

鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 对鸡小肠上皮细胞 β -防御素-9 基因表达的影响

黎观红^{1*}, 洪智敏¹, 贾永杰¹, 易中华¹, 瞿明仁¹, 刘思国²

(1. 江西农业大学动物科技学院, 南昌 330045; 2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨 150001)

摘要: 本研究旨在研究益生性鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 对体外培养的鸡小肠上皮细胞 β -防御素-9(AvBD9)表达的调节作用。选用鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 对体外培养的鸡小肠上皮细胞进行剂量依赖性及时间依赖性刺激实验, 利用实时荧光定量 PCR (fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR) 从 mRNA 水平研究刺激后上皮细胞 AvBD9 基因表达水平的差异。结果表明, 不同浓度 (2×10^5 、 2×10^6 、 2×10^7 cfu \cdot mL⁻¹) 鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 均能上调 AvBD9 mRNA 的表达, 且在不同细菌浓度之间 AvBD9 mRNA 的表达存在差异。热灭活鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 亦能上调 AvBD9 基因表达, 且上调值显著高于活菌 ($P < 0.05$)。鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 刺激上皮细胞后 AvBD9 表达存在时间依赖关系, 12 h 时 AvBD9 的表达达到峰值。Western blot 检测结果显示, 鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 刺激后的上皮细胞培养上清中存在 AvBD9 蛋白表达, 表明 AvBD9 蛋白可以分泌到细胞外而发挥其生物学功能。益生性鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 与鸡肠道上皮细胞的相互作用过程中, 鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 能够促进上皮细胞抗菌肽 β -防御素-9 的表达。本研究结果提示益生性乳酸杆菌可能通过促进肠道上皮抗菌肽的表达而发挥其益生作用。

关键词: β -防御素-9; 鸡小肠上皮细胞; 鼠李糖乳酸杆菌 LG_A ; 荧光定量 PCR

中图分类号: S831.1

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)04-0634-08

Effect of *Lactobacillus rhamnosus* LG_A on β -defensin 9 Expression in Cultured Chicken Small Intestinal Epithelial Cells

LI Guan-hong^{1*}, HONG Zhi-min¹, JIA Yong-jie¹, YI Zhong-hua¹, QU Ming-ren¹, LIU Si-guo²

(1. College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: This study aimed to investigate the effect of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* LG_A (*L. rhamnosus* LG_A) on the β -defensin 9 (AvBD9) expression in cultured chicken small intestinal epithelial cells. *L. rhamnosus* LG_A was selected to examine the time- and dose-response of AvBD9 gene expression upon stimulation of chicken intestinal small epithelial cells with *L. rhamnosus* LG_A . The AvBD9 mRNA expression was determined by fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR). The results showed that AvBD9 expression was upregulated by stimulation of *L. rhamnosus* LG_A at different concentrations (2×10^5 , 2×10^6 , 2×10^7 cfu \cdot mL⁻¹), and expression difference was observed between treatments at three bacterial concentrations. Heat-inactivated *L. rhamnosus* LG_A also stimulated the expression of AvBD9, and showed stronger induction response than live bacteria ($P < 0.05$). The *L. rhamnosus* LG_A promoted AvBD9 mRNA transcription in time-dependent manner. The AvBD9 mRNA expression peaked at 12 h of incubation upon treatment of epithelial cells with lactobacillus. AvBD9 peptide was detected by Western blot in the su-

收稿日期: 2011-08-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30800791); 江西省青年科学家培养对象计划项目(赣科发计字[2010]209号)

作者简介: 黎观红(1974-), 男, 江西于都人, 博士, 副教授, 主要从事家禽肠道免疫研究, E-mail: liguanh@163.com

* 通讯作者: 黎观红, Tel: 0791-83813503, E-mail: liguanh@163.com

pernatants of cultured epithelial cells treated with *L. rhamnosus* LG_A, indicating that AvBD9 peptide releases into extracellular medium and exerts its biological actions. Probiotic *L. rhamnosus* LG_A stimulates AvBD9 expression in the epithelial cells of chicken small intestine during lactobacillus-epithelial cell interaction. This study reveals the new possible functional mechanism by which the probiotic Lactobacilli exert their beneficial effects to the host through the antimicrobial peptide expression in the small intestinal epithelium.

