胶体二氧化硅对幼年小鼠肠道屏障和黏膜免疫的影响

张成宁[1], 姚思妤[1], 杨 龙[1], 万淳钰[1], 陈 英[2*], 张 强[1], 王学清[1*]

(1. 北京大学药学院, 北京 100191; 2. 广东省药品检验所, 广东 广州 510700)

摘要: 本研究旨在探究胶体二氧化硅纳米颗粒 Aerosil 200 (A200) 对幼年小鼠肠道屏障及黏膜免疫的影响。3 周龄 BALB/c 小鼠持续 1 周灌胃给予不同剂量 (20、50、200 mg·kg^{-1}) 的 A200, 综合评估其肠道形态、屏障功能、免疫细胞表型及口服耐受能力。肠道形态研究结果显示, 不同剂量 A200 未引起明显肠道病理损伤, 但 200 mg·kg^{-1} 剂量组导致回肠绒毛长度增加、隐窝深度降低。屏障功能研究结果表明, 200 mg·kg^{-1} 剂量组导致回肠 ZO-1 蛋白表达上调而结肠 ZO-1 下调; 不同剂量组肠道干细胞标志物 Lgr5 无显著变化, 200 mg·kg^{-1} 组回肠 Mucin-2 升高、lysozyme 减少。免疫细胞表型研究结果表明, 20、50 mg·kg^{-1} 组的肠系膜淋巴结的 Treg、Th2 细胞表型占比无明显变化, 200 mg·kg^{-1} 组 Treg 和 Th2 细胞比例增加, 但血清及回肠炎症因子 (TNF-α、IL-6) 水平未受影响。口服耐受实验结果表明, 不同剂量 A200 未改变 OVA 特异性 IgG、IgG1、IgG2a 抗体水平。所有动物实验经北京大学医学部实验动物科研伦理委员会审查 (批准号: BCJB0076), 符合实验动物伦理相关规范。综上, 3 种剂量 A200 对幼年小鼠肠道屏障及黏膜免疫总体安全, 但高剂量可能通过调节上皮屏障相关蛋白及免疫细胞表型产生潜在影响。这些结果为儿童用药安全性评估提供参考。

关键词: 儿童; 胶体二氧化硅; 肠道屏障; 肠道黏膜免疫; 口服耐受

中图分类号: R943 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)06-1901-10

Effects of colloidal silicon dioxide on intestinal barrier and mucosal immunity in childhood mice

ZHANG Cheng-ning[1], YAO Si-yu[1], YANG Long[1], WAN Chun-yu[1], CHEN Ying[2*], ZHANG Qiang[1], WANG Xue-qing[1*]

(*1. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China; 2. Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510700, China*)

Abstract: This study aimed to investigate the effects of colloidal silica nanoparticles Aerosil 200 (A200) on intestinal barrier and mucosal immunity in childhood mice. Three-week-old BALB/c mice were administered A200 (20, 50, 200 mg·kg^{-1}) *via* gavage for 7 days. Intestinal morphology, barrier function, immune cell phenotypes, and oral tolerance were systematically evaluated. Histopathological analysis of intestinal morphology revealed that no obvious pathological damage in the intestine. However, 200 mg·kg^{-1} A200 increased ileal villus length, reduced crypt depth. Functional assessments of the intestinal barrier demonstrated that 200 mg·kg^{-1} A200 upregulated ZO-1 in the ileum but downregulated it in the colon; The intestinal stem cell marker Lgr5 remained unchanged, while Mucin-2 increased and lysozyme decreased in the ileum. Analysis of immune cell phenotypes revealed that the 200 mg·kg^{-1} group exhibited elevated proportions of Treg and Th2 cells in the mesenteric lymph nodes, while serum and intestinal levels of TNF-α and IL-6 remained unaffected. Oral tolerance assays revealed no alteration in

收稿日期: 2025-03-01; 修回日期: 2025-04-23.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82473855); 广东省药品监督管理局科技创新项目 (2023ZDZ04).

*通讯作者 E-mail: wangxq@bjmu.edu.cn; gdidc_chenying@gd.gov.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0224

OVA-specific IgG, IgG1, or IgG2a antibody levels. Animal welfare and the animal experimental protocols were strictly consistent with related ethics regulations of Peking University Health Science Center (Approval No.: BCJB0076). In conclusion, A200 is generally safe for childhood mice but may modulate epithelial barrier proteins and immune cell phenotypes at high doses, which may provide insights into its pediatric application.

Key words: childhood; colloidal silica; intestinal barrier; mucosal immunity; oral tolerance

随着纳米颗粒在食品和药物制剂中的广泛应用, 其生物安全性也日益受到广泛关注。研究表明, 食品级的二氧化钛、二氧化硅纳米颗粒口服会导致小鼠肠道屏障黏液厚度减少, 引发黏液相关菌群紊乱, 产生炎症[1]、抑制小鼠口服耐受的诱导[2,3]。儿童的肠道屏障处于发育阶段, 儿童的绒毛高度、表面积及隐窝深度等形态学参数与成人有差别[4]。儿童的肠道通透性也高于成人, 且与年龄呈现负相关[5,6]。新生儿出生的最初几天, 肠上皮具有较高的通透性, 能够使初乳免疫球蛋白 (IgA 和 IgM) 易位, 在新生儿肠道具有免疫效果。在出生 72 h 后, 初乳中含有的生长因子会启动肠道闭合, 减低肠道通透性。儿童至成年期, 肠道通透性会进一步降低[5]。与成人相比, 儿童肠道相关淋巴组织的发育也尚未成熟。组织水平上, 儿童肠道中的派氏结的数量会随年龄增加, 并在青春期达到峰值, 随后会减少并趋于稳定[7]; 儿童小肠的独立淋巴滤泡含量也高于成人和老年时期[8]。细胞水平上, 儿童小肠的肠道淋巴组织中的幼稚性 T 细胞和 Treg 细胞的含量均高于成人时期[8]。这些差异均可能造成儿童对纳米颗粒的免疫应答与成人不同[9]。由于儿童临床、实验研究的特殊性, 口服纳米颗粒在儿童群体的相关表现缺乏系统研究, 口服纳米颗粒对儿童肠道屏障及黏膜免疫有什么影响尚不清楚。

