

## 枯草芽孢杆菌肽聚糖对 $\beta$ -伴大豆球蛋白诱导的 鲤幼鱼肠上皮细胞损伤的保护作用

张甜甜, 殷海成\*, 黄巍

(河南工业大学生物工程学院, 河南 郑州 450001)

**摘要:** 为观察不同浓度枯草芽孢杆菌肽聚糖对 $\beta$ -伴大豆球蛋白( $\beta$ -conglycinin)诱导的鲤幼鱼肠上皮细胞炎性损伤的保护作用, 将原代培养72 h (26 °C、6%的CO<sub>2</sub>)的24孔鲤幼鱼IECs培养板随机设为6组, 每组4个重复。其中1组为阴性对照, 其余5组用浓度为1.0 mg/mL的枯草芽孢杆菌肽聚糖诱导24 h后, 分别更换浓度为0(阳性对照)、0.15、0.30、0.45和0.60 mg/mL枯草芽孢杆菌肽聚糖培养液, 相同条件培养12、24和36 h, 分别检测细胞的抗超氧阴离子(ASA)和抗羟自由基(AHR)能力、蛋白羰基(PC)含量、抗氧化酶(SOD、CAT和GPx)活性和细胞因子IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-10、TNF- $\alpha$ 1、TGF- $\beta$ 基因表达。结果显示,  $\beta$ -conglycinin上调细胞炎性因子表达, 降低细胞抗氧化性能。添加枯草芽孢杆菌肽聚糖后, 随PG浓度增加和处理时间延长, 细胞抗氧化性能增加, 呈显著的量效关系, 且36 h呈二次曲线相关。IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$ 1 mRNA表达呈二次曲线递减, IL-10、TGF- $\beta$  mRNA表达呈线性递增。研究表明, 不同浓度枯草芽孢杆菌肽聚糖均可保护由 $\beta$ -conglycinin诱导引起的鲤幼鱼IECs氧化损伤, 提高IECs抗氧化能力; 高浓度PG通过抑制致炎因子和促进抗炎细胞因子的基因表达, 提高IECs的抗炎能力。

**关键词:** 鲤; 枯草芽孢杆菌肽聚糖;  $\beta$ -伴大豆球蛋白; 肠上皮细胞; 抗氧化; 炎性因子  
**中图分类号:** S 917.1 **文献标志码:** A

$\beta$ -伴大豆球蛋白( $\beta$ -conglycinin)是大豆中主要致敏蛋白之一, 常引起幼龄动物发生过敏反应<sup>[1]</sup>。过敏必然造成细胞的炎性损伤并伴随细胞膜的脂质过氧化<sup>[2]</sup>。因此, 由 $\beta$ -conglycinin诱导的过敏反应也必然影响细胞的抗氧化性能。此外, 脂质过氧化也会对蛋白质结构改变和功能损伤产生负面效应<sup>[3]</sup>, 常把蛋白质羰基数目作为细胞氧化损伤并反映损伤程度的主要指标<sup>[4]</sup>。Zhang等<sup>[5]</sup>研究发现, 建鲤(*Cyprinus carpio* var. *jian*)幼鱼摄食8%的 $\beta$ -conglycinin的饲料, 肠上皮细胞(intestinal epithelial cells, IECs)抗氧化性能显著降低。因此, 推测 $\beta$ -conglycinin诱导的肠黏膜的炎性反应至少部分原因在于对IECs的氧化损伤。通过抑制细胞的氧化应激和/或增强细胞的抗氧化性能是

预防 $\beta$ -conglycinin致敏损伤的理想方法。

益生菌肽聚糖(peptidoglycan, PG)能增强动物机体特异性和非特异性免疫反应, 发挥抗炎、抗过敏等功能<sup>[6]</sup>。有研究表明, 乳酸菌(*Lactobacillus*)肽聚糖可以诱导小鼠(*Mus musculus*)IECs产生致炎因子(IL-1、IL-6、IL-12、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ )和抗炎因子(IL-10、TGF- $\beta$ )<sup>[7]</sup>, 并激活下游信号通路, 维护Th1/Th2失衡, 进而缓解或消除过敏性炎性损伤。而嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)肽聚糖还可以通过抑制脂多糖诱导RAW 264.7细胞的iNOS表达以增强其抗炎能力<sup>[8]</sup>。可见, 益生菌肽聚糖通过调节相关细胞因子基因表达来缓解炎性反应。此外, 双歧杆菌(*Bifidobacterium*)肽聚糖以占位定植的方式, 阻止病原菌对上皮细胞黏

收稿日期: 2017-03-12 修回日期: 2017-07-12

资助项目: 河南省科技攻关项目(172102110205)

