

吴雨泓,陈碧华,吴欢,等. 炎症性肠病子代患病的性别差异及其机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(7): 819-827.
WU Y H, CHEN B H, WU H, et al. Effects and mechanisms of sex differences on the prevalence of inflammatory bowel disease in offspring [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(7): 819-827.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.07.001

炎症性肠病子代患病的性别差异及其机制研究

吴雨泓^{1,2,3}, 陈碧华^{1,2,3}, 吴欢^{1,2,3}, 刘瀚文^{1,2,3}, 欧阳璞玉^{1,2,3},
孟轩夷^{1,3,4*}, 陈红兵^{1,3,4}

(1. 南昌大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 南昌 330047; 2. 南昌大学食品学院, 南昌 330047;
3. 南昌大学江西省食物过敏重点实验室, 南昌 330047; 4. 南昌大学中德联合研究院, 南昌 330047)

【摘要】 目的 探讨炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 小鼠子代中患 IBD 是否存在性别差异。
方法 将 BALB/c 雌鼠随机分为正常对照组 (Naïve 组) 和 DSS 模型组 (DSS 组), Naïve 组小鼠自由饮用高压灭菌水, DSS 组连续饮用 2% 葡聚糖硫酸钠溶液 (dextran sodium sulfate, DSS), 7 d 后更换为自由饮用高压灭菌水 10 d, 共进行 3 ~ 4 个循环, 同时与健康雄鼠合笼构建 IBD 母鼠模型。待幼鼠出生后 8 周, 将幼鼠分为 Con 组和 IBD 组, Con 组自由饮用高压灭菌水 7 d, IBD 组饮用 3% DSS 溶液 7 d 构建 IBD 模型。造模期间通过每日监测小鼠体重、粪便一致性以及便血情况进行疾病活动指数评分; 观察结肠组织的病理切片、杯状细胞和黏液层变化; 酶联免疫吸附法检测结肠中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、IL-33 和 IL-10 的含量; 实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 测定结肠中紧密连接蛋白和 MUC-2 mRNA 表达水平。结果 与 IBD 雌性小鼠相比, IBD 雄性小鼠疾病活动指数评分更高、结肠显著缩短, 结肠中出现大量炎性浸润、隐窝异常和杯状细胞缺失的现象, 闭合蛋白 (occludin, OCLN) 的 mRNA 相对表达量显著降低, IL-6、IL-33 水平显著升高、IL-10 水平显著下降。结论 IBD 小鼠的子代中雄鼠比雌鼠的结肠炎症症状更严重, 主要与肠道上皮屏障功能严重受损有关。

【关键词】 炎症性肠病; 结肠炎; 炎症反应; 上皮屏障; 肠道屏障

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 07-0819-09

Effects and mechanisms of sex differences on the prevalence of inflammatory bowel disease in offspring

WU Yuhong^{1,2,3}, CHEN Bihua^{1,2,3}, WU Huan^{1,2,3}, LIU Hanwen^{1,2,3}, OUYANG Puyu^{1,2,3},
MENG Xuanyi^{1,3,4*}, CHEN Hongbing^{1,3,4}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
2. College of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 3. Jiangxi
Province Key Laboratory of Food Allergy, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
4. Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Corresponding author: MENG Xuanyi. E-mail: mengxuanyi@ncu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate whether there are sex differences in inflammatory bowel disease (IBD) among the offspring of mice with IBD. **Methods** BALB/c female mice were randomly divided into Naïve and DSS groups. The mice in the Naïve group drank autoclaved water freely, and the DSS group freely drank 2% dextran sodium sulfate (DSS) for 7 days before it was replaced with autoclaved water for 10 days. A total of 3 ~ 4 cycles were applied, and the IBD female mice were paired with healthy male mice in cages. When the pups were 8 weeks old, they were divided into the

[基金项目] 国家自然科学基金 (32102092), 江西省自然科学基金 (20224BAB215009)。

Funded by the National Natural Science Foundation of China (32102092), the Jiangxi Provincial Natural Science Foundation (20224BAB215009)。

[作者简介] 吴雨泓, 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 食物过敏和炎症性肠病。Email: wuyuhong@email.ncu.edu.cn

[通信作者] 孟轩夷, 女, 副研究员, 博士, 研究方向: 食物过敏和炎症性肠病。Email: mengxuanyi@ncu.edu.cn

Con group and IBD group. The Con group drank autoclaved water freely for 7 days, and the IBD group drank 3% DSS for 7 days. During the modeling period, disease activity index was scored by monitoring body weight, fecal consistency, and the presence of blood in stool every day. Pathological sections were taken to observe changes in goblet cells and the mucus layer of colon tissues. The concentrations of interleukin (IL)-6, IL-1 β , IL-33, and IL-10 in the colon were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Real-time quantitative PCR was used to determine the mRNA expression levels of tight-junction proteins and MUC-2 in the colon. **Results** Compared with female IBD mice, male IBD mice had higher DAI scores, significantly shorter colons, larger amounts of inflammatory infiltrate, more crypt abnormalities, and a higher absence of goblet cells in the colon; their relative mRNA expression of occludin mRNA was significantly reduced, levels of IL-6 and IL-33 were significantly increased, and level of IL-10 was significantly decreased. **Conclusions** The symptoms of colitis in the offspring of IBD mice were more severe in male than in female mice, a result that was mainly attributed to the more severely impaired intestinal epithelial barrier function in males.

