

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.32.004

蜡样芽孢杆菌对胆汁淤积大鼠的肝损伤和肠黏膜通透性的影响*

李永春¹,王菊平²,李小芹^{1△},郑俊霞³

(1. 郑州大学附属儿童医院/河南省儿童医院/郑州儿童医院消化科, 郑州 450018; 2. 郑州大学附属儿童医院/河南省儿童医院/郑州儿童医院药学部, 郑州 450018; 3. 许昌职业技术学院医学系, 河南许昌 461000)

[摘要] **目的** 探讨蜡样芽孢杆菌(Bc)对肝内胆汁淤积大鼠的肝损伤和肠黏膜通透性的影响。**方法** 将 40 只大鼠分为对照组、模型组及 Bc 低、高剂量组, 每组 10 只。除对照组外, 其余大鼠均单次灌胃 α-萘基异硫氰酸盐(ANIT)建立胆汁淤积模型。Bc 低、高剂量组于造模次日开始灌胃 Bc(1.0×10^8 、 2.0×10^8 CFU/kg), 对照组和模型组灌胃等体积蒸馏水, 每天 1 次, 连续 5 d。检测各组大鼠血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、二胺氧化酶(DAO)、总胆红素(T-BIL)和乳酸(LA)的水平; 观察各组大鼠肝组织病理学变化, 免疫组织化学分析各组大鼠小肠组织中紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 的表达。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 ALT、AST、DAO、T-BIL 及 LA 水平明显升高, 小肠组织中 Occludin 和 ZO-1 表达明显减少($P<0.05$)。与模型组比较, Bc 低、高剂量组大鼠血清中 AST、DAO 和 LA 等水平明显降低($P<0.05$); 肝组织病理学明显改善, 小肠组织中 Occludin 和 ZO-1 的蛋白表达增加($P<0.05$)。**结论** Bc 对胆汁淤积大鼠肝损伤有一定保护作用, 可改善其肠黏膜通透性, 其机制可能与上调小肠组织中紧密连接蛋白的表达有关。

[关键词] 蜡样芽孢杆菌; 胆汁淤积; 肠黏膜屏障; 紧密连接部
[中图法分类号] R725.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)32-4098-04

Effect of Bacillus cereus on liver injury and intestinal mucosal permeability
in rats with intrahepatic cholestasis*

LI Yongchun¹, WANG Juping², LI Xiaoqin^{1△}, ZHENG Junxia³

(1. Department of Gastroenterology, Children's Hospital Affiliated to Zhengzhou University/Henan Children's Hospital/Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou, Henan 450018, China; 2. Department of Pharmacy, Children's Hospital Affiliated to Zhengzhou University/Henan Children's Hospital/Zhengzhou Children's Hospital, Zhengzhou, Henan 450018, China; 3. Department of Medicine, Xuchang Vocational Technical College, Xuchang, Henan 461000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Bacillus cereus (Bc) on liver injury and intestinal mucosal permeability in rats with intrahepatic cholestasis. **Methods** Forty rats were divided into the control group, with the model group, and the Bc low- and high-dose groups, with 10 rats in each group. Animal models of intrahepatic cholestasis were induced by alpha-naphthylisothiocyanate (ANIT) excluding the normal control group. The Bc low- and high-dose groups were intragastrically administered Bc (1.0×10^8 , 2.0×10^8 CFU/kg) on the next day of modeling, and the control group and the model group were given an equal volume of distilled water once a day for 5 days. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), diamine oxidase (DAO), total bilirubin (T-BIL) and lactic acid (LA) of each group were detected. The pathological changes of liver tissues were observed, the expression of Occludin and ZO-1 proteins in the small intestine was analyzed by immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, the levels of ALT, AST, T-BIL, DAO and LA in the model group significantly increased, the expression of Occludin and ZO-1 in small intestine significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the levels of AST, DAO and LA decreased ($P<0.05$); the liver pathologic changes were improved, the expression of Occludin and ZO-1 increased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** Bc can protect the liver function and improve the intestinal mucosal permeability in rats with intrahepatic cholestasis, the mechanism may be related to the upregulation of tight junction protein expression in small intestine tissue.

