

透明质酸促进肠道抵抗感染*

牛沂菲¹⁾ 王海方¹⁾ 付杰²⁾ 潘莹¹⁾ 刘志华^{1,3)**}

¹⁾ 中国科学院感染与免疫重点实验室, 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101;

²⁾ 华熙福瑞达生物医药有限公司, 济南 250012; ³⁾ 中国科学院生物大分子科教融合卓越中心, 北京 100101)

摘要 透明质酸是构成细胞外基质的一种重要成分, 已有的研究发现, 肠道受损后透明质酸的表达上调, 促进组织修复. 本研究分析了透明质酸在多种肠道感染与肠道炎症模型中的作用. 结果显示, 口服透明质酸能够提高小鼠对肠道李斯特氏菌、柠檬酸杆菌、肠致病性大肠杆菌感染的控制能力, 但对急性肠炎模型没有明显的改善作用.

关键词 肠道感染, 透明质酸, 炎症

学科分类号 Q41

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0196

肠道内数以百亿计的共生菌在机体的营养消化及吸收、能量代谢、免疫系统成熟、抵御感染中发挥重要作用. 多种重大疾病的发生发展均与肠道菌群异常相关. 肠道菌群会随着生活环境、饮食状况等因素发生动态改变, 而肠道黏膜免疫系统在菌群建立、成熟过程中不断与肠道菌相互作用, 实现两者的相互制约、相互包容的动态平衡. 肠道感染、肠道炎症均会导致肠道稳态失衡.

透明质酸(hyaluronic acid, HA)是由 β -D-葡萄糖醛酸和 β -D-N-乙酰氨基葡萄糖的双糖单位聚合而成的高分子多糖物质, 是细胞外基质的重要组成部分, 主要表达在动物包括肠道在内的大部分软结缔组织中, 发挥重要的生理功能, 例如调节蛋白质、协助水电解质的扩散及运转、润滑关节、调节血管壁的通透性、促进伤口愈合等等. 透明质酸由透明质酸合成酶(HA synthases, HASs)在质膜上组装, 延伸成多糖进而分泌到胞外空间^[1-3], 其生理功能的发挥依赖于分子质量大小^[4], 比如高分子质量(400~20 000 ku) HA 大量存在于关节、结缔组织中^[4], 在损伤和炎症状态下, HA 表达上调而后被透明质酸酶降解为小分子片段, 低分子质量的短

链 HA 能够诱导巨噬细胞炎症基因表达^[5-6]. 在克罗恩病损伤状态下, 低分子质量 HA 表达增加^[7]. 回肠炎遗传模型中 HA 和 HAS1 表达增加, 同时肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor alpha, TNF- α)过表达^[7], 说明低分子质量的 HA 具有促炎作用. 而大分子质量的 HA 能够对肠上皮细胞起保护作用, 例如在辐射诱导的肠道上皮损伤模型中, 辐射前腹腔注射 HA(750 ku)能够缓解辐射引起的肠道上皮细胞凋亡^[8], 在三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的大鼠结肠炎模型中, 联合使用 HA (350 和 2 000 ku)与美沙拉秦(mesalamine)能够使大鼠肠道上皮损伤得到更好的恢复^[9], 上述研究暗示了大分子质量的 HA 在控制损伤或炎症中发挥着保护作用. 那么大分子质量的 HA 在肠道中能否通过维持肠道稳态而起到抗感染和炎症的作用呢?

本研究拟分别通过李斯特菌 (*Listeria*

* 华熙福瑞达生物医药有限公司资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888004, E-mail: zhihualiu@ibp.ac.cn

收稿日期: 2018-07-16, 接受日期: 2018-08-15

monocytogenes, *L. monocytogenes*)、柠檬酸杆菌(*Citrobacter rodentium*, *C. rodentium*)、肠致病性大肠杆菌(*enteropathogenic Escherichia coli*, EPEC)肠道感染研究大分子质量透明质酸(530 ku)在肠道感染中的作用, 以及在硫酸葡聚糖(*dextran sulfate sodium*, DSS)诱导急性肠炎和慢性肠炎模型中探究大分子质量透明质酸(530 ku)对肠炎的诱导是否有保护作用.

