

生命早期补充鼠李糖乳杆菌 GG 保护子代肠道屏障的研究

金歌 刘响 谢润祥 郭子宣 孙悦 刘天宇 王邦茂 曹海龙

【摘要】 目的 探讨生命早期益生菌鼠李糖乳杆菌 GG (*LGG*) 肠道定植对子代小鼠肠道屏障及肠道发育的影响及其可能的作用机制。**方法** 选择 SPF 级 6 只 6 周龄野生型 C57BL/6 雌鼠随机分为实验组和对照组, 实验组为 *LGG* 活菌组, 对照组为 *LGG* 灭活菌组, 分别予 10^8 cfu/ml *LGG* 活菌或 *LGG* 灭活菌灌胃直至自然分娩。两组子代小鼠分别于出生第 1~5 天继续给予 10^7 cfu/ml *LGG* 活菌或 *LGG* 灭活菌灌胃。记录 3 周子代小鼠体重变化; 于第 2、3 周检测子代小鼠 *LGG* 菌的定植情况; 运用 Real-time PCR 方法评价肠道促炎因子及紧密连接分子 mRNA 变化; 运用 HE、免疫组化、免疫荧光染色法及酶联免疫吸附法评价 3 周子鼠的肠道屏障情况。**结果** 实验组的子代小鼠与对照组相比, 第 1 周时体重相比无明显差异, 第 2 周和第 3 周体重有所增加 [第 2 周: (4.326 ± 0.140) g 比 (3.790 ± 0.240) g, $t = 3.707$, $P = 0.006$; 第 3 周: (8.040 ± 0.370) g 比 (7.295 ± 0.326) g, $t = 3.130$, $P = 0.011$]; 仅在实验组子代小鼠的粪便中可检测出 *LGG* 定植。肠道定植可促进小肠绒毛长度及结肠隐窝深度明显增长 [空肠: (320.000 ± 22.514) μm 比 (265.100 ± 15.611) μm , $t = 8.258$, $P < 0.001$; 回肠 (150.500 ± 13.099) μm 比 (111.000 ± 11.308) μm , $t = 9.958$, $P < 0.001$; 结肠 (295.000 ± 15.209) μm 比 (233.100 ± 6.678) μm , $t = 9.129$, $P < 0.001$]。与 *LGG* 灭活组相比, 实验组子代小鼠结肠隐窝中杯状细胞的数量增加 [(35.24 ± 1.370) 个比 (11.62 ± 0.780) 个, $t = 15.000$, $P < 0.001$], 促炎因子 IFN- γ (0.512 ± 0.206 比 1.280 ± 0.232 , $t = 4.970$, $P = 0.001$)、IL-6 (0.941 ± 0.215 比 1.364 ± 0.271 , $t = 2.452$, $P = 0.040$)、IL-10 (0.744 ± 0.294 比 1.341 ± 0.320 , $t = 2.762$, $P = 0.025$) 和 TNF- α (2.581 ± 0.500 比 3.702 ± 0.150 , $t = 2.553$, $P = 0.034$) mRNA 的相对表达水平降低, 肠道组织紧密连接分子 (Claudin3) (1.881 ± 0.172 比 1.283 ± 0.152 , $t = 4.932$, $P = 0.001$) 和闭锁蛋白分子 (Occludin) (1.164 ± 0.342 比 0.812 ± 0.224 , $t = 3.67$, $P = 0.016$) 表达含量显著增加 ($P < 0.01$)。**结论** 生命早期 *LGG* 定植可通过抑制肠道低度炎症进而保护肠道屏障。本研究将为生命早期补充益生菌进而防治肠道疾病奠定实验基础。

【关键词】 生命早期; 鼠李糖乳杆菌; 低度炎症; 肠道屏障

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81741075)

Protection effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplied in early life on intestinal barrier in offspring

Jin Ge, Liu Xiang, Xie Runxiang, Guo Zixuan, Sun Yue, Liu Tianyu, Wang Bangmao, Cao Hailong. Department of Gastroenterology and Hepatology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 30052, China

Corresponding author: Cao Hailong, E-mail: caohailong@tmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG (*LGG*) colonization in early life on intestinal barrier and intestinal development in offspring mice and its possible mechanism. **Methods** Six C57BL/6 pregnant mice with the same conception time of 6 weeks were selected and randomly divided into experiment group given 10^8 cfu/ml *LGG* live bacteria and control group given *LGG* inactivated bacteria by gavage from the 18th day of pregnancy until natural birth. The progeny mice in the two groups were continued to be gavaged with 10^7 cfu/ml of *LGG* live bacteria or *LGG* inactivated bacteria on days 1-5 of birth.

