

沉默信息调节因子6基因敲除模型小鼠肠黏膜形态及转录组学的特征性变化

<https://doi.org/10.12307/2022.847>游弋晖¹, 宋春晖¹, 陈曦¹, 姚晓宏¹, 柯俊羽¹, 杜群¹, 宋宁², 李燕舞¹

投稿日期: 2021-10-19

采用日期: 2021-11-20

修回日期: 2021-12-29

在线日期: 2022-01-22

中图分类号:

R459.9; R329; R333.3

文章编号:

2095-4344(2022)32-05119-07

文献标识码: B

文章快速阅读:

采用苏木精-伊红染色及免疫组化法观察小肠SIRT6基因特异性敲除(SIRT6^{-/-})小鼠肠黏膜形态改变

体外构建小鼠肠道类器官模型, 光镜下观察类器官形态变化, 免疫荧光及Western-blot检测相关标记物蛋白表达

采用Illumina平台测序, 分析SIRT6^{-/-}小鼠肠组织转录组学的特征变化

观察指标:

- (1) 肠黏膜绒毛长度及密度、隐窝高度、杯状细胞数目和潘氏细胞数目;
- (2) 小肠类器官出芽率;
- (3) 小肠干细胞标记物Lgr5蛋白、潘氏细胞标记物溶菌酶蛋白、吸收上皮细胞标记物细胞角蛋白20蛋白、杯状细胞标记物黏蛋白2蛋白表达;
- (4) 转录组差异基因及生物信息学分析。

结论:

SIRT6缺失会导致肠道干细胞增殖和分化功能失衡, 其机制可能与SIRT6调控代谢通路有关。

文题释义:

肠类器官: 来源于隐窝干细胞, 在体外3D培养技术下, 通过隐窝干细胞可增殖分化成各种功能的肠上皮细胞, 可在体外重建出类似体内肠道细胞组成、生理结构和功能的三维立体肠组织。

沉默信息调节因子(Silent information regulator, SIRT): 是具有去乙酰化酶活性的第三类去乙酰化酶的总称, 主要通过依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸发挥去乙酰化作用, SIRT家族参与了细胞新陈代谢、DNA损伤修复等细胞生命过程。

SIRT6: 是SIRT家族的成员之一, 具有去乙酰化酶活性和单ADP核糖基转移酶活性, 在调控衰老、糖酵解、脂质代谢、炎症、肿瘤和凋亡的发生发展中发挥着不可忽视的作用。

摘要

背景: 肠黏膜更新是维持机体稳态的关键生理过程, 其中隐窝干细胞是肠上皮增殖和分化的驱动力。沉默信息调节因子(silent information regulator, SIRT)参与细胞的基因修复、代谢、能量平衡和寿命的调节, 在肠上皮稳态中的研究逐步成为热点。肠类器官由单个隐窝干细胞经3D培养形成, 可体外呈现肠上皮更新及受损后修复过程, 是研究肠黏膜更新的最新模式。

目的: 探究SIRT6基因特异性敲除(SIRT6^{-/-})小鼠模型肠黏膜形态、肠类器官形成及其转录组学的特征性变化。

方法: ①采用Cre-loxp方法建立SIRT6^{-/-}小鼠模型, 制备小肠组织石蜡切片并进行苏木精-伊红染色, 观察其病理变化, 免疫组化检测肠干细胞标记物Lgr5和潘氏细胞标记物溶菌酶的表达; ②体外构建SIRT6^{-/-}小鼠肠类器官模型, Western-blot检测类器官SIRT6蛋白变化, 免疫荧光检测肠类器官Lgr5、细胞角蛋白20和黏蛋白2蛋白表达变化; ③采用肠组织进行转录组测序, 分析该模型小鼠差异基因及相关功能的特征变化。

结果与结论: ①与野生型对照小鼠肠黏膜形态比较, SIRT6^{-/-}小鼠肠黏膜出现绒毛稀疏、变短, 隐窝高度变浅, 且杯状细胞数目增多, 潘氏细胞数目明显减少, Lgr5和溶菌酶的表达明显降低; ②SIRT6^{-/-}小鼠肠类器官中SIRT6蛋白表达明显降低, 培养中出芽率明显减少, 且Lgr5表达降低, 吸收上皮细胞标记物细胞角蛋白20和杯状细胞标记物黏蛋白2表达水平升高; ③转录组结果显示, 与野生型对照小鼠比较, 模型小鼠肠组织的差异基因有846个, 其中上调基因438个, 下调基因408个, 差异基因在京都基因与基因组百科全书通路富集前5位的分别是化学致癌、药物代谢、视黄酸代谢、亚油酸代谢和类固醇生物合成, 显著富集通路中关联的基因主要为Cyp2c29、Cyp2c65、Cyp3a11、Cyp3a25等Cyp450家族的改变; ④结果表明, SIRT6缺失会导致肠道干细胞增殖和分化功能失衡, 其机制可能与SIRT6调控代谢通路有关, 其中SIRT6对细胞色素P450家族的调控与肠黏膜更新稳态关系密切。

