

脆弱拟杆菌 ATCC25285 通过 TGF- β /Smad3 通路诱导 Treg 细胞分化缓解结肠炎

魏芳, 范梦慧, 刘光臣, 顾馨月, 邢莹莹*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 211198)

摘要 肠道菌群的变化通常与不同的胃肠道疾病有关, 维持肠道菌群稳态可以增强免疫耐受性, 调节肠道免疫平衡。已有研究发现, 增加肠道菌群拟杆菌门中脆弱拟杆菌(*B. fragilis*)的相对丰度, 可以显著增强肠道调节性T细胞(Treg)和抗炎细胞因子的表达, 缓解肠道炎症。然而, *B. fragilis* 调节肠道免疫的具体机制尚不清楚。本研究通过给 SPF 级 C57BL/6 小鼠饮用 3% DSS 溶液构建急性结肠炎模型, 自由饮用 7 d 后, 通过灌胃对已患结肠炎小鼠外源性补充 *B. fragilis*, 研究 *B. fragilis* 对肠道免疫的调控作用及其作用机制。实验结果表明, *B. fragilis* 可以改善结肠炎小鼠的肠道菌群紊乱, 增加肠道菌群主要代谢产物短链脂肪酸(SCFAs)的含量。通过提取小鼠组织淋巴细胞、初始 CD4⁺ T 细胞、使用脂质体修饰的 siRNA 敲低小鼠 Smad3, 采用流式细胞术进一步研究发现 *B. fragilis* 能够通过 TGF- β /Smad3 信号通路诱导肠道 Treg 细胞及相关细胞因子的表达, 增强肠道调节免疫, 进而缓解结肠炎。此外, 本研究还发现 *B. fragilis* 通过增加肠道中活性氧(ROS)的表达来激活 TGF- β , 从而诱导 Treg 细胞分化并发挥免疫调节作用。

关键词 脆弱拟杆菌; 胃肠道微生物; 调节性T细胞; TGF- β /Smad3; 结肠炎

中图分类号 Q939.91 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2023)02-0226-12

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.2023011202

引用本文 魏芳, 范梦慧, 刘光臣, 等. 脆弱拟杆菌 ATCC25285 通过 TGF- β /Smad3 通路诱导 Treg 细胞分化缓解结肠炎[J]. 中国药科大学学报, 2023, 54(2): 226 - 237.

Cite this article as: WEI Fang, FAN Menghui, LIU Guangchen, et al. *Bacteroides fragilis* ATCC25285 relieves colitis by inducing Treg cells differentiation via the TGF- β /Smad3 signaling pathway[J]. J China Pharm Univ, 2023, 54(2): 226 - 237.

Bacteroides fragilis ATCC25285 relieves colitis by inducing Treg cells differentiation via the TGF- β /Smad3 signaling pathway

WEI Fang, FAN Menghui, LIU Guangchen, GU Xinyue, XING Yingying*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract The changes in intestinal flora are usually associated with different gastrointestinal diseases, and intestinal flora homeostasis can enhance immune tolerance and regulate intestinal immune balance. Previous studies have found that the increase of the relative abundance of *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*) in *Bacteroides intestinalis* can significantly enhance the expression of intestinal regulatory T cells (Treg) and anti-inflammatory cytokines, thus alleviating intestinal inflammation. However, the mechanism of *B. fragilis* regulating intestinal immunity is still unclear. In this study, an acute colitis model was constructed by giving 3% DSS in drinking water solution to SPF-grade C57BL/6 mice for 7 days, and exogenous supplementation *B. fragilis* was given to mice by gastric gavage to study its regulatory effect on intestinal immunity and its mechanism of action. The results showed that *B. fragilis* could improve the intestinal flora disorder in mice with colitis and increase the content of short-chain fatty acids (SCFAs), the main metabolite of the intestinal flora. By extracting mouse tissue lymphocytes, naive CD4⁺ T cells, and liposome-modified siRNA knockdown mouse Smad3, it was further

收稿日期 2023-01-12 *通信作者 Tel: 025-86185397 E-mail: cpuskyxy@126.com

基金项目 国家重点研发项目(No. 2017YFD0400303); 国家自然科学基金资助项目(No. 81971562); 宁夏省重点研发计划项目(No. 2020BFG02012); 江苏省高校优先学术项目开发(PAPD)

discovered by flow cytometry that *B. fragilis* induced the expression of intestinal Treg cells and related cytokines through the TGF- β /Smad3 signaling pathway, which enhanced intestinal regulatory immunity and alleviated colitis. It was also found that *B. fragilis* activated TGF- β by increasing the expression of reactive oxygen species (ROS), thus inducing Treg cell differentiation and playing an immunomodulatory role.

Key words *Bacteroides fragilis*; gut microbiota; regulatory T cells; TGF- β /Smad3; intestinal inflammation

肠道菌群与肠黏膜免疫密切相关,肠道菌群失调常导致炎症性疾病,如溃疡性结肠炎、克罗恩病等炎症性肠病^[1-2]。本课题组之前的研究发现,乳酸乳球菌(*L. lactis*)的肽聚糖可以改变小鼠肠道菌群的多样性,其中最显著的是增加小鼠肠道菌群中拟杆菌门的相对丰度^[3-4]。此外,拟杆菌门最常见的成员之一是脆弱拟杆菌(*B. fragilis*),*B. fragilis*常见于人体肠道菌群中,也存在于口腔和上呼吸道中。*B. fragilis*的非产肠毒素菌株被认为是有益细菌,是肠道菌群的重要组成部分,有利于维持肠道稳态^[5]。

微生物群落、其代谢物和成分不仅是免疫稳态所必需的,还会影响宿主对各种免疫介导的疾病和紊乱的易感性。短链脂肪酸(SCFAs)是链长1~6个碳原子的饱和脂肪酸,是肠道中膳食纤维发酵的主要产物,可以重塑肠道生态,诱导免疫调节和发挥抗菌作用。此外,SCFAs可以调节肠道炎症过程中的炎症信号通路^[6]。SCFAs在肠道炎症免疫调节中的作用,特别是通过G蛋白偶联受体(GPR)/Toll样受体(TLR)介导的潜在信号级联反应,已成为现代新兴的热点问题^[7-8]。

*B. fragilis*已被证明可以促进结肠炎中的肠道CD4⁺T细胞的扩增并分泌IL-10,从而增加和增强肠道调节免疫力并减轻肠道炎症^[9]。此外,通过TLR4信号通路,*B. fragilis*可以抑制无菌结肠炎相关结肠癌中肠道炎症和肿瘤的发展^[10]。然而,*B. fragilis*对Treg细胞作用的特定机制以及它是否可以通过其他免疫途径调节肠道炎症仍然未知。因此,本研究的目的是更进一步地探究*B. fragilis*在肠道炎症中的免疫调节作用和机制。

在某些条件下,CD4⁺T细胞可以被诱导发育成不同的T细胞亚群,包括效应T细胞Th1, Th2, Th17和Treg。研究发现,产生抗炎细胞因子IL-10的Treg细胞在维持肠道稳态中起着关键作用^[11]。但目前尚不清楚*B. fragilis*如何在肠道炎症的背景下调节Treg细胞的产生。在以前的研究中,TGF- β

