

· 临床研究 ·

长双歧杆菌对克罗恩病患者外周血单核细胞IL-10、IL-12、TGF- β 分泌以及CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞分化的影响

邱新运*,赵小静,毛夏琼,张红杰*

南京医科大学第一附属医院消化内科,江苏 南京 210029

[摘要] **目的:**比较克罗恩病(Crohn's disease, CD)患者与健康人群肠道菌群的丰度,研究长双歧杆菌对CD患者外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞分化以及白细胞介素(interleukin, IL)-10、IL-12和转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 分泌的影响。**方法:**收集19例活动期CD患者和20例健康对照人群的粪便,对16S rRNA片段进行高通量测序。将长双歧杆菌、长双歧杆菌上清、长双歧杆菌培养基或PBS分别与CD患者PBMC体外共培养后,采用流式细胞术检测外周血中CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞比例;用ELISA法检测细胞培养上清液中IL-10、IL-12和TGF- β 浓度。**结果:**CD患者肠道菌群与健康人群有显著差别。门水平上,CD患者组变形菌门含量显著增加,而厚壁菌门和放线菌门含量显著减少;属水平上,CD患者组大肠杆菌-志贺氏菌、链球菌及韦荣氏球菌属含量显著增加,而柔嫩梭菌属、*Gemmiger*、双歧杆菌、瘤胃球菌、罗斯氏菌和*Fusicatenibacter*等菌属的含量显著降低。与培养基和PBS组相比,长双歧杆菌及其上清液均可刺激CD患者PBMC分泌大量抗炎因子IL-10和TGF- β ,而对促炎因子IL-12并没有显著的刺激作用。长双歧杆菌及其上清液组IL-10/IL-12比值及CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞分化比例较培养基组和PBS组明显增高,其中长双歧杆菌上清液组增高最为明显。**结论:**长双歧杆菌及其上清液均显示出抗炎作用,并且能够诱导外周血中CD25⁺Foxp3⁺Treg的分化。长双歧杆菌的代谢产物可能在未来炎症性肠病治疗中起着重要作用。

[关键词] 克罗恩病;长双歧杆菌;外周血单个核细胞;细胞因子;调节T细胞**[中图分类号]** R516.1**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2020)08-1156-07**doi:** 10.7655/NYDXBNS20200813

Effects of *Bifidobacterium longum* on secretion of IL - 10, IL - 12 and TGF - β and differentiation of CD25⁺Foxp3⁺Treg cells in peripheral blood mononuclear cells in patients with Crohn's disease

QIU Xinyun*, ZHAO Xiaojing, MAO Xiaqiong, ZHANG Hongjie*

Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the change of bacterial composition in the gut of Crohn's disease (CD) patients in comparison with the healthy subjects and the effects of *Bifidobacterium longum* (*B. longum*) on differentiation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to CD25⁺Foxp3⁺Treg cells and secretion of interleukin (IL)-10, IL-12, and transforming growth factor (TGF)- β of PBMCs in patients with CD. **Methods:** Fecal samples were obtained from active CD patients ($n=19$) and healthy subjects ($n=20$). Bacterial microbiome was analyzed by high-throughput sequencing of 16S rRNA. PBMCs obtained from CD patients were co-cultured *in vitro* with *B. longum*, *B. longum* supernatant, *B. longum* medium and PBS. The proportion of CD25⁺Foxp3⁺Treg cells in the peripheral blood was determined by flow cytometry. Concentrations of IL-10, IL-12 and TGF- β in culture supernatant were measured by ELISA. **Results:** We observed that bacterial microbiota was skewed in CD, with an increased proportion of *Proteobacteria* and a decreased proportion of *Firmicutes* and *Actinobacteria* at the phylum level, and an increased proportion of *Escherichia Shigella*, *Streptococcus*, and *Veillonella*, while a decreased proportion of *Faecalibacterium*, *Gemmiger*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Roseburia* and *Fusicatenibacter* at the genus level. Compared with *B. longum* medium and PBS, *B. longum* and *B. longum* supernatant showed a

[基金项目] 国家自然科学基金(81600416,81470827);江苏省自然科学基金(BK20161065)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: qiuxinyun2819@126.com; hjzhang06@163.com

significant higher induction capacity of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and TGF- β , while did not remarkably elicit the production of pro-inflammatory cytokine IL-12. The *B. longum* supernatant induced the highest IL-10/IL-12 ratio and the frequency of peripheral blood CD25⁺Foxp3⁺Treg cells in PBMCs, followed by the *B. longum*. **Conclusion:** Both *B. longum* and *B. longum* supernatant display anti-inflammatory capacities and properties to induce the peripheral blood CD25⁺Foxp3⁺Treg cells differentiation. The metabolite of *B. longum* shows a promising role in treating the inflammatory bowel disease.

