

表达猪表皮生长因子重组乳酸乳球菌的构建及其对结肠炎模型小鼠肠道损伤的修复作用

刘淑杰 陶新 邓波 门小明 徐子伟*

(浙江省农业科学院畜牧兽医研究所, 杭州 310021)

摘要: 本试验旨在构建表达猪表皮生长因子(pEGF)的重组乳酸乳球菌(*L. lactis*),并评价其对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎模型小鼠肠道损伤的修复作用,为将表达pEGF重组*L. lactis*应用于断奶仔猪肠道保护提供重要的依据。设计含有3个拷贝数的pEGF同向串联基因序列,并进行*L. lactis*密码子优化,将合成的3pEGF基因片段与表达载体pNZ8148连接,构建表达pEGF的重组*L. lactis*。选用32只BALB/c小鼠,随机分为4组,每组8只。采用4%的DSS建立小鼠结肠炎模型,各组小鼠具体处理如下:正常对照组,试验第1~12天饮用自来水;DSS模型对照组,试验第1~7天饮用4%的DSS水溶液,第8~12天饮用自来水;*L. lactis*组,饮水按照DSS模型对照组处理,同时每天口服 1×10^{12} CFU *L. lactis*,连续12 d;重组*L. lactis*组,饮水按照DSS模型对照组处理,同时口服 1×10^{12} CFU 表达pEGF的重组*L. lactis*,连续服12 d。结果显示:1)通过序列鉴定可知,3pEGF基因成功转入*L. lactis*;Western blot分析表明所表达的pEGF能与特异性抗体相结合,初步证明该重组蛋白具有活性。2)与正常对照组相比,DSS模型对照组小鼠结肠长度显著降低($P < 0.05$);与DSS模型对照组相比,重组*L. lactis*组小鼠结肠长度显著增加($P < 0.05$)。3)与正常对照组相比,DSS模型对照组小鼠结肠闭锁蛋白(occludin)浓度显著降低($P < 0.05$),D-乳酸(D-LAC)浓度显著升高($P < 0.05$),二胺氧化酶(DAO)活性极显著升高($P < 0.01$);与DSS模型对照组相比,重组*L. lactis*组小鼠结肠occludin浓度显著升高($P < 0.05$),D-LAC浓度显著降低($P < 0.05$),DAO活性极显著降低($P < 0.01$)。4)与正常对照组相比,DSS模型对照组小鼠结肠白细胞介素-10(IL-10)浓度极显著降低($P < 0.01$),白细胞介素-4(IL-4)浓度显著降低($P < 0.05$),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)浓度极显著增加($P < 0.01$);与DSS模型对照组相比,重组*L. lactis*组小鼠结肠IL-10浓度极显著增加($P < 0.01$),IL-4浓度显著增加($P < 0.05$),TNF- α 浓度有降低的趋势。由此可见,本试验成功构建了表达pEGF的重组*L. lactis*,重组pEGF具有良好生物活性;小鼠口服表达pEGF的重组*L. lactis*可抑制结肠的缩短,改善结肠结构和通透性,调节细胞因子浓度到达正常水平,这说明表达pEGF的重组*L. lactis*维护了肠道屏障功能的完整性,对损伤的肠道具有一定修复作用。

关键词: 表皮生长因子;乳酸乳球菌;表达;肠道;损伤修复;结肠炎

中图分类号:S811.2

文献标识码:A

文章编号:1006-267X(2021)04-2253-10

仔猪早期断奶技术是现代规模化猪场普遍采用的关键技术,其重要性日益显著。然而早期断

收稿日期:2020-10-28

基金项目:浙江省重点研发计划项目(2021C02007);国家现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-36);国家青年科学基金项目(C170105/31501966);浙江省科技厅资助项目(2016C02054)

作者简介:刘淑杰(1978—),女,内蒙古扎兰屯人,副研究员,博士,主要从事动物健康养殖与分子生物学研究。E-mail: Liushujie78@126.com

*通信作者:徐子伟,研究员,博士生导师,E-mail: xzwfyz@sina.com

奶却是仔猪必须经历的一个重大创伤性事件,首当其冲是损害肠道健康。断奶应极易造成仔猪肠道损伤,黏膜形态改变,消化酶活性降低,功能基因与蛋白表达异常,最终导致整个消化系统功能紊乱,严重阻碍了仔猪健康生长,给畜牧业造成严重的经济损失^[1-3]。肠道健康是决定仔猪整体健康和后期生产力水平的关键因素,对肠道进行损伤修复一直是仔猪营养研究的重点。

表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)是一个含有53个氨基酸的单链多肽,分子质量为6.05 ku,属于促生长因子家族成员之一^[4]。EGF是一种强有力的细胞有丝分裂原,可刺激细胞分裂、增殖,增加上皮组织的DNA与蛋白质合成,其独特作用是促进胃肠组织生长和发育^[5]。研究显示,EGF可以刺激胃肠道上皮细胞增殖与分化,促进肠道生长发育,诱导小肠黏膜刷状缘消化酶表达,改善机体对养分的消化利用^[6]。母乳是动物哺乳时期肠道EGF的主要来源,早期断奶使仔猪突然中断乳源性猪表皮生长因子(porcine epidermal growth factor, pEGF),此时通过外源补充pEGF极有可能是修复断奶仔猪肠道损伤、维护正常肠道功能屏障的一个有效途径。然而,关于pEGF对断奶仔猪肠道作用方面的报道还比较缺乏,有限的来源、昂贵的价格是制约其在畜牧业领域研究及应用的主要原因。