Key words: β -defensin-9; chicken small intestinal epithelial cells; *Lactobacillus rhamnosus* LG_A; fluorescence quantitative PCR

动物内源性抗菌肽(Endogenous antimicrobial peptides)是基因编码的阳离子多肽,具有广谱抗菌能力,在机体组织中分布广泛,尤其是那些与微生物密切接触的上皮如消化道、呼吸道、生殖道黏膜上皮和皮肤,抗菌肽在机体局部抗感染与免疫方面发挥着重要作用^[1]。最近研究发现,抗菌肽是肠道黏膜天然免疫的重要成分,是先天抗微生物免疫的直接效应分子^[2]。肠道抗菌肽主要由肠道黏膜上皮细胞(Intestinal epithelial cells, IECs)和免疫细胞产生和分泌,而肠道上皮细胞作为机体防御的第一道防线,其产生的抗菌肽/蛋白对保护整个肠道黏膜完整和调节微生物区系平衡尤为重要^[2]。肠道上皮细胞产生的抗菌肽除了具有较强的直接杀灭有害微生物的作用外,它们还可作为细胞间的信号分子而发挥多重免疫调节活性,在连接天然免疫和获得性免疫(特异性免疫)反应之间起着重要的桥梁作用,并启动获得性免疫系统提高机体的特异性免疫水平^[3]。目前,从鸡肠道组织中发现的抗菌肽/蛋白主要有鸡 β -防御素(β -defensins)、Cathelicidins、组蛋白 H1 和 H2B、溶菌酶等^[4-8]。其中, β -防御素家族是鸡肠道上皮细胞表达的一类最重要的抗菌肽。鸡的染色体基因编码 13 种 β -防御素,它们成族地排列在 3 号染色体的 q3.5-q3.7 上^[4, 5, 9]。国内外学者对 β -防御素在健康鸡各种组织(包括消化道)的分布表达进行了许多研究,不同的 β -防御素在机体内的表达具有组织特异性^[4-5, 8, 10-11],其中, β -防御素-9(AvBD9)是鸡胃肠道上皮细胞表达的重要抗菌肽,在肠道黏膜抗感染免疫中发挥重要作用。人和哺乳动物肠道上皮细胞抗菌肽的表达调控及其机制、新功能的发现已成为医学和农业生物研究的热点。然而,对于鸡肠道抗菌肽的研究报道尤其是其在肠道的表达调控和功能研究则很少。

乳酸杆菌作为一种重要的绿色饲料添加剂已广泛用于畜禽饲料中以提高动物健康和生产性能。然

而,乳酸杆菌的作用机理目前还不完全清楚。乳酸杆菌黏附并定植于肠道上皮细胞是其发挥益生作用的前提,而上皮细胞是乳酸杆菌发挥益生作用的重要扮演者^[12]。目前,对于肠道内占绝大多数的乳酸杆菌与肠道抗菌肽表达之间的关系研究甚少,两者之间的关系尚不清楚。为此,本试验采用实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测益生性鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 刺激鸡小肠上皮细胞后抗菌肽——AvBD9 基因表达变化,为从益生菌与上皮细胞抗菌肽表达关系新角度解析益生菌发挥益生作用的新途径和机制提供一定的基础及依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂与仪器 细胞培养基:DMEM 培养基,购自 Gibco 公司。细菌培养基:MRS 培养基,1 L 蒸馏水中溶解 15 g 琼脂的培养基,加入下列成分:蛋白胨 10 g、牛肉膏 10 g、柠檬酸二铵 2 g、酵母膏 5 g、乙酸钠 5 g、葡萄糖 20 g、吐温 80 1 mL、K₂HPO₄ 2 g、MgSO₄·7H₂O 0.58 g、MnSO₄·4H₂O 0.25 g,调节 pH 为 6.2~6.4,121 °C 灭菌 15 min。RNA 提取试剂盒(TOYOBIO 公司)、反转录试剂盒(DRR037, TaKaRa 公司)及荧光定量试剂盒(DRR039, TaKaRa 公司)。二氧化碳培养箱(HF90, 香港 Heal Force 公司)、倒置显微镜(CKX31, 日本 OLYMPUS 公司)、酶联免疫检测仪(ELX800, 美国 BioTek 公司)。细胞培养瓶、培养板、0.22 μ m 滤膜,均购自美国 Costar 公司。梯度 PCR 仪(TP600, 大连宝生物工程有限公司);荧光定量 PCR 仪(LightCycler 480, 美国罗氏公司)。

1.1.2 小肠上皮细胞的获取与培养 将孵育 18 日龄无特定病原(Specific pathogen free, SPF)鸡胚用酒精棉擦拭,并将大头朝上放置在蛋座上,用已消毒的金属器具轻轻将鸡蛋大头击破,用镊子夹去破