[Key words] Crohn's disease; *Bifidobacterium longum*; peripheral blood mononuclear cells; cytokines; regulatory T cell

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(08): 1156-1162]

人体肠道中定植着1 000种以上的细菌,总量最高可达 10^{14} 个菌落形成单位(colony forming unit, CFU)。其中,肠道中的细菌既包括益生菌,又包括致病菌,彼此间形成一种动态的生态平衡,维系着人类的健康。当人体肠道菌群微生态被打破时,常常导致人体疾病的发生。炎症性肠病是一类以肠道慢性炎症为主要表现、反复发作的肠道自身免疫性疾病,主要包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)。目前认为该病的发生与肠道微生态环境紊乱密切相关,在炎症性肠病治疗过程中,微生物制剂有着重要作用,而益生菌制剂则有助于促进和维持疾病的缓解^[1-2]。

双歧杆菌(*Bifidobacterium*)是人体肠道中数量众多的一种有益菌,其最早在母乳喂养的婴儿粪便中被发现,因其末端常常分叉,故名双歧杆菌。目前研究发现,双歧杆菌具有免疫调节、上皮黏附和增强肠屏障功能等许多临床相关的特性^[3]。在研究中发现,活动期CD患者粪便中双歧杆菌数量明显低于正常人,提示双歧杆菌在肠道炎症的发生中具有保护作用,但具体作用机制尚不清楚。由于长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)是人体内含量最多的双歧杆菌,且已被证实可以改善肠道炎症^[4]。因此,本研究以长双歧杆菌为例,在体外实验中刺激外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)分泌细胞因子的变化以及对调节性T细胞(regulatory T cell, Treg)分化的影响,旨在了解双歧杆菌的抗炎机制及其在机体免疫功能调节中可能发挥的作用。

1 对象和方法

1.1 对象

收集2018年6—12月南京医科大学第一附属医院确诊为活动期CD(按照2018年我国炎症性肠病诊断与治疗的共识意见确诊为CD的患者^[5];且根据蒙特利尔分型,CD活动指数评分 ≥ 150 分)患者19例,其中男9例,女10例,年龄(30.4 ± 10.8)岁

(19~45岁);健康志愿者20例,其中,男10例,女10例,年龄(28.2 ± 6.3)岁(21~45岁);两组性别及年龄均无统计学差异。所有入组人员遵循自愿原则并签署知情同意书;在入组前8周内未服用益生菌、益生元、抗生素或抗真菌药等药物;所有受试者均无代谢疾病或胃肠病史,无手术史;非孕期或哺乳期。本研究经本院伦理委员会审核批准。

FastDNA[®]粪便SPIN试剂盒(MP Biomedicals公司,美国);RPMI1640培养基、新生胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青链霉素(Gibco公司,美国);淋巴细胞分离液(深圳达科为公司);流式细胞仪(BD Biosciences公司,美国);酶联免疫检测仪(ELx800, Bio-Tek公司,美国);HotStarTaq[®]DNA聚合酶和Qiaquick凝胶提取试剂盒(Qiagen公司,德国);人白细胞介素(interleukin, IL)-10、IL-12和转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β ELISA试剂盒,抗人CD28抗体、CD3抗体和重组人IL-2,调节T细胞检测试剂盒(eBioscience公司,美国);长双歧杆菌菌株由上海信谊公司提供。

1.2 方法

1.2.1 粪便DNA的收集、建库及16S rRNA高通量测序

收集健康志愿者及CD患者新鲜粪便,在液氮中冷冻,并储存在 -80 ℃直至进一步处理。粪便样本中DNA的提取使用FastDNA[®]粪便SPIN试剂盒,并按照说明书操作步骤进行。按照既往文献中的方法对16S rDNA片段进行扩增建库,具体步骤为:将DNA模板(100 ng)与5 μ L PCR缓冲液,1 μ L dNTP组合,0.25 μ L HotStarTaq[®]DNA聚合酶,每种引物量2.5 pmol,总体积为50 μ L。反应包括在95℃下进行5 min的预热步骤;94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 60 s, 25个循环;最后在72℃下延伸10 min。cDNA产物通过1.5%(w/v)琼脂糖凝胶电泳在0.5 mg/mL溴化乙锭中聚集并用Qiaquick凝胶提取试剂盒纯化,在Illumina GAIIx平台上进行测序。最后使用R