1 材料与方法

1.1 材料

野生型 C57BL/6J 小鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司; 透明质酸(分子质量 530 ku)由华熙福瑞达生物医药有限公司提供; 单增李斯特菌(*L. monocytogenes* 10403s 菌株)由唐宏实验室赠送; 脑心浸出液、麦糠凯琼脂购自 OXOID 公司; 柠檬酸杆菌(*C. rodentium* DBS100 菌株)由清华大学郭晓欢实验室赠送; 肠致病性大肠杆菌(EPEC E2348/69 菌株)由唐宏实验室赠送; 硫酸葡聚糖钠购自 SIGMA 公司.

1.2 实验方法

1.2.1 李斯特菌口服感染实验

8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 2 组, 一组每天灌胃 200 μ l 30 mg/kg HA(分子质量为 530 ku)水溶液, 一组每天灌胃 200 μ l PBS 溶液, 连续 8d. 第 9d 每只小鼠灌胃 200 μ l(2×10^9 CFU)的李斯特菌. 10 h 后取粪便, 72 h 后取肝脏和脾脏, 涂板, 分别测粪便和组织中细菌的载量. 数据进行统计分析.

1.2.2 鼠柠檬酸杆菌感染实验

8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 2 组, 一组每天灌胃 200 μ l 30 mg/kg HA(分子质量为 530 ku)水溶液, 一组每天灌胃 200 μ l PBS 溶液, 连续 8d. 第 9d 每只小鼠灌胃 200 μ l(1×10^{10} CFU)的柠檬酸杆菌. 每天称重, 第 3、5、7、9、11、14d 取粪便涂板, 测粪便中细菌的载量. 数据进行统计分析.

1.2.3 肠致病性大肠杆菌感染实验

8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 2 组, 一组每天灌胃 200 μ l 30 mg/kg HA(分子质量为 530 ku)水溶液, 一组每天灌胃 200 μ l PBS 溶液, 连续 8d. 第 9d 每只小鼠灌胃 200 μ l(1×10^{10} CFU)的肠致病性大肠杆菌. 每天称重, 第 6 h、12 h、1 d、

2 d 取粪便涂板, 测粪便中细菌的载量. 数据进行统计分析.

1.2.4 DSS 诱导慢性肠炎实验

8 周龄 C57BL/6J 小鼠随机分成 3 组, 分别为对照组(无 DSS), DSS 组和口服 HA 的 DSS 组(DSS+HA), 每组 6 只. DSS 组以 2% DSS 水溶液为饮用水 5d, 双蒸水 5d, 3 个循环诱发慢性结肠炎; DSS+HA 组以 2% DSS 和 0.25 g/L 透明质酸水溶液 5d, 0.25 g/L HA 水溶液 5d, 3 个循环; 无 DSS 组口服双蒸水. 肠炎的评估: 每日观察和记录小鼠的体重, 大便性状和便血情况, 进行疾病活动度指数(DAI)评分.

1.2.5 DSS 诱导急性肠炎实验

8 周龄 C57BL/6J 小鼠随机分成 3 组[DSS+HA、DSS、NT(Non-treated)], 每组 6 只. DSS+HA 组每天口服 0.25 g/L 透明质酸水溶液, DSS 组和 NT 组口服双蒸水溶液, 持续 10d. 急性 DSS 处理: DSS+HA 组每天口服 2.5% DSS 和 0.25 g/L 透明质酸水溶液; DSS 组口服 2.5% DSS 水溶液; NT 组口服双蒸水. 每日观察和记录小鼠的体重, 大便性状和便血情况, 进行疾病活动度指数(DAI)评分.

2 结果

2.1 透明质酸在李斯特菌肠道感染中发挥保护作用

李斯特菌在免疫低下的人群中可导致脑膜炎等严重的感染, 其在 4°C 的环境中仍可生长繁殖, 是冷藏食品威胁人类健康的主要病原菌之一. 我们首先分析了 HA 是否可以提高小鼠对李斯特菌感染的抵抗能力. 发现对小鼠进行肠道感染李斯特菌后, 喂食 HA(分子质量为 530 ku)的小鼠粪便中细菌载量显著低于对照组(图 1a), 表明口服 HA 可提高小鼠对肠道李斯特菌感染的控制能力.

