

肠 疾 病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002275

IL-18通过下调 KLF4 阻碍杯状细胞发育加剧小鼠
溃疡性结肠炎

杨松巍,王 亮,李虎进,陈 飏

(重庆大学附属肿瘤医院肿瘤转移与个体化诊治转化研究重庆市重点实验室,重庆 400030)

【摘要】目的:观察白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)对葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulphate, DSS)溶液诱导的小鼠结肠炎中肠黏膜屏障功能的作用及机制。**方法:**将成年雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、DSS 组(每天给予 DSS 喂养,连续 7 d)、DSS+IL-18 组(给予 DSS 喂养连续 7 d,同时给予腹腔注射 1 μ g IL-18),每天测量小鼠体质量变化,7 d 后 HE 染色检测肠黏膜损伤情况、肠道杯状细胞数量、qPCR 及 Western blot 检测 IL-18 和 Kruppel 样转录因子-4(Kruppel-like factors-4, KLF4)的变化。**结果:**与正常对照组相比,DSS 组小鼠体质量明显减轻($P=0.000$),肠黏膜损伤,绒毛高度降低,结构紊乱,空泡状杯状细胞数量减少(对照组: 43.600 ± 7.092 , DSS 组: 16.000 ± 6.205 , $P=0.000$), IL-18 蛋白表达增加(对照组: 0.444 ± 0.073 ; DSS 组: 0.649 ± 0.062 , $P=0.006$),同时参与杯状细胞分化成熟的 KLF4 表达减少(对照组: 0.934 ± 0.053 ; DSS 组: 0.777 ± 0.081 , $P=0.018$)。与 DSS 组相比,DSS+IL-18 组小鼠体质量减轻更加明显($P=0.000$),肠黏膜损伤及杯状细胞数量减少加剧(DSS+IL-18 组: 3.200 ± 2.863 , $P=0.004$), IL-18 表达明显增加(0.903 ± 0.037 , $P=0.002$), KLF4 表达减少(0.469 ± 0.037 , $P=0.001$)。**结论:**IL-18 加剧小鼠肠黏膜屏障损伤的作用,可能是通过下调生长因子 KLF4 的表达,阻碍杯状细胞的分化成熟发挥作用。

【关键词】白细胞介素-18;溃疡性结肠炎;Kruppel 样转录因子-4;杯状细胞**【中图分类号】**R574.62**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-01-12IL-18 aggravated ulcerative colitis by inhibiting the development of goblet
cells through KLF4 in mice

Yang Songwei, Wang Liang, Li Hujin, Chen Biao

(Chongqing Key Laboratory of Translational Research for Cancer Metastasis and Individualized Treatment,
Chongqing University Cancer Hospital)

【Abstract】Objective: To observe the role and mechanism of interleukin-18 (IL-18) in intestinal mucosal barrier in dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. **Methods:** Mice were randomly divided into three groups: control group, DSS group (fed with DSS continually for 7 days) and DSS+IL-18 group (fed with DSS continually for 7 days and given injections of IL-18). The weight of the mice were measured every day. Seven days later, colon tissues were collected and histology analysis were performed; goblet cell amount in histological sections was measured; the expression of the IL-18 and Kruppel-like factors-4 (KLF4) were analyzed by Western bolt. **Results:** Compared with control group, the mice weight of DSS group loss significantly ($P=0.000$). Damaged intestinal mucosa, reduced villous height, and deterioration of tissue integrity was corroborated by histological examination of distal colon sections performed on DSS group. The number of goblet cell in histological sections showed a dramatic decrease in DSS-treated mice compared to control group (control group: 43.600 ± 7.092 , DSS group: 16.000 ± 6.205 , $P=0.000$). The protein expression of IL-18 in DSS group increased (control group: 0.444 ± 0.073 ; DSS group: 0.649 ± 0.062 ; $P=0.006$), but the KLF4 expression decreased (control group: 0.777 ± 0.081 ; control group: 0.934 ± 0.053 ; $P=0.018$). Compared with DSS group, the weight of mice in DSS+IL-18 group decreased more significantly ($P=0.000$), the intestinal mucosa was damaged more severely, the number of goblet cell reduced dramatically (DSS+IL-18 group: 3.200 ± 2.863 , $P=0.004$), the expression of IL-18 increased obviously ($0.903 \pm$

作者介绍:杨松巍, Email: yangsongwei01@126.com,

研究方向:肠道疾病。

通信作者:陈 飏, Email: chenbiao1179@sina.com。

基金项目:重庆市科学技术委员会基础研究与前沿探索资助项目
(编号: cstc2018jcyjAX0777)。优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190917.1045.014.html>
(2019-09-18)

0.037, $P=0.002$), and the expression of KLF4 decreased (0.469 ± 0.037 , $P=0.001$). **Conclusion:** IL-18 may aggravate ulcerative colitis by inhibiting the development of goblet cells through KLF4 expression reduction in mice.