[Key words] bacillus cereus; cholestasis; intestinal mucosal barrier; tight junctions

* 基金项目: 河南省医学科技攻关计划资助项目(201503234)。作者简介: 李永春(1983—), 主治医师, 本科, 主要从事小儿消化系统疾病的诊治研究。 △ 通信作者, E-mail: wanjun6633@163.com。

胆汁淤积型肝损伤是由于肝细胞和(或)毛细胆管排泄障碍引起胆汁流出部分或完全阻滞,引起肝脏损伤。胆汁淤积时进入肠道内的胆汁减少,导致肠上皮细胞间紧密连接表达减少,肠黏膜通透性增加,引起肠道功能紊乱、肠源性感染。肠黏膜受损时,肠道内的细菌和内毒素经门静脉进入肝脏,激活肝内巨噬细胞分泌大量细胞因子,引起炎症级联反应,加重肝损伤,形成恶性循环^[1]。益生菌能够调节肠道内菌群生态平衡,改善肠黏膜通透性,有研究显示其可降低胆红素,改善肝损伤^[2-3]。本研究旨在探索蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*, Bc)对胆汁淤积大鼠肝损伤和肠黏膜通透性的影响,并分析小肠组织中紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 的表达变化,为临床治疗胆汁淤积及相关疾病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 动物:40 只雄性 SD 大鼠购自河南省实验动物中心,6~8 周龄,体质量 180~200 g。试剂:Bc 活菌胶囊购自安阳市源首生物药业有限责任公司;α-茶基异硫氰酸盐(ANIT)购自美国 Sigma 公司;丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、血清总胆红素(T-BIL)、二胺氧化酶(DAO)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;乳酸(LA)试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司;兔抗 Occludin、ZO-1 多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 造模方法 将 40 只雄性 SD 大鼠,按随机数字表分为对照组、模型组及 Bc 低、高剂量组,每组 10 只。除对照组外,其余大鼠均单次灌胃 ANIT(50 mg/kg)橄榄油溶液建立大鼠胆汁淤积模型^[4];Bc 低、高剂量组于造模次日开始灌胃 Bc(1.0×10^8 、 2.0×10^8 CFU/kg),对照组和模型组灌胃等体积蒸馏水,均每天 1 次,连续 5 d。

1.2.2 肝功能和肠黏膜通透性检测 末次给药后禁食 12 h,腹腔注射 10%水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血,离心分离血清,按照试剂盒说明书检测血清中 ALT、AST、DAO 的活性和 T-BIL、LA 水平。

1.2.3 肝组织病理检测 采血后分离大鼠肝脏,取固定部位经中性甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE 染色后于显微镜下观察肝组织病理学形态。

1.2.4 免疫组织化学检测 采血后取大鼠小肠,常规脱水、包埋,切片,二甲苯脱蜡后乙醇水化,抗原修复后分别滴加 Occludin、ZO-1 一抗(1:800),链霉亲和素-生物素复合物(SABC)法孵育二抗,二氨基联苯胺(DAB)显色后复染,显微镜下观察,细胞质染成棕黄色为阳性细胞。用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件分析 Occludin、ZO-1 免疫反应阳性的累积光密度值(integrated optical density, IOD)。每张切片随机取 3 个视野分析,取其平均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组间比较采用单因素方差分析,组间两两多重比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肝功能检测指标比较 与对照组比较,模型组大鼠血清中 AST、ALT 和 T-BIL 水平明显升高($P < 0.05$)。与模型组比较,Bc 高剂量组大鼠血清 ALT、AST 及 T-BIL 水平均明显降低($P < 0.05$),见表 1。

