

研究报告

芽孢杆菌 DU-106 裂解物对 2,4-二硝基氟苯诱导的特应性皮炎小鼠的治疗作用

赵文俊, 张余威, 李伟杰, 赵超凡, 李彦力, 杜冰, 黎攀*

华南农业大学食品学院, 广东 广州 510642

赵文俊, 张余威, 李伟杰, 赵超凡, 李彦力, 杜冰, 黎攀. 芽孢杆菌 DU-106 裂解物对 2,4-二硝基氟苯诱导的特应性皮炎小鼠的治疗作用[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 2970-2982.

ZHAO Wenjun, ZHANG Yuwei, LI Weijie, ZHAO Chaofan, LI Yanli, DU Bing, LI Pan. Therapeutic effect of *Bacillus* sp. DU-106 lysate on 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis in mice[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 2970-2982.

摘要: 【背景】本团队前期研究发现芽孢杆菌 DU-106 具有良好的健康益处, 但都是基于活菌的研究, 对灭活菌的研究尚未开展。【目的】探究芽孢杆菌 DU-106 裂解物对特应性皮炎的治疗效果及作用机制。【方法】以 2,4-二硝基氟苯诱导的特应性皮炎 BALB/c 小鼠为模型, 通过病理学观察、免疫组化等手段研究其治疗效果, 并测定 NF- κ B 通路中基因与蛋白表达量, 揭示其内在机制。【结果】芽孢杆菌 DU-106 裂解物有效缓解了特应性皮炎小鼠的病理学特征, 减轻了肥大细胞的浸润, 降低了免疫球蛋白 E、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和干扰素- γ 的含量($P<0.05$)。芽孢杆菌 DU-106 裂解物可能是通过抑制 NF- κ B 信号通路中 TNF- α 、IKK α 和 NF- κ B 基因表达水平和蛋白磷酸化而实现抗特应性皮炎效果。【结论】芽孢杆菌 DU-106 裂解物可作为一种后生元, 对特应性皮炎具有积极的治疗作用。

关键词: 芽孢杆菌 DU-106; 特应性皮炎; 抗炎; 免疫组化

Therapeutic effect of *Bacillus* sp. DU-106 lysate on 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis in mice

ZHAO Wenjun, ZHANG Yuwei, LI Weijie, ZHAO Chaofan, LI Yanli, DU Bing, LI Pan*

College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

Abstract: [Background] Our research team have discovered that *Bacillus* sp. DU-106 has good

资助项目: 广东省重点领域研发计划(2020B020226008); 国家现代农业产业技术体系(CARS-21)

This work was supported by the Key-area Research and Development Program of Guangdong Province (2020B020226008) and the China Agriculture Research System (CARS-21).

*Corresponding author. E-mail: lp19900815@scau.edu.cn

Received: 2023-02-20; Accepted: 2023-03-22; Published online: 2023-04-11

health benefits in previous studies. However, the conclusion is based on the studies of living bacteria and the studies of inactivated bacteria remain to be carried out. **[Objective]** To investigate the effect and mechanism of *Bacillus* sp. DU-106 lysate in the treatment of atopic dermatitis. **[Methods]** Pathological observation and immunohistochemistry were employed to study the therapeutic effect of *Bacillus* sp. DU-106 lysate on the mouse model of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis. The expression levels of the proteins involved in the nuclear factor kappa-B (NF- κ B) signaling pathway were determined to reveal the mechanism. **[Results]** *Bacillus* sp. DU-106 lysate alleviated the pathological changes, reduced the infiltration of mast cells, and lowered the levels of immunoglobulin E, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interferon- γ ($P < 0.05$) in the model mice. Furthermore, *Bacillus* sp. DU-106 lysate down-regulated the expression levels and inhibited the phosphorylation of TNF- α , inhibitory kappa B kinase α (IKK α), and NF- κ B in the NF- κ B signaling pathway in the model mice. **[Conclusion]** *Bacillus* sp. DU-106 lysate can be used as a probiotic with therapeutic effects on atopic dermatitis.

Keywords: *Bacillus* sp. DU-106; atopic dermatitis; anti-inflammatory; immunohistochemistry

特应性皮炎是(atopic dermatitis, AD)一种慢性炎症性皮肤病,常伴有复发性瘙痒、红肿、化脓等临床症状。随着工业化的发展,AD的患病率增加了 1–2 倍,目前有 15%–30%儿童和 2%–10%成人受该病影响^[1–3]。AD 的发病机制与遗传因素、环境影响、免疫失衡和炎症反应有关,其中以炎症和 Th1/Th2 失衡最为关键^[3–4]。抗原刺激诱导 CD4⁺ T 细胞分化为 Th1 细胞,进而分泌大量的促炎因子,如 IL-2、TNF- α 、IFN- γ 。促炎因子通过与细胞表面受体结合,促进 IKKs 复合体磷酸化,释放 IKK α 并进一步磷酸化下游 I κ Bs 复合体;当 I κ Bs 复合体被磷酸化后, NF- κ B-P50 蛋白转运至细胞核,从而激活 NF- κ B 通路^[5]。目前治疗 AD 大多采用抗炎药、抗组胺药和免疫抑制剂治疗,但这些药物长期服用存在着一定的健康危害和经济负担^[6]。因此,不少学者试图寻找一种安全健康且具有良好抗炎和抗过敏的药物。

大量研究证明,益生菌具有多种健康功效^[7–8],但益生菌的生物安全性和稳定性尚存在一些问题^[9],特别是对于婴儿和老年人^[10]。灭活益生

菌(后生元)是一种来源于益生菌且具有促进健康作用的细菌成分^[11]。与活的益生菌相比,其不仅具有与活菌相似甚至更好的健康效应,还有安全性高、稳定性好、保质期长和成本低等优势,因此近年来后生元的研究备受瞩目^[12]。有研究表明,热休克植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)细胞裂解物比完整的细胞在免疫调节方面具有更显著的效果^[13]。目前,AD 药物的挖掘大多是中药组方^[14]、槲皮素^[15]等,很少报道关于微生物疗法对 AD 的作用。另外,大量研究表明,后生元具有抗 LPS 诱导的细胞炎症^[16]、抗食物过敏性炎症^[17]、伤口炎症^[18]等功效,但后生元对 AD 的治疗效果鲜有报道。有临床试验表明,使用含 10%益生菌提取物面霜的 AD 志愿者在使用 29 d 后皮肤干燥程度和 AD 临床症状得到显著改善^[19]。另外,婴幼儿口服细菌裂解液可降低 AD 的患病率^[20]。

芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) DU-106 是本团队前期从酸奶中分离、具有多重健康功效的益生菌^[21–22],具有降血脂^[23]、免疫调节^[7]和抗腹泻^[22]等健康效应。前期研究还发现芽孢杆菌 DU-106

裂解物(*Bacillus* sp. DU-106 lysate, BL)具有良好的抗氧化和抗衰老效果^[24],但尚无关于 BL 对 AD 的报道。鉴于此,本研究拟以 2,4-二硝基氟苯(2,4-dinitrofluorobenzene, DNFB)诱导的 AD 小鼠为模型,探讨 BL 对 AD 的治疗作用及可能的机制,研究结果可为 BL 的应用和开发提供理论依据,同时有望拓宽 AD 的治疗途径,以寻求更安全高效、更经济实惠的治疗方案。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、主要试剂和仪器

芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) DU-106 保藏于华南农业大学新资源食品及功能性原料评价中心;DNFB (Sigma 公司)与基质(丙酮:橄榄油体积比为 4:1)配成 0.25%的 DNFB 溶液,常温避光保存;免疫球蛋白 E (immunoglobulin E, IgE)、组胺(histamine, HIS)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-4 (interleukin-4, IL-4)、胸腺基质淋巴生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)和干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)的酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所,其他所用试剂均为分析纯。

