

## • 论著 •

# 双歧杆菌干预对实验性末端回肠炎肠上皮细胞 Toll 样受体 2 和 Toll 样受体 4 表达的影响

周国华 胡咏 秦稳

**【摘要】 目的** 建立回肠-盲肠侧侧吻合术导致的实验性末端回肠炎动物模型以及双歧杆菌干预模型,观察 Toll 样受体(TLR)2 和 TLR4 在双歧杆菌干预下的表达,研究双歧杆菌对实验性末端回肠炎的保护作用。**方法** 清洁级 SD 雄性大鼠 100 只,随机分为五组:正常对照组(A)、模型对照组(B)、双歧杆菌低剂量干预组(C)、中剂量干预组(D)及高剂量干预组(E),每组 20 只。观察这五组大鼠末端回肠的炎症情况,行镜下肠组织病理学评分(HS),使用免疫组化法检测各组末端回肠黏膜中 TLR2、TLR4 的表达。**结果** (1)肉眼观察,模型对照组与双歧杆菌干预组及空白对照组相比,炎症评分有统计学差异( $P < 0.05$ )。(2)镜下观察,模型对照组与双歧杆菌干预组及空白对照组相比,炎症评分差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。(3)造模对照组肠上皮细胞 TLR2 和 TLR4 的平均吸光度值较其余四组高( $P < 0.05$ );在双歧杆菌干预下,干预组 TLR2 和 TLR4 的平均吸光度值低于 B 组( $P < 0.05$ )。**结论** 使用双歧杆菌干预可降低实验性末端回肠炎肠组织 TLR2、TLR4 的表达,双歧杆菌对实验性末端回肠炎有保护作用。

**【关键词】** 回肠炎; Toll 样受体 2; Toll 样受体 4; 双歧杆菌

**The protective effect of bifid bacteria on roles of TLR2 and TLR4 in rat model of experimental terminal ileitis** ZHOU Guo-hua, HU Yong, QIN Wen. Department of Gastroenterology, The 169th Hospital of PLA, Hengyang 421002, China

Corresponding author: ZHOU Guo-hua, Email: zgh1691@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To establish the ileum-caecus side-to-side intestinal anastomosis induced SD mouse experimental terminal ileitis (ETI) model and the bifid bacteria intervention model, to study the expression of TLR2 and TLR4 in ETI with or without bifid bacteria and study bifid bacteria's effects in ETI. **Methods** One hundred healthy male SD rats were randomly assigned into five groups, namely the normal control group (A), the ETI model group (B), the low bifid bacteria given group (C), the middle bifid bacteria given group (D) and the high bifid bacteria given group (E). Firstly, the experimental groups were observed the tissue's general macroscopic view, then the tissues were fixed 10% neutral formalin, taken HE and immunohistochemistry stain, embedded in paraffin for blinded histological analysis, to observe the positive expression of TLR2 and TLR4. **Results** Compared B with other groups the HS score was significant different at the same time ( $P < 0.05$ ). Compared B with other groups TLR2 and TLR4 positive expression were increased ( $P < 0.05$ ), but the positive expressions of group C-E TLR2 and TLR4 were lower than group B ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Using bifid bacteria can significantly reduce the expression of TLR2 and TLR4 in ETI intestinal tissue, bifid bacteria has a protective effect in rat of ETI.

**【Key words】** Ileitis; Toll-like receptor-2; Toll-like receptor-4; Bifid bacterium

慢性末端回肠炎是一种病因不明的肠道慢性非特异性炎症性疾病。临床上以腹痛(以右下腹痛为主)、腹泻与便秘交替等为主要症状。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是先天性免疫系统中的细胞跨膜受体及病原模式识别受体之一,它可以识别许多病原微生物保守的病原相关分子模式(pathogen associated molec-

ular patterns, PAMPs),可表达于肠道黏膜的多种细胞中,主要参与病原微生物产物的识别及炎症信号传导<sup>[1]</sup>。由于 TLRs 为一种重要的病原模式识别受体,故与生物体内各种肠道微生物的关系显得尤为重要。正常情况下,健康人体内的肠道菌群相对稳定,它们通过与宿主之间的动态性生理作用,有效防止肠道内细菌及内毒素易位。当正常的微生物群落受宿主及外环境影响,原先的平衡遭到破坏,可使宿主致病<sup>[2]</sup>。许多临床研究将益生菌作为治疗或辅助治疗慢性末端回肠炎的重要手段,并发现其具有积极作用。本实验拟予双

