



枯草芽孢杆菌刺激小鼠肠上皮细胞分泌的 IL-33 在活化树突状细胞中发挥重要作用

牟春晓, 孟慧, 朱立麒, 陈振海*

扬州大学兽医学院, 江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

摘要: 【目的】枯草芽孢杆菌能有效诱导肠道黏膜免疫应答, 但活化黏膜下树突状细胞(DC)的具体机制不完全清楚。【方法】本研究首先用不同浓度枯草芽孢杆菌刺激小鼠肠上皮CMT93细胞, 用荧光定量PCR和ELISA检测细胞因子表达水平, 然后将枯草芽孢杆菌刺激细胞的培养上清与小鼠骨髓源树突状细胞(BMDC)进行共孵育, 用流式细胞术检测BMDC活化标志, 最后用RNA干扰技术证明IL-33在活化BMDC中的作用。【结果】枯草芽孢杆菌能显著刺激CMT93细胞分泌IL-6、IL-33和IFN- γ 等细胞因子, 对刺激IL-33表达呈现剂量依赖性; 枯草芽孢杆菌刺激CMT93细胞产生的细胞因子能活化BMDC, 在RNA干扰IL-33基因表达和枯草芽孢杆菌刺激后, CMT93细胞培养上清活化BMDC的能力显著降低。【结论】本研究结果表明枯草芽孢杆菌刺激肠上皮细胞产生的IL-33在BMDC活化中具有重要作用。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 肠上皮细胞, 白细胞介素 33, 树突状细胞

枯草芽孢杆菌是广泛存在的益生菌, 具有较强的抗逆性^[1-2], 口服进入机体肠道后能拮抗病原菌粘附^[2]、促进黏膜淋巴组织发育和诱导黏膜IgA抗体反应, 因此是良好的黏膜免疫增强剂^[3-4], 但目前对其调节黏膜免疫的机制尚不明确。

树突状细胞(dendritic cell, DC)作为天然免疫系统的“哨兵”, 不仅能在黏膜组织捕获抗原, 而且活化后能向淋巴结迁移, 刺激 T、B 淋巴细胞

免疫应答^[5-7]。尽管肠道 DC 能利用其树突摄取肠黏膜的枯草芽孢杆菌, 迁移至引流淋巴组织激发免疫反应^[8], 但口服枯草芽孢杆菌进入肠道后接触的主要是肠上皮细胞, 如何有效活化黏膜下层的 DC 尚不明确, 因此研究枯草芽孢杆菌活化 DC 的具体机制具有重要意义。

肠上皮细胞作为肠道抵抗病原的第一道屏障, 能通过模式识别受体识别病原相关分子模

基金项目: 国家自然科学基金(31802225); 江苏高校优势学科建设工程资助项目; 江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心

*通信作者。E-mail: zhenhai@yzu.edu.cn

收稿日期: 2020-11-09; 修回日期: 2021-02-05; 网络出版日期: 2021-04-19

式^[9], 分泌多种细胞因子(IL-6、IL-5、IFN- γ 和 IL-33), 从而活化黏膜下 DC、巨噬细胞和淋巴细胞。IL-33 是 IL-1 家族的一种细胞因子^[10-11], 不仅能作为免疫佐剂促进抗体应答反应和病原清除^[12], 还能上调黏膜下 DC 表面共刺激分子的表达, 促进 DC 分泌促炎细胞因子^[13-14]。尽管多种黏膜免疫增强剂都能刺激 IL-33 表达^[15], 但口服枯草芽孢杆菌能否刺激肠上皮细胞产生 IL-33 及其在活化黏膜下层 DC 中的作用尚不清楚。为此, 本研究先用枯草芽孢杆菌刺激小鼠肠上皮细胞系, 然后将细胞培养上清与小鼠骨髓源树突状细胞(bone marrow-derived dendritic cell, BMDC)进行共孵育, 利用 RNA 干扰技术证明 IL-33 在活化 BMDC 中发挥重要作用, 为阐明枯草芽孢杆菌促进黏膜免疫应答的具体机制提供了科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

