·基础研究·

小鼠11β-羟类固醇脱氢酶敲除对肠道功能的影响

夏　凡,丁　菲,吕伊凡,盛云露,丁国宪*

南京医科大学第一附属医院老年医学科,江苏　南京　210029

[摘　要]　**目的:**探究小鼠11β-羟类固醇脱氢酶(11β- hydroxysteroid dehydrogenase,11β-HSD1)基因敲除对肠道功能的影响。**方法:**将C57/BL6为遗传背景的野生对照组及11β-HSD1基因敲除组各6只小鼠正常喂养至6~8周,观察小鼠及小肠组织大体变化,PCR及免疫组化确定其肠道功能及炎症变化。**结果:**11β-HSD1基因敲除能够显著改善肠道的炎症状态,减轻炎症,同时肠道黏膜通透性改变,肠道绒毛长度缩短,隐窝长度变长,杯状细胞数量增多,黏膜的屏障功能增强。**结论:**本研究成功建立了小鼠11β-HSD1基因敲除模型,证实了肠道在11β-HSD1基因敲除后炎症状态改善,为进一步11β-HSD1肠道组织特异性敲除提供了研究基础。

[关键词]　11β-HSD1;肠道;炎症

[中图分类号]　Q784　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1007-4368(2019)08-1106-06

doi:10.7655/NYDXBNS20190803

Effects of mouse 11β-hydroxysteroid dehydrogenase knockout on intestinal function

Xia Fan,Ding Fei,Lü Yifan,Sheng Yunlu,Ding Guoxian*

Division of Geriatric Endocrinology,the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University,Nanjing 210029,China

[**Abstract**]　**Objective:** This study aims to observe the changes of intestinal function in 11β- hydroxysteroid dehydrogenase(11β-HSD1)knockout mice. **Methods:** Six 11β-HSD1 knockout mice were paired with 6 control mice with C57/BL6 genetic background both fed standard chow ad libitum for a period of 6-8 weeks. The changes in mice characteristics and intestinal morphometry were observed. The intestinal function and inflammatory alterations were determined by PCR and immunohistochemistry. **Results:** 11β-HSD1 gene abortion significantly decreased the intestinal inflammation. Intestinal mucosal permeability was altered, intestinal villus length was shortened, crypt depth became deeper, goblet cell number increased, and mucosal barrier function was enhanced. **Conclusion:** This study successfully established a 11β-HSD1 knockout mice model, which showed inflammation amelioration in intestinal tract after 11β-HSD1 gene knockout, providing a research foundation for further specific knockouting 11β-HSD1 in intestinal tissue.

[**Key words**]　11β-HSD1;intestine;inflammation

[J Nanjing Med Univ,2019,39(08):1106-1111]

肠道拥有人体最大的表面积[1],在作为最主要的营养吸收器官的同时,为了抵御外来病原体的入侵、维持体内免疫的稳定,也成为了体内最大的免疫器官[2]。肠道内含有大量免疫细胞,这些免疫细胞与物理屏障一起保护个体免受病原微生物或其他可能导致肠道炎症反应的有害内容物的影响[3]。糖皮质激素(glucocorticoid,GC)被认为在调节这种肠道局部炎症和维持肠道免疫稳态中起到了至关重要的作用[4]。GC是重要的免疫调节因子,主要由肾上腺分泌。GC能够通过促进炎症介质产生、白细胞迁移、淋巴细胞发育和抗原受体信号传导从而调节机体的炎症状态[5]。GC不仅受下丘脑—肾上腺—皮质醇轴(HPA)的调节能影响全身功能及调节免疫应答[6],也能够通过11β-羟类固醇脱氢酶(11β-hydroxysteroid dehydrogenase,1β-HSD1)的作用从代谢产物中再生[7],提高了组织及细胞中GC的表达水平[8]。而11β-HSD1作为一种微线粒体酶,它可将无活性的氢化可的松转化为有活性的氢化可的

[基金项目]　国家自然科学基金(91649122,81870613)

