

鼠李糖乳杆菌通过调节肠道微生物群 缓解造血干细胞移植后肝脏移植物抗宿主病

房婷¹, 李响², 刘洁³, 王皓^{4*}

(中国人民解放军第960医院 1. 血液病科; 4. 普外科, 山东 济南 250031; 2. 中国人民解放军93381部队医院, 黑龙江 五常 150223; 3. 常州市第二人民医院 血液内科, 江苏 常州 213000)

摘要:目的 探讨鼠李糖乳杆菌 GG 菌株(LGG)对造血干细胞移植(HSCT)后肝脏移植物抗宿主病(GVHD)的影响及机制。方法 将小鼠随机分为对照组, GVHD组(通过尾静脉回输供体来源骨髓和脾细胞悬液), 及LGG组(造模后LGG灌胃处理, 200 μ L/只, 一周2次, 持续5周)。HE染色观察肝脏病理改变; ELISA检测肝功能和血浆细胞因子IL-6、IL-18和TNF- α 的水平; PCR检测肠道微生物群的变化。结果 相比对照组, GVHD组小鼠生存期缩短, 呈现肝功能损伤及病理改变, 血浆细胞因子IL-6、IL-18和TNF- α 显著升高($P < 0.01$), 且肠道微生物群多样性下降($P < 0.05$)。LGG处理明显减轻了肝脏中GVHD诱发的上述病理改变($P < 0.05$)。结论 LGG可以通过补充肠道微生物群的多样性减轻肝脏炎症因子水平, 进而缓解小鼠HSCT后肝脏GVHD, 提示LGG可能用于治疗GVHD。

关键词: 造血干细胞移植; 肝脏移植物抗宿主病; 肠道微生物群; 炎症因子

中图分类号: R457.7 文献标志码: A

Lactobacillus rhamnoides alleviates liver graft-versus-host disease after transplantation of hematopoietic stem cell through regulating intestinal microbiota

FANG Ting¹, LI Xiang², LIU Jie³, WANG Hao^{4*}

(1. Department of Hematology; 4. Department of General Surgery, 960th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Jinan 250031; 2. Chinese People's Liberation Army 93381 Army Hospital, Wuchang 150223; 3. Department of Hematology, Changzhou Second People's Hospital, Changzhou 213000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* GG strain(LGG) on liver graft-versus-host disease (GVHD) after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). **Methods** Mice were randomly divided into three groups, including control, GVHD (the donor-derived bone marrow and spleen cell suspension were reinfused through the tail vein), and LGG groups (LGG gavage after modeling, 200 μ L/mouse, twice a week for 5 weeks). The pathological changes of liver tissues were observed by HE staining, the liver function and the levels of plasma cytokines IL-6, IL-18 and TNF- α were detected by ELISA, and the changes of intestinal microbiota were detected by PCR. **Results** Compared with mice in the

收稿日期: 2020-09-07 修回日期: 2021-01-09

基金项目: 南京医科大学科技发展基金(NMUB201)

* 通信作者 (corresponding author): 123028856@qq.com

control group, mice in GVHD group showed shorter survival time, obvious liver function damage and pathological changes, increased level of plasma cytokines IL-6, IL-18 and TNF- α ($P < 0.01$) and decreased intestinal microbiota diversity ($P < 0.05$). LGG treatment significantly alleviated the pathological changes induced by GVHD in the liver ($P < 0.05$). **Conclusions** LGG can reduce the level of inflammatory factors in liver by regulating the intestinal microbiota, thereby alleviate GVHD in mice after HSCT, suggesting that LGG may be useful in the treatment of GVHD.