基因工程是获得pEGF来源的好方法。乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, *L. lactis*)是乳酸菌的一个典型模式菌株,存在于人和动物的肠道中并发挥重要的生理功能,是公认的安全级微生物(generally recognized as safe, GRAS)^[7]。*L. lactis*具有不产生内毒素、生长迅速和易于操作等优点,成为表达外源蛋白的理想候选者;另外,*L. lactis*表达的外源蛋白可保持天然构型,不需要进一步纯化可直接连同菌体一起服用^[8]。目前,采用*L. lactis*载体系统已经表达出了多种外源抗原(出血性败血症病毒G蛋白、Ⅲ型鸭乙型肝炎病毒VP1蛋白)^[9-10]、酶类(β -1,4-葡聚糖内切酶egl3、L-乳酸脱氢酶)^[11-12]和活性肽(胰岛素样生长因子-I、牛乳铁蛋白肽)^[13-14]等,并应用于食品工业、生物制药和疫苗等研究领域。pEGF的来源有限制约了其在断奶仔猪上的研究及应用,*L. lactis*表达系统已经发展成熟,鉴于此,本研究采用*L. lactis*高效诱导表达系统,构建表达pEGF的重组

L. lactis,以葡聚糖硫酸钠(dextra sulfate sodium, DSS)诱导的结肠炎小鼠为模型动物,研究重组pEGF对肠道形态结构、通透性和细胞因子浓度的影响,评价其对损伤肠道的修复作用,为将表达pEGF重组*L. lactis*应用于断奶仔猪肠道保护提供重要的依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

乳酸链球菌素(Nisin)诱导型细胞内表达载体pNZ8148和宿主菌*L. lactis* NZ9000购自荷兰NIZO研究所。

1.2 主要试剂

Nisin购自美国Sigma公司,限制性内切酶Nco I、Hind III和T4 DNA连接酶购自美国NEB公司,兔抗EGF单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗均购自美国Abcam公司,DSS(相对分子质量为36 000~50 000)购自上海MP公司,10%中性甲醛购自杭州长青化工有限公司。

1.3 pEGF基因设计与优化

pEGF是一个由53个氨基酸组成的分子质量为6.05 ku的小分子蛋白质,为了增加表达量,根据GenBank中登录的pEGF基因序列,设计将3个拷贝数的pEGF基因同向串联,相邻pEGF序列之间通过柔性Linker(氨基酸序列为GGGGSG)连接。然后,基于*L. lactis*对密码子的偏好性进一步优化该序列,并在基因序列全长的5'端加入限制性内切酶Nco I,3'端加入终止密码子(TAA)和限制性内切酶Hind III。总基因序列长度542 bp,重组蛋白分子质量约19 ku。将设计好的基因序列送至上海生物工程有限公司合成。

1.4 重组*L. lactis*的构建

将表达载体pNZ8148用限制性内切酶Nco I、Hind III双酶切,纯化回收双酶切载体片段。将合成好的3pEGF基因与表达载体连接,电转化至感受态*L. lactis* NZ9000中,利用氯霉素(10 mg/mL)对转化子进行筛选,挑取白色菌落,培养重组菌,然后提取重组质粒,将重组质粒进行双酶切鉴定与DNA序列测定(由上海英俊生物技术有限公司完成)。鉴定正确的质粒命名为pNZ8148-3pEGF,重组菌命名为*L. lactis* NZ9000(pNZ8148-3pEGF)。

1.5 重组 pEGF 的表达及 Western blot 检测

将重组菌 *L. lactis* NZ9000 (pNZ8148-3pEGF) 接种于 GM17 液体培养基中, 37 °C 厌氧培养至光密度 (OD) = 0.4 ~ 0.5, 加入终浓度为 5 μg/L 的诱导剂 Nisin, 继续培养 3 h; 将培养物离心后收集菌体, 向菌体中加入等体积的 1 倍上样缓冲液, 沸水浴 10 min 后离心, 上清液经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后转印至硝酸纤维素膜上, 以羊抗 EGF 单克隆抗体为一抗, HRP 标记的山羊抗兔为二抗, 对目的蛋白进行分析。

1.6 表达 pEGF 重组 *L. lactis* 对小鼠肠道损伤修复作用的研究

将 32 只 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠 (购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 体重为 18 ~ 24 g) 随机分为 4 组, 每组 8 只。采用 4% 的 DSS 建立小鼠结肠炎模型, 各组小鼠具体处理如下: 正常对照组, 试验第 1 ~ 12 天饮用自来水; DSS 模型对照组, 试验第 1 ~ 7 天饮用 4% 的 DSS 水溶液, 第 8 ~ 12 天饮用自来水; *L. lactis* 组, 饮水按照 DSS 模型对照组处理, 同时每天 08:00 口服 (灌胃) 1×10^{12} CFU *L. lactis* NZ9000 (pNZ8148), 连续口服 12 d; 重组 *L. lactis* 组, 饮水按照 DSS 模型对照组处理, 同时每天 08:00 口服 (灌胃) 1×10^{12} CFU 重组 *L. lactis* NZ9000 (pNZ8148-3pEGF), 连续口服 12 d。饲养环境温度为 (24 ± 1) °C、相对湿度 40% ~ 70%, 光照周期 12 h 明、12 h 暗。

1.7 小鼠样本采集及处理

试验第 13 天, 于小鼠眶下静脉采血, 分离血清; 颈椎脱臼法处死小鼠, 沿腹中线打开腹腔, 取出肠道组织, 测定小鼠盲肠端至肛门的结肠长度; 截取 1 cm 结肠组织放入 10% 中性甲醛溶液中, 样品经石蜡包埋后切片, 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色, 显微镜下观察小鼠结肠形态结构, 用于组织病理学分析。剩余的结肠放于 -70 °C 冰箱保存待测其他指标。

