



## 吲哚-3-甲醛对志贺菌感染的保护作用及其机制研究

陈泳焰, 吴小小, 杨欢\*

徐州医科大学医学技术学院, 江苏 徐州 221004

陈泳焰, 吴小小, 杨欢. 吲哚-3-甲醛对志贺菌感染的保护作用及其机制研究. 微生物学报, 2022, 62(10): 4019–4029.

Chen Yongyan, Wu Xiaoxiao, Yang Huan. Indole-3-carboxaldehyde protects mouse from *Shigella* infection. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 4019–4029.

**摘要:** 【目的】探究吲哚-3-甲醛(indole-3-carboxaldehyde, I3A)对志贺菌感染性结肠炎的缓解作用及其机制研究。【方法】体外实验, 通过微量肉汤稀释法测定 I3A 对志贺菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)和 I3A 的抗菌活性, 运用酶标仪测定 600 nm 处不同浓度 I3A 作用的菌液吸光度( $A_{600}$ ), 并通过平板菌落计数检测志贺菌量。体内实验, 将 18 只小鼠随机分为对照(NC)组、SF301 组和 SF301+I3A 组。然后 SF301+I3A 组进行连续 8 d 的 200  $\mu$ L I3A 灌胃处理, 同时 NC 组和 SF301 组用 200  $\mu$ L 无菌水灌胃处理, SF301 组和 SF301+I3A 组于灌药第 4 天制备志贺菌感染性结肠炎小鼠模型, 体重和疾病活动指数(disease activity index, DAI)用于评价小鼠状况。上述实验结束后将所有小鼠处死, 取中段结肠进行组织病理学检测观察炎症情况, 下段结肠检测白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )的表达水平, 粪便、盲肠内容物检测载菌量。同时进行 14 d 的 I3A 处理小鼠监测 I3A 的体内应用安全性。【结果】体外实验: I3A 的 MIC 为 128  $\mu$ g/mL, 不同浓度的 I3A 涂板计数和  $A_{600}$  结果与对照组比较, 均有统计学差异(均  $P < 0.05$ )。体内实验: 与 SF301 组相比, SF301+I3A 组小鼠体重和 DAI 更接近 NC 组, 肉眼观结肠组织无明显损伤, 组织病理学检查未见明显炎症, 载菌量和炎症因子均有统计学差异(均  $P < 0.05$ ); I3A 对小鼠体重变化无显著影响( $P > 0.05$ )。【结论】本研究证明 I3A 在志贺菌感染性结肠炎中对肠道具有保护作用, I3A 可通过抑制志贺菌载菌量、降低结肠

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(82102408); 徐州科技计划项目(KC20116); 江苏省高等学校自然科学基金项目(20KJB310013); 徐州医科大学优秀人才引进项目(D2019030)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (82102408), by the Xuzhou Science and Technology Planning Project (KC20116), by the Natural Science Research Project of Higher Education Institutions in Jiangsu Province (20KJB310013) and by the Xuzhou Medical University Excellent Talent Introduction Project (D2019030)

\*Corresponding author. E-mail: yanghuan2015@tmu.edu.cn

Received: 27 February 2022; Revised: 22 May 2022; Published online: 9 June 2022

损伤和炎症水平来缓解志贺菌感染性结肠炎，并且 I3A 在体内没有显示毒性。

**关键词：** 吲哚-3-甲醛；志贺菌；结肠炎；炎症反应

## Indole-3-carboxaldehyde protects mouse from *Shigella* infection

CHEN Yongyan, WU Xiaoxiao, YANG Huan\*

School of Medical Technology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu, China

**Abstract:** [Objective] To investigate the alleviating effect of indole-3-carboxaldehyde (I3A) on the colitis caused by *Shigella* infection and decipher the underlying mechanism. [Methods] We conducted the *in vitro* experiment to measure the minimum inhibitory concentration (MIC) and activity of I3A against *Shigella* by micro broth dilution method. Further, we used a microplate reader to measure the absorbance ( $A_{600}$ ) of the bacterial suspensions with different concentrations of I3A at 600 nm and counted the number of *Shigella* via the plate colony counting method. In the *in vivo* experiment, we randomly assigned 18 mice into a control (NC) group, a SF301 group, and a SF301+I3A group. The SF301+I3A group was administrated with 200  $\mu$ L I3A by gavage for 8 consecutive days, and the NC group and SF301 group with 200  $\mu$ L sterile water. The colitis model of *Shigella* infection was established on the 4th day in the SF301 group and SF301+I3A group. Body weight and disease activity index (DAI) were used to evaluate the conditions of mice. After the above experiments, we euthanized all the mice, collected the middle colon for histopathological detection to observe the inflammation, determined the expression levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the lower colon, and measured the bacterial load in feces and cecum. The safety of I3A application *in vivo* was monitored in mice for 14 days. [Results] *In vitro* experiment: the MIC of I3A was 128  $\mu$ g/mL. The bacterial counts and  $A_{600}$  in the groups treated with different concentrations of I3A were different from those in the control group ( $P < 0.05$ ). *In vivo* experiment: compared with the SF301 group, the SF301+I3A group showed the body weight and DAI close to those in the NC group and significantly relieved colonic damage. No obvious inflammation was observed in SF301+I3A group, and the bacterial load and the expression levels of inflammatory cytokines were different between SF301+I3A group and SF301 group ( $P < 0.05$ ). I3A had no significant effect on the body weight of mice ( $P > 0.05$ ). [Conclusion] We demonstrate that I3A has a protective effect on the colitis caused by *Shigella* infection. Specifically, I3A alleviates the colitis by inhibiting *Shigella* load and reducing colonic damage and inflammation levels. Moreover, I3A shows no toxicity *in vivo*.