碎的蛋壳,弯头镊子撕去气室膜,用镊子夹住鸡胚颈部,将其拖出放入干净无菌的培养皿中,备用。在无菌条件下取出整条小肠,小心去除肠系膜,用D-Hank's液清洗2~3次,将小肠剪成小于 1 mm^3 的组织块,加入D-Hank's液清洗,清洗液中加入浓度为 $500\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 左右的双抗(青霉素-链霉素),静置1 min,反复洗2~3次至上清液澄清,吸弃液,清洗干净组织块。加入5倍体积胶原酶I($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)至组织块中,移入三角瓶中 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 慢速振荡消化50 min,期间不断观察小肠黏膜的消化情况,小肠粘膜为蜂窝空泡状时终止消化,小心吸弃消化液,加入完全培养液反复吹打5~10次。而后 500 g 离心6 min,去除残余的消化液,沉淀用培养液悬浮,轻轻吹打5~10次, 500 g 离心6 min,重复1次,尽量去掉单细胞,最终沉淀用完全培养液悬浮,并用四层纱布过滤,滤去未消化完全的组织块,收集隐窝细胞团块,液接种于 75 cm^2 培养瓶中,差速贴壁培养,成纤维细胞在培养10 min左右就开始贴壁,90 min后将细胞按一定浓度接种于6孔板中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{ CO}_2$ 饱和湿度培养箱静置培养24~48 h后换液,以后每2 d换液1次。

1.1.3 供试菌株 鼠李糖乳酸杆菌 LG_A (*Lactobacillus rhamnosus* LG_A),分离自健康鸡消化道。

1.2 试验方法

1.2.1 乳酸杆菌的培养与鉴定

1.2.1.1 乳酸杆菌的培养:乳酸杆菌接种于MRS液体培养基, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 厌氧恒温箱中静置培养,紫外分光光度计测定600 nm光密度($\text{OD}_{600\text{ nm}}$),当细菌处于指数生长期时, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 8 000 g 离心10 min,弃液体,PBS洗涤2次,按照公式 $\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}=2.5\times 10^8\times\text{OD}_{600\text{ nm}}$ 调节细菌数,使其浓度为 $1\times 10^9\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$,用于细胞刺激试验。

1.2.1.2 乳酸杆菌鉴定:革兰氏染色,光学显微镜下观察菌体形态,如大小、长短、分叉情况及染色性等。进一步进行16S rDNA分子鉴定。16S rDNA菌种鉴定由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

1.2.2 β -防御素-9 mRNA表达水平的检测

1.2.2.1 小肠上皮细胞与乳酸杆菌共培养:取相同数目细胞接种于六孔板中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{ CO}_2$ 培养箱中静置培养,至细胞铺满底层80%时用于细菌刺激试验,吸弃培养液,PBS洗2~3次,加入不同浓度的鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 进行刺激试验,每孔加入2 mL

DMEM培养液悬浮的细菌悬液,对照组加入2 mL DMEM培养液。分别用3个浓度梯度进行刺激试验: 2×10^5 、 2×10^6 、 $2\times 10^7\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。刺激4 h后,吸去培养基,PBS洗3次,用细胞刮刷将贴壁细胞刮下, 2 500 g 离心5 min,弃上清放入 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存,用于提取总RNA检测AvBD9 mRNA的表达量。取活菌和热灭活全菌 $2\times 10^6\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与小肠上皮细胞共培养4 h后分别提取各组总RNA检测AvBD9 mRNA的表达量。取 $2\times 10^6\text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 刺激小肠上皮细胞0、1、2、4、8、12、24 h后分别提取各组总RNA检测AvBD9 mRNA的表达量。

1.2.2.2 乳酸杆菌刺激后细胞总RNA的提取和反转录合成:RNA提取按照试剂盒说明书操作。提取的样品用1%琼脂糖电泳观察所提RNA的质量,同时用紫外分光光度计测吸光度 $A_{260\text{ nm}}$ 和 $A_{280\text{ nm}}$,以测定RNA纯度和浓度。将经鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 刺激后以及无细菌刺激组(对照组)提取的总RNA,根据TaKaRa公司试剂盒采用两步法进行反转录,得到cDNA。以提取的总RNA为模板,Oligo(dT)15为随机引物, $10\text{ }\mu\text{L}$ 反转录合成cDNA的体系为 $5\times\text{Prime Script Buffer}$ $2\text{ }\mu\text{L}$,Prime Script RT Enzyme Mix I $0.5\text{ }\mu\text{L}$,Oligo dT Primer ($50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.5\text{ }\mu\text{L}$,Random 6 mers ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $2\text{ }\mu\text{L}$,RNase Free dH_2O $2\text{ }\mu\text{L}$,样品RNA $3\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件为 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 15 min, $85\text{ }^\circ\text{C}$ 5 s。RT产物于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.2.2.3 PCR引物设计和探针的合成:参照GenBank中所提供的基因序列设计特异性引物(目的基因AvBD9基因GenBank登录号:NM_001001611,内参 β actin基因登录号:L08165.1)。目的基因引物及探针由上海超世生物公司设计合成,内参基因引物及探针由南京金斯瑞公司设计合成。目的基因AvBD9上游引物序列:CCACGGCTCCT-GCTCTTTT,下游引物序列:ACCACGGCAG-GTCCCAAT,探针:FAM-TTGCATGCCGT-GCTCCTTCAGTTG-BHQ,预期扩增长度69 bp;内参 β actin上游引物序列:TTGTGATG-GACTCTGGTGATGG,下游引物:TGTCAG-GATCTTCATGAGGTAGTC,探针:FAM-TCACGGCCAGCCAGATCCAGACGG-BHQ,预期扩增长度131 bp。