歧杆菌干预回肠-盲肠侧侧吻合术诱导的大鼠实验性末端回肠炎模型,观察肠黏膜病理炎症改变以及 TLRs 表达的变化,了解肠黏膜 TLR2、TLR4 表达的变化情况,以探讨双歧杆菌对慢性末端回肠炎的干预作用,为慢性末端回肠炎提供新的治疗靶点。

## 材料和方法

### 一、材料

1. 实验动物:健康、清洁级 SD 大鼠 100 只,均为雄性,体重为 250 ~ 350 g,均由南华大学动物实验部提供。饲养温度为(20 ± 1) °C,湿度 50%,光照每 12 h 明暗交替,通风 8 ~ 15 次/h。

2. 主要仪器和试剂:光学显微镜、显微照相机:日本 Olympus Bx51 型;兔抗鼠 TLR-2、TLR-4 多克隆抗体:英国 Abcam 公司;免疫组化染色试剂盒:美国 ZYMED 公司,SP-0023。

### 二、方法

1. 大鼠分组及手术方法:将 100 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组:正常对照组(A)、模型对照组(B)、双歧杆菌低剂量组(C)、双歧杆菌中剂量组(D)、双歧杆菌高剂量组(E)每组 20 只,2、8 周各 10 只。术前禁食 12 h 并按 2 ml/100 g 给予盐酸氯胺酮腹腔注射麻醉。剖腹后寻找回盲部,造模组采用回肠末端-盲肠侧侧吻合术,术后关腹并用碘附消毒。术后 2 d 禁食,只进水,第 3 天开始给平时进食量的 1/3,术后 1 周进食量约为平时进食量的 3/4,1 周后给予平时进食量。双歧杆菌干预组手术操作同模型对照组,术后当日分别给予 C、D、E 三组大鼠 1 ml 浓度为 10<sup>6</sup> cfu/ml、10<sup>8</sup> cfu/ml、10<sup>10</sup> cfu/ml 双歧杆菌菌悬液灌胃处理。A、B 两组每日 10% 脱脂乳 1 ml 灌胃作为对照。

2. 标本的制备:以上实验动物经过以上处理后,于造模的第 2 周与 8 周禁食、不禁水 12 h,将大鼠分批处死,迅速剖取回肠末端组织,将结肠组织标本冲洗干净,肉眼、镜下观察末端回肠黏膜组织病理炎症情况以及各期组织炎症状况。对末端回肠组织石蜡切片并行苏木素伊红(hematoxylin eosin, HE)染色。回肠组织损伤大体形态和组织学形态评分方法参照 Theresa 的评估标准<sup>[3]</sup>。肉眼评估:0,无明显改变;1,中等;2,严重。依据下列参数:红斑,出血,水肿,狭窄的出现,黏液分泌物的出现,溃疡,黏连,各指标相加总得分为肉眼炎症分数。镜下评估:0、1、1 分。经过常规的组织化学处理的回肠横切面,每个动物的相邻的三张切片,每张切片观察不同的三个横断面,下列参数:中性粒细胞浸润,中性粒细胞浸润的距离,黏膜下的厚度,出血,绒毛面的损害,中央乳糜管的膨胀。每个参数加在一起得

到一个总数为镜下炎症分数。常规石蜡切片并免疫组化法测末端回肠组织中 TLR-2、TLR-4 的表达。

3. IHC 结果判定阳性信号及平均吸光度值的测定:IHC 结果判定阳性信号为棕黄色颗粒,随机选 10 个视野(×400),电子显微镜下摄取数码照片,将图片输入计算机,应用 Image ProPlus 图像分析软件进行半定量分析,得出平均吸光度值。计算 10 个高倍视野的均数即代表该样本阳性细胞平均吸光度值。平均吸光度值越大,表达越强。

### 三、统计学分析

所有实验数据均进行正态性检验,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,均数比较前先进行 Levene 方差齐性检验(以  $\alpha = 0.1$  为检验水准,当  $P > 0.1$  时,认为方差齐),两样本比较时,方差齐同者采用  $t$  检验,方差不齐者采用 Satterthwaite 近似  $t$  检验;多个样本均数比较及样本均数间的多重比较时,运用完全随机设计资料的方差分析(One-Way ANOVA)进行统计分析,各组间方差齐同时用 LSD 法进行均数间的两两比较,各组方差不齐时用 Dunnett T3 法进行均数间的两两比较。计数资料采用  $\chi^2$  检验。以  $\alpha = 0.05$  为检验水准,当  $P < 0.05$  时,认为有统计学意义。全部统计资料均应用 SPSS 15.0 统计软件处理完成。

