

金黄色葡萄球菌核酸酶对2,4,6-三硝基苯磺酸诱导的小鼠结肠炎的保护作用

张婷婷,梅银柳,董万法,王镜勋,金亮*,吴洁**

(中国药科大学生命科学与技术学院微基因药学实验室,南京 210009)

摘要 探究金黄色葡萄球菌核酸酶(SNase)对2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)诱导小鼠结肠炎的改善作用及机制。用2.5% TNBS溶液灌肠雌性BALB/c小鼠建立结肠炎模型,并连续6 d灌胃给予以重组乳酸菌为递呈载体的SNase。探究SNase介导的中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)的降解对小鼠结肠炎的影响。实验分为正常组、TNBS模型组、NZ9000乳酸菌组、表达SNase的重组乳酸菌组。每日观测小鼠体质量、粪便性状和粪便隐血情况,观察期结束取结肠组织进行HE病理分析,检测结肠组织髓过氧化物酶(MPO)酶活和促炎细胞因子的mRNA表达水平,检测血清炎性细胞因子含量,同时免疫组化检测结肠组织中性粒细胞及其NETs标志物的表达水平。结果表明,乳酸菌递呈的SNase能缓解TNBS诱导的结肠炎小鼠体质量下降,降低疾病活动指数(DAI)评分,缓解结肠缩短并减轻病理损伤,降低结肠组织MPO酶活及炎性细胞因子表达,同时改善了血清炎性水平,免疫组化结果表明结肠组织Ly6G和cith3水平下降。初步机制表明,SNase能够下调炎性细胞因子的表达,降低NETs水平从而缓解小鼠结肠炎。

关键词 金黄色葡萄球菌核酸酶;乳酸乳球菌;2,4,6-三硝基苯磺酸;中性粒细胞胞外诱捕网;结肠炎

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)02-0198-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200211

引用本文 张婷婷,梅银柳,董万法,等. 金黄色葡萄球菌核酸酶对2,4,6-三硝基苯磺酸诱导的小鼠结肠炎的保护作用[J]. 中国药科大学学报,2020,51(2):198-205.

Cite this article as: ZHANG Tingting, MEI Yinliu, DONG Wanfa, et al. Protective effect of staphylococcal nuclease on 2,4,6-trinitro-benzene sulfonic acid-induced colitis in mice[J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(2):198-205.

Protective effect of staphylococcal nuclease on 2,4,6-trinitro-benzene sulfonic acid-induced colitis in mice

ZHANG Tingting, MEI Yinliu, DONG Wanfa, WANG Jingxun, JIN Liang*, WU Jie**

Minigene Pharmacy Laboratory, School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract To explore the improving effect and mechanism of staphylococcal nuclease (SNase)-mediated degradation of neutrophil extracellular traps (NETs) on 2,4,6-trinitro-benzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in mice. The model of colitis in female BALB/c mice was established by intrarectal injection of 2.5% TNBS solution, and SNase loaded by *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) were orally administrated for 6 days. To investigate the effect of SNase-mediated degradation of neutrophil extracellular traps on colitis in mice, the experiment was divided into control group, TNBS model group, NZ900 group and *L. lactis* pCYT: SNase group. The daily body weight, stool consistency and bleeding of mice were observed. The pathological condition of HE in colon group was detected. The activity of MPO and the mRNA expression level of inflammatory cytokines in each group were measured, and the concentration of inflammatory factors in serum was detected. The expression of NETs level marker cith3 in colon

收稿日期 2020-02-24 通信作者 * Tel:18761874536 E-mail:lingjin1975@cpu.edu.cn

** Tel:025-86185386 E-mail:wujie@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81973224);中国药科大学“双一流”创新团队项目资助(No. CPU2018GF/GY16, No. CPU2018GF/GY17)

tissue was determined by immunohistochemistry. The results showed that SNase loaded by *lactis* acid bacteria could alleviate the weight loss, disease activity index score, colonic length and pathological damage induced by TNBS in mice, and reduce the levels of inflammatory cytokines in serum and colonic tissue, inhibit the activity of MPO and the expression of Ly6G and citH3 in colon tissue. The preliminary mechanism showed that SNase could down-regulate the expression of inflammatory cytokines and reduce the content of NETs markers to alleviate colitis in mice.

Key words staphylococcal nuclease; *Lactococcus lactis*; 2, 4, 6-trinitro-benzene sulfonic acid; neutrophil extracellular traps; colitis

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81973224); and the Foundation for the Double First-Class Innovation Team of China Pharmaceutical University (No. CPU2018GF/GY16, No. CPU2018GF/GY17)

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一种慢性肠道疾病, 包括溃疡性结肠炎 (ulceration colitis, UC) 和克罗恩病 (Crohn's disease, CD), 在西方国家较为常见, 北美和欧洲分别有超过 150 万和 200 万人患病, 近年来, 随着生活方式的改变, 亚洲国家发病率逐年提高^[1]。IBD 发病机制不明, 一般认为与环境因素、遗传因素、肠道微环境和免疫因素等相关。目前 IBD 治疗手段主要依赖手术切除和病症缓解, 但存在不良反应强、易复发等缺点, 因此寻找新的治疗靶点是十分必要。

