

阿克曼氏菌缓解胰腺炎所致肠道损伤的研究

黄伊雯¹, 任正楠¹, 宋东筱¹, 潘礼龙², 孙嘉^{1*}

(¹ 江南大学食品学院 江苏无锡 214122)

(² 江南大学无锡医学院 江苏无锡 214122)

摘要 目的:探究阿克曼氏菌在小鼠重症急性胰腺炎中的作用及机制。方法:将 C57BL/6J 雄性小鼠随机分成对照组、模型组、活菌和灭活菌组。通过腹腔注射雨蛙素及脂多糖建立小鼠重症急性胰腺炎模型,造模前 10 d 每天灌胃给予活菌组小鼠 200 μ L 5 \times 10⁹ CFU/mL 阿克曼氏菌活菌制剂,灭活菌组灌胃等量灭活菌制剂。检测肠道通透性及肠道紧密连接蛋白的表达情况 & 组织学变化。称量胰腺干、湿重,检测血清淀粉酶、脂肪酶活力、胰腺病理学变化,胰腺组织中细胞因子表达及胰腺中核转录因子- κ B(NF- κ B)的蛋白表达。结果:活菌组与灭活菌组小鼠较模型组小鼠相比,肠紧密连接蛋白表达增加,杯状细胞及黏液层增多。其中,活菌对肠机械屏障的保护作用更为显著。胰腺水肿缓解不明显,未能降低血清淀粉酶及脂肪酶活力,对促炎性细胞因子及炎症信号 NF- κ B 的磷酸化调控能力不足。结论:阿克曼氏菌活菌及灭活菌预处理可以保护重症急性胰腺炎引起的肠道屏障损伤,然而,无法减轻小鼠的重症急性胰腺炎。

关键词 阿克曼氏菌;重症急性胰腺炎;肠道屏障

文章编号 1009-7848(2022)10-0153-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.10.017

急性胰腺炎(Acute pancreatitis, AP)是一类急性消化类疾病,发病原因主要有酗酒、胆结石、代谢异常等。据估计,全球每 10 万人中 AP 的发病率达 33.74 例,死亡率达 1.6 例,表明 AP 具有很高的发病率与死亡率^[1]。根据严重程度,AP 可分为轻症胰腺炎(Mild acute pancreatitis, MAP)与重症胰腺炎(Severe acute pancreatitis, SAP),主要取决于胰腺及其周围局部损伤的程度,同时也取决于对远端器官的全身性损伤^[2]。在 MAP 发生时,没有严重的局部和全身性并发症,而约 20%的 MAP 患者会发展为更严重的 SAP,并伴有坏死等明显的局部并发症,以及全身炎症反应综合征和多器官功能障碍综合征^[3]。

在 SAP 动物模型和临床患者中均发现肠屏障损伤。在大鼠中,SAP 诱导后的早期,肠道通透性增加,肠道吸收能力降低,并伴有系统性血容量不足和肠道局部缺血^[4]。肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor, TNF- α)等炎性因子的瀑布式释放,会导致肠黏膜缺血再灌注损伤,最终产生严重的氧化应激、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)途径

的激活和肠黏膜的严重凋亡^[5-6]。同时,肠道生物屏障也遭到破坏,并进一步引起肠道细菌和内毒素发生移位。这不仅会加速败血症的进程,引起坏死组织感染,还会诱发和加重全身炎症反应综合征及多器官功能障碍,甚至引起死亡^[7]。有研究证明,SAP 疾病发生前使用益生菌保护肠道屏障,可有效缓解 SAP 发病进程^[8],因此在治疗原发病的同时,对肠道损伤的保护至关重要。

人体和动物肠道内存在数量庞大的微生物群,它们黏附在肠黏膜表面,构成生物屏障,宿主与肠道微生物群之间的相互作用一直是生命健康领域的研究热点^[9]。肠道菌群主要由专性厌氧菌、兼性厌氧菌和需氧菌组成,其中专性厌氧菌占 99%以上^[10]。阿克曼氏菌(*Akkermansia muciniphila*, *A. muciniphila*)是一种革兰氏阴性的严格厌氧菌,可在降解宿主黏蛋白的同时释放氨基酸或单糖,产生短链脂肪酸(Short chain fatty acids, SCFAs),为肠道中共生菌群提供营养^[11],这提示阿克曼氏菌摄入对肠道菌群具有调节作用。此外,阿克曼氏菌可调节 Toll 样受体(TLR)通路,通过增强肠道屏障减少内毒素脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)泄露进入循环^[12-13]。有研究表明,阿克曼氏菌在缓解或治疗肥胖、2 型糖尿病和酒精性脂肪肝等疾病时,具有显著作用^[13-16]。还有研究表明,外源给予

收稿日期:2021-10-03

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81870439)

