

# 嗜黏蛋白阿克曼菌干预对特异性皮炎小鼠的影响

令狐晨曦<sup>1</sup>, 邓思思<sup>2</sup>, 查碧晴<sup>1</sup>, 陈静<sup>1</sup>, 张翔凌<sup>1</sup>, 王国庆<sup>1</sup>

1. 四川大学华西公共卫生学院 / 华西第四医院, 四川 成都 610041; 2. 湖南省疾病预防控制中心

**摘要:** **目的** 探究嗜黏蛋白阿克曼菌 (*Akkermansia muciniphila*, AKK) 对 2,4-二硝基氯苯 (2,4-dichloronitrobenzene, DNCB) 诱导的特应性皮炎 (atopic dermatitis, AD) 小鼠的干预作用及肠道菌群的影响。 **方法** 将 72 只 BALB/c 小鼠随机分高、低剂量活菌组与巴氏灭菌组、模型组与空白组, 每组 12 只。采用 DNCB 构建 AD 小鼠模型, 使用不同剂量的 AKK 活菌和巴氏灭活菌灌胃干预 4 周。观察各组小鼠背部皮损、脾肿大和皮肤组织病理情况, 测定血清 IgE 水平, 检测背部皮肤组织中 IL-4 和 IFN- $\gamma$  在 mRNA 转录和蛋白上的表达水平。收集小鼠粪便样品, 采用 16S rRNA 测序了解肠道菌群结构及丰度变化。 **结果** AKK 干预后未明显改善 AD 小鼠的皮损、脾肿大及皮肤组织病理损伤情况, 血清 IgE 水平升高, IL-4 水平除低剂量活菌组的 mRNA 转录水平外均降低, 低剂量活菌组和高剂量灭活组的 IFN- $\gamma$  水平在 mRNA 和蛋白水平上均表达升高; 各干预组肠道菌群多样性增加, 厚壁菌门 / 拟杆菌门比值降低。 **结论** AKK 虽未明显改善 AD 小鼠的皮肤病变, 但在一定程度上缓解了小鼠体内的炎症反应, 改善了其肠道菌群多样性和结构。

**关键词:** 特异性皮炎; 嗜黏蛋白阿克曼菌; 肠道菌群

中图分类号: R758.2 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2024)03-514-09

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202308487

## Effect of *Akkermansia muciniphila* intervention on mice with atopic dermatitis

LINGHU Chen-xi\*, DENG Si-si, ZHA Bi-qing, CHEN Jing, ZHANG Xiang-ling, WANG Guo-qing

\*West China School of Public Health, Sichuan University/West China Fourth Hospital, Chengdu, Sichuan 610041, China

**Abstract: Objective** To investigate the intervention effect of *Akkermansia muciniphila* (AKK) on atopic dermatitis (AD) induced by 2,4-dichloronitrobenzene (DNCB) in mice and the effect of intestinal flora. **Methods** In total 72 BALB/c mice were randomly divided into high and low dose live bacteria group, pasteurization group, model group, and blank group, with 12 mice in each group. The AD mouse model was established by DNCB, and different doses of AKK living bacteria and *Pasteurella multocida* were intragastrically administered for 4 weeks. The skin lesions, splenomegaly, and skin histopathology of mice in each group were observed, the level of serum IgE was measured, and the expression levels of IL-4 and IFN- $\gamma$  on mRNA transcription and protein in back skin tissue were detected. The fecal samples of mice were collected and 16SrRNA sequencing was used to understand the changes in the structure and abundance of intestinal microflora. **Results** After AKK intervention, the skin lesions, splenomegaly, and skin pathological damage of AD mice were not significantly improved, the level of serum IgE increased, the level of IL-4 decreased except the mRNA transcription level of low dose live bacteria group, and the expression of IFN- $\gamma$  increased at mRNA and protein levels in low dose live bacteria group and high dose inactivated group. **Conclusion** Although AKK did not significantly improve the skin lesions of AD mice, it alleviated the inflammatory reaction in mice to some extent and improved the diversity and structure of intestinal flora.

**Keywords:** Atopic Dermatitis; *Akkermansia muciniphila*; Intestinal flora

特应性皮炎 (atopic dermatitis, AD) 是一种与免疫相关的炎症性皮肤病, 具有慢性、复发性、皮肤持续瘙痒等特征<sup>[1]</sup>。AD 病例一般出现在生命早期, 少数严重的病例可持续到成年仍然继续发病, 并影响患者的睡眠、社交等正常活动<sup>[2-4]</sup>。AD 的发病机制非常复杂, 涉

及遗传、皮肤屏障功能障碍、免疫障碍、微生物失衡等多个因素<sup>[5]</sup>。有研究表明, 免疫失衡是 AD 的关键病因, 过敏原刺激 Th2 细胞释放炎性细胞因子, 导致其与 Th1 细胞失衡<sup>[6]</sup>。Th1 和 Th2 是 CD4+T 辅助性 (Th) 淋巴细胞的细胞亚群, 检测 Th1/Th2 细胞比例及相关细胞因子表达的变化可以更好的理解免疫性疾病的发病机制, 为治疗相关疾病提供理论基础<sup>[7]</sup>。目前 AD 的治疗方法包括紫外线光疗、外用皮质类固醇及注射

基金项目: 四川省科技厅重点研发项目 (2019YFS0304)

作者简介: 令狐晨曦 (1998—), 女, 硕士在读, 研究方向: 卫生检验与检疫

通信作者: 王国庆, E-mail: huaxiwgq@163.com

度普利尤单抗等,这些方法存在一定的副作用或价格昂贵<sup>[8]</sup>。因此需要探索有效、安全且易获得的 AD 治疗策略。

肠道和皮肤作为与外界环境接触的重要器官,存在许多共同之处,因此有研究提出了“肠-皮肤”轴理论,认为可基于肠道健康治疗皮肤病<sup>[9]</sup>。肠道微生物群是宿主代谢的中央调节器,其结构发生改变将会导致代谢紊乱和免疫功能障碍,因此,可通过肠道微生物群调节免疫反应<sup>[10-11]</sup>。有研究表明,肠道微生物群与特异性皮炎之间存在相关性,可通过补充益生菌来预防和治疗 AD<sup>[12]</sup>。益生菌已被证实在塑造肠道微生物群和促进机体健康方面发挥了很好的作用<sup>[13]</sup>。对于 AD 的预防与治疗,大多数研究采用的都是传统益生菌(乳酸杆菌和双歧杆菌),且它们缓解 AD 的作用可能还存在菌株特异性<sup>[14-15]</sup>。嗜黏蛋白阿克曼菌(*Akkermansia muciniphila*, AKK)是一种肠道共生厌氧菌,于 2004 年由 Derrien 等人<sup>[16]</sup>首次从人类粪便中分离得到。已有研究证实 AKK 的丰度水平与肥胖<sup>[17]</sup>、结肠炎<sup>[18]</sup>、2 型糖尿病<sup>[19]</sup>等多种疾病有关,被认为是极具潜力的下一代益生菌<sup>[20]</sup>。AKK 与宿主的代谢和免疫反应密切相关,可望成为预防和治疗与免疫相关的炎症性疾病的新策略<sup>[21]</sup>。

