

让肠道告诉你...

dorun
for the real health

都润肠讯

都润肠道健康研究中心主办

微生物激活信号通路抑制细菌的增殖

微生物和固有免疫 (II)

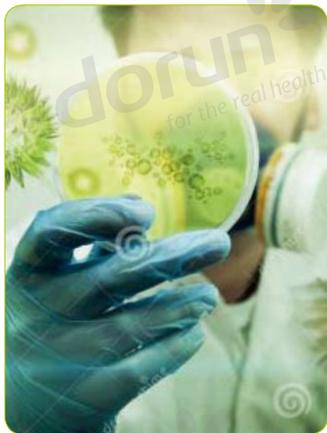
31

第三十一期



dorun
for the real health

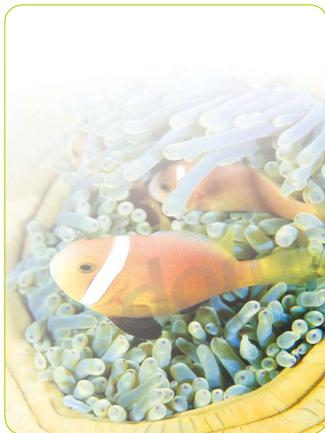
contents



03

基础理论:

微生物激活信号通路
抑制细菌的增殖



08

研究进展:

微生物和固有免疫 (II)



14

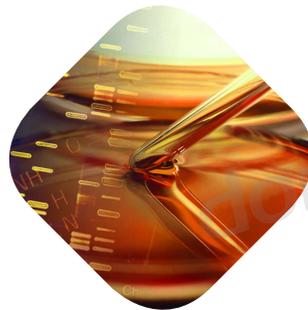
专家观点

基础理论

微生物激活信号通路抑制细菌的增殖

肠道微生物菌群的失衡可能导致疾病的发生，其维持体内平衡机制的研究相对较少。在抗生素治疗过程中丁酸产生菌数量降低，导致细胞内丁酸传感器过氧化酶体增殖物激活型受体(PPAR)的上皮信号减弱。由于缺乏PPAR信号，Nos2的表达量(诱导型一氧化氮合酶)升高，结肠内的硝酸盐含量增加。微生物组诱导的PPAR信号通过驱动结肠上皮细胞氧化的能量代谢，限制了氧的生物利用率。因此，微生物通过激活PPAR信号并减少呼吸链电子受体在结肠内的生物可利用性，来防止潜在致病性大肠杆菌和沙门氏菌的扩增。

平衡的肠道菌群主要由厚壁菌门和拟杆菌门等厌氧菌属组成，当兼性厌氧肠杆菌(*Phylum Proteobacteria*)增殖时，多是肠道菌群失调的常见标志。专性厌氧菌抑制兼性厌氧肠杆菌的增殖，可能是通过限制宿主源性硝酸盐和氧气来发挥作用的。



肠道微生物可能通过抑制宿主的电子呼吸受体的可利用性来发挥作用，但作用机制目前尚不清楚。由于链霉素的使用引起肠道菌群的破坏，增加了肠腔对宿主硝酸盐的生物利用度。与缺乏硝酸盐呼吸链(napA narG narG突变)等基因的突变菌相比，小鼠体内的野生型大肠杆菌的菌群更容易恢复。链霉素处理的小鼠中添加诱导型一氧化氮合酶(iNOS)来抑制氨基胍盐盐(AG)的产生，进而抑制了由于硝酸盐呼吸作用促进的大肠杆菌的生长优势，从而证实硝酸盐是宿主产生的。

