

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.06.0528

论著

Akkermansia muciniphila 上清通过抑制内质网应激改善小肠黏膜损伤

张丽君¹, 袁俊婕¹, 赵经文^{1,2}, 陈鑫^{1,2}

(1.天津医科大学总医院消化科, 天津 300052; 2.天津市消化疾病研究所, 天津市消化病学重点实验室, 天津 300052)

摘要 目的:探究 *Akkermansia muciniphila*(AKK)上清对非甾体类抗炎药(NSAIDs)导致小肠黏膜损伤的干预效果及作用机制。方法:将 18 只 C57BL/6 小鼠(6~8 周龄)采用随机数字表法随机分为 3 组:正常对照组(CON 组)、造模组(INDO 组)、干预组(INDO+AKK 组),每组 6 只。INDO 组使用吲哚美辛构建 NSAIDs 小肠损伤模型,INDO+AKK 组使用 AKK 上清灌胃。采集各组肠道标本,常规苏木精-伊红(HE)染色观察黏膜屏障形态,免疫组织化学染色法(IHC)观察黏膜屏障指标咬合蛋白(Occudin)、闭锁小带蛋白(ZO1)、黏蛋白 2(MUC2)的表达水平。采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)从 mRNA 水平验证 MUC2、葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、X 盒结合蛋白 1(XBP1s)、C/EBP 坏死因子相关蛋白(CHOP)、激活转录因子 4(ATF4)、激活转录因子 6(ATF6)、真核翻译起始因子 2 α 激酶 3(PERK)等基因的表达变化。结果:小肠组织 HE 染色观察发现,与 CON 组相比,INDO 组出现小肠黏膜结构破坏、绒毛明显减少等特征。INDO+AKK 组小肠黏膜损伤减轻、绒毛丧失现象减少、黏膜及其下层的炎症细胞浸润区域也显著减小。IHC 分析显示,与 INDO 组相比,INDO+AKK 组 Occudin($F=11.48, P<0.05$)、ZO1($F=68.10, P<0.001$)、MUC2($F=19.93, P<0.01$)表达水平增加。PAS 结果显示,INDO+AKK 组杯状细胞数量相对于 INDO 组明显增加($F=205.9, P<0.001$)。qRT-PCR 结果发现,与 INDO 组相比,INDO+AKK 组 MUC2 的基因($F=23.67, P<0.01$)表达水平升高,GRP78($F=7.869, P<0.01$)、CHOP($F=11.45, P<0.05$)、XBP1s($F=8.344, P<0.05$)、ATF4($F=16.37, P<0.001$)、ATF6($F=12.99, P<0.001$)、PERK($F=11.58, P<0.01$)的基因表达水平均下降。结论:AKK 上清通过抑制内质网应激,改善 NSAIDs 诱导的小肠黏膜屏障损伤。

关键词 AKK 上清;内质网应激;NSAIDs;小肠黏膜损伤

中图分类号 R574.5

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)06-0528-07

Akkermansia muciniphila supernatant improves intestinal mucosal injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress

ZHANG Lijun¹, YUAN Junjie¹, ZHAO Jingwen^{1,2}, CHEN Xin^{1,2}

(1.Department of Gastroenterology and Hepatology, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2.Tianjin Institute of Digestive Diseases, Tianjin Key Laboratory of Digestive Diseases, Tianjin 300052, China)

Abstract Objective: To investigate the effect and mechanism of *Akkermansia muciniphila* (AKK) supernatant on intestinal mucosal injury induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **Methods:** Eighteen C57BL/6 mice (6–8 weeks of age) were randomly divided into three groups by random number table method: normal control group (CON), modeling group (INDO) and intervention group (INDO+AKK), with 6 mice in each group. INDO group was treated with Indomethacin to establish the small intestine injury model of NSAIDs, INDO+AKK group was treated with AKK supernatant by oral gavage. Intestinal samples of each group were collected, and mucosal barrier morphology was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, mucosal barrier indexes occudin, zona occlusa (ZO1), and mucin 2 (MUC2) were observed by immunohistochemical staining (IHC), and goblet cell number was observed by periodic Schiff (PAS) staining. Real-time quantitative fluorescent PCR (qRT-PCR) was used to verify the expression changes of MUC2, glucose regulatory protein 78 (GRP78), X-box binding protein 1 (XBP1s), C/EBP necrosis factor related protein (CHOP), activated transcription factor 4 (ATF4), activated transcription factor 6 (ATF6), and eukaryotic translation initiation factor 2 α kinase 3 (PERK). and other genes at mRNA level. **Results:** HE staining of small intestine tissue revealed that compared with CON group, INDO group showed damage of intestinal mucosal structure and reduced villi. In the INDO+AKK group, the damage of small intestinal mucosa and the loss of villi were reduced, and the areas infiltrated by inflammatory cells in the mucosa and its sublayer were also significantly reduced. IHC analysis showed that Occudin ($F=11.48, P<0.05$), ZO1 ($F=68.10, P<0.001$) and MUC2 ($F=19.93, P<0.01$) expression levels were increased in INDO+AKK group compared with INDO group. PAS results showed that the number of goblet cells in INDO+AKK group was significantly increased compared with INDO group ($F=205.9, P<0.001$). The results of qRT-PCR showed that