目前,通过构建 AD 小鼠模型使用 AKK 灌胃干预,探究 AKK 缓解 AD 症状的研究较少。因此,本研究通过 2,4-二硝基氯苯(2,4-dichloronitrobenzene, DNCB)建立 AD 小鼠模型,拟评价 AKK 菌株对 AD 小鼠的干预作用,并探讨 AD 小鼠肠道菌群的变化,为 AD 的预防与治疗及 AKK 作为益生菌的开发与应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 2,4-二硝基氯苯(成都化夏试剂有限公司);总 RNA 提取试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司);Evo M-MLV 反转录试剂预混液、SYBR<sup>®</sup> Green Pro Taq HS 预混型 qPCR 试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司);小鼠免疫球蛋白 E(IgE)酶联免疫吸附测定试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);小鼠多因子检测试剂盒(成都诺和生物科技股份有限公司);嗜黏蛋白阿克曼菌(DSM 22959)由南京农业大学刘丽教授惠赠,本课题组保存。

**1.2 实验动物** 72 只 SPF 级 5 周龄雌性 BALB/c 小鼠购自成都达硕实验动物有限公司(实验动物生产许可证:SCXK(川)2020-030)。饲养于室温 20~26℃,空气相对湿度 40%~70%,光照周期 12 h/12 h 的 SPF 级屏障环境中。适应性喂养 1 周,自主饮水及进食。本实验所有涉及实验动物的操作严格按照四川大学

华西公共卫生学院/华西第四医院伦理委员会的要求进行(批件号:Gwl12022056)。

## 1.3 方法

**1.3.1 AKK 灌胃液的制备** 将细菌接种于含有 L-半胱氨酸的 BHI 液体培养基中厌氧培养,根据课题组前期制备的菌落数-OD600 nm 处吸光度值的标准曲线确定细菌浓度,用含 25%甘油的无菌 PBS 收集菌体,调整菌液终浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/ml 和  $1 \times 10^{10}$  CFU/ml,即为 AKK 活菌灌胃储备液,分别取上述菌液于 70℃水浴加热 30 min 进行巴氏灭活,即为 AKK 灭活菌灌胃储备液,将上述灌胃储备液于 -80℃冻存备用。灌胃前将灌胃储备液解冻,用无菌 PBS 进行 10 倍稀释,制备为  $1 \times 10^7$  CFU/ml 的低浓度和  $1 \times 10^9$  CFU/ml 的高浓度灌胃液。

**1.3.2 实验动物分组及处理** 将 72 只小鼠随机分为 6 组,每组各 12 只。分别为 A 组,即高剂量活菌组(high-dose live AKK);B 组,即低剂量活菌组(low-dose live AKK);C 组,高剂量灭活组(high-dose pasteurized AKK);D 组,低剂量灭活组(low-dose pasteurized AKK);E 组,模型对照组(MC);F 组,空白对照组(NC)。单次灌胃剂量为 200  $\mu$ l,最终高剂量组、低剂量组的灌胃菌量分别为  $2 \times 10^8$  CFU 和  $2 \times 10^6$  CFU。

灌胃前先剃去小鼠背部毛发,大小约为 3 cm  $\times$  2 cm。除 F 组外,在实验的第 1、4 和 7 d 给其余各组小鼠背部脱毛区涂抹 1%的二硝基氯苯溶液(4:1 丙酮橄榄油配制)200  $\mu$ l 进行致敏;在第 14、17、19、22、24、27、29、32、34、37 和 39 d 给小鼠背部脱毛区涂抹 0.5%的二硝基氯苯溶液 200  $\mu$ l 诱发皮炎。在持续 6 周的处理中,各组从第 3 周开始给小鼠灌胃 200  $\mu$ l/次。干预组分别用 1.3.2 制备的灌胃液进行灌胃,两对照组用含 2.5%甘油的无菌 PBS 进行灌胃。所有小鼠灌胃每天 1 次,连续 4 周。

实验期间观察小鼠的生长情况,记录各组小鼠背部皮损部位的情况。

**1.3.3 小鼠脾脏指数测定和皮肤病理组织观察** 在实验结束的第 1 d 采用颈椎脱臼处死小鼠,取小鼠脾脏进行称重,脏器指数 = 脏器重量 / 小鼠体重  $\times$  100%。切取小鼠背部脱毛区域皮肤组织,在 4%多聚甲醛溶液中固定,经乙醇脱水、二甲苯透明化、石蜡包埋制成切片。采用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)对切片进行染色,于显微镜下观察小鼠皮肤组织的病理症状。

**1.3.4 血清 IgE 检测** 小鼠麻醉后进行摘眼球取血,室温放置 2 h 后 4 000 r/min 离心 20 min,收集血清,-20℃冷冻保存备用,用 ELISA 法检测各组小鼠

的血清 IgE 含量。

**1.3.5 皮肤组织炎症因子 mRNA 表达水平检测** 取小鼠背部皮肤组织提取 RNA, 采用逆转录-荧光定量 PCR 法 (quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR) 测定 IL-4 与 IFN- $\gamma$  的 mRNA 表达水平, 所有操作均按试剂盒要求进行。cDNA 作为 qPCR 的模板, 目的基因及引物序列如表 1 所示, 引物由擎科生物科技有限公司合成。反应体系为: 2  $\times$  SYBR<sup>®</sup> Green Pro Taq HS Premix 10  $\mu$ l, 上下游引物各 1  $\mu$ l, 模板 2  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 2  $\mu$ l; 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 65~95 $^{\circ}$ C 0.5 $^{\circ}$ C/5 s 扩增, 40 个循环。以 GAPDH 基因为参比, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$</sup>  相对定量法计算目的基因的 mRNA 表达水平。

表 1 目的基因及引物序列  
Table 1 Target genes and primer sequences

目的基因	引物序列(5'→3')	碱基长度(bp)
GAPDH	F:AGGTCGCTGTGAACGGATTTC	123
	R:TCTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	
IL-4	F:GGTCTCAACCCAGCTAGT	102
	R:GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT	
IFN- $\gamma$	F:TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	92
	R:TGGCTCTGCAGGATTTTCATG	