中性粒细胞是机体抵抗病原体入侵的第一道屏障, 在固有免疫中发挥重要作用。2004 年, 研究人员发现中性粒细胞可通过一种新型方式达到杀灭病原体的作用——中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs), 它是活化的中性粒细胞释放核内包括染色质 DNA 在内的核酸, 并包裹自身胞质颗粒蛋白酶所形成的纤维网状结构^[2]。研究发现, NETs 在杀伤病原菌的同时也会对机体黏膜组织造成损伤, NETs 的过度强盛或者不及时清除与类风湿关节炎、系统性红斑狼疮等多种自身性免疫疾病密切相关^[3-4]。蛋白组学分析发现溃疡性结肠炎患者结肠组织中有多种 NETs 成分蛋白^[5], 另有研究发现对中性粒细胞蛋白如蛋白酶 3 (PR3)、髓过氧化物酶 (MPO)、中性粒细胞弹性蛋白酶 (NE) 和组蛋白的抗中性粒细胞胞浆抗体 (ANCA) 可成为 IBD 诊断和预后的生物标志物^[6], 这些蛋白会在 NETs 形成过程中释放并成为 ANCA 的来源^[7-8], 从而增强机体免疫反应, 造成组织损伤。由此可见, NETs 形成参与 IBD 疾病发展。

DNA 是 NETs 主要的结构成分, NETs 抗原性也需 DNA 维持结构完整性^[9], 因此破坏 NETs 的 DNA 骨架可以阻止其导致的异常自身免疫。国内

外也有多项研究证明, DNase 可用于改善和治疗因 NETs 增多而引发的疾病^[10]。金黄色葡萄球菌分泌的葡萄球菌核酸酶 (SNase) 是一种具有磷酸二酯酶活性的单链蛋白, 能迅速切割 DNA 和 RNA 长链形成的 3'-核苷酸产物, 且 pH 4.8 ~ 9.2 之间具有很好的酶活等优点^[11]。

乳酸菌 (*lactis* acid bacteria, LAB) 是公认的食品级安全菌, 试验表明, 乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*, *L. lactis*) 可以逃离胃酸的过度侵袭 (存活率 90% ~ 98%), 并成功定植肠道, 以乳酸乳球菌表达载体已逐渐成为口服疫苗的热点^[12]。本课题组前期构建制备的重组乳酸菌 *L. lactis* pCYT: SNase 可以稳定表达 SNase, 并用于递送基于自身抗原设计的重组蛋白疫苗^[13]。前期的实验结果表明: 灌胃给予表达 SNase 的重组乳酸菌一方面可以稳定定植于 NOD 小鼠肠道中并表达 SNase 蛋白^[14]。在本次研究中将已表达 SNase 的重组乳酸菌灌胃给 TNBS 诱导的结肠炎模型小鼠, 以探究其基于 NETs 降解而对小鼠肠道炎症的保护机制。

1 材 料

1.1 药品与试剂

5% TNBS 水溶液 (美国 Sigma 公司); 乳链菌肽 (上海源叶生物科技有限公司); 胰蛋白胨、酵母提取物 (德国 Oxoid 公司); M17 肉汤粉 (青岛海博生物技术有限公司); 兔 Ly6G 抗体 (美国 Santa Cruz 公司), 兔 citH3 抗体 (英国 Abcam 公司); 隐血试剂盒 (上海雷根生物科技有限公司); LEG-ENDplex™ 多因子检测试剂盒 (美国 Biolegend 公司); TMB 显色液 (上海碧云天生物技术有限公司); 逆转录试剂盒 (武汉艾瑞科生物科技有限公司); SYBR Green Premix 试剂盒 (上海天根生物科

技有限公司), 其他试剂均为市售化学或分析纯。

1.2 仪器

Spark 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司); 离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司); 7300 Plus Real-Time PCR system、FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司); 数理切片扫描仪(日本 Hamamatsu 公司); 超声破碎仪、LGJ-12 冷冻干燥机、ZXZ-2 型旋片式真空泵(台州市博雯真空设备有限公司); 研磨仪(北京赫得科技有限公司); MylabTM Shaker SLST3(韩国 Seoulin 公司)。

1.3 菌 种

L. lactis NZ9000 和 *L. lactis* pCYT:SNase 均为本实验室保存。

1.4 动 物

清洁级 BALB/c 小鼠, 雌性, 体质量 20~22 g, 购自上海西普儿-必凯实验动物有限公司, 合格证号: SCXK(沪)2018-0006。所有动物实验均符合动物伦理操作。

2 方 法

2.1 给药乳酸菌 *L. lactis* pCYT:SNase 的制备

给药乳酸菌 *L. lactis* pCYT:SNase 的制备方法参见文献^[14], 即从保存的 *L. lactis* pCYT:SNase 甘油管按照体积分数 1% 加到 GM17 培养基中 30 °C 恒温静置过夜培养。次日按体积分数 4% 的接种量将活化的菌液转接到 GM17 大瓶培养基中培养。当培养液 A_{600} 达到 0.5 左右时加乳链菌肽(nisin)诱导培养, 至 A_{600} 达到 1.2 时停止培养。收集菌体, 用无菌水对沉淀进行重悬, 调整菌体浓度至 2×10^{10} CFU/mL。*L. lactis* NZ9000(以下简称 NZ9000)同法培养和制备, 但不加诱导剂。

