DOI:10.16016/j.2097-0927.202309140

自诱导因子-2激活芳香烃受体缓解新生小鼠坏死性小肠结肠炎肠道损伤

胡灵君[1],芦 起[1,2] 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院新生儿科,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室[1]; 644000 四川 宜宾,重庆医科大学附属儿童医院宜宾医院新生儿科[2]

[**摘要**] **目的** 探讨自诱导因子-2(autoinducer-2,AI-2)缓解新生鼠坏死性小肠结肠炎(necrotizing enter colitis,NEC)模型肠道损伤的作用机制。**方法** 将36只7 d龄C57BL/6J小鼠随机分为(n=12):对照组(Control组,由母鼠喂养)、NEC组(采用配方奶+脂多糖灌胃、缺氧和冷应激的方法诱导新生鼠NEC模型)及NEC+AI-2组(建模的配方奶中添加AI-2溶液)。记录造模期间各组小鼠体质量及存活率。建模3 d后处死小鼠,HE染色观察末端回肠组织病理学改变;RT-qPCR检测肠组织芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor,AHR)、细胞色素P450 1A1(cytochrome P450 1A1,CYP1A1)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、白细胞介素-22(interleukin-22,IL-22)基因的表达水平;Western blot检测肠组织AHR、CYP1A1蛋白表达水平;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肠组织中TNF-α、IL-6、IL-22蛋白表达水平。**结果** 与NEC组相比,NEC+AI-2组新生鼠存活率增加(91.7% *vs* 66.7%,P<0.05);肠道病理损伤评分降低(1.33±0.21 *vs* 2.67±0.33,P<0.05);肠组织中AHR、CYP1A1在基因及蛋白表达水平均明显升高(均P<0.05);肠组织中促炎因子TNF-α、IL-6表达水平降低(均P<0.05),抑炎因子IL-22表达水平增加(均P<0.05)。肠道AHR表达及活化与肠道病理损伤评分呈明显的负相关关系(P<0.001)。**结论** AI-2可通过激活肠道中AHR调节炎症反应缓解NEC新生鼠的肠道损伤。

[**关键词**] 芳香烃受体;自诱导因子-2;坏死性小肠结肠炎;炎症反应
[**中图法分类号**] R-332; R363.22; R725.745 [**文献标志码**] A

Activation of aryl hydrocarbon receptor by autoinducer-2 alleviates intestinal injury in a neonatal mouse model of necrotizing enterocolitis

HU Lingjun[1], LU Qi[1,2] [1]Department of Neonatology, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014; [2]Department of Neonatology, Yibin Hospital Affiliated to Children's Hospital of Chongqing Medical University, Yibin, Sichuan Province, 644000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanism of autoinducer-2 (AI-2) in relieving intestinal injury in neonatal mouse model of necrotizing enterocolitis (NEC). **Methods** Thirty-six 7-day-old C57BL/6J mice were randomly divided into Control group (fed by mother mice), NEC group (NEC model induced by formula+lipopolysaccharide administration, hypoxia and cold stress), and NEC+AI-2 group (AI-2 solution added to the modeled formula milk), with 12 mice in each group. The body weight and survival rate of each group were recorded during the modeling period. In 3 d after modeling, the mice were euthanized, and the histopathological changes in the terminal ileum were observed using HE staining. The mRNA expression levels of aryl hydrocarbon receptor (AHR), cytochrome P450 1A1 (CYP1A1), TNF-α, IL-6 and IL-22 in intestinal tissue were detected with RT-qPCR. The protein levels of AHR and CYP1A1 in intestinal tissues were measured with Western blotting. The contents of TNF-α, IL-6 and IL-22 in intestinal tissues were

[**通信作者**] 芦 起,E-mail: qilu_qi@163.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

detected using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The survival rate of neonatal rats was significantly higher in the NEC+AI-2 group than the NEC group (91.7% *vs* 66.7%, $P<0.05$). The NEC+AI-2 group had obviously lower intestinal pathological injury score (1.33±0.21 *vs* 2.67±0.33, $P<0.05$), increased mRNA and protein levels of AHR and CYP1A1 in intestinal tissues ($P<0.05$), decreased expression levels of pro-inflammatory factors TNF-α and IL-6 in intestinal tissues ($P<0.05$), while increased expression level of anti-inflammatory factor IL-22 ($P<0.05$) when compared with the NEC group. Furthermore, the expression and activation of intestinal AHR were negatively correlated with the intestinal pathological injury score ($P<0.001$). **Conclusion** AI-2 alleviates intestinal injury in neonatal mice with NEC by activating AHR to regulate inflammatory response.

[**Key words**] aryl hydrocarbon receptor; autoinducer-2; necrotizing enterocolitis; inflammatory response

Corresponding author: LU Qi, E-mail: qilu_qi@163.com

新生儿坏死性小肠结肠炎(neonatal necrotizing enterocolitis,NEC)是新生儿期高发且严重的胃肠道急症。研究报道确贝尔分期>Ⅱa的NEC的新生儿病死率为23.5%[1]。存活的患儿可能会出现短肠综合征、肠衰竭[2]、神经发育异常[3]以及肺部损害[4]等并发症。因此,亟待探索NEC的发病机制以有效防治NEC。目前对于NEC发病机制的研究主要集中于肠道屏障功能障碍及肠道菌群失调等方面[5]。群体感应(quorum sensing,QS)是细菌间交流的一种机制,细菌通过QS系统感知周围细菌密度的变化,协调细菌的群体行为。这种通信过程由QS信号分子介导。自诱导分子-2(Autoinducer-2,AI-2)是QS系统中的一类重要的信号分子[6]。研究表明,AI-2与NEC疾病进展密切相关,急性期NEC患儿肠道AI-2水平降低,恢复期逐步升高[7]。

芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor,AHR)是一种配体依赖的转录因子,广泛表达于肠道多种细胞,经特定配体活化后转运至胞核,参与细胞增殖分化、免疫调节等病理生理过程[8]。研究发现AHR在维持肠道黏膜稳态中具有重要作用[9]。我们前期通过分析NEC患儿手术切除的肠组织,发现NEC患儿肠组织中的AHR较非NEC患儿表达减少,且与病变组织病理评分呈负相关,AHR表达越低,肠道损伤越重[10]。研究表明AHR不仅可以作为环境、饮食中某些化合物的传感器,还能够感知肠道微生物产生的QS信号分子,参与维持肠道屏障功能,实现肠道内稳态[11]。因此,我们推测AI-2可能通过激活AHR减轻NEC肠道组织损伤。本研究通过给NEC新生鼠外源性补充AI-2,以探索AHR在AI-2缓解新生鼠坏死性小肠结肠炎中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

10只8~10周SPF级C57BL/6J小鼠,体质量18.0~20.0 g(购自重庆医科大学动物实验中心,饲养于重庆医科大学附属儿童医院动物实验中心)。按雌鼠6只、雄鼠4只合笼,合笼后21天小鼠正常分娩,取孕鼠自然分娩的7 d龄新生鼠进行实验,雌雄不拘,体质量约3.0~3.5 g。本研究通过重庆医科大学附属儿童医院动物实验中心伦理审查委员会批准(批准文号:CHCMU-IACUC20230529009)。

1.2 主要仪器、试剂

本研究主要采用的仪器和试剂有:AI-2标准液(Omm公司,美国),脂多糖(Sigma公司,美国)。Trizol(湖南艾科瑞生物,中国),反转录和实时荧光定量PCR试剂(TaKaRa公司,日本),引物(北京擎科,中国)。全蛋白提取试剂盒、BCA蛋白含量检测试剂盒(江苏凯基,中国),SDS-PAGE电泳凝胶配制试剂盒(上海雅酶,中国),AHR Rabbit抗体(武汉三鹰,中国),CYP1A1 Rabbit抗体(杭州华安,中国),0.22 μm PVDF膜(Millipore公司,德国)。TNF-α检测试剂盒(北京四正柏,中国),IL-6 ELISA(深圳优品,中国),IL-22 ELISA检测试剂盒(深圳欣博盛,中国)。CFX-96荧光定量PCR仪、电泳仪(Bio-Rad,美国),BioTek Synergy H1酶标仪、低温高速离心机、NanoDrop 2000(Thermo,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组和处理 根据随机数字表法将新生7 d的SPF级C57BL/6小鼠分为3组:Control组、坏死性小肠结肠炎组(NEC组),AI-2治疗组(NEC+AI-2组),每组12只。Control组小鼠由母鼠喂养,

NEC 组和 NEC+AI-2 组按照 WANG[12]、ZOU[13]等的方法诱导 NEC 模型,幼鼠饲养于温度(36±1)℃、湿度45%~60%的恒温保育箱中,PICC 管灌胃配方奶(30~50 μL/g),5 次/d(08:00、12:00、16:00、20:00、24:00)。将新生鼠放入缺氧箱,以 10 L/min 流量向箱内充入 100 %氮气,待箱内氧气浓度降至 0 时开始计时,90 s 后将新生鼠取出立即放入 4 ℃冰箱中刺激 10 min,2 次/d(10:00、22:00);LPS (5 mg /kg)灌胃,1 次/d;连续 3 d。AI-2 治疗组 NEC 建模方法同 NEC 组,另在配方奶粉中加入 AI-2 溶液(AI-2 终浓度为 500 nmol/L)。

1.3.2 建模期间新生鼠一般情况观察 观察新生鼠精神状态、活动度、毛色、皮下脂肪厚度、有无腹胀、腹泻、便血等。每日清晨建模前记录每只小鼠体质量、大便性状,每 24 h 统计各组小鼠生存情况。

1.3.3 新生鼠肠道内容物采集和 AI-2 活性测量 用800μL 2216E 液体培养基冲洗每只小鼠的回肠和结肠,并用无菌管收集内容物,涡旋并离心。将粪便沉积物及粪便上清冷冻在-80 ℃。使用哈维弧菌报告菌株 BB170 检测样品中的 AI-2 活性。将 BB170 菌株在 2216E 液体培养基中生长(30 ℃,18 h),并以 1∶5 000 梯度稀释到新鲜的 2216E 液体培养基中,作为工作液。然后,将 180 μL BB170 稀释剂加入 96 孔测定板中,之后分别将 20 μL 待测样本、1 μmol/L AI-2 标准溶液(阳性对照),和 2216E 液体培养基(阴性对照)以加入 96 孔板以产生 200 μL 的最终体积,并将板以 30 ℃、120 r/min 摇动。孵育 30 min 后,使用 BioTek Synergy H1 仪器每 30 min 测量一次生物发光强度,直到阴性对照组的值最小化。样本相对发光度为样本发光值与标准液发光值之比。

1.3.4 新生鼠回肠末端组织 HE 染色 建模结束 12 h 后将各组小鼠断头处死,取出自十二指肠至直肠段肠管,分离系膜,观察肠道大体形态。取回肠远端约 1 cm 肠组织立即放入 4%多聚甲醛中固定 24 h,随后将样品脱水、包埋,并切成 4 μm 的石蜡切片,经 HE 染色后,在光学显微镜下观察回肠末端肠道组织病理形态学变化。根据 SODHI 等[14]所报道的双盲法行肠组织损伤评分:0 分,肠道完整无损;1 分,远端上皮脱落;2 分,绒毛中段脱落;3 分,绒毛完全坏死,隐窝保留;4 分,肠道透壁性坏死。每例标本观察均 3 个视野,并取其平均值,评分≥2 分确定为 NEC。

