

共生菌对小鼠外周血及黏膜相关组织中趋化因子配体 24 和胰岛素样生长因子 1 表达的调控

程民, 陈稳, 毛菊, 杨雯雯, 徐婷娟, 沈国栋, 吴新春, 胡世莲

[中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院), 安徽省老年医学研究所, 肿瘤免疫与营养治疗安徽省重点实验室, 合肥 230001]

[摘要] **目的** 探讨共生菌群对小鼠外周血及黏膜相关组织(肺脏、肝脏)中趋化因子配体 24(CCL24)及胰岛素样生长因子 1(IGF-1)表达的调控作用。**方法** 利用 ELISA 方法检测共生菌缺失小鼠(Abx 鼠)及正常小鼠(WT 鼠)血清中、肺脏及肝脏组织匀浆中 CCL24 及 IGF-1 的浓度, 并对其表达量进行分析比较。**结果** 小鼠缺失共生菌后, 其血清中 CCL24 浓度上调[WT 与 Abx, $(1.018 \pm 0.043) \mu\text{g/L}$ 与 $(1.509 \pm 0.119) \mu\text{g/L}$], 而 IGF-1 浓度无显著变化[WT 与 Abx, $(1.240 \pm 0.019) \mu\text{g/L}$ 与 $(1.250 \pm 0.066) \mu\text{g/L}$]; 其肺脏中 CCL24[WT 与 Abx, $(11.984 \pm 0.683) \text{ng/g}$ 与 $(14.626 \pm 0.769) \text{ng/g}$]和 IGF-1[WT 与 Abx, $(0.998 \pm 0.024) \text{ng/g}$ 与 $(1.290 \pm 0.031) \text{ng/g}$]表达量均显著上调; 其肝脏中 CCL24(WT 与 Abx, $(11.575 \pm 0.609) \text{ng/g}$ 与 $(8.704 \pm 0.458) \text{ng/g}$]和 IGF-1[WT 与 Abx, $(2.989 \pm 0.073) \text{ng/g}$ 与 $(1.112 \pm 0.027) \text{ng/g}$]表达量均显著下调。**结论** 共生菌对小鼠外周血、肺脏、肝脏中 CCL24 和 IGF-1 表达调控具有组织特异性。

[关键词] 细菌; 趋化因子 CCL24; 胰岛素样生长因子 I; 模型, 动物

DOI: 10.3969/J.issn.1672-6790.2019.01.021

Commensal microbiota regulates the expression of CCL24 and IGF-1 in the peripheral blood and mucosal associated organs in mouse Cheng Min, Chen Wen, Mao Ju, Yang Wenwen, Xu Tingjuan, Shen Guodong, Wu Xinchun, Hu Shilian(*The First Affiliated Hospital of USTC, Division of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China. Gerontology Institute of Anhui Province. Anhui Provincial Key Laboratory of Tumor Immunotherapy and Nutrition Therapy. Hefei 230001. China*)

Corresponding author: Hu Shilian, Email: hushilian@126.com

[Abstract] **Objective** To explore the regulation of symbiotic microbiota on the expression of chemokine ligand 24 (CCL24) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) in peripheral blood and mucosal associated organs (lung and liver) in mouse. **Methods** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to test the concentrations of CCL24 and IGF-1 in the serum, lung-homogenate and liver-homogenate of wild-type (WT) mouse and antibiotics-treated (Abx) mouse, then the expression levels were statistically analyzed. **Results** After the commensal bacteria were depleted by the antibiotics, the serum CCL24[WT vs Abx, $(1.018 \pm 0.043) \mu\text{g/L}$ vs $(1.509 \pm 0.119) \mu\text{g/L}$], but not IGF-1[WT vs Abx, $(1.240 \pm 0.019) \mu\text{g/L}$ vs $(1.250 \pm 0.066) \mu\text{g/L}$], was upregulated in Abx mouse; both CCL24[WT vs Abx, $(11.984 \pm 0.683) \text{ng/g}$ vs $(14.626 \pm 0.769) \text{ng/g}$] and IGF-1[WT vs Abx, $(0.998 \pm 0.024) \text{ng/g}$ vs $(1.290 \pm 0.031) \text{ng/g}$] were upregulated in the lung of Abx mouse; both CCL24[WT vs Abx, $(11.575 \pm 0.609) \text{ng/g}$ vs $(8.704 \pm 0.458) \text{ng/g}$] and IGF-1[WT vs Abx, $(2.989 \pm 0.073) \text{ng/g}$ vs $(1.112 \pm 0.027) \text{ng/g}$] were downregulated in the liver of the Abx mouse. **Conclusion** The symbiotic microbiota can regulate the expression of CCL24 and IGF-1 in peripheral blood, lung and liver in a tissue-specific manner.

