

王怡如,周唯,蒋笑影,等. 美沙拉秦干预下 IBD 小鼠结肠组织的转录组分析 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(1): 7-16.
Wang YR, Zhou W, Jiang XY, et al. RNA-seq based gene expression profiling of colon tissue from a mesalazine-treated mouse model of inflammatory bowel disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(1): 7-16.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.01.001

美沙拉秦干预下 IBD 小鼠结肠组织的转录组分析

王怡如^{1#},周唯^{1#},蒋笑影¹,潘一滨¹,许言午²,曹永清^{1*}

(1. 上海中医药大学附属龙华医院肛肠科,上海 200032; 2. 上海中医药大学基础医学院生物化学教研室,上海 201203)

【摘要】 目的 应用转录组测序技术 (RNA sequencing, RNA-seq) 检测炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 小鼠结肠组织的基因表达变化,增进对美沙拉秦 (5-aminosalicylic acid, 5-ASA) 治疗 IBD 的分子机制的理解。**方法** 用葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 建立 IBD 小鼠模型。将 15 只 C57BL/6 小鼠随机均分为三组:对照组、DSS 组和 DSS+5-ASA 组。每组随机选择 3 只小鼠取结肠组织进行测序,经两组间比较,鉴定差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 及重要生物学信号通路。随后通过基因表达数据库 (gene expression omnibus, GEO) 中溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 患者和经美沙拉秦治疗后患者结肠组织活检的微阵列 (microarray) 数据,验证前面鉴定得到的子显著 DEGs。**结果** DSS+5-ASA 组与 DSS 组比较中共得到 2983 个差异表达基因,上调基因 604 个,下调基因 753 个;DSS 组与对照组比较,共得到 1626 个差异表达基因,其中上调基因 820 个,下调基因 806 个。GO (gene ontology) 和 KEGG 富集分析结果显示,这些 DEGs 与免疫反应等信号通路有关。部分表达差异显著的基因如 *Rnase1* 和 *Cxcl10*,在 UC 患者结肠组织中有相似的表达趋势。**结论** 经美沙拉秦治疗的 IBD 模型小鼠结肠组织的基因表达谱,与 IBD 患者对比进行验证,得到数个 IBD 治疗过程中可能涉及的基因和生物学通路,增加了美沙拉秦对 IBD 治疗作用机制的进一步理解。

【关键词】 炎症性肠病;美沙拉秦;葡聚糖硫酸钠;转录组测序;差异表达基因

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022) 01-0007-10

RNA-seq based gene expression profiling of colon tissue from a mesalazine-treated mouse model of inflammatory bowel disease

WANG Yiru^{1#}, ZHOU Wei^{1#}, JIANG Xiaoying¹, PAN Yibin¹, XU Yanwu², CAO Yongqing^{1*}

(1. Department of Anal-rectal Surgery, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China. 2. Department of Biochemistry, School of Basic Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

Corresponding author: CAO Yongqing. E-mail: cyq88tcm@163.com

【Abstract】 Objective To explore gene expression profiling of colon tissues from mesalazine-treated inflammatory bowel disease (IBD) mice using RNA-sequencing (RNA-seq), and provide a better understanding of the mechanism of mesalazine (5-ASA) in the treatment of IBD. **Methods** Dextran sodium sulfate (DSS) was used to establish the IBD mouse model. Fifteen mice (C57BL/6) were randomly assigned to three groups: control ($n=5$), DSS ($n=5$, using DSS to induce IBD), and DSS+5-ASA ($n=5$, using 5-ASA to treat IBD). Three mice per group were randomly selected and colon tissues extracted for RNA-seq. Bioinformatic analysis was used for two comparisons (DSS vs. control, and DSS+5-

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题 (81874469, 81202696)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (81874469, 81202696)。

[作者简介] 王怡如 (1991—), 女, 博士, 研究方向: 中医外科学 (肛肠方向)。Email: wangyiru1707@163.com;

周唯 (1991—), 女, 博士, 研究方向: 中医外科学 (肛肠方向)。Email: zhouweitcm@163.com。

#共同第一作者

[通信作者] 曹永清 (1961—), 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中医外科及中医药治疗大肠肛门疾病。

Email: cyq88tcm@163.com

ASA vs. DSS), and differentially expressed genes (DEGs) and biological signal pathways were identified. The top DEGs were further examined using microarray data of biopsies from ulcerative colitis patients and those treated with 5-ASA.

Results Bioinformatic analysis identified 2983 DEGs, including 604 up-regulated and 753 down-regulated genes in the DSS+5-ASA group and DSS group comparison. In the DSS group and control group comparison, there were 1626 DEGs, 820 of which were up-regulated and 806 were down-regulated. Gene ontology and KEGG analysis of these DEGs suggested certain biological processes and pathways. The expression patterns of top DEG candidates, such as *Rnase1* and *Cxcl10*, were confirmed in patients' samples. **Conclusions** By exploring gene expression profiles in colon tissues from 5-ASA-treated IBD mice using RNA-seq and human mucosal biopsies, this study identified genes and pathways involved in the treatment process of IBD, providing new insights for understanding the mechanism of 5-ASA in IBD treatment.

【Keywords】 inflammatory bowel disease; mesalazine; dextran sodium sulfate; RNA sequencing; differentially expressed genes

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一组慢性、复发的消化道炎症性疾病,包括克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 和溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC)。UC 临床表现常见腹痛、腹泻、粘液血便等。近年来,IBD 已从传统的西方常见病逐渐发展为一种全球性疾病,世界胃肠病学组织 (World Gastroenterology Organization, WGO) 2015 年发布的指南报道欧洲与北美 UC 最高患病率分别为 505/10 万、249/10 万^[1]。据预测,由于人口基数庞大,我国 IBD 总病例数或将在 2025 年达到 150 万^[2],据粗略估算,当前我国 UC 的患病率为 11.6/10 万,已居亚洲之首^[3-4]。IBD 反复发作,迁延难愈,患者多为 20 ~ 40 岁的青壮年,患病不但极大影响患者生存质量,还带来沉重的经济负担,对 IBD 的防治和机制研究艰巨而迫切。

IBD 的发病机制通常认为与环境、感染、免疫、遗传等因素有关,免疫因素被认为是诱发 IBD 的关键因素^[5]。IBD 继发于肠道黏膜免疫系统的异常应答可能引起持续的慢性炎症,免疫细胞激活后及其分泌的炎性细胞因子,在 IBD 的发生发展过程中发挥着重要的调控作用^[6-7]。