**Keywords:** indole-3-carboxaldehyde; *Shigella*; colitis; inflammatory response

志贺菌(*Shigella*)是一种兼性厌氧、无荚膜、无芽胞、无动力的革兰氏阴性菌，是全球腹泻负担的重要因素之一。据 1999 年的统计，全世

界每年有 1.647 亿例痢疾病例，其中 80%发生在亚洲。2010 年，Bardhan 等对亚洲进行了统计，每年约有 1.25 亿人患痢疾，其中约 1.4 万人

死亡。据两项统计, 婴儿和 5 岁以下儿童是志贺菌感染相关疾病的主要受害者<sup>[1-2]</sup>。

志贺菌的致病性归因于效应蛋白, 称为毒力因子。III型分泌系统(TTSS)将毒力蛋白注入宿主细胞, 也与其侵袭性有关<sup>[3]</sup>。志贺菌感染可侵入人体结肠和直肠上皮细胞, 引起急性结肠炎。临床症状为水样腹泻、黏液脓血便、里急后重(痢疾)。志贺菌通过粪口途径传播。志贺菌到达结肠后, 通过 M 细胞侵入结肠上皮<sup>[4]</sup>, 诱导巨噬细胞死亡, 激活黏膜下层<sup>[5]</sup>, 进入上皮细胞复制, 然后利用肌动蛋白聚合扩散到邻近的上皮细胞<sup>[6]</sup>, 形成感染灶, 引起肠炎。志贺菌感染的免疫反应中辅助性 T 细胞 17 (helper T cell 17, Th17)起到重要作用<sup>[7]</sup>, 也是炎症的“罪魁祸首”。随着抗生素的应用, 志贺菌耐药性越来越普遍。细菌通过自身基因突变或获得外源性耐药基因(主要途径)阻止抗生素对志贺菌产生影响<sup>[8-9]</sup>, 但抗生素目前是志贺菌感染性疾病患者的标准治疗方法。更重要的是, 目前没有更加完善的疫苗和非抗生素药物治疗的方案<sup>[10]</sup>。基于这种情况, 迫切需要寻求新的方向来探索志贺氏痢疾的治疗。

肠道菌群近年来备受关注, 研究发现其与肥胖、糖尿病、心脑血管疾病、炎症性肠病、胃肠癌和自身免疫性疾病有关<sup>[11]</sup>。此外, 微生物代谢物与肠道免疫功能之间存在密切关系, 在维持肠道稳态方面发挥着重要作用<sup>[12]</sup>。对于细菌性肠道炎症, 已采用益生菌、粪便移植等方法改变肠道菌群治疗肠炎<sup>[13-14]</sup>, 但存在感染和违反伦理的风险。过去几年, 一些研究人员逐渐转向细菌代谢物治疗细菌性结肠炎, 试图利用代谢物改善肠道菌群, 干扰结肠炎并缓解症状<sup>[15]</sup>。研究表明, 当肠道菌群不能顺利代谢色氨酸时, 结肠炎会加重, 当色氨酸介入时,

肠道炎症会得到缓解<sup>[16]</sup>。色氨酸是肠道菌群代谢的氮源, 肠道菌群分解色氨酸产生各种吲哚代谢物<sup>[17]</sup>。这些代谢物可以平衡肠黏膜反应, 并能很好地维持肠道免疫稳态<sup>[18]</sup>。吲哚-3-甲醛(indole-3-carboxaldehyde, I3A)是其中重要的一项。I3A 可以通过食物干预改善小鼠的结肠炎<sup>[17-19]</sup>。在此, 我们旨在探索 I3A 在志贺菌引起的结肠炎中的保护作用。

在本研究中, 我们进行了体外抗菌实验, 主要在体内研究了 I3A 是否对志贺菌引起的结肠炎具有保护作用, 分析了 I3A 治疗志贺菌引起的结肠炎的临床症状和病理变化。此外, 我们还阐述了 I3A 可能的作用机制, 如抑制志贺菌、调节免疫反应等, 证明了 I3A 在志贺菌引起的结肠炎中的保护和改善潜力。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 福氏志贺菌菌株 sf301

中国福氏志贺菌的参考株, 由湖南大学化学化工学院冯欣欣老师赠与, 该菌株混合于含有体积分数 15%甘油的胰酪大豆胨液体培养基(trypticase soy broth, TSB)中置于-80 °C 保存。TSB 购于山东青岛海博生物技术有限公司。

#### 1.1.2 药物

吲哚-3-甲醛(I3A)购自 Sigma 公司(129445, 纯度 $\geq 97\%$ )。

#### 1.1.3 动物

雄性 C57BL/6J 小鼠, 5-6 周龄, 20 g 左右, 无特定病原体, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司。

### 1.2 菌株与生长培养

福氏志贺菌菌株 sf301 冻存于-80 °C, 使用前复苏。将菌株接种到 TSB 固体平板上, 37 °C 培养 24 h。

### 1.3 I3A 的体外抗菌活性

#### 1.3.1 药敏试验

根据临床和实验室标准化协会和欧盟药敏试验标准委员会建议,采用微量肉汤稀释法进行药敏实验。挑取接种在 TSB 平板上的单个菌落于生理盐水混匀,使用 DensiCHEK™ Plus 比浊仪(生物梅里埃美国股份有限公司)配制 0.5 麦氏标准菌液。TSB 液体培养基稀释菌液至  $5 \times 10^3$  CFU/mL,配制 10 mg/mL I3A,在 96 孔板中,第一孔加 200  $\mu$ L 菌液,其余孔加入 100  $\mu$ L 菌液,加入药物使第一孔药物浓度是 1 024  $\mu$ g/mL,并进行倍比稀释。另外设置 100  $\mu$ L 菌液作为阳性对照,放入 37 °C 培养箱 24 h,观察不出现浑浊沉淀的最低药物浓度即为最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。

