

肠道菌群介导溃疡性结肠炎大鼠肠 CYP3A 和 P-糖蛋白的变化及机制

高雪姣^{1,2}, 李 婷^{1,2}, 魏 斌^{1,2}, 严志祥^{1,2}, 燕 茹^{1,2*}

(1. 澳门大学中华医药研究院, 中药质量研究国家重点实验室 (澳门大学), 澳门 999078;

2. 珠海澳大科技研究院, 广东 珠海 519080)

摘要: 肠道细胞色素 P450 3A (cytochrome P450 3A, CYP3A) 和 P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 是肠屏障的重要组成部分。炎症性肠病中肠 CYP3A 和 P-gp 下调伴随肠道菌群紊乱。但两者是否关联? 机制如何? 尚不清楚。本研究采用 5% 葡聚糖硫酸钠诱导大鼠溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC), 并对正常动物分别灌胃正常及 UC 动物粪便, 发现粪便移植改变了受体动物肠道菌组成, 而移植 UC 粪便组肠 CYP3A2 和 P-gp mRNA 的表达显著下调。外膜囊泡 (outer-membrane vesicles, OMVs) 是革兰阴性菌产生、进行群体行为及与环境通信的关键结构。不同处理组的 OMVs 均能下调人结肠腺癌细胞 Caco-2 中 CYP3A4 和 P-gp 的 mRNA 表达, 而 UC 组以及 UC 粪便处理组的 OMVs 的抑制作用更强, 且相对分子质量 3~5 万的 OMVs 组分的作用更显著。细胞经 toll 样受体 4 (toll like receptor 4, TLR4) 抑制剂瑞沙托维处理或转染 TLR4 siRNA 能够阻断 OMVs 对 CYP3A4 和 P-gp 的下调。本研究证实, UC 肠道菌部分通过分泌 OMVs 活化 TLR4 受体通路下调肠道 CYP3A 和 P-gp 表达。

关键词: 肠道菌群失衡; 粪菌移植; 外膜囊泡; 肠细胞色素 P450 3A; 肠 P-糖蛋白; toll 样受体 4

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 01-0034-10

Regulatory mechanisms of gut microbiota on intestinal CYP3A and P-glycoprotein in rats with dextran sulfate sodium-induced colitis

GAO Xue-jiao^{1,2}, LI Ting^{1,2}, WEI Bin^{1,2}, YAN Zhi-xiang^{1,2}, YAN Ru^{1,2*}

(1. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Macao 999078, China; 2. UM Zhuhai Research Institute, Zhuhai 519080, China)

Abstract: As important constituents of the first-line of host defense barrier, intestinal cytochrome P450 3A (CYP3A) and P-glycoprotein (P-gp) play important roles in disease pathogenesis as well as drug absorption and exposure. Clinical reports and experimental data revealed diminished intestinal CYP3A and P-gp expression accompanying with gut dysbiosis in inflammatory bowel disease. Yet whether gut dysbiosis is associated with the down-regulation of CYP3A and P-gp and the underlying mechanisms are unclear. In this study, daily administration of fresh feces from normal rats and rats with ulcerative colitis (UC) induced by dextran sulfate sodium to normal rats resulted in alterations of gut bacterial compositions. Intestinal CYP3A2 and P-gp were significantly down-regulated in rats receiving UC feces. Outer-membrane vesicles (OMVs) are nano-scale special buds of the outer membrane which are produced by Gram-negative bacteria and mediate diverse functions including interactions within bacterial communities and communications with host. Expressions of CYP3A4 and P-gp mRNA were diminished in human epithelial colorectal adenocarcinoma cells (Caco-2) treated by OMVs from all different groups with OMVs from UC rats or rats receiving UC feces showing more significant effects.

收稿日期: 2016-10-17; 修回日期: 2016-12-10.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473281); 973 基金资助项目 (2009CB522707); 澳门大学基金资助项目 (MYRG2015-00220).

*通讯作者 E-mail: ruyan@umac.mo

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1002

Moreover, the OMVs fractions within 30 000-50 000 Daltons from both normal and UC rats elicited more effects than fractions of other molecular weights. Treatment of Caco-2 cells with toll like receptor 4 (TLR4) inhibitor resatorvid (TAK-242) or TLR4 silence RNA (siRNA) blocked CYP3A4 and P-gp down-regulation induced by bacterial OMVs. Taken together, we proved in this study that gut microbiota can down-regulate intestinal CYP3A and P-gp partially through producing OMVs to activate the TLR4 signaling pathway.

Key words: gut dysbiosis; fecal microbiota transplantation; outer membrane vesicles; intestinal cytochrome P450 3A; intestinal P-glycoprotein; toll like receptor 4

阐明肠道菌群与宿主相互作用的方式、物质基础与信号机制是目前临床与基础医学、微生物学等领域共同关注的研究热点。已经知道, 肠道菌群是一个非常庞大、复杂、多样、持续动态变化的微生态系统。它与宿主通过底物的代谢交换与共代谢等方式相互作用, 深刻影响宿主代谢表型, 决定宿主的营养、健康和疾病状态^[1]。但是直到最近, 肠道菌群对宿主代谢、处置药物的影响才逐渐被关注和研究。

一些与肠道菌群失调密切相关的疾病, 如糖尿病、肥胖症和炎症性肠病, 同时伴随着药物代谢酶和转运蛋白表达和/或功能的改变^[2]。通过对无特定病原体 (SPF) 小鼠和无菌小鼠肝基因表达的对比分析, 发现了 112 个差异表达基因与药物代谢转运相关的核受体通路抑制功能相关^[3]。比较出生 1~90 天的正常幼鼠及无菌幼鼠的肝脏信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 转录组, 发现无菌小鼠中异源物代谢相关的基因下调最为明显^[4]。孕烷 X 受体 (pregnane X receptor, PXR) 是调控药物代谢酶及转运体表达和活性的一类重要的核受体。肠道菌产生的吡啶类成分是 PXR 的天然配体, 能够激活肠上皮细胞 PXR, 通过 toll 样受体 4 (toll like receptor 4, TLR4) 介导的信号通路, 调节靶基因表达, 增强肠屏障功能^[5]。这些报道为肠道菌群介导宿主药物代谢及转运系统的病理变化提供了间接证据。