已被证明会影响Treg细胞的表达^[12-13]。在正常分化的肠细胞中,TGF- β 家族成员的各种梯度在维持肠道稳态中起重要作用^[14-15]。腔内细菌、细胞因子和其他刺激物均会促进TGF- β 的产生^[16-17]。TGF- β 与免疫细胞(T细胞、B细胞、DC和巨噬细胞)和上皮细胞上的TGF- β 受体结合可以诱导细胞内转导途径和肠道稳态的激活^[18]。肠道TGF- β 调节多种反应,例如Treg和Th17诱导、IEL发育、IgA产生、黏附分子表达的调节、预防杯状细胞耗竭和营养不良、抑制IL-10和IL-33的产生,以及增强上皮密封性连接表达^[19]。在Treg分化过程中,TGF- β /Smad3信号通路是决定Foxp3表达的关键信号转导途径^[20-21],然而*B. fragilis*是否会影响TGF- β 的产生及相关信号的传递尚不清楚,因此,本文将探讨*B. fragilis*对肠道免疫的调节与TGF- β /Smad3信号通路的关系。

1 材料

1.1 试剂

无菌脱纤维羊血(山西九龙生物科技有限公司);通用型组织固定液(武汉赛维尔生物科技有限公司);苏木精、伊红(上海生工生物工程技术有限公司);FastDNA[®] Spin Kit for Stool(美国MP Biomedicals公司);QIA-quick PCR purification kit(德国Qiagen公司);胰蛋白胨(英国Oxoid公司);大豆蛋白胨(北京奥博星生物技术有限公司);DSS(美国MP Biomedicals公司);琼脂粉(国药集团化学试剂有限公司);Percoll(美国GE公司);胎牛血清1640细胞培养基(美国Gibco公司);Foxp3固定液/破膜液、APC抗小鼠Foxp3、抗小鼠ZO-1抗体(美国eBioscience公司);FITC抗小鼠CD4、Pacific blue[™]抗小鼠CD4、PE抗小鼠CD25、MojoSort[™]小鼠CD4 T细胞分选试剂盒、多因子试剂盒(美国Biolegend公司);蛋白酶抑制剂(美国APE×BIO公司);BCA定量试剂盒(北京天根生化科技有限公司);jetPRIME转染试剂、siRNA(百奥迈科生物技

术有限公司); Trizol up(美国 Invitrogen 公司); BCA 定量试剂盒(北京天根生化科技有限公司); PAGE 凝胶制备试剂盒(上海雅酶生物科技有限公司); 抗小鼠 GAPDH 抗体(美国 Proteintech 公司); Phospho-Smad3(Ser423/425)兔单抗(美国 Cell Signaling Technology 公司); 其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

恒温培养箱、冷冻离心机、CO₂细胞培养箱(美国 Thermo 公司); 分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司); 冰冻切片机、荧光倒置显微镜(德国徕卡公司); BD Calibur/Celesta 流式细胞仪(美国 BD 公司); 手持式组织匀浆机(德国 IKA 公司); 多功能酶标仪(美国 Promega 公司); PCR 仪、实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); Tanon5200 全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司)。

1.3 动物与菌种

于南京青龙山动物繁育中心购买(20±2)g 雌性无特异性病原体(SPF)C57BL/6 小鼠, 安置在中国药科大学动物实验中心。所有动物研究均遵循国际医学伦理规范并经中国药科大学动物伦理委员会批准。脆弱拟杆菌菌种(*B. fragilis* ATCC25285, 正文中简称为 *B. fragilis*)购于北京北纳生物技术有限公司。

2 方法

2.1 实验性急性结肠炎模型

给予小鼠 3% 葡聚糖硫酸钠(DSS, MPbio)作为饮用水使其自由饮水 7 d 以诱导急性结肠炎。然后使用 1×10^9 CFU *B. fragilis* ATCC25285 灌胃 3 d 进行治疗。观察并记录粪便的黏稠度、形状以及便血情况, 并每天在同一时间记录体重。处死时, 测量结肠长度并将距离肛门 1~1.5 cm 处部分结肠置于 4% 多聚甲醛溶液中进行固定, 用于组织病理学分析。

2.2 16S rRNA 基因测序

基于 Illumina Novaseq 测序平台, 对小鼠肠道菌群进行 16S rRNA 基因测序, 主要过程如下。样品采集: 采集小鼠粪便样品并在 -80 °C 下保存。DNA 提取: 使用该试剂盒从小鼠粪便样品中提取 DNA。通过 PCR 对靶片段基因进行扩增。产物纯化: 纯化试剂盒用于准确定量 DNA 的浓度。测序:

根据扩增的 16S 区特点, 构建一个小片段文库, 基于 Illumina Novaseq 测序平台对文库进行双端测序。从该实验的测序中获得的原始数据已上传到 NCBI SRA 数据库。生物项目编号为 PRJNA699675, 收录号为 SRP305360。

2.3 SCFA 定量

通过气相色谱法检测粪便样品中 SCFAs 的浓度。取标准液或 10% 粪便悬浮液 500 μL 放入 1.5 mL 离心管中, 然后加入巴豆酸和偏磷酸混合物(样品与内标比例 5:1)100 μL; 均匀旋转, 放入 -20 °C 过夜; 解冻后, 以 14 000 r/min 离心 5 min; 取所有上清液, 经水相滤膜过滤于新管; 向样品瓶中加入滤液 100 μL, 从试管底部排出气泡, 然后进样并检测; 标准稀释液: 按初始浓度的 1/2、1/5、1/10、1/20、1/100 和 1/500 稀释比制备标准溶液。然后, 使用与上述相同的方法对每个标准样品进行 3 次检测。通过比较标准品和样品之间的峰面积来计算样品中 SCFAs 的浓度。

2.4 组织淋巴细胞提取实验

去除小鼠结肠组织或胃周围的脂肪及结缔组织, 取小鼠整段结肠或胃, 用眼科剪纵向剪开, 除去其内容物并用 PBS 洗净; 取配制好的组织上皮细胞提取缓冲液 14.25 mL 置 50 mL 离心管中, 加入经热灭活的胎牛血清(5%)750 μL, 将组织放入离心管内, 250 r/min、37 °C 置于摇床中 30 min; 取出, 经 70 μm 细胞筛过滤至一新的离心管中, 置于冰上; 将剩余组织剪碎, 重新加入细胞提取缓冲液 14.25 mL 及胎牛血清 750 μL, 同上条件置于摇床中 15 min; 溶液经 70 μm 细胞筛过滤, 合并两次所得细胞悬液, 1 850 r/min 离心 5 min 弃上清液。加入适当比例的 70% percoll 溶液, 2 350 r/min, 加速度为 3 N/kg, 减速度为 0 N/kg, 密度梯度离心 25 min; 依次移去上层及下层溶液(勿吸到中间层), 取中间层淋巴细胞; 加入适量 PBS, 1 850 r/min 离心 5 min, 即得淋巴细胞。

2.5 初始 CD4⁺ T 细胞提取实验

取野生型小鼠的脾脏, 并在 PBS 中用 300 目筛轻轻研磨以形成悬浮液, 然后过滤。离心后收集细胞沉淀物。CD4⁺ T 细胞通过 MojoSort™ 小鼠 CD4 T 细胞分选试剂盒分离。进行流式细胞术分析, 检测 CD4⁺ T 细胞的比例, 当分选率达到至少 90% 时进行后续实验。

2.6 Smad3 敲减效率验证实验

收取培养 48 h 后的转染细胞,用 Trizol 试剂提取细胞中的总 RNA,将总 RNA 1 μ g 反转录为 cDNA,cDNA 经过 QuantStudio3 系统扩增为目的基因片段,以 GAPDH 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算检测 Smad3 的表达情况,以此来筛选有效敲低 Smad3 的 siRNA。