生化培养箱,上海博迅实业有限公司;酶标仪和荧光定量 RCP 仪,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;微量高速冷冻离心机,广州吉迪仪器有限公司;电泳仪,北京六一生物科技有限公司;化学发光成像系统,上海勤翔科学仪器有限公司。

1.1.2 动物

七周龄的雄性无特定病原体(SPF)的 BALB/c 小鼠购自南方医科大学实验动物中心,在华南

农业大学实验动物中心饲养。小鼠饲养于屏障环境中,温度 23 °C,相对湿度 55%,12 h 明暗交替,允许小鼠自由摄取和饮水。所有动物试验程序由华南农业大学实验动物伦理委员会批准[许可证号:SYXK (Yue) 2014-0136]。

1.2 方法

1.2.1 样品准备

挑取 LB 平板中的芽孢杆菌 DU-106 单菌落接种于 300 mL 的 LB 肉汤培养基中培养 24–36 h,取适量培养液用分光光度计测定 OD_{600} 值,当 OD_{600} 为 0.9 ± 0.1 时,菌体浓度达到 1.0×10^9 CFU/mL。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、6 000 r/min 离心 20 min 得到芽孢杆菌 DU-106 菌泥。用无菌蒸馏水反复冲洗 2–3 次。最后一次离心得到菌体时,用 5 mL 无菌蒸馏水重悬芽孢杆菌 DU-106 菌泥,此时菌体浓度为 6.0×10^{10} CFU/mL。将重悬的菌体于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 30 min,最后用细胞破碎仪(功率 400 W,总时间 30 min,间隔 10 s)破碎试验样品。

1.2.2 动物分组与给药

适应性饲养 7 d 后,将所有小鼠随机分为 4 组($n=10$),分别为正常组(NC)、模型组(MC)、阳性对照组(PC)和芽孢杆菌 DU-106 裂解物组(BL)。试验第 0 天用电推剪进行小鼠背部剃毛,露出约 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 大小的皮肤。参照前人的研究方法^[25]稍作修改。造模期从第 1 天开始,除正常组外,MC 组、PC 组和 BL 组小鼠以 $100\text{ }\mu\text{L}$ 0.25%的 DNFB 涂抹小鼠背部暴露的皮肤,之后每隔 2 d 涂抹一次,持续到第 28 天,共 9 次,正常组用基质替代。

治疗期从第 14 天开始,每天给各组小鼠背部暴露皮肤涂抹相应药物各 $100\text{ }\mu\text{L}$,正常组和模型组小鼠涂抹蒸馏水,阳性对照组小鼠涂抹地塞米松乳膏,BL 组小鼠涂抹芽孢杆菌 DU-106 裂解物,持续到第 28 天。试验结束后,麻醉小鼠并取血液和皮肤组织备用。

1.2.3 酶联免疫吸附法(ELISA)检测相关指标

从眼眶静脉丛采血所得的血液于 4 °C 静置 6 h 后, 4 °C、3 500 r/min 离心 20 min 得到上清, 即为血清。按照 IgE、TSLP 和 HIS 的试剂盒说明测定血清中 IgE、TSLP 和 HIS 含量。在冰浴中用 0.9% 的 NaCl 溶液将皮肤组织匀浆。将匀浆在 4 °C、4 000 r/min 离心 20 min, 根据 IL-4、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 的试剂盒说明测定小鼠皮肤匀浆中 IL-4、TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 的含量。

1.2.4 组织病理学观察

所得小鼠皮肤组织于 10% 中性福尔马林固定 48 h, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 然后进行石蜡包埋, 切成 5 μ m 厚的切片, 用苏木精&伊红(H&E)和 0.5% 甲苯胺蓝(TB)进行染色。在显微镜下观察皮肤组织特征。

1.2.5 免疫组化和免疫荧光分析

切片 60 °C 烘烤 12 h, 将切片依次置于二甲苯 I-III 号中 20 min, 再依次放入梯度乙醇(100%、95%、85% 和 75%) 中放置 5 min, 蒸馏水浸洗 5 min。将切片置于 EDTA 缓冲液(pH 9.0)煮沸 20 min, 再冷却至室温, 再用 0.01 mol/L PBS (pH 7.2-7.6) 冲洗 3 次, 每次 3 min, 以修复抗原。

1) 免疫组化

切片加入 1% 高碘酸, 室温反应 10 min 以灭活内源性酶。PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min。再加入适量的一抗[IL-1 β 、IFN- γ 、TSLP 和胸腺源激活调节趋化因子(thymus and activation-regulated chemokine, TARC)]反应, 4 °C 过夜, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min; 随后加入二抗, 37 °C 反应 30 min。加入显色剂 DAB 工作液孵育 1 min, 随后加入苏木精复染 5 min, PBS 冲洗反蓝, 乙醇梯度脱水, 用二甲苯进行透明化, 中性树脂胶封片, 显微镜观察染色结果。

2) 免疫荧光

切片置于硼氢化钠溶液中室温 30 min, 自来水冲洗 5 min; 再置于 75% 乙醇溶液中浸泡 1 min, 置于苏丹黑染液中室温 15 min, 自来水冲洗 5 min, 5% BSA 封闭 60 min。再加入适量的一抗反应, 4 °C 过夜, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min; 随后加入二抗, 37 °C 反应 30 min。加入 DAPI 工作液 37 °C 染核 15 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min。缓冲甘油封片, 荧光显微镜下观察。

1.2.6 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析

用 Trizol 试剂提取小鼠皮肤组织中总 RNA 并测定其浓度。将 RNA 模板逆转录成互补 DNA (cDNA) 模板, 然后在 95 °C 变性 10 min, 然后对变性的 cDNA 模板进行扩增, 以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参进行相对定量。PCR 反应体系(30 μ L): 2 \times SYBG Green PCR Master Mix 15 μ L, 引物 F 和 R (10 μ mol/L) 各 1 μ L, cDNA 模板 2 μ L, ddH₂O 11 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。引物设计使用 Primer 5 软件进行, 引物序列见表 1。

1.2.7 蛋白质印迹(Western blotting)分析

用 RIPA 裂解液提取小鼠背部皮肤的总蛋白, 然后在 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 去除沉淀, 用 BCA 蛋白测定试剂盒测定上清液的

表 1 RT-qPCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR

Name	Sequence (5'→3')	Fragment size (bp)
β -actin	F: ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	223
	R: TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	
NF- κ B	F: TAGCCAGCGAATCCAGACCAACA	115
	R: TGGGTCCCGCACTGTACACCT	
IKK α	F: CCAGCCTCCTTGTTGTTGCTC	127
	R: AAGGCACAAAAGTCCAACCC	
TNF- α	F: AGCACAGAAAGCATGATCCG	162
	R: CACCCCGAAGTTCAGTAGACA	

蛋白浓度。用 TEMED 凝胶进行电泳分离蛋白, 然后转移到 NC 膜上。随后将膜与包括 p-NF- κ B 在内的一抗在 4 °C 孵育过夜, 再将膜与 HRP 标记的二抗在室温孵育 90 min。二抗孵化后, 用适量的 ELC 化学发光液孵育 1 min, 通过凝胶成像系统成像。

1.3 数据处理与分析

所有试验数据均以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。数据由 SPSS 21.0 软件进行分析。用单因素方差分析(ANOVA)与 Tukey 事后检验法进行组间比较。当 $P < 0.05$ 时具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 BL 对 AD 小鼠皮肤组织病理状况的影响