【Keywords】 inflammatory bowel disease; colitis; inflammatory response; epithelial barrier; gut barrier

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

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一类由基因易感个体对细菌产生异常黏膜免疫反应而引起的消化道疾病, 主要包括克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 和溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC)^[1-3]。目前, IBD 的发病机制尚不明确, 可能影响发病的主要因素有遗传、环境、肠道菌群失调以及黏膜免疫功能障碍^[4-6]。肠黏膜屏障作为与外部环境相互作用的主要部位, 由生物屏障、化学屏障、上皮屏障和免疫屏障 4 部分组成^[2,5], 肠道屏障结构和功能的完整性可以有效预防细菌、有害物质的入侵^[7]。越来越多的证据表明, IBD 与肠道上皮屏障缺陷和过度炎症反应密切相关^[7-9]。上皮屏障缺陷的起始阶段是肠道屏障和黏膜稳态的破坏^[10-11]。结肠中粘液的主要成分是杯状细胞分泌的粘蛋白-2 (MUC-2), 主要功能是为肠道提供保护层^[2,12]。然而, IBD 会导致杯状细胞减少甚至缺失以及紧密连接蛋白表达异常, 从而导致保护层破坏屏障功能进一步丧失。

中青年是患 IBD 的高发人群, 其中女性的发病率明显高于男性, 大部分 IBD 女性患者处于生育高峰期^[1,13]。阳性家族史是患 IBD 的最强风险因素, 若父母一方患 IBD, 其后代 IBD 的发病风险比普通人群高 2 ~ 13 倍^[14]。流行病学调查发现, 与患 IBD 的父亲相比, 患 IBD 的母亲疾病遗传率可能更高^[13]。2017 年一项关于 IBD 母亲后代健康结果的队列研究发现, 与非 IBD 母亲的后代相比, IBD 母亲后代患 IBD 的风险更高^[15], 出生后 1 周菌群多样性降低, 并在未来 3 个月内表现出肠道菌群组成的差异^[13], 可见肠道菌群在 IBD 发病机制中的重要作用^[1,16]。因此, 除了遗传因素的影响, IBD 后代易患 IBD 的主要因素是肠道菌群失调, 进而导致肠道屏

障功能的紊乱^[17]。尽管 IBD 母亲后代患 IBD 的风险更高, 但是 IBD 母亲后代患 IBD 的风险是否同样存在性别差异尚不清楚。

本研究拟用葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 构建溃疡性结肠炎小鼠, 探讨其子代中患 IBD 是否存在性别差异, 并阐明影响子代患 IBD 的可能影响机制, 对进一步了解 IBD 母亲的妊娠结果和改善 IBD 后代的健康状况提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 5 周龄 BALB/c 小鼠雌性 20 只、雄性 10 只, 体重 16 ~ 18 g, 由浙江维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK (浙) 2019-0001】。饲养于温度 23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C, 相对湿度 55% $\pm$ 5%, 12 h 开灯/关灯循环, 自由摄食饮水的环境, SPF 级饲料由北京科奥协力饲料有限公司提供, 适应 1 周后开始实验, 饲养于江西省药物研究所【SYXK (赣) 2021-0004】。本研究经南昌大学第二附属医院医学研究伦理委员会审查批准 (20210311-028)。

1.1.2 主要试剂与仪器

DSS (MW36000-50000) (MP Biomedicals 公司, 美国); 4% 多聚甲醛 (广州硕谱生物科技有限公司); 苏木素-伊红 (Hematoxylin and eosin, HE) 染色液套装、阿尔辛蓝过碘酸雪夫 (periodic acid schiff and alcian blue, AB-PAS) 染色液套装 (皮诺飞生物科技有限公司, 中国); 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠 (西陇科学有限公司, 中国); 吐温-20 (Solarbio 公司, 中国); 白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-10、IL-1 β 和 IL-33 试剂盒 (赛默飞世尔科技公司, 美国); 逆转

录试剂盒、PCR 试剂盒(诺唯赞生物科技股份有限公司,中国)。

4 ℃ 冰箱(中科美菱公司,型号:YC-260L,中国);电子天平(A&D Company Limited 公司,型号:LK-120A,日本);多功能酶标仪(Bio-Rad 公司,型号:Mode 1860,美国);高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技公司,型号:Sorvall ST16R,美国);超纯水机(Milipore 公司,型号:Millipore,德国);旋涡混合器(其林贝尔仪器制造有限公司,型号:D1008E,中国);组织脱水机(Leica,型号:TP1020,德国);包埋机(Thermo,型号:HistoStar,美国);切片机(Leica,型号:RM2235,德国);光学显微镜(JEOL 公司,型号:JSM-6701F,日本)。

1.2 方法

1.2.1 IBD 母鼠模型的构建

将雌性小鼠随机分为 2 组,正常对照组(Naïve 组, $n = 10$)和 DSS 模型组(DSS 组, $n = 10$),并在造模的第 10 天将雌鼠和雄鼠按照 2:1 的比例进行合笼、交配,待幼鼠出生直至断奶。Naïve 组的小鼠在整个实验过程中自由饮用高压灭菌水。DSS 组小鼠先连续饮用含 2% DSS 的高压灭菌水 7 d 后,换成自由饮用高压灭菌水 10 d 进行缓解,共进行 3 ~ 4 个循环直至幼鼠出生后断奶。每天监测小鼠的体重、粪便以及便血情况,进行疾病活动指数(disease activity index,DAI)评分,待造模结束后取肠道组织进行苏木素-伊红(HE)染色,判断 IBD 母鼠造模情况。

1.2.2 子代 IBD 模型的构建

待 24 只幼鼠出生后断奶,将雄鼠和雌鼠分开饲养至 8 周龄,雄鼠和雌鼠随机分为 4 组,包括对照雄鼠组(Con-1 组, $n = 6$)、IBD 雄鼠模型组(IBD-1 组, $n = 6$)、对照雌鼠组(Con-2 组, $n = 6$)和 IBD 雌鼠模型组(IBD-2 组, $n = 6$)。Con-1 组和 Con-2 组的小鼠在整个实验过程中自由饮用高压灭菌水。IBD-1 组和 IBD-2 组小鼠连续饮用含 3% DSS 的高压灭菌水 7 d。

1.2.3 DAI 评分

参照文献方法^[18],每日观察和检测小鼠体重、粪便一致性以及便血情况,按照表 1 标准进行 DAI 评分。DAI 评分为体重损失、粪便一致性和便血情况评分的总和。