IBD 的治疗药物包括氨基水杨酸制剂^[8]、糖皮质激素^[9]、抗生素、免疫抑制剂及生物制剂等^[10]。其中,美沙拉秦 (5-aminosalicylic acid, 5-ASA) 是 5-氨基水杨酸的衍生药物,在肠道内通过接触肠粘膜直接作用于黏膜及黏膜下组织,发挥抗炎作用,临床上对于轻、中度 UC 的疗效较好,而副作用较柳氮磺吡啶小^[11-12],但该药物的体内药理机制尚不明确,以往相关研究大多集中于蛋白水平,而在 IBD 这类复杂疾病的病理过程中,病变组织经治疗好转后,其基因表达可能发生显著变化,故基因水平的药理机制急需进一步探索。

前期以“IBD”、“UC”和“5-ASA”、“mesalazine”、“RNA-seq”为关键词在中英文数据库中进行检索,未查询到应用转录组测序技术探索美沙拉秦治疗 IBD 小鼠结肠组织中基因表达情况的研究。故课题组以葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导建立 IBD 结肠炎小鼠,并以美沙拉秦进行干预,经测量小鼠体重、粪便性状、DAI 评分、结肠组织炎症程度及血清 IL-6 和 TNF- α 水平,提示成功建立了 IBD 小鼠肠炎模型,证实美沙拉秦有效减轻了小鼠结肠炎症,在 IBD 小鼠肠炎发展过程中发挥了治疗作用^[13],现将通过对结肠组织进行转录组测序,从分子层面探索美沙拉秦治疗 IBD 的作用机制,试图增进对这一过程的深入理解,为其临床应用提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

15 只 10 周龄 SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠,体重 20 ~ 23 g,购于上海西普尔必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2018-0006】,饲于上海中医药大学实验动物中心【SYXK(沪)2020-0009】,予灭菌饲料、蒸馏水自由食饮,房间每 12 h 光照/黑暗循环,温度 22 ~ 25℃,湿度 50% ~ 70%。本研究经过上海中医药大学附属龙华医院伦理审查批准【审批号:2018LCSY452】,实验动物按照 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 主要试剂与仪器

美沙拉秦缓释颗粒剂 (艾迪莎,批号:15237,上海爱的发制药有限公司) 研磨成粉后用灭菌蒸馏水配制成 25 mg/mL 的混悬液。DSS (分子量 36 000 ~ 50 000, CAS#9011-18-1 M.W.) (MP Biomedicals 公

司,美国),用灭菌蒸馏水配制成 2.5% (质量体积比)的溶液。超纯水机(Millipore,型号:Millipore,德国),4℃冰箱(中科美菱公司,型号:YC-260L,中国),超低温冰箱(SANYO,型号:MDF-U 32V,日本),包埋机(Thermo,型号:HistoStar,美国),切片机(Leica,型号:RM2235,德国),组织脱水机(Leica,型号:TP1020,德国),涡旋振荡器(其林贝尔仪器制造有限公司,型号:D1008E,中国),掌上离心机(其林贝尔仪器制造有限公司,型号:D1008E,中国),低温离心机(Eppendorf,型号:5810R,德国),电子天平(光学仪器厂,型号:FA1604,中国)。

1.2 方法

1.2.1 动物造模

适应性饲养 1 周后,将 15 只小鼠完全随机分为 3 组,每组 5 只,分别为对照组(Control 组)、模型组(DSS 组)和美沙拉秦组(DSS+5-ASA 组)。参考 Chassaing 等^[14]造模方法,给予 DSS 组和 DSS+5-ASA 组小鼠 2.5% DSS(每组 300 mL,每 2 d 一换)自由饮用 7 d,第 8 天起给予灭菌蒸馏水继续自由饮用 7 d;对照组小鼠自由饮用等量的灭菌蒸馏水。第 8 天开始,DSS+5-ASA 组小鼠给予美沙拉秦(0.5 g/(kg·d))灌胃 7 d,每天 2 次,每次 0.2 mL,对照组和 DSS 组小鼠灌胃等量的灭菌蒸馏水。

1.2.2 模型评估指标

记录各组小鼠体重变化、粪便性状、血便、疾病活动指数^[15](disease activity index,DAI)、结肠组织炎症程度指标评估造模效果。使用 ELISA 试剂盒(pg/mL,Abcam,美国)检测美沙拉秦用药后各组小鼠血清中 IL-6 与 TNF- α 的表达水平,评估美沙拉秦治疗作用。

1.2.3 转录组测序

每组随机选取 3 只小鼠的结肠组织作为样本,送至上海云序生物科技有限公司进行高通量转录组测序。

(1)总 RNA 提取与质控:使用 TRIzol(TaKaRa,日本)从小鼠结肠组织中提取总 RNA,分别通过 NanoDrop® ND-1000 分光光度仪(Thermo Fisher Scientific,美国)和变性琼脂糖凝胶电泳测定 RNA 浓度、纯度和完整性。

(2)文库制备与测序:使用 rRNA 去除试剂盒移除总 RNA 中的 rRNAs 后,通过总 RNA 文库制备试剂盒预处理 RNA。将 10 pM 文库变性为单链 DNA 分子,在 Illumina flowcell 上捕获后原位扩增为簇

(cluster),通过 BioAnalyzer 2100 生物分析仪(Agilent,美国)进行文库质控和定量后,在 Illumina HiSeq™4000(Illumina,美国)测序仪上采用双端模式(PE mode)进行 150 cycle 测序。

(3)测序分析:经过图像和碱基识别后,从 Illumina HiSeq 测序仪上收获原始序列(reads);经 cutadapt 软件(v1.9.3)修剪,删除低质量 reads,获得高质量 reads 用于分析。使用 hisat2 软件(v2.1),将高质量 reads 比对到小鼠参考基因组(UCSC MM10)上,根据 ensembl gtf 基因注释文件中已注释的 mRNA,通过 cuffdiff 软件(cufflinks 的一部分)获得 FPKM(fragments per kilobase of transcript per million mapped fragments),作为 mRNA 的表达谱。使用 R 的 heatmap2 函数,以 FPKM 值进行差异表达 mRNA 聚类分析。基于倍数变化(fold change) ≥ 2.0 ,即 $\log(FC) \geq 1.0$, $P\text{-value} \leq 0.05$ 及 FPKM 值至少在一个样品中 ≥ 0.1 作为差异筛选阈值,并在此基础上进行基因本体论(gene ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)富集分析。GO 分析包括生物过程(biological process,BP)、细胞成分(cellular component,CC)和分子功能(molecular function,MF),GO 分析注释并推测这些差异表达 mRNA 的功能;KEGG 通路分析则是推断它们可能参与的生物学信号通路,以 $P \leq 0.05$ 作为显著富集的阈值。应用 TargetScan 和 miRanda 软件预测关键环状 RNA(circular RNA, circRNA)、微小 RNA(microRNA, miRNA)和差异 mRNA 之间的相互作用,用 Cytoscape 软件构建 circRNA-miRNA-mRNA 关系网络。