#### 1.3.2 平板计数

通过微量肉汤试验,将志贺菌 sf301 在 TSB 液体培养基中 37 °C 孵育 24 h。取 1 mL 菌液,4 000 r/min、4 °C 离心 5 min,取 20 mL TSB 液体培养基重悬混匀,分装 4 个 10 mL 离心管,加入 I3A 使其浓度依次为 0、64、128、256  $\mu$ g/mL,混匀加入到 24 孔细菌培养板中,并在 37 °C 共培养 2 h,使用 iMark 酶标仪(Bio-Rad 公司)检测共培养后菌悬液 600 nm 处的吸光度( $A_{600}$ ),将细菌悬液混合,10 倍梯度稀释,取 100  $\mu$ L 涂布在 TSB 平板上,37 °C 孵育 24 h。最后,计数平板上志贺菌的菌落数以量化 I3A 的抗菌能力。

### 1.4 动物模型建立及给药

C57BL/6J 小鼠饲养于徐州医科大学实验动物中心,动物房室温 25 °C,湿度 40%–70%,给予 12 h 昼夜交替光源,标准实验室灭菌饲料,自由进食和饮水,实验前适应环境 3 d。

将 18 只小鼠随机分成 3 个不同的组:NC

组、SF301 组和 SF301+I3A 组,每组 6 只。感染前 3 d 开始给 SF301+I3A 组连续 8 d 进行 200  $\mu$ L/d 的 I3A (10 mg/mL)灌胃处理,每天灌胃 1 次<sup>[20]</sup>,NC 组和 SF301 组则同时进行 200  $\mu$ L 无菌水灌胃处理。第 0 天,给 SF301 组和 SF301+I3A 组每只小鼠灌胃  $5 \times 10^8$  CFU/200  $\mu$ L 志贺菌悬液制备志贺菌感染性结肠炎模型,自感染之日起每日记录小鼠体重、粪便、存活情况,体重和疾病活动指数(DAI)用于评价小鼠的感染状况。于感染后 5 d 处死小鼠,并收集小鼠的结肠组织、盲肠内容物和粪便,取肛门至回盲部段结肠,测量长度后沿肠系膜侧剖开结肠,取中段结肠用 4%甲醛固定以进行组织学观察,下段结肠–80 °C 保存,待测肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)等炎性细胞因子含量。

将 10 只小鼠随机分成 2 个不同的组:NC 组, I3A 组,每组 5 只, I3A 组小鼠连续 14 d 进行 200  $\mu$ L/d 的 I3A (10 mg/mL)灌胃处理,每天灌胃 1 次,每天观察小鼠体重、行为状态。

### 1.5 检测指标

#### 1.5.1 DAI 评分

灌胃志贺菌后,观察并记录小鼠体重、大便性状、便血情况,依据体重下降百分率(体重不变为 0, 1%–5%为 1 分, 5%–10%为 2 分, 10%–15%为 3 分, 大于 15%为 4 分)、大便黏稠度(正常为 0, 松软大便为 2 分, 腹泻为 4 分)和大便出血(正常 0 分, 隐血阳性为 2 分, 显性出血为 4 分)3 种情况进行综合评分,将 3 项结果的总分除以 3 即得到 DAI 值。即  $DAI = (\text{体重指数} + \text{大便形状} + \text{出血情况}) / 3$ 。

#### 1.5.2 观察结肠长度及组织样本处理

在感染后 5 d 脱颈椎处死小鼠,剖腹观察结肠外观,取肛门至回盲部段结肠,测量长度。

取小鼠中段结肠,用4%多聚甲醛固定24 h,之后将固定的结肠组织流水冲洗24 h,再用70%乙醇/80%乙醇/90%乙醇/无水乙醇/无水乙醇进行梯度脱水,接着将结肠组织置于二甲苯 I /二甲苯 II 中各 10 min,之后进行浸蜡、包埋,最后切片进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,光学显微镜下观察结肠黏膜受损的范围、程度及炎性细胞浸润的情况。

### 1.5.3 检测盲肠内容物和粪便中的志贺菌菌量

将收集到的盲肠内容物与粪便称重,加入1 mL 无菌 PBS 匀浆,混匀作为原液,用无菌 PBS 做 10 倍梯度稀释,取原液、稀释 10、100 倍的组织悬液 100  $\mu$ L 涂布在 TSB 平板上,37  $^{\circ}$ C 孵育 24 h,计数平板上志贺菌的菌落形成单位(colony forming unit, CFU),结果以  $\log_{10}$ (CFU/g) 表示。

### 1.5.4 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)定量检测炎性细胞因子

使用总 RNA 提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)根据制造商的规程提取下段结肠的总 RNA。根据说明书,使用 Ultra SYBR 混合物(北京康为试剂生物有限公司)和特异引物通过 qPCR (Roche 公司)定量检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达水平。将基因表达相对  $\beta$ -actin 标准化并通过  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算目的基因的相对表达量。不同细胞因子的 PCR 引物对:TNF- $\alpha$ :5'-GATCGGTCCCCAAAGGGATG-3'和 5'-TTTGCTACGACGTGGGCTAC-3';IL-6:5'-AGACAAAGCCAGAGTCCTCAG-3'和 5'-GAGCATTGGAAATTGGGGTAGG-3'。

### 1.6 统计学分析

使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计学分析。数据用平均值 $\pm$ SEM 表示。两组之间的比较采用 *t* 检验或 Mann-Whitney 检验,这取决于数据是否为正态分布。采用单因素多重方差分析(ANOVA)或 Kruskal-Wallis 方法检验多组