基金项目 天津市卫生健康科技项目(TJWJ2021MS005)

作者简介 张丽君(1997-),女,硕士,研究方向:上消化道疾病小肠损伤;通信作者:陈鑫, E-mail: xchen03@tmu.edu.cn。

compared with the INDO group, the expression level of MUC2 gene ($F=23.67, P<0.01$) was increased in the INDO+AKK group, GRP78 ($F=7.869, P<0.01$), CHOP ($F=11.45, P<0.05$), XBP1s ($F=8.344, P<0.05$), ATF4 ($F=16.37, P<0.001$), ATF6 ($F=12.99, P<0.001$), PERK ($F=11.58, P<0.01$) were all decreased. **Conclusion:** AKK supernatant can ameliorate NSAIDs induced intestinal mucosal barrier injury by inhibiting ER stress.

Key words AKK supernatant; endoplasmic reticulum stress; NSAIDs; intestinal mucosal injury

非甾体抗炎药(NSAIDs)是世界上使用最广泛的药物之一,也是一类经典的解热、镇痛、抗炎药物。近几年,越来越多的研究证实,NSAIDs 相关下消化道损伤发病率逐渐升高^[1-2]。在长期服用 NSAIDs 的患者中,71%出现了小肠损伤^[3]。

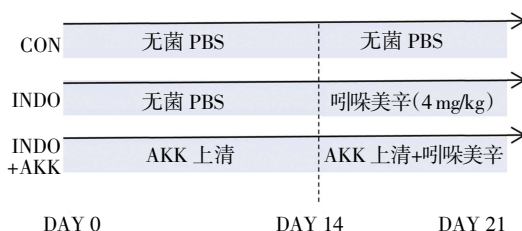
Akkermansia muciniphila(AKK)是一种以黏蛋白作为唯一碳源、氮源、能量来源的益生菌,能够通过促进黏液分泌、增加杯状细胞数量和诱导干细胞向分泌细胞的分化来改善肠道屏障功能^[4]。由肠道杯状细胞产生的 MUC2 黏蛋白是肠道黏膜屏障的主要成分。MUC2 在杯状细胞核糖体中翻译形成 MUC2 单体,转移至内质网并通过分子间二硫键结合成二聚体,进一步转移至高尔基体进行 O 型糖基化^[5-6]。当黏蛋白发生异常折叠并在内质网中积聚时,会引发内质网应激。

在此意义上,本研究通过利用吲哚美辛构建 NSAIDs 小肠损伤的动物模型,探究 AKK 上清对 NSAIDs 相关小肠损伤的干预效果及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型 使用 C57BL/6J 雄性小鼠 18 只,6~8 周龄,体重 18~20 g,体重差不超过 2 g,小鼠由北京华阜康生物科技有限公司提供(动物批号:SYXK 津202000010)。将小鼠置于合适的温度(约 25℃)和光照(12 h 的光照/黑暗)下,自由进食、饮水。垫料每两天换 1 次。在适应环境 1 周后进行实验干预。所有动物实验均经中国医学科学院放射医学研究所批准(伦理号:IRM-DWLL-2022244),并按照《实验动物护理和使用指南》进行。

将 18 只小鼠通过随机数字表法分为空白对照组(CON 组)、吲哚美辛组(INDO 组)、上清+吲哚美辛组(INDO+AKK 组),每组 6 只。每天测定各组小鼠的体重和摄食量。CON 组连续 21 d 每天灌胃无菌 PBS 0.2 mL;INDO 组前 14 d 每天灌胃无菌 PBS 0.2 mL,后 7 d 灌胃吲哚美辛混悬液(4 mg/kg) 0.2 mL;INDO+AKK 组前 14 d 每天灌胃 AKK 上清液 0.2 mL,后 7 d 每天给予 AKK 上清液和吲哚美辛混悬液(4 mg/kg)各 0.2 mL。小鼠在第 21 天处死,见图 1。



注:CON:空白对照组;INDO:吲哚美辛组;INDO+AKK:吲哚美辛加 AKK 上清组

图 1 动物模型的构建

Fig.1 Construction of the animal model

1.2 菌株上清的制备 AKK 菌株购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC),鉴定号 CICC 24917。该菌株用液体培养基储存在-80℃冻存管中。将 AKK 菌株接种于脑心浸液肉汤培养基中,在恒温 37℃厌氧条件下培养。孵育 48 h 后,收集细菌培养物,在 10 000×g、4℃下离心 60 min,弃去沉淀,用 0.22 μm 过滤器过滤上清液,去除残留的细菌碎片和杂质后得到 AKK 上清。

1.3 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR) 使用 Trizol (Vazyme)从小鼠小肠组织中提取 RNA,使用 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (Vazyme)反转录成 cDNA,使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master MIX (Vazyme)进行实时定量分析,qRT-PCR 反应条件为:预变性阶段:95℃,30 s;循环反应阶段:95℃,10 s;60℃,30 s;循环次数为 40;溶解曲线阶段:95℃,15 s;60℃,60 s;95℃,15 s。通过 2^{-ΔΔCT} 方法计算靶基因 mRNA 的相对表达量。引物序列由 GENEWIZ 生物技术公司合成。各基因引物序列如表 1 所示。