1.2.4 UC 患者结肠组织活检数据

以“IBD”、“UC”、“CD”和“5-ASA”、“mesalazine”为关键词在 GEO 数据库中进行搜索,仅得到了一个与人类 UC 相关的公共数据集(GSE46451)。该数据集通过微阵列(Microarray)技术检测了 3 组(无炎症无用药组、有炎症无用药组和有炎症美沙拉秦治疗组, $n=3$)UC 患者结肠组织的基因表达谱,以探究美沙拉秦对 UC 患者的治疗效果与副作用^[16]。具体操作为:将活检组织切片置于 24 孔培养板的一个孔中,内有 300 μ L 无血清 HL-1 培养基,依次加入 100 U/mL 青霉素钠、100 mg/mL 硫酸链霉素、50 μ g/mL 庆大霉素,分别加入和不加 5-ASA(50 mmol)后在 37℃、5% CO₂ 条件下培养 6 h。FC > 2 和 $P < 0.05$ 定义为基因差异表

达。更多细节见 MacFie 等^[16]的原始论文。

1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 7.0 软件 (GraphPad Software 公司, 美国) 进行数据统计与分析。计量资料均采用平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。正态分布的计量资料组间比较采用 *t* 检验 (student's *t* test) 或单因素方差 (One-way ANOVA) 分析, 偏态分布的计量资料组间比较采用秩和检验 (Kruskal-Wallis test)。转录组测序基因表达差异分析采用 Quasi-likelihood (QL) *F* 检验。 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 mRNA 表达谱

转录组测序在 3 组小鼠结肠组织中共检测到 22

585 个 mRNA, 其中有 2983 个差异表达。当 DSS 组与对照组比较时, 分别有 820 个上调和 806 个下调的 mRNA; DSS+5-ASA 组与 DSS 组之间分别有 604 个上调和 753 个下调的 mRNA。表 1 列举了 DSS+5-ASA 组与 DSS 组比较中上调和下调的前 10 个差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 及其基因描述。散点图描述了差异表达 mRNA 的分布 (图 1A), 热图展示了对这些差异表达 mRNA 使用分层聚类分析的结果 (图 1B), 每一列代表一个样品的表达模式, 高和低表达水平分别由红线和绿线指示。编码-非编码基因共表达网络 (coding and non-coding co-expression, CNC) 分析确定了一个由 72 个 mRNA、39 个 miRNA 和 9 个 circRNA 组成的 circRNA-miRNA-mRNA 网络 (图 2)。

表 1 DSS+5-ASA 组与 DSS 组比较中差异表达前 10 位的 mRNA

Table 1 Top 10 DEGs in DSS+5-ASA vs. DSS

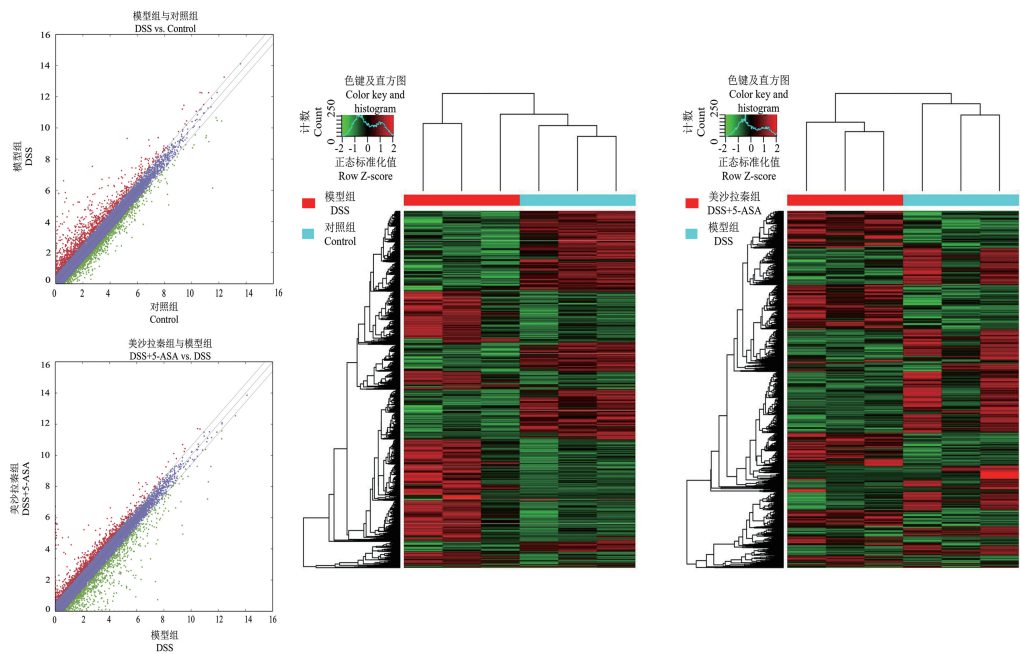
基因 Gene	基因描述 Description	倍数变化 FC	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
上调 (DSS+美沙拉秦组 vs. DSS 组) Up-regulated (DSS+5-ASA vs. DSS)	<i>Pdia2</i> 蛋白质二硫异构酶 2 Protein disulfide isomerase associated 2	15.6	0.01
	<i>Pnliprp1</i> 胰脂肪酶相关蛋白 1 Pancreatic lipase related protein 1	8.8	0.03
	<i>Cpb1</i> 胰羧肽酶 B1 Carboxypeptidase B1	7.9	0.04
	<i>Reg1</i> 再生胰岛源性 1 Regenerating islet-derived 1	6.8	0.02
	<i>Ctrl</i> 糜蛋白酶样 Chymotrypsin-like	5.8	0.00
	<i>Rnase1</i> 核糖核酸酶, RNase A 家族, 1 Ribonuclease, RNase A family, 1	4.8	0.00
	<i>Mat1a</i> 蛋氨酸腺苷转移酶 I, α Methionine adenosyltransferase I, α	4.6	0.01
	<i>Cpa2</i> 胰羧肽酶 A2 Carboxypeptidase A2, pancreatic	4.5	0.00
	<i>Gm14434</i> 预测基因 14434 Predicted gene 14434	4.4	0.00
	<i>Gp2</i> 糖蛋白 2 Glycoprotein 2	4.1	0.00
下调 (DSS+美沙拉秦组 vs. DSS 组) Down-regulated (DSS+5-ASA vs. DSS)	<i>Krt5</i> 角蛋白 5 Keratin 5	7.2	0.02
	<i>Krt6b</i> 角蛋白 6B Keratin 6B	6.1	0.05
	<i>Fabp6</i> 脂肪酸结合蛋白 6, 回肠 Fatty acid binding protein 6, ileal	6.0	0.00
	<i>Anpep</i> 丙氨酰氨肽酶 Alanyl aminopeptidase	5.9	0.00
	<i>Ppbp</i> 促血小板碱性蛋白 Pro-platelet basic protein	5.5	0.00
	<i>Ltf</i> 乳转铁蛋白 Lactotransferrin	5.4	0.00
	<i>Cxcl10</i> 趋化因子配体 10 Chemokine ligand 10	5.0	0.01
	<i>Mmp13</i> 基质金属肽酶 13 Matrix metalloproteinase 13	4.8	0.00
	<i>Iigp1</i> 干扰素诱导 GTP 酶 1 Interferon inducible GTPase 1	4.7	0.00
	<i>Gm4841</i> 预测基因 4841 Predicted gene 4841	4.5	0.00