作者简介:黄伊雯(1996—),女,硕士生

通信作者:孙嘉 E-mail: jiasun@jiangnan.edu.cn

SCFAs 及生产 SCFAs 的益生菌,可缓解小鼠 AP 发病进程^[8-17]。作为 SCFAs 生产菌,阿克曼氏菌是否对 AP 具有潜在调节作用,尚不清楚。此外,有大量研究证明巴氏消毒后的阿克曼氏菌,可以保留一些阿克曼氏菌活菌中活性分子的有益作用。例如,阿克曼氏菌的外膜蛋白 Amuc_1100 在 70 °C 加热处理后仍有热稳定性,它几乎能够复制所有的阿克曼氏菌活菌的作用^[18-19]。本文旨在探究阿克曼氏菌活菌及灭活菌制剂对雨蛙素诱导的小鼠 SAP 的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物、菌株与试剂

实验动物 C57BL/6J,江苏集萃药康生物科技公司,动物实验已获得江南大学动物伦理委员会批准(伦理号 JN.No20190915c0401020[204]),并严格遵循国家以及国际动物实验伦理原则,由江南大学提供饲养条件。阿克曼氏菌(*A. muciniphila*) MucT(ATTC BAA-835),美国的模式培养物集存库;脑心浸液培养基,中国青岛海博公司;Ⅲ型粘蛋白、雨蛙素、异硫氰酸酯-葡聚糖,美国 Sigma-Aldrich 公司; α -淀粉酶测试盒、脂肪酶测试盒,中国南京建成生物研究所;AB-PAS 染色试剂盒,北京索莱宝公司;TRIzol 试剂、Super Script II 逆转录酶,加拿大 Invitrogen 公司;SYBR Green Supermix 染料,上海翌圣生物科技有限公司;苏木精、伊红染色剂,中国南昌雨露实验器材有限公司;p-NF- κ B p65 抗体,美国 Cell Signaling Technology 公司;NF- κ B p65 抗体,美国 Bioass 公司;乙醇、氯仿、异丙醇,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

厌氧工作站,英国 DWS 公司;4 °C 冷冻离心机、全波长酶标仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;切片电子扫描仪,匈牙利 3DHISTECH 公司;超声波破碎仪,美国 Sonics 公司;电子数显恒温水浴锅,中国深仪科技公司;高通量组织研磨机,宁波新芝生物科技股份有限公司;石蜡包埋机、手动轮转切片机,德国徕卡公司;多功能酶标仪 Infinite M200 仪器,瑞士 Tecan 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株制备 阿克曼氏菌 MucT(ATTC BAA-

835) 被严格厌氧培养在添加 20 g/L Ⅲ型粘蛋白的脑心浸液培养基中。将对数生长期的菌液,4 °C,8 000×g 离心 10 min,去上清,用无菌生理盐水将菌泥洗涤 2 次,重悬菌泥于 30%甘油中,-80 °C 冰箱保存。使用前将菌液用无菌生理盐水稀释至含 3%甘油的 5×10⁹ CFU/mL 的菌液后水浴锅 37 °C,活化 30 min 备用。灭活阿克曼氏菌制剂于灌胃前进行 70 °C,30 min 巴氏杀菌处理。

1.3.2 动物模型 将 8 周龄左右的雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、活菌和灭活菌组。每组 6 只。为了验证阿克曼氏菌的生物学作用,在建立 SAP 模型前,采用连续 10 d 灌胃的方式给予活菌组小鼠 200 μ L 含 3%甘油的 5×10⁹ CFU/mL 阿克曼氏菌液,灭活菌组小鼠 200 μ L 含 3%甘油的 5×10⁹ CFU/mL 经 70 °C,30 min 巴氏杀菌处理的阿克曼氏菌液。其余两组每日灌胃 200 μ L 含 3%甘油的无菌生理盐水。第 11 天建立 SAP 模型:小鼠连续 13 次腹腔注射雨蛙素(50 μ g/kg),每次注射间隔 1 h,注射完第 13 针雨蛙素后立即注射 1 针 LPS(20 mg/kg)。3 h 后处死小鼠,并迅速收集血液、胰腺、结肠等样本。

1.3.3 胰腺组织水肿测定 取部分胰腺组织,称量新鲜胰腺样品湿重(Wet weight,ww)及 80 °C 烘干 48 h 后胰腺样品干重(Dry weight,dw),评估胰腺组织水肿程度。计算胰腺组织水含量的百分比(ww/dw)。

1.3.4 血清淀粉酶、脂肪酶测定 收集新鲜血液于采血管,室温静置 1 h,经 3 000×g,15 min 离心后得到血清样品,冻存于-80 °C 备用。血清淀粉酶采用 α -淀粉酶测试盒进行测定。使用比色法在 660 nm 波长处检测其吸光值,根据给定公式计算血清淀粉酶的含量。血清脂肪酶按说明书步骤测定,使用酶标仪于 420 nm 波长处比浊,测定脂肪酶的活性。