[Key words] interleukin-18; ulcerative colitis; Kruppel-like factors-4; goblet cells

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一类复杂的肠道慢性炎症性疾病,可以分为克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)2种亚型^[1-2]。两者均以慢性复发性肠道炎症和肠上皮细胞损伤为特征,但其临床表现差异明显。UC表现为结肠黏膜层和黏膜下层的连续性炎症,而CD为非连续性的肠道全层炎症,可累及全消化道。尽管在全球范围内UC的发病率高于CD,但我们对其发病原因知之甚少^[3]。杯状细胞及其分泌的黏液在维持肠黏膜屏障功能中发挥着关键作用^[4]。在肠黏膜屏障损伤性疾病中,均可观察到杯状细胞数量及黏蛋白分泌减少^[5-6],但其原因尚不清楚。

细胞因子在肠黏膜屏障功能损害的过程中发挥了重要作用^[7-9],特别是白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)已经成为调节微生物和宿主体内平衡不可或缺的因素,被认为是IBD的关键决定因素^[10]。Nowarski等^[11]报道,在DSS诱导的小鼠结肠炎模型中,特异性地敲除肠上皮细胞产生的IL-18能明显减轻葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulphate, DSS)诱导的结肠炎,注射外源性IL-18或特异性敲除IL-18结合蛋白(IL-18 binding protein, IL-18BP)则导致更加严重的结肠炎及杯状细胞成熟障碍、黏液分泌减少,但引起这一过程的机制尚不清楚。

本实验通过DSS诱导小鼠溃疡性结肠炎模型,研究溃疡性结肠炎中细胞因子IL-18及杯状细胞的变化,探讨IL-18对UC模型中杯状细胞的影响,阐述UC发生的可能机制,为治疗溃疡性结肠炎提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 试剂与器材

IL-18购自Novoprotein公司,DSS购自Biosharp公司,蛋白酶抑制剂(PMSF)、RIPA裂解液、BCA蛋白质量浓度测定试剂盒购自碧云天公司,台式低温超速离心机购于HERMLE公司,ECL化学发光检测试剂盒、SDS-PAGE凝胶

试剂盒、GAPDH抗体、KLF4抗体、IL-18抗体购自博士德生物公司,聚偏二氟乙烯(PVDF)膜购于美国Millipore公司,电泳仪与湿转仪购自Bio-Rad公司,发光成像分析仪购自CareStream公司。

1.2 实验动物

18只清洁级雄性C57BL/6小鼠购自陆军军医大学第二附属医院实验动物中心。采用目前公认的慢性肠黏膜屏障损伤方法,通过给小鼠自由饮用3.5%的葡聚糖硫酸钠溶液7d,构建小鼠溃疡性结肠炎模型^[8]。根据实验设计将C57BL/6小鼠随机分为3组:正常对照组、DSS组和DSS+IL-18组,每组6只。正常对照组给予普通饮用水喂养,DSS组给予含有3.5% DSS的饮用水喂养7d,DSS+IL-18组给予含有3.5% DSS饮用水连续喂养7d,同时给予腹腔注射1 μ g IL-18。本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠体质量的测量 构建小鼠DSS模型后,按照预先设定的分组分别给予相应的干预治疗。每天测量并记录小鼠的体质量至喂养7d。

1.3.2 小鼠结肠病理组织切片染色 按上述方法构建小鼠DSS诱导的结肠炎模型,7d后分别处死各组老鼠,取出部分结肠组织,固定在10%福尔马林溶液中,经过脱水,石蜡包埋,切片后行HE染色。在显微镜下观察肠黏膜组织的形态学变化,评估结肠黏膜损伤程度。同时对肠隐窝内空泡状的杯状细胞进行计数,比较不同分组之间杯状细胞数量的变化。