通信作者: 殷海成, E-mail: yhch007@126.com

附<sup>[9]</sup>, 或刺激机体分泌IgA, 在肠黏膜形成保护层, 以阻断病原菌的侵袭<sup>[10]</sup>。然而, 关于枯草芽孢杆菌肽聚糖(*Bacillus subtilis* PG)抗氧化和抗炎的机理还知之甚少。鉴于此, 本实验拟先以 $\beta$ -conglycinin诱导鲤幼鱼IECs 24 h, 再用不同浓度*B. subtilis* PG作用12、24和36 h, 通过检测炎症因子基因表达和抗氧化性能改变, 研究*B. subtilis* PG对IECs损伤的保护作用。该结果为鱼类营养生理研究提供基础理论, 为饲料配方研究提供应用参考数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 $\beta$ -conglycinin和肽聚糖制备

$\beta$ -conglycinin(80%)由中国农业大学馈赠(专利号200410029589-4, 中国), 采用凝胶柱层析方法进一步纯化, 结果纯度为99%,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。方法简述: Sepharose CL-6B装柱(110 cm $\times$ 4.5 cm), KP缓冲液冲洗至平衡, 将溶有 $\beta$ -conglycinin的KP缓冲液上样、过滤、洗脱(pH 7.6的磷酸盐缓冲液)、检测(280 nm紫外可见分光光度计), 收集洗脱液。洗脱液透析去盐(4 $^{\circ}\text{C}$ ), 冻干后即得到纯化的 $\beta$ -conglycinin。利用BCA蛋白检测试剂盒(北京鼎国试剂公司, 中国)检测。

实验用肽聚糖源于枯草芽孢杆菌BS-02(*B. subtilis*-02)。菌株无菌条件下划线接种于普通琼脂平板培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养18 h, 挑取单个菌落接种于液态LB培养基(Luria-Bertani)30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min振荡培养18 h(菌株处于对数期), 3 000 r/min离心10 min。取沉淀菌体20 g, 用10%的三氯乙酸溶液(TCA)按照10:1比例使其溶解、混匀, 在轻轻搅拌条件下75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴20 min使菌体裂解, 逐渐冷却至室温, 8 000 r/min离心10 min后弃上清液, 用灭菌蒸馏水洗涤沉淀, 重复3次, 收集沉淀。将所得沉淀按照1:5(W/V)加入pH为8.0的胰蛋白酶-磷酸盐缓冲液(胰蛋白酶3 mg/mL), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min摇床振荡5 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min离心5 min, 收集上清液, 上清液12 000 r/min离心15 min, 将得到的沉淀用灭菌蒸馏水洗涤3次, 加入氯仿: 甲醇为1:2(V/V)的混合溶液处理5 h, 12 000 r/min离心15 min, 所得沉淀用无水乙醇洗涤脱水, 70 $^{\circ}\text{C}$ 干燥, 即得*B. subtilis* PG(约2.3 g)。

### 1.2 实验鲤幼鱼肠上皮细胞分离及原代培养

实验鲤幼鱼购于河南省水产科学研究院(黄

河鲤鱼良种场)并经河南省实验动物学会批准使用。选择体格健壮、均匀一致的鲤幼鱼50尾于水族箱中, 饲喂以鱼粉为蛋白源的饲料(粗蛋白34%、粗脂肪36%), 进行14 d驯化, 期间连续充气(氨氮质量浓度 $\leq 0.5\text{ mg/L}$ , 溶解氧 $\geq 5.0\text{ mg/L}$ ), 温度为25~27 $^{\circ}\text{C}$ , 自然光照。

肠上皮细胞分离 驯化实验结束, 空腹24 h, 选取体质量为(10.25 $\pm$ 0.01) g幼鲤, 用超纯水冲洗体表2次, MS-222麻醉, 迅速置于75%乙醇中浸泡5 s, 于超净工作台上解剖, 取出肠道中段, 去除肠系膜, 用注射器(10 mL)吸取D-Hanks平衡盐溶液冲洗肠段内腔3~4次, 将肠段剪成1 mm<sup>3</sup>大小的组织块, D-Hanks平衡盐溶液反复清洗, 800 r/min离心3 min, 弃去上清液, 将沉淀转入细胞培养瓶(50 mL)中, 加入胶原酶XI(终浓度0.5%)和中性蛋白酶I(终浓度0.2%)联合消化液, 28 $^{\circ}\text{C}$ 振荡消化30 min后, 按消化液: 胎牛血清(V/V)=19:1的比例立即加入FBS终止消化, 玻璃吸管(10 mL)反复吹打5 min后, 静置1 min, 800 r/min离心5 min, 加入含有胎牛血清(10%)、青霉素(500 U/mL)、链霉素(0.2 mg/mL)、转铁蛋白(0.2  $\mu\text{g/mL}$ )的DMEM培养液, 将细胞稀释至350个/cm<sup>2</sup>, 接种于用胶原蛋白涂抹的24孔细胞培养板中, 在(26 $\pm$ 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 、6% CO<sub>2</sub>条件下静置原代培养48 h, 以后每48 h更换1次培养液。每天观察细胞, 待细胞铺满培养板底。弃去原培养液, 每孔加入200  $\mu\text{L}$  DMEM培养液, 冲洗细胞2次, 按实验设计方案分别进行实验。