胶体二氧化硅 Aerosil 200 (A200) 在药物制剂中应用广泛, 具有悬浮稳定剂、助流剂、增稠剂[10]等作用, 在口服混悬液或喷雾剂中能有效减少颗粒沉降, 提高稳定性。A200 是一种无孔、亲水性的气相二氧化硅, 比表面积为 200 $m^2 \cdot g^{-1}$, 单体颗粒的平均粒径为 12 nm。它通常以纳米级 (10～1 000 nm) 至微米级 (> 1 μm) 团聚体的形式存在[11]。有研究表明, 暴露于 A200 的斑马鱼胚胎中观察到中性粒细胞数量显著增加[12]; 也有研究表明, 每天口服 1 000 $mg \cdot kg^{-1}$ 的二氧化硅 NM-200 对大鼠的生殖性能和连续两代的子代生长发育无不良影响[13]。本课题组前期研究表明, 口服的 A200 能够穿过大鼠肠道上皮, 也能进入肠道派氏结, 并能增加小鼠血浆中炎性因子 TNF、MCP-1 的水平和 $CD4^+$ 淋巴细胞亚群的数量[14]。但目前对 A200 在儿童群体的生物安全性研究有限。故本研究以 A200 为研究对象, 探究其口服后对幼年小鼠肠道屏障和黏膜免疫的影响, 包括对肠道绒毛长度和隐窝深度、上皮屏障相关蛋白、肠道细胞增殖与分化相关蛋白、肠系膜淋巴结 (mesenteric lymph nodes, MLN) T 细胞表型、肠道炎症因子, 以及口服耐受的影响。

材料与方法

试剂 鸡卵清蛋白 (ovalbumin, OVA 上海源叶生物科技有限公司); 完全弗氏佐剂 (Sigma-Aldrich 公司); HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、含有 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂、BCA 蛋白定量检测试剂盒、RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂 (上海碧云天生物技术有限公司); HRP 标记的山羊抗小鼠 IgE 抗体 (SouthernBiotech 公司); Ghost Dye™ Violet 450 (TONBO Bioscience 公司); FITC anti-mouse CD45、APCCy7 anti-mouse CD3、PECy7 anti-mouse CD4、PE anti-mouse FOXP3、APC anti-mouse GATA-3、ELISA MAX Deluxe Set Mouse TNF-α 试剂盒、ELISA MAX Deluxe Set Mouse IL-6 试剂盒 (美国 BioLegend 公司); BV605 anti-mouse T-bet、BV786 anti-mouse Rorγ-t (BD Bioscience 公司); 破膜液 Permeabilization Buffer (10×, Invitrogen 公司); 4% 多聚甲醛 (武汉塞维尔生物科技有限公司)。

动物 3 周龄的雌性 BALB/c 小鼠购于北京大学医学部动物部。将小鼠在 SPF 条件下饲养, 自由获取标准啮齿动物食物和水。动物实验经北京大学医学部实验动物科研伦理委员会审查 (批准号: BCJB0076), 实验动物使用许可证号: SYXK (京) 2021-0064。

仪器 透射电子显微镜 (JEM 1200 EX, 日本电子公司); 扫描电子显微镜 (JSM-7900F, 日本电子公司); 纳米粒度及 Zeta 电位分析仪 (Malvern Zetasizer Nano-ZS, 英国马尔文公司); 自动脱蜡水化仪, 石蜡切片机, 自动脱蜡水化染色仪 (德国 Leica 公司); 数字病理切片扫描仪 (WS-10, 江苏智跃医疗科技有限公司); 六激光流式细胞仪 (Cytoflex LX, 美国贝克曼公司); 低温高速组织研磨仪 (KZ-III-F, 武汉塞维尔生物科技有限公司); Polaris 多光谱组织成像定量分析系统 (PerkinElmer Vectra Polaris, 美国珀金埃尔默公司)。

纳米粒的获取与表征 胶体二氧化硅纳米粒

Aerosil 200 Pharma (A200) 由 IMCD China (EVONIK) 公司赠送。将适量的A200粉末固定于双面导电胶上, 表面镀金后采用扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 观察A200固体颗粒的微观形态; 通过动态光散射法测定A200在水溶液中的流体动力学直径和表面电荷。为了探究A200在体外模拟胃肠道环境中粒径及形态的变化, 参考《中华人民共和国药典》所述配方配制人工胃、肠液。将纳米粒加入水、人工胃液和人工肠液中, 配置成2 mg·mL^{-1}的混悬液, 水浴超声15 min, 随后置于空气浴摇床中以37 ℃, 100 r·min^{-1}的条件振摇, 并分别于0、24 h取样测量粒径; 分别用水、人工胃液和人工肠液配置2、5、20 mg·mL^{-1}的混悬液, 在37 ℃, 100 r·min^{-1}的条件下孵育, 拍照0和24 h样品的外观图像, 随后振摇重悬A200混悬液并拍照, 并取24 h样品用透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 观察, 将样品冻干后用SEM观察。

A200对幼年小鼠肠道屏障的影响

给药方案及样本制备　0～5周龄小鼠相当于人类的0～12岁, 3周小鼠处于刚断乳阶段, 故本文以3周龄小鼠作为动物模型来模拟人类生长发育过程中的儿童阶段[15,16]。经FDA官网查询口服混悬剂中胶体二氧化硅辅料每日暴露量[17], 并在儿童与小鼠之间进行等效剂量系数折算, 得到小鼠的胶体二氧化硅常用剂量为10～50 mg·kg^{-1}。故本文选用20、50 mg·kg^{-1}代表制剂中的常用剂量, 200 mg·kg^{-1}代表高剂量, 考察A200对幼年小鼠安全性的影响。取3周龄的BALB/c小鼠, 随机分成4组, 每组3只, 分别灌胃给予不同剂量的A200 (20、50、200 mg·kg^{-1}) 和同等体积的水, 连续7天。第8天处死小鼠, 取出回肠和结肠, 分别剪下1～2 cm, 用注射器吸取PBS轻轻冲洗肠腔内容物2或3次, 将清洗好的肠段放入4%多聚甲醛中固定24 h, 过夜脱水后制备组织石蜡包埋块, 备用; 另外, 每只小鼠取50 mg左右回肠和结肠, 制备肠道组织蛋白裂解液, 备用。

苏木精−伊红 (hematoxylin-eosin, H&E) 染色、阿利新蓝染色　用石蜡切片机将组织包埋块切成5 μm的切片, 用自动脱蜡水化染色仪进行H&E染色和阿利新蓝染色, 用数字病理切片扫描仪进行切片扫描。

绒毛长度、隐窝深度测定　使用Nano Measurer 1.2软件统计H&E染色切片上的肠道绒毛长度、隐窝深度。每只小鼠选取3个不同的横切面视野, 对视野中竖直、完整的绒毛和隐窝进行长度和深度的统计分析, 每组含40～60个绒毛或隐窝。

肠道紧密连接相关蛋白ZO-1、E-cadherin的免疫荧光观察　取石蜡切片60 ℃烤片1 h, 使用自动脱蜡抗原修复仪进行抗原修复。在组织上滴加免疫染色封闭液并37 ℃孵育1 h; 封闭结束用PBS洗涤, 甩干后滴加一抗, 4 ℃避光孵育过夜, PBS洗涤3次, 滴加对应的二抗稀释液, 于37 ℃孵育1 h, 吸取抗体后用PBS洗涤4或5次, 用含有DAPI的抗荧光淬灭封片剂封片, 并使用Polaris多光谱组织成像定量分析系统进行切片扫描。每张照片平均分为4部分, 用ImageJ对每个区域进行平均荧光强度定量和统计。