用干扰素(IFN- γ)和白介素-22(IL-22)刺激结肠上皮癌细胞(Caco2)NOS2的表达来构建结肠上皮细胞中硝酸盐生成的模型。丁酸是肠道微生物菌群的一种发酵产物，是结肠上皮细胞(colonocytes)主要碳源。丁酸能显著降低NOS2的表达($P < 0.05$)、iNOS的合成($P < 0.05$)，减少上皮细胞中一氧化氮分解产物硝酸盐的产生($P < 0.05$)，宿主可以通过核受体PPAR(过氧化物酶体增殖物激活受体)感知到丁酸，而对其它短链脂肪酸，如乙酸、丙酸不敏感。为确定PPAR是否抑制iNOS的合成，在模型中上皮细胞使用PPAR

的激动剂--罗格列酮。罗格列酮显著降低NOS2的表达($P < 0.05$)，减少了iNOS的合成($P < 0.05$)，降低了硝酸盐的产量($P < 0.01$)，并诱导PPAR的合成和定位。在这些数据的基础上得出以下结论：微生物源的丁酸通过刺激结肠细胞中的PPAR 信号来抑制肠内的iNOS合成。

链霉素通过介导PPAR 激动剂的消耗来促进硝酸盐呼吸菌的生长

通过小鼠实验来研究链霉素的治疗是否

会消耗丁酸产生菌，并增加Nos2在结肠细胞中的表达。链霉素处理组降低了结肠内细菌数，并显著($P < 0.01$)降低了专性厌氧菌梭状菌的丰度(厚壁菌门)，梭状菌中包括大量的丁酸生产菌，如毛螺菌科*Lachnospiraceae*和疣微菌科*Ruminococcaceae*。微生物组成分的变化与盲肠的丁酸浓度的降低相关联($P < 0.01$)，此时小鼠结肠细胞中Nos2表达升高($P < 0.05$)。

下一步研究主要是PPAR在改变上皮基因表达的作用。链霉素治疗降低了上皮Angpt1基因的表达，这是PPAR正调控的基因，在使用了PPAR激动剂罗格列酮后的链霉素处理小鼠Angpt1的表达恢复。上皮Nos2表达与Angpt4表达呈反相关，支持PPAR负调控Nos2的观点。

其次，我们利用大肠杆菌*E. coli*指标菌株来研究PPAR信号是否会增加结肠中硝酸盐的生物利用度。小鼠接种了1:1比例混合的硝酸盐呼吸的指标菌株(*E. coli*野生型)和等源

硝酸盐呼吸缺失指示菌株(napA narG narG narG突变体)。采用PPAR激动剂罗格列酮的治疗方法后，消除了链球菌感染的小鼠体内野生型大肠杆菌的生长优势。

上皮PPAR信号限制硝酸盐的可用性

为了排除结果是由于化学激动剂或拮抗剂的效应，实验中繁殖出肠上皮中缺乏PPAR的小鼠，并将它们与同窝出生的野生型进行比较。缺乏上皮PPAR信号的小鼠结肠上皮Nos2转录水平升高($P < 0.01$)，导致肠道菌群中丁酸类细菌的数量没有减少，其粪便中丁酸盐含量也没有降低。接种大肠杆菌指标菌株，发现缺乏PPAR小鼠通过iNOS活性的机制提高了硝酸盐的生物利用度，使用iNOS抑制剂AG后抑制了硝酸盐呼吸依赖菌的生长优势($P < 0.05$)。小鼠感染小鼠大肠杆菌菌株JB2时获得了相似的结果，并产生硝酸盐还原酶活性。为了直接检测上皮PPAR的基

