

枯草芽孢杆菌对小鼠炎症性肠病的 保护作用及其机制研究

刘晋倩,王福贵,范宗强,吴 苹,田 歌,王 硕,陈 芳¹

(聊城大学 药学院,山东 聊城 252059)

摘 要 目的:观察枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, BS)对炎症性肠病(Inflammatory bowel disease, IBD)的保护作用,探讨肠道菌群在 BS 拮抗 IBD 中的作用。方法:40 只小鼠随机分为空白对照组、模型组、干预治疗组、干预对照组,其中模型组和干预治疗组通过 3.5% 葡聚糖硫酸钠(DSS)饮水摄入诱导 IBD 模型,干预治疗组和干预对照组灌胃给予枯草芽孢杆菌菌液进行干预,观察小鼠体重、结肠长度、疾病活动指数(DAI)及结肠组织病理改变,ELISA 测量血清中肿瘤细胞坏死作用因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)的含量改变,Western blot 检测紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的表达,16S rRNA 系统测序技术监测肠道内微生物菌群水平的改变。结果:与对照组相比,模型组小鼠 DAI 评分明显升高,结肠长度明显缩短,结肠组织病理改变明显,炎症因子水平明显提高,紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的表达量下降;而与模型组相比 BS 干预能明显减低 DAI 评分,增长结肠长度,改善结肠组织病理改变明显,降低促炎细胞因子水平,恢复紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的表达。菌群分析结果表明,与模型组相比,干预治疗组的菌群 α 多样性、均匀度和区系种数显著增加;拟杆菌、大肠杆菌等数量降低,另支菌、乳酸杆菌等有益菌群的数量增多。结论:枯草芽孢杆菌对 DSS 诱导的 IBD 具有保护作用,能够降低其炎症反应,维持肠粘膜完整性,其发挥作用的机制可能与其改善肠道菌群有关。

关键词 炎症性肠病;小鼠;枯草芽孢杆菌;肠道菌群;作用机制

中图分类号 Q935

文献标识码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Study on the Protective Effect and Mechanism of *Bacillus Subtilis* on Inflammatory Bowel Disease

LIU Jin-qian, WANG Fu-gui, FAN Zong-qiang, WU Ping,
TIAN Ge, WANG Shuo, CHEN Fang¹

(School of Pharmacy, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract Objective To observe the protective effect of *Bacillus subtilis* (BS) on Inflammatory bowel disease (IBD), and to investigate the antagonistic effect of intestinal flora on BS against IBD. Methods 40 mice were randomly divided into blank control group, model group, interference treatment group and interference control group. Model group and interference treatment group were induced IBD model by 3.5%

收稿日期:2022-03-01

基金项目:国家自然科学基金项目(31401799);山东省抗体制药协同创新中心开放课题(CIC-AD1816);山东省自然科学基金项目(ZR2020MC126);聊城大学畜牧学学科开放课题(319312101-28)资助

通讯作者:陈芳,女,汉族,博士,教授,研究方向:微生物与生物制药,E-mail:chenfang20045@163.com。

dextran sodium sulfate (DSS) drinking water intake. Interference treatment group and control group were given bacillus subtilis liquid by gavage. Body weight, colon length, disease activity index (DAI) and pathological changes of colon tissue were observed. Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6) were measured by ELISA. Western blot was used to detect the expression of tight junction proteins ZO-1 and Occludin, and 16S rRNA sequencing system was used to monitor the changes of intestinal microbial flora. Results Compared with the control group, the DAI score of model group was significantly increased, the length of colon was significantly shortened, the pathological changes of colon tissue were significantly increased, the levels of inflammatory factors were significantly increased, and the expressions of tight junction proteins ZO-1 and Occludin were decreased. Compared with the model group, BS intervention can significantly reduce DAI score, increase colon length, improve colon histopathological changes, reduce the level of pro-inflammatory cytokines, and restore the expression of tight junction proteins ZO-1 and Occludin. Compared with the model group, the diversity, evenness and number of flora α in the interference group were significantly increased. The number of bacteroidetes and Escherichia coli decreased, while the number of other bacteria, lactobacillus and other beneficial bacteria increased. Conclusion Bacillus subtilis has a protective effect on DSS induced IBD, which can reduce its inflammatory response and maintain the integrity of intestinal mucosa. The mechanism of this effect may be related to the improvement of intestinal flora.