2.2 透明质酸在鼠柠檬酸杆菌肠道感染中对肠道的保护作用

鼠柠檬酸杆菌是小鼠肠道病原菌, 能够穿过黏液层进入上皮细胞引起结肠炎, 常被作为模型用于研究人类病原菌肠致病性大肠杆菌(*enteropathogenic Escherichia coli*, EPEC)和肠出血性大肠杆菌(*enterohaemorrhagic E. coli*, EHEC)感染的分子机制. 我们发现喂食 HA 可降低小鼠粪便中细菌载量(图 2a), 并改善小鼠感染中的体重改变(图 2b), 意味着口服 HA 可帮助小鼠拮抗鼠柠檬酸杆菌的感染.

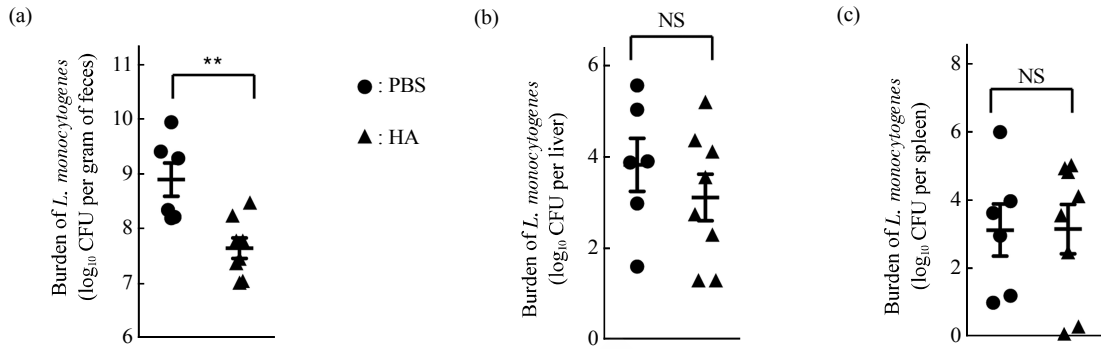


Fig. 1 Oral administration of hyaluronic acid helped mice against *Listeria monocytogenes* infection

WT mice were oral administrated with PBS or HA for 8 days before *Listeria monocytogenes* infection by oral gavage. Bacterial loads in feces 24 h post-infection (a), liver (b) and spleen (c) 72 h post-infection.

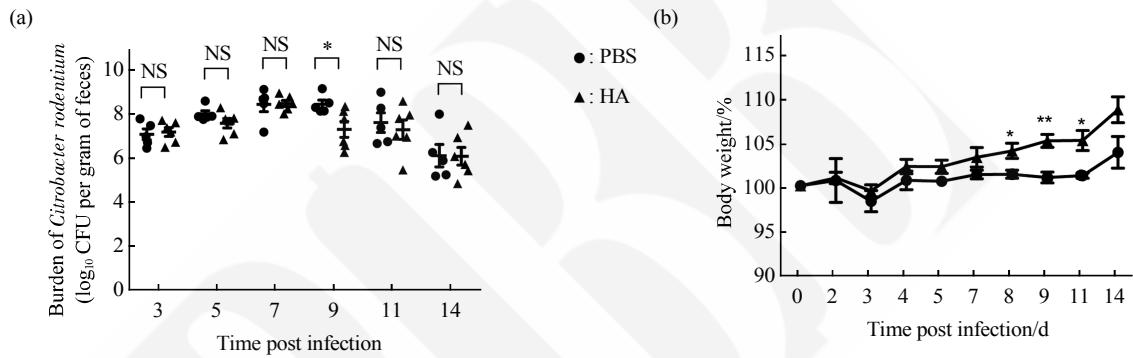


Fig. 2 Oral administration of hyaluronic acid helped mice to control *Citrobacter rodentium* infection

WT mice were oral administrated with PBS or HA for 8 days before *Citrobacter rodentium* infection by gavage, bacterial loads in feces (a) and body weight change (b).