1.3.5 组织形态学分析 剪取一定大小、长度的新鲜胰腺组织,迅速置于 4%的中性多聚甲醛中固定 12~24 h 左右,经常规流程对组织使用浓度梯度乙醇脱水和二甲苯透明。然后用切片石蜡进行包埋后制成蜡块,随后将组织进行切片,逐级脱蜡复水后进行续染色。本实验采用苏木精-伊红染色(Hematoxylin-eosin staining,H&E)法来观察结肠

及胰腺组织形态,观察腺泡细胞损失及炎性细胞浸润情况。使用阿利新蓝-过碘酸雪夫氏染色(Alcian blue-periodic acid Schiff,AB-PAS)观察结肠组织中杯状细胞及黏液层情况。

1.3.6 肠道通透性测定 小鼠肠道通透性检测通过荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖(Fluorescein isothiocyanate-Dextran,FITC-Dextran)来检测。小鼠处死前,禁食 4 h,随后灌胃 500 mg/kg 的 FITC-Dextran。灌胃 4 h 后处死,避光快速收集血液并离心得到血清。使用多功能酶标仪在激发波长 492 nm,发射波长 525 nm 下测定吸光度。通过连续稀释 FITC-Dextran 溶液制作标准曲线,并换算血清中的 FITC-Dextran 浓度。

1.3.7 胰腺 RNA 提取与实时荧光定量 PCR 分析

采用 TRIzol 提取方法提取小鼠胰腺、结肠中的总 RNA,使用 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒将所提 RNA 反转为 cDNA,测定 RNA 和 cDNA 的浓度。以 cDNA 为模板,骨架蛋白 β -actin 为内参,Fast SYBR Green Master Mix 混合体系,进行实时定量 PCR 实验。引物设计见表 1。反应体系为:2 \times SYBR Green Supermix,10 μ L;上游引物(10 μ mol/L)、下游引物(10 μ mol/L),1 μ L;模板 1 μ L;ddH₂O 7 μ L。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;95 $^{\circ}$ C 变性 15 s;58 $^{\circ}$ C 退火 30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min;2~4 步循环 40 次,4 $^{\circ}$ C 降温 5 min。

表 1 实时荧光定量 PCR 使用的特异性引物

Table 1 Specific primers for qRT-PCR

基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
<i>il1b</i>	CTGAACCTCAACTGTGAAATGC	TGATGTGCTGCTGCGAGA
<i>il6</i>	TAGTCCTTCTACCCCAATTTC	TGGTCTTAGCCACTCCTTC
<i>Tnfa</i>	AGGGTCTGGGCCATAGAACT	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC
<i>Tjp1</i>	GCCGCTAAGAGCACAGCAA	TCCCCACTCTGAAAATGAGGA
<i>TJP2</i>	ATGGGAGCAGTACACCGTGA	TGACCACCCTGTCATTTTCTTG
<i>Actb</i>	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

1.3.8 Western blot 分析 将胰腺组织置于 RIPA 裂解液中制备组织匀浆,4 $^{\circ}$ C,14 000 \times g 条件下离心 15 min,取上清液用于免疫印迹分析。采用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白浓度分析。等量蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后,电转印到硝酸纤维素膜上,封闭后,用 NF- κ B p65、p-NF- κ B p65 抗体进行过夜孵育。随后用辣根过氧化物酶偶联的抗兔抗体室温孵育 1.5 h,采用 ECL 试剂盒进行显色,于 Bio-Rad 凝胶成像系统中曝光观察。

1.3.9 统计分析 所有数据均表示为“平均值 \pm 标准差”。使用单因素方差分析(One-way ANOVA)对各组之间的显著性差异进行评估,将数据导入 GraphPad Prime 7 统计学软件进行专业统计分析(*. $P < 0.05$,**. $P < 0.01$,***. $P < 0.001$)。

2 结果与分析

2.1 阿克曼氏菌保护重症急性胰腺炎引起的肠屏障损伤

肠道菌群紊乱与多种胃肠道相关疾病的发病机制都存在一定关联性,例如,肠炎疾病和肠易激综合征^[20],以及一些其它疾病,如代谢综合征、肥胖、糖尿病和胰腺相关的疾病,肠道菌群的干预可以作为预防或治疗这些疾病的有效方法^[21-24]。以往研究已经表明,SAP 小鼠的肠道屏障会发生一定程度的损伤。结肠病理学切片显示(图 1a),SAP 组小鼠肠黏膜上皮变宽,绒毛顶端上皮脱落。这种结肠损伤在阿克曼氏菌干预的活菌及灭活菌小鼠中得到缓解。通过灌胃 FITC-dextran 检测小鼠结肠黏膜通透性。如图 1b 所示,模型小鼠血清中 FITC-dextran 浓度大幅度增加,活菌和灭活菌组与模型组小鼠相比,小鼠血清中 FITC-dextran 浓度则显著降低。表明阿克曼氏菌的干预可以保护屏障,减少泄露。此外也通过测定小鼠结肠上皮中紧密连接(Tight junctions,TJs)蛋白 ZO-1(*Tjp1*)和 ZO-2(*Tjp2*)的表达,探究阿克曼氏菌是否能调节小鼠 SAP 模型中的肠屏障功能。结果表明(图