[Keywords] Bacteria; Chemokine CCL24; Insulin-like growth factor I; Models, animal

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81471552);安徽省科技攻关项目(1501041142);肿瘤免疫与营养治疗安徽省重点实验室绩效补助(2017070503B041, 20183400002555)

作者简介:程民, 副研究员, 硕士生导师, Email: chengmin@ustc.edu.cn

通信作者:胡世莲, 教授, 博士生导师, Email: hushilian@126.com

呼吸道、消化道等黏膜组织存在着大量的“共生菌”,共生菌在维持肠道、肝脏及肺脏等组织器官免疫系统稳态过程中发挥极其重要的作用,共生菌群改变与感染性疾病、肿瘤、哮喘及遗传性过敏症等易感性密切相关。趋化因子配体 24(CCL24)、胰岛素样生长因子 1(IGF-1)等细胞因子在机体免疫调节、免疫应答、器官发育及代谢等过程中发挥重要作用,共生菌群对机体 CCL24、IGF-1 表达水平的调控是值得研究的科学问题,本研究通过检测小鼠外周血、肺脏、肝脏中 CCL24 及 IGF-1 的表达情况,进而探讨共生菌群对上述因子表达的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57BL/6 小鼠(5~6 周龄,雌性,SPF 级)购自上海斯莱克实验动物责任有限公司,22℃、55%湿度、12 h 昼/夜节奏条件下饲养。小鼠的饲养和实验操作过程遵循中国科学技术大学实验动物管理规范条例执行。

1.1.2 抗菌药物 万古霉素、新霉素、氨苄青霉素和甲硝唑均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.3 组织匀浆试剂 PBS 磷酸盐缓冲液购自北京索莱宝科技有限公司,TritonX-100 溶液购自生工生物工程股份有限公司,蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司。

1.1.4 ELISA 试剂盒 Mouse IGF-1 ELISA kit 购自 RayBiotech 公司,Eotaxin-2(CCL24) mouse ELISA kit 购自 abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 共生菌缺失小鼠的构建 使用含有组合抗菌药物的饮用水连续饲喂 C57BL/6 小鼠 4~6 周,构建共生菌缺失小鼠模型^[1]。饲喂期间观测小鼠体重变化、活动状态等,对体重降低严重(下降超过 30%)的小鼠进行安乐死。实验过程中设立对照组,使用不含抗菌药物的饮用水进行饲喂。

1.2.2 匀浆缓冲液配制 取 PBS 溶液 20 mL(pH 值:7.25),加入蛋白酶抑制剂混合片 2 片,TritonX-100 溶液 20 μ L,振荡混匀至蛋白抑制剂完全溶解,冰上放置,备用。

1.2.3 血清标本获取 取实验组与对照组小鼠各 6 只,摘除眼球取血,收集血液至 1.5 mL 无菌 Ep 管中,4℃放置 3~4 h,之后 3 000 r/min,4℃,离心 10 min,将上清液(血清)转移至 0.5 mL 无菌 Ep 管中。

1.2.4 组织匀浆液制备 上述小鼠(1.2.3 中小

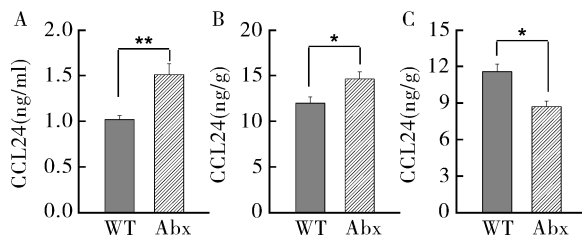
鼠)摘眼球取血后,脱臼处死,解剖小鼠,小心分离肺脏、肝脏组织,去除血液、残余血管及结缔组织后,称重。肝脏、肺脏组织按 100 mg:300 μ L 的比例加入相应体积的匀浆缓冲液,并在无菌玻璃匀浆器中进行匀浆,将匀浆液移入 1.5 mL 无菌 Ep 管中,3 000 g,4℃,离心 10 min。吸取上清液,分装至 0.5 mL 无菌 EP 管中,-80℃保存,备用。

