



## 一株猪肠道 *Lactobacillus animalis* LGM 对结肠炎小鼠 Th 细胞分化转录因子基因表达的影响

程颖州, 慕春龙\*, 朱伟云

南京农业大学消化道微生物研究室, 国家动物消化道营养国际联合研究中心, 江苏省消化道营养与动物健康重点实验室, 江苏 南京 210095

**摘要:**【目的】从体外和体内研究 *Lactobacillus animalis* LGM 对 Th 细胞分化转录因子 T-bet、GATA-3、ROR- $\gamma$ t 和 Foxp3 的调节作用, 以及探究 *L. animalis* LGM 对小鼠结肠炎的影响。【方法】本试验采用改良型的 Hungate 滚管技术从猪结肠内容物中分离一株 *L. animalis* LGM, 根据其 16S rRNA 序列进行鉴定。收集 *L. animalis* LGM 培养液上清, 与细菌脂多糖(LPS, 2  $\mu$ g/mL)同时孵育 Caco-2 细胞 24 h, 体外研究 *L. animalis* LGM 对 Caco-2 细胞内 Th 细胞分化转录因子(T-bet, GATA3, ROR- $\gamma$ t 和 Foxp3) mRNA 表达的影响; 配制 *L. animalis* LGM 细菌悬液, 研究 *L. animalis* LGM 灌胃对 DSS 诱导结肠炎小鼠症状及结肠 Th 细胞分化转录因子和细胞因子(IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 和 IL-10) mRNA 表达的影响, 表达结果采用荧光定量 PCR 法检测。【结果】与对照组相比, *L. animalis* LGM 培养液上清显著上调 Caco-2 细胞内 ROR- $\gamma$ t 与 Foxp3 mRNA 表达( $P < 0.05$ ), 显著下调 GATA3、IL-4、IL-17 和 TGF- $\beta$  mRNA 表达( $P < 0.05$ )。*L. animalis* LGM 灌胃显著上调小鼠结肠内 ROR- $\gamma$ t 和 Foxp3 的表达( $P < 0.05$ ), 显著降低了促炎因子 IL-4 和 IL-17 的表达( $P < 0.05$ ), 阻止了小鼠结肠长度缩短( $P < 0.05$ )。【结论】猪肠道分离 *L. animalis* LGM 表现出对 Th 细胞分化转录因子的选择性调节, 显著上调 Caco-2 细胞及结肠炎小鼠 ROR- $\gamma$ t 与 Foxp3 mRNA 表达。降低 DSS 诱导结肠炎小鼠炎症水平, 对 DSS 诱导结肠炎起保护作用, 有助于维护肠道环境稳态。

**关键词:** *Lactobacillus animalis*, 肠道免疫, 猪, DSS 诱导结肠炎

猪肠道内细菌资源十分丰富, 已有的研究发现肠道细菌在宿主营养物质代谢及免疫屏障系统中发挥重要作用。肠道内乳酸菌因其数量种类丰富, 维护肠道健康而备受关注, 其代谢细菌素、

乳酸能够维持肠道环境稳态, 抑制病原菌生长与增殖, 因此, 乳酸菌成为动物生产中常考虑使用的益生菌<sup>[1-2]</sup>。其中, 猪肠道分离的 *Lactobacillus animalis* T12 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus*

基金项目: 国家自然科学基金(31430082)

\*通信作者。E-mail: muchunlong@njau.edu.cn

收稿日期: 2019-02-24; 修回日期: 2019-05-11; 网络出版日期: 2019-06-14

*aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)均有良好的抑制作用<sup>[3]</sup>。因此, *L. animalis* 很早之前就被发现具有成为益生菌添加剂的可能, 并在动物生产中有所应用<sup>[4]</sup>。然而, 关于 *L. animalis* 参与肠道免疫的研究并不多。

肠道细菌与肠道免疫联系密切, 能够诱导宿主肠道淋巴组织发育, 调节肠道免疫应答, 在维持肠道正常免疫功能中必不可少<sup>[5-6]</sup>。与此同时, 宿主肠道免疫反应受自身辅助性 T(Th)细胞调节, 在 Th 细胞分化及发展过程中, T 盒子转录因子(T-box expressed in T cells, T-bet)、GATA 结合蛋白 3(GATA binding protein 3, GATA3)、RAR 相关孤儿受体(RAR-related orphan receptor gamma t, ROR- $\gamma$ t)和叉状头转录因子 3 (Forkhead box P3, Foxp3)四种特异性转录因子发挥重要作用。T-bet 与 GATA3 在 Th1 和 Th2 分化过程中不可或缺, 影响体内 Th1/Th2 细胞平衡及其介导的免疫途径<sup>[7-8]</sup>, ROR- $\gamma$ t 促进 Th17 细胞分化, 同时在抑制细菌介导肠道炎症方面起重要作用<sup>[9]</sup>, Foxp3 能够诱导调节性 T (Treg)细胞分化, 具有抗炎免疫调节功能<sup>[10]</sup>。因此, T-bet、GATA3、ROR- $\gamma$ t 和 Foxp3 或成为免疫调节策略中重要靶点。断奶仔猪饲喂 *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 后, 回肠淋巴组织中 GATA3 和 Foxp3 mRNA 表达显著降低<sup>[11]</sup>。因此, 推测肠道细菌可能通过调节 T-bet、GATA3、ROR- $\gamma$ t 和 Foxp3 的表达影响肠道免疫反应。

本试验从猪结肠内容物中分离一株 *L. animalis* LGM, 对其基本性质进行初步探索, 研究其对 T-bet、GATA3、ROR- $\gamma$ t 和 Foxp3 表达的影响。并通过探索 *L. animalis* LGM 培养液上清对 Caco-2 细胞转录因子 mRNA 表达的影响, 以及 *L. animalis* LGM 灌胃对结肠炎小鼠症状及结肠内

转录因子和细胞因子 mRNA 表达的调控, 反映猪肠道分离 *L. animalis* LGM 对 Th 细胞分化转录因子表达的调节作用, 揭示 *L. animalis* LGM 在肠道免疫中发挥的作用, 为 *L. animalis* LGM 的肠道益生作用提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 培养基

细菌培养基: 改良 M2GSC 培养基(g/L): 酪蛋白胨 10, 牛肉膏 10, 酵母浸出物 2.5, 葡萄糖 5, 可溶性淀粉 1, 纤维二糖 1<sup>[12]</sup>, CO<sub>2</sub> 通气 3-4 h, 115 °C 高压灭菌 20 min。

细胞培养基: DMEM 培养基(吉诺生物医药技术有限公司), 胎牛血清(FBS, Gen-view 公司)。

### 1.2 试验动物与主要试剂

SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠 15 只, 体重 18-22 g, 购于南京江宁区青龙山动物繁殖场[SCXK(苏)2017-0001]。室温 25±2 °C, 自由饮水采食。葡聚糖硫酸钠(DSS, 上海翊圣生物科技有限公司); 乳酸测定试剂盒、CCK-8 细胞活力检测试剂盒(南京建成生物工程研究所); 细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、总 RNA 提取试剂盒(生工生物工程(上海)股份有限公司); 普通 PCR, 反转录, 荧光定量试剂(TaKaRa 公司)。