2.7 流式细胞术分析实验

通过抗小鼠 CD4(GK1.5)和抗小鼠 Foxp3 流式抗体(FJK-16s)染色分析 Treg 的比例和数量。为了分析 Th1 和 Th17 细胞的表达,首先在 CO₂ 培养箱中用细胞活化混合物(含 Brefeldin A)刺激样品过夜,以诱导细胞内细胞因子分泌。用抗小鼠 CD4 抗体染色后,用细胞内染色缓冲液试剂盒处理细胞,然后用抗小鼠 IFN- γ 流式抗体和抗小鼠 IL-17 流式抗体染色。根据试剂盒说明书操作步骤,使用多因子试剂盒检测结肠 IL-10 的表达。所有实验均在多色流式细胞分析仪上进行。

2.8 siRNA 敲低实验

针对 Smad3 的 siRNA 已提前经过脂质体进行修饰,可直接进行尾静脉注射,为确保 siRNA 对 Smad3 基因的干扰效率,提取小鼠的 CD4⁺ T 细胞在体外转染针对 Smad3 的 siRNA 以筛选出有效序列。通过 qPCR 确认敲低效率后,对已给 3% DSS 饮用水 7 d 的结肠炎小鼠尾静脉注射脂质体修饰的 siRNA,连续注射 3 d。然后如前所述接种 *B. fragilis* ATCC25285。

2.9 结肠 TGF- β 的酶联免疫吸附法实验

称取适量的组织,加入 5 倍体积的预冷 PBS 溶液(含 1% PMSF)。首先,用剪刀将组织切成小块,然后使用手动匀浆仪将组织均质化,直到没有明显的组织碎片(全程放在冰上);在 4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min 下离心 15 min,取上清液。使用 BCA 蛋白质检测试剂盒对上清液中的蛋白质进行定量,然后根据说明书使用小鼠 TGF- β ELISA 试剂盒检测 TGF- β 。

2.10 免疫荧光和苏木精-伊红染色

首先将结肠和胃组织在室温或 4 $^{\circ}$ C 下固定在 4% 多聚甲醛中过夜。脱水、石蜡包埋和切片后,样品用苏木精和伊红染色。对于免疫荧光分析,用抗小鼠 CD4 和抗小鼠 ZO-1 抗体染色样品。所有样品均采用荧光倒置显微镜观察,并采集图像。

2.11 数据统计分析

使用 GraphPad Prism 7.0 统计分析各项实验数据和作图,每组数据以均值 \pm 标准误差表示,两组独立样本之间采用 *t* 检验,多组样本间采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

3 结果

3.1 *B. fragilis* 可以改善肠道菌群失衡

为探究 *B. fragilis* 对结肠炎小鼠肠道菌群组成和代谢物的影响,本研究首先通过使用 3% DSS 水溶液使小鼠自由饮水 7 d,构建小鼠急性结肠炎模型。接受正常水的小鼠作为对照组(NC),另一组接受 3% DSS 溶液自由饮水。实验结果显示,与 NC 组相比,DSS 处理的小鼠从第 3 天起粪便变稀,便血明显(图 1-A)。结肠的长度从正常的 8~9 cm 缩短至约 6 cm(图 1-B)。H&E 染色的结果显示,DSS 组小鼠结肠中缺少腺体结构和隐窝,黏膜层中浸润大量炎症细胞(图 1-C)。

然后用 *B. fragilis* 治疗结肠炎小鼠(如图 2-A 所示),并对肠道菌群进行 16S rRNA 基因测序。肠道菌群的 α 多样性分析,即样品内微生物群落的物种多样性和丰度,表明 DSS 诱导的结肠炎小鼠肠道中的微生物群的多样性和丰度降低,在给予 *B. fragilis* 后小鼠肠道中的微生物群的多样性和丰度增加,正如图 2-C 中物种和 Chao 1 指数所反映的。 β 多样性分析的结果还显示,*B. fragilis* 处理组的多样性显著提高(图 2-D)。通过主成分分析(PCA)对测序数据的降维用于监测组间肠道微生物群的结构变化。在主成分处观察到有或没有给予 *B. fragilis* 的小鼠肠道微生物群组成的差异,*B. fragilis* 处理的小鼠的簇圈与对照组(NC)的簇圈重叠,表明其肠道菌群与健康小鼠相似(图 2-B)。此外,分析了门和属水平上前 10 个最丰富的物种,以比较物种的相对丰度及其比例。在门水平上,在结肠炎小鼠中观察到厚壁菌的收缩以及疣状微生物和含有致病菌的变形杆菌的扩张。相比之下,肠道微生物在用 *B. fragilis* 治疗的小鼠中表现出恢复正常的趋势(图 2-E)。在属水平上,还发现 DSS 结肠炎的主要微生物群从厚壁菌、乳杆菌转变为链球菌,而 *B. fragilis* 治疗后链球菌显著减少(图 2-F)。此外,代谢物的分析表明,使用 *B. fragilis* 增加了 SCFAs 的产生,包括乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸

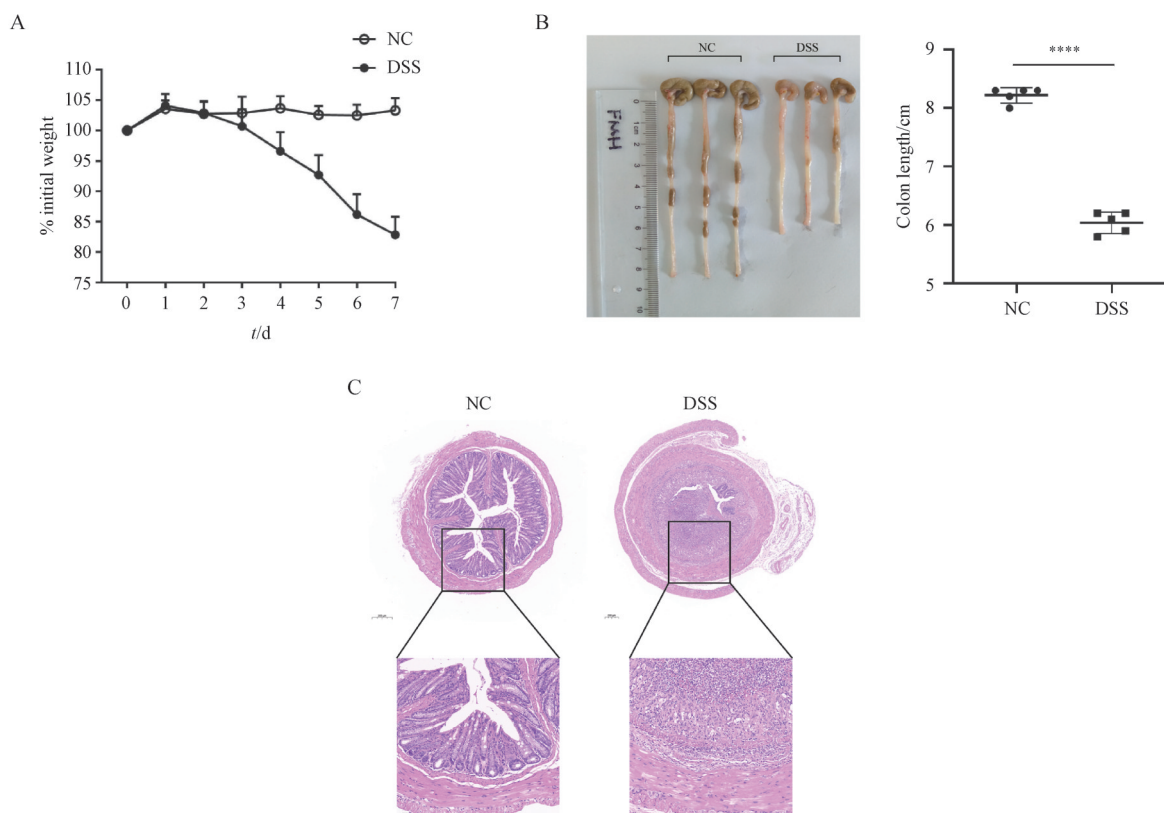


Figure 1 Establishment of mouse colitis model

A, B: Body weight change (A) and colon length (B) of untreated (NC) and DSS-treated mice. C: H&E staining of colons; Scalebar 500 μm (above) and 50 μm (below)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs NC group, $n=5$ per group