1.8 结肠通透性相关指标及细胞因子浓度的测定

准确称取小鼠结肠重量, 加入灭菌生理盐水, 机械匀浆后离心取上清, 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法测定结肠闭锁蛋白 (occludin)、白细胞介素-10 (IL-10)、白细胞介素-4 (IL-4) 和肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 浓度, 采用比色法测定小鼠血清二胺氧化酶 (diamine oxidase, DAO) 活性和 D-

乳酸 (D-lactate, D-LAC) 浓度。

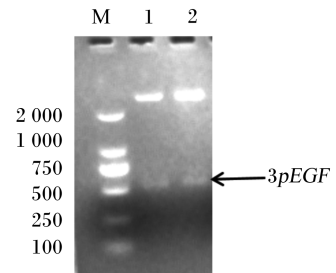
1.9 统计分析

试验数据采用 SPSS 21.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA) 及 Duncan 氏法多重比较, 试验数据以“平均值 ± 标准差”表示, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 则为差异极显著。

2 结果

2.1 表达 pEGF 重组 *L. lactis* 的构建

表达载体 pNZ8148 经限制性内切酶 *Nco* I、*Hind* III 双酶切后, 与合成的 3pEGF 基因片段连接并转化至 *L. lactis* NZ9000 中, 重组质粒经 *Nco* I、*Hind* III 双酶切鉴定, 目的基因大小相符 (图 1), 证明外源基因 3pEGF 插入表达载体中。测序结果表明目的片段序列正确, 3pEGF 基因插入位置和方向与预期结果完全一致。



M: DNA 分子量标准 DNA marker; 1, 2: *Nco* I、*Hind* III 双酶切 *Nco* I and *Hind* III double digestion; 3pEGF: 3 个拷贝的猪表皮生长因子 3 copies of porcine epidermal growth factor。

图 1 重组质粒 pNZ8148-3pEGF 双酶切鉴定

Fig.1 Identification of pNZ8148-3pEGF by double enzyme digestion

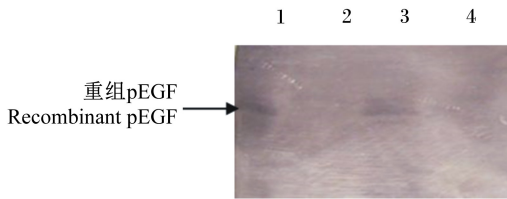
2.2 pEGF 的表达及 Western blot 分析

L. lactis NZ9000 (pNZ8148-3pEGF) 经 Nisin 诱导表达后, 菌体裂解液经 SDS-PAGE 后转印至硝酸纤维素膜上, 采用 Western blot 方法检测重组蛋白, 与 *L. lactis* NZ9000 (pNZ8148) 相比, 膜上重组菌的位置出现特异性条带 (图 2), 说明 *L. lactis* 能够表达 pEGF, 且能与 EGF 单克隆抗体结合, 初步证明重组 pEGF 具有生物活性。

2.3 试验小鼠临床表现

正常对照组小鼠采食、饮水、活动及精神状态均正常, 皮毛顺滑有光泽, 无便血。DSS 模型对照

组小鼠饮用4% DSS 水溶液后,采食和饮水逐渐减少,活动迟缓,精神萎靡,皮毛蓬松无光泽,试验第6天全部出现直肠便血或水样稀便。*L. lactis* 组小鼠采食和饮水也相应减少,皮毛蓬松,试验第6天直肠出现血便,个别出现稀便。重组 *L. lactis* 组小鼠皮毛顺滑,活动和精神状况较为正常,个别小鼠出现稀便。



1、3; *L. lactis* NZ9000 (pNZ8148-3pEGF) 菌体蛋白 bacterial protein of *L. lactis* NZ9000 (pNZ8148-3pEGF); 2、4; *L. lactis* NZ9000 (pNZ8148) 菌体蛋白 bacterial protein of *L. lactis* NZ9000 (pNZ8148)。

图2 Western blot 方法检测重组 pEGF

Fig.2 Recombinant pEGF detected by Western blot method

2.4 试验小鼠结肠长度及形态

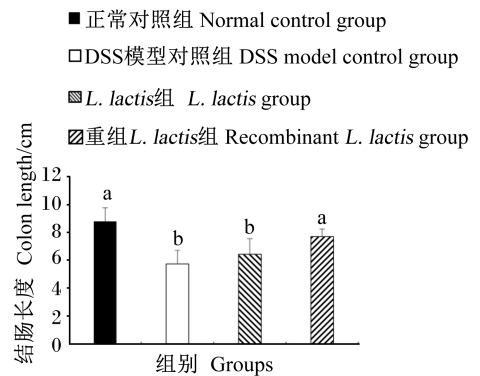
与正常对照组相比,DSS 模型对照组小鼠结肠长度显著降低 ($P < 0.05$),降低了 34.77% (图3)。与 DSS 模型对照组和 *L. lactis* 组相比,重组 *L. lactis* 组小鼠结肠长度显著增加 ($P < 0.05$),分别增加了 34.32% 和 19.72%,并与正常对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$) (图3)。DSS 模型对照组和 *L. lactis* 组间小鼠结肠长度差异不显著 ($P > 0.05$)。上述结果说明口服表达 pEGF 的重组 *L. lactis* 抑制了小鼠结肠的缩短。

HE 染色结果 (图4) 显示,正常对照组小鼠结肠结构清晰,黏膜层上皮细胞完整,未见脱落,未见炎症细胞浸润和溃疡等;DSS 模型对照组小鼠结肠黏膜上皮细胞大量脱落,可见溃疡形成,较多的炎症细胞浸润,溃疡周边上皮细胞增生;*L. lactis* 组小鼠结肠结构尚存在,黏膜层上皮细胞不完整,部分脱落,可见溃疡和少量炎症细胞浸润等;重组 *L. lactis* 组小鼠结肠黏膜上皮修复,未见糜烂和溃疡,仅见黏膜层内少量炎症细胞浸润。