2.2 GO 和 KEGG 分析

差异表达 mRNA 的 GO 分析结果显示, 在生物学过程 (BP) 方面, DSS 组与对照组相比, 最丰富 BP 的条目是免疫系统过程 (上调) 和单生物体过程 (下调, 图 3A)。同时, DSS 组与 DSS+5-ASA 组相比, 最重要 BP 的条目分别是单生物体运输 (上调) 和对其其他生物的防御反应 (下调, 图 3B)。在细胞成分 (CC) 方面, DSS 组与对照组相比较时, 最富集的 CC

条目集中于细胞外区域 (上调) 和细胞器 (下调, 图 3C); DSS 组与 DSS + 5-ASA 组比较时, 最富集的 CC 条目是囊泡 (上调) 和细胞外区域 (下调, 图 3D)。

在分子功能 (MF) 域中, DSS 组与 control 组比较, 最丰富的 MF 条目为蛋白质结合 (上调) 和催化活性 (下调, 图 4A); 而当 DSS 组与 DSS+5-ASA 组相比时, 结果显示催化活性 (上调) 和转运活性最为重要 (下调, 图 4B)。

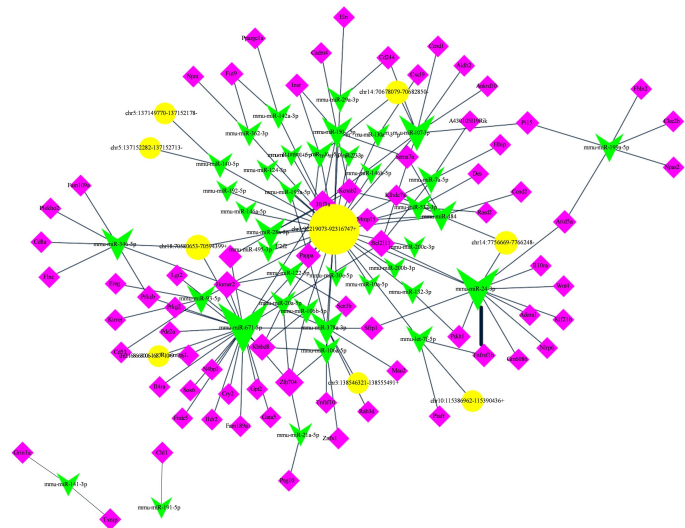


注:A:所有基因的表达分布。实线表示分析默认的显著倍数变化(≥ 2);B:差异表达基因的分层聚类分析。每一列代表一个样品的表达模式,高和低表达水平分别由红线和绿线指示。

图 1 应用转录组测序分析美沙拉秦治疗 DSS 诱导的 IBD 的基因表达谱

Note. A. Expression distribution of all genes. Solid lines indicate significant fold changes (≥ 2) by default for analysis. B. Hierarchical cluster analysis of differentially expressed genes. Each column represents the expression pattern of one sample, with high and low expression levels indicated by red and green lines, respectively.

Figure 1 Bioinformatics analysis of gene expression profiling during mesalazine treatment of DSS-induced IBD by RNA-seq



注:该网络由 72 个 mRNA(紫色),39 个 miRNA(绿色)和 9 个 circRNA(黄色)构成。

图 2 编码-非编码基因共表达网络

Note. The network consists of 72 mRNAs (purple), 39 miRNAs (green) and 9 circRNAs (yellow).

Figure 2 Coding-noncoding co-expression (CNC) network analysis

对差异表达 mRNA 进行 KEGG 分析,共鉴定出 285 条通路。根据 P 值和富集分数,分别列出了 DSS 组与对照组比较、DSS+5-ASA 组与 DSS 组比较时上调和下调的前 10 个通路(图 5A 和

5B)。比较结果中的相同通路包括粘蛋白 O-聚糖生物合成、胰腺分泌物、丙酸代谢、外源性物质通过细胞色素 P450 的代谢、近端小管碳酸氢盐回收(DSS+5-ASA 组与 DSS 组相比表达上调,