### 1.3 $\beta$ -conglycinin对IECs的影响

将培养好的肠上皮细胞用1.0 mg/mL的 $\beta$ -conglycinin诱导24 h。基于前期实验, 1.0 mg/mL的 $\beta$ -conglycinin造成鲤幼鱼肠上皮细胞活性比对照组显著降低, 而乳酸脱氢酶(LDH)及表达的IL-1 $\beta$ 、IL-8、TNF- $\alpha$  mRNA炎症因子显著增加<sup>[11]</sup>。

### 1.4 PG对 $\beta$ -conglycinin损伤IECs的影响

取 $\beta$ -conglycinin诱导IECs 24 h的细胞培养板, 设计1个正对照组(添加1.0 mg/mL的 $\beta$ -conglycinin)和4个不同*B. subtilis* PG(0.15、0.30、0.45和0.60 mg/mL)处理组, 另设原代培养的肠上皮细胞作为阴性对照组(未添加PG和 $\beta$ -conglycinin), 每组4个重复, 每个重复1孔细胞, 在26 $^{\circ}\text{C}$ 、6% CO<sub>2</sub>生化培养箱孵育12、24和36 h。

## 1.5 IECs培养液和细胞裂解液的收集

**IECs培养液的收集** 在12、24和36 h孵育结束后, 收集各孔细胞中的培养液,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

**IECs细胞裂解液的收集** 将已收集细胞培养液的培养板, 用200  $\mu\text{L}$  DMEM培养液冲洗细胞1次, 然后每孔加入含0.05%胰蛋白酶200  $\mu\text{L}$ 使细胞脱落, 每孔再加入200  $\mu\text{L}$ 无血清DMEM培养液终止消化, 转入2 mL EP管, 1 000 r/min离心10 min, 去上清液, 每管加1.5 mL PBS吹打均匀。冰浴、400 W超声波细胞粉碎仪破碎细胞, 3 500 r/min离心10 min, 收集细胞裂解液。

## 1.6 抗氧化性能检测

**总抗氧化能力指标测定** 抗超氧阴离子(anti-superoxide anion, ASA)活力测定: 黄嘌呤氧化酶催化黄嘌呤产生超氧阴离子自由基, 通过电子传递物质及着色剂Gross氏显色(呈紫红色), 通过紫外分光光度计550 nm处的吸光值, 并以维生素C为标准计算抗超氧阴离子能力。抗羟自由基(anti-hydroxy radical, AHR)活力测定采用Fenton反应。反应体系中OH $\cdot$ 量与H $_2$ O $_2$ 成正比, 经添加电子受体和Gross氏显色(红色), 通过紫外分光光度计在550 nm处的吸光值, 计算样品抗羟自由基能力。

细胞蛋白羰基(protein carbonyl, PC)含量测定

参照Baltacıoğlu等<sup>[4]</sup>应用的2,4-二硝基苯肼(DNPH)方法检测蛋白质羰基含量。通过紫外分光光度计340 nm处的吸光值计算蛋白质羰基含量。

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)活性均严格按照试剂盒说明书进行测定(南京建成生物工程研究所)。

## 1.7 炎症因子基因表达

**提取总RNA及合成cDNA** 应用RNAiso Plus(Biomiga公司, 美国)并严格按照说明书操作方法提取细胞总RNA。其质量和数量经OD $_{260}$ /OD $_{280}$ 值和1%琼脂糖凝胶电泳检测。细胞cDNA的合成采用Prime Script<sup>TM</sup> RT-PCR逆转录试剂盒(宝生物工程(中国)有限公司, 中国)合成, 反应液[总RNA 2  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{mol/L}$  Oligo (dT) 0.5  $\mu\text{L}$ 、5 $\times$ Prime Script<sup>TM</sup> Buffer 2  $\mu\text{L}$ 、Prime Script<sup>TM</sup> RT Enzyme Mix I 0.5  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{mol/L}$  Random 6 mers 0.5  $\mu\text{L}$ 、RNase-free dH $_2$ O 4.5  $\mu\text{L}$ ]轻柔混匀, 于PCR仪37  $^{\circ}\text{C}$ 、15 min, 随后85  $^{\circ}\text{C}$ 灭活5 s。产物保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