关键词: SIRT6; 基因敲除; 肠类器官; 肠黏膜; 肠道干细胞; 转录组; 小鼠

缩略语: 沉默信息调节因子6: silent information regulator 6, SIRT6; 小肠绒毛SIRT6基因特异性敲除小鼠: small intestinal villi SIRT6 gene-specific knockout mice, SIRT6^{-/-}; 京都基因与基因组百科全书: Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG

Characteristic changes of intestinal mucosal morphology and transcriptomics in silent information regulator 6 gene knockout mice

You Yihui¹, Song Chunhui¹, Chen Xi¹, Yao Xiaohong¹, Ke Junyu¹, Du Qun¹, Song Ning², Li Yanwu¹

¹Science and Technology Innovation Center, Institute of Spleen and Stomach, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China; ²School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan Province, China

¹广州中医药大学科技创新中心, 脾胃研究所, 广东省广州市 510405; ²河南中医药大学药学院, 河南省郑州市 450046

第一作者: 游弋晖, 女, 1996年生, 广东省遂溪县人, 汉族, 广州中医药大学在读硕士, 主要从事肠道炎-癌机制及中药的调控研究。

通讯作者: 李燕舞, 博士, 研究员, 广州中医药大学科技创新中心, 脾胃研究所, 广东省广州市 510405

通讯作者: 宋宁, 博士, 副教授, 河南中医药大学药学院, 河南省郑州市 450046

<https://orcid.org/0000-0003-4032-8222> (游弋晖)

基金资助: 广东省教育厅特色创新类项目(2018KTSCX043), 项目负责人: 李燕舞

引用本文: 游弋晖, 宋春晖, 陈曦, 姚晓宏, 柯俊羽, 杜群, 宋宁, 李燕舞. 沉默信息调节因子6基因敲除模型小鼠肠黏膜形态及转录组学的特征性变化[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(32):5119-5125.



You Yihui, Master candidate, Science and Technology Innovation Center, Institute of Spleen and Stomach, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Corresponding author: Li Yanwu, MD, Researcher, Science and Technology Innovation Center, Institute of Spleen and Stomach, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Co-corresponding author: Song Ning, MD, Associate professor, School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Intestinal mucosal renewal is a key physiological process to maintain body homeostasis, and stem cells at the crypt base are the driving force for intestinal epithelial proliferation and differentiation. Silent information regulator (SIRT) is involved in the regulation of cell gene repair, metabolism, energy balance, and lifespan. Research on its role in intestinal epithelial homeostasis has gradually become a hot spot. Intestinal organoids are formed by 3D culture of single crypt stem cells, which can present the intestinal epithelial renewal and repair process after damage *in vitro*. It is the latest model for studying intestinal mucosal renewal.

OBJECTIVE: To elucidate the characteristic changes of intestinal mucosal morphology, intestinal organoid formation and its transcriptomics in a SIRT6 gene-specific knockout (SIRT6^{-/-}) mouse model.

METHODS: The Cre-loxp method was used to establish the SIRT6^{-/-} mouse model. Paraffin sections of small intestine tissue were prepared to observe the pathological changes using hematoxylin-eosin staining, and the expression of intestinal stem cell marker Lgr5 and Paneth cell marker Lyso was detected by immunohistochemistry. The intestinal organoid SIRT6^{-/-} mouse model was constructed *in vitro*, SIRT6 protein expression in intestinal organoids was detected by western blot assay, and the protein expression of Lgr5, cytokeratin 20 and mucin 2 in intestinal organoids was detected by immunofluorescence staining. The intestinal tissue was used for transcriptome sequencing, and the characteristic changes of the transcriptome in the mouse model were analyzed.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, SIRT6^{-/-} mouse intestinal mucosa showed sparse and shortened villi, shallower crypts, increased number of goblet cells, significantly decreased number of Paneth cells, and significantly reduced expression of Lgr5 and Lyso. The expression of SIRT6 protein in the SIRT6^{-/-} mouse organoid was significantly reduced. The budding rate of organoids and the expression of Lgr5 were reduced, while the expression of absorption epithelial cell marker cytokeratin 20 and goblet cell marker mucin 2 increased obviously. Transcriptome results showed that there were 846 differentially expressed genes between the control and model mouse intestine, including 438 up-regulated genes and 408 down-regulated genes. The top five differentially expressed genes enriched in the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway were chemical carcinogens, drug metabolism, retinoic acid metabolism, linoleic acid metabolism, and steroid biosynthesis. And the differentially expressed genes in the top five pathways focusing on the Cyp450 family included Cyp2c29, Cyp2c65, Cyp3a11, and Cyp3a25. To conclude, SIRT6 gene deletion can lead to the imbalance of intestinal stem cell proliferation and differentiation, and the mechanism may be related to the metabolic regulation pathways of SIRT6. Regulating cytochrome P450 family by SIRT6 is closely related to the homeostasis of intestinal mucosal renewal.