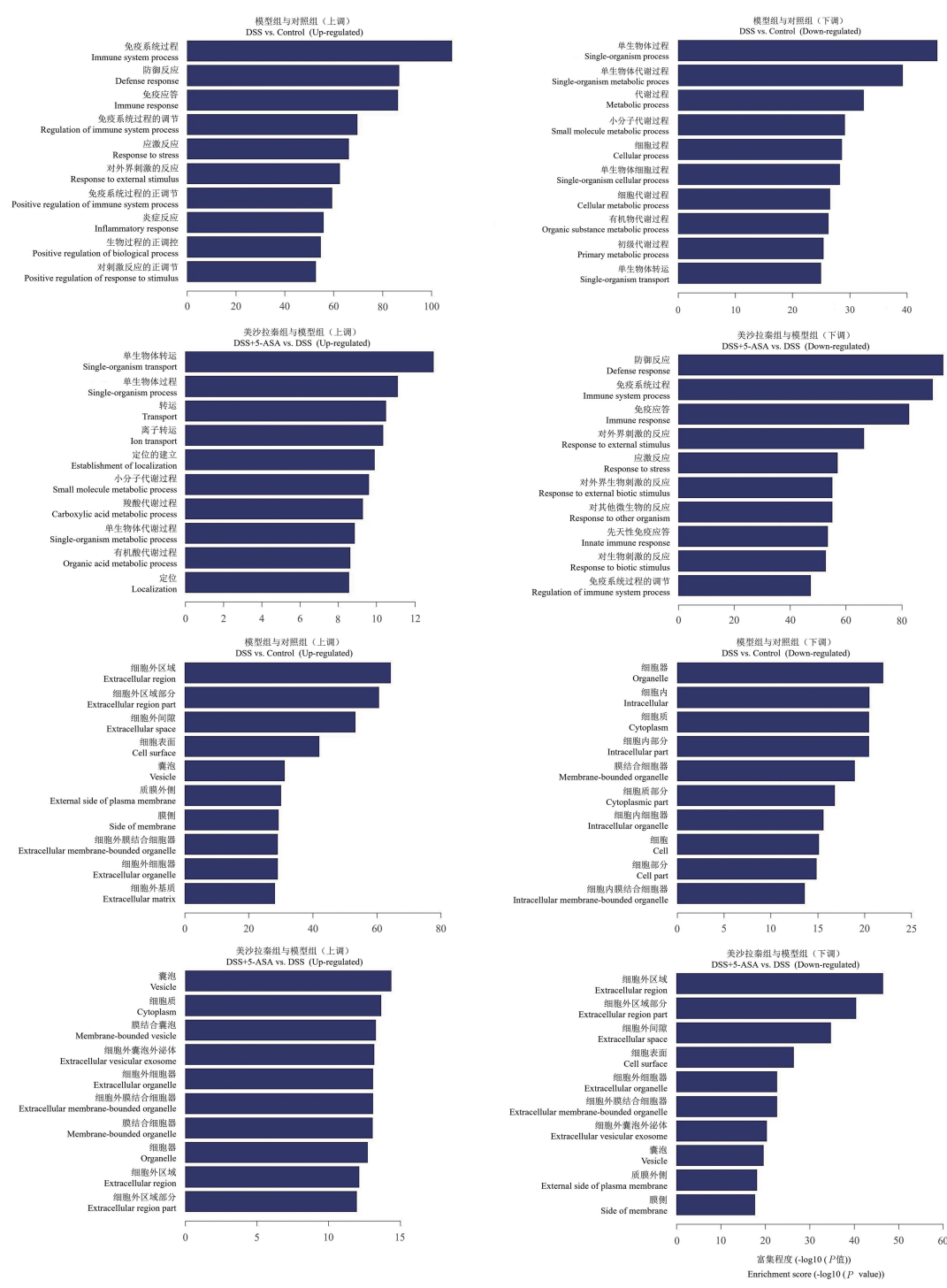


图3 差异表达基因的GO(BP和CC)分析

Figure 3 GO (BP and CC) analysis of DEGs

DSS 组与对照组相比下调) 和金黄色葡萄球菌感染、细胞因子-细胞因子受体相互作用、TNF 信号通路、肺结核、利什曼病和弓形虫病(DSS+5-ASA 组与 DSS 组相比表达下调, DSS 组与对照组相比较上调)。

2.3 部分差异表达 mRNA 的验证

为进一步验证上述结果,在 DSS+5-ASA 组和

DSS 组比较中,选择了差异表达最显著的 10 个上调和下调的 DEGs(表 2),在 GEO 数据库(GSE46451)中将这 些 DEGs 与 UC 患者结肠组织样本中的表达水平进行对照。如表 2 所示,与无炎症无用药组和有炎症美沙拉秦治疗组相比,有炎症无用药组中的角蛋白 6B(Keratin 6B, KRT6B)和 γ 干扰素诱导蛋白-10(interferon- γ -