1.2.4 脾指数和结肠长度测量

小鼠处死后取出脾进行称重,按照脾重量(mg) ×

表 1 IBD 疾病活动指数评分标准

Table 1 IBD disease activity index scoring criteria		
参数 Parameter	描述 Description	评分 Score
体重损失/% Weight loss/%	无 None	0
	1% ~ 5%	1
	5% ~ 10%	2
	10% ~ 20%	3
	> 20%	4
粪便一致性 Fecal consistency	正常 Nomal	0
	软但成型 Soft but soft	1
	松散 Loose	2
	水样便 Watery stool	3
便血 Bloody stools	严重腹泻 Severe diarrhea	4
	无 None	0
	肉眼看到便上有血 Visible blood in the stool	2
	大量血便 Large amount of blood in the stool	3
	肛周出血 Perianal bleeding	4

10/体重(g)来计算脾指数。结肠的测量是从盲肠到肛门的长度,收集 1 ~ 2 cm 远端结肠组织立即放入 4%多聚甲醛溶液中进行固定,用于组织切片的制作,其余结肠组织立即转移至-80 ℃冰箱中储存用于后续实验。

1.2.5 HE、AB-PAS 染色以及组织学评分

结肠组织在 4%多聚甲醛溶液中固定 24 ~ 48 h 后,进行石蜡包埋切片,分别用 HE 染色和 AB-PAS 染色后观察拍照。随后使用 HAN 等^[16]描述的方法进行结肠组织学评分(表 2),结肠组织学评分为炎性浸润、腺体和上皮细胞的损伤程度、病变深度和受影响范围的评分总和。

1.2.6 实时荧光定量 PCR (Real-time quantitative PCR,PT-qPCR) 检测紧密连接蛋白表达水平

TRIzol 法提取小鼠结肠组织总 RNA 并测定浓度,按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录操作,在 NCBI 网站查找相应的引物序列,筛选后送入上海生工进行合成,具体引物序列如表 3 所示。以上实验结果重复 3 次以上。

1.2.7 结肠组织中细胞因子测定

取小鼠结肠组织,按 1:9 加入生理盐水进行匀浆,4 ℃条件下 1350 r/min 离心 10 min,收集上清,按照试剂盒说明书测定细胞因子 IL-6、IL-10、IL-1 β 和 IL-33 的含量。

1.3 统计学分析

实验处理每组设置 3 个平行样本,最终用平均

表 2 结肠组织学评分

Table 2 Histopathology scoring system for colonic sections				
炎症浸润 Inflammatory infiltration	黏膜损伤 Mucosal injury	隐窝损伤 Crypt injury	病变范围 Extent of disease	评分 Score
无 None	无 None	无 None	无 None	0
轻度 Mild	黏膜层 Mucous layer	近基底膜 1/3 破坏 Proximal basement membrane 1/3	1% ~ 25%	1
中度 Moderate	黏膜及黏膜下层 Mucosa and submucosa	近基底膜 2/3 破坏 Proximal basement membrane 2/3	26% ~ 50%	2
重度 Severe	黏膜全层 Whole layer of mucosa	仅上皮层 Epithelial layer	51% ~ 75%	3
-	-	全层破坏 Full layer failure	76% ~ 100%	4

表 3 RT-qPCR 相关引物序列

Table 3 RT-qPCR related primer sequences		
引物名称 Primer name	上游引物(5'-3') Upstream primers(5'-3')	下游引物(5'-3') Downstream primers(5'-3')
MUC-2	GGCTGTATTCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
OCLN	TTGAAAGTCCACCTCCTTACAGA	CCGGATAAAAAGACTACGCTGG
CLDN-2	CAACTGGTGGGCTACATCCTA	CCCTTGGAAGCCAAACCG
ZO-1	CGAGGCATCATCCAAATAAGAAC	TCCAGAACTCTGCCCGATCAC

值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的方式表示。使用 GraphPad Prism 9.0.0 软件分析所有数据。使用 Student's *t* 检验(单因素两组间比较)或 Two-way ANOVA(双因素比较)检验确定统计显著性。当 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 IBD 母鼠造模情况评价

如图 1 所示,与 Naïve 组相比,DSS 组母鼠的 DAI 评分从造模后第 6 天开始显著增加(图 1A),在母鼠合笼前和造模结束时 DSS 组母鼠的结肠显著缩短($P < 0.05, P < 0.01$,图 1B),从结肠代表图可以看到两组的结肠长度存在显著性差异(图 1C),且组织出现炎症浸润、隐窝异常以及杯状细胞缺失的现象(图 1D,1E),说明 IBD 母鼠模型造模成功。

2.2 子代 IBD 小鼠体重变化及 DAI 评分

体重下降百分比和 DAI 评分是评价结肠炎症状严重程度的常用指标^[19]。实验结果显示,IBD-1 组小鼠在造模第 4 天出现体重显著降低($P < 0.0001$),而 IBD-2 组小鼠从第 2 天就已出现体重显著减轻($P < 0.05$)(图 2A)。如图 2B 所示,与 Con-1 组和 Con-2 组相比,IBD-1 组和 IBD-2 组小鼠的 DAI 评分显著升高,IBD-1 组和 IBD-2 组小鼠分别在造模第 5 天和第 6 天均出现精神变差、肛周出血的情况,说明 IBD-1 组和 IBD-2 组造模成功,且 IBD-1