*通信作者(Corresponding author),E-mail:dinggx@njmu.edu.cn

松[9]，增强局部组织GC的作用，因而又称11β-HSD1为GC的局部放大器。过去大量11β-HSD1的研究都集中在肝脏、脂肪、脑及其他组织，包括前期研究已发现11β-HSD1选择性抑制剂（BVT.2733）可明显减轻高脂饮食肥胖小鼠体重、改善糖耐量和胰岛素敏感、减少内脏脂肪蓄积，同时减轻内脏脂肪组织巨噬细胞浸润和炎症因子（MCP1、TNFα）表达[10]。目前关于肠道及11β-HSD1的研究仍然较少。因此本文主要探究11β-HSD1敲除小鼠对肠道功能及炎症改变的影响。

1　材料和方法

1.1　材料

C57BL/6小鼠，6~8周，雄性，16~20 g（南京大学模式动物研究所）；C57BL/6背景的11β-HSD1$^{(-/-)}$小鼠，6~8周，雄性，16~20 g，繁殖于南京大学模式动物研究所。将小鼠分为对照组和11β-HSD1基因敲除组，每组各6只，饲养在SPF级动物房。

1.2　方法

1.2.1　石蜡切片及HE染色

小鼠喂养6~8周后颈椎脱臼法处死小鼠，各组分别完整取出肠道做成圈状，4%甲醛固定24 h，修剪组织后脱水，依次进行75%酒精4 h→85%酒精2 h→90%酒精1 h→无水乙醇Ⅰ30 min→无水乙醇Ⅱ30 min→醇苯5~10 min→二甲苯Ⅰ5~10 min→二甲苯Ⅱ5~10 min→蜡Ⅰ1 h→蜡Ⅱ 1 h→蜡Ⅲ 1 h。常规包埋。将包埋好的蜡块置于切片机上切片，4 ℃冰箱保存。取石蜡切片，常规脱蜡，苏木素染液3~5 min，然后伊红染液中染色5 min。常规脱水后用中性树胶封片。每组于光学显微镜下随机选取3个HE染色的区域进行观察。

1.2.2　过碘酸希夫（periodic acid-Schiff，PAS）糖原染色

取小鼠小肠组织石蜡切片，常规包埋、复水。样品滴加1 %阿利新蓝染液（pH 2.5），室温放置10~20 min，冲洗1次，再用蒸馏水浸洗2次。滴加高碘酸溶液，室温放置10 min。再次冲洗1次，再用蒸馏水浸洗2次。滴加Schiff试剂，室温放置10~15 min。纯水冲洗。逐级常规乙醇脱水后中性树胶封固。每组于光学显微镜下随机选取3个PAS染色的组织隐窝区域进行观察。

1.2.3　免疫组化及免疫荧光

取石蜡切片，脱水后BSA室温封闭30 min。去除封闭液，滴加一抗，切片平放于湿盒内4 ℃孵育过夜。洗涤后滴加与一抗相应种属的二抗覆盖组织，室温孵育50 min。再次洗涤后滴加DAB显色液。DAPI染核3 min左右，自来水洗后用1%的盐酸酒精分化数秒，自来水冲洗，氨水返蓝，流水冲洗。最后将切片依次脱水后中性树胶封固。

1.2.4　实时荧光定量PCR

取小鼠小肠组织，提取组织RNA，并测定RNA的含量和纯度。将RNA逆转成cDNA为模板，用相关引物进行RT-PCR扩增。实时定量PCR总反应体系为10 μL，反应条件：95 ℃预变性5 min；94 ℃变性15 s，60 ℃退火延伸15 s，40个循环；72~94 ℃，每升高0.5 ℃读1次制备熔解曲线。以actin基因作为内参，引物序列详见表1。

1.2.5　Western blot

取小鼠小肠组织，提取组织蛋白。待热变性后，在每孔中加入15 μg蛋白，再经过电泳、转膜及封闭操作。分别加羊抗HSD1抗体（1∶400）和兔抗GAPDH抗体（1∶1 000），4 ℃摇床作用12 h；洗涤，加入由HRP标记的兔抗羊IgG（1∶1 000），室温孵育2 h后洗膜，滴加ECL显影液，显影拍照并分析。