### 1.3 细菌分离与纯化

购买新鲜杜×长×大三元杂交商品猪大肠。取新鲜商品猪结肠内容物 10 g, 溶于灭菌 90 mL PBS 溶液中, 轻轻振荡混匀, 经 4 层纱布过滤至血清瓶中作为接种液, 做 3 个重复。抽取 10 mL 接种液, 接种于 150 mL 密封血清瓶中(含 90 mL M2GSC 培养基), 37 °C 厌氧培养 48 h, 重复接种、

培养过程, 依此传 3 代。取第三代培养液, 利用密封 Hungate 滚管(含 9 mL M2GSC 培养基)梯度稀释至  $10^{-10}$ , 取  $10^{-8}$ – $10^{-10}$  三个梯度, 接种于未凝固的 M2GSC 固体培养基中, 利用 Hungate 滚管技术均匀涂布于管壁, 37 °C 厌氧培养 24 h。在厌氧装置下, 用接种环挑取单菌落接种于密封 Hungate 滚管中, 37 °C 厌氧培养 24 h。重复稀释、滚管、挑菌等纯化过程 3 次。

#### 1.4 菌株鉴定

根据菌株 16S rRNA 序列鉴定其生物学分类。采用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒法提取分离菌株基因组 DNA, 以多功能酶标仪(Tecan, Spark, Austria)检测提取基因组 DNA 浓度与质量。20  $\mu$ L 基础 PCR 体系: 200 ng 基因组 DNA, 10  $\mu$ L *Premix Taq* 酶, 1  $\mu$ L 上、下游引物, ddH<sub>2</sub>O 补足。16S rDNA 扩增引物: 8f (5'-CACGGATCCAGAGTTTGA(C/T)(A/C)TGGCTCAG-3')和 1510r (5'-GTG AAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')<sup>[13]</sup>。PCR 扩增程序: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 68 °C 60 s, 35 个循环; 68 °C 10 min; 4 °C 终止反应。PCR 产物交由上海英骏(Invitrogen)生物技术有限公司完成测序。根据其 16S rRNA 序列, 在 NCBI 内进行 BLAST (NCBI <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)分析, 获取同源性较高的相关序列, 在 MAGA 7.0 内进行比对, 用 Maximum Likelihood 法建立系统进化树。

#### 1.5 *L. animalis* LGM 生长曲线及培养液乳酸和丁酸含量测定

利用 1 mol/L HCl 溶液和 1 mol/L NaOH 溶液将 Hungate 滚管中细菌培养基 pH 分别调至 3.5–8.5, 按照 1/10 比例接种同一培养液, 37 °C 培养, 使用分光光度计分别在 2、4、6、12、24 h

时间点测定培养液  $OD_{600}$  值, 绘制分离菌株生长曲线。乳酸及丁酸是肠道细菌常见代谢产物, 是肠道细菌维护肠道环境稳态、为宿主提供能量的重要体现, 因此对 *L. animalis* LGM 乳酸及丁酸产量进行检测。选取细菌生长平台期, 取细菌培养液, 用乳酸测定试剂盒测定 24 h 内培养液乳酸积累量。丁酸测定: 配制 2.278 mmol/L 丁酸溶液, 依次稀释 2、4、8、16 倍, 在岛津气相色谱仪中构建丁酸浓度标准曲线; 取 1 mL 细菌培养液, 加 0.2 mL 25% (W/V) 偏磷酸溶液, -20 °C 冷冻过夜, 4 °C、12000 $\times$ g 离心 10 min, 经 0.22  $\mu$ m 过滤器至新离心管中, 取 500  $\mu$ L 上清, 加等体积乙醚萃取后经气相色谱仪(Shimadzu, GC-14B, Japan)测定丁酸含量。

#### 1.6 *L. animalis* LGM 培养液上清对 Caco-2 细胞内转录因子基因表达的影响

待细菌培养至  $OD_{600}$  为 1 时, 取 *L. animalis* LGM 培养液, 4 °C、12000 $\times$ g 离心 10 min, 经 0.22  $\mu$ m 过滤器过滤即得 *L. animalis* LGM 培养液上清。Caco-2 细胞在含 10% (V/V) 胎牛血清(FBS)的 DMEM 完全培养基中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下恒温培养, 待细胞在细胞培养瓶中分布率达 80%–90% 时传代, 细胞试验在 20–50 代内完成。试验分为 3 组, 对照组、细菌脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)处理组、细菌脂多糖(LPS)+10% (V/V) *L. animalis* LGM 培养液上清处理组, 每组 6 个重复。24 孔板每孔加 1 mL 完全培养基, 接种  $1 \times 10^5$  个细胞, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养至分布率达 80%–90%。更换不含 FBS 的 DMEM 培养基, 静默 12 h。更换新鲜培养基, 除对照组外, 其余 2 组均由 LPS (2  $\mu$ g/mL) 诱导细胞炎症, 同时添加 10% (V/V) *L. animalis* LGM 培养

液上清处理, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 24 h。用总 RNA 提取试剂盒提取处理细胞内 RNA, 以多功能酶标仪(Tecan, Spark, Austria)检测 RNA 浓度与质量, 将 RNA 浓度调至 500 ng/μL, 利用反

转录试剂将 mRNA 反转录为 cDNA。Caco-2 细胞内转录因子表达量采用荧光定量 PCR 技术检测分析, 所用引物见表 1, 细胞活性检测依据 CCK-8 细胞活力检测试剂盒。

表 1. 荧光定量所采用的引物

Table 1. Primers for Real-time PCR analysis

Samples	Genes	Primer sequences (5'→3')	Product size/bp	Annealing temperature/°C	References
Caco-2 cell	T-bet	F: CCCCTTGGTGTGGACTGAGA	87	61.13	[8]
		R: ACGCGCCTCCTCTTAGAGTC		61.38	
	GATA3	F: GTCCTCCCTGAGCCACATCT	98	60.98	
		R: GTGGTCCAAAGGACAGGCTG		60.89	
	ROR-γt	F: GGCTCCCTGGATGAATAGAATG	190	58.32	[14]
		R: AGGCAGAGGCAGAAAATGTAAAG		59.24	
	FOXP3	F: TCCCAGAGTTCCTCCACAAC	122	58.94	[15]
		R: ATTGAGTGTCCGCTGCTTCT		59.68	
	IL-4	F: CACAAGTGCATATCACCTT	386	55.85	[16]
		R: GCTCGAACACTTTGAATATT		51.90	
	IL-17	F: GGTTTGACTGAGTACCAATTTGC	172	58.45	[17]
		R: AAATTCCCAAGCCCAGAATC		55.95	
	TGF-β	F: GGGACTATCCACCTGCAAGA	239	58.80	[18]
		R: CCTCCTTGGCGTAGTAGTCG		59.62	
β-actin	F: CACTGTGCCATCTACGAGG	154	60.18	[19]	
	R: AATGTCACGCACGATTTCC		56.64		
Mice	T-bet	GCCAGGGAACCGCTTATATG	136	58.48	[20]
		GACGATCATCTGGGTCACATTGT		60.68	
	GATA3	CCTTAAAACTCTTGGCGTCC	533	56.73	[21]
		AGACACATGTCATCCCTGAG		56.63	
	ROR-γt	TGTTTTATGGGGTTTGGGTATG	122	56.56	[22]
		CTGTGTGGATGTGTGTCTCTGATTA		60.57	
	FOXP3	CTCATGATAGTGCCTGTGTCCTCAA	93	62.36	[23]
		AGGGCCAGCATAGGTGCAAG		62.56	
	IFN-γ	CACTGCATCTTGGCTTTGCA	252	59.68	[24]
		GCTGATGGCCTGATTGTCTTTC		59.90	
	IL-4	CACGGATGCGACAAAATCAC	251	58.76	[25]
		CGAAAAGCCCAGAAAGAGTCTCT		60.61	
	IL-17	TATCCCTCTGTGATCTGGGAAG	161	58.42	[26]
		ATCTTCTCGACCCTGAAAGTGA		58.83	
	IL-10	CTTACTGACTGGCATGAGGATCA	101	59.87	[27]
		GCAGCTCTAGGAGCATGTGG		60.53	
	β-actin	CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC	171	61.48	[28]
		ATGGAGCCACCGATCCACA		61.00	