**1.3.6 皮肤组织炎症因子蛋白水平检测** 称取 100 mg 的小鼠背部皮肤组织, 加入 1 ml 预冷的 PBS 缓冲

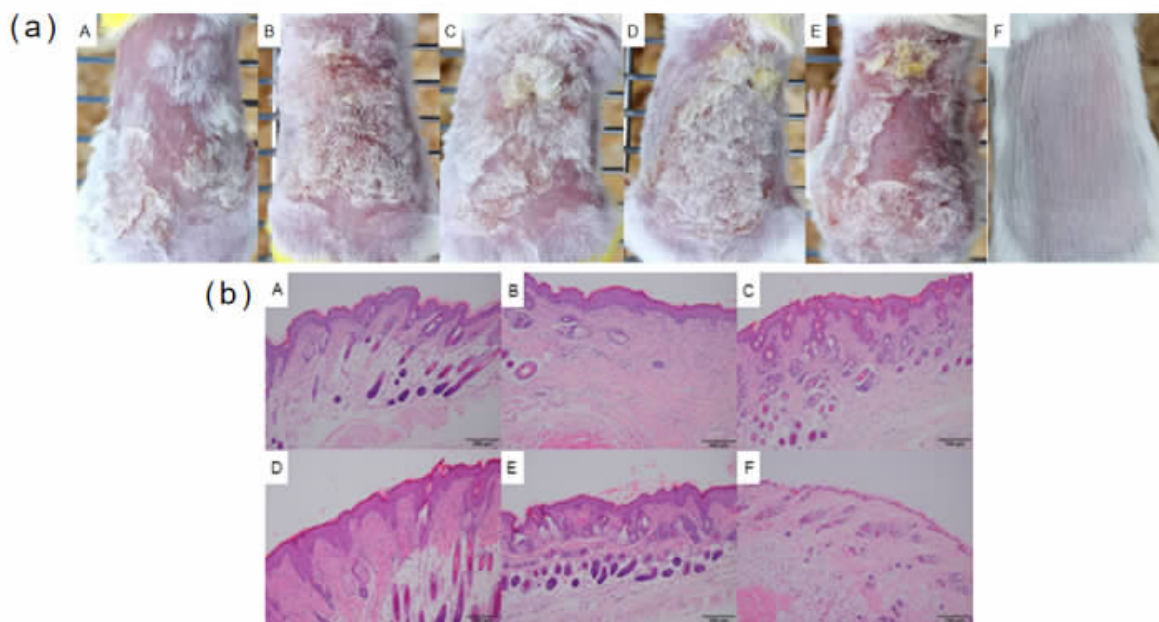
液, 裂解均质后 14 000  $\times$  g 离心 10 min 取上清, -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存。根据小鼠多因子试剂盒提取蛋白 IL-4 和 IFN- $\gamma$ , 采用流式细胞仪上机检测。

**1.4 肠道菌群多样性测序分析** 在实验结束前一天收集各组小鼠粪便, -80 $^{\circ}$ C 冷冻保存。每组随机选择 8 只小鼠, 共 48 个粪便样品进行 16S rRNA 基因测序。粪便 DNA 提取及测序由奥维森基因科技有限公司进行。

**1.5 统计学分析** 使用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析, GraphPad Prism 9.0 软件绘制图形。计量资料使用(均数  $\pm$  标准差)表示, 符合正态性和方差齐性的资料采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行组间比较, 两两比较采用 SNK 检验, 反之则进行 Kruskal-Wallis H 检验。检验水准为  $\alpha=0.05$ 。测序结果的数据分析均在奥维森云平台上进行。

## 2 结果

**2.1 小鼠背部皮肤皮损情况及病理组织变化** 如图 1(a)所示, 与 F 组比较, 造模第 40 d, 各组小鼠背部皮肤均出现红斑、结痂、脱皮的皮损表现, 表明特异性皮炎模型造模成功; 与 E 组比较, 各干预组的皮损症状并无明显改善。同时 HE 染色镜检发现, F 组小鼠背部皮肤组织各层界限清晰、结构完整、表皮层薄, 而 E 组皮肤组织表现为角化过度、表皮层变厚, 基底细胞增生; 与 E 组比较, 各干预组的皮肤组织结构均未明显改善, 见图 1(b)。

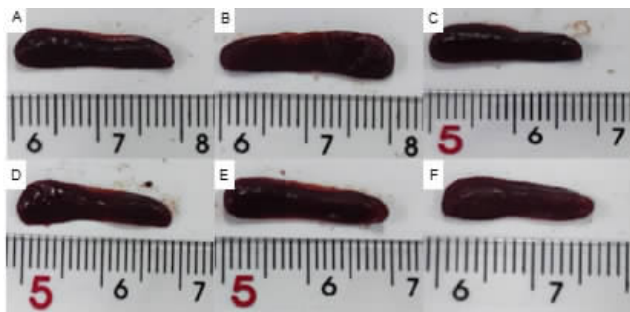


注: (a) 小鼠背部皮损图, (b) 小鼠背部皮肤 HE 病理染色图; A 为高剂量活菌组, B 为低剂量活菌组, C 为高剂量灭活组, D 为低剂量灭活组, E 为模型对照组, F 为空白对照组。

图 1 各组小鼠背部皮肤损伤情况

Figure 1 Skin damage on the back of mice in each group

**2.2 脾脏指数比较** 脾脏是最重要的免疫器官,具有调节各种免疫反应的作用,脾肿大提示免疫系统功能异常<sup>[2]</sup>。如图 2 与表 2 所示,与 F 组比较,E 组脾脏增大,脾脏指数显著升高( $P<0.001$ );与 E 组比较,各干预组脾脏大小无明显差异,脾脏指数均升高,其中 A 组与 E 组相比显著升高,有统计学意义( $P<0.01$ )。