软件,根据美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) 16S 数据库(<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)进行分析。筛选出在50%及以上样品中含有且丰度>1%的门和属,对健康志愿者和活动期CD患者粪便中细菌在门和属水平进行比较。不同组中粪便菌群丰度用Chao1和ACE指数衡量;菌群多样性用Shannon和Simpson指数衡量;并用主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)来反映两组粪便菌群的聚类情况。

1.2.2 长双歧杆菌的培养

将菌株加入长双歧杆菌培养基,于37℃在厌氧培养箱中培养至细菌对数生长末期。培养基具体配置原料有:酵母膏(10 g/L)、盐酸半胱氨酸(0.5 g/L)、胰酪胨(20 g/L)、葡萄糖(10 g/L)、VPI溶液(磷酸氢二钾1 g、磷酸二氢钾1 g、氯化钙0.2 g和七水硫酸镁0.2 g,加入水配制成1 L溶液),每升培养基中加入40 mL VPI溶液。

1.2.3 长双歧杆菌及其上清液的收集

先将培养至对数生长末期的长双歧杆菌培养液3 000 g离心20 min,收集上清液,用滤菌筛过滤后-80℃冻存;离心后的菌体用PBS洗涤,3 000 g离心20 min×3次,用PBS(含20%的甘油)调整细菌密度至 1×10^9 CFU/mL,分装后-80℃保存。

1.2.4 PBMC的分离

签署知情同意后,从肘静脉抽取14例CD患者外周血10 mL,用肝素抗凝后,10 mL PBS等比例稀释,将稀释的外周血加入装有4 mL淋巴细胞分离液的无菌试管中,密度梯度进行离心(386 g离心20 min)。收集PBMC后,用PBS清洗2遍,用RPMI 1640培养基(含100 μg/mL链霉素、青霉素和10%胎牛血清)重悬并调整细胞密度至 2×10^6 /mL。

1.2.5 ELISA法检测细胞培养上清IL-10、IL-12和TGF-β浓度

先取CD患者PBMC接种于24孔板(每孔 1×10^6 个细胞),每孔分别加入20 μL长双歧杆菌(含 2×10^7 CFU)、长双歧杆菌培养上清液、长双歧杆菌培养基及PBS(含20%甘油)。培养24 h后离心收集上清,-80℃保存。采用IL-10、IL-12和TGF-β ELISA试剂盒分别检测细胞因子浓度。

1.2.6 流式细胞术检测CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞比例

将抗人CD28抗体(终浓度为2 μg/mL)和CD3抗体(终浓度为1 μg/mL)4℃包被24孔板过夜后,加入CD患者分离的PBMC(每孔1 mL,含 1×10^6 个细胞)。并于每个细胞培养基中加入重组人IL-2(终浓

度为40 U/mL)刺激细胞增殖。然后在每个培养孔中分别加入20 μL长双歧杆菌(均含 1×10^7 CFU/mL)、长双歧杆菌上清、长双歧杆菌培养基培养或PBS(含有20%甘油)后,共培养168 h。再收集共培养后的PBMC,加入抗人CD25-APC和抗人CD4-FITC混合物20 μL,4℃孵育30 min;清洗掉未结合的抗体后,加入破膜固定剂孵育1 h;继续清洗掉破膜固定剂后,加入抗人Foxp3-PE 20 μL或大鼠IgG2A-PE同型对照20 μL孵育45 min;洗去未结合抗体,加入PBS溶液300 μL重悬。上流式细胞仪检测CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞比例。

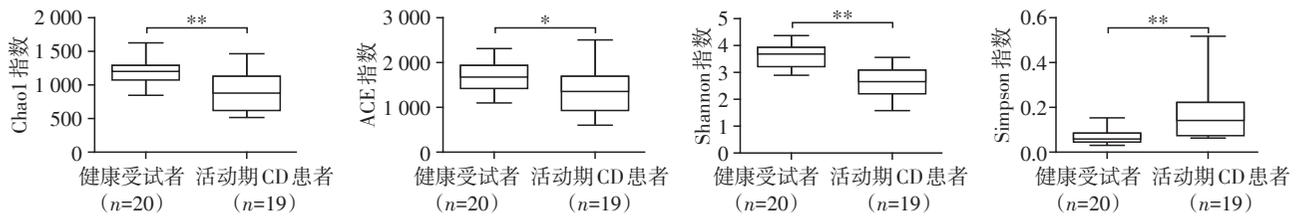
1.3 统计学方法

应用SPSS22.0统计软件,实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,粪便细菌丰度比较用非参数检验,细胞因子水平和CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞比例组间均数的比较用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD患者及健康志愿者粪便中双歧杆菌数量的比较