### 1.7 小鼠结肠炎诱导及 *L. animalis* LGM 灌胃对结肠内转录因子表达的影响

待 *L. animalis* LGM 培养至  $OD_{600}$  为 1 时, 取细菌悬液, 梯度稀释至  $10^{-10}$ , 分别取  $10^{-8}$ – $10^{-10}$  梯度滚管培养, 数单菌落数计算细菌浓度。在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $10000\times g$  条件下离心 10 min, 重悬于 PBS 溶液并将细菌浓度调至  $5\times 10^9$  CFU/mL, 用于灌胃试验。15 只 SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠随机分为 3 组: 对照组、DSS 组和 *L. animalis* LGM 灌胃组, 适应性饲养 1 周后, 以 DSS 组与 *L. animalis* LGM 灌胃组小鼠构建急性结肠炎模型。将葡聚糖硫酸钠(DSS)溶于灭菌日常饮用水中, 浓度为 3% (W/V), 小鼠自由饮水, 隔 1 d 更换新鲜 DSS 饮用水, 连续饮用 7 d, 每只小鼠饮水量大约 5 mL/d。第 8 天更换正常饮水, 开始灌胃阶段, 对照组不进行处理; DSS 组每天灌胃 0.2 mL PBS 溶液; *L. animalis* LGM 灌胃组每天灌胃 0.2 mL *L. animalis* LGM 菌液( $1\times 10^9$  CFU), 连续灌胃 4 d。禁食 1 晚, 第 12 天乙醚麻醉处死, 分离小鼠结肠组织, 测量长度后保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱。提取结肠组织 RNA, 采用荧光定量 PCR 技术检测分析结肠内转录因子和细胞因子的表达, 所用引物见表 1。

### 1.8 统计学方法

试验数据使用 SPSS 25.0 (SPSS Inc., Chicago,

USA)软件分析, 利用单因素方差分析进行统计学分析, 采用 LSD-Turkey 法进行多重比较。结果表示为  $\text{mean}\pm\text{SEM}$ ,  $P<0.05$  表示有显著性差异。文章图例均由 Graphad Prism 7.0 软件完成。

## 2 结果和分析

### 2.1 猪结肠 *Lactobacillus animalis* LGM 分离与鉴定

根据 16S rRNA 序列比对结果, 确定分离菌株与 *Lactobacillus animalis* KCTC 3501 最为相似, 相似性为 99.79%, 并将其命名为 *L. animalis* LGM。此外, 该菌株与 *Lactobacillus murinus* LMG 14189 及 *Lactobacillus apodemi* DSM 16634 也具有较高相似性。利用 MAGA 7.0 软件将分离菌株与相关菌株归纳在系统进化树中(图 1), 更清晰地反映已分离 *L. animalis* LGM 的系统发生关系。

### 2.2 *L. animalis* LGM 生长曲线及培养液乳酸、丁酸含量

不同 pH 条件下 *L. animalis* LGM 的生长曲线表明, *L. animalis* LGM 在中性或略碱性环境下繁殖速度较快, 但在酸性条件下受到抑制(图 2-A)。体外发酵 pH 为 6.5,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温培养 24 h 内其乳酸累积浓度为  $46.16\pm 1.19$  mmol/L, 但丁酸浓度较低, 为  $1.28\pm 0.16$  mmol/L (图 2-B)。

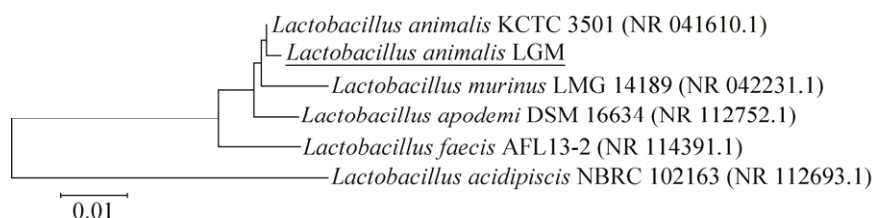


图 1. 本研究分离到的 *L. animalis* LGM 与相关菌株基于 16S rRNA 序列的 Maximum Likelihood 法系统进化树 Figure 1. A maximum-likelihood phylogenetic tree of *L. animalis* LGM and reference strains based on 16S rRNA gene sequences. Numbers in bracket refer to the number of bacterial 16S rRNA sequences in NCBI database. Bar 0.01 at the bottom is the sequence divergence.

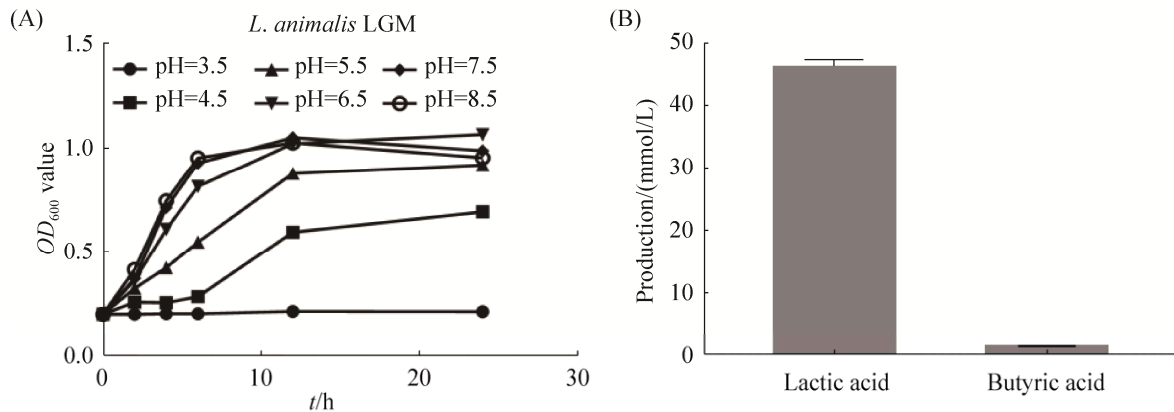


图 2. *L. animalis* LGM 不同 pH 条件下生长曲线(A)及其乳酸、丁酸产量(B)

Figure 2. *L. animalis* LGM growth curves in different pH conditions (A), and lactic acid and butyric acid production (B). Lactic acid and butyric acid accumulation was detected after 24 h cultivation.