1.3.3 Western blot检测 7d后将各组小鼠处死后取结肠组织,纵行剖开后用D-Hanks液充分洗净黏附在肠黏膜上的粪便,将结肠组织用细胞裂解缓冲液裂解,置于4℃低温离心机内12 000 r/min离心15 min,收集上清液,利用BCA蛋白测定试剂盒检测蛋白浓度。蛋白上样后恒压80 V电泳1 h,当溴酚蓝至凝胶底部时,停止电泳;将目的条带用100 V恒压湿转至甲醛浸泡过的PVDF膜。将转上目的蛋白的PVDF膜置于5%小牛血清中,室温封闭1 h,然后分别加入稀释的IL-18、KLF4及GAPDH一抗4℃孵育过夜,TBST漂洗,再加入辣根过氧化物标记的二抗室温孵育1 h,TBST再次漂洗后,加入ECL化学发光试剂曝光,利用分子成像软件分析数据。

1.4 统计学处理

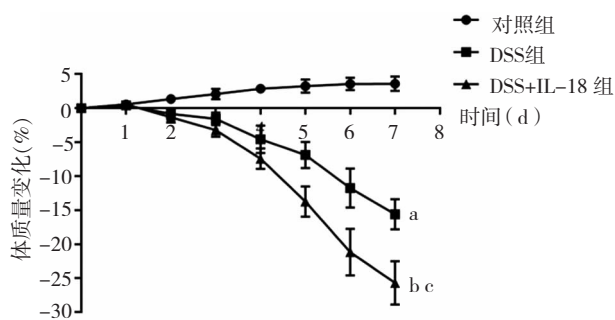
采用SPSS 22.0统计软件,计量资料用均数 $\pm$ 标准差

($\bar{x} \pm s$)表示。3组之间的比较采用单因素方差分析,如果组间差异有统计学意义,组间进一步采用LSD- t 法进行两两比较。对于重复测量数据,采用重复测量方差分析进行比较,分别比较组间、时间点之间是否具有统计学意义,并进行交互项分析,组间差异有统计学意义,则进一步采用LSD- t 法进行两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠体质量的变化

用上述方法构建DSS诱导的小鼠结肠炎模型,每天测量并记录各组小鼠的体质量变化,结果如图1所示。3组不同处理后小鼠体质量变化具有统计学差异($P=0.000$)。与对照组相比,DSS组体质量明显减轻($P=0.000$);DSS+IL-18组小鼠与对照组相比也出现明显的体质量减轻($P=0.000$),与DSS组小鼠相比体质量下降,差异具有统计学意义($P=0.000$)。

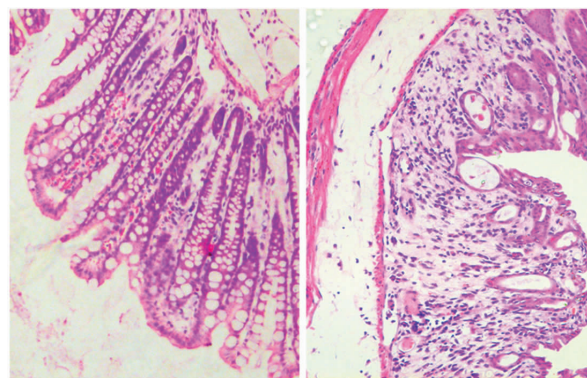


注: $F_{\text{时间}}=333.225$, $P_{\text{时间}}=0.000$; $F_{\text{分组} \times \text{时间}}=69.255$, $P_{\text{分组} \times \text{时间}}=0.000$; $F_{\text{分组}}=219.700$, $P_{\text{分组}}=0.000$;a:DSS组与对照组比较, $P=0.000$;b:DSS+IL-18组与对照组相比, $P=0.000$;c:DSS+IL-18组与DSS组比较, $P=0.000$