高通量测序结果显示,与健康受试者相比,活动期CD患者粪便菌群Chao1和Shannon指数显著降低;Simpson指数显著增高(图1)。PCoA显示,两组人群粪便菌群有不同的聚类(图2)。厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)为人体内粪便中4种最主要的菌门,其总和占据人体肠道菌群总量的97%以上(图3A)。与健康人群相比,CD患者粪便中变形菌门含量显著增加,而厚壁菌门和放线菌门含量显著减少(图3B)。此外,从两组人群一共筛选出18个在50%及以上样品中含有且丰度>1%的属,分别为:*Blautia*、大肠杆菌-志贺氏菌(*Escherichia Shigella*)、链球菌(*Streptococcus*)、毛螺菌(*Lachnospiracea_incertae_sedis*)、柔嫩梭菌(*Faecalibacterium*)、*Gemmiger*、双歧杆菌(*Bifidobacterium*)、*Dorea*、拟杆菌(*Bacteroides*)、*Romboutsia*、梭状杆菌(*Clostridium*)、瘤胃球菌(*Ruminococcus*)、罗斯氏菌(*Roseburia*)、*Anaerostipes*、肠球菌(*Enterococcus*)、*Fusicatenibacter*、克雷白杆菌(*Klebsiella*)和韦荣氏球菌(*Veillonella*)。其中,大肠杆菌-志贺氏菌、链球菌、肠球菌及韦荣氏球菌属在CD组患者粪便中明显升高;柔嫩梭菌、*Gemmiger*、双歧杆菌、*Romboutsia*、瘤胃球菌、罗斯氏菌和*Fusicatenibacter*在CD患者粪便



两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图1 健康人群和活动期CD患者粪便菌群中Chao1、ACE、Shannon和Simpson指数的比较

Figure 1 Comparison of Chao1, ACE, Shannon and Simpson index in fecal microbial composition of healthy subjects and active CD patients

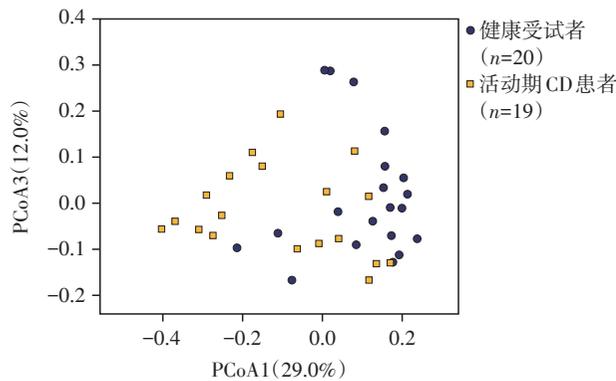


图2 健康受试者和活动期CD患者肠道菌群组成的主坐标分析

Figure 2 PCoA of the composition of intestinal microbiota in healthy subjects and active CD patients

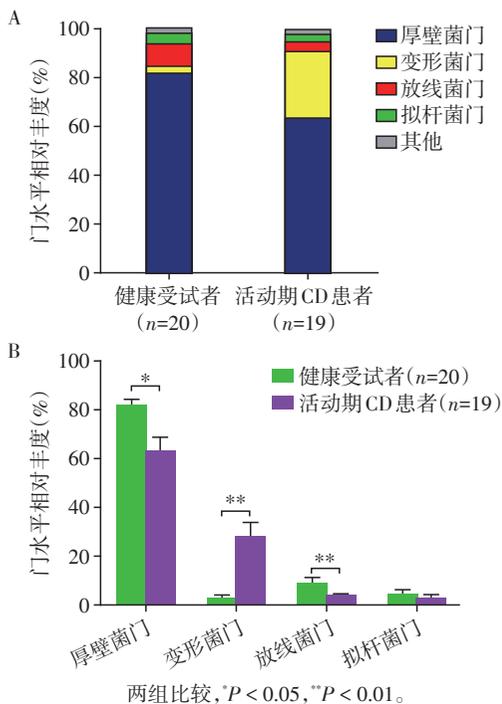


图3 健康受试者和活动期CD患者粪便中细菌在门水平的整体比较(A)及两两比较(B)

Figure 3 Overall (A) and pairwise (B) comparison of bacterial composition at the phylum level in feces of healthy subjects and active CD patients