2.5 试验小鼠肠道通透性相关指标及细胞因子浓度

由表1可知,与正常对照组相比,DSS 模型对照组小鼠结肠 occludin 浓度显著降低 ($P < 0.05$),降低了 30.43%,*D-LAC* 浓度显著增加 ($P < 0.05$),

DAO 活性极显著升高 ($P < 0.01$),分别升高了 60.81% 和 56.48%。与 DSS 模型对照组相比,*L. lactis* 组小鼠结肠 DAO 活性、*D-LAC* 和 occludin 浓度均差异不显著 ($P > 0.05$);重组 *L. lactis* 组小鼠结肠 occludin 浓度显著增加 ($P < 0.05$),增加了 40.63%,*D-LAC* 浓度显著降低 ($P < 0.05$),DAO 活性极显著降低 ($P < 0.01$),分别降低了 36.13% 和 26.03%。重组 *L. lactis* 组小鼠结肠 *D-LAC* 浓度和 DAO 活性均显著低于 *L. lactis* 组 ($P < 0.05$),分别降低了 29.62% 和 17.27%。



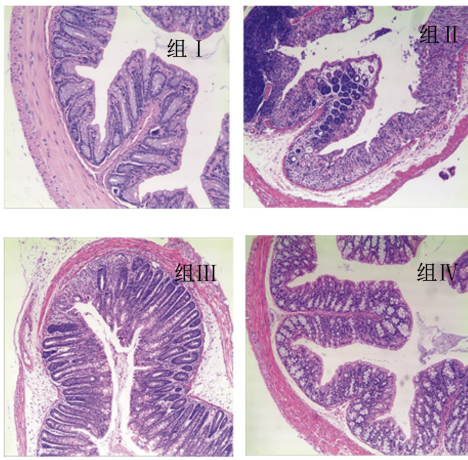
数据柱形标注相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$),不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Data values with the same letters mean no significant difference ($P > 0.05$), while with different small letters mean significant difference ($P < 0.05$), and with different capital letters mean significant difference ($P < 0.01$).

图3 口服重组 *L. lactis* 对小鼠结肠长度的影响

Fig.3 Effects of oral administration of recombinant *L. lactis* on colon length in mice

由表1可知,与正常对照组相比,DSS 模型对照组小鼠结肠 IL-10 浓度极显著降低 ($P < 0.01$),IL-4 浓度显著降低 ($P < 0.05$),分别降低了 32.19% 和 21.94%,TNF- α 浓度极显著增加 ($P < 0.01$),增加了 29.37%。与 DSS 模型对照组相比,*L. lactis* 组小鼠结肠 IL-10 浓度极显著增加 ($P < 0.01$),增加了 36.21%,而 IL-4 和 TNF- α 浓度均差异不显著 ($P > 0.05$);重组 *L. lactis* 组小鼠结肠 IL-10 浓度极显著增加 ($P < 0.01$),IL-4 浓度显著增加 ($P < 0.05$),分别增加了 58.87% 和 27.86%,结肠 TNF- α 浓度有降低的趋势。与正常对照组和 *L. lactis* 组相比,重组 *L. lactis* 组小鼠结肠 TNF- α 、IL-10 和 IL-4 浓度均差异不显著 ($P > 0.05$)。



组 I : 正常对照组 normal control group; 组 II : DSS 模型对照组 DSS model control group; 组 III : *L. lactis* 组 *L. lactis* group; 组 IV : 重组 *L. lactis* 组 recombinant *L. lactis* group。

图 4 口服重组 *L. lactis* 对小鼠结肠组织形态的影响

Fig.4 Effects of oral administration of recombinant *L. lactis* on colonic morphology in mice (50 \times)

3 讨论

EGF 是一种重要的细胞调控因子,可促进肠道上皮细胞增殖和分化,加速肠道创伤愈合,在消化道成熟、功能完善以及抵抗应激方面发挥重要

作用。EGF 具有较高的稳定性,对热、酸具有耐受性,能抵抗胃蛋白酶、胰蛋白酶和糜蛋白酶的消化,这对其在肠道发挥生物学作用具有重要意义^[5]。然而,有限的来源是限制 EGF 在畜牧领域研究及应用的主要原因,基因工程是获得 EGF 的好方法。目前,已有报道采用大肠埃希菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) 和毕赤酵母 (*Pichia pastoris*, *P. pastoris*) 系统表达 pEGF。Lee 等^[15]采用 *P. pastoris* 成功表达 pEGF,并将 pEGF 分泌于上清液中。贺超等^[16]构建了 1、2 和 3 个 pEGF 拷贝数的原核重组表达质粒,不同质粒转化 *E. coli* 后均表达了 pEGF。但是采用 *E. coli* 表达 pEGF 多以包涵体形式存在,需经过提取、纯化及复性等繁琐处理,且内毒素较难去除;而采用 *P. pastoris* 表达系统需要甲醇诱导,还需进一步加工脱毒处理。*L. lactis* 作为宿主菌的优势在于它属于食品级微生物,表达的外源蛋白以可溶性形式存在,可保持天然构型,连同菌体一起可直接口服,具有安全、方便和经济等特点。因此,本试验采用 *L. lactis* 高效诱导表达系统,将 3 个拷贝数的 pEGF 基因序列串联并优化,成功构建了表达 pEGF 的重组 *L. lactis*,并且重组 pEGF 以可溶性形式存在,Western blot 分析显示重组蛋白能够与特异性抗体结合,初步证明 *L. lactis* 表达的 pEGF 具有生物活性。

表 1 口服重组 *L. lactis* 对小鼠结肠通透性相关指标及细胞因子浓度的影响

Table 1 Effects of oral administration of recombinant *L. lactis* on colonic permeability indexes and cytokine concentrations in mice