肠道药物代谢酶和转运蛋白是肠屏障功能的重要组成部分。细胞色素 P450 3A (cytochrome P450 3A, CYP3A) 是一种重要的细胞色素 P450 酶亚型, 参与多种内源性和外源性物质的代谢, 在肠道和肝脏中含量丰富。CYP3A 的活性高低影响许多药物的疗效以及患者对药物毒性的反应。有研究表明, 多种 CYP 亚型在无菌小鼠体内表达降低, 但定植细菌一段时间后, CYP 亚型的表达不再降低, 有些亚型反而升高^[6]; 另外, 细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 也可以下调小鼠肝脏 CYP3A 的表达^[7]。作为肠道最主要的转运蛋白, P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 不仅影响许多药物的肠道吸收, 也参与体内多种有毒物质的

外排, 保护肠上皮细胞免受毒物或代谢废物的损害, 维持细胞内环境的稳定。研究数据表明, 因肠道菌群失衡而产生的多种物质均可影响 P-gp 的表达, 如细菌诱导肝癌细胞产生的胆汁酸可以直接抑制肝癌细胞 P-gp 的过度表达与活性^[8]; 细菌 LPS 下调大鼠 P-gp 活性与 mRNA 的表达^[9]。另一方面, 益生菌嗜酸乳杆菌 (*Lactobacilli acidophilus*) 或鼠李糖乳酸杆菌 (*L. rhamnosus*) 的体外培养上清能升高人结肠腺癌细胞 Caco-2 的 P-gp 表达及活性^[10]。由以上研究结果可以推测, 肠道菌群能够通过释放小分子、蛋白、肽类成分或其他成分调节 CYP3A 和 P-gp 的表达。但是, 肠道菌失调是否介导肠道 CYP3A 和 P-gp 的表达, 目前尚缺少直接证据, 其效应分子及具体作用机制也有待进一步研究。

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是以肠道菌群失衡和局部免疫失调为特征的慢性炎症性疾病。有研究证实, 革兰阴性菌的改变是引起结肠炎肠道菌群失衡的主要原因^[11]。外膜囊泡 (outer-membrane vesicles, OMVs) 是革兰阴性菌分泌的、介导菌群内部通讯以及和宿主传递信号的重要生物活性结构, 包括 DNA、RNA、细菌内毒素 (如 LPS)、外毒素或细菌蛋白衍生物 (如肠菌抗原) 等, 可以作用于宿主肠道和免疫细胞, 引起肠道黏膜损伤及炎症^[12]。研究表明, 绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的 OMVs 可直接与 TLR4 靶向结合, 诱导肺上皮细胞释放白介素-6 和白介素-1 β , 激活炎症^[13]; 脑膜炎球菌 (*Meningococcus*) 的 OMVs 可与 TLR4 结合, 触发树突状细胞的免疫应答^[14]; 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 的 OMVs 可通过 TLR4 激活核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 调控人微血管上皮细胞黏附因子的分泌^[15]。由此推断, TLR4 可能是 OMVs 产生生物学效应的主要靶点。

因此, 本研究以葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导大鼠 UC, 造成肠道菌群紊乱, 并通过给正常动物同步饲喂正常或 UC 大鼠粪便, 观察菌群移植对肠 CYP3A2 和 P-gp 的影响; 进一步通

过比较不同粪菌 OMVs 及 TLR4 通路阻断对肠上皮细胞 Caco-2 表达 CYP3A4 和 P-gp mRNA 的影响,初步探讨肠道菌 OMVs 调控肠道 CYP3A 及 P-gp 的分子机制。

材料与方法

主要实验试剂 葡聚糖硫酸钠 (Mr: 36 000~50 000) 购自美国 MP Biomedicals。细菌 DNA 抽提试剂盒、SYBR Premix Ex Taq PCR 试剂和引物均购自日本 TaKaRa 公司。Lipofectamine 2000、Trizol 和逆转录试剂盒购自 Thermo Fisher 公司。甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、阴性对照和 TLR4 的沉默 RNA (silence RNA, siRNA) 购自上海吉玛基因公司。瑞沙托维 (resatorvid, TAK-242) 购自美国 APEXBIO 公司。DMEM、胎牛血清和非必需氨基酸购自美国 Gibco 公司。

实验动物 24 只 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠, SPF 级, 体重 250~300 g, 由澳门大学实验动物中心提供。在室温 (20±2) °C, 湿度 (50±5) %, 12 h/12 h 昼夜交替条件下饲养。所有对动物的处理和操作均通过澳门大学动物伦理委员会的批准 (No.: UMAEC-2015-09)。

造模方法和样品采集 SD 大鼠按体重随机分为 4 组 ($n=6$)。正常组 (Nor) 大鼠给予去离子水 7 天, UC 组大鼠给予 5% DSS 溶液 7 天。每天收集来自 Nor 和 UC 组大鼠的粪便, 并按照 1 g 粪便: 10 mL 生理盐水的比例分别制备成粪便混悬液, 灌胃 (每公斤体重 1 g 粪便) 给予正常动物 (粪菌定植 NN 组, NU 组), 连续 7 天。DSS 需每天新鲜配制。每天新鲜收

集各组大鼠粪便样品, -80 °C 冻存, 用于菌组成检测。造模第 8 天, 动物颈椎脱臼处死, 收集十二指肠、空肠、回肠及结肠, 并清除肠道内容物, 用于后续检测。

细菌组成测定 取大鼠粪便样品组内等量混合, 按照文献所示方法^[16]制备肠道菌悬液 (0.1 g·mL⁻¹)。细菌总 DNA 的提取按照试剂盒说明书进行操作。所有 DNA 样品均设 3 个复孔, 使用 ABI 7500 PCR 基因扩增仪进行扩增。所测目标菌名称、相应引物及参考文献见表 1^[17-22]。该 PCR 反应体系为 50 μL, 包括: 1×SYBR Green Master Mix 26 μL, 引物各 1 μL (终浓度为 0.2 μmol·L⁻¹), DNA 4 μL, 灭菌水 18 μL。扩增及信号采集程序按照说明书进行设定, 并使用仪器自带软件按照 2^{-ΔΔCt} 方法进行数据分析。

