



无菌小鼠在肠道菌与机体免疫互作机制研究中的应用

张征¹, 刘志华^{2*}

(1. 江苏省宜兴市人民医院消化内科, 宜兴 214200; 2. 中国科学院生物物理研究所, 感染与免疫重点实验室, 北京 100101)

【摘要】 肠道菌在机体健康中发挥重要作用, 而其中肠道菌发挥作用的具体机制是什么? 无菌小鼠作为一种动物模型, 在研究肠道菌作用机制的研究中必不可缺。本综述以无菌小鼠模型为基础, 探讨肠道菌对机体系统发育、维持中的作用, 并重点讨论一些特有的肠道菌在免疫调控中的具体作用。

【关键词】 无菌小鼠; 肠道菌群; 免疫

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 06-0663-03

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.06.014

A review on immune regulation by intestinal microbiota

ZHANG Zheng¹, LIU Zhi-hua^{2*}

(1. Department of Gastroenterology, the Affiliated Yixing Hospital of Jiangsu University, Yixing 214200, China; 2. CAS Key Laboratory of Infection and Immunity, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

【Abstract】 In a “superorganism” of human being, commensal bacteria play vital roles in regulating many aspects of host physiology. Germ-free mice have been proven to be a valuable tool to unravel the underlying mechanisms how microbes interact with the host. This review discusses the recent research progress on microbiota and immune regulation.

【Key words】 Germ-free mice; Microbiota; Immunity

Corresponding author: LIU Zhi-hua. E-mail: zhihualiu@ibp.ac.cn

肠道菌与机体健康密切相关, 已有的研究发现了菌群失衡与多种代谢性疾病、自身免疫疾病等相关。利用无菌小鼠和菌群移植技术, 有证据表明了菌群失衡与疾病发生并不是简单的相关, 往往在发病中起主导或促进作用。除了在揭示菌群在疾病发生中的作用外, 无菌动物的广泛应用也极大的推动了肠道菌的生理功能的机制研究。在长期的互进化中, 肠道菌与宿主建立了复杂的互作关系, 而互作关系的失衡可能是肠道菌相关的疾病发生的生理基础。分子遗传学家 Lederberg 博士^[1]最早于 2000 年就提出了人是由人体与共生微生物共同组成的超级生物体“superorganism”的概念。微生物与免疫学家 Bäckhed 等^[2-4]一系列的研究首次验证了 Lederberg 博士的假说, 发现了共生菌在机体生理中发挥重要

作用, 从而开启了微生物组研究的大门。因篇幅等原因, 本综述仅涵盖肠道共生菌与免疫调控方面的研究。

肠道共生菌对免疫系统的作用研究最早开展于 20 世纪 60 年代。20 世纪 60 年代成功繁育了无菌小鼠, 描述了无菌小鼠中淋巴节较小, 含有较少的淋巴细胞^[5]。近十年来的深入研究揭示了肠道共生菌调控免疫系统的具体作用与生理意义。本综述将从肠道菌对免疫系统的组织发育、稳态条件下对免疫的调控作用, 以及肠道菌诱导的肠道局部及周身的免疫保护作用等几个方面来阐述。

1 肠道菌与免疫系统在发育中的作用

在出生后, 机体的肠道经历一个从无菌到有菌

【作者简介】张征, 男, 本科, 主要从事炎症性肠病的临床。Email: staff968@yxph.com

【通讯作者】刘志华, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事免疫学研究。Email: zhihualiu@ibp.ac.cn

的转变,其中涉及到定植细菌与机体免疫系统如何相互作用并建立稳态平衡,这个过程目前还没有完全理解。目前发现了肠道菌在促进肠道黏膜免疫系统的发育中发挥作用。相较于常规的有菌小鼠,无菌小鼠中 Peyer 集合淋巴结较小、CD4⁺ T 细胞较少、IgA 产生的浆细胞少、而肠道中孤立淋巴滤泡等不成熟^[5,6]。研究表明来自肠道菌细胞壁的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 组分以及肽聚糖组分可诱导肠道中孤立淋巴滤泡的形成与成熟,这个过程依赖于机体编码的模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 识别微生物相关分子模式 (microbial-associated molecular patterns), 新生个体的免疫细胞及上皮细胞通过表达模式识别受体感知肠道菌,可能导致一些表观遗传的改变,影响细胞转录组的变化^[7,8]。肠道菌细胞壁肽聚糖可以上调机体中白介素-15 的表达从而诱导上皮内淋巴细胞 (intraepithelial lymphocytes, IEL)^[9]。Mazmanian^[6] 发现了由肠道脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 来源的寡糖 A (polysaccharide A, PSA) 诱导树突状细胞表达多种细胞因子并上调 MHCII 分子,从而诱导 CD4⁺ T 细胞。此外,早期暴露在微生物的环境中可以抑制一些炎症免疫反应,比如自然杀伤 T 细胞 (natural killer T cells, NKT), 而这个会影响以后的炎症性疾病^[10]。肠道菌抑制恒定自然杀伤 T 细胞 (invariant NKT, iNKT) 则依赖于肠道菌来源的一类鞘脂 (sphingolipids)^[11]。