间的统计学意义。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 I3A 体外抗菌活性试验

根据检测,I3A 对志贺菌的 MIC 为 128  $\mu$ g/mL。根据共培养涂布结果,64、128、256  $\mu$ g/mL I3A 与 NC 组的细菌量差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ) (图 1A–B)。此外,64、128、256  $\mu$ g/mL I3A 与志贺菌共培养 2 h 后,志贺菌的  $A_{600}$  明显降低,与 NC 组相比,差异均有统计学意义( $P < 0.000 1$ )。图 1 显示了不同浓度的 I3A 对菌株生长的影响,细菌量和  $A_{600}$  均显示,I3A 在 256  $\mu$ g/mL 的剂量下,志贺菌的载量下降幅度最大。

### 2.2 I3A 减轻志贺菌引起的结肠炎小鼠的临床症状

为了探究 I3A 在志贺菌引起的结肠炎中的意义,我们给予小鼠 200  $\mu$ L 10 mg/mL 的 I3A 进行 3 d 的灌胃预处理,并在第 0 天灌胃  $5 \times 10^8$  CFU/小鼠志贺菌悬浮液以诱导结肠炎的发生,之后持续 I3A 灌胃干预到小鼠处死前 1 d (图 2A)。SF301 组小鼠的体重较 SF301+I3A 组小鼠发生了比较剧烈的波动,又由于黏液脓血的粪便,导致 SF301 组小鼠的 DAI 评分骤增,波动剧烈。然而,用 I3A 处理的志贺菌感染小鼠显示的临床症状呈现缓解的趋势,小鼠的体重变化更为接近 NC 组(图 2C),DAI 评分也波动平缓(图 2D)。另外,I3A 并未对小鼠的状态、体重产生显著影响,我们认为 I3A 可能具有生物安全性(图 2B)。

### 2.3 I3A 改善结肠黏液屏障

为进一步评价 I3A 对志贺菌引起的结肠炎的影响,我们提取各组小鼠的结肠部分测量其长度,并通过 HE 染色观察小鼠结肠的病理情况。肉眼观察 SF301 组小鼠结肠损伤严重,有出血变化,而 I3A 处理之后的小鼠结肠损伤得到明显缓解,形似 NC 组。与 NC 组  $6.580 0 \pm 0.425 9$  cm

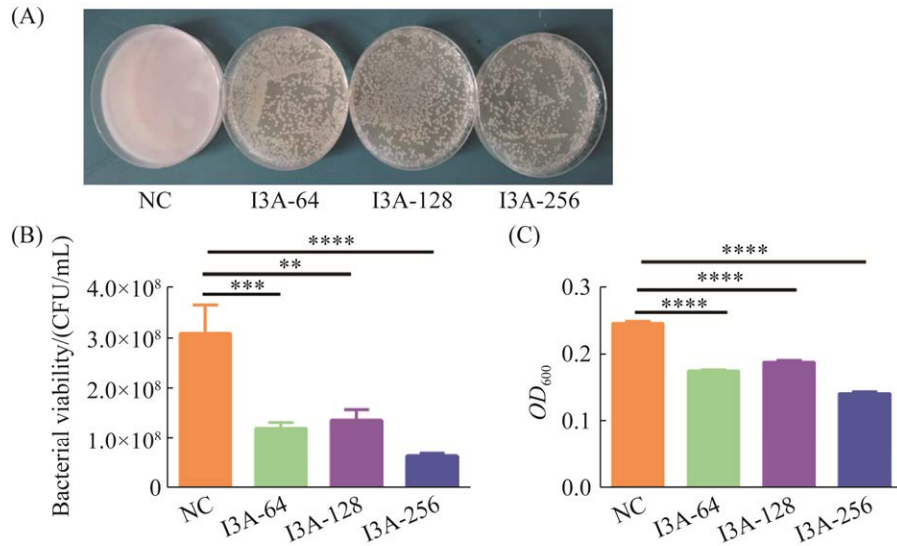


图 1 I3A 在不同浓度(0、64、128、256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )条件下对志贺菌的抗菌活性

Figure 1 Antibacterial activity of I3A against *Shigella* at different concentrations (0, 64, 128, 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A: depiction of colony forming units (CFU) by plate count method; B: the number of colonies of *Shigella*; C:  $A_{600}$  co-cultured with *Shigella* at different concentrations of I3A for 2 h. \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