The body weight changes of 3 week's progeny mice were recorded. The colonization of *LGG* bacteria in offspring mice was detected at 2nd and 3rd weeks. The mRNA of intestinal proinflammatory cytokines and tight junction molecules were evaluated by real-time PCR method. HE, immunohistochemistry, immunofluorescence staining and enzyme-linked immunosorbent assay were used to evaluate the intestinal barrier of 3-week old offspring mice.

Results Compared with the control group, the progeny mice of the experiment group showed no significant difference in body weight at the first week, and the body weight increased at the second week and the third week [2nd week: (3.790±0.240) g vs. (4.326±0.140) g, $t=3.707$, $P=0.006$; 3rd week: (7.295±0.326) g vs. (8.040±0.370) g, $t=3.130$, $P=0.011$]. *LGG* colonization can be detected only in the feces of progeny mice in the experiment group. Intestinal colonization can promote the growth of small intestine villi and colon crypt depth [jejunum: (320.000±22.514) μm vs. (265.100±15.611) μm, $t=8.258$, $P<0.001$; ileum: (150.500±13.099) μm vs. (111.000±11.308) μm, $t=9.958$, $P<0.001$; colon: (295.000±15.209) μm vs. (233.100±6.678) μm, $t=9.129$, $P<0.001$]. Compared with the control group, the number of goblet cells in the colonic crypt of the experiment group increased (11.62±0.780 vs. 35.24±1.370, $t=15.000$, $P<0.001$), and the relative mRNA expression levels of pro-inflammatory factors as IFN-γ (1.280±0.232 vs. 0.512±0.206, $t=4.970$, $P=0.001$), IL-6 (1.364±0.271 vs. 0.941±0.215, $t=2.452$, $P=0.040$), IL-10 (1.341±0.320 vs. 0.744±0.294, $t=2.762$, $P=0.025$) and TNF-α (3.702±0.150 vs. 2.581±0.500, $t=2.553$, $P=0.034$) in the experiment group decreased; the expression levels of the intimate tight junction molecules (Claudin3) (1.283±0.152 vs. 1.881±0.172, $t=4.932$, $P=0.001$) and the atresia protein molecule (Occludin) (1.164±0.342 vs. 0.812±0.224, $t=3.67$, $P=0.016$) significantly increased. **Conclusion** Early life *LGG* colonization protects the intestinal barrier by inhibiting low-grade intestinal inflammation. This study will lay the experimental foundation for the supplementation of probiotics in early life so as to prevent intestinal diseases.

[Key words] Early life; *Lactobacillus rhamnosus GG*; Low-grade inflammation; Intestinal barrier

Fund program: Chinese National Natural Science Funds (81741075)

研究发现, 人体消化系统内定植 $10^{13} \sim 10^{14}$ 个微生物, 约由 1 000 种细菌组成, 多定植于小肠及大肠的不同节段^[1-2]。正常条件下肠道菌群处于动态平衡状态。肠道菌群最初定植于母体子宫, 其中未出生胎儿暴露在大量母亲菌群的代谢产物中^[3-5]。母亲循环系统及阴道中的细菌可能是胎儿菌群来源, 孕期母体传递给胎儿的菌群可影响胎儿发育^[6]。在出生后, 微生物迅速定植于肠道, 且肠道菌群的组成在出生后第一年内即可发育成熟^[7]。但成熟过程中, 肠道菌群受多种因素影响, 如外界环境、喂养方式及分娩方式等。一旦稳定的宿主与微生物之间的共生关系被打乱, 则易导致多种疾病发生^[8-9]。