1.2.2.4 实时荧光定量PCR检测AvBD9基因

mRNA 表达水平:用 LightCycler 480 PCR 仪检测 AvBD9 在不同浓度鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 刺激后其 mRNA 表达水平。根据 TaKaRa 试剂盒优化反应体系,对每个样品 cDNA 进行目的基因和内参基因荧光定量 PCR 反应。20 μ L 反应体系:Premix Ex Taq (2 \times) 10 μ L,PCR Forward Primer (10 μ mol \cdot L⁻¹) 0.4 μ L,PCR Reverse Primer (10 μ mol \cdot L⁻¹) 0.4 μ L,Probe 0.6 μ L,RNase Free dH₂O 6.6 μ L,样品 cDNA 2 μ L。反应条件:两步法进行 PCR 扩增,95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,1 循环;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 20 s,40 循环。PCR 扩增反应结束,根据扩增曲线的 CT 值计算定量结果,并对数据进行统计学分析。目的基因及内参基因在同一条件下不同管内扩增,每个样品设 3 个重复。

1.2.3 Tricine-SDS-PAGE 蛋白质电泳 由于 AvBD9 相对分子质量较小,只有 8 ku 左右,按常规蛋白胶配方配制,蛋白容易丢失,因此采用适合小分子蛋白分离的 Tricine-SDS-PAGE。每份蛋白质样品取 50 μ g,按比例加入 4 \times 上样缓冲液,旋涡混匀,沸水浴 5 min,12 000 g 离心 2 min,吸取上清加入凝胶上样孔。其中一空加入 10 μ L 预染蛋白质分子质量标准(Marker)。

1.2.4 Western blot 检测培养上清中 AvBD9 的表达 收集乳酸杆菌刺激上皮细胞 12 h 后的培养上清,冻干后用 PBS 重溶,测定蛋白浓度,Western blot 检测 AvBD9 蛋白的表达。

1.3 数据处理

目的基因的相对表达量采用 $\Delta\Delta C_T$ 法计算:

ΔC_T (目的基因) = C_T (目的基因) - C_T (内参基因);

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (乳酸杆菌刺激组) - ΔC_T (对照组)目的基因的相对表达水平 = $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 。实时荧光定量 PCR 结果均用“平均值 \pm 标准误 (Means \pm SE)”表示,其中各基因的表达量所示结果均经内参基因表达量的校正。采用 SAS 8.0 的 One-way ANOVA 过程进行方差分析,并采用 Duncan 氏法进行多重比较,以 $P < 0.05$ 为显著性标准。

2 结果

2.1 乳酸杆菌的鉴定

鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 经革兰氏染色为革兰氏阳性,呈小菌落、针尖状,乳白色突起,长杆菌,单个或成对排列。根据菌株的 16S rDNA 测序结果(图略),登录 GenBank 数据库进行序列比对,经比对乳

酸杆菌 LG_A 的 16S rDNA 序列与鼠李糖乳酸杆菌 (GenBank 登录号为 HM218396.1) 相似性为 99%。通过 BLAST 工具找到与测得序列同源性最高的序列,按照目前建议的依据细菌 16S rDNA 序列进行分类的标准,乳酸杆菌 LG_A 鉴定为鼠李糖乳酸杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*)。

2.2 肠上皮细胞总 RNA 的检测

所提取的总 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, RNA 样品电泳条带清晰,28 S、18 S 和 5 S 清晰可见,均未降解。紫外分光光度计检测样品 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$, 比值在 1.8~2.0, 表明无 DNA 残留,无蛋白污染,可以满足试验要求。

2.3 实时荧光定量 PCR 结果

2.3.1 不同浓度鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 对 AvBD9 mRNA 表达的影响 分别用 2×10^5 、 2×10^6 、 2×10^7 cfu \cdot mL⁻¹ 鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 刺激生长 5 d 的鸡肠道上皮细胞,4 h 后吸去培养液,用 PBS 洗 3 次,提取细胞总 RNA, FQ-PCR 检测 AvBD9 mRNA 的表达,结果如图 1。未受刺激的正常对照组也检测到 AvBD9 mRNA 的表达,不同浓度鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 均能上调 AvBD9 基因表达,且呈剂量依赖性。 2×10^5 、 2×10^6 、 2×10^7 cfu \cdot mL⁻¹ 鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 刺激组 AvBD9 mRNA 表达量均极显著高于未受细菌刺激的对照组 ($P < 0.01$), 2×10^6 cfu \cdot mL⁻¹ 组 AvBD9 mRNA 表达量显著高于 2×10^5 cfu \cdot mL⁻¹ 组 ($P < 0.05$), 但与 2×10^7 cfu \cdot mL⁻¹ 组差异不显著 ($P > 0.05$)。 2×10^5 cfu \cdot mL⁻¹ 组与 2×10^7 cfu \cdot mL⁻¹ 组 AvBD9 mRNA 表达量亦无显著差异 ($P > 0.05$)。