因消融是否增加了肠腔内硝酸盐的浓度，实验检测了结肠黏液中电子受体的浓度，结果显示上皮缺乏PPAR的小鼠中电子受体显著增加($P < 0.01$)。

上皮细胞缺乏PPAR信号的小鼠接受链霉素治疗后，第二天感染大肠杆菌指示菌株，并在一天后接种梭菌菌株。与同窝次对照小鼠相比，梭状芽孢杆菌接种后盲肠中

微生物通过激活PPAR信号并减少呼吸链电子受体在结肠内的生物可利用性，来防止潜在致病性大肠杆菌和沙门氏菌的扩增。



丁酸浓度得以恢复($P<0.01$), 并抑制了硝酸盐呼吸依赖性大肠杆菌的生长。然而, 在无上皮PPAR信号($P<0.05$)的链霉素处理小鼠中, 大肠杆菌的硝酸盐呼吸依赖性生长并未受到抑制。为验证丁酸是否对动物的大肠杆菌硝酸盐呼吸链起作用, 通过对小鼠进行链霉素治疗, 第二天用大肠杆菌进行感染, 1天之后接种1、2、3-丁酸, 其在小肠内的吸收与丁酸盐相比有延迟, 而在大肠中降解则增加了丁酸的浓度。链霉素治疗小鼠中抑制了对硝酸盐呼吸依赖的大肠杆菌的生长, 但在无上皮PPAR信号通路的小鼠中未出现($P<0.05$)。这些数据说明, 通过诱导上皮PPAR信号, 微生物产生的丁酸用以维持肠道内菌群稳态, 这反过来又限制了硝酸盐呼吸链相关的大肠杆菌的扩增。

结肠炎期间缺乏上皮PPAR信号通路会增加结肠菌氧化

结肠细胞通过微生物产生的丁酸盐来



获取能量, 消耗氧气产生微生物的氧化产物丁酸, 由于消耗大量的氧气, 从而造成上皮缺氧状态。然而, 在链霉素介导的丁酸消耗后, 结肠细胞将其能量代谢转换成乳酸(无氧糖酵解), 所以, 链霉素治疗增加了乳酸的浓度, 减少了原发性小鼠的细胞中三磷酸腺苷(ATP)的浓度。无氧糖酵解不消耗氧气, 氧气随后透过上皮细胞进入

肠道内腔。使得有氧呼吸系统得以恢复。在链霉素处理的小鼠中增加PPAR拮抗剂丁酸的浓度后, 通过接种17种梭状芽孢杆菌的分离株或通过补充三丁酸甘油酯的方法, 可以减少氧气的生物利用度。此外, PPAR激动剂罗格列酮的使用对接种大肠杆菌指示菌株的链霉素处理小鼠的有氧生长进行了抑制。接种大肠杆菌的指示菌株与缺乏上皮PPAR信号小鼠的恢复比率相似, 这表明仅减少PPAR信号不足以增加氧气的生物可用性。

PPAR- γ 信号激活线粒体 β -氧化或是激活巨噬细胞, IFN- γ 信号驱动巨噬细胞进行厌氧糖酵解从而进行能量代谢, 肠道代谢的重建除了需要PPAR- γ 信号沉默外, 还可能需要炎症信号。为测试此假设, 用带有两个III型分泌系统的鼠伤寒沙门氏菌进行感染引发宿主肠道炎症, 使用cyxAB基因编码细胞色素bd-II氧化酶, 接种沙门氏菌在肠道有氧环境下进行扩繁。当小鼠感染沙门氏菌菌

株(野生型或cyxA突变缺陷型), 微氧的条件下, 缺乏上皮PPAR- γ 信号的小鼠可以从有氧呼吸中获得能量, 而在对照实验动物中没有观察到。为研究沙门氏菌毒性因子引起的炎症反应是否增加宿主体内对氧的生物利用度, 实验通过对invA和spiB的基因突变, 灭活了两种对沙门氏菌至关重要的III型分泌系统。当小鼠感染了无毒的野生型或缺乏(invA spiB cyxA突变体)在微氧条件下进行有氧呼吸, 有氧呼吸对缺乏上皮PPAR- γ 信号的小鼠不再有贡献。

为验证除了基因消融PPAR- γ 信号, 炎症信号是否可以增加氧的生物利用度, 对小鼠进行低剂量(1%饮用水中)葡聚糖硫酸钠(DSS)治疗。接种大肠杆菌后, 结果显示有氧呼吸对DSS处理后的缺乏上皮PPAR- γ 信号的小鼠提供了更优生存环境。同样, 接种无毒性因子的沙门氏菌菌株后, 仅在DSS处理后缺乏上皮PPAR- γ 信号的小鼠可以在微氧的条件下增加氧生物利用度。

