



副干酪乳酪杆菌N1115的巨噬细胞免疫活化产物 促进原代海马神经细胞发育*

周志谟, 贾雯, 陈菲, 刘美汛, 王凯, 柳鉴修, 沈曦, 何方, 程如越[△]

四川大学华西公共卫生学院/四川大学华西第四医院(成都 610041)

【摘要】目的 初步探究副干酪乳酪杆菌N1115活菌介导免疫途径对体外培养的原代海马神经细胞发育的影响。**方法** 以适宜浓度的副干酪乳酪杆菌N1115活菌悬液为实验组,以肽聚糖(PGN)、脂多糖(LPS)为阳性对照,以RPMI1640培养基为空白对照,分别与RAW264.7细胞共培养,获得共培养上清液及细胞总RNA,测定细胞因子的表达及分泌情况。各组上清液经离心后以适当的比例与原代海马神经细胞共培养,收集共培养上清液,提取细胞总RNA,测定神经细胞突触发育相关基因的表达情况;原代海马神经细胞免疫荧光染色后对突触前后膜相关蛋白——突触后膜致密蛋白95(PSD95)、突触生长蛋白(SYP)及神经细胞成熟标志物——微管相关蛋白2(MAP-2)、双皮质素(DCX)进行定量分析,对神经细胞的形态发育进行测量。**结果** 与空白对照相比,N1115活菌干预RAW264.7细胞后,细胞免疫功能激活,白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的mRNA相对表达量分别提高7471%、926%,分泌量分别提高184.16 pg/mL、12320.76 pg/mL,差异均有统计学意义($P<0.05$);N1115活菌的激活能力强于PGN,但弱于LPS,差异有统计学意义($P<0.05$)。与空白对照相比,N1115活菌-RAW264.7细胞共培养上清液干预原代海马神经细胞后,10%上清干预组原代海马神经细胞活率提升19.25%,差异有统计学意义($P<0.05$),突触前后膜SYP、PSD95 mRNA相对表达量分别提高137%、159%,差异有统计学意义($P<0.05$)。N1115活菌上清干预组神经细胞的突起总长度(489.88 μm)较空白对照组(381.51 μm)增加,胞体面积(2092.22 μm^2)、轴突长度(184.78 μm)、突起总长度、平均突起长度(108.38 μm)、分支点(4.84个)较两阳性对照组升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 副干酪乳酪杆菌N1115可激活巨噬细胞的免疫调节功能,从而促进神经细胞的形态发育以及突触功能。

【关键词】 副干酪乳酪杆菌N1115 神经发育 免疫 原代海马神经细胞

Macrophage-Activated Products of *Lactacaseibacillus paracasei* N1115 Promote the Development of Primary Hippocampal Neurons ZHOU Zhimo, JIA Wen, CHEN Fei, LIU Meixun, WANG Kai, LIU Jianxiu, SHEN Xi, HE Fang, CHENG Ruyue[△]. West China School of Public Health and West China Fourth Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: ruyuecheng1993@163.com

【Abstract】Objective To make a preliminary investigation of the effect of the immune pathway mediated by live *Lactacaseibacillus paracasei* N1115 on the development of primary hippocampal neurons cultured *in vitro*. **Methods** Live *Lactacaseibacillus paracasei* N1115 suspension of an appropriate concentration was used as the experimental group. Peptidoglycan (PGN) and lipopolysaccharide (LPS) were used as positive controls, and RPMI1640 medium served as the blank control. These were co-cultured with RAW264.7 cells to obtain the co-culture mediums and the total cellular RNA, and to measure the expression and secretion of cytokines. After centrifugation, the supernatants were co-cultured with primary hippocampal neurons at appropriate ratios. The co-culture mediums were collected, and the total cellular RNA was extracted to measure the expression of genes related to synaptic development in neurons. Following immunofluorescence staining of the primary hippocampal neurons, the presynaptic and postsynaptic membrane-associated proteins, including synaptophysin (SYP) and the postsynaptic density protein 95 (PSD95), and neuronal cell maturation markers, including microtubule-associated protein 2 (MAP-2), and doublecortin (DCX) were quantitatively analyzed. Additionally, the morphological development of the neurons were measured. **Results** Compared with the blank control, the mRNA expression levels of interleukin (IL)-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) increased by 7471% and 926%, respectively, after the RAW264.7 cells were treated with live *Lactacaseibacillus paracasei* N1115, while their secretion levels increased by 184.16 pg/mL and 12320.76 pg/mL, respectively, all showing statistically significant differences ($P<0.05$). The activation ability of N1115 live bacteria was stronger than that of PGN but weaker than that of LPS, showing statistically significant differences ($P<0.05$). Compared with the blank control, following the intervention with the supernatant from the co-culture of N1115 live bacteria and RAW264.7 cells, the

* 河北省自然科学基金生物农业联合基金重点项目(No.C2023106008)资助

[△] 通信作者, E-mail: ruyuecheng1993@163.com

出版日期: 2024-09-20

viability of primary hippocampal neurons in the 10% supernatant intervention group increased by 19.25%, showing statistically significant differences ($P<0.05$), and the mRNA expression of SYP and PSD95 increased by 137% and 159%, respectively, showing statistically significant differences ($P<0.05$). The total neurite length (489.88 μm) of the neurons of the group intervened with the supernatant of N1115 live bacteria was increased compared to that of the blank control group (381.51 μm), and the cell body area (2092.22 μm^2), maximum neurite length (184.78 μm), total neurite length, average neurite length (108.38 μm), and branching points (4.84 s) were higher than those in the two positive control groups, showing statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion** *Lactocaseibacillus paracasei* N1115 can significantly activate the immune regulatory function of macrophages, thereby promoting the morphological development and synaptic function of nerve cells.