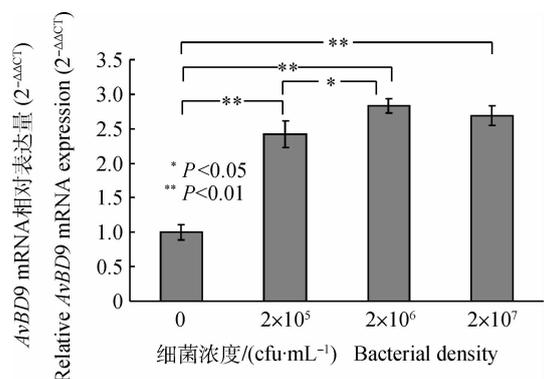


图 1 不同浓度鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 对鸡小肠上皮细胞 AvBD9 mRNA 表达的影响

Fig. 1 Effects of different density of *L. rhamnosus* LG_A on AvBD9 mRNA expression in cultured chicken small intestinal epithelial cells

2.3.2 鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 及其灭活菌与 $AvBD9$ mRNA 表达水平的关系 取对数生长期的鼠李糖乳酸杆菌 LG_A , 调节浓度为 2×10^6 cfu \cdot mL $^{-1}$, 另取相同数量的此菌在 65 $^{\circ}$ C 水浴中灭活 30 min; 刺激肠上皮细胞, 对照组只加入 DMEM 培养液, 刺激 4 h 后, 活菌与热灭活菌均上调 $AvBD9$ mRNA 表达, 但热灭活菌上调值显著高于活菌 ($P < 0.05$, 图 2)。

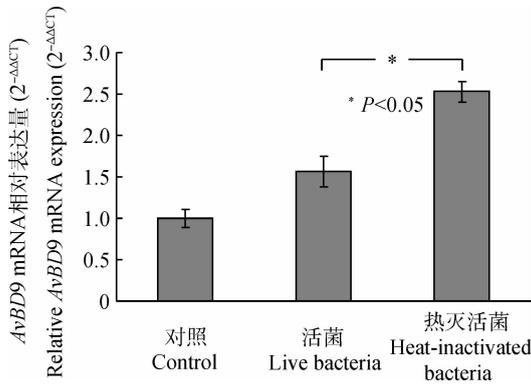


图 2 鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 活菌及热灭活菌与对鸡小肠上皮细胞 $AvBD9$ mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effects of live and heat-inactivated *L. rhamnosus* LG_A on $AvBD9$ mRNA expression in cultured chicken small intestinal epithelial cells

2.3.3 鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 刺激时间与 $AvBD9$ mRNA 表达水平的关系 不同菌株浓度依赖性试验结果表明, 在细菌浓度为 2×10^6 cfu \cdot mL $^{-1}$ 时, 鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 促进鸡小肠上皮细胞 $AvBD9$ 表达能力最强。因此, 用此浓度的鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 刺激上皮细胞 2、4、6、8、12、20 h 后分别提取各样品的总 RNA, FQ-PCR 检测 $AvBD9$ mRNA 的表达水平。结果发现, 与对照组相比, 鸡小肠上皮细胞受鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 刺激后, $AvBD9$ mRNA 的表达水平在 20 h 内均上调, 且存在时间依赖性, 12 h 达到峰值, 此后 $AvBD9$ mRNA 的表达开始下降(图 3)。

2.4 Western blot 检测培养上清中 $AvBD9$ 蛋白的表达

用鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 刺激上皮细胞 12 h 后收集上清, Western blot 检测表明, 鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 与上皮细胞共培养的上清中存在 $AvBD9$ 蛋白(图 4 箭头所示), 说明抗菌肽是上皮细胞产生的分泌蛋白, 可分泌到细胞外, 从而发挥抗菌作用及其他生物学功能。

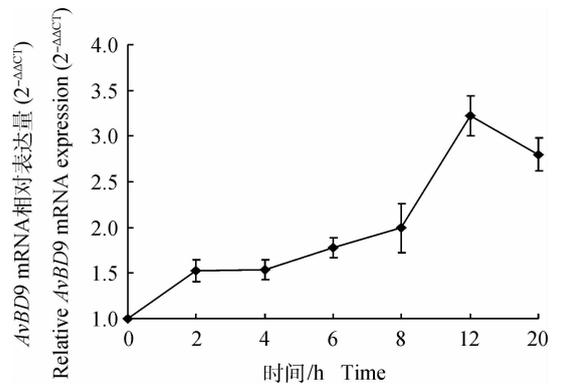


图 3 鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 刺激不同时间与 $AvBD9$ mRNA 表达水平的关系