1c 和图 1d),ZO-1 和 ZO-2 在雨蛙素诱导的 SAP 小鼠中的基因表达水平出现不同程度的降低。阿克曼氏菌活菌干预后,大幅度上调了 ZO-1 和 ZO-2 的表达,灭活的阿克曼氏菌也使得 ZO-2 的

基因水平上升。这些结果表明,阿克曼氏菌可以增强 SAP 结肠中小鼠的 TJs, 保护肠道机械屏障损伤。

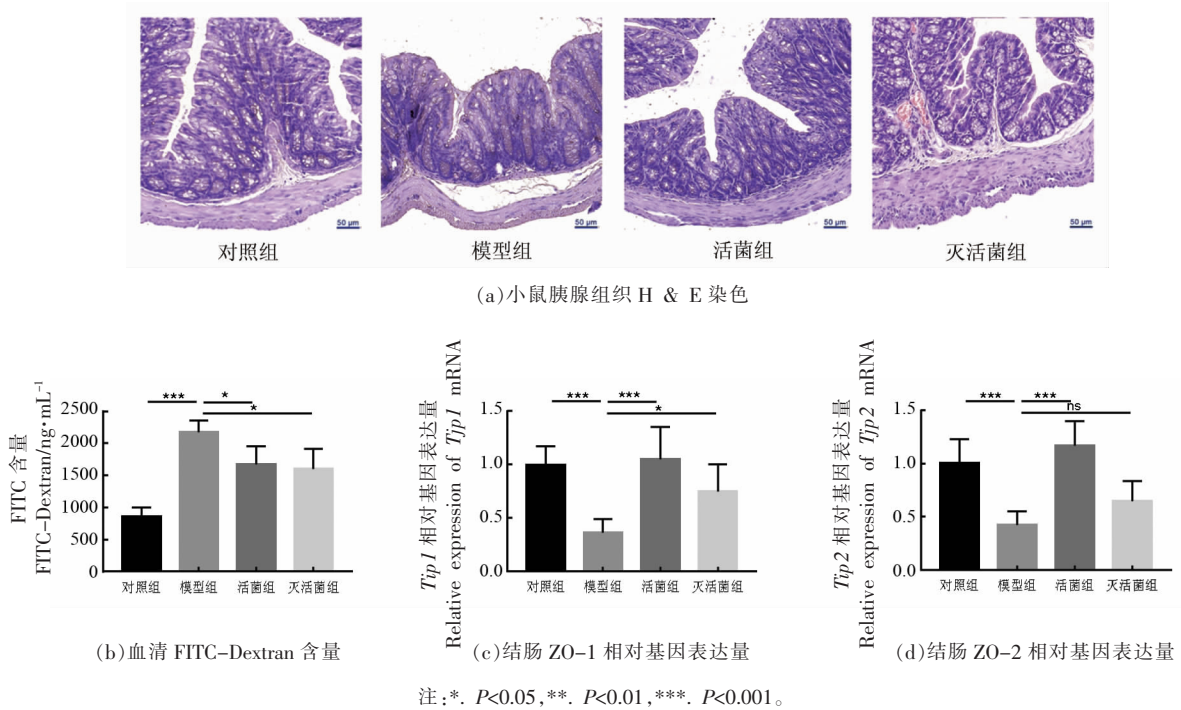


图 1 阿克曼氏菌干预对 SAP 相关的肠屏障影响

Fig.1 Effect of *A. muciniphila* treatment on the SAP-associated intestinal barrier

2.2 阿克曼氏菌恢复肠道黏液层破坏

阿克曼氏菌能刺激杯状细胞, 增加黏蛋白 MUC2 和三叶因子 (Recombinant trefoil factor 2, TFF2) 的表达,同时增加肠黏液层的厚度^[25]。本实验使用 AB-PAS 染色结肠组织(图 2),结果显示