枯草芽孢杆菌 168 购自武汉森灵生物公司; 小鼠结肠癌细胞系(CMT93)由扬州大学阴银燕老师惠赠; 4-6 周龄 C57BL/6J 小鼠购自扬州大学实验动物中心; RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; 青霉素、链霉素购自北京索莱宝科技有限公司; 小鼠重组粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)和小鼠重组白介素 4 (rmIL-4)购自南京巴傲德生物科技公司; 脂质体(Lipofectamine 3000)购自赛默飞世尔科技公司; PE 标记羊抗小鼠 CD40 单克隆抗体、FITC 标记羊抗小鼠 MHC II 单克隆抗体、PE 标记羊抗小鼠 CD80 单克隆抗体、FITC 标记羊抗小鼠 CD86 单克隆抗体及对应的同型对照抗体购自美国 BD 公司; 细胞活力检测试剂盒(CCK-8 试剂盒)

和小鼠 IL-33 ELISA 检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; 细胞 RNA 提取试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; 反转录试剂盒和荧光定量 PCR 酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.2 枯草芽孢杆菌对 CMT93 细胞的毒性检测

将枯草芽孢杆菌 168 接种于 LB 培养基中 37 °C 培养过夜, 离心收集细菌, 无菌 PBS 离心洗 2 次后涂琼脂平板, 37 °C 培养过夜后进行菌落计数, 用 PBS 悬浮备用。将含 10%胎牛血清(FBS)和 2%青霉素、链霉素的 DMEM 分装 96 孔板, 加入 CMT93 细胞, 5×10^4 个细胞/孔, CO₂ 培养箱 37 °C 培养至满层。按 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 CFU/孔加入枯草芽孢杆菌, 37 °C 孵育 24 h。加入 CCK-8 溶液, 10 μ L/孔, 37 °C 避光孵育 2 h, 用酶标仪测定 OD₄₅₀ 值。细胞活性(%)=(OD_{枯草芽孢杆菌}-OD_{细胞培养基})/(OD_{阴性孔}-OD_{细胞培养基}) \times 100。

1.3 枯草芽孢杆菌刺激与细胞因子 ELISA 检测

将含 10% FBS 和 2%青霉素、链霉素的 DMEM 分装 12 孔板, 接种 CMT93 细胞, 5×10^5 个细胞/孔, 37 °C 培养至细胞满层。按 1×10^5 CFU/孔加入枯草芽孢杆菌, 37 °C 孵育 24 h。收获细胞培养上清液, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测 IL-6、IFN- γ 、IL-12、IL-1 β 和 IL-33 表达水平。

1.4 IL-33 表达荧光定量 PCR 检测

如前进行 CMT93 细胞培养, 长满单层后加入枯草芽孢杆菌, 接种剂量分别为 1×10^6 、 1×10^5 和 1×10^4 CFU/孔, 孵育 24 h 后分别收集细胞和培养液。细胞培养上清 10000 r/min 离心 10 min, 用 0.22 μ m 滤膜过滤后备用。用细胞 RNA 提取试剂盒提取细胞 RNA, 用 PrimeScriptTM RT Mix 反

转录试剂盒反转录得到 cDNA。用荧光定量 PCR 检测 IL-33 转录水平,正、反向引物序列分别为 5'-GTTCTGGAGACTACAGCGCA-3' 和 5'-TTTGCCGGGGAAATCTTGGA-3',内参(GAPDH)正、反向引物分别为 5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3' 和 5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'。PCR 程序为:恒温段 95 °C 30 s;循环段 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环;熔解段 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。

1.5 小鼠 BMDC 制备与培养

颈椎脱臼处死 C57BL/6J 小鼠,无菌分离股骨和胫骨。注射器吸取 RPMI 1640 培养基冲洗骨髓至无菌离心管中,1500 r/min 离心 10 min,弃上清。沉淀细胞加入 1 mL 红细胞裂解液混匀,孵育 1 min 后加入 5 mL RPMI 1640 培养基,1500 r/min 离心 10 min,弃上清。细胞用含 10% FBS、10 ng/mL rmGM-CSF、10 ng/mL rmIL-4 和 1%青霉素、链霉素的 RPMI 1640 培养基重悬,接种 6 孔细胞培养板,CO₂ 培养箱 37 °C 培养 60 h 后换液,继续培养 5 d,收集未活化的 BMDC。

1.6 BMDC 活化标志的流式细胞术检测

将 BMDC 接种 24 孔板,5×10⁵ 细胞/mL,用上述细胞培养液培养 24 h 后收集细胞,1500 r/min 离心 10 min,弃上清。细胞用适量 PBS 洗涤 2 次,每孔细胞用 100 μL PBS 重悬。按照使用说明分别加入 PE 标记羊抗小鼠 CD40 单克隆抗体、FITC 标记羊抗小鼠 MHCII 单克隆抗体、PE 标记羊抗小鼠 CD80 单克隆抗体、FITC 标记羊抗小鼠 CD86 单克隆抗体以及对应的同型对照抗体,4 °C 孵育 30 min,PBS 清洗 2 次后进行流式细胞术检测。