鼠李糖乳酸杆菌 *GG* (*Lactobacillus rhamnosus GG*, *LGG*) 属于生理性细菌, 乳杆菌属鼠李糖乳杆菌种, 是从健康人肠道中分离出的一种革兰阳性菌。*LGG* 是临床上应用较多的益生菌, 其不良反应少。一项随机双盲试验中, 围生期孕妇服用含 *LGG* 的奶制品, 新生儿在出生后 10 天和 3 个月的粪便样本中均可检测 *LGG* 定植^[10]。此外, 临床研究在

围生期孕妇中应用 *LGG* 制剂可预防儿童期湿疹、哮喘及过敏疾病的发病率, 提示 *LGG* 早期干预对婴幼儿成长存在潜在重要作用, 但具体的作用机制尚不清楚。本研究旨在探讨生命早期益生菌 *LGG* 定植对子代小鼠肠道发育的影响, 为临床益生菌早期干预提供实验支持。

1 对象与方法

1.1 实验动物

选择 SPF 级 6 只 6 周龄野生型 C57BL/6 雌鼠随机分为实验组和对照组, 实验组为 *LGG* 活菌组, *LGG* 在乳酸菌肉汤培养基中培养, 对照组为 *LGG* 灭活菌组, 采用 0.25% 戊二醛固定 *LGG* 15 min 得到 *LGG* 灭活菌, 适应 1 周后与 C57BL/6 雄性小鼠按 1:3 比例交配。选取受孕时间相同的孕鼠在同笼饲养至受孕后第 18 天。此后孕鼠分笼饲养, 并分别予 10^8 cfu/ml *LGG* 活菌或 *LGG* 灭活菌灌胃直至分娩, 且仔鼠仅于分娩后第 1~5 天分别予以 10^7 cfu/ml *LGG* 活菌或 *LGG* 灭活菌灌胃, 3 周后处死仔鼠。

1.2 研究方法

留取全部肠管放于 10% 甲醛，-80 °C 保存。仔鼠于出生及每周行 1 次称重并记录，运用 PCR 及凝胶电泳方法判断 3 周仔鼠肠道定植情况。采用 HE 染色观察仔鼠空肠、回肠及结肠肠道绒毛长度及隐窝深度，Real-time PCR 及免疫荧光评价肠道上皮紧密连接分子 mRNA 和蛋白变化，免疫组织化学染色、过碘酸雪夫 (Periodic Acid-Schiff, PAS) 染色和观察肠道杯状细胞及潘氏细胞数量变化，同时应用 Real-time PCR 方法及免疫组织化学染色观察肠道杯状细胞表达。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 分析软件分析，计量资料采用均数±标准差表示，采用 *t* 检验，以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 子代小鼠肠道 LGG 定植情况的评价

实验组 2 周龄和 3 周龄子代小鼠的粪便中均可检测出 LGG 定植，而对照组无 LGG 定植 (图 1)。

2.2 生命早期 LGG 定植对子代小鼠肠道发育的影响

两组的子代小鼠第 1 周时体重比较差异无统计学意义；实验组子代小鼠第 2 周体重是 (4.326±0.140) g，对照组为 (3.790±0.240) g，两组比较差异有统计学意义 (*t*=3.707, *P*=0.006)；实验组子代小鼠第三周体重是 (8.040±0.370) g，对照组为 (7.295±0.326) g，两组比较差异有统计学意义 (*t*=3.130, *P*=0.011)。实验组小鼠回盲部重量高于对照组 [(0.099±0.0143) g 比 (0.072±0.006) g, *t*=2.389, *P*=0.044]，而肝脾