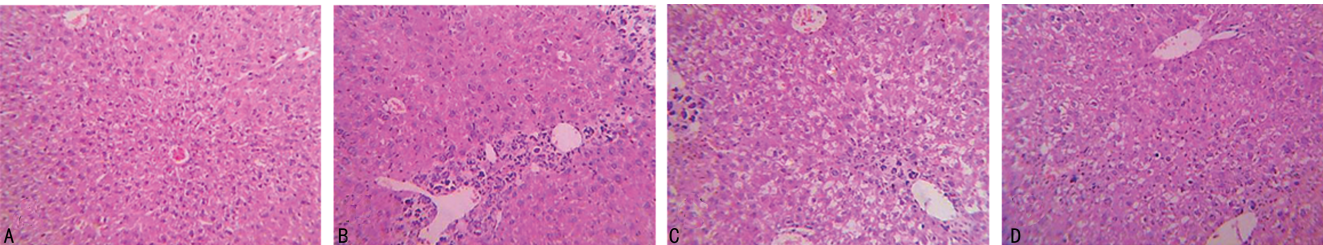
表 1 各组大鼠肝功能检测指标比较($\bar{x} \pm s, n=10$)			
组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	T-BIL(μ mol/L)
对照组	48.62±5.53	102.28±12.84	1.21±0.29
模型组	91.75±14.62 ^a	257.34±26.03 ^a	9.12±1.69 ^a
Bc 低剂量组	80.24±11.27 ^a	210.75±20.17 ^{ab}	7.57±1.43 ^a
Bc 高剂量组	64.03±9.50 ^{ab}	158.60±17.3 ^{ab}	4.71±1.26 ^{ab}

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组比较

2.2 各组大鼠血清 LA 和 DAO 水平比较 与对照组比较,模型组大鼠血清 LA 和 DAO 水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,Bc 低、高剂量组大鼠血清 LA 和 DAO 水平均明显降低($P < 0.05$),见表 2。

表 2 各组大鼠血清 LA 和 DAO 水平比较($\bar{x} \pm s, n=10$)		
组别	LA(μ g/L)	DAO(U/L)
对照组	1 752.53±153.20	3.65±1.58
模型组	2 257.29±184.37 ^a	19.12±3.31 ^a
Bc 低剂量组	1 968.85±203.91 ^{ab}	14.86±2.43 ^{ab}
Bc 高剂量组	1 892.08±182.40 ^{ab}	8.87±1.96 ^{ab}

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组比较



A:对照组;B:模型组;C:Bc 低剂量组;D:Bc 高剂量组

图 1 普通光镜下观察各组大鼠的肝组织病理改变(HE,×200)