项目 Items	正常对照组 Normal control group	DSS 模型对照组 DSS model control group	<i>L. lactis</i> 组 <i>L. lactis</i> group	重组 <i>L. lactis</i> 组 Recombinant <i>L. lactis</i> group
闭锁蛋白 Occludin/(ng/mg)	0.46 \pm 0.08 ^a	0.32 \pm 0.09 ^b	0.42 \pm 0.07 ^{ab}	0.45 \pm 0.11 ^a
D-乳酸 D-LAC/(μ mol/mL)	1.48 \pm 0.21 ^b	2.38 \pm 0.66 ^a	2.16 \pm 0.47 ^a	1.52 \pm 0.24 ^b
二胺氧化酶 DAO/(U/L)	18.66 \pm 1.19 ^{Cb}	29.20 \pm 3.95 ^{Aa}	26.11 \pm 1.85 ^{ABa}	21.60 \pm 2.92 ^{BCb}
肿瘤坏死因子 TNF- α /(ng/g)	11.78 \pm 1.69 ^{Bb}	16.68 \pm 1.68 ^{Aa}	14.84 \pm 2.29 ^{ABa}	14.32 \pm 2.00 ^{ABab}
白细胞介素-10 IL-10/(pg/mg)	36.04 \pm 4.46 ^{Aa}	24.44 \pm 3.11 ^{Bb}	33.29 \pm 2.02 ^{Aa}	38.83 \pm 6.36 ^{Aa}
白细胞介素-4 IL-4/(ng/g)	21.38 \pm 3.71 ^a	16.69 \pm 1.78 ^b	20.43 \pm 2.63 ^{ab}	21.34 \pm 3.65 ^a

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$), 相同或无字母表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$), and with different capital letter superscripts mean significant difference ($P < 0.01$), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference ($P > 0.05$).

本研究采用 DSS 诱导小鼠结肠炎模型,并同时给小鼠口服重组 *L. lactis*,以进一步验证重组

pEGF 的生物活性及对损伤肠道的修复作用。DSS 结肠炎模型是目前应用最广的一种肠炎模型,通

过给小鼠饮用4~7 d的2%~5% DSS水溶液来造模,造模成功的结肠炎模型小鼠会出现腹泻、便血、结肠缩短现象,病理检测显示结肠多灶性溃疡,黏膜炎症明显^[17]。在本研究中,饮用4% DSS溶液7 d后小鼠全部出现腹泻及便血现象,结肠明显缩短,组织病理检测发现结肠严重溃疡,黏膜上皮细胞大量脱落,较多炎症细胞浸润,说明结肠炎模型构建成功。而口服表达 pEGF 重组 *L. lacits* 小鼠个别出现水样稀便,结肠长度显著增加,HE染色发现小鼠结肠黏膜上皮修复,未见糜烂和溃疡,仅见黏膜层内少量炎症细胞浸润。EGF 是一类对肠道黏膜有营养、成熟和治疗性作用的缩氨酸,具有促进肠上皮细胞增殖和分化,加速肠道创伤愈合的重要作用^[18-19]。本课题组前期研究结果显示,皮下注射 EGF 可改善 DSS 结肠炎模型小鼠结肠组织形态,降低结肠损伤程度评分^[20]。林军等^[21]研究显示,给结肠炎模型大鼠注射 EGF 并联合饲喂谷氨酰胺,可增加组织营养和能量供给,抑制炎症反应,对结肠黏膜具有保护作用。在本研究中,小鼠口服表达 pEGF 的重组 *L. lacits* 抑制了小鼠结肠的缩短,修复了肠道黏膜损伤,维持了结肠上皮结构的相对完整性。

肠道不仅是营养物质消化吸收的场所,也是阻止肠腔内细菌、毒素等有害物质入侵体内的重要屏障,屏障功能的完整性是维持肠道正常功能和动物健康的关键因素。occludin 是肠道细胞间紧密连接(tight junction, TJ)的主要结构蛋白,与 TJ 的组装、稳定性和肠道屏障功能密切相关,其浓度降低会导致肠道通透性增加、肠道屏障功能障碍等^[22]。EGF 具有保护肠道屏障功能完整性的作用。研究显示,给坏死性肠炎大鼠补充 EGF, EGF 可通过促进杯状细胞的成熟和黏液的产生来维持肠道损伤部位的完整性,调节肠道 TJ 蛋白的表达水平,改善肠道屏障功能^[23]。把肠上皮细胞 Caco-2 暴露在甲醛溶液中,可增加 Caco-2 对菊糖和脂多糖的细胞旁通透性,降低 occludin 浓度,而补充 EGF 可阻止甲醛对 TJ 与黏合连接的破坏,提高 occludin 浓度^[24]。在本研究中,小鼠饮用4%的 DSS 水溶液显著降低了结肠 occludin 浓度,而口服表达 pEGF 的重组 *L. lacits* 显著增加了小鼠结肠 occludin 浓度,并与正常对照组相比差异不显著,说明 DSS 增加了结肠的通透性,破坏了肠道的屏障功能,给小鼠口服表达 pEGF 的重组 *L. lacits* 可