SAP 造模组杯状细胞和黏液层破坏严重。阿克曼氏菌活菌干预后,可增加杯状细胞数量,恢复黏液层含量。灭活菌也具有一定的作用,活菌组效果更为显著。

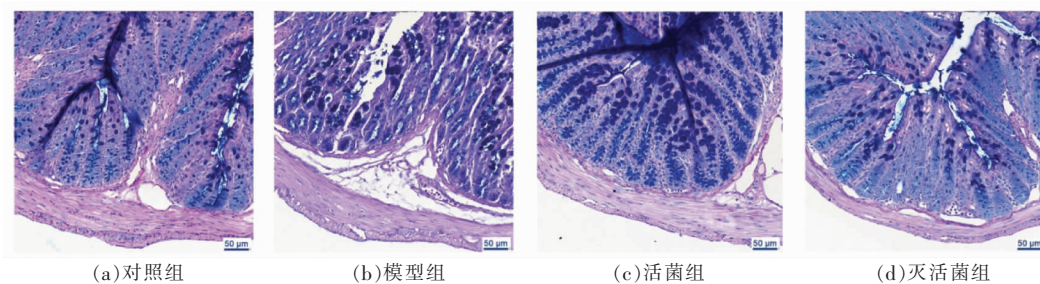


图 2 阿克曼氏菌干预对结肠黏液层影响

Fig.2 Effects of *A. muciniphila* treatment on colonic mucous layer

2.3 阿克曼氏菌无法缓解重症急性胰腺炎症状发生 SAP 时,包括中性粒细胞在内的免疫细

胞的募集和浸润,引起胰腺组织水肿。为了探究阿克曼氏菌预处理在 SAP 发生时是否发挥作用,首

先检测了雨蛙素与 LPS 联合建立的 SAP 小鼠模型中胰腺组织的水肿情况。利用 H&E 染色观察胰腺组织的形态(图 3a),发现对照组小鼠胰腺形态完整,实质率高,未出现水肿、坏死及免疫细胞浸润的情况;与之相比,SAP 组小鼠胰腺组织间质间隙增大,内部结构紊乱,胰腺腺泡细胞明显肿胀并出现部分坏死,组织间隙及实质内出现明显的免疫细胞浸润,胰腺组织损伤严重。阿克曼氏菌活菌与灭活菌预处理后,与模型组小鼠相比,腺泡细胞坏死程度、免疫细胞浸润及胰腺组织的间质水肿均未得到改善。如图 3b 所示,使用胰腺组织湿重与干重比值,评估胰腺组织水肿程度。模型组小鼠

与对照组相比,胰腺水肿程度显著增加,阿克曼氏菌活菌与灭活菌干预均无法改善小鼠的水肿程度。

同时,由于胰蛋白酶原异常激活,胰腺腺泡细胞遭到破坏,胰腺分泌的淀粉酶和脂肪酶大量进入血液,导致血清淀粉酶和脂肪酶升高。图 3c 和 3d 所示,在 SAP 模型建立后,血清淀粉酶及脂肪酶活力显著升高,活菌和灭活菌组较模型组而言,并未降低二者在血清中的水平。总之,研究认为阿克曼氏菌的活菌与灭活菌预处理均不能缓解 SAP 的症状。