1.7 siRNA 干扰 CMT93 细胞的 IL-33 基因表达与检测

用网络在线软件 (<http://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaexpress/insert.do>)设计 3 条小鼠 IL-33 siRNA 序列,靶向序列分别为 AGACTCGTCTGCTGCCTCACCATAA(222)、GCTGCGTCTGTTGACACATTGAGCA(384)和 ACACAGACATCTGGCTGCATGCCAA(643),经过预实验筛选发现 siRNA 384 的干扰效果最佳。将 CMT93 细胞接种 6 孔板,按照 Lipofectamine 3000 说明书进行 siRNA384 转染,30 pmol/孔。转染后 36 h 收集细胞,接种 12 孔板,待细胞贴壁后加入枯草芽孢杆菌,1×10⁶ CFU/孔。CO₂ 培养箱 37 °C 孵育 24 h 后收集细胞培养上清,用 ELISA 试剂盒检测 IL-33 表达水平。按 1.6 方法分离培养未成熟 BMDC,与 CMT93 细胞培养液孵育 24 h 后收集 BMDC,用流式细胞术检测进行 BMDC 活化表型检测。

1.8 数据处理及分析

数据均采用平均值±标准误表示。采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析,采用单因子方差分析进行差异显著性检验。

2 结果和分析

2.1 枯草芽孢杆菌对 CMT93 细胞的毒性检测

从图 1 可以看出,与不同剂量的枯草芽孢杆菌孵育 24 h 后,CMT93 细胞的活性无明显改变。

2.2 枯草芽孢杆菌刺激 CMT93 细胞的细胞因子表达检测

将枯草芽孢杆菌 168 与 CMT93 细胞共孵育 24 h,收集培养上清用 ELISA 检测 IL-6、IFN-γ

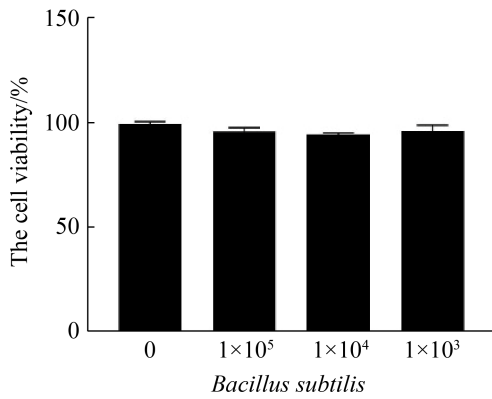


图 1. 枯草芽孢杆菌对 CMT93 细胞活性的影响
 Figure 1. The influence of *Bacillus subtilis* 168 on CMT93 cell viability. The CMT93 cells viability were detected by CCK-8, compared with the control. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

和 IL-33 表达水平。从图 2 可知, 枯草芽孢杆菌刺激能显著促进 CMT93 细胞分泌 IL-6、IFN- γ 和 IL-33, 但不能显著促进 IL-12 和 IL-1 β 表达。

2.3 枯草芽孢杆菌刺激 CMT93 表达 IL-33 的剂量依赖性

用不同浓度枯草芽孢杆菌与 CMT93 细胞进行共孵育, 24 h 后分别收集细胞和培养上清, 分别用荧光定量 PCR 和 ELISA 检测 IL-33 表达水平。从图 3 可以看出, 枯草芽孢杆菌刺激 CMT93 细胞的 IL-33 表达具有明显的剂量依赖性。