和异戊酸(图3)。以上实验结果表明,*B. fragilis*可以有效改善结肠炎引起的肠道菌群失衡,增加SCFAs的产生,从而维持肠道菌群的稳态。

3.2 *B. fragilis*通过增加Treg细胞增强肠道调节免疫力

已知肠道菌群与肠道免疫密切相关,接下来,旨在探讨*B. fragilis*治疗对肠道免疫的影响,推测结肠炎小鼠的*B. fragilis*治疗可能会诱导结肠免疫细胞表达和功能的变化。有关报道显示,产生IL-10的Treg细胞在维持肠道免疫平衡方面发挥了关键作用。因此,尝试探究*B. fragilis*如何影响Treg细胞的发展。

首先,*B. fragilis*处理的小鼠表现出肠道炎症减轻,如体重回升(图4-A)和结肠长度增加(图4-B)。H&E染色和组织学评分的结果也表明,用*B. fragilis*治疗的小鼠结肠炎得到有效缓解(图4-C)。更重要的是,使用流式细胞术检测结肠中Treg的表达,发现Treg的比例显著增加(图4-D)。同时,

IL-10的表达也显著上调(图4-E)。

此外,肠黏膜屏障的功能与肠道免疫密切相关。细胞间紧密连接是肠道屏障中最重要的组成部分,其中紧密连接蛋白ZO-1起着至关重要的作用。为了评估*B. fragilis*是否对肠道屏障产生保护作用,通过免疫荧光检测小鼠结肠中ZO-1的表达。正如预期的那样,当结肠炎小鼠使用*B. fragilis*治疗时,ZO-1表达水平明显升高,表明该治疗可以增强肠黏膜屏障功能(图4-F)。这些发现表明,*B. fragilis*可以增强肠道调节免疫力并有效缓解肠道炎症。

3.3 *B. fragilis*通过TGF- β /Smad3途径诱导Treg缓解结肠炎

进一步探讨*B. fragilis*调节肠道免疫的机制。由已有研究知道,初始CD4⁺T细胞在不同条件下可以被诱导分化成不同的T细胞亚群,包括具有免疫抑制作用的效应T细胞Th1、Th2、Th17和Treg。据报道TGF- β 信号通路在CD4⁺T分化为Treg中起

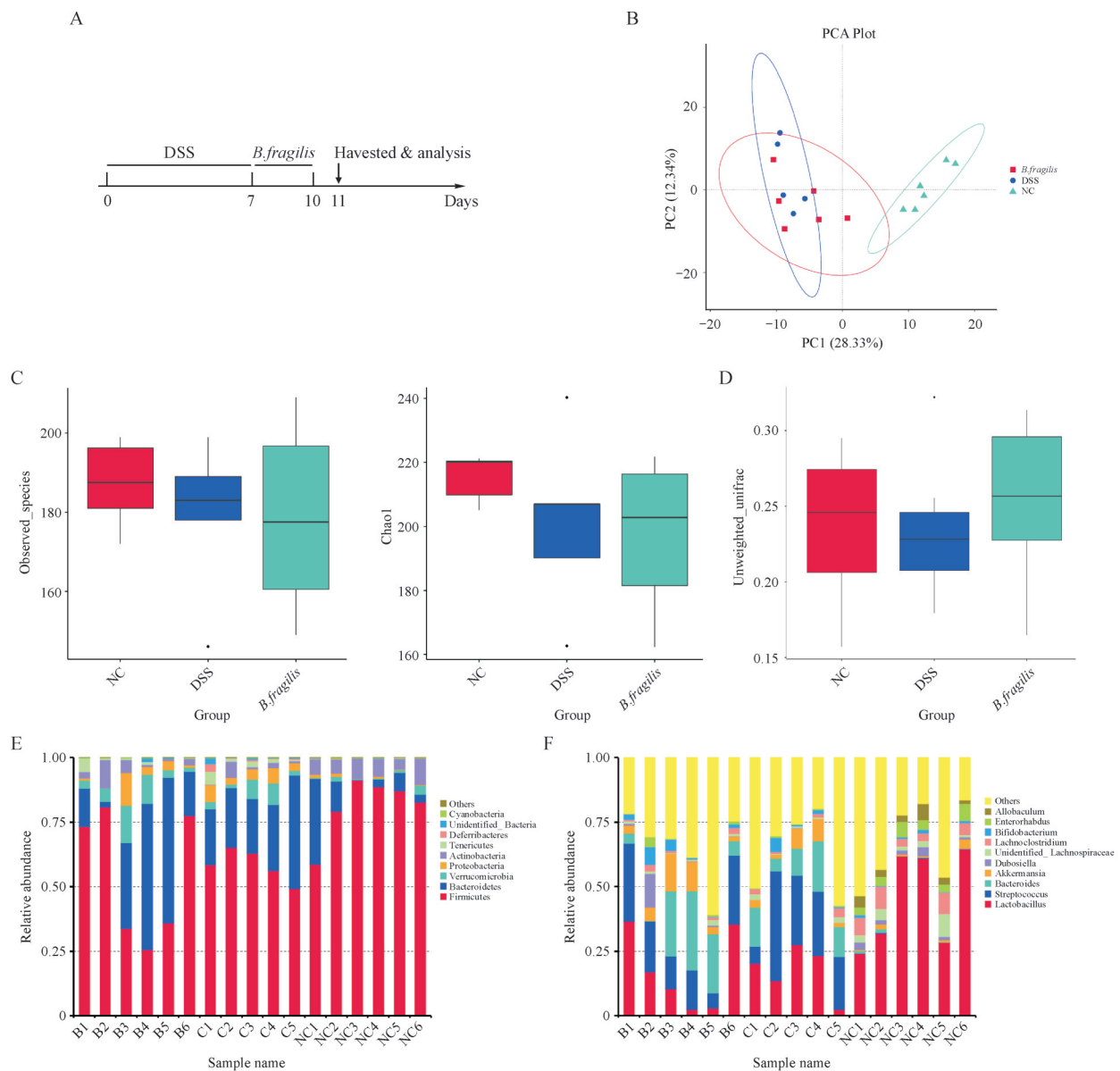


Figure 2 *B. fragilis* treatment alters intestinal flora

A: Scheme of *B. fragilis* treatment in experimental colitis; B: Principal Coordinate Analysis (PCA) of gut microbiota in DSS, DSS+*B. fragilis* and NC mice; C: The alpha diversity analysis of intestinal flora, shown as observed species and Chao 1; *B. fragilis* group (DSS+*B. fragilis* group); D: Beta diversity analysis of intestinal flora; E, F: Relative abundance of the top 10 most abundant species at the phylum (E) and genus (F) level in NC, DSS (C1-5) and DSS+*B. fragilis* (B1-6) treated mice. Each bar represents a sample (NC $n=6$, DSS $n=5$, DSS+*B. fragilis* $n=6$)

