

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.01.03

鼠李糖乳杆菌在防御鼠伤寒沙门菌感染中的保护作用

邵丽娜,冯博,廖野,段冰洁,杨文涛,王春风*,胡静涛*

(吉林农业大学动物科学技术学院,吉林省动物微生态制剂工程研究中心,动物生产及产品质量安全教育部重点实验室,长春 130118)

[收稿日期] 2018-09-27 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 01-0013-06 [中图分类号] S853

[摘要] 为探讨鼠李糖乳杆菌对鼠伤寒沙门菌感染的防御作用,实验拟利用鼠伤寒沙门菌诱导建立小鼠肠炎模型,采用鼠李糖乳杆菌对肠炎模型进行干预。通过检测小鼠的肠道病理变化、器官指数、沙门菌的组织荷菌数、盲肠组织细胞因子的分泌水平及小鼠体重和存活率,明确鼠李糖乳杆菌对沙门菌感染小鼠的保护作用。结果显示,鼠李糖乳杆菌能显著改善沙门菌造成的肠炎损伤,抑制沙门菌向脾、肝脏等器官的侵袭,促进抑炎因子 IL-10 的分泌,抑制炎性因子 NO、IL-12 的分泌从而缓解肠道炎症,并能提高感染沙门菌后小鼠的体重增加率和存活率。实验表明,鼠李糖乳杆菌在防御沙门菌感染及改善肠道损伤方面发挥了较好的保护作用。

[关键词] 鼠李糖乳杆菌;鼠伤寒沙门菌;感染;防御保护作用

Evaluation of Protective Effect of *Lactobacillus rhamnosus* against *Salmonella typhimurium* Infection

SHAO Li-na, FENG Bo, LIAO Ye, DUAN Bing-jie, YANG Wen-tao, WANG Chun-feng*, HU Jing-tao*

(Jilin Provincial Engineering Research Center of Animal Probiotics, College of Animal Science and Technology,

Jilin Provincial Engineering Research Center of Animal Probiotics, Key Laboratory of Animal Production and Product

Quality Safety of Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Corresponding authors: HU Jing-tao E-mail: hujingtao2004@126.com; WANG Chun-feng, E-mail: wangchunfeng@jlau.edu.cn

Abstract: In order to evaluate the defense effect of *Lactobacillus rhamnosus* (GG) against *Salmonella typhimurium* infection, the mouse were treated with *Lactobacillus rhamnosus* (GG) and then models of enteritis were built up through infecting *Salmonella typhimurium*. To demonstrate the protective effect, the intestinal pathological score, organ index, bacterial loads in tissue, cytokine expression in cecal tissue, body weight and survival rate were determined in this paper. The results showed that *Lactobacillus rhamnosus* significantly reduced intestinal inflammation in mice with enteritis, prevented *Salmonella typhimurium* from invading the intestinal barrier to reside in other organs. It also showed that *Lactobacillus rhamnosus* increased the secretion of IL-10, decreased the secretion of NO and IL-12, and also promoted the weight gain rate and survival rate, which could

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0500500,2017YFD0500506,2017YFD0501000);国家自然科学基金科学项目(31302061)

作者简介: 邵丽娜,硕士研究生,从事乳酸菌对机体免疫细胞的研究。

通讯作者: 胡静涛,E-mail:hujingtao2004@126.com;王春风,E-mail:wangchunfeng@jlau.edu.cn

be helpful to relieve intestinal inflammation and injury. Therefore, *Lactobacillus rhamnosus* can display the protective effect against *Salmonella* infection.

Key words: *Lactobacillus rhamnosus*; *Salmonella typhimurium*; infection; defense and protect effect

乳酸菌 (*lactic acid bacteria*, LAB) 是一类无芽孢的、革兰氏阳性细菌, 作为 FAO 和 WHO 定义的益生菌重要代表成员, 在动物体内发挥着益生功能。一方面, 乳酸菌本身能在肠道内定植、维护肠道菌群平衡, 通过产生有机酸、细菌素等抗菌物质抑制肠道内有害菌的生长^[1]; 另一方面, 乳酸菌在肠道黏膜免疫调节中也发挥了重要作用, 因其特有的定植位置和益生功能与肠道黏膜底层细胞关系密切、参与免疫细胞的调节和活化。因此, 乳酸菌常应用于预防和治疗肠道病原菌感染引起的炎症和腹泻^[2-3]。由于乳酸菌成员众多、菌株作用复杂多样, 因此在影响机体免疫调节效应方面具有很强的菌株依赖性。部分菌株在宿主病理条件下 (如坏死性小肠结肠炎和过敏性机体) 发挥抑制炎症效应; 而某些菌株在体外实验中发现, 其能通过促进 TNF- α 、IL-12 和 IL-8 等细胞因子从而促进炎症发生。这些有免疫调节活性的菌株在活菌或灭活的情况下, 均得到了相似的结果^[4]。尽管如此, 已知免疫活性较好的菌株仍然有限, 本实验以在抑制慢性肠炎等方面具有潜在效应的 LGG 作为模式菌株^[5], 深入研究 LGG 参与机体的免疫调节作用, 以开发更多益生菌株的潜在作用。