图1 3组小鼠体质量的变化

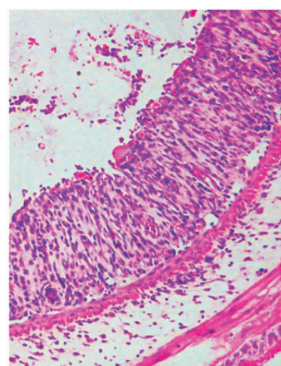
2.2 小鼠结肠组织病理学及杯状细胞数量变化

对各组小鼠的结肠组织行HE染色,结果如图2所示。对照组小鼠肠道上皮连续,结肠黏膜结构完整,绒毛规则整齐,肠隐窝内大量空泡状的杯状细胞清晰可见(43.600 ± 7.092),黏膜下基质未见明显炎症细胞。DSS组结肠黏膜结构紊乱,绒毛高度降低、破坏、断裂,甚至消失,肠隐窝扭曲变形,空泡状的杯状细胞减少(16.000 ± 6.205),黏膜下基质中出现大量的炎症细胞浸润。DSS+IL-18组结肠黏膜结构更加紊乱,无完整绒毛结构,肠上皮细胞脱落、裂解,黏膜下基质浸润的炎症细胞明显增多,肠隐窝塌陷消失,空泡状的杯状细胞几近消失(3.200 ± 2.863),3组间杯状细胞数量变化有统计学意义($F=65.922$, $P=0.000$)。其中DSS组与对照组相比差异有统计学意义($P=0.000$);DSS+IL-18组与对照组相比差异有统计学意义($P=0.000$);DSS组与DSS+IL-18组相比差异也具有统计学意义($P=0.004$),如图3所示。



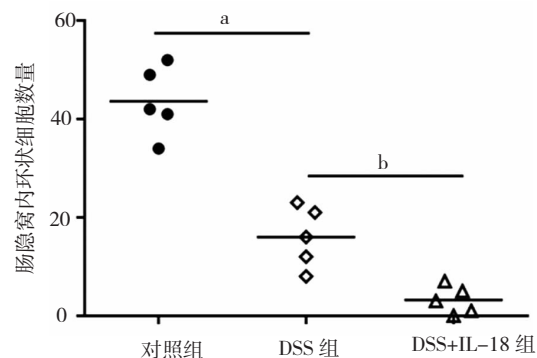
A. 对照组

B. DSS组



C. DSS+IL-18组

图2 各组小鼠结肠组织病理学变化(200×)

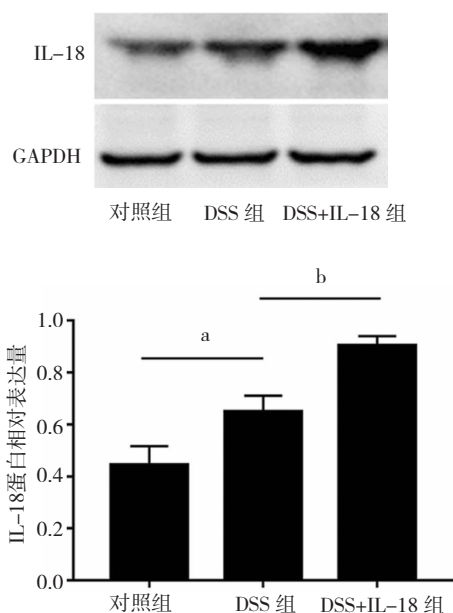


注:a,DSS组与Control组比较, $P=0.000$;b:DSS+IL-18组与DSS组比较, $P=0.004$

图3 3组小鼠肠隐窝内的杯状细胞计数

2.3 小鼠肠黏膜内IL-18的表达变化

Western blot检测各组结肠黏膜内IL-18蛋白的表达变化,以GAPDH为内参,通过分析灰度值定量检测蛋白的表达情况,结果如图4所示。IL-18在对照组、DSS组和DSS+IL-18组的表达量分别为 0.444 ± 0.073 、 0.649 ± 0.062 、 0.903 ± 0.037 。3组间IL-18蛋白的表达变化具有统计学意义($F=44.871$, $P=0.000$),其中DSS组IL-18蛋白水平较对照组明显增加($P=0.006$),腹腔内注射IL-18后,肠黏膜IL-18蛋白表达水平较DSS组进一步增高($P=0.002$),同时伴有肠道炎症损伤的继续加剧,说明IL-18可能与肠道的炎症损伤有关。