1.3.5 荧光定量 PCR 法检测新生鼠回肠组织 *Ahr*、*Cyp*1*a*1、*Tnf*-α、*IL*-6、*IL*-22 mRNA 的表达量 建模结束处死小鼠后,取回肠远端 2~3 cm 肠组织(约 20 mg)冻存于-80 ℃。Trizol 法提取肠组织总 RNA,用分光光度计测定每个样本 RNA 浓度,取 1 μg 总 RNA 反转录为 cDNA,接着以 cDNA 为模板扩增 *Ahr*、*Cyp*1*a*1、*Tnf*-α、*IL*-6、*IL*-22 ,*Gapdh* 为内参。qPCR 反应条件:95 ℃预变性 30 s、95 ℃变性 5 s、60 ℃退火 30 s,共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行目的基因相对表达量分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列及长度

基因	引物序列(5′→3′)	长度(bp)
Ahr	正义:ATGTCCATGTATCAGTGCCAG	21
	反义:CTGCTCAAGTCGGACGAATAG	21
*Cyp*1*a*1	正义:TTTGTGAACCAGTGGCAGGT	20
	反义:TCTCCGATGCACTTTCGCTT	20
Tnf-α	正义:TTCCGAATTCACTGAGCCTCGAA	23
	反义:TGCACCTCAGGGAAGAATCTGGAA	24
IL-6	正义:CCAATTTCCAATGCTCTCCT	20
	反义:ACCACAGTGAGGAATGTCCA	20
IL-22	正义:CATACATCGTCAACCGCACCT	21
	反义:TCCCCGATGAGCCGGACA	18
Gapdh	正义:CTTCTCCTGCAGCCTCGT	18
	反义:TCATCCACCTCCCCACAGTA	20

1.3.6 酶联免疫法检测新生鼠回肠组织细胞因子蛋白表达水平 从冰箱取出冻存的肠组织,按照 1 g 组织加入 9 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)的比例加入相应体积的 PBS,同时加入对应体积蛋白酶抑制剂(1∶1 000),匀浆后离心(4 ℃、14 000 ×*g*、10 min),取上清,向相应的抗体包被板中每孔加入待测样品 100 μL(做好复孔及标准曲线),再向孔中加入 100 μL 生物素化抗体,微震荡混匀,37 ℃孵育 2 h,洗板 4 次,甩尽孔中残余液体,每孔 50 μL 加入酶结合物,混匀,37 ℃孵育 30 min,洗板 4 次,避光加入显色液及终止液,使用 BioTek Synergy H1 仪器测量 450 nm 吸光值,计算各自标准曲线公式并根据公式计算样本中 TNF-α、IL-6、IL-22 蛋白含量。

1.3.7 蛋白质印迹法检测新生鼠回肠组织 AHR、CYP1A1 的蛋白表达水平 取 20 mg 新鲜肠组织置于 200 μL 组织裂解液(含 200 μL Lysis buffer 、2 μL PMSF、0.2 μL 的蛋白酶抑制剂和 2 μL 磷酸酶抑制剂)中,匀浆后离心(4 ℃、14 000 ×*g* 、10 min),取上清,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白质溶液与十二烷基硫酸钠样品缓冲液以 4∶1的比例混合,然后在金属浴中变性 10 min。电泳分离变性蛋白并转移至 PVDF

膜,5%脱脂奶粉在室温下封闭 1 h,TBST 洗膜 3 次,在 AHR、CYP1A1 一抗中 4 ℃孵育过夜,次日相应二抗常温孵育 1 h,洗膜 3 次后使用 Bio-Rad ChemiDoc™ Touch 成像系统进行成像。使用 Image Lab 软件测量目的蛋白与 β-actin 灰度值比值,相对定量分析目的蛋白表达。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 9.0 软件分析和绘图。采用 $\bar{x}\pm s$ 表示正态分布且方差齐的定量资料;多组间比较采用单因素方差分析,采用 LSD 法进行组间两两比较;生存分析采用 Kaplan-Meier 检验。采用 Spearman 法进行相关性分析。检验水准 $\alpha=0.05$,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AI-2 改善新生鼠 NEC 模型体质量及存活率

图 1A 显示 3 组新生小鼠肠内容物中的 AI-2 水平,NEC 组新生鼠的肠道中 AI-2 相对生物发光度低于 Control 组和 NEC+AI-2 组($t=-2.723$,$P=0.047$;$t=-2.831$,$P=0.038$)。在实验过程中,Control 组新生鼠精神、活动度可,无腹胀、腹泻;NEC 组新生鼠出现精神萎靡,活动量减少,毛发黯淡,皮下脂肪薄,有明显的腹胀、腹泻,部分出现血便;NEC+AI-2 组新生鼠较 NEC 组小鼠活动量明显增加,毛发较干净,部分小鼠出现腹胀、腹泻。

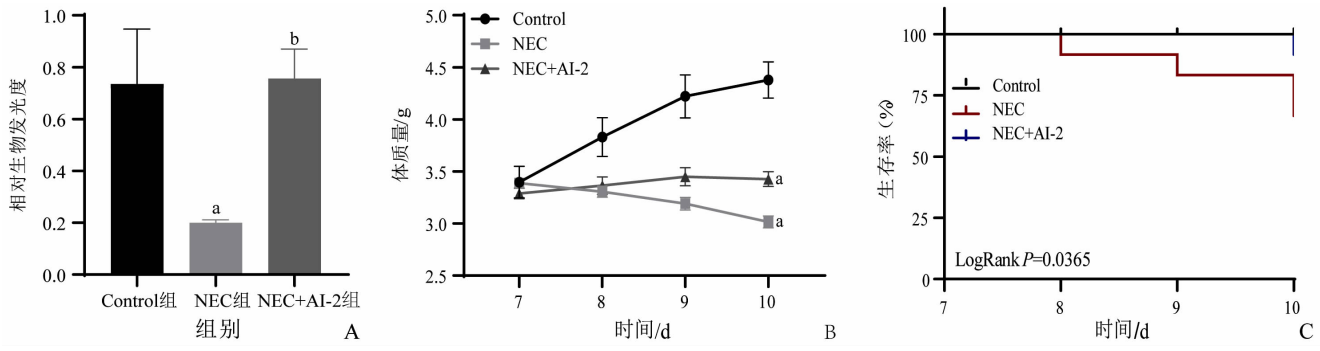
建模 72 h 后,NEC 组新生鼠建模期间体质量下降明显高于 Control 组和 NEC+AI-2 组($t=-7.298$,$P<0.001$;$t=-2.168$,$P=0.116$),见图 1B。NEC 组建模期间 4 只新生鼠死亡(4/12,33.3%),NEC+AI-2 组 1 只小鼠死亡(1/12,8.3%),3 组间小鼠生存率具有统计学意义($P=0.036\ 5$),见图 1C。