【Key words】 *Lactocaseibacillus paracasei* N1115 Neural development Immunity Primary hippocampal neurons

肠道微生物群通过微生物-肠-脑轴影响中枢神经系统,对免疫功能和神经调节至关重要^[1-2]。肠道微生物与免疫细胞相互作用,通过细胞因子调节大脑功能^[3]。细胞因子在神经系统中的重要作用包括参与突触发育和神经元形态变化^[4]。特定细胞因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6和IL-1 β 对神经兴奋性、突触传递和神经元分化有积极影响^[5-7],但这些调节作用均依赖于一定的干预浓度^[8]。益生菌作为有益微生物,可参与免疫因子分泌的调节过程^[9],从而可能对神经细胞发育产生正面影响,但其效果具有菌株特异性,需进一步研究。

本课题组前期研究表明,副干酪乳酪杆菌N1115可增强小鼠非特异性免疫功能,并显著改善脂质代谢^[10];利用阿尔茨海默病动物模型开展的动物实验研究也表明,副干酪乳酪杆菌N1115可能通过肠道与免疫系统的互作改善神经炎症和认知,并减轻氧化应激^[11]。此外,本课题组前期将副干酪乳酪杆菌N1115与原代海马神经细胞直接共培养,发现热灭活的副干酪乳酪杆菌N1115可以显著提高海马神经细胞的活率,增加神经营养因子的分泌和5羟色胺受体的表达,展现出调控神经细胞发育和神经递质功能表达的潜力^[12]。

因此,本研究拟构建副干酪乳酪杆菌N1115-RAW264.7细胞-原代海马神经细胞共培养模型,通过体外实验模拟摄入肠道中的益生菌活化局部免疫系统,并借助循环系统转运活化产物到中枢神经系统进而发挥作用的过程,探究副干酪乳酪杆菌N1115是否可以通过免疫调节途径调控神经细胞发育。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与试剂

本研究实验仪器包括电泳仪(北京六一)、恒温厌氧培养箱(英国Electrotek)、台式低速离心机(湘仪仪器)、CO₂培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific)、细胞计数仪

(中国华利达)、超净工作台(苏州博莱尔)、酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific)、恒温水浴锅(太仓市华利达)、倒置显微镜(日本Olympus)。

实验动物购于四川维通利华实验动物技术有限公司,许可证号: SCXK(川)2023-0040。本研究已通过四川大学华西公共卫生学院伦理委员会审批,伦理编号: Gwll2023228。

实验试剂包括MRS琼脂培养基(北京陆桥)、RPMI1640基础培养基(美国Gibco)、高糖DMEM基础培养基(美国Gibco)、B₂₇添加剂(美国Gibco)、N₂添加剂(美国Gibco)、热灭活胎牛血清(美国Gibco)、磷酸盐缓冲溶液(美国Gibco)、青霉素-链霉素溶液(美国Hyclone)、肽聚糖(美国Sigma)、多聚左旋赖氨酸(北京鼎国昌盛)、HEPES(美国Sigma)、阿糖胞苷(美国Sigma)、CCK-8试剂(日本东仁)、胰蛋白酶-EDTA消化液(美国Sigma)、脂多糖(美国Hyclone)、细胞因子ELISA检测试剂盒(美国NOVUS公司)、蛋白抗体(美国CST)、细胞总RNA分离试剂盒(成都福际)、逆转录试剂盒(美国BIO-RAD)、实时荧光定量PCR试剂盒(美国BIO-RAD)。

1.2 实验分组

首先收集菌株或对照组与巨噬细胞的共培养上清液(co-culture mediums, CMs),实验组为N1115活菌干预(N1115-L)组,同时设置肽聚糖(peptidoglycan, PGN)干预阳性对照组、脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)干预阳性对照组和空白对照(control, CON)组。

共培养上清液经低温离心去除沉淀后干预原代海马神经细胞,设置N1115活菌共培养上清液干预(N1115-L-CM)组、肽聚糖共培养上清液干预阳性对照(PGN-CM)组、脂多糖共培养上清液干预阳性对照(LPS-CM)组及空白对照共培养上清液干预(CON-CM)组。

1.3 受试菌株的培养及菌悬液制备

取冻存于-80℃脱脂奶中的副干酪乳酪杆菌N1115

100 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中加热至室温后, 均匀涂布于 MRS 琼脂培养基。将培养基置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 厌氧培养箱内培养 48 h, 传代 3 次后, 根据菌落吸光度曲线, 将菌悬液浓度调至 1×10^9 CFU/mL, 菌悬液经 RPMI1640 培养基重悬后备用。

1.4 菌悬液与 RAW264.7 细胞共培养

取 -80 $^{\circ}\text{C}$ 液氮罐中冻存的 RAW264.7 细胞, 传代至稳定后接种于 96 孔板 (5×10^5 mL $^{-1}$, 100 μL /孔, 每组 6 个生物学重复)。用 RPMI1640 培养基稀释活菌悬液, 使菌量: 细胞量分别为 200 : 1、100 : 1、10 : 1、1 : 1。37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数为 5% CO_2 共培养 22 h 后, 每孔加 10 μL CCK-8 试剂, 继续培养 2 h 后, 测量 RAW264.7 细胞的增殖活性。

将 RAW264.7 细胞接入 24 孔板中 (5×10^5 mL $^{-1}$, 1 mL/孔, 每组 3 个生物学重复), 根据增殖活性实验结果确定的菌悬液干预比例对巨噬细胞进行干预, 干预量为 100 μL ; PGN 组及 LPS 组中肽聚糖和脂多糖的用量为 2 μg /孔, 分别溶解于 100 μL RPMI1640 培养基中; CON 组加入 100 μL 不含 N1115 菌的 RPMI1640 培养基, 24 h 后收集共培养上清液。上清液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min 后, 弃去下层沉淀, 收集上清液, 冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。使用细胞刮刀收集贴壁细胞, 冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.5 原代海马神经细胞的分离培养

出生 24 h 内 SD 大鼠断头后剥离海马组织, 胰蛋白酶消化后用种植液调节细胞密度为 1×10^6 mL $^{-1}$ 。以 2 mL/孔的密度接种于 6 孔板或以 100 μL /孔的密度接种于 96 孔板, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% CO_2 细胞孵箱中培养。24 h 后更换为含 1% N_2 、2% B_{27} 及添加双抗溶液的有血清培养液 1, 48 h 后更换为含 1% N_2 、2% B_{27} 、1.5% 阿糖胞苷及添加双抗溶液的有血清培养液 2, 48 h 后更换为含 1% N_2 的无血清培养液。整个过程持续 7 d, 直至神经细胞分化出较明显但未完全成熟的突触结构^[13]。