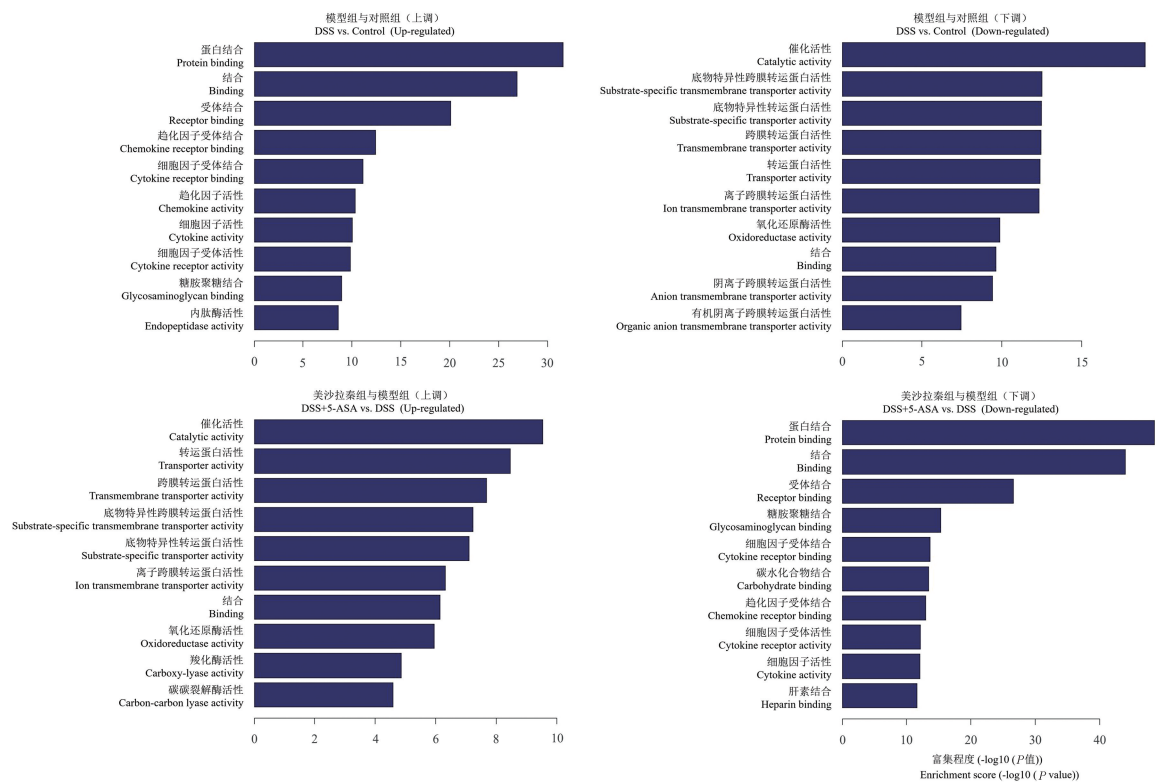


图 4 差异表达基因的 MF 分析
Figure 4 MF analysis of DEGs

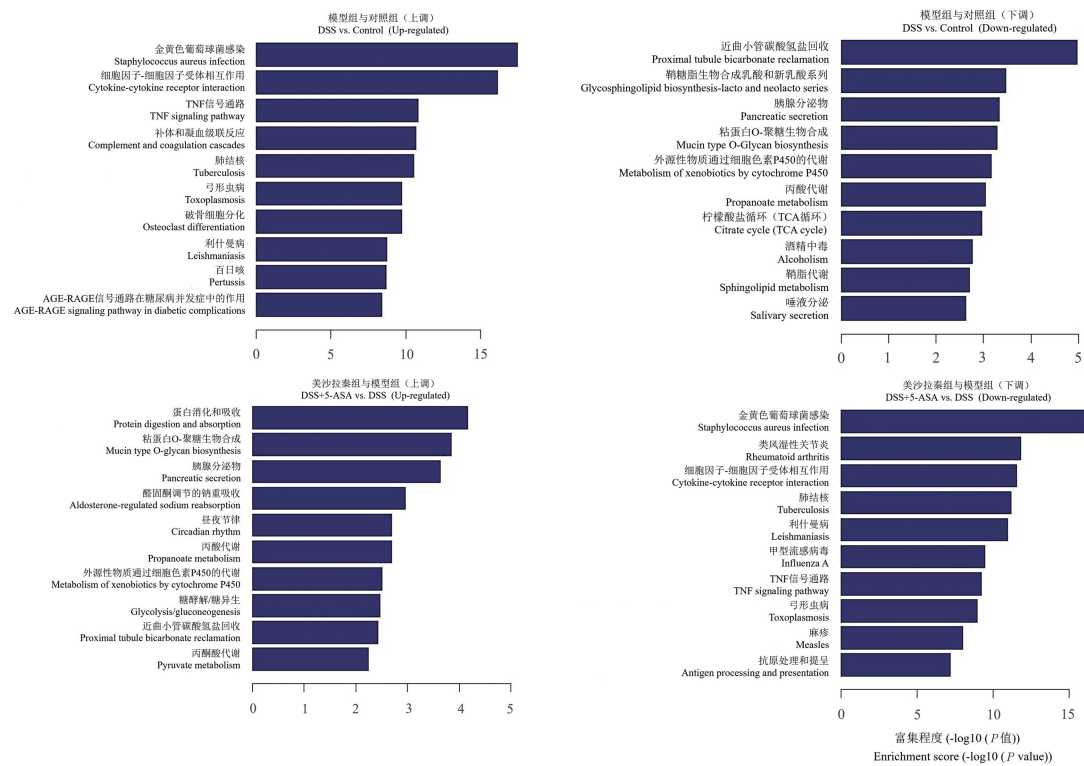


图 5 差异表达基因的 KEGG 分析
Figure 5 KEGG analysis of DEGs

inducible protein-10, CXCL10) 表达升高,核糖核
酸酶 1 (ribonuclease 1 , RNASE1) 和胰羧肽酶 B1
(carboxypeptidase B1 , CPB1) 表达下调。微阵列
结果与我们的转录组测序结果部分一致。

表 2 UC 患者结肠活检组织验证差异表达基因

Table 2 Validation of selected DEGs from colonic biopsies of UC patients

基因 Gene	无炎症无用药 Non-inflamed_no drug			有炎症无用药 Inflamed_no drug			有炎症美沙拉秦治疗 Inflamed_5-ASA		
	GSM 1130498	GSM 1130499	GSM 1130500	GSM 1130492	GSM 1130493	GSM 1130494	GSM 1130495	GSM 1130496	GSM 1130497
PDIA2	108.8	122.5	125.0	112.7	120.4	117.1	122.5	132.7	113.9
PNLIPRP1	125.7	117.2	120.5	117.6	104.5	116.9	109.9	140.3	122.0
CPB1	414.4	823.6	389.3	167.2	476.2	197.1	160.3	957.6	144.1
CTRL	132.1	112.8	133.2	138.0	130.8	130.2	137.5	137.8	142.8
RNASE1	4178.9	3433.8	2547.2	1852.0	2333.9	986.3	1494.8	1953.2	2324.2
MAT1A	122.2	108.1	113.2	106.8	121.6	123.0	102.9	122.5	129.9
CPA2	127.8	120.1	125.2	119.1	117.9	115.2	118.7	119.5	124.1
GP2	237.3	208.3	140.9	145.9	236.9	142.6	133.8	214.6	171.6
KRT5	116.1	109.3	118.0	121.0	124.8	121.4	110.0	119.2	117.6
KRT6B	131.2	122.7	132.9	241.8	185.0	418.0	156.7	123.5	162.5
FABP6	117.6	119.9	119.7	117.2	143.2	126.6	169.9	116.9	128.4
ANPEP	589.8	1044.8	610.3	562.1	2132.6	353.7	639.4	1166.3	2012.7
PPBP	194.3	219.1	208.2	248.0	210.4	209.5	278.2	199.5	197.1
LRF	144.2	138.2	135.2	155.4	147.0	145.6	146.7	127.9	137.2
CXCL10	475.5	215.0	295.7	585.2	346.6	2050.2	287.8	540.4	433.4
MMP13	128.3	136.1	147.5	123.7	120.1	133.8	120.7	120.6	126.8

3 讨论

转录组测序技术可在单核苷酸水平高效全面的获得组织器官在特定状态下的整体转录过程, mRNA 作为 DNA 与功能蛋白之间的生物信息桥梁, 测定肠粘膜组织在不同生理、病理状态下的转录活动有助于对基因表达模式及表达水平进行量化, 为疾病研究提供重要策略。5-ASA 是临床治疗 IBD 肠道炎症的常用药物, 其药理作用可能与花生四烯酸代谢、抑制反应性氧自由基生成、逆转丁酸代谢障碍、抑制免疫细胞活性及细胞因子表达有关^[17], 研究报道, 5-ASA 能下调肠道黏膜 IL-6 与 TNF- α 等与 IBD 密切相关的炎性细胞因子水平, 经 5-ASA 治疗后的炎性结肠组织中 NF- κ B 原位激活被强烈抑制, 提示其可能通过干扰促炎性 NF- κ B 信号传导, 抑制 AMPK 活性从而减轻了大鼠的结肠炎症^[18-19], 但以上美沙拉秦的药理机制是否为 5-ASA 的特异性作用尚存在争议。尽管 RNA-seq 技术已发展成熟, 以 DSS 诱导的经典 IBD 小鼠模型及以 5-ASA 作为阳性对照药物的研究也在 IBD 领域广泛应用, 但目前仍缺乏应用 RNA-seq 技术在基因水平研究 5-ASA 治疗 IBD 作用机制的报道。本研究建立了 DSS 诱导的 IBD 小鼠模型, 其肠炎表现与人类 UC 相似^[20], 经 5-ASA 灌胃治疗 7 d 后, 小鼠实验性肠炎