### 2.3 *L. animalis* LGM 培养液上清对 Caco-2 细胞内转录因子 mRNA 表达的影响

LPS (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理导致 Caco-2 细胞活性显著降低( $P<0.05$ ), 显著上调 IL-4 和 IL-17 基因表达, 同时显著下调细胞内 TGF- $\beta$ 、GATA3 和 ROR- $\gamma\text{t}$  基因表达( $P<0.05$ )。与对照组及 LPS 组相比, *L. animalis* LGM 培养液上清处理组显著下调细胞内 GATA3 和 IL-4、IL-17、TGF- $\beta$  基因表达( $P<0.05$ ), 同时显著上调 Foxp3 基因表达( $P<0.05$ )。与 LPS 组相比, *L. animalis* LGM 培养液上清处理组显著上调 ROR- $\gamma\text{t}$  基因表达( $P<0.05$ ), 恢复至对照组水平。从细胞活性方面看, *L. animalis* LGM 培养液上清处理组细胞活性显著低于对照组与 LPS 组( $P<0.05$ , 图 3)。

### 2.4 小鼠结肠炎诱导及 *L. animalis* LGM 灌胃对 DSS 结肠炎小鼠表型的影响

小鼠结肠炎诱导阶段, 与对照组相比, DSS 诱导小鼠体重逐日递减, 到第 6-7 天时, DSS 组和 *L. animalis* LGM 培养液上清处理组小鼠体重显著下降( $P<0.05$ , 图 4-A), 并伴有拉稀、易惊的症状。灌胃阶段, *L. animalis* LGM 灌胃并没有

改善小鼠体重的降低。整个试验过程, DSS 组和 *L. animalis* LGM 灌胃组小鼠体增重无显著差异, 灌胃结束后, 与 DSS 组相比, *L. animalis* LGM 灌胃小鼠体重增加 6.41%。与对照组相比, DSS 组小鼠结肠长度显著缩短( $P<0.05$ ), *L. animalis* LGM 灌胃组则显著高于 DSS 组( $P<0.05$ , 图 4-B)。

### 2.5 *L. animalis* LGM 灌胃对 DSS 结肠炎小鼠结肠内转录因子表达的影响

与对照组相比, DSS 组小鼠结肠内 T-bet、GATA3、ROR- $\gamma\text{t}$  和 Foxp3 mRNA 表达显著降低( $P<0.05$ ); *L. animalis* LGM 灌胃改变了结肠炎小鼠结肠内 Th 细胞分化转录因子的表达, 与 DSS 组相比, *L. animalis* LGM 灌胃显著上调了 ROR- $\gamma\text{t}$  与 Foxp3 的表达( $P<0.05$ ), 其中 Foxp3 表达恢复至对照组水平(图 5-A)。与对照组相比, DSS 组小鼠结肠内促炎因子 IL-4、IL-17 表达显著增加( $P<0.05$ ); *L. animalis* LGM 灌胃显著降低了结肠炎小鼠结肠内 IL-4、IL-17 的表达( $P<0.05$ ), 同时显著上调 IFN- $\gamma$  的表达( $P<0.05$ ), DSS 组与 *L. animalis* LGM 灌胃组小鼠结肠内 IL-10 表达均显著降低( $P<0.05$ , 图 5-B)。

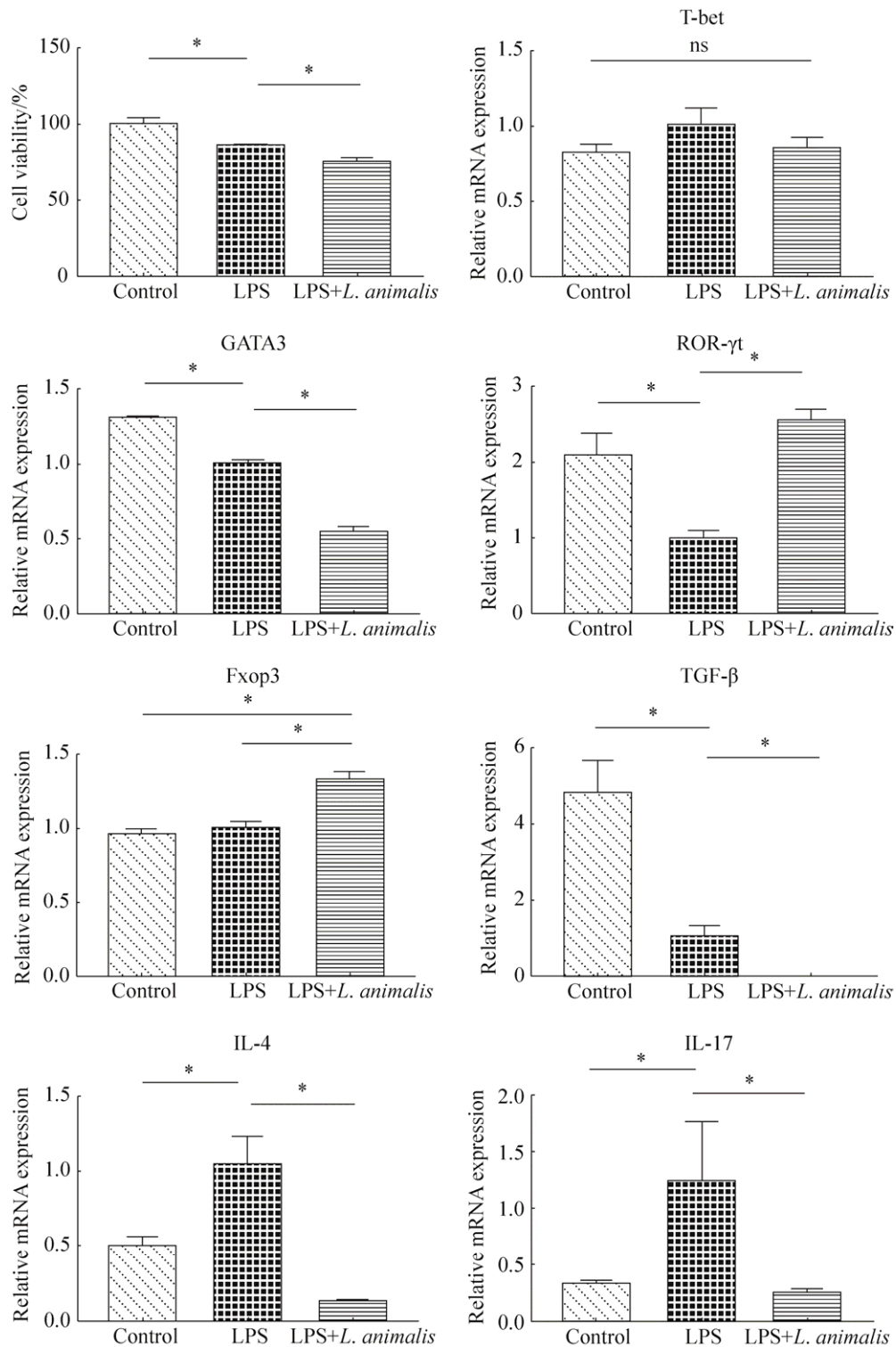


图 3. *L. animalis* LGM 培养液上清对 Caco-2 细胞活性、转录因子和细胞因子基因表达的影响

Figure 3. The effects of *L. animalis* LGM supernatants (10%, V/V) on cell viability, transcription factors and intracellular cytokines gene expressions in Caco-2 cells. Control group: without LPS and bacterial supernatants; LPS group: treated with LPS (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); LPS+*L. animalis* group: treated with LPS (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and *L. animalis* LGM supernatants simultaneously. \* represent significant difference ( $P < 0.05$ ).