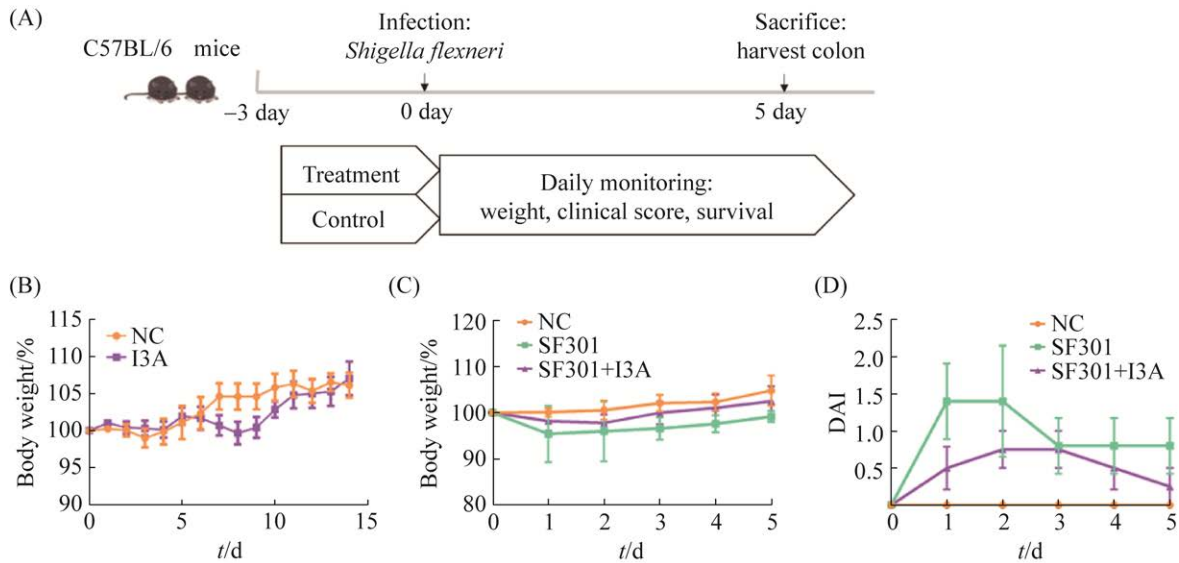


图 2 小鼠模型的建立及各组小鼠体重、疾病活动指数评分变化

Figure 2 Establishment of mouse model and changes in body weight and disease activity index scores of mice in each group. A: establishment of a *Shigella*-infected colitis mouse model: each mouse was pre-gavaged with 200  $\mu\text{L}$  of 10 mg/mL I3A for 3 consecutive days, followed by intragastric administration of  $5 \times 10^8$  CFU of *Shigella*, and I3A was administered again by intragastric administration for 5 days. B: body weight of mice in NC group and I3A group ( $AV \pm SE$ ,  $n=5$ ). C: body weight of mice in NC group, SF301 group and SF301+I3A group ( $AV \pm SE$ ,  $n=6$ ). D: disease activity index score ( $AV \pm SE$ ,  $n=6$ ).

相比, SF301 组  $6.100 0 \pm 0.077 4$  cm 和 SF301+I3A 组  $5.980 0 \pm 0.287 1$  cm 小鼠结肠长度无统计学差异 ( $P > 0.05$ ) (图 3A–B)。

HE 染色显示 SF301 组小鼠结肠组织严重受损, 上皮细胞脱落, 杯状细胞减少, 中性粒细胞浸润, 肠腔内有渗出物。相比之下, 用 I3A 治疗的小鼠肠道表现出明显的缓解(图 3C), 因此 I3A 可以改善志贺菌引起的结肠炎的肠道黏液屏障。

#### 2.4 I3A 降低体内志贺菌负荷

根据 I3A 在体外的抗菌活性, 我们推测 I3A 在体内可以抑制志贺菌, 从而促进其对志贺菌引起的结肠炎的保护作用, 因此我们测试了粪便和盲肠内容物中志贺菌的含量。在盲肠内容物中, SF301+I3A 组小鼠的志贺菌载量的对数值为  $2.556 0 \pm 0.229 3$ , 显著少于 SF301 组  $3.485 0 \pm 0.105 5$

( $P < 0.05$ ); 在粪便中 SF301+I3A 组的细菌载量的对数值  $3.347 0 \pm 0.285 6$  也显著低于 SF301 组的  $5.340 0 \pm 0.171 8$  ( $P < 0.05$ ) (图 4)。

#### 2.5 I3A 减少炎性细胞因子的表达

炎症因子的变化通常意味着炎症进展的变化。为检测 I3A 是否能降低肠炎性细胞因子的表达以保护肠黏膜, 定量分析结肠组织中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达水平。根据表 1, 对于 IL-6 的相对表达量, 与 NC 组  $1.008 00 \pm 0.075 52$  相比, SF301 组  $1.998 00 \pm 0.236 20$  明显升高 ( $P < 0.01$ ), 而 SF301+I3A 组  $1.231 00 \pm 0.193 10$  明显降低 ( $P < 0.05$ )。同样, TNF- $\alpha$  的相对表达量, SF301 组  $1.892 00 \pm 0.105 00$  明显高于 NC 组  $1.009 00 \pm 0.060 89$  ( $P < 0.000 1$ ), 而 I3A 处理后为  $1.343 00 \pm 0.116 70$ , 明显降低 ( $P < 0.01$ ) (图 5)。因此, I3A 在志贺菌感染中的积极作用与细胞因子密切相关。

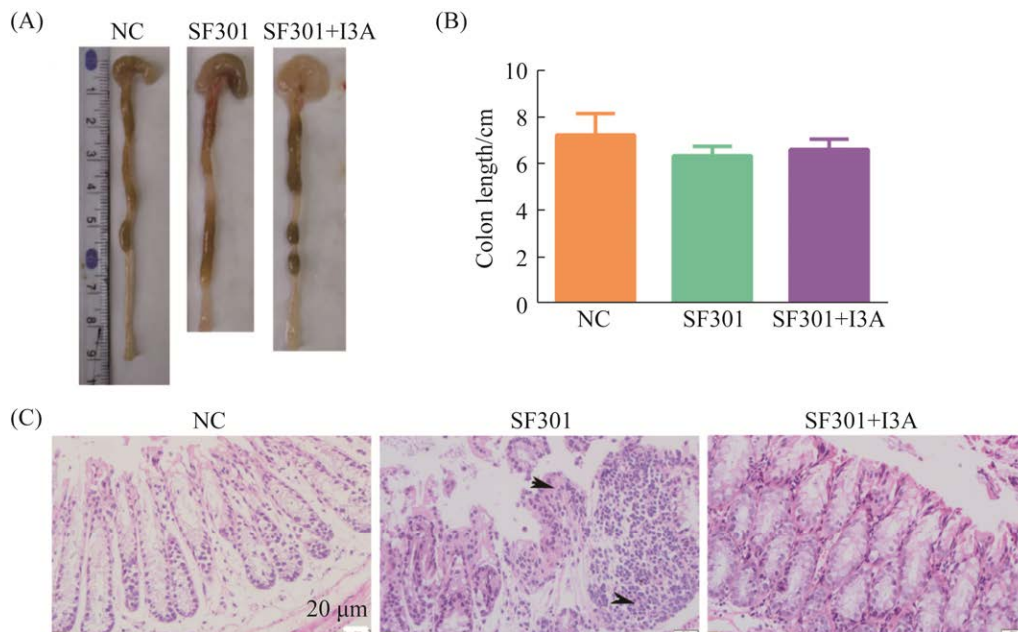


图 3 各组小鼠结肠形态和病理变化比较

Figure 3 Comparison of colon morphology and pathological changes of mice in each group. A: mouse colon morphology. B: mouse colon length ( $AV \pm SE$ ,  $n=6$ ). C: pathological images of HE staining and histopathological scoring of mouse colon tissue, arrows indicate infiltration of inflammatory cells and disappearance of goblet cells.