## 结 果

1. 末端回肠组织大体肉眼观察(表 1):2 周时,B 组与 C、D、E 组末端回肠均出现充血、水肿等明显急性炎症反应,但 B 组较 D、E 组明显( $P < 0.05$ ),A 组末端回肠黏膜基本正常;8 周时,B 组出现肠管水肿、黏连、狭窄,少部分出现糜烂、出血,与 C、D、E 组相比评分明显增加。

表 1 实验动物末端回肠大体肉眼观评分比较(分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数		大体肉眼评分	
	2 周	8 周	2 周	8 周
A 组	10	10	0.21 ± 0.11	0.22 ± 0.12
B 组	8	9	3.44 ± 0.94 <sup>a</sup>	4.92 ± 0.75 <sup>a</sup>
C 组	9	10	3.40 ± 0.63	2.33 ± 0.24 <sup>c</sup>
D 组	10	10	2.70 ± 0.46 <sup>bd</sup>	1.66 ± 0.45 <sup>cd</sup>
E 组	10	10	2.02 ± 0.12 <sup>cde</sup>	0.88 ± 0.05 <sup>cd</sup>

注:与 A 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 B 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ,<sup>c</sup> $P < 0.01$ ;与 C 组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ ;与 D 组比较,<sup>e</sup> $P < 0.05$ ,<sup>f</sup> $P < 0.01$

2. 各组大鼠回肠末端的镜下病理观察:2 周时,A 组肠道组织学表现基本正常,而 B 组光镜下回肠末端组织有急性炎症表现,毛细血管、淋巴管、乳糜管明显扩张,炎症细胞浸润以中性粒细胞及嗜酸粒细胞为主,上皮明显脱落,绒毛变粗变短,病变主要侵及黏膜层。

C、D、E 三组镜下组织学评分表现与 B 组相比炎症病变减轻。结果表明:与 A 组相比, B 组的 HS 显著增高 ( $P < 0.01$ ); C、D 组与 B 组相比 HS 数值有所下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); E 组的 HS 明显低于 B 组 ( $P < 0.01$ )。8 周时, A 组肠道组织学表现基本正常, B 组为明显的慢性炎症反应表现:局部绒毛变粗变短部分脱落, 充血、出血, 淋巴管、乳糜管扩张, 炎症细胞浸及黏膜及黏膜下层, 黏膜下结构破坏, 毛细血管增生, 部分糜烂及浅溃疡形成。双歧杆菌干预组炎症明显减轻, 上皮基本完整, 可见成纤维细胞增生, 肠黏膜无明显充血, 局部可见糜烂, 但较模型对照组表浅, 黏膜缺失少见, 小部分腺体不完整, 炎症细胞浸润少。B 组与 C、D、E 组及 A 组相比, 评分有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组 SD 大鼠组织病理学评分比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数		HS 评分	
	2 周	8 周	2 周	8 周
A 组	10	10	1.21 ± 0.32	1.02 ± 0.34
B 组	8	9	9.02 ± 0.26 <sup>a</sup>	12.83 ± 0.63 <sup>a</sup>
C 组	9	10	7.44 ± 0.43 <sup>b</sup>	3.44 ± 0.52 <sup>b</sup>
D 组	10	10	6.29 ± 0.59 <sup>bd</sup>	2.04 ± 0.19 <sup>cd</sup>
E 组	10	10	3.36 ± 0.52 <sup>cde</sup>	2.09 ± 0.34 <sup>cd</sup>

注:与 A 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 B 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; 与 C 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$ ; 与 D 组比较, <sup>e</sup> $P < 0.01$

3. 双歧杆菌干预对各组大鼠末端回肠组织 TLR2 及 TLR4 平均吸光度值的影响: (1) TLR2: 2 周和 8 周时 B 组 TLR2 的平均吸光度值高于其他四组 ( $P < 0.05$ ), 随着干预剂量的增大, C、D、E 组 TLR2 的平均吸光度值依次减轻 (分别为  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。 (2) TLR4: 2 周和 8 周时 B 组 TLR4 的平均吸光度值均高于其余四组 ( $P < 0.05$ ), 随着干预剂量的增大, 各期 C、D、E 组 TLR4 的平均吸光度值依次减轻 (分别为  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表 3。各组 TLR2 及 TLR4