组小鼠处于严重的结肠炎状态。

2.3 小鼠结肠长度和脾系数变化

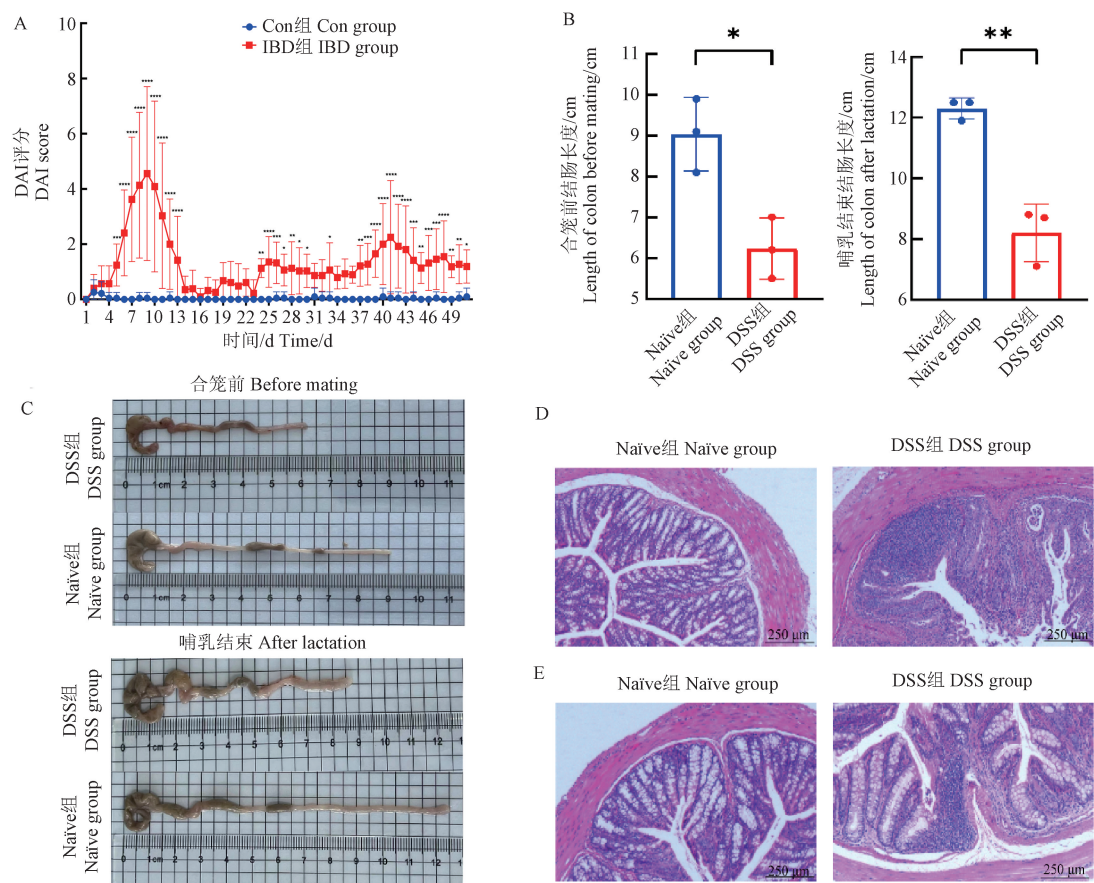
结肠长度的变化可以反映肠道的炎症程度和对肠道组织的损伤程度^[19~20],而脾指数的增加也与炎症程度相关。如图 3 所示,与 Con-1 组和 Con-2 组相比,IBD-1 组和 IBD-2 组小鼠的结肠长度均显著缩短($P < 0.0001$)、脾系数则显著升高($P < 0.0001, P < 0.05$);但与 IBD-2 组小鼠相比,IBD-1 组小鼠结肠长度缩短更严重。综上所述,IBD-1 组小鼠的结肠炎症状更为严重。

2.4 小鼠结肠组织病理学改变

如图 4A 所示,Con-1 组和 Con-2 组小鼠结肠组织形态正常,粘膜隐窝结构完整,可见大量杯状细胞,上皮细胞整齐且排列紧密,无炎症细胞浸润。相比之下,IBD-1 组和 IBD-2 组小鼠结肠组织中腺体排列紊乱,隐窝大小形状异常,且存在隐窝、杯状细胞缺失、炎症细胞浸润的情况。与 IBD-2 组相比,IBD-1 组小鼠结肠上皮表面、隐窝结构严重受损,并出现大量杯状细胞缺失、炎症细胞浸润。组织学评分结果显示,与 Con-1 组和 Con-2 组相比,IBD-1 组和 IBD-2 组小鼠的结肠组织学评分显著升高(图 4B)。以上结果表明,IBD-1 组小鼠结肠组织病理损伤更为严重。

2.5 小鼠杯状细胞、粘蛋白的分布情况

进一步对小鼠结肠组织切片进行 AB-PAS 染

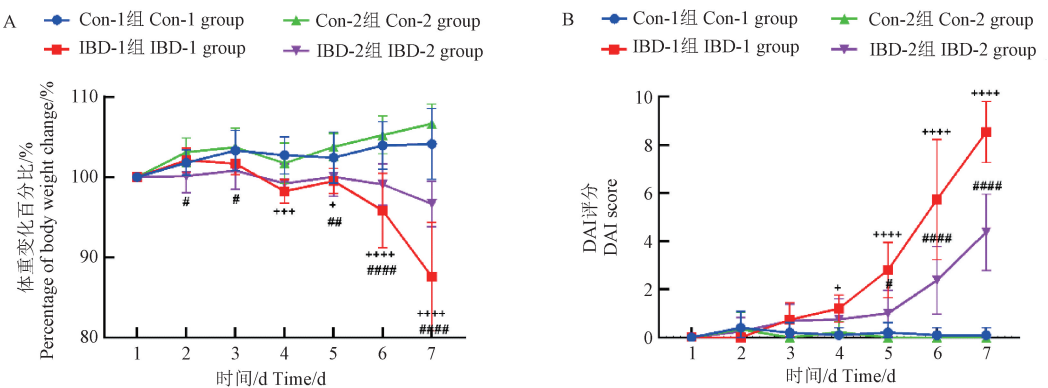


注:A;DAI 评分;B:结肠长度;C:结肠长度代表图;D:合笼前结肠组织 HE 染色;E:哺乳结束结肠组织 HE 染色;与 Naive 组相比,**P* < 0.05,***P* < 0.01,****P* < 0.001,*****P* < 0.0001。

图 1 母鼠 IBD 造模情况评价

Note. A. DAI score. B. Colon length. C. Representative picture of colon length. D. Colonic HE staining before mating. E. Colonic HE staining after lactation. Compared with Naive group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001.