得到减轻^[16], 通过 RNA-seq 检测各组肠粘膜组织 mRNA 的表达谱, 将两组间的显著差异基因与 GEO 数据库中 UC 患者活检样本的基因表达进行对比, 部分 DEGs (如 *Krt6b*、*Cxcl10*、*Rnase1* 和 *Cpb1*) 得到了验证, 一方面说明了测序结果的准确性, 另一方面提示经美沙拉秦治疗后的 IBD 小鼠模型与 UC 患者的基因表达变化具有相似性, 这些表达趋势相同的基因可能揭示了部分药理机制的一致性, 也可能是治疗 IBD 的潜在靶点。*Krt6b* 属于角蛋白基因家族, 组织受损时, 促炎信号能够调节 *Krt6b* 的表达。Klinghammer 等^[21]发现, TNF- α 对角质形成细胞具有强烈的刺激作用, 可诱导 *Krt6b* 的表达, 尽管尚未见文献报道 *Krt6b* 与 IBD 之间的关系, 基于上述理论和研究结果, 推测 TNF- α 可能上调了 DSS 诱导的 IBD 小鼠结肠黏膜中 *Krt6b* 的表达, 从而导致肠上皮屏障的破坏。*Cxcl10* 是一种炎症趋化因子, 在 IFN- γ 诱导的单核细胞促进促炎细胞因子的释放方面起着重要的作用, 在 IBD 患者的体内 CXCL10 表达水平显著上升^[22]。Hyun 等^[23]认为, 阻断 *Cxcl10* 能够缓解 C57BL/6 小鼠结肠炎症状, 减轻肠道炎症。测序结果示, DSS 组小鼠结肠组织中的 *Krt6b* 和 *Cxcl10* 的表达水平显著高于 DSS+5-ASA 组 and 对照组, 与前人研究具有一致性。*Rnase1* 是一种对血管和组织起保护作用的细胞外循环内切酶。它可以被促炎

细胞因子调节,从而影响炎症过程中的内皮细胞功能^[24]。Bedenbender 等^[25]发现,TNF- α 或 IL-1 β 诱导的炎症内皮细胞中 *Rnase1* 的表达显著降低。测序结果发现,与其他两组相比,DSS 诱导的小鼠炎症结肠组织中 *Rnase1* 的表达明显下降,与前人研究趋势相符。

同时,基于这些差异表达 mRNA 的 GO(BP) 分析结果显示,其功能条目与免疫系统过程、代谢过程(包括免疫反应和炎症反应)和防御反应等相关,表明黏膜免疫,尤其是 T 细胞反应可能在结肠炎性损伤及 5-ASA 的治疗过程中起到了重要作用。Holleran 等^[26]指出先天性和适应性免疫途径的功能障碍导致了 IBD 中异常的肠道炎症反应,测序结果为这一观点增加了证据支持。最后,基于差异表达 mRNA 的 KEGG 分析,提示 5-ASA 治疗肠炎的体内过程不仅与细胞因子-细胞因子受体相互作用、TNF 信号途径、感染等炎症和免疫过程有关,还涉及胰腺分泌、黏蛋白型 O-聚糖型生物合成、细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP450)、丙酸代谢等多种机制,具有广谱治疗作用^[17],证明了以往药理研究中的部分机制。其中,外分泌型胰腺功能不全(exocrine pancreatic insufficiency, EPI)是由于原发性胰腺疾病或继发性外分泌型胰腺功能受损导致的消化不良和吸收不良的重要原因。EPI 在 IBD 患者中发病率较高,国外研究统计,在 38% 的 CD 患者和 53% 的 UC 患者中,胰腺病变没有胰腺炎的先兆。大约三分之一的 CD 患者具有针对胰腺成分的自身抗体,这提示 EPI 可能是由免疫诱导的途径削弱了外分泌的功能引起的,且这些抗体似乎对 CD 具有特异性^[27]。黏蛋白型 O-聚糖是黏蛋白的主要成分,它们分布在人体的各种黏膜部位,特别是在携带细菌的肠黏膜中表达。黏蛋白是黏液的主要成分,由杯状细胞分泌,并在常驻菌群和结肠中潜在的免疫细胞之间形成保护性的稳态屏障^[28]。Xuan 等^[29]发现大肠癌细胞中的 Core 3 黏蛋白型 O-聚糖修复可以促进 MUC1/p53/mir-200c 依赖的上皮功能。细胞色素在人类的许多组织中表达,尤其是在肝脏和肠道组织中。细胞色素 P450 是一种可自身氧化的单氧酶,能够代谢多种异源物质。感染和炎症过程与细胞色素的代谢密切相关,大多数细胞色素酶具有类似于促炎性细胞因子的功能,此外,它们通过直接激活感觉神经元和炎性细胞因子参与病理性疼痛的发生和发展^[30]。近期研究示,肠道细

菌代谢的短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFA),如乙酸和丁酸,可减轻 IBD 动物模型的炎症程度,对于增强肠道屏障功能和维持肠道稳态也具有重要性^[31-33]。最后,基于差异的 DEGs,预测并构建了一组由 72 个 mRNA、39 个 miRNA 和 9 个 circRNA 组成的编码-非编码基因组成的共表达网络,基因共表达网络主要围绕枢纽基因(Hub gene)或基因模块(Gene modules)展开,枢纽基因是某个通路或生物过程的关键基因,而有相似表达的基因则会被归为同一模块,枢纽基因与其链接的基因模块的相关性可以初步鉴定一些候选基因,为疾病诊治提供预测及靶点,也为我们的进一步研究提供了方向。

综上,本研究表明,5-ASA 治疗 DSS 诱导的 IBD 小鼠实验性肠炎的机制涉及了与免疫、炎症、代谢等一系列生物学过程,改变了炎性肠粘膜的基因表达,治疗前后部分差异表达的基因与 UC 患者的基因表达一致,虽然这些结果尚待进一步验证,但仍为 5-ASA 的机制提供了部分依据,也今后的研究提供新的线索和思路。

参 考 文 献(References)