Key words: hematopoietic stem cell transplantation; liver graft-versus-host disease; intestinal microbiota; inflammatory factor

移植物抗宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) 是造血干细胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) 后的主要并发症,严重影响患者的生活质量,也是导致非复发死亡的重要原因^[1]。它主要累及皮肤、肝脏、肾脏和消化道等,其中肝脏是除皮肤之外最常受累的靶器官^[2]。肠道微生物群在 HSCT 后 GVHD 的发生发展中起重要作用。研究表明,GVHD 小鼠中微生物群落多样性降低,且与 GVHD 严重程度显著相关^[3]。GVHD 发生时肠道微生物多样化水平降低,口服乳酸杆菌能够减轻 GVHD 症状及相关死亡率^[4]。鼠李糖乳杆菌 GG 菌株 (*Lactobacillus rhamnosus* GG strain, LGG) 从属于乳杆菌属,是从人肠道中分离而得的重要益生菌。近年来,研究证明 LGG 能够耐受消化道环境,并且能够在肠道内定植,起到调节肠道微生物群的作用^[5-6]。然而 LGG 对 HSCT 后 GVHD 肝脏损伤影响的研究还较少。本研究以 GVHD 小鼠为研究对象,研究了 LGG 对 GVHD 肝脏损伤的影响,为 GVHD 的临床干预提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:清洁级雄性 C57BL/6 小鼠,8 周龄,体质量 22~25 g 为供鼠,相同特征的 BALB/C 小鼠为受鼠(上海斯莱克实验动物责任有限公司)。

1.1.2 主要试剂:鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus* CICC No. 6001,冻干粉,中国食品发酵工业研究院);ELISA 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司);苏木精和伊红(HE)溶液(珠海贝索生物技术有限公司);粪便 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠的分组及处理:GVHD 组和 LGG 组小

鼠在移植前 1 周饮用含抗生素的饮用水(32 万 U/L 庆大霉素及 0.25 g/L 头孢曲松钠)。在移植前 4 h,接受⁶⁰Co(cobalt-60) γ 射线全身照射 7.5 Gy,剂量率为 0.67 Gy/min。将供体 C57BL/6 小鼠处死后在超净工作台上取胫、股骨骨髓及脾脏,制备骨髓细胞 (5×10^6 个)和脾细胞 (1×10^6 个)的单细胞悬液。通过尾静脉回输 BALB/C 受体小鼠诱导 GVHD。骨髓移植后,LGG 组小鼠行 LGG 溶液灌胃,200 μ L/次,2 次/周,连续灌胃 5 周。对照组和 GVHD 组给予同等剂量 0.9%氯化钠溶液。

1.2.2 临床特征观察:移植后每天观察小鼠的精神状态、毛色、饮食情况和排便情况等。每周称量体质量 1 次,记录死亡情况。动态观察至术后 8 周。

1.2.3 肝脏功能和炎性因子的检测:在术后第 36 天(即 5 周灌胃结束后),每组各取 4 只小鼠,先麻醉,之后摘取眼球采血,用 ELISA 试剂盒检测血浆中谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransaminase, AST)、IL-6、IL-18 和 TNF- α 的含量。

1.2.4 肝脏病理的检测:将肝脏组织常规石蜡包埋切片,行 HE 染色,于光镜下观察各组受鼠肝脏组织病理变化及炎性反应细胞浸润情况。肝脏病理评分参照以往标准^[7]。

1.2.5 PCR 检测小鼠肠道微生物群:先麻醉小鼠,处死后,解剖出小鼠大肠,挤出新鲜粪便,置于无菌离心管中冻存。按照粪便 DNA 提取试剂盒说明抽提各组小鼠的粪便总 DNA,储存于 -20 $^{\circ}$ C。以提取到的 DNA 为模板,对 16S rDNA 的 V3 及 V4 区进行 PCR 扩增。引物为:338 正向:5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'; 806 反向:5'-GGACTACHVGGGTW TCTAAT-3'。扩增结束后,用琼脂糖凝胶回收 PCR 产物,电泳后对条带亮区切胶回收,用 Quanti FluorTM-ST 检测定量,然后利用 Illumina MiSeq 测序

仪测序。上机测定完成之后,进行数据提取和合并。数据处理后比对 Greengenes 数据库,随后进行 α 多样性分析和肠道微生物群门属水平种类与丰度的多样性分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 和 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。两组资料之间单变量的比较采用独立样本 t 检验;多组资料之间的单变量比较采用单因素方差分析;方差不齐采用非参数检验;生存分析采用 Kaplan-Meier 生存分析图体现。