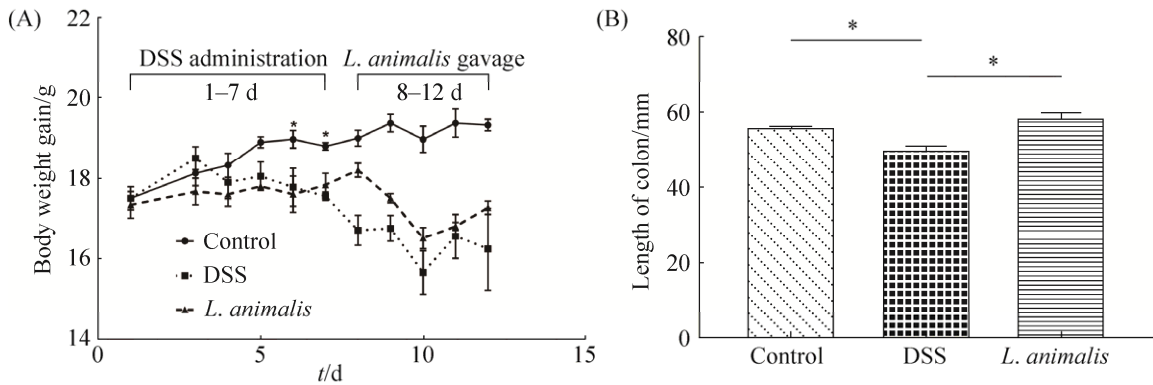


图 4. *L. animalis* LGM 灌胃对 DSS 诱导结肠炎小鼠体重和结肠长度的影响

Figure 4. Effects of *L. animalis* LGM suspension oral administration on DSS-induced colitis mice body weight gain and colon length. Control group: without DSS and bacterial suspension administration; DSS group: treated with 3% (V/V) DSS solution; *L. animalis* group: treated with 3% (V/V) DSS solution and gavaged *L. animalis* LGM suspension ( $5 \times 10^9$  CFU/mL) for 4 days. A: Body weight gain of mice through the whole experiment; B: Colon length of various groups. \* represent significant difference ( $P < 0.05$ ).

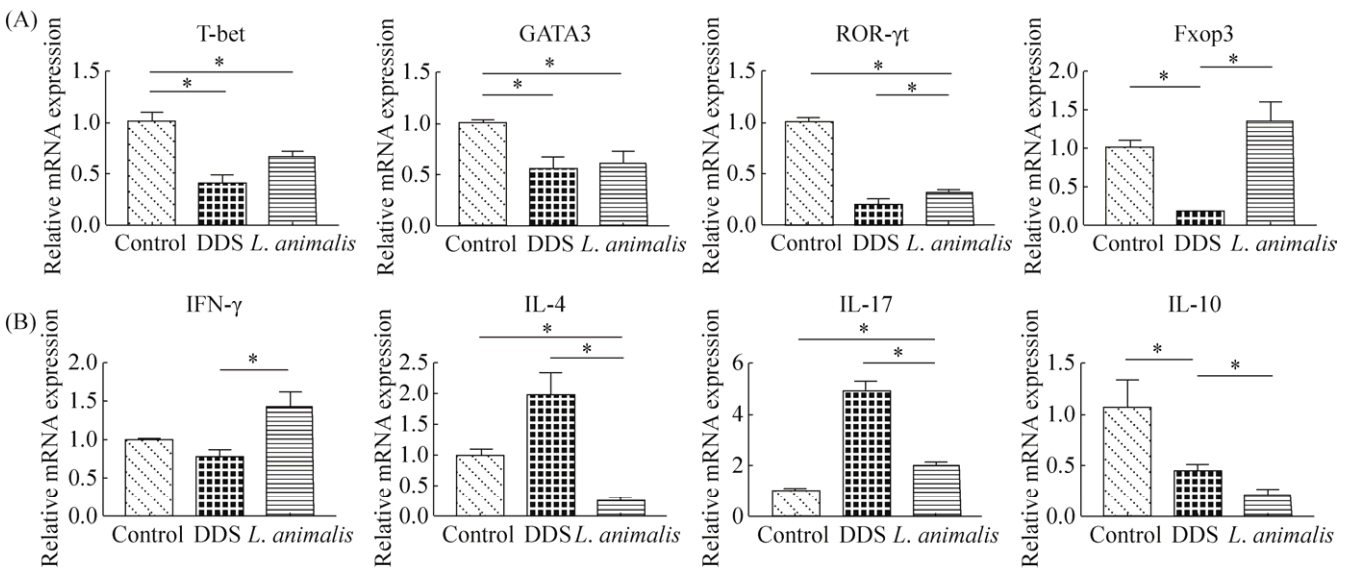


图 5. *L. animalis* LGM 灌胃对小鼠结肠内 Th 细胞分化转录因子和细胞因子基因表达的影响

Figure 5. Effects of *L. animalis* LGM suspension oral administration on transcription factors and intracellular cytokines gene expressions in mice colon. Control group: without DSS and bacterial suspension administration; DSS group: treated with 3% (V/V) DSS solution; *L. animalis* group: treated with 3% (V/V) DSS solution and gavaged *L. animalis* LGM suspension ( $5 \times 10^9$  CFU/mL) for 4 days. A: Transcription factors (T-bet, GATA3, ROR- $\gamma$ t and Foxp3) gene expressions; B: Intracellular cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-17 and IL-10) gene expressions. \* represent significant difference ( $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

乳酸菌在猪生长发育过程中扮演重要角色，

高通量测序发现乳酸菌是猪肠道中最丰富的几类细菌之一<sup>[29]</sup>。研究发现，饲喂 *Lactobacillus fermentum* I5007、*Lactobacillus reuteri* BSA131、



*Lactobacillus plantarum* ZJ316、*Lactobacillus rhamnosus* GG、*Lactobacillus amylovorus* 和 *Enterococcus faecium* 等乳酸菌在猪生长发育过程中均表现出益生作用<sup>[30]</sup>。本试验从猪肠道内分离出一株 *L. animalis* LGM, 发现其对 Foxp3 和 ROR- $\gamma$ t 表达有调节作用, 对结肠炎小鼠表现出益生效果。