试验结束后, 对各组小鼠背部暴露皮肤进

行评估, 如图 1A 所示, NC 组小鼠皮肤正常, 无明显抓痕, 而 DNFB 处理后的小鼠背部皮肤有明显的红肿, 结痂、干燥和抓痕等情况。对比结果从宏观上证实 BL 减轻了 AD 小鼠病理特征。通过苏木精&伊红(H&E)染色分析小鼠皮肤厚度和炎症细胞浸润情况, 结果如图 1B 所示, 相较于 NC 组, DNFB 处理后小鼠皮肤厚度明显增加, 炎症细胞浸润明显, 但经 BL 处理后炎症细胞浸润程度和皮肤厚度明显下降。通过甲苯胺蓝染色对比各组小鼠肥大细胞浸润情况, 图 1C 结果表明, DNFB 处理后肥大细胞数量明显增加, 相较于 MC 组, BL 组小鼠皮肤肥大细胞明显下降。图 1D 为各组小鼠最终体重, MC 组体重显著低于 NC 组($P < 0.01$), 而 BL 组治疗后得到恢复($P < 0.01$)。

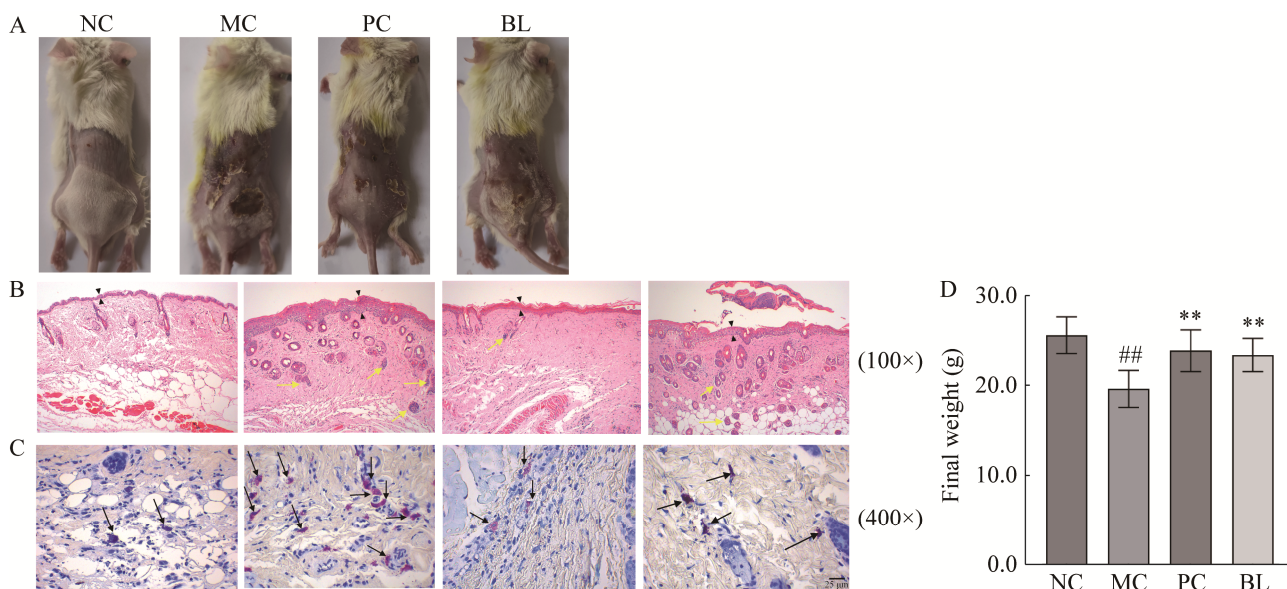


图 1 BL 对 AD 小鼠皮肤病理特征影响 A: 各组小鼠皮肤损伤情况. B: 苏木精&伊红(H&E)染色的病理图, 放大倍数 100 \times , 比例尺 100 μ m, 黑色箭头之间表示表皮厚度, 黄色箭头代表炎症细胞浸润. C: 苯甲胺蓝的病理图. 放大倍数 400 \times , 比例尺 25 μ m; 黑色箭头指示肥大细胞阳性染色. D: 小鼠最终体重, 其中与 NC 组相比, ##: $P < 0.01$; 与 MC 组相比, **: $P < 0.01$

Figure 1 Effect of BL on skin pathological characteristics of AD mice. A: Skin lesions of mice in each group. B: Pathogram of hematoxylin & eosin (H&E) staining. Magnification 100 \times , scale bar 100 μ m, black arrows between indicate epidermal thickness, and yellow arrows indicate inflammatory cell infiltration. C: Pathogram of benzylamine blue. Magnification 400 \times , scale bar 25 μ m; Black arrow indicates positive staining for mast cells. D: The final weight in mice, ##: $P < 0.01$ vs. NC group; **: $P < 0.01$ vs. MC group.

2.2 BL 对 AD 小鼠血清 IgE、TSLP 和 HIS 的影响

IgE 常用于临床诊断 AD, IgE 识别过敏原而激活肥大细胞释放组胺和其他因子, 进而导致皮肤干燥、瘙痒^[26]。如图 2 所示, 通过测定小鼠血清中 IgE、HIS 和 TSLP 的水平可知, DNFB 处理后, MC 组小鼠血清各项指标显著高于 NC 组($P<0.01$), 说明 AD 小鼠模型造模效果良好。相较于 MC 组, PC 组和 BL 组小鼠血清指标显著下降($P<0.01$)。研究表明^[27], 植物乳杆菌(*L. plantarum*)裂解物降低了 AD 小鼠的皮肤厚度和 IgE 水平, 与本研究结果一致。

2.3 BL 对 AD 小鼠皮肤炎症因子的影响

AD 属于慢性炎症性疾病, 在由 IgE 介导的过敏反应中, 过敏原被抗原识别并呈递给 $CD4^+$ T 细胞, 进一步分化为 Th2 细胞, 并分泌如 IL-4、IL-5 等炎症因子^[17,28]。通过测定小鼠皮损组织中炎症因子水平, 结果表明, 与 NC 组相比, MC 组小鼠各项炎症因子指标均显著升高($P<0.01$), 说明 DNFB 诱导的 AD 模型小鼠发生了炎症反应。相较而言, BL 组的炎症因子水平得到显著改善($P<0.01$), 说明 BL 确实具有抗

炎效果(图 3)。相关研究证明^[16], 植物乳杆菌裂解物 K8 (*L. plantarum* K8)通过降低 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平而实现益生菌裂解物的抗炎效果。另外, 植物乳杆菌(*L. plantarum*)裂解物同样降低了 IL-4 的水平, 并呈现浓度依赖性, 但能够提高 IFN- γ 的水平, 研究者认为是 Th1 极化抑制了 IL-4 的分泌^[27]。

2.4 BL 对 AD 小鼠的免疫组化和免疫荧光结果分析

炎症细胞浸润皮肤病变是 AD 常见的表现, 皮损组织中 T 淋巴细胞通过影响其他免疫细胞促进炎症反应^[29]。因此, 本文研究了 BL 处理是否可以减轻炎症细胞浸润和炎症因子的水平(图 4)。统计结果表明(图 5), 与 NC 组相比, MC 组 IL-1 β 、TSLP、TARC 和 IFN- γ 的相对含量显著升高($P<0.01$), 而经 BL 处理后 IL-1 β 、TSLP 和 IFN- γ 的相对含量显著下降($P<0.01$), 但对 TARC 的水平抑制效果不显著($P>0.05$)。图 4E 和图 5E 中, 红色代表 $CD4^+$ T 细胞阳性染色结果, DNFB 刺激后, $CD4^+$ T 细胞密度显著增加($P<0.05$), 而 BL 处理后得到改善($P<0.05$)。