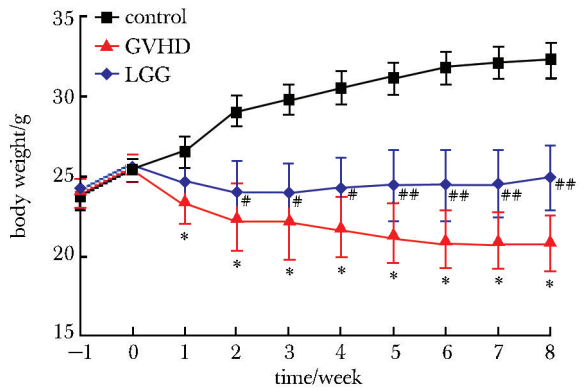
2 结果

2.1 小鼠一般状况及生存率

移植 1 周后, GVHD 组小鼠呈现精神萎靡及进食减少的表征; 2 周后呈现弓背及毛发干枯呈倒钩状, 还有部分小鼠尾部皮肤脱落; 3 周后上述表现逐渐加重。LGG 组小鼠在移植后 3 周前的状态与 GVHD 组类似, 而 3 周后上述症状明显减轻。此外, 移植后, GVHD 组和 LGG 组小鼠体质量均出现明显下降, 其中 GVHD 组小鼠体质量下降更为明显(图 1)。LGG 组小鼠体质量在移植 2 周后下降趋势趋于停止, 且高于 GVHD 组 ($P < 0.05$)。GVHD 组小鼠在移植后第 14 天开始出现死亡, 死亡高峰期移植后 14~22 d; 而 LGG 组小鼠仅在移植后第 15 天出现 1 例死亡, 其生存时间长于 GVHD 组 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.2 肝功能的检测

移植后, GVHD 组小鼠血浆 ALT 及 AST/ALT 值显著高于对照组 ($P < 0.01$)。相比 GVHD 组, LGG



* $P < 0.01$ compared with the control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with the GVHD group

图 1 各组小鼠体质量变化曲线

Fig 1 Curves of body weight change in mice of each group ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

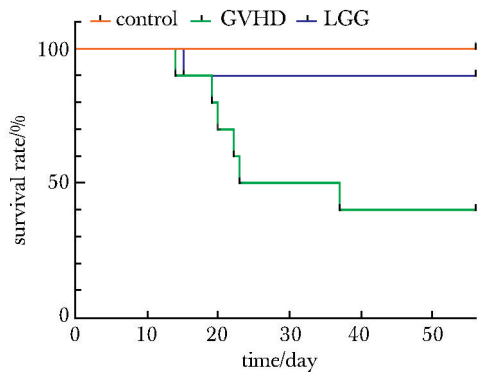
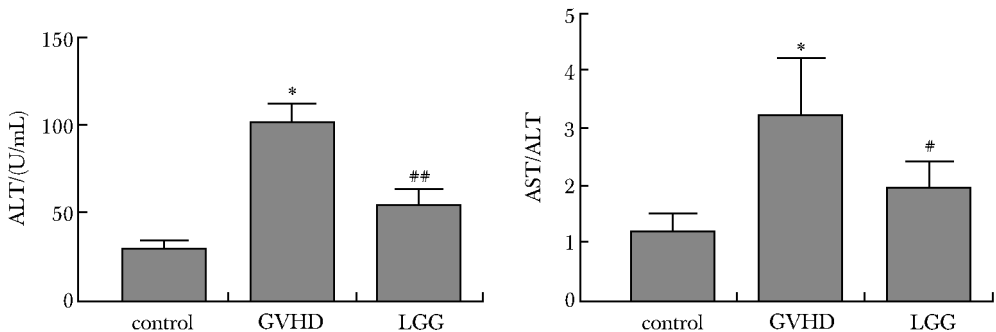