1.2.5 CCL24 及 IGF-1 蛋白浓度检测 利用 ELISA 方法按照试剂盒说明书方法检测小鼠血清、肝脏及肺脏组织匀浆液中 CCL24 与 IGF-1 蛋白的浓度,每个样品设 3 个重复孔。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据分析。所有的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用两独立样本 *t* 检验方法比较各组样本间的差异。当 $P < 0.05$ 时,认为差异有统计学意义,使用 ORIGIN 7.5 软件绘图并解析。

2 结果

2.1 血清、肺脏、肝脏组织中 CCL24 的表达情况 结果显示,共生菌缺失小鼠血清、肺脏及肝脏组织匀浆中 CCL24 的浓度分别为 $(1.509 \pm 0.119) \mu\text{g/L}$ 、 $(14.626 \pm 0.769) \text{ ng/g}$ 、 $(8.704 \pm 0.458) \text{ ng/g}$,正常小鼠血清、肺脏及肝脏组织匀浆中 CCL24 的浓度分别为 $(1.018 \pm 0.043) \mu\text{g/L}$ 、 $(11.984 \pm 0.683) \text{ ng/g}$ 、 $(11.575 \pm 0.609) \text{ ng/g}$ 。两组各项指标比较, P 均 < 0.05 (图 1)。

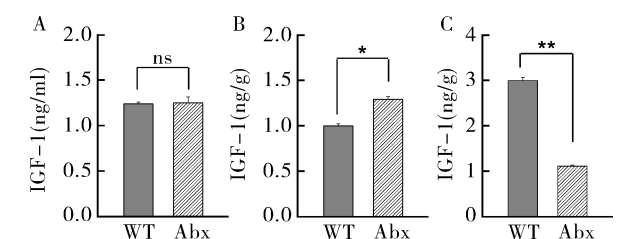


注:WT 为正常小鼠,Abx 为共生菌缺失小鼠,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$

图 1 共生菌缺失小鼠血清、肺脏及肝脏组织中趋化因子配体 24 蛋白的表达情况($n=6$):A 为血清标本,B 为肺脏组织匀浆标本,C 为肝脏组织匀浆标本

2.2 血清、肺脏、肝脏组织中 IGF-1 的表达情况 共生菌缺失小鼠血清、肺脏及肝脏组织匀浆中 IGF-1 的浓度分别为 $(1.250 \pm 0.066) \mu\text{g/L}$ 、 $(1.290 \pm 0.031) \text{ ng/g}$ 、 $(1.112 \pm 0.027) \text{ ng/g}$,正常小鼠血清、肺脏及肝脏组织匀浆中 IGF-1 的浓度分别为 $(1.240 \pm 0.019) \mu\text{g/L}$ 、 $(0.998 \pm 0.024) \text{ ng/g}$ 、 $(2.989 \pm 0.073) \text{ ng/g}$ 。共生菌缺失小鼠血清中

IGF-1 蛋白的表达水平与正常小鼠血清相比较,差异无统计学意义($P>0.05$)、肺脏组织匀浆中 IGF-1 蛋白的水平明显高于正常小鼠肺脏组织匀浆($P<0.05$),但共生菌缺失小鼠肝脏组织匀浆中 IGF-1 的浓度却明显低于正常小鼠($P<0.01$)(图 2)。



