

· 实验研究 ·

双歧杆菌对内毒素损伤幼年大鼠肠道 血管内皮细胞粘附分子-1 的影响

王玮^{1,3}, 叶青², 刘伟³, 孙梅¹

(1. 中国医科大学附属二院儿科, 辽宁 沈阳 10004; 2. 黑龙江省红十字医院儿科, 黑龙江 哈尔滨 150030;
3. 哈尔滨医科大学附属二院儿科、科研试验中心, 黑龙江 哈尔滨 150086)

[摘要] 目的 双歧杆菌是肠黏膜屏障中生物屏障的主要成分, 参与了宿主的消化、营养、代谢、吸收、免疫及抗感染过程, 然而其具体的作用机制目前还不清楚。该研究欲探讨双歧杆菌对内毒素损伤幼年大鼠血清和回肠组织的丙二醛(MDA)含量和小肠绒毛间质血管内皮细胞粘附分子-1(ICAM-1)表达的影响。方法 腹腔注射内毒素制造内毒素损伤动物模型(模型组, E组), 治疗组(T组)提前7 d给予双歧杆菌灌胃, 同时设对照组(C组, 腹腔注射生理盐水), 于不同时间点处死后检测血清和肠组织中MDA的含量, 并用免疫组织化学和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测小肠组织ICAM-1蛋白质和核酸水平的变化。结果 E组血清和小肠MDA含量较对照组增加, 以6 h增加明显(肠组织: 99.88 ± 12.62 nmol/mg prot vs 84.25 ± 12.96 nmol/mg prot, $P < 0.05$; 血清: 1.67 ± 0.30 nmol/mL vs 1.13 ± 0.20 nmol/mL, $P < 0.05$); T组MDA含量(6 h: 肠组织 92.75 ± 9.28 nmol/mg prot; 血清 1.17 ± 0.23 nmol/mL)较E组下降; E组小肠组织ICAM-1蛋白质和核酸表达增加, 分别以6 h和2 h为著, T组改变低于E组($P < 0.05$)。结论 内毒素损伤幼年大鼠血清和小肠MDA含量增加, 同时ICAM-1蛋白质和mRNA表达增加, 外源性给予双歧杆菌能降低内毒素组MDA和ICAM-1的增加, 表明双歧杆菌能通过抑制大鼠体内的MDA含量和ICAM-1的表达而起到一定的肠道保护作用。 [中国当代儿科杂志, 2007, 9(4): 375-378]

[关键词] 双歧杆菌; 小肠; 丙二醛; 细胞粘附分子-1; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)04-0375-04

Effect of bifidobacteria on ileum intercellular adhesion molecule-1 expression in young rats with endotoxin-induced intestinal damage

WANG Wei, YE Qing, LIU Wei, SUN Mei. Department of Pediatrics, Second Affiliated Clinical College, China Medical University, Shenyang 110004, China (Sun M, Email: sunm@cmu2h.com)

Abstract: Objective To investigate the effects of bifidobacteria on malondialdehyde (MDA) content and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in serum and ileum tissues of young rats with endotoxin-induced intestinal damage, and possible protective mechanisms of bifidobacteria on intestines. **Methods** Eighteen-day-old Wistar rats were randomly administered with normal saline (NS), lipopolysaccharide (LPS, 5 mg/kg) or LPS + bifidobacteria. Bifidobacteria (0.5 mL, twice a day) was intragastrically administrated 7 days prior to LPS injection until the end of the experiment. MDA contents in serum and ileum were detected by the TBA method. Expression of ICAM-1 protein and mRNA were evaluated by immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) after 2, 6, 24 and 72 hrs of LPS injection. **Results** The serum and ileum MDA contents in the untreated LPS group increased significantly and reached a peak at 6 hrs of LPS injection when compared with the NS control group (ileum: 99.88 ± 12.62 nmol/mg prot vs 84.25 ± 12.96 nmol/mg prot, $P < 0.05$; serum: 1.67 ± 0.30 nmol/mL vs 1.13 ± 0.20 nmol/mL, $P < 0.05$). The MDA contents in ileum (92.75 ± 9.28 nmol/mg prot) and serum (1.17 ± 0.23 nmol/mL) in the bifidobacteria-treated group at 6 hrs of LPS injection were significantly lower than in the LPS group ($P < 0.05$). The expression of ICAM-1 protein in the untreated LPS group remarkably increased at 6, 12, 24 and 72 hrs of LPS injection when compared with the NS control group ($P < 0.01$). The bifidobacteria-treated group displayed lower ICAM-1 protein levels than the untreated LPS group at 72 hrs of LPS injection ($P < 0.01$). The ICAM-1 mRNA expression in the untreated LPS group significantly increased at 2 hrs of LPS injection when compared with the NS control group ($P < 0.01$). The ICAM-1 mRNA expression in the bifidobacteria-treated group began to decrease at 2 hrs of LPS injection and was reduced