1.4 免疫组织化学染色 处死小鼠后,将小肠组织包埋于石蜡中,用多聚甲醛固定 24 h 后切片。将切片在 EDTA 溶液中加热,煮沸后用流水冷却,PBS 洗涤。将内源性过氧化物酶阻断剂(3%过氧化氢溶液)滴入样品片中,室温避光培养 15 min,PBS 洗涤。BSA 密封在室温下 1 h。一抗(1:500)4℃孵育过夜,二抗(1:1 000)37℃孵育 1 h,PBST 洗涤 30 min。用 DAB 工作液显色,脱水后封片。所有组织学图像均使用全景扫描仪捕获。

表 1 引物序列
Tab.1 Sequences of primer

基因	引物序列(5'→3')	引物大小(bp)
GAPDH	F: GGAGAAACCTGCCAAGTATG	126
	R: TGGGAGTTGCTGTTGAAGTC	
GRP78	F: TGTCTTCTCAGCATCAAGCAAGG	260
	R: CCAACACTTCCTGGACAGGCTT	
CHOP	F: GGAGTCTCTGCTCAGATGAA	120
	R: GCTCCTGTCAGCCAAGCTAG	
MUC2	F: ATGCCACCTCCTCAAAGAC	101
	R: GTAGTTTCCGTTGGAACAGTGAA	
XBPIs	F: CCAACACTTCCTGGACAGGCTT	160
	R: TAGACCTCTGGGAGTTCTCCA	
ATF6	F: GTCCAAAGCGAAGAGCTGTCTG	138
	R: AGAGATGCCTCCTCTGATTGGC	
ATF4	F: AACCTCATGGGTCTCCAGCGA	125
	R: CTCCAACATCCAATCTGTCCCG	
PERK	F: CCGATGTCAGTGACAACAGCTG	115
	R: AAGACAACGCCAAAGCCACCAC	

注: GAPDH: 内参基因; GRP78: 葡萄糖调节蛋白 78; CHOP: C/EBP 坏死因子相关蛋白; MUC2: 黏蛋白 2; XBPIs: X 盒结合蛋白 1; ATF6: 激活转录因子 6; ATF4: 激活转录因子 4; PERK: 真核翻译起始因子 2α 激酶 3

1.5 苏木精-伊红(HE)染色 将小肠组织固定于 4%多聚甲醛溶液中 48 h 后进行脱水、透明包埋和切片处理。将石蜡切片进行 3 次二甲苯洗涤,每次 8 min,然后将切片按顺序置于梯度浓度(无水、95%、80%、75%)酒精中,每次 5 min。接着使用超纯水洗涤 3 次,进行水化处理。吸取苏木精染液,将染液滴加到组织块部位,染色 5 min,染色结束后使用自来水轻轻冲洗切片 2 min,水流避开组织块部位。将

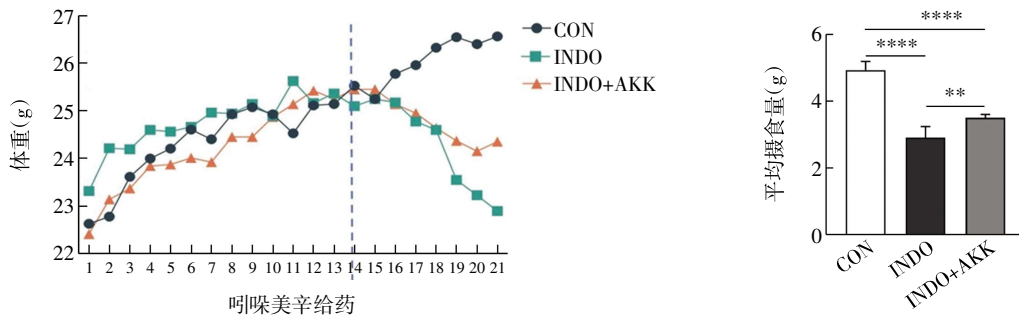
1%盐酸酒精滴加到组织块部,然后切片使用自来水洗涤 2 min。伊红染液染色 2 min,然后自来水轻轻冲洗伊红染液。依次经过 95%、无水酒精脱水后,用二甲苯透明处理,然后滴加中性树胶封片固定。

1.6 高碘酸希夫(PAS)染色 石蜡切片脱蜡复水后,将处理好的切片放入 PAS 染色液中浸泡 5~10 min。将染色后的切片放入蒸馏水中洗脱,去除多余的染色液,使用浓度递增的乙醇(70%、95%、100%)进行脱水处理,每个浓度的乙醇中浸泡片段 5~10 min,然后进行脱水、透明、封片处理。

