

郭玉倩,陆姜利,角建林,等. D-半乳糖增加树鼩肠道 IL-18 的表达及肠道菌群失调 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 50-55.

Guo YQ, Lu JL, Jiao JL, et al. D-Galactose increases the expression of IL-18 in the gut of tree shrews and deregulates intestinal flora [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 50-55.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.03.009

# D-半乳糖增加树鼩肠道 IL-18 的表达及肠道菌群失调

郭玉倩<sup>1</sup>, 陆姜利<sup>1</sup>, 角建林<sup>2</sup>, 曾跃勤<sup>3</sup>, 梁 张<sup>2\*</sup>, 郑 红<sup>1\*</sup>

(1. 昆明医科大学实验动物学部, 昆明 650500; 2. 昆明医科大学技术转移中心, 昆明 650031;  
3. 昆明医科大学分子临床研究, 昆明 650500)

**【摘要】 目的** 分析 D-半乳糖作用下, 树鼩肠组织 IL-18 的表达和肠道菌群的变化情况。**方法** 10 只雄性树鼩随机分为正常组和 D-半乳糖组 ( $n=5$ )。处理组腹腔注射 D-半乳糖 (0.6 g/kg) 8 周; 正常组按相同操作注射生理盐水。分离回肠、盲肠和结肠并收集其内容物, 免疫组化检测 IL-18 表达情况; 16S rDNA 高通量测序分析肠内容物细菌 DNA 序列。**结果** D-半乳糖组的回肠、盲肠和结肠的 IL-18 表达均显著性升高 ( $P<0.05$ )。D-半乳糖组盲肠、结肠的肠杆菌科和结肠气单胞菌科丰度显著性升高; 结肠双歧杆菌科丰度下降。**结论** D-半乳糖增加肠道炎症因子 IL-18 表达和肠道菌群紊乱, 推测树鼩肠道菌群失调引起 IL-18 表达升高, 促进肠道炎症反应。

**【关键词】** 白介素-18; 炎症; 肠道菌群; D-半乳糖; 树鼩

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 03-0050-06

## D-Galactose increases the expression of IL-18 in the gut of tree shrews and deregulates intestinal flora

GUO Yuqian<sup>1</sup>, LU Jiangli<sup>1</sup>, JIAO Jianlin<sup>2</sup>, ZENG Yueqin<sup>3</sup>, LIANG Zhang<sup>2\*</sup>, ZHENG Hong<sup>1\*</sup>

(1. Department of Laboratory Animal Science, Kunming Medical University, Kunming 650500, China.

2. Technology Transfer Centers, Kunming Medical University, Kunming 650031.

3. Institute of Molecular and Clinical Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500)

**【Abstract】 Objective** To analyze the expression of IL-18 and changes of intestinal flora in tree shrews under the action of D-galactose. **Methods** Ten male tree shrews were randomly divided into normal and D-galactose groups ( $n=5$ ). Intraperitoneally injected D-galactose (0.6 g/kg) for 8 weeks was applied to the D-galactose group. Tree shrews in the normal group were injected with normal saline in the same manner. The ileum of the small intestines and the cecum and colon of the large intestines were separated, and their contents were collected. Expression of IL-18 was detected by immunohistochemistry. The bacterial 16S rDNA sequence in intestinal contents was analyzed by high-throughput sequencing. **Results** Immunohistochemistry showed that the expression of IL-18 in the ileum, cecum, and colon was significantly increased in the D-galactose group ( $P<0.05$ ). The abundances of enterobacteriaceae and aeromonas in the cecum and colon were increased significantly in the D-galactose group. The abundance of bifidobacteriaceae was decreased

**【基金项目】** 云南省应用基础研究计划项目 (2017FE468-014, 2017FE468-016); 云南省教育厅科学研究基金项目 (2018Y048); 昆明医科大学创新基金项目 (2019S093)。

**【作者简介】** 郭玉倩 (1995—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 药理学。E-mail: 1461553155@qq.com

**【通信作者】** 郑红 (1969—), 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 疾病动物模型。E-mail: 847255170@qq.com

梁张 (1966—), 女, 副教授, 研究方向: 药理学。E-mail: ynlml-z@163.com。\* 共同通信作者

in the colon of the D-galactose group. **Conclusions** D-Galactose increases the expression of intestinal inflammatory factor IL-18 and causes intestinal flora disorder, suggesting that the imbalance of intestinal flora in tree shrews caused the increased expression of IL-18 and promoted the intestinal inflammatory response.