细菌 OMVs 及不同组分的提取 按照上述方法处理第 7 天各组粪便样品, 获得粪便总菌, 并用 Luria-Bertani 肉汤培养基混悬菌体至 2 mg·mL⁻¹。37 °C 孵育 24 h 后, 6 000 ×g 离心 20 min 收集上清。上清经 0.45 μm 膜过滤后, 4 °C 及 150 000 ×g 条件下超高速离心 3 h^[23], 收集沉淀, 并测定蛋白浓度。

分别采用相对分子质量 3 000、10 000、30 000、50 000 的超滤膜, 参照超滤膜说明书所示的分离条件进行操作, 分离制备细菌 OMVs 不同组分。所得组分按照相对分子质量分为 5 组: 小于 3 000 (F<3)、3 000~10 000 (F3~10)、10 000~30 000 (F10~30)、30 000~50 000 (F30~50)、大于 >50 000 (F>50)。

Caco-2 细胞培养及处理 Caco-2 用含 10% 胎牛血清、1% 非必需氨基酸、100 u·mL⁻¹ 青霉素和链霉素的 DMEM 培养基于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养。

细胞于 6 孔板上长至融合时, 分别来自 4 组

Table 1 Primers for 16S rRNA genes of target bacteria

Target bacteria	Primer	Sequence (5'-3')	Reference
<i>Bifidobacterium</i>	Forward	CTCCTGGAACGGGTGG	[17]
	Reverse	GGTGTTCCTCCGATATCTACA	
<i>Enterobacteriaceae</i>	Forward	CATTGACGTTACCCGAGAAGAAGC	[18]
	Reverse	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	
<i>Bacteroides</i>	Forward	ATA GCC TTT CGA AAG RAA GAT	[19]
	Reverse	CCA GTA TCA ACT GCA ATT TTA	
<i>Lactobacillus</i>	Forward	TGGAAACAGTTGCTAATACCG	[20]
	Reverse	GTCCATTGTGGAAGATTCCC	
<i>Clostridium coccooides</i>	Forward	AAATGACGGTACCTGACTAA	[19]
	Reverse	CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA	
<i>Clostridium leptum</i>	Forward	GCACAAGCAGTGGAGT	[21]
	Reverse	CTTCCTCCGTTTTGTCAA	
Universal primer	341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	[22]
	534R	ATTACCGCGCTGCTGG	

大鼠的粪便菌 OMVs ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 或 OMVs 的不同相对分子质量组刺激细胞 24 h, 或用 TAK-242 ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) 预处理 1 h 后再加入来自正常和 UC 的 OMVs ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 孵育 24 h, 收集所有细胞用于基因扩增检测。

TLR4 siRNA 转染 选择与哺乳动物无同源性的序列和 GAPDH 基因序列分别作为 TLR4 siRNA 转染的阴性对照 (negative control, NC) 及阳性对照 (positive control, PC)。Caco-2 细胞培养至 40% 融合后, 用 Lipofectamine 2000 试剂将 $5 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ TLR4 siRNA、NC siRNA 及 PC siRNA 分别转染细胞并培养 48 h。运用 real-time quantitation PCR (QPCR) 方法检测 siRNA 转染前后阴性对照、GAPDH 及 TLR4 相对表达量的变化, 评估方法的可靠性以及 TLR4 沉默效率。TLR4 siRNA 转染序列分别如下: TLR4-770, 上游 5'-GCUCACAAUCUUAUCCAATT-3', 下游 5'-AUUGGAUAAGAUUGUGAGCTT-3'; TLR4-931, 上游 5'-CCUGAACCCUAUGAACUUUTT-3', 下游 5'-AAAGUUCAUAGGGUUCAGGTT-3'; TLR4-1240, 上游 5'-CCUGGUGAGUGUGACUAUUTT-3', 下游 5'-AAUAGUCACACUCACCAGGTT-3'; 阴性对照 siRNA 的转染序列为: 上游 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3', 下游 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'; 阳性对照 GAPDH siRNA 的转染序列为: 上游 5'-UGACCUC AACUACAUGGUUTT-3', 下游 5'-AACCAUGUAGUUGAGGUCATT-3'。

经转染的 Caco-2 细胞用来自正常和 UC 大鼠粪便的 OMVs ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 分别刺激 24 h, 按上述方法收集所有细胞用于基因扩增检测。

CYP3A 和 P-gp 在肠组织和细胞中的 mRNA 表达测定 将来自不同组大鼠的十二指肠、空肠、回

肠、结肠或不同方法处理的 Caco-2 细胞用 Trizol 试剂裂解, 并按照说明书提取 mRNA。根据逆转录试剂盒说明书操作得到互补 DNA (complementary DNA, cDNA)。所有 cDNA 样品均设 3 个复孔, 使用 ABI 7500 PCR 基因扩增仪进行扩增。采用的引物及参考文献见表 2^[24-27]。扩增及信号采集程序按照说明书进行设定, 并使用仪器自带软件按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行数据分析。

数据统计处理 所有数据均以 mean \pm SD 表示。结果的差异性分析通过 GraphPad Prism 6 软件及双侧 *t* 检验进行计算。 $P < 0.05$ 时认为结果具有显著性差异。

结果

1 DSS 诱导及粪便移植对大鼠粪便菌组成的影响

如图 1 所示, 实验期间, 正常组大鼠总菌量相对稳定, DSS 诱导的 UC 组及定植正常及 UC 粪菌组的总菌量较正常组没有明显改变。UC 组大鼠粪菌中双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、柔嫩梭菌 (*Clostridium leptum*) 和球形梭菌 (*Clostridium coccoides*) 的相对比例均持续减少, 而肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 和拟杆菌属 (*Bacteroides*) 的比例持续升高。定植正常大鼠的粪菌后, NN 组双歧杆菌属和乳杆菌属显著减少, 肠杆菌科和拟杆菌属没有明显变化, 优势菌属梭菌属, 尤其是球形梭菌比例明显升高。而定植 UC 粪菌的 NU 组, 双歧杆菌属和乳杆菌属明显减少, 实验后期肠杆菌科和拟杆菌属的比例增加, 但变化程度弱于 UC; 柔嫩梭菌和球形梭菌的变化趋势与 NN 组相似, 即两菌的比例均都接近或高于正常组。以上结果表明, DSS 诱导大鼠 UC, 引起肠道菌群失调, 定植正常及失调的粪菌后,