2.2 AI-2 缓解新生鼠 NEC 模型的肠道损伤

肉眼观察可见:Control 组新生鼠肠组织外观基本正常,淡黄色,肠腔无扩张,肠壁无水肿、出血、坏死;NEC 组新生鼠肠道明显扩张,肠壁水肿、积气呈串珠样改变;NEC+AI-2 组有少量积气和水肿,无出血(图 2A)。光镜下观察显示:Control 组新生鼠肠上皮细胞排列整齐,绒毛完整,黏膜下层、肌层无水肿、分离;NEC 组肠组织结构紊乱,部分绒毛脱落、坏死,固有层及黏膜下层分离,肌层变薄,部分肠段出现透壁坏死;NEC+AI-2 组肠组织病理损伤较 NEC 组明显减轻,结构形态基本正常,绒毛肿胀,无脱落、坏死,固有层、肌层轻度肿胀(图 2B)。病理损伤评分显示,NEC 组病理损伤评分明显高于 Control 组($t=8.281$,$P<0.001$),AI-2 干预后病理损伤评分明显降低($t=-4.140$,$P=0.003$,图 2C)。

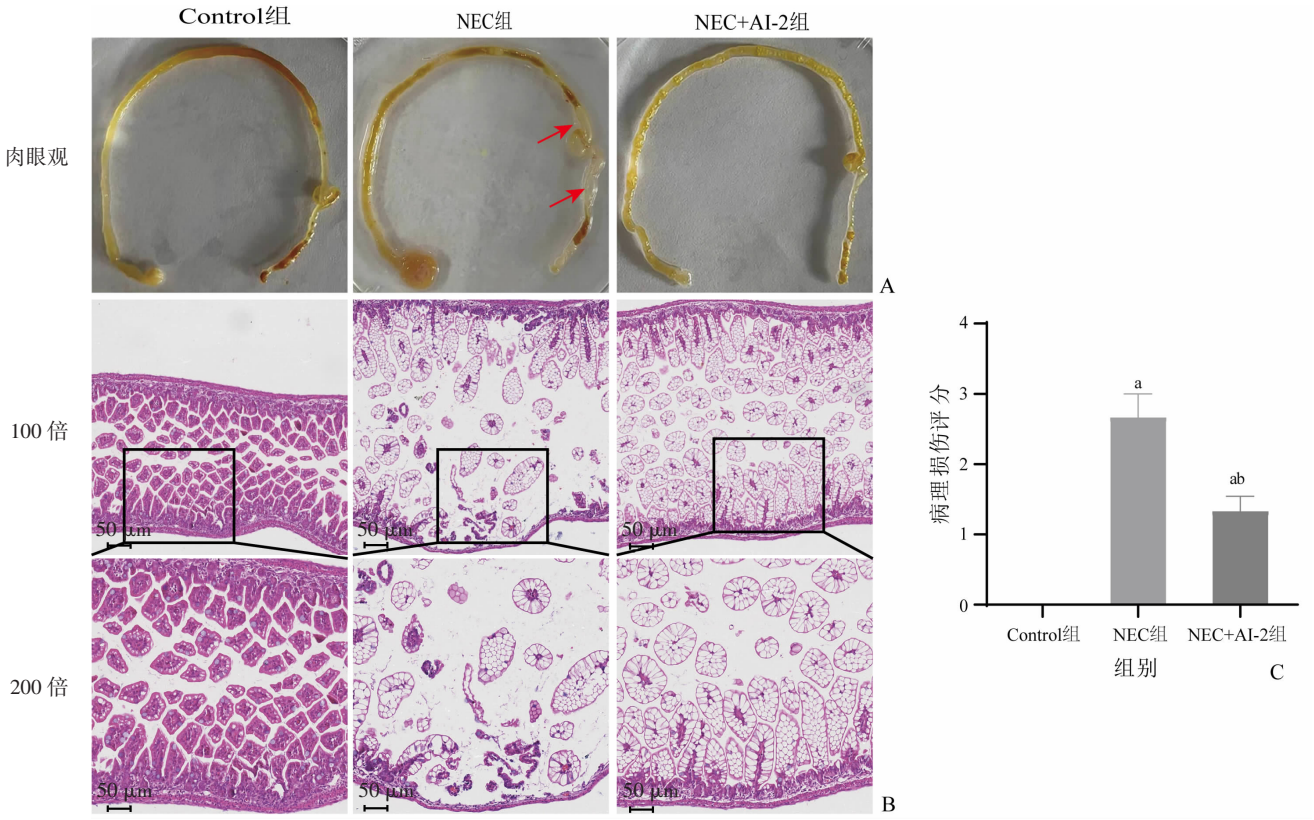
2.3 AI-2 干预后新生鼠 NEC 模型肠组织中 AHR、CYP1A1 的表达水平增加