**[Keywords]** interleukin-18; inflammation; intestinal flora; D-galactose; tree shrews

越来越多的研究表明肠道菌群失调与肠道炎症的有密切联系。肠道菌群的多样性及丰度处于平衡状态时,能维持宿主正常的营养物质转化、能量代谢、免疫功能、神经生理功能等<sup>[1-2]</sup>。肠道微生物能激活树突状细胞表面的 Toll 样受体 (TLRs),导致 IL-10、IL-12 的分泌,进而诱导 Th0 分化为 Th1、Th2。但肠道微生物引起肠道炎症的具体机制尚需进一步阐明<sup>[3-4]</sup>。

D-半乳糖在机体内聚集,会导致活性氧类 (ROS) 的蓄积与激活,诱导 IL-1 $\beta$ 、IL-6 等多种细胞因子的表达,引起结肠炎性细胞浸润。但是 D-半乳糖介导的肠道炎症反应是否与肠道菌群有关,未见报道。白细胞介素-18 (IL-18) 是一种强力致炎性细胞因子,参与肠道免疫系统调节。有报道称,IL-18 的分泌与肠道菌群关系密切<sup>[5]</sup>。因此,本实验通过分析 D-半乳糖作用下,新型实验动物树鼩回肠、盲肠、结肠组织 IL-18 的表达和内容物菌群的变化情况,初步探索肠道炎症反应与菌群微生态失调的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

普通级中国树鼩滇西亚种 10 只,雄性,130~150 g,10 月龄,购于昆明医科大学实验动物学部 [SCXK (滇) K2015-0005],饲养于昆明医科大学普通级实验室 [SYXK (滇) K2015-0002]。饲料配方参照本课题组前期研究<sup>[6]</sup>。实验程序符合昆明医科大学动物实验伦理委员会要求 (伦理审批号: KMMU2018022),按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

D-半乳糖 (Sigma-G5388, 美国); 基因提取试剂盒 (Omega, 瑞士); 测序试剂盒 (Hiseq Rapid SBS Kit v2, ThermoFisher, 美国); 荧光计 (Qubit 2.0, ThermoFisher, 美国); PCR 仪 (Applied Biosystems® Gene Amp® PCR System 9700, 美国); 免疫组化检测抗体 IL-18 (ab243091, abcam 公司, 英国)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物给药及处理

树鼩分为正常组和 D 半乳糖组 ( $n=5$ )。每天下午 2:00, D-半乳糖组腹腔注射给药,给药量 0.6 g/kg; 正常组给予等量生理盐水。8 周后,禁食 12 h,心脏采血处死树鼩。距胃部约 60~70 cm 处,分离小肠的回肠 (ileum, i)、大肠的盲肠 (cecum, ca) 和结肠 (colon, co),用生理盐水冲洗、收集肠内容物,储存于 -80℃ 冰箱; 肠组织浸泡于多聚甲醛中,4℃ 保存。

#### 1.3.2 免疫组化分析

回肠、盲肠和结肠组织在多聚甲醛中固定 48 h 后,石蜡包埋。按照切片、烘烤、脱蜡、抗原修复、一抗孵育过夜、二抗孵育和 DAB 显色的流程操作,观察 IL-18 在两组树鼩不同肠段的表达情况。

#### 1.3.3 PCR 扩增、文库构建、测序及生物信息学分析

使用 DNA 试剂盒抽提 DNA,合成带有 Barcode 的特异引物 515F (5'-GTGYCAGCMGCC GCGGTAA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'),其中兼并碱基 Y=C 或 T; M=A 或 C; H=A, C 或 T; V=A, C 或 G; W=A 或 T。对样本的 16S rDNA V4 区域进行扩增。文库构建、测序、生物信息学参考文献的方法进行<sup>[6]</sup>。统计分析在门、科水平上的物种组成及丰度。