Figure 1 Evaluation of IBD modeling in female mice



注:与 Con-1 组相比,+*P* < 0.05,+++*P* < 0.001,++++*P* < 0.0001;与 Con-2 组相比,#*P* < 0.05,###*P* < 0.01,####*P* < 0.0001。(下图同)

图 2 结肠炎小鼠造模情况评价

Note. Compared with Con-1 group, +*P* < 0.05, +++*P* < 0.001, *****P* < 0.0001. Compared with Con-2 group, #*P* < 0.05, ###*P* < 0.01, ####*P* < 0.0001. (The same in the following figures)

Figure 2 Evaluation of colitis mouse modeling

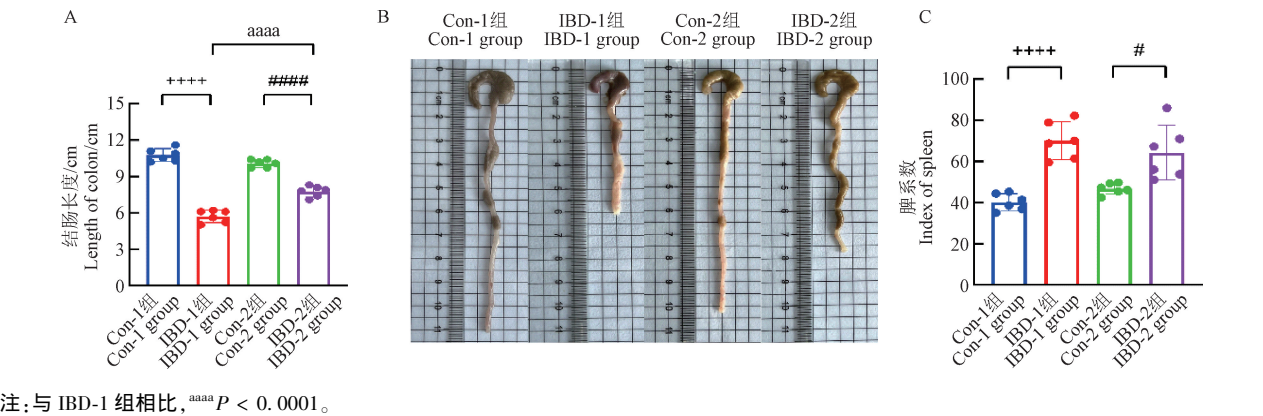


图 3 小鼠结肠长度和脾系数变化情况

Note. Compared with IBD-1 group, $^{aaaa}P < 0.0001$.

Figure 3 Changes of colon length and spleen index in mice

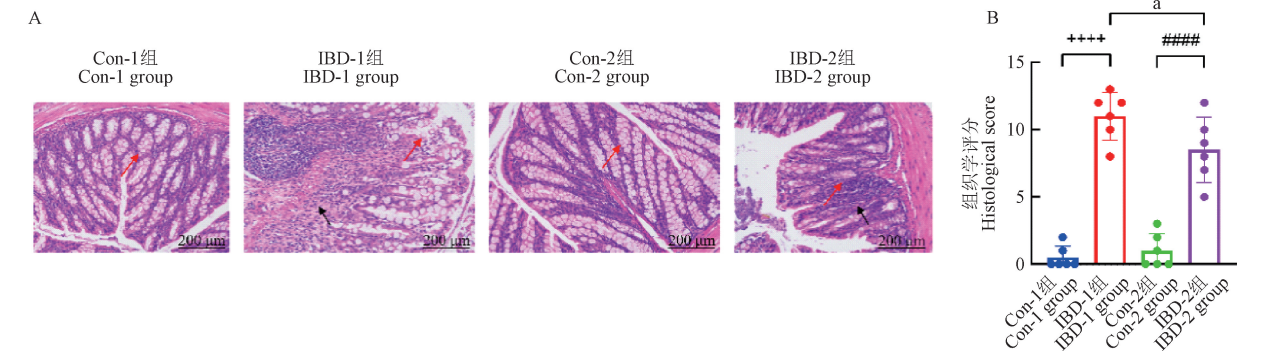


图 4 小鼠结肠组织病理学变化

Note. Black arrows. Inflammatory cell infiltration. Red arrows. Cup cells. Compared with IBD-1 group, $^aP < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 4 Histopathological changes of colon in mice

色,如图 5A 所示,Con-1 组和 Con-2 组小鼠隐窝内存在大量的杯状细胞并且粘蛋白在杯状细胞中含量丰富,黏液层分布完整均匀。与 IBD-2 组小鼠相比,IBD-1 组小鼠的杯状细胞缺失严重,肠上皮黏液层明显受损、未见明显的粘蛋白,更易受到肠道中抗原和致病微生物的侵袭和破坏。

由杯状细胞分泌的 MUC-2 是结肠黏液屏障的主要组成成分,对于维持黏液屏障结构与功能的完整性具有重要意义^[21]。DSS 诱导小鼠肠道炎症后,杯状细胞衰竭。与 Con-1 组和 Con-2 组小鼠相比,IBD 组小鼠 MUC-2 mRNA 相对表达量均呈下降的趋势(图 5B)。