[收稿日期] 2007-02-07; [修回日期] 2007-03-14

[作者简介] 王玮, 女, 硕士, 主治医师。主攻方向: 小儿消化系统疾病。

[通讯作者] 孙梅, 教授, 博士生导师, 中国医科大学附属二院儿科, 邮编: 110004。

again at 24 hrs after experiencing increase at 6 and 12 hrs of LPS injection when compared with the untreated LPS group ($P < 0.01$). **Conclusions** The serum and ileum MDA contents and the expression of ICAM-1 protein and mRNA increased in young rats with endotoxin-induced intestinal damage. Bifidobacteria supplementation can decrease MDA contents and inhibit ICAM-1 expressions, thus providing protections for intestines.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9 (4):375-378]

Key words: Bifidobacteria; Intestine; Malondialdehyde; Intercellular adhesion molecule-1; Rats

严重感染是小儿胃肠功能障碍的常见病因之一,其发病机制与内毒素血症和胃肠道屏障功能破坏密切相关。双歧杆菌是肠黏膜屏障中生物屏障的主要成分,是人体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^[1]。细胞间粘附分子(ICAM-1)是一类位于细胞膜表面的糖蛋白分子,在体内分布广泛,在炎症和免疫反应中起重要作用。组织局部粘附分子表达上调是中性粒细胞(PMN)粘附、激活的基础,PMN过度激活引起的组织损伤日益受到重视。但是有关外源性双歧杆菌对腹腔感染大鼠肠道的ICAM-1表达情况国内外尚未见报道。本文欲研究内毒素损伤幼鼠肠道的MDA含量和ICAM-1的表达变化并探讨双歧杆菌对肠道的保护机制。

1 材料和方法

1.1 材料

双歧杆菌为为婴儿型双歧杆菌,菌种编号KLDS 2.0002,购自东北农业大学乳品科学教育部重点实验室(KLDS);大肠杆菌精制内毒素(LPS)购自Sigma公司;考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒和丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;ICAM-1兔抗大鼠IgG(一抗)购于武汉博士德生物工程有限公司,辣根酶标记山羊抗兔IgG(二抗)及浓缩型DAB试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司;ICAM-1及 β -actin引物由上海申能博彩生物科技有限公司设计并合成;RT-PCR试剂盒购于Promega(北京)生物技术有限公司;Wistar大鼠由哈尔滨医科大学附属二院实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 内毒素损伤动物模型制作^[2-3] 健康18日龄Wistar大鼠120只,平均体质量 30.4 ± 6.3 g,雌雄不限,进食鼠乳。除对照组40只外均腹腔注射内毒素(LPS)5 mg/kg,配比浓度为5 mg/L,用生理盐水溶解。注射后仍送回母鼠笼内哺喂鼠乳。

1.2.2 实验分组 实验动物随机分为3组,每组40只。对照组(C组)腹腔注射生理盐水1 mL/kg,

模型组(E组)腹腔注射LPS(5 mg/kg,5 mg/L);治疗组(T组)提前1周给予双歧杆菌混悬液(2.0×10^9 CFU/mL)灌胃,每次0.5 mL,每日2次,直至实验结束^[4-6];分别于注射内毒素或生理盐水后2,6,12,24,72 h断头处死动物,留取血清和回肠组织。

1.2.3 实验方法 各组动物于各时间点断头处死后取血,3 500 r/min离心15 min,取上清-20℃保存。距回盲部2~3 cm处留取0.5~1 cm回肠,置于0.1 mol/L PBS配置的4%多聚甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋,切片,用于免疫组织化学研究;距回盲部3~4 cm处留取4~5 cm回肠,部分放入液氮后移至-80℃冰箱中用于提取总RNA,部分用冰生理盐水冲洗肠腔内容物后,滤纸吸干水分后,称重,用生理盐水制成1%匀浆,3 000 r/min离心10 min,留上清-20℃保存。