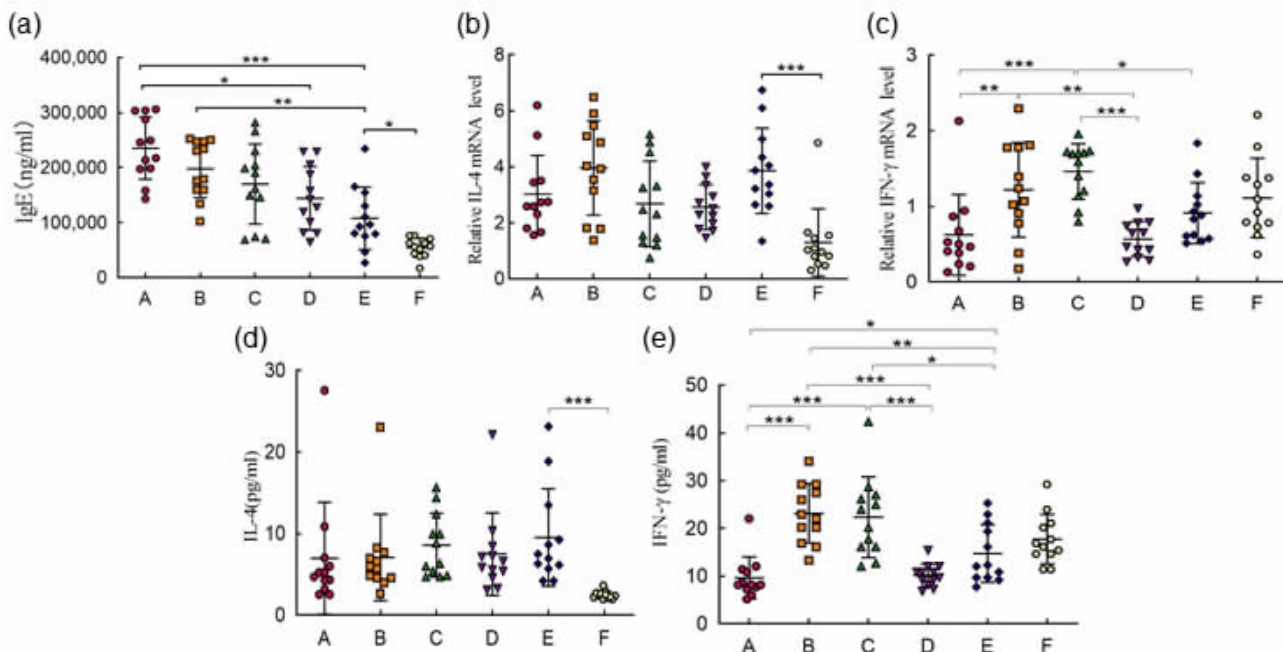


注:A 为高剂量活菌组,B 为低剂量活菌组,C 为高剂量灭活组,D 为低剂量灭活组,E 为模型对照组,F 为空白对照组。

图 2 各组小鼠脾脏图

Figure 2 Spleen diagrams of mice in each group

**2.3 血清 IgE 分析结果** ELISA 测得小鼠血清 IgE 含量结果见图 3(a),与 F 组比较,E 组小鼠血清 IgE 水平显著升高( $P<0.05$ ),与 E 组比较,各干预组 IgE 水平均升高,仅有 A 组和 B 组的差异有统计学意义( $P<0.001, P<0.01$ )。



注:图(a)血清 IgE 水平,图(b)IL-4 转录水平,图(c)IFN- $\gamma$  转录水平,图(d)IL-4 蛋白水平,图(e)IFN- $\gamma$  蛋白水平;A 为高剂量活菌组,B 为低剂量活菌组,C 为高剂量灭活组,D 为低剂量灭活组,E 为模型对照组,F 为空白对照组;\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ,\*\*\* $P<0.001$ 。

图 3 各组小鼠血清 IgE 水平及皮肤组织炎症因子水平

Figure 3 Serum IgE levels and skin tissue inflammatory factor levels in mice in each group

**2.5 肠道菌群分析**

表 2 各组小鼠脾脏指数比较

Table 2 Spleen index of mice in each group

分组	脾脏指数
A 组(n=12)	0.62 ± 0.08**
B 组(n=12)	0.57 ± 0.06
C 组(n=12)	0.58 ± 0.06
D 组(n=12)	0.57 ± 0.06
E 组(n=12)	0.52 ± 0.06###
F 组(n=12)	0.38 ± 0.05

注:A 为高剂量活菌组,B 为低剂量活菌组,C 为高剂量灭活组,D 为低剂量灭活组,E 为模型对照组,F 为空白对照组;与对照组比较,### $P<0.001$ ;与模型组比较,\*\* $P<0.01$ 。

**2.4 小鼠皮肤组织炎症因子 mRNA 转录水平与蛋白水平** 如图 3(b)与(c),与 F 组比较,E 组中 IL-4 转录水平显著增加 ( $P<0.001$ ),IFN- $\gamma$  转录水平降低。与 E 组比较,除 B 组外其余干预组 IL-4 转录水平均降低,但差异无统计学意义;IFN- $\gamma$  转录水平 A、D 组降低,B、C 组升高,仅有 C 组有统计学差异 ( $P<0.05$ )。

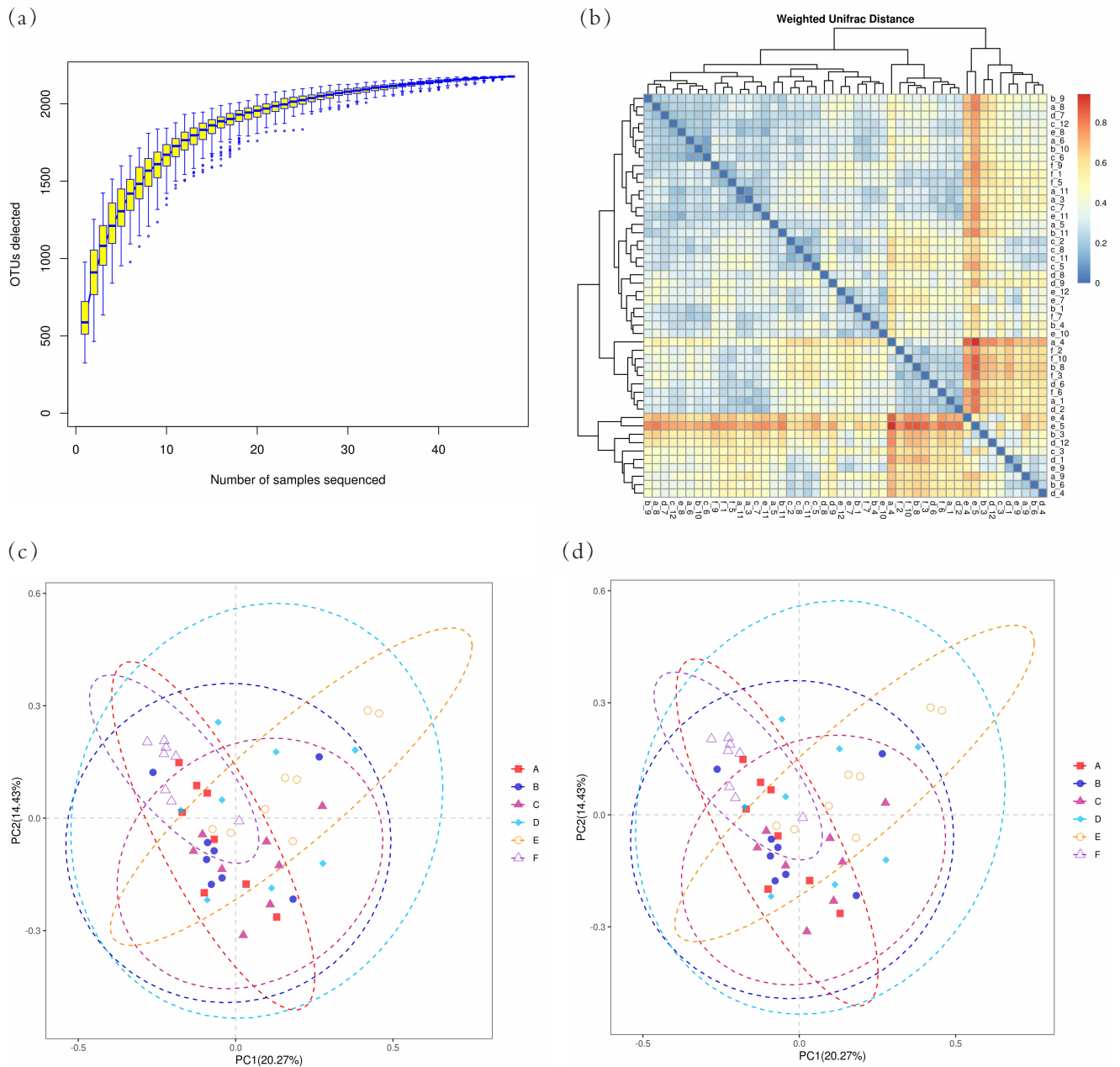
如图 3(d)与(e),与 F 组比较,E 组 IL-4 蛋白水平显著升高( $P<0.001$ ),IFN- $\gamma$  蛋白水平降低。与 E 组比较,各干预组 IL-4 蛋白水平均降低,但差异无统计学意义,IFN- $\gamma$  蛋白水平 A、D 组降低,B、C 组升高,仅有 D 组无统计学差异( $P>0.05$ )。