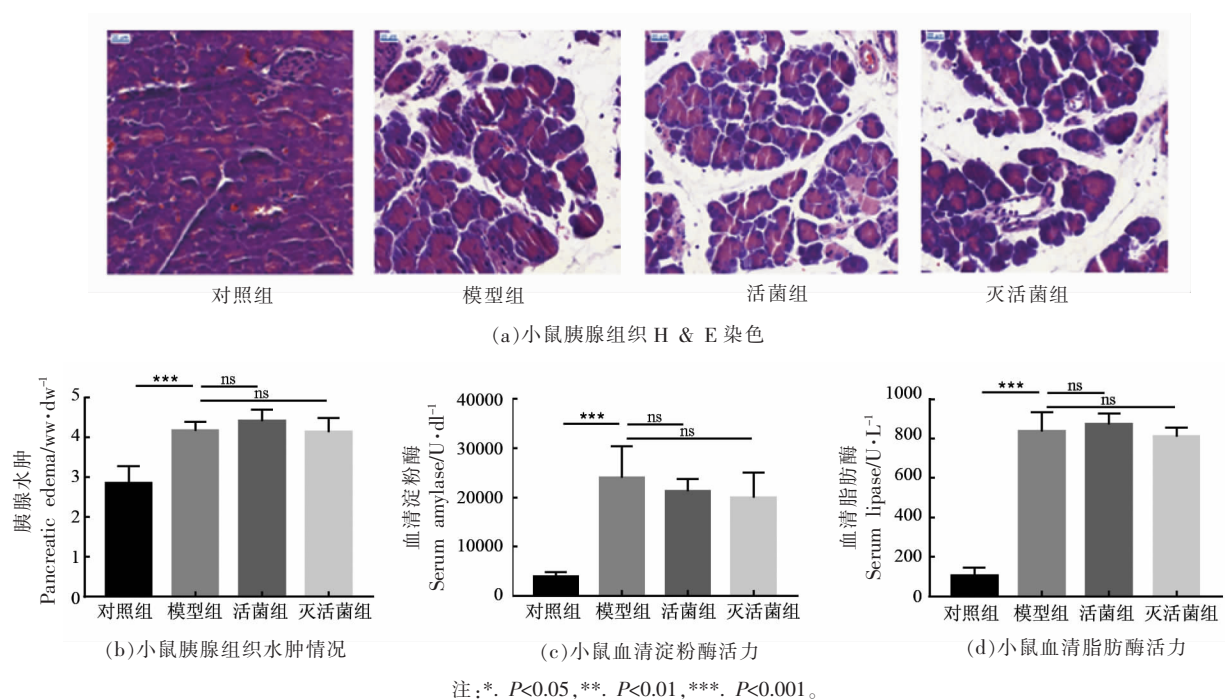


图 3 阿克曼氏菌无法缓解重症急性胰腺炎症状

Fig.3 *A. muciniphila* cannot relieve severe acute pancreatitis symptoms

2.4 阿克曼氏菌无法调节重症急性胰腺炎过程中炎症因子的释放

SAP 发生后引起一系列炎症级联反应。在这个反应过程中,受损的腺泡细胞释放大量炎症因子,并募集大量免疫细胞浸润至病灶中。而这些浸润的细胞则会产生更多的炎症因子,加重局部和整体性的炎症反应^[26-27]。利用实时荧光定量 PCR 测定了胰腺组织中几种常见炎症因子。如图 4 所示,模型组小鼠胰腺组织中的炎症因子白细胞介

素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、TNF- α 和白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6) 基因表达水平显著升高,约为对照组的 4~10 倍,说明 SAP 小鼠出现了明显的系统性炎症反应。两组阿克曼氏菌的活菌与灭活菌预处理均无法调节胰腺局部炎症因子。

2.5 阿克曼氏菌无法抑制胰腺组织中 NF- κ B 的激活

在 AP 发生的早期阶段,核转录因子- κ B (Nuclear factor- κ B, NF- κ B) 立即作出应答,并导致下

游炎症因子大量释放。组织中大量分泌的炎症介质同时又作为 NF- κ B 的诱导剂,由此形成恶性循环,加重胰腺损伤^[28]。检测了 NF- κ B (p-NF- κ B p65) 的表达情况,如图 5 所示,模型组 p-NF- κ B

p65 高表达,活菌和灭活组 NF- κ B p65 磷酸化水平较模型组没有显著性差异。这证明阿克曼氏菌的干预不能通过调控 NF- κ B 信号通路,从而调节胰腺的炎症进程。