Table 2 Primers for target genes in human Caco-2 cells and rats. CYP3A2: Cytochrome P450 3A2; CYP3A4: Cytochrome P450 3A4; P-gp: P-Glycoprotein

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Reference
hCYP3A4	Forward	CCTTACATATACACACCCTTTGGAAG	[24]
	Reverse	GGTTGAAGAAGTCCTCCTAAGCT	
hP-gp	Forward	CCCATCATTGCAATAGCAGG	[24]
	Reverse	GTTCAAACCTCTGCTCCTGA	
h β -Actin	Forward	TACGCCAACACAGTGTGTCTGG	[24]
	Reverse	TACTCTGCTTGCTGATCCACAT	
rCYP3A2	Forward	AGTAGTGACGATTCCAACATAT	[25]
	Reverse	TCAGAGGTATCTGTGTTTCCT	
rP-gp	Forward	GCAGGTTGGCTGGACAGATT	[26]
	Reverse	GGAGCGCAATTCATGGATA	
r β -Actin	Forward	ATCGCTGACAGGATGCAGAA	[27]
	Reverse	TAGAGCCACCAATCCACACAG	

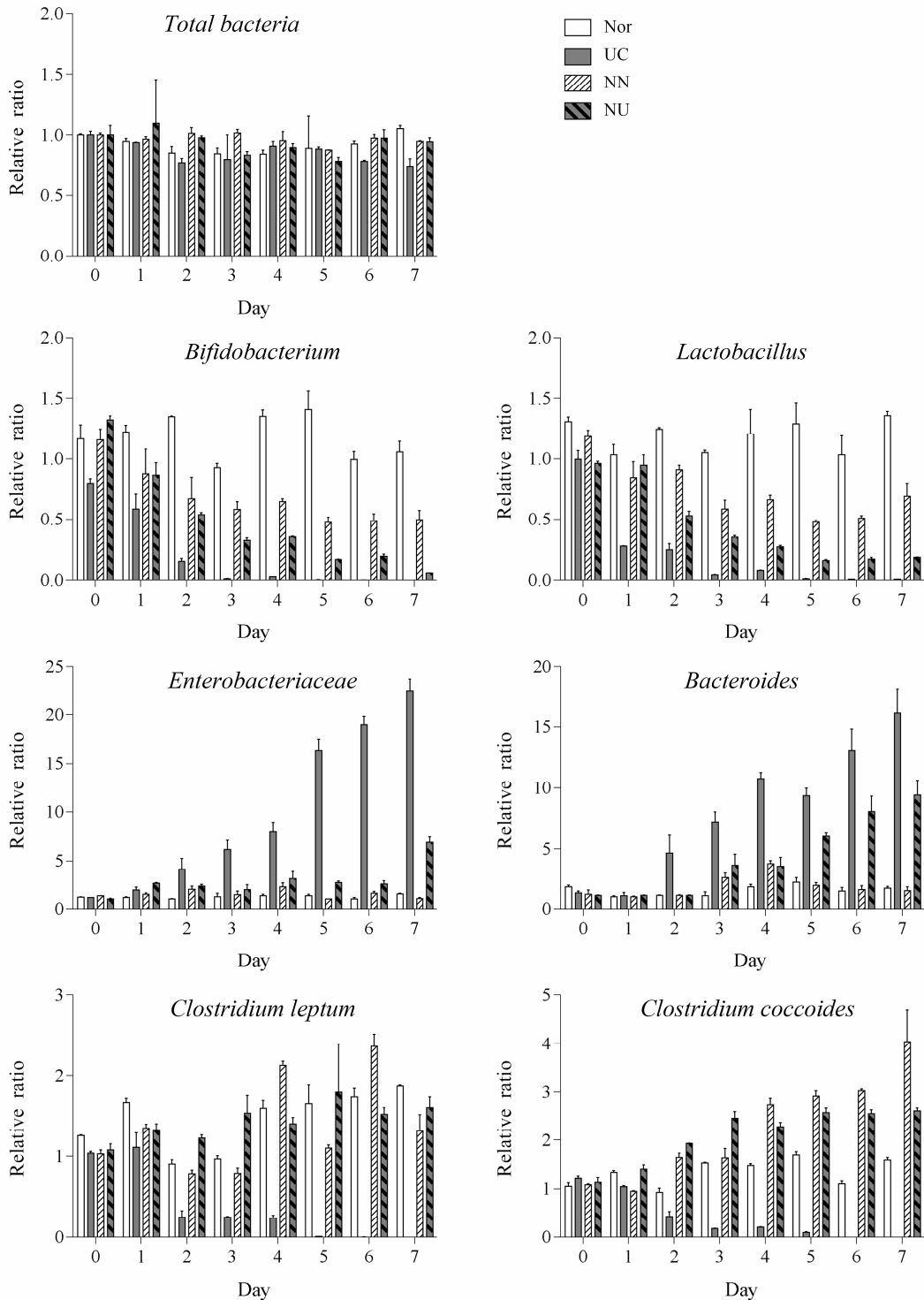


Figure 1 Alterations of total and six main bacteria in fecal samples from normal and ulcerative colitis (UC) rats, and rats receiving normal or UC rat feces. mRNA levels were measured by QPCR. Animals received water (Nor), 5% DSS (UC), feces from normal (NN) or ulcerative colitis rats (NU), respectively, for 7 days. Data were expressed as mean \pm SD of triplicate determinations. The relative level of each bacterium at each time point was obtained by comparing with the level of the same group on day 0

引起受体动物体内肠道菌群组成发生改变。

2 DSS 诱导及粪菌移植对大鼠不同肠段 CYP3A2 及 P-gp 表达的影响

如图 2 所示, 在十二指肠、空肠、回肠和结肠中,

CYP3A2 和 P-gp 的表达呈现相同的变化趋势, 即 UC 组中的表达较正常组显著降低, 在定植来自正常组大鼠的粪菌后, 两者的表达均没有明显变化, 而定植来自 UC 组大鼠的粪菌后, CYP3A2 和 P-gp 的表达显

