

骆驼奶对 DSS 诱导的小鼠急性肠炎的保护作用

崔畅婉, 于 淼, 王 爽, 吴 思, 孙峥嵘

(中国医科大学附属盛京医院生物样本库, 沈阳 110001)

[摘要] 目的 探究骆驼奶对葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的小鼠急性肠炎的保护作用。方法 6~8周龄雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 2 组, 对照组使用双蒸水灌胃, 实验组使用骆驼奶灌胃, 14 d 后经 3% DSS 水溶液自由饮用诱导建立急性肠炎模型。流式细胞术分析实验组和对照组免疫细胞比例, 酶联免疫吸附法测定细胞因子含量。结果 相对于双蒸水对照组, 骆驼奶实验组小鼠体质量下降缓慢($P < 0.05$), 生存率提高, 组织学评分下降($P < 0.05$), γ 干扰素(IFN- γ)阳性表达的辅助性 T 淋巴($CD4^+$ IFN- γ^+)细胞比例增加($P < 0.05$), 白细胞介素-17(IL-17)阳性表达的辅助性 T 淋巴($CD4^+$ IL-17 $^+$)细胞比例下降($P < 0.05$), 细胞培养上清液中 IFN- γ 增高($P < 0.05$), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和 IL-17 降低($P < 0.05$)。结论 骆驼奶可能通过调节 T 细胞分化和细胞因子分泌, 缓解 DSS 诱导的小鼠急性肠炎。

[关键词] 骆驼奶; 肠炎; 葡聚糖硫酸钠; 小鼠

[中图分类号] R392.8; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)03-0218-05

骆驼处于干旱的荒漠地区, 并能在如此恶劣环境中把盐碱含量高的粗硬植物转化为营养含量极高的乳、肉^[1]。骆驼奶中含有丰富的蛋白质, 而且对牛乳过敏的人不会对骆驼奶产生类似的过敏症状, 食用更安全^[2]。研究^[3]表明, 骆驼奶能够通过调节 T 细胞分化和细胞因子分泌, 纠正失衡的机体内环境, 在哮喘、糖尿病、肝炎的治疗过程中起到辅助作用。目前, 骆驼奶对炎性肠病患者肠道的黏膜免疫功能是否具有调节作用, 能否缓解肠道炎症的疾病进程, 其机制尚不明确。本实验采用葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)诱导的急性小鼠肠炎模型, 通过灌胃给药方式给予骆驼奶, 检测小鼠肠道淋巴细胞

分泌的细胞因子含量, 探讨骆驼奶对小鼠肠炎的影响, 有望为临床应用骆驼奶辅助治疗炎性肠病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、材料和试剂

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 32 只, 6~8 周龄, 16~18 g, 由华阜康生物科技有限公司提供[SCXK(京)2014-0004], 饲养于本单位实验动物设施[SYXK(辽)2013-0007]。DSS、Percoll 细胞分离液均购自美国 Sigma 公司, RPMI-1640 培养基购自美国 Gibco 公司, 抗鼠 CD4- 异硫氰酸荧光素(FITC)、CD44- 藻红蛋白(PE)、 γ 干扰素(IFN- γ)- 多甲藻黄素-叶绿素-蛋白质复合物(Percp)、白细胞介素 17 α (IL-17 α)- 藻蓝蛋白(APC)和 IL-4-Percp 均购自美国 BD 公司, 酶联免疫吸附试验试剂盒购自美国 R&D 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 生存率和体质量影响实验 20 只小鼠随机分为实验组和对照组各 10 只, 肠炎诱导前 14 d 持续进行灌胃操作。实验组每只小鼠灌胃骆驼奶

[收稿日期] 2019-05-15

[基金项目] 国家自然科学基金(81171581); 辽宁省高等学校基本科研项目(LFWK201710); 2018 年辽宁省重点研发计划指导项目(2018225009)

[作者简介] 崔畅婉(1991—), 女, 硕士, 技师, 主要从事黏膜免疫研究。E-mail: cuicw@sj-hospital.org

[通信作者] 孙峥嵘(1970—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事肠道免疫和病毒学研究。