图 2 各组小鼠移植后生存率比较

Fig 2 Comparison of survival rates in mice of each group after transplantation

组血浆 ALT ($P < 0.01$) 及 AST/ALT 值 ($P < 0.05$) 显著降低(图 3)。



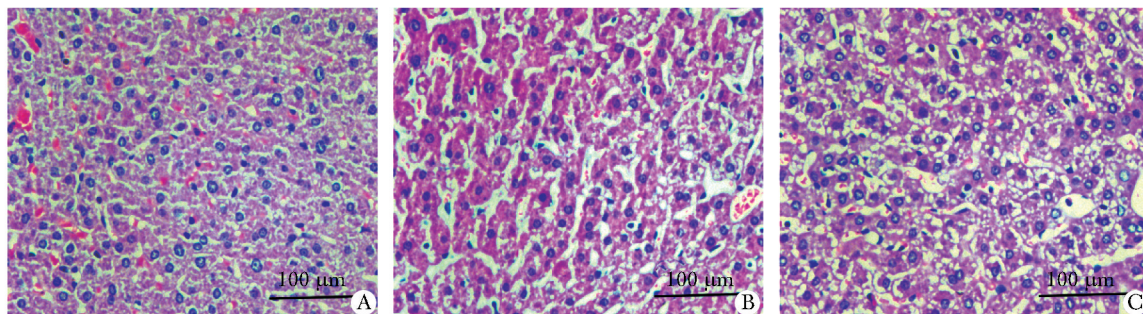
* $P < 0.01$ compared with the control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared with the GVHD group

图 3 各组小鼠血浆 ALT 水平及 AST/ALT 值的比较

Fig 3 Comparison of plasma ALT levels and AST/ALT values in mice of each group ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

2.3 肝组织的病理

对照组小鼠肝组织形态正常(图4A)。GVHD组小鼠肝组织出现大量肝细胞水肿、增生和坏死,以及大量炎性细胞如淋巴细胞及中性粒细胞浸润(图4C)。LGG组小鼠肝脏表现出一定程度的肝细胞水肿和坏死,然而其血窦纤维化明显减轻,且浸润的炎性细胞明显减少(图4B)。此外,GVHD组的肝病理学评分显著高于对照组($P<0.01$),而LGG组肝病理评分显著低于GVHD组($P<0.01$)(表1)。



A. control; B. GVHD; C. LGG

图4 移植36 d后小鼠肝组织病理变化

Fig 4 Pathological changes of liver tissue in mice 36 days after transplantation($\times 200$)

表1 各组小鼠肝组织病理学评分

Table 1 Histopathological score of liver tissue in mice of each group ($\bar{x}\pm s, n=4$)

group	score
control	0.5 \pm 0.5
GVHD	7.2 \pm 1.06*
LGG	4.5 \pm 0.96#

* $P<0.01$ compared with the control group; # $P<0.01$ compared with the GVHD group.

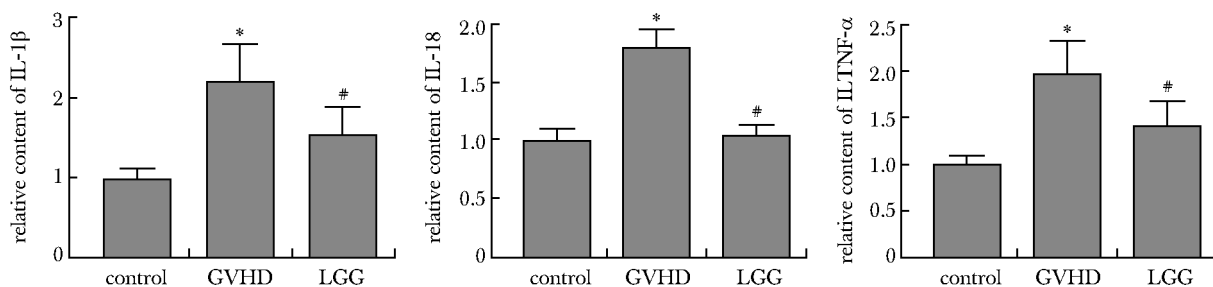
2.4 细胞因子

GVHD组血浆中IL-1 β 、IL-18及TNF- α 的相对含量显著高于对照组($P<0.01$);与GVHD组相比,LGG组血浆中IL-1 β 、IL-18及TNF- α 的相对含量显著降低($P<0.01$)(图5)。