Key words: SIRT6; gene knockout; intestinal organoid; intestinal mucosa; intestinal stem cell; transcriptome; mouse

Funding: the Special Innovation Project of Guangdong Provincial Education Department, No. 2018KTSCX043 (to LYW)

How to cite this article: YOU YH, SONG CH, CHEN X, YAO XH, KE JY, DU Q, SONG N, LI YW. Characteristic changes of intestinal mucosal morphology and transcriptomics in silent information regulator 6 gene knockout mice. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu.* 2022;26(32):5119-5125.

0 引言 Introduction

沉默信息调节因子 (silent information regulator, SIRT) 存在于细菌和哺乳动物细胞内高度保守的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖的蛋白去乙酰化酶, 参与调控细胞的基因修复、细胞代谢、细胞能量平衡和寿命, 大多涉及心、脑、肾、肝等器官^[1]。近年来研究表明, SIRT 通过调节炎症因子、改变杯状细胞和潘氏细胞数量及肠上皮细胞间紧密连接蛋白等影响肠屏障功能, 其在肠黏膜调控中的研究日益受到关注^[2]。SIRT6 是 SIRT 家族中的一员, 主要表达于细胞核中, 研究发现 SIRT6 敲除小鼠寿命显著缩短^[3], 而肠上皮 SIRT6 特异性敲除小鼠对葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎更为敏感^[4]。同时, SIRT6 在调控干细胞稳态方面发挥重要作用: SIRT6 通过共激活核因子 E2 相关因子 2 保护人骨髓间充质干细胞免受氧化应激损伤, 在维持人骨髓间充质干细胞稳态方面起重要作用^[5]; 通过骨形态发生蛋白信号促进间充质干细胞成骨分化^[6]; 通过 TET 介导的 5-羟甲基胞嘧啶的产生来调控胚胎干细胞稳态^[7]。目前关于 SIRT6 在肠干细胞调控中的作用尚不明晰, 此次研究采用肠道 SIRT6 特异性基因敲除小鼠模型, 初步探讨 SIRT6 对肠黏膜更新的影响, 并通过转录组学分析相关机制, 为后续 SIRT6 参与肠黏膜形态及功能的生理病理研究提供依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验, 两组间的各项数据经检验符合正态分布, 经过方差齐性检验, 方差齐, 采用 t 检验分析。

1.2 时间及地点 实验于 2020 年 7 月至 2021 年 5 月在广州中医药大学科技创新中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SIRT6^{-/-} 小鼠及同窝野生型对照小鼠各 3 只, SPF 级, 雌性, 8 周龄, 体质量 20–22 g, 由广州中医药大学科技创新中心高永博士赠送。环境湿度控制在 50%–70%, 温度 20–26 °C, 喂养灭菌饮用水和标准鼠饲料。

实验过程符合广州中医药大学实验动物伦理要求, 批准号为 20200703001。实验遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

1.3.2 主要试剂与仪器 IntestiCult™ Organoid Growth Medium (Mouse) (货号: 06005, 加拿大 STEMCELL 公司); cell dissociation reagent (货号: 07174, 加拿大 STEMCELL 公司); Matrigel (货号: 356234, 美国 BD 公司); Corning CELL Recovery Solution (货号: 354253, 美国康宁公司); CryoStor® CS10 (货号: 07930, 加拿大 STEMCELL 公司)。全蛋白提取试剂盒/BCA 蛋白含量检测试剂盒 (货号: KPG2100、KPGBCA, 凯基生物公司); SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (货号: P0012A, 上海碧云天生物技术有限公司); SIRT6 小鼠多克隆抗体、细胞角蛋白 20 小鼠多克隆抗体 (货号: 12486S, 13063S, 美国 CST 公司); GAPDH 小鼠单克隆抗体、溶菌酶小鼠多克隆抗体、Lgr5 小鼠单克隆抗体 (货号: Ab125247, Ab108508, Ab75850, 美国 abcam 公司); 黏蛋白 2 小鼠单克隆抗体 (货号: Sc-7314, 美国 Santa 公司)。山羊抗小鼠 IgG H&L (Alexa Fluor® 488) 预吸附二抗 (货号: ab6734, 美