肠道组织蛋白的Western blot检测　BCA蛋白定量检测试剂盒测定肠道组织蛋白裂解液中的蛋白浓度, 并调整样品的蛋白浓度相同, 加入适量SDS-PAGE蛋白上样缓冲液, 100 ℃水浴5 min。将每组3只小鼠的样品等比例混合, 上样20 μg蛋白量, 恒压电泳分离蛋白, 转膜, 5%脱脂牛奶封闭1 h, 一抗ZO-1、E-cadherin、Lgr5、lysozyme、Mucin-2、β-catenin、cleaved caspase-3、GAPDH, 4 ℃孵育过夜, 用TBST洗膜3次, 每次10 min, 二抗室温孵育2 h, 再次用TBST洗膜3次, 每次10 min, 随后发光显影。

A200对幼年小鼠肠道黏膜免疫的影响

给药方案及样本收集　取3周龄的BALB/c小鼠, 随机分成4组, 每组5只。分别灌胃给予不同剂量的A200 (20、50、200 mg·kg^{-1}) 和同等体积的水, 连续7天。第8天处死小鼠, 收集血清, 保存于−80 ℃冰箱, 备用; 收集回肠组织, 保存于液氮中, 备用; 收集MLN, 立即进行T细胞表型分析。

流式细胞术检测MLN中T细胞表型　使用玻璃匀浆器将MLN分散成单细胞, 经70 μm滤网过滤后收集单细胞悬液, 400 r·min^{-1}、4 ℃离心5 min, 弃去上清, 往细胞沉淀中加入1 mL的Ghost Dye™ Violet 450染料稀释液重悬, 冰上孵育30 min进行死活细胞染色, 孵育结束后用预冷的PBS洗涤细胞1次。每管细胞加入100 μL的FITC anti-mouse CD45、APCCy7 anti-mouse CD3、PECy7 anti-mouse CD4流式荧光抗体工作液, 冰上避光孵育20 min, 孵育结束后用预冷的PBS洗涤1次, 使用4%多聚甲醛室温孵育细胞20 min完成固定, 固定结束后用预冷的PBS洗涤1次。用细胞破膜液洗涤细胞4次, 加入100 μL的PE anti-mouse FOXP3、APC anti-mouse GATA-3、BV605 anti-mouse T-bet、BV786 anti-mouse Rorγ-t流式荧光抗体工作液, 冰上孵育25 min, 洗涤1次。将细胞通过300目细胞筛网过滤入流式管, 并使用流式细胞仪分析不同表型T细胞的比例。

血清和回肠组织炎症细胞因子水平检测　取液氮中保存的回肠组织50 mg置于组织研磨管中, 加入2 mL组织裂解液 (RIPA裂解液/蛋白酶抑制剂/磷酸酶抑制

剂 50∶1∶1), 用低温高速组织研磨仪以 70 Hz、−10 ℃、10 min 的条件充分研磨组织, 研磨结束后以 12 000 r·min^{-1}、4 ℃、10 min 的条件离心, 离心结束后, 轻轻吸取上清液到 1.5 mL EP 管中, 即为回肠组织裂解液。用 TNF-α 的 ELISA 试剂盒、IL-6 的 ELISA 试剂盒对血清中 TNF-α、回肠组织裂解液中的 TNF-α 和 IL-6 进行检测。

A200 对幼年小鼠口服耐受的影响

给药方案与样本收集　取 3 周龄的 BALB/c 小鼠, 随机分成 5 组, 每组 5 至 6 只, 分别为: ① 未诱导口服耐受组 (PBS)、② 诱导口服耐受组 (blank), 及③～⑤灌胃 7 天 A200 后诱导口服耐受组 (20、50、200 mg·kg^{-1})。

不同剂量的 A200 组分别灌胃给予 20、50、200 mg·kg^{-1} 的 A200, PBS 和 blank 组灌胃同等体积的纯水, 连续 7 天。第 8 天小鼠灌胃给予含有 25 mg OVA 的 PBS 溶液 200 μL 诱导口服耐受, 未诱导口服耐受组灌胃同等体积的 PBS 作为对照; 第 15 天, 所有小鼠尾基部皮下注射含有 100 μg OVA 的完全弗氏佐剂−抗原乳液, 刺激小鼠特异性免疫反应; 皮下免疫 21 天后处死小鼠, 收集血清, −80 ℃下保存, 备用。

血清 OVA 特异性抗体水平检测　使用 ELISA 测定血清中 OVA 特异性抗体的水平, 方法如下: 取 96 孔平底聚苯乙烯板, 每孔加入含 10 μg·mL^{-1} OVA 的 $NaHCO_3$ 缓冲液 (0.05 mol·L^{-1}, pH 9.6) 100 μL, 4 ℃下包被过夜。用 0.05% (*v*/*v*) Tween-20 PBS 溶液洗涤, 然后用 2% BSA PBS 溶液在 37 ℃封闭 2 h。洗涤后, 加入血清样品稀释液 100 μL, 37 ℃孵育 2 h。洗涤 4 次, 向每孔中加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、IgG1 或 IgG2a 抗体 (1/2 000) 100 μL, 并在 37 ℃下孵育 1 h。洗涤 5 次, 加入 TMB 溶液 100 μL 进行显色反应。15 min 后, 加入 2 mol·L^{-1} H_2SO_4 100 μL 中断反应, 并使用酶标仪在 450 nm 处读取吸光度 (OD) 值。

统计学方法　使用 GraphPad Prism 10.0 软件进行分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据采用非配对双尾 *t* 检验 (unpaired two-tailed Student's *t*-test) 和单因素方差分析 (one way ANOVA) 进行显著性分析。除另有说明外, $P < 0.05$ 表示具有显著性差异。

结果与讨论

1　A200 的表征

A200 的推荐使用浓度为 0.5%～3%, 可以确保药物在储存期间保持均匀分散, 使用时通过振摇快速恢复流动性, 符合儿童用药对剂型顺应性的要求。

将不同浓度的 A200 分散在纯水、人工胃液、人工肠液中, 所得纳米混悬液均具有淡蓝色乳光。孵育 24 h 后均有一定的沉降, 且浓度越低沉降越明显 (图 1A)。通过振摇, 在纯水、人工胃液中沉降的 A200 可以重新分散, 与 0 h 状态类似, 而人工肠液沉降的 A200 虽然会有一些颗粒聚集, 但仍处于混悬分散状态 (图 1A)。以上结果验证了 A200 的助悬效果, 可以在使用时通过振摇快速均匀分散和恢复流动性。