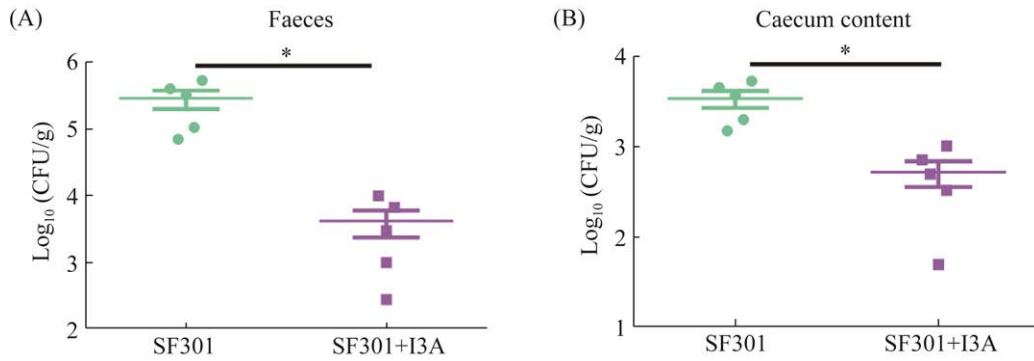


图 4 各组粪便和盲肠内容物载菌量比较

Figure 4 Comparison of bacterial load in feces and caecal contents in each group (AV±SE,  $n=6$ ). A: faecal bacterial counts; B: bacterial count of caecum contents. \*:  $P<0.05$ .

表 1 I3A 对小鼠结肠中 IL-6、TNF- $\alpha$  表达的影响

Table 1 The effect of I3A on the expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  in mouse colon

Groups	IL-6	TNF- $\alpha$
NC group	1.008 00±0.075 52 ( $n=5$ )	1.009 00±0.060 89 ( $n=6$ )
SF301 group	1.998 00±0.236 20 ( $n=5$ )	1.892 00±0.105 00 ( $n=6$ )
SF301+I3A group	1.231 00±0.193 10 ( $n=4$ )	1.343 00±0.116 70 ( $n=6$ )

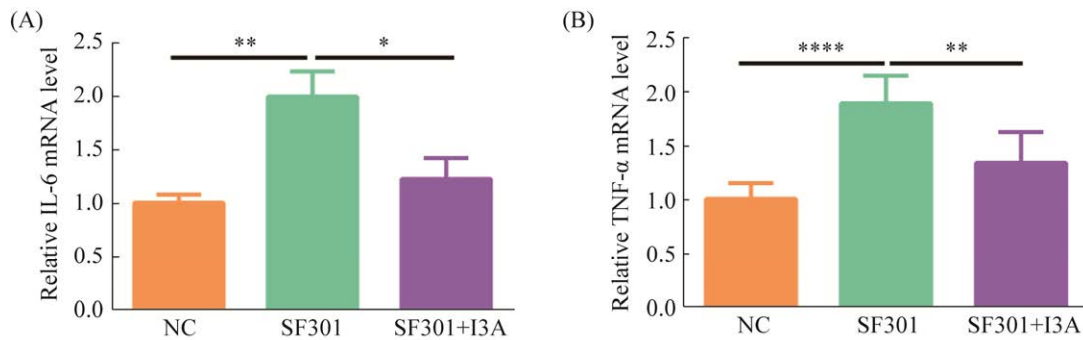


图 5 结肠组织中炎症细胞因子的表达水平分析

Figure 5 Analysis of the expression levels of inflammatory cytokines in colon tissue. A: IL-6 mRNA levels in the colon of each group; B: TNF- $\alpha$  mRNA levels in the colon of each group. \*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*\*:  $P<0.0001$ .

### 3 讨论与结论

最近, 志贺菌与肠道菌群之间的联系引起了科学家们的兴趣。肠道微生物群的作用也已被初步研究。然而, 肠道菌群分泌什么样的代谢物尚不清楚, 肠道代谢物与志贺菌感染的肠道反应及机制仍有待进一步探索<sup>[21]</sup>。研究表明,

肠道代谢物 I3A 对肠炎有缓解作用<sup>[19]</sup>。因此, 我们推测 I3A 可以降低志贺菌引起的结肠炎的免疫反应, 保护肠黏膜免受志贺菌的侵袭。我们首先在体外测试了 I3A 对志贺菌的抗菌活性, 然后建立了志贺菌诱导的结肠炎小鼠模型, 并比较了 I3A 治疗后小鼠临床症状和结肠病理学的变化。