2.2 TNBS 诱导小鼠结肠炎模型的建立及给药

小鼠清洁级环境下适应饲养 1 周, 实验前按体质量随机分为 4 组: 健康对照组(Control)、TNBS 模型组(TNBS)、TNBS + NZ9000 组(LL)、TNBS + *L. lactis* pCYT:SNase 组(LL-SNase); 每组 12 只。造模前小鼠禁食不禁水 24 h, 4% 水合氯醛按照 10 μ L/g 的剂量腹腔注射麻醉小鼠, 用 3.5F 橡胶软管甘油湿润后从肛门缓慢插入 4 cm 处, 按照 100 mg/kg 的剂量灌入 5% TNBS 水溶液加等体积乙醇的混合液, 静置 30 s 拔出, 倒置 5 min 放回笼中, 待其自然清醒。每天观测小鼠体质量、粪便性状

及隐血状况, 根据表 1 的疾病活动指数(DAI)评分标准计算出每组小鼠的平均 DAI 分数^[15]。给药流程见图 1, 具体为造模前 3 天提前乳酸菌灌胃给药, 每天 1 次, 剂量均为每只 4×10^9 CFU。于第 6 天处死小鼠, 分离结肠和脾脏, 后续进行组织学分析。

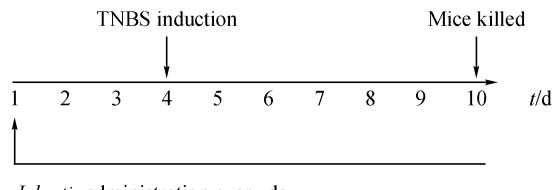


Figure 1 Schematic representation of *L. lactis* administration and induction of colitis in mice by 2.5% 2,4,6-trinitro-benzene sulfonic acid (TNBS)

Table 1 Disease activity index (DAI) score after TNBS induction in mice

Score	Body weight loss/%	Stool consistency	Bleeding
0	<0	Normal	Negative
1	1~5	-	-
2	6~10	Loose stool	Hemoccult positive
3	11~15	-	-
4	>15	Diarrhea	Gross bleeding

2.3 结肠组织 HE 分析

分别取各组结肠于 4% 多聚甲醛中固定, 经石蜡包埋, 制成 5 μ m 切片, HE 染色后, 在显微镜下观察结肠黏膜肌层结构完整性、杯状细胞数量、隐窝结构及炎性细胞浸润等情况, 根据影响的程度对各组小鼠结肠组织进行评分^[16]: 无影响(0)、轻(1)、重(2)。每组最终评分为各项指标的平均数。

2.4 结肠组织 MPO 酶活测定

分别取各组结肠组织 20 mg 左右, 加入生理盐水研磨成 10% 的组织匀浆液, 4 °C, 12 000 r/min 离心 15 min 收集上清液, 取 10% 结肠匀浆上清 10 μ L 和 TMB 溶液 100 μ L, 37 °C 反应 5 min, 加入 2 mol/L 硫酸 50 μ L 终止反应, 于 450 nm 处测定吸收度。MPO 相对酶活 (U/g 组织湿重) = (测定吸收度 - 对照吸收度) / 取样量(g)。

2.5 结肠组织 QPCR 检测

称取结肠组织 50 mg, 加入 Trizol 500 μ L, 提取总 RNA, 定量后取 2 μ g RNA 按照逆转录试剂盒合成 cDNA, 用 SYBR Green 进行扩增, 反应条件如下: 95 °C 30 s 循环 1 次, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s 循环 40 次。GAPDH 作为每次扩增内参, 相对表达水平用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示, 引物序列见表 2。

Table 2 Sequences of real time PCR primers

Gene	Primer sequences (5'→3')
GAPDH	Forward: CTCTCTGCTCCCTGTTGGACAG Reverse: GTGGAATCTATTGAAACATGT
TNF- α	Forward: CCTGTAGCCCACGTCGTAG Reverse: GGGAGTAGACAAGGTACAACCC
IL-1 β	Forward: GAAATGCCACCTTTGACAGTG Reverse: TGGATGCTCTCATCAGGACAG
IL-6	Forward: CTGCAAGAGACTCCATCCAG Reverse: TCAGTGGTATAGACAGGTGTTGG

2.6 血清流式多细胞因子检测

采用 LEGENDplex™ 多因子检测试剂盒,流式检测血清与炎症相关的炎性细胞因子。简要流程为:标准品和血清稀释样本分别与磁珠室温孵育 2 h,加抗体后继续室温孵育 1 h,加 PE 荧光标记的链霉亲和素室温孵育 30 min,离心加缓冲液混悬上流式细胞仪检测,用 Legendplex 软件进行数据分析。

2.7 结肠组织免疫组化分析

各组石蜡包埋的结肠组织切成 5 μm 的切片,进行 Ly6G 和 cith3 抗体染色,用数字病理切片扫描仪进行扫描,Image Pro Plus 软件分析阳性信号。

2.8 统计分析

所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差进行显著性比较,采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结 果

3.1 重组乳酸菌 SNase 表达的鉴定

如图 2 所示,乳链菌肽诱导的工程菌 *L. lactis* pCYT:SNase 能稳定表达 SNase。在本课题组前期研究中,重组乳酸菌诱导表达的 SNase 可在体外有效降解中性粒细胞刺激形成的 NETs,并通过灌胃乳酸菌成功被递送至肠道发挥其降解 NETs 的作用^[14]。