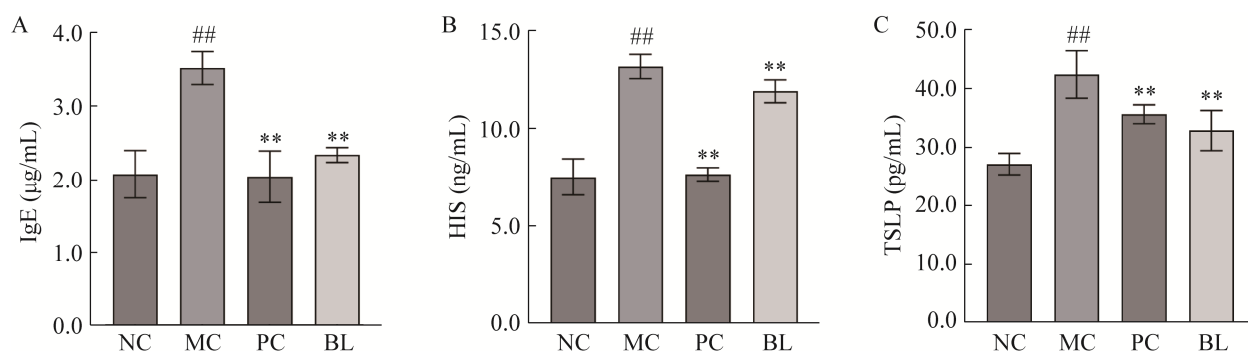


图 2 BL 对各组小鼠血清指标的影响 A: 血清免疫球蛋白 E 水平(IgE). B: 血清组胺水平(HIS). C: 胸腺基质淋巴生成素(TSLP). 结果以平均值 \pm 标准差($n=10$)表示, 其中与 NC 组相比, #: $P<0.01$; 与 MC 组相比, **: $P<0.01$

Figure 2 Effect of BL on serum indexes in each group of mice. A: Serum immunoglobulin E level (IgE). B: Serum histamine level (HIS). C: Thymic stromal lymphopoietin (TSLP). The results are expressed as mean \pm SD ($n=10$), where #: $P<0.01$ vs. NC group; **: $P<0.01$ vs. MC group.

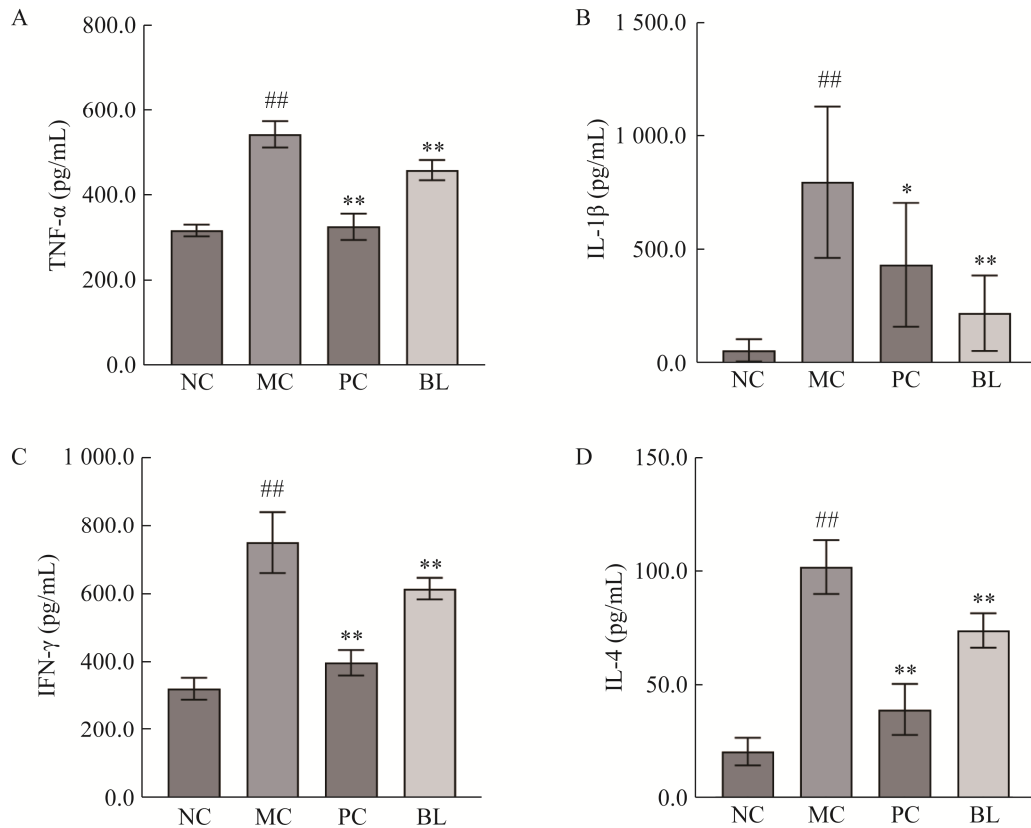


图 3 BL 对 AD 小鼠皮损组织炎症因子的影响 A: 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平. B: 白介素-1 β (IL-1 β)的水平. C: 干扰素- γ (IFN- γ)的水平. D: 白介素-4 (IL-4)的水平. 结果以平均值 \pm 标准差($n=10$)表示, 其中与 NC 组相比, ##: $P<0.01$; 与 MC 组相比, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$

Figure 3 Effect of BL on inflammatory factors in skin lesion tissues of AD mice. A: Levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α). B: Levels of interleukin-1 β (IL-1 β). C: Levels of interferon- γ (IFN- γ). D: Levels of interleukin-4 (IL-4). The results are expressed as mean \pm SD ($n=10$), where ##: $P<0.01$ vs. NC group; *: $P<0.05$ vs. MC group, **: $P<0.01$ vs. MC group.

2.5 BL 对 AD 小鼠相关 mRNA 表达量的影响

从上述结果可知, BL 改善了 AD 小鼠皮炎症状和病理特征, 降低了炎症因子的表达量。为进一步研究 BL 抗 AD 机制, 通过 RT-qPCR 测定 TNF- α 、IKK α 、I κ B α 和 NF- κ B 的 mRNA 相对表达量。图 6 结果表明, 与 NC 组相比, MC 组小鼠 TNF- α 、IKK α 和 NF- κ B 的 mRNA 表达量显著增加($P<0.01$), 但在 PC 与 BL 组中, 与 MC 组相比, TNF- α 、IKK α 和 NF- κ B 的 mRNA

表达量得到显著改善($P<0.01$)。综上所述, DNFB 诱导的 AD 的发病机制可能与 NF- κ B 通路中相关因子的 mRNA 表达有关, 而 BL 的抗 AD 效果可能是抑制 NF- κ B 通路相关 mRNA 表达。

2.6 BL 对 AD 小鼠相关蛋白表达的影响

为了进一步揭示 BL 的抗 AD 机制, 通过蛋白质印迹法(Western blotting)测定 TNF- α 、磷酸化 I κ B α (p-I κ B α)、磷酸化 IKK α (p-IKK α)和磷酸化 NF- κ B (p-NF- κ B)的蛋白表达量。图 7 结果表