RT-qPCR 检测到 NEC 组 *Ahr* 及其下游靶基因 *Cyp1a1* mRNA 的表达水平较 Control 组明显降低($t=-9.016$,$P<0.001$;$t=-5.411$,$P<0.001$),NEC+AI-2 组中 *Ahr* 和 *Cyp1a1* mRNA 的表达水平较 NEC 组明显升高($t=8.941$,$P<0.001$;$t=5.813$,$P<0.001$),见图 3A、B。同时,Western blot 检测到 NEC 组 AHR 和 CYP1A1 蛋白表达水平较 Control 组明显降低($t=-3.336$,$P=0.005$;$t=-4.532$,$P<0.001$);NEC+AI-2 组 AHR 和 CYP1A1 蛋白表达水平较 NEC 组明显升高($t=3.573$,$P=0.003$;$t=6.031$,$P<0.001$),见图 3C~E。



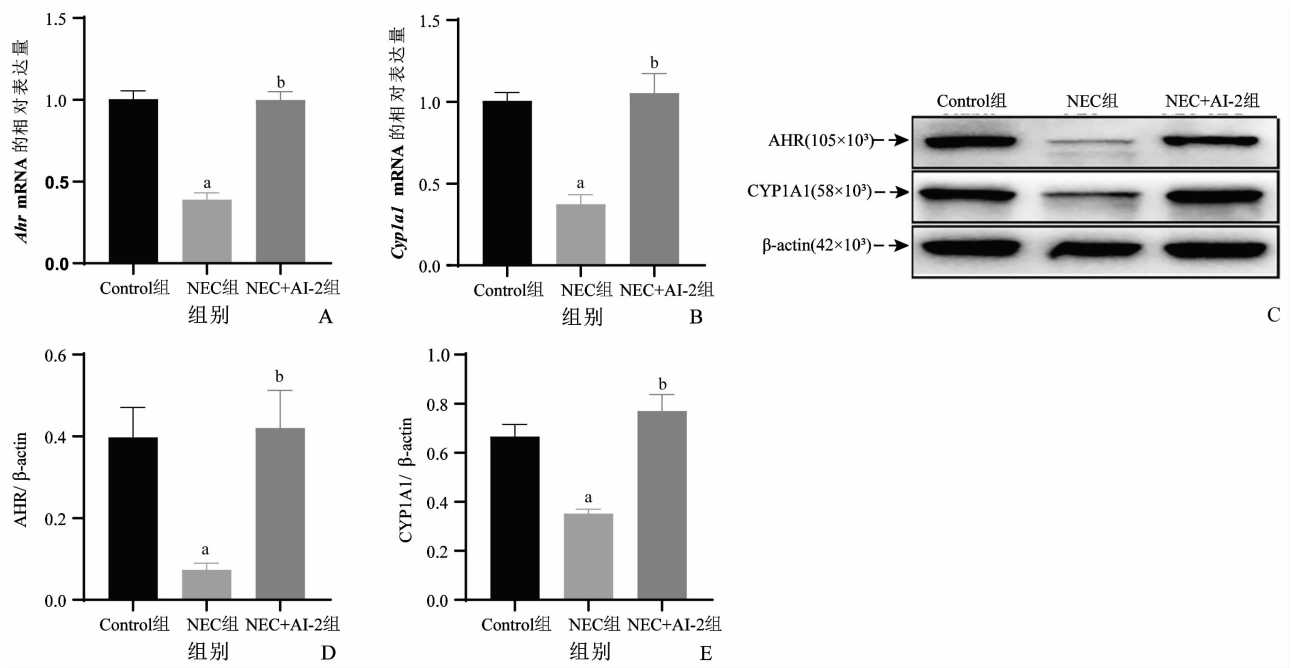
A:肠道内容物中 AI-2 的相对生物发光度测定结果($n=6$);B:小鼠生后第 7、8、9、10 天体质量变化($n=12$);a:$P<0.05$,与 Control 组比较,b:$P<0.05$,与 NEC 组比较;C:小鼠生后第 7、8、9、10 天的生存情况($n=12$,LogRank $P=0.036\ 5$)

图 1 3 组小鼠肠内容物中 AI-2 水平及建模期间一般情况($\bar{x}\pm s$)



A:小鼠肠组织的大体形态 ↘:示肠壁积气处肠段;B:光学显微镜观察各组小鼠肠组织的病理改变;C :各组小鼠肠组织病理损伤评分 a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 NEC 组比较

图 2 3 组小鼠肠组织的大体形态和病理学改变 ($n=6$,$\bar{x}\pm s$)

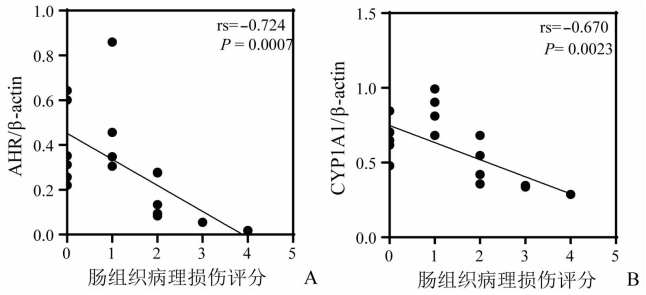


A:各组小鼠肠组织中 *Ahr* 基因的表达水平($n=4$);B:各组小鼠肠组织中 *Cyp1a1* 基因的表达水平($n=6$);C :各组小鼠肠组织 AHR、CYP1A1、β-actin 电泳图;D :各组小鼠肠组织 AHR 定量分析($n=6$);E :各组小鼠肠组织 CYP1A1 定量分析($n=6$) a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 NEC 组比较

图 3 RT-qPCR 和 Western blot 检测各组小鼠肠组织 AHR 和 CYP1A1 的表达水平 ($\bar{x}\pm s$)

2.4 新生鼠肠组织中 AHR、CYP1A1 表达水平与肠道病理损伤呈负相关

Spearman 相关性分析结果显示:AHR 和 CYP1A1 的蛋白表达水平与新生鼠肠组织病理损伤评分呈现显著的负相关关系($P<0.001$,图 4A,4B)。