3.2 SNase 缓解 TNBS 诱导的小鼠结肠炎疾病指征

用 TNBS 建立小鼠结肠炎模型,提前 3 d 乳酸菌给药,观测小鼠生存情况,体质量变化,DAI 评分。在实验第 6 天处死小鼠,分离结肠和脾脏,测量结肠长度和称量脾脏重量。TNBS 造模后小鼠生存 3 只,经过 LL 处理小鼠生存 4 只,LL-SNase 组小鼠生存 3 只。结果显示,相比较于健康对照组,TNBS 诱导小鼠体质量下降(图 3-A)更明显,DAI 评分(图 3-B)显著提高,结肠长度明显缩短(图 3-C,图 3-D),脾脏质量也明显增加(图 3-E)。经 LL-SNase 给药处理后,

体质量下降有所缓解,DAI 评分也有下降,结肠长度明显变长。从宏观指标上看,SNase 可以缓解 TNBS 诱导的小鼠结肠炎的发展。

为进一步观察 SNase 对结肠组织组织结构和炎性细胞浸润的影响,对结肠组织进行 HE 染色分析。由图 4-A 可以看出,相比较于健康对照组,TNBS 组结肠组织黏膜肌层结构被破坏,腺上皮细胞大量较少,结构紊乱,而经 LL-SNase 处理后,黏膜肌层结构较为完整,腺上皮细胞增多,排布整齐。根据黏膜肌层结构破坏程度,杯状细胞数量,隐窝结构及中性粒细胞,淋巴细胞浸润情况对各组结肠 HE 切片进行评分(图 4-B),LL-SNase 组中 TNBS 小鼠的结肠组织损伤得到明显改善。结果表明,SNase 能够很好地缓解 TNBS 诱导的小鼠结肠炎的发展。

3.2 SNase 缓解小鼠结肠组织炎性水平

为了探究乳酸菌递呈的 SNase 对结肠组织炎性水平的影响,本研究测定了小鼠结肠组织 MPO 酶活。如图 5-A 所示,相比较于健康对照组,TNBS 组 MPO 酶活显著提高,而 LL-SNase 处理明显下调 TNBS 诱导小鼠结肠组织 MPO 酶活性,提示 SNase 能够改善 TNBS 小鼠结肠组织中性粒细胞浸润状况。本研究进一步对小鼠结肠组织炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 进行 mRNA 水平分析。如图 5B-5D 显示,相比较于健康对照组,TNBS 组 IL-1 β mRNA 水平明显提高,TNF- α 和 IL-6 也有上升趋势,但经数据统计无显著性差异。经 LL-SNase 处理后,IL-1 β mRNA 水平得到显著抑制,TNF- α 和 IL-6 均有不同程度的下调。总的来说,SNase 能从 mRNA 水平上改善 TNBS 结肠炎小鼠结肠组织的炎性水平。

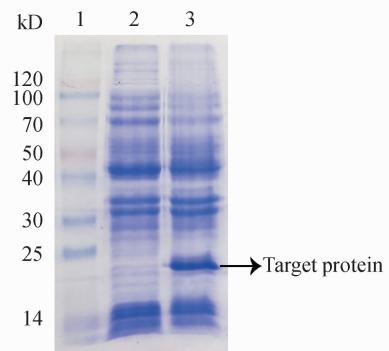


Figure 2 12% SDS-PAGE analysis of SNase induced by nisin in *L. lactis* pCYT:SNase
Lane 1: Protein marker; Lane 2: Supernant of the lysate of *L. lactis* pCYT:SNase; Lane 3: Supernant of the lysate of *L. lactis* pCYT:SNase induced by nisin (50 ng/mL)