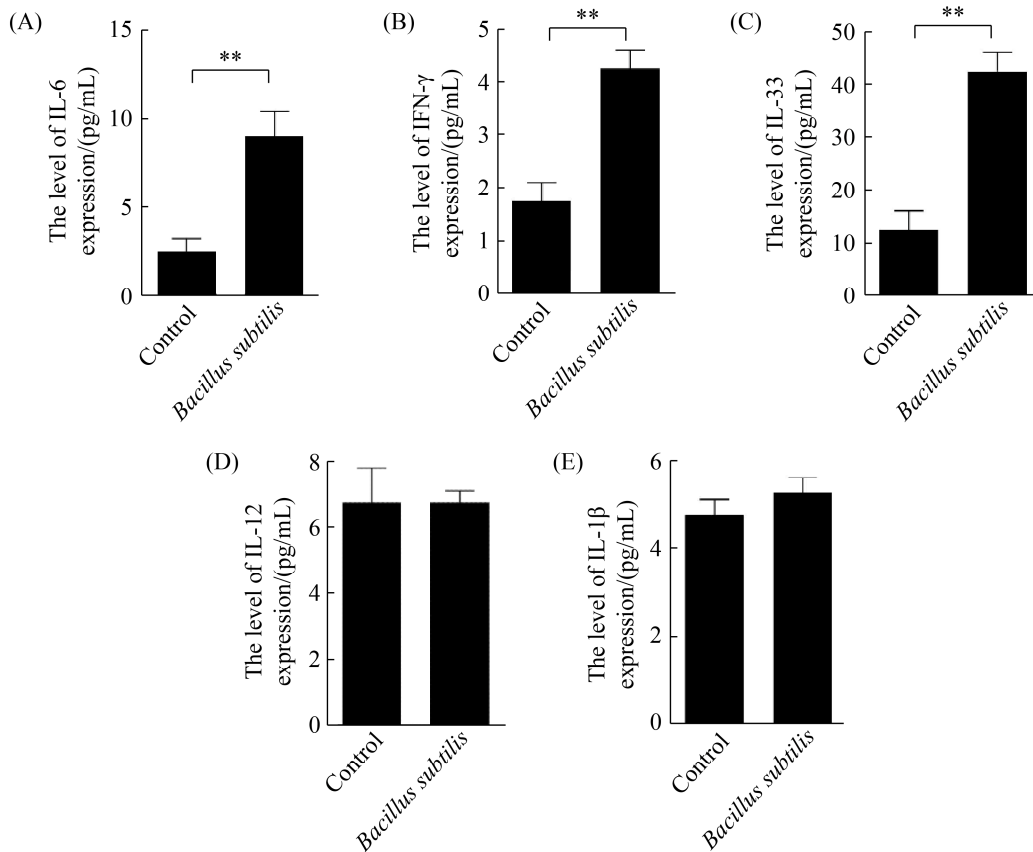


图 2. 枯草芽孢杆菌刺激 CMT93 细胞的细胞因子表达检测

Figure 2. Detection of cytokine expression in *Bacillus subtilis*-stimulated CMT93 cells. The protein expression level of IL-6 (A), IFN- γ (B), IL-33 (C), IL-12 (D) and IL-1 β (E) in *Bacillus subtilis*-stimulated CMT93 cells were detected, compared with the control. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

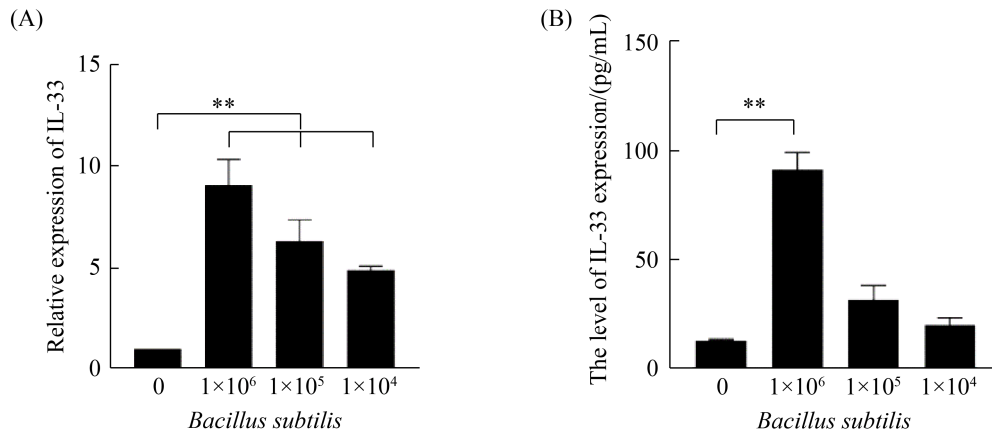


图 3. 枯草芽孢杆菌刺激 CMT93 细胞表达 IL-33 的剂量依赖性

Figure 3. Dose-dependent IL-33 expression in *Bacillus subtilis*-stimulated CMT93 cells. The relative mRNA expression of IL-33 (A) and protein expression level of IL-33 (B) in *Bacillus subtilis*-stimulated CMT93 cells were detected, compared with the control. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