*L. animalis* 是一种常见乳酸菌, 本研究中 *L. animalis* LGM 最适 pH 为 6.5, 与 *L. animalis* TMW 1.971 最适 pH 6.0 相似, 与 *Lactobacillus curvatus* TMW 1.624、*Lactobacillus reuteri* TMW 1.106 最适 pH 4.4 具有明显区别<sup>[31]</sup>。有研究报道, *L. animalis* LA4 与新鲜粪便悬液共同培养, 显著增加粪便菌群中肠球菌(*Enterococcus*)和乳酸杆菌(*Lactobacillus*)数量<sup>[32]</sup>。乳酸是肠道细菌常见代谢产物, 是肠道细菌维护肠道环境稳态的重要体现, 本研究中检测到 *L. animalis* LGM 培养液中具有较高水平乳酸产量。然而, 关于 *L. animalis* 的益生作用鲜有报道。

已有研究表明, 乳酸菌能够通过影响细胞活性和细胞因子表达, 调节炎症反应。在 LPS 诱导的细胞炎症模型中, *Lactobacillus rhamnosus* GG 能够有效抑制 LPS 诱导的炎症反应, 降低小鼠巨噬细胞促炎细胞因子 TNF- $\alpha$  的表达<sup>[33]</sup>。本研究中, *L. animalis* LGM 培养液上清能够显著降低 LPS 致炎 Caco-2 细胞内促炎因子 IL-4 和 IL-17 mRNA 表达, 表现出抗炎作用。另外, 乳酸菌可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号下调细胞活性。研究发现, *Lactobacillus rhamnosus* GG、*Lactobacillus acidophilus* 和 *Streptococcus salivarius* JIM8772 Sn 均对 LPS 或 TNF- $\alpha$  诱导的 NF- $\kappa$ B 活化产生抑制作用<sup>[34-35]</sup>。与 LPS 组相比, *L. animalis* LGM 培养液上清显著降低 Caco-2 细胞活性。这可能与乳酸菌抑制 NF- $\kappa$ B

信号相关, 研究发现, NF- $\kappa$ B 信号途径与肿瘤生长联系密切, 抑制 NF- $\kappa$ B 活化将会抑制肿瘤细胞生长<sup>[36-38]</sup>。另外, 细胞活性的降低也可能受 *L. animalis* LGM 产生的乳酸等代谢物及其营造的低 pH 环境影响<sup>[39]</sup>。因此, 乳酸菌 *L. animalis* LGM 能够影响 Caco-2 细胞活性。

肠道菌群稳定和肠道结构完整是肠道健康的基础<sup>[40]</sup>。乳酸菌作为宿主共生菌, 具有维护肠道健康的能力。研究发现, *Lactobacillus reuteri* R2LC 灌胃使 DSS 诱导结肠炎小鼠结肠黏膜厚度恢复, 同时增加了结肠末端紧密连接蛋白 ZO-1 的表达, 缓解了肠道炎症<sup>[41]</sup>。本研究的小鼠灌胃试验中, *L. animalis* LGM 灌胃组小鼠结肠长度显著高于 DSS 组, 接近正常小鼠, 说明 *L. animalis* LGM 灌胃对小鼠结肠有保护作用。

乳酸菌在结肠炎小鼠免疫调节中发挥重要作用, *Lactobacillus curvatus* WiKim38 灌胃显著提高 DSS 诱导结肠炎小鼠树突细胞 IL-10 表达, 改善小鼠结肠炎症水平<sup>[42]</sup>。*Faecalibacterium prausnitzii* 分泌抗菌肽在结肠炎小鼠体内降低促炎因子 IL-5 和 IL-17 mRNA 表达, 抑制了 Th1、Th2 和 Th17 介导的免疫反应<sup>[43]</sup>。本试验中, 在 LPS 诱导的 Caco-2 细胞炎症和 DSS 诱导的小鼠结肠炎中, *L. animalis* LGM 均能够显著上调 Th 细胞分化转录因子 ROR- $\gamma$ t 与 Foxp3 的表达。研究表明, ROR- $\gamma$ t 与 Foxp3 在维护肠道稳态方面发挥重要作用。ROR- $\gamma$ t 在肠道细菌免疫耐受机制中发挥重要作用, 机体内 ROR- $\gamma$ t<sup>+</sup>固有淋巴样细胞的存在能够缓解正常肠道菌群引起的炎症反应, 但 ROR- $\gamma$ t 基因敲出后, 小鼠脾脏表现增大, 内环境 IgG 显著增加<sup>[9]</sup>。Foxp3<sup>+</sup>调节性 T 细胞能够产生抗炎因子, 调节宿主免疫反应水平, 并可通过与 B、T 淋巴细胞弱化因子削弱淋巴细胞效应<sup>[10,44]</sup>。除此之外,

本试验中, *L. animalis* LGM 培养液上清显著下调 Caco-2 细胞内 GATA3 表达, *L. animalis* LGM 灌胃显著下调小鼠结肠内促炎因子 IL-4 与 IL-17 表达。IL4 和 IL17 表达的下调可能参与缓解 Th2 细胞介导的免疫反应<sup>[45]</sup>。因此我们推测, *L. animalis* LGM 具有调节肠道免疫、缓解肠道炎症、抑制 T 淋巴细胞效应等作用, 在结肠炎小鼠肠道内发挥益生作用。

## 4 结论

本研究从猪结肠食糜中分离出一株乳杆菌 *L. animalis* LGM, 该菌株表现出对 Th 细胞分化转录因子的选择性调节, 显著上调 LPS 诱导的 Caco-2 细胞及 DSS 诱导结肠炎小鼠结肠黏膜的 ROR- $\gamma$ t 与 Foxp3 mRNA 表达, 降低 DSS 诱导结肠炎小鼠炎症水平, 对 DSS 诱导结肠炎起保护作用, 能够作为潜在的益生菌调节肠道健康。