1.6 共培养上清液与原代海马神经细胞共培养

取 1.5 中培养 7 d 的 96 孔板 (细胞量 1×10^6 mL $^{-1}$, 100 μL /孔, 每组 6 个生物学重复), 加入上述 2.4 中的 CMs 使其分别占总培养基体积的 10%、5%、2%、1%、0.5%。37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数为 5% CO_2 共培养 22 h 后每孔加 10 μL CCK-8 试剂, 继续培养 2 h 后测量原代海马神经细胞的增殖活性。另取 1.5 中培养 7 d 的 6 孔板 (细胞量 1×10^6 mL $^{-1}$, 2 mL/孔, 每组 3 个生物学重复), 根据增殖活性实验结果确定的 CMs 干预比例对原代海马神经细胞进行干预, 干预量为 100 μL , 24 h 后收集贴壁细胞, 冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.7 逆转录-实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

按照细胞总 RNA 分离试剂盒的说明, 经细胞裂解、DNA

去除、RNA 纯化后获得 RAW264.7 细胞和原代海马神经细胞总 RNA, 采用逆转录试剂盒合成 cDNA, 逆转录程序如下: 25 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min; 46 $^{\circ}\text{C}$ 、20 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保持。

利用 qPCR 测定 RAW264.7 细胞和原代海马神经细胞基因相对表达量, 引物序列如下:

RAW264.7 细胞免疫激活相关基因: *IL-6* (正向: 5'-GGACTGATGCTGGTGACAAC-3', 反向: 5'-CAGGTCTGTTGGGAGTGGTAT-3')、*IL-10* (正向: 5'-CAGTACAGCCGGGAAGACAAT-3', 反向: 5'-TTGTCCAGCTGGTCTCTTGT-3')、*TNF- α* (正向: 5'-GCCTATGTCTCAGCCTCTTCTC-3', 反向: 5'-GGTCTGGGCCATAGAACTGAT-3')、*IL-1 β* (正向: 5'-CCCAGGGCATGTTAAGGAGC-3', 反向: 5'-TTCTTGTGACCCCTGAGCGAC-3')、 β -actin (正向: 5'-CAGCCTTCCTTCTTGGGTATGGA-3', 反向: 5'-AGAGGTCTTTACGGATGTCAACG-3')。

原代海马神经细胞突触发育相关基因: *PSD95* (正向: 5'-CTCTCCTCCCTCAAGGCCAAT-3', 反向: 5'-TGTTCCGTTACCTGCAACTC-3'), *SYP* (正向: 5'-TCTTCCTGCAGAACAAAGTACC-3', 反向: 5'-CCTTGCAATGTGTTCCCTGTCTG-3'), *GAPDH* (正向: 5'-GCCGCATCTTCTTGTGCAG-3', 反向: 5'-ATGAAGGGGTCGTTGATGGC-3')。

qPCR 反应程序为: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s、98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 循环 39 次, 每个循环结束后读取荧光值。以 β -actin 或 *GAPDH* 为内参基因, 每个基因设置两个平行孔, 按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 相对定量法计算基因的 mRNA 相对表达量。

1.8 酶联免疫吸附实验 (ELISA)

根据 ELISA 操作试剂盒的说明, 经孵育、清洗、显色等步骤后测定巨噬细胞上清液中细胞因子 IL-6、IL-10、IL-1 β 和 *TNF- α* 的分泌量。

1.9 免疫荧光染色

按照 TSA 法双染程序对干预完成的神经细胞行免疫荧光染色, 染色指标包括突触后膜致密蛋白 95 (postsynaptic density protein 95, PSD95)、突触生长蛋白 (synaptophysin, SYP)、微管相关蛋白 2 (microtubule-associated protein 2, MAP-2)、双皮质素 (doublecortin, DCX), 经破膜、封闭、孵育一抗、孵育二抗、TSA 染色、洗脱、封闭、染核后用荧光封片剂封片, 在显微镜下进行图像采集。

1.10 统计学方法

使用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析, 计量资料表示为 $\bar{x} \pm s$ 。服从正态分布的组间多重比较使用单因素方差分析; 不服从正态分布的组间比较采用 Kruskal-

Wallis检验。两两比较采用Dunnett-*t*或Tukey检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。利用Image-J软件测量神经细胞的轴突和树突长度、胞体大小和面积、树突棘的数量,并检测突触可塑性相关蛋白PSD95、SYP及神经细胞成熟程度标志蛋白MAP-2、DCX的表达量。

2 结果

2.1 N1115活菌对RAW264.7细胞增殖活性的影响

如图1所示,与空白对照相比,菌悬液干预巨噬细胞后,细胞活率明显上升;在菌量:细胞量为1:1~100:1范围内存在剂量反应关系,菌量:细胞量为

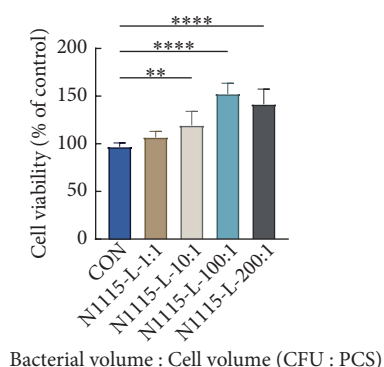


图1 N1115活菌对RAW264.7细胞增殖活性的影响

Fig 1 Effect of live N1115 on the proliferation viability of RAW264.7 cells

$n=6$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$.

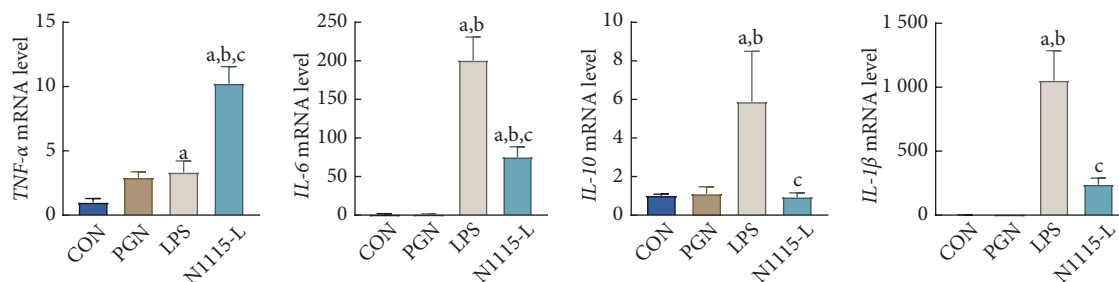


图2 RAW264.7细胞的细胞因子表达情况

Fig 2 The mRNA level of cytokine in RAW264.7 cells

$n=3$, ^a $P<0.05$, vs. CON group; ^b $P<0.05$, vs. PGN group; ^c $P<0.05$, vs. LPS group.