Key words IBD; mice; Bacillus subtilis; Intestinal flora; Mechanism of action

1 引言

全世界患有炎症性肠病(IBD)的人数正在增加。历史上,IBD在北美和欧洲人最为普遍。然而,最近在新工业化国家(如亚洲、非洲、南美和东欧)因为饮食和生活方式的转变,使IBD的发病率显著上升^[1]。IBD病人可能会发生慢性腹泻、直肠出血、腹胀、体重减轻等表现。IBD已被界定为一类以由先天免疫程序功能障碍引起的胃肠道慢性炎症为特征的自身免疫性疾病^[2]。IBD包含两种主要亚型:克罗恩病(CD)和炎症性肠病(UC),均具有复杂的病理光谱^[2-3]。

IBD的药物疗法主要是使用氨基水杨酸盐、皮质类固醇、6-巯基嘌呤和其他免疫抑制剂等^[4]。然而,这些疗法的高成本和复发率极大地限制了临床应用^[5]。与传统疗法和单一疗法相比,益生菌饮食疗法以及某些治疗方法的联合疗法在预防和治疗IBD方面可能具有更好的患者可接受性和治疗效果^[6,7]。最近的研究表明,肠道菌群多样性的变化和IBD相关,包括相对丰富程度的变化以及复杂性的下降。厚壁菌门、放线菌门、拟杆菌门、梭菌、乳酸菌和芽孢杆菌的微生物群丰富度下降^[8,9]。为了恢复IBD中的菌群平衡,一些益生菌产品已应用于调节肠道菌群治疗该病^[10,11]。

枯草芽孢杆菌是一种对多种疾病具有潜在治疗价值的生物菌种,已被作为益生菌用于人类疾病^[12]。研究发现,枯草芽孢杆菌对儿童腹泻、急性胃炎以及儿童巨细胞病毒性肝炎等均具有很好的治疗效果^[13-15]。枯草芽孢杆菌的生物疗效主要与其分泌的生物活性物质及对菌群的调控作用有关^[16,17]。Foligné等人研究证实,枯草芽孢杆菌PB6菌株的芽孢能够改善TNBS所诱发的小鼠结肠炎,具有抗炎作用^[18]。因此,枯草芽孢杆菌具有预防和治疗IBD的潜在价值。然而,对于枯草芽孢杆菌干预IBD,抑制炎症反应的机制仍不明确。

本研究旨在以DSS诱导的IBD小鼠实验为基础,研究枯草芽孢杆菌对IBD的干预效果和潜在机制。为评价枯草芽孢杆菌对DSS诱导的IBD的保护作用,我们观察了疾病活动度指数(DAI)和小肠和结肠黏膜的组织学病理特征。此外,本课题还研究了炎症细胞因子的表达和肠道菌群的改变,以提供枯草芽孢杆菌缓解IBD的潜在机制,为开发具有抗炎症性肠病的产品提供依据。

2 材料与方法

2.1 材料

DSS(CAS 号:9011-18-1)购于上海麦克林生化科技有限公司;TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 检测试剂盒购于武汉赛培生物科技有限公司;苏木素和伊红(HE)染色试剂,杭州碧云天有限公司;其余检验试剂均为国产分析纯。枯草芽孢杆菌来源于本实验室冻存菌株(保藏号:CGMCC NO.:9256)。

ICR 小鼠,SPF 级,平均重量 16~20 g,雄性,购自济南朋悦实验动物繁殖有限公司,试验哺乳动物许可证编号:SCXK(鲁)20190003。小鼠适应性生活 7 天,随意获取饲料和无菌水,20~25 $^{\circ}\text{C}$,光暗周期 12/12 h。

2.2 实验方法

2.2.1 菌液制备。将冻存于冷冻培养基(-80 $^{\circ}\text{C}$)中的枯草芽孢杆菌,在 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 下有氧条件下摇床(BSD-YX2400,上海博讯实业有限公司)培养 24 h,达到对数生长期。将悬浮液连续稀释 10 倍,然后将每连续稀释 10 μL 置于 LB 固体培养基板上。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 有氧环境下孵育 12 h 后,枚举带有 30~300 个菌落的培养皿。存活率以每克菌落形成单位(CFU)计算。计数重复三份。以 3 000 r/min 转速在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 10 min 收集菌体(5910R 型高速冷冻离心机,艾本德中国有限公司),用无菌的 PBS 洗 3 次后 3 000 r/min 离心 10 min,去上清液,用无菌去离子水重悬至 10^9 CFU/mL 体积,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2.2 DSS 诱导的动物模型建立及实验设计。在本研究中,各种动物试验方法均经聊城大学伦理委员会的同意后,可用于试验动物上,并遵循《实验动物护理与使用指南》。将 40 只小鼠适应性饲养后,按体重无显著性的差异分为 4 组,每组 10 只,依次是空白对照组(Control)、模型组(DSS)、干预治疗组(DSS+BS)、干预对照组(BS),BS 剂量的选择参照郑等^[19]方法(表 1 为实验步骤):(1) 空白对照组喂食标准饲料,喝无菌水。另外,服用生理盐水为 10 mL/kg·bw,每天一次,持续 14 天;(2) 模型组喂食标准饲料 14 天,前 7 天饮用无菌水。为了诱导 IBD,在第二个 7 天内,正常饮用水被 3.5% 的 DSS 代替。另外,口服生理盐水 10 mL/kg·bw,每日一次,连续十四天;(3) 干预治疗组喂食标准饲料 14 天,并在前 7 天饮用无菌水,为了诱导 IBD,在第二个 7 天内,正常饮用水被 3.5% 的 DSS 代替;另外,按 10 mL/kg·bw 的给药体积给予 10^9 CFU/mL 的枯草芽孢杆菌菌液,口服灌胃,每日一次,连续 14 天,保护 IBD;(4) 干预对照组喂用标准饲料和无菌饮水;另外,按 10 mL/kg·bw 的给药体积给予 10^9 CFU/mL 的枯草芽孢杆菌菌液,灌胃,每天一次,持续 14 天。在实验期间,每天两次监测动物的健康和症状,包括腹泻和粪便中的血液,每天记录体重。