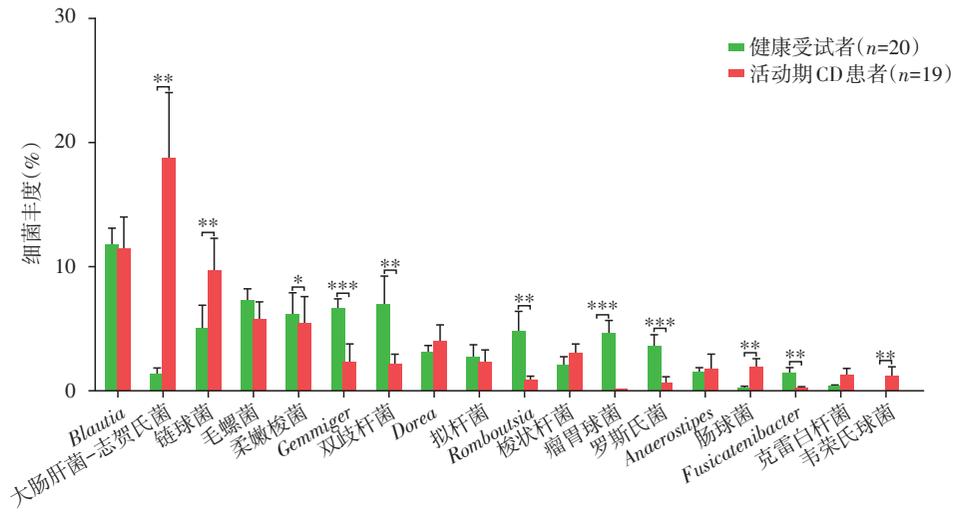
中含量显著降低(图4)。

2.2 共培养后PBMC上清液中IL-10、IL-12和TGF- β 浓度

将长双歧杆菌、长双歧杆菌上清、长双歧杆菌培养基或PBS(含有20%甘油)分别与14例CD患者PBMC共培养24 h后,长双歧杆菌组和长双歧杆菌上清组IL-10浓度分别为(469.51 ± 352.42) pg/mL、(364.0 ± 179.61) pg/mL,较长双歧杆菌培养基组[(4.08 ± 3.79) pg/mL]和PBS组[(1.30 ± 0.54) pg/mL]明显升高($P < 0.001$),长双歧杆菌组和长双歧杆菌上清组之间差异无统计学意义;长双歧杆菌组、长双歧杆菌上清、长双歧杆菌培养基和PBS(含有20%甘油)组IL-12浓度分别为(2.23 ± 2.14) pg/mL、(0.38 ± 0.31) pg/mL、(1.16 ± 0.62) pg/mL和(1.3 ± 0.54) pg/mL,各组之间未见显著统计学差异。IL-10/IL-12比值长双歧杆菌上清组最高,与其余3组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$);此外,长双歧杆菌组IL-10/IL-12比值较长双歧杆菌培养基及PBS组也有统计学差异。长双歧杆菌与长双歧杆菌上清组TGF- β 浓度分别为(347.40 ± 165.17) pg/mL和(647.04 ± 581.11) pg/mL,较长双歧杆菌培养基组[(7.095 ± 39.80) pg/mL]和PBS组[(61.70 ± 21.69) pg/mL]明显升高($P < 0.05$),其中长双歧杆菌上清组TGF- β 浓度较长双歧杆菌组有升高趋势,但无统计学差异($P = 0.65$,图5)。

2.3 共培养后PBMC中CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞比例

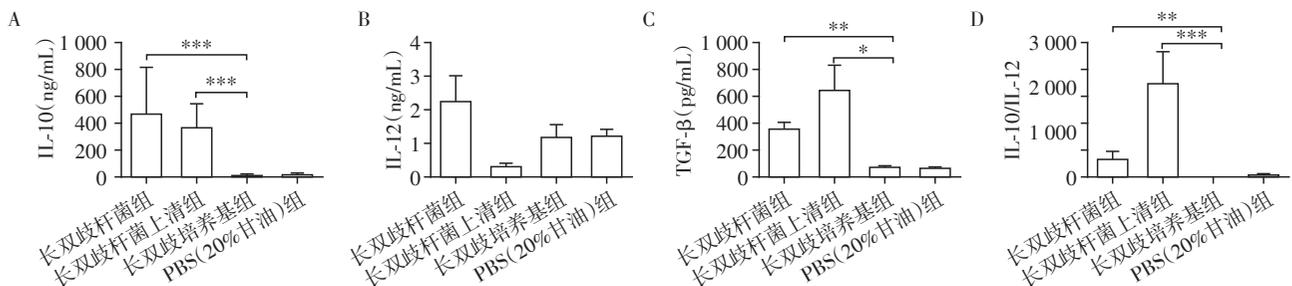
将长双歧杆菌、长双歧杆菌上清、长双歧杆菌培养基或PBS(含有20%甘油)分别与14例CD患者PBMC共培养168 h后,长双歧杆菌上清组CD25⁺Foxp3⁺Treg比例最高(3.04 ± 0.94)%,其次为长双歧杆菌组(2.55 ± 1.12)%,但两者间没有显著统计学差异($P = 0.085$);长双歧杆菌上清和长双歧杆菌组与其余两组[长双歧杆菌培养基(1.16 ± 0.89)%和PBS组(1.06 ± 0.53)%]相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$,图6B)。