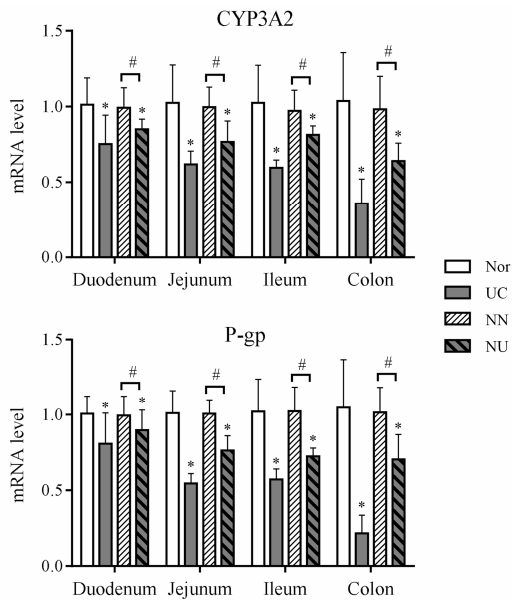


Figure 2 mRNA expression of CYP3A2 and P-gp in different intestinal segments of rats. mRNA expression was measured by QPCR. Data were expressed as mean \pm SD ($n=6$). * $P<0.05$ vs Nor; # $P<0.05$ vs NN

著降低, 与 NN 组相比有显著性差异, 但强度较 UC 组弱。以上结果表明, DSS 诱导大鼠 UC, 导致 CYP3A2 和 P-gp 变化, 而定植失调的菌群可以造成小肠和结肠中 CYP3A2 和 P-gp 的表达下调。

3 肠道菌 OMVs 对 Caco-2 细胞中 CYP3A4 和 P-gp 表达的影响

肠道菌 OMVs 对 Caco-2 细胞表达 CYP3A4 及 P-gp mRNA 的影响见图 3。正常组的粪菌 OMVs 与 Caco-2 细胞共孵能显著下调细胞中 CYP3A4 和 P-gp 的表达, 而 UC_{OMVs} 处理组两者的表达变化较正常组均有显著性降低; 接受正常动物粪便组其肠道菌 OMVs (NN_{OMVs}) 对 CYP3As 和 P-gp 的下调作用程度与正常组类似, 而接受 UC 动物粪便组其肠道菌 OMVs (NU_{OMVs}) 的作用强于 NN_{OMVs}。以上结果表明, 肠道菌 OMVs 可降低肠 CYP3A4 和 P-gp 的表达, DSS 诱导或移植失调的菌群能够进一步加强下调, 导致肠屏障降低。

4 不同 OMVs 组分对 Caco-2 细胞中 CYP3A4 和 P-gp 表达的影响

采用超滤法将正常及 UC 组大鼠肠道菌 OMVs 分成相对分子质量不同范围的 5 个组分 (F<3、F3~10、F10~30、F30~50 和 F>50)。如图 4 所示, 两组中小于相对分子质量 3 000 的组分对 Caco-2 细胞 CYP3A4 和 P-gp mRNA 的表达均无明显影响。与 control 相比, 正常粪菌 OMVs 的相对分子质量 10 000~50 000

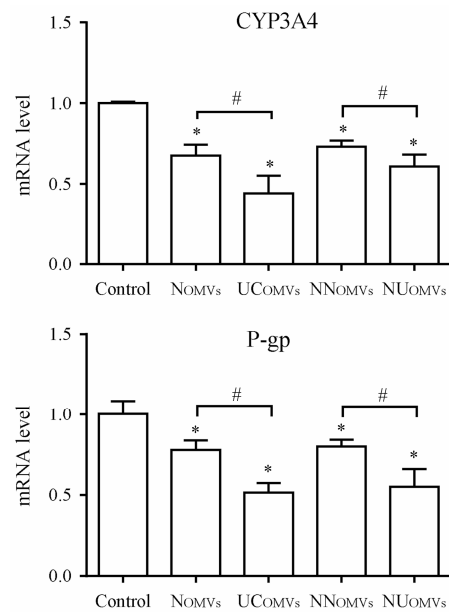


Figure 3 Effects of rat OMVs on mRNA expression of CYP3A4 and P-gp in Caco-2 cells. Cells were treated by OMVs from normal (NOMVs) and UC (UCOMVs) rats, and rats receiving normal (NNOMVs) or UC (NUOMVs) rat feces, respectively. mRNA expression was measured by QPCR. Data were expressed as mean \pm SD of triplicate determination of one representative experiment. * $P<0.05$ vs control; # $P<0.05$ vs NOMVs or NNOMVs

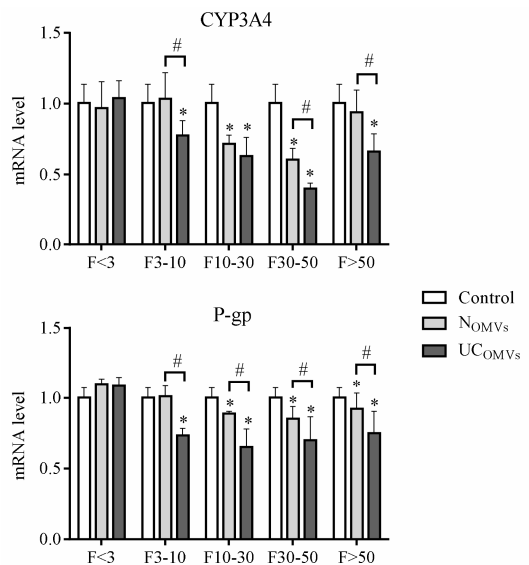


Figure 4 Effects of OMVs different fractions on mRNA expression of CYP3A4 and P-gp in Caco-2 cells. Cells were treated with or without different OMVs fractions from normal or UC rats. mRNA expression was measured by QPCR. Data were expressed as mean \pm SD of triplicate determination of one representative experiment. * $P<0.05$ vs control; # $P<0.05$ vs N_{OMVs}

组分 (F10~30 和 F30~50) 均显著下调 CYP3A4 和 P-gp 的表达, 而大于相对分子质量 50 000 的组分对 P-gp 也有显著抑制; 而 UC 粪菌的 OMVs 中大于相

对分子质量 3 000 的不同组分对 CYP3A4 和 P-gp 均有不同程度的显著抑制, 其中相对分子质量 30 000~50 000 的组分对 CYP3A4 的抑制作用最强; UC 组 OMVs 各组分的作用强度均显著强于正常 OMVs 的相应组分。