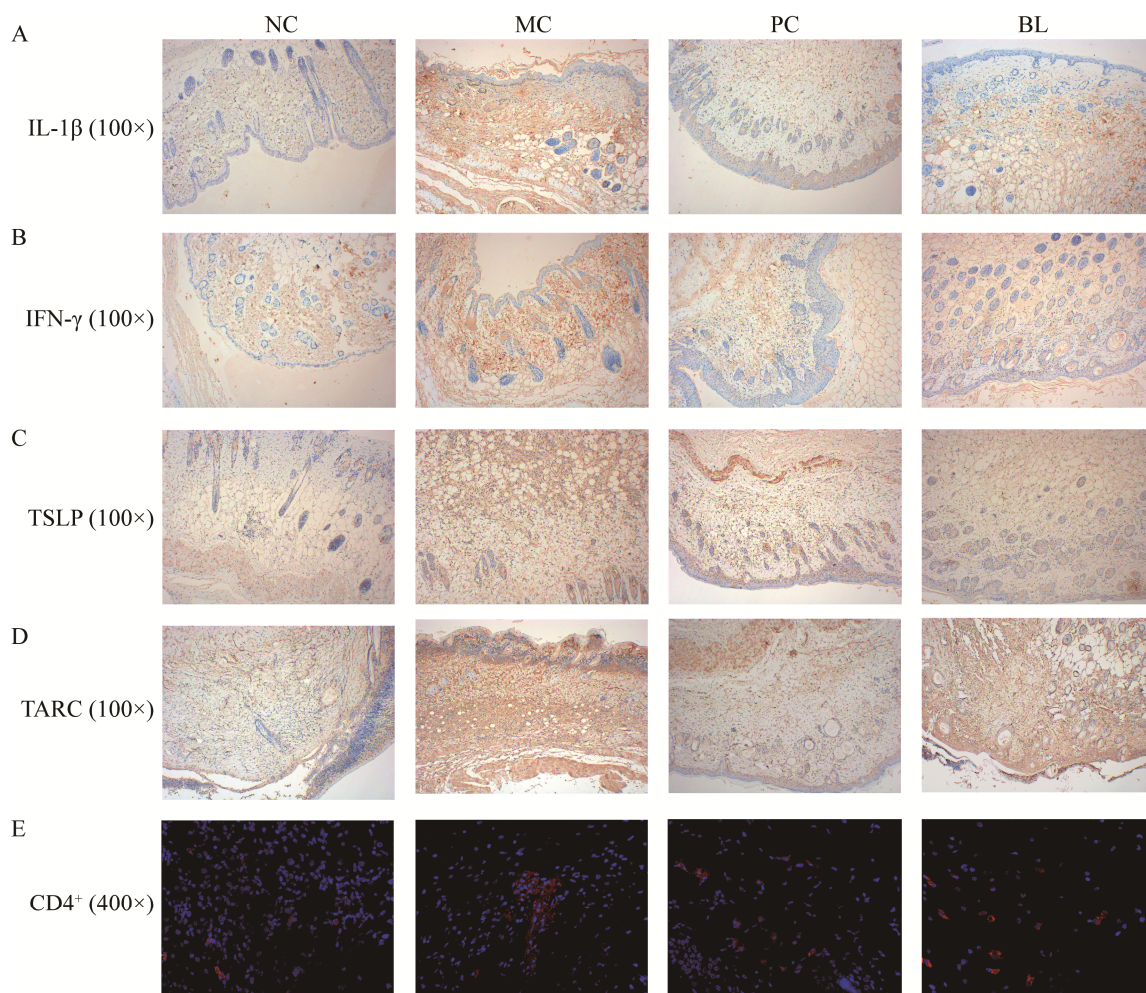


图 4 BL 对 AD 小鼠皮损组织中相关因子表达量的影响 A: 白介素-1 β (IL-1 β) 的表达水平. B: 干扰素- γ (IFN- γ) 的表达水平. C: 胸腺基质淋巴生成素 (TSLP) 的表达水平. D: 胸腺源激活调节趋化因子 (TARC) 的表达水平. E: CD4⁺ T 细胞的荧光密度. A–D: 放大倍数 100 \times , 比例尺 100 μ m, 阳性染色为褐色至棕褐色; E: 放大倍数 400 \times , 比例尺 25 μ m, 阳性染色为红色

Figure 4 Effect of BL on the expression of related factors in skin lesion tissues of AD mice. A: Expression level of interleukin-1 β (IL-1 β). B: Expression level of interferon- γ (IFN- γ). C: Expression level of thymic stromal lymphopoietin (TSLP). D: Expression level of thymus-derived activating regulatory chemokine (TARC). E: Fluorescence density of CD4⁺ T cells. A–D: Magnification 100 \times , scale bar 100 μ m, positive staining is brown to tan; E: Magnification 400 \times , scale bar 25 μ m, positive stain is red.

明, 相较于 NC 组, MC 组中 TNF- α 、p-I κ B α 、p-IKK α 和 p-NF- κ B 蛋白的相对表达量显著提高 ($P < 0.01$), 而与模型组相比, BL 组中各蛋白显著降低 ($P < 0.01$), 表明 BL 抑制了 TNF- α 、p-I κ B α 、p-IKK α 和 p-NF- κ B 蛋白的表达, 从而

有利于 AD 的缓解。研究表明 AD 的发病机制与 NF- κ B 信号通路的激活有关^[30], 如前人利用清血解毒方治疗后, 降低了 AD 小鼠 p-I κ B α 蛋白表达, 抑制 NF- κ B 信号通路而达到抗 AD 的效果^[14], 这与本研究的结果相似。

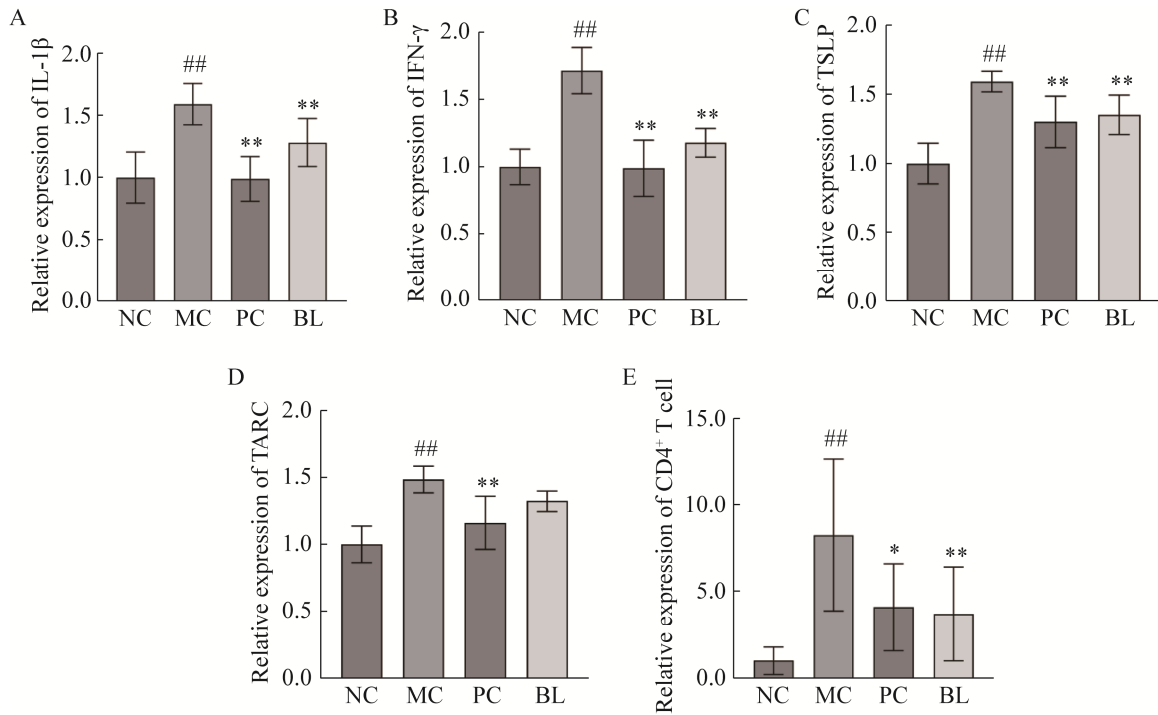


图5 BL处理对小鼠皮损组织的免疫组化和免疫荧光分析 使用Image J软件对免疫组化和免疫荧光的结果进行数据统计. 结果以平均值 \pm 标准差($n=10$)表示. 与NC组相比, ^{##}: $P<0.01$; 与MC组相比, ^{*}: $P<0.05$, ^{**}: $P<0.01$

Figure 5 Immunohistochemical and immunofluorescence analysis of mice skin lesion tissue by BL treatment. Data were statistically analyzed for immunohistochemical and immunofluorescence results using Image J software. The results are expressed as mean \pm SD ($n=10$), where ^{##}: $P<0.01$ vs. NC group; ^{*}: $P<0.05$ vs. MC group, ^{**}: $P<0.01$ vs. MC group.