2.3 透明质酸在肠致病性大肠杆菌肠道感染中对肠道的保护作用

在观察到 HA 改善小鼠控制鼠柠檬酸杆菌感染

后, 我们进一步分析了 HA 对肠致病性大肠杆菌感染的影响. 发现喂饲 HA 具有降低小鼠粪便中肠致病性大肠杆菌细菌载量的作用(图 3a), 并且喂饲 HA 组的小鼠能够改善由于肠道感染引起的体重降

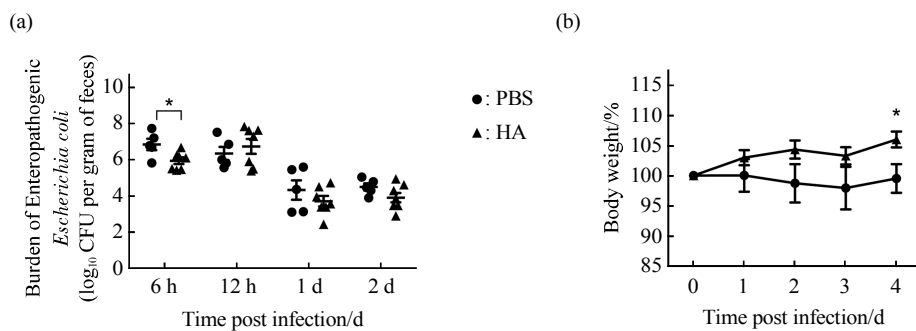


Fig. 3 Oral administration of hyaluronic acid helped mice to control enteropathogenic *Escherichia coli* infection

WT mice were oral administrated with PBS or HA for 8 days before enteropathogenic *Escherichia coli* infection by gavage, bacterial loads in feces (a) and body weight change (b).

低(图 3b).

2.4 口服透明质酸对 DSS 诱导慢性结肠炎的影响

在上述研究中, 我们发现了喂饲 HA 改善了小鼠对肠道感染的控制能力. 进而分析口服 HA 是否

具有改善损伤诱导结肠炎的作用. 我们利用了 DSS 诱发慢性结肠炎, 并给小鼠喂饲 HA, 结果发现喂饲 HA 组对 DSS 诱导的慢性结肠炎没有明显的改善作用(图 4).

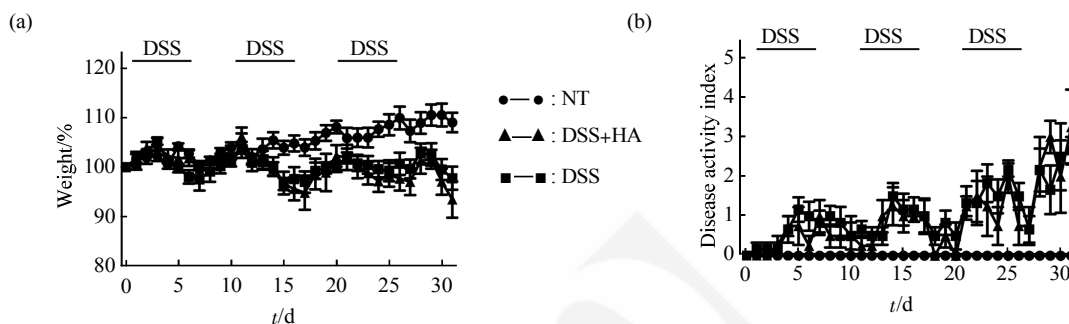


Fig. 4 Oral administration of hyaluronic acid had no effect on DSS-induced chronic colitis

Body weight change (a) and daily colitis disease activity (b).

2.5 口服透明质酸对 DSS 诱导急性结肠炎的影响

我们进一步分析了 HA 对 DSS 诱导的急性结肠炎的作用. 先给小鼠喂饲了 HA, 再用 DSS 诱导急

性结肠炎, 比较了喂饲组和非喂饲组在体重和疾病活动指数评分上的差异, 结果显示两者没有显著变化(图 5), 说明口服 HA 对 DSS 诱导急性结肠炎并无显著作用.