Fig. 3 Time course of *L. rhamnosus* LG_A -induced $AvBD9$ mRNA expression

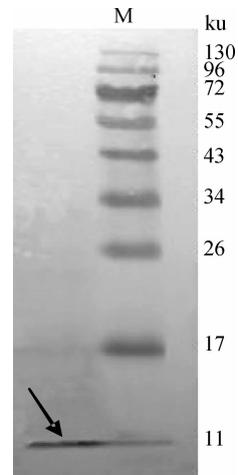


图 4 Western blot 检测 LG_A 刺激的培养上清中 $AvBD9$ 蛋白表达

Fig. 4 Detection of the $AvBD9$ peptide in culture supernatants from *L. rhamnosus* LG_A -stimulated chicken small intestinal epithelial cells by Western blot

3 讨论

益生菌作为调整胃肠道微生态平衡、预防肠道感染以及减轻胃肠道炎症反应等制剂以及作为肠道免疫调节剂和黏膜免疫佐剂, 已广泛用于畜禽饲料中以提高动物生产性能。但是, 益生菌的具体作用机制还不完全清楚, 许多益生菌的研究只停留在作用效果研究上。目前, 研究者对于益生菌的作用机制主要有以下几种解释: 生物夺氧, 使肠道菌群恢复到正常状态(主要针对芽孢杆菌的作用), 即生物夺氧学说; 增加肠道内有益菌数量, 竞争性抑制致病菌

对肠上皮细胞的黏附,拮抗致病微生物,即菌群屏障学说;益生菌产生有机酸降低肠道 pH,产生过氧化氢、细菌素和类似抗菌素的抗菌物质,合成和分泌营养物质和消化酶,即微生物代谢学说;调节机体体液免疫、细胞免疫和非特异性免疫,即免疫调节学说。不同益生菌对畜禽作用效应的研究也主要围绕以上解释展开。

乳酸杆菌是家禽肠道正常菌群中的主要优势菌群,尤其是在小肠占据绝对优势^[13]。在乳酸杆菌发挥的众多益生作用中,乳酸杆菌对肠道黏膜免疫(包括天然免疫和获得性免疫)的调节作用尤其引人关注。乳酸杆菌可通过多种方式调节或维持肠道免疫功能,包括提高肠道局部体液免疫应答即提高抗原特异性分泌型 IgA 水平^[14],诱导上皮细胞黏液素基因表达和分泌^[15],诱导上皮细胞细胞因子表达和分泌^[16-17]以及调节炎症信号分子表达^[18-19]。乳酸杆菌通过黏附作用附着在肠黏膜上皮细胞表面,与宿主细胞紧密接触甚至深入到细胞内并与之发生相互作用,从而调节上皮细胞的生理功能和信号转导^[20]。Wehkamp 等^[21]和 Schlee 等^[22-23]利用结肠癌细胞系(Caco-2)研究发现,益生乳杆菌及其他益生菌在与上皮细胞相互作用过程中可通过诱导细胞抗菌肽(防御素)而提高机体天然免疫功能。然而,在现有的几项关于益生菌对肠道上皮细胞抗菌肽表达影响的研究报道中,研究者所使用的肠道上皮细胞均为人类结肠癌上皮细胞系。显然,癌上皮细胞与正常上皮细胞在细胞基本结构、代谢和功能等特征方面存在一定的差异,以癌细胞的研究结果来解释正常细胞的行为存在很大的局限性。肠道抗菌肽除主要来源于上皮细胞外,还来源于肠黏膜免疫细胞^[3]。此外,益生菌在体内发挥作用受许多因素的影响,如胃肠道 pH 环境、消化酶和胆汁等均会影响益生菌的活力和细胞壁组分的完整性。因此,为避免这些复杂因素的干扰及肠道共生菌相互之间的影响,本研究利用体外原代培养的正常鸡小肠上皮细胞研究了益生性鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 对抗菌肽 AvBD9 基因表达的影响。研究发现,分离自健康鸡肠道的鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 能够促进鸡小肠上皮细胞防御素 AvBD9 的表达。研究表明(未发表资料),来源于健康鸡肠道的鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 可提高肉鸡的生产性能。最近在鸡的试验中发现^[24],饲喂动物肠道来源的抗菌肽可提高鸡肠道黏膜上皮内淋巴细胞和 IgA 分泌细胞数量,并可改善小肠黏