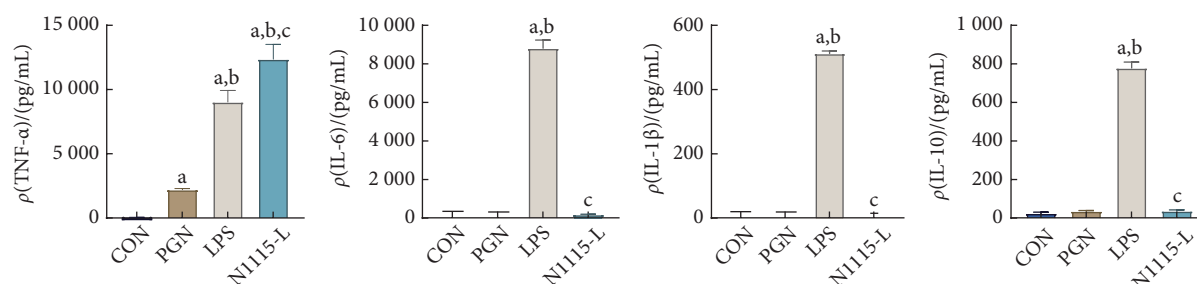


图3 RAW264.7细胞的细胞因子分泌情况

Fig 3 The secretion of RAW264.7 cell cytokines

$n=3$, ^a $P<0.05$, vs. CON group; ^b $P<0.05$, vs. PGN group; ^c $P<0.05$, vs. LPS group.

100:1时细胞活率最高,差异有统计学意义($q=8.526$, $P<0.0001$);但干预比例继续升高至200:1时,细胞活率反而下降。后续实验以菌量:细胞量=100:1作为副干酪乳酪杆菌N1115干预巨噬细胞的比例。

2.2 RAW264.7细胞的细胞因子表达量及分泌量

如图2、图3所示,N1115-L组TNF- α 的mRNA相对表达量高于CON组($q=19.63$, $P<0.0001$)、PGN组($q=15.55$, $P<0.0001$)和LPS组($q=14.69$, $P<0.0001$);IL-6的mRNA相对表达量高于CON组($q=7.922$, $P<0.0001$)和PGN组($q=7.930$, $P<0.0001$),但不及LPS组($q=13.35$, $P<0.0001$);N1115活菌对IL-10及IL-1 β 的激活作用不明显,且低于LPS。各干预组上清液中细胞因子的分泌量与其表达量趋势基本一致,N1115活菌促进了巨噬细胞分泌TNF- α 及IL-6。N1115活菌对巨噬细胞的激活程度优于空白对照及PGN,但低于LPS。

2.3 N1115-巨噬细胞共培养上清液对原代海马神经细胞增殖活性的影响

如图4所示,在N1115活菌与巨噬细胞的共培养上清液以5%($q=4.752$, $P<0.001$)和10%($q=4.029$, $P<0.01$)比例分别干预后,原代海马神经细胞的细胞活率较CON-CM组均升高,差异有统计学意义。10%浓度的PGN-CM,10%、5%、2%、0.5%浓度的LPS-CM对原代海马神经细胞的增殖无明显影响,但PGN-CM和LPS-CM的其余浓

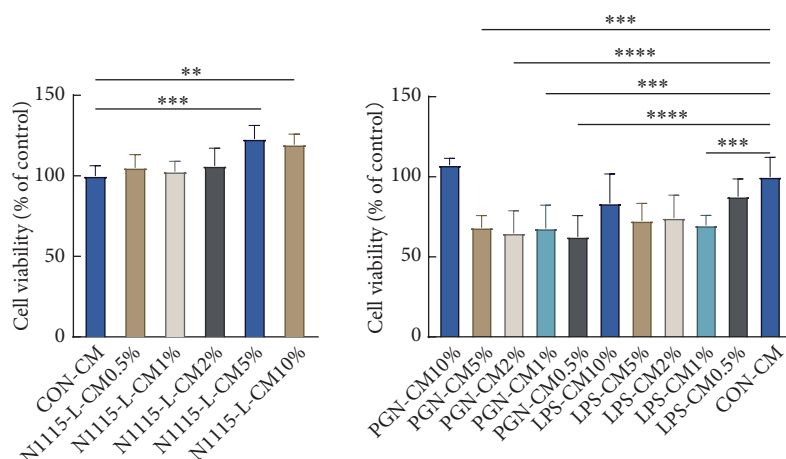


图 4 CMs对原代海马神经细胞增殖活性的影响

Fig 4 Effect of CMs on the cell proliferation viability of primary hippocampal neurons

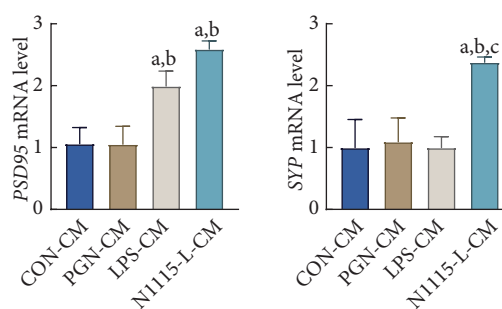
$n=6$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