1.3　统计学方法

用GraphPad Prism 6统计软件进行分析，数据以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用t检验进行两组比较。$P \leqslant 0.05$为差异具有统计学意义。

2　结　果

2.1　11β-HSD1基因敲除小鼠的大体变化

将12只小鼠分为对照组及11β-HSD1敲除组

表1　PCR引物序列

Table 1　PCR primer table

基因名称	引物序列（5′→3′）
11β-HSD1	F：AAGGAGCCGCACTTATCAGA
	R：TTCAAGGCAGCGAGACACTA
claudin-2	F：AGGTGCTGCTGAGGGTAGAA
	R：GCCTCTGGGCATAGCCTAA
TJP1	F：AGCAATGTGAACGTGGATTG
	R：CCTCTAGCCAATGCCTGACA
MUC3	F：TTCTGTATCACGCCTTGCTC
	R：GAGGAGGATCACGAGGATCA
TNF-α	F：TCACTGGAGCCACGAATGTC
	R：CAGGGAAGAATCTGGAAAGGT
MCP1	F：GGCTCAGCCAGATGCAGTTAA
	R：CCTACTCATTGGGATCATCTTGCT
IL-1b	F：AGCCTGTGTTTTCCTCCT
	R：GCTGCCTAATGTCCCCTT

（各6只），观察到小鼠大体上差异不明显（图1A）。小鼠小肠长度分析显示：11β-HSD1敲除组的小肠长度比对照组的小肠长度明显增长（图1B）。通过荧光定量PCR及Western blot鉴定11β-HSD1基因敲除模型的建立（图1C、D）。

2.2　各组小鼠肠组织HE染色和PAS染色的比较

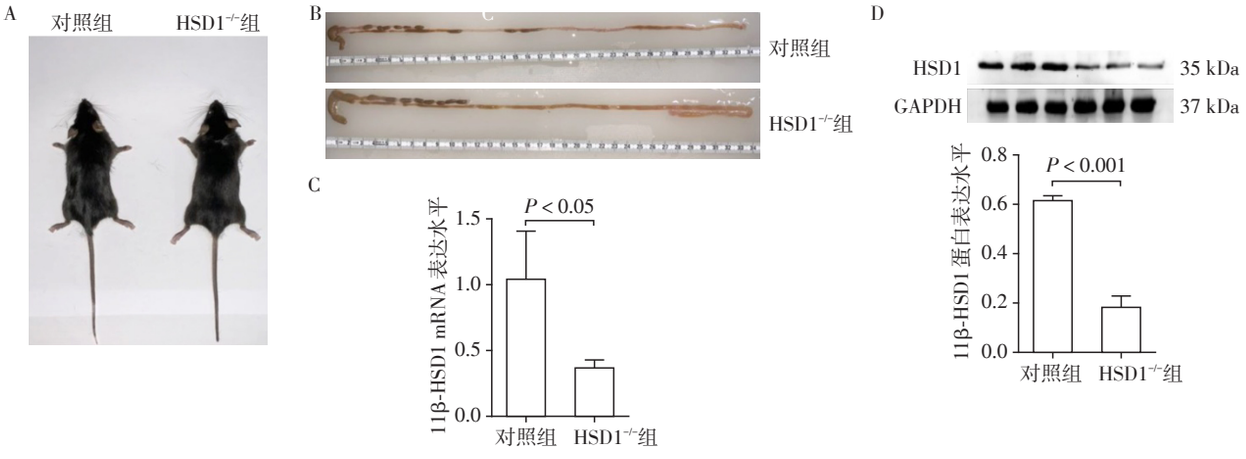
与对照组相比，11β-HSD1基因敲除组小鼠绒毛长度明显缩短（$P < 0.001$）；且隐窝长度明显增长（$P < 0.001$，图2）；与对照组相比，11β-HSD1基因敲除组小鼠的单位面积内杯状细胞数量明显增多，敲除组小鼠小肠黏膜屏障功能增强（图3）。