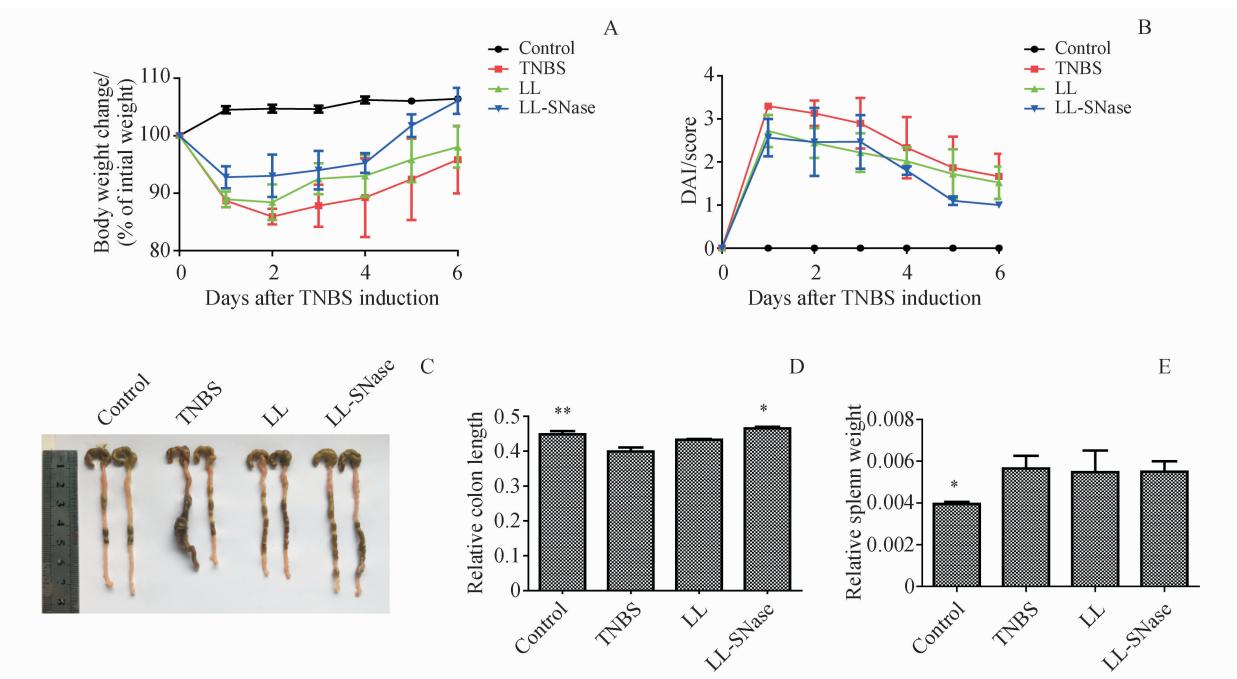


Figure 3 SNase ameliorated the TNBS-induced colitis in mice ($\bar{x} \pm s, n = 3-8$)

A: Body weight changes; B: Disease activity index (DAI) scores; C: Images of colon; D: Relative colon lengths; E: Relative spleen weights
LL: TNBS + NZ9000; LL-SNase: TNBS + *L. lactis* pCYT:SNase

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs TNBS group

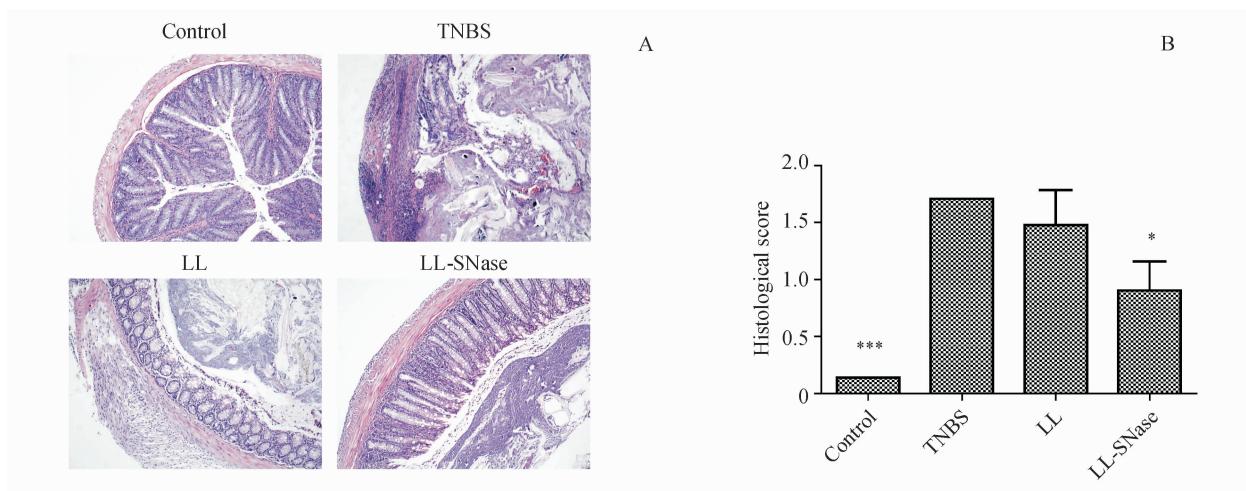


Figure 4 SNase reduced histological damage in TNBS-induced mice colitis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Histological micro-photographs of hematoxylin/eosin-stained sections of distal colon ($\times 200$); B: Histological scores for histological change

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs TNBS group

3.3 SNase 改善结肠炎小鼠体内炎性因子水平

本研究对各组血清中与炎症相关的细胞因子水平进行含量测定。如图 6 所示, TNBS 诱导的小鼠血清促炎细胞因子 IL-6 水平显著提高, 抑炎细胞因子 IL-10 显著下降, TNF- α 、IL-1 β 、IL-17A 和

IFN- γ 水平均有上升趋势, 但数据分析无显著性差异。而 LL-SNase 处理能显著上调 TNBS 结肠炎小鼠的抑炎细胞因子 IL-10 水平, 不同程度下调促炎细胞因子水平。由此可以看出, SNase 能改善小鼠体内的炎症水平。