鼠伤寒沙门菌为革兰氏阴性菌, 通过食入被污染的水造成人和动物胃肠道系统疾病^[6]。该病原能够耐受胃肠道的酸性环境, 进入小肠后, 侵入肠道粘液层, 入侵的细菌可被消化酶、分泌型 IgA、抗菌肽以及其它固有免疫防御分子所清除。作为一种肠道模式病原菌, 能在肠道中大量繁殖破坏肠黏膜上皮细胞屏障及菌群的平衡从而引发肠道类疾病。此外, 它还能够通过巨噬细胞摄取从而破坏细胞紧密连接, 进而转移到黏膜下层, 造成动物肠道疾病。这种逃逸免疫系统是沙门菌存活的重要机制^[7]。而 LGG 在建立黏膜屏障, 提高免疫机能和活化抗原递呈细胞如巨噬细胞 (Macrophage, M ϕ)

等方面具有突出优势^[8]。本实验通过构建鼠伤寒沙门菌的肠炎模型, 以评价 LGG 对该模型的防御保护作用, 为 LGG 在预防和治疗肠道病原菌感染方面奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及菌株

1.1.1 实验动物 6~8 周龄 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠, 购买于长春亿斯试验动物技术有限公司, 均饲养在恒温 (21~22 $^{\circ}$ C) 房间。

1.1.2 实验菌株 鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG) ATCC53103 和鼠伤寒沙门菌 (*S.typhimurium*, Sty) SL1344 由吉林省动物微生态制剂工程研究中心实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器 硫酸链霉素 (山东鲁抗医药股份有限公司); 琼脂粉、无水乙醇、二甲苯、中性树胶、苏木精-伊红染色 (北京化学制剂公司); 4% 多聚甲醛 (solarbio); PBS 缓冲剂 (HyClone); mouse NO Elisa 试剂盒、IL-10 Elisa 试剂盒、IL-12 Elisa 试剂盒 (上海朗顿)。高温烘箱 DHG-9240A (上海一恒公司); 低温超速离心机 3V30 (德国 SIGMA 公司); 电子分析天平 ME204 (岛津国际贸易 (上海) 有限公司); 培养箱 LRH-250F (上海一恒公司); 漩涡振荡器 MX-S (大龙兴创公司); 全波长酶标仪 Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific)。

1.3 鼠伤寒沙门菌感染肠炎模型的建立及分组

1.3.1 肠炎模型建立 6~8 周龄 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠口服硫酸链霉素 20 mg/100 μ L, 提供饮水和饮食。链霉素处理 24 h 后, 给小鼠口服 5×10^7 CFU/100 μ L 的鼠伤寒沙门菌^[9]。感染后 48 h 无菌收取肠系膜淋巴结、肝脏、脾脏进行器官指数和沙门菌荷菌数检测, H&E 染色检测肠道的病理变化, ELISA 检测肠道细胞因子分泌水平等。

1.3.2 实验分组 将小鼠随机分为 4 组, 每组 5 只。第 1 组为生理盐水对照组 (命名为 Saline); 每

天灌胃 100 μL 生理盐水,连续灌胃 9 d。第 2 组为鼠李糖乳杆菌对照组(命名为 LGG):在造模前提前 7 d 灌胃 5×10^8 CFU/100 μL 鼠李糖乳杆菌,此后灌胃等量生理盐水直到第 9 天;第 3 组为沙门菌感染模型组(命名为 Sty):在造模前提前 7 d 灌胃 100 μL 生理盐水;第 4 组为鼠李糖乳杆菌干预组(命名为 LGG+Sty):造模前提前 7 d 灌胃 5×10^8 CFU/100 μL 鼠李糖乳杆菌,Sty 组和 LGG+Sty 组第 8 天开始按照 1.3.1 方法感染鼠伤寒沙门菌,实验重复 3 次,实验过程中无小鼠死亡。