两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图4 健康受试者和活动期CD患者粪便中细菌在属水平的比较

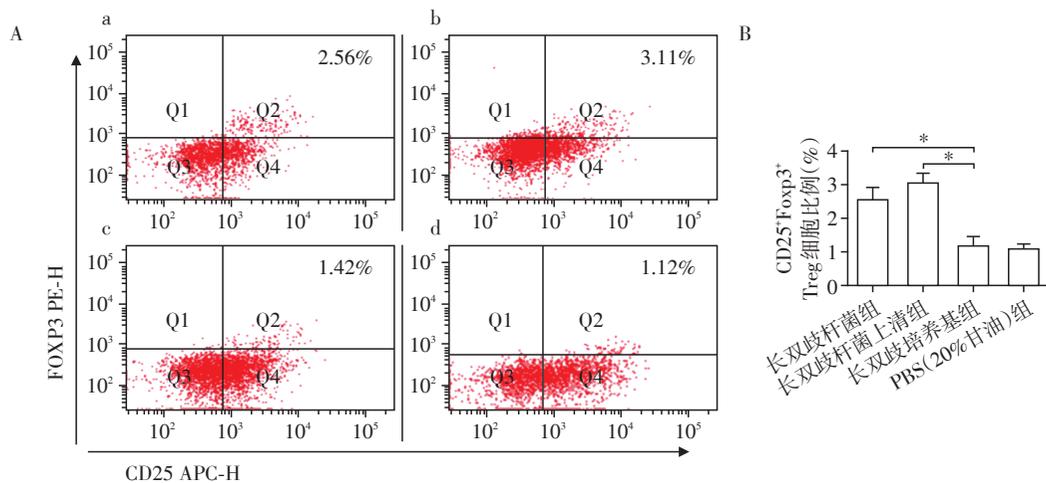
Figure 4 Comparison of bacterial composition at the genus level in feces of healthy subjects and active CD patients



两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=14$)。

图5 长双歧杆菌、长双歧杆菌上清、长双歧杆菌培养基及PBS(含20%甘油)组PBMC上清液中IL-10(A)、IL-12(B)、TGF-β(C)以及IL-10/IL-12比值(D)的比较

Figure 5 The concentration of IL-10(A), IL-12(B), TGF-β(C), as well as the IL-10/IL-12 ratio(D) in PBMCs supernatant of *B. longum*, *B. longum* supernatant, *B. longum* medium, and PBS (containing 20% glycerin) groups



A: 长双歧杆菌(a)、长双歧杆菌上清(b)、长双歧杆菌培养基(c)和PBS(含20%甘油)(d)与CD患者PBMC共培养后, CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞比例情况; B: 各组PBMC中CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞比例定量分析。两组比较, * $P < 0.05$ ($n=14$)。

图6 长双歧杆菌、长双歧杆菌上清、长双歧杆菌培养基及PBS(含20%甘油)组PBMC+中CD25⁺Foxp3⁺Treg细胞比例

Figure 6 Percentages of CD25⁺Foxp3⁺Treg cells in PBMCs in CD patients in *B. longum*, *B. longum* supernatant, *B. longum* medium and PBS(containing 20% glycerin) groups

3 讨 论

CD是一类慢性肠道炎症性疾病,越来越多的文献证实,肠道菌群的紊乱在该病的发生、发展中有重要的作用;而通过补充肠道益生菌、恢复肠道生态平衡有助于改善肠炎。本研究通过比较活动期CD患者与健康受试者粪便中的菌群分布后发现,与后者相比,活动期CD患者粪便菌群Chao1和Shannon指数显著降低,而Simpson指数显著增高,提示CD患者肠道菌群的物种丰富度及多样性均显著低于健康人群。在门水平上的分析显示,与健康人群相比,CD患者粪便中变形菌门的含量显著增加,而厚壁菌门和放线菌门的含量显著减少。在属水平上的分析显示,与健康人群相比,CD患者粪便中大肠杆菌-志贺氏菌、链球菌、肠球菌及韦荣氏球菌属明显升高;柔嫩梭菌、*Gemmiger*、双歧杆菌、*Romboutsia*、瘤胃球菌、罗斯氏菌和*Fusicatenibacter*含量显著降低,提示这些菌属可能与肠道炎症发生有关。既往研究也发现与健康人群相比,炎症性肠病患者肠道中大肠杆菌、瘤胃球菌含量显著升高,而双歧杆菌、柔嫩梭菌、罗斯氏菌含量明显减少^[6],与本研究结果相符。一项研究对CD患者与其健康亲属肠道菌群进行对比后发现,与健康亲属相比,CD患者肠道中戴阿利斯特杆菌属(*Dialister invisus*)、*Clostridium cluster XIVa*、普拉梭菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)、青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)含量显著降低,而活泼瘤胃球菌(*Ruminococcus gnavus*)含量显著增加^[7]。然而,肠道菌群容易受到地域、饮食、年龄和环境因素的影响。因此,CD在不同国家、地域、人群的研究中也会存在差异。然而,多数临床研究都提示双歧杆菌(属于放线菌门)在CD患者肠道中降低,显示出双歧杆菌的变化在不同研究中具有良好的一致性。前人研究已证实双歧杆菌可以改善肠炎,修复肠黏膜屏障及调节肠道动力^[8],然而,目前对于其具体作用机制仍然在进一步的探究中。