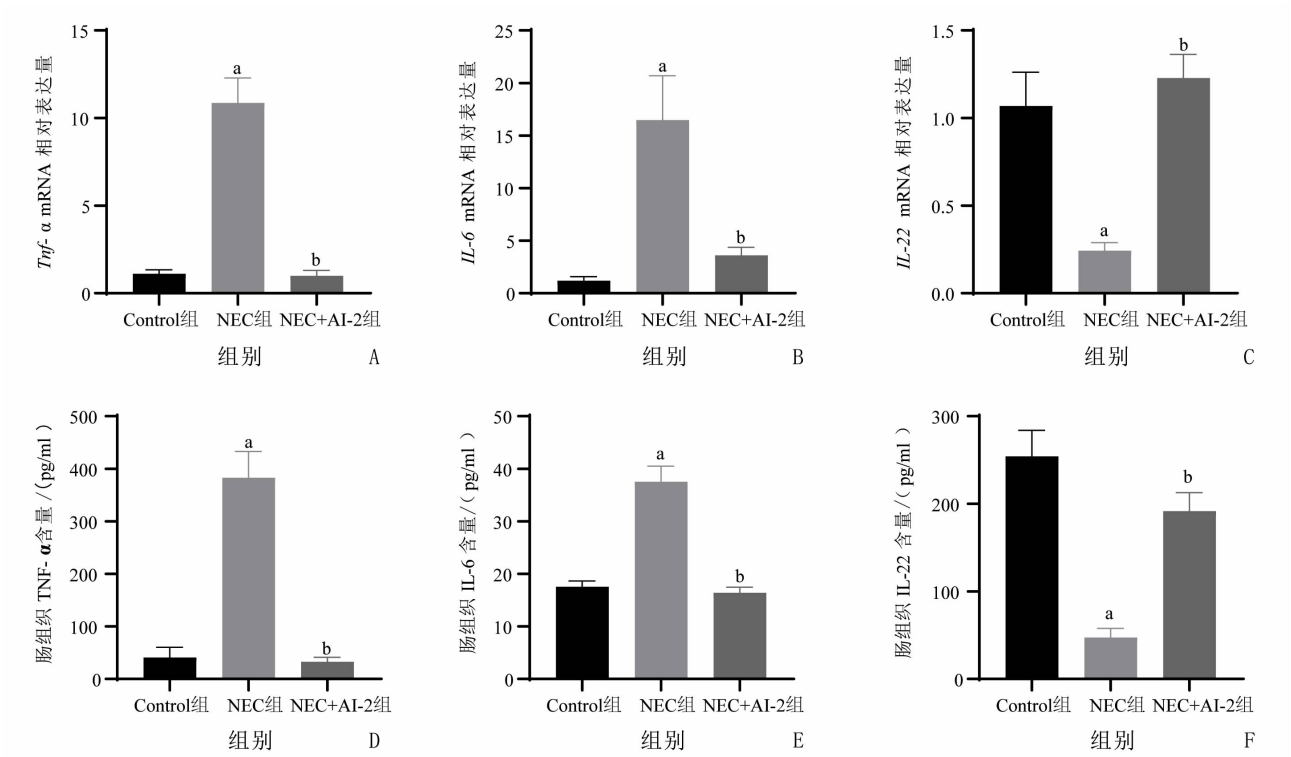


A:各组小鼠肠组织 AHR 蛋白相对表达量与病理损伤评分的相关性分析($n=18$);B:各组小鼠肠组织 CYP1A1 蛋白相对表达量与病理损伤评分的相关性分析($n=18$)

图 4 小鼠肠组织中 AHR、CYP1A1 表达量与病理损伤评分的相关性分析

2.5 AI-2 干预调节新生鼠 NEC 模型肠组织中炎症因子水平

RT-qPCR 显示 NEC 组新生鼠肠组织中炎症因子 *Tnf-α* 和 *IL-6* mRNA 水平较 Control 组明显升高($t=8.149$,$P<0.001$;$t=4.369$,$P<0.01$),且抑炎因子*IL-22* mRNA 水平明显下降($t=-4.237$,$P<0.01$);而 NEC+AI-2 组新生鼠回肠组织中 *Tnf-α* 和 *IL-6* mRNA 水平较 NEC 组明显降低($t=-8.244$,$P<0.001$;$t=-3.676$,$P<0.01$),*IL-22* mRNA 水平上调($t=5.061$,$P<0.01$),见图 5A~C。ELISA 检测新生鼠回肠组织中 TNF-α 和 IL-6 蛋白表达水平显示 NEC 组明显高于 Control 组($t=7.740$,$P<0.01$;$t=7.373$,$P<0.01$), IL-22 蛋白表达水平下调($t=-6.663$,$P<0.001$);NEC+AI-2 组新生鼠回肠组织中 TNF-α 和 IL-6 蛋白表达量较 NEC 组明显降低($t=-7.922$,$P<0.001$;$t=-7.798$,$P<0.001$),IL-22 蛋白水平上调($t=4.646$,$P<0.01$),见图 5D~F。



A:各组小鼠肠组织 *Tnf-α* mRNA 表达水平($n=5$);B:各组小鼠肠组织 *IL-6* mRNA 表达水平($n=5$);C:各组小鼠肠组织 *IL-22* mRNA 表达水平($n=5$);D:各组小鼠肠组织 TNF-α 蛋白表达水平($n=4$);E:各组小鼠肠组织 IL-6 蛋白表达水平($n=5$);F:各组小鼠肠组织 IL-22 蛋白表达水平($n=5$); a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 NEC 组比较

图 5 3 组小鼠肠组织细胞因子表达水平 ($\bar{x}\pm s$)