国 Abcam 公司); 鼠兔通用型免疫组化检测试剂盒 (货号: SP-9000, 北京中杉金桥生物科技有限公司); DAB 显色试剂盒 (20×) (货号: ZLI-9017, 北京中杉金桥生物科技有限公司)。垂直电泳仪 Mini-protean TETra System、Trans-Blot®SD Cell 转印系统、ChemiDocTMXR5+ 成像仪、Imark 酶标仪 (型号: 1658001, 2211BR, 1708265, LD108, 美国 Bio-RAD 公司); 荧光显微镜 (型号: BX63, 日本奥林巴斯公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 构建 SIRT6^{fl/fl} 小鼠模型 SIRT6 基因 (NCBI 参考序列: NM_181586; Ensembl: ENSMUSG00000034748) 位于小鼠 10 号染色体上; 共鉴定出 8 个外显子, ATG 起始密码子位于外显子 1, TGA 终止密码子位于外显子 8 (转录 SIRT6-201: ENSMUST00000042923); 选择外显子 2-3 作为目的位点; 将 Cas9 和 gRNA 共同注射到受精卵中用于生产 CRISPR-AI 条件性敲除小鼠 (flox/+) 并进行基因分型鉴定。采用 SIRT6-floxed 杂合小鼠与 Villin-Cre 小鼠交配, 同时 SIRT6-floxed 杂合小鼠进行自交; 获得的 SIRT6^{floxed/floxed} 小鼠和 Villin-Cre; SIRT6^{floxed/+} 小鼠交配, 最终获得 Villin-Cre; SIRT6^{floxed/floxed} 小鼠即为肠绒毛特异性 SIRT6 敲除小鼠, 获得 SIRT6^{floxed/floxed} 小鼠即为同窝野生型对照小鼠。幼鼠出生 3 周进行基因型鉴定。

组织工程实验动物造模过程中的相关问题:

造模目的	探究 SIRT6 ^{fl/fl} 小鼠模型肠黏膜形态、肠类器官形成及其转录组学的特征性变化
选择动物的条数	C57BL/6J SIRT6 ^{fl/fl} 小鼠及野生型对照小鼠, SPF 级, 8 周龄, 体质量 20-22 g, 为同窝小鼠
模型与所研究疾病的关系	探究 SIRT6 对肠黏膜更新的影响
动物来源及品系	SIRT6 ^{fl/fl} 小鼠及同窝野生型对照小鼠各 3 只, SPF 级, 雌性, 8 周龄, 体质量 20-22 g, 由广州中医药大学科技创新中心高永博士赠送
造模技术描述	SIRT6 基因位于小鼠 10 号染色体上; 共鉴定出 8 个外显子, 选择外显子 2-3 作为目的位点; 将 Cas9 和 gRNA 共同注射到受精卵中用于生产 CRISPR-AI 条件性敲除小鼠 (flox/+) 并进行基因分型鉴定。采用 SIRT6-floxed 杂合小鼠与 Villin-Cre 小鼠交配, 同时 SIRT6-floxed 杂合小鼠进行自交; 获得的 SIRT6 ^{floxed/floxed} 小鼠和 Villin-Cre; SIRT6 ^{floxed/+} 小鼠交配, 最终获得 Villin-Cre; SIRT6 ^{floxed/floxed} 小鼠即为肠绒毛特异性 SIRT6 敲除小鼠, 获得 SIRT6 ^{floxed/floxed} 小鼠即为同窝对照小鼠。幼鼠出生 3 周进行基因型鉴定
动物数量及分组方法	SIRT6 特异性基因敲除小鼠 (SIRT6 ^{fl/fl}) 及同窝对照小鼠共 6 只, 采用随机对照的方法进行分组, 野生型对照及 SIRT6 ^{fl/fl} 小鼠各 3 只
造模成功评价指标	幼鼠出生 3 周通过 PCR 进行基因分型, 然后进行测序分析
造模后观察指标	①肠黏膜绒毛长度及密度、隐窝高度、杯状细胞数目和潘氏细胞数目; ②小肠类器官出芽率; ③小肠干细胞标记物 Lgr5 蛋白、潘氏细胞标记物溶菌酶蛋白, 吸收上皮细胞标记物细胞角蛋白 20 蛋白, 杯状细胞标记物黏蛋白 2 蛋白表达; ④转录组差异基因及生物信息学分析
造模后动物处理	实验动物在腹腔注射戊巴比妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡
伦理委员会批准	实验方案经广州中医药大学动物实验伦理委员会批准, 批准号为 20200703001

1.4.2 形态学观察 8 周龄 SIRT6^{fl/fl} 小鼠和同窝对照组小鼠, 适应性饲养 3 d。按照小鼠体质量以 1.5 mL/kg 的剂量腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉, 随后处死小鼠。取小肠组织 (空肠段 1 cm) 置于 40 g/L 多聚甲醛溶液中固定 72 h, 经过脱水、浸蜡、包埋、切片处理后, 进行苏木精-伊红染色, 然后脱水、中性树脂封固后在光学显微镜下观察拍片, 比较小肠组织形态学变化。在显微镜 400 倍镜下, 计数杯状细胞和潘氏细胞的数目 (5 个视野/片); 另一部分切片用于免疫组织化学染色。剩余的小肠组织用于后文所述各项实验。