1.4 肠道病理分析 无菌 PBS 冲洗盲肠、结直肠内容物,截取 1 cm 肠段固定于 4% 多聚甲醛中,石蜡切片及苏木精-伊红染色:梯度脱水-透明-浸蜡-包埋-切片-烤片-脱蜡-水化-苏木精染核-1% 盐酸分化-0.5% 氨水反蓝-伊红染色-梯度脱水-透明-封片。具体参考 Myunghoo Kim^[10] 的步骤,并对病理损伤进行分析。

1.5 器官指数分析 取小鼠脾脏、肝脏、盲肠、结直肠样品进行称重,按照器官重量/尸重,计算器官指数,进行统计。

1.6 器官中沙门菌荷菌数的检测 无菌取脾脏、肝脏,称重后将样品用预冷 PBS 进行研磨并稀释。取 100 μL 稀释好的样品涂布在浓度为 20 mg/mL 硫酸链霉素的 LB 琼脂板上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,观察

菌落状态并计数。

1.7 细胞因子检测 PBS 冲洗取盲肠内容物并置于研钵中液氮研磨,4 $^{\circ}\text{C}$ 3500 r/min 离心 20 min,取上清用于检测组织中分泌的细胞因子水平,检测方法按照 eBioscience ELISA 试剂盒说明书方法操作,并在酶标仪 450nm 处读取吸光值。

1.8 体重及存活率检测 采取 1.3.1 和 1.3.2 方法进行模型建立及分组,监测小鼠体重并观察小鼠一般状态及记录死亡情况。

1.9 统计学分析 本实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,每个实验重复 3 次。GraphPad Prism5.0 数据统计分析,unpaired two-tailed *t* 检验 and one-way ANOVA 检验统计学显著与否。* $P < 0.05$ 代表统计学意义为差异显著,** $P < 0.01$ 代表统计学意义为差异极显著,*** $P < 0.001$ 代表统计学意义为差异最显著。

2 结果与分析

2.1 LGG 对沙门菌引起肠道损伤的缓解作用 病理检测结果如图 1 显示,LGG 和 Saline 组结直肠和盲肠腺体完整,无出血点;Sty 组肠道的大部分腺体被破坏,肠黏膜脱落,有大量的炎性细胞浸润以及出血点;而 LGG+Sty 组腺体结构较完整,有少量炎性细胞浸润和出血点。结果表明 LGG 可以有效缓解鼠伤寒沙门菌造成的肠道病理损伤。

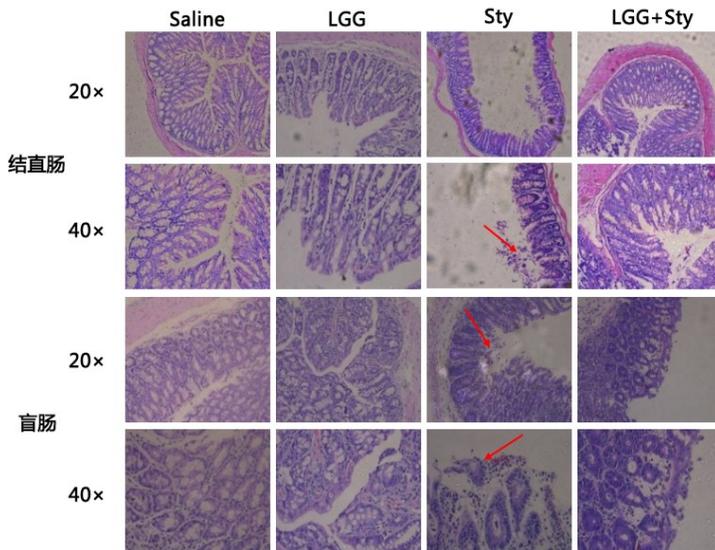
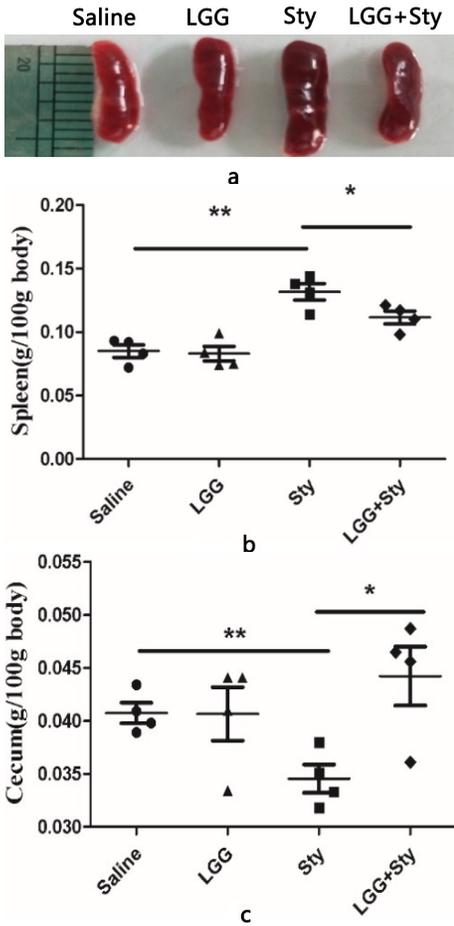