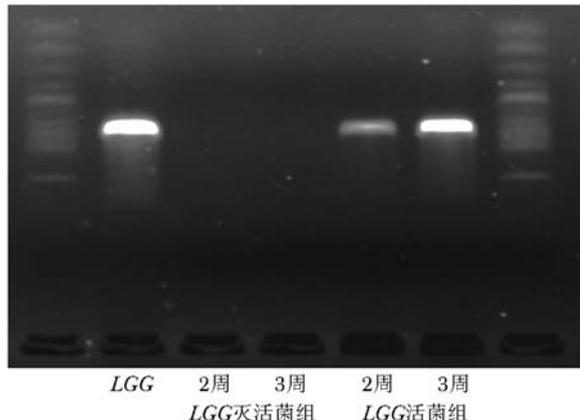


图 1 肠道 LGG 定植情况的检测

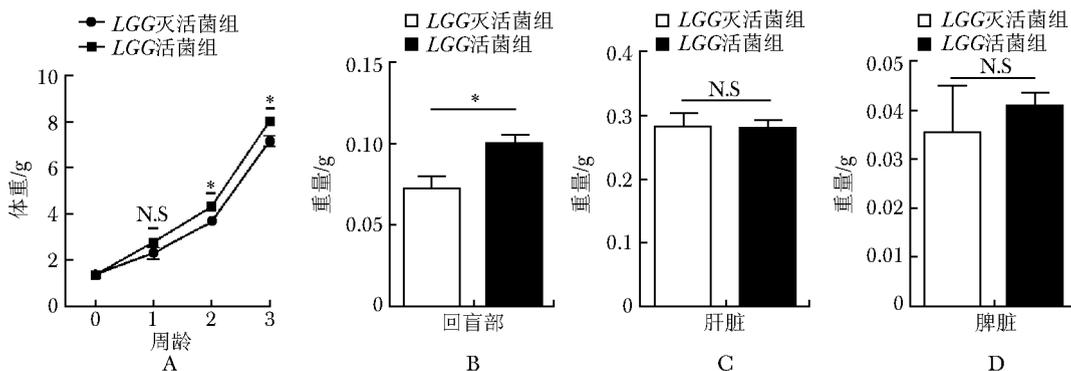
Fig 1 Detection of intestinal LGG colonization

重量差异无统计学意义 (*P*>0.05) (图 2)。

同时 HE 染色显示实验组子代小鼠 3 周龄时空肠和回肠绒毛长度及结肠隐窝深度较对照组明显增长 [空肠: (320.000±22.514) μm 比 (265.100±15.611) μm, *t*=8.258, *P*<0.001; 回肠 (150.500±13.099) μm 比 (111.000±11.308) μm, *t*=9.958, *P*<0.001; 结肠 (295.000±15.209) μm 比 (233.100±6.678) μm, *t*=9.129, *P*<0.001] (图 3)。

2.3 生命早期 LGG 定植抑制子代小鼠肠道慢性低度炎症

两组子代小鼠 3 周龄肠道 HE 染色均未见明显镜下炎症改变。而基因表达水平上，实验组的子代小鼠较对照组相比，IFN-γ (0.512±0.206 比 1.280±0.232, *t*=4.970, *P*=0.001)、IL-6 (0.941±0.215 比 1.364±0.271, *t*=2.452, *P*=0.040)、IL-10 (0.744±0.294 比 1.341±0.320, *t*=2.762, *P*=0.025)



