



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104031878 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 10

(21) 申请号 201410207726. 2

G01N 21/64(2006. 01)

(22) 申请日 2014. 05. 16

(71) 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38 号

(72) 发明人 汪以真 张海文 金灵红

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公
司 33200

代理人 林松海

(51) Int. Cl.

C12N 5/071(2010. 01)

C12Q 1/68(2006. 01)

C12Q 1/26(2006. 01)

C12Q 1/02(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

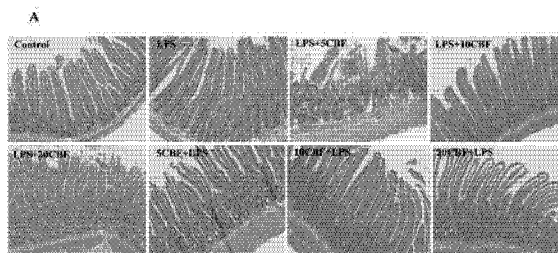
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54) 发明名称

通过 LPS 刺激建立的大鼠及猪肠道上皮细胞的综合模型

(57) 摘要

本发明公开了一种通过 LPS 刺激建立的大鼠及猪肠道上皮细胞的综合模型。细菌脂多糖(LPS)具有破坏肠上皮屏障功能,本发明旨在鉴定来源于蛇的抗菌肽 Cathelicidin-BF(C-BF)是否对 LPS 诱导的肠炎具有保护作用。IPEC-J2 是从猪空肠段分离的肠上皮细胞系,猪消化系统与人的非常相似。通过体内大鼠模型和体外猪 IPEC-J2 细胞模型检测了 Cathelicidin-BF 保护 LPS 诱导的肠道屏障功能受损的作用。我们发现,外源 Cathelicidin-BF 对 LPS 诱导的大鼠肠道屏障功能受损和 LPS 致 IPEC-J2 细胞损伤模型有保护作用。



1. 一种通过 LPS 刺激建立的大鼠及猪肠道上皮细胞的综合模型,研究来源于蛇的抗菌肽 Cathelicidin-BF (C-BF) 是否对 LPS 诱导的肠炎有保护作用,其特征在于,

1)对于大鼠,建立 5mg/kg 剂量脂多糖诱导雄性 Sprague-Dawley 大鼠肠炎模型,LPS 采用腹腔注射的方式,大鼠通过腹腔注射不同浓度(5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg)C-BF 的 PBS 溶液,注射顺序及时间为先注射不同剂量 C-BF, 24h 后注射 5mg/kg 的 LPS,于 4h 后处死取样,研究抗菌肽 C-BF 的保护功能,另一种处理方式为调换两者的注射顺序,研究抗菌肽 C-BF 的治疗作用;

2) 在体外建立 LPS 刺激猪肠道上皮细胞系 J2 (IPEC-J2) 细胞模型,处理方式为先 10 μ g/ml C-BF 处理 24 小时,再 1 μ g/ml LPS 处理 4 小时后收取细胞。

2. 根据权利要求 1 所述的通过 LPS 刺激建立的大鼠及猪肠道上皮细胞的综合模型,其特征在于,进一步,

3) 对于大鼠,采取一截空肠段,利用尤斯灌流室测定电导率来评估肠上皮细胞和 IPEC-J2 细胞单层屏障的完整性,通过测定血浆 D-乳酸和二胺氧化酶(DAO)的水平评价大鼠肠上皮细胞的渗透性,通过 RT-PCR 和 western blot 测定紧密连接蛋白(TJs) mRNA 和蛋白水平来评估其屏障功能,通过 HE 染色观察肠上皮形态结构及测量绒毛高度与隐窝深度比值,通过透射电镜观察肠上皮细胞超微结构,通过免疫荧光和共聚焦成像法分析 TJs 在组织中位置和分布;

4) 对于猪肠上皮细胞,利用尤斯灌流室测定跨膜电流,来评估营养物质转运效率,通过透射电镜, qRT-PCR, western-blot, 免疫荧光技术方法评价 C-BF 对猪肠上皮细胞屏障功能的保护作用及初步机制;

5) 综合体内大鼠实验和体外细胞实验,评价 C-BF 在改善肠道屏障功能方面的作用。

通过 LPS 刺激建立的大鼠及猪肠道上皮细胞的综合模型

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及 Cathelicidin-BF 对脂多糖诱导的大鼠肠上皮屏障功能障碍及脂多糖致猪肠上皮细胞屏障损伤模型的保护作用。

背景技术

[0002] 在体内小肠黏膜上皮成连续的单层状,它在抵抗微生物引发的胃肠道疾病方面起着关键作用。屏障完整性缺陷,作为黏膜炎性疾病的主要病理生理学特征,导致渗透性增加进而导致水和血浆蛋白的渗漏到管腔,同时肠细菌和 / 或微生物的副产物移位进入体循环引起全身败血症。因此,维持肠上皮屏障的完整性对于肠道稳态是十分重要的。众所周知,在体内,由革兰氏阴性菌产生细菌内毒素(脂多糖, LPS) 导致黏膜通透性增加是由 LPS 对肠上皮细胞如粘膜缺血的间接作用导致的。通过跨膜电阻(TER) 所示, LPS 对 IEC -6 细胞作用是破坏紧密连接蛋白的屏障功能。LPS 增加肠上皮细胞的渗透性与肠紧密连接相关蛋白再分配有关。