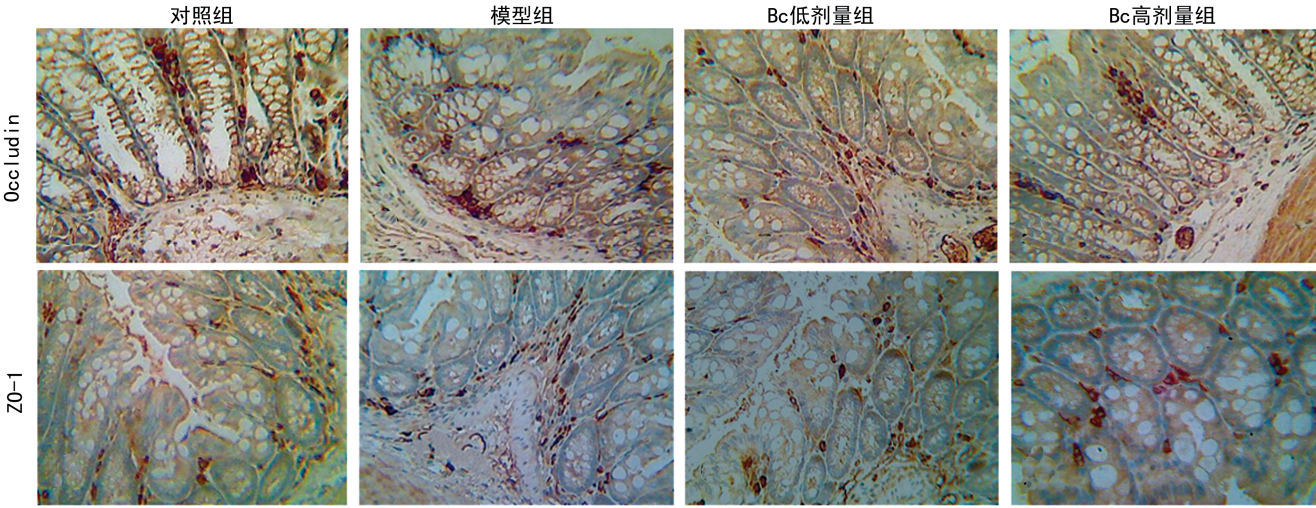
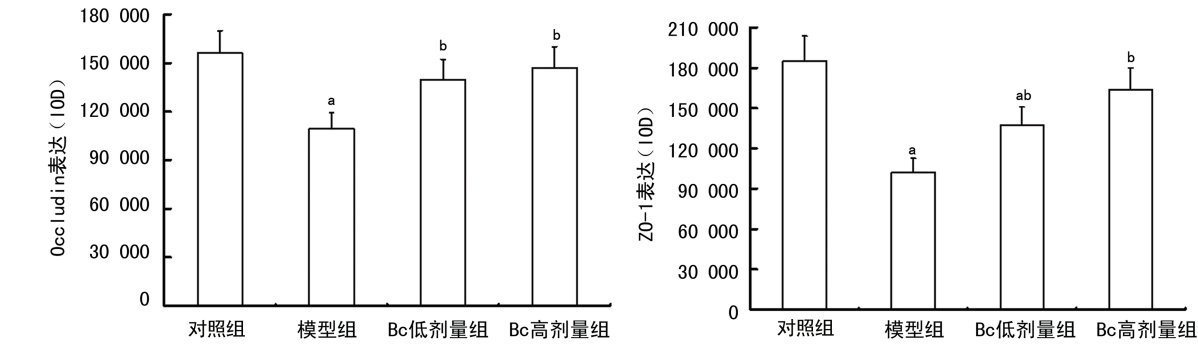


图 2 显微镜下观察各组大鼠小肠组织中 Occludin 及 ZO-1 表达(DAB,×200)



a: $P<0.05$, 与对照组比较; b: $P<0.05$, 与模型组比较

图 3 各组大鼠小肠组织中 Occludin 及 ZO-1 表达水平比较

2.3 各组大鼠肝组织病理结果比较 普通光镜下, 对照组大鼠肝小叶结构正常, 肝细胞呈整齐的索状排列, 细胞形态正常无变性坏死, 汇管区未见炎性细胞浸润; 模型组肝细胞肿胀、空泡样变形, 坏死, 细胞排列紊乱, 汇管区出现大量的炎性细胞浸润, 局部有胆管增生; Bc 低、高剂量组肝组织病理损伤明显较模型组为轻, 肝细胞排列相对正常, 少见炎性浸润, 尤其是 Bc 高剂量组, 炎性细胞及肝细胞坏死明显减少, 见图 1。

2.4 各组大鼠小肠组织中 Occludin、ZO-1 的表达水平比较 与对照组相比, 模型组大鼠小肠组织中 Occludin、ZO-1 蛋白表达明显减少($P<0.05$)。与模型组比较, Bc 低、高剂量组大鼠小肠组织中 Occludin、ZO-1 表达均明显增加($P<0.05$), 见图 2、3。