注:WT 为正常小鼠,Abx 为共生菌缺失小鼠; ** $P<0.01$, * $P<0.05$

图 2 共生菌缺失小鼠血清、肺脏及肝脏组织中 IGF-1 蛋白的表达情况($n=6$):A 为血清标本,B 为肺脏组织匀浆标本,C 为肝脏组织匀浆标本

3 讨论

呼吸道、消化道、泌尿生殖道、皮肤等黏膜组织中存在着大量的微生物,这些对人体有益的微生物被称为“共生菌”。共生菌在维持黏膜免疫系统稳态中发挥着重要的作用,共生菌与免疫系统之间存在错综复杂的关系与精妙的平衡^[2-3]。共生菌在维持肠道黏膜稳态过程中发挥至关重要的调控作用,可以调控免疫细胞的活性,并能刺激肠黏膜上的淋巴组织的发育。肝脏因与肠道特有的解剖学位置关系,肝脏免疫学特性与黏膜免疫系统之间存在诸多相似之处,共生菌对肝脏免疫细胞的组成及功能亦有显著影响。呼吸道内也存在着大量的共生菌,对肺脏局部黏膜免疫应答亦具有重要的调控作用。黏膜及其相关组织亦是肿瘤好发部位,肺癌、肝癌、肠癌等均是危害人类健康的严重问题,共生菌信号对机体抗肿瘤免疫应答的影响是值得深入探讨的科学问题。

CCL24 是属于 CC 趋化因子家族的细胞因子通过 CCR3 受体相互作用,募集嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、Th2 细胞及中性粒细胞等,在过敏性炎症中起重要作用,并与原发性结肠直肠癌、肺脏及肝脏转移瘤等密切相关^[4-5]。胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 是一种分子结构类似于胰岛素的活性蛋白多肽物质,通过与其特定受体结合,可以调节机体细胞的生长、发育、增殖及凋亡等,参与机体组织器官发育、生长、血糖调节、细胞分化等生理过程,同时在机体感染、肿瘤发生发展、创伤修复等病理过程亦发挥重要

作用^[6-8]。

本研究通过 ELISA 方法检测万古霉素、新霉素、氨苄青霉素及甲硝唑等四种抗菌药物联合饲喂 4~6 周后的共生菌缺失小鼠及正常小鼠血清、肺脏、肝脏中 CCL24 及 IGF-1 的表达情况,结果发现,共生菌缺失小鼠血清中 CCL24 的表达水平较正常小鼠血清明显升高($P<0.01$),IGF-1 的表达水平无明显区别($P>0.05$);肺脏中 CCL24、IGF-1 的表达水平均明显高于正常小鼠($P<0.05$),但肝脏中 CCL24、IGF-1 的水平却明显低于正常小鼠($P<0.05$)(图 1,2)。上述结果表明共生菌群可以调控外周血、肺脏、肝脏组织中 CCL24 及 IGF-1 的表达水平,该调控作用调控具有组织特异性,本研究结果为进一步探索共生菌与机体相互作用及作用机制提供了新的依据和参考。

参考文献

- [1] CHENG M, QIAN L, SHEN G, et al. Microbiota modulate tumoral immune surveillance in lung through a gammadeltaT17 immune cell-dependent mechanism [J]. Cancer res, 2014, 74 (15): 4030-4041.
- [2] FURUSAWA Y, OBATA Y, FUKUDA S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells [J]. Nature, 2013, 504 (7480): 446-450.
- [3] ABT M C, OSBORNE L C, MONTICELLI L A, et al. Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity [J]. Immunity, 2012, 37 (1): 158-170.
- [4] CHENG M, CHEN Y, WANG L, et al. Commensal microbiota maintains alveolar macrophages with a low level of CCL24 production to generate anti-metastatic tumor activity [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 7471.
- [5] CHEADLE E J, RIYAD K, SUBAR D, et al. Eotaxin-2 and colorectal cancer: a potential target for immune therapy [J]. Clin Cancer Res, 2007, 13 (19): 5719-5728.
- [6] WANG Z, LI W, GUO Q, et al. Insulin-like growth factor-1 signaling in lung development and inflammatory lung diseases [J]. Biomed Res Int, 2018 (3): 6057589.
- [7] CARDOSO A L, FERNANDES A, AGUILAR-PIMENTEL J A, et al. Towards frailty biomarkers: Candidates from genes and pathways regulated in aging and age-related diseases [J]. Ageing Res Rev, 2018, 47: 214-277.
- [8] HUBER Y, BIERLING F, LABENZ C, et al. Validation of insulin-like growth factor-1 as a prognostic parameter in patients with hepatocellular carcinoma in a European cohort [J]. BMC Cancer, 2018, 18 (1): 774.

(收稿日期:2018-06-20)