动态光散射法测定粒径和电位结果表明, A200 在纯水中粒径为 240 nm 左右, 带负电, 孵育 24 h 后粒径无明显变化; A200 在 SGF、SIF 中都有一定的聚集, 粒

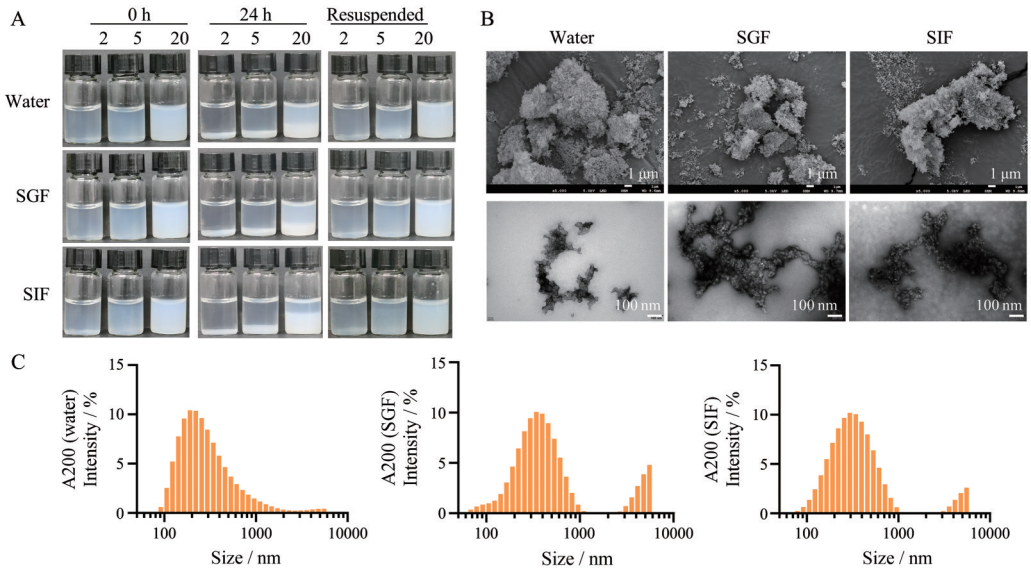


Figure 1　Characterization of A200. A: Appearance and 24 h sedimentation behavior of A200 at concentrations of 2, 5 and 20 mg·mL^{-1} in water, SGF and SIF; B: Scanning electron microscope (SEM, upper) and transmission electron microscope (TEM, bottom) images of A200 in different media; C: Particle size distribution of A200 in different media. SGF: Simulated gastric fluid; SIF: Simulated intestinal fluid

径增大为364和318 nm, 孵育24 h后分别变为528和306 nm (表1, 图1C)。扫描电镜结果显示, 在纯水、人工胃液、人工肠液中孵育24 h后A200混悬液的冻干产物颗粒形态类似, 是纳米粒的团状集合 (图1B); 透射电镜结果也表明在这3种介质中, A200颗粒呈现出相似的不规则的聚集体状态 (图1B)。以上结果均说明A200在不同介质中的形态和颗粒状态稳定, 有利于其在药物制剂中发挥其功能。

Table 1 Particle size of A200 after incubated in water, SGF, and SIF for 0 and 24 h. PDI: Polymer dispersity index

Time /h	Dispersion medium	Particle size /nm	PDI	Zeta potential /mV
0	Water	240.0 ± 4.3	0.239 ± 0.004	−22.6 ± 0.71
	SGF	364.4 ± 22.7	0.463 ± 0.071	0.068 ± 0.40
	SIF	318.1 ± 13.3	0.376 ± 0.048	−19.0 ± 1.80
24	Water	220.4 ± 3.2	0.186 ± 0.018	−19.5 ± 0.15
	SGF	528.1 ± 15.3	0.417 ± 0.048	1.25 ± 0.95
	SIF	306.5 ± 4.7	0.256 ± 0.013	−17.0 ± 1.28

2 A200对幼年小鼠肠道上皮屏障的影响

人类肠道每日都接受大量的微生物和食物外来抗原, 肠道免疫系统稳态下能够对有益微生物做出适当的反应, 同时针对入侵病原体产生主动免疫。肠道稳态的破坏会导致炎症性肠病[18]。肠道屏障由黏液层、上皮细胞、紧密连接蛋白及免疫细胞等组成, 是抵御病原体和毒素入侵的关键防线[19]。本部分重点考察了A200对幼年小鼠肠道上皮屏障的影响。

2.1 肠道黏膜宏观观察 3周龄小鼠持续1周灌胃A200, 其肠道H&E染色、阿利新蓝染色结果显示, 不同剂量的A200组小鼠肠道没有绒毛倒伏、细胞浸润、炎症反应等实质性损伤 (图2A); 肠道黏液、杯状细胞没有明显变化 (图2B), 说明不同剂量的A200对小鼠肠道没有造成宏观上的病理损伤。

2.2 肠道绒毛长度、隐窝深度测定 肠道绒毛长度、隐窝深度统计结果显示, 与对照组相比, 20、200 mg·kg^{-1}组的回肠绒毛长度升高, 50 mg·kg^{-1}组无显著性差异 (图2C); 200 mg·kg^{-1}组回肠隐窝深度降低, 20、50 mg·kg^{-1}组没有显著性变化; 3个剂量组结肠隐窝深度均降低, 以上结果说明大剂量的A200会对幼年小鼠的肠道绒毛长度、隐窝深度产生一定的影响。肠道上皮细胞是肠道干细胞不断增殖和分化完成更新的, 绒毛的长度、面积、绒毛长度/隐窝深度等指数与营养吸收和肠道健康高度相关[20]; Yu等[21]研究发现PS NPs联合暴露能够增强DEHP对小鼠的肠道损伤, 引起肠道绒毛长度减少、隐窝