2.4 细胞因子激活 BMDC 的表型检测

用不同浓度枯草芽孢杆菌刺激 CMT93 细胞, 收集培养上清与 BMDC 共孵育 24 h, 用流式细胞术进行激活表型检测。从图 4 可以看出, 与空白对照组相比, 枯草芽孢杆菌刺激 CMT93 细胞产生的细胞因子能上调 BMDC 的 CD40 (A)、CD80 (B)、CD86 (C) 和 MHCII (D) 表达, 并具有枯草芽

孢杆菌剂量依赖性。

2.5 siRNA 抑制 CMT93 细胞的 IL-33 表达检测

将 IL-33 基因特异 siRNA 转染 CMT93 细胞, 转染后 24 h 用高剂量枯草芽孢杆菌刺激, 用 ELISA 检测细胞培养上清中的 IL-33 表达水平。结果与正常 CMT93 细胞相比, siRNA 转染细胞培养上清中的 IL-33 表达量显著降低(图 5)。

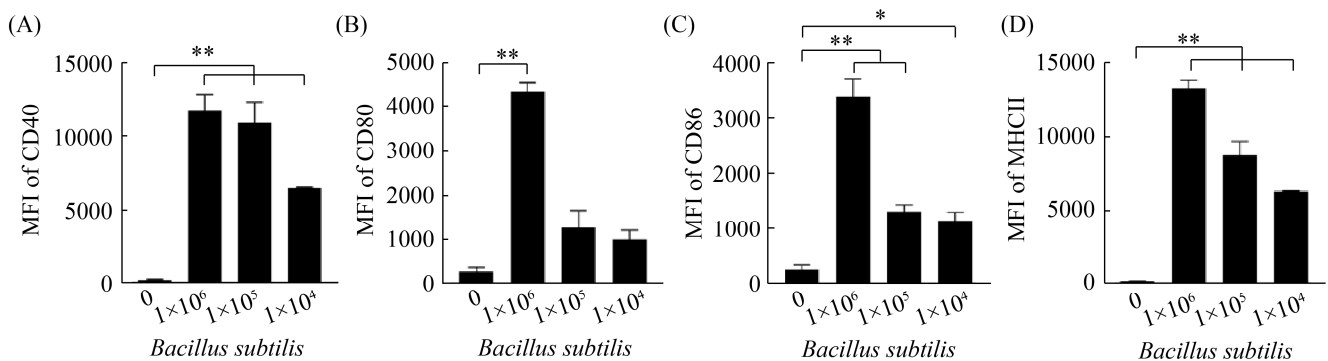


图 4. 细胞因子激活 BMDC 的表型检测

Figure 4. Detection of BMDC activation after cytokine stimulation. The expression of CD40 (A), CD80 (B), CD86 (C) and MHCII (D) on the surface of BMDC were detected by flow cytometric, compared with the control. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

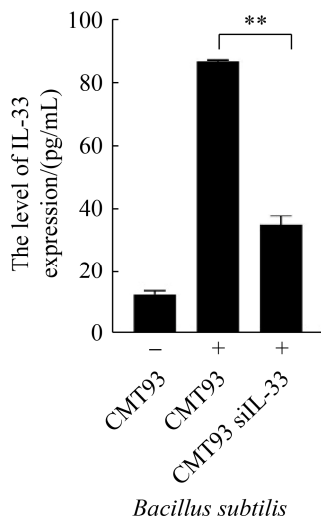


图 5. siRNA 干扰 CMT93 细胞的 IL-33 表达检测
Figure 5. Detection of IL-33 expression in siRNA-transfected CMT93 cells. Compared with the control. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

2.6 IL-33 表达抑制对活化 BMDC 的影响

在 IL-33 基因特异性 siRNA 转染后, 用高剂量枯草芽孢杆菌刺激 CMT93 细胞, 流式细胞术检测 BMDC 活化表型。结果与正常 CMT93 细胞培养液相比, IL-33 基因特异性 siRNA 转染细胞