图 1 结直肠和盲肠的病理变化

Fig 1 Colon and cecum pathology change

2.2 LGG 能改善沙门菌引起小鼠的器官损伤 检测脾脏器官指数如图 2a、2b 所示,Sty 组脾脏肉眼明显比 Saline 组肿大且器官指数显著增加 ($P < 0.01$),而 LGG+Sty 组脾脏肿大有所缓解,并且器官指数较 Sty 组明显下降 ($P < 0.05$)。盲肠器官指数如图 2c 所示,Sty 组盲肠内容物减少且重量减轻。Sty 与 LGG+Sty 组比较差异显著 ($P < 0.05$),LGG 和 LGG+Sty 组盲肠器官指数较 Sty 组有所改善。结果表明 LGG 能缓解沙门菌引起小鼠的器官损伤。



a: 脾脏肉眼病理变化程度; b: 脾脏的器官指数; c: 盲肠的器官指数
a: Degree of pathological changes in the spleen eye;
b: Organ index of the spleen; c: Organ index of the cecum

图 2 脾脏及盲肠的器官指数

Fig 2 Organ index of the cecum and spleen

2.3 LGG 对沙门菌侵袭器官组织的影响 对小鼠盲肠、脾脏、肝脏以及肠系膜淋巴结的沙门菌荷菌数检测,结果如图 3 所示。Saline 和 LGG 组器官中

并未检测到沙门菌,而 LGG+Sty 比 Sty 组脾脏和肝脏的荷菌数显著减少 ($P < 0.001$),肠系膜淋巴结的荷菌数显著减少 ($P < 0.01$),说明 LGG 能有效抑制沙门菌侵袭其他器官组织。

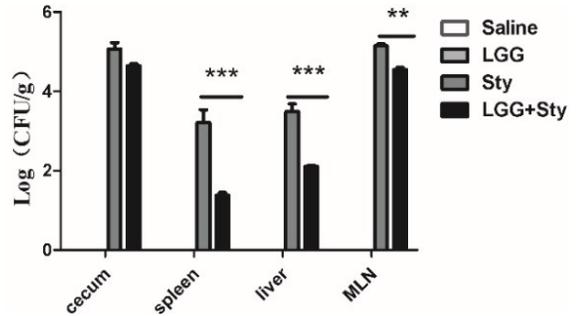
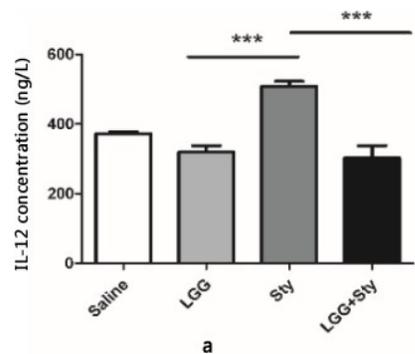