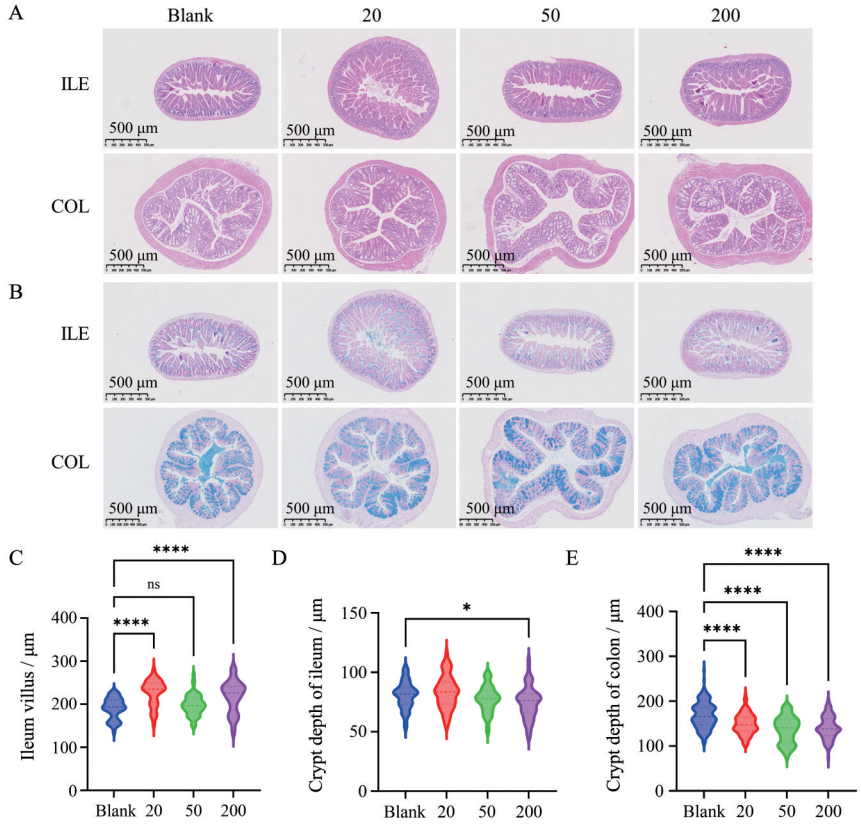


Figure 2 Effects of A200 on morphology, villi and crypts of ileum and colon. A, B: H&E and Alcian blue staining of the ileum and colon; C−E: Villus length, crypt depth of ileum and crypt depth of colon (n = 40−60) after one week of A200 gavage at the dose 20, 50, 200 mg·kg^{-1}, respectively. $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{****}P < 0.000\ 1$. ns: No significance; ILE: Ileum; COL: Colon

深度增加、黏液覆盖减少、Mucin-2表达水平下调等。大剂量的A200能够造成绒毛长度增加, 隐窝深度降低, 说明大剂量的A200对肠道屏障具有一定的影响。

2.3 肠道紧密连接和黏着连接的变化 免疫荧光法和Western blot法考察紧密连接关键蛋白ZO-1和黏着连接关键蛋白E-cadherin的变化。免疫荧光染色结果显示 (图3A), 不同剂量组的回肠、结肠组织中的ZO-1、E-cadherin的免疫荧光染色与对照组没有显著性差异, 但200 mg·kg^{-1}组回肠的ZO-1平均荧光强度存在一定上升的趋势; 肠道组织Western blot结果表明 (图3B), 与blank组相比, 20和50 mg·kg^{-1}组ZO-1无明显改变, 但200 mg·kg^{-1}在回肠略有增加、在结肠中略有降低, E-cadherin在3个剂量组没有明显差别。肠道上皮屏障对肠道稳态健康至关重要, 紧密连接蛋白ZO-1是上皮机械屏障的重要组成部分, 可以维持正常的细胞旁通透性, 防止大分子有毒物质侵入人体[22]。E-cadherin是一种钙依赖型的细胞黏附蛋白, 调节细胞与细胞间黏附并维持上皮组织的结构和功能完整性, E-cadherin表达减少或异常会中断细胞间的联系, 从而使细胞能够迁移[23]。大剂量的A200能够造成幼年小鼠肠道中ZO-1蛋白在回肠中增加、结肠中降低, 说明大剂量的A200对上皮屏障有一定影响, 需要予以关注。

2.4 肠道细胞的增殖与分化 为了进一步检测A200对肠道细胞增殖与分化的影响, 通过Western blot检测肠道中肠道干细胞标志物Lgr5及lysozyme、Mucin-2、β-catenin、cleaved caspase-3等相关蛋白。结果如图4所示, 不同剂量的A200对Lgr5没有明显影响; 与对照组相比, 回肠中200 mg·kg^{-1}组的Mucin-2升高、不同剂量组的lysozyme蛋白都降低。肠上皮细胞是由肠道干细胞通过不断分裂分化完成更新的, Lgr5是肠道干细胞标志物[24], lysozyme、Mucin-2能显示潘氏细胞、杯状细胞的分泌状态和分化状态, 是肠道细胞为了应对细菌感染和炎症分泌的物质[25], β-catenin是Wnt通路

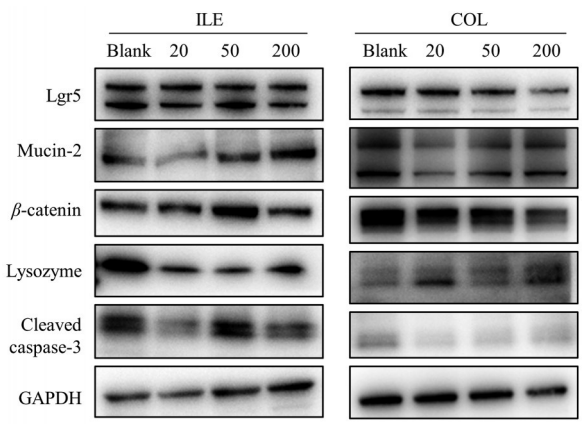


Figure 4 Effects of A200 on the proliferation and differentiation of intestinal epithelial cells in ileum and colon. Western blot of Lgr5, Mucin-2, β-catenin, lysozyme, and cleaved caspase-3 in the ileum and colon after one week of A200 gavage at the dose 20, 50, 200 mg·kg^{-1}, respectively