降低结肠的通透性,缓解 DSS 对肠道屏障功能的破坏,这个结果与 HE 染色结果相一致。

血清 DAO 活性和 *D-LAC* 浓度被认为是反映肠道机械屏障完整性和受损伤程度的重要指标^[25]。DAO 是肠道绒毛中具有高度活性的细胞内酶,在组胺及多胺代谢中起作用;*D-LAC* 是肠道细菌发酵产生的代谢产物。正常情况下 DAO 和 *D-LAC* 主要存在肠道内,当肠道屏障功能受到损伤,黏膜通透性增加,肠道内的 DAO 和 *D-LAC* 则通过受损的黏膜释放到血液中,导致血清中 DAO 活性和 *D-LAC* 浓度升高。研究显示, DSS 能够增加肠道通透性,诱导大鼠或小鼠血浆 DAO 活性和 *D-LAC* 浓度显著升高^[26-27]。在本研究中, DSS 模型对照组小鼠血清 DAO 活性极显著高于正常对照组,血清 *D-LAC* 浓度显著高于正常对照组,说明了小鼠饮用4%的 DSS 水溶液导致肠道黏膜损伤,肠道黏膜通透性增加,而口服重组 *L. lacits* 则显著降低了血清 *D-LAC* 浓度,极显著降低了血清 DAO 活性,进一步提示表达 pEGF 的重组 *L. lacits* 改善了肠道的通透性,对肠道屏障具有保护作用。

细胞因子在调节肠道免疫反应中发挥重要作用,促炎性细胞因子与抗炎性细胞因子间的平衡失调是导致肠道免疫机能障碍的主要原因。研究显示,小鼠自由饮用3%的 DSS 水溶液10 d,结肠白细胞介素-8(IL-8)浓度显著升高,IL-10 浓度显著降低^[28];大鼠口服3%的 DSS 水溶液8 d,结肠 IL-4 浓度显著降低, TNF- α 浓度显著升高^[29]。目前关于 DSS 结肠炎的具体致病机制仍不清楚,可能与巨噬细胞的功能失调、细胞因子浓度改变,以及 DSS 对结肠上皮的毒性作用等多种因素有关。研究显示,IL-10 具有很强的免疫调节作用,可调节 Th1 和 Th2 细胞因子的平衡,有效抑制白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-12(IL-12)和 TNF- α 等促炎细胞因子的产生^[30]。肠上皮细胞缺失 IL-10,可导致肠道黏膜屏障损伤^[31]。IL-4 是由肥大细胞或活化的 Th2 细胞产生,可抑制细胞因子 IL-6、IL-8、IL-1 和 TNF- α 等的产生,随着 IL-4 浓度升高,炎症抑制的效果更显著^[32]。TNF- α 是结肠炎致病的关键细胞因子,通过表达黏附分子、凝血因子等启动细胞毒性、凋亡和急性期反应等发挥作用。在结肠炎早期抑制 TNF- α 产生,可减轻或阻止结肠炎的发生^[33]。在本研究中,与正常对照组相比, DSS 模型对照组小

鼠结肠 TNF- α 浓度极显著升高,IL-10 浓度极显著降低,IL-4 浓度显著降低;口服表达 pEGF 的重组 *L. lactis* 改善了结肠中细胞因子浓度,极显著提高了 IL-10 浓度,显著提高了 IL-4 浓度,并有降低 TNF- α 浓度的趋势,并且上述细胞因子浓度与正常对照组比较差异不显著。这些结果说明 *L. lactis* 表达的 pEGF 具有良好的生物活性,可以调节 TNF- α 、IL-10 和 IL-4 浓度达到正常水平,显著抑制了肠道炎症反应,对损伤的肠道具有修护作用。

4 结 论

本试验成功构建了表达 pEGF 的重组 *L. lactis*,重组 pEGF 具有良好生物活性;结肠炎模型小鼠口服表达 pEGF 的重组 *L. lactis*,可抑制结肠的缩短,改善结肠的形态结构和通透性,调节细胞因子浓度达到正常水平,维护肠道屏障功能的相对完整性,对损伤肠道具有修复作用。

参考文献:

- [1] JI F J, WANG L X, YANG H S, et al. The roles and functions of glutamine on intestinal health and performance of weaning pigs [J]. *Animal*, 2019, 13 (11) : 2727-2735.
- [2] MOESER A J, KLOK C V, RYAN K A, et al. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig [J]. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2007, 292 (1) : G173-G181.
- [3] YIN J, LI F N, KONG X F, et al. Dietary xylo-oligosaccharide improves intestinal functions in weaned piglets [J]. *Food & Function*, 2019, 10 (5) : 2701-2709.
- [4] HARDWICKE J, SCHMALJOHANN D, BOYCE D, et al. Epidermal growth factor therapy and wound healing-past, present and future perspectives [J]. *The Surgeon*, 2008, 6 (3) : 172-177.
- [5] 刘淑杰,徐子伟,齐珂珂,等.表皮生长因子对肠道功能调控的研究 [J]. *动物营养学报*, 2014, 26 (3) : 565-570.
LIU S J, XU Z W, QI K K, et al. Regulation of epidermal growth factor on intestinal functions [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2014, 26 (3) : 565-570. (in Chinese)
- [6] WANG S J, GUO C H, ZHOU L, et al. Comparison of the biological activities of *Saccharomyces cerevisiae* expressed intracellular EGF, extracellular EGF, and tagged EGF in early-weaned pigs [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99 (17) : 7125-7135.
- [7] LIU C Q, SU P, KHUNAJAKR N, et al. Development of food-grade cloning and expression vectors for *Lactococcus lactis* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98 (1) : 127-135.
- [8] STEIDLER L, VANDENBROUCKE K. Genetically modified *Lactococcus lactis*: novel tools for drug delivery [J]. *International Journal of Dairy Technology*, 2006, 59 (2) : 140-146.
- [9] NADERI-SAMANI M, SOLTANI M, DADAR M, et al. Oral immunization of trout fry with recombinant *Lactococcus lactis* NZ3900 expressing G gene of viral hemorrhagic septicaemia virus (VHSV) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 105 : 62-70.
- [10] SING S S, LI P F, ZHANG J H, et al. Oral vaccine of recombinant *Lactococcus lactis* expressing the VP1 protein of duck hepatitis A virus type 3 induces mucosal and systemic immune responses [J]. *Vaccine*, 2019, 37 (31) : 4364-4369.
- [11] 刘秦华,邵涛,董志浩,等. β -1,4-葡聚糖内切酶 eg13 基因在乳酸乳球菌中分泌表达的研究 [J]. *中国科技论文*, 2017, 12 (6) : 633-638.
LIU Q H, SHAO T, DONG Z H, et al. Research of β -1,4-endoglucanase gene secreting expression in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363 [J]. *China Science Paper*, 2017, 12 (6) : 633-638. (in Chinese)
- [12] 周颖,高晓峰,刘飞,等.*L*-乳酸脱氢酶基因在乳酸乳球菌 KLDS4.0325 中的表达 [J]. *现代食品科技*, 2015, 31 (4) : 63-68.
ZHOU Y, GAO X F, LIU F, et al. Variations in the expression of the *L*-lactate dehydrogenase gene during the different phases of *Lactococcus lactis* KLDS4.0325 Growth [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31 (4) : 63-68. (in Chinese)
- [13] LIU S J, LI Y M, DENG B, et al. Recombinant *Lactococcus lactis* expressing porcine insulin-like growth factor I ameliorates DSS-induced colitis in mice [J]. *BMC Biotechnology*, 2016, 16 : 25.
- [14] 宋丽影,邵怡岚,李雪纯,等.表达牛乳铁蛋白肽的重组乳酸乳球菌对雏鸡抗鸡白痢沙门氏菌感染的效果研究 [J]. *中国预防兽医学报*, 2017, 39 (3) : 206-209.
SONG L Y, SHAO Y L, LI X C, et al. Effect of recombinant *Lactococcus lactis* expressing bovine lacto-