#### 1.4 统计学方法

利用 GraphPad PRISM6 软件 (GraphPad software, CA, USA) 计算出样本序列的平均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ),使用 SPSS 20 软件,采用  $t$  检验分析组间相同部位差异,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 D-半乳糖作用下树鼩肠道 3 个部位 IL-18 表达增多

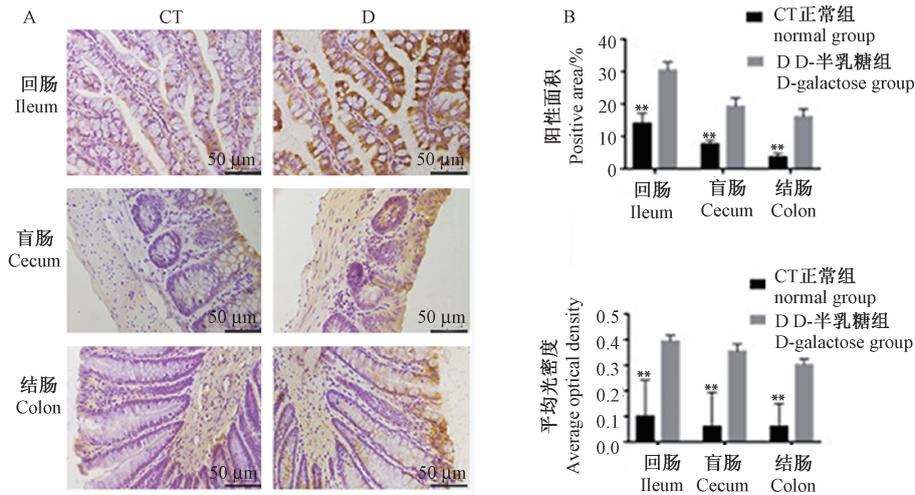
比较正常组 (CT) 和 D-半乳糖组 (D) 树鼩回肠、盲肠和结肠中 IL-18 的表达,免疫组化染色 (图 1) 显示,IL-18 在 D-半乳糖组肠黏膜细胞呈棕黄色集中性表达,而在正常组基本无阳性表达。D-半乳糖组阳性细胞数和平均光密度值均显著性高于正常组 ( $P<0.05$ ),提示 D-半乳糖能够上调树鼩肠道 3 个部位 IL-18 的表达。

## 2.2 肠道菌群构成变化

正常树鼯肠道菌群中共发现 24 个门,以厚壁菌门 (55.9%)、变形菌门 (20.6%)、放线菌门 (10.2%) 和拟杆菌门 (7.9%) 为主 (图 2A)。D-半乳糖作用后,树鼯 3 个肠段共发现 22 个门,并且优势菌发生变化。变形菌门 (42.9%)、厚壁菌门 (36.8%)、拟杆菌门 (11.8%) 和放线菌门 (5.6%) 为优势菌群 (图 2B)。D-半乳糖组盲肠中变形菌门丰度升高 ( $32.1 \pm 7.6\%$ ) 与 ( $13.0 \pm 6.6\%$ ),  $P=0.03$ ; 结肠中放线菌门丰度减小 ( $2.9 \pm 0.16\%$ ) 与 ( $10.7 \pm 3.7\%$ ),  $P=0.02$ ; 回肠中疣微菌门丰度降低 ( $0.1 \pm$

$0.02\%$ ) 与 ( $0.8 \pm 0.2\%$ ),  $P=0.005$ 。

使用热图分析科水平群落组成,选取丰度排名前 50 的科,纵坐标按照平均丰度由高到低进行排列 (图 3)。正常组 (图 3A) 丰度最高的科依次是乳杆菌科 (31.3%)、肠杆菌科 (8.8%)、韦荣氏菌科 (8.6%) 和双歧杆菌科 (8.1%); 而 D-半乳糖组 (图 3B) 肠杆菌科 (27.8%) 丰度最高,乳杆菌科 (23.5%)、普雷沃氏菌科 (8.3%) 和伯克氏菌科 (8.1%) 丰度次之。在科层面,D-半乳糖组肠杆菌科和气单胞菌科丰度显著性升高,梭菌科、A4b 科、双歧杆菌科和链孢囊菌科丰度显著性下降 (表 1)。