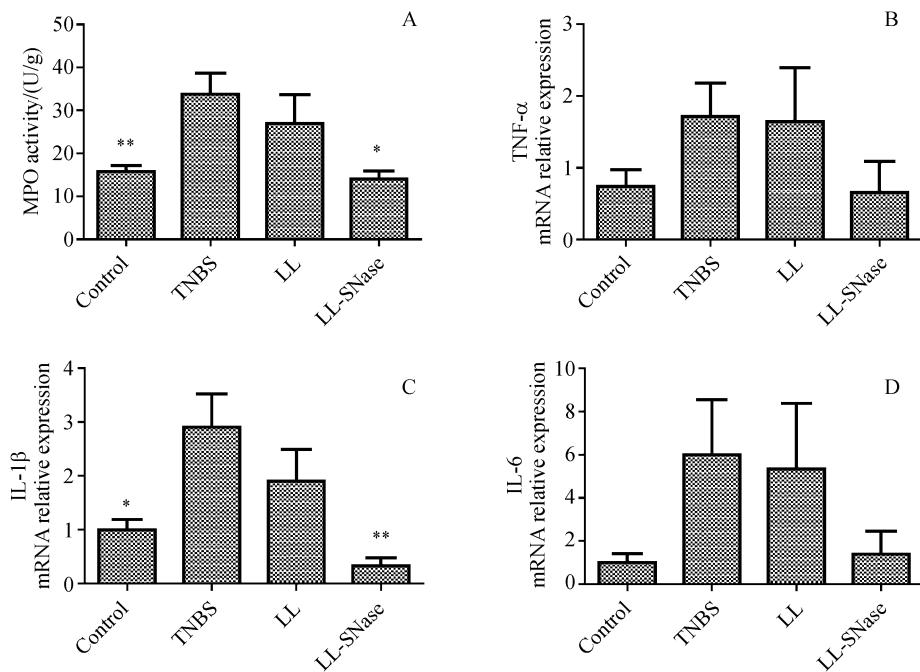


Figure 5 SNase reduced the inflammatory response in the colon tissue of TNBS-induced mice colitis ($\bar{x} \pm s, n=4-6$)

A: Activity of myeloperoxidase (MPO) enzyme in colon; B: Relative mRNA expression level of TNF- α ; C: Relative mRNA expression level of IL-1 β ; D: Relative mRNA expression level of IL-6

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs TNBS group

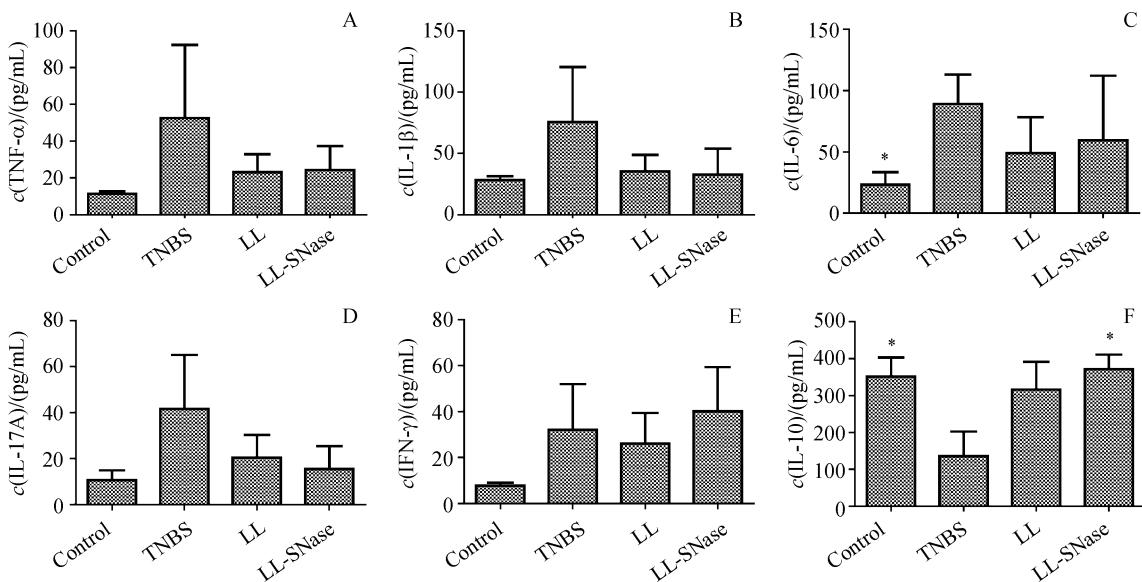


Figure 6 SNase suppressed the expression of inflammatory cytokines in TNBS-induced colitis mice ($\bar{x} \pm s, n=3-8$)

A: TNF- α ; B: IL-1 β ; C: IL-6; D: IL-17A; E: IFN- γ ; F: IL-10

* $P < 0.05$ vs TNBS group

3.4 SNase 能够减少 TNBS 诱导小鼠结肠组织中 NETs 水平标志物含量

为了探究 SNase 靶向肠道是否可以抑制肠道 NETs 形成, 本研究对各组结肠组织 NETs 水平标

志物表达进行评估, 通过免疫组化染色检测结肠组织中 NETs 水平标志物 citH3 和中性粒细胞标记分子 Ly6G 表达。如图 7 所示, TNBS 组中 Ly6G 和 citH3 含量明显高于健康对照组, 提示 TNBS 组小

鼠体内存在更显著的 NETs 水平,而 LL-SNase 处理均能够显著下调 TNBS 小鼠结肠组织 Ly6G 和 citH3 含量。此外, MPO 也是 NETs 水平的一个重要标志物,LL-SNase 给药处理也大大降低了其在

TNBS 小鼠结肠组织 MPO 酶的活性(图 5-A)。结果表明,SNase 经口给药可以减少 TNBS 诱导小鼠结肠组织中 NETs 水平标志物含量,抑制肠道 NETs 形成。