**2.5.1  $\alpha$  多样性分析** 如图 4,Specaccum 物种累积

曲线(a)趋向平缓,说明测序样本量充足,物种丰富度高。因此,我们通过  $\alpha$  多样性指数来评估样本中微生物群落的丰度和多样性,见表 3。在 chao1 指数、observed\_species 指数和 PD\_whole\_tree 指数水平上,与 F 组比较,E 组三种指数均显著降低( $P<0.01$ );与 E 组比较,A 组和 D 组三种指数均升高(差异无统计学意义),B、C 组都与 F 组相差不大。但在 Shannon 指数和 Simpson 指数水平上,与 F 组比较,E 组两种指数均显著降低( $P<0.01$ )。与 E 组比较,各干预组两种指数均升高,但仅有 C 组的 Shannon 指数有显著性

( $P<0.05$ )。提示 AD 小鼠肠道菌群丰富度显著降低,各干预组在经过 AKK 干预后,AD 小鼠肠道菌群  $\alpha$  多样性能在一定程度上能升高。

**2.5.2  $\beta$  多样性分析** 如图 4(b),基于 unifrac 距离的聚类热图显示,各个样本间存在一定程度的差异。图 4 (c)PCoA 分析显示,当主坐标 PC1=20.27%,PC2=14.43%时,F 组与 E 组距离较远,说明微生物组成结构差异较大;而 F 组与 A 组距离较近,说明微生物组成结构分布较为相似。这一结果与 NMDS 分析所显示的结果较为一致,见图 4(d)。



注:(a)  $\alpha$  多样性物种累积曲线图,(b)  $\beta$  多样性聚类热图,(c)  $\beta$  多样性 PCoA 图,(d)  $\beta$  多样性 NMDS 图;A 为高剂量活菌组,B 为低剂量活菌组,C 为高剂量灭活组,D 为低剂量灭活组,E 为模型对照组,F 为空白对照组。

图 4 肠道菌群多样性分析图  
Figure 4 Diversity analysis of gut microbiota chart

表 3 α 多样性指数比较

Table 3 Comparison of alpha diversity indices

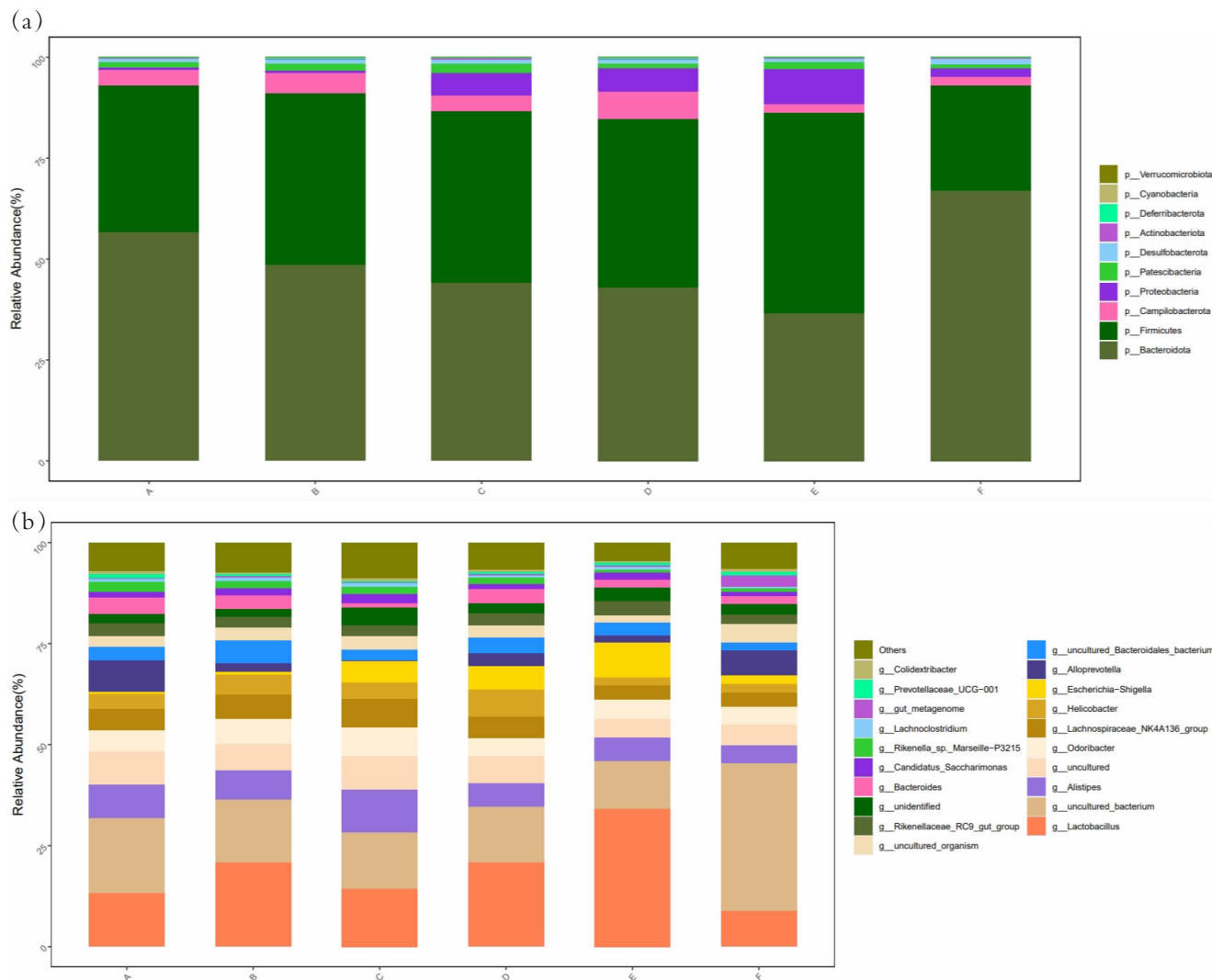
组别	chao1	observed_species	PD_whole_tree	shannon	simpson
A 组(n=8)	865.64 ± 197.48	593.25 ± 106.80 <sup>#</sup>	44.35 ± 5.03 <sup>###</sup>	5.88 ± 0.57	0.96 ± 0.05 <sup>###</sup>
B 组(n=8)	780.50 ± 174.14 <sup>##</sup>	534.63 ± 126.69 <sup>###</sup>	42.36 ± 6.42 <sup>##</sup>	5.66 ± 0.68 <sup>#</sup>	0.95 ± 0.04
C 组(n=8)	743.00 ± 169.70 <sup>###</sup>	541.00 ± 100.98 <sup>###</sup>	42.60 ± 5.22 <sup>##</sup>	6.01 ± 0.54 <sup>*</sup>	0.95 ± 0.04
D 组(n=8)	825.52 ± 265.58 <sup>##</sup>	566.00 ± 151.69 <sup>##</sup>	43.55 ± 7.60 <sup>##</sup>	5.53 ± 0.95 <sup>#</sup>	0.93 ± 0.06 <sup>#</sup>
E 组(n=8)	790.86 ± 251.30 <sup>##</sup>	538.63 ± 173.91 <sup>##</sup>	42.38 ± 8.78 <sup>##</sup>	4.82 ± 1.51 <sup>###</sup>	0.83 ± 0.19 <sup>###</sup>
F 组(n=8)	1218.17 ± 206.62	860.63 ± 141.47	56.36 ± 6.07	6.39 ± 0.42	0.97 ± 0.01