表达情况见图 1 ~ 12。

## 讨 论

肠道是人体消化吸收的场所, 健康人群的胃肠道寄居着种类繁多的微生物, 这些微生物被统称为肠道菌群。正常情况下, 肠道菌群和宿主、外界环境建立一个动态的生态平衡, 对人体的健康起着重要作用, 任何打破其内外环境的举措都可导致菌群的失调<sup>[4]</sup>。双歧杆菌是主要的益生菌之一, 参与了宿主的消化、营养、代谢、吸收、免疫及抗感染过程, 尤其在维持机体肠黏膜屏障的完整性方面起重要作用, 它能够通过免疫调节、免疫排斥和免疫清除, 加强消化道防御屏障, 发挥抗炎症、抗感染的作用<sup>[5]</sup>。越来越多的实验证实, 补充外源性双歧杆菌不仅能刺激肠道内有益菌的生长, 而且还能通过多种途径抑制致病菌的生长、黏附和侵袭, 使失调的菌群正常化, 从而增强肠屏障功能。

双歧杆菌防治肠道疾病的机制尚不完全明确, 目前对其抗感染机制的研究主要为以下三个方面: (1) 产生有机酸, 能显著降低环境中的 pH 值, 促进肠道正常菌群的定植与优化; (2) 产生类似细菌素的蛋白质, 有一定的杀菌作用; (3) 产生过氧化氢, 从而激活机体产生过氧化氢酶, 抑制和杀灭革兰阴性菌<sup>[6]</sup>。外源性双歧杆菌在肠道定植, 能拮抗潜在致病菌的过度增殖, 减少细菌和内毒素移位, 并能利用肠道谷氨酸合成谷氨酰胺, 有利于肠损伤的恢复<sup>[7]</sup>。

本实验中, 通过回肠末端-结肠侧侧吻合术建立 SD 大鼠实验性末端回肠炎模型, 结果发现: 2 周时模型对照组与干预组末端回肠均出现充血、水肿等明显急性炎症反应的表现, 但模型对照组炎症较干预组明显 ( $P < 0.05$ ); 8 周时, 模型对照组出现肠管水肿扩张、黏连、狭窄, 少部分出现糜烂等慢性炎症表现, 而干预组炎症表现明显较模型对照组轻, 且随着干预剂量的增加, 炎症逐渐减轻。由此可推测: 外源性双歧杆菌的补充, 对回肠-结肠侧侧吻合术诱导的大鼠实验性末端回肠炎的改善作用呈剂量依赖关系, 低剂量使用双歧杆

表 3 各组 SD 大鼠 2 周及 8 周末端回肠 TLR2、TLR4 平均吸光度值对比 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数		TLR2		TLR4	
	2 周	8 周	2 周	8 周	2 周	8 周
A 组	10	10	0.20 ± 0.05	0.18 ± 0.06	0.18 ± 0.05	0.18 ± 0.07
B 组	8	9	0.40 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.40 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.14 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.15 <sup>a</sup>
C 组	9	10	0.35 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.06 <sup>c</sup>	0.38 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.28 ± 0.06 <sup>c</sup>
D 组	10	10	0.33 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.12 <sup>c</sup>	0.32 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.24 ± 0.10 <sup>c</sup>
E 组	10	10	0.30 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.08 <sup>c</sup>	0.24 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.19 ± 0.07 <sup>c</sup>

注:与 A 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 B 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$