2.3　各组小鼠肠黏膜屏障相关基因比较

HSD1敲除组肠道黏膜相关黏蛋白MUC3的表达较对照组显著上升（$P < 0.01$），HSD1敲除组肠道结合蛋白相关基因TJP1（ZO-1）较对照组显著下降（$P < 0.05$），而HSD1敲除组claudin-2较对照组有上升趋势，这个结果也在claudin-2的免疫荧光染色中体现（图4）。结合PAS糖原染色结果，说明肠上皮层通透性改变，黏膜屏障功能增强。

2.4　各组小鼠肠道炎症因子基因表达的比较

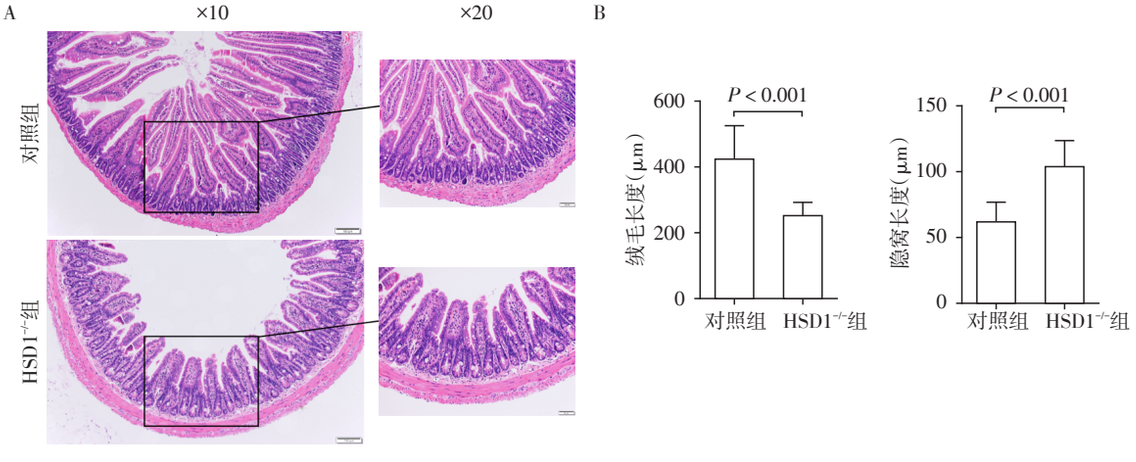
TNF-α由内毒素刺激单核巨噬细胞产生，可促进细胞生长、分化、凋亡及诱发炎症等，抑制宿主的免疫功能。肠道炎症相关基因TNF-α的表达在HSD1敲除组较对照组有显著下降（$P < 0.01$），MCP1、IL-1b的表达有明显下降趋势。对照组及11β-HSD敲除基因组小肠F4/80染色的结果也显示了同样趋势（图5）。说明11β-HSD1基因敲除后能够显著改善肠道的炎症状态，减轻肠道炎症。



A、B：小鼠大体及小肠大体图；C、D：定量PCR（C）及Western blot（D）鉴定11β-HSD1基因水平。

图1　11β-HSD1基因敲除小鼠小肠11β-HSD1表达水平

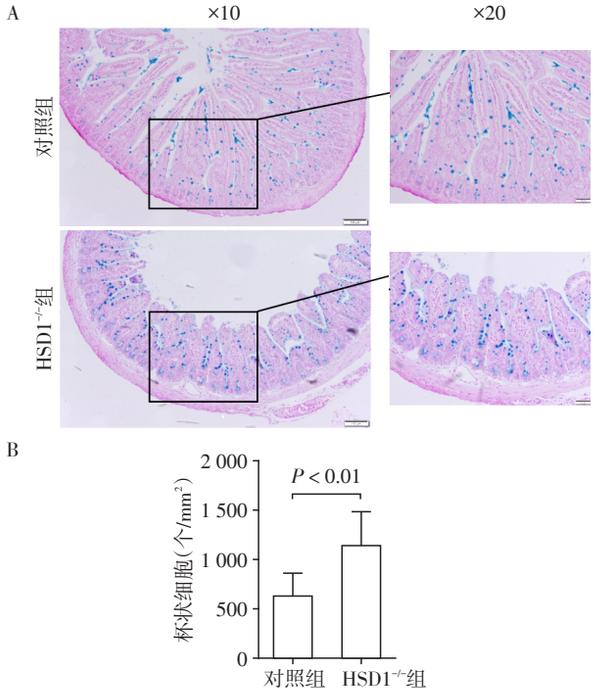
Figure 1　Expression of 11β-HSD1 in instestine of 11β-HSD1 knockout mice