度干预比例反而抑制了细胞增殖。因此,综合各干预组的结果,后续研究中选择共培养上清液干预原代海马神经细胞的干预比例为10%。

2.4 N1115-巨噬细胞共培养上清液对原代海马神经细胞突触前后膜发育的影响

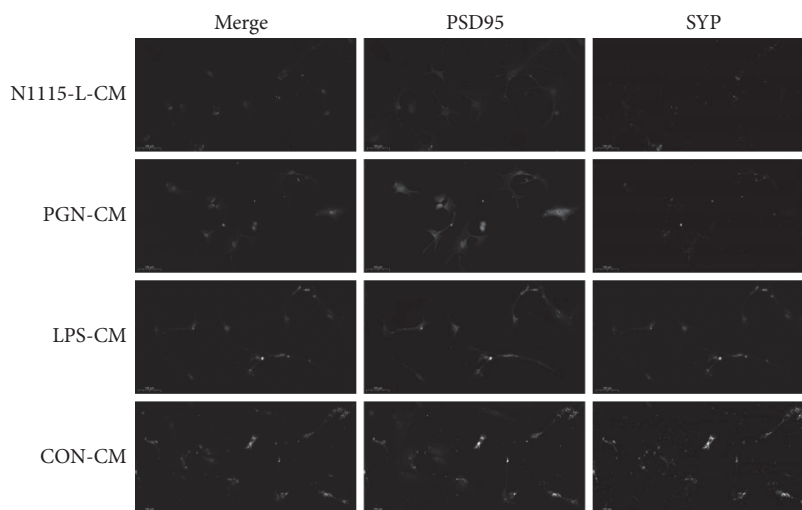
由图5可知, N1115-L-CM组突触后膜相关基因 *PSD95* 的mRNA相对表达量高于PGN-CM组($q=11.13$, $P=0.0002$)和CON-CM组($q=11.07$, $P=0.0002$), 突触前膜相关基因 *SYP* 的mRNA相对表达量高于PGN-CM组($q=7.092$, $P=0.0045$)、LPS-CM组($q=7.612$, $P=0.0029$)和CON-CM组($q=7.214$, $P=0.0029$), 差异均有统计学意义。与CON-CM组相比, LPS-CM组促进 *PSD95* 的表达($q=6.743$, $P=0.0062$), 差异均有统计学意义。

对来自三个不同样本中的50个神经细胞突触前后膜

图 5 原代海马神经细胞 *PSD95*、*SYP* 基因表达情况Fig 5 The expression of *PSD95* and *SYP* mRNA in primary hippocampal neurons

$n=3$, ^a $P<0.05$, vs. CON-CM group; ^b $P<0.05$, vs. PGN-CM group; ^c $P<0.05$, vs. LPS-CM group.

蛋白 *PSD95* 及 *SYP* 的总荧光强度进行定量后,以CON-CM组的均值为参照进行标化,结果如图6、图7所示,

图 6 原代海马神经细胞 *PSD95*、*SYP* 蛋白表达 ($\times 200$)Fig 6 *PSD95* and *SYP* protein expression in primary hippocampal neurons (original magnification $\times 200$)

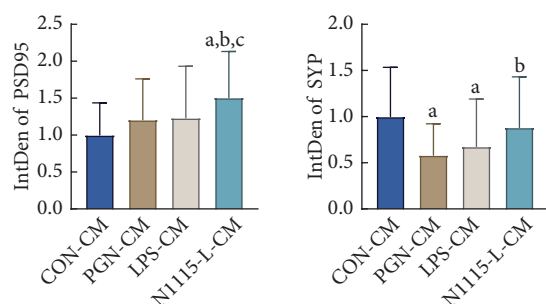


图7 原代海马神经细胞PSD95、SYP蛋白表达情况

Fig 7 The expression of PSD95 and SYP proteins in primary hippocampal neurons

$n=50$, ^a $P<0.05$, vs. CON-CM group; ^b $P<0.05$, vs. PGN-CM group; ^c $P<0.05$, vs. LPS-CM group.

N1115-L-CM组PSD95的荧光强度高于CON-CM组 ($Z=5.022$, $P<0.0001$)、PGN-CM组 ($Z=3.013$, $P=0.0155$) 和LPS-CM组 ($Z=3.100$, $P=0.0116$), 差异均有统计学意义; N1115-L-CM组SYP的总荧光强度与CON-CM组无明显差异 ($Z=1.615$, $P=0.6383$), 但高于PGN-CM组 ($Z=3.304$, $P=0.0057$)。

2.5 N1115-巨噬细胞共培养上清液对原代海马神经细胞成熟及生长发育的影响

染色后的原代海马神经细胞如图8所示, 神经细胞成熟标志物表达情况如图9所示。共培养上清液干预后, 对来自三个不同样本中的50个神经细胞进行计数, 发现N1115-L-CM组成熟神经元标志蛋白MAP-2表达高于CON-CM组 ($Z=3.376$, $P=0.0044$)、PGN-CM组 ($Z=7.398$, $P<0.0001$) 和LPS-CM组 ($Z=8.299$, $P<0.0001$), 差异均有统计学意义; N1115-L-CM组神经细胞成熟度高于PGN-CM组 ($Z=9.304$, $P<0.0001$) 和LPS-CM组 ($Z=8.526$, $P<0.0001$), 差异均有统计学意义。

原代海马神经细胞生长发育情况如图10所示, 与PGN-CM组相比, N1115-L-CM组原代海马神经细胞的突触总长度增加 ($Z=7.070$, $P<0.0001$)、突触平均长度增长 ($Z=4.017$, $P=0.0004$)、轴突长度增长 ($Z=4.352$, $P<0.0001$)、分支点数量增多 ($Z=4.379$, $P<0.0001$)、胞体面积增加 ($Z=5.300$, $P<0.0001$), 差异均有统计学意义。与LPS-CM组相比, N1115-L-CM组原代海马神经细胞的突

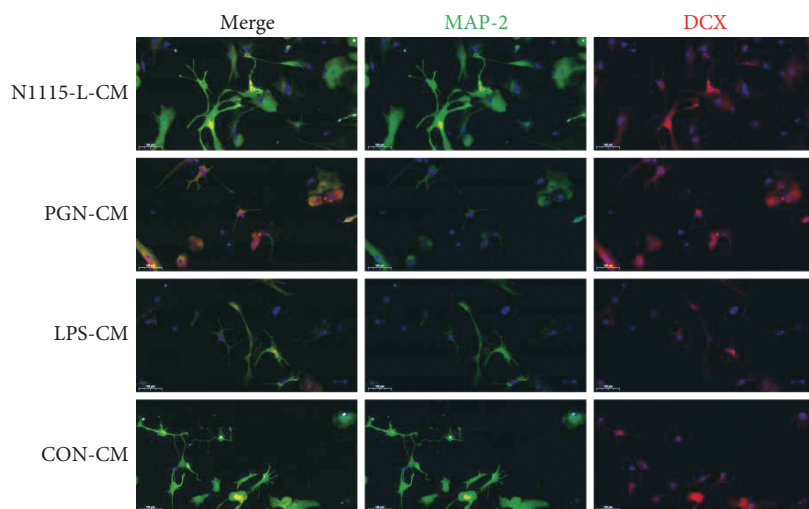
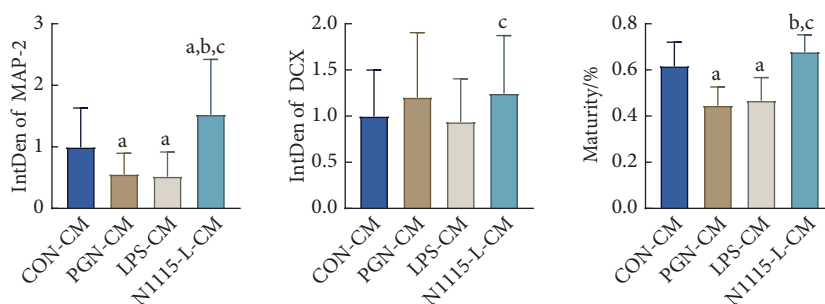
图8 原代海马神经细胞免疫荧光染色图 ($\times 200$)Fig 8 Immunofluorescent staining of primary hippocampal neurons (original magnification $\times 200$)