**IL-1 $\beta$ 、IL-8、IL-10、TNF- $\alpha$ 1、TGF- $\beta$ 和 $\beta$ -action的表达** 参照GenBank中公布的鲤序列, 其中以 $\beta$ -action为内参引物, 引物设计由大连宝生物技术有限公司利用Primer 5.0软件(Premier Biosoft International)合成(表1)。反应条件: 预变

表1 目的基因引物序列

Tab. 1 Primer sequences of designated genes

目的基因 target gene	引物序列 primer sequences	登录号 GenBank accession no.	产物大小/bp product length
IL-1 $\beta$	F: 5'-AAGGAGGCCAGTGGCTCTGT-3'	AB010701	69
	R: 5'-CCTGAAGAAGAGGAGGCTGTCA-3'		
IL-8	F: 5'-ATGCTTTTGTATCTGCACAGCTGCAC-3'	AB470924	150
	R: 5'-TGGTCCAGCAGGAATAACCCTCAG-3'		
IL-10	F: 5'-GCTGTACGTCATGAACGAGAT-3'	AB110780	132
	R: 5'-CCCCTTGAGATCCTGAAATAT-3'		
TNF- $\alpha$ 1	F: 5'-GCTGTCTGCTTCACGCTCAA-3'	AJ311800	106
	R: 5'-CCTTGGAAGTGACATTTGCTTTT-3'		
TGF- $\beta$	F: 5'-ACGCTTTATCCCAACCAAA-3'	AF136947	97
	R: 5'-GAAATCCTTGCTCTGCCTCA-3'		
$\beta$ -action	F: 5'-AGACATCAGGGTGTTCATGGTTGGT-3'	M24113	352
	R: 5'-CTCAAACATGATCTGTGTCAT-3'		

性98℃、10 s, 变性98℃、5 s, 退火72℃、15 s, 40个循环。反应体系(总体积15 μL, 上游和下游引物各1.0 μL、SYBR®RremixEx Taq™ 7.5 μL、模板2 μL、RNase-free dH<sub>2</sub>O 3.5 μL)经混合和离心处理, 应用ABI Prism 7000实时定量荧光PCR仪(美国应用生物系统公司)分析, 每个基因重复5次。根据扩增结果, 分别得出各引物PCR扩增的C<sub>T</sub>值, 运用 $2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-C_T\text{目的基因} - C_T\text{管家基因}}$ 公式, 依据标准曲线计算目标和内参基因的相对表达丰度。

### 1.8 统计分析

实验数据用平均值±标准差表示(mean±SD), 采用SPSS 17.0统计软件进行双因素方差分析(Two-Way ANOVA), 并运用Duncan氏方法作多重比较, 以检验不同处理组之间差异显著性, 差异显著性水平为P<0.05。对阴性对照和正对照采用独立样本t检验。

## 2 结果

### 2.1 β-conglycinin诱导鲤幼鱼肠上皮细胞氧化损伤

单独使用β-conglycinin诱导鲤幼鱼IECs, IECs的ASA、AHR、CAT、GPx、24和36 h SOD活性显著降低, PC显著增加(P<0.05)(表2)。提示鲤幼鱼IECs氧化损伤。

### 2.2 PG对β-conglycinin诱导鲤幼鱼IECs氧化损伤的影响

PG对于β-conglycinin诱导的IECs氧化损伤具有一定的保护作用, 其保护效果与处理时间和剂量相关。即在12和24 h, 随*B. subtilis* PG浓度增加, GPx活性呈二次递增外(Q: P<0.05, 24 h), ASA、AHR、SOD、CAT活性和PC含量各组差异不显著(P>0.05)(表2)。在36 h, 随*B. subtilis* PG浓度增加, PC含量呈显著二次曲线递减, 其他各组抗氧化活性呈显著二次曲线递增(Q: P<0.05), 由此可知, 随肽聚糖处理时间的延长, 高浓度肽聚糖可抑制β-conglycinin诱导肠上皮细胞的氧化损伤。

### 2.3 β-conglycinin诱导对鲤幼鱼IECs炎性因子基因表达的影响

β-conglycinin诱导鲤幼鱼IECs的IL-1β、IL-

8、TNF-α1、IL-10和TGF-β mRNA表达显著增加(P<0.05)(表3)。

### 2.4 PG对β-conglycinin诱导的鲤幼鱼IECs炎性因子基因表达的影响

随*B. subtilis* PG浓度增加和处理时间的延长, IL-1β、IL-8和TNF-α1 mRNA表达呈显著二次曲线减少, 而IL-10和TGF-β mRNA表达则呈线性递增(P<0.05)(表3)。可知, 随*B. subtilis* PG浓度增加和处理时间的延长, *B. subtilis* PG可抑制β-conglycinin诱导IECs的炎症反应。