PPAR- γ 信号和调节性T细胞共同保持肠道的厌氧环境

虽然链霉素治疗通过消耗微生物源性的丁酸降低了PPAR- γ 信号强度, 结果表明, 减弱PPAR- γ 信号对于在结肠增加氧的生物利用度是必要但不充分条件, 因为DSS引发的炎症或沙门氏菌毒力因子也是氧化肠道的条件。尽管链霉素治疗不会导致明显的炎症反应, 但破坏肠道菌群会通过G蛋白偶联受体(GPR)-43、T细胞、树突状细胞和巨噬细胞表达的组蛋白去乙酰酶降低其它微生物来源的短链脂肪酸浓度, 来降低肠道炎症。短链脂肪酸作为宿主细胞受体促使结肠调节性T细胞(Tregs)的成熟和扩增, 这是一种限制促炎反应的细胞类型。这与之前的报道一致, 抗生素介导的短链脂肪酸的消耗导致结肠黏膜中T细胞群的降低, 链霉素治疗使结肠Treg细胞池(CD3+富含CD4+ FOXP3+细胞)缩小到正常大小的三分之一。因此, 在抗生素治疗期间, 结肠Treg群的收缩增加结肠氧生

物利用度, 从而加重了黏膜的炎症反应。

结肠上皮细胞的厌氧环境, 保持微生物菌群多为专性厌氧菌, 厌氧菌产生短链脂肪酸, 反过来, 短链脂肪酸维持Tregs亚群和上皮PPAR- γ 信号, 协同促进肠道细胞的 β -氧化产生的微生物源性丁酸保护上皮组织缺氧, 维持肠道的平衡健康。PPAR- γ 信号也激活 β -防御素的表达, 有助于肠道环境的健康。抗生素诱导缺乏上皮PPAR- γ 信号和Treg池的萎缩使得宿主进行糖酵解代谢, 提高了氧气的生物利用度, 促进肠杆菌科的扩张。因此, 肠杆菌科的增殖是肠道上皮菌群失调的重要指标, PPAR- γ 信号也是一个潜在的干预策略。

注: 文章参考自: [Microbiota-activated PPAR signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. Science. 2017, 357:570-575.](#)

研究进展

微生物和固有免疫 (II)

骨髓细胞

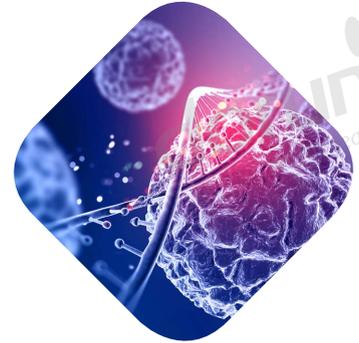
无菌小鼠的固有免疫系统发生了彻底的改变。在多个器官及其细胞发育期间的不同时间点，微生物菌群影响骨髓细胞的发育和功能（图2）。在缺乏微生物的情况下，骨髓中的髓细胞发育减少，导致清除全身性细菌感染延迟。骨髓细胞生成的水平与肠道菌群的复杂性相关，且依据血清中TLR配体的水平来调节。微生物产生的短链脂肪酸同样可能促使骨髓中的髓细胞生成。微生物对髓细胞生成的影响在出生前就开始。在怀孕期间用抗生素治疗的小鼠后代血液中嗜中性粒细胞及其骨髓前体的数量减少，而妊娠期微生物的定殖使新生小鼠肠道单核细胞的数量增加。