3 讨论

3.1 NEC 的研究现状

NEC 是新生儿中最常见和最严重的胃肠道疾病之一。目前主要的治疗手段包括禁食、胃肠减压、抗生素治疗[15]。然而,约 20%~50%的患儿对保守治疗无效,需要进行手术治疗。不幸的是,手术会导致患儿的死亡率显著增加,并且术后可能出现严重的并发症[16]。目前 NEC 的发病机制尚不完全清楚,也缺乏针对病因的有效治疗手段。现普遍认为肠道屏障功能障碍与 NEC 发病密切相关[5]。

3.2 AHR 参与维护肠道黏膜稳态的机制探讨

AHR 是维护肠道黏膜稳态的关键调节因子。研究发现,AHR 通过调节肠道免疫应答来维持肠道黏膜稳态。例如,LIU 等[17]发现黄芩素通过激活 AHR 调节小鼠肠道 Th17/Treg 细胞分化,恢复促炎细胞因子和抗炎细胞因子的平衡,从而缓解右旋糖酐硫酸钠(DSS)诱导的结肠炎。LI 等[18]也发现通过激活 AHR/IL-22 途径可以减轻溃疡性结肠炎小鼠的肠道损伤。此外,AHR 还参与调控肠道上皮细胞的增殖和修复。SHAH 等[19]人研究发现 AHR 可直接调控结肠上皮细胞分化过程中的关键转录因子,终止再生反应,促进细胞再生后高效、及时的分化,从而控制结肠上皮细胞再生并防止恶性转化。METIDJI 等[20]研究也表明肠上皮细胞中 *Ahr* 的缺失会促进炎症和结肠肿瘤的发生。综上所述,研究揭示了 AHR 与肠道健康的密切关系。因此,肠道细胞中的 AHR 可能是 NEC 的潜在治疗靶点。

3.3 AI-2 在肠道健康中的作用研究

研究表明,肠道共生菌释放的一些 QS 信号分子可以与宿主肠上皮细胞上的受体相互作用,有助于维持肠黏膜的屏障功能,并调节免疫反应[11],揭示了宿主-微生物界面的群体感应信号传递的可能性,对于维持正常的宿主-微生物关系具有重要的影响。AI-2 作为细菌间的“公共语言”,有助于促进不同种类细菌之间的信号交流,同时也参与宿主-细菌共生[6]。研究发现,哺乳动物肠道上皮细胞在受损后会产生 AI-2 类似物刺激细菌的群体感应,在肠上皮修复过程中发挥保护作用[21],ZARGAR 等[22]将体外合成的 AI-2 与肠道上皮细胞共培养,结果显示,在 AI-2 不同浓度和作用时间下细胞炎症因子的表达发生了动态变化,这些研究结果表明 AI-2 也可能是一种肠上皮信号分子。近期研究发现,给孕鼠提供富含 QS 信号分子的饮食,可以激活胎儿肠道中的 AHR 信号预防新生小鼠发生 NEC[23]。综上所述,AI-2 具有激活肠道细胞中 AHR 并参与维持肠道稳态的可能性。

3.4 AI-2 可能通过激活 AHR 减轻新生鼠 NEC 模型的肠道炎症

我们的研究发现,与正常新生鼠相比,NEC 组新生鼠模型中 AHR、CYP1A1 的表达水平均显著降低。同时,AHR 的表达水平与活性与小鼠肠道病理损伤程度呈负相关,这一结果与我们课题组前期在 NEC 患儿手术标本中的发现一致。CYP1A1 是体内重要的Ⅰ相解毒酶,也是 AHR 调控的直接靶基因之一,通过检测 CYP1A1 的表达水平,可以评估 AHR 的活性[24]。AI-2 干预后,新生鼠 NEC 模型的一般情况、体质量下降明显好转,存活率增加;且肠组织中 AHR 和 CYP1A1 在基因和蛋白水平的表达量都明显增加;促炎因子 TNF-α、IL-6 的表达降低,抑炎因子 IL-22 的表达增加。综上所述,本研究表明 AI-2 可以通过激活肠组织中的 AHR 来下调促炎因子表达、上调抑炎因子表达,从而减轻新生鼠 NEC 模型的肠道损伤。在本研究中,关于 AI-2 激活 AHR 的机制尚未进行深入研究,AI-2 是通过配体的方式直接活化 AHR 还是通过操纵肠道菌群的行为间接激活 AHR,仍需进一步探索。在未来的研究中,可通过运用 $Ahr^{-/-}$ 动物模型抑制 *Ahr* 基因表达或使用 AHR 抑制剂阻断 AHR 功能,来进一步验证 AHR 在 AI-2 缓解 NEC 肠道损伤中的重要作用。同时,可以分析各组小鼠的粪便微生物组成和代谢物组成进行分析,以深入挖掘潜在的分子机制。

参考文献:

[1] JONES I H, HALL N J. Contemporary outcomes for infants with necrotizing enterocolitis—a systematic review[J]. J Pediatr, 2020, 220: 86-92. e3. DOI: 10.1016/j.jpeds.2019.11.011.

[2] OU J, COURTNEY C M, STEINBERGER A E, *et al*. Nutrition in necrotizing enterocolitis and following intestinal resection[J]. Nutrients, 2020, 12(2): 520. DOI: 10.3390/nu12020520.

[3] MATEI A, MONTALVA L, GOODBAUM A, *et al*. Neurodevelopmental impairment in necrotising enterocolitis survivors: systematic review and meta-analysis[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2020, 105(4): 432-439. DOI: 10.1136/archdischild-2019-317830.

[4] HOSFIELD B D, HUNTER C E, LI H G, *et al*. A hydrogen-sulfide derivative of mesalamine reduces the severity of intestinal and lung injury in necrotizing enterocolitis through endothelial nitric oxide synthase[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2022, 323(4): R422-R431. DOI: 10.1152/ajpregu.00229.2021.

[5] HACKAM D J, SODHI C P. Bench to bedside—new insights

into the pathogenesis of necrotizing enterocolitis[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2022, 19: 468-479. DOI: 10.1038/s41575-022-00594-x.