膜结构,增强小肠消化吸收能力。综合这些试验结果以及本试验结果,可推断益生性鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 促进或诱导鸡肠道抗菌肽的表达可能是其发挥益生作用尤其是免疫促进作用的一种重要作用方式。益生性鼠李糖乳酸杆菌 LG_A 通过上调鸡肠道抗菌肽如 AvBD9 表达而提高肠道天然免疫功能。本研究 Western blot 检测证实,AvBD9 肽可分泌至细胞外而发挥其生物学作用。因此,益生性乳酸菌可能通过诱导或促进肠道抗菌肽的表达在黏膜局部形成高浓度,从而抑制和杀灭肠道有害菌并调节有益菌数量和种类以维持肠道微生态平衡。同时,肠道上皮细胞分泌的抗菌肽可作为细胞间的信号分子发挥多重免疫调节作用。

本试验发现,热灭活的鼠李糖乳杆菌 LG_A 亦能促进鸡小肠上皮细胞抗菌肽 AvBD9 的表达,且灭活菌刺激后肠上皮细胞 AvBD9 基因表达水平显著高于活菌刺激($P < 0.05$)。Schlee 等研究亦发现,热灭活的益生乳杆菌亦可促进肠道上皮细胞抗菌肽(防御素)基因表达^[22]。益生菌的细胞组分自身亦可通过增强肠道抗菌肽表达而对宿主发挥益生作用。Bu 等^[25]研究发现,用溶菌酶处理来自人粪便有益菌 *Lactobacillus sp.* (ATCC 53103)所得的细胞壁组分能够被小肠吸收进入肝脏并被肝脏中的巨噬细胞吞噬,口服该细菌细胞壁组分能够提高败血症大鼠肝脏清除细菌的能力并因此而有效降低败血症大鼠的死亡率,这种保护效应是通过增强败血症大鼠肝脏和巨噬细胞抗菌肽 CRAMP(Cathelicidin-related antimicrobial peptide)表达而介导的。同样地,Sakai 等研究发现^[26-27],益生性粪肠球菌 EC-12 细胞壁组分能够阻止抗万古霉素肠球菌在刚孵化后的鸡的肠道定植,并可促进 5 日龄鸡舌头和法氏囊 β -防御素-2(AvBD2)基因的表达,肠道 β -防御素表达的提高是益生性粪肠球菌 EC-12 细胞壁组分抑制抗万古霉素肠球菌在肠道定植的主要作用机制之一。此外,Schlee 等^[23]研究表明,益生菌 *Escherichia coli* Nissle 1917 培养上清诱导人结肠癌细胞(Caco-2 细胞) β -防御素-2(hBD-2)表达的能力强于菌体,存在于培养上清的鞭毛蛋白(Flagellin)是 *Escherichia coli* Nissle 1917 诱导 hBD-2 表达的主要刺激因子。研究发现热灭活乳杆菌也具有与活菌相同的黏附能力,甚至黏附能力高过活菌刺激^[28]。灭活后乳酸杆菌对细胞黏附率增高,可能和黏附素有关,65 °C 灭活过程中,乳酸杆菌中的黏附素样的

物质由于热刺激而被释放出,这些黏附素能黏附肠道上皮细胞,进而加强了益生菌与上皮细胞间的作用。以上结果表明,“活”的状态并不是益生菌发挥其益生作用的必需条件,益生菌的免疫调节作用并非完全通过活益生菌与小肠上皮细胞的黏附作用而实现的,益生菌的特定组成成分(包括细胞壁组分和细菌分泌产物)在促进抗菌肽的表达中发挥重要作用。然而,本试验中上调抗菌肽基因表达的鼠李糖乳杆菌 LG_A 特定组分的分离鉴定仍需进一步研究。

4 结 论

本研究利用体外培养的鸡小肠上皮细胞模型,从基因水平和蛋白质水平探讨了鼠李糖乳杆菌 LG_A 诱导或促进肠道正常抗菌肽 AvBD9 表达的可能性,适宜浓度的鼠李糖乳杆菌 LG_A 可显著提高鸡正常上皮细胞抗菌肽 AvBD9 的表达,且呈剂量和时间依赖性。鼠李糖乳杆菌 LG_A 刺激后 AvBD9 蛋白可以分泌到细胞外,发挥杀菌作用和其他生物学功能。本研究结果有助于深入揭示益生菌调节肠道免疫功能的分子机制。

参 考 文 献:

[1] ZASLOFF M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms [J]. *Nature*, 2002, 415: 389-395.

[2] DANN S M, ECKMANN L. Innate immune defenses in the intestinal tract [J]. *Curr Opin Gastroen*, 2007, 23: 115-120.

[3] CUNLIFFE R N, MAHIDA Y R. Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract [J]. *J Leukocyte Biol*, 2004, 75: 49-58.