在枯草芽孢杆菌刺激后, 其培养上清上调 BMDC 活化的能力降低(图 6)。

3 讨论

黏膜疫苗接种可以同时诱导黏膜和全身免疫反应^[16-17], 但黏膜免疫系统的复杂性和屏障作用制约着黏膜疫苗的研发。枯草芽孢杆菌具有黏膜免疫增强作用, 其表面展示的病毒抗原能有效诱导黏膜局部和全身免疫应答^[18], 但具体的免疫应答机制还有待进一步研究。枯草芽孢杆菌 168 是全基因组最早测序的枯草芽孢杆菌^[19], 已被用作黏膜免疫佐剂^[20]。例如, 口服枯草芽孢杆菌 168 分泌的抗菌肽(sublancin)能激活小鼠肠道巨噬细胞、减轻免疫抑制和诱导平衡的 Th1 和 Th2 免疫应答^[21]。口服和鼻内接种表面表达或吸附梭状芽孢杆菌 FliD 抗原的枯草芽孢杆菌 168 都能诱导小鼠产生抗原特异性 IgA 抗体^[22-23]。然而, 枯草芽孢杆菌增强黏膜免疫应答的具体机制还有待深入研究。

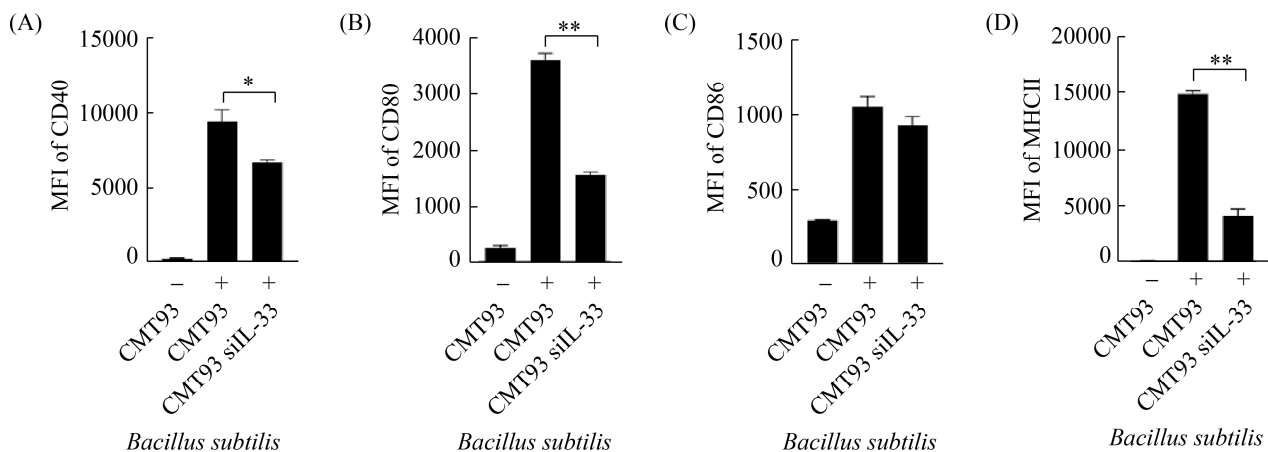


图 6. 干扰 IL-33 基因表达对活化 BMDC 的影响

Figure 6. The effect of IL-33 interference on BMDC activation. The expression of CD40 (A), CD80 (B), CD86 (C) and MHCII (D) on the surface of BMDCs were detected by flow cytometric, compared with the control. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

枯草芽孢杆菌增强黏膜免疫应答的可能机制包括黏膜下 DC 伸出树突直接摄取枯草芽孢杆菌从而活化 DC^[8,18], 或者通过刺激肠上皮细胞分泌细胞因子间接激活 DC^[24]。为了阐明这一问题, 本研究用枯草芽孢杆菌 168 刺激小鼠肠上皮细胞系^[25-26], 结果显示枯草芽孢杆菌能显著刺激 CMT93 细胞分泌 IFN- γ 、IL-6 和 IL-33 等细胞因子, 而且具有枯草芽孢杆菌剂量依赖性。将含细胞因子的 CMT93 细胞培养液与 BMDC 进行共孵育, 结果显示能显著活化 BMDC, 提示枯草芽孢杆菌可能通过刺激肠上皮细胞产生细胞因子活化 DC。