E-mail: sunzr@sj-hospital.org

0.2 g/次(溶于200 μ L双蒸水),对照组小鼠灌胃双蒸水200 μ L/次,并于自由饮用DSS诱导肠炎时终止灌胃操作。实验组和对照组小鼠均在饮水水中注入3% DSS以诱导急性肠炎模型。开始饮用DSS诱导肠炎记为0 d,记录至对照组小鼠全部死亡共7 d。

1.2.2 肠炎炎症指标影响实验 12只小鼠随机分为实验组和对照组各6只,肠炎诱导前14 d持续进行灌胃操作,方法同1.2.1。实验组和对照组小鼠均以3% DSS诱导急性肠炎。前期预实验发现,DSS诱导5 d起实验组小鼠体质量与对照组比较差异有统计学意义,诱导6 d和7 d小鼠死亡率过高。因此在诱导5 d时以断颈法处死小鼠,并取结肠至肛门部位肠管进行后续病理学观察(HE染色)、流式细胞术实验和ELISA实验。

1.2.3 病理学观察 取0.5 cm肠管中段浸于体积分数10%的甲醛溶液中固定,并以梯度乙醇脱水,二甲苯透明,以及浸蜡制备蜡块。用切片机制片,厚度5 μ m,45 $^{\circ}$ C水浴展片,56 $^{\circ}$ C烘片,脱蜡并进行HE染色。病理学观察和评分判断炎性细胞浸润情况。上皮细胞评分:0,正常;1,部分杯状细胞损伤;2,大面积杯状细胞缺损;3,隐窝损伤;4,大面积隐窝缺失。浸润情况评分:0,正常;1,浸润隐窝基底;2,浸润至黏膜肌层;3,广泛浸润黏膜肌层,黏膜增厚,水肿明显;4,浸润达黏膜下层。组织学评分=上皮细胞评分+浸润情况评分。

1.2.4 提取小肠固有层淋巴细胞 断颈法处死小鼠,75%乙醇溶液消毒,沿腹中线剪开小鼠腹部皮肤及黏膜组织,取出肛门至盲肠段肠管并清洗干净,剪碎后转移到50 mL离心管中。向离心管中加入RPMI-1640培养液35 mL,37 $^{\circ}$ C培养20 min;用纱布过滤,转移至新的50 mL离心管中离心(3 000 r/min,2 min),弃去上清液并以8 mL 45%密度梯度分离液分离细胞,将细胞悬液慢慢加入已放入5 mL 66.6%硅石胶态悬浮液(Percoll)的15 mL离心管中离心(1 200 r/min,15 min);回收上清液,并用RPMI-1640细胞培养液重悬。

1.2.5 流式细胞术分析 向小鼠肠黏膜固有层淋巴细胞培养上清液中加入丙二醇甲醚醋酸酯(PMA,

25 ng/mL)、离子霉素(ionomycin,1 μ g/mL)以及布雷非德菌素A(brefeldin A,10 μ g/mL),在37 $^{\circ}$ C刺激培养5 h后回收细胞,加入CD4-FITC和CD44-PE进行表面染色,之后将细胞破膜固定,再分别加入IFN- γ -Percp、IL-17-APC和IL-4-Percp,4 $^{\circ}$ C孵育30 min,之后5 500 r/min离心1 min,弃掉上清液后重悬。用流式细胞仪进行检测,使用FlowJo 7.6软件进行分析。

1.2.6 酶联免疫吸附试验 将 2×10^5 个/mL小鼠黏膜固有层淋巴细胞接种于包被了抗CD3单克隆抗体的细胞培养板(200 μ L/孔),加抗CD28单克隆抗体并培养48 h,加捕获抗体过夜;第2日封闭后加入标准品和样品50 μ L/孔,室温避光2 h;加入检测抗体后,加辣根过氧化物酶50 μ L/孔,避光20 min;加入底物后20 min加终止液,上机检测吸光度。