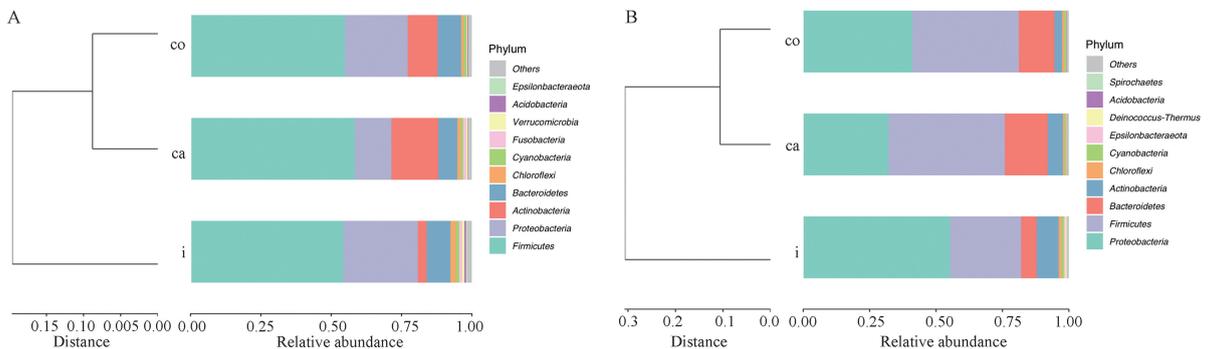


注:A:免疫组化显示 IL-18 的表达。B:阳性细胞数和平均光密度值统计分析,两组相比,\*\*  $P < 0.05$ 。

图 1 IL-18 在两组树鼯回肠、盲肠和结肠中的表达

Note. A, Immunohistochemistry of IL-18 expression. B, The positive cell area and average optical density values were analyzed statistically. \*\*  $P < 0.05$ , compared between the two groups.

Figure 1 Expression of IL-18 in the ileum, cecum, and colon of tree shrews in the two groups



注:A:正常组;B:D-半乳糖组。

图 2 门层面上 Barplot 聚类(各组均值)

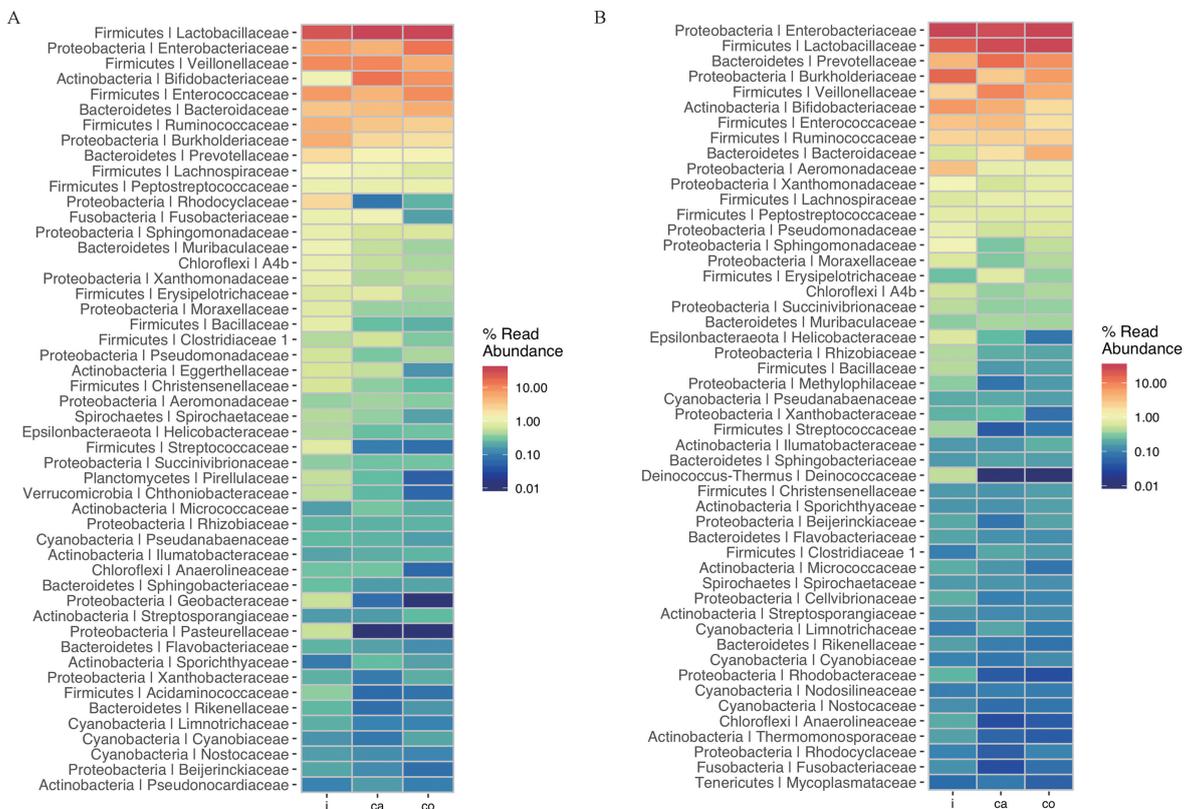
Note. A, Control group. B, D-galactose group.