A：对照组及11β-HSD敲除基因组小肠HE染色；B：对照组及11β-HSD敲除基因组绒毛长度及隐窝长度。

图2　小肠大体HE染色

Figure 2　H&E staining images of small intestine



A:小鼠野生组及11β-HSD敲除基因组小肠杯状细胞染色PAS;B:小鼠野生组及11β-HSD敲除基因组单位面积内的杯状细胞数量。

图3　小肠杯状细胞PAS染色

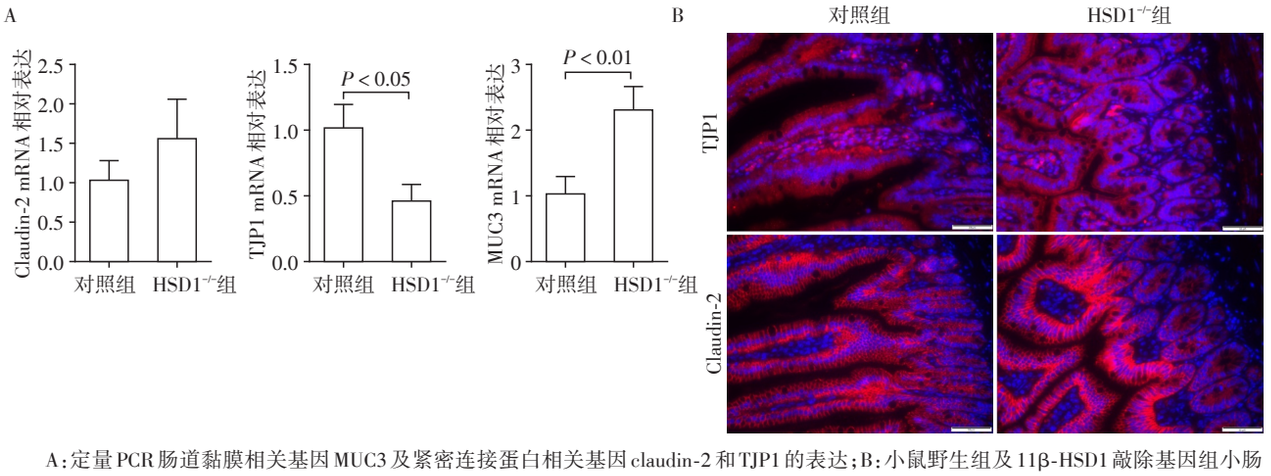
Figure 3　PAS staining images of goblet cells

3　讨　论

GC能够调节许多免疫应答,包括抵抗炎症。在表达GC和盐皮质激素受体的组织中,GC代谢受11β-羟基类固醇脱氢酶(11β-HSD)的同工酶调节,有两种亚型(11β-HSD1和11β-HSD2)[11],11β-HSD1是一种具有脱氢酶和还原酶双向作用的酶,它活化氢化可的松,增加局部组织GC的水平。本课题组已有研究证实了11β-HSD1敲除之后能够明显改善小鼠全身多脏器如心脏、脂肪炎症状态[10-12],然而关于11β-HSD1敲除与肠道炎症的关系尚不明确。