表 1 动物实验设计

组别	0~7 天	8~14 天
空白对照组	自由饮水+每日 1 次生理盐水灌胃	自由饮水+每日 1 次生理盐水灌胃
模型组	自由饮水+每日 1 次生理盐水灌胃	3.5% DSS 自由饮用+每日 1 次生理盐水灌胃
干预治疗组	自由饮水+每日 1 次枯草芽孢杆菌菌液灌胃	3.5% DSS 自由饮用+每日 1 次枯草芽孢杆菌菌液灌胃
干预对照组	自由饮水+每日 1 次枯草芽孢杆菌菌液灌胃	自由饮水+每日 1 次枯草芽孢杆菌菌液灌胃

2.2.3 标本采集。在末次给药并禁食 24 h 后,通过眼球采血,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 3 000 r/min,离心 10 min 后取上清液,然后将上清液在-80 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,用于 TNF- α 、IL-1 β 以及 IL-6 分析。在眼球取血后将老鼠处死,然后解剖并收集结肠组织。测量完结肠长度后,一部分放入提前配置好的 4% 多聚甲醛液中固定,用于组织学观察;一部分冻存于-80 $^{\circ}\text{C}$,用于 Western Blot(WB)。最后采集了小鼠 24 h 的新鲜粪便后,用经过消毒的镊子采集了每只老鼠部分结肠中的大便,再用乙醇擦拭镊子并消毒,后继续采集了下一只的粪便。采集好的粪便装入无菌的 EP 管,并将 EP 管立即置于干冰中,最后再置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

2.2.4 疾病活动指数(DAI)的评估。采用 DAI 来评估结肠炎的严重程度^[20]。每天检查这些动物的体重、粪便的形状和一致性。DAI 评分系统的定义如下。体重,0 表示没有减轻,1 表示减轻 5%~10%,2 表示减轻 10%~15%,3 表示减轻 15%~20%,4 表示减轻大于 20%。大便,0 表示大便正常,2 表示大便松动,4 表示

大便腹泻。出血,0表示无血,2表示有血,4表示总血。为观察疾病进展,从实验的第8天至第14天,每天进行DAI评分具体标准见表2。

表2 疾病活动指数(DAI)评分标准^[20]

体重下降(%)	便血情况	大便形状	评分值/分
<1	阴性	正常	0
≥1~5	-	-	1
≥5~10	阳性,但无肉眼可见便血	稀软	2
≥10~5	-	-	3
≥15	无肉眼可见便血	水样便	4

注:“-”表示在上下指标之间者。

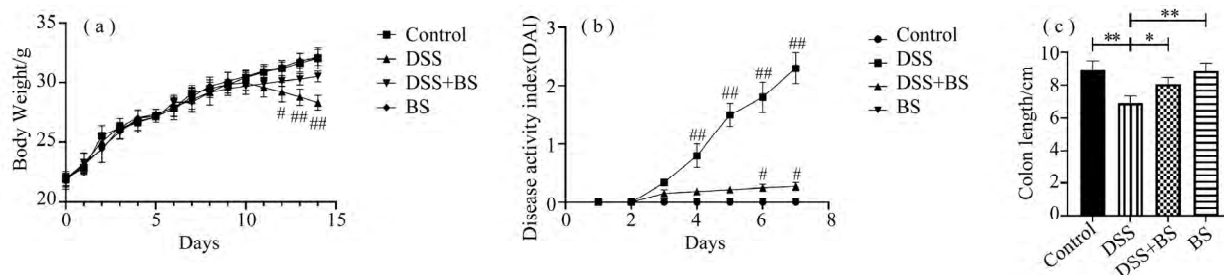
2.2.5 组织学观察。从DSS诱导的IBD动物模型中提取结肠样本用4%多聚甲醛固定。样品用梯度乙醇和二甲苯洗涤后,用石蜡包埋,然后切开(5 μm厚)。切片后用HE染色在光学显微镜(BX-53,日本奥林巴斯有限公司)下可以看到结肠组织的病理变化。