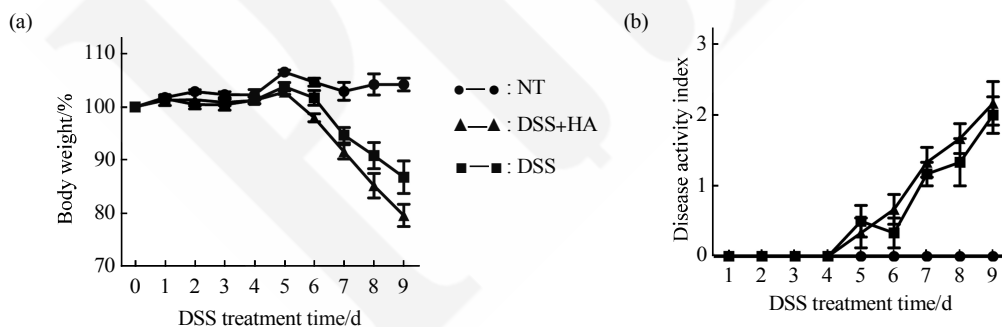


Fig. 5 Oral administration of hyaluronic acid had no effect on DSS-induced acute colitis

Body weight change (a) and daily colitis disease activity (b).

3 讨 论

肠道稳态的建立与维持依赖于肠道的屏障——肠道上皮黏膜层. 肠道上皮中的多种细胞(包括普通上皮细胞、杯状细胞、潘氏细胞等)通过分泌黏液及多种抗菌活性物质, 构成肠道抵御病原微生物入侵的第一道防线^[10-11]. HA 是双糖单位聚合而成的高分子多糖物质, 一方面可能作为“益生元”为

肠道共生菌提供多糖类物质促进肠道菌群共生, 进而维持更好的肠道稳态; 另一方面透明质酸可以吸附在黏膜表面形成生物膜, 增强肠道屏障, 抵抗病原微生物的进一步刺激, 提高了对病原菌的控制能力.

在 DSS 诱导的结肠炎模型中, 能够检测到内源的 HA 在结肠黏膜下层聚集, 同时有大量的炎性细胞浸润^[12], 阻断 HA 的受体 CD44 分子则能够减少炎性细胞的浸润^[13-14], 说明在炎症状态下, HA

起到促炎作用. 我们采取 DSS 造模前持续灌胃大分子质量的 HA, 并不能缓解 DSS 诱导的结肠炎, 但是也不加重 DSS 诱导的结肠炎. HA 在体内的合成与降解是动态的过程, 一方面大分子质量的 HA 可能对 DSS 诱导的结肠炎起到一定的保护作用, 但大量的 HA 又能被水解产生更多的小分子质量 HA 加强了促炎作用, 两者的作用可能抵消. 而此前的研究发现了大分子质量的 HA 对 TNBS 诱导的肠炎有保护作用^[9], 而我们的结果发现大分子质量的 HA 对 DSS 诱导的肠炎没有保护作用, 我们猜测其中的可能原因是两者诱导肠炎的病理机制有所不同, 比如 TNBS 诱导的肠炎依赖于 CD4 T 细胞的活化^[15], 而 DSS 诱导了肠炎则主要依赖于天然免疫细胞的活化, 如巨噬细胞等等, 而 CD4 T 细胞的作用不大^[16]. 当然其中的具体原因有待更深入的研究.

本研究通过不同的感染和炎症模型, 初步解析了透明质酸对肠道屏障功能的促进作用. 研究发现, 服用 HA 的小鼠对肠道李斯特氏菌、柠檬酸杆菌、肠致病性大肠杆菌感染控制能力升高, 意味着 HA 对肠道稳态维持发挥着促进作用. 这暗示着 HA 或能通过促进肠道屏障功能, 抵抗肠道细菌感染.