IFN- γ 、IL-6 和 IL-33 都是能活化 DC 的细胞因子^[24], 其中 IL-33 是新发现的 IL-1 家族成员, 不仅参与局部炎症、过敏反应和免疫应答^[27-28], 还能促进 DC 分化成熟^[11-12,15,29]。为了阐明枯草芽孢杆菌刺激肠上皮细胞分泌的 IL-33 在激活 DC 中的作用, 本研究先用 siRNA 干扰 CMT93 细胞的 IL-33 基因表达, 经枯草芽孢杆菌刺激后, 再用细胞培养上清与 BMDC 进行共孵育, 结果显示细胞培养上清活化 BMDC 的能力显著降低, 提示 IL-33 是活化 BMDC 的主要细胞因子, 枯草芽孢杆菌可能通过刺激肠上皮细胞分泌 IL-33 来活化黏膜下 DC。

参 考 文 献

- [1] Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JDH, Braun PG, Darmon E, Dorenbos R, Dubois JYF, Westers H, Zanen G, Quax WJ, Kuipers OP, Bron S, Hecker M, van Dijk JM. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the “secrets” of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(2): 207–233.
- [2] Song M, Hong HA, Huang JM, Colenutt C, Khang DD, Nguyen TVA, Park SM, Shim BS, Song HH, Cheon IS, Jang JE, Choi JA, Choi YK, Stadler K, Cutting SM. Killed *Bacillus subtilis* spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine. *Vaccine*, 2012, 30(22): 3266–3277.
- [3] Hinc K, Stasiłojć M, Piątek I, Peszyńska-Sularz G, Isticato R, Ricca E, Obuchowski M, Iwanicki A. Mucosal adjuvant activity of IL-2 presenting spores of *Bacillus subtilis* in a murine model of *Helicobacter pylori* vaccination. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e95187.
- [4] Liang JF, Fu J, Kang HH, Lin J, Yu QH, Yang Q. The stimulatory effect of TLRs ligands on maturation of chicken bone marrow-derived dendritic cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2013, 155(3): 205–210.
- [5] Chang SY, Ko HJ, Kweon MN. Mucosal dendritic cells shape mucosal immunity. *Experimental & Molecular Medicine*, 2014, 46(3): e84.
- [6] Short KR, Brooks AG, Reading PC, Londrigan SL. The fate of influenza A virus after infection of human macrophages and dendritic cells. *The Journal of General Virology*, 2012, 93(Pt 11): 2315–2325.
- [7] Kitani A, Xu L. Regulatory T cells and the induction of IL-17. *Mucosal Immunology*, 2008, 1(Suppl 1): S43–S46.
- [8] Huang LL, Qin T, Yin YY, Gao X, Lin J, Yang Q, Yu QH. *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 induces dendritic cell maturation and enhances the immune response against inactivated avian influenza virus. *Scientific Reports*, 2016, 6: 21363.
- [9] Yousefi B, Eslami M, Ghasemian A, Kokhaei P, Salek Farrokhi A, Darabi N. Probiotics importance and their immunomodulatory properties. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(6): 8008–8018.
- [10] Hodzic Z, Schill EM, Bolock AM, Good M. IL-33 and the intestine: The good, the bad, and the inflammatory. *Cytokine*, 2017, 100: 1–10.
- [11] Park SH, Kim MS, Lim HX, Cho D, Kim TS. IL-33-matured dendritic cells promote Th17 cell responses via IL-1 β and IL-6. *Cytokine*, 2017, 99: 106–113.
- [12] Rose WA, Okragly AJ, Patel CN, Benschop RJ. IL-33 released by alum is responsible for early cytokine production and has adjuvant properties. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13146.
- [13] Besnard AG, Togbe D, Guillou N, Erard F, Quesniaux V, Ryffel B. IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation. *European Journal of Immunology*, 2011, 41(6): 1675–1686.