1.4.3 转录组学分析 取 1.4.2 中所述两组小鼠剩余的小肠组织中段 (空肠段 2 cm), 迅速液氮冻存。样本由百迈克生物科技有限公司进行提取、Illumina 平台测序, 并进行生物信息学分析 BMKCloud (www.biocloud.net)。分析差异表达基因在某一通路上是否发生显著差异 (over-presentation) 即为差异表达基因的通路富集分析。转录组差异表达基因使用 edgeR 进行分析, 将 Fold Change ≥ 1.5 且 $P < 0.01$ 作为筛选标准。Pathway 显著性富集分析以 KEGG 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/>) 中 Pathway 为单位^[8], 应用超几何检验, 找出与整个基因组背景相比, 在差异表达基因中显著性富集的 Pathway。

1.4.4 类器官培养 取 1.4.2 中所述两组小鼠剩余的小肠组织 6-8 cm 进行隐窝干细胞分离及类器官培养。将所取小肠组织装入 10 mL 含有预冷 PBS 的离心管中, 移入超净台内进行操作; 用已经过高温灭菌的剪刀镊子沿着肠系膜纵向剖开肠管, 用预冷的 PBS 进行反复清洗, 剪碎成长度约为 1 mm 组织, 用滴管将剪碎的组织移入 50 mL 的离心管中, 用预冷的 PBS 进行冲洗, 每次 30 s, 重复 20 次, 直到上清液清澈; 去除上清液, 每一管加入 20 mL gentle cell dissociation reagent, 室温放在摇床上震荡消化 15 min; 静置 30 s, 去除上清液, 每管加入 15 mL 0.1%BSA(99 mL 冷 PBS+1 mL 10%BSA), 用滴管吹打, 静置 30 s, 用 70 μ m 滤器进行过滤, 重复操作 4 次; 常温离心, 1 500 r/min, 5 min, 收集沉淀; 加入 10 mL 培养基 (99 mL F12+1 mL 10%BSA), 用 1 mL 枪头吹打混匀。取 10 μ L 混悬液滴于玻片, 于显微镜下评估类器官活力及数量; 常温离心, 1 500 r/min, 5 min, 去上清; 加入 300 μ L Intestinal Mouse Basal Medium, 用 1 mL 枪头吹打, 混匀, 加入 300 μ L 提前放在 4 $^{\circ}$ C 的基质胶, 吹打, 混匀, 制成隐窝干细胞混悬液; 拿出提前放在细胞培养箱预热的 24 孔板, 以每孔 50 μ L 混悬液滴在 24 孔板中; 将 24 孔板放在培养箱 10 min 待基质胶固化, 每孔加入 600 μ L Intestinal Mouse Basal Medium 培养液, 每两三天换一次培养液。

1.4.5 Western blot 检测类器官 SIRT6 蛋白表达变化 1.4.4 中所提取的两组类器官培养传代后, 收集类器官样品提取蛋白, 具体收集步骤如下: 弃去孔中原来的培养液, 用预冷的 PBS 冲洗 2 遍; 每孔加入 500 μ L 细胞回收液, 用 1 mL 枪头进行吹打, 直至基质胶溶解; 将液体吸入 1.5 mL 离心管, 4 $^{\circ}$ C 放置 30 min; 4 $^{\circ}$ C 离心 5 000 r/min, 3 min, 弃上清, 收集沉淀用

于后续实验。BCA 试剂盒进行蛋白定量；配制 10% 分离胶和浓缩胶，进行电泳（条件：80 V，20 min；100 V，90 min），转膜条件（100 V，60 min）。一抗（SIRT6 1 : 1 000，GAPDH 1 : 5 000）4 °C 孵育过夜，二抗（1 : 3 000），室温孵育 1 h。采用 ECL 显色，用 Image Lab 3.0 进行曝光，Image J 测定吸光度，做半定量分析。

1.4.6 免疫荧光检测肠类器官 Lgr5、细胞角蛋白 20 和黏蛋白 2 蛋白表达变化 ①第 1 天，用 1.4.4 中所述两组类器官培养传代后，制作类器官爬片，具体步骤如下：将细胞爬片置于 24 孔板中，以每孔 5 μ L 类器官基质胶滴于爬片上培养 3 d。加入 40 g/L 多聚甲醛固定，放入 4 °C 冰箱过夜，用于后续免疫荧光检测。②第 4 天，将 24 孔板取出进行类器官免疫荧光检测，具体步骤如下：弃去孔中固定液，用预冷 IF buffer 冲洗 3 遍，5 min/次；用 0.5% Tritonx-100 透膜 20 min，再次用预冷 IF buffer 进行冲洗，条件同前；用 1% BAS (IF buffer 配制) 封闭 30 min 后，一抗 (Lgr5 为 1 : 100；细胞角蛋白 20 为 1 : 200；黏蛋白 2 为 1 : 200) 4 °C 孵育过夜。③第 5 天，取出 24 孔板于室温复温 10 min，用预冷 IF buffer 冲洗 5 min，重复 3 次；之后与室温下避光孵育荧光二抗 (1 : 500) 1 h 和 DAPI 避光染核 3 min；将爬片放在滴有防荧光淬灭剂的玻片上，周围用透明指甲油封固，避光在室温下进行风干 1 h 后，用荧光显微镜观察与拍摄。