图9 原代海马神经细胞MAP-2、DCX蛋白表达情况

Fig 9 The expression of MAP-2 and DCX proteins in primary hippocampal neurons

$n=50$, ^a $P<0.05$, vs. CON-CM group; ^b $P<0.05$, vs. PGN-CM group; ^c $P<0.05$, vs. LPS-CM group.

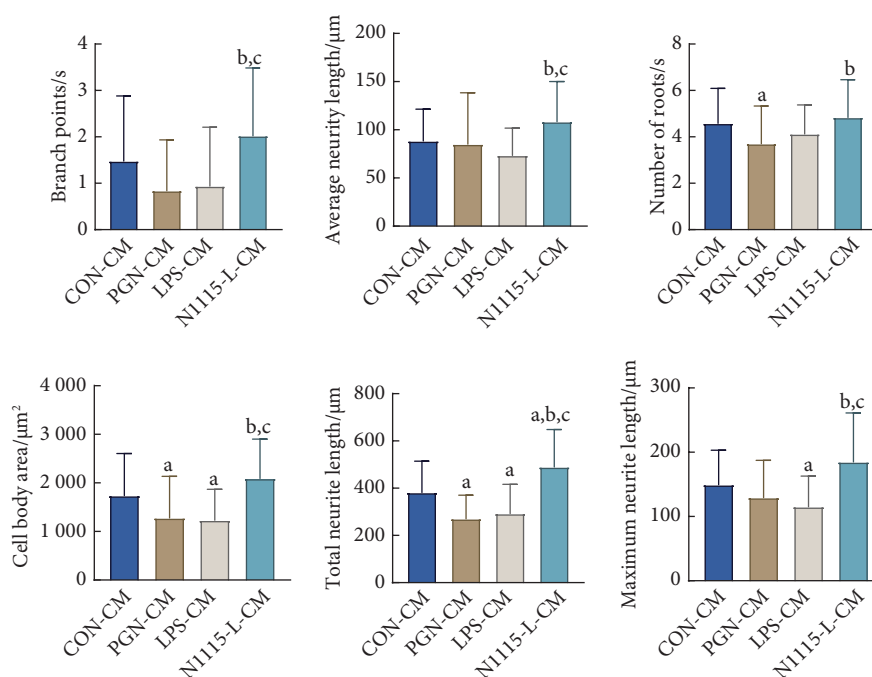


图 10 CMs对原代海马神经细胞生长发育的影响

Fig 10 Effect of CMs on the growth of primary hippocampal neurons

$n=50$, ^a $P<0.05$, vs. CON-CM group; ^b $P<0.05$, vs. PGN-CM group; ^c $P<0.05$, vs. LPS-CM group.

触总长度增加($Z=6.441$, $P<0.0001$)、突触平均长度增长($Z=4.677$, $P<0.0001$)、轴突长度增长($Z=5.299$, $P<0.0001$)、分支点数量增多($Z=4.115$, $P=0.0002$)、胞体面积增加($Z=5.316$, $P<0.0001$), 差异均有统计学意义。N1115-L-CM组原代海马神经细胞根数量高于PGN-CM组($Z=3.836$, $P=0.0008$), 差异有统计学意义; 但与LPS-CM组相比差异无统计学意义。

与CON-CM组相比, N1115-L-CM组细胞的突触总长度增长($Z=3.151$, $P=0.0097$), 差异有统计学意义; 突触平均长度、轴突长度、胞体面积、根数量及分支点数量有上升的趋势, 但差异无统计学意义; PGN-CM及LPS-CM干预后这些指标均呈现出下降的趋势, 提示LPS-CM组过高的细胞因子浓度及PGN-CM组过低的细胞因子浓度均未促进神经细胞的生长发育。

3 讨论

副干酪乳酪杆菌N1115分离自内蒙古地区传统奶酪制品, 具有耐酸耐胆盐特性, 对肠黏膜具有较好的保护作用^[14]。副干酪乳酪杆菌N1115活菌干预RAW264.7细胞的量在一定范围内存在剂量-反应关系, 本研究发现在菌量: 细胞量为100:1时, 细菌的免疫活化效果最显著。本研究发现, N1115激活巨噬细胞产生的细胞因子主要是TNF- α 和IL-6, 对IL-10和IL-1 β 的激活能力较弱。LPS对TNF- α 的激活能力与N1115活菌相当, 但对IL-6、IL-10和

IL-1 β 的激活能力远远高于N1115活菌, 而PGN对巨噬细胞几乎没有激活能力, 仅能诱导RAW264.7细胞产生少量的TNF- α 。上述结果提示LPS、PGN以及N1115活菌刺激巨噬细胞分泌细胞因子的组成和浓度存在较大差异。基于细胞因子是神经系统与免疫系统相互交流的重要中介, 推测这种细胞因子的差异可能会对后续原代海马神经细胞的发育产生较大影响, 并进一步使用各组差异的免疫活化产物开展的干预实验证实了上述推测。

突触是传递神经元信息的重要通道, 与其相关的重要蛋白标志物为突触后致密蛋白PSD95和突触生长蛋白SYP。大量研究表明, PSD95和SYP在突触的结构、功能和可塑性等方面发挥着重要的作用^[15]。本研究发现, N1115活菌-巨噬细胞共培养上清液促进了神经细胞的突触发育; 值得注意的是, LPS-巨噬细胞共培养上清液同样促进了神经细胞的PSD95表达, 提示PSD95的表达可能与机体炎症过程密切相关, 有必要对不同细胞因子的单独作用及协同作用展开深入研究。通过促进突触形成和增强突触传递, 副干酪乳酪杆菌N1115可能有助于形成神经网络, 并参与海马内的信息处理。这些结构和功能上的变化很可能是机体学习和记忆改善的基础。