Figure 2 Clustering at the phylum level (mean of each group)

### 2.3 肠道菌群多样性分析

比较正常组和 D-半乳糖组树鼩肠道菌群的 Alpha 多样性,计算 Chao1 指数和 Shannon 指数;分析

Beta 多样性的 PCoA 指数,发现两组树鼩 3 个肠段菌群的丰度 (Chao1 指数) 和多样性 (Shannon 指数) 和 PCoA 指数均没有显著性差异 ( $P>0.05$ ) (表 2)。



注:A:正常组;B:D-半乳糖组。

图 3 科水平相对丰度热图 (各组平均值)

Note. A, Control group. B, D-Galactose group.

Figure 3 Heatmap of relative abundance at the family level (mean of each group)

表 1 两组树鼩肠道相同部位有统计学差异的科 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Table 1 Families with statistical differences in the same parts of the two groups

部位 Parts	菌群 Flora	组别 Groups		P 值 P value
		正常组 Normal group	D-半乳糖组 D-galactose group	
回肠 Ileum	梭菌科 Clostridiaceae 1	0.46% ± 0.18%	0.10% ± 0.06%	0.030
	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	5.00% ± 1.80%	25.20% ± 6.80%	0.008
盲肠 Cecum	A4b 科	5.20% ± 0.20%	3.50% ± 0.70%	0.015
	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	14.10% ± 5.40%	29.20% ± 7.60%	0.049
结肠 Colon	双歧杆菌科 Bifidobacteriaceae	8.90% ± 3.30%	1.90% ± 2.80%	0.022
	气单胞菌科 Aeromonadaceae	0.34% ± 0.08%	0.90% ± 0.30%	0.024
	链孢囊菌科 Streptosporangiaceae	0.26% ± 0.0001%	0.13% ± 0.03%	0.001

表 2 不同部位两组 Alpha 多样性和 Beta 多样性指数比较( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 2 Comparison of alpha and beta diversity indexes between the two groups at different positions

多样性 Diversity	指标 Index	部位 Parts	组别 Groups		P 值 P value
			正常组 Normal group	D-半乳糖组 D-galactose group	
α 多样性 α diversity	Chao1 指数 Chao1 index	回肠 Ileum	42.63±19.89	36.43±5.28	0.63
		盲肠 Cecum	582.66±9.89	542.89±55.26	0.29
		结肠 Colon	729.15±1.39	636.03±2.14	0.56
	Shannon 指数 Shannon index	回肠 Ileum	4.16±0.64	4.29±0.59	0.16
		盲肠 Cecum	3.26±0.55	3.12±0.32	0.71
		结肠 Colon	3.37±0.62	3.29±0.30	0.85
β 多样性 β diversity	PCoA 指数 PCoA index	回肠 Ileum	0.13±0.06	0.29±0.21	0.27
		盲肠 Cecum	0.02±0.01	0.02±0.02	0.81
		结肠 Colon	-0.0002±0.003	0.001±0.0017	0.57