1.7 统计学处理 本研究采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析。符合正态分布的计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AKK 上清干预改善小肠损伤的一般状况 CON 组体重从(22.60±0.96) g 逐渐增加到(26.60±0.89) g, INDO 组在给药后体重由(25.10±1.53) g 逐步下降至(22.90±0.62) g,且第 4 天时出现明显下降且下降趋势持续至造模结束。INDO+AKK 组体重在给药起始阶段也有下降趋势,从(25.40±0.93) g 下降至(24.60±1.05) g,但与 INDO 组相比,第 5 天起体重下降趋势明显得到控制,最终体重稳定在(24.40±1.53) g。3 组平均摄食量的差异有统计学意义(F=101.3, P<0.000 1),其中 INDO 组 21 d 平均摄食量与 CON 组相比从(4.94±0.24) g 减少至(2.92±0.31) g (P<0.000 1),而 INDO+AKK 组 21 d 平均摄食量[(2.92±0.31) g]与 INDO 组[(3.51±0.09) g]相比增加(P<0.01),见图 2。



注: CON: 空白对照组; INDO: 吡啶美辛组; INDO+AKK: 吡啶美辛加 AKK 上清组; **P<0.01, ****P<0.000 1

图 2 各组小鼠体重和平均摄食量

Fig.2 Body weight and average food intake of mice in each group

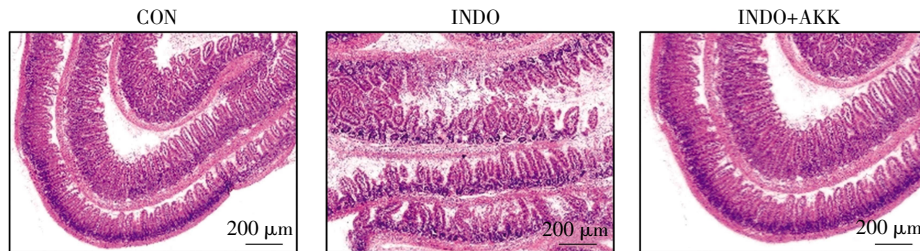
2.2 AKK 上清干预改善小肠损伤的组织学改变 小肠组织的病理结果呈现明显异常,与 CON 组相比,INDO 组出现小肠黏膜结构被破坏,肠上皮细胞大量丧失,绒毛遭受破坏、消失或者呈现不规则变形与缩短等现象。此外,小肠隐窝结构受到影响,出

现变形并带有一定程度的损伤。黏膜表面出现了糜烂、溃疡等病变,部分黏膜出现脱落坏死。黏膜及其下层出现大量炎症细胞浸润,呈典型的炎症特征。INDO+AKK 组上述病理改变明显缓解。小肠黏膜损伤减轻,绒毛丧失现象减少,黏膜及其下层的炎症

细胞浸润区域也显著减小且更为局限,见图3。

2.3 AKK上清干预改善了小肠屏障功能 小肠组织中支架蛋白 ZO1 的表达水平在 CON 组、INDO 组与 INDO+AKK 组中存在差异($F=68.10, P<0.0001$), CON 组与 INDO+AKK 组表达水平高, INDO 组表达水平低。其中 INDO 组支架蛋白 ZO1 的表达明显低于 CON 组($P<0.001$), INDO+AKK 组支架蛋白 ZO1 的表达水平与 CON 组相比无明显差异($P>0.05$),而

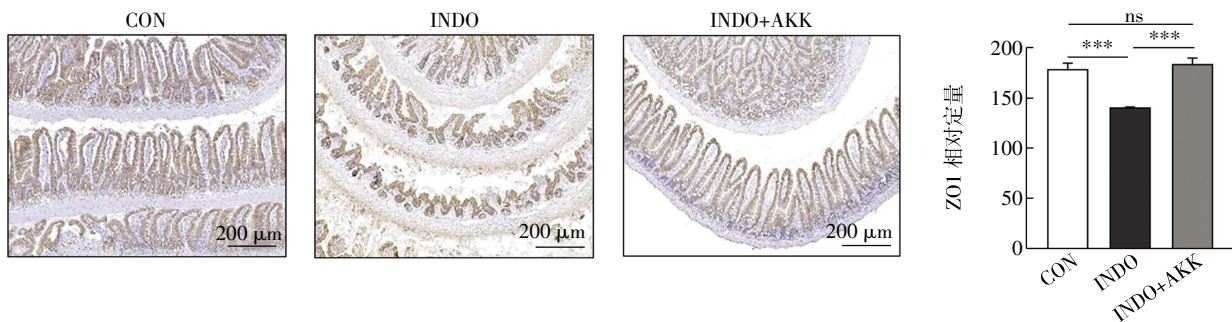
INDO+AKK 组支架蛋白 ZO1 的表达水平与 INDO 组相比增加($P<0.001$),见图4;3组小肠组织中膜整合蛋白 Occludin 表达水平差异具有统计学意义($F=11.48, P<0.01$), CON 组与 INDO+AKK 组表达水平高, INDO 组表达水平低。其中 INDO 组膜整合蛋白 Occludin 的表达水平低于 CON 组($P<0.01$), INDO+AKK 组与 CON 组相比无明显差异($P>0.05$),而 INDO+AKK 组与 INDO 组相比增加($P<0.05$),见图5。



注:CON:空白对照组;INDO:吡喹酮组;INDO+AKK:吡喹酮加 AKK 上清组

图3 各组小鼠小肠组织形态学改变(HE,5×)