## 参考文献

- [1] Arqués JL, Rodríguez E, Langa S, Landete JM, Medina M. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 584183.
- [2] Wang SM, Zhang LW, Shan YJ. *Lactobacilli* and colon carcinoma-A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(6): 667–674. (in Chinese)  
王淑梅, 张兰威, 单毓娟. 乳酸菌与结肠癌. *微生物学报*, 2015, 55(6): 667–674.
- [3] Li MX, Li N, Li Z, Xiang WL, Yang ZR, Luo F. Screening and identification of *Lactobacillus animalis* strain and its inhibitory protein characteristics. *Microbiology China*, 2009, 36(7): 1001–1007. (in Chinese)  
李明雄, 李妮, 李征, 向文良, 杨志荣, 罗璠. 动物乳杆菌的分离鉴定及其抑菌蛋白的特性分析. *微生物学通报*, 2009, 36(7): 1001–1007.
- [4] Ayala DI, Chen JC, Bugarel M, Lonergan GH, den Bakker HC, Kottapalli KR, Brashears MM, Nightingale KK. Molecular detection and quantification of viable probiotic strains in animal feedstuffs using the commercial direct fed microbial *Lactobacillus animalis* NP51 as a model. *Journal of Microbiological Methods*, 2018, 149: 36–43.
- [5] Zhang YM, Tian F, Guo XK. Intestinal lymphoid tissue and commensal bacteria work together to maintain intestinal homeostasis. *Chinese Journal of Microecology*, 2010, 22(9): 854–856. (in Chinese)  
张羽萌, 田菲, 郭晓奎. 肠道淋巴组织与共生细菌对肠道环境稳态的共同维持. *中国微生态学杂志*, 2010, 22(9): 854–856.
- [6] Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2015, 31(1): 69–75.
- [7] Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang XK, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, 2000, 100(6): 655–669.
- [8] Bahria-Sediki IB, Yousfi N, Paul C, Chebil M, Cherif M, Zermani R, El Gaaied ABA, Bettaieb A. Clinical significance of T-bet, GATA-3, and Bcl-6 transcription factor expression in bladder carcinoma. *Journal of Translational Medicine*, 2016, 14(1): 144.
- [9] Hepworth MR, Monticelli LA, Fung TC, Ziegler CGK, Grunberg S, Sinha R, Mantegazza AR, Ma HL, Crawford A, Angelosanto JM, Wherry EJ, Koni PA, Bushman FD, Elson CO, Eberl G, Artis D, Sonnenberg GF. Innate lymphoid cells regulate CD4<sup>+</sup> T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature*, 2013, 498(7452): 113–117.
- [10] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nature Immunology*, 2003, 4(4): 330–336.
- [11] Kreuzer S, Rieger J, Strucken EM, Thaben N, Hünigen H, Nöckler K, Janczyk P, Plendl J, Brockmann GA. Characterization of CD4<sup>+</sup> subpopulations and CD25<sup>+</sup> cells in ileal lymphatic tissue of weaned piglets infected with *Salmonella typhimurium* with or without *Enterococcus faecium* feeding. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2014, 158(3/4): 143–155.
- [12] Miyazaki K, Martin JC, Marinsek-Logar R, Flint HJ. Degradation and utilization of xylans by the rumen anaerobe *Prevotella bryantii* (formerly *P. ruminicola* subsp. *brevis*) B<sub>14</sub>. *Anaerobe*, 1997, 3(6): 373–381.
- [13] Zhang DY, Ji HF, Wang SX, Liu H, Wang YM. Advances in of lactobacillus micro-ecology in pig intestine. *Feeding and Husbandry*, 2010, (10): 42–44. (in Chinese)

- 张董燕, 季海峰, 王四新, 刘辉, 王雅民. 猪肠道乳酸菌的微生物学研究进展. 饲料与畜牧, 2010, (10): 42–44.
- [14] Wang LL, Tang PH, Shi CG, Wan YH, Tang W, Hou XX, Pan NL, Shi YB, Tao QL. Expression of CD39 mRNA is altered in the peripheral blood of patients with allergic asthma. *Biomedical Reports*, 2014, 2(1): 75–78.
- [15] Liu YY, Xia TT, Jin CH, Gu DM, Yu J, Shi WQ, Zhang K, Zhang LP, Ye JX, Li L. FOXP3 and CEACAM6 expression and T cell infiltration in the occurrence and development of colon cancer. *Oncology Letters*, 2016, 11(6): 3693–3701.
- [16] Nilsen EM, Lundin KEA, Krajči P, Scott H, Sollid LM, Brandtzaeg P. Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon  $\gamma$ . *Gut*, 1995, 37(6): 766–776.
- [17] Mardegan GP, Shibli JA, Roth LA, Faveri M, Giro G, Bastos MF. Transforming growth factor- $\beta$ , interleukin-17, and IL-23 gene expression profiles associated with human peri-implantitis. *Clinical Oral Implants Research*, 2017, 28(7): e10–e15.
- [18] Shibata SI, Marushima H, Asakura T, Matsuura T, Eda H, Aoki K, Matsudaira H, Ueda K, Ohkawa K. Three-dimensional culture using a radial flow bioreactor induces matrix metalloprotease 7-mediated EMT-like process in tumor cells via TGF $\beta$ 1/Smad pathway. *International Journal of Oncology*, 2009, 34(5): 1433–1448.
- [19] Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH.  $\beta$ -actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax*, 2002, 57(9): 765–770.
- [20] Liu NS, Ohnishi N, Ni L, Akira S, Bacon KB. CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells. *Nature Immunology*, 2003, 4(7): 687–693.
- [21] Zhang CL, Gui L, Xu YJ, Wu T, Liu D. Preventive effects of andrographolide on the development of diabetes in autoimmune diabetic NOD mice by inducing immune tolerance. *International Immunopharmacology*, 2013, 16(4): 451–456.
- [22] Zhu M, Xu Q, Li XL, He Q, Wang WF. Modulating effects of leflunomide on the balance of Th17/Treg cells in collageninduced arthritis DBA/1 mice. *Central European Journal of Immunology*, 2014, 39(2): 152–158.
- [23] Zhong YC, Wang X, Ji QW, Mao XB, Tang HX, Yi GW, Meng K, Yang XF, Zeng QT. CD4<sup>+</sup>LAP<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells induced by nasal oxidized low-density lipoprotein suppress effector T cells response and attenuate atherosclerosis in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Journal of Clinical Immunology*, 2012, 32(5): 1104–1117.
- [24] Bay-Richter C, Janelidze S, Sauro A, Bucala R, Lipton J, Deierborg T, Brundin L. Behavioural and neurobiological consequences of macrophage migration inhibitory factor gene deletion in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 2015, 12: 163.
- [25] Jin WY, Huang W, Chen LQ, Jin MJ, Wang QM, Gao ZG, Jin ZH. Topical application of JAK1/JAK2 inhibitor momelotinib exhibits significant anti-inflammatory responses in DNCB-induced atopic dermatitis model mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(12): 3973.
- [26] Zhao SH, Yang YY, Liu W, Xuan ZQ, Wu SM, Yu SF, Mei K, Huang YJ, Zhang P, Cai JM, Ni J, Zhao YX. Protective effect of hydrogen-rich saline against radiation-induced immune dysfunction. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2014, 18(5): 938–946.
- [27] Li HD, Zhang ZR, Zhang QX, Qin ZC, He DM, Chen JS. Treatment with exogenous hydrogen sulfide attenuates hyperoxia-induced acute lung injury in mice. *European Journal of Applied Physiology*, 2013, 113(6): 1555–1563.
- [28] Zhao JY, Zhuang FF, Wang HY, Wu D, Zhang JS. *Msx2* plays a critical role in lens epithelium cell cycle control. *International Journal of Ophthalmology*, 2013, 6(3): 276–279.
- [29] Kim HB, Borewicz K, White BA, Singer RS, Sreevatsan S, Tu ZJ, Isaacson RE. Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Veterinary Microbiology*, 2011, 153(1/2): 124–133.
- [30] Yang FJ, Hou CL, Zeng XF, Qiao SY. The use of lactic acid bacteria as a probiotic in swine diets. *Pathogens*, 2015, 4(1): 34–45.
- [31] Rühmkorf C, Bork C, Mischnick P, Rübsam H, Becker T, Vogel RF. Identification of *Lactobacillus curvatus* TMW 1.624 dextranucrase and comparative characterization with *Lactobacillus reuteri* TMW 1.106 and *Lactobacillus animalis* TMW 1.971 dextranucrases. *Food Microbiology*, 2013, 34(1): 52–61.
- [32] Biagi G, Cipollini I, Pompei A, Zaghini G, Matteuzzi D. Effect of a *Lactobacillus animalis* strain on composition and metabolism of the intestinal microflora in adult dogs. *Veterinary Microbiology*, 2007, 124(1/2): 160–165.
- [33] Peña JA, Versalovic J. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF- $\alpha$  production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cellular Microbiology*, 2003, 5(4): 277–285.