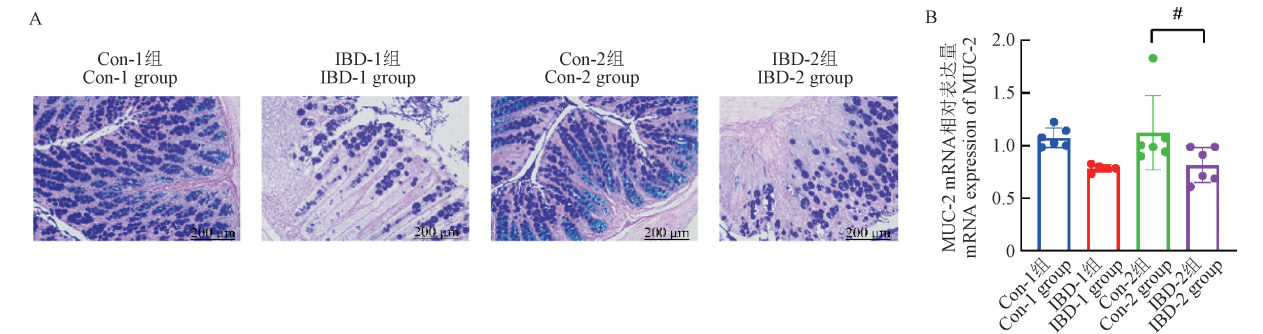


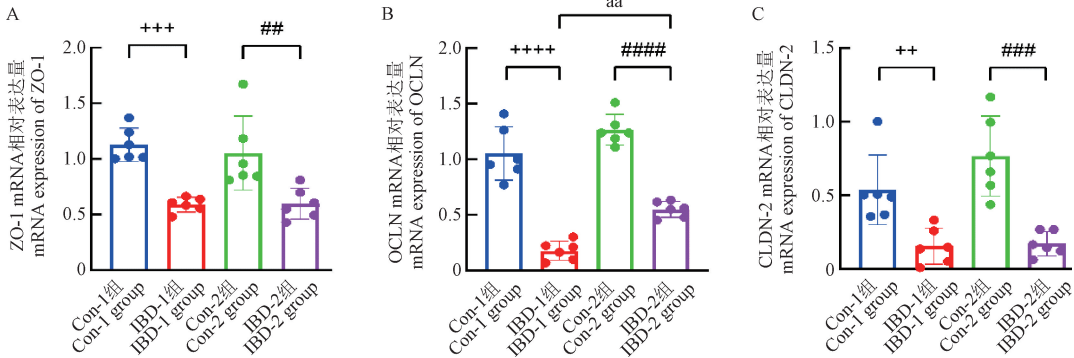
图 5 小鼠肠道屏障的变化情况

Figure 5 Change of intestinal barrier in mice

2.6 肠道组织中紧密连接蛋白 mRNA 相对表达量的变化

紧密连接蛋白是构成肠上皮细胞间紧密连接结构的重要组成部分,表达不足会导致肠道黏膜屏障功能受损^[21-22]。在确定子代雄鼠的结肠炎症状更为严重后,进一步探究子代小鼠肠道屏障相关蛋

白的表达情况。通过 RT-qPCR 测定了小鼠结肠中 ZO-1 (图 6A)、OCLN (图 6B) 和 CLDN-2 (图 6C) mRNA 相对表达量。与 IBD-2 组小鼠相比,IBD-1 组小鼠 OCLN mRNA 相对表达量显著下降,CLDN-2 mRNA 相对表达量存在下降的趋势,说明 IBD-1 组小鼠肠道上皮屏障功能受损相对严重。



注:与 Con-1 组相比,++ $P < 0.01$; 与 IBD-1 组相比,aa $P < 0.01$ 。(下图同)
图 6 结肠炎小鼠结肠中紧密连接蛋白的 mRNA 表达水平
Note. Compared with Con-1 group, ++ $P < 0.01$. Compared with IBD-1 groups, aa $P < 0.01$. (The same in the following figures)

2.7 肠道组织中免疫因子的含量

小鼠结肠组织中 IL-6、IL-1 β 、IL-10 和 IL-33 的含量如图 7 所示。与 Con-1 组小鼠相比,IBD-1 组小鼠结肠组织中 IL-6、IL-1 β 和 IL-33 含量均显著升高

($P < 0.0001, P < 0.05, P < 0.0001$)。与 IBD-2 组小鼠相比,IBD-1 组小鼠结肠中 IL-6、IL-33 含量显著升高、IL-10 含量显著降低($P < 0.05$),说明 IBD-1 组小鼠处于更严重的炎症状态。

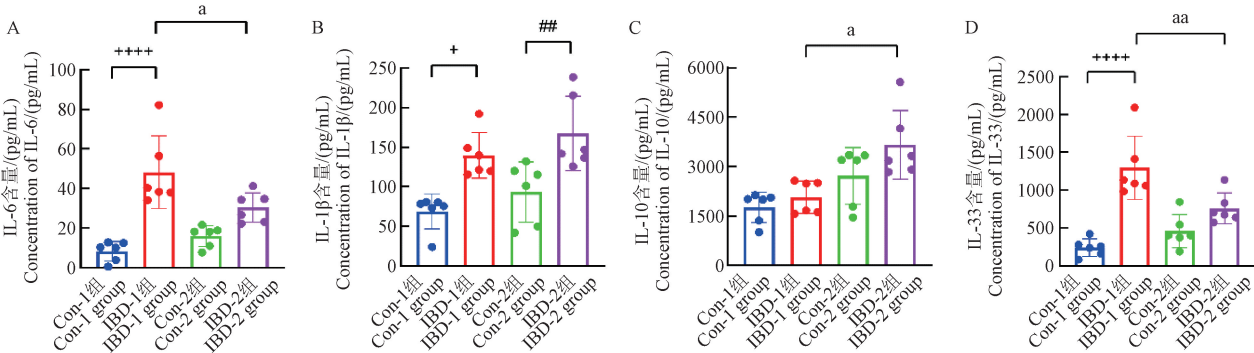


图 7 结肠炎小鼠结肠组织中免疫因子的含量
Figure 7 Concentration of immune factors in colitis mice

3 讨论

随着对 IBD 研究的深入,发现 IBD 在流行病学、临床病程和疾病结果方面均存在性别差异,这可能是多因素相互作用的结果。其中,性激素在 IBD 发病过程中的波动可能会导致 IBD 存在性别差异。雌激素不仅可以抑制炎症,还可以减少炎症浸润和组织学损伤。雌二醇治疗可显著提高结肠长