- ferrin peptide against *Salmonella pullorum* infection in chicken[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2017, 39(3): 206-209. (in Chinese)
- [15] LEE D N, KUO T Y, CHEN M C, et al. Expression of porcine epidermal growth factor in *Pichia pastoris* and its biology activity in early-weaned piglets [J]. Life Sciences, 2006, 78(6): 649-654.
- [16] 贺超, 邓璐, 汤承, 等. 猪表皮生长因子在大肠杆菌中的串联表达[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2015, 41(2): 144-149.
- HE C, DENG L, TANG C, et al. Expression of tandem repeats of porcine epidermal growth factor in *Escherichia coli* [J]. Journal of Southwest University for Nationalities (Natural Science Edition), 2015, 41(2): 144-149. (in Chinese)
- [17] 温红珠, 郝微微, 李佳, 等. 葡聚糖硫酸钠结肠炎模型影响因素的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(36): 3666-3671.
- HNONG Z W, WEI W H, JIA L, et al. Factors influencing the development of animal models of dextran sulphate sodium-induced colitis [J]. Journal of Clinical Investigation, 2011, 19(36): 3666-3671. (in Chinese)
- [18] CLATK J A, LANE R H, MACLENNAN N K, et al. Epidermal growth factor reduces intestinal apoptosis in an experimental model of necrotizing enterocolitis [J]. American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology, 2005, 288(4): G755-G762.
- [19] TANG X P, LIU H, YANG S F, et al. Epidermal growth factor and intestinal barrier function [J]. Mediators of Inflammation, 2016, 2016: 1927348, doi: 10.1155/2016/1927348.
- [20] 刘淑杰, 邓波, 徐子伟. 表皮生长因子对葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎模型小鼠肠道损伤的修复研究 [J]. 动物营养学报, 2016, 28(6): 1735-1741.
- LIU S J, DENG B, XU Z W. Study on intestinal damage repair of epidermal growth factor on dextra sulfate sodium-induced colitis in mice [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2016, 28(6): 1735-1741. (in Chinese)
- [21] 林军, 邓长生, 陈德基. 表皮生长因子与谷氨酰胺对大鼠乙酸性结肠炎的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 1997, 13(3): 278-281.
- LIN J, CHEN D J. Effect of epidermal growth factor and glutamine on acetic acid-induced colitis in rats [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 1997, 13(3): 278-281. (in Chinese)
- [22] MIR H, MEENA A S, CHAUDHRY K K, et al. Occludin deficiency promotes ethanol-induced disruption of colonic epithelial junctions, gut barrier dysfunction and liver damage in mice [J]. Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects, 2016, 1860(4): 765-774.
- [23] CLARK J A, DOELLE S M, HALPERN M D, et al. Intestinal barrier failure during experimental necrotizing enterocolitis: protective effect of EGF treatment [J]. American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology, 2006, 291(5): G938-G949.
- [24] SHETH P, SETH A, THANGAVEL M, et al. Epidermal growth factor prevents acetaldehyde-induced paracellular permeability in Caco-2 cell monolayer [J]. Alcoholism-Clinical and Experimental Research, 2004, 28(5): 797-804.
- [25] 胡红莲, 高民. 肠道屏障功能及其评价指标的研究进展 [J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(17): 78-82.
- HU H L, GAO M. Research advance in intestinal barrier function and evaluation index [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2012, 48(17): 78-82. (in Chinese)
- [26] 黄婧渝, 农辉, 裴羨, 等. 四君子汤对溃疡性结肠炎小鼠模型肠黏膜屏障的作用机制 [J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(27): 4326-4334.
- HUANG Q Y, NONG H, PEI X, et al. Mechanism underlying effect of *Sijunzi* decoction on intestinal mucosal barrier of mice with ulcerative colitis [J]. World Chinese Journal of Digestology, 2015, 23(27): 4326-4334. (in Chinese)
- [27] WNAG R Q, WU G T, DU L D, et al. Semi-bionic extraction of compound turmeric protects against dextran sulfate sodium-induced acute enteritis in rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 192: 288-300.
- [28] 刘力, 张欢, 马文军. 马齿苋水煎剂对溃疡性结肠炎小鼠结肠组织中 *IL-8*、*IL-10* 表达的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(5): 18-20.
- LIU L, ZHANG H, MA W J. Effects of purslane water decoction on *IL-8*, *IL-10* in colon tissue of ulcerative colitis in mice [J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, 2011, 13(5): 18-20. (in Chinese)
- [29] 肖娴, 李秀琼, 刁建新, 等. 白芍总苷对葡聚糖硫酸钠致大鼠实验性结肠炎作用机制研究 [J]. 佛山科学技术学院学报(自然科学版), 2012, 30(2): 78-81.
- XIAO X, LI X Q, DIAO J X, et al. Effects of total glucosides of paeony on rats' ulcerative colitis caused by dextran sulfate sodium [J]. Journal of Foshan Univer-