结果证明 I3A 能显著抑制志贺菌并缓解志贺菌引起的结肠炎小鼠的临床症状。在体外抑菌实验中, I3A 的 MIC 被确定为 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 抗菌活性检测实验也证明 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度是 I3A 作用的转折点, 尽管在 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度间未呈现梯度作用, 但这 2 个浓度的细菌量间并未呈现统计学差异, 因此我们将着重考虑 I3A 在 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度下的抑菌意义。体内实验中, SF301+I3A 组小鼠体重下降缓慢, DAI 曲线较未经 I3A 处理的志贺菌组更平滑, 直接反映了 I3A 对志贺菌所致结肠炎的保护作用。肉眼观小鼠结肠的状态, I3A 明显缓解了志贺菌对结肠的损伤, 减少结肠出血。组织切片的病理分析表明, 结肠上皮细胞的肠黏液屏障在志贺菌的侵袭下被破坏, 是结肠的第一道防线<sup>[22]</sup>。上皮细胞大量脱落, 包括许多能分泌黏液成分的细胞(如分泌肠黏液骨架成分的杯状细胞: MUC2 黏蛋白<sup>[23]</sup>), 肠渗出液异常增多, 上皮层脱落, 肠道发生急性炎症反应。感染部位聚集中性粒细胞, 肠道上皮细胞排列整齐性被破坏, 最终导致志贺菌穿过上皮屏障进入下一层组织<sup>[24-25]</sup>。而我们证明 I3A 在志贺菌感染中可以减少炎症细胞的浸润以及保护肠道屏障的完整性和紧密性, 因此志贺菌入侵停留在肠道内, 不会通过破坏肠黏膜进一步损伤肠道组织。

我们进一步研究了 I3A 作用的可能机制。我们检测了小鼠粪便和盲肠内容物中志贺菌的变化, 发现志贺菌负荷降低, 这与体外实验相似。因此, I3A 可能直接作用于志贺菌, 减少志贺菌代谢物对肠黏膜的损伤和毒性。此外, 志贺菌诱导的细胞死亡已被确定为与炎症反应相关的程序性细胞死亡。巨噬细胞响应志贺菌产生的促炎细胞因子是强烈炎症的罪魁祸首<sup>[26]</sup>。在急性炎症过程中, 活化的巨噬细胞释放 TNF- $\alpha$ , 可诱导白细胞粘附和聚集, 引起炎症<sup>[27-28]</sup>。

TNF- $\alpha$  在结肠炎中具有不可替代的促炎作用。研究人员曾尝试使用抗 TNF- $\alpha$  药物来缓解结肠炎<sup>[29]</sup>。IL-6 在中性粒细胞募集中起重要作用, 促进炎症的发生和发展, 加重机体的免疫反应<sup>[30]</sup>。IL-6 和 TNF- $\alpha$  也是诱导 Th17 (对志贺菌免疫反应的重要炎症细胞)的主要执行细胞因子<sup>[31]</sup>, 因此它们在志贺菌感染和炎症中非常重要。此外, 研究表明, TNF- $\alpha$  和 IL-6 都是志贺菌引起结肠炎发生机制中必不可少的细胞因子<sup>[32]</sup>。综上所述, 这些细胞因子的水平可以表征结肠炎的病程。我们的研究表明, I3A 可以降低这些促炎因子的 RNA 水平。这或许也是 I3A 在志贺菌感染性结肠炎中缓解肠道损伤的原因。另外, 我们检测了 I3A 的安全性, I3A 并未对小鼠的体重产生显著影响, 并且行为状态均正常, 这证明 I3A 可能不具有生物毒性<sup>[33]</sup>。

综上所述, 我们在此证明了 I3A 在志贺菌引起的结肠炎期间可以保护肠道, 并阐明了 I3A 可能的保护机制: 直接减少志贺菌的侵袭和调节炎症因子的水平。如今, 肠道菌群与疾病的发展密切相关。从肠道菌群的角度, 治疗志贺菌引起的结肠炎, 引导肠道代谢物的变化, 探索抑制结肠炎发生发展, 改善其病理现象的作用和机制。本研究对于发现对志贺菌感染具有保护作用的相关肠道菌群代谢物, 促进疾病治疗的发展具有重要意义。

## 参考文献

- [1] Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, Levine MM. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bulletin of the World Health Organization*, 1999, 77(8): 651-666.
- [2] Bardhan P, Faruque ASG, Naheed A, Sack DA. Decrease in shigellosis-related deaths without *Shigella* spp.-specific interventions, Asia. *Emerging Infectious Diseases*