[0003] 体内和体外动物和人体试验研究表明, LPS 可能对肠屏障功能和细菌移位造成损害。尽管许多研究已证实 LPS 对肠道黏膜完整性具有破坏效果,但极少数试验研究有效地应用于临床和非抗生素治疗 LPS 诱导的肠炎方法。

[0004] Cathelicidins 是具有保守的亲肽序列一大抗菌肽家族,首先在哺乳动物被发现。LL-37/hCAP-18 是在人类中发现的唯一的抗菌肽,而我们研究中所涉及的抗菌肽 C-BF 是从爬行动物中首次被发现的 Cathelicidin 家族抗菌肽。虽然抗菌肽如 cathelicidins 有杀死病原微生物的活力,但有新的证据显示这些肽在不同的生理过程,如细胞增殖和迁移,免疫调节,促进伤口愈合,血管生成,细胞因子和组胺的释放等具有多个受体介导的功能。在小鼠上, Cathelicidins 已被证实可以通过减少肠毒素引起的黏膜结构的改变部分降低艰难梭菌结肠炎和毒素 A 肠炎。从金环蛇蛇毒纯化得到的 Cathelicidin-BF 是一个具有 30 个氨基酸的多肽,具有较高的抗菌活性和非常迅速的微生物杀灭效果。然而,抗菌肽 C-BF 是否有肠道屏障功能的维护和重建的保护作用从未进行过相关研究。

发明内容

[0005] 本发明旨在鉴定来源于蛇的抗菌肽 Cathelicidin-BF (C-BF) 是否对 LPS 诱导的肠炎有保护作用。

[0006] 为了实现本发明的目的,本发明提供了如下技术方案:

一种通过 LPS 刺激建立的大鼠及猪肠道上皮细胞的综合模型,研究来源于蛇的抗菌肽 Cathelicidin-BF (C-BF) 是否对 LPS 诱导的肠炎有保护作用,

1)对于大鼠,建立 5mg/kg 剂量脂多糖诱导雄性 Sprague-Dawley 大鼠肠炎模型, LPS 采用腹腔注射的方式。大鼠通过腹腔注射不同浓度(5mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg) C-BF 的 PBS 溶液,注射顺序及时间为先注射不同剂量 C-BF, 24h 后注射 5mg/kg 的 LPS, 于 4h 后处死取样,研究抗菌肽 C-BF 的保护功能,另一种处理方式为先注射 5mg/kg 的 LPS, 于 4h 后注射不

同剂量的 C-BF, 24h 后处死取样, 研究抗菌肽 C-BF 的治疗作用, 侧重于研究 C-BF 的保护功能;

2) 在体外建立 LPS 刺激猪肠道上皮细胞系 J2 (IPEC-J2) 细胞模型, 处理方式为先 $10 \mu\text{g/ml}$ C-BF 处理 24 小时, 再 $1 \mu\text{g/ml}$ LPS 处理 4 小时后收取细胞。

[0007] 进一步, 3) 对于大鼠, 采取一截空肠段, 利用尤斯灌流室测定电导率来评估肠上皮细胞和 IPEC-J2 细胞单层屏障的完整性, 通过测定血浆 D-乳酸和二胺氧化酶(DAO)的水平评价大鼠肠上皮细胞的渗透性, 通过 RT-PCR 和 western blot 测定紧密连接蛋白(TJs)mRNA 和蛋白水平来评估其屏障功能, 通过 HE 染色观察肠上皮形态结构及测量绒毛高度与隐窝深度比值, 通过透射电镜观察肠上皮细胞超微结构, 通过免疫荧光和共聚焦成像法分析 TJs 在组织中位置和分布;

4) 对于猪肠上皮细胞, 利用尤斯灌流室测定跨膜电流, 来评估营养物质转运效率, 通过透射电镜, qRT-PCR, western-blot, 免疫荧光技术方法评价 C-BF 对猪肠上皮细胞屏障功能的保护作用及初步机制;

5) 综合体内大鼠实验和体外细胞实验, 评价 C-BF 在改善肠道屏障功能方面的作用。

[0008] 本发明的有益效果在于:

在体内, 通过 LPS 诱导的大鼠肠炎模型发现 C-BF 可以缓解空肠黏膜结构的改变, 恢复上皮屏障功能, 并阻止紧密连接蛋白表达下降。在体外, 通过 LPS 诱导 IPEC-J2 细胞模型发现 C-BF 可以防止屏障功能中断, 还原和重新分配紧密连接蛋白。

[0009] 这是第一次同时从体内体外试验揭示抗菌肽 C-BF 可通过改善肠屏障功能防止 LPS 诱导的肠炎。C-BF 对改善 LPS 诱导的肠炎的保护作用表明它可被用在 LPS 介导的肠疾病的潜在的预防和治疗药剂。

