

非变性 I 型胶原蛋白对免疫低下大鼠肠道屏障的影响

王超跃, 谢金莉, 叶春婷*

广州创尔生物技术股份有限公司, 广州 510663

摘要: 本文旨在观察非变性 I 型胶原蛋白 (non-denatured type-I collagen, NDC-I) 对免疫低下大鼠肠道屏障的作用。雄性 SD 大鼠 36 只随机分成 4 组, 每组 9 只, 分别灌胃 NDC-I (NDC-I 组, 10.0 mg/(kg·d))、脾氨肽 (阳性对照组, 0.42 mg/(kg·d)) 和等体积蒸馏水 (对照组和模型组), 实验周期为 30 天。第 24、25 天, 对照组腹腔注射蒸馏水, 其余组腹腔注射环磷酰胺 (40 mg/(kg·d)), 每天 1 次, 建立免疫低下大鼠模型。实验结束后, 与模型组比较, NDC-I 组血清中 DAO、ET 和 D-乳酸水平显著降低 ($P < 0.01$), 小肠粘液中 sIgA 含量显著增加 ($P < 0.01$), 空肠组织病理学损伤减轻。研究结果表明, NDC-I 对环磷酰胺致免疫低下大鼠的肠道屏障具有一定保护作用。

关键词: 非变性 I 型胶原蛋白; 肠道屏障; 环磷酰胺; 免疫低下

中图分类号: TS251.9

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022) Suppl-0099-05

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.S.016

Effect of non-denatured type-I collagen on intestinal barrier of immunocompromised rats

WANG Chao-yue, XIE Jin-li, YE Chun-ting*

Guangzhou Trauer Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou 510663, China

Abstract: To investigate the effect of non-denatured type-I collagen (NDC-I) on the intestinal barrier of immunocompromised rats, totally 36 male SD rats were randomly divided into four groups, each with nine rats. NDC-I (NDC-I group, 10.0 mg/(kg·d)), Spleen amino peptide (positive control group, 0.42 mg/(kg·d)) and equal volume of distilled water (control group and model group) were intragastrically administered respectively, and the experiment period was 30 days. On the 24th and 25th days, rats of control group were intraperitoneally injected with distilled water, and the others were intraperitoneally injected with cyclophosphamide (40 mg/(kg·d)) once a day to establish the immunocompromised model. The results showed the level of DAO, ET, and D-lactate in the NDC-I group significantly reduced ($P < 0.01$) compared with the model group. Moreover, sIgA content in the small intestinal mucus significantly increased ($P < 0.01$). Besides, the damage of the jejunum was reduced shown by pathological analysis. According to these results, the NDC-I treatment showed a certain regulatory effect on the intestinal barrier of cyclophosphamide-induced immunocompromised rats.

Key words: non-denatured type I collagen; intestinal barrier; cyclophosphamide; immunocompromised

肠上皮由一层单细胞构成, 它不仅是最大的消化吸收器官, 还是许多病原体入侵或引发感染的主要场所^[1]。功能完好的肠道屏障能够防止肠腔内的微生物和毒素的入侵, 是机体正常运行的基本保障。许多因素会影响肠道屏障功能, 如饮酒、质子泵抑制剂和非甾体类抗炎药的使用、致病菌的入侵等, 都会导致肠道屏障功能失常^[2-5]。临床和实验证据

证明, 肠上皮屏障功能障碍是导致许多常见疾病 (包括食物过敏、炎症性肠病、肠易激综合征、乳糜泻和肥胖症等) 的主要因素^[6]。

环磷酰胺 (cyclophosphamide, CTX) 是一种广泛使用的抗肿瘤药和免疫抑制剂, 具有强大的细胞毒性和免疫抑制作用, 但其细胞毒性并不限于肿瘤组织和免疫细胞, 容易产生多种副作用。CTX 能够产生氧自由基、干扰 DNA 合成、诱导 DNA 损伤, 属于细胞周期非特异性药物, 由于肠上皮细胞增殖迅速、更新率高, CTX 在治疗疾病的同时也会影响肠上皮细胞的正常分裂, 造成感染风险增加、胃肠道不良反

收稿日期: 2021-12-21 接受日期: 2022-01-21

基金项目: 广州创尔生物技术股份有限公司科研攻关项目 (RD202006)