微生物也影响造血后骨髓细胞的成熟。微生物来源的TLR配体的持续存在促进了中性粒细胞的老化。循环嗜碱性粒细胞的数量同样受微生物来源的TLR配体的影响。除了影响循环骨髓细胞外，微生物菌群强烈影响组织固有巨噬细胞的生物特性。小胶质细胞、中枢神经系统的巨噬细胞在无菌小鼠中显示形态改变，部分是由于缺乏短链脂肪酸。在皮肤中，菌群影响固有骨髓细胞的组成和炎症潜能。在肺部，抗生素治疗会引起由前列腺素E2介导的巨噬细胞的极性发生改变，从而增加了对过敏性气道炎症的易感性。在肠内，微生物产生的短链脂肪酸作为一种信号来改变局部巨噬细胞的基因表达谱。这些菌群也调节肠道内骨髓细胞的运输。肠道微生物的定殖促使肠粘膜的巨噬细胞通过表达C-C趋化因子II型受体（CCRII）的单核细胞持续更新。

微生物对固有骨髓细胞的组织特异性影响超越了真正的免疫功能。微生物菌群释放的

信号可能影响肠神经系统的神经元与肠道肌层巨噬细胞之间的相互作用，从而促进胃肠动力。共生微生物调节肌层巨噬细胞表达骨形态发生蛋白2(BMP2)和肠道神经产生集落刺激因子1（CSF1；也被称为巨噬细胞集落刺激因子1），这反过来又影响肠道肌层平滑肌的收缩。微生物也影响着组织损伤后的恢复。2015年的一项研究发现，肠道菌群维持假结核耶尔氏菌感染后炎症和淋巴结肿大，从而恢复到稳态下的组织特异性免疫应答。

这些研究结果表明，共生微生物的定殖深刻地塑造了宿主粘膜组织和全身的骨髓状况。微生物产生的代谢产物的局部浓度，以及微生物产物的系统水平，似乎通过PRR信号促使骨髓细胞的分化和功能。值得注意的是，这些微生物引起的髓细胞库的改变极大地影响了宿主对各种疾病的易感性，这些疾病范围从感染和败血症到过敏、哮喘和移植抗宿主病。它们也调节疫苗接种的有效性和癌症治疗。



固有淋巴细胞

微生物菌群的影响并不局限于固有免疫系统中骨髓的发育。然而，微生物菌群对固有淋巴细胞的调节似乎遵循不同于骨髓细胞调节原理的规则和机制。固有淋巴细胞（ILCs），一种最近发现的固有免疫系统的淋巴细胞分支，在缺乏微生物时正常发育，但ILCs本身的功能依赖于共生微生物的定殖，而不是在淋巴细胞增殖过程中发挥它们的作用。来自共生微生物的信号，似乎影响ILCs组织特异性功能的成熟和获得。

ILC家族包括细胞毒性细胞（自然杀伤细胞）和非细胞毒性亚群（ILC1，ILC2和ILC3）。考察微生物菌群对ILC影响的大多数研究主要集中在ILC3。ILC3细胞在宿主-菌群相互作用的重要性变得越来越明显，它们的减少和由此导致的IL-22产物的缺失，表明肠道内出现细菌容量减少。微生物菌群也影响ILC3与免疫系统的其它成分相互作用。由ILC3s呈递微生物抗原限制共生微生物特异性T细胞反