### 3 讨论

众多证据表明,肠道微生物群失调导致机体功能异常和疾病发生,例如溃疡性结肠炎<sup>[7]</sup>、腹泻型肠易激综合征<sup>[8]</sup>、慢性肾病<sup>[9]</sup>以及肠癌<sup>[10]</sup>等。D-半乳糖能引起结肠炎性细胞浸润,但是引起肠道炎症是否与肠道微生物群有关还未见报道。本研究选取菌群丰富的回肠、盲肠和结肠内容物,对树鼩肠道菌群 16S rDNA V4 区域进行高通量测序,构建正常树鼩与 D-半乳糖作用下树鼩肠道 3 个部位微生物的基因图谱,并进行了生物信息学分析。探索 D-半乳糖作用下树鼩肠道菌群与炎症因子 IL-18 的关系。

IL-18 在肠中主要由活化的巨噬细胞和上皮细胞产生,属于 Th1 型致炎性细胞因子,能促进 IL-1 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)产生,诱导 Th1 细胞产生干扰素- $\gamma$ ,促进 TNF- $\alpha$  和多种趋化因子,在机体免疫损伤过程中发挥重要作用<sup>[11]</sup>。IL-18 在溃疡性结肠炎小鼠结肠粘膜<sup>[12]</sup>表达升高。结肠炎性期间 IL-18 升高引发杯状细胞功能出现异常,进而引起粘液层的形成缺失,造成粘膜屏障破损,引发炎症<sup>[13]</sup>。本实验显示,D-半乳糖作用下树鼩回肠、盲肠和结肠粘膜 IL-18 的表达均明显升高,提示 D-半乳糖引起树鼩肠道的炎症反应。

肠道菌群中厚壁菌门可将葡聚糖、肽聚糖<sup>[14]</sup>、糖原<sup>[15]</sup>等肠道内宿主无法消化的多糖类物质分解为可消化的小分子糖类,促进宿主对营养物质的消化和吸收。有报道指出,短链脂肪酸是肠道菌群的主要代谢产物,大鼠肠道菌群失调,引起短链脂肪酸代谢障碍,进而影响短链脂肪酸受体(GPR43)的表达,从而导致血清中 IL-18 的表达升高<sup>[16]</sup>,与本研究结果相同。所以我们推测,本实验 D-半乳糖导致

树鼩肠道菌群紊乱,进而引发 IL-18 表达升高。

肠道中变形菌门丰度升高,其代谢产物脂多糖的产生增多,进而引起慢性代谢性内毒素血症,可导致肥胖、糖尿病和胰岛素抵抗发病率升高<sup>[17]</sup>。因此,变形菌门丰度升高,被认为是潜在的疾病诊断标志物以及肠道菌群紊乱的生物学标志物<sup>[18]</sup>。肠杆菌科(Enterobacteriaceae)可造成复杂腹腔内感染、急性肠胃炎、败血症等<sup>[19]</sup>。气单胞菌科(Aeromonadaceae)能够引起人和动物肠炎<sup>[20]</sup>,引发草鱼肠道炎性细胞浸润和肠绒毛融合肿胀<sup>[21]</sup>。双歧杆菌科(Bifidobacteriaceae)是肠道有益菌,能抑制病原菌繁殖,减少毒性代谢物产生。本实验发现,D-半乳糖作用下肠道菌群的结构发生显著改变,变形菌门(42.90%)上升为第 1 优势门。同时,树鼩盲肠和结肠的肠杆菌科丰度显著性升高,结肠中气单胞菌科显著性增加,双歧杆菌科丰度明显下降。提示 D-半乳糖作用下,树鼩肠道通过增加致炎性细菌及其毒性代谢产物,刺激肠黏膜炎症因子 IL-18 的表达,继而诱发肠道炎症反应。

综上所述,在树鼩小肠区域回肠段、大肠的盲肠、结肠组织中,D-半乳糖增加了炎症因子 IL-18 表达和肠道菌群紊乱。由此推测,树鼩肠道菌群失调促进肠道炎症反应,本研究为树鼩作为肠道菌群动物模型提供了基础数据。

### 参考文献:

- [1] Mu C, Yang Y, Zhu W. Gut microbiota: the brain peacekeeper [J]. Front Microbiol, 2016, 7: 345.
- [2] Malmuthuge N, Li M, Goonewardene LA, et al. Effect of calf starter feeding on gut microbial diversity and expression of genes involved in host immune responses and tight junctions in dairy calves during weaning transition [J]. J Dairy Sci, 2013, 96 (5): 3189-3200.