重要作用, Smad3 是 TGF- β /Smad 信号通路中的关键信号分子^[20]。Foxp3 作为 Treg 细胞的特异性标志物, 其基因的表达受到磷酸化 Smad3 的直接调控^[22]。因此, 进一步探讨了 TGF- β /Smad3 信号通路在 *B. fragilis* 增强结肠中 Treg 细胞表达和缓解结肠炎过程中的调控机制。

本研究通过对小鼠尾静脉注射针对 Smad3 的 siRNA, 对其基因表达进行干扰, 构建了 Smad3 敲低

小鼠, 并在此基础上进行了实验。用磁珠分离脾脏初始 CD4⁺ T 细胞, 当分选率达到 90% 以上时, 进行体外细胞转染实验(图 5-A)。在 CD4⁺ T 细胞中通过转染 siRNA, 筛选获得可有效敲低 Smad3 表达的 siRNA 序列后(图 5-B), 在小鼠体内静脉注射脂质体修饰的 siRNA。设置 NC 组、*B. fragilis* 组、siSmad3+*B. fragilis* 组和 siSmad3+NC 组。根据 Western blot 结果显示, 与 *B. fragilis* 组相比, siSmad3+*B. fragilis* 组

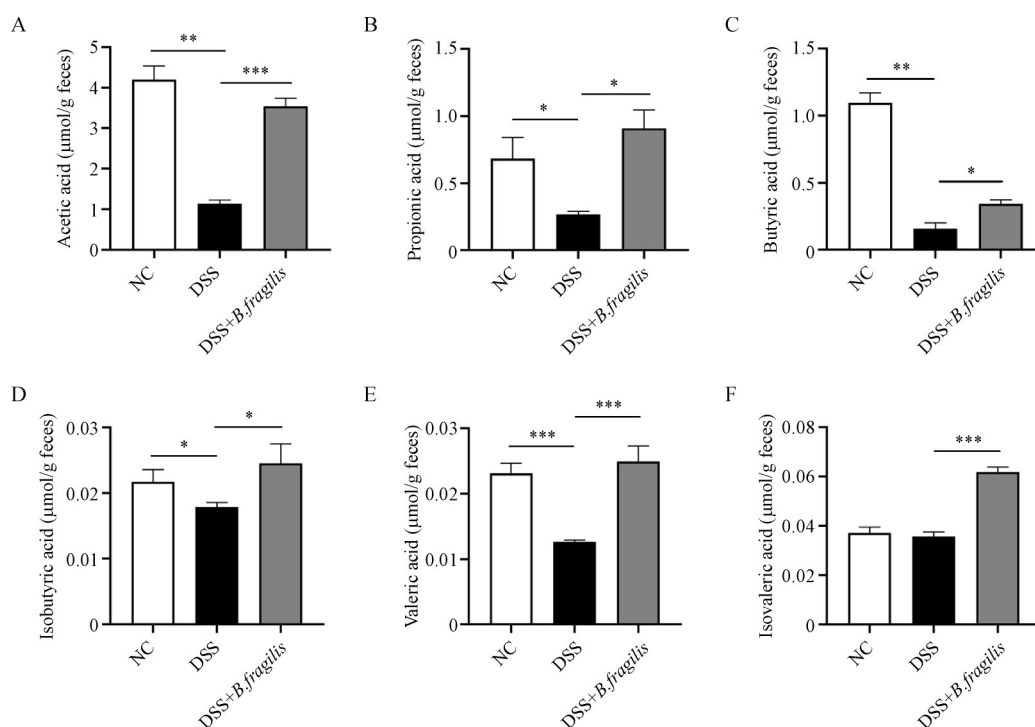


Figure 3 *B. fragilis* treatment alters SCFAs production ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

A–F: Production of acetic acid, propionic acid, butyric acid, isobutyric acid, valeric acid and isovaleric acid

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

p-Smad3 表达明显下调, siSmad3+NC 组的表达也比 NC 组降低。尽管如此, *B. fragilis* 处理的小鼠表现出 p-Smad3 表达的增加。此外, 在 *B. fragilis* 治疗组中观察到结肠 Treg 的比例显著升高, 当 Smad3 被敲低时 Treg 比例降低(图 5-D)。结肠 H&E 染色的结果还表明, Smad3 敲低后给予小鼠 *B. fragilis* 治疗不能有效的减轻小鼠结肠炎(图 5-E)。

这些数据表明, Smad3 敲低可以抑制 *B. fragilis* 在增加肠道 Treg 和缓解肠道炎症中的作用。综上所述, *B. fragilis* 通过 TGF- β /Smad3 信号通路在肠道免疫调节中发挥作用, 从而调节肠道免疫平衡。

3.4 *B. fragilis* 通过增加肠道 ROS 激活 TGF- β

之前的研究表明, 在 *B. fragilis* 治疗后, 肠道 Treg 显著增加, 并且 Treg 的分化受到 TGF- β /Smad3 的调节。据报道, ROS 是激活 TGF- β 的因素之一。因此, 可怀疑在结肠炎小鼠中的 *B. fragilis* 治疗可能对 ROS 的表达产生影响, 从而导致 TGF- β 的激活。

为了验证假设, 本研究构建了小鼠结肠炎模型, 并如前所述给予 *B. fragilis* 治疗。正如预期的

那样, 在结肠炎小鼠接受治疗后, 在结肠中观察到更高水平的 ROS(图 6-A)和 TGF- β (图 6-B)表达, 这表明 ROS 在 TGF- β 激活中起重要作用。以上结果表明, *B. fragilis* 可通过增加肠道 ROS 的产生来激活 TGF- β , 从而诱导 Treg 分化并增强肠道调节免疫。

综上所述, 给予 *B. fragilis* 可以改善结肠炎引起的肠道菌群失衡, 增加 SCFAs 的产生。此外, *B. fragilis* 能够增加肠道中的 ROS, 激活 TGF- β , 进而通过 TGF- β /Smad3 信号通路诱导肠道 Treg 细胞分化, 增强肠道调节免疫, 减少肠道炎症(图 7), 这为结肠炎的治疗提供了新思路。

4 讨论

炎症性肠病(IBD)是复发性的, 难以治愈的, 其病因和发病机制尚未完全明确, 通常认为是由多种因素(如遗传、免疫和环境)相互作用引起的。对于细菌等原因引起的肠道炎症, 人们经常使用抗生素治疗相当长的时间, 但抗生素引起的菌群紊乱往往带来很多副作用^[23]。肠道菌群已成为炎症性肠病治疗的研究热点。近年来, 粪便菌群移