2.2.6 炎症因子测定。对所收集的血清,采取酶联免疫吸附法开展炎症因子测定方法。并通过酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒指示书使用过程,确定各组小鼠血清中的炎症因子(TNF-α、IL-1β和IL-6)。

2.2.7 Western Blot。采集的各组结肠样品,用PBS水冲洗三次。为获得组织蛋白,对样品使用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液(100 mg/mL)冰解30 min,4℃下超声,8 000 r/min离心5 min。用BCA检验试剂盒定量上清液中的蛋白质浓度,然后与等量的装载缓冲液混合,在100℃加热5 min后变性。这些样本中的(等量)蛋白质首先在聚丙烯酰胺凝胶上用SDS-PAGE分散,随后再迁移到PVDF膜上。用封闭液封闭膜约1 h,然后与针对靶蛋白质的一抗,在4℃下孵育过夜。为了显示这些目标蛋白的条带,将膜与对应属性的二抗孵育,在暗室中发光,并用扫描仪进行扫描。计算靶蛋白条带和内参之间的灰度差值,用于靶蛋白质的相应表达水平。每次试验反复三次以进行统计分析。

2.2.8 肠道细菌群16S rRNA测序与生物信息学研究分析。将每组(4组)6只小鼠结肠中粪便取出置于EP管中,在-80℃下保存。将收集的小鼠粪便委托北京诺禾致源科技股份有限公司进行测序分析,以便确定枯草芽孢杆菌引起的肠道菌群变化如何抑制炎症性肠病的发生。

2.2.9 统计分析。所有数据都以平均±标准差(SD)显示。使用IBM spss24的统计学软件完成统计学数据分析。数值比较通过单因素方差分析(One-way ANOVA)、双因素方差分析(Two-way ANOVA)和T检验完成差异的显著性分析方法。一般认为 $p<0.05$ 具有统计意义。图形分析采用Graph Pad Prism9.0。



注:(a)小鼠体重变化(g);(b)疾病活动指数;(c)小鼠结肠长度(cm)。所有数据均以平均值 mean±SD 表示($n=10$)。# $p<0.05$; ## $p<0.01$,空白组 vs 模型组;* $p<0.05$,** $p<0.01$,模型组 vs 空白组。

图1 枯草芽孢杆菌对体重和DAI的影响

3 结果与讨论

3.1 枯草芽孢杆菌对体重和DAI的影响

IBD最直观的指标就是体重下降。如图1(a)所示,在第一个7日内,各组小鼠的体重上升幅度基本一

致,在第二个7日内,空白对照组和干预对照组重量保持之前的上升幅度不变,但干预对照组稍高于空白组,模型组重量减少更加显著,甚至发生了死亡情况。而干预治疗组体重与之前基本保持一致,出现较轻改变,与模型组相比,有明显改善。

为评估 DSS 诱导的 IBD 的疾病严重程度,我们进行了 DAI 评分,并测量了结肠的长度。如图 1(b) 所示,在第二个 7 天期间(IBD 的活性期),模型组的 DAI 随着 DSS 摄入量的延长,持续增加。而干预治疗组的 DAI 明显低于模型组。结果表明,口服 DSS 可引起肠道损伤,但口服枯草芽孢杆菌可显著减轻 IBD 的症状。如图 1(c) 所示,在 DSS 摄入的 7 天内,与空白对照组和模型组相比,模型组的结肠明显缩短。然而,在干预治疗组中,结肠仅略有缩短,且明显长于模型组。

3.2 枯草芽孢杆菌对结肠组织病理变化的影响

不同组的结肠组织切片分别用伊红-苏木精染色,观察并比较了 IBD 活动期肠黏膜的病理变化。组织学切片显示(图 2),在正常结肠中,上皮细胞排列紧密,无局部缺损。对于模型组,在给予 DSS 后,结肠黏膜损伤严重,出血和深部溃疡表现明显,上皮细胞和杯状细胞大部分被破坏,溃疡内只有隐窝上皮细胞和杯状细胞的分散分布。而干预治疗组对结肠黏膜的损伤程度要小于模型组。观察到存活的腺体和杯状细胞。这些结果表明,口服枯草芽孢杆菌可显著降低 DSS 诱导的 IBD 活性结肠黏膜损伤。