## 3 讨论

β-conglycinin是公认的致敏源, 常常诱导幼龄动物发生过敏反应, 除了产生敏感性炎症外, 还诱导机体氧化损伤, 不仅导致机体炎性因子分泌增加, 而且造成抗氧化性能降低<sup>[12]</sup>。其主要在于炎症伴随脂质的过氧化并产生大量活性氧, 造成氧化损伤, 同时使抗氧化酶活性降低<sup>[13]</sup>。因此, 检测总抗氧化指标、抗氧化酶活性及蛋白羰基能反映细胞脂质过氧化反应强弱, 直接或间接反映细胞氧化损伤程度, 也是标记细胞氧化状态的常用指标<sup>[14]</sup>。本研究结果显示, 单独使用β-conglycinin, IECs的ASA、AHR活力及SOD、CAT和GPx活性显著减低, 而PC含量显著增加, 提示鲤幼鱼IECs氧化损伤。其原因在于细胞膜中多不饱和脂肪酸含量较多, 极易受氧自由基等攻击, 引起细胞膜的脂质过氧化, 而脂质过氧化使活性氧的活性增强并通过级联放大作用, 引起蛋白氧化, 使其氧化产物蛋白羰基增加<sup>[15]</sup>。

氧化应激不断地产生各种自由基, 引发脂质过氧化, 造成氧化损伤, 同时使抗氧化酶活性降低, 因此, 增强抗超氧阴离子、抗羟自由基和提高抗氧化酶活性有利于保护细胞免受氧化损伤。本研究结果显示, 伴随PG浓度依次递增, ASA、AHR活力及SOD、CAT和GPx活性逐渐递增, 而PC依次递减, 但24 h内无显著差异, 仅在36 h时呈二次下降。说明高浓度和长时间PG处理, 细胞能增强其抵御β-conglycinin的氧化应激。Mantis等<sup>[10]</sup>研究嗜酸乳杆菌胞壁肽聚糖发现, 肽聚糖能诱导小鼠肠黏膜形成保护膜, 阻断病原菌对肠黏膜的炎性损伤, 从而缓解氧化应激。此外, Frodermann等<sup>[9]</sup>研究双歧杆菌肽

表 2 PG对 $\beta$ -conglycinin诱导鲤幼鱼IECs抗氧化性能的影响Tab. 2 The effects of peptidoglycan on the antioxidant properties of IECs in juvenile *C. carpio* induced with  $\beta$ -conglycinin

处理时间/h time	对照组 control group				肽聚糖浓度/(mg/mL) PG concentration					<i>P</i>	
	阴性对照 negative control	SD	正对照 positive control	SD	0.15	0.30	0.45	0.60	SD	线性(L) linear	二次曲线(Q) quadratic
ASA/(U/mg)											
12	16.06	1.21 <sup>a</sup>	14.11	0.93 <sup>b</sup>	14.21	14.28	14.97	15.89	1.27	0.28	0.09
24	17.11	2.02 <sup>a</sup>	15.05	0.76 <sup>b</sup>	15.15	15.52	15.91	16.58	0.87	0.15	0.06
36	17.42	1.43 <sup>a</sup>	14.64	1.03 <sup>b</sup>	14.63	15.12	15.27	16.16	1.05	0.07	0.02
AHR/(U/mg)											
12	966.11	8.04 <sup>a</sup>	913.22	10.22 <sup>b</sup>	915.07	927.14	939.68	959.32	9.23	0.43	0.12
24	984.13	5.12 <sup>a</sup>	883.06	6.37 <sup>b</sup>	924.44	930.01	942.33	961.30	11.41	0.31	0.07
36	992.55	7.39 <sup>a</sup>	862.37	11.08 <sup>b</sup>	927.65	931.56	949.58	988.97	10.08	0.16	0.04
PC/(nmol/mg)											
12	0.48	0.03 <sup>b</sup>	0.64	0.01 <sup>a</sup>	0.66	0.61	0.59	0.57	0.01	0.37	0.12
24	0.51	0.01 <sup>b</sup>	0.76	0.02 <sup>a</sup>	0.79	0.72	0.69	0.66	0.01	0.24	0.08
36	0.58	0.03 <sup>b</sup>	0.89	0.02 <sup>a</sup>	0.91	0.88	0.81	0.70	0.02	0.10	0.04
SOD/(U/mg)											
12	13.66	1.03	12.96	2.21	13.01	13.38	13.47	13.86	1.03	0.54	0.37
24	14.06	0.98 <sup>a</sup>	10.91	1.69 <sup>b</sup>	13.82	14.52	14.91	14.61	0.75	0.21	0.14
36	15.98	1.34 <sup>a</sup>	9.73	0.37 <sup>b</sup>	13.97	14.86	15.12	15.79	0.49	0.11	0.01
CAT/(U/mg)											
12	1.76	0.33 <sup>a</sup>	1.51	0.04 <sup>b</sup>	1.53	1.59	1.66	1.78	0.04	0.20	0.26
24	1.98	0.08 <sup>a</sup>	1.16	0.10 <sup>b</sup>	1.59	1.64	1.72	1.86	0.06	0.14	0.08
36	2.19	0.05 <sup>a</sup>	0.89	0.02 <sup>b</sup>	1.62	1.99	2.03	2.23	0.03	0.09	0.03
GPx/(U/mg)											
12	609.36	8.36 <sup>a</sup>	531.36	10.03 <sup>b</sup>	533.63	541.38	577.44	599.13	10.01	0.55	0.03
24	618.63	10.02 <sup>a</sup>	510.37	8.64 <sup>b</sup>	544.39	552.47	570.39	604.68	8.34	0.31	0.04
36	631.01	6.58 <sup>a</sup>	501.22	11.21 <sup>b</sup>	551.06	560.16	577.40	633.20	9.22	0.08	0.01