度^[23]。因此,性别差异可能会诱发表型变化。DSS 诱导的结肠炎模型是目前应用最广泛的 IBD 模型之一,其发病特征与人体类似,表现为体重减轻、血性腹泻、形成溃疡、上皮细胞缺失和中性粒细胞浸润^[11]。本实验结果显示,与 IBD-2 组小鼠相比,IBD-1 组小鼠 DAI 评分、脾系数显著增加,结肠长度显著缩短,结肠黏膜层有大范围的炎症细胞浸润,隐窝数量减少,肠上皮细胞损伤严重,这表明 IBD

小鼠的子代中雄性小鼠比雌性小鼠的结肠炎症状更为严重。

黏液层作为肠道屏障的重要组成部分,是防止细菌和毒素与肠道上皮细胞直接接触的第一道防线^[7,11,24]。肠道杯状细胞分泌的粘蛋白具有保护肠黏膜、润滑黏膜表面和防止致病菌黏附的作用,而杯状细胞和粘蛋白的减少是诱导 IBD 的关键因素^[25]。研究发现 IBD-1 组小鼠结肠组织中出现大量杯状细胞缺失和粘蛋白耗竭的现象,无法形成紧密的黏液层结构,从而导致肠道黏液屏障严重破坏。除此之外,紧密连接蛋白是肠道上皮细胞屏障的另一重要组成部分,对上皮细胞通透性起决定性作用^[26]。研究表明,肠道屏障中紧密连接蛋白的破坏会促进细菌和内毒素穿透黏膜^[27],激活免疫细胞产生各种炎症因子,进而导致炎症损伤和肠道屏障的免疫失衡,最终导致结肠上皮通透性降低^[26,28]。本研究发现 IBD-1 组小鼠肠道中的紧密连接蛋白 OCLN mRNA 相对表达量显著下降,CLDN-2 mRNA 相对表达量同样存在下降的趋势,证实子代 IBD 小鼠的肠道屏障功能受损,其中以雄性小鼠更为显著。

免疫细胞因子主要包括促炎因子和抗炎因子^[29],其中促炎因子 IL-6 在 IBD 发病机制中的作用已被广泛研究^[30-31],被认为是 IBD 发展过程中反映结肠损伤的关键指标^[9,32-33]。不仅如此,结肠来源的促炎因子 IL-33 被认为是 IBD 发病机制的关键启动子^[34],是连接上皮损伤和结肠炎的关键致病因素,在炎症黏膜中特异性增强^[35],能够特异性诱导关键致病细胞因子同时抑制 IL-10 的分泌^[34,36],具有促进炎症的作用。研究结果发现 IBD-1 组小鼠结肠中 IL-6、IL-33 水平显著升高,IL-10 水平显著降低,证实了 IBD-1 组小鼠结肠损伤严重,肠道上皮屏障严重破坏,炎症状态增强,最终导致 IBD-1 组小鼠结肠炎加剧。

综上所述,本研究发现 IBD 子代中小鼠结肠炎存在性别差异。与雌性小鼠相比,雄鼠患结肠炎的症状更为严重,这可能是由于子代雄性小鼠的炎症反应和肠道上皮屏障功能变化更敏感导致的。在今后的研究中,应更加关注 IBD 子代的雄性个体,阐明 IBD 子代在不同性别中的发病机制,为缓解和治疗 IBD 儿童提供理论基础和干预方法。

参 考 文 献(References)

[1] BRONDFIELD M N, MAHADEVAN U. Inflammatory bowel disease in pregnancy and breastfeeding [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(8) : 504-523.

[2] 侯晓婷, 孟欢, 薛佳辰, 等. 关于炎症性肠病发病机制的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(9) : 138-148.
HOU X T, MENG H, XUE J C, et al. Research progress in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(9) : 138-148.

[3] 陈碧华, 吴雨泓, 吴欢, 等. 食物过敏与炎症性肠道疾病关联性的研究进展 [J]. 食品科学, 2023, 44(1) : 294-304.
CHEN B H, WU Y H, WU H, et al. Advances in the relationship between food allergy and inflammatory bowel disease [J]. Food Sci, 2023, 44(1) : 294-304.

[4] MENG X, DUNSMORE G, KOLEVA P, et al. The profile of human milk metabolome, cytokines, and antibodies in inflammatory bowel diseases versus healthy mothers, and potential impact on the newborn [J]. J Crohns Colitis, 2019, 13(4) : 431-441.

[5] ZHOU F, ZHANG G D, TAN Y, et al. NOD-like receptors mediate homeostatic intestinal epithelial barrier function; promising therapeutic targets for inflammatory bowel disease [J]. Therap Adv Gastroenterol, 2023, 16: 17562848231176889.

[6] LÊ A, SELLE A, AUBERT P, et al. Maternal prebiotic supplementation impacts colitis development in offspring mice [J]. Front Nutr, 2022, 9: 988529.

[7] LI M, GE Q, DU H, et al. Potential mechanisms mediating the protective effects of *Tricholoma matsutake*-derived peptides in mitigating DSS-induced colitis [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(19) : 5536-5546.

[8] RAMOS G P, PAPADAKIS K A. Mechanisms of disease: inflammatory bowel diseases [J]. Mayo Clin Proc, 2019, 94(1) : 155-165.

[9] ZHANG L, YAO X, MA M, et al. Protective effect of l-theanine against DSS-induced colitis by regulating the lipid metabolism and reducing inflammation via the NF-κB signaling pathway [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(47) : 14192-14203.

[10] LE BERRE C, HONAP S, PEYRIN-BIROULET L. Ulcerative colitis [J]. Lancet, 2023, 402(10401) : 571-584.

[11] HOFFMANN M, SCHWERTASSEK U, SEYDEL A, et al. A refined and translationally relevant model of chronic DSS colitis in BALB/c mice [J]. Lab Anim, 2018, 52(3) : 240-252.

[12] 刘伟, 刘又前, 蒋翠花, 等. 基于 Notch 信号通路研究白头翁汤对溃疡性结肠炎小鼠肠黏液屏障的保护作用 [J]. 中草药, 2023, 54(16) : 5257-5266.
LIU W, LIU Y Q, JIANG C H, et al. Protective effect of Baitouweng Decoction on intestinal mucus barrier in mice with ulcerative colitis based on Notch signaling pathway [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(16) : 5257-5266.