[4] LYNN D J, HIGGS R, GAINES S, et al. Bioinformatic discovery and initial characterization of nine novel antimicrobial peptides genes in the chicken [J]. *Immunogenetics*, 2004, 56: 170-177.

[5] XIAO Y, HUGHES A L, ANDO J, et al. A genome-wide screen identifies a single β -defensin gene cluster in the chicken: implications for the origin and evolution of mammalian defensins [J]. *BMC Genomics*, 2004, 5: 56-66.

[6] XIAO Y, CAI Y, BOMMINENI Y R, et al. Identification and functional characterization of three chicken cathelicidins with potent antimicrobial activity [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 2858-2867.

[7] LI G H, MINE Y, HINCKE M T, et al. Isolation and characterization of antimicrobial proteins and peptide

from chicken liver [J]. *J Pept Sci*, 2007, 13: 368-378.

[8] WELLMAN-LABADIE O, PICMAN J, HINCKE M T. Avian antimicrobial proteins: structure, distribution and activity [J]. *World Poultry Sci J*, 2007, 63: 421-438.

[9] LYNN D J, HIGGS R, LLOYD A T, et al. Avian beta-defensin nomenclature: A community proposed update [J]. *Immunol Lett*, 2007, 110: 86-89.

[10] 张辉华, 毕英佐, 曹永长, 等. 鸡 β -防御素-3 的克隆与诱导表达 [J]. *中国预防兽医学报*, 2006, 28(4): 401-405.

[11] MA D Y, LIU S W, HAN Z X, et al. Expression and characterization of recombinant gallinacin-9 and gallinacin-8 in *Escherichia coli* [J]. *Protein Express Purif*, 2008, 58: 284-291.

[12] GALDEANO C M, VINDEROLA G, BONET M E B, et al. Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, 14: 485-492.

[13] 郭兴华. 益生菌基础与应用 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2002: 256-279.

[14] MEDICI M, VINDEROLA C G, PERDIGON G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese [J]. *Int Dairy J*, 2004, 14: 611-618.

[15] CABALLERO-FRANCO C, KELLER K, DE SIMONE C, et al. The VSL # 3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells [J]. *Am J Physiol-Gastr L*, 2007, 292: G315-322.

[16] GALDEANO C M, PERDIGON G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2006, 13: 219-226.

[17] PATURI G, PHILLIPS M, JONES M. Immune enhancing effects of *Lactobacillus acidophilus* LAFTI L10 and *Lactobacillus paracasei* LAFTI L26 in mice [J]. *Int J Food Microbiol*, 2007, 115: 115-118.

[18] OTTE J M, PODOLSKY D K. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 286: G613-626.

[19] PAGNINI C, SAEED R, BAMIAS G, et al. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 454-459.

[20] PETRA W, DARAB G, JRGEN S, et al. Molecular

- and cellular basis of microflora-host interactions [J]. *J Nutr*, 2007,137: 756S-772S.
- [21] WEHKAMP J, HARDER J, WEHKAMO K, et al. NF- κ B- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium [J]. *Infect Immun*, 2004,72: 5750-5758.
- [22] SCHLEE M, HARDER J, KOTEN B, et al. Probiotic lactobacilli and VSL # 3 induce enterocyte β -defensin 2 [J]. *Clin Exp Immunol*, 2008,151: 528-535.
- [23] SCHLEE M, WEHKAMP J, ALTENHOEFER A, et al. Induction of human β -defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin [J]. *Infect Immun*, 2007,75: 2399-2407.
- [24] LIU T, SHE R, WANG K, et al. Effects of rabbit *sacculus rotundus* antimicrobial peptides on the intestinal mucosal immunity in chickens [J]. *Poult Sci*, 2008,87: 250-254.
- [25] BU H F, WANG X, ZHU Y Q, et al. Lysozyme-modified probiotic components protect rats against polymicrobial sepsis: role of macrophages and cathelicidin-related innate immunity [J]. *J Immunol*, 2006, 177: 8767-8776.
- [26] SAKAI Y, TSUKAHARA T, MATSUBARA N, et al. The cell preparation of *Enterococcus faecalis* strain EC-12 prevents vancomycin-resistant enterococci colonization in the cecum of newly hatched chicks [J]. *Poult Sci*, 2006,85: 273-277.
- [27] SAKAI Y, TSUKAHARA T, MATSUBARA N, et al. A cell wall preparation of *Enterococcus faecalis* strain EC-12 stimulates β -defensin expression in newly hatched broiler chicks [J]. *Anim Sci J*, 2007,78: 92-97.
- [28] ZIEGELAAR B W, AIGNER J. The characterization of human respiratory epithelial cells cultured on resorbable scaffolds: first steps towards a tissue engineered tracheal replacement [J]. *Biomaterials*, 2002,23: 1425-1438.

(编辑 白永平)