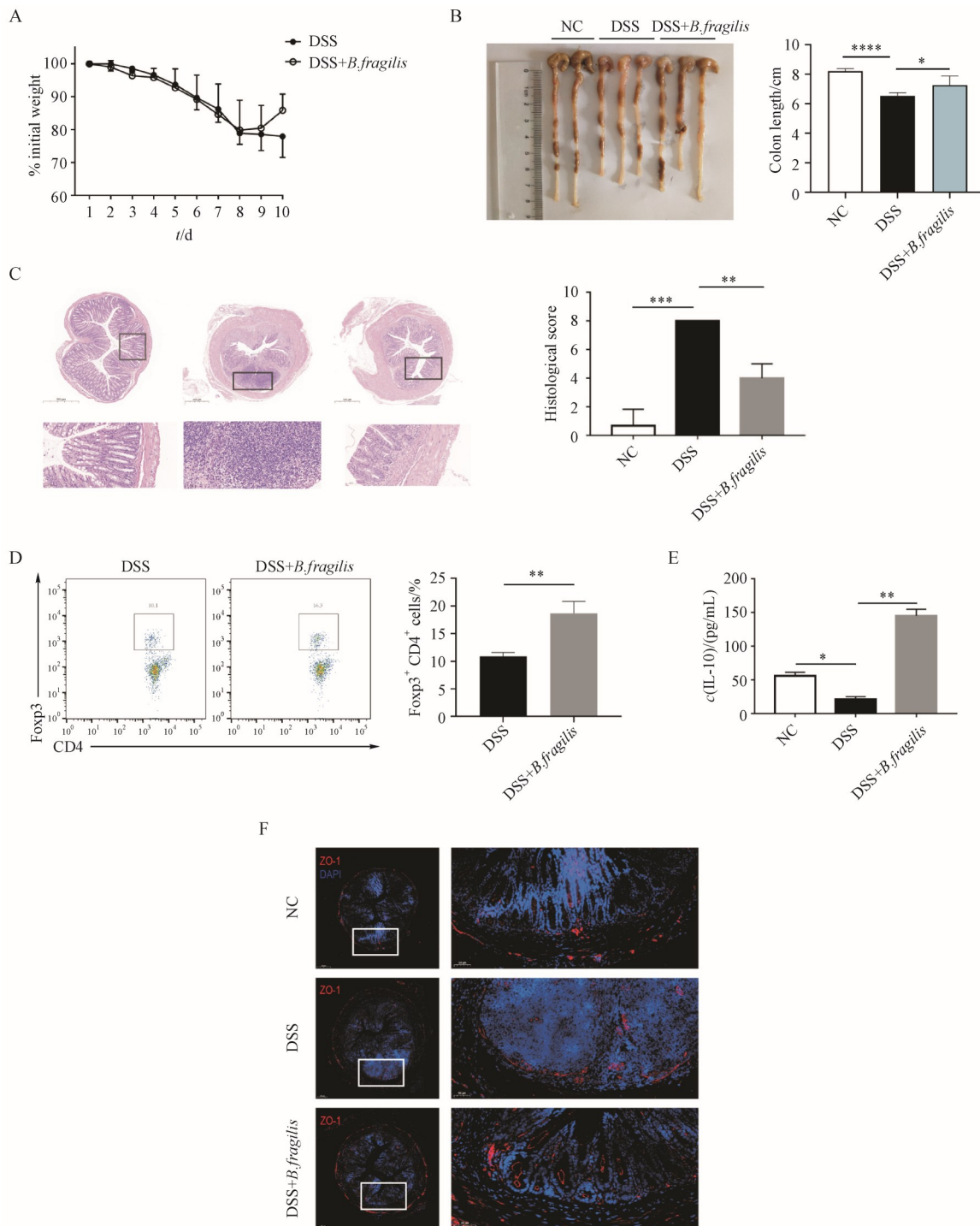


Figure 4 *B. fragilis* enhances intestinal regulatory immunity by expanding Treg

A, B: Body weight (A) and colon length (B) of DSS-treated and DSS+B. *fragilis*-treated mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$); C: H&E staining of colons and histological score, including mucosal injury and inflammatory infiltration ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$); D: Frequency of colonic CD4⁺ Foxp3⁺ Treg in DSS and DSS+B. *fragilis* treated mice by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, ** $P < 0.01$ vs DSS group); E: Flow cytometry analysis of colonic IL-10 expression by Multifactor kit ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs DSS group); F: Expression of ZO-1 in colon detected by immunofluorescence. ZO-1 (red) and nuclei stained with DAPI (blue). Scale bar, 200 μ m (left) and 50 μ m (right), $n = 6$

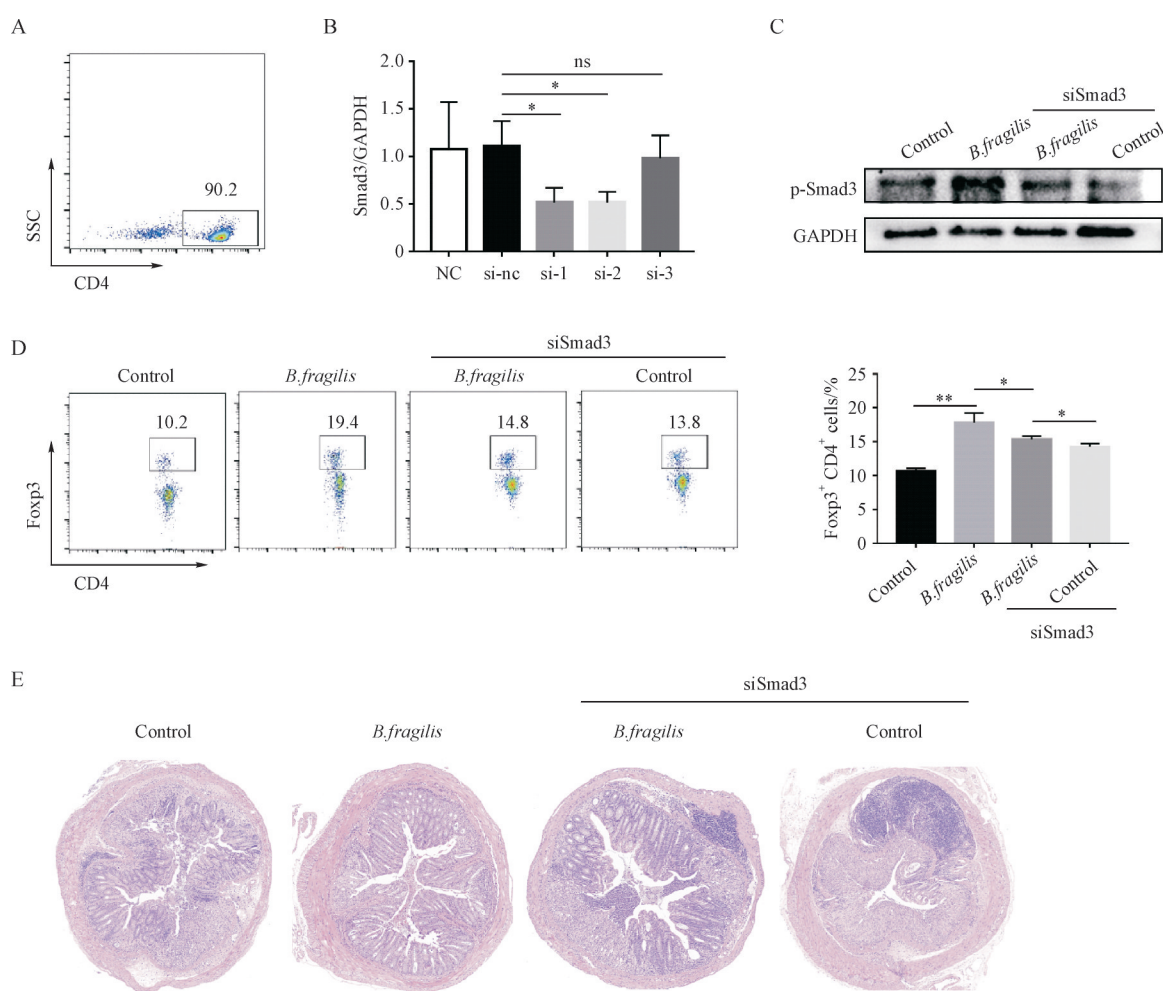


Figure 5 *B. fragilis* induces Treg to reduce colitis through TGF- β /Smad3 pathway