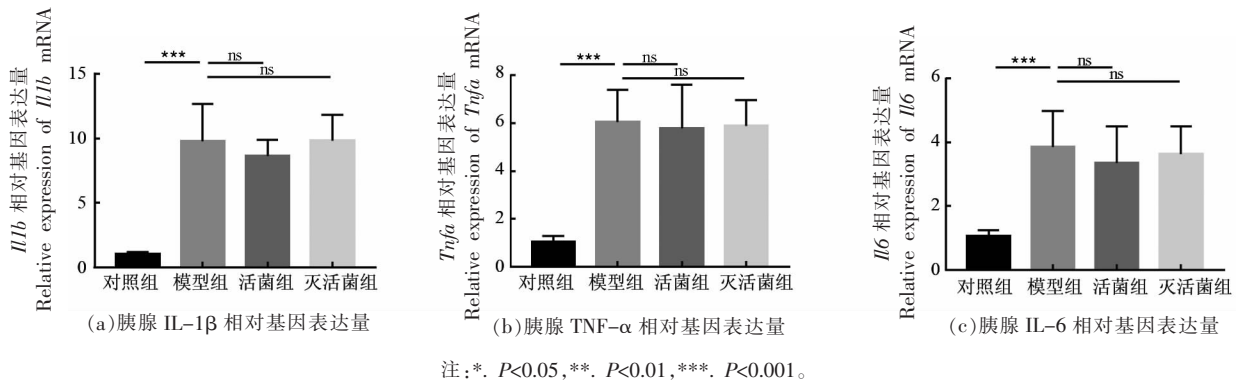


图 4 小鼠胰腺组织中 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的基因表达水平

Fig.4 The levels of IL-1 β , TNF- α and IL-6 in mouse pancreas tissue

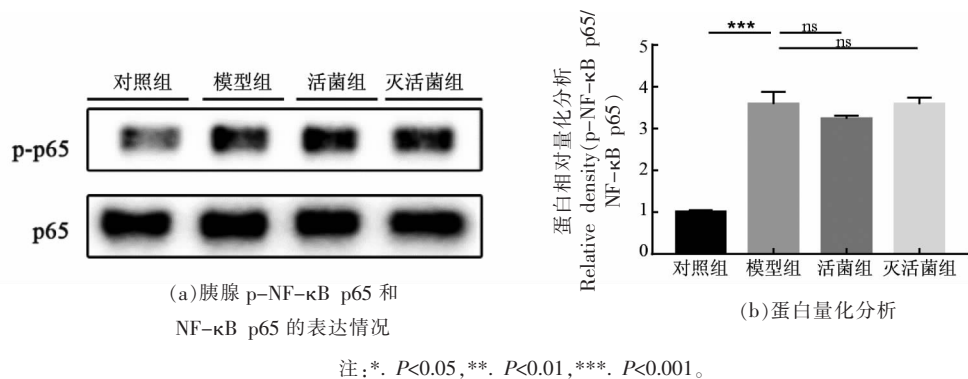


图 5 阿克曼氏菌的干预对胰腺 NF- κ B 信号的影响

Fig.5 The effect of *A. muciniphila* treatment on NF- κ B in pancreas

3 结论

本文通过反复注射雨蛙素并佐以 LPS 的方式建立模型,灌胃阿克曼氏菌活菌及灭活菌制剂。小鼠灌胃阿克曼氏菌后,与模型组相比,小鼠肠道屏障得到保护,紧密连接蛋白表达量增加,肠屏障泄露减少,杯状细胞及黏液层增多,活菌的保护效果较灭活菌更为显著。然而,胰腺的水肿情况、血清淀粉酶及血清脂肪酶升高的情况并未改善,也未能逆转 SAP 发生时,炎症因子的增加及 NF- κ B 信号的激活。

在本研究中,发现阿克曼氏菌虽然能够增强肠道屏障功能,但未能表现出对 SAP 的缓解作

用。SAP 作为一种急性炎症性疾病,已经证明能通过肠道屏障的恢复以及 SCFAs 的补充来缓解发病进程。阿克曼氏菌作为一种可增加肠道黏液层厚度且产 SCFAs 的益生菌,在 T1D 及 T2D 中已被验证有益效果,然而需要长期干预才能发挥作用。延长阿克曼氏菌的预防干预时间或干预慢性疾病,如慢性胰腺炎,或许能进一步挖掘阿克曼氏菌的有益作用。

参 考 文 献

- [1] XIAO A Y, TAN M L, WU L M, et al. Global incidence and mortality of pancreatic diseases: A sys-

- tematic review, meta-analysis, and meta-regression of population-based cohort studies[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2016, 1(1): 45-55.
- [2] BANKS P A, BOLLEN T L, DERVENIS C, et al. Classification of acute pancreatitis--2012: Revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus[J]. *Gut*, 2013, 62(1): 102-111.
- [3] MOFIDI R, DUFF M D, WIGMORE S J, et al. Association between early systemic inflammatory response, severity of multiorgan dysfunction and death in acute pancreatitis[J]. *Br J Surg*, 2006, 93(6): 738-744.
- [4] ANDERSSON R, WANG X, IHSE I. The influence of abdominal sepsis on acute pancreatitis in rats: A study on mortality, permeability, arterial pressure, and intestinal blood flow[J]. *Pancreas*, 1995, 11(4): 365-373.
- [5] TIAN R, TAN J T, WANG R L, et al. The role of intestinal mucosa oxidative stress in gut barrier dysfunction of severe acute pancreatitis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(3): 349-355.
- [6] MIKAMI Y, DOBSCHÜTZ E V, SOMMER O, et al. Matrix metalloproteinase-9 derived from polymorphonuclear neutrophils increases gut barrier dysfunction and bacterial translocation in rat severe acute pancreatitis[J]. *Surgery*, 2009, 145(2): 147-156.
- [7] DENG W S, ZHANG J, JU H, et al. Arpin contributes to bacterial translocation and development of severe acute pancreatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(14): 4293-4301.
- [8] PAN L L, NIU W, FANG X, et al. *Clostridium butyricum* strains suppress experimental acute pancreatitis by maintaining intestinal homeostasis[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2019, 63: e1801419.
- [9] FLINT H J, SCOTT K P, LOUIS P, et al. The role of the gut microbiota in nutrition and health[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 9(10): 577-589.
- [10] OZAWA A, SAWAMURA S, NAGAO T, et al. Ecological investigation on intestinal bacterial flora of patients nursed in protected environmental units[J]. *Tokai J Exp Clin Med*, 1980, 5(1): 97-112.
- [11] DERRIEN M, VAUGHAN E E, PLUGGE C M, et al. *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(Pt 5): 1469-1476.
- [12] DERRIEN M, BELZER C, DE VOS W M. *Akkermansia muciniphila* and its role in regulating host functions[J]. *Microb Pathog*, 2017, 106: 171-181.
- [13] PLOVIER H, EVERARD A, DRUART C, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurized bacterium improves metabolism in obese and diabetic mice[J]. *Nat Med*, 2017, 23(1): 107-113.
- [14] HANNINEN A, TOIVONEN R, POYSTI S, et al. *Akkermansia muciniphila* induces gut microbiota remodelling and controls islet autoimmunity in NOD mice[J]. *Gut*, 2018, 67(8): 1445-1453.
- [15] GRANDER C, ADOLPH T E, WIESER V, et al. Recovery of ethanol-induced *Akkermansia muciniphila* depletion ameliorates alcoholic liver disease[J]. *Gut*, 2018, 67(5): 891-901.
- [16] EVERARD A, BELZER C, GEURTS L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(22): 9066-9071.
- [17] PAN X, FANG X, WANG F, et al. Butyrate ameliorates caerulein-induced acute pancreatitis and associated intestinal injury by tissue-specific mechanisms[J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(23): 4446-4461.
- [18] OTTMAN N, REUNANEN J, MEIJERINK M, et al. Pili-like proteins of *Akkermansia muciniphila* modulate host immune responses and gut barrier function[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173004.
- [19] WANG L, TANG L, FENG Y, et al. A purified membrane protein from *Akkermansia muciniphila* or the pasteurised bacterium blunts colitis associated tumorigenesis by modulation of CD8⁺ T cells in mice[J]. *Gut*, 2020, 69(11): 1988-1997.
- [20] SARTOR R B, WU G D. Roles for intestinal bacteria, viruses, and fungi in pathogenesis of inflammatory bowel diseases and therapeutic approaches[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(2): 327-339.
- [21] BURCELIN R, SERINO M, CHABO C, et al. Gut microbiota and diabetes: From pathogenesis to therapeutic perspective[J]. *Acta Diabetol*, 2011, 48(4): 257-273.
- [22] MEMBA R, DUGGAN S N, CHONCHUBHAIR H M N, et al. The potential role of gut microbiota in pancreatic disease: A systematic review[J]. *Pancre-*