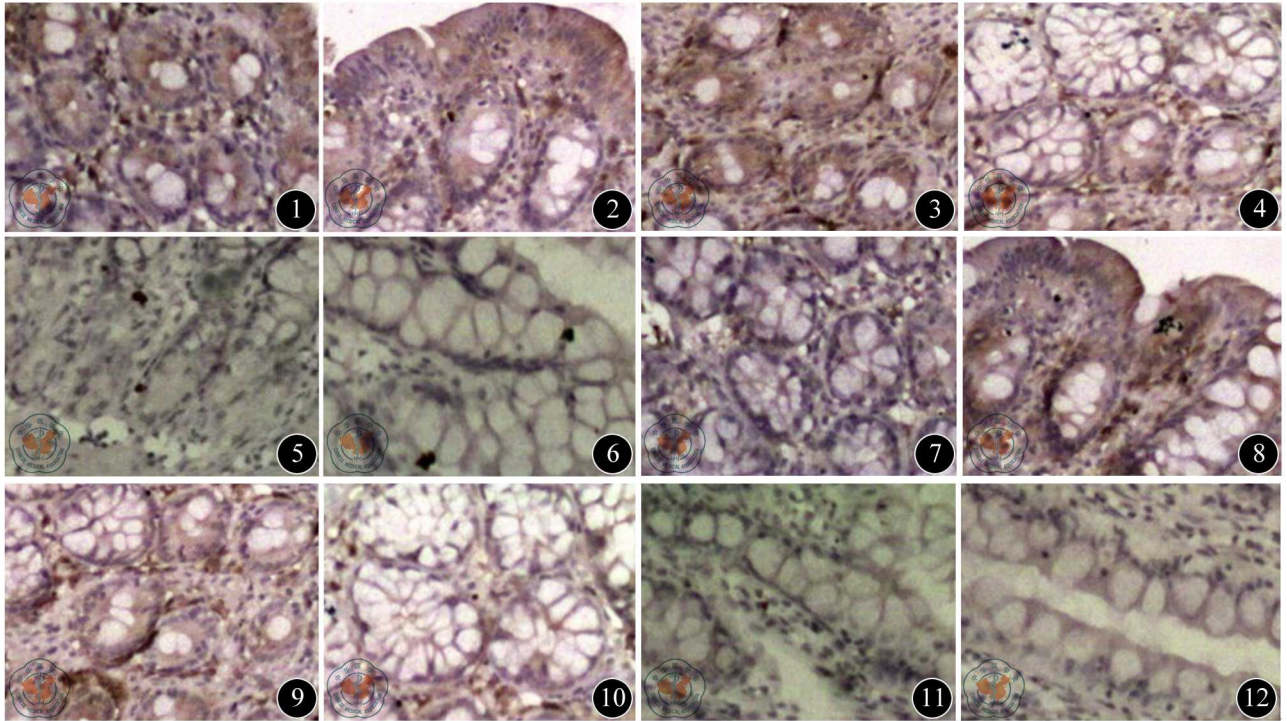


图1 模型对照组2周TLR2的表达 (IHC ×40) 图2 模型对照组8周TLR2的表达 (IHC ×40) 图3 缝线组2周TLR2的表达 (IHC ×40) 图4 缝线组8周TLR2的表达 (IHC ×40) 图5 对照组2周TLR2的表达 (IHC ×40) 图6 对照组8周TLR2的表达 (IHC ×40) 图7 模型对照组2周TLR4的表达 (IHC ×40) 图8 模型对照组8周TLR4的表达 (IHC ×40) 图9 缝线组2周TLR4的表达 (IHC ×40) 图10 缝线组8周TLR4的表达 (IHC ×40) 图11 对照组2周TLR4的表达 (IHC ×40) 图12 对照组8周TLR4的表达 (IHC ×40)

菌时对炎症有一定的抑制作用,但使用高剂量干预时对炎症的改善作用更为明显。且病理组织学评分的改善也证实了高剂量试验双歧杆菌后大鼠回肠末端组织的炎症被抑制、上皮细胞得到一定程度的修复,对末端回肠炎也具有保护作用。

TLRs是先天性受体 (innate receptor repertoire) 家族的主要成员。随着人们对TLR的研究不断深入,越来越多的TLR被不断发现,TLRs与人类疾病(包括慢性末端回肠炎)的关系现仍在进一步探索之中。TLR是参与非特异性免疫(天然免疫)的一类重要蛋白质分子,也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁,当微生物突破机体的物理屏障,如皮肤、黏膜等时,它可以识别来源于微生物的具有保守结构的分子,激活机体产生免疫细胞应答,从而在抗感染中发挥重要作用。TLR4可以识别革兰阴性菌的脂多糖<sup>[8]</sup> (lipopolysaccharide, LPS),还可识别宿主坏死细胞释放的热休克蛋白 (heat-shock proteins, HSP)<sup>[9]</sup>,体内类肝素硫酸盐和透明质酸盐降解的多糖部分以及局部的内源性酶的级联活化反应也可激活TLR4。TLR2的配体较TLR4的广泛,包括脂蛋白,脂多肽,脂壁酸(LTA)阿拉伯甘聚糖(LAM)及酵母多糖等。TLR2和TLR4均可激活NF- $\kappa$ B和MAPK两条经典信息传导通路<sup>[10]</sup>,促进多种炎症细