注: A: 两组小鼠 0~3 周体重增长趋势; B-D: 3 周龄时两组小鼠回盲部重量; C: 肝脏重量; D: 脾脏重量

图 2 子代 3 周龄小鼠体重及回盲部、肝脏、脾脏重量

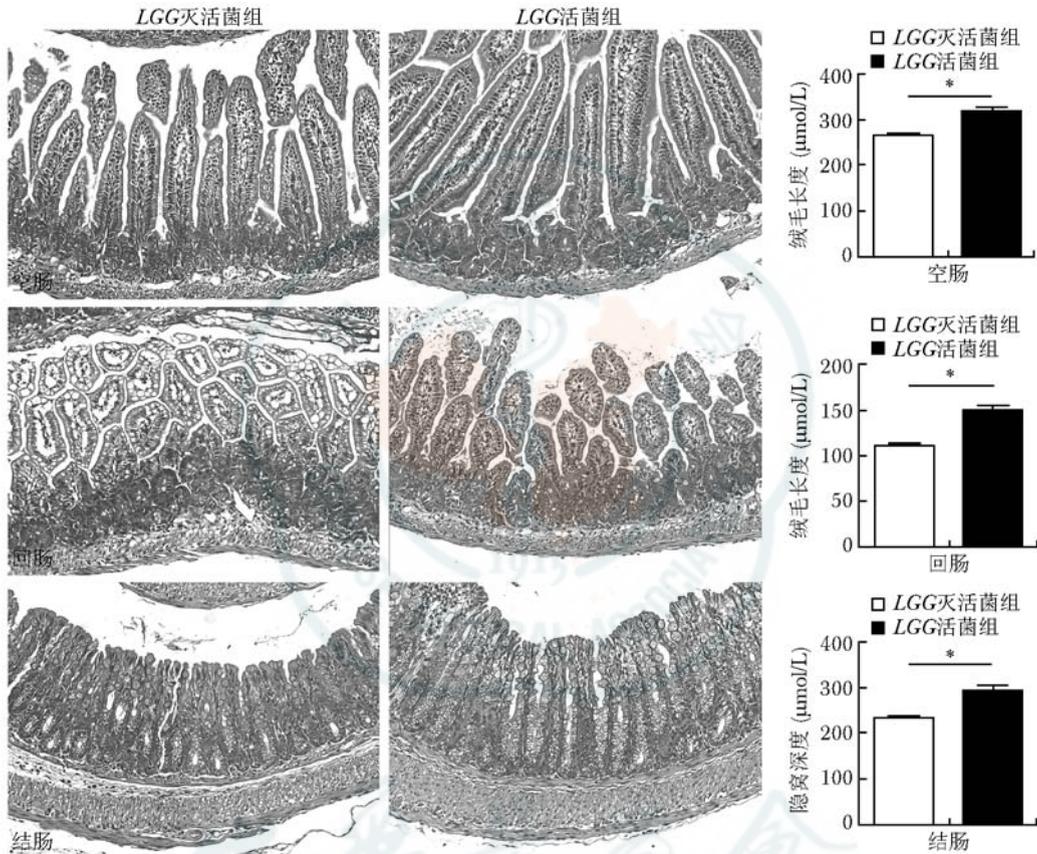
Fig 2 Body weight and ileocecal, liver and spleen weight of 3-week old mice

和 TNF- α (2.581 \pm 0.500 比 3.702 \pm 0.150, $t=2.553$, $P=0.034$) 等炎症因子 mRNA 的相对表达水平降低, 差异具有统计学意义 (图 4)。

2.4 生命早期 LGG 定植对子代小鼠肠黏膜屏障功能的影响

杯状细胞 PAS 染色结果示实验组子代小鼠结肠每个隐窝平均 PAS 染色阳性细胞数 (35.240 \pm

1.370) 个较对照组 (11.620 \pm 0.780) 个明显增多 ($t=15.000$, $P<0.001$)。肠道组织紧密连接分子 (Claudin3) (1.881 \pm 0.172 比 1.283 \pm 0.152, $t=4.932$, $P=0.001$) 和闭锁蛋白分子 (Occludin) (1.164 \pm 0.342 比 0.812 \pm 0.224, $t=3.67$, $P=0.016$) 表达含量显著增加 (图 5)。



注: HE 染色评估 3 周龄时两组小鼠空肠和回肠肠绒毛及结肠隐窝发育情况

图 3 子代 3 周龄小鼠肠道发育情况 (苏木精-伊红染色, $\times 200$)

Fig 3 Intestinal development of 3-week old mice (Hematoxylin and Eosin staining, $\times 200$)