5 siRNA 对 Caco-2 细胞中 TLR4 和 GAPDH 表达的影响

如图 5 所示, 转染 TLR4 siRNA 或 GAPDH siRNA (PC 组) 后, Caco-2 细胞内 TLR4 或 GAPDH mRNA 表达显著降低, 抑制效率可达 98% 以上, 说明基因转染和转染后基因表达检测的方法是合理可靠的; NC 组与 control 相比无显著性差异, 表明实验中所使用的 TLR4 siRNA 序列可高效并特异性地抑制 TLR4 表达。

6 抑制或沉默 TLR4 受体对 Caco-2 细胞中 CYP3A4 和 P-gp 表达的影响

如图 6A 所示, 用 TLR4 抑制剂 TAK-242 处理 Caco-2 细胞能阻断正常组及 UC 组 OMVs 对 CYP3A4 和 P-gp mRNA 的下调, 两者的表达恢复至 control 组水平。同样地, 用 TLR4 siRNA 沉默 Caco-2 细胞中 TLR4 基因, 能够抑制 OMVs 对 CYP3A4 和 P-gp 的下调, 使 CYP3A4 和 P-gp 的表达恢复到 control 组水

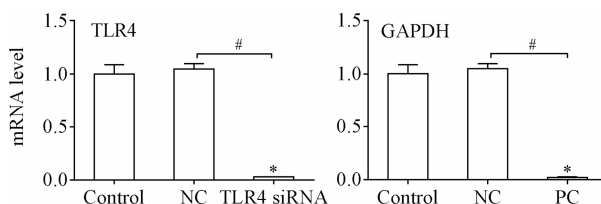


Figure 5 Effects of TLR4 siRNA transfection on TLR4 mRNA expression in Caco-2 cells. Cells were transfected with TLR4 siRNA for 48 h. Cells treated with negative siRNA (NC) or GAPDH siRNA (PC) were processed in parallel to serve as controls. mRNA expression was determined by QPCR. Data was expressed as mean \pm SD of triplicate determination of one representative experiment. * $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs NC. TLR4: Toll like receptor 4; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

平; 而阴性 siRNA 处理后 CYP3A4 和 P-gp 的表达与 control 相比无显著性差异, 表明 CYP3A4 和 P-gp 的改变不受非特异性因素的干扰 (图 6B)。以上结果表明, OMVs 通过激活 TLR4 受体通路调控 Caco-2 细胞 CYP3A4 和 P-gp 的 mRNA 表达。

讨论

随着人们对肠道菌群的深入了解, 其在宿主药

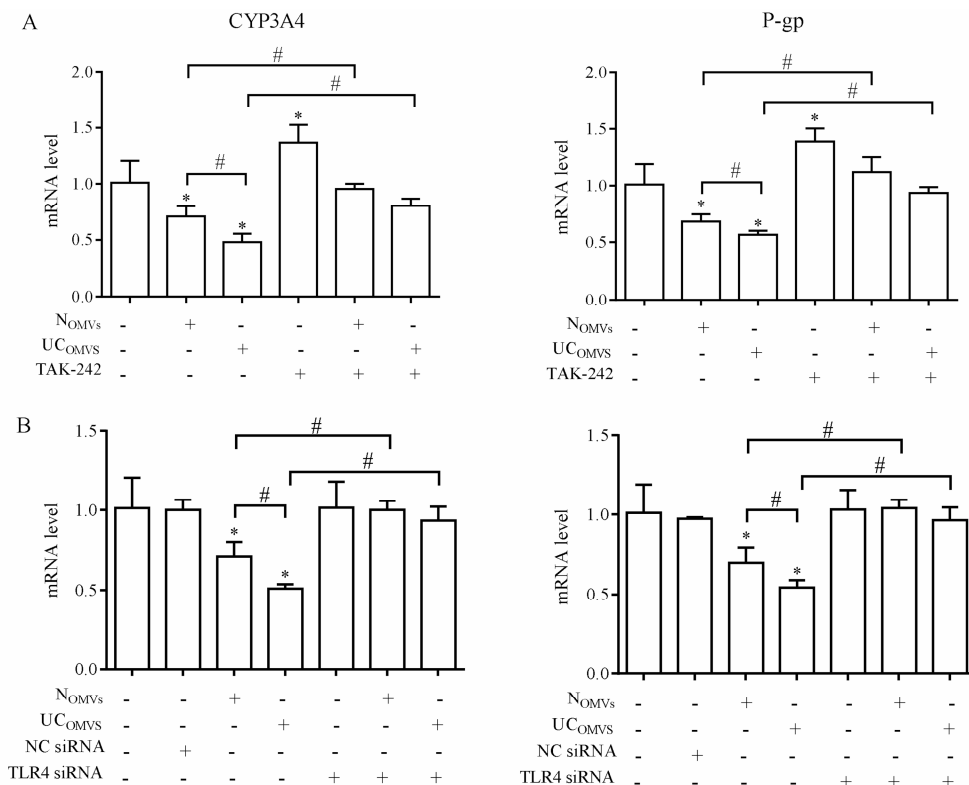


Figure 6 Effects of TLR4 inhibitor and siRNA transfection on mRNA expression of CYP3A4 and P-gp in Caco-2 cells. Cells were treated with TLR4 inhibitor (A), transfected with TLR4 or negative siRNA (NC) (B) followed by treatment of OMVs from normal or UC rats. mRNA expression was determined by QPCR. Data were expressed as mean \pm SD of triplicate determination of one representative experiment. * $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs N_{OMVs} or UC_{OMVs}. TAK-242: Resatorvid

物代谢和转运中的作用也受到越来越多的关注。本研究首次利用 DSS 诱导的大鼠溃疡性结肠炎模型结合粪便移植, 探讨肠道菌群失衡对肠道 CYP3A 以及 P-糖蛋白的影响以及主要调节机制。研究发现: DSS 诱导引起大鼠小肠和结肠中 CYP3A 和 P-gp 下调, 同时伴随肠道菌群组成的改变, UC 粪菌移植至健康大鼠可引起相似的变化; 正常和结肠炎大鼠来源的粪菌 OMVs 均可下调 Caco-2 细胞 CYP3A 和 P-gp 的表达, 来自结肠炎大鼠的 OMVs 作用更为明显; 不同分子质量的粪菌 OMVs 组分可差异性地引起 CYP3A 和 P-gp 的改变; 抑制 TLR4 活化可以阻断 OMVs 对 Caco-2 细胞 CYP3A 和 P-gp 的下调。以上研究证实了肠道菌群失衡对肠道药物代谢和转运系统的影响, 揭示了部分调控机制。这对于调节肠道菌群的平衡以维持肠道屏障功能和提高药物疗效具有重要意义。