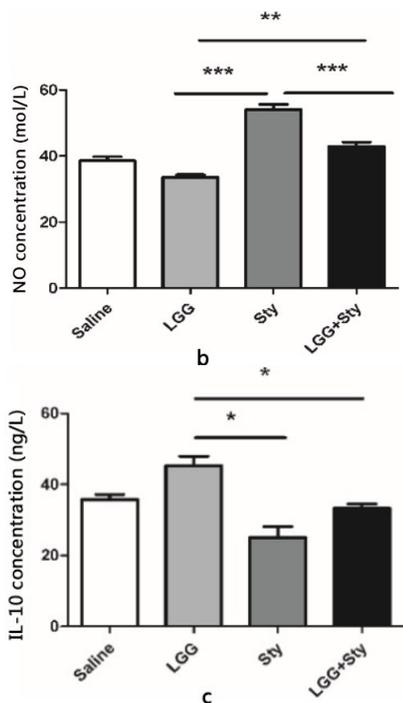
图 3 沙门菌在体内器官定植分布数量检测

Fig 3 Detection of *S. typhimurium* loads in tissue

2.4 LGG 对细胞因子分泌水平的影响 如图 4a、4b 所示 LGG+Sty 组一氧化氮(NO)和白细胞介素-12 (IL-12)分泌水平显著降低 ($P < 0.001$)。而如图 4c 所示白细胞介素-10(IL-10)分泌显著增加 ($P < 0.05$)。初步表明 LGG 可能通过调节 Th2 型细胞因子的分泌,维持肠道免疫平衡,缓解肠道炎症反应。
2.5 LGG 对小鼠体重及死亡情况的影响 小鼠体重监测结果如图 5a 所示,Saline 和 LGG 组小鼠体重缓慢上升,LGG+Sty 比与 Sty 组体重丢失有所缓解。小鼠存活率监测如图 5b 可见 Saline 和 LGG 组无小鼠死亡。Sty 组在第 11 天全部死亡,而 LGG+Sty 与 Sty 组相比死亡率有所降低。结果表明,LGG 对感染鼠伤寒沙门菌的小鼠体重丢失有一定的改善,并且能缓解沙门菌引起的小鼠死亡。



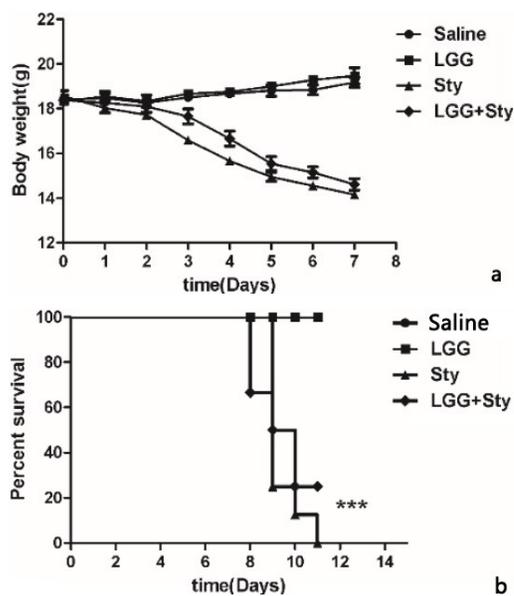
a



a: 促进炎性细胞因子 IL-12 分泌水平; b: 炎性介质细胞因子 NO 分泌水平; c: 抑制炎性细胞因子 IL-10 分泌水平
 a: Promote inflammatory cytokine IL-12 secretion level;
 b: Inflammatory mediator cytokine NO secretion level;
 c: Inhibit inflammatory cytokine IL-10 secretion level

图 4 盲肠组织细胞因子检测

Fig 4 Cecal tissue cytokine detection



a: 小鼠的体重情况监测; b: 小鼠的死亡情况监测
 a: Detection of body weight in mice; b: Detection of death in mice

图 5 小鼠体重变化及存活率的监测

Fig 5 Detection of body weight change and survival rate in mice

3 讨论与结论

鼠伤寒沙门菌是一种胞内寄生的肠道病原菌,能引起人和动物肠道疾病。近年来,滥用抗生素增强了细菌的耐药性,破坏了微生态环境。为寻找抗生素的替代物,益生菌以能在肠道定植的优势逐渐成为研究热点。本实验评估了 LGG 在鼠伤寒沙门菌诱导肠炎模型中的作用,发现 LGG+Sty 组能改善肠道组织的病理损伤,减少鼠伤寒沙门菌侵袭器官组织的能力,改善小鼠的体重及死亡率,说明 LGG 能缓解鼠伤寒沙门菌引起的肠道炎症,这与 Jian Ji 等^[12]的研究一致。这一过程可能与 LGG 参与激活机体的免疫防御功能、缓解机体的炎症反应有关。本实验也发现 LGG 能调节肠道 Th1 和 Th2 细胞因子的分泌水平,减少 NO 和 IL-12 分泌以及增强 IL-10 分泌,这与 Trine Eker Christoffersen 等^[13]的研究一致,表明乳酸菌在调节和维持肠道免疫平衡方面具有重要作用^[14]。这些研究为 LGG 在缓解鼠伤寒沙门菌诱导肠炎的机制研究奠定基础。