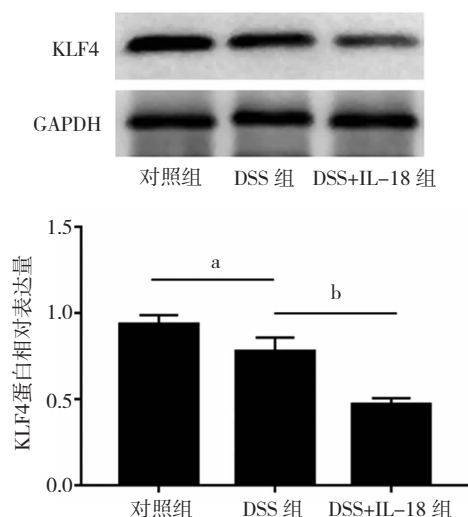


注:a,DSS 组与 Control 组比较, $P=0.006$;b:DSS+IL-18 组与 DSS 组比较, $P=0.002$

图 4 3 组小鼠肠黏膜内 IL-18 的表达

2.4 小鼠肠黏膜内 KLF4 的表达变化

Western blot 检测各组结肠黏膜内 KLF4 蛋白表达水平的变化。以 GAPDH 为内参,通过分析灰度值定量检测蛋白的表达情况(图 5)。KLF4 在对照组、DSS 组和 DSS+IL-18 组的表达量分别为 0.934 ± 0.053 、 0.777 ± 0.081 、 0.469 ± 0.037 。3 组间 KLF4 蛋白表达水平变化具有统计学意义($F=46.765$, $P=0.000$),其中 DSS 组 KLF4 蛋白水平较正常组明显减少($P=0.018$),腹腔内注射 IL-18 后,肠黏膜 KLF4 蛋白表达水平进一步减少($P=0.001$),同时伴有肠道空泡状杯状细胞的减少,而 KLF4 与肠道杯状细胞的分化成熟有关。



注:a,DSS 组与 Control 组比较, $P=0.018$;b:DSS+IL-18 组与 DSS 组比较, $P=0.001$

图 5 IL-18 对小鼠肠黏膜内 KLF4 表达的影响

3 讨论

IBD 是肠道慢性炎症性疾病,虽然其具体发病机制不明,但有研究表明免疫失调和细胞因子的变化是其中的重要因素^[12]。肠道炎症条件下,大量细胞因子释放,引起杯状细胞和黏液层大量损耗,造成肠黏膜屏障和屏障功能破坏,加剧炎症性肠病。杯状细胞及其分泌的黏液层在维持肠黏膜屏障的过程中发挥重要作用^[13],杯状细胞和黏液层的大量损耗是 UC 独特而明显的病理特征^[5,14]。

IL-18 是细胞因子 IL-1 家族的成员^[15],在维持宿主与肠道微生物群之间的稳态中发挥重要作用。同时,诱导并参与慢性炎症性疾病(包括 IBD)发病机制的促炎信号通路^[16-17]。IL-18 对肠黏膜屏障功能的调节过程异常复杂,在肠道稳定状态下,通过维持肠道微生物菌群的平衡,发挥保护肠黏膜屏障功能的作用,而在肠道炎症状态下,IL-18 则会导致杯状细胞丢失,破坏肠黏膜屏障^[18-19]。肠道上皮细胞,包括杯状细胞,迅速更新,新细胞从未分化的干细胞前体中发育而来。有趣的是,IL-18 信号通路特别阻碍了杯状细胞的发育,导致结肠黏液减少,可能增加了细菌进入肠道表面的机会^[18]。

本实验构建 DSS 诱导小鼠溃疡性结肠炎模型,并通过腹腔内注射 IL-18 深入研究了 IL-18 对小鼠肠黏膜损伤情况及肠道杯状细胞的调控作用。通过小鼠体质量、结肠 HE 染色、杯状细胞计数发现,DSS+IL-18 组可加剧 DSS 诱导的结肠炎,进一步减少成熟杯状细胞的数量。由于 IL-18 对肠黏膜屏障功能的调节过程复杂,在肠道稳定状态下,IL-18 起到保护肠黏膜屏障的作用,而本研究的目的是探讨炎症条件下,IL-18 如何通过调控杯状细胞发挥肠黏膜屏障的破坏作用,故在实验分组时未做 IL-18 处理组。有报道证明,在炎症条件下 IL-18 可以参与杯状细胞发育过程的调控^[20],但其机制不详。Kruppel 样转录因子-4(Kruppel-like factors-4,KLF4)是一类具有锌指结构的转录因子,广泛参与细胞增殖、分化及胚胎发育等多个生命活动的调控,特别是在结肠杯状细胞的分化成熟过程中发挥重要作用^[4,21]。