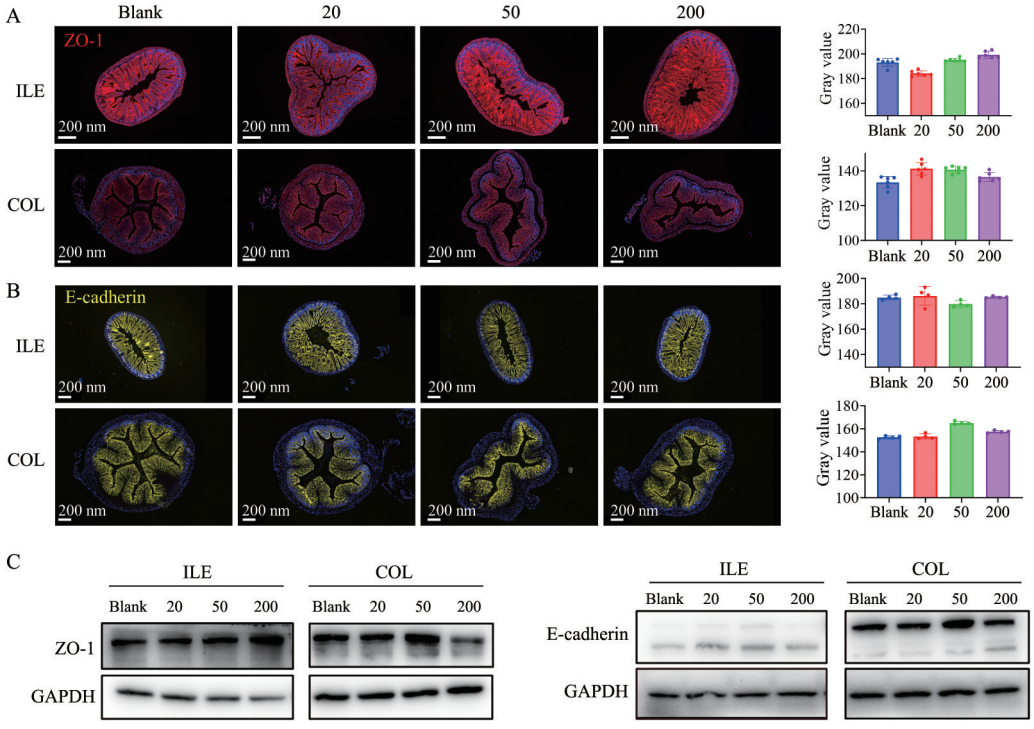


Figure 3 Effect of A200 on intestinal epithelium-related proteins in ileum and colon. Immunofluorescence staining (A, B) and Western blot (C) of ZO-1 and E-cadherin in the ileum and colon after one week of A200 gavage at the dose 20, 50, 200 mg·kg^{-1}, respectively

的重要信号分子[26], cleaved caspase-3 是细胞凋亡标志物[27]。以上结果说明, A200 对肠道干细胞的增殖没有明显影响, 但是可能对杯状细胞和潘氏细胞产生影响, 引起 Mucin-2 升高、lysozyme 减低, 引发这个现象的原因和机制仍有待研究。

总之, 以上结果说明不同剂量的 A200 对幼年小鼠肠道屏障没有造成明显的病理损伤, 但是大剂量的 A200 能够造成绒毛长度增加, 隐窝深度降低, 并使得回肠中 ZO-1 蛋白增加, 还造成回肠 Mucin-2 升高、lysozyme 减低, 可能对肠道屏障具有潜在的影响。

3 A200 对幼年小鼠 MLN 中 T 细胞表型和回肠炎症因子的影响

在肠道黏膜免疫系统中, 肠道引流 MLN 和肠道相关淋巴组织是肠道免疫的诱导位点; 肠道固有层和肠道上皮是肠道免疫系统的效应位点[18]。本部分重点考察了 A200 对幼年小鼠 MLN 中 T 细胞表型和回肠炎症因子的影响。

3.1 T 细胞表型的变化 为了探究 A200 对幼年小鼠的肠道黏膜免疫的影响, 给 3 周龄小鼠灌胃 1 周不同剂量的 A200 混悬液, 然后利用流式细胞术检测小鼠 MLN 中的 T 细胞表型 (Treg、Th1、Th2、Th17) 的变化。流式细胞术统计结果显示 (图 5A), 与 blank 组相比, 20、50 mg·kg^{-1} 组的 Treg、Th2 细胞表型占比没有明显变化, 200 mg·kg^{-1} 组 Treg、Th2 细胞表型占比增加; 不同剂量组的 Th1、Th17 细胞表型占比与 blank 组之间没有显著性差异, 但是都存在一定上升的趋势。MLN 是

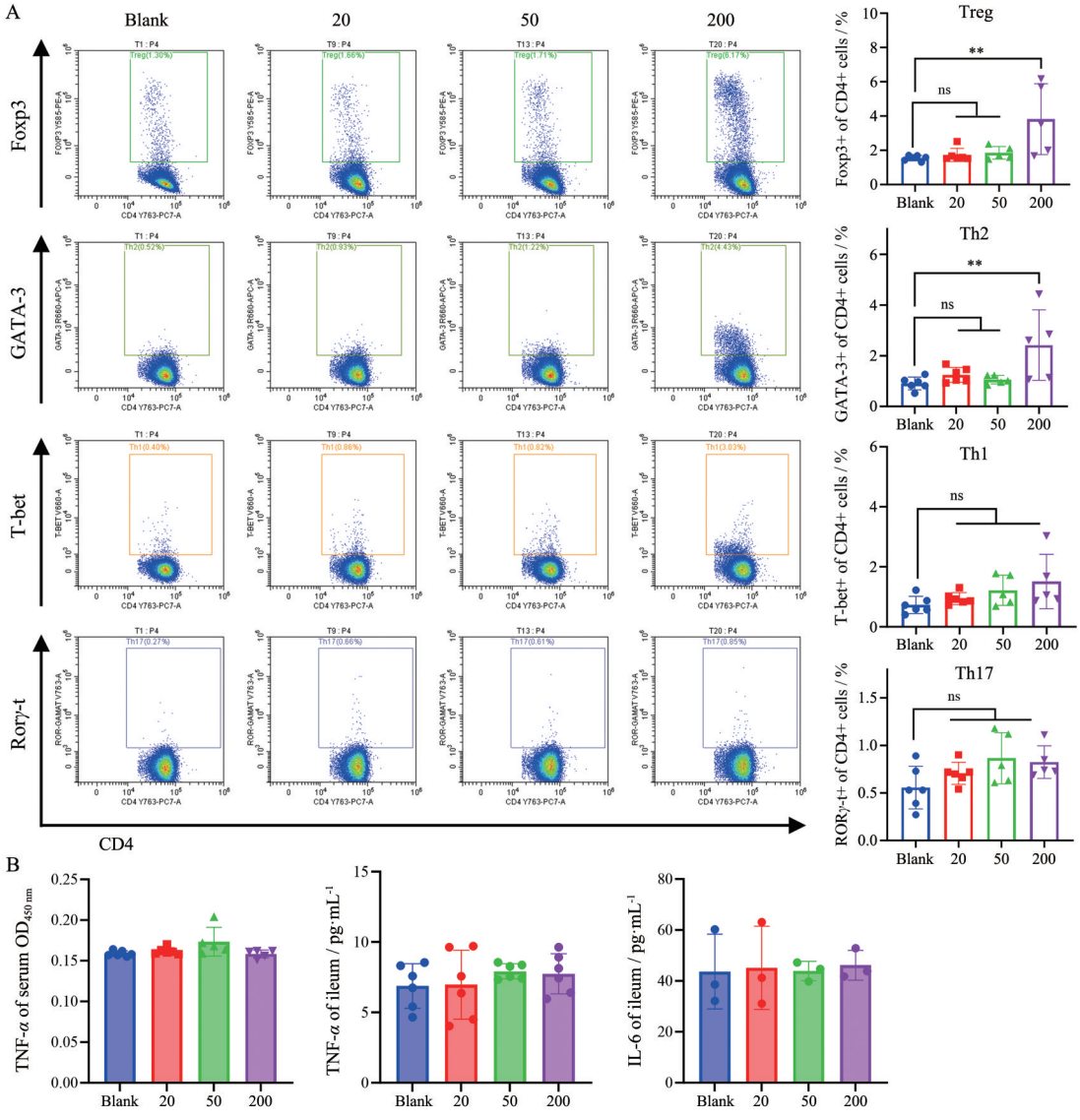


Figure 5 T cell phenotype of MLN and inflammatory factors of serum and ileum. A: Proportions of Treg, Th2, Th1 and Th17 cells among CD4$^+$ T cells in mesenteric lymph nodes (n = 5−6); B: Cytokine levels of TNF-α in serum and TNF-α, IL-6 in ileum after one week of A200 gavage at the dose 20, 50, 200 mg·kg^{-1}, respectively. n = 3−6, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$