- Diseases*, 2010, 16(11): 1718–1723.
- [3] Phalipon A, Sansonetti PJ. *Shigella's* ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival? *Immunology and Cell Biology*, 2007, 85(2): 119–129.
- [4] Sansonetti PJ, Arondel J, Cantey JR, Prévost MC, Huerre M. Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. *Infection & Immunity*, 1996, 64(7): 2752–2764.
- [5] Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*, 1992, 358(6382): 167–169.
- [6] Bernardini ML, Mounier J, d'Hauteville H, Coquis-Rondon M, Sansonetti PJ. Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *PNAS*, 1989, 86(10): 3867–3871.
- [7] Sellge G, Magalhaes JG, Konradt C, Fritz JH, Salgado-Pabon W, Eberl G, Bandeira A, Di Santo JP, Sansonetti PJ, Phalipon A. Th17 cells are the dominant T cell subtype primed by *Shigella flexneri* mediating protective immunity. *Journal of Immunology*, 2010, 184(4): 2076–2085.
- [8] Tan YT, Tillett DJ, McKay IA. Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. *Molecular Medicine Today*, 2000, 6(8): 309–314.
- [9] Hawkey PM. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. *British Journal of Pharmacology*, 2008, 153(Suppl 1): S406–S413.
- [10] Kotloff KL, Riddle MS, Platts-Mills JA, Pavlinac P, Zaidi AKM. Shigellosis. *The Lancet*, 2017: 801–812.
- [11] Zackular JP, Baxter NT, Iverson KD, Sadler WD, Petrosino JF, Chen GY, Schloss PD. The gut microbiome modulates colon tumorigenesis. *mBio*, 2013, 4(6): e00692-13.
- [12] Gao J, Xu K, Liu HN, Liu G, Bai MM, Peng C, Li TJ, Yin YL. Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 13.
- [13] Ganji-Arjenaki M, Rafieian-Kopaei M. Probiotics are a good choice in remission of inflammatory bowel diseases: a meta analysis and systematic review. *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 233(3): 2091–2103.
- [14] Paramsothy S, Kamm MA, Kaakoush NO, Walsh AJ, Van Den Bogaerde J, Samuel D, Leong RWL, Connor S, Ng W, Paramsothy R, Xuan W, Lin E, Mitchell HM, Borody TJ. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2017, 389(10075): 1218–1228.
- [15] Wang CZ, Yao HQ, Zhang CF, Chen LN, Wan JY, Huang WH, Zeng JX, Zhang QH, Liu Z, Yuan JB, Bi Y, Sava-Segal C, Du W, Xu M, Yuan CS. American ginseng microbial metabolites attenuate DSS-induced colitis and abdominal pain. *International Immunopharmacology*, 2018, 64: 246–251.
- [16] Lamas B, Richard ML, Leducq V, Pham HP, Michel ML, Da Costa G, Bridonneau C, Jegou S, Hoffmann TW, Natividad JM, Brot L, Taleb S, Couturier-Maillard A, Nion-Larmurier I, Merabtene F, Seksik P, Bourrier A, Cosnes J, Ryffel B, Beaugerie L, Launay JM, Langella P, Xavier RJ, Sokol H. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nature Medicine*, 2016, 22(6): 598–605.
- [17] Marsland BJ. Regulating inflammation with microbial metabolites. *Nature Medicine*, 2016, 22(6): 581–583.
- [18] Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Pieraccini G, Zecchi R, D'Angelo C, Massi-Benedetti C, Fallarino F, Carvalho A, Puccetti P, Romani L. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*, 2013, 39(2): 372–385.
- [19] Teng Y, Ren Y, Sayed M, Hu X, Lei C, Kumar A, Hutchins E, Mu J, Deng Z, Luo C, Sundaram K, Sriwastva MK, Zhang L, Hsieh M, Reiman R, Haribabu B, Yan J, Jala VR, Miller DM, Van Keuren-Jensen K, Merchant ML, McClain CJ, Park JW, Egilmez NK, Zhang HG. Plant-derived exosomal microRNAs shape the gut microbiota. *Cell Host Microbe*, 2018: 24.
- [20] Swimm A, Giver CR, DeFilipp Z, Rangaraju S, Sharma A, Ulezko Antonova A, Sonowal R, Capaldo C, Powell D, Qayed M, Kalman D, Waller EK. Indoles derived from intestinal microbiota act via type I interferon signaling to limit graft-versus-host disease. *Blood*, 2018, 132(23): 2506–2519.
- [21] Baker S, Hao CT. Recent insights into *Shigella*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2018, 31(5): 1.
- [22] Martens EC, Neumann M, Desai MS. Interactions of commensal and pathogenic microorganisms with the intestinal mucosal barrier. *Nature Reviews*

- Microbiology*, 2018, 16(8): 457–470.
- [23] Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GM, Schütte A, Van Der Post S, Svensson F, Rodríguez-Piñeiro AM, Nyström EE, Wising C, Johansson ME, Hansson GC. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological Reviews*, 2014, 260(1): 8–20.
- [24] Hermansson AK, Paciello I, Bernardini ML. The orchestra and its maestro: *Shigella*'s fine-tuning of the inflammasome platforms. *Inflammasome Signaling and Bacterial Infections*, 2016, 397: 91–115.
- [25] Liu GY, Pilla G, Tang CM. *Shigella* host: pathogen interactions: keeping bacteria in the loop. *Cellular Microbiology*, 2019, 21(11): e13062.
- [26] Ashida H, Ogawa M, Mimuro H, Sasakawa C. *Shigella* infection of intestinal epithelium and circumvention of the host innate defense system. *Molecular Mechanisms of Bacterial Infection Via the Gut*, 2009, 337(1): 231–255.
- [27] Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique*, 2000, 50(3): 184–195.
- [28] Yang H, Chen J, Shen ZW, Zhou XJ, Ji GZ. Deaggregators inhibit TNF- $\alpha$ -induced leukocyte adhesion *in vitro* by breaking up hydrophobic lipophilic interactions. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2014, 35(7): 907–915.
- [29] Pugliese D, Felice C, Papa A, Gasbarrini A, Rapaccini GL, Guidi L, Armuzzi A. Anti TNF- $\alpha$  therapy for ulcerative colitis: current status and prospects for the future. *Expert Review of Clinical Immunology*, 2017, 13(3): 223–233.
- [30] Mateer SW, Mathe A, Bruce J, Liu G, Maltby S, Fricker M, Goggins BJ, Tay HL, Marks E, Burns G, Kim RY, Minahan K, Walker MM, Callister RC, Foster PS, Horvat JC, Hansbro PM, Keely S. Interleukin-6 drives neutrophil-mediated pulmonary inflammation associated with bacteraemia in murine models of colitis. *American Journal of Pathology*, 2018, 188(7): 1625–1639.
- [31] Kimura A, Kishimoto T. Th17 cells in inflammation. *International Immunopharmacology*, 2011, 11(3): 319–322.
- [32] Moazzezy N, Oloomi M, Bouzari S. Effect of shiga toxin and its subunits on cytokine induction in different cell lines. *International Journal of Molecular & Cellular Medicine*, 2014, 3(2): 108–117.
- [33] Wu X, Chen Y, Zhang Y, Shan Y, Peng Z, Gu B, Yang H. Au nanoclusters ameliorate *Shigella* infectious colitis by inducing oxidative stress. *International Journal of Nanomedicine*, 2021, 16: 4545–4557.