2.5 肠道微生物群相关检测

2.5.1 α 多样性指数:GVHD组shannon指数明显低于对照组($P<0.05$);LGG组shannon指数明显高于GVHD组($P<0.05$)(表2)。

2.5.2 肠道微生物群在门水平上的结构组成:小鼠肠道微生物群在门水平上主要由拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)和变形菌门(*Proteobacteria*)组成。其中丰度相对较高的是拟杆菌门、厚壁菌门和放线菌门。移植后,小鼠肠道微生物群中拟杆菌门水平降低,放线菌门水平升高;经LGG灌服后,拟杆菌门水平升高,放线菌门水平降低(表3)。



* $P<0.01$ compared with the control group; # $P<0.01$ compared with the GVHD group

图5 各组小鼠血浆IL-1 β 、IL-18和TNF- α 水平

Fig 5 Plasma levels of IL-1 β , IL-18, and TNF- α in each group of mice ($\bar{x}\pm s, n=4$)

表 2 各组小鼠肠道微生物群 α 多样性指数Table 2 Alpha diversity index of intestinal microbiota in each group of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

group/index	Shannon	Simpson	Chao	ACE
control	4.98 \pm 0.53	0.03 \pm 0.02	792 \pm 37	753 \pm 36
GVHD	3.03 \pm 0.42 [*]	0.04 \pm 0.03	742 \pm 20	713 \pm 59
LGG	4.18 \pm 0.56 [#]	0.04 \pm 0.02	769 \pm 90	721 \pm 86

^{*} $P<0.05$ compared with the control group; [#] $P<0.05$ compared with the GVHD group.

表 3 各组小鼠肠道微生物群在门水平上的组成

Table 3 Composition of intestinal microbiota at the phylum level in each group of mice ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

group/species	Bacteroidetes	Firmicutes	Actinobacteria	Verrucomicrobia	Proteobacteria	others
control	48.37	34.73	7.61	6.12	2.68	0.49
GVHD	36.59	32.26	19.51	9.12	1.75	0.77
LGG	42.16	40.88	7.22	7.23	2.02	0.49

3 讨论

GVHD 是制约 HSCT 术后临床疗效的重要因素之一,其中累及肝脏的发生率为 26.4%^[8]。肠道微生物群是肠道微生物在肠道中形成的复杂群落。研究证实肠道微生物群会影响 GVHD 的发生与发展。一项动物实验发现:HSCT 后 GVHD 小鼠肠道中微生物群落多样性降低,炎性细胞因子增多;且肠道微生物多样化水平越低,GVHD 越严重^[9]。一项多中心临床试验显示,HSCT 后 GVHD 患者十二指肠的帕内特细胞减少,且帕内特细胞越少,治疗效果越差^[10]。在本研究中,GVHD 组小鼠肝功能受损,肝组织呈现明显炎性浸润,炎性因子水平升高,且肠道微生物群的多样性下降,说明 GVHD 诱发的损伤减少了肝脏中肠道微生物群的多样性。

益生菌是一类可以改善宿主微生态平衡的细

菌,而益生元则是肠道中为益生菌提供养料的物质。益生菌和益生元在维持胃肠道稳态方面起重要的调节作用^[11]。研究表明,益生菌改善微生态平衡的作用机制包括抑制病原体、促进免疫应答、上调抗炎因子、重构微生物群和保护肠道屏障等^[12]。LGG 是第三代益生菌,其黏着率高、定植力强。在干细胞移植前后口服 LGG 可提高生存率并降低急性 GVHD 的发生^[13]。在本研究中发现,经 LGG 灌服的小鼠生存时间延长,肠道微生物群的多样性升高,小鼠肝功能受损程度和炎性浸润程度减轻,说明 LGG 可能是通过改善肠道微生物群,介导抗炎作用进而改善肝脏 GVHD。