附图说明

[0010] 图 1. LPS 单独处理或 LPS+C-BF 处理大鼠空肠黏膜结构的改变

图 1A 是空肠黏膜 H&E 染色 ($\times 40$) 图。对照: 对照大鼠未经 LPS 和 C-BF 处理。LPS: 大鼠用 LPS 单独处理。LPS+5CBF, +10CBF, +20CBF: 大鼠先注射 LPS 后分别再添加 5, 10 或 20 mg/kg 的 C-BF。5CBF+, 10CBF+, 20CBF+LPS: 大鼠先添加 5, 10 或 20 mg/kg 的 C-BF 后再注射 LPS, 显示不同浓度 C-BF 或 LPS 和 C-BF 不同添加顺序对 LPS 诱导空肠黏膜改变的恢复作用。

[0011] 图 1B 是空肠黏膜的透射电镜。对照: 对照大鼠未经 LPS 和 C-BF 处理, 上皮细胞和 TJ (\rightarrow) 是完整的。LPS: 大鼠用 LPS 单独处理。LPS+5C, +10C, +20C: 大鼠先注射 LPS 后分别再添加 5, 10 或 20 mg/kg 的 C-BF。5C+, 10C+, 20C+LPS: 大鼠先添加 5, 10 或 20 mg/kg 的 C-BF 后再注射 LPS。显示不同浓度 C-BF 或 LPS 和 C-BF 不同添加顺序对 LPS 诱导空肠黏膜改变的恢复作用。

[0012] 图 2 是 C-BF 缓解 LPS 对大鼠上皮屏障的影响图

(A) 10 或 20 mg/kg C-BF 显著抑制了 LPS 诱导的 DAO 增加 ($P < 0.05$)。 (B) 10 mg/kg C-BF, 无论在 LPS 注射之前还是之后添加, 会引起血浆 D-lactate 水平的最显著下降 ($P < 0.05$)。 (C) C-BF 恢复了 LPS 诱导的空肠营养物质吸收减少 ($P < 0.05$)。 (D) C-BF 改善了 LPS 诱导的空肠 TER 下降 ($P < 0.05$)。 LPS+5CBF, +10CBF, +20CBF: 大鼠先注射 LPS 后分别再添加 5, 10

或 20 mg/kg 的 C-BF。5CBF+, 10CBF+, 20CBF+LPS: 大鼠先添加 5, 10 或 20 mg/kg 的 C-BF 后再注射 LPS。

[0013] 图 3 是 C-BF 抑制 LPS 诱导的紧密连接蛋白表达下降图。

[0014] (A) 用 LPS, LPS+5CBF, LPS+10CBF 或 LPS+20CBF 处理大鼠的空肠黏膜紧密连接蛋白表达。C-BF (10, 20 mg/kg) 显著改善了 LPS 诱导的 Claudin-1 和 Occludin 表达下降。C-BF (5, 10, 20 mg/kg) 显著改善了 LPS 诱导的 Claudin-2 和 JAM 表达下降。C-BF (20 mg/kg) 显著改善了 LPS 诱导的 TJP-1 表达下降。(B) LPS, 5CBF+LPS, 10CBF+LPS 和 20CBF+LPS 处理大鼠的空肠黏膜紧密连接蛋白表达。C-BF (5, 10, 20 mg/kg) 显著改善了 LPS 诱导的 Claudin-2 和 Occludin、JAM 表达下降。C-BF (10, 20 mg/kg) 显著改善了 LPS 诱导的 Claudin-1 表达下降。C-BF (5, 10 mg/kg) 显著改善了 LPS 诱导的 TJP-1 表达下降。LPS+5CBF, +10CBF, +20CBF: 大鼠先注射 LPS 后分别再添加 5, 10 或 20 mg/kg 的 C-BF。5CBF+, 10CBF+, 20CBF+LPS: 大鼠先添加 5, 10 或 20 mg/kg 的 C-BF 后再注射 LPS。

[0015] 图 4 是 C-BF 降低 LPS 诱导的单层 IPEC-J2 细胞的 TJs 和完整性损害图

(A) 对照组、LPS 和 CB-F+LPS 组 IPEC-J2 细胞 TJs 的透射电镜图片。对照组 TJs (→) 是完整的; LPS 组, TJs (→) 是受损的; CB-F+LPS 组, TJs (→) 是不完整的; (B) 对照、LPS、CB-F+LPS 的 IPEC-J2 细胞 Δ Isc。C-BF 恢复了 LPS 诱导的营养物质吸收下降。(C) 对照、LPS、CB-F+LPS 组 IPEC-J2 细胞的 TER。

[0016] 图 5 是 C-BF 缓解 LPS 诱导的 occludin 和 ZO-1 表达下降图

(A) 添加 C-BF 对 LPS 诱导的 occludin 和 ZO-1 的 mRNA 表达影响; (B) 添加 C-BF 对 LPS 诱导的 occludin 和 ZO-1 的蛋白表达影响表; (C) 经 C-BF 预处理后免疫荧光染色观察 LPS 处理细胞相比 occludin 蛋白的分布; (D) 经 C-BF 预处理后免疫荧光染色观察 LPS 处理细胞相比 ZO-1 蛋白的分布。