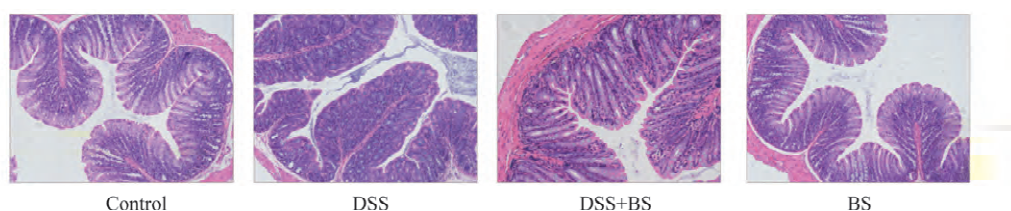
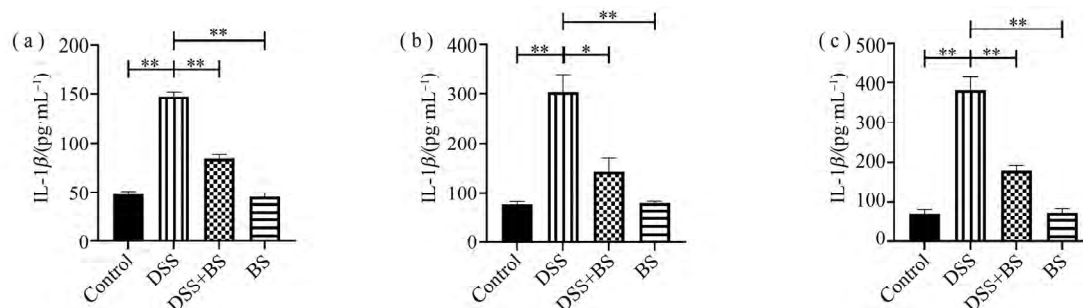


图2 枯草芽孢杆菌对 IBD 小鼠结肠组织切片 HE 染色 (400×)

3.3 枯草芽孢杆菌对炎症因子表达的影响

枯草芽孢杆菌还可抑制促炎症细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 和 IL-6 在血清中的表达,减少了炎症损伤。促炎症因子如 IL-1 β 、IL-6 是 IBD 症状的典型特征^[21,22]。

如图 3 所示,与空白组相比,DSS 处理可显著诱导促炎症细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 、IL-6。此外,与模型小鼠相比,枯草芽孢杆菌显著降低了 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 以及 IL-6。



注:(a) $\text{TNF-}\alpha$ 含量;(b) IL-1 β 含量;(c) IL-6 含量。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

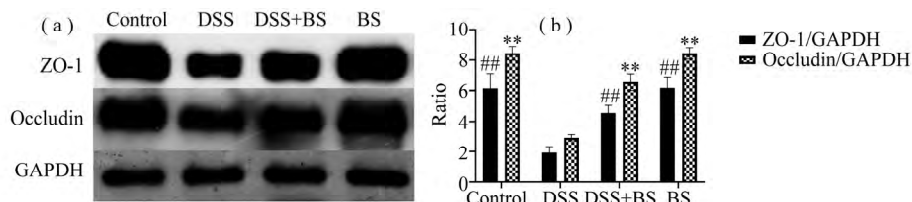
图3 枯草芽孢杆菌对炎症因子表达的影响

3.4 枯草芽孢杆菌对 ZO-1 和 Occludin 表达的研究

ZO-1 和 Occludin 是肠上皮细胞紧密连接的标记蛋白,绒毛蛋白是位于上皮细胞游离表面的微绒毛的标记蛋白。这种蛋白质在维护上皮屏障功能的完善方面也起到了重大作用^[23,24]。紧密连接的蛋白如 ZO-1 和 Occludin,可以直接和 F-肌动蛋白以及其他的细胞骨架蛋白结合,这些蛋白与细胞组织和上皮形态发生相关^[25,26]。据报道,ZO-1 的表达明显高于静止 IBD 患者粘膜愈合相比没有粘膜愈合,和损失 ZO-1 可以增加肠上皮的通透性,促进重要的发展肠道炎症动物结肠炎^[27]。Peng 等人研究发现,益生菌枯草芽孢杆菌可通过促进 ZO-1 蛋白质的表达来降低对上皮屏障的损伤,以及赭曲霉蛋白 A 对 Caco-2 蛋白质的细胞毒

性^[28]。

根据 WB 结果(图 4),在模型组中 ZO-1 和 Occludin 的相对表达率明显低于正常组。干预治疗组中 ZO-1 和 Occludin 的相对表达数量都明显大于模型组。结果表明,口服枯草杆菌乳可诱导小肠和结肠上皮过表达 ZO-1 和 Occludin,促进肠上皮细胞紧密连接的形成,维持上皮屏障的完整性,防止致病菌的侵袭,保护肠黏膜免受炎症损伤。