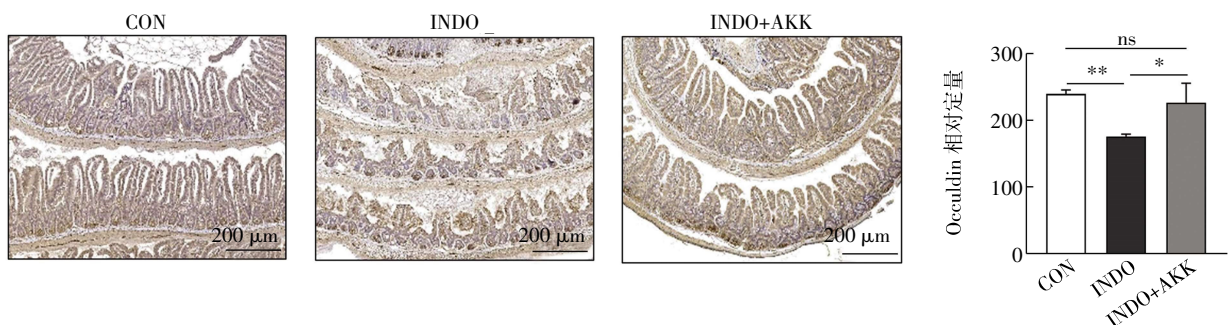
Fig.3 The histological changes in mouse small intestine tissues of each group (HE,5×)



注:CON:空白对照组;INDO:吡喹酮组;INDO+AKK:吡喹酮加 AKK 上清组;ZO1:闭锁小带蛋白1;*** $P<0.001$, ns: $P>0.05$

图4 ZO1 在小肠组织的表达

Fig.4 Expression of ZO1 in small intestine tissues



注:CON:空白对照组;INDO:吡喹酮组;INDO+AKK:吡喹酮加 AKK 上清组;Occludin:咬合蛋白;* $P<0.05$, ** $P<0.01$, ns: $P>0.05$

图5 Occludin 在小肠组织的表达

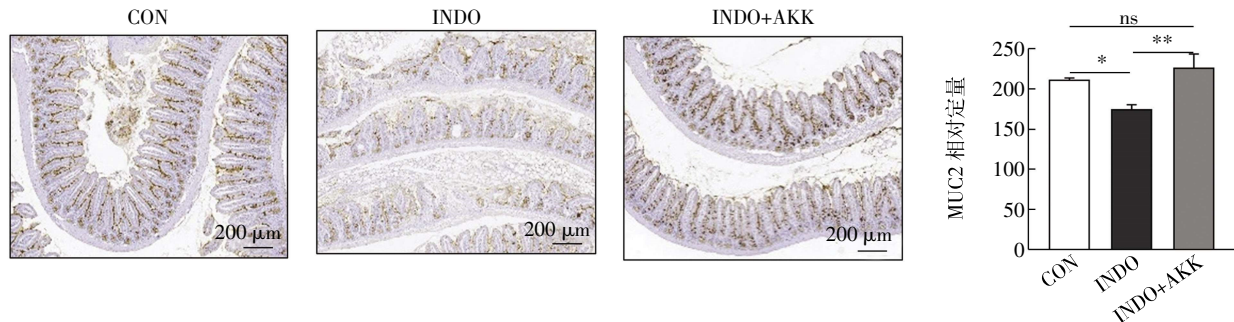
Fig.5 Expression of Occludin in small intestine tissues

免疫组化结果显示,小肠组织中 MUC2 的表达水平在 CON、INDO、INDO+AKK 组中存在差异($F=19.93, P<0.01$), CON 组与 INDO+AKK 组表达水平高, INDO 组表达水平低。相较于 CON 组, INDO 组小肠组织中 MUC2 的表达水平下降($P<0.05$), IN-

DO+AKK 组表达水平无明显变化($P>0.05$)。相较于 INDO 组, INDO+AKK 组 MUC2 表达量增加($P<0.01$),见图6。此外, PAS 染色结果显示,在 CON、INDO 与 INDO+AKK 组中, 小肠杯状细胞的数量存在明显差异($F=205.9, P<0.0001$), CON 组与 INDO+AKK 组

中杯状细胞数量多,INDO 组中杯状细胞数量少。与 CON 组相比,INDO 组杯状细胞数量减少($P<0.001$),INDO+AKK 组数量增加($P<0.0001$)。与INDO 组相比,INDO+AKK 组杯状细胞数量明显增加($P<0.001$),见图7。进一步 qRT-PCR 结果显示,小肠组织中 MUC2 mRNA 的表达水平与免疫组化的结果