[13] TORRES J, HU J, SEKI A, et al. Infants born to mothers with IBD present with altered gut microbiome that transfers abnormalities of the adaptive immune system to germ-free mice [J]. Gut, 2020, 69(1) : 42-51.

[14] 何瑶, 李玥, 谭莅, 等. 炎症性肠病妊娠期管理的专家共识意见 [J]. 协和医学杂志, 2019, 10(5) : 465-475.
HE Y, LI Y, TAN B, et al. Expert consensus on management of

- inflammatory bowel disease during pregnancy [J]. Med J Peking Union Med Coll Hosp, 2019, 10(5): 465–475.
- [15] JØLVING L R, NIELSEN J, BECK-NIELSEN S S, et al. The association between maternal chronic inflammatory bowel disease and long-term health outcomes in children—a nationwide cohort study [J]. Inflamm Bowel Dis, 2017, 23(8): 1440–1446.
- [16] HAN Y, SONG M, GU M, et al. Dietary intake of whole strawberry inhibited colonic inflammation in dextran-sulfate-sodium-treated mice via restoring immune homeostasis and alleviating gut microbiota dysbiosis [J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(33): 9168–9177.
- [17] COBURN L A, GONG X, SINGH K, et al. L-arginine supplementation improves responses to injury and inflammation in dextran sulfate sodium colitis [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33546.
- [18] CHEN B, WU Y, WU H, et al. Establishment of food allergy model in dextran sulfate sodium induced colitis mice [J]. Foods, 2023, 12(5): 1007.
- [19] LAROUI H, INGERSOLL S A, LIU H C, et al. Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipo complexes with medium-chain-length fatty acids in the colon [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32084.
- [20] LEI F, ZENG F, YU X, et al. Oral hydrogel nanoemulsion co-delivery system treats inflammatory bowel disease via anti-inflammatory and promoting intestinal mucosa repair [J]. J Nanobiotechnology, 2023, 21(1): 275.
- [21] PENG Y, YAN Y, WAN P, et al. Gut microbiota modulation and anti-inflammatory properties of anthocyanins from the fruits of *Lycium ruthenicum* Murray in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice [J]. Free Radic Biol Med, 2019, 136: 96–108.
- [22] CHANG Y, DENG Q, ZHANG Z, et al. Glucagon-like peptide 2 attenuates intestinal mucosal barrier injury through the MLCK/pMLC signaling pathway in a piglet model [J]. J Cell Physiol, 2021, 236(4): 3015–3032.
- [23] 邵小娟, 刘凯军, 何雨琴, 等. 炎症性肠病性别差异机制的研究 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2021, 30(3): 241–246.
- SHAO X J, LIU K J, HE Y Q, et al. Advances of gender difference mechanism in inflammatory bowel disease [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2021, 30(3): 241–246.
- [24] 韩菲菲, 杨莎莎, 赵霞, 等. 抗菌肽 LL-37 对患结肠炎小鼠肠黏膜屏障的保护功能 [J]. 中国食品学报, 2020, 20(9): 67–73.
- HAN F F, YANG S S, ZHAO X, et al. Protective effect of antibacterial peptide LL-37 on intestinal mucosal barrier in mouse with colitis [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2020, 20(9): 67–73.
- [25] 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 Y R, ZHOU W, JIANG X Y, 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.
- [26] WANG J, ZHAO H, LV K, et al. Pterostilbene ameliorates DSS-induced intestinal epithelial barrier loss in mice via suppression of the NF- κ B-mediated MLCK-MLC signaling pathway [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(13): 3871–3878.
- [27] BERGSTROM K S, XIA L. Mucin-type O-glycans and their roles in intestinal homeostasis [J]. Glycobiology, 2013, 23(9): 1026–1037.
- [28] HOROWITZ A, CHANEZ-PAREDES S D, HAEST X, et al. Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(7): 417–432.
- [29] 周欣欣, 刘茜茜, 任珍, 等. 溃疡性结肠炎动物模型的特点及应用分析 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(7): 896–904.
- ZHOU X X, LIU X X, REN Z, et al. Characteristics and application analysis of animal models of ulcerative colitis [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(7): 896–904.
- [30] GÜNALTA Y S, KUMAWAT A K, NYHLIN N, et al. Enhanced levels of chemokines and their receptors in the colon of microscopic colitis patients indicate mixed immune cell recruitment [J]. Mediators Inflamm, 2015, 2015: 132458.
- [31] ISHIGAKI S, KONDO Y, OTA Y, et al. Successful treatment of refractory enteritis and arthritis with combination of tumour necrosis factor and interleukin-6 inhibition in patients with ulcerative colitis [J]. Mod Rheumatol Case Rep, 2023, 8(1): 33–36.
- [32] HU S, LI S, LIU Y, et al. Aged ripe Puerh tea reduced oxidative stress-mediated inflammation in dextran sulfate sodium-induced colitis mice by regulating intestinal microbes [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(36): 10592–10605.
- [33] KATSANDEGWAZA B, HORSNELL W, SMITH K. Inflammatory bowel disease: a review of pre-clinical murine models of human disease [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(16): 9344.
- [34] PUSHPARAJ P N, LI D, KOMAI-KOMA M, et al. Interleukin-33 exacerbates acute colitis via interleukin-4 in mice [J]. Immunology, 2013, 140(1): 70–77.
- [35] GUNDERSEN M D, LARSEN K B, JOHNSEN K M, et al. Hypo-osmotic stress induces the epithelial alarmin IL-33 in the colonic barrier of ulcerative colitis [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 11550.
- [36] ZHU J F, XU Y, ZHAO J, et al. IL-33 protects mice against DSS-induced chronic colitis by increasing both regulatory B cell and regulatory T cell responses as well as decreasing Th17 cell response [J]. J Immunol Res, 2018, 2018: 1827901.