A: Flow cytometry analysis of initial CD4⁺T cells isolated from spleen of WT mice; B: Expression of Smad3 after transfection with siRNA against Smad3 in CD4⁺T cells by qPCR ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, $^*P < 0.05$ vs si-nc group, ns: not significant); C: Western blotting analysis of the expression of p-Smad3 in the colon isolated from DSS, DSS+*B. fragilis* and Smad3 knocked-down treated with or not with *B. fragilis* mice; D: Flow cytometry analysis shows the effect of Smad3 knockdown in the frequency of Treg in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$); E: H&E staining of colons

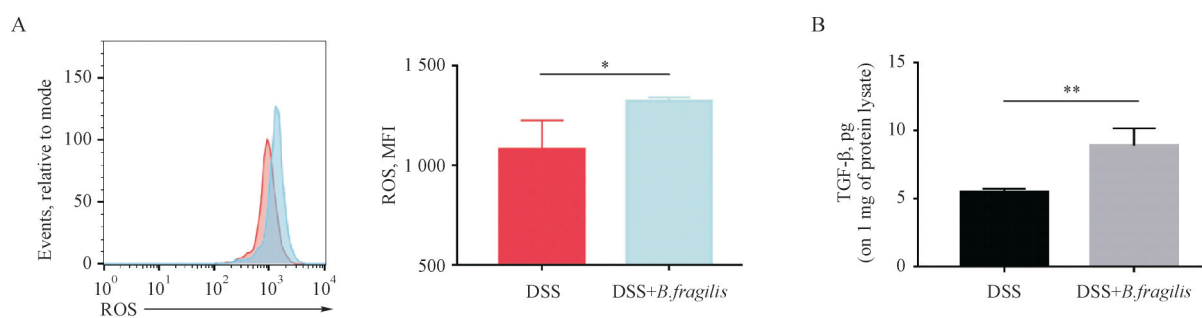


Figure 6 *B. fragilis* activates TGF- β through increased ROS

A: Events and mean fluorescence intensity (MFI) of ROS in colonic CD4⁺T cells of DSS (red boxes) and DSS+*B. fragilis* (green boxes) treated mice by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$, $^*P < 0.05$); B: Expression of TGF- β in colon by ELISA ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$, $^{**}P < 0.01$)

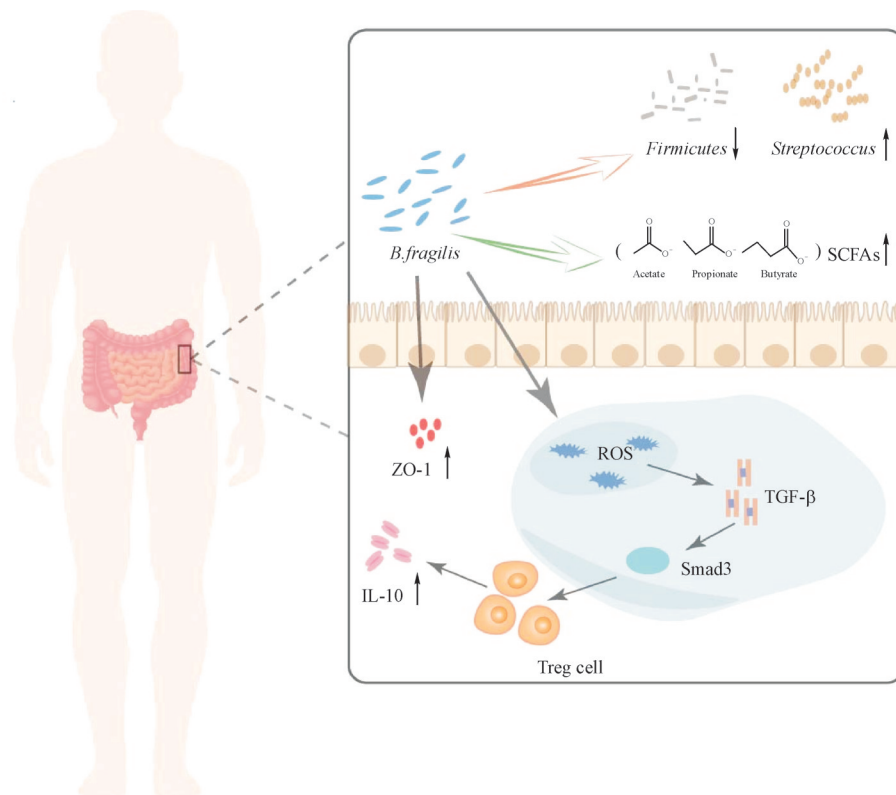


Figure 7 *Bacteroides fragilis* regulates intestinal flora balance and controls intestinal inflammation through promoting Treg differentiation via TGF- β /Smad3 signaling pathway

植(FMT)已被证实可以通过恢复肠道菌群组成,缓解肠道炎症,取得有效的治疗效果,已应用于临床^[24-25]。

将健康小鼠的细菌移植到结肠炎小鼠中,可以促进紊乱的菌群结构向正常菌群的转化,增加肠道T细胞和抗原呈递细胞的表达和功能,促进抗炎细胞因子IL-10的分泌。从而使肠道菌群转化为正常菌群,调节肠道免疫平衡,缓解肠道炎症^[1]。此外,相关益生菌在肠道疾病中的作用已被越来越多的研究证明。尽管一些研究表明,拟杆菌门中的*B. fragilis*可以通过增加Treg的表达来增强肠道免疫耐受性,但其机制仍有待进一步研究^[23]。SCFAs是肠道菌群的代谢产物,也在调节免疫力中发挥作用^[26]。本研究表明,结肠炎小鼠补充*B. fragilis*可以提高其肠道有益菌的多样性和丰度,同时检测到其肠道中SCFAs显著上调;也检测到小鼠结肠中Treg细胞比例和抗炎细胞因子IL-10的表达水平显著上调,同时肠道中紧密连接蛋白ZO-1的表达上调增强了肠黏膜屏障功能。在机制方面,本研究发现*B. fragilis*可以上调肠道中的ROS,

结肠中TGF- β 被激活,其重要的信号传导分子Smad3磷酸化显著上调,以上实验结果为解释*B. fragilis*上调结肠中Treg细胞比例提供了合理的思路。

之前的相关报道称SCFAs通过调节免疫细胞趋化性,ROS释放和细胞因子释放发挥抗炎功能^[27]。研究表明,SCFAs可以调节肠道Treg细胞的数量和功能,并发挥抗炎作用^[26]。丁酸盐通过抑制人单核细胞IL-12的产生^[28]和上调IL-10的产生^[29-30]来发挥抗炎作用。SCFAs可以抑制巨噬细胞和中性粒细胞中促炎细胞因子的释放。乙酸盐通过激活GPR43促进小鼠中性粒细胞的ROS释放^[31]。临床研究证明,丁酸盐在炎症部位具有直接的抗炎作用^[32]。丁酸盐与多种人肿瘤细胞系中的抗癌活性有关,人结肠癌细胞上GPR109A的激活与细胞凋亡有关,通过诱导细胞凋亡直接抑制结肠癌发展。它还可能通过增加MCT-1表达并随后增加丁酸盐转移到细胞中来间接起作用。丁酸盐转运蛋白SMCT-1在结肠癌细胞中下调,表明其表达对结肠癌细胞的抗肿瘤功能至关重要^[33]。本