胞因子如IL-1、IL-2、IL-6、TNF- $\alpha$ 等的基因转录<sup>[11-12]</sup>,促进了溃疡性结肠炎时的肠内炎症反应。

正常情况下,肠黏膜上皮细胞在基底侧面主要表达TLR3和TLR5,而TLR2和TLR4则很难被检测到。王雪梅等<sup>[13]</sup>通过对Rome III诊断为肠易激综合征的患者及健康对照组进行研究时发现,肠易激综合征腹泻型患者肠黏膜TLR2及TLR4的表达均高于健康对照组。

本次研究使用免疫组化的方法检测了各组大鼠末端回肠组织TLR2及TLR4的表达水平,发现回肠-盲肠侧侧吻合术诱导的肠炎大鼠末端回肠组织TLR2、TLR4的表达明显高于正常对照组,与人类溃疡性结肠炎患者情况相似。通过实验,我们发现双歧杆菌干预后,干预组大鼠肠组织TLR2、TLR4表达明显低于模型对照组。说明双歧杆菌干预可影响TLRs受体的阳性表达。无论使用低剂量、中剂量还是高剂量的双歧杆菌干预,大鼠末端回肠组织的TLR2及TLR4的表达均可降低,并且随着双歧杆菌干预剂量的增大,TLR2及TLR4的表达依次降低,这一现象说明双歧杆菌与TLR2、TLR4的表达的降低存在某种关联。因此我们推测,TLR2和TLR4在实验性末端回肠炎的发病中有可能起一定的作用,即当肠黏膜受到细菌等毒素攻击的时候,TLRs

迅速识别相应配体的 PAMPs,启动信号转导及各种免疫应答,最终造成肠黏膜的炎性反应。而双歧杆菌可阻断或抑制 TLR2 和 TLR4 的信号转导及免疫应答。

### 参 考 文 献

- [1] Toiyama Y, Araki T, Yoshiyama S, et al. The expression patterns of Toll-like receptors in the ileal pouch mucosa of postoperative ulcerative colitis patients. *Surg Today*, 2006, 36:287-290.
- [2] 刘重阳, 陈东. 肠道菌群在炎症性肠病发病中的作用. *重庆医学*, 2009, 38:1251-1253.
- [3] Wu TF, Carati CJ, Macnaughton WK, et al. Contractile activity of lymphatic vessels is altered in the TNBS model of guinea pig ileitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 291:566-574.
- [4] 王晓华, 夏文涵, 王晓刚, 等. 肠道菌群失调症的研究进展. *实用临床医学*, 2007, 8:136-138.
- [5] Alvarez-Olmos MI, Oberhelman RA. Probiotic agents and factious disease: a modern perspective a traditional therapy. *Clin Infect Dis*, 2001, 32:1567.
- [6] 梁冰, 吴力克, 姜峰, 等. 双歧杆菌 QJ405 乳杆菌 QJ405 在实管内对肠道致病菌抑杀效果的初步的报告. *中国微生态杂志*, 2000, 12:269-271.
- [7] 唐燕, 王锁英. 微生态疗法在抗生素相关性肠道菌群失调中的应用. *现代医药卫生*, 2009, 25:3242-3244.
- [8] 龚小卫, 姜勇. TLR4 在哺乳动物对脂多糖反应中的作用. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28:299303.
- [9] Ohashi K, Burkart V, Flohé S, et al. Cutting Edge: Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor 4 complex. *J Immunol*, 2000, 164:558-561.
- [10] Marta M, Mantovani A. Toll-like receptors. *Microbes Infect*, 2000, 2:251-255.
- [11] Baldwin AS Jr. Series introduction the transcription factor NF- $\kappa$ B and human disease. *J Clin Invest*, 2001, 107:3-6.
- [12] Waetzig GH, Seeger D, Rosenstiel P, et al. P38 motogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF- $\alpha$  signaling in inflammatory bowel disease. *J Immunol*, 2002, 168:5342.
- [13] 王雪梅, 刘玉兰. 肠易激综合征腹泻型患者结肠黏膜 Toll 样受体 2 和 4 的表达. *中华消化杂志*, 2009, 2:105-108.

(收稿日期:2011-09-21)

(本文编辑:马超)

周国华, 胡咏, 秦稳. 双歧杆菌干预对实验性末端回肠炎上皮细胞 Toll 样受体 2 和 Toll 样受体 4 表达的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2012, 6(5):1181-1185.

中 华 临 床 医 师 杂 志