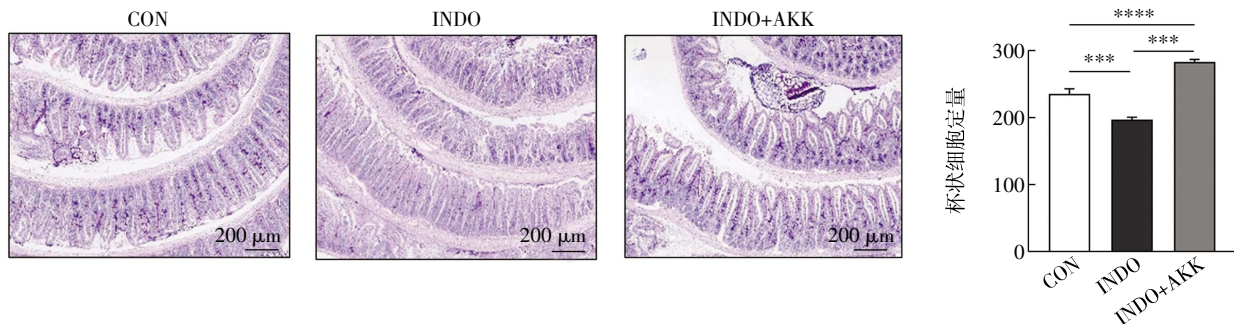
趋势一致,3 组小肠组织中 MUC2 mRNA 的表达水平差异有统计学意义($F=23.67, P<0.001$)。与 CON 组相比,INDO 组 MUC2 mRNA 的表达水平降低($P<0.001$),INDO+AKK 组 MUC2 mRNA 的表达水平无明显变化($P>0.05$)。与 IND0 组相比,INDO+AKK 组 MUC2 mRNA 的表达水平明显增加($P<0.01$),见图8。



注:CON:空白对照组;INDO:吡喹酮组;INDO+AKK:吡喹酮加 AKK 上清组;MUC2:黏蛋白 2; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, ns: $P>0.05$

图6 MUC2 在小肠组织的表达

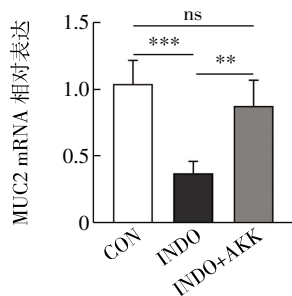
Fig.6 Expression of MUC2 in small intestine



注:CON:空白对照组;INDO:吡喹酮组;INDO+AKK:吡喹酮加 AKK 上清组;*** $P<0.001$, **** $P<0.0001$

图7 小肠组织中杯状细胞的数量

Fig.7 The number of goblet cells in small intestine



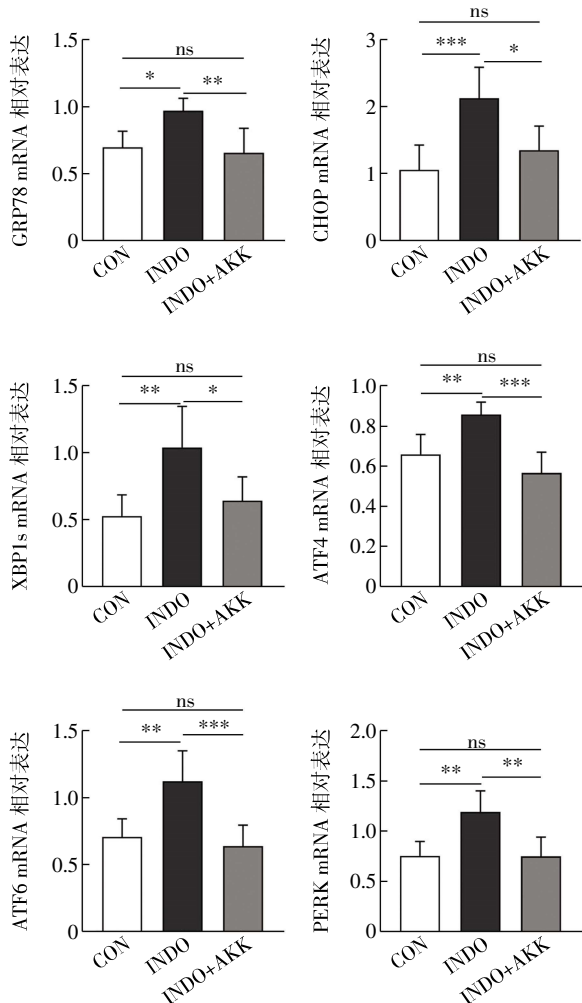
注:CON:空白对照组;INDO:吡喹酮组;INDO+AKK:吡喹酮加 AKK 上清组; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns: $P>0.05$

图8 qRT-PCR 检测 MUC2 mRNA 的表达

Fig.8 The expression of MUC2 mRNA was detected by qRT-PCR

2.3 AKK 上清干预抑制吡喹酮诱导的内质网应激 根据 qRT-PCR 结果显示,CON、INDO 与 IN-

DO +AKK 组 GRP78、CHOP、XBP1s、ATF6、ATF4、PERK mRNA 表达水平的差异具有统计学意义($F=7.869, P<0.01$; $F=11.45, P<0.001$; $F=8.344, P<0.01$; $F=12.99, P<0.001$; $F=16.37, P<0.001$; $F=11.58, P<0.001$), CON 组与 INDO+AKK 组表达水平低,INDO 组表达水平高。与 CON 组相比,INDO 组上调了 GRP78、CHOP、XBP1s、ATF6、ATF4、PERK mRNA 的表达水平(均 $P<0.05$),INDO+AKK 组 GRP78、CHOP、XBP1s、ATF6、ATF4、PERK mRNA 的表达水平与 CON 组相比差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。而 INDO+AKK 组 GRP78、CHOP、XBP1s、ATF6、ATF4、PERK mRNA 的表达水平与 INDO 组相比呈下调趋势(均 $P<0.05$),即吡喹酮诱导的内质网应激被 AKK 上清抑制,见图9。