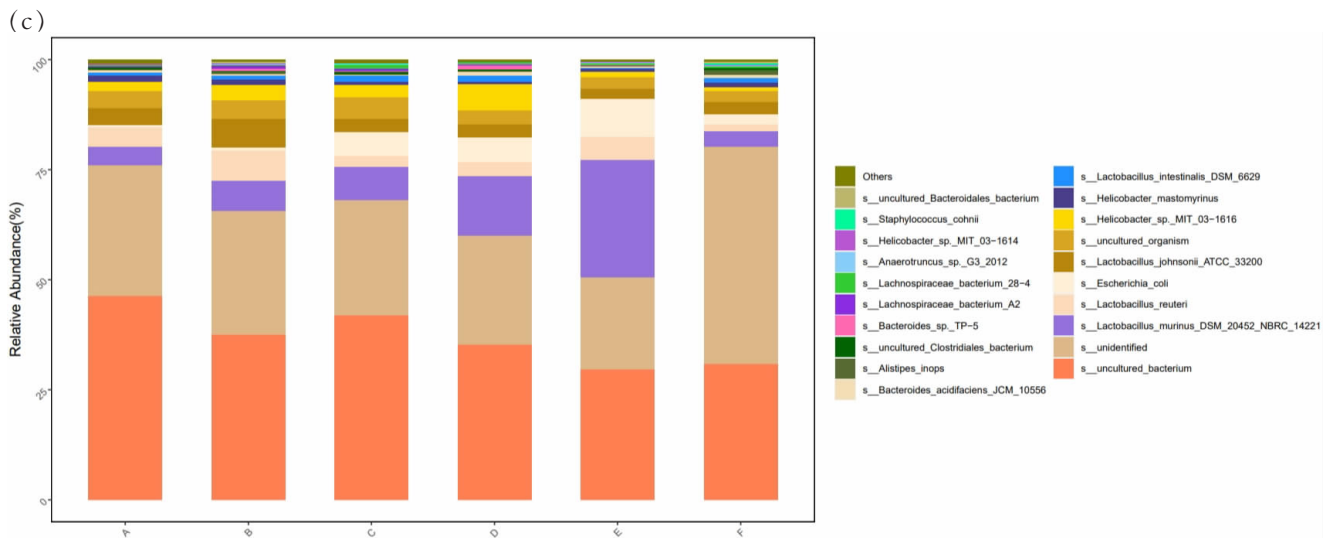
注:A 为高剂量活菌组,B 为低剂量活菌组,C 为高剂量灭活组,D 为低剂量灭活组,E 为模型对照组,F 为空白对照组; 与对照组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ ,<sup>###</sup> $P < 0.001$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.05$ 。

2.5.3 菌群相对丰度差异分析 在门水平上,如图 5 (a),与 F 组比较,E 组拟杆菌门(*Bacteroidota*)水平显著降低( $P < 0.05$ ),厚壁菌门(*Firmicutes*)水平显著升高( $P < 0.05$ )。与 E 组比较,各干预组拟杆菌门水平平均升高、厚壁菌门水平平均降低,差异虽无统计学意义,但提示 AKK 在一定程度上恢复了各干预组小鼠在拟杆菌门和厚壁菌门水平上的相对丰度。

在属水平上,如图 5 (b),E 组乳杆菌属(*Lactobacillus*)水平显著高于 F 组( $P < 0.05$ );与 E 组比较,各干预组乳杆菌属水平平均降低,接近 F 组的水平。

在种水平上,如图 5(c),与 F 组比较,E 组鼠乳杆菌 (*Lactobacillus murinus*) 水平显著升高 ( $P < 0.001$ ),*Alistipes inops* 水平和肠乳杆菌 (*Lactobacillus intestinalis*) 水平平均显著性降低 ( $P < 0.01$ )。与 E 组比较,各干预组鼠乳杆菌水平平均降低,除 D 组外均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );各干预组 *Alistipes inops* 水平和肠乳杆菌水平平均升高,仅有肠乳杆菌水平差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),提示 AKK 干预在一定程度上恢复了 AD 小鼠的菌群结构。





注:图(a)门水平的相对丰度,图(b)属水平的相对丰度,图(c)种水平的相对丰度;A 为高剂量活菌组,B 为低剂量活菌组,C 为高剂量灭活组, D 为低剂量灭活组,E 为模型对照组,F 为空白对照组。

图 5 各组小鼠菌群不同水平的相对丰度

Figure 5 Relative abundance of different levels of mouse colonies in each group

### 3 讨论

已有研究表明用 DNCB 诱导 BALB/c 小鼠构建的 AD 模型与人类 AD 具有相似的免疫现象,其可作为探究 AD 治疗策略的动物模型<sup>[23]</sup>。本研究通过构建 AD 小鼠模型,研究不同剂量 AKK 活菌和灭活菌对 AD 症状的影响。与空白组比较,AD 小鼠背部出现明显的红斑、表皮脱落等典型症状,脾脏增大,皮肤病理组织明显增生,表明 AD 模型构建成功。但经过 AKK 干预后,上述症状和指标并未明显改变,与模型组差异不大,各干预组间也并未出现明显差异。说明本研究中 AKK 改善 AD 小鼠皮肤炎症的效果并不明显。而 Jeong 等人<sup>[24]</sup>用 DNCB 构建雄性 NC/Nga 小鼠 AD 模型,使用乳酸片球菌(PA)灌胃干预 5 周,结果显示 AD 小鼠的皮肤损伤和病理组织炎症得到改善。由于本文干预时间较短,使用的动物品系和性别也不同,因此还不能直接判定 AKK 对调节 AD 没有益处,需更多研究继续探讨 AKK 在 AD 免疫调节方面的作用。