肠道菌定植于肠道的早期过程是肠道稳态平衡的建立过程,这个过程对于机体的健康具有重要作用,而流行病学的观察也发现了早期肠道菌异常往往会增加炎症性免疫疾病的发生,例如哮喘^[12]。

2 肠道菌的免疫调控作用

肠道稳态依赖于天然免疫与获得性免疫针对自身、食物与病原等做出复杂而合适的协同反应。其中,一些特殊类型的细胞必须整合代谢物、细胞因子与激素等信息,以保障肠道组织的正常生理。肠道免疫组织面临着巨大数量的肠道菌与食物抗原,而免疫系统如何做出正确的响应也是刚刚开始被理解。如果耐受不能被正常的诱导,往往会导致一些疾病的发生,例如炎症性肠道、过敏等等。

肠道菌在调控黏膜免疫、诱导免疫耐受中发挥作用。值得注意的是,对食物等抗原的免疫耐受的建立依赖于肠道菌的信号^[13-15]。在诱导免疫耐受

的多种机制中, Foxp3⁺ 调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg) 在外周免疫耐受中起主导作用。Treg 细胞异常导致口服耐受的失败和严重的自身免疫疾病^[16,17]。虽然 Foxp3⁺ Treg 细胞可以在胸腺中产生,而肠道是参与口服耐受的 Foxp3⁺ Treg 细胞的主要发生地^[18-20]。目前的共识是对肠道共生菌与环境抗原的最佳耐受依赖于胸腺来源与肠道起源的 Treg 细胞的协同作用。肠道中的视黄酸 (retinoic acid) 和 MUC2 蛋白在诱导肠源 Treg 细胞中发挥着作用^[7,21]。

肠道菌依赖于多种机制诱导 Treg 细胞。脆弱拟杆菌来源的寡糖 A (polysaccharide A, PSA) 可诱导并扩展表达白介素 10 的 Treg 细胞^[22]。此外,一些梭菌 (*Clostridium*) 也具有诱导 Treg 细胞产生的能力^[23,24]。这些梭菌通过发酵纤维素产生短链脂肪酸,短链脂肪酸,尤其是丁酸,可以抑制组蛋白去乙酰酶 (histone deacetylase, HDACs), 从而诱导 Treg 细胞的发生^[23,24]。而利用梭菌通过发酵产生短链脂肪酸诱导 Treg 细胞可能具有治疗自身免疫疾病的潜力。给自发 I 型糖尿病小鼠喂饲高乙酸/丁酸纤维素可以有效降低糖尿病的发生^[25]。

3 肠道菌诱导的在肠道局部的免疫保护作用

病从口入,肠道正是病原物主要机体的入侵场所。病原菌与肠道共生菌首先在肠道中相遇,而病原菌成功感染与肠道共生菌息息相关。肠道共生菌可以直接与病原菌、黏膜免疫互作,从而影响感染的结果。

肠道菌帮助机体抵抗外源病原物,赋予肠道定植抗力 (colonization resistance)。比如,常见的艰难杆菌感染往往发生在服用大量抗生素后,当正常的菌群被大量抗生素杀死后,对抗生素有抗性艰难杆菌开始大量扩增,引发炎症。当移植正常菌群 (粪菌移植) 后,艰难杆菌感染可以得到有效的抑制。*Clostridium scindens* 加工胆酸成为次级胆酸,可以抑制艰难杆菌,有望成为取代粪菌移植成为艰难杆菌感染的精准治疗^[26]。此外,共生菌还可以通过竞争营养物质、产生细菌素 (microcin) 等来限制病原物的定植^[27,28]。

与此同时,肠道菌通过调控天然免疫与获得性免疫来保护机体。实际上,肠道菌通过提供免疫佐剂效应对机体的整体免疫状态进行调控。肠道菌的定植增强肠道的防御能力。例如,肠道菌上调肠道