3 讨 论

自从马歇尔提出了“肝肠轴”的概念, 肝脏疾病与肠道之间的相互作用就逐渐受到关注^[5]。肝内胆汁淤积时排进肠道内胆汁减少, 导致肠黏膜上紧密连接表达减少, 肠上皮细胞间紧密连接断裂, 肠黏膜屏障受损, 通透性增加, 肠道内细菌和内毒素移位进入门静脉系统, 激活肝内巨噬细胞分泌大量细胞因子, 产生炎症级联反应和免疫应答, 引起或加重肝损伤。基于肝肠轴的存在, 改善肠黏膜通透性、保护肠黏膜屏

障可能是治疗肝脏相关疾病的切入点^[6]。肠道内的菌群不仅在人体消化吸收、免疫应答等方面发挥作用, 其作为肝肠轴的重要媒介, 与肝硬化、肝性脑病、胆汁淤积、脂肪性肝病等有关^[7]。有研究证实, 益生菌可能通过改善肠道菌群、调节肠道屏障功能等机制进而改善患者肝脏功能的作用^[8]。本研究显示 Bc 可降低胆汁淤积大鼠血清中 AST、AST 及 T-BIL 水平, 改善肝组织病理, 表明 Bc 具有改善胆汁淤积大鼠肝损伤的作用。DAO 是存在于肠黏膜上层绒毛细胞中具有高度活性的细胞内酶, 细胞受损后 DAO 进入淋巴管和血液系统, 导致血液中 DAO 活性增加, DAO 是反映小肠黏膜通透性的敏感指标^[9-10]。LA 是胃肠道固有细菌的代谢产物, 哺乳动物不具备将其分解的酶, 肠黏膜正常时很少被机体吸收, 测定血清中 LA 水平能够反映肠黏膜的完整程度和通透性的改变^[11]。本研究发现模型组大鼠的血清中 LA 和 DAO 水平较对照组大鼠明显升高($P<0.05$), 说明胆汁淤积大鼠的肠黏膜屏障受到损伤, 结构受到破坏, Bc 干预后, 大鼠血清中 LA、DAO 水平降低, 表明 Bc 可改善大鼠肠黏膜通透性, 对肠黏膜屏障具有保护作用。肠黏膜上皮细胞与细胞间连接形成完整的生物屏障, 细胞间连接以紧密连接最为重要, 控制着物质

跨膜运输及维持细胞的极性^[12]。紧密连接包括 Occludin、周膜蛋白紧密连接蛋白家族和 Claudin 跨膜蛋白家族,Occludin 表达于细胞基侧膜顶端,与其他蛋白构成紧密连接的基本结构,调控上皮细胞的跨上皮电阻和膜转运功能^[13]。ZO-1 则在连接 Occludin 中起桥梁作用,是 Occludin 与细胞内骨架系统连接的关键物质,对肠上皮起稳定作用^[14]。紧密连接表达的改变可能是胆汁淤积时肠黏膜屏障损伤的重要原因^[15]。本实验发现模型组大鼠的小肠组织中 Occludin 和 ZO-1 表达水平较对照组大鼠明显减少,Bc 干预后,大鼠小肠组织中 Occludin 和 ZO-1 表达增加。紧密连接是肠黏膜屏障完整的基础,这提示 Bc 上调大鼠肠黏膜紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 的表达可能是其改善肠黏膜通透性,进而保护肝损伤的关键因素。

综上所述,Bc 可能通过改变肠黏膜通透性、增加紧密连接蛋白表达进而通过肝肠轴对胆汁淤积大鼠肝损伤产生保护作用,然而肝肠之间相互作用复杂,Bc 保护肝损伤的具体机制还有待进一步深入研究。

参考文献

[1] VOLTA U,CAIO G,TOVOLI F,et al. Gut-liver axis;an immune Link between celiac disease and primary biliary cirrhosis[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2013, 7 (3):253-261.

[2] WONG V W,WON G L,CHIM A M,et al. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with probiotics. A proof-of-concept study[J]. Ann Hepatol,2013,12(2):256-262.