1.3 统计学处理

采用SPSS 20.0统计软件处理各实验数据,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

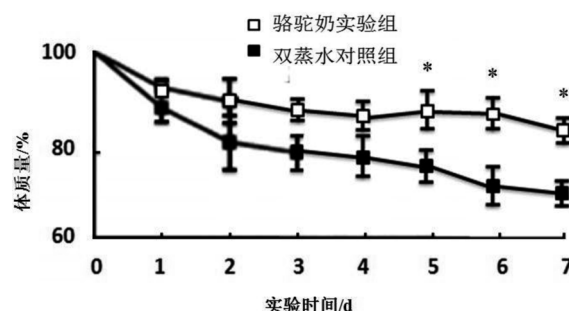
2 结果

2.1 骆驼奶提高肠炎小鼠生存质量

实验组小鼠体质量下降缓慢,平均体质量高于对照组($P < 0.05$)(图1)。诱导7 d对照组小鼠均死亡,而实验组小鼠仍然有生存(图2)。

2.2 骆驼奶减轻DSS诱导的小鼠肠道炎性反应

实验组和对照组小鼠结肠均出现上皮结构不完整,隐窝消失及炎细胞浸润,但实验组小鼠



与对照组比较, * $P < 0.05$, $n = 6$ 。

图1 小鼠经DSS诱导的体质量变化

Figure 1 Changes of body weight of mice induced by DSS

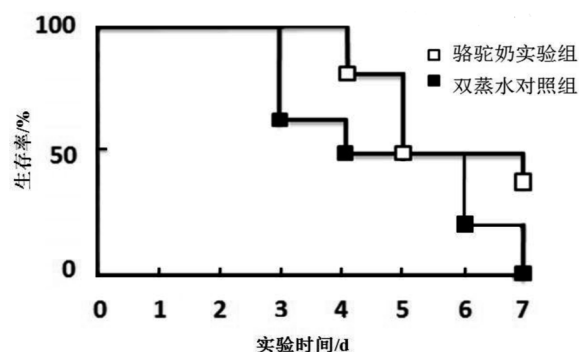


图2 经DSS诱导的急性肠炎小鼠生存率

Figure 2 Survival rate of acute colitis mice induced by DSS

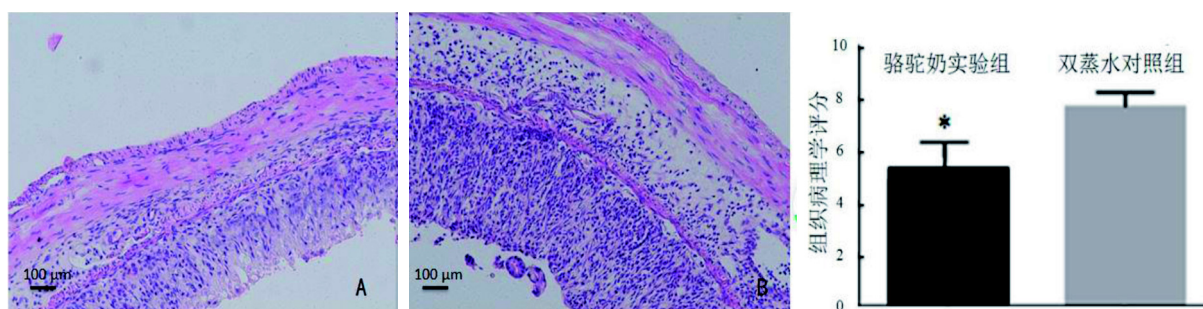
A: 实验组; B: 对照组; 与双蒸水对照组比较, * $P<0.05$, $n=6$ 。

图3 DSS诱导急性肠炎小鼠结肠HE染色及病理组织评分

Figure 3 HE staining and pathological tissue score of colon in acute colitis mice induced by DSS

表1 小鼠结肠黏膜固有层细胞培养上清液中IFN- γ 、IL-17和TNF- α 含量Table 1 Levels of IFN- γ , IL-17 and TNF- α in the supernatant of lamina propria cells of mouse colon mucosa

组别	[$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$, $\bar{x} \pm s$]		
	IFN- γ	IL-17	TNF- α
对照组	11.64 $\pm$ 1.48	14.73 $\pm$ 1.59	0.82 $\pm$ 0.04
实验组	17.35 $\pm$ 2.02*	10.86 $\pm$ 0.71*	0.46 $\pm$ 0.03*

注: 与双蒸水对照组比较, * $P<0.05$ 。

3 讨论

炎性肠病近年来发病率持续上升, 发病机制包括环境、遗传和免疫等多种因素。目前, 临床治疗多以水杨酸制剂、激素类以及免疫抑制剂治疗为主, 长期使用的不良反应明显, 因此探究新的治疗手段具有重要意义。炎性肠病与Th1/Th2细胞比例失衡有关, Th1细胞是Th0细胞在IL-12等细胞因子作用下分化而成, 主要分泌IL-2、IFN- γ 和TNF- α 。Th17细胞可分泌的细胞因子包