- [14] Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, Bartemes KR, Squillace DL, Kita H. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2009, 123(5): 1047–1054.
- [15] Bol-Schoenmakers M, Braber S, Akbari P, de Graaff P, van Roest M, Kruijssen L, Smit JJ, van Esch BCAM, Jeurink PV, Garssen J, Fink-Gremmels J, Pieters RHH. The mycotoxin deoxynivalenol facilitates allergic sensitization to whey in mice. *Mucosal Immunology*, 2016, 9(6): 1477–1486.
- [16] Eslani M, Baradaran-Rafii A, Ahmad S. Cultivated limbal and oral mucosal epithelial transplantation. *Seminars in Ophthalmology*, 2012, 27(3/4): 80–93.
- [17] Sohi H, Ahuja A, Ahmad FJ, Khar RK. Critical evaluation of permeation enhancers for oral mucosal drug delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2010, 36(3): 254–282.
- [18] Mou CX, Zhu LQ, Xing XP, Lin J, Yang Q. Immune responses induced by recombinant *Bacillus subtilis* expressing the spike protein of transmissible gastroenteritis virus in pigs. *Antiviral Research*, 2016, 131: 74–84.
- [19] Paik SH, Chakicherla A, Hansen JN. Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(36): 23134–23142.
- [20] Liu YK, Zhang J, Wang S, Guo Y, He T, Zhou R. A novel adjuvant “sublancin” enhances immune response in specific pathogen-free broiler chickens inoculated with Newcastle disease vaccine. *Journal of Immunology Research*, 2019, 2019: 1016567.
- [21] Wang S, Huang S, Ye QH, Zeng XF, Yu HT, Qi DS, Qiao SY. Prevention of cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice with the antimicrobial peptide sublancin. *Journal of Immunology Research*, 2018, 2018: 4353580.
- [22] Potocki W, Negri A, Peszyńska-Sularz G, Hinc K, Obuchowski M, Iwanicki A. The combination of recombinant and non-recombinant *Bacillus subtilis* spore display technology for presentation of antigen and adjuvant on single spore. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 1–11.
- [23] Potocki W, Negri A, Peszyńska-Sularz G, Hinc K, Obuchowski M, Iwanicki A. IL-1 fragment modulates immune response elicited by recombinant *Bacillus subtilis* spores presenting an antigen/adjuvant chimeric protein. *Molecular Biotechnology*, 2018, 60(11): 810–819.
- [24] Stagg AJ. Intestinal dendritic cells in health and gut inflammation. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 2883.
- [25] Algeri F, Garrido-Mesa J, Vezza T, Rodríguez-Sojo MJ, Rodríguez-Cabezas ME, Olivares M, García F, Gálvez J, Morón R, Rodríguez-Nogales A. Intestinal anti-inflammatory effects of probiotics in DNBS-colitis via modulation of gut microbiota and microRNAs. *European Journal of Nutrition*, 2020: 1–15.
- [26] Choudhry N, Petry F, van Rooijen N, McDonald V. A protective role for interleukin 18 in interferon γ -mediated innate immunity to *Cryptosporidium parvum* that is independent of natural killer cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 2012, 206(1): 117–124.
- [27] Pastorelli L, De Salvo C, Vecchi M, Pizarro TT. The role of IL-33 in gut mucosal inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2013, 2013: 608187.
- [28] Takatori H, Makita S, Ito T, Matsuki A, Nakajima H. Regulatory mechanisms of IL-33-ST2-mediated allergic inflammation. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 2004.
- [29] Mayuzumi N, Matsushima H, Takashima A. IL-33 promotes DC development in BM culture by triggering GM-CSF production. *European Journal of Immunology*, 2009, 39(12): 3331–3342.

The important role of IL-33 secreted from *Bacillus subtilis*-stimulated intestinal epithelial cells in mouse dendritic cell activation

Chunxiao Mou, Hui Meng, Liqi Zhu, Zhenhai Chen*

Jiangsu University Co-innovation Center for the Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] *Bacillus subtilis* can induce efficient intestinal mucosal immune responses, but the detailed mechanism for dendritic cell activation remains to be defined. [Methods] Mouse intestinal epithelial CMT93 cells were stimulated with different concentrations of *Bacillus subtilis* and the cytokine expression was measured by quantitative RT-PCR and ELISA. After incubation with the cytokine-containing cell culture medium, activation of mouse bone marrow-derived dendrites (BMDC) was analyzed by flow cytometry and the role of IL-33 in BMDC activation was confirmed by RNA interference. [Results] *Bacillus subtilis* could significantly stimulate CMT93 cells to secrete IL-6, IL-33 and IFN- γ , and induce the IL-33 secretion in a dose-dependent manner. The cytokine-containing cell medium could significantly activate BMDC. After interfering IL-33 gene expression and stimulation with *Bacillus subtilis*, however, the ability of CMT93 cell medium for BMDC activation was significantly reduced. [Conclusion] These data suggest that IL-33 from *Bacillus subtilis*-stimulated mouse intestinal epithelial cells plays an important role in the dendritic cell activation.

Keywords: *Bacillus subtilis*, intestinal epithelial cells, IL-33, dendritic cells

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31802225), by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD) and by the Jiangsu Co-Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses

*Corresponding author. E-mail: zhenhai@yzu.edu.cn

Received: 9 November 2020; Revised: 5 February 2021; Published online: 19 April 2021