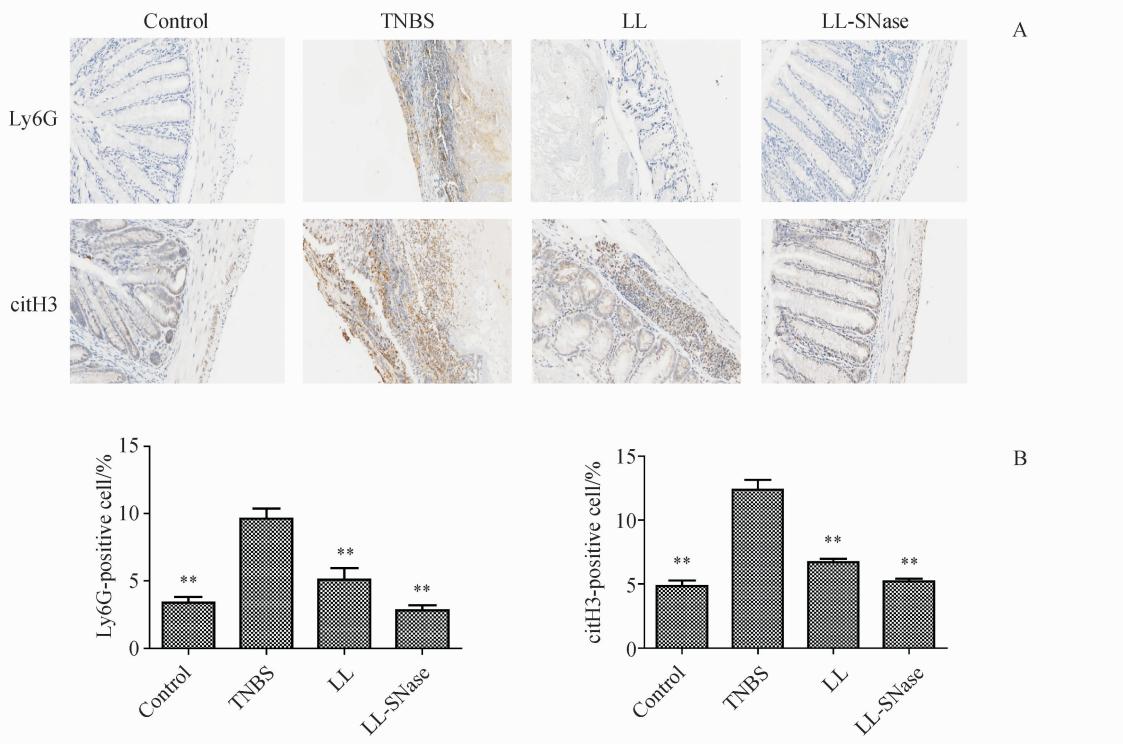


Figure 7 SNase reduced NETs-associated proteins in TNBS-induced colitis mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: Representative immunohistochemical images showing Ly6G-positive cell and citH3-positive cell in colon section ($\times 200$); B: Percentages of Ly6G-positive cell and citH3-positive cell in colon section

** $P < 0.01$ vs TNBS group

4 讨 论

炎症性肠病是一种病因不明的慢性肠道炎症疾病,包括溃疡性结肠炎和克罗恩病。这两种疾病类型临床诊断、发病部位及致病机制有所不同。克罗恩病在整个胃肠道均可发病,多见于结肠部位,伴有肠道狭窄症状,主要是由 Th1 细胞引起的免疫反应^[17]。TNBS 诱导的结肠炎与临幊上克罗恩病的病症表现相似,可用来研究克罗恩病的发病机制^[18]。越来越多的证据表明 NETs 形成参与炎症性肠病的致病形成,尽管部分研究表明 NETs 成分在溃疡性结肠炎患者中检测要比克罗恩病患者更为显著。不可否认的是,确有多项研究表明 NETs 形成与克罗恩病相关。在克罗恩病患者粪便、血清和活检组织中确实可检测到 NETs 主要成分,包括 citH3, NE, MPO 等^[19–22]。Cl-amidine 是 PAD4 酶抑

制剂,能抑制 NETs 的前期形成,Chumanovich 等^[23]发现腹腔注射 Cl-amidine 能够缓解葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠结肠炎。由此看出,干预 NETs 降解是 IBD 治疗的一个方向。

为探究 SNase 降解 NETs 对小鼠结肠炎的影响,同时为了让 SNase 直接靶向到肠道而发挥作用,本研究选择重组乳酸菌作为递呈载体。结果发现,乳酸菌递呈的 SNase 能缓解 TNBS 造模小鼠体质量下降,降低 DAI 评分,增加结肠长度以及减轻结肠组织病理损伤。MPO 酶作为中性粒细胞特异性表达的酶,其活力水平可以反应组织中性粒细胞浸润情况。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎性细胞因子上调是结肠炎炎症的显著表现。通过表达 SNase 的重组乳酸菌 LL-SNase 灌胃给药,结果表明 SNase 能下调结肠组织 MPO 酶活水平以及 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 炎性细胞因子转录水平。进一步利用免

疫组化检测结肠组织 NETs 水平标志物 citH3 水平,结果发现,TNBS 模型组 citH3 含量明显上调,提示结肠炎中 NETs 形成活跃,经 LL-SNase 处理后,中性粒细胞浸润以及 citH3 含量明显下调,而乳酸菌 NZ9000 也能改善 NETs 相关指标,可能因为乳酸菌本身作为益生菌,可以调节肠道微生态从而抑制 NETs 形成。本研究结果初步表明,SNase 能通过抑制 NETs 形成从而缓解小鼠结肠炎症。