在 AD 的发病机制中,急性期主要由 Th2 细胞介导免疫反应,随着慢性病变的出现转为 Th1 细胞介导,但仍以 Th2 免疫反应为主<sup>[25-26]</sup>。Th2 细胞主要产生 IL-4,与 IL-5 和 IL-13 共同参与 IgE 的合成,Th1 细胞主要产生 IFN- $\gamma$ ,在特异性发育中具有拮抗 Th2 细胞的作用<sup>[7,27]</sup>。血清总 IgE 水平升高是 AD 的一个主要标志,大约有 80% 的 AD 患者血清总 IgE 水平升高<sup>[28]</sup>。IFN- $\gamma$  是调节 Th1/Th2 平衡的重要细胞因子,可促进由 Th1 细胞介导的免疫反应发生<sup>[26]</sup>。为了评估 AKK 的免疫调节作用,本研究测定了 AKK 干预后 AD 小

鼠血清 IgE 水平、IL-4 与 IFN- $\gamma$  转录水平和蛋白水平的变化。结果显示,模型组中血清 IgE、IL-4(转录与蛋白)水平均显著高于对照组,IFN- $\gamma$ (转录与蛋白)水平降低。经过 AKK 干预后,各组小鼠 IgE 水平并未降低,甚至高于模型组,推测可能是干预之后增强了小鼠体内的免疫应答反应。IL-4 水平除低剂量活菌干预组的转录水平外均降低。IFN- $\gamma$ (转录与蛋白)水平仅有低剂量活菌组和高剂量灭活组升高。Lee 等人<sup>[29]</sup>用 DNCB 构建雄性 NC/Nga 小鼠 AD 模型,首次使用 AKK 菌株进行灌胃干预 6 周,结果显示,AKK 菌株 EBAMDK19 与 ATCC BAA-835(与 DSM 22959 属于同一株)均能有效缓解 AD 小鼠的皮肤炎症情况和降低血清 IgE 水平,改善了 Th1/Th2 免疫反应之间的不平衡,但 EBAMDK19 效果优于 ATCC BAA-835,提示可能存在菌株特异性。本研究与他们的结果并不完全一致,推测可能有以下原因。一是黏蛋白附着于肠上皮细胞表面,有助于构建上皮保护屏障<sup>[30]</sup>。AKK 粘附于肠上皮细胞上,通过降解黏蛋白获得能量并可加强肠细胞单层的完整性,保护肠道屏障<sup>[16,31]</sup>。但有研究表明,当 AKK 过度降解黏蛋白时,肠道屏障的完整性会降低,导致胃肠道对过敏蛋白的摄入增加,从而加剧机体免疫反应<sup>[32-33]</sup>。同时有研究表明,益生菌至少给药 8 周才能有效改善 AD 严重程度的评分<sup>[34]</sup>。因此要更加关注 AKK 干预剂量和干预时间的影响。二是 Wakabayashi 等人<sup>[35]</sup>研究表明,不同菌株对改善 NC/Nga 小鼠 AD 样病变具有免疫调节差异,因此菌株特异性也可能是原因之一。除此之外,推测小鼠品系、性别、造模过程及菌株的培养条件与处理方式也是可能的原因。

AD 的发展与肠道菌群多样性和组成变化密切相关,与健康对照组比较,AD 患者的  $\alpha$  多样性降低,肠道菌群组成之间存在差异<sup>[36-38]</sup>。肠道微生物群优势菌门主要包括厚壁菌门与拟杆菌门,其比值增加与多种代谢疾病相关<sup>[39]</sup>。本研究结果显示,经过 AKK 干预后,AD 小鼠的肠道菌群多样性能在一定程度上升高,厚壁菌门/拟杆菌门水平降低,属水平和种水平上的优势菌群相对丰度均趋向空白对照组水平。这与 Bian 等人<sup>[40]</sup>使用 AKK 干预结肠炎小鼠和 Xie 等人<sup>[41]</sup>使用银耳多糖干预 AD 小鼠得到的结果一致。提示 AKK 能够调节 AD 小鼠肠道菌群的多样性和菌群组成。其机制可能是肠道菌群的代谢物会激活宿主免疫细胞,增加抗炎免疫反应,以缓解 AD 的症状<sup>[42]</sup>。

综上所述,本研究使用 AKK 干预 AD 小鼠虽未得到与预期完全一致的结果,但也能说明 AKK 在一定程度上能缓解 AD 小鼠体内的炎症反应,并调节了 AD 小鼠肠道菌群的多样性与组成。但由于本研究测定的炎症因子种类不够全面,不能很好的说明 AKK 对 AD 炎症的免疫调节作用,需要更多的证据进一步探索 AKK 对 AD 的作用,为预防和治疗 AD 及 AKK 作为益生菌的开发提供新策略。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

## 参考文献

- [ 1 ] Langan SM, Irvine AD, Weidinger S. Atopic dermatitis [J]. *Lancet*, 2020, 396(10247): 345-360.
- [ 2 ] Kim JP, Chao LX, Simpson EL, et al. Persistence of atopic dermatitis (AD): A systematic review and meta-analysis [J]. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2016, 75(4): 681-687.e11.
- [ 3 ] Sacotte R, Silverberg JI. Epidemiology of adult atopic dermatitis[J]. *Clinics in Dermatology*, 2018, 36(5): 595-605.
- [ 4 ] Silverberg JI, Gelfand JM, Margolis DJ, et al. Patient burden and quality of Life in atopic dermatitis in US adults: A population-based cross-sectional study [J]. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 2018, 121(3): 340-347.
- [ 5 ] Sroka-Tomaszewska J, Trzeciak M. Molecular mechanisms of atopic dermatitis pathogenesis [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(8): 4130.
- [ 6 ] Huidrom S. Therapeutic approach of probiotics in children with atopic dermatitis[J]. *Anti-inflammatory & Anti-allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 2021, 20(1): 2-9.
- [ 7 ] Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2)[J]. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 2000, 85(1): 9-18; quiz 18, 21.
- [ 8 ] Frazier W, Bhardwaj N. Atopic dermatitis: diagnosis and treatment [J]. *American Family Physician*, 2020, 101(10): 590-598.
- [ 9 ] O'neill CA, Monteleone G, McLaughlin JT, et al. The gut-skin axis in health and disease: A paradigm with therapeutic implications [J]. *BioEssays*, 2016, 38(11): 1167-1176.
- [ 10 ] Schoeler M, Caesar R. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism [J]. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 2019, 20(4): 461-472.
- [ 11 ] Ni JJ, Xu Q, Yan SS, et al. Gut microbiota and psychiatric disorders: a Two-Sample mendelian randomization study [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 737197.
- [ 12 ] Alam MJ, Xie L, Yap YA, et al. Manipulating microbiota to treat atopic dermatitis: functions and therapies[J]. *Pathogens*, 2022, 11(6): 642.
- [ 13 ] Kim SK, Guevarra RB, Kim YT, et al. Role of probiotics in human gut Microbiome-Associated diseases [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(9): 1335-1340.
- [ 14 ] Tan-Lim CSC, Esteban-Ipac NAR, Recto MST, et al. Comparative effectiveness of probiotic strains on the prevention of pediatric atopic dermatitis: A systematic review and network meta-analysis[J]. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2021, 32(6): 1255-1270.
- [ 15 ] Fang ZF, Lu WW, Zhao JA, et al. Probiotics modulate the gut microbiota composition and immune responses in patients with atopic dermatitis: a pilot study [J]. *European Journal of Nutrition*, 2020, 59(5): 2119-2130.
- [ 16 ] Derrien M, Vaughan EE, Plugge CM, et al. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(Pt 5): 1469-1476.
- [ 17 ] 万仁辉, 翟晓, 鲁瑾, 等. 嗜黏蛋白阿克曼菌与肥胖的关系[J]. *第二军医大学学报*, 2019, 40(2): 203-208.  
Wan RH, Zhai X, Lu J, et al. Relationship between *Akkermansia muciniphila* and obesity [J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2019, 40(2): 203-208.
- [ 18 ] Zhang T, Li P, Wu X, et al. Alterations of *Akkermansia muciniphila* in the inflammatory bowel disease patients with washed microbiota transplantation [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(23): 10203-10215.
- [ 19 ] Zhang L, Qin QQ, Liu MN, et al. *Akkermansia muciniphila* can reduce the damage of gluco/lipotoxicity, oxidative stress and inflammation, and normalize intestine microbiota in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Pathogens and Disease*, 2018, 76(4): fty028.
- [ 20 ] Cani PD, Depommier C, Derrien M, et al. *Akkermansia muciniphila*: paradigm for next-generation beneficial microorganisms [J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2022, 19(10): 625-637.
- [ 21 ] Effendi RMRA, Anshory M, Kalim H, et al. *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* in Immune-Related Diseases [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(12): 2382.
- [ 22 ] Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2005, 5(8): 606-616.
- [ 23 ] Kim JY, Lee JH, Shin SJ, et al. Molecular mechanism of atopic dermatitis induction following sensitization and challenge with 2,4-Dinitrochlorobenzene in mouse skin tissue [J]. *Toxicol Res*, 2018, 34(1): 7-12.
- [ 24 ] Jeong DY, Ryu MS, Yang HJ, et al. *Pediococcus acidilactici* intake decreases the clinical severity of atopic dermatitis along with increasing mucin production and improving the gut microbiome in Nc/Nga mice [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapie*, 2020, 129: 110488.
- [ 25 ] Leung DYM. Atopic dermatitis: New insights and opportunities for therapeutic intervention[J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunol-*