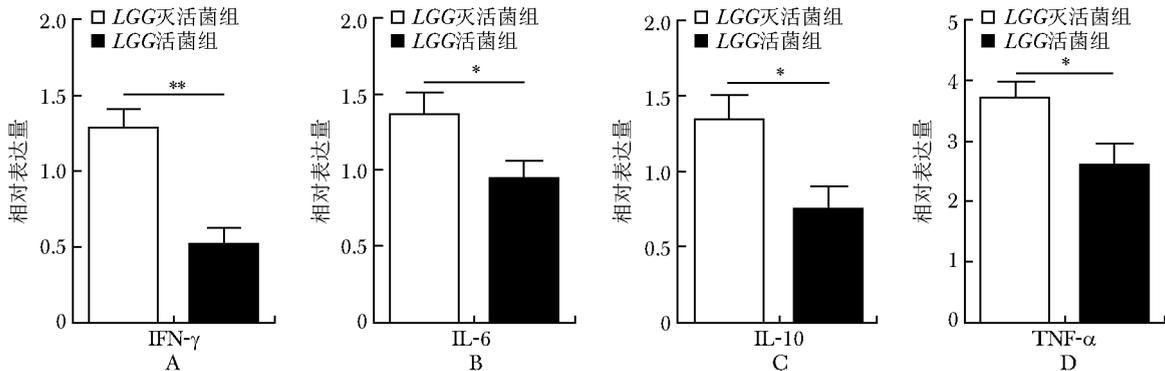
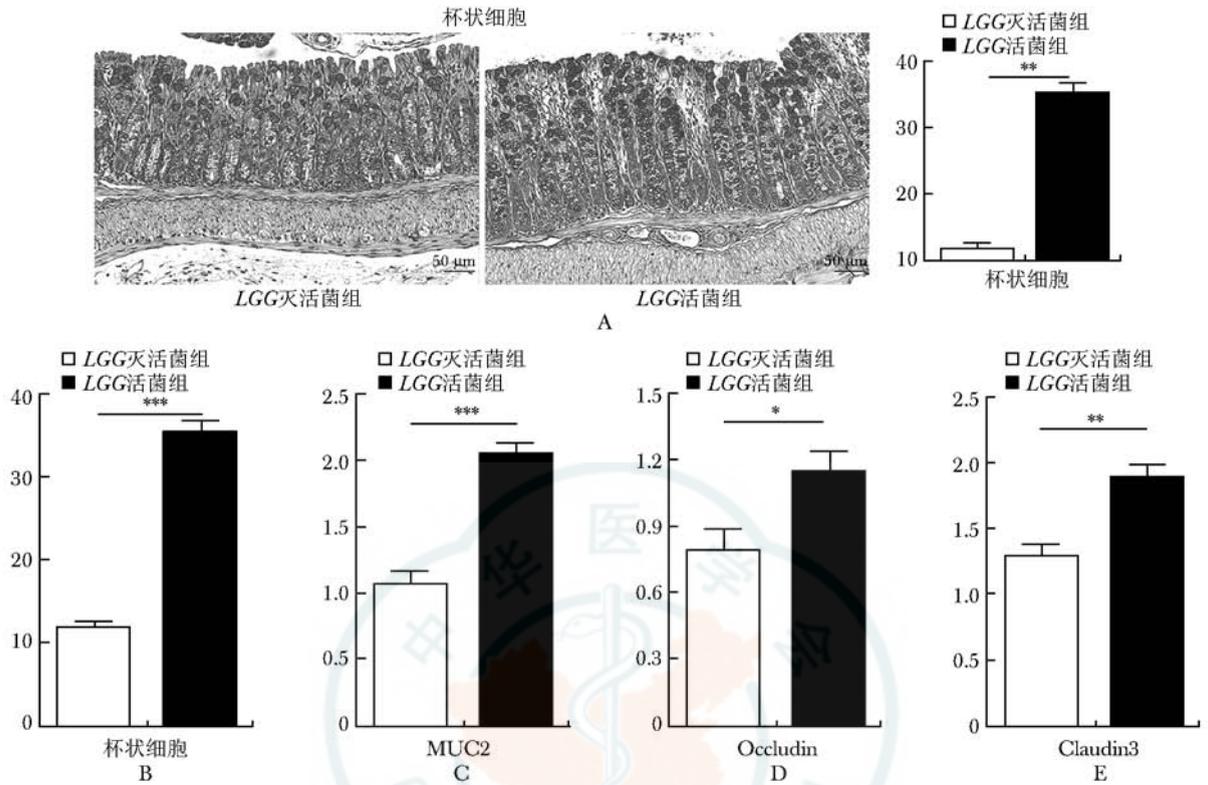