[3] LV L X,HU X J,QIAN G R,et al. Administration of lactobacillus salivarius LI01 or pediococcus pentosaceus LI05 improves acute liver injury induced by d-galactosamine in rats[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98 (12): 5619-5632.

[4] CULLEN J M,FAIOLA B,MELICH D H,et al. Acute Alpha-Naphthylisothiocyanate-induced liver toxicity in germfree and conventional male rats[J]. Toxicol Pathol, 2016,44(7):987-997.

[5] 陈蛟,张映林,刘作金. 肝肠轴相关机制研究进展[J]. 现代医药卫生,2014,30(22):3405-3408.

[6] WIEST R,ALBILLOS A,TRAUNER M,et al. Targeting

the gut-liver axis in liver disease[J]. J Hepatol,2017,67 (5):1084-1103.

[7] BELL D S. Changes seen in gut bacteria content and distribution with obesity: causation or association? [J]. Postgrad Med,2015,127(8):863-868.

[8] TIAN F W,CHI F F,WANG G,et al. Lactobacillus rhamnosus CCFM1107 treatment ameliorates alcohol-induced liver injury in a mouse model of chronic alcohol feeding[J]. J Microbiol,2015,53(12):856-863.

[9] LI H Z, QIU P,WANG J H, et al. Effects of compound Ginkgo biloba on intestinal permeability in rats with alcohol-induced liver injury[J]. Food Funct, 2015, 6 (2): 470-478.

[10] SUN T,GAO G Z,LI R F, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates oxidative stress and restores intestinal mucosal permeability in chemically induced colitis in mice[J]. Am J Transl Res, 2015,7(5):891-901.

[11] MATTY L T, RAMANDEEP S,SUZANNE E G, et al. Measurement of the intestinal permeability in chronic kidney disease[J]. World J Nephrol,2016,5(4):378-388.

[12] CHASIOTIS H,KELLY S P. Effects of elevated circulating cortisol levels on hydromineral status and gill tight junction protein abundance in the stenohaline goldfish [J]. Gen Comp Endocrinol,2012,175(2):277-283.

[13] ABDAYEM R,CALLEJON S,PORTES P,et al. Modulation of transepithelial electric resistance(TEER) in reconstructed human epidermis by excipients known to permeate intestinal tight junctions[J]. Exp Dermatol, 2015, 24 (9):686-691.

[14] YU T,LU X J,LI J Y, et al. Overexpression of miR-429 impairs intestinal barrier function in diabetic mice by down-regulating occludin expression[J]. Cell Tissue Res, 2016,366(2):341-352.

[15] YIN J,WU M M,DUAN J L, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits NF-KappaB activation and upregulates the expression of Gpx1,Gpx4,occludin,and ZO-1 in DSS-Induced colitis[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2015, 177 (8):1716-1728.

(收稿日期:2018-01-24 修回日期:2018-06-18)

(上接第 4097 页)

and therapeutic resistance[J]. Tumor Biology, 2016, 37 (9):11553-11572.

[12] WANG S W,SUN Y M. The IL-6/JAK/STAT3 pathway;Potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer(Review)[J]. Int J Oncol,2014,44(4):1032-1040.

[13] BOURNAZOU E,BROMBERG J. Targeting the tumor microenvironment: JAK-STAT3 signaling [J]. JAK-STAT,2013,2(2):e23828.

[14] CHANG Q,BOURNAZOU E,SANSONE P, et al. The

IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis[J]. Neoplasia,2013,15(7):848-862.

[15] SPITZNER M,EBNER R,WOLFF H A, et al. STAT3: A novel molecular mediator of resistance to chemoradiotherapy[J]. Cancers (Basel),2014,6(4):1986-2011.

[16] LEE H J,ZHUANG G L,CAO Y, et al. Drug resistance via feedback activation of Stat3 in oncogene-addicted cancer cells[J]. Cancer Cell,2014,26(2):207-221.

(收稿日期:2018-05-18 修回日期:2018-07-16)