[6] WU S B, LIU J H, LIU C J, *et al*. Quorum sensing for population-level control of bacteria and potential therapeutic applications[J]. Cell Mol Life Sci, 2020, 77(7): 1319-1343. DOI: 10.1007/s00018-019-03326-8.

[7] FU C Y, LI L Q, YANG T, *et al*. Autoinducer-2 may be a new biomarker for monitoring neonatal necrotizing enterocolitis [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 140. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00140.

[8] PERNOMIAN L, DUARTE-SILVA M, DE BARROS CARDOSO C R. The aryl hydrocarbon receptor (AHR) as a potential target for the control of intestinal inflammation: insights from an immune and bacteria sensor receptor[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2020, 59(3): 382-390. DOI: 10.1007/s12016-020-08789-3.

[9] GONG S Y, ZHENG J C, ZHANG J J, et al. Arabinogalactan ameliorates benzo [a] pyrene-induced intestinal epithelial barrier dysfunction via AhR/MAPK signaling pathway[J]. Int J Biol Macromol, 2023, 242(Pt 4): 124866. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.124866.

[10] ZHANG Y H, YANG L, LU Q. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the intestinal tissue of preterm infants with necrotizing enterocolitis[J]. Indian J Pharm Sci, 2023, 85(S5): Spl Issue "22-28". DOI: 10.36468/pharmaceutical-sciences.spl.737.

[11] KRASULOVA K, ILLES P. Intestinal interplay of quorum sensing molecules and human receptors[J]. Biochimie, 2021, 189: 108-119. DOI: 10.1016/j.biochi.2021.06.010.

[12] 王雪, 邹谋, 张绍卿, 等. 坏死性小肠结肠炎对新生小鼠脑损伤及其程度的影响[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(17): 1634-1641. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202103125.
WANG X, ZOU M, ZHANG S Q, *et al*. Effects of necrotizing enterocolitis on brain injury and its severity in neonatal mice[J]. J Third Mil Med Univ, 2021, 43(17): 1634-1641. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202103125.

[13] 邹谋, 王雪, 余玉娟, 等. 缺氧诱导因子-1α对坏死性小肠结肠炎小鼠脑损伤的保护作用[J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(10): 1001-1008. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202110078.
ZOU M, WANG X, YU Y J, *et al*. Protective effect of hypoxia-inducible factor-1α on brain injury in mice with necrotizing enterocolitis[J]. J Army Med Univ, 2022, 44(10): 1001-1008. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202110078.

[14] SODHI C P, WIPF P, YAMAGUCHI Y, *et al*. The human milk oligosaccharides 2′-fucosyllactose and 6′-sialyllactose protect against the development of necrotizing enterocolitis by inhibiting toll-like receptor 4 signaling[J]. Pediatr Res, 2021, 89(1): 91-101. DOI: 10.1038/s41390-020-0852-3.

[15] 黄兰, 熊涛, 唐军, 等. 新生儿坏死性小肠结肠炎临床诊疗指南(2020)[J]. 中国当代儿科杂志, 2021, 23(1): 1-11. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2011145
HUANG L, XIONG T, TANG J, *et al*. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of neonatal necrotizing enterocolitis (2020)[J]. Chin J Contemp Pediatr, 2021, 23(1): 1-11. DOI: 10.7499/j.issn.1008-8830.2011145

[16] MOSCHINO L, DUCI M, FASCETTI LEON F, *et al*. Optimizing nutritional strategies to prevent necrotizing enterocolitis and growth failure after bowel resection[J]. Nutrients, 2021, 13(2): 340. DOI: 10.3390/nu13020340.

[17] LIU C, LI Y Y, CHEN Y P, *et al*. Baicalein restores the balance of Th17/treg cells via aryl hydrocarbon receptor to attenuate colitis[J]. Mediators Inflamm, 2020, 2020: 5918587. DOI: 10.1155/2020/5918587.

[18] LI Y Y, WANG X J, SU Y L, *et al*. Baicalein ameliorates ulcerative colitis by improving intestinal epithelial barrier via AhR/IL-22 pathway in ILC3s[J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(6): 1495-1507. DOI: 10.1038/s41401-021-00781-7.

[19] SHAH K, MARADANA M R, JOAQUINA DELAS M, *et al*. Cell-intrinsic aryl hydrocarbon receptor signalling is required for the resolution of injury-induced colonic stem cells[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 1827. DOI: 10.1038/s41467-022-29098-7.

[20] METIDJI A, OMENETTI S, CROTTA S, *et al*. The environmental sensor AHR protects from inflammatory damage by maintaining intestinal stem cell homeostasis and barrier integrity[J]. Immunity, 2019, 50(6): 1542. DOI: 10.1016/j.immuni.2019.05.024.

[21] ISMAIL A S, VALASTYAN J S, BASSLER B L. A host-produced autoinducer-2 mimic activates bacterial quorum sensing[J]. Cell Host Microbe, 2016, 19(4): 470-480. DOI: 10.1016/j.chom.2016.02.020.

[22] ZARGAR A, QUAN D N, CARTER K K, *et al*. Bacterial secretions of nonpathogenic *Escherichia coli* elicit inflammatory pathways: a closer investigation of interKingdom signaling[J]. mBio, 2015, 6(2): e00025. DOI: 10.1128/mBio.00025-15.

[23] LU P, YAMAGUCHI Y, FULTON W B, *et al*. Maternal aryl hydrocarbon receptor activation protects newborns against necrotizing enterocolitis[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 1042. DOI: 10.1038/s41467-021-21356-4.

[24] RANNUG A. How the AHRbecame important in intestinal homeostasis-a diurnal FICZ/AHR/CYP1A1 feedback controls both immunity and immunopathology[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(16): 5681. DOI: 10.3390/ijms21165681.

(收稿:2023-09-26;修回:2023-11-22)

(编辑 栾 嘉)