- [34] Lee SK, Yang KM, Cheon JH, Kim TI, Kim WH. Anti-inflammatory mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* GG in lipopolysaccharide-stimulated HT-29 Cell. *The Korean Journal of Gastroenterology*, 2012, 60(2): 86–93.
- [35] Kaci G, Lakhdari O, Doré J, Ehrlich SD, Renault P, Blottière HM, Delorme C. Inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in human intestinal epithelial cells by commensal *Streptococcus salivarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(13): 4681–4684.
- [36] Lee SI, Kim HS, Koo JM, Kim IH. *Lactobacillus acidophilus* modulates inflammatory activity by regulating the *TLR4* and *NF- $\kappa$ B* expression in porcine peripheral blood mononuclear cells after lipopolysaccharide challenge. *British Journal of Nutrition*, 2016, 115(4): 567–575.
- [37] Park MH, Hong JT. Roles of NF- $\kappa$ B in cancer and inflammatory diseases and their therapeutic approaches. *Cells*, 2016, 5(2): 15.
- [38] Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Archiv*, 2005, 446(5): 475–482.
- [39] van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD, Maguin E. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, 82(1/4): 187–216.
- [40] Shen YJ, Bian ZL, Shao JG. Research progress of on the mechanism of impaired intestinal mucosal barrier function and repair therapy in inflammatory bowel disease. *Shandong Medical Journal*, 2019, 59(2): 90–93. (in Chinese)
- 沈羽嘉, 卞兆连, 邵建国. 炎症性肠病肠黏膜屏障功能受损机制与修复治疗的研究进展. *山东医药*, 2019, 59(2): 90–93.
- [41] Ahl D, Liu H, Schreiber O, Roos S, Phillipson M, Holm L. *Lactobacillus reuteri* increases mucus thickness and ameliorates dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Acta Physiologica*, 2016, 217(4): 300–310.
- [42] Jo SG, Noh EJ, Lee JY, Kim G, Choi JH, Lee ME, Song JH, Chang JY, Park JH. *Lactobacillus curvatus* WiKim38 isolated from kimchi induces IL-10 production in dendritic cells and alleviates DSS-induced colitis in mice. *Journal of Microbiology*, 2016, 54(7): 503–509.
- [43] Breyner NM, Michon C, de Sousa CS, Vilas Boas PB, Chain F, Azevedo VA, Langella P, Chatel JM. Microbial anti-inflammatory molecule (MAM) from *Faecalibacterium prausnitzii* shows a protective effect on DNBS and DSS-induced colitis model in mice through inhibition of NF- $\kappa$ B pathway. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 114.
- [44] Zhang HX, Zhu B, Fu XX, Zeng JC, Zhang JA, Wang WD, Kong B, Xiang WY, Zhong JX, Wang CY, Zheng XB, Xu JF. BTLA associates with increased Foxp3 expression in CD4<sup>+</sup> T cells in dextran sulfate sodium-induced colitis. *International Journal of Clinical & Experimental Pathology*, 2015, 8(2): 1259–1269.
- [45] Lan F, Zhang N, Gevaert E, Zhang L, Bachert C. Viruses and bacteria in Th2-biased allergic airway disease. *Allergy*, 2016, 71(10): 1381–1392.

# Effects of *Lactobacillus animalis* LGM on transcription factors gene expressions in DSS-induced colitis mice

Yingzhou Cheng, Chunlong Mu<sup>\*</sup>, Weiyun Zhu

National Center for International Research on Animal Gut Nutrition, Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Jiangsu Key Laboratory of Gastrointestinal Nutrition and Animal Health, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] Investigating the relationship between *Lactobacillus animalis* LGM and transcription factors (T-bet, GATA3, ROR- $\gamma$ t and Foxp3) gene expressions *in vivo* or *in vitro* and observing the effects of *L. animalis* LGM gavage on DSS-induced colitis. [Methods] *L. animalis* LGM was isolated from pig colon contents using Hungate rolling tube technique. Bacterial supernatants were extracted and incubated Caco-2 cells with LPS (2  $\mu$ g/mL) simultaneously. Bacterial suspension was adjusted to  $1 \times 10^9$  CFU/0.2 mL and gavaged to DSS-induced mice. Gene expressions of transcription factors (T-bet, GATA-3, ROR- $\gamma$ t and Foxp3) and intracellular cytokines (IL-4, IL-17, INF- $\gamma$  and IL-10) were analyzed by real-time PCR. [Results] In Caco-2 cells culture experiment, compared to control and LPS groups, *L. animalis* LGM supernatants treatment significantly downregulated the GATA-3, IL-4, IL-17 and TGF- $\beta$  gene expressions and upregulated Foxp3 and ROR- $\gamma$ t gene expressions ( $P < 0.05$ ). In DSS-induced colitis mice, compared to the DSS group, *L. animalis* LGM administration restored the colonic length and increased ROR- $\gamma$ t and Foxp3 gene expressions ( $P < 0.05$ ). [Conclusion] *L. animalis* LGM isolated from pig colon contents in the present study have distinctive effects on transcription factors. ROR- $\gamma$ t and Foxp3 expressions were significantly upregulated both in Caco-2 cells and DSS-induced colitis mice. *L. animalis* LGM showed protection on DSS-induced colitis and gut inflammation.

**Keywords:** *Lactobacillus animalis*, gut immunity, pigs, DSS-induced colitis

(本文责编: 李磊)

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (31430082)

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: muchunlong@njau.edu.cn

Received: 24 February 2019; Revised: 11 May 2019; Published online: 14 June 2019

慕春龙, 博士, 2016年毕业于南京农业大学动物科技学院动物营养与饲料科学专业, 现任南京农业大学讲师, 从事动物营养和肠道微生物研究。主要研究领域为猪肠道微生物功能及宿主-微生物互作、微生物-肠-脑轴。已在 *The Journal of Nutrition*、*Applied Environmental and Microbiology*、*Journal of Proteome Research*、*Frontiers in Microbiology* 等期刊发表 SCI 论文 12 篇, 参与英文专著 1 部。先后参与国家 973 项目、国家自然科学基金和江苏省自然科学基金项目的研究工作。荣获 2017 年江苏省优秀博士学位论文, 并获得 2016 年度“帝斯曼缤纷科技奖-中国青年学者动物营养科学奖”优胜奖。