本研究通过检测 KLF4 后发现,DSS 组 KLF4 蛋白水平及空泡状杯状细胞较正常组明显减少,DSS+IL-18 组中肠黏膜 KLF4 蛋白表达水平进一步减少,同时伴有肠道杯状细胞的明显减少。说明 IL-18 可以通过 KLF4 阻碍杯状细胞的发育,导致肠道黏液减少,增加细菌入侵肠道的机会,进而加剧肠道炎症。

综上所述,本研究通过构建 DSS 诱导的小鼠结肠炎模型,研究 IL-18 对 DSS 诱导的结肠炎的影响,发现 IL-18 可以通过下调 KLF4 阻碍杯状细胞的发育进而加剧溃疡性结肠炎,这为治疗溃疡性结肠炎提供了新的治疗策略。

参 考 文 献

- [1] Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease[J]. *Nature*, 2011, 474(7351): 298–306.
- [2] Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142: 46–54.
- [3] Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis[J]. *N Engl J Med*, 2011, 365(18): 1713–1725.
- [4] Wrzosek L, Miquel S, Noordine ML, et al. Bacteroides thetaiotaomicron and Faecalibacterium prausnitzii influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent[J]. *BMC Biol*, 2013, 11: 61.
- [5] Strugala V, Dettmar PW, Pearson JP. Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease[J]. *Int J Clin Pract*, 2008, 62(5): 762–769.
- [6] MacDonald TT, Monteleone I, Fantini MC, et al. Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine[J]. *Gastroenterology*, 2011, 140(6): 1768–1775.
- [7] Yang S, Yu M, Sun L, et al. Interferon-gamma-induced intestinal epithelial barrier dysfunction by NF- κ B/HIF-1 α pathway[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2014, 34(3): 195–203.
- [8] Yu M, Yang S, Qiu Y, et al. Par-3 modulates intestinal epithelial barrier function through regulating intracellular trafficking of occludin and myosin light chain phosphorylation[J]. *J Gastroenterol*, 2015, 50(11): 1103–1113.
- [9] Moldoveanu AC, Diclescu M, Braticevici CF. Cytokines in inflammatory bowel disease[J]. *Rom J Intern Med*, 2015, 53(2): 118–127.
- [10] Dinarello CA, Novick D, Kim S, et al. Interleukin-18 and IL-18 binding protein[J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 289.
- [11] Nowarski R, Jackson R, Gagliani N, et al. Epithelial IL-18 equilibrium controls barrier function in colitis[J]. *Cell*, 2015, 163(6): 1444–1456.
- [12] Tili E, Michaille JJ, Piurowski V, et al. MicroRNAs in intestinal barrier function, inflammatory bowel disease and related cancers—their effects and therapeutic potentials[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2017, 37: 142–150.
- [13] Alipour M, Zaidi D, Valcheva R, et al. Mucosal barrier depletion and loss of bacterial diversity are primary abnormalities in paediatric ulcerative colitis[J]. *J Crohns Colitis*, 2016, 10(4): 462–471.
- [14] Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and inflammation in the intestine[J]. *Cell*, 2010, 140(6): 859–870.
- [15] Sivakumar PV, Westrich GM, Kanaly S, et al. Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis; blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage[J]. *Gut*, 2002, 50(6): 812–820.
- [16] Bamias G, Corridoni D, Pizarro TT, et al. New insights into the dichotomous role of innate cytokines in gut homeostasis and inflammation[J]. *Cytokine*, 2012, 59(3): 451–459.
- [17] Reuter BK, Pizarro TT. Commentary: the role of the IL-18 system and other members of the IL-1R/TLR superfamily in innate mucosal immunity and the pathogenesis of inflammatory bowel disease: friend or foe?[J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(9): 2347–2355.
- [18] Hand TW. Interleukin-18: the bouncer at the mucosal bar[J]. *Cell*, 2015, 163(6): 1310–1312.
- [19] Levy M, Thaïs CA, Zeevi D, et al. Microbiota-modulated metabolites shape the intestinal microenvironment by regulating nlrp6 inflammasome signaling[J]. *Cell*, 2015, 163(6): 1428–1443.
- [20] Bamias G, Cominelli F. Cytokines and intestinal inflammation[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2016, 32(6): 437–442.
- [21] Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, et al. The zinc-finger transcription factor KLF4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon[J]. *Development*, 2002, 129(11): 2619–2628.

(责任编辑: 冉明会)