- ogy, 2000, 105(5): 860–876.
- [ 26 ] Asadullah K, Sterry W, Trefzer U. Cytokines: interleukin and interferon therapy in dermatology [J]. *Clinical and Experimental Dermatology*, 2002, 27(7): 578–584.
- [ 27 ] Herberth G, Heinrich J, R?der S, et al. Reduced IFN- $\gamma$  and enhanced IL-4-producing CD4+ cord blood T cells are associated with a higher risk for atopic dermatitis during the first 2 yr of Life [J]. *Pediatric Allergy and Immunology*, 2010, 21(1/Part I): 5–13.
- [ 28 ] Kasperkiewicz M, Schmidt E, Ludwig RJ, et al. Targeting IgE antibodies by immunoabsorption in atopic dermatitis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 254.
- [ 29 ] Lee Y, Byeon HR, Jang SY, et al. Oral administration of *Faecalibacterium prausnitzii* and *Akkermansia muciniphila* strains from humans improves atopic dermatitis symptoms in DNCB induced NC/Nga mice[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 7324.
- [ 30 ] Hansson GC. Mucins and the microbiome[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2020, 89(1): 769–793.
- [ 31 ] Reunanen J, Kainulainen V, Huuskonen L, et al. *Akkermansia muciniphila* Adheres to Enterocytes and Strengthens the Integrity of the Epithelial Cell Layer[J]. *Applied and Environment Microbiology*, 2015, 81(11): 3655–3662.
- [ 32 ] Wang Q, Huang SQ, Li CQ, et al. *Akkermansia muciniphila* May Determine Chondroitin Sulfate Ameliorating or Aggravating Osteoarthritis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1955.
- [ 33 ] Sonoyama K, Ogasawara T, Goto H, et al. Comparison of gut microbiota and allergic reactions in BALB/c mice fed different cultivars of rice[J]. *British Journal of Nutrition*, 2010, 103(2): 218–226.
- [ 34 ] Rusu E, Enache G, Cursaru R, et al. Prebiotics and probiotics in atopic dermatitis [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2019, 18(2): 926–931.
- [ 35 ] Wakabayashi H, Nariai C, Takemura F, et al. Dietary supplementation with lactic acid bacteria attenuates the development of atopic-dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice in a strain-dependent manner[J]. *International Archives of Allergy and Immunology*, 2008, 145(2): 141–151.
- [ 36 ] Fang ZF, Li LZ, Zhang H, et al. Gut microbiota, probiotics, and their interactions in prevention and treatment of atopic dermatitis: a review [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 720393.
- [ 37 ] Lopez-Santamarina A, Gonzalez EG, Lamas A, et al. Probiotics as a possible strategy for the prevention and treatment of allergies. a narrative review[J]. *FOODS*, 2021, 10(4): 701.
- [ 38 ] Ye SQ, Yan FG, Wang HY, et al. Diversity analysis of gut microbiota between healthy controls and those with atopic dermatitis in a Chinese population[J]. *Journal of Dermatology*, 2021, 48(2): 158–167.
- [ 39 ] Yanez CM, Hern?ndez AM, Sandoval AM, et al. Prevalence of blastocystis and its association with firmicutes/bacteroidetes ratio in clinically healthy and metabolically ill subjects [J]. *BMC Microbiology*, 2021, 21(1): 339.
- [ 40 ] Bian XY, Wu WR, Yang LY, et al. Administration of *akkermansia muciniphila* ameliorates dextran sulfate Sodium-Induced ulcerative colitis in mice[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2259.
- [ 41 ] Xie LN, Yang KY, Liang YH, et al. *Tremella fuciformis* polysaccharides alleviate induced atopic dermatitis in mice by regulating immune response and gut microbiota [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 944801.
- [ 42 ] O'hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ[J]. *EMBO Reports*, 2006, 7(7): 688–693.

收稿日期: 2023–08–26

读者·作者·编者

## 本刊对统计学符号的要求

按照 GB/T 3358.1~3-2009 《统计学术语》的有关规定, 统计学符号一律采用斜体排印。常用: (1) 样本的算术平均数用英文小写  $\bar{x}$  或 mean (中位数英文叙述中用  $M$  或 median); (2) 标准差用英文小写  $s$  或大写  $SD$  (限英文文献中); (3) 标准误用英文小写  $s_{\bar{x}}$  或大写  $SE$  (限英文文献中); (4)  $t$  检验用英文小写  $t$ ; (5)  $F$  检验用英文大写  $F$ ; (6) 卡方检验用希腊文小写  $\chi^2$ ; (7) 相关系数用英文小写  $r$ ; (8) 自由度用希腊文小写  $\nu$  或  $df$  (限英文文献中); (9) 概率用英文大写  $P$  ( $P$  值前应给出具体检验值, 如  $t$  值、 $\chi^2$  值、 $q$  值等)。