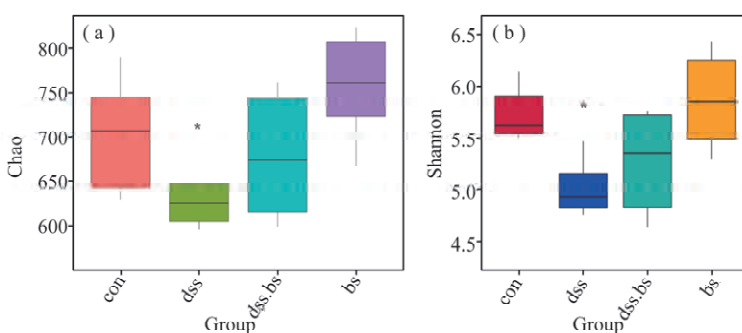
注:(a)肠紧密连接蛋白 WB 结果;(b)ZO-1 和 Occludin 与内参的灰度比值。ZO-1/GAPDH: # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$,模型组 vs 空白组;Occludin/GAPDH, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,模型组 vs 空白组。

图 4 枯草芽孢杆菌对 ZO-1 和 Occludin 表达的影响

3.5 枯草芽孢杆菌对肠道菌群的影响

据报道,肠道炎症损伤与肠道菌群失衡和肠道微生物群丰度和多样性的减少有关^[29]。据 Mentellag 等人报道^[6],炎症性肠病患者肠道微生物群的操作分类单位(OTU)少于对照,厚壁菌门、放线菌、科林菌、乳酸菌和芽孢杆菌的肠道微生物群丰富度减少。在以往的研究中已经观测到了微生物群落的改变,和健康个体比较,IBD 患者的细胞多样性降低和细胞不稳定性增多。在本研究中,DSS 打破了肠道菌的数量平衡,从而改善了肠道菌的生物多样性和组成结构。 α 多样性的 Shannon 指数和 Chao 指数(图 5)都表明干预对对照组的多样性显著超过正常组,说明引入枯草芽孢杆菌增强了肠道菌群的多样性和平衡性。模型组肠道菌群的 Shannon 指数和 Chao 指数都明显低于正常组,表明 DSS 诱导的 IBD 与肠道菌种异常有关。干预治疗组的 Shannon 指数和 Chao 指数明显大于模型组,表明其摄入枯草芽孢杆菌可维持肠道菌群的多样性。

在科水平上的区系丰度热图(图 6),干预对照组中芽孢杆菌、肠球菌、异芽孢菌、瘤胃球菌和布蒂奥氏菌的丰度显著高于正常组。在模型组中,多种细菌(包括另支菌、里氏菌、巴氏菌、麦氏杆菌和乳杆菌)的丰度显著降低,而大肠杆菌和拟杆菌的丰度显著增加。干预治疗组芽孢杆菌、异端芽孢菌和瘤胃球菌的丰度均高于模型组。在模型组中,以拟杆菌科为优势科。与模型组相比,干预治疗组中拟杆菌科和麦氏杆菌科的比例显著降低。干预对照组中乳酸杆菌的比例显著增加。在通过摄入枯草芽孢杆菌增加的物种中,巴尼氏菌和另支菌已被批准对肠道健康有益^[30]。此外,DSS 产生短链脂肪酸(SCFA)的瘤胃球菌的丰度显著较高。据报道,瘤胃球菌的缺失与乳糜泻有关^[31]。这些结果表明,口服枯草杆菌乳可有效增加肠道菌群多样性,恢复 DSS 干预的肠道菌群平衡。



注:(a) Chao 指数;(b) Shannon 指数。

图 5 α 多样性箱线图

最近有报道称,这些代谢物来自于枯草芽孢杆菌,包括活性素 A 和聚谷氨酸,可以减轻 IBD 动物模型的症状^[32]。此外,不同种类的拟杆菌和约氏乳杆菌可以通过酶水解调节肠道炎症,酶调节肠道炎症,那枯草芽孢杆菌也可能有助于预防和减轻 IBD 的作用。但真正起作用的究竟是枯草芽孢杆菌菌株还是其代谢物,有待进一步研究。