图 4 子代 3 周龄小鼠肠道组织中炎症因子基因表达

Fig 4 Expression of inflammatory cytokines in intestinal tissues of offspring of 3-week old mice



注: A: PAS 染色结肠组织标记杯状细胞 (肠道杯状细胞 PAS 染色, $\times 200$); B: 杯状细胞计数; C: PCR 检测 MUC2 表达; D: 肠道组织紧密连接分子 Claudin3 表达; E: 闭锁蛋白分子 Occludin 表达

图 5 子代 3 周龄小鼠肠道杯状细胞数量及紧密连接分子相对表达量

Fig 5 Number of intestinal goblet cells and relative expression of tight junction molecules in 3-week old mice

3 讨论

广义上说, 肠道发育 (intestinal development) 应包括肠道结构的形成 (肠绒毛和隐窝等)、构成肠腺细胞的分化成熟以及肠道免疫系统和微生态的建立等。而肠道发育不良 (intestinal maldevelopment) 是目前婴幼儿的高危致病因素之一, 与新生儿坏死性小肠结肠炎、感染性腹泻、先天性巨结肠以及炎症性肠病等多种新生儿期肠道疾病的发生有关^[11]。婴幼儿肠道发育不良可引起机体多种功能失衡, 如胃肠动力减慢使肠道细菌过度繁殖导致菌群失调, 杯状细胞分泌黏液不足、肠上皮间的紧密连接松弛, 进而使肠黏膜屏障功能受损致使抗氧化机制失衡和细菌易位等, 可导致成年期各种肠道疾病的发生^[12]。因此, 探究促进婴幼儿肠道发育熟的治疗或干预措施对防治多种疾病发生具有重要意义。

研究表明出生时微生物暴露与定植对新生儿初始微生物群形成有重要影响^[13], 且存在菌群定殖

时间窗。最新研究发现, *LGG* 成功定植的最佳时间窗为出生后第 1~5 天, 而超过 5 d 后给予 *LGG* 也难以定植成功或定植率极低。临床研究发现婴儿喂养 7 d *LGG* 后, 其粪便中 *LGG* 可持续存在 7~14 d, 而动物实验显示 *LGG* 在出生后 1~5 d 内定植率高达 70%~100%^[14-15]。本实验中选用 *LGG* 定植时间窗为出生后第 1~5 天, 并证实发现小鼠第 2 周和第 3 周的粪便菌群内可见 *LGG* 菌定植。近年来, 越来越多实验关注点在于婴幼儿早期口服 *LGG* 可以促进婴幼儿发育及减少疾病的发生^[16-17]。Nermes M 等^[18] 研究者发现特发性皮炎的婴儿口服 *LGG* 后其肠道屏障功能增强, 有助于免疫应答的发生及发展。一项随机对照研究发现 *LGG* 具有良好的免疫调节作用, 可用于减少儿童期轮状病毒引起的复发性腹泻^[19]。本实验发现 *LGG* 生命早期定植可以增加小鼠空肠、回肠绒毛长度和结肠组织内隐窝深度, 提示生命早期 *LGG* 定植可促进子代小鼠的肠道发育。

肠道黏膜屏障是机体最重要的防御体系, 完整

的肠道黏膜屏障在吸收营养物质的同时,可阻止各类有害因素侵入,维持机体肠道环境稳态。肠道黏膜屏障包括机械屏障、化学屏障、免疫屏障及生物屏障四部分^[20]。肠道黏膜屏障功能受损导致多种疾病的发生,如炎症性肠病、代谢综合征、肠易激综合征和结肠肿瘤等。既往研究发现小鼠胃肠道功能于出生后第 3 周发育成熟,研究者发现 *LGG* 生命早期定植可促进小鼠肠道杯状细胞数量、紧密连接蛋白增多及肠道屏障完整性增强。此外,肠道长期低度炎症是肠道屏障功能损伤的重要因素之一,本研究中实验组子代小鼠肠道组织炎症因子表达量较对照组显著下降,由此可推测, *LGG* 生命早期定植可能抑制炎症,促进肠道屏障功能发育,而是可对成年期抵御肠道细菌感染、抑制肠道疾病有保护作用。