1.4.7 免疫组化检测肠干细胞标记物 Lgr5 和潘氏细胞标记物溶菌酶的表达 取 1.4.2 中所述小肠切片用于免疫组化检测，具体步骤如下：切片经过二甲苯及各级乙醇进行常规脱蜡；PBS 冲洗后，将切片置于抗原修复液中，用微波炉加热，高火 8 min，中高火 10 min 进行抗原修复；待切片恢复至室温，PBS 冲洗，滴加体积分数 3% 过氧化氢酶，室温孵育 10 min，PBS 冲洗；滴加正常羊血清工作液 37 °C 孵育 1 h 进行封闭；滴加一抗 (Lgr5 1 : 100；溶菌酶 1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜。次日，二抗室温孵育 1 h，辣根酶标记链霉卵白素工作液孵育 20 min，DAB 显色液染色 30 s，苏木精染核 40 s，切片经过各级乙醇及二甲苯进行透明、晾干后用中性树脂封固，用光学显微镜进行组织切片染色情况观察。

1.5 主要观察指标 ①小鼠小肠黏膜绒毛长度及密度、隐窝高度、杯状细胞数目和潘氏细胞数目；②小肠黏膜干细胞标记物 Lgr5 蛋白、潘氏细胞标记物溶菌酶蛋白的表达；③肠类器官出芽率、肠类器官中 Lgr5、细胞角蛋白 20、黏蛋白 2 蛋白表达；④转录组学分析。

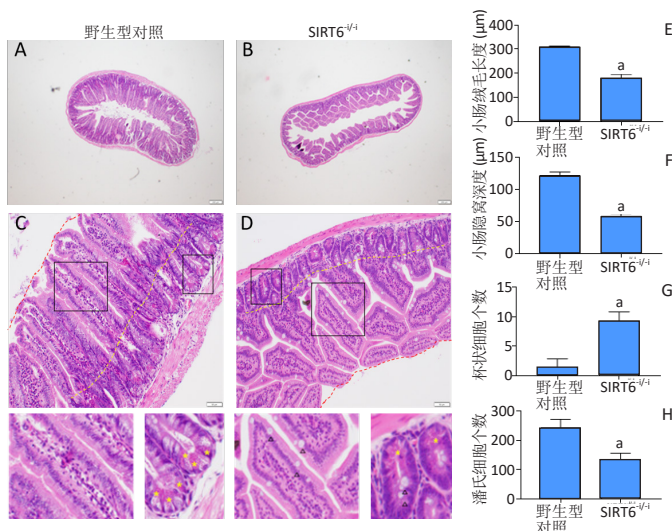
1.6 统计学分析 文章统计学方法已经过广东中医药大学生物统计学专家审核。此次实验应用 Prism 软件作图，应用 SPSS statistics 软件进行统计学分析，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，先检验是否符合正态分布，再进行方差齐性检验，经检验两组间的数据符合正态分布，方差齐，采用 t 检验进行分析， $P < 0.01$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用 SIRT6^{-/-} 小鼠及同窝野生型

对照小鼠各 3 只，实验过程中无脱失，全部进入结果分析。

2.2 SIRT6^{-/-} 小鼠肠道黏膜形态变化 与野生型对照小鼠相比，SIRT6^{-/-} 小鼠小肠绒毛变短 ($P < 0.01$)、紊乱，隐窝高度变浅 ($P < 0.01$)，杯状细胞数量明显增多 ($P < 0.01$)，潘氏细胞数量显著减少 ($P < 0.01$)，见图 1 及表 1。



图注：图 A、C 为野生型对照小鼠小肠切片苏木精-伊红染色图；图 B、D 为 SIRT6^{-/-} 小鼠小肠切片苏木精-伊红染色图，其中小肠黏膜绒毛（红色虚线与黄色虚线之间）、隐窝（黄色虚线到黏膜底部）、杯状细胞（三角号）、潘氏细胞（黄色星号）。图 A、B 为 $\times 40$ 、图 C、D 为 $\times 400$ 。图 E-H 分别为两组小鼠小肠绒毛长度、隐窝深度、杯状细胞个数及潘氏细胞个数的柱状统计图，与野生型对照组相比，^a $P < 0.01$

图 1 | SIRT6^{-/-} 小鼠小肠黏膜绒毛、隐窝、杯状细胞、潘氏细胞的变化
Figure 1 | Changes of villi, crypts, goblet cells, and Paneth cells in the small intestine mucosa of SIRT6^{-/-} mice