注: CON: 空白对照组; INDO: 吡啶美辛组; INDO+AKK: 吡啶美辛加 AKK 上清组; GRP78: 葡萄糖调节蛋白 78; XBP1s: X 盒结合蛋白 1; CHOP: C/EBP 坏死因子相关蛋白; ATF4: 激活转录因子 4; ATF6: 激活转录因子 6; PERK: 真核翻译起始因子 2 α 激酶 3; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, ns: P >0.05

图9 内质网应激相关指标 GRP78、XBP1s、CHOP、ATF4、ATF6、PERK mRNA 表达水平

Fig.9 Expression levels of endoplasmic reticulum stress related indicators GRP78, XBP1s, CHOP, ATF4, ATF6 and PERK mRNA

3 讨论

随着人们对 NSAIDs 造成的小肠损伤的重视度增加,对 NSAIDs 诱导的小肠黏膜损伤的机制也有了更深入的理解。首先,NSAIDs 作用于 COX 受体,导致前列腺素水平降低,降低了前列腺素在维持肠道血流、上皮细胞更新以及减轻炎症方面的作用^[7]。其次,NSAIDs 与肠道上皮直接接触,可通过多种机制产生局部效应,形成“多重打击学说”中的第一击,具体机制包括:与细胞膜直接接触产生相互作用,改变细胞膜的生物物理特性,增加了对毒素的渗透性^[8];抑制线粒体复合物 I 的活性,增加线粒体超氧化物的产生^[9],促进氧化磷酸化(OXPHOS)的解

耦联^[10];增加线粒体膜的通透性,促进凋亡因子的释放^[11],引起线粒体功能障碍;增加肠道通透性^[12];增加肠道氧化应激^[13];引起肠道内质网应激^[14]。“多重打击学说”中的第二击为肠道炎症,包括 Toll 样受体 4-髓样分化因子 88(TLR4-MyD88)信号通路的激活^[15]、巨噬细胞分泌高迁移率族蛋白 1(HMGB1)的增加^[16]、细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的合成增加^[17]以及中性粒细胞在溃疡区域的大量浸润^[15]。最后,从药物动力学方面看,NSAIDs 的肠肝循环增加了药物与肠道的接触时间,加重了对肠道的损伤^[18]。但是对于 NSAIDs 相关肠病的治疗,目前尚无明确有效的治疗措施。肠道屏障功能的破坏主要表现在以下几个方面:损伤部位黏膜紧密连接结构被破坏,紧密连接蛋白的表达下调;肠道长度缩短,绒毛结构异常或消失;损伤部位杯状细胞数量的减少,MUC2 表达的降低,黏液层变薄;损伤部位巨噬细胞和树突状细胞的激活分泌大量炎症因子,肠道免疫屏障被破坏;肠道菌群出现失衡,肠道生物屏障被破坏^[19]。本研究结果发现,吡啶美辛造成小肠黏膜结构破坏,紧密连接蛋白 Occludin、ZO1 表达下降,杯状细胞数量减少,MUC2 表达量下调,损伤了肠道屏障功能。而 AKK 上清干预缓解了吡啶美辛诱导的小肠黏膜屏障功能障碍,上调了紧密连接蛋白 Occludin、ZO1 的表达水平,增加了小肠杯状细胞的数量,促进了黏蛋白 MUC2 的表达。

杯状细胞分泌 MUC2 的过程受多种因素的调控,有研究通过建立 MUC2 突变小鼠品系,发现异常组装和产生 MUC2 的变异小鼠,其杯状细胞中储存的黏蛋白的数量较正常组少,并且不完全组装的 MUC2 积聚在杯状细胞的内质网中,触发内质网应激^[20]。通过用胆汁酸牛磺酸去氧胆酸(TUDCA)处理野生型小鼠,抑制小鼠内质网应激的发生,发现杯状细胞的黏液分泌增加,得出内质网应激可以限制杯状细胞黏蛋白分泌的结论^[21]。上述研究证实内质网应激的发生与 MUC2 的分泌密切相关,当发生内质网应激时,未折叠蛋白反应被激活,即 GRP78 从内质网膜上蛋白传感器的管腔结构域解离,导致下游 3 条通路 IRE1-XBP1s、PERK-ATF4 和 ATF6 激活,并进一步启动未折叠蛋白反应(UPR)和下游级联信号转导^[22]。因而,本研究检测了内质网应激相关指标 CHOP、GRP78 以及未折叠蛋白反应 3 条通路中 XBP1s、PERK-ATF4 和 ATF6 等指标的表达水平,结果发现,吡啶美辛可以上调上述指标的表达,诱导内质网应激的发生,AKK 上清则能够下调吡啶美辛诱导的上述指标表达量的上调,抑制内质网应