综上所述,本研究发现 *LGG* 早期定植可抑制肠道低度炎症,进而保护子代肠道屏障,促进子代小鼠的肠道发育,可能对成人肠道健康有持久的积极影响,将为益生菌防治疾病提供治疗新视角,但是其具体保护的分子机制仍有待进一步探究。

参 考 文 献

[1] Gilbert JA, Blaser MJ, Caporaso JG, et al. Current understanding of the human microbiome [J]. *Nat Med*, 2018, 24 (4): 392-400.

[2] Simrén M, Barbara G, Flint HJ, et al. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report [J]. *Gut*, 2013, 62 (1): 159-176.

[3] Wang J, Zheng J, Shi W, et al. Dysbiosis of maternal and neonatal microbiota associated with gestational diabetes mellitus [J]. *Gut*, 2018, 67 (9): 1614-1625.

[4] Macpherson AJ, de Agüero MG, Ganai-Vonarburg SC. How nutrition and the maternal microbiota shape the neonatal immune system [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17 (8): 508-517.

[5] Milani C, Duranti S, Bottacini F, et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2017, 81 (4): e00036-17.

[6] Stinson LF, Payne MS, Keelan JA. Planting the seed: origins, composition, and postnatal health significance of the fetal gastrointestinal microbiota [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2017, 43 (3): 352-369.

[7] Stokholm J, Blaser MJ, Thorsen J, et al. Maturation of the gut microbiome and risk of asthma in childhood [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 141.

[8] Tamburini S, Shen N, Wu HC, et al. The microbiome in early life: implications for health outcomes [J]. *Nat Med*, 2016, 22 (7): 713-722.

[9] Torow N, Hornef MW. The neonatal window of opportunity: setting the stage for life-long host-microbial interaction and immune homeostasis [J]. *J Immunol*, 2017, 198 (2): 557-563.

[10] Dotterud CK, Avershina E, Sekelja M, et al. Does maternal perinatal probiotic supplementation alter the intestinal microbiota of mother and child [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2015, 61 (2): 200-207.

[11] Collado MC, Cernada M, Neu J, et al. Factors influencing gastrointestinal tract and microbiota immune interaction in preterm infants [J]. *Pediatr Res*, 2015, 77 (6): 726-731.

[12] Byndloss MX, Pernetzsch SR, Bäumlér AJ. Healthy hosts rule within: ecological forces shaping the gut microbiota [J]. *Mucosal Immunol*, 2018, 11 (5): 1299-1305.

[13] Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107 (26): 11971-11975.

[14] Hansen CH, Nielsen DS, Kverka M, et al. Patterns of early gut colonization shape future immune responses of the host [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (3): e34043.

[15] Yan F, Liu L, Cao H, et al. Neonatal colonization of mice with *LGG* promotes intestinal development and decreases susceptibility to colitis in adulthood [J]. *Mucosal Immunol*, 2017, 10 (1): 117-127.

[16] Jarde A, Lewis-Mikhael AM, Moayyedi P, et al. Pregnancy outcomes in women taking probiotics or prebiotics: a systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2018, 18 (1): 14.

[17] Sohn K, Underwood MA. Prenatal and postnatal administration of prebiotics and probiotics [J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2017, 22 (5): 284-289.

[18] Nermes M, Kantele JM, Atosuo TJ, et al. Interaction of orally administered *Lactobacillus rhamnosus GG* with skin and gut microbiota and humoral immunity in infants with atopic dermatitis [J]. *Clin Exp Allergy*, 2011, 41 (3): 370-377.

[19] Sindhu KN, Sowmyanarayanan TV, Paul A, et al. Immune response and intestinal permeability in children with acute gastroenteritis treated with *Lactobacillus rhamnosus GG*: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Clin Infect Dis*, 2014, 58 (8): 1107-1115.

[20] Cao H, Xu M, Dong W, et al. Secondary bile acid-induced dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis [J]. *Int J Cancer*, 2017, 140 (11): 2545-2556.