括IL-17A、IL-17F和IL-21等, 在多种自身免疫性疾病中起促炎作用^[4]。研究^[5]显示, 骆驼奶中不饱和脂肪酸比例较牛奶高, 机体不饱和脂肪酸含量与糖尿病发生率呈负相关, 糖尿病患者中TNF- α mRNA呈增高趋势, 饮用骆驼奶可降低体内TNF- α 的含量, 进而改善糖尿病患者糖脂代谢紊乱症状。骆驼奶中具有抗癌活性成分, 研究证实, 饮用骆驼奶可抑制多种癌细胞的增殖, 如人乳腺癌、喉癌等^[6-7]。骆驼奶中含有的乳铁蛋白和溶菌酶可以通过直接抑制病原体入侵感染, 增强局部Th1反应, 从而增强免疫调节功能^[8-9]。骆驼奶及其奶制品中含有双歧杆菌和乳酸杆菌等益生菌。双歧杆菌和乳酸杆菌能够抑制Th2型细胞增殖, 促进Th1型细胞增殖, 并且有利于丝状细菌、梭状芽胞杆菌和脆弱类杆菌生长, 从而增加调节性T细胞免疫应答^[10-11]。

目前, 建立炎性肠病动物模型的方法主要是通过外源性化学物质诱导, 包括恶唑酮、三硝基

苯磺酸及 DSS^[12-13]。本研究以 DSS 诱导的 C57BL/6 小鼠肠炎模型为研究对象,模拟人肠道环境,探究骆驼奶对肠道黏膜免疫的影响。与双蒸水对照组比较,骆驼奶实验组小鼠体质量下降缓慢,生存率提高,组织学评分下降,表明骆驼奶对小鼠急性肠炎有缓解作用。流式细胞术胞内染色结果显示,骆驼奶能促进 Th1 型细胞分化,抑制 Th17 型细胞分化。Th17 及其分泌的 IL-17 是促进自身免疫性疾病发病的重要因素,炎症性肠病患者血清中 Th17 水平较正常人高,并与病程呈正相关^[14-15]。灌胃骆驼奶抑制 Th17 细胞分化,证明骆驼奶通过调节 T 细胞亚群增殖和分化,缓解肠炎症状。Th1 型细胞能够辅助细胞毒性 T 细胞分化,进而介导细胞免疫应答。溃疡性结肠炎部分患者的肠道黏膜中 Th1/Th2 比例失衡。本实验证明骆驼奶促进 Th1 型细胞分化,上调其分泌的细胞因子 IFN- γ 水平,有助于缓解疾病进展。酶联免疫吸附试验结果显示,小鼠肠黏膜固有层细胞分泌 IL-17 和 TNF- α 水平降低,而 IFN- γ 水平升高。IFN- γ 具有免疫调控作用,它可以调控多个基因表达水平,增强自然杀伤细胞活性^[16],而这些作用在人胃肠道稳态维持过程中起重要作用。灌胃骆驼奶后,小鼠体内 IFN- γ 水平增高而 IL-17 和 TNF- α 水平下降,证明骆驼奶能够调节小鼠肠道细胞因子分泌,进而缓解肠炎进展,为骆驼奶辅助临床治疗炎性肠病提供了新的依据。

综上所述,本研究证明,骆驼奶能够调节 DSS 诱导的急性肠炎小鼠肠道黏膜免疫细胞的比例,促进 Th1 细胞分化,抑制 Th17 细胞分化,促进细胞因子 IFN- γ 分泌,抑制 IL-17 和 TNF- α 的分泌。本研究结果为骆驼奶临床辅助治疗炎性肠病提供了新的可能性。

参考文献:

- [1] Shariatikia M, Behbahani M, Mohabatkar H. Anticancer activity of cow, sheep, goat, mare, donkey and camel milks and their caseins and whey proteins and in silico comparison of the caseins [J]. Mol Biol Res Commun, 2017, 6(2): 57-64.
- [2] Hailu Y, Hansen EB, Seifu E, et al. Functional and technological properties of camel milk proteins: a review [J]. J Dairy Res, 2016, 83(4):422-429.
- [3] Badawy AA, El-Magd MA, AlSadrah SA. Therapeutic effect of camel milk and its exosomes on MCF7 cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Integr Cancer Ther, 2018, 17(4):1235-1246.
- [4] Faghih M, Rostami-Nejad M, Amani D, et al. Analysis of IL17A and IL21 expression in the small intestine of celiac disease patients and correlation with circulating thioredoxin level[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2018, 22(9):518-525.
- [5] Mirmiran P, Ejtahed HS, Angoorani P, et al. Camel milk has beneficial effects on diabetes mellitus: a systematic review [J]. Int J Endocrinol Metab, 2017, 15(2):11-15.
- [6] Hasson SS, Al-Busaidi JZ, Al-Qarni ZA, et al. *In vitro* apoptosis triggering in the BT-474 human breast cancer cell line by lyophilised camel's milk[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(15):6651-6661.
- [7] Habib HM, Ibrahim WH, Schneider-Stock R, et al. Camel milk lactoferrin reduces the proliferation of colorectal cancer cells and exerts antioxidant and DNA damage inhibitory activities[J]. Food Chem, 2003, 141(1):148-152.
- [8] Uversky VN, El-Fakharany EM, Abu-Serie MM, et al. Divergent anticancer activity of free and formulated camel milk alpha-lactalbumin[J]. Cancer Invest, 2017, 35(9):610-623.
- [9] Alhaider AA, Abdel Gader AG, Almeshaal N, et al. Camel milk inhibits inflammatory angiogenesis via downregulation of proangiogenic and proinflammatory cytokines in mice [J]. APMIS, 2014, 122(7):599-607.
- [10] Pasternak B, Svanström H, Schmiegelow K, et al. Use of azathioprine and the risk of cancer in inflammatory bowel disease[J]. Am J Epidemiol, 2013, 177(11):1296-1305.
- [11] Huang VW, Prosser C, Kroeker KI, et al. Knowledge of fecal calprotectin and infliximab trough levels alters clinical decision-making for IBD outpatients on maintenance infliximab therapy[J]. Inflamm Bowel Dis, 2015, 21:1359-1367.
- [12] Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity[J]. Nat Med, 2002, 8(6): 567-573.
- [13] Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice[J]. Gastroenterology, 1990, 98 (3): 694-702.
- [14] Ahluwalia B, Moraes L, Magnusson MK, et al. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies[J]. Scand J Gastroenterol, 2018, 53(4): 379-389.
- [15] Lin H, Chen R, Jiang X, et al. Elevated fibrinogen like protein 2 in TNBS induced colitis mice: Association with Th17 and

regulatory T cells[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(3):3445-3454.
[16] Domeier PP, Chodisetti SB, Soni C, et al. IFN- γ receptor and

STAT1 signaling in B cells are central to spontaneous germinal center formation and autoimmunity[J]. J Exp Med, 2016, 213(5):715-732.

Protective Effect of Camel Milk on DSS-induced Acute Colitis in Mice

CUI Changwan, YU Miao, WANG Shuang, WU Si, SUN Zhengrong

(BioBank, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of camel milk on the acute colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS) in mice. **Methods** Male C57BL/6 mice (6-8 weeks) were randomly divided into 2 groups: the mice were treated by intragastric administration of double distilled water as the control group, and the experimental group were given with camel milk. After 14 d, 3% DSS was used to induce acute colitis in mice. Flow cytometry was used to analyze the proportion of immune cells. Cytokines were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared to the control group, the mice with camel milk treatment showed slow weight loss ($P<0.05$), improved survival rate, decline in histological score ($P<0.05$). In the experimental group, the percentage of interferon- γ (IFN- γ) positively expressed T lymphocytes (CD4⁺IFN- γ ⁺) increased ($P<0.05$), while the percentage of interleukin-17 (IL-17) positively expressed T lymphocytes (CD4⁺IL-17⁺) decreased ($P<0.05$). The expression levels of IL-17 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were reduced ($P<0.05$), and the expression of IFN- γ was increased in the cell culture supernatant of the experimental group ($P<0.05$). **Conclusion** Camel milk can relieve the progression of acute colitis induced by DSS by regulating the differentiation of T cells and the secretion of cytokines.

[Key words] Camel milk; Colitis; Dextran sodium sulfate; Mice