肠道是人体中最大的黏膜表面,不仅是人体最大的营养吸收器官[2],而且需要即时感受各种病原微生物及化学物质的变化,所以肠道又被认为是第一细胞屏障和免疫防御组织[13]。在肠道中,两个GC的关键酶11β-HSD1和P450ssc表达量都非常低,但是能够被免疫应激所诱导,将肠道上皮细胞及隐窝分开培养,则会发现肠道的这两个糖皮质激素关键酶能够稳定且持续的表达[14]。这也就说明11β-HSD1能够调节肠道黏膜的通透性。通过11β-HSD1敲除小鼠模型的建立,反映了在缺乏GC合成关键酶11β-HSD1的情况下,发现肠道绒毛明显缩短,而隐窝数量明显增多,同时杯状细胞增多,肠道黏液分泌增多,证实了肠道黏膜形态改变,缺乏肠道11β-HSD1合成的小鼠表现出更高的肠上皮层通透性,且黏膜屏障功能增强。

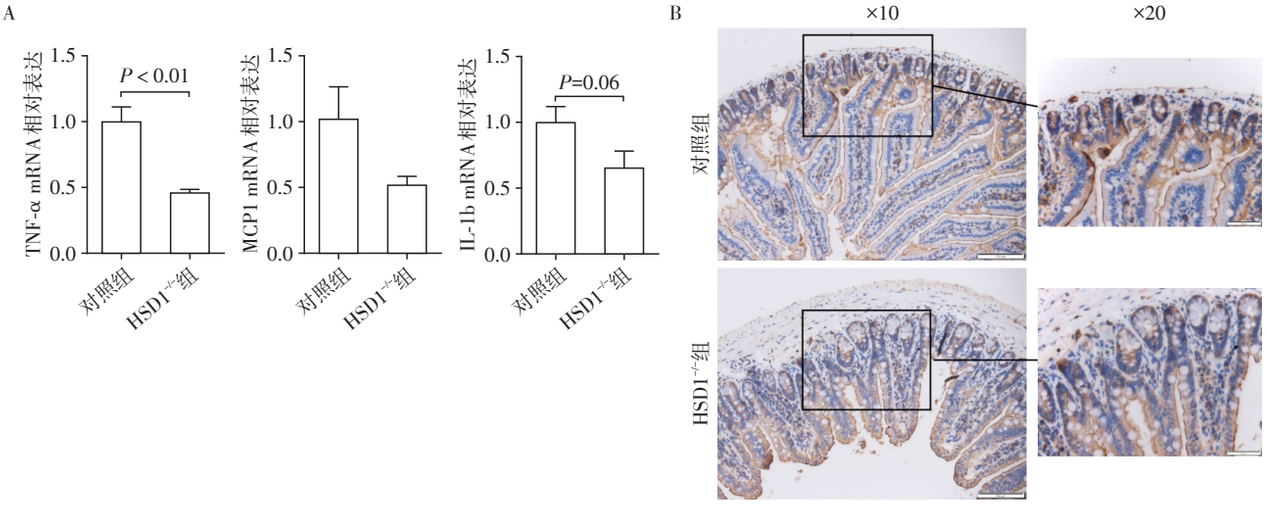
GC通常能够具有有效的免疫调节和免疫抑制活性,肠道黏膜组织能够自体产生GC且影响免疫细胞活化[15],并反过来有助于平衡这些免疫应答以避免组织损伤。肠道局部产生的GC代表负反馈的调节和维持免疫稳态[6]。本研究显示了11β-HSD1基因敲除小鼠肠道最重要的3个炎症因子TNF-α、MCP1、IL-1b均显示出明显下降趋势,所以有理由认为11β-HSD1敲除后能够改善肠的炎症状态,减轻炎症。实际上,近年来11β-HSD1在各类疾病中的重要作用已越来越受到国内外学者的关注。人体研究发现,随着年龄增加骨骼肌中11β-HSD1的表



A:定量PCR肠道黏膜相关基因MUC3及紧密连接蛋白相关基因claudin-2和TJP1的表达;B:小鼠野生组及11β-HSD1敲除基因组小肠TJP1和claudin-2免疫荧光染色(×10)。