注: 同行数据上标不同小写字母代表差异显著性为 $P<0.05$ , 下同

Notes: in the same line, values with different lowercase letter superscripts mean significant difference ( $P<0.05$ ), the same below

聚糖能阻止病原菌对上皮细胞黏附, 归于肽聚糖占位定植以阻止病原体对上皮细胞的应激反应, 间接缓解炎症反应以防御氧化损伤。因此, 使用较高浓度的肽聚糖以增强IECs的抗氧化能力, 或许表明肽聚糖能优先占位定植竞争 $\beta$ -conglycinin与细胞结合位点, 从而缓解 $\beta$ -conglycinin的氧化应激。

炎症反应产生炎性因子, 并将IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 作为致炎因子, IL-10和TGF- $\beta$ 作为抗炎因子, 其

动态变化决定炎症发展方向<sup>[16-17]</sup>。本研究表明, 单独使用 $\beta$ -conglycinin能显著上调鲤幼鱼IECs炎性因子IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$  mRNA的表达, 表明 $\beta$ -conglycinin诱导细胞炎症反应, 并从细胞的抗氧化能力降低也得到进一步证实, 这与Zhang等<sup>[5]</sup>研究 $\beta$ -conglycinin诱导建鲤幼鱼肠上皮细胞得出的结果相一致。抑制致炎因子和/或增强抗炎因子, 能有效预防炎性损伤<sup>[18]</sup>。本研究结果显示, 肽聚糖显著下调致炎因子的表达和上调抗炎因

表 3 PG对β-conglycinin诱导的鲤幼鱼IECs炎性因子基因表达的影响

Tab. 3 The effects of different concentrations of peptidoglycan on the cytokine gene expression of IECs in juvenile *C. carpio* induced with β-conglycinin

处理时间/h time	对照组 control group		肽聚糖浓度/(mg/mL) PG concentration		P						
	阴性对照 negative control	SD	正对照 positive control	SD	0.15 0.30 0.45 0.60	SD	线性(L) linear 二次曲线(Q) quadratic				
IL-1β											
12	1.00	0.03 <sup>b</sup>	1.63	0.06 <sup>a</sup>	1.55	1.42	1.21	1.11	0.05	0.28	0.04
24	1.09	0.04 <sup>b</sup>	1.74	0.05 <sup>a</sup>	1.53	1.40	1.16	1.05	0.03	0.35	0.01
36	1.21	0.01 <sup>b</sup>	1.95	0.02 <sup>a</sup>	1.48	1.43	1.13	1.03	0.02	0.37	0.01
IL-8											
12	1.00	0.03 <sup>b</sup>	1.57	0.04 <sup>a</sup>	1.51	1.35	1.23	1.05	0.03	0.63	0.05
24	1.16	0.01 <sup>b</sup>	1.74	0.02 <sup>a</sup>	1.57	1.31	1.16	1.02	0.03	0.39	0.04
36	1.25	0.04 <sup>b</sup>	1.96	0.06 <sup>a</sup>	1.62	1.29	1.18	1.01	0.01	0.23	0.01
TNF-α1											
12	1.00	0.02 <sup>b</sup>	1.77	0.06 <sup>a</sup>	1.71	1.66	1.59	1.14	0.03	0.54	0.02
24	1.49	0.02 <sup>b</sup>	1.98	0.06 <sup>a</sup>	1.88	1.62	1.27	1.09	0.01	0.31	0.04
36	1.88	0.03 <sup>b</sup>	2.29	0.02 <sup>a</sup>	1.93	1.54	1.11	1.06	0.02	0.06	0.05
IL-10											
12	1.00	0.03 <sup>b</sup>	1.48	0.05 <sup>a</sup>	1.41	1.59	1.88	1.96	0.10	0.05	0.22
24	1.26	0.01 <sup>b</sup>	1.54	0.02 <sup>a</sup>	1.46	1.79	1.96	2.19	0.05	0.03	0.34
36	1.61	0.06 <sup>b</sup>	1.63	0.01 <sup>a</sup>	1.55	1.83	2.02	2.31	0.03	0.01	0.52
TGF-β											
12	1.00	0.03 <sup>a</sup>	1.73	0.02 <sup>b</sup>	1.98	2.08	2.25	2.36	0.11	0.02	0.56
24	1.24	0.06 <sup>a</sup>	1.81	0.05 <sup>b</sup>	1.96	2.11	2.38	2.39	0.07	0.04	0.32
36	1.33	0.02 <sup>a</sup>	1.96	0.04 <sup>b</sup>	2.01	2.19	2.47	2.53	0.03	0.01	0.11