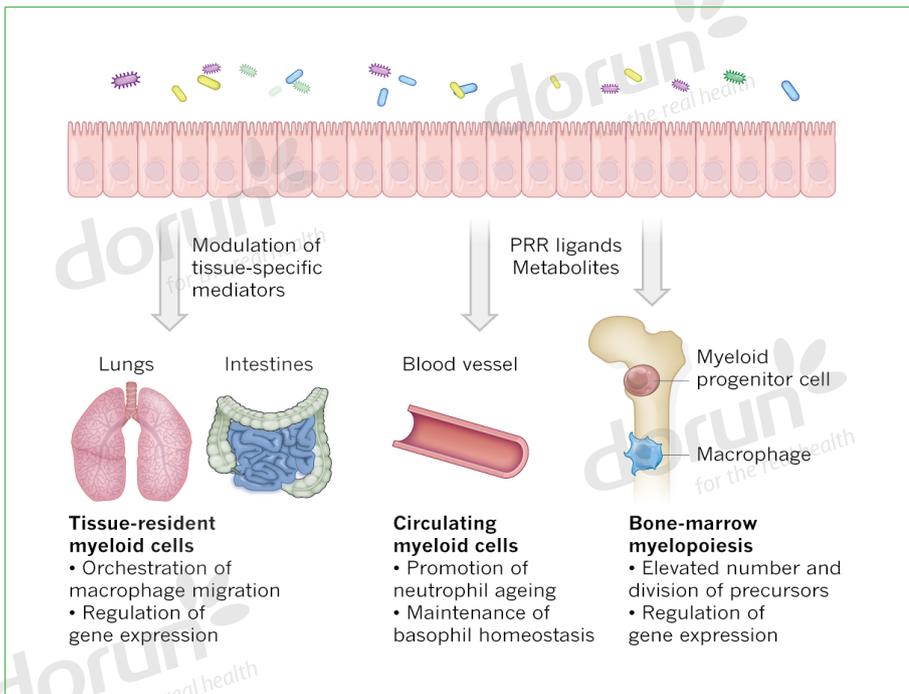


图2. 微生物信号由骨髓细胞整合

微生物菌群在骨髓细胞发育的各个阶段影响它们的功能。微生物菌群对组织固有骨髓细胞迁移和基因表达的影响主要是通过局部代谢物调节和组织识别介质来实现。循环粒细胞受微生物PRR配体的影响。当共生细菌及其血液中微生物产物缺失时，骨髓中的骨髓细胞生成减少。

应来维持对共生细菌的耐受。微生物感知和肠道巨噬细胞产生IL-1 β 促使ILC3s分泌粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),这对巨噬细胞的功能及诱导口服耐受是必需的。携带CD103抗原的骨髓细胞感知鞭毛蛋白对IL-23介导的ILCs产生IL-22是必需的。此外,由ILC3s产生淋巴毒素- α (也被称为肿瘤坏死因子- β)对IgA的产生和肠道菌群平衡是至关重要。同样重要的微生物介导的ILCs功能是它们与上皮细胞的通讯。微生物诱导ILC3s产生的IL-22诱导肠上皮细胞岩藻糖基转移酶2(半乳糖苷酶2- α -L-岩藻糖基转移酶2)的表达和表面蛋白岩藻糖基化,这对宿主防御病原微生物是必需的。

虽然这些例子证明微生物信号对ILCs成熟和功能的重要性,但它们发挥影响力的确切机制仍不清楚,且在某些情况下是有争议的。例如,一些研究已经报道,在缺少微生物菌群时,由ILCs产生的IL-22水平升高,而其它已发表的研究则显示IL-22分泌缺失。

关于无菌小鼠或已用抗生素治疗的小鼠组织中固有ILCs的数量是否发生变化,也有不同的结论。需要进一步的研究来解释这些现象及其潜在机制。

微生物菌群也可能影响其他ILC亚群的活动。上皮细胞产生的IL-25激活ILC2s,而IL-25是以微生物依赖的方式产生。在固有免疫系统中,ILC1谱转录因子T-bet的缺失(也称为T-box转录因子TBX21)导致ILC依赖并且幽门螺旋杆菌*typhlonius*引起肠道炎症。

总的来说,固有免疫系统的骨髓和淋巴分枝是由微生物菌群形成的,但其潜在机制基于不同的原理。共生微生物定殖的复杂性体现在循环PRR配体的数量和组织中微生物产生的代谢产物的浓度,可以在短期内调节骨髓细胞产生的水平和全身的炎症反应。相比之下,ILCs的发育可能基本预测微生物的定殖情况。组织固有ILCs可整合来自微生物菌群的信号,通过尚不完全清楚的调节机制,微调组织水平的固有免疫和适应性免疫反应。