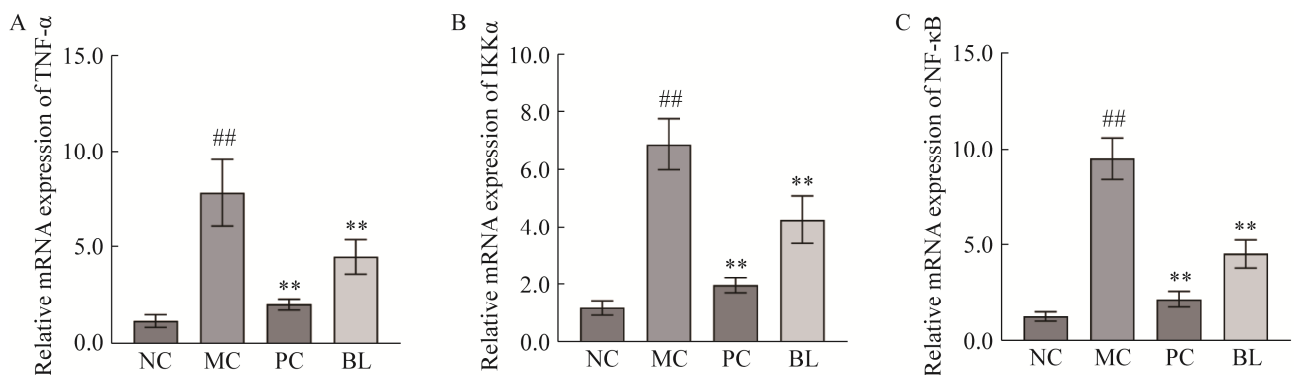


图6 BL对AD小鼠相关mRNA表达量的影响 A: TNF- α 的mRNA表达量. B: IKK α 的mRNA表达量. C: NF- κ B的mRNA表达量. 结果以平均值 \pm 标准差($n=10$)表示, 其中与NC组相比, ^{##}: $P<0.01$; 与MC组相比, ^{**}: $P<0.01$

Figure 6 Effect of BL on mRNA expression related to AD mice. A: mRNA expression of TNF- α . B: mRNA expression of IKK α . C: mRNA expression of NF- κ B. The results are expressed as mean \pm SD ($n=10$), where ^{##}: $P<0.01$ vs. NC group; ^{**}: $P<0.01$ vs. MC group.

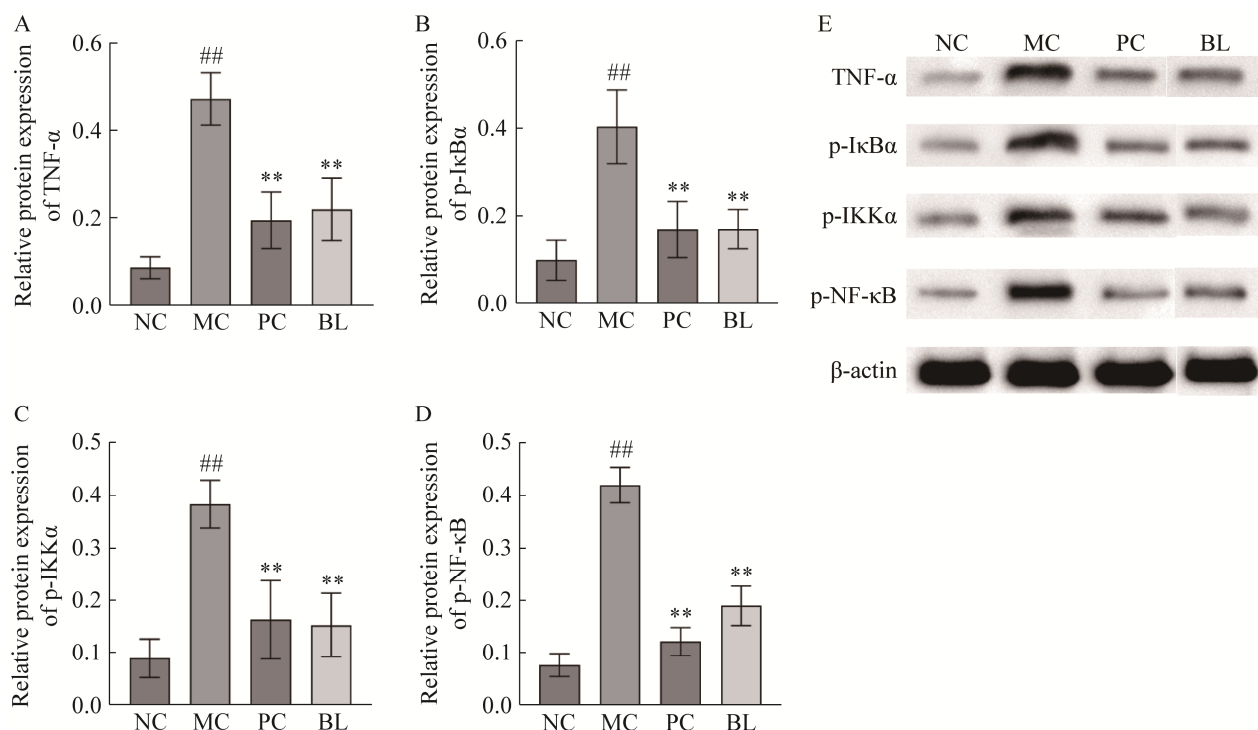


图 7 BL 对 AD 小鼠相关蛋白表达的影响 A: TNF- α 的蛋白表达量. B: p-I κ B α 的蛋白表达量. C: p-IKK α 的蛋白表达量. D: p-NF- κ B 的蛋白表达量. E: 蛋白质印迹条带图, 以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参, 结果以平均值 \pm 标准差($n=10$)表示, 其中与 NC 组相比, ##: $P<0.01$; 与 MC 组相比, **: $P<0.01$

Figure 7 Effect of BL on protein expression related to AD mice. A: Protein expression of TNF- α . B: Protein expression of p-I κ B α . C: Protein expression of p-IKK α . D: Protein expression of p-NF- κ B. E: Protein blot strip plot with β -actin as internal reference, results are presented as mean \pm SD ($n=10$), where ##: $P<0.01$ vs. NC group; **: $P<0.01$ vs. MC group.