子的基因表达，表明肽聚糖能预防β-conglycinin诱导的细胞炎症损伤。Wu等<sup>[6]</sup>通过乳酸菌肽聚糖(*Lactobacillus* PG)对脂多糖诱导的RAW-264.7细胞的抗炎效果分析显示，肽聚糖能显著抑制RAW-264.7细胞下游NF-κB途径，降低IL-1β和TNF-α mRNA的表达与释放，以抑制炎症反应的发生。此外，Fernandez等<sup>[19]</sup>发现肽聚糖能够通过TLR2受体识别并诱导鼠源树突细胞表达IL-10和TGF-β，而TGF-β在预防细胞炎性反应中具有重要作用<sup>[20]</sup>。因此，*B. subtilis* PG通过上调TGF-β水平参与保护β-conglycinin诱导的炎症反应。然而，关于肽聚糖防御β-conglycinin诱导的肠上皮细胞炎性损伤还需要更深入研究。

研究表明，β-conglycinin能诱导鲤幼鱼

IECs氧化损伤，并通过上调IL-1β、IL-8、TNF-α mRNA的表达刺激炎症发展；而高浓度*B. subtilis* PG能抑制β-conglycinin的氧化应激，并通过下调致炎细胞因子和上调抗炎细胞因子的基因表达，提高细胞抗炎能力。

参考文献：

[ 1 ] Zhao Y, Qin G X, Sun Z W, *et al.* Effects of glycinin and β-conglycinin on enterocyte apoptosis, proliferation and migration of piglets[J]. Food and Agricultural Immunology, 2010, 21(3): 209-218.

[ 2 ] West X Z, Malinin N L, Merkulova A A, *et al.* Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands[J]. Nature, 2010, 467(7318):