肠道黏膜免疫系统的重要组成部分, 树突状细胞从肠腔中摄取可溶性抗原, 然后迁移到MLN, 并将抗原呈递给幼稚T细胞, 诱导调节性或促炎性$CD4^+$ T细胞亚群的分化[28]。大剂量的A200能够引起Treg、Th2细胞表型占比增加, Th1、Th17细胞表型也存在一定上升的趋势, 说明大剂量A200可能会促进MLN中幼稚性T细胞的激活, 并且偏向于免疫抑制性的反应。

3.2 炎症细胞因子的变化 血清和回肠炎症细胞因子水平检测结果 (图5B) 显示, 与blank组相比, 不同剂量组的血清TNF-α水平、回肠TNF-α水平、回肠IL-6水平都没有显著性差异。TNF-α具有促炎功能, 能够激活内皮细胞和免疫细胞, 诱导其他炎症因子 (如IL-1、IL-6) 释放, 促进T细胞激活, 在肠道免疫调控中具有重要的作用; IL-6也能够促进炎症反应和T细胞分化。不同剂量组对血清TNF-α, 肠道TNF-α、IL-6无明显影响, 说明A200没有引起幼年小鼠肠道黏膜免疫炎症反应。以上结果表明A200在幼年小鼠中是比较安全的, 虽然对肠道黏膜免疫有一定影响, 如引起MLN中Treg、Th2细胞的上调, 但并未引发明显的炎症反应。

4 A200对幼年小鼠的口服耐受的影响

口服耐受是口服无害抗原 (如食物蛋白) 后对该抗原产生的局部和全身免疫耐受状态。口服耐受与肠道炎症疾病、食物过敏等疾病密切相关。儿童口服耐受的诱导能够预防和治疗食物过敏, 对儿童健康安全十分重要[29]。因此本部分构建了幼年小鼠口服耐受模型用于探究A200对幼年小鼠口服耐受的影响。

按照图6A所示流程构建幼年小鼠的口服耐受模型, 在实验结束后检测血清中的OVA特异性IgG、IgG1、IgG2a抗体的水平。与PBS组相比, 灌胃大剂量OVA (25 mg) 以诱导口服耐受的blank组的血清OVA特异性IgG、IgG1显著降低, 说明口服耐受模型造模成功 (图6B)。血清抗体水平结果显示, 与blank组相比, 不同剂量的A200组小鼠血清中的OVA特异性IgG、IgG1、IgG2a都没有显著性差异 (图6B), 说明A200灌胃1周对肠道的相关影响并不会影响3周龄小鼠的口服耐受的诱导。口服耐受对肠道免疫稳态和肠道疾病都具有重要的作用, 能够预防肠道内存在的大量膳食和微生物抗原引起的炎症反应[30,31], 同时, 肠道中的免疫系统紊乱、肠道菌群紊乱也会导致口服耐受的受损[32]。3周龄小鼠灌胃1周A200后诱导口服耐受, 小鼠血清中的OVA特异性IgG、IgG1、IgG2a并没有明显变化, 说明A200对幼年小鼠的口服耐受没有明显影响, 在肠道黏膜免疫方面比较安全。

结论

本研究以胶体二氧化硅A200为对象探究了口服不同剂量的A200纳米颗粒对幼年小鼠肠道屏障和黏膜免疫的影响。结果显示, 不同剂量A200未引起明显肠道病理损伤, 但200 mg·kg^{-1}组导致回肠绒毛长度增加、隐窝深度降低, 回肠ZO-1蛋白表达上调而结肠ZO-1下调。肠道干细胞标志物Lgr5无显著变化, 但200 mg·kg^{-1}组回肠Mucin-2升高、lysozyme减少。MLN中, 20、50 mg·kg^{-1}组的Treg、Th2细胞表型占比无明显变化, 200 mg·kg^{-1}组Treg和Th2细胞比例增加, 血清及

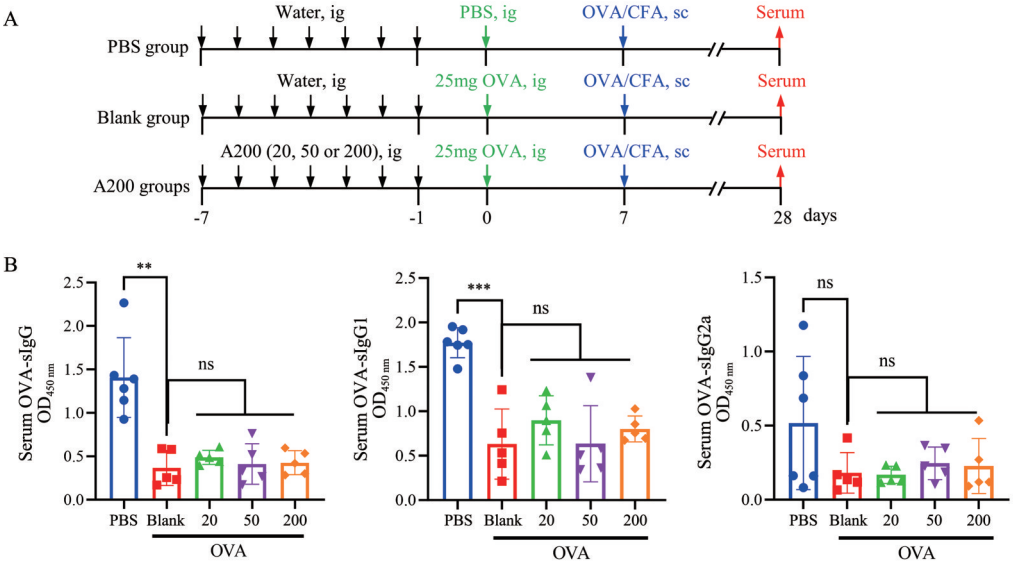


Figure 6 Effect of A200 on oral tolerance in mice. A: Scheme oral tolerance induction and the effects of A200 (20, 50, 200 mg·kg^{-1}) administered by gavage for one week on oral tolerance in 3 week mice; B: OVA-specific IgG, IgG1, and IgG2a in serum of oral toleranced mice. n = 5−6, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$