* 通信作者 E-mail: yechunting@trauer.com.cn

应、急性胃肠道黏膜损伤等^[7]。基于 CTX 对肠道的副作用,CTX 常被用于建立肠道损伤动物模型^[8-10]。

胶原蛋白是细胞外基质中含量最丰富的蛋白质,主要参与细胞外基质、基底膜以及细胞外基质的其他结构的原纤维和微原纤维网络的形成^[11]。其中 I 型胶原蛋白是胶原蛋白家族中最常见的一种,由三条多肽链组成,一级结构包含 (Gly-x-y)_n 重复序列,其中 x 常为脯氨酸,y 常为羟脯氨酸或羟赖氨酸^[12]。三条多肽链互相缠绕形成的三螺旋结构,胶原的这种三螺旋结构是其生物学活性的基础,很多细胞上的胶原蛋白受体都只能识别三螺旋结构的氨基酸序列。在高温、强酸、强碱的情况下会不可逆地破坏这种三螺旋结构。我们采用的 NDC-I 是在控温的条件下保留了胶原的三螺旋结构下提取的。我们前期的研究证明了 NDC-I 对环磷酰胺诱导的免疫低下有改善作用,但对肠道屏障的作用还不清楚。因此,在本文中重点探讨了 NDC-I 对 CTX 诱导的肠屏障损伤的保护作用。

本实验采用环磷酰胺诱导的免疫低下大鼠模型,通过血液指标、肠道免疫指标和病理切片评估 NDC-I 对大鼠肠道屏障功能的调节作用。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

脾氨肽口服冻干粉 (spleen aminopeptide oral lyophilized powder, SA, 大连百利天华制药有限公司);注射用环磷酰胺 (Baxter Oncology GmbH);异氟烷 (瑞沃德生命科技有限公司);生理盐水 (广东科伦药业有限公司);二胺氧化酶 (diamine oxidase, DAO) 含量测定试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司);内毒素 (endotoxin, ET) 含量测定试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司);D-乳酸 (D-lactate) 含量测定试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司);分泌性免疫球蛋白 A (secretory immunoglobulin A, sIgA) 含量测定试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司);NDC-I (平均分子量 300 kDa, 纯度 $\geq 90\%$, 来源于牛筋腱, 具有完整三股螺旋结构, 广州创尔生物技术股份有限公司)。

1.2 仪器与设备

ZCS 电子天平 (东莞市怡雪电子有限公司);SC3610 型低速离心机 (科大创新股份有限公司中佳分公司);RT-6100 型酶标分析仪 (美国伯腾仪器有限公司);R620IP 型麻醉机 (瑞沃德生命科技有限公司)。

1.3 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 36 只,购于广东省医学实验动物中心,体质量 180 ~ 200 g,实验单位使用许可证编号:SYXK(粤)2017-0125,许可证号:SCXK(粤)2018-0002。实验动物饲养于 SPF 级屏障环境动物房。

适应性喂养 7 天后,将 36 只大鼠随机分为 4 组 ($n = 9$):NDC-I 组 (灌胃 10.0 mg/(kg·d) 非变性大分子胶原)、SA 组 (阳性对照组,灌胃 0.42 mg/(kg·d) 脾氨肽,人用量等效剂量 6.3 倍)、MC 组 (模型对照组,灌胃等体积蒸馏水)、NC 组 (正常对照组,灌胃等体积蒸馏水)。连续灌胃 30 天,每天 1 次。在实验的第 24 天和第 25 天,NDC-I、SA 和 MC 组腹腔注射环磷酰胺 (40 mg/(kg·d)),NC 组腹腔注射等量生理盐水,每天 1 次。实验第 30 天处死大鼠,取材进行指标检测。实验期间大鼠自由饮水摄食。

1.4 血清中 DAO、ET 和 D-乳酸含量测定

异氟烷麻醉后,SD 大鼠经腹主动脉取血,促凝管收集血液,静置 2 h 后,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液测定血清中 DAO、ET 和 D-乳酸含量,具体操作按照 ELISA 试剂盒说明书进行。

1.5 小肠黏液 sIgA 含量和组织形态观察

大鼠解剖后取紧靠回盲部的小肠肠段约 4 cm,平铺于滤纸上纵向剖开,刮取肠道内容物及黏液入 EP 管,-80 °C 保存。取空肠,迅速用 PBS 缓冲液多次漂洗干净,滤纸吸干,置于 4% 多聚甲醛溶液常温固定后进行石蜡包埋、切片和苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, HE staining),镜下观察组织病理变化。

1.6 统计学分析

实验数据采用 IBM SPSS Statistics 25.0 进行数据处理,计量数据资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示;两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用 ANOVA 方差分析, $P < 0.05$ 表示具有统计学差异, $P < 0.01$ 表示具有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 NDC-I 对血清中 DAO、ET 和 D-乳酸的影响