综上,本实验发现鼠李糖乳杆菌可通过调节肠道微生物群,减轻肝脏炎性因子水平进而缓解肝脏 GVHD。相关调控机制还需进一步地探讨和验证。

参考文献:

- [1] Zeiser R, Blazar BR. Pathophysiology of chronic graft-versus-host disease and therapeutic targets.[J]. New Engl J Med, 2017,377:2565-2579.
- [2] Paczesny S, Hakim FT, Pidala J, et al. National institutes of health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease; III. The 2014 Biomarker Working Group Report[J]. Biol Blood Marrow Tr, 2015,21:780-792.
- [3] Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, et al. Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of α -defensins [J]. Blood, 2012,120:223-231.

- [4] Jenq RR, Ubeda C, Ying T, *et al.* Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation[J]. *J Exp Med*, 2012,209:903-911.
- [5] Ritze Y, Búrdos G, Claus A, *et al.* Lactobacillus rhamnosus GG protects against non-alcoholic fatty liver disease in mice[J]. *PLoS One*, 2014,9:e80169. doi:10.1371/journal.pone.0080169.
- [6] Shen, Liping, Liu, *et al.* Supplementation of p40, a Lactobacillus rhamnosus GG-derived protein, in early life promotes epidermal growth factor receptor-dependent intestinal development and long-term health outcomes.[J]. *Mucosal Immunol*, 2018,11:1316-1328.
- [7] Geng Y, Ma Q, Liu YN, *et al.* Heatstroke induces liver injury via IL-1 β and HMGB1-induced pyroptosis [J]. *J Hepatol*, 2015,63:622-633.
- [8] 于迪, 韩雅慧, 扈臣媛, 等. 转基因造血干细胞移植后慢性肝脏移植抗宿主病的危险因素及预后分析[J]. *中国实验血液学杂志*, 2018,26:1174-1179.
- [9] Eriguchi Y, Takashima S, Oka H, *et al.* Graft-versus-host disease disrupts intestinal microbial ecology by inhibiting Paneth cell production of α -defensins [J]. *Blood*, 2012,120:223-231.
- [10] Levine JE, Huber E, Hammer STG, *et al.* Low Paneth cell numbers at onset of gastrointestinal graft-versus-host disease identify patients at high risk for nonrelapse mortality[J]. *Blood*, 2013,122:1505-1509.
- [11] Vitetta L, Briskey D, Alford H, *et al.* Probiotics, prebiotics and the gastrointestinal tract in health and disease [J]. *Inflammopharmacology*, 2014,22:135-154.
- [12] Andermann TM, Rezvani A, Bhatt AS. Microbiota manipulation with prebiotics and probiotics in patients undergoing stem cell transplantation [J]. *Curr Hematol Malig R*, 2016,11:1-10.
- [13] Shukla M, Tripathi SN. Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt[J]. *Blood*, 2004,103:4365-4367.

本刊稿件格式要求(1)

1.1 题名:应与内容相符,言简意赅,体现创新点或主要结论,避免过大、空泛,一般不超过20个汉字,不用副标题。英文题名应与中文一致,除专有名词外,只第1个词的首字母大写,其他均小写。

1.2 基金:在首页页脚标注所受资助的基金项目及编号。

例:基金项目:国家自然科学基金(39470325)。

1.3 作者:应是对文章做出贡献、能对内容负责者,一般 ≤ 7 个。如有不同单位作者,在右上角标注不同数字以区别。通信作者以“*”标注。作者英文的“姓”需用全称并且大写,“名”的第1个字拼音的首字母大写,后面均用小写,两字之间用连字符。

例:WANG Xiao-san。

1.4 作者单位:

1.4.1 中文:写标准全称(由大单位到小单位,中间用空格隔开)、所在省份、城市及邮编。如有不同单位,以作者右上角标的数字对应标注单位。

例:华中科技大学 同济医学院 1. 免疫学系;2. 病理生理学系,湖北 武汉 430022

1.4.2 英文:由小单位到大单位,中间用“,”隔开,省略略去。每个实义词的首字母大写。

例:1. Department of Immunology;2. Department of Pathophysiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China