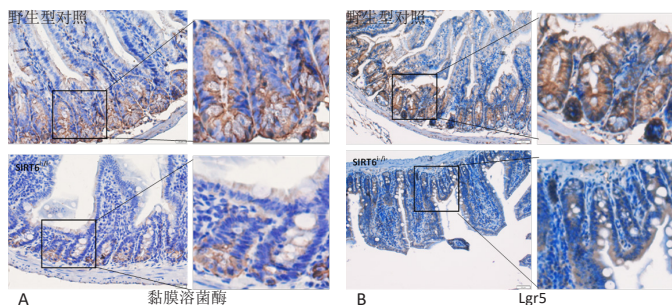
表 1 | 两组小鼠小肠黏膜绒毛长度、隐窝深度、杯状细胞及潘氏细胞个数的比较
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 | Comparison of villi, crypts, goblet cells, and Paneth cells in the small intestine mucosa between SIRT6^{-/-} mice and wild-type control mice

组别	绒毛长度 (μ m)	隐窝深度 (μ m)	杯状细胞个数	潘氏细胞个数
野生型对照组	311.76 \pm 1.89	123.13 \pm 4.24	1.30 \pm 1.53	245.00 \pm 27.78
SIRT6 ^{-/-} 组	181.91 \pm 13.89 ^a	58.55 \pm 3.93 ^a	9.30 \pm 1.53 ^a	134.00 \pm 22.52 ^a

表注：与野生型对照组相比，^a $P < 0.01$

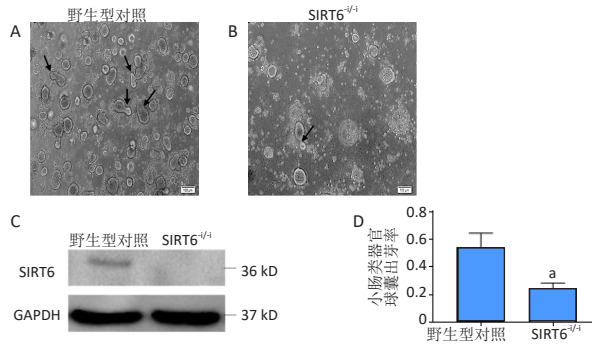
免疫组化结果显示，与野生型对照小鼠相比，SIRT6^{-/-} 小鼠小肠潘氏细胞标记物溶菌酶表达水平明显降低，干细胞标记物 Lgr5 表达水平降低，见图 2。



图注：图 A、B 分别为溶菌酶蛋白、Lgr5 蛋白的免疫组化染色结果图 ($\times 400$)，图中黄褐色部分代表该目的蛋白的阳性表达部分，颜色越深，范围越大，提示目的蛋白表达越多

图 2 | SIRT6^{-/-} 小鼠小肠黏膜溶菌酶及 Lgr5 表达变化
Figure 2 | Changes in the expression of Lyso and Lgr5 in the small intestinal mucosa of SIRT6^{-/-} mice

2.3 SIRT6^{-/-} 小鼠来源的肠类器官形成及特征标记物改变
SIRT6^{-/-} 小鼠来源的肠隐窝细胞经培养 3 d, 可形成球囊状类器官, 其出芽率较野生型对照小鼠来源的肠类器官显著降低 (0.25±0.04, 0.54±0.10, *P* < 0.01)。经 Western-blot 实验检测显示, SIRT6^{-/-} 肠道类器官中 SIRT6 的蛋白表达水平明显降低, 见图 3。



图注: 图 A、B 分别为野生型对照组及 SIRT6^{-/-} 组肠类器官培养 3 d 光镜下形态 (×40), 黑色箭头所指表示类器官出芽球囊; 图 C 为两组肠道类器官 SIRT6 蛋白表达, GAPDH 为内参蛋白; 图 D 为两组肠类器官球囊出芽率比较, 与野生型对照组相比, ^a*P* < 0.01

图 3 | 培养 3 d 两组小鼠来源的类器官形态、蛋白表达及出芽率变化
Figure 3 | Changes of organoid morphology, protein expression and budding rate in mice after 3 days of culture

免疫荧光结果显示, 与野生型对照小鼠相比, SIRT6^{-/-} 小鼠来源的肠类器官中 Lgr5 的蛋白表达水平显著降低, 而细胞角蛋白 20、黏蛋白 2 的蛋白表达水平明显升高, 见图 4 及表 2。