具体实施方式

[0017] 下面结合附图对本发明做详细描述, 实施例仅是描述而非限定本发明。

[0018] 1、C-BF 能减少由 LPS 诱导的大鼠空肠黏膜形态改变

为了评估 C-BF 在 LPS 相关肠炎中的潜在作用, 我们在 C-BF 作用前后用 LPS 腹腔内注射健康成年大鼠 (10 只每组)。由图 1 所示, LPS 处理的大鼠产生肠炎并伴有肠黏膜形态改变, 而在 LPS 注射前后添加 C-BF 则能显著降低 LPS 诱导的空肠黏膜损害, 可从 H&E 染色看出 (图 1A)。LPS 处理组可观察到明显的肠绒毛高度减少和隐窝深度增加 (表一)。LPS 处理前后添加 10 或 20 mg/kg C-BF 可显著提高绒毛高度和减少隐窝深度 (表一)。

[0019]

表 1 大鼠空肠黏膜上皮的形态测定

分组	绒毛高度	隐窝深度	绒毛高度和隐窝 深度比例
对照组	290.23±3.53 ^c	120.29±3.11 ^e	2.41±0.06 ^a
LPS	155.03±3.13 ^f	217.29±1.69 ^a	0.71±0.02 ^g
LPS+5 mg/kg CBF	139.29±3.68 ^g	119.84±3.10 ^d	1.16±0.05 ^f
LPS+10 mg/kg CBF	394.61±5.75 ^a	181.78±5.15 ^b	2.17±0.06 ^b
LPS+20 mg/kg CBF	222.43±2.98 ^e	146.48±2.75 ^d	1.52±0.04 ^d
5 mg/kg CBF+LPS	214.12±2.33 ^e	161.90±1.53 ^c	1.32±0.02 ^e
10 mg/kg CBF+LPS	318.23±2.20 ^b	186.66±3.55 ^b	1.70±0.03 ^c
20 mg/kg CBF+LPS	237.98±1.60 ^d	159.17±1.99 ^c	1.50±0.02 ^d

平均±标准误。在以不同字母表示同一列的值有显著差异 (P<0.05, n=10)

由透射电镜观察可知, C-BF 可减少由 LPS 引起的小肠粘膜病理变化(图 1B), 包括排列不规整和变形的上皮细胞微绒毛(由箭头所示)以及上皮细胞肿胀和萎缩引起的 TJs 干扰。C-BF 处理组的上皮细胞只有轻微萎缩, 但其 TJs 相比于 LPS 处理组是完整的(图 1B)。

[0020] 2、C-BF 可以修复 LPS 诱导肠炎大鼠的肠上皮屏障功能

为了研究 C-BF 在肠上皮屏障功能的作用, 我们探究了 C-BF 是否影响 LPS 诱导肠炎大鼠上皮通透性、吸收能力以及小肠 TER, 通过评估血浆 D(-)-lactate 水平和 DAO 的改变。血浆 D(-)-lactate 水平是一种评价肠道损害的有用标志, 并能在严重损伤的早期监视肠道通透性的升高。DAO 也经常用于评价肠道损害和通透性。由图 2 中 A 所示, LPS (0.28mM) 处理前后添加 10 mg/kg of C-BF 相比于 LPS 处理组 (0.42mM), 血浆 D-lactate 水平显著降低, 后者与对照组 (0.28mM) 水平相近。相似的, LPS ((1.7×10^{-3} and 2.0×10^{-3} U/ml) 处理前后添加 10 或 20 mg/kg C-BF 相比于 LPS 处理组 (3.4×10^{-3} U/ml) DAO 水平也显著下降(图 2 中 B)。C-BF 对于 LPS 诱导高通透性的效应在营养物质吸收和 TER 分析中被进一步分析。LPS 处理组可引起显著地空肠营养物质(葡萄糖、磷、谷氨酰胺)吸收能力下降(图 2 中 C)和 TER (图 2 中 D)。而 LPS 前后的 C-BF 处理能显著改善 LPS 诱导的空肠营养物质吸收下降和 TER。

[0021] 3、C-BF 对 LPS 诱导大鼠中紧密连接蛋白表达的作用

LPS 被报道通过下调紧密连接蛋白表达来干扰上皮屏障完整性。在本发明中, 我们探究了 C-BF 处理是否会影响 TJs 的表达, 荧光定量所用引物见表二, 与对照组相比, LPS 处理大鼠的 Claudin-1, Claudin-2, Occludin, TJP-1 和 JAM 在空肠的表达都显著降低(图 3)。然而, 与 C-BF 的共处理能防止由 LPS 引起的紧密连接蛋白表达量下降(图 3)。

[0022] 表二荧光定量 PCR 中使用的引物

表 2 荧光定量 PCR 中使用的引物

目的基因	GeneBank 登录号	引物序列 (5'-3')	大小(bp)
Claudin-1	NM031699.2	ATTGGCATGAAGTGCATGAG	108
		CCATGGCCTCCCTTGCGTC	
Claudin-2	NM001106846.2	CCATGGCCTCCCTTGCGTC	184
		ATGCCAGTGCTGTGGGTCGC	
Occludin	NM031329.2	ACACAGACCCCAGAGCGGCA	218
		AGCCTGGGCAGTCGGGTTGA	
TJP-1	NM001106266.1	GCCAGCCAGTCCGCCTCTG	173
		AGGGTCCTCCCGGGTTGGTG	
JAM-1	NM053796.1	GCGAAGCTGTTCCAGCGGA	265
		CGCAGTGGTGCTGCCTTGA	
18S	NR046237.1	GTAACCCGTTGAACCCATT	151
		CCATCCAATCGGTAGTAGCG	