肠道是一种选择性渗透屏障,在吸收营养物质、电解质和水的同时,对肠腔内的毒素、抗原和微生物保持着有效的防御。DAO 是参与组胺和多胺代谢的一种细胞内酶,在许多哺乳动物物种中,DAO 几乎只存在于小肠黏膜中^[13]。肠黏膜损伤后,肠道通

透性增加,DAO 进入血液循环,血清中的 DAO 水平可以反映肠道黏膜损伤的程度和修复情况^[14]。腹腔注射环磷酰胺后,模型组的血清 DAO 水平显著上升($P < 0.01$),表明模型组的肠黏膜已被损伤;与模型组相比,摄入 NDC-I 的大鼠血清中 DAO 含量显著下降($P < 0.01$),反映 NDC-I 组的肠黏膜得到了一定的修复(见图 1A)。

ET 是构成大多数革兰氏阴性菌外膜外小叶的脂多糖,当细菌死亡或自溶后会释放出来,对宿主

具有毒性^[15]。*D*-乳酸是肠道不能消化吸收的碳水化合物化合物的细菌发酵产物^[16]。ET 和 *D*-乳酸能够通过受损黏膜进入血液,使得血液中 ET 和 *D*-乳酸的水平升高,因此血液中 ET 和 *D*-乳酸的水平可以反映肠黏膜损伤程度和通透性变化。与 DAO 类似,模型组的 ET 和 *D*-乳酸含量都显著增加($P < 0.01$),经过 NDC-I 饮食干预后,血清 ET 和 *D*-乳酸水平都明显下降(见图 1B、图 1C)。

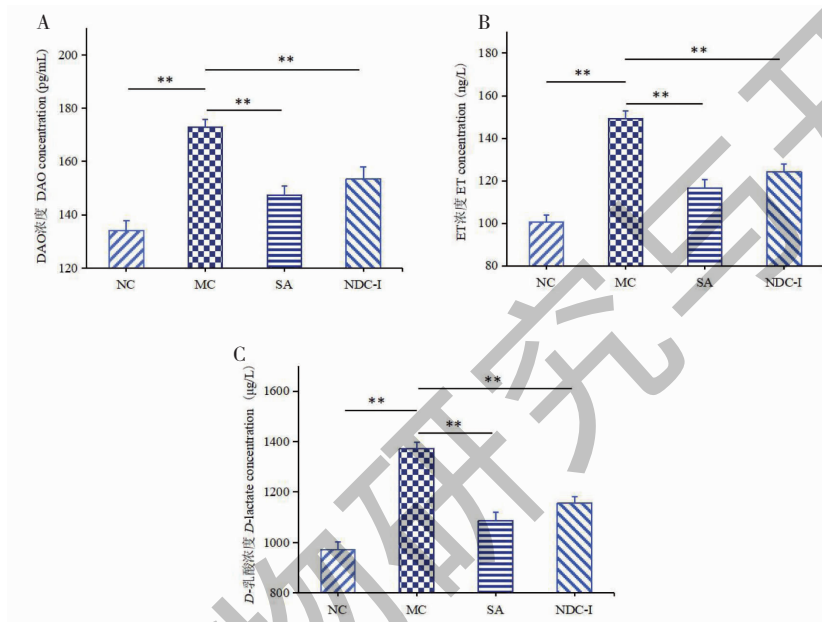


图 1 NDC-I 对大鼠 DAO、ET 和 *D*-乳酸的影响

Fig. 1 Effects of NDC-I on DAO, ET and *D*-lactate of rats

注: ** $P < 0.01$, 下同。Note: ** $P < 0.01$, the same below.

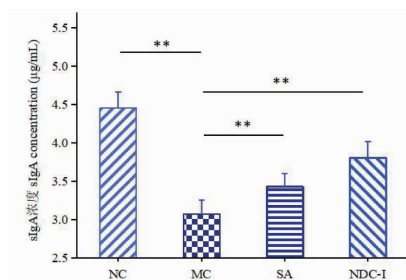


图 2 NDC-I 对大鼠小肠粘液中 sIgA 的影响

Fig. 2 Effects of NDC-I on sIgA in rat small intestinal mucus

2.2 NDC-I 对小肠粘液中 sIgA 的影响

肠腔内存在着大量的微生物、病毒、抗原等物质,由于肠道具有皱褶、绒毛和微绒毛结构,导致肠与抗原接触的面积非常大,因此,有效阻止抗原入侵尤为重要。sIgA 是肠固有层细胞和肠上皮细胞