回肠炎症因子 (TNF-α、IL-6) 水平未受影响。口服耐受实验结果表明, 不同剂量A200未改变OVA特异性IgG、IgG1、IgG2a抗体水平, 对幼年小鼠的口服耐受无明显影响。综上, 3种剂量A200对幼年小鼠肠道屏障及黏膜免疫总体安全, 但高剂量可能通过调节上皮屏障相关蛋白及免疫细胞表型产生潜在影响, 需要予以关注。

作者贡献: 张成宁负责文献查阅、实验设计、实验操作、数据分析及论文撰写; 姚思妤、杨龙、万淳钰负责部分实验操作和样品采集; 王学清、陈英和张强负责课题设计、指导、论文修改审阅及研究经费支持。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Yan J, Wang DG, Li K, et al. Toxic effects of the food additives titanium dioxide and silica on the murine intestinal tract: mechanisms related to intestinal barrier dysfunction involved by gut microbiota [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2020, 80: 103485.

[2] Toda T, Yoshino S. Amorphous nanosilica particles block induction of oral tolerance in mice [J]. J Immunotoxicol, 2016, 13: 723-728.

[3] Lamas B, Chevalier L, Gaultier E, et al. The food additive titanium dioxide hinders intestinal production of TGF-β and IL-10 in mice, and long-term exposure in adults or from perinatal life blocks oral tolerance to ovalbumin [J]. Food Chem Toxicol, 2023, 179: 113974.

[4] Thompson FM, Catto-Smith AG, Moore D, et al. Epithelial growth of the small intestine in human infants [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1998, 26: 506-512.

[5] Van Elburg RM, Uil JJ, De Monchy JGR, et al. Intestinal permeability in pediatric gastroenterology [J]. Scand J Gastroenterol, 1992, 27: 19-24.

[6] Yin JT, Yang SH, Li CX, et al. The effect of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. on intestinal function and gut microbiota homeostasis in aging mice [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2022, 57: 3535-3545, 3450.

[7] Cornes JS. Number, size, and distribution of Peyer's patches in the human small intestine [J]. Gut, 1965, 6: 225-229.

[8] Senda T, Dogra P, Granot T, et al. Microanatomical dissection of human intestinal T-cell immunity reveals site-specific changes in gut-associated lymphoid tissues over life [J]. Mucosal Immunol, 2019, 12: 378-389.

[9] Tokuhara D, Hikita N. Cord blood-based approach to assess candidate vaccine adjuvants designed for neonates and infants [J]. Vaccines (Basel), 2021, 9: 95.

[10] Chen K, Zhang JA, Cui Y, et al. Study on the gelatinization of ligustrazine phosphate microemulsion and its transdermal characters [J]. J Logist Univ PAPF (Med Sci) (武警后勤学院学报医学版), 2015, 24: 18-20.

[11] Albertini B, Passerini N, González-Rodríguez ML, et al. Effect of Aerosil® on the properties of lipid controlled release microparticles [J]. J Control Release, 2004, 100: 233-246.

[12] Bragato C, Mazzotta R, Persico A, et al. Biocompatibility analysis of bio-based and synthetic silica nanoparticles during early zebrafish development [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25: 5530.

[13] Wolterbeek A, Oosterwijk T, Schneider S, et al. Oral two-generation reproduction toxicity study with NM-200 synthetic amorphous silica in Wistar rats [J]. Reprod Toxicol, 2015, 56: 147-154.

[14] Zhang Y, Chen XH, Zhao B, et al. Biosafety study and mechanism comparison on two types of silica with different nanostructures [J]. Toxicol Res (Camb), 2017, 6: 487-498.

[15] Dutta S, Sengupta P. Men and mice: relating their ages [J]. Life Sci, 2016, 152: 244-248.

[16] Barrow P. Toxicology testing for products intended for pediatric populations [M] // William KS, Richard S. Nonclinical Drug Safety Assessment: Practical Considerations for Successful Registration. Silver Spring: FDAnews, 2007: 411-440.

[17] Tng DJH, Low JGH. Current status of silica-based nanoparticles as therapeutics and its potential as therapies against viruses [J]. Antiviral Res, 2023, 210: 105488.

[18] Mörbe UM, Jørgensen PB, Fenton TM, et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function [J]. Mucosal Immunol, 2021, 14: 793-802.

[19] Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9: 799-809.

[20] Moor AE, Harnik Y, Ben-Moshe S, et al. Spatial reconstruction of single enterocytes uncovers broad zonation along the intestinal villus axis [J]. Cell, 2018, 175: 1156-1167.

[21] Yu ZY, Xia YY, Cheng SQ, et al. Polystyrene nanoparticles aggravate the adverse effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on different segments of intestine in mice [J]. Chemosphere, 2022, 305: 135324.

[22] Li L, Lü X, He J, et al. Chronic exposure to polystyrene nanoplastics induces intestinal mechanical and immune barrier dysfunction in mice [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2024, 269: 115749.

[23] van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin [J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65: 3756-3788.

[24] Capdevila C, Miller J, Cheng L, et al. Time-resolved fate mapping identifies the intestinal upper crypt zone as an origin of Lgr5+ crypt base columnar cells [J]. Cell, 2024, 187: 3039-3055.

[25] Li C, Zhou YN, Wei RZ, et al. Glycolytic regulation of intestinal stem cell self-renewal and differentiation [J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2023, 15: 931-947.

[26] Liu JQ, Xiao Q, Xiao JN, et al. Wnt/β-catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7: 3.

[27] Asadi M, Taghizadeh S, Kaviani E, et al. Caspase-3: structure,

function, and biotechnological aspects [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2022, 69: 1633-1645.

[28] Scott CL, Aumeunier AM, Mowat AM. Intestinal CD103^{+} dendritic cells: master regulators of tolerance? [J]. Trends Immunol, 2011, 32: 412-419.

[29] Peters RL, Dang TD, Allen KJ. Specific oral tolerance induction in childhood [J]. Pediatr Allergy Immunol, 2016, 27: 784-794.

[30] Mowat AM. To respond or not to respond — a personal perspective of intestinal tolerance [J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18: 405-415.

[31] Miranda-Waldetario MCG, Curotto de Lafaille MA. Oral tolerance to dietary antigens and Foxp3(+) regulatory T cells [J]. Immunol Rev, 2024, 326: 8-16.

[32] Fukaya T, Uto T, Mitoma S, et al. Gut dysbiosis promotes the breakdown of oral tolerance mediated through dysfunction of mucosal dendritic cells [J]. Cell Rep, 2023, 42: 112431.