TJP-1: 紧密连接蛋白-1; JAM: 连接黏附分子。

4、C-BF 能够减轻 IPEC-J2 细胞中 LPS 诱导的屏障功能紊乱

为了证实以上体内试验的结果,我们进一步分析了 C-BF 在猪 IPEC-J2 细胞屏障功能的作用。相比于对照组,在 LPS 处理的 IPEC-J2 细胞中屏障功能受到干扰,但是 C-BF + LPS 组中 TJs 没有明显的干扰(图 4 中 A)。与我们的体内试验一致,LPS 处理组营养物质(葡萄糖、磷、铜、谷氨酰胺)吸收显著下降,而 C-BF 处理使得营养物质吸收恢复到了对照组的正常水平(图 4 中 B)。另外,LPS 处理导致了在单层 IPEC-J2 细胞中 TER 的快速下降,但在 C-BF + LPS 组中 TER 水平得到恢复(图 4 中 C),与对照组相比下降速度慢很多。

[0023] 5、C-BF 能够防止单层 IPEC-J2 细胞中 LPS 诱导的 TJs 减少和再分布

为了探究 LPS 处理后 C-BF 对单层 IPEC-J2 细胞保护作用的可能机制,我们评估了紧密连接相关 mRNA 和蛋白的表达(ZO-1 和 occludin)。与对照组相比(图 5 中 A),LPS 处理细胞会导致显著的 ZO-1 和 occludin 转录(图 5 中 A)及蛋白水平(图 5 中 B)下降。然而,添加 C-BF 后能显著抑制 ZO-1 和 occludin 的 mRNA 和蛋白的表达下降(图 5 中 A, 5 中 B)。免疫荧光和共聚焦图像分析显示,4 小时孵育后 LPS 处理 IPEC-J2 细胞中紧密连接相关 ZO-1 和 occludin 的区域化诱导了连接区域 ZO-1 和 occludin 水平的明显下降(图 5 中 C)。相反地,用 C-BF 预孵育后,ZO-1 和 occludin 表达量显著升高,并且与 LPS 处理细胞相比他们的蛋白分布变的正常。连接蛋白重新定位于细胞的胞质和核区域(图 5 中 D)。

[0024] 最后应当说明的是,以上内容仅用以说明本发明的技术方案,而非对本发明保护范围的限制,本领域的普通技术人员对本发明的技术进行的若干改进与润饰,均视为本发明的保护范围。