- [ 3 ] 李玉青,洪莉. 肠道菌群与儿科肠道炎症性疾病研究进展 [J]. 临床儿科杂志, 2016, 34(1): 59-63.
- [ 4 ] 花蕾,敬兆飞,靳家扬,等. 肠道菌群调控炎症微环境在结肠癌中的作用及机制研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(4): 625-629.
- [ 5 ] 赵斌,郭联斌,段武琼. 肠易激综合征血清炎症因子表达与肠道菌群变化的关系 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2019, 24(9): 1046-1049.
- [ 6 ] 郭玉倩,角建林,袁鑫,等. 树鼩大肠内容物细菌的群落多样性分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(9): 7-13,32.
- [ 7 ] 付小梅,杨超,刘婧,等. 法尼醇 X 受体在溃疡性结肠炎中的作用 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(6): 750-755.
- [ 8 ] 丁晓洁,孙喜灵,于晓飞,等. 乌梅丸对腹泄型肠易激综合征模型大鼠肠道菌群和炎症因子的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2019, 46(6): 1296-1299, 1345.
- [ 9 ] 张育彬,许建平. 慢性肾病患者肠道菌群特征及与微炎症因子水平的相关性 [J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(6): 703-706,711.
- [ 10 ] 孔宪斌,王方园,彭莹莹,等. 肠道菌群在炎症相关肠癌中的研究进展 [J]. 天津医药, 2019, 47(2): 207-212.
- [ 11 ] Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, et al. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2001, 12(1): 53-72.
- [ 12 ] 李富凤. 补中益气汤对溃疡性结肠炎肠道 NLRP3 炎性体活性的调控研究 [D]. 广州中医药大学, 2015.
- [ 13 ] Stam MR, Danchin EG, Rancurel C, et al. Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of  $\alpha$ -amylase-related proteins [J]. Protein Eng Des Sel, 2006, 19(12): 555-562.
- [ 14 ] Vollmer W, Joris B, Charlier P, et al. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases [J]. FEMS Microbiol Rev, 2008, 32(2): 259-286.
- [ 15 ] Leitch EC, Walker AW, Duncan SH, et al. Selective colonization of insoluble substrates by human faecal bacteria [J]. Environ. Microbiol, 2007, 9(3): 667-679.
- [ 16 ] 刘鸿飞,魏云林,卢磊磊,等. 短链脂肪酸受体 GPR43 的研究进展 [J]. 生命科学研究, 2014, 18(6): 557-564.
- [ 17 ] 姚虹,吕治,徐虎峰,苏建荣. 黄连素对艰难梭菌相关性腹泻小鼠肠道菌群的调节作用研究 [J]. 中国医刊, 2018, 53(1): 77-83.
- [ 18 ] Shin NR, Whont TW, Bae J. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota [J]. Trends Biotechnol, 2015, 33(9): 496-503.
- [ 19 ] 何晓华,顿玉慧,卢力,等. 环介导等温扩增技术在肠杆菌科致病菌检测中的研究进展 [J]. 食品科学, 2014, 35(19): 312-317.
- [ 20 ] Zhou Y, Yu L, Nan Z, et al. Taxonomy, virulence genes and antimicrobial resistance of *Aeromonas* isolated from extra-intestinal and intestinal infections [J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1): 158.
- [ 21 ] Kong WG, Li SS, Chen XX, et al. A study of the damage of the intestinal mucosa barrier structure and function of *Ctenopharyngodon idella* with *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish Physiol. Biochem, 2017, 43(5): 1223-1235.

[ 收稿日期 ] 2019-08-15