原代海马神经细胞由未成熟到成熟的过程中会表达不同的标志蛋白, 其中, MAP-2在成熟神经细胞中显著表达, DCX在新生神经元的胞质和突起上显著表达^[16]。本研究发现, N1115-L-CM干预后, 神经细胞MAP-2表达显

著升高,神经细胞成熟度较CON-CM组也有升高的趋势,而PGN-CM及LPS-CM干预后显著抑制了原代海马神经细胞的成熟。N1115-L-CM中特异的细胞因子构成及浓度促进了神经细胞成熟。

神经细胞突触的长短、突起数量的多少、分支点的形成及胞体面积等指标是评估神经细胞生长发育状况的最直观指标。本研究发现,N1115-L-CM对神经细胞的发育有一定促进作用。受限于较短的共培养时间,N1115-L-CM干预后,仅突触总长度与CON-CM组相比显著增高,而其余指标均呈现出上升趋势。与两阳性对照组比较后,N1115-L-CM组原代海马神经细胞的突触总长度、突触平均长度及轴突长度增长、分支点数量增多、神经细胞面积增加,说明阳性对照产生的免疫活化产物并未对原代海马神经细胞产生正向促进作用,甚至出现了一定的抑制趋势。这些结果提示副干酪乳酪杆菌N1115对神经细胞生长发育的促进作用与其刺激巨噬细胞分泌细胞因子的组成及浓度有关。大量研究中提到^[17-20],适当浓度的IL-6、IL-1 β 、IL-10、TNF- α 作用于神经元,可对神经细胞起支持和保护作用,起作用的机制包括激活Jak2/Stat3、MAPK和NF- κ B等信号通路;而过量的细胞因子往往导致神经炎症、神经元凋亡和突触损伤。本研究进一步支持了适宜浓度细胞因子对神经细胞发育起到促进作用的观点。

既往研究显示,益生菌诱导RAW264.7细胞产生细胞因子依赖菌体细胞壁和其RNA、DNA等成分,不会造成强烈的炎症反应^[21],与本研究观察到的结果一致。相比于单一开展某一种细胞因子或人为进行细胞因子组合研究,本研究模拟人体脑-肠轴中的免疫交流途径,开展益生菌诱导的免疫活化产物整体促进神经细胞发育的体外研究更符合生理规律,同时,这一生理促进过程可能是课题组前期观察到的副干酪乳酪杆菌N1115改善动物焦虑和抑郁症状的潜在机制^[11]。基于“微生物-肠-脑轴”理论,已有研究证实某些细菌可能作为治疗神经系统疾病的潜在药物,活菌药开发正逐渐成为研究者关注的重点^[22]。本研究所观察到的副干酪乳酪杆菌N1115活化免疫功能可能是神经系统相关疾病新型活菌药物开发的新靶点,相关活菌药物可能发挥相应的治疗效果,并有助于改善患者预后。

综上,本研究创新性地构建了副干酪乳酪杆菌N1115-RAW264.7细胞-原代海马神经细胞共培养模型,并首次将含有益生菌免疫活化产物的共培养上清液干预海马原代神经细胞,证明了共培养上清液中适宜的细胞因子浓度促进了原代海马神经细胞的发育,对突触前后

膜相关蛋白PSD95和SYP的表达、神经细胞的成熟及形态发育有显著促进作用。本研究结果可为益生菌介导免疫促进神经发育的作用和机制研究、以及其在免疫和脑健康功能食品中的应用、神经系统相关疾病的活菌药物开发提供科学依据,并为微生物-肠-脑轴理论的体外模型提供参考。

* * *

作者贡献声明 周志谟负责论文构思、数据审编、正式分析、研究方法和初稿写作,贾雯、陈菲、刘美汛、王凯和柳鉴修负责调查研究、可视化和审读与编辑写作,沈曦和何方负责监督指导和审读与编辑写作,程如越负责论文构思、经费获取、研究项目管理、监督指导和审读与编辑写作。所有作者已经同意将文章提交给本刊,且对将要发表的版本进行最终定稿,并同意对工作的所有方面负责。

Author Contribution ZHOU Zhimo is responsible for conceptualization, data curation, formal analysis, methodology, and writing--original draft. JIA Wen, CHEN Fei, LIU Meixun, WANG Kai, and LIU Jianxiu are responsible for investigation, visualization, and writing--review and editing. SHEN Xi and HE Fang are responsible for supervision and writing--review and editing. CHEGN Ruyue is responsible for conceptualization, funding acquisition, project administration, supervision, and writing--review and editing. All authors consented to the submission of the article to the Journal. All authors approved the final version to be published and agreed to take responsibility for all aspects of the work.

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Declaration of Conflicting Interests All authors declare no competing interests.

参 考 文 献

- [1] AGIRMAN G, HSIAO E Y. SnapShot: the microbiota-gut-brain axis. *Cell*, 2021, 184(9): 252. doi: 10.1016/j.cell.2021.03.022.
- [2] 刘天怡, 陈灿希, 胡泽汗. 肠道微生物与肠上皮细胞互作的免疫调节机制. *生理科学进展*, 2022, 53(6): 422-427. doi: 10.20059/j.cnki.pps.2022.11.1097.
- LIU T Y, CHEN C X, HU Z H. The immunomodulatory mechanism of the interaction between intestinal microbes and intestinal epithelial cells. *Adv Physiol Sci*, 2022, 53(6): 422-427. doi: 10.20059/j.cnki.pps.2022.11.1097.
- [3] GABANYI I, MULLERPAUL A, FEIGHERY L, *et al.* Neuro-immune interactions drive tissue programming in intestinal macrophages. *Cell*, 2016, 164(3): 378-391. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.023.
- [4] ZIPP F, BITTNER S, SCHAFER D P. Cytokines as emerging regulators of central nervous system synapses. *Immunity*, 2023, 56(5): 914-925. doi: 10.1016/j.immuni.2023.04.011.
- [5] SAHA R N, LIU X, PAHAN K. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF- α : a case for the neuroprotective role of cytokine. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2006, 1(3): 212-222. doi: 10.1007/s11481-006-9020-8.
- [6] LEIBINGER M, ANDREADAKI A, DIEKMANN H, *et al.* Neuronal STAT3 activation is essential for CNTF- and inflammatory stimulation-