分泌的重要抗体,是肠道黏膜上的第一道防线。sIgA 由二聚体 IgA (dIgA)、J 链和分泌成分 (SC) 组成,可以通过阻止病原体黏附、促进微生物聚集和清除、调节免疫功能等来抵抗病原微生物和抗原^[17]。因此,肠道中 sIgA 的分泌情况可以在很大程度上反

映肠道上皮免疫屏障的水平^[18]。实验结果表明,模型组小肠粘液中的 sIgA 分泌水平显著下降($P < 0.01$),肠道免疫水平下降,更容易受到病原体的感染;NDC-I 干预后, sIgA 含量显著上升($P < 0.01$) (图 2)。

2.3 NDC-I 对空肠组织形态学的影响

小肠绒毛是肠上皮组织伸入肠腔的叶状结构,包含有吸收细胞、杯状细胞、内分泌细胞和簇状细胞,是评价肠黏膜完整性的重要指标^[19]。而肠黏膜上皮内淋巴细胞是肠道屏障中最先接触病原体的免疫功能细胞,并且通过分泌免疫相关细胞因子来发

挥免疫调节作用,上皮内淋巴细胞越多,说明肠道防御能力越强^[20]。由图 3 可以看出,对照组(见图 3A)肠黏膜组织无损伤性改变,肠上皮完整,绒毛完整,整齐排列。模型组(见图 3B)小肠绒毛偶有出现脱落现象,上皮内吸收细胞数量下降,杯状细胞数量无明显变化。SA 组(见图 3C)能够减轻小肠绒毛脱落的情况,但杯状细胞数量增加不明显,NDC-I 组(见图 3D)能够减轻小肠绒毛脱落的情况,增加上皮吸收细胞的数量。以上结果说明,NDC-I 在一定程度上能够改善环磷酰胺导致的消化吸收功能下降,提高肠道防御能力。

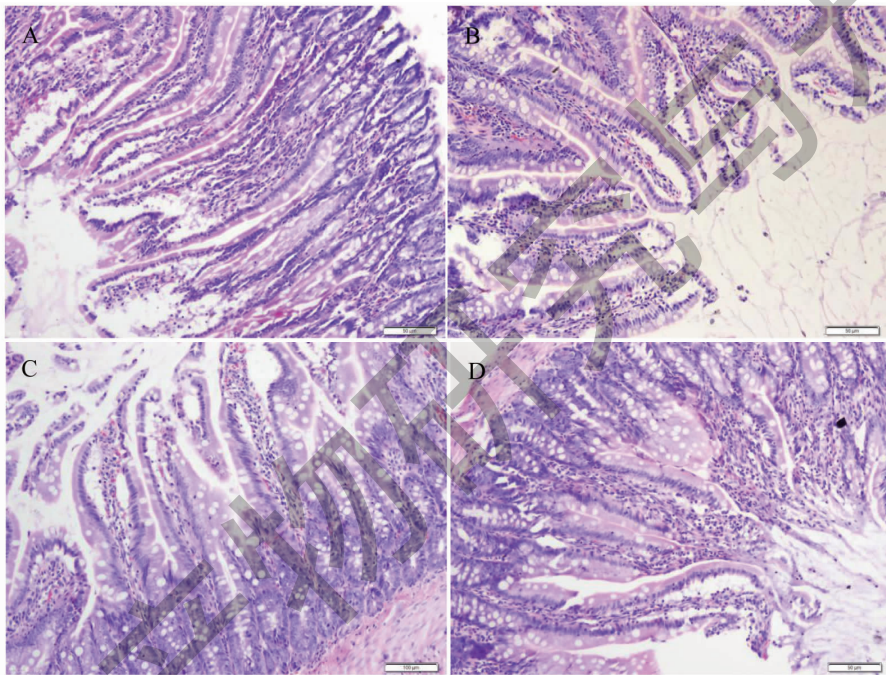


图 3 NDC-I 对大鼠空肠病理损伤的影响($\times 200$, HE 染色)

Fig. 3 Effect of NDC-I on pathological injury of jejunum tissue in rats ($\times 200$, HE staining)

注:A:对照组;B:模型组;C:SA 组;D:NDC-I 组。Note:A:Control group;B:Model group;C:SA group;D:NDC-I group.