据报道,小鼠体内的枯草芽孢杆菌可以抑制小鼠的炎症和抑制氧化应激,而几丁质酶来自小鼠体内的枯

草芽孢杆菌通过降解细胞壁表现出抗真菌活性,这可能有助于调节肠道菌群^[33,34]。

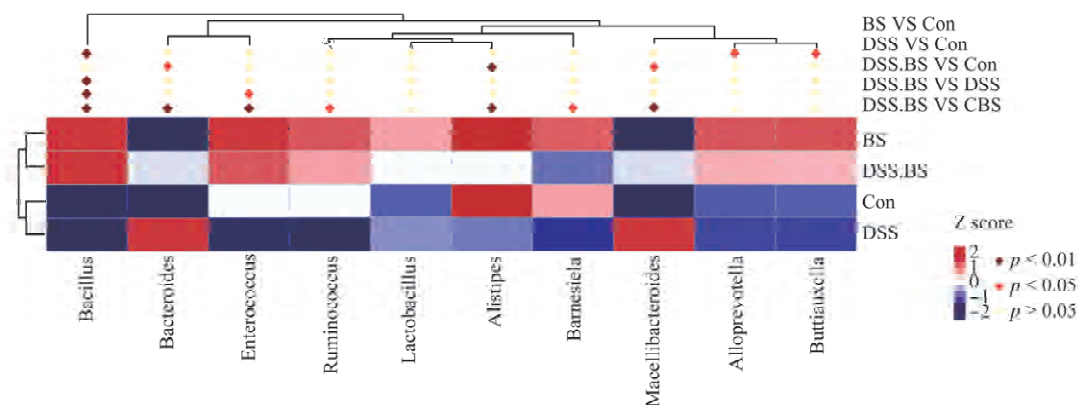


图 6 科水平上的区系丰度热图

4 结语

本研究主要关注枯草芽孢杆菌在 DSS 诱导的 IBD 小鼠模型中的结肠黏膜和肠道菌群改变,旨在探讨其作用机制。结果表明,口服 DSS 可引起结肠黏膜的广泛损伤。在 DSS 诱导的 IBD 的活动期,主要的病理特征包括上皮细胞坏死和黏膜溃疡。而口服的摄入枯草芽孢杆菌可减轻黏膜溃疡。这些结果表明枯草芽孢杆菌对 DSS 诱导的 IBD 具有预防的作用。口服枯草芽孢杆菌可增加 DSS 诱导的 IBD 影响的肠道菌群的总种类和多样性,调节肠道菌群平衡,其可能是枯草芽孢杆菌保护 IBD 的潜在机制。因此,枯草芽孢杆菌将是一种潜在的应用于 IBD 治疗的新型功能食品。然而,枯草芽孢杆菌是否会分泌某些具有 IBD 保护功能的生物活性成分(枯草芽孢杆菌、其代谢物或这些合作因子)仍需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] CONRAD K, ROGGENBUCK DLAASS M W. Diagnosis and classification of ulcerative colitis[J]. Autoimmunity Reviews, 2014, 13(4-5): 463-466.
- [2] CETINKAYA A, BULBULOGLU E, KURUTAS E B, et al. Beneficial effects of N-acetylcysteine on acetic acid-induced colitis in rats [J]. Journal of Experimental Medicine, 2005, 206(2): 131-139.
- [3] HILL D A, HOFFMANN C, ABT M C, et al. Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis[J]. Mucosal Immunology, 2010, 3(2): 148-158.
- [4] ALI SOHRABPOUR A, MALEKZADEH R, KESHAVERZIAN A. Current therapeutic approaches in inflammatory bowel disease[J]. Current Pharmaceutical Design, 2010, 16(33): 3668-3683.
- [5] LUO H, CAO G, LUO C, et al. Emerging pharmacotherapy for inflammatory bowel diseases[J]. Pharmacological Research, 2022, 2(11): 106146-106168.
- [6] MENTELLA M C, SCALDAFERRI F, PIZZOFERRATO M, et al. Nutrition IBD and gut microbiota: a review[J]. Nutrients, 2020, 12(4): 944-964.
- [7] TARGOWNIK L E, BENCHIMOL E I, BERNSTEIN C N, et al. Combined biologic and immunomodulatory therapy is superior to monotherapy for decreasing the risk of inflammatory bowel disease-related complications[J]. Journal of Crohn's and Colitis, 2020, 14(10): 1354-1363.
- [8] ALIPOUR M, ZAIDI D, VALCHEVA R, et al. Mucosal barrier depletion and loss of bacterial diversity are primary abnormalities in paediatric ulcerative colitis[J]. Journal of Crohn's and Colitis, 2016, 10(4): 462-471.
- [9] SJÖBERG F, BARKMAN C, NOOKAEW I, et al. Low-complexity microbiota in the duodenum of children with newly diagnosed ulcerative colitis[J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0186178-0186195.
- [10] AMER M, NADEEM M, NAZIR R, et al. Probiotics and their use in inflammatory bowel disease[J]. Alternative Therapies in Health & Medicine, 2018, 24(3): 68-82.
- [11] WANG Y, XIE Q, ZHANG Y, et al. Combination of probiotics with different functions alleviate DSS-induced colitis by regulating intesti-