乳酸菌对机体的免疫调节机制十分复杂,免疫细胞(如 Mφ)在免疫调节的过程中也扮演着重要角色。LGG 与 Mφ 共作用,使 Mφ 产生 NO、IL-12 和 IL-10 等细胞因子,调节 Mφ 的免疫功能及吞噬能力,参与模式识别受体 (PRRs) 包括 ToLL 样受体 (TLRs)、Notch、核因子 κB (NF-κB) 信号通路等,这些通路之间的相互作用调节 Mφ 的免疫功能,降低机体的炎症反应。因此我们有必要对 LGG 缓解鼠伤寒沙门菌诱导的肠炎作用机制进一步探索,从而为炎症疾病提供新的治疗方向。

参考文献:

[1] Camargo A C , Todorov S D , Chihib N E , et al. Lactic acid bacteria (LAB) and their bacteriocins as alternative biotechnological tools to control listeria monocytogenes , biofilms in food processing facilities [J] . Molecular Biotechnology , 2018 , 60 (9) : 712-726.

[2] Vanderhoof J A , Mitmesser S H . Probiotics in the management of children with allergy and other disorders of intestinal inflammation [J] . Beneficial Microbes , 2010 , 1 (4) : 351-356.

[3] Nixon A F , Cunningham S J , Cohen H W , et al. The effect

- of *Lactobacillus* GG on acute diarrheal illness in the pediatric emergency department[J]. *Pediatric Emergency Care*, 2012, 28(10):1048-1051.
- [4] Rocha-Ramírez L M, Pérez-Solano R A, Castañón-Alonso S L, et al. Probiotic *Lactobacillus* strains stimulate the inflammatory response and activate human macrophages[J]. *Journal of Immunology Research*, 2017, 2017(1):460-491.
- [5] Parkins M D, Mcneil S A, Laupland K B. Routine immunization of adults in Canada: Review of the epidemiology of vaccine-preventable diseases and current recommendations for primary prevention[J]. 2016, 20(3):81-90.
- [6] Dar M A, Ahmed R, Urwat U, et al. Expression kinetics of natural resistance associated macrophage protein (NRAMP) genes in *Salmonella typhimurium*-infected chicken[J]. *Bmc Veterinary Research*, 2018, 14(1):1746-6148.
- [7] A Wilensky, H Segev, G Mizraji, et al. Dendritic cells and their role in periodontal disease [J]. *Oral Dis*, 2014, 20(2):119-126.
- [8] Zu X, Nagle D G, Zhou Y D, et al. Chapter 5-application of intestinal flora in the study of TCM formulae[J]. *Systems Biology & Its Application in Tcm Formulas Research*, 2018:97-112.
- [9] 胡桂秋. AIM2 在鼠伤寒沙门菌感染中的作用及机制研究[D].吉林:吉林大学, 2016.
- Hu G Q. Role and mechanism of AIM2 in *Salmonella typhimurium* infection[D]. Jilin: Jilin University, 2016.
- [10] Kim M, Galan C, Hill A A, et al. Critical role for the microbiota in CX3CR1 + intestinal mononuclear phagocyte regulation of intestinal T cell responses[J]. 2018, 49(1):151-163.
- [11] 付爱坤. 解淀粉芽孢杆菌影响小鼠巨噬细胞极化及其抵抗沙门氏菌感染的机理研究[D]. 浙江:浙江大学, 2017.
- Fu A K. Study on the effect of *Bacillus amyloliquefaciens* on macrophage polarization and resistance to *Salmonella* infection in mice[D]. Zhejiang: Zhejiang University, 2017.
- [12] Ji J, Hu S L, Cui Z W, et al. Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* mediate M1 macrophage polarization in mouse bone marrow-derived macrophages [J]. *Archives of Microbiology*, 2013, 195(5):349-356.
- [13] Christoffersen T E, Hult L T, Kuczkowska K, et al. *In vitro* comparison of the effects of probiotic, commensal and pathogenic strains on macrophage polarization [J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2014, 6(1):1-10.
- [14] 董懿樱,陈臣,任婧,等.乳酸菌对肠免疫调节功能研究进展[J].*中国微生态学杂志*, 2014, 26(2):221-224-242.
- Dong Y Y, Chen C, Ren W, et al. Research progress of lactic acid bacteria on intestinal immune regulation function [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2014, 26(2):221-224-242.

(编辑:李文平)