肠道菌群平衡对维持肠黏膜免疫屏障功能具有重要的作用。菌群失调可激活肠道免疫细胞, 释放大量的炎症因子^[28], 引起炎症, 影响宿主多种靶基因的转录和表达。溃疡性结肠炎是以肠道菌群失衡和局部免疫失调为特征的慢性炎症性疾病。大量研究证实, UC 状态下可导致肠道菌群失衡, 细菌代谢网络发生改变。本研究选取文献报道的与 UC 病理紧密相关或显著变化的 6 个代表性肠道菌, 检测其在 DSS 诱导后的动态变化, 发现它们的变化与 Rooks 等^[29]对炎症性肠病患者肠道菌群的研究结果相一致。

粪菌移植旨在通过将健康人粪便中的功能菌移植到患者肠道内, 调节肠道菌群平衡, 重建正常的肠道微生态系统, 从而治疗或改善疾病。目前, 粪菌移植在临床治疗伪膜性肠炎、慢性便秘、炎症性肠病和肠易激综合征, 尤其是艰难梭菌感染方面已取得明显疗效^[30]。此外, 粪菌移植技术是研究肠道菌群和疾病关系以及相关机制的有效手段, 在基础研究领域也有越来越多的应用^[31]。本研究采用将对照组及 UC 组粪便同步饲喂正常动物的方式, 观察粪菌移植后是否会引起大鼠肠道菌群失调以及肠道 CYP3A 和 P-gp 表达的变化。结果表明, 移植 UC 粪菌后可引起受体动物产生类似 UC 的肠道菌组成的改变, 肠杆菌科和拟杆菌属增加, 乳杆菌属和双歧杆菌属减少, 这些变化与结肠炎临床研究的结果相吻合^[32]。研究报道, 肠道优势菌柔嫩梭菌和球形梭菌在结肠炎患者中数量减少^[33], 而在本研究中两者尤其是球形梭菌在接受正常菌及 UC 菌的动物肠道中呈增加的趋势。这可能是健康动物在接受异体菌移植后反馈性地通过调整优势菌的数量来维持自身的菌群平衡。

本研究中 DSS 诱导的 UC 大鼠小肠 CYP3A2 和 P-gp 的 mRNA 显著下调, 这与结肠炎小鼠小肠中两者的变化一致^[2]; 还发现 CYP3A2 和 P-gp 在结肠下调更为显著, 这可能是由于肠道菌主要定植在结肠, 因而对结肠黏膜的损伤更为严重。移植正常动物的菌群对受体动物肠道 CYP3A 和 P-gp 的 mRNA 表达没有明显影响, 而 UC 粪菌移植造成肠道 CYP3A2 和 P-gp 的显著下调, 表明 DSS 诱导造成的菌群失衡是 UC 肠道 CYP3A 和 P-gp 下调的主要原因。

Vignsnaes 等^[11]通过比较结肠炎患者和健康人的粪便细菌组成, 发现二者最主要的差异为革兰阴性菌的数量。作者首次采用将革兰阴性菌 OMVs 与 Caco-2 细胞共孵的方法研究肠道菌对肠 CYP3A 和 P-gp 的调控, 发现正常及 UC 组粪菌 OMVs 对 Caco-2 细胞 CYP3A4 和 P-gp 均有下调作用, 这与体内研究中仅移植 UC 粪菌组能引起两者下调的结果不一致。此外, UC 粪菌移植组 OMVs 的下调作用弱于 UC 组 OMVs 的作用。导致上述结果的可能原因如下: ① 体内有除肠道菌以外的其他因素参与肠道 CYP3A 和 P-gp 的调控; ② 粪菌移植后机体整体发生反馈性调节, 启动代偿机制。

有报道表明, LPS 能够调节小鼠 CYP3A 和大鼠 P-gp 的表达和活性^[7, 9], 细菌合成的石胆酸盐也可参与对小鼠 CYP3A 的调控^[34]。本研究尝试通过比较正常和 UC 粪菌 OMVs 不同分子质量组分的作用寻找调控肠道 CYP3A4 和 P-gp 的主要效应分子, 发现相对分子质量大于 10 000 和 3 000 的正常和 UC 粪菌 OMVs 组分分别下调 CYP3A4 和 P-gp, 相对分子质量处于 30 000~50 000 之间的组分作用最为显著, 正常与 UC 组 OMVs 作用的差别也最为明显。这可能是 DSS 诱导 UC 引起肠道菌群中革兰阴性菌的组成及相对丰度变化所致。相应地, 在本研究中观察到 DSS 诱导的 UC 大鼠革兰阴性菌肠杆菌科和拟杆菌属的相对比例明显升高。这两种菌是否是介导 OMVs 调控肠 CYP3A 和 P-gp 的主要肠道菌还有待进一步研究。由于肠道菌群组成的复杂性以及分析技术的限制, 本研究未能对正常和 UC 粪菌 OMVs 的主要差异性成分作进一步分析。

CYP3A 和 P-gp 的转录受核受体如 PXR^[35]的调控。TLRs 是模式识别受体家族中一类重要的受体, 能够激活丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等炎症相关的信号通路, 活化 NF- κ B, 调节 PXR 等表达^[36]。作为革兰阴性细菌

脂多糖的重要结合配体, TLR4 可能介导了 UC 大鼠 OMVs 对肠 CYP3A 和 P-gp 的下调。本研究采用化学抑制和基因沉默两种方法抑制或阻断 TLR4 活化, 发现 OMVs 下调 CYP3A 和 P-gp 的作用被阻断, 证实了 UC 肠道菌群部分通过 TLR4 受体通路下调肠 CYP3A 和 P-gp。

综上, 本研究通过体内菌群移植结合体外 Caco-2 细胞研究, 证实肠道菌可通过释放 OMVs, 激活 TLR4 受体通路, 下调肠道 CYP3A 和 P-gp 的表达。本研究为阐明肠道菌平衡对维持肠屏障和药物治疗的重要性提供重要数据, 为发现肠道菌群失调相关疾病的治疗靶标及合理用药研究提供新思路。