- 972-976.
- [ 3 ] Bhor V M, Raghuram N, Sivakami S. Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004, 36(1): 89-97.
- [ 4 ] Baltacıoğlu E, Akalın F A, Alver A, *et al.* Protein carbonyl levels in serum and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis[J]. Archives of Oral Biology, 2008, 53(8): 716-722.
- [ 5 ] Zhang J X, Guo L Y, Feng L, *et al.* Soybean  $\beta$ -conglycinin induces inflammation and oxidation and causes dysfunction of intestinal digestion and absorption in fish[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58115.
- [ 6 ] Wu Z, Pan D D, Guo Y X, *et al.* Structure and anti-inflammatory capacity of peptidoglycan from *Lactobacillus acidophilus* in RAW-264.7 cells[J]. Carbohydrate Polymers, 2013, 96(2): 466-473.
- [ 7 ] Christensen H R, Frøkiaer H, Pestka J J. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells[J]. Journal of Immunology, 2002, 168(1): 171-178.
- [ 8 ] 李丹, 李艾黎, 季晓梅, 等. 乳杆菌肽聚糖对 $\beta$ -乳球蛋白致敏小鼠脾细胞Th1/Th2及Treg/Th17失衡的体外影响[J]. 微生物学通报, 2014, 41(7): 1334-1341.
- Li D, Li A L, Ji X M, *et al.* Effect of whole peptidoglycan from lactobacilli on the imbalance of Th1/Th2 and Treg/Th17 in lymphocyte of bovine  $\beta$ -lactoglobulin-sensitized mice *in vitro*[J]. Microbiology China, 2014, 41(7): 1334-1341(in Chinese).
- [ 9 ] Frodermann V, Chau T A, Sayedyahosseini S, *et al.* A modulatory interleukin-10 response to staphylococcal peptidoglycan prevents Th1/Th17 adaptive immunity to *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Infectious Diseases, 2011, 204(2): 253-262.
- [10] Mantis N J, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut[J]. Mucosal Immunology, 2011, 4(6): 603-611.
- [11] Yin H C, Guan J J, Yang D H, *et al.* Effects of dietary protein level on growth performance, muscle composition and nitrogen excretion in juvenile *Ancherythroculter nigrocauda* (Yih & Wu 1964)[J]. Asian Journal of Science and Technology, 2014, 5(3): 208-213.
- [12] Sun P, Li D F, Li Z J, *et al.* Effects of glycinin on IgE-mediated increase of mast cell numbers and histamine release in the small intestine[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2008, 19(9): 627-633.
- [13] Turan A, Mahmood A. The profile of antioxidant systems and lipid peroxidation across the crypt-villus axis in rat intestine[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2007, 52(8): 1840-1844.
- [14] Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification[J]. Toxicologic Pathology, 2002, 30(6): 620-650.
- [15] Koven W, Rojas-García C, Finn R, *et al.* Stimulatory effect of ingested protein and/or free amino acids on the secretion of the gastro-endocrine hormone cholecystokinin and on tryptic activity, in early-feeding herring larvae, *Clupea harengus*[J]. Marine Biology, 2002, 140(6): 1241-1247.
- [16] Urán P A, Gonçalves A A, Taverne-Thiele J J, *et al.* Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(6): 751-760.
- [17] Komatsu K, Tsutsui S, Hino K, *et al.* Expression profiles of cytokines released in intestinal epithelial cells of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, in response to bacterial infection[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2009, 33(4): 499-506.
- [18] Fu C L, Ye Y L, Lee Y L, *et al.* Effects of overexpression of IL-10, IL-12, TGF- $\beta$  and IL-4 on allergen induced change in bronchial responsiveness[J]. Respiratory Research, 2006, 7(1): 72.
- [19] Fernandez E M, Valenti V, Rockel C, *et al.* Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide[J]. Gut, 2011, 60(8): 1050-1059.
- [20] Lilleeng E, Penn M H, Haugland Ø, *et al.* Decreased expression of TGF- $\beta$ , GILT and T-cell markers in the early stages of soybean enteropathy in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(1): 65-72.

## Protective effect of *Bacillus subtilis* peptidoglycan on $\beta$ -conglycinin-induced intestinal epithelial cells damage of juvenile carp (*Cyprinus carpio*)

ZHANG Tiantian, YIN Haicheng\*, HUANG Wei

(College of Biological Engineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** This experiment was conducted to investigate the protective effects of different concentration of *Bacillus subtilis* peptidoglycan on the  $\beta$ -conglycinin-induced inflammatory lesions in intestinal epithelial cells of juvenile carp (*Cyprinus carpio*). In 24-cell microplates, the intestinal epithelial cells (IECs) of juvenile carp were primarily cultured for 72 h at 26 °C and 6% CO<sub>2</sub>, and then the IECs were randomly divided into 6 groups with 4 replicates per group. One of the 6 groups was set as negative control group, and the other groups were all supplemented with 1.0 mg/mL  $\beta$ -conglycinin in culture medium in order to establish inflammatory lesions. After 24 h further culture in the same conditions, the culture medium was changed into the *B. subtilis* peptidoglycan culture medium with 0 (positive control group), 0.15, 0.30, 0.45 and 0.60 mg/mL, respectively. The samples were collected to measure the antioxidant and anti-inflammatory indices after 12, 24 and 36 h *B. subtilis* peptidoglycan culture. The results showed as follows:  $\beta$ -conglycinin exposure significantly decreased the activity of ASA, AHR, SOD, CAT, GPx, and increased the content of PC and the mRNA expression of inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ <sub>1</sub>, IL-10 and TGF- $\beta$ ). The 12, 24 and 36 hours after the peptidoglycan were given, the activity of ASA, AHR, SOD, CAT, GPx and the content of PC in the cells were decreased in a dose-dependent manner; and the mRNA levels of IL-1 $\beta$ , IL-8 and TNF- $\alpha$ <sub>1</sub> were down-regulated and IL-10 and TGF- $\beta$  were up-regulated. Different concentration of *B. subtilis* peptidoglycan could significantly improve the anti-oxidative activity, and increase the mRNA levels of anti-inflammation cytokine, and decrease the pro-inflammation cytokine, and inhibit the inflammatory response of the carp IECs induced by  $\beta$ -conglycinin.

**Key words:** *Cyprinus carpio*; *Bacillus subtilis* peptidoglycan;  $\beta$ -conglycinin; intestinal epithelial cell; antioxidant; inflammatory factor

**Corresponding author:** YIN Haicheng. E-mail: yhch007@126.com

**Funding projects:** Science and Technology Research Project of Henan (172102110205)