图4　小鼠肠黏膜屏障功能

Figure 4　Barrier function of small intestine



A：定量PCR肠道炎症相关基因TNF-α、MCP1、IL-1b的表达；B：小鼠野生组及11β-HSD敲除基因组小肠F4/80免疫组化染色。

图5　小鼠肠道炎症相关基因表达

Figure 5　Inflammatory gene expression in small intestine

达逐渐增高，肌肉力量逐渐减弱，体脂含量进行性增加，并且胰岛素敏感性逐步下降，提示11β-HSD1与年龄相关的肌少症和衰弱密切相关。动物研究发现，11β-HSD1基因缺陷的小鼠可以抵抗脂多糖诱导的脑代谢障碍及脑组织炎症状态。对阿尔海默茨病模型的小鼠使用11β-HSD1抑制剂可显著改善其认知功能障碍。更有趣的是，在人体活检的皮肤组织中使用11β-HSD1抑制剂，发现其可明显增加真皮组织中的胶原含量，有效改善紫外线诱导的皮肤老化。既往研究也证实，11β-HSD1抑制剂能够促进成骨细胞的分化，改善成骨细胞功能，是治疗老年性骨质疏松症的有效手段[16]。因此，这些都为11β-HSD1基因参与调控肠道炎症提供了线索，抑制体内11β-HSD1可降低体内糖皮质激素活性、改善肠道组织功能，从而能进一步挖掘溃疡性结肠炎及克罗恩病等一些肠道类固醇生成相关疾病的发病机制，为进一步治疗这些疾病提供新靶点。

然而由于糖皮质激素是重要的免疫调节因子，11β-HSD1也在体内广泛表达（脂肪、肝脏、巨噬细胞、血管内皮、呼吸道上皮等），在不同组织中发挥着不同效应。全面抑制11β-HSD1可能会因影响免疫系统功能而导致不良后果。如Randall等[17]报道，与在肠道组织的作用相反，抑制气道上皮细胞的11β-HSD1活性反而会加重气道炎症。无独有偶，另外也有学者发现，特异性敲除肝脏的11β-HSD1完全不能改善小鼠高脂饮食诱导的肥胖、胰岛素抵抗等代谢紊乱。因此，11β-HSD1具有组织特异性，全面抑制机体的11β-HSD1，会作用于体内多个组织，带来有害影响。如何仅仅将11β-HSD1抑制剂作用于肠道组织，改善肠道功能，而不带来其他方面的不良反应，是一个巨大的挑战。对此将应用11β-HSD1基因肠道特异性敲除的小鼠进行后续研究，探究抑制肠道局部11β-HSD1对整个肠道免疫功能及全身免疫反应的调节。

[参考文献]

[1] Furness JB, Rivera LR, Cho HJ, et al. The gut as a sensory organ[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2013, 10, 729-740

[2] Allaire JM, Crowley SM, Law HT, et al. The intestinal epithelium: Central coordinator of mucosal immunity[J]. Trends Immunol, 2018, 39: 677-696

[3] Talabér G, Jondal M, Okret S. Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: Immune regulation and aspects on local organ homeostasis[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2013, 380(1): 89-98

[4] Bouguen G, Dubuquoy L, Desreumaux P, et al. Intestinal steroidogenesis[J]. Steroids, 2015, 103(1): 64-71

[5] Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids[J]. Nat Rev Immunol, 2017, 17: 233-247

[6] Kostadinova F, Schwaderer J, Sebeo V, et al. Why does the gut synthesize glucocorticoids?[J]. Ann Med, 2014, 46, 490-497

[7] Incollingo Rodriguez AC, Epel ES, White ML, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and cortisol activity in obesity: A systematic review[J]. Psychoneuroendocrinology, 2015, 62: 301-318

[8] Gray GA, White CI., Castellan RF, et al. Getting to the heart of intracellular glucocorticoid regeneration: 11beta-