研究表明, *B. fragilis* 可有效改善结肠炎引起的肠道菌群失衡, 增加 SCFAs 的产生, 包括醋酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸等, 从而维持肠道菌群稳态。结直肠癌(CRC)发病机制与肠道微生物群结构的变化和 SCFAs 的减少有关^[34]。CRC 细胞对 SCFAs 比正常结肠上皮细胞更敏感, 表明 SCFAs 在细胞稳态中起重要作用。SCFAs 诱导的正常细胞和癌细胞生长之间的代谢差异可用于抑制 CRC 中的肿瘤生长。因此, 靶向调节 SCFAs 的产生, 调节细菌生态学, 激活有效的抗癌作用可能是 CRC 未来的有效治疗方法。

在本研究中, 讨论了 *B. fragilis* 在改变肠道菌群以增强肠道调节免疫的作用。对机制进行了初步探索, 为进一步研究 *B. fragilis* 治疗与炎症性肠病的关系提供了理论和实验基础。然而, 肠道菌群是否可能通过其他免疫细胞或免疫途径调节机体的免疫力及其机制仍需进一步研究。

References

- [1] Burrello C, Garavaglia F, Cribiù FM, *et al.* Therapeutic faecal microbiota transplantation controls intestinal inflammation through IL10 secretion by immune cells[J]. *Nat Commun*, 2018, **9**(1): 5184.
- [2] Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, **4**(6): 478-485.
- [3] Liu W, Tan ZL, Xue JF, *et al.* Therapeutic efficacy of oral immunization with a non-genetically modified *Lactococcus lactis*-based vaccine CUE-GEM induces local immunity against *Helicobacter pylori* infection[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, **100**(14): 6219-6229.
- [4] Zeng ZQ, Liu W, Luo SH, *et al.* Shape of gastrointestinal immunity with non-genetically modified *Lactococcus lactis* particles requires commensal bacteria and myeloid cells-derived TGF- β 1[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, **103**(9): 3847-3861.
- [5] Wexler HM. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, **20**(4): 593-621.
- [6] McHardy IH, Goudarzi M, Tong MM, *et al.* Integrative analysis of the microbiome and metabolome of the human intestinal mucosal surface reveals exquisite inter-relationships[J]. *Microbiome*, 2013, **1**(1): 17.
- [7] Spiljar M, Merkler D, Trajkovski M. The immune system bridges the gut microbiota with systemic energy homeostasis: focus on TLRs, mucosal barrier, and SCFAs[J]. *Front Immunol*, 2017, **8**: 1353.
- [8] Corrêa-Oliveira R, Fachi JL, Vieira A, *et al.* Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids[J]. *Clin Transl Immunology*, 2016, **5**(4): e73.
- [9] Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease[J]. *Nature*, 2008, **453**(7195): 620-625.
- [10] Lee YP, Huang WC, Lin TJ, *et al.* Toll-like receptor 4 prevents AOM/DSS-induced colitis-associated colorectal cancer in *Bacteroides fragilis* gnotobiotic mice[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2021, **40**(4): 622-633.
- [11] Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, *et al.* Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces[J]. *Immunity*, 2008, **28**(4): 546-558.
- [12] Cruz-Bermúdez A, Laza-Briviesca R, Vicente-Blanco RJ, *et al.* Cancer-associated fibroblasts modify lung cancer metabolism involving ROS and TGF- β signaling[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, **130**: 163-173.
- [13] Qi YY, Du XH, Yao XY, *et al.* Vildagliptin inhibits high free fatty acid (FFA)-induced NLRP3 inflammasome activation in endothelial cells[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, **47**(1): 1067-1074.
- [14] Nishita M, Hashimoto MK, Ogata S, *et al.* Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer[J]. *Nature*, 2000, **403**(6771): 781-785.
- [15] Radtke F, Clevers H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin[J]. *Science*, 2005, **307**(5717): 1904-1909.
- [16] Kashiwagi I, Morita R, Schichita T, *et al.* Smad2 and Smad3 inversely regulate TGF- β autoinduction in *Clostridium butyricum*-activated dendritic cells[J]. *Immunity*, 2015, **43**(1): 65-79.
- [17] Torchinsky MB, Garaude J, Martin AP, *et al.* Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)₁₇ cell differentiation[J]. *Nature*, 2009, **458**(7234): 78-82.
- [18] Ihara S, Hirata Y, Koike K. TGF- β in inflammatory bowel disease: a key regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota[J]. *J Gastroenterol*, 2017, **52**(7): 777-787.
- [19] Biancheri P, Di Sabatino A, Corazza GR, *et al.* Proteases and the gut barrier[J]. *Cell Tissue Res*, 2013, **351**(2): 269-280.
- [20] Yang L, Pang YL, Moses HL. TGF- β and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression[J]. *Trends Immunol*, 2010, **31**(6): 220-227.
- [21] Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, *et al.* The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, **10**(8): 554-567.
- [22] Jana S, Jailwala P, Haribhai D, *et al.* The role of NF- κ B and Smad3 in TGF- β -mediated Foxp3 expression[J]. *Eur J Immunol*, 2009, **39**(9): 2571-2583.
- [23] Knoop KA, McDonald KG, Kulkarni DH, *et al.* Antibiotics promote inflammation through the translocation of native commensal colonic bacteria[J]. *Gut*, 2016, **65**(7): 1100-1109.
- [24] Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, *et al.* European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice

- [J]. *Gut*, 2017, **66**(4): 569-580.
- [25] van Nood E, Vireze A, Nieuwdorp M, *et al.* Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*[J]. *N Engl J Med*, 2013, **368**(5): 407-415.
- [26] Smith PM, Howitt MR, Panikov N, *et al.* The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis[J]. *Science*, 2013, **341**(6145): 569-573.
- [27] Sun MM, Wu W, Liu ZJ, *et al.* Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases[J]. *J Gastroenterol*, 2017, **52**(1): 1-8.
- [28] Millard AL, Mertes PM, Ittelet D, *et al.* Butyrate affects differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells and macrophages[J]. *Clin Exp Immunol*, 2002, **130**(2): 245-255.
- [29] Kim DS, Woo JS, Min HK, *et al.* Short-chain fatty acid butyrate induces IL-10-producing B cells by regulating circadian-clock-related genes to ameliorate Sjögren's syndrome[J]. *J Autoimmun*, 2021, **119**: 102611.
- [30] Rosser EC, Piper CJM, Matei DE, *et al.* Microbiota-derived metabolites suppress arthritis by amplifying aryl-hydrocarbon receptor activation in regulatory B cells[J]. *Cell Metab*, 2020, **4**(31): 837-851.
- [31] Al-Harbi NO, Nadeem A, Ahmad SF, *et al.* Short chain fatty acid, acetate ameliorates sepsis-induced acute kidney injury by inhibition of NADPH oxidase signaling in T cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, **58**: 24-31.
- [32] Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism[J]. *Gut Microbes*, 2016, **7**(3): 189-200.
- [33] Paroder V, Spencer SR, Paroder M, *et al.* Na⁺/monocarboxylate transport (SMCT) protein expression correlates with survival in colon cancer: molecular characterization of SMCT[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**(19): 7270-7275.
- [34] Wang G, Yu Y, Wang YZ, *et al.* Role of SCFAs in gut microbiome and glycolysis for colorectal cancer therapy[J]. *J Cell Physiol*, 2019, **234**(10): 17023-17049.



中國藥科學學報

中国精品科技期刊 中国高校精品科技期刊
中国中文核心期刊 中国科学引文数据库核心期刊

传播医药科技创新研究成果的优秀媒体

药学前沿

提供药学领域的前沿信息 反映最新的药学研究进展

创新成果

展示医药科技最新成果 构建学术交流的平台

研究论文

科学研究原创论文 国家重大药学研究基金产出论文

邮发代号: 28-115, 欢迎订阅, 欢迎投稿!