1.2.4 检测指标及方法 ①血清和回肠组织MDA含量测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法,回肠组织匀浆蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝染色法,具体操作严格按照试剂盒说明进行;②小肠组织ICAM-1蛋白用免疫组织化学ABC法显示肠绒毛间质血管内皮ICAM-1的表达,DAB显色棕黄色深浅不同代表表达量的多少;③小肠组织ICAM-1 mRNA的表达:用RT-PCR法,异硫氰酸胍一步法提取总RNA,逆转录合成cDNA,PCR扩增ICAM-1片段,引物序列为:5'-TGTCCGTGCTCAGGTATCCATC-3',5'-GCCGCTCAGTGTCTCATTC-3',产物长度406 bp,扩增条件:94℃,5 min;94℃,30 s,57℃,30 s,72℃,40 s,35次循环后,72℃,7 min;以 β -actin作内参照, β -actin引物序列为:5'-CATCTGCTGGAAGGTGGA-CA-3',5'-GAGAGGGAATCGTGCGTGAC-3',产物长度452 bp,扩增条件:94℃,5 min;94℃,30 s,56℃,40 s,72℃,22 s,30次循环后,72℃,7 min。PCR产物经2%琼脂糖凝胶电泳后紫外光照相分析,结果以ICAM-1光密度/ β -actin光密度表示。

1.3 统计学处理

采用SPSS10.0统计软件,计量资料结果以均值 $\pm$ 标准差表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 提示差异有显著性。

2 结果

2.1 血清MDA含量

E组MDA含量在6,12,24 h与C组比较有显著增加($P<0.05$),T组MDA含量在6,12 h及24 h与E组比较有显著下降($P<0.05$),见表1。

2.2 回肠组织MDA含量

E组MDA含量在6,12,24 h与C组比较有显著增加($P<0.05$),T组MDA含量在12 h及24 h与E组比较有显著降低($P<0.05$),见表2。

2.3 回肠ICAM-1蛋白表达

ICAM-1蛋白免疫组织化学染色结果显示:C组

小肠黏膜间质少量棕黄色颗粒,E组小肠黏膜间质均有棕黄色颗粒,以6 h为著,在6,12,24 h和72 h均较C组差异有显著性($P<0.01$),T组在6 h和12 h光密度值较E组增加($P<0.01$),以后逐渐下降,在72 h低于E组($P<0.01$)。见图1,表3。

2.4 回肠ICAM-1 mRNA表达

C组回肠有少量ICAM-1 mRNA的表达,而E组在LPS作用2 h后表达明显增加($P<0.01$),以后各时间点与C组差异无显著性;T组在2 h较E组表达下降($P<0.01$)而与C组差异无显著性,在6 h和12 h表达较E组明显增加($P<0.01$),24 h下降明显,与C组、E组比较均差异有显著性($P<0.01$),72 h回升至正常,见表4。

表1 各组大鼠不同时间点血清MDA含量 (nmol/mL, $\bar{x} \pm s$)

	2 h	6 h	12 h	24 h	72 h
C组	1.01 ± 0.20	1.13 ± 0.20	1.06 ± 0.23	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.19
E组	1.11 ± 0.21	1.67 ± 0.30 ^a	1.44 ± 0.30 ^a	1.42 ± 0.26 ^a	1.20 ± 0.24
T组	1.24 ± 0.27	1.17 ± 0.23 ^b	1.11 ± 0.19 ^b	1.14 ± 0.16 ^b	1.14 ± 0.18

a与C组比较, $P<0.05$;b与E组比较, $P<0.05$

表2 各组大鼠不同时间点回肠组织MDA含量 (nmol/mg prot, $\bar{x} \pm s$)

	2 h	6 h	12 h	24 h	72 h
C组	78.22 ± 11.78	84.25 ± 12.96	83.77 ± 15.46	81.87 ± 13.58	89.43 ± 14.17
E组	89.20 ± 16.37	99.88 ± 12.62 ^a	101.40 ± 15.02 ^a	98.29 ± 15.75 ^a	90.93 ± 15.08
T组	83.09 ± 18.92	92.75 ± 9.28	86.45 ± 11.51 ^b	81.14 ± 13.06 ^b	93.08 ± 10.95

a与C组比较, $P<0.05$;b与E组比较, $P<0.05$

表3 各组大鼠不同时间点回肠ICAM-1免疫组织化学光密度 ($\bar{x} \pm s$)