3 讨论

本研究评估了芽孢杆菌 DU-106 裂解物对 DNFB 诱导的特应性皮炎小鼠的治疗作用。AD 是一种常见的慢性病, 其发病机制复杂, 涉及免疫调节^[31]、炎症反应^[3]和氧化应激^[32]等。AD 患者通常表皮厚度增加, 肥大细胞浸润。肥大细胞的增加有助于 AD 的发展, 当肥大细胞被免疫激活后, 进而释放包括 TSLP 在内的细胞因子, 当 TSLP 与树突状细胞结合后可促进 CD4⁺ T 细胞向 Th2 细胞分化, 加剧炎症反应, 进一步地, 当 NF- κ B 介导的炎症反应被促炎因子激活后, 表皮朗格汉斯细胞(Langerhans)会分

泌大量的 IL-1 β , 进而促进角质形成细胞分泌 IL-4 和 TNF- α 等促炎介质^[33]。随着疾病的发展和促炎介质的积累, Th2 反应转变为 Th1 反应, 进而分泌大量的 Th1 因子如 TNF- α 、IFN- γ ^[34-36], 因此维持 Th1/Th2 平衡对 AD 的发展至关重要。本研究结果表明, BL 降低了 AD 小鼠的皮肤厚度, 减轻肥大细胞浸润, 血清指标检测结果表明, BL 降低了 IgE、HIS 和 TSLP 的水平, 从而缓解了 AD 的瘙痒、炎症症状; 免疫组化结果表明 BL 减轻了炎症介质的积累, 抑制 CD4⁺ T 细胞成熟。进一步地, 通过 RT-qPCR 和 Western blotting 检测 NF- κ B 通路中 IKK α 、NF- κ B 和

TNF- α 的基因与蛋白表达量, 结果表明 BL 可能是通过抑制 NF- κ B 炎症信号通路的 IKK α 、NF- κ B、TNF- α 的 mRNA 表达及 I κ B α 、IKK α 、NF- κ B、TNF- α 蛋白质磷酸化而实现抗 AD 效果。

已有大量研究表明益生菌副产物具有抗炎^[13]、抗菌和免疫调节^[37]的作用。本研究使用了益生菌芽孢杆菌 DU-106 的灭活混合物, 证实它具有抗 AD 的作用, 但是尚未证实其具体的有效成分, 这也是接下来本研究的工作重点。后生元(包括裂解物、热灭活菌、全细胞培养液等)由于体内外消化条件的稳定性缺乏系统的研究, 无法通过与配体的相互作用了解其具体机制^[38], 且后生元化合物较为复杂, 包括酶、分泌蛋白、多肽、有机酸、表面活性剂、多糖、肽聚糖、脂磷酸、磷壁酸等物质。相关研究表明, 鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*) GG 裂解物的抗炎作用与肽聚糖等细胞成分有关^[39], 另有研究证实肽聚糖与免疫调节^[40]和抗肿瘤^[41]有关。另一项研究中, 从植物乳杆菌(*L. plantarum*) K8 中提取的脂磷酸(lipoteichoic)可抑制 HaCaT 细胞中 TNF- α 或 IFN- γ 介导的补体 C3 mRNA 和蛋白的表达, 揭示脂磷酸可能参与 AD 的抗病机制^[42]。因此, 关于芽孢杆菌 DU-106 裂解物的抗 AD 机制, 接下来的研究将更加注重对肽聚糖和脂磷酸的分离并验证其抗 AD 作用。

4 结论

本研究证实芽孢杆菌 DU-106 裂解物降低了特应性皮炎小鼠皮损组织中肥大细胞的浸润, 降低血清中 IgE 和 HIS 的水平以减缓瘙痒等症状。此外, 芽孢杆菌 DU-106 裂解物抑制 TNF- α 、IL-1 β 和 IFN- γ 等促炎介质产生, 并通过调节 NF- κ B 信号通路中 IKK α 、NF- κ B 和 TNF- α 等蛋白表达水平而实现抗 AD 的效果。本研究结果有利于开发功能性的益生菌制剂,

扩大益生菌的应用价值, 同时为治疗 AD 提供理论基础。

REFERENCES

- [1] WEIDINGER S, NOVAK N. Atopic dermatitis[J]. The Lancet, 2016, 387(10023): 1109-1122.
- [2] STÄNDER S. Atopic dermatitis[J]. The New England Journal of Medicine, 2021, 384(12): 1136-1143.
- [3] CHO K, KANG MC, PARVEEN A, YUMNAM S, KIM SY. Anti-inflammatory effect of chloroform fraction of *Pyrus ussuriensis* maxim. leaf extract on 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in nc/nga mice[J]. Nutrients, 2019, 11(2): 276.
- [4] MANDLIK DS, MANDLIK SK. Atopic dermatitis: new insight into the etiology, pathogenesis, diagnosis and novel treatment strategies[J]. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2021, 43(2): 105-125.
- [5] OECKINGHAUS A, HAYDEN MS, GHOSH S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways[J]. Nature Immunology, 2011, 12(8): 695-708.
- [6] DATTOLA A, BENNARDO L, SILVESTRI M, NISTICÒ SP. What's new in the treatment of atopic dermatitis?[J]. Dermatologic Therapy, 2019, 32(2): e12787.
- [7] LAI YJ, CHEN SM, LUO PH, LI P, DU B. Dietary supplementation of *Bacillus* sp. DU106 activates innate immunity and regulates intestinal microbiota in mice[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 75: 104247.
- [8] SANDERS ME, MERENSTEIN D, MERRIFIELD CA, HUTKINS R. Probiotics for human use[J]. Nutrition Bulletin, 2018, 43(3): 212-225.
- [9] MAEHATA H, ARAI S, IWABUCHI N, ABE F. Immuno-modulation by heat-killed *Lactocaseibacillus paracasei* MCC1849 and its application to food products[J]. International Journal of Immunopathology and Pharmacology, 2021, 35: 20587384211008291.
- [10] TAVERNITI V, GUGLIELMETTI S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept)[J]. Genes & Nutrition, 2011, 6(3): 261-274.
- [11] PIQUÉ N, BERLANGA M, MIÑANA-GALBIS D. Health benefits of heat-killed (tyndallized) probiotics: an overview[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(10): 2534.
- [12] AKTER S, PARK JH, JUNG HK. Potential health-promoting benefits of paraprobiotics, inactivated