上皮表达 RegIII, 不仅维持了肠道菌与上皮间的间隙, 也抵抗病原物的感染^[29]。潘氏细胞中富含大量抗菌肽, 调控肠道菌群。此外, 肠道菌调控潘氏细胞的分泌活动^[30,31]。肠道菌的定植诱导产生 IgA 的浆细胞^[32]。

除了上述的整体佐剂效应外, 肠道菌的一些特定细菌具有占优势的免疫诱导效应。其中研究比较透彻的是分支节杆菌 (segmented filamentous bacteria, SFB), 分支节杆菌定植于回肠末端, 诱导肠道中主要促炎 Th17 细胞的发生^[33]。有别于其他肠道共生菌, SFB 菌与肠道上皮紧密接触, 利用这一特性, Itoh^[34]成功分离了 SFB 菌, 并定植到无菌小鼠中, 建立了 SFB 单菌小鼠模型, 为研究 SFB 菌与免疫提供了重要的研究工具。分支节杆菌定植有助于抵抗感染, 另一方面, 在小鼠模型中发现了可能与自身免疫疾病发生相关。

此外, 有一种新的肠道菌与宿主互作的机制最近被发现。与第三军医大学合作^[31,35]研究发现了肠道菌释放的胞壁酰二肽能够被肠道潘氏细胞直接感知, 进而招募 NOD2、LRRK2、RIP2 和 RAB2A 到潘氏细胞的致密核心囊泡 (dense core vesicles, DCVs) 表面, 帮助潘氏细胞中的溶菌酶正常分拣。在无菌小鼠中, 溶菌酶被错误分拣到溶酶体中发生了降解, 导致无菌小鼠的肠腔中溶菌酶含量降低^[31]。

4 肠道菌诱导的周身免疫保护作用

肠道菌改变肠道局部免疫特性已经被广泛接受, 而肠道菌也改变远离肠道的远端组织中的免疫特性也越来越被接受。比如, 通过使用抗生素减少肠道菌会削弱 T 细胞与 B 细胞抵抗流感病毒的反应能力, 这个依赖于肠道菌诱导的白介素 1 和 18 的表达, 并且可以通过肛门回灌 Toll 受体的激动剂恢复小鼠的抗流感能力, 暗示了细菌配体或下游的细胞因子可以从肠道到达外周, 激活抗感染能力。抗生素处理也降低小鼠对淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV) 的能力^[36,37]。肠道菌对外周抗感染的作用可能依赖于从肠道进入机体的 Toll 受体和 NOD 受体的激动剂等等。比如, 肠道菌来源的肽聚糖在小鼠的外周循环中, 肽聚糖作为 NOD 受体的激动剂可以提高机体抵抗肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)^[38]。更多的实验证据说明了机体对来源于肠道菌的这些衍生物、

代谢物的感知可能影响这造血干细胞的分化^[39]。

此外, 肠道菌对外周免疫的作用影响着免疫治疗。在免疫治疗和骨髓移植中, 全身放射性治疗会造成肠道损伤, 其中伴随着细菌易位, 可以具有了免疫佐剂效应, 可以提高抗肿瘤的 T 细胞效应^[40]。同样, 化疗药物如环磷酰胺 (cyclophosphamide) 也导致肠道损伤, 诱导依赖于肠道菌的 Th17 细胞, 发挥抗肿瘤效应^[41]。

总之, 肠道菌在稳态和炎症状态中对外周免疫系统均具有调整作用。免疫系统通过感知外周中的细菌配体进行微调, 对机体的抗感染、肿瘤治疗有重要影响。而其中免疫系统如何根据外周中的细菌配体进行微调目前所知不多, 有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Lederberg J. Infectious History [J]. Science, 2000, 288 (5464): 287-293.
- [2] Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2007, 104(3): 979-984.
- [3] Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2004, 101(44): 15718-15723.
- [4] Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine [J]. Science, 2016, 307(5717): 1915-1920.
- [5] Bauer H, Horowitz RE, Levenson SM, et al. The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice [J]. Am J Pathol, 1963, 42: 471-483.
- [6] Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, et al. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system [J]. Cell, 2005, 122(1): 107-118.
- [7] Bouskra D, Brézillon C, Bérard M, et al. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis [J]. Nature, 2008, 456(7221): 507-510.
- [8] Woo V, Alenghat T. Host-microbiota interactions: epigenomic regulation [J]. Curr Opin Immunol, 2017, 44: 52-60.
- [9] Jiang W, Wang X, Zeng B, et al. Recognition of gut microbiota by NOD2 is essential for the homeostasis of intestinal intraepithelial lymphocytes [J]. J Exp Med, 2013, 210(11): 2465-2476.
- [10] Olszak T, Blumberg RS. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function [J]. Science, 2012, 336(6080): 489-493.
- [11] An D, Oh SF, Olszak T, et al. Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells [J]. Cell, 2014, 156(1-2): 123-133.
- [12] Ege MJ, Mayer M, Normand AC, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma [J]. New Engl J Med,