本研究显示,长双歧杆菌及其上清液在体外与CD患者PBMC共培养后,均可以刺激后者分泌抗炎因子IL-10和TGF- β ,却并没有显著刺激PBMC中促炎因子IL-12的产生,提示长双歧杆菌不仅可以通过自身,还可以通过分泌的某种物质发挥抗炎作用。前人研究报道体外实验中用益生菌刺激人PBMC分泌,IL-10/IL-12的比值可以间接反映其在动物模型中改善肠道炎症的能力^[9]。本研究中与长

双歧杆菌组相比,长双歧杆菌上清液诱导PBMC产生更高剂量的IL-10及IL-10/IL-12的比值,提示长双歧杆菌的代谢产物在其发挥抗炎作用中可能扮演着更加重要的角色。然而,长双歧杆菌上清液中具体起作用的代谢产物仍有待进一步研究。

Treg是CD4⁺T细胞家族中重要的成员,其在维持对人体自身抗原的免疫应答性和抑制对宿主有害的过度免疫应答中起着不可或缺的作用^[10]。FOXP3是叉头/翼状螺旋转录因子的家族成员,主要在Tregs中表达,在Treg细胞亚群的分化、发育和维持功能中起关键作用。TGF- β 和IL-10既可以是Treg细胞分泌的细胞因子,又可以协同诱导初始CD4⁺T细胞向CD4⁺CD25⁺Treg细胞方向分化,并维持FOXP3表达及其免疫抑制功能。有研究显示,CD患者外周血中Treg含量较正常对照组明显降低,且Treg降低程度与CD严重程度评分呈负相关^[10]。动物研究也显示Treg缺失会导致葡聚糖硫酸钠肠炎小鼠肠道炎症的加重,而通过给肠炎小鼠喂食益生菌,会诱导其外周血及肠系膜淋巴结中Treg表达及IL-10、TGF- β 等抗炎细胞因子的产生,改善肠炎^[11-12]。然而,关于长双歧杆菌及其代谢产物对CD患者外周血中Treg细胞的影响,却鲜有文献报道。本研究显示,长双歧杆菌及其上清液均可以促使CD患者PBMC中Treg细胞的生成及IL-10、TGF- β 等抗炎因子的产生,提示未来的研究不仅要关注益生菌本身,也要关注其代谢产物;筛选出最有益的物质,可以更好地发挥益生菌的“益生”作用。

总之,肠道菌群的变化在肠道炎症的发生、发展中作用重大。本研究通过比较活动期CD患者和健康对照人群粪便中的菌群构成,发现并从体外实验研究了其中一种差异菌——双歧杆菌的抗炎作用机制,对未来的临床疾病诊治具有启示意义。然而,双歧杆菌种类繁多,包括长双歧杆菌、短双歧杆菌、两歧双歧杆菌、动物双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、青春双歧杆菌等多种不同的种属,不同双歧杆菌的作用机制可能不同,产生的代谢产物可能也不完全一样,意味着不同种属的双歧杆菌在体外及体内实验对机体免疫及炎症反应的作用机制也会有差别,提示未来应对不同种属的双歧杆菌,进行体外到体内、基础到临床更深入的研究,有助于揭开双歧杆菌“益生”作用的面纱。

[参考文献]