- probiotic cells[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 30(4): 477-481.
- [13] SANAEI M, MAHDAVI M, SETAYESH N, SHAHVERDI AR, SEPEHRIZADEH Z, YAZDI MH. Comparison of cytokine expression in human PBMCs stimulated with normal and heat-shocked *Lactobacillus plantarum* cell lysate[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2021, 13(6): 1539-1545.
- [14] XIONG X, HUANG CQ, WANG FQ, DONG JL, ZHANG D, JIANG J, FENG Y, WU B, XIE TT, CHENG L. Qingxue Jiedu formulation ameliorated DNFB-induced atopic dermatitis by inhibiting STAT3/MAPK/NF- κ B signaling pathways[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2021, 270: 113773.
- [15] KARUPPAGOUNDER V, ARUMUGAM S, THANDAVARAYAN RA, SREEDHAR R, GIRIDHARAN VV, WATANABE K. Molecular targets of quercetin with anti-inflammatory properties in atopic dermatitis[J]. *Drug Discovery Today*, 2016, 21(4): 632-639.
- [16] KIM G, CHOI KH, KIM H, CHUNG DK. Alleviation of LPS-induced inflammation and septic shock by *Lactiplantibacillus plantarum* K8 lysates[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(11): 5921.
- [17] ENOKIDA M, MINATO K, YOSHINO S, OHTO N, KUWAHARA H, MIZUNO M. Oral administration of *Lactiplantibacillus plantarum* 22A-3 exerts anti-allergic activity against intestinal food allergy mouse models sensitized and challenged with ovalbumin[J]. *Food Bioscience*, 2022, 47: 101785.
- [18] BRANDI J, CHERI S, MANFREDI M, DI CARLO C, VITA VANELLA V, FEDERICI F, BOMBIERO E, BAZAJ A, RIZZI E, MANNA L, CORNAGLIA G, MARINI U, TERESA VALENTI M, MARENGO E, CECCONI D. Exploring the wound healing, anti-inflammatory, anti-pathogenic and proteomic effects of lactic acid bacteria on keratinocytes[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 11572.
- [19] GUÉNICHE A, BASTIEN P, OVIGNE JM, KERMICI M, COURCHAY G, CHEVALIER V, BRETON L, CASTIEL-HIGOUNENC I. *Bifidobacterium longum* lysate, a new ingredient for reactive skin[J]. *Experimental Dermatology*, 2010, 19(8): e1-e8.
- [20] LAU S. Oral application of bacterial lysate in infancy diminishes the prevalence of atopic dermatitis in children at risk for atopy[J]. *Beneficial Microbes*, 2014, 5(2): 147-149.
- [21] LI P, TIAN WN, JIANG Z, LIANG ZH, WU XY, DU B. Genomic characterization and probiotic potency of *Bacillus* sp. DU-106, a highly effective producer of L-lactic acid isolated from fermented yogurt[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2216.
- [22] HUANG DR, CHEN YL, CHEN HZ, DENG XY, HUANG JZ, LU SM, LI P, DU B. Supplementation of *Bacillus* sp. DU-106 alleviates antibiotic-associated diarrhea in association with the regulation of intestinal microbiota in mice[J]. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2022, 14(2): 372-383.
- [23] HUANG JZ, XIAO N, SUN YY, WU SS, TIAN WN, LAI YJ, LI P, DU B. Supplementation of *Bacillus* sp. DU-106 reduces hypercholesterolemia and ameliorates gut dysbiosis in high-fat diet rats[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(1): 287-299.
- [24] 张余威, 赵文俊, 李伟杰. 灭活芽孢杆菌 DU-106 对秀丽隐杆线虫的抗衰老作用[J]. *食品科学*, 2023. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20230217.1507.026.html>.
ZHANG YW, ZHAO WJ, LI WJ, DU B, LI P. Effect of Inactivated *Bacillus* sp. DU-106 on anti-aging of *C. elegans*[J]. *Food Science*, 2023. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.ts.20230217.1507.026.html> (in Chinese).
- [25] HOU DD, DI ZH, QI RQ, WANG HX, ZHENG S, HONG YX, GUO H, CHEN HD, GAO XH. Sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) oil improves atopic dermatitis-like skin lesions via inhibition of NF- κ B and STAT1 activation[J]. *Skin Pharmacology and Physiology*, 2017, 30(5): 268-276.
- [26] KIM TH, KIM GD, AHN HJ, CHO JJ, PARK YS, PARK CS. The inhibitory effect of naringenin on atopic dermatitis induced by DNFB in NC/Nga mice[J]. *Life Sciences*, 2013, 93(15): 516-524.
- [27] KIM H, KIM HR, KIM NR, JEONG BJ, LEE JS, JANG S, CHUNG DK. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* lysates attenuates the development of atopic dermatitis lesions in mouse models[J]. *Journal of Microbiology*, 2015, 53(1): 47-52.
- [28] LIANG YH, LIU GR, XIE LN, SU KW, CHANG X, XU YN, CHEN JS, ZHU ZY, YANG KY, CHEN HX, DU ZY. *Dendrobium candidum* polysaccharide reduce atopic dermatitis symptoms and modulate gut microbiota in DNFB-induced AD-like mice[J]. *Frontiers in Physiology*, 2022, 13: 976421.
- [29] SIDO JM, JACKSON AR, NAGARKATTI PS,

- NAGARKATTI M. Marijuana-derived Δ -9-tetrahydrocannabinol suppresses Th1/Th17 cell-mediated delayed-type hypersensitivity through microRNA regulation[J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2016, 94(9): 1039-1051.
- [30] DU HY, FU HY, LI DN, QIAO Y, WANG QW, LIU W. The expression and regulation of interleukin-33 in human epidermal keratinocytes: a new mediator of atopic dermatitis and its possible signaling pathway[J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research: the Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 2016, 36(9): 552-562.
- [31] LEE JH, LEE YS, LEE EJ, LEE JH, KIM TY. Capsiate inhibits DNFB-induced atopic dermatitis in NC/nga mice through mast cell and $CD4^+$ T-cell inactivation[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2015, 135(8): 1977-1985.
- [32] BALAHA MF, AHMED NJ, ALMALKI ZS, ALAHMARI AK, ALSHEHRI AM, SOLIMAN GA, HAMAD AM. Epimedin ameliorates DNFB-induced allergic contact dermatitis in mice: role of NF- κ B/NLRP3-driven pyroptosis, Nrf2/HO-1 pathway, and inflammation modulation[J]. *Life Sciences*, 2022, 302: 120653.
- [33] KEMPURAJ D, CASTELLANI ML, PETRARCA C, FRYDAS S, CONTI P, THEOHARIDES TC, VECCHIET J. Inhibitory effect of quercetin on tryptase and interleukin-6 release, and histidine decarboxylase mRNA transcription by human mast cell-1 cell line[J]. *Clinical and Experimental Medicine*, 2006, 6(4): 150-156.
- [34] HELOU DG, MARTIN SF, PALLARDY M, CHOLLET-MARTIN S, Kerdine-Römer S. Nrf2 involvement in chemical-induced skin innate immunity[J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1004.
- [35] SCHEINMAN PL, VOCANSON M, THYSSEN JP, JOHANSEN JD, NIXON RL, DEAR K, BOTTO NC, MOROT J, GOLDMINZ AM. Contact dermatitis[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2021, 7(1): 38.
- [36] MONTELEONE M, STANLEY AC, CHEN KW, BROWN DL, BEZBRADICA JS, von PEIN JB, HOLLEY CL, BOUCHER D, SHAKESPEAR MR, KAPETANOVIC R, ROLFES V, SWEET MJ, STOW JL, SCHRODER K. Interleukin-1 β maturation triggers its relocation to the plasma membrane for gasdermin-D-dependent and-independent secretion[J]. *Cell Reports*, 2018, 24(6): 1425-1433.
- [37] de ALMADA CN, ALMADA CN, MARTINEZ R CR, SANT'ANA AS. Paraprobiotics: evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, 58: 96-114.
- [38] NATARAJ BH, ALI SA, BEHARE PV, YADAV H. Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods[J]. *Microbial Cell Factories*, 2020, 19(1): 168.
- [39] LI N, RUSSELL WM, DOUGLAS-ESCOBAR M, HAUSER N, LOPEZ M, NEU J. Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG: effects on proinflammatory and anti-inflammatory cytokines/chemokines in gastrostomy-fed infant rats[J]. *Pediatric Research*, 2009, 66(2): 203-207.
- [40] CRUMP GM, ZHOU JH, MASHAYEKH S, GRIMES CL. Revisiting peptidoglycan sensing: interactions with host immunity and beyond[J]. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2020, 56(87): 13313-13322.
- [41] NAUCIEL C, GOGUEL AF. Inhibition of tumor growth by the peptidoglycan from *Bacillus megaterium*[J]. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 1977, 59(6): 1723-1726.
- [42] JEON B, KIM HR, KIM H, CHUNG DK. *In vitro* and *in vivo* downregulation of C3 by lipoteichoic acid isolated from *Lactobacillus plantarum* K8 suppressed cytokine-mediated complement system activation[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2016, 363(14): fnw140.