- nal microbiota, IL-10, and barrier function[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(1): 335-349.
- [12] LEFEVRE M, RACEDO S M, DENAYROLLES M, et al. Safety assessment of *Bacillus subtilis* CU1 for use as a probiotic in humans [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2017, 83(2): 54-65.
- [13] JOHNSTON B C, GOLDENBERG J Z, VANDVIK P O, et al. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic - associated diarrhea [J]. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2011, 63(11): 1-69.
- [14] 崔力凤. 雷贝拉唑与奥美拉唑分别联合枯草杆菌治疗急性胃炎效果对比[J]. *中国实用医药*, 2020, 15(29): 32-34.
- [15] 陈丹丹, 尹杨艳, 桂冬梅. 枯草杆菌二联活菌对儿童巨细胞病毒性肝炎患儿肠道菌群及预后的影响[J]. *中国微生态学杂志*, 2022, 34(1): 82-85.
- [16] YAN L, LIU G, ZHAO B, et al. Novel biomedical functions of surfactin A from *Bacillus subtilis* in wound healing promotion and scar inhibition[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(26): 6987-6997.
- [17] JOHNSON B A, HAGE A, KALVERAM B, et al. Peptidoglycan-associated cyclic lipopeptide disrupts viral infectivity[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(22): e01282-19.
- [18] FOLIGNÉ B, PEYS E, VANDENKERCKHOVE J, et al. Spores from two distinct colony types of the strain *Bacillus subtilis* PB6 substantiate anti-inflammatory probiotic effects in mice[J]. *Clinical Nutrition*, 2012, 31(6): 987-994.
- [19] 郑雨星, 朱慧越, 焦婷, 等. 鼠李糖乳杆菌 FZJTZ46L6 通过影响肠道内短链脂肪酸的水平缓解小鼠由葡聚糖硫酸钠导致的结肠炎[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(10): 44-52.
- [20] KIM J J, SHAJIB M S, MANOCHA M M, et al. Investigating intestinal inflammation in DSS-induced model of IBD[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2012, 80(60): e3678-3693.
- [21] WILDENBERG M E, LEVIN A D, CERONI A, et al. Benzimidazoles promote anti-TNF mediated induction of regulatory macrophages and enhance therapeutic efficacy in a murine model[J]. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2017, 11(12): 1480-1490.
- [22] WONG J, GARCIA-CARBONELL R, ZELIC M, et al. RIPK1 mediates TNF-induced intestinal crypt apoptosis during chronic NF- κ B activation[J]. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2020, 9(2): 295-312.
- [23] HODIN R A, SHEI A, MENG S. Transcriptional activation of the human villin gene during enterocyte differentiation[J]. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 1997, 1(5): 433-438.
- [24] TAN Y, GUAN Y, SUN Y, et al. Correlation of intestinal mucosal healing and tight junction protein expression in ulcerative colitis patients[J]. *The American Journal of the Medical Sciences*, 2019, 357(3): 195-204.
- [25] BUCKLEY A, TURNER J R. Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease[J]. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2018, 10(1): a029314-029331.
- [26] ROY S, ESMAELNIAKOOSHKHAZI A, PATNAIK S, et al. Villin-1 and gelsolin regulate changes in actin dynamics that affect cell survival signaling pathways and intestinal inflammation[J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(5): 1405-1420.
- [27] PORITZ L S, GARVER K I, GREEN C, et al. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis[J]. *Journal of Surgical Research*, 2007, 140(1): 12-19.
- [28] PENG M, LIU J, LIANG Z. Probiotic *Bacillus subtilis* CW14 reduces disruption of the epithelial barrier and toxicity of ochratoxin A to Caco-2 cells[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 126(2): 25-33.
- [29] CABRÉ E, A. GASSULL M. Probiotics for preventing relapse or recurrence in Crohn's disease involving the ileum: are there reasons for failure? [J]. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2007, 1(1): 47-52.
- [30] DAILLÈRE R, VÉTIZOU M, WALDSCHMITT N, et al. *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* facilitate cyclophosphamide-induced therapeutic immunomodulatory effects[J]. *Immunity*, 2016, 45(4): 931-943.
- [31] EL MOUZAN M I, WINTER H S, ASSIRI A A, et al. Microbiota profile in new-onset pediatric Crohn's disease: data from a non-Western population[J]. *Gut Pathogens*, 2018, 10(1): 1-10.
- [32] DAVAATSEREN M, HWANG J T, PARK J H, et al. Poly- γ -glutamic acid attenuates angiogenesis and inflammation in experimental colitis[J]. *Mediators of Inflammation*, 2013, 3(10):13-20.
- [33] WU H, WANG Y, ZHANG Y, et al. Breaking the vicious loop between inflammation, oxidative stress and coagulation, a novel anti-thrombus insight of nattokinase by inhibiting LPS-induced inflammation and oxidative stress[J]. *Redox Biology*, 2020, 32(3): 101500-101513.
- [34] MANJULA K, PODILE A R. Production of fungal cell wall degrading enzymes by a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF 1[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2005, 43(11): 892-896.

(责任编辑:刘庆松)