References

- [1] Marchesi JR, Adams DH, Fava F, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier [J]. *Gut*, 2016, 65: 330–339.
- [2] Kawauchi S, Nakamura T, Miki I, et al. Downregulation of CYP3A and P-glycoprotein in the secondary inflammatory response of mice with dextran sulfate sodium-induced colitis and its contribution to cyclosporine A blood concentrations [J]. *J Pharmacol Sci*, 2014, 124: 180–191.
- [3] Bjorkholm B, Bok CM, Lundin A, et al. Intestinal microbiota regulate xenobiotic metabolism in the liver [J]. *PLoS One*, 2009, 4: e6958.
- [4] Selwyn FP, Cheng SL, Bammler TK, et al. Developmental regulation of drug-processing genes in livers of germ-free mice [J]. *Toxicol Sci*, 2015, 147: 84–103.
- [5] Venkatesh M, Mukherjee S, Wang H, et al. Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4 [J]. *Immunity*, 2014, 41: 296–310.
- [6] Claus SP, Ellero SL, Berger B, et al. Colonization-induced host-gut microbial metabolic interaction [J]. *MBio*, 2011, 2: e00271–10.
- [7] Gandhi AS, Guo T, Shah P, et al. CYP3A-dependent drug metabolism is reduced in bacterial inflammation in mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 166: 2176–2187.
- [8] Komori Y, Arisawa S, Takai M, et al. Ursodeoxycholic acid inhibits overexpression of P-glycoprotein induced by doxorubicin in HepG2 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 724: 161–167.
- [9] Tomita M, Takizawa Y, Kanbayashi A, et al. Suppression of efflux transporters in the intestines of endotoxin-treated rats [J]. *Int J Pharm*, 2012, 428: 33–38.
- [10] Saksena S, Goyal S, Raheja G, et al. Upregulation of P-glycoprotein by probiotics in intestinal epithelial cells and in the dextran sulfate sodium model of colitis in mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 300: G1115–G1123.
- [11] Vigsnaes LK, Brynskov J, Steenholdt C, et al. Gram-negative bacteria account for main differences between faecal microbiota from patients with ulcerative colitis and healthy controls [J]. *Benef Microbes*, 2012, 3: 287–297.
- [12] Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles [J]. *Nat Rev Immunol*, 2015, 15: 375–387.
- [13] Zhao K, Deng X, He C, et al. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles modulate host immune responses by targeting the toll-like receptor 4 signaling pathway [J]. *Infect Immun*, 2013, 81: 4509–4518.
- [14] Zariri A, Beskers J, van de Waterbeemd B, et al. Meningococcal outer membrane vesicle composition-dependent activation of the innate immune response [J]. *Infect Immun*, 2016, 84: 3024–3033.
- [15] Kim JH, Yoon YJ, Lee J, et al. Outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli* up-regulate expression of endothelial cell adhesion molecules *in vitro* and *in vivo* [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e59276.
- [16] Ben-Amor K, Heilig H, Smidt H, et al. Genetic diversity of viable, injured, and dead fecal bacteria assessed by fluorescence-activated cell sorting and 16S rRNA gene analysis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 4679–4689.
- [17] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 5445–5451.
- [18] Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, et al. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 3575–3581.
- [19] Conte MP, Schippa S, Zamboni I, et al. Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease [J]. *Gut*, 2006, 55: 1760–1767.
- [20] Byun R, Nadkarni MA, Chhour KL, et al. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 3128–3136.
- [21] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70: 7220–7228.
- [22] Muhling M, Woolven-Allen J, Murrell JC, et al. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel

- electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities [J]. *ISME J*, 2008, 2: 379–392.
- [23] Park KS, Lee J, Jang SC, et al. Pulmonary inflammation induced by bacteria-free outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 49: 637–645.
- [24] Aiba T, Susa M, Fukumori S, et al. The effects of culture conditions on CYP3A4 and MDR1 mRNA induction by $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D₃ in human intestinal cell lines, Caco-2 and LS180 [J]. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2005, 20: 268–274.
- [25] Zhang Y, Li Y, Li Q. Inhibition of cytochrome P450 3A in rat liver by the diorganotin (IV) compound di-*n*-butyl-di-(4-chlorobenzo-hydroxamate)tin (IV) and its probable mechanism [J]. *Molecules*, 2012, 17: 10994–11009.
- [26] Chisaki I, Kobayashi M, Itagaki S, et al. Liver X receptor regulates expression of MRP2 but not that of MDR1 and BCRP in the liver [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1788: 2396–2403.
- [27] Liu H, Wu B, Pan G, et al. Metabolism and pharmacokinetics of mangiferin in conventional rats, pseudo-germ-free rats, and streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Drug Metab Dispos*, 2012, 40: 2109–2118.
- [28] Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9: 313–323.
- [29] Rooks MG, Veiga P, Wardwell-Scott LH, et al. Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission [J]. *ISME J*, 2014, 8: 1403–1417.
- [30] van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile* [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368: 407–415.
- [31] Borody TJ, Paramsothy S, Agrawal G. Fecal microbiota transplantation: indications, methods, evidence, and future directions [J]. *Curr Gastroenterol Rep*, 2013, 15: 337.
- [32] Baek SJ, Kim SH, Lee CK, et al. Relationship between the severity of diversion colitis and the composition of colonic bacteria: a prospective study [J]. *Gut Liver*, 2014, 8: 6.
- [33] Bullock NR, Booth JC, Gibson GR. Comparative composition of bacteria in the human intestinal microflora during remission and active ulcerative colitis [J]. *Curr Issues Intest Microbiol*, 2004, 5: 59–64.
- [34] Toda T, Ohi K, Kudo T, et al. Antibiotics suppress CYP3A in the mouse liver by reducing lithocholic acid-producing intestinal flora [J]. *J Pharm Soc Jpn*, 2009, 129: 601–608.
- [35] Cerveny L, Svecova L, Anzenbacherova E, et al. Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35: 1032–1041.
- [36] Pascussi JM, Vilarem MJ. Inflammation and drug metabolism: NF- κ B and the CAR and PXR xeno-receptors [J]. *Med Sci (Paris)*, 2008, 24: 301–305.