	2 h	6 h	12 h	24 h	72 h
C	0.141 ± 0.028	0.135 ± 0.024	0.129 ± 0.028	0.130 ± 0.031	0.122 ± 0.027
E	0.163 ± 0.020	0.418 ± 0.047 ^a	0.365 ± 0.058 ^a	0.331 ± 0.031 ^a	0.240 ± 0.032 ^a
T	0.171 ± 0.034	0.556 ± 0.057 ^b	0.436 ± 0.030 ^b	0.330 ± 0.030	0.131 ± 0.020 ^b

a与C组比较, $P<0.01$;b与E组比较, $P<0.01$

表4 各组大鼠不同时间点回肠组织ICAM-1 mRNA光密度/ β -actin mRNA光密度值 ($\bar{x} \pm s$)

	2 h	6 h	12 h	24 h	72 h
C	0.109 ± 0.025	0.103 ± 0.027	0.100 ± 0.029	0.098 ± 0.033	0.106 ± 0.024
E	0.205 ± 0.031 ^a	0.093 ± 0.024	0.103 ± 0.021	0.090 ± 0.029	0.110 ± 0.028
T	0.111 ± 0.022 ^b	0.318 ± 0.053 ^{a,b}	0.231 ± 0.027 ^{a,b}	0.007 ± 0.002 ^{a,b}	0.112 ± 0.018

a与C组比较, $P<0.01$;b与E组比较, $P<0.01$

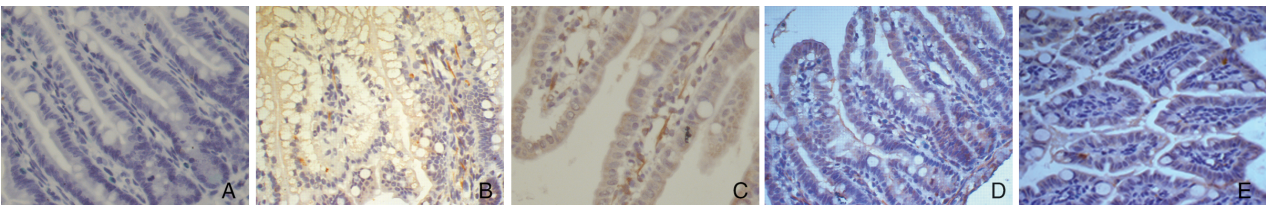


图1 各组回肠ICAM-1免疫组织化学(400×)A:C组,小肠绒毛间质少量棕黄色颗粒;B:E组6 h,小肠黏膜间质均有棕黄色颗粒;C:E组72 h,小肠黏膜间质仍有棕黄色颗粒;D:T组6 h,小肠黏膜间质均有棕黄色颗粒,分布密集;E:T组72 h,小肠黏膜间质阳性染色较淡。

3 讨论

胃肠功能障碍在多器官功能衰竭(MODS)的发展进程中起重要作用,肠道既是MODS发生时受损的靶器官之一,又在MODS发生中起着始动器的作用,而肠黏膜屏障损害是其发生的关键。肠黏膜机械屏障和肠道菌群组成的生物屏障在阻止细菌或内毒素移位过程中发挥着关键作用^[7]。

组织损伤产生的自由基氧化生物膜的不饱和脂肪酸,形成的过氧化脂质分解产生丙二醛(MDA)。MDA含量多少在一定程度上反映了氧自由基对组织、细胞损伤的程度。腹腔注射LPS后,血清和回肠MDA含量明显升高,在6、12和24 h增加明显,高峰分别在6、12 h,说明LPS使肠组织损伤,动物模型制造成功。

ICAM-1属于免疫球蛋白超家族成员,是血管内皮细胞表面重要的粘附分子,其配体为中性粒细胞(PMN)上的CD11b/CD18分子,组织局部粘附分子表达上调是PMN粘附、激活的基础。PMN过度激活引起的组织损伤日益受到重视。

本研究中ICAM-1免疫组织化学染色结果显示:对照组大鼠小肠黏膜间质有少量棕黄色颗粒,注射LPS后在6、12、24和72 h小肠黏膜间质均有棕黄色颗粒,以6 h为著。ICAM-1 mRNA的RT-PCR结果显示:对照组大鼠回肠有少量ICAM-1 mRNA的表达,而腹腔注射LPS后2 h后表达明显增加,以后表达开始下降。肠黏膜组织中ICAM-1表达增加介导的PMN在局部组织中聚集、粘附,从而引起炎症反应。