虽然本项研究存在一些不足,例如:TNBS 造模病死率偏高,导致样本较少,在统计学分析时部分指标只出现差异趋势,未能得到理想的显著性差异结果。但是,实验结果依然可以初步显示 NETs 参与克罗恩病小鼠的疾病发展,本研究通过 SNase 处理,靶向 NETs 降解可以缓解 TNBS 诱导的小鼠结肠炎,保护结肠组织结构,缓解炎性浸润下调促炎细胞因子和上调抑炎细胞因子等。后续本课题组将增加实验动物数量,继续深入探究 SNase 对 TNBS 造模小鼠结肠炎症影响的机制。总的来说,SNase 靶向 NETs 降解是克罗恩病的一个治疗方向,其具体机制还需进一步探索。

参 考 文 献

- [1] Tighe D, McNamara D. Clinical impact of immunomonitoring in the treatment of inflammatory bowel disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, **23**(3): 414–425.
- [2] Grayson PC, Kaplan MJ. At the Bench: neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases [J]. *J Leukoc Biol*, 2016, **99**(2): 253–264.
- [3] Hahn J, Knopf J, Maueroder C, et al. Neutrophils and neutrophil extracellular traps orchestrate initiation and resolution of inflammation [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2016, **34**(4 Suppl 98): 6–8.
- [4] Leslie RD, Bradford C. Autoimmune diabetes; caught in a NET [J]. *Diabetes*, 2014, **63**(12): 4018–4020.
- [5] Bennike TB, Carlsen TG, Ellingsen T, et al. Neutrophil extracellular traps in ulcerative colitis: a proteome analysis of intestinal biopsies [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2015, **21**(9): 2052–2067.
- [6] Zhou G, Song Y, Yang W, et al. ASCA, ANCA, ALCA and many more; are they useful in the diagnosis of Inflammatory Bowel Disease? [J]. *Dig Dis*, 2016, **34**(1/2): 90–97.
- [7] Jarrot PA, Kaplanski G. Pathogenesis of ANCA-associated vasculitis; an update [J]. *Autoimmun Rev*, 2016, **15**(7): 704–713.
- [8] Sangaletti S, Tripodo C, Chiodoni C, et al. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity [J]. *Blood*, 2012, **120**(15): 3007–3018.
- [9] Gao X, Hao S, Yan H, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to the intestine damage in endotoxemic rats [J]. *J Surg Res*, 2015, **195**(1): 211–218.
- [10] Martinez Valle F, Balada E, Ordi-Ros J, et al. DNase 1 and systemic lupus erythematosus [J]. *Autoimmun Rev*, 2008, **7**(5): 359–363.
- [11] Hong L, Lang J, Dongmei HE, et al. Studies on preparation and properties of *Staphylococcus* nuclease [J]. *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2017, **48**(2): 214–219.
- [12] Bahey-El-Din M, Gahan CG, Griffin BT. *Lactococcus lactis* as a cell factory for delivery of therapeutic proteins [J]. *Curr Gene Ther*, 2010, **10**(1): 34–45.
- [13] Ma Y, Liu J, Hou J, et al. Oral administration of recombinant *Lactococcus lactis* expressing HSP65 and tandemly repeated P277 reduces the incidence of type I diabetes in non-obese diabetic mice [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(8): e105701.
- [14] Lang J, Wang X, Liu K, et al. Oral delivery of staphylococcal nuclease by *Lactococcus lactis* prevents type 1 diabetes mellitus in NOD mice [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, **101**(20): 7653–7662.
- [15] Danese S, Sans M, Spencer DM, et al. Angiogenesis blockade as a new therapeutic approach to experimental colitis [J]. *Gut*, 2007, **56**(6): 855–862.
- [16] Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines [J]. *Clin Exp Immunol*, 1998, **114**(3): 385–391.
- [17] Derkacz A, Olczyk P, Komosinska-Vassev K. Diagnostic markers for nonspecific inflammatory bowel diseases [J]. *Dis Markers*, 2018, **2018**: 7451946.
- [18] Wirtz S, Popp V, Kindermann M, et al. Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation [J]. *Nat Protoc*, 2017, **12**(7): 1295–1309.
- [19] de Bruyn M, Arijs I, De Hertogh G, et al. Serum neutrophil gelatinase b-associated lipocalin and matrix metalloproteinase-9 complex as a surrogate marker for mucosal healing in patients with Crohn's disease [J]. *J Crohns Colitis*, 2015, **9**(12): 1079–1087.
- [20] Kato S, Ochiai M, Sakurada T, et al. Increased expression of long pentraxin PTX3 in inflammatory bowel diseases [J]. *Dig Dis Sci*, 2008, **53**(7): 1910–1916.
- [21] Lehmann T, Schallert K, Vilchez-Vargas R, et al. Metaproteomics of fecal samples of Crohn's disease and ulcerative colitis [J]. *J Proteomics*, 2019, **201**: 93–103.
- [22] Li T, Wang C, Liu Y, et al. Neutrophil extracellular traps induce intestinal damage and thrombotic tendency in inflammatory bowel disease [J]. *J Crohns Colitis*, 2020, **14**(2): 240–253.
- [23] Chumanovich AA, Causey CP, Knuckley BA, et al. Suppression of colitis in mice by Cl-amidine; a novel peptidylarginine deiminase inhibitor [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, **300**(6): G929–938.