- 2011, 364(8): 701–709.
- [13] Kiyono H, McGhee JR, Wannemuehler MJ, et al. Lack of oral tolerance in C3H/HeJ mice [J]. *J Exp Med*, 1982, 155(2): 605–610.
- [14] Wannemuehler MJ, Kiyono H, Babb JL, et al. Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS converts germfree mice to sensitivity to oral tolerance induction [J]. *J Immunol*, 1982, 129(3): 959–965.
- [15] Sudo N, Sawamura S, Tanaka K, et al. The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction [J]. *J Immunol*, 1997, 159(4): 1739–1745.
- [16] Worbs T, Bode U, Yan S, et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(3): 519–527.
- [17] Gavin M, Rudensky A. Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4⁺ T cells [J]. *Curr Opin Immunol*, 2003, 15(6): 690–696.
- [18] Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, et al. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(7): 1923–1933.
- [19] Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism [J]. *J Exp Med*, 2007, 204(8): 1757–1764.
- [20] Sun CM, Hall JA, Blank RB, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid [J]. *J Exp Med*, 2007, 204(8): 1775–1785.
- [21] Shan M, Gentile M, Yeiser JR, et al. Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals [J]. *Science*, 2013, 342(6157): 447–453.
- [22] Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease [J]. *Nature*, 2008, 453(7195): 620–625.
- [23] Atarashi K, Tanoue T, Shima T, et al. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species [J]. *Science*, 2011, 331(6015): 337–341.
- [24] Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota [J]. *Nature*, 2013, 500(7461): 232–236.
- [25] Mariño E, Richards JL, McLeod KH, et al. Gut microbial metabolites limit the frequency of autoimmune T cells and protect against type 1 diabetes [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(5): 552–562.
- [26] Buffie CG, Bucci V, Stein RR, et al. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile* [J]. *Nature*, 2015, 517(7533): 205–208.
- [27] Sassonecorsi M, Nuccio SP, Liu H, et al. Microcins mediate competition among Enterobacteriaceae in the inflamed gut [J]. *Nature*, 2016, 540(7632): 280–283.
- [28] Kamada N, Chen GY, Inohara N, et al. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota [J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(7): 685–690.
- [29] Cash HL, Whitham CV, Behrendt CL, et al. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin [J]. *Science*, 2006, 313(5790): 1126–1130.
- [30] Zhang Z, Liu Z. Paneth cells: the hub for sensing and regulating intestinal flora [J]. *Sci China Life Sci*, 2016, 59(5): 463–467.
- [31] Zhang Q, Pan Y, Yan R, et al. Commensal bacteria direct selective cargo sorting to promote symbiosis [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16(9): 918–926.
- [32] Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria [J]. *Science*, 2004, 303(5664): 1662–1665.
- [33] Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria [J]. *Cell*, 2009, 139(3): 485–498.
- [34] Itoh K, Mitsuoka T. Characterization of clostridia isolated from faeces of limited flora mice and their effect on caecal size when associated with germ-free mice [J]. *Lab Animals*, 1985, 19(2): 111–118.
- [35] Wang H, Zhang X, Zuo Z, et al. Rip2 is required for Nod2-mediated lysozyme sorting in Paneth cells [J]. *J Immunol*, 2017, 198(9): 3729–3736.
- [36] Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y, et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(13): 5354–5359.
- [37] Abt MC, Osborne LC, Monticelli LA, et al. Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity [J]. *Immunity*, 2012, 37(1): 158–170.
- [38] Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, et al. Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity [J]. *Nat Med*, 2010, 16(2): 228–231.
- [39] Iwamura C, Bouladoux N, Belkaid Y, et al. Sensing of the microbiota by NOD1 in mesenchymal stromal cells regulates murine hematopoiesis [J]. *Blood*, 2017, 129(2): 171–176.
- [40] Paulos CM, Wrzesinski C, Kaiser A, et al. Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8⁺ T cells via TLR4 signaling [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(8): 2197–2204.
- [41] Viaud S, Saccheri F, Mignot G, et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide [J]. *Science*, 2013, 342(6161): 971–976.