参 考 文 献

- [1] Flynn R S, Mahavadi S, Murthy K S, *et al.* Insulin-like growth factor-binding protein-5 stimulates growth of human intestinal muscle cells by activation of G α _{i3}. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, **297**(6): G1232-1238
- [2] Karamanos N K, Axelsson S, Vanky P, *et al.* Determination of hyaluronan and galactosaminoglycan disaccharides by high-performance capillary electrophoresis at the attomole level. Applications to analyses of tissue and cell culture proteoglycans. *J Chromatogr A*, 1995, **696**(2): 295-305
- [3] Tammi R, Saamanen A M, Maibach H I, *et al.* Degradation of newly synthesized high molecular mass hyaluronan in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture. *J Invest Dermatol*, 1991, **97**(1): 126-130
- [4] Stern R, Asari A A, Sugahara K N. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol*, 2006, **85**(8): 699-715
- [5] Mckee C M, Penno M B, Cowman M, *et al.* Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *J Clin Invest*, 1996, **98**(10): 2403-2413
- [6] Mckee C M, Lowenstein C J, Horton M R, *et al.* Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor kappaB-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 1997, **272**(12): 8013-8018
- [7] Majors A K, Austin R C, De La Motte C A, *et al.* Endoplasmic reticulum stress induces hyaluronan deposition and leukocyte adhesion. *J Biol Chem*, 2003, **278**(47): 47223-47231
- [8] Riehl T E, Foster L, Stenson W F. Hyaluronic acid is radioprotective in the intestine through a TLR4 and COX-2-mediated mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, **302**(3): G309-316
- [9] Chiu C T, Kuo S N, Hung S W, *et al.* Combined treatment with hyaluronic acid and mesalamine protects rats from inflammatory bowel disease induced by intracolonic administration of trinitrobenzenesulfonic acid. *Molecules*, 2017, **22** (6): pii:E904 (DOI:10.3390/molecules22060904)
- [10] Bevins C L, Salzman N H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol*, 2011, **9**(5): 356-368
- [11] Shan M, Gentile M, Yeiser J R, *et al.* Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science*, 2013, **342**(6157): 447-453
- [12] Kessler S, Rho H, West G, *et al.* Hyaluronan (HA) deposition precedes and promotes leukocyte recruitment in intestinal inflammation. *Clin Transl Sci*, 2008, **1**(1): 57-61
- [13] Nandi A, Estess P, Siegelman M. Bimolecular complex between rolling and firm adhesion receptors required for cell arrest; CD44 association with VLA-4 in T cell extravasation. *Immunity*, 2004, **20**(4): 455-465
- [14] Binion D G, West G A, Ina K, *et al.* Enhanced leukocyte binding by intestinal microvascular endothelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 1997, **112**(6): 1895-1907
- [15] Antoniou E, Margonis G A, Angelou A, *et al.* The TNBS-induced colitis animal model: an overview. *Ann Med Surg (Lond)*, 2016, **11**: 9-15
- [16] Axelsson L G, Landstrom E, Goldschmidt T J, *et al.* Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4 (+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice. *Inflamm Res*, 1996, **45**(4): 181-191

Hyaluronic Acids Protects Against Gastric Infection*

NIU Yi-Fei¹⁾, WANG Hai-Fang¹⁾, FU Jie²⁾, PAN Ying¹⁾, LIU Zhi-Hua^{1,3)**}

¹⁾ Key Laboratory of Infection and Immunity of CAS, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾ Bloomage Freda Biopharm Co., Ltd, Jinan 250012, China;

³⁾ CAS Center for Excellence in Biomacromolecules, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Hyaluronic acid, an important component of extracellular matrix, is up-regulated in intestinal injury to promote wound healing. Here we investigated the roles of hyaluronic acid on different enteritis or intestinal infection models and found that oral administration of hyaluronic acid improved the ability of mice to control the infection of pathogen, including *Listeria monocytogenes*, *Citrobacter rodentium* and Enteropathogenic *Escherichia coli*. These results indicate that hyaluronic acid protects host from gastric infection.

Key words gastric infection, hyaluronic acid, inflammation

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0196

* This work was supported by a grant from Bloomage Freda Biopharm Co., Ltd.

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64888004, E-mail: zhihualiu@ibp.ac.cn

Received: July 16, 2018 Accepted: August 15, 2018