- sity (Natural Science Edition), 2012, 30(2): 78-81. (in Chinese)
- [30] 顾秋平, 白爱平. 白介素-10 与炎症性肠病[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(1): 57-61.
GU Q P, BAI A P. Interleukin-10 and inflammatory bowel disease[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2011, 19(1): 57-61. (in Chinese)
- [31] JARRY A, BOSSARD C, BOU-HANNA C, et al. Mucosal IL-10 and TGF-beta play crucial roles in preventing LPS-driven, IFN-gamma-mediated epithelial damage in human colon explants[J]. Journal of Clinical Investigation, 2008, 118(3): 1132-1142.
- [32] 沈天天, 吴建新. 炎症性肠病与抗炎细胞因子[J]. 中华消化杂志, 2011, 31(2): 138-141.
SHEN T T, WU J X. Inflammatory bowel disease and anti-inflammatory cytokines [J]. Chinese Journal of Digestion, 2011, 31(2): 138-140. (in Chinese)
- [33] 郑萍, 牛凤丽, 刘文忠, 等. 氧化苦参碱对葡聚糖硫酸钠诱导大鼠结肠炎的抗炎作用机制研究[J]. 中华消化杂志, 2003, 23(4): 207-210.
ZHENG P, NIU F L, LIU W Z, et al. Study on the anti-inflammatory mechanism of oxymatrine in dextran sulfate sodium induced colitis of rats [J]. Chinese Journal of Digestion, 2003, 23(4): 207-210. (in Chinese)

Construction of Recombinant *Lactococcus lactis* Expressing Porcine Epidermal Growth Factor and Its Repair Effects on Intestinal Damage of Colitis Model in Mice

LIU Shujie TAO Xin DENG Bo MEN Xiaoming XU Ziwei*

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: This study aimed to construct recombinant *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) expressing porcine epidermal growth factor (pEGF), evaluate its repair effects on intestinal damage of colitis model induced by dextran sulfate sodium (DSS) in mice, and further provide an important foundation in order that recombinant *L. Lactis* could be applied to intestinal protection in weaned piglets. Three copies of mature pEGF with the same nucleotide sequence were designed by tandem repeat strategy. The gene sequence of designed 3pEGF was further optimized based on codon bias of *L. lactis*. The resulting fragment was synthesized, and then was cloned into pNZ8148 vector. Recombinant *L. lactis* expressing pEGF was constructed. Thirty-two BALB/C mice were randomly allotted in four groups with eight mice per group. Colitis model was induced by 4% DDS in mice. The mice in the four groups were treated as follow: normal control group received normal drinking water on the 1st to 12th day; DSS model control group received 4% DSS solution in drinking water on the 1st to 7th days and followed with normal drinking water on the 8th to 12th days; *L. lactis* group received the same treatment of DSS as DSS model control group, meanwhile, these mice were orally administered with 1×10^{12} CFU/d of *L. lactis* for consecutive 12 days; recombinant *L. lactis* group received the same treatment of DSS as DSS model control group, meanwhile, these mice were orally administered with 1×10^{12} CFU/d of recombinant *L. lactis* for consecutive 12 days. The results showed as follows: 1) by sequence identification, the 3pEGF had been successfully transformed into *L. lactis*. Western blot analysis results revealed that pEGF could react with the specific antibody, which primarily indicated that pEGF had biological activity. 2) DSS treatment significantly shortened colon length compared with normal control group ($P < 0.05$), and oral administration of recombinant *L. lactis* significantly increased colon length compared with DSS model control group ($P < 0.05$). 3) DSS treatment significantly decreased colonic occludin concentration ($P < 0.05$), significantly increased colonic D-lactate

(*D-LAC*) concentration ($P<0.05$) and diamine oxidase (DAO) activity ($P<0.01$) compared with normal control group. Oral administration of recombinant *L. lactis* significantly increased colonic occludin concentration ($P<0.05$), and significantly decreased colonic *D-LAC* concentration ($P<0.05$) and DAO activity ($P<0.01$) compared with DSS model control group. 4) DSS treatment significantly decreased colonic interleukin-10 (IL-10) ($P<0.01$) and interleukin-4 (IL-4) concentrations ($P<0.05$), and significantly increased colonic tumor necrosis factor- α (TNF- α) concentration ($P<0.01$) compared with normal control group. Oral administration of recombinant *L. lactis* significantly enhanced colonic IL-10 ($P<0.01$) and IL-4 concentrations ($P<0.05$), and significantly decreased colonic TNF- α concentration compared with DSS model control group. In conclusion, recombinant *L. lactis* expressing pEGF is successfully constructed, and recombinant pEGF possesses good biological activity. Oral administration of recombinant *L. lactis* in mice can prevent colon shortening, improve intestinal permeability, and regulate the concentrations of intestinal cytokines to normal levels, these show that recombinant *L. lactis* expressing pEGF can maintain the integrity of intestinal mucosal barrier, and has a certain effect for repairing the damaged intestinal tissue. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(4):2253-2262]

Key words: epidermal growth factor; *Lactococcus lactis*; express; intestine; damage repair; colitis