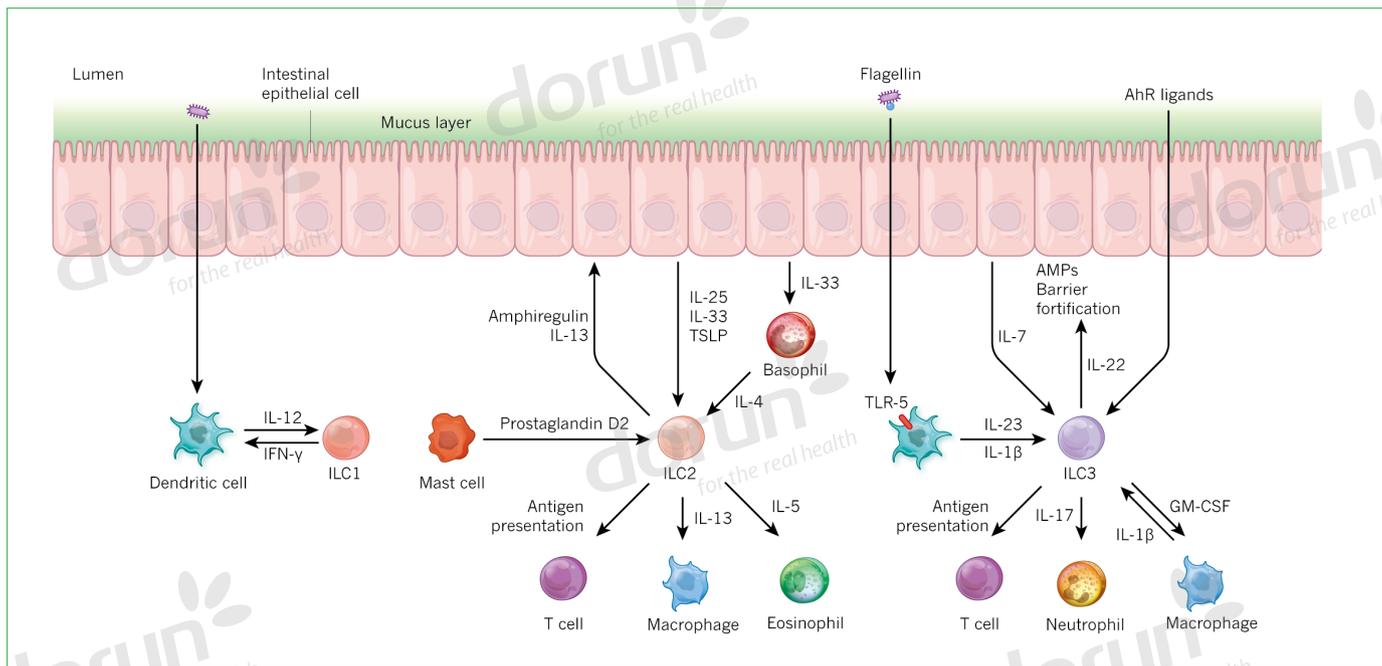


图3. 微生物信号由ILCs整合

ILCs通过细胞因子、PRR配体和抗菌肽与局部微生物菌群进行通讯。在许多情况下，上皮细胞或骨髓细胞作为ILCs和微生物菌群之间对话的中继站。第1组ILC（ILC1）细胞可由骨髓细胞来源的IL-12激活。第2组ILC（ILC2）细胞由上皮细胞产生的细胞因子激活，并通过与肥大细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和巨噬细胞的相互作用来协调2型免疫。第3组ILC（ILC3）细胞与先天免疫和适应性免疫系统细胞的相互作用。它们分泌的IL-22可以启动抗菌程序使上皮细胞中的屏障加强（AhR, 芳香烃受体, AMPs, 抗菌蛋白, LT, 淋巴毒素, TSLP, 胸腺基质淋巴生成素）。