3 结论

肠道屏障包括机械屏障、化学屏障、免疫屏障、生物屏障,防止肠内有毒有害物质进入组织体内。本实验探究了 NDC-I 对环磷酰胺诱导的免疫力低下大鼠肠道屏障的保护作用。血清 DAO、ET 和 *D*-乳酸水平是常用的评估肠道损伤的指标,小肠粘液中 sIgA 作为组成肠道黏膜免疫的第一道防线,其含量反映了肠道免疫屏障功能的强弱,而肠组织切片能够最直观地展现肠道损伤情况。腹腔注射 CTX 后,模型组大鼠产生了明显的肠道屏障受损症状,各项指标发生异常。NDC-I 饮食干预后,血清中

DAO、ET 和 *D*-乳酸的水平显著降低,说明肠道通透性降低,肠黏膜受损情况减轻;受损肠道黏液中 sIgA 含量增加,肠道免疫功能有所恢复;空肠组织病理学损伤也得到减轻。综上所述,NDC-I 能在一定程度上降低环磷酰胺的副作用,逆转肠黏膜在药物治疗期间的损害,保护肠道屏障功能。

参考文献

- Groschwitz KR, et al. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis[J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 124: 3-20.
- Diebel L, Liberati D, Diglio C. Alcohol effects on intestinal

- barrier function and inflammatory cytokine production [J]. Shock, 1999, 11 (Suppl): 22.
- 3 Zhang YJ. Effects of proton pump inhibitors on intestinal barrier function in the elderly [J]. China Med Abstracts (Internal Med), 2018, 35: 100-101.
 - 4 Utzeri E, et al. Role of non-steroidal anti-inflammatory drugs on intestinal permeability and nonalcoholic fatty liver disease [J]. World J Gastroenterol, 2017, 39: 3954-3963.
 - 5 McNamara BP, Koutsouris A, O'Connell CB, et al. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function [J]. J Clin Invest, 2001, 107: 621-629.
 - 6 König J, et al. Human intestinal barrier function in health and disease [J]. Clin Transl Gastroen, 2016, 7: e196.
 - 7 Duncan M, et al. Oral and intestinal mucositis-causes and possible treatments [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2003, 18: 853-874.
 - 8 Cai G, Wu Y, Wusiman A, et al. Alhagi honey polysaccharides attenuate intestinal injury and immune suppression in cyclophosphamide-induced mice [J]. Food Funct, 2021, 12: 6863-6877.
 - 9 Ying M, Yu Q, Zheng B, et al. Cultured *Cordyceps sinensis* polysaccharides attenuate cyclophosphamide-induced intestinal barrier injury in mice [J]. J Funct Foods, 2019, 62: 103523.
 - 10 Gao Y, Shi HJ, Chang YG, et al. Protective effects of *Acaudina molpadioides* fucoidan on small intestinal mucosa injury induced by cyclophosphamide in mice [J]. J Food Safe Qual (食品安全质量检测学报), 2019, 10: 56-62.
 - 11 Gelse K, et al. Collagens--structure, function, and biosynthesis [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2003, 55: 1531-1546.
 - 12 Brodsky B, et al. Molecular structure of the collagen triple helix [J]. Adv Protein Chem, 2005, 70: 301-339.
 - 13 Rokkas T, Vaja S, Murphy GM, et al. Postheparin plasma diamine oxidase in health and intestinal disease [J]. Gastroenterology, 1990, 98: 1493-1501.
 - 14 Luk GD, Vaughan WP, Burke PJ, et al. Diamine oxidase as a plasma marker of rat intestinal mucosal injury and regeneration after administration of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine [J]. Cancer Res, 1981, 41: 2334-2337.
 - 15 Cavillon JM. Exotoxins and endotoxins: inducers of inflammatory cytokines [J]. Toxicol, 2018, 149: 45-53.
 - 16 Demircan M, Cetin S, Uguralp S, et al. Plasma D-lactic acid level: a useful marker to distinguish perforated from acute simple appendicitis [J]. Asian J Surg, 2004, 27: 303-305.
 - 17 Li Y, et al. The effects of secretory IgA in the mucosal immune system [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 2032057.
 - 18 Rol N, Favre L, Benyacoub J, et al. The role of secretory immunoglobulin A in the natural sensing of commensal bacteria by mouse Peyer's patch dendritic cells [J]. J Biol Chem, 2012, 287: 40074-40082.
 - 19 Elliott EN, et al. Epigenetic regulation of the intestinal epithelium [J]. Cell Mol Life Sci, 2015, 72: 4139-4156.
 - 20 Yuan Q, et al. Effects of intraepithelial lymphocyte-derived cytokines on intestinal mucosal barrier function [J]. J Interferon Cytokine Res, 2013, 33: 551-562.