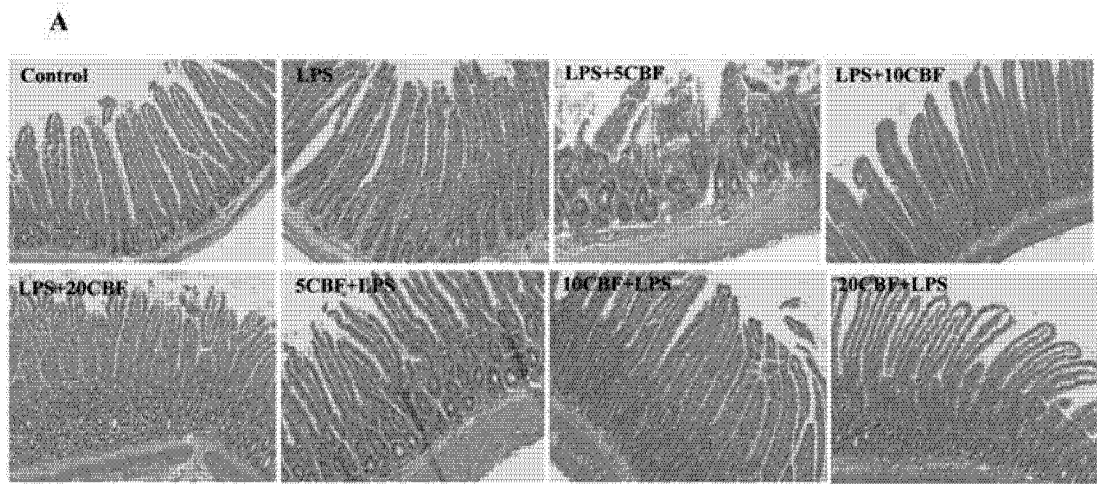


图 1A

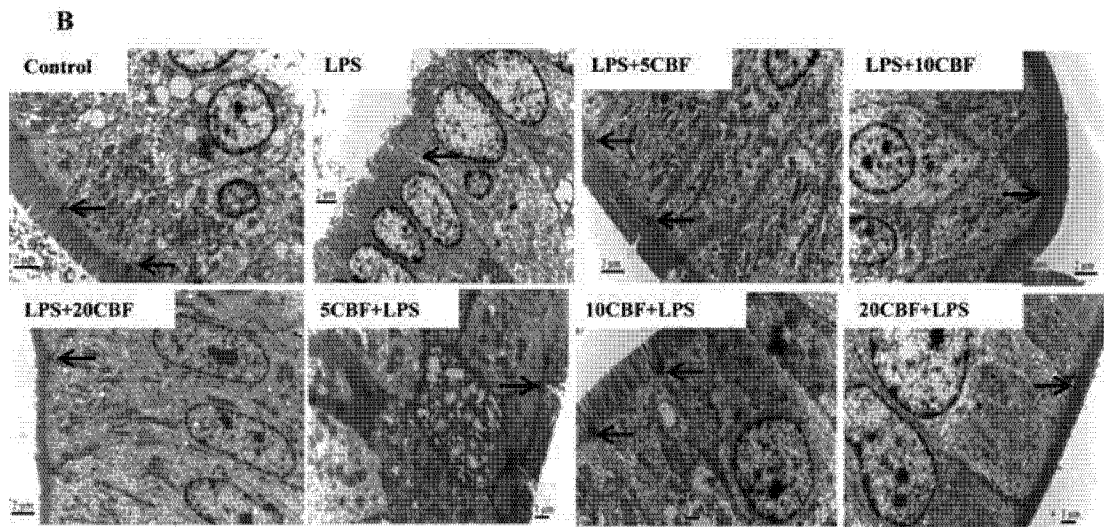


图 1B

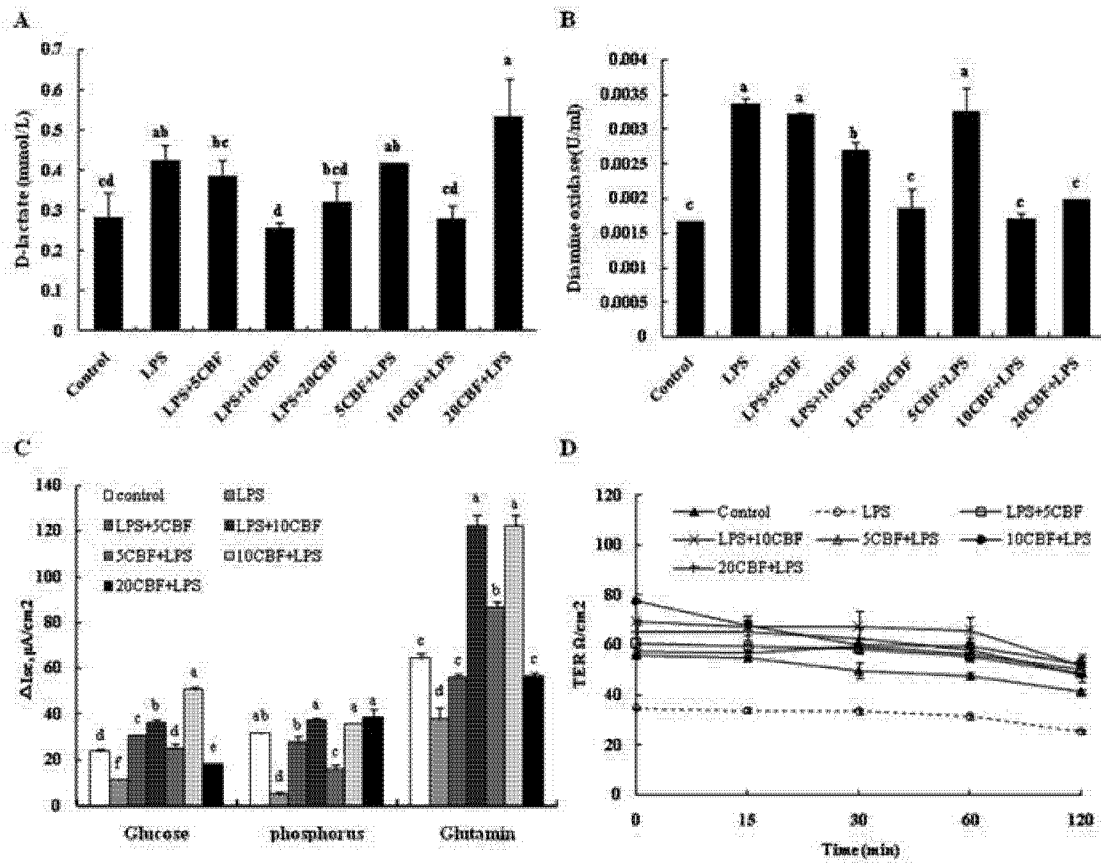


图 2

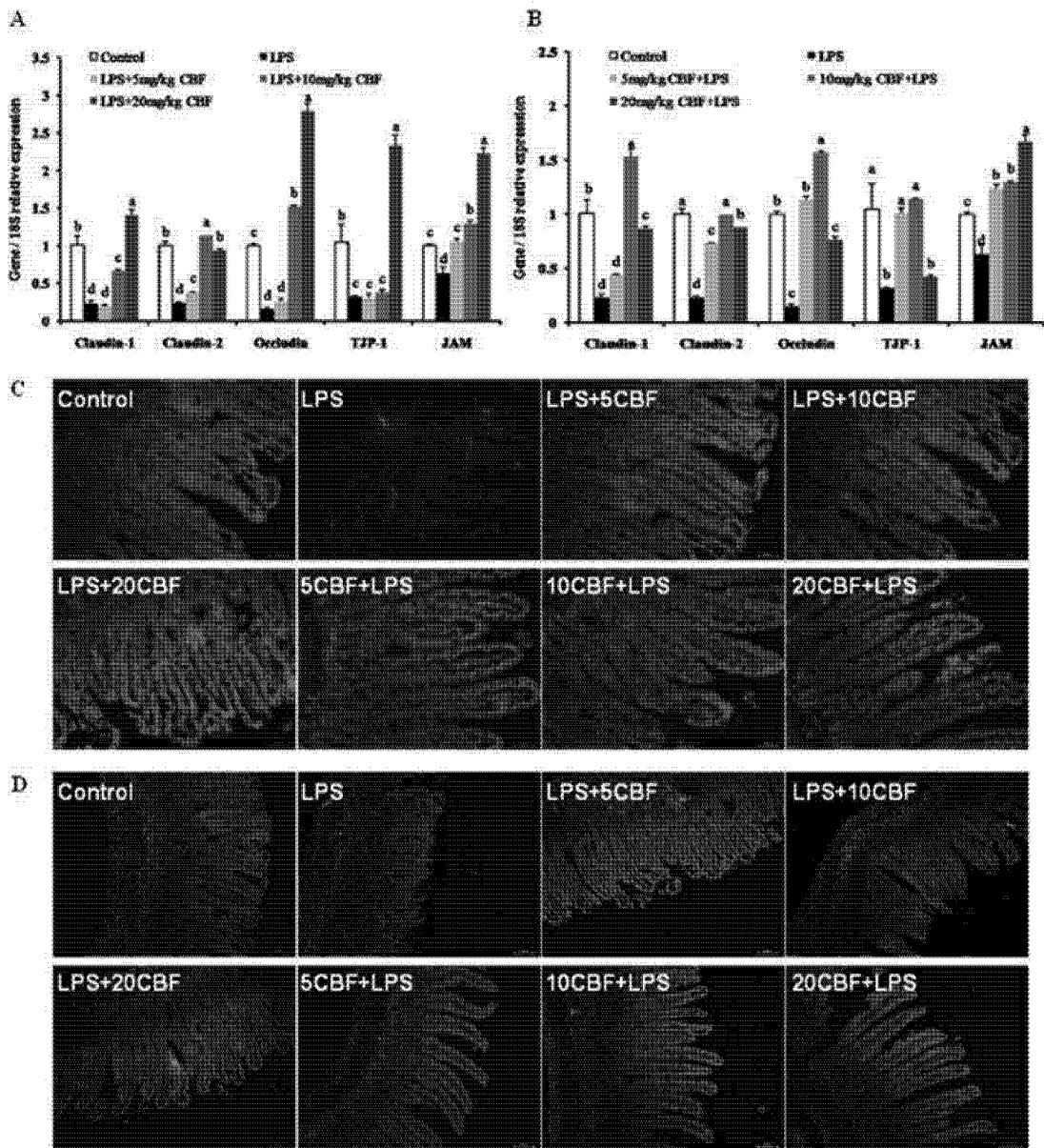


图 3

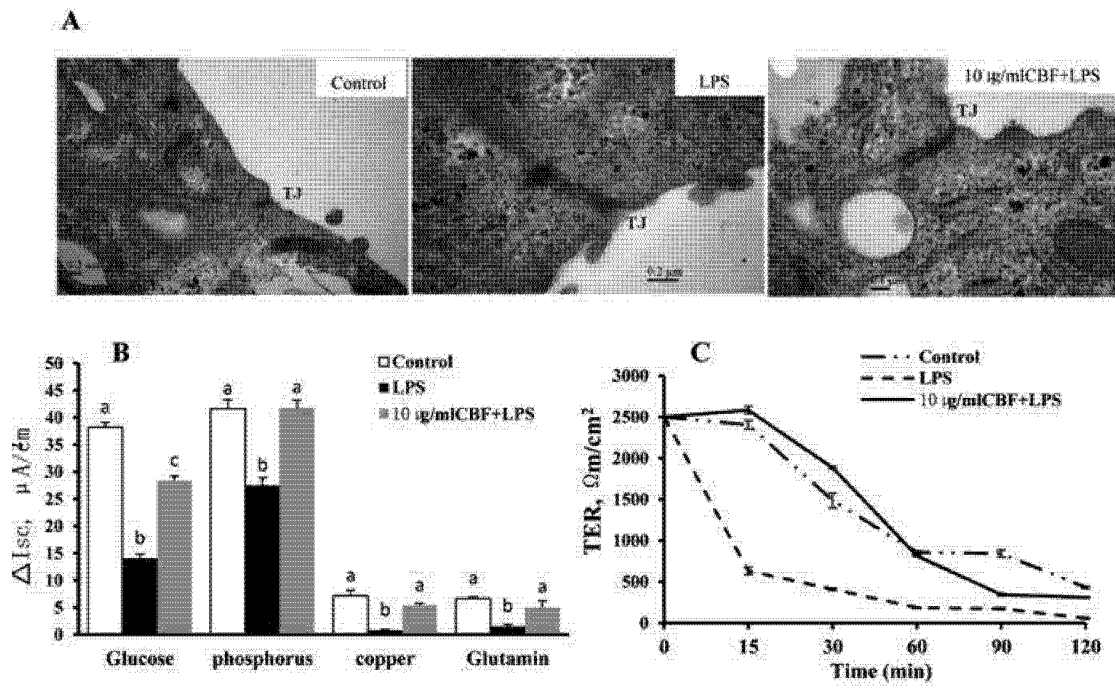


图 4

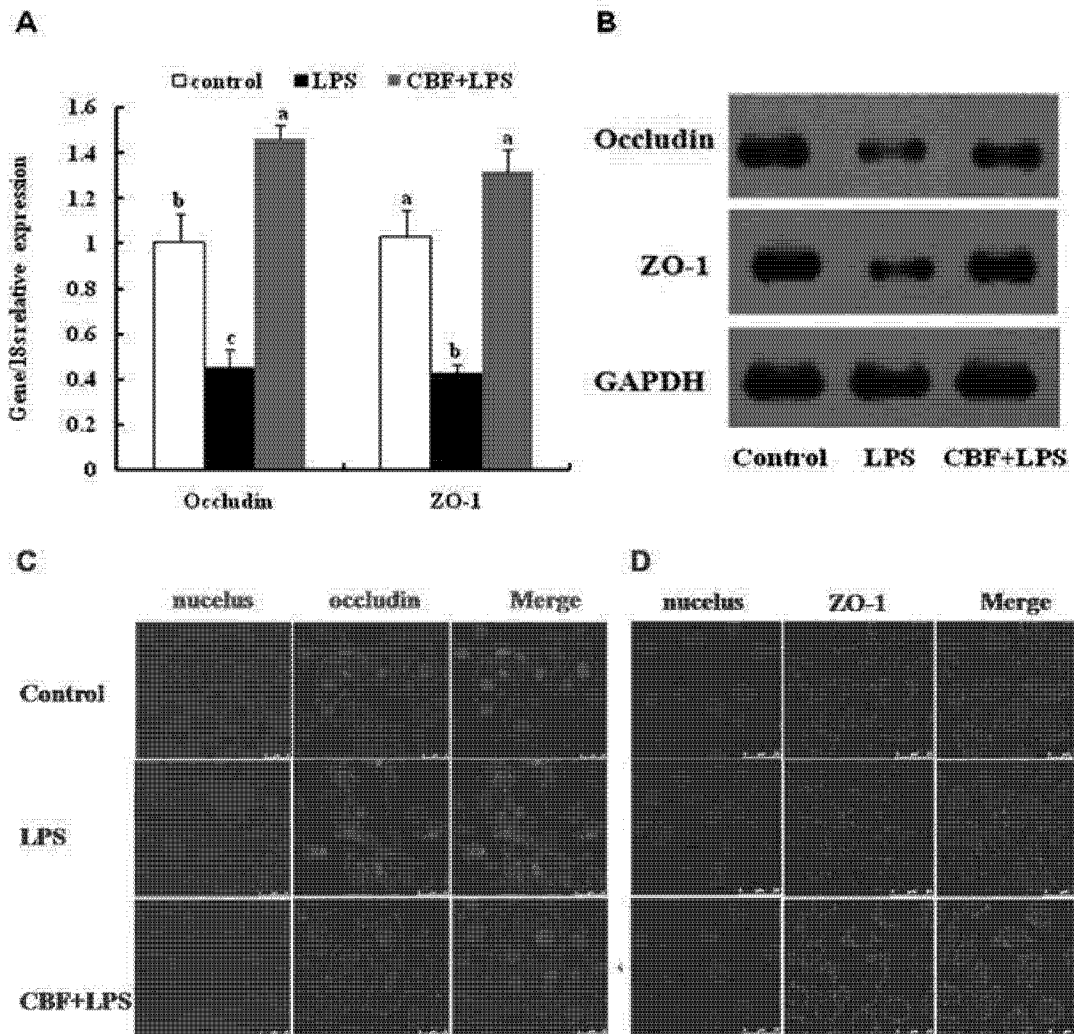


图 5

专利名称(译)	通过LPS刺激建立的大鼠及猪肠道上皮细胞的综合模型		
公开(公告)号	CN104031878A	公开(公告)日	2014-09-10
申请号	CN201410207726.2	申请日	2014-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	汪以真 张海文 金灵红		
发明人	汪以真 张海文 金灵红		
IPC分类号	C12N5/071 C12Q1/68 C12Q1/26 C12Q1/02 G01N33/53 G01N21/64		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种通过LPS刺激建立的大鼠及猪肠道上皮细胞的综合模型。细菌脂多糖 (LPS) 具有破坏肠上皮屏障功能, 本发明旨在鉴定来源于蛇的抗菌肽Cathelicidin-BF (C-BF) 是否对LPS诱导的肠炎具有保护作用。IPEC-J2是从猪空肠段分离的肠上皮细胞系, 猪消化系统与人的非常相似。通过体内大鼠模型和体外猪IPEC-J2细胞模型检测了Cathelicidin-BF保护LPS诱导的肠道屏障功能受损的作用。我们发现, 外源Cathelicidin-BF对LPS诱导的大鼠肠道屏障功能受损和LPS致IPEC-J2细胞损伤模型有保护作用。