HSD1 in the myocardium[J]. J Mol Endocrinol,2017,58:R1-R13
[9] Seckl JR. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases: changing glucocorticoid action[J]. Curr Opin Pharmacol,2004,4:597-602
[10] Wang L, Liu J, Zhang A, et al. BVT.2733, a selective 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, attenuates obesity and inflammation in diet-induced obese mice[J]. PLoS One,2012,7:e40056
[11] Anagnostis P, Katsiki N, Adamidou F, et al. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors: novel agents for the treatment of metabolic syndrome and obesity-related disorders?[J]. Metabolism,2013,62(1):21-33
[12] Yu J, Kong X, Liu J, et al. Expression profiling of PPARγ-regulated microRNAs in human subcutaneous and visceral adipogenesis in both genders[J]. Endocrinology,2014,155:2155-2165
[13] Santaolalla R, Abreu MT. Innate immunity in the small intestine[J]. Curr Opin Gastroenterol,2012,28:124-129
[14] Cima I, Corazza N, Dick B, et al. Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation[J]. J Exp Med,2004,200:1635-1646
[15] Mueller M, Atanasov A, Cima I, et al. Differential regulation of glucocorticoid synthesis in murine intestinal epithelial versus adrenocortical cell lines[J]. Endocrinology,2007,148:1445-1453
[16] 祁寒梅,吴　琳,王　龙,等.小鼠11β-HSD1基因过表达的前成骨细胞系的建立[J].南京医科大学学报(自然科学版),2012,32(5):626-630
[17] Randall MJ, Kostin SF, Burgess EJ, et al. Anti-inflammatory effects of levalbuterol-induced 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in airway epithelial cells[J]. Front Endocrinol(Lausanne),2014,5:236

[收稿日期]　2018-12-17

(上接第1105页)

[11] Yang Y, Lei H, Wang B. Effect of the PTHrP(1-34)analog abaloparatide on inducing chondrogenesis involves inhibition of intracellular reactive oxygen species production[J]. Biochem Biophys Res Commun,2019,509(4):960-965
[12] Steinbusch MMF, Caron MMJ, Surtel DAM, et al. The anti-viral protein viperin regulates chondrogenic differentiation via CXCL10 protein secretion[J]. J Biol Chem,2019,294(13):5121-5136
[13] 刘　浩,陆征峰,杨　凯,等.脂肪间充质干细胞中Noggin下调能够促进GDF5的表达[J].南京医科大学学报(自然科学版),2018,38(9):1181-1186
[14] 吴　伟,焦俊玥,李　慧,等.运动对软骨代谢影响的研究进展[J].中国骨质疏松杂志,2018,24(10):1384-1389
[15] Gobbi A, Karnatzikos G, Sankineani SR. One-step surgery with multipotent stem cells for the treatment of large full-thickness chondral defects of the knee[J]. Am J Sports Med,2014,42(3):648-657
[16] Richardson SM, Kalamegam G, Pushparaj PN, et al. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration[J]. Methods,2016,99(1):69-80
[17] 田义超,周端鹏,崔艳君,等.人脐带间充质干细胞的安全性毒理学评价[J].中国新药杂志,2019,28(2):159-163
[18] 杨旭芳,冯　华,杨云芳,等.人脐带血来源间充质干细胞的成脂分化[J].全科口腔医学电子杂志,2019,6(1):146-147
[19] Wu SG, Chang TH, Tsai MF, et al. IGFBP7 drives resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition in lung cancer[J]. Cancers(Basel),2019,11(1):36
[20] Cai X, Wang L, Wang X, et al. Silence of IGFBP7 suppresses apoptosis and epithelial mesenchymal transformation of high glucose induced-podocytes[J]. Exp Ther Med,2018,16(2):1095-1102
[21] 袁剑峰,张翠芳,苏振宏.胰岛素样生长因子结合蛋白7在肝硬化患者急性肾损伤时的诊断价值[J].皖南医学院学报,2018,37(3):233-236
[22] Wang X, Ma T, Wan X, et al. IGFBP7 regulates sepsis-induced acute kidney injury through ERK1/2 signaling[J]. J Cell Biochem, 2018, doi: 10.1002/jcb.28035.[Epub ahead of print]
[22] Bolomsky A, Hose D, Schreder M, et al. Insulin like growth factor binding protein 7(IGFBP7)expression is linked to poor prognosis but may protect from bone disease in multiple myeloma[J]. J Hematol Oncol,2015,8:10

[收稿日期]　2019-03-17