激的发生。因此笔者得出结论,AKK 上清干预能够通过抑制内质网应激,上调黏蛋白 MUC2 和紧密连接蛋白 Occludin、ZO1 的表达,增加小肠杯状细胞的数量,改善小肠屏障功能,治疗 NSAIDs 引起的小肠损伤。

未来的研究可以进一步探究 AKK 对内质网应激途径的具体调节机制,同时也可以考虑进行临床试验以验证其在人体中的作用及安全性。此外,结合其他肠道保护策略,如膳食调节和其他益生菌干预,可能会进一步增强小肠健康的改善效果。

参考文献:

- [1] LANAS A, GARCÍA-RODRÍGUEZ L A, POLO-TOMÁS M, et al. Time trends and impact of upper and lower gastrointestinal bleeding and perforation in clinical practice[J]. *Am J Gastroenterol*, 2009, 104(7):1633–1641.
- [2] TAI F, MCALINDON M E. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and the gastrointestinal tract[J]. *Clin Med (Lond)*, 2021, 21(2): 131–134.
- [3] GRAHAM D Y, OPEKUN A R, WILLINGHAM F F, et al. Visible small-intestinal mucosal injury in chronic NSAID users[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2005, 3(1):55–59.
- [4] CANI P D, DEPOMMIER C, DERRIEN M, et al. Akkermansia muciniphila: paradigm for next-generation beneficial microorganisms[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19(10):625–637.
- [5] PEREZ-VILAR J, HILL R L. The structure and assembly of secreted mucins[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(45):31751–31754.
- [6] 聂烁, 闻正顺. 肠道黏蛋白 2 的分泌、结构、合成调控及其在肠道疾病发生发展中的作用[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(6): 2521–2532.
- [7] BOELSTERLI U A, REDINBO M R, SAIITA K S. Multiple NSAID-induced hits injure the small intestine: underlying mechanisms and novel strategies[J]. *Toxicol Sci*, 2013, 131(2):654–667.
- [8] LICHTENBERGER L M, ZHOU Y, JAYARAMAN V, et al. Insight into NSAID-induced membrane alterations, pathogenesis and therapeutics: characterization of interaction of NSAIDs with phosphatidylcholine[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821(7):994–1002.
- [9] SANDOVAL-ACUÑA C, LOPEZ-ALARCÓN C, ALIAGA M E, et al. Inhibition of mitochondrial complex I by various non-steroidal anti-inflammatory drugs and its protection by quercetin via a coenzyme Q-like action[J]. *Chem Biol Interact*, 2012, 199(1):18–28.
- [10] SOMASUNDARAM S, SIGTHORSSON G, SIMPSON R J, et al. Uncoupling of intestinal mitochondrial oxidative phosphorylation and inhibition of cyclooxygenase are required for the development of NSAID-enteropathy in the rat[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2000, 14(5):639–650.
- [11] LOGUIDICE A, RAMIREZ-ALCANTARA V, PROLI A, et al. Pharmacologic targeting or genetic deletion of mitochondrial cyclophilin D protects from NSAID-induced small intestinal ulceration in mice[J]. *Toxicol Sci*, 2010, 118(1):276–285.
- [12] LOGUIDICE A, WALLACE B D, BENDEL L, et al. Pharmacologic targeting of bacterial β -glucuronidase alleviates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced enteropathy in mice[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 341(2):447–454.
- [13] HARUSATO A, NAITO Y, TAKAGI T, et al. Suppression of indomethacin-induced apoptosis in the small intestine due to Bach1 deficiency[J]. *Free Radic Res*, 2011, 45(6):717–727.
- [14] OHYAMA K, SHIOKAWA A, ITO K, et al. Toxicoproteomic analysis of a mouse model of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric ulcers[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420(1):210–215.
- [15] WATANABE T, HIGUCHI K, KOBATA A, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent[J]. *Gut*, 2008, 57(2):181–187.
- [16] NADATANI Y, WATANABE T, TANIGAWA T, et al. High mobility group box 1 promotes small intestinal damage induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs through Toll-like receptor 4[J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(1):98–110.
- [17] FUKUMOTO K, NAITO Y, TAKAGI T, et al. Role of tumor necrosis factor- α in the pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal injury in mice[J]. *Int J Mol Med*, 2011, 27(3):353–359.
- [18] REUTER B K, DAVIES N M, WALLACE J L. Nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy in rats: role of permeability, bacteria, and enterohepatic circulation[J]. *Gastroenterology*, 1997, 112(1): 109–117.
- [19] 易俊, 刘小伟. 炎症性肠病的肠道屏障功能研究进展[J]. *中华炎症性肠病杂志*, 2019, 3(1):41–44.
- [20] HEAZLEWOOD C K, COOK M C, ERI R, et al. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis[J]. *PLoS Med*, 2008, 5(3):e54.
- [21] NAAMA M, TELPAZ S, AWAD A, et al. Autophagy controls mucus secretion from intestinal goblet cells by alleviating ER stress[J]. *Cell Host Microbe*, 2023, 31(3):433–446, e4.
- [22] MA X, DAI Z, SUN K, et al. Intestinal epithelial cell endoplasmic reticulum stress and inflammatory bowel disease pathogenesis: an update review[J]. *Front Immunol*, 2017, 8:1271.

(2024-03-09 收稿)