- [1] Bernstein CN, Eliakim A, Fedail S, et al. World gastroenterology organisation global guidelines inflammatory bowel disease: update august 2015 [J]. J Clin Gastroenterol, 2016, 50(10): 803-818.
- [2] Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025 [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015, 12(12): 720-727.
- [3] Ng SC, Shi HY, Hamidi N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies [J]. Lancet, 2017, 390(10114): 2769-2778.
- [4] 薛林云, 欧阳钦, 黄中华, 等. 近 20 年中国 IBD 研究进展——20 年文献总结 [J]. 国际消化病杂志, 2013, 33(4): 276-278.
- Xue LY, Ouyang Q, Huang ZH, et al. Research progress of IBD in China in the past 20 years-20-year literature summary [J]. Int J Dig Dis, 2013, 33(4): 276-278.
- [5] Park JH, Peyrin-Biroulet L, Eisenhut M, et al. IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules [J]. Autoimmun Rev, 2017, 16(4): 416-426.
- [6] Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. Nature, 2007, 448(7152): 427-434.
- [7] Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease [J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(5): 313-323.
- [8] Pithadia AB, Jain S. Treatment of inflammatory bowel disease

- (IBD) [J]. *Pharmacol Rep*, 2011, 63(3): 629–642.
- [9] Gabryel M, Skrzypczak-Zielinska M, Kucharski MA, et al. The impact of genetic factors on response to glucocorticoids therapy in IBD [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2016, 51(6): 654–665.
- [10] Pugliese D, Felice C, Papa A, et al. Anti TNF- α therapy for ulcerative colitis: current status and prospects for the future [J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2017, 13(3): 223–233.
- [11] Schreiber S, Hanauer SB, Sandborn WJ, et al. Time to symptom resolution in ulcerative colitis with multimatrix mesalazine treatment: a pooled analysis [J]. *J Crohns Colitis*, 2020, 14(9): 1274–1281.
- [12] Lamb CA, Kennedy NA, Raine T, et al. British Society of Gastroenterology consensus guidelines on the management of inflammatory bowel disease in adults [J]. *Gut*, 2019, 68(3): s1–s106.
- [13] Zhou W, Zhang HY, Pan YB, et al. circRNA expression profiling of colon tissue from mesalazine-treated mouse of inflammatory bowel disease reveals an important circRNA-miRNA-mRNA pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(7): 10187–10207.
- [14] Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, et al. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice [J]. *Curr Protoc Immunol*, 2014, 104: 15.25.1–15.25.14.
- [15] Hirata I, Yasumoto S, Toshina K, et al. Evaluation of the effect of pyrrolidine dithiocarbamate in suppressing inflammation in mice with dextran sodium sulfate-induced colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(11): 1666–1671.
- [16] MacFie TS, Poulosom R, Parker A, et al. DUOX2 and DUOX2 form the predominant enzyme system capable of producing the reactive oxygen species H_2O_2 in active ulcerative colitis and are modulated by 5-aminosalicylic acid [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(3): 514–524.
- [17] 郑家驹. 氨基水杨酸盐治疗炎症性肠病的药理学研究 [J]. *中国药房*, 2005, 16(13): 1025–1028.
- Zheng JJ. Pharmacological study of aminosalicylates in the treatment of inflammatory bowel disease [J]. *Chin Pharm*, 2005, 16(13): 1025–1028.
- [18] Bantel H, Berg C, Vieth M, et al. Mesalazine inhibits activation of transcription factor NF- κ B in inflamed mucosa of patients with ulcerative colitis [J]. *Am J Gastroenterol*, 2000, 95(12): 3452–3457.
- [19] Park H, Kim W, Kim D, et al. Mesalazine activates adenosine monophosphate-activated protein kinase: implication in the anti-inflammatory activity of this anti-colitic drug [J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2019, 12(4): 272–280.
- [20] 陈素傲, 金世柱. 葡聚糖硫酸钠诱导鼠溃疡性结肠炎模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(4): 142–146.
- Chen SA, Jin SZ. Murine model of dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis [J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(4): 142–146.
- [21] Klinghammer K, Walther W, Hoffmann J. Choosing wisely - Preclinical test models in the era of precision medicine [J]. *Cancer Treat Rev*, 2017, 55: 36–45.
- [22] Ostvik AE, Granlund AV, Bugge M, et al. Enhanced expression of CXCL10 in inflammatory bowel disease: potential role of mucosal Toll-like receptor 3 stimulation [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19(2): 265–274.
- [23] Hyun JG, Lee G, Brown JB, et al. Anti-interferon-inducible chemokine, CXCL10, reduces colitis by impairing T helper-1 induction and recruitment in mice [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2005, 11(9): 799–805.
- [24] Lu L, Li J, Moussaoui M, et al. Immune modulation by human secreted RNases at the extracellular space [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1012.
- [25] Bedenbender K, Scheller N, Fischer S, et al. Inflammation-mediated deacetylation of the ribonuclease 1 promoter via histone deacetylase 2 in endothelial cells [J]. *FASEB J*, 2019, 33(8): 9017–9029.
- [26] Holleran G, Lopetuso L, Petito V, et al. The innate and adaptive immune system as targets for biologic therapies in inflammatory bowel disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10): 2020.
- [27] Singh VK, Haupt ME, Geller DE, et al. Less common etiologies of exocrine pancreatic insufficiency [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(39): 7059–7076.
- [28] Ye J, Wei X, Shang Y, et al. Core 3 mucin-type O-glycan restoration in colorectal cancer cells promotes MUC1/p53/mir-200c-dependent epithelial identity [J]. *Oncogene*, 2017, 36(46): 6391–6407.
- [29] Xuan L, Luan G, Wang Y, et al. MicroRNAs regulating mucin type O-glycan biosynthesis and transforming growth factor beta signaling pathways in nasal mucosa of patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps in Northern China [J]. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2019, 9(1): 106–113.
- [30] Stavropoulou E, Pircalabioru GG, Bezirtoglou E. The role of cytochromes P450 in infection [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 89.
- [31] Chen J, Vitetta L. Butyrate in inflammatory bowel disease therapy [J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(5): 1511.
- [32] Zhai S, Qin S, Li L, et al. Dietary butyrate suppresses inflammation through modulating gut microbiota in high-fat diet-fed mice [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2019, 366(13): 153.
- [33] Li G, Lin J, Zhang C, et al. Microbiota metabolite butyrate constrains neutrophil functions and ameliorates mucosal inflammation in inflammatory bowel disease [J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1968257.

[收稿日期] 2021-07-06