外源性补充双歧杆菌能减少新生大鼠坏死性小肠结肠炎(NEC)的发生^[6],改善免疫力低下小鼠的肠道菌群结构^[8],能有效防治严重烧伤后肠道菌群紊乱性腹泻及抗生素相关性腹泻^[9],能促进烫伤后受损肠黏膜机械屏障、生物屏障和免疫屏障的修复,有效防治肠道细菌和内毒素移位^[10,11]。

预先外源性给予幼鼠双歧杆菌灌胃可抑制LPS损伤后血清和回肠组织MDA的增高,表明双歧杆菌通过加强肠道微生态屏障而降低了内毒素对肠黏膜的损害,因此脂质过氧化反应减轻,自由基生成减少,间接的保护肠组织免受损伤;双歧杆菌治疗组ICAM-1蛋白质表达在6和12 h光密度值较E组增加,24 h与E组无差异,72 h低于E组,表明双歧杆菌能最终减少ICAM-1蛋白质的表达,但是表现为6和12 h表达增加、24 h表达同E组、72 h下降明显

的先升后降特点;双歧杆菌治疗组ICAM-1 mRNA在6和12 h表达较E组明显增加,24 h和72 h下降至正常,表明双歧杆菌能最终减少ICAM-1 mRNA的表达,在2 h为著,6和12 h表达有增加,以后才逐渐下降至正常。

本研究表明LPS引起幼鼠回肠组织ICAM-1蛋白质和mRNA表达增加,其中mRNA表达增加在先,双歧杆菌在时间上延迟了ICAM-1蛋白质和mRNA的表达,在程度上先增加,以后才逐渐减少表达,从而抑制了ICAM-1介导的炎症反应,但是这种表达强弱的变化原因有待于在以后的研究中进一步探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Alvarez-Olmos MI, Oberhelman RA. Probiotic agents and infectious diseases; a modern perspective on a traditional therapy[J]. Clin Infect Dis, 2001, 32(11):1567-1576.
- [2] Lee IK, Lee YM, Song IS, Chung SJ, Kim SG, Lee MG, et al. Hepatobiliary excretion of tributylmethylammonium in rats with lipopolysaccharide-induced acute inflammation[J]. Arch Pharm Res, 2002, 25(6):969-972.
- [3] 李军,赵亚娟,孙梅,潘莉莉,高红. 肠三叶因子对内毒素诱导幼鼠肠组织NO和MDA的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(1):63-67.
- [4] Choi SS, Kang BY, Chung MJ, Kim SD, Park SH, Kim JS, et al. Safety assessment of potential lactic acid bacteria Bifidobacterium longum SPM1205 isolated from healthy Koreans[J]. J Microbiol, 2005, 43(6):493-498.
- [5] Eizaguirre I, Urkia NG, Asensio AB, Zubillaga I, Zubillaga P, Vidales C, et al. Probiotic supplementation reduces the risk of bacterial translocation in experimental short bowel syndrome[J]. J Pediatr Surg, 2002, 37(5):699-702.
- [6] Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, Russell T, Lickerman M, Amer M, et al. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model[J]. Gastroenterology, 1999, 117(3):577-583.
- [7] 王忠堂,姚咏明,肖光夏,盛志勇. 烫伤大鼠肠源性细菌移位危险性多因素分析[J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(9):770-773.
- [8] 孟祥晨,霍贵成. 双歧杆菌对小白鼠免疫力低下的预防与治疗作用研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23(8):641.
- [9] 王忠堂,肖光夏,肖杰,王海军,彭毅志,罗奇志. 双歧杆菌悬液对严重烧伤患者美罗培南用后肠道菌群紊乱的扶正作用[J]. 中华烧伤杂志, 2002, 18(2):111-112.
- [10] 王忠堂,姚咏明,肖光夏,盛志勇. 双歧杆菌对烫伤大鼠肠道黏膜机械及生物屏障的改善作用[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(3):154-158.
- [11] 王忠堂,姚咏明,肖光夏,盛志勇. 益生菌与核黄素联用对烫伤大鼠肠道屏障的保护作用[J]. 中华烧伤杂志, 2004, 20(4):202-205.

(本文编辑:吉耕中)