固有免疫系统对微生物的作用

在感知微生物代谢状态的信息时，固有免疫系统将信号传递给宿主以适应组织水平的生理机能，并调节微生物的组成和功能。来自人类和小鼠的基因证据表明，固有免疫系统在调节微生物的组成随时间和个体之间变化中起着重要的作用。在一些固有免疫缺陷的小鼠模型中，微生物失调已被报道，例如缺乏NOD2，NLRP6或TLR5基因的小鼠。因此，固有免疫系统可能发挥促进微生物菌群中有益成员生长的作用，并有助于维持微生物群落的稳定。由ILC3s和IL-22诱导上皮岩藻糖基化是最好的证明。与肠道感染相关的饥饿期间，脱落的岩藻糖基化蛋白质进入肠腔作为共生细菌的能量来源。因此，在肠道生态系统紊乱时，固有免疫系统资源可以被调动起来支持微生物菌群。同样，TLR1信号在小肠结肠炎耶尔森菌感染后微生物菌群组成的维持中需要。与此相反，PRRs在抗生素治疗结束后微生物菌群的

发育中似乎没有起很大作用。然而，不依赖于PRRs的菌群活动参与控制菌群失调后微生物定殖的演替过程是可能的。

微生物控制固有免疫系统发育的机制已经开始被理解，尽管固有免疫在时空动态方面控制微生物功能的原理和目的仍然未知。未来机理的研究需要更好地定义宿主的免疫系统试图保留的“健康”微生物的特性。深入了解这种机制来自于发现NLRP6缺陷小鼠的微生物失调与不同动物研究中类似的宏基因组功

能有关。移植无菌NLRP6缺陷小鼠后微生物失调重新发生，表明某些PRRS可能产生特定的抗菌物，这些抗菌物与保留微生物菌群的不同功能相关。

注：文章参考自：“The microbiome and innate immunity” Nature, 2016 (535): 65–74.





动物抗病的机制是生命活动过程中多种要素对立统一、辩证统一的结果。两个力量对立的结果会体现疾病、亚健康，健康三种状态。

抗病的前提是细胞结构完整；抗病的机制是免疫反应；抗病的关键在肠道；抗病的焦点是自由基平衡。

肠道健康包括肠道结构与功能，微生物组成与代谢。合理的营养能够保障健康，包括保障肠道健康、促进免疫系统发育和免疫功能、维持氧化还原平衡、修复受损组织细胞，从而确保最佳抗病力。

抗病力与肠道微生物密切相关，主要通过肠道微生物、IL-33、抗菌蛋白REG3 γ 与肠道微生物之间的对话机制。

四川农业大学 陈代文教授
第九届四川饲料企业技术总监论坛
2018年8月

dorun
for the real health

dorun
for the real health

肠精灵®

守护肠道健康

dorun
for the real health

dorun
for the real health

肠精灵® 家族



肠优®

猪专用枯草芽孢杆菌



肠佳®

蛋禽专用枯草芽孢杆菌



肠悦®

肉禽专用枯草芽孢杆菌



肠爽®

水产专用枯草芽孢杆菌



同源筛分

Homologous
screening



合生发酵

Synbiotic
fermentation

dorun
for the real health

更多信息请致电 400-652-6899 或登录 www.dorunbio.com

dorun
for the real health

都润 只为真健康

更多资讯请拨打“真健康”专线：400-652-6899
或登录 www.dorunbio.com



北京都润科技有限公司

地址：北京市海淀区中关村南大街12号农科院饲料所科研辅助楼303(100081)
电话：010-62159219 62159129 传真：010-62158831

Beijing Dorun Science & Technology Co., Ltd

Add.:No. 303 Feed affiliated building in Chinese Academy of Agricultural Sciences,
12 ZhongGuanCun South Avenue, Haidian District, Beijing(100081)
Tel: 010-62159219 62159129 Fax:010-62158831