[1] MATSUOKA K, KOBAYASHI T, UENO F, et al. Evidence-

- based clinical practice guidelines for inflammatory bowel disease[J]. *J Gastroenterol*, 2018, 53(3):305-353
- [2] MATSUOKA K, UEMURA Y, KANAI T, et al. Efficacy of *Bifidobacterium breve* fermented milk in maintaining remission of ulcerative Colitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2018, 63(7):1910-1919
- [3] PICARD C, FIORAMONTI J, FRANCOIS A, et al. *Bifidobacteria* as probiotic agents-physiological effects and clinical benefits [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005, 22(6):495-512
- [4] ZHANG C, YU Z, ZHAO J, et al. Colonization and probiotic function of *Bifidobacterium longum* [J]. *J Funct Foods*, 2019, 53:157-165
- [5] 杨红, 钱家鸣. 2018年炎症性肠病诊断与治疗的共识意见解读[J]. *中华炎症肠病杂志*, 2018, 2(3):145-147
- [6] SARTOR R B, WU G D. Roles for intestinal bacteria, viruses, and fungi in pathogenesis of inflammatory bowel diseases and therapeutic approaches [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(2):327-339
- [7] JOOSSENS M, HUYS G, CNOCKAERT M, et al. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives [J]. *Gut*, 2011, 60(5):631-637
- [8] CHEN X, FU Y, WANG L, et al. *Bifidobacterium longum* and VSL#3[®] amelioration of TNBS-induced colitis associated with reduced HMGB1 and epithelial barrier impairment [J]. *Dev Comp Immunol*, 2019, 92(1):77-86
- [9] QIU X, ZHANG M, YANG X, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating TNBS-induced colitis [J]. *J Crohns Colitis*, 2013, 7(11):e558-e568
- [10] 赵小静, 马晶晶, 朱云娟, 等. 克罗恩病患者外周血 Th17/Treg 细胞比例、血清炎症活动指标改变及其临床意义 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(8):1000-1004
- [11] KWON H K, LEE C G, SO J S, et al. Generation of regulatory dendritic cells and CD4⁺Foxp3⁺ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(5):2159-2164
- [12] 夏菲, 李芳, 张东波, 等. LFA-1 对小鼠 Treg 细胞功能可塑性的影响及其机制探讨 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(12):1543-1547
- [收稿日期] 2019-06-07

(上接第 1139 页)

- [9] BARARIA A, DEY S, GULATI S, et al. Differential methylation landscape of pancreatic ductal adenocarcinoma and its precancerous lesions [J/OL]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2020. DOI: 10.1016/j.hbpd.2020.03.010
- [10] YI J M, GUZZETTA A A, BAILEY V J, et al. Novel methylation biomarker panel for the early detection of pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(23):6544-6555
- [11] DEMIRAG G G, SULLU Y, YUCELI I. Expression of plakophilins (PKP1, PKP2, and PKP3) in breast cancers [J]. *Med Oncol*, 2012, 29(3):1518-1522
- [12] LEE L, WOOLLEY C, STARKEY T, et al. Serum- and glucocorticoid-induced kinase Sgk1 directly promotes the differentiation of colorectal cancer cells and restrains metastasis [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(2):629-640
- [13] ZHU F, DAI S N, XU D L, et al. EFNB2 facilitates cell proliferation, migration, and invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma via the p53/p21 pathway and EMT [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125:109972
- [14] ZHANG Y, ZHANG R, DING X, et al. EFNB2 acts as the target of miR-557 to facilitate cell proliferation, migration and invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma by bioinformatics analysis and verification [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(11):3514-3528
- [15] TIAN M, BAI C, LIN Q, et al. Binding of RhoA by the C2 domain of E3 ligase Smurf1 is essential for Smurf1-regulated RhoA ubiquitination and cell protrusive activity [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(14):2199-2204
- [16] 周嘉俊, 桂泽平, 顾民, 等. 硼替佐米通过下调 Smurf1 拮抗大鼠慢性移植肾间质纤维化 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(5):636-640
- [17] OTSUKA Y, FURIHATA T, NAKAGAWA K, et al. Sodium-coupled monocarboxylate transporter 1 interacts with the RING finger- and PDZ domain-containing protein PDZRN3 [J]. *J Physiol Sci*, 2019, 69(4):635-642
- [18] KO J A, KIMURA Y, MATSUURA K, et al. PDZRN3 (LNX3, SEMCAP3) is required for the differentiation of C2C12 myoblasts into myotubes [J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 24):5106-5113
- [19] ZHU Y, ZHANG J J, PENG Y P, et al. NIDO, AMOP and vWD domains of MUC4 play synergic role in MUC4 mediated signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(6):10385-10399
- [20] ZHANG J J, ZHU Y, XIE K L, et al. Yin Yang-1 suppresses invasion and metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma by downregulating MMP10 in a MUC4/ErbB2/p38/MEF2C-dependent mechanism [J]. *Mol Cancer*, 2014, 13:130
- [收稿日期] 2019-11-19