- atology, 2017, 17(6): 867–874.
- [23] GRINEVICH V B, SAS E I, DENISOV N L, et al. Chronic pancreatitis: microbe-intestinal tissue complex and systemic inflammatory response[J]. *Eksp Klin Gastroenterol*, 2011, (7): 13–17.
- [24] NICOLUCCI A C, HUME M P, MARTÍNEZ I, et al. Prebiotics reduce body fat and alter intestinal microbiota in children who are overweight or with obesity[J]. *Gastroenterology*, 2017, 153(3): 711–722.
- [25] ZHU L, LU X, LIU L, et al. *Akkermansia muciniphila* protects intestinal mucosa from damage caused by *S. pullorum* by initiating proliferation of intestinal epithelium[J]. *Vet Res*, 2020, 51(1): 34.
- [26] STAUBLI S M, OERTLI D, NEBIKER C A. Laboratory markers predicting severity of acute pancreatitis[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2015, 52(6): 273–283.
- [27] JAMBRIK Z, GYÖNGYÖSI M, HEGYI P, et al. Plasma levels of IL-6 correlate with hemodynamic abnormalities in acute pancreatitis in rabbits[J]. *Intensive Care Med*, 2002, 28(12): 1810–1818.
- [28] JAKKAMPUDI A, JANGALA R, REDDY B R, et al. NF- κ B in acute pancreatitis: Mechanisms and therapeutic potential[J]. *Pancreatology*, 2016, 16(4): 477–488.

Studies on *Akkermansia muciniphila* Alleviates the Severe Acute Pancreatitis-induced Intestinal Barrier Damage

Huang Yiwen¹, Ren Zhengnan¹, Song Dongxiao¹, Pan Lilong², Sun Jia^{1*}

¹School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu

²Wuxi School of Medicine, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu

Abstract Objective: To explore the role and mechanism of *Akkermansia muciniphila* (*A. muciniphila*) in severe acute pancreatitis in mice. Methods: C57BL/6J male mice were randomly divided into four groups: control group, model group, live *A. muciniphila* group and pasteurized *A. muciniphila* group. The animal model of severe acute pancreatitis was established by intraperitoneal injection of caerulein combined with lipopolysaccharide. Mice were given live *A. muciniphila* or pasteurized *A. muciniphila* at 200 μ L/mouse (5×10^9 CFU/mL) by intragastric gavage every day 10 days before the first caerulein stimulation. The intestinal permeability and the expression of tight junction proteins were examined. Additionally, the pancreatitis markers (pancreatic edema, serum amylase level, serum lipase level and histomorphology) and the levels of inflammatory factors (proinflammatory cytokines and NF- κ B) were investigated. Results: The expression of tight junction proteins, goblet cells and mucus layer were both increased in live *A. muciniphila* group and pasteurized *A. muciniphila* group. Notably, the live *A. muciniphila* exhibited optimal protective effect on intestinal barrier function. However, the modulation of *A. muciniphila* on severe acute pancreatitis was not insufficient. Conclusion: Live *A. muciniphila* and pasteurized *A. muciniphila* both protect the intestinal barrier function; however, they could not alleviate severe acute pancreatitis in experimental mice.

Keywords *Akkermansia muciniphila*; severe acute pancreatitis; intestinal barrier