- induced CNS axon regeneration. *Cell Death Dis*, 2013, 4(9): e805. doi: 10.1038/cddis.2013.310.
- [7] PARK S Y, KANG M J, HAN J S. Interleukin-1 beta promotes neuronal differentiation through the Wnt5a/RhoA/JNK pathway in cortical neural precursor cells. *Mol Brain*, 2018, 11(1): 39. doi: 10.1186/s13041-018-0383-6.
- [8] HE X H, ZANG Y, CHEN X, *et al*. TNF- α contributes to up-regulation of Nav1. 3 and Nav1. 8 in DRG neurons following motor fiber injury. *Pain*, 2010, 151(2): 266–279. doi: 10.1016/j.pain.2010.06.005.
- [9] SINGH S, SHARMA R K, MALHOTRA S, *et al*. Lactobacillus rhamnosus NCD17 ameliorates type-2 diabetes by improving gut function, oxidative stress and inflammation in high-fat-diet fed and streptozotocintreated rats. *Benef Microbes*, 2017, 8(2): 243–255. doi: 10.3920/BM2016.0090.
- [10] 葛林, 张瑜杰, 蒲芳芳, 等. 高脂饮食对大鼠免疫功能影响及热灭活益生菌改善作用的初探. *中国乳品工业*, 2020, 48: 4–8. doi: 10.19827/j.issn1001-2230.2020.02.001.
- GE L, ZHANG Y J, PU F F, *et al*. Effects of high-fat diet on immune function in rats and improvement of heat-inactivated probiotics. *China Dairy Ind*, 2020, 48: 4–8. doi: 10.19827/j.issn1001-2230.2020.02.001.
- [11] ZHANG Y, LIANG H, WANG Y, *et al*. Heat-inactivated Lactocaseibacillus paracasei N1115 alleviates the damage due to brain function caused by long-term antibiotic cocktail exposure in mice. *BMC Neurosci*, 2022, 23(1): 38. doi: 10.1186/s12868-022-00724-w.
- [12] 周志谟, 张瑜杰, 程如越, 等. 热灭活副干酪乳酪杆菌N1115对海马神经细胞发育的影响. *营养学报*, 2024, 46(3): 289–293. doi: 10.13325/j.cnki.acta.nutr.sin.20240401.001.
- ZHOU Z M, ZHANG Y J, CHENG R Y, *et al*. The effect of heat-inactivated Lactobacillus paracasei N1115 on the development of Hippocampal nerve cells. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2024, 46(3): 289–293. doi: 10.13325/j.cnki.acta.nutr.sin.20240401.001.
- [13] 庞伟. MEK/ERK信号通路在缺锌致海马神经细胞损伤中的作用及其机制研究. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2012.
- PANG W. The role and mechanism of MEK/ERK signaling pathway in zinc deficiency-induced injury of hippocampal neurons. Beijing: PLA Academy of Military Medical Sciences, 2012.
- [14] 杨洋, 王家妮, 王一媚, 等. 杀菌型副干酪乳酪杆菌N1115发酵乳饮品对小鼠免疫功能的影响. *中国微生态学杂志*, 2023, 35: 311–316. doi: 10.13381/j.cnki.cjm.202303010.
- YANG Y, WANG J N, WANG Y M, *et al*. Effect of bactericidal Tyrobacter paracasei N1115 fermented milk beverage on immune function in mice. *Chin J Microecol*, 2023, 35: 311–316. doi: 10.13381/j.cnki.cjm.202303010.
- [15] HUANG P, LIN J, SHEN H, *et al*. PSD95 as a new potential therapeutic target of osteoarthritis: A study of the identification of Hub genes through self-contrast model. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(19): 14682. doi: 10.3390/ijms241914682.
- [16] MORENO-JIMÉNEZ E P, FLOR-GARCÍA M, TERREROS-RONCAL J, *et al*. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med*, 2019, 25(4): 554–560. doi: 10.1038/s41591-019-0375-9.
- [17] MIRABELLA F, DESIATO G, MANCINELLI S, *et al*. Prenatal interleukin 6 elevation increases glutamatergic synapse density and disrupts hippocampal connectivity in offspring. *Immunity*, 2021, 54(11): 2611–2631. doi: 10.1016/j.immuni.2021.10.006.
- [18] DELREY A, BALSCHUN D, WETZEL W, *et al*. A cytokine network involving brain-borne IL-1 β , IL-1ra, IL-18, IL-6, and TNF α operates during long-term potentiation and learning. *Brain Behav Immun*, 2013, 33: 15–23. doi: 10.1016/j.bbi.2013.05.011.
- [19] PRIETO G A, TONG L, SMITH E D, *et al*. TNF α and IL-1 β but not IL-18 suppresses hippocampal long-term potentiation directly at the synapse. *Neurochem Res*, 2019, 44(1): 49–60. doi: 10.1007/s11064-018-2517-8.
- [20] TAKEMIYA T, FUMIZAWA K, YAMAGATA K, *et al*. Brain interleukin-1 facilitates learning of a water maze spatial memory task in young mice. *Front Behav Neurosci*, 2017, 11: 202. doi: 10.3389/fnbeh.2017.00202.
- [21] KANG X, LIANG H, LUO Y, *et al*. Streptococcus thermophilus MN-ZLW-002 can inhibit pre-adipocyte differentiation through macrophage activation. *Biol Pharm Bull*, 2021, 44(3): 316–324. doi: 10.1248/bpb.b20-00335.
- [22] AĞAGÜNDÜZ D, ÇELİK E, CEMALİ Ö, *et al*. Probiotics, live biotherapeutic products (LBPs), and gut-brain axis related psychological conditions: Implications for research and dietetics. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2023, 15(4): 1014–1031. doi: 10.1007/s12602-023-10092-4.

(2024-05-20 收稿, 2024-08-30 修回)

编辑 汤洁



开放获取 本文使用遵循知识共享署名—非商业性使用 4.0 国际许可协议 (CC BY-NC 4.0), 详细信息请访问

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>。

OPEN ACCESS This article is licensed for use under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (CC BY-NC 4.0). For more information, visit <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© 2024 《四川大学学报(医学版)》编辑部 版权所有

Editorial Office of Journal of Sichuan University (Medical Sciences)