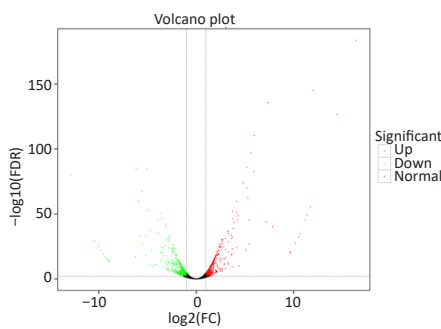
表 2 | 两组小鼠肠道类器官中 Lgr5、细胞角蛋白 20、黏蛋白 2 蛋白荧光定量的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 | Comparison of the fluorescence quantification of Lgr5, cytokeratin 20, and mucin 2 in the mouse intestinal organoids

组别	Lgr5	细胞角蛋白 20	黏蛋白 2
野生型对照组	20.67±1.39	34.55±1.40	22.66±2.34
SIRT6 ^{-/-} 组	10.17±0.37 ^a	48.60±0.69 ^a	44.29±1.29 ^a

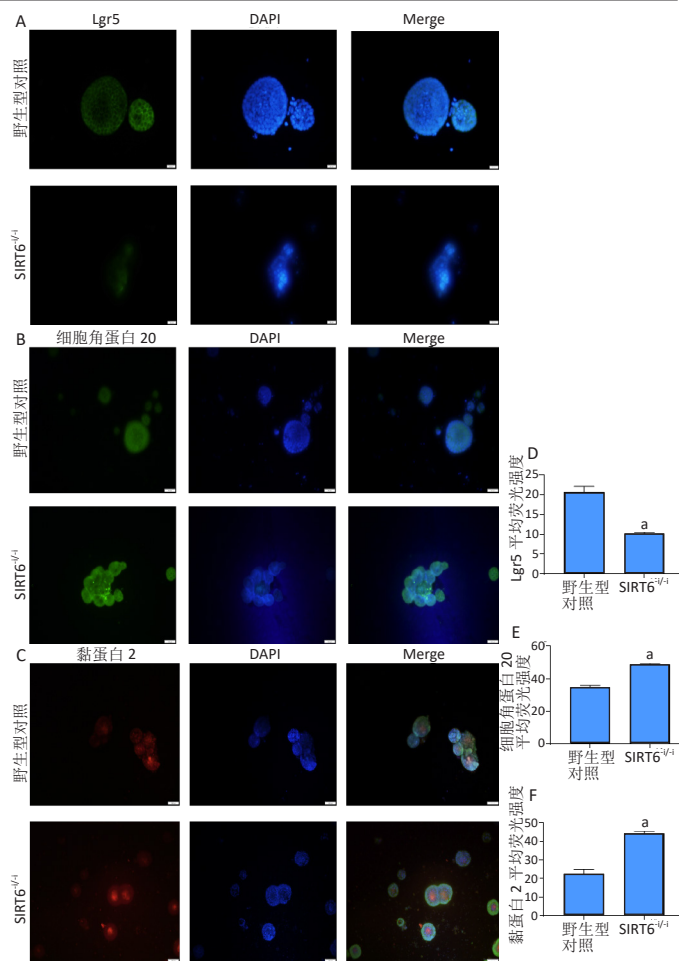
表注: 与野生型对照组相比, ^a*P* < 0.01

2.4 SIRT6^{-/-} 小鼠肠组织转录组学的特征变化 转录组分析表明, 与野生型对照小鼠比较, SIRT6^{-/-} 小鼠肠组织差异表达基因共 846 个, 其中上调基因 438 个, 下调基因 408 个, 见图 5; 差异基因在 KEGG 通路富集前 5 位的分别是化学致癌、药物代谢、视黄酸代谢、亚油酸代谢和类固醇生物合成, 见图 6; 显著富集通路中关联的基因主要为 Cyp2、Cyp3、Cyp4 家族的改变, 尤其以基因表达上调为主, 见图 7。



图注: X、Y 坐标轴均取筛选条件值的对数形式, 图中每个点代表一个差异表达基因, Up 表示上调基因, Down 表示下调基因, Normal 表示无明显变化的基因 图 5 | 差异表达基因火山图

Figure 5 | Volcano map of differentially expressed genes



图注: 图 A-C 分别为 Lgr5、细胞角蛋白 20 和黏蛋白 2 蛋白的免疫荧光结果图 (×200), 其中 Lgr5 和细胞角蛋白 20 蛋白为绿色荧光标记, 黏蛋白 2 蛋白为红色荧光标记, 荧光强度越大表示该区域目的蛋白表达越多; DAPI 蓝色荧光标记表示细胞核, Merge 为目的蛋白染色图与 DAPI 核染图合成图片。图 D-F 分别为与 A-C 相对应的 Lgr5、细胞角蛋白 20 和黏蛋白 2 蛋白平均荧光强度柱状图, 与野生型对照组相比, ^a*P* < 0.01

图 4 | 两组小鼠肠道类器官中 Lgr5、细胞角蛋白 20、黏蛋白 2 蛋白的表达
Figure 4 | Expression of Lgr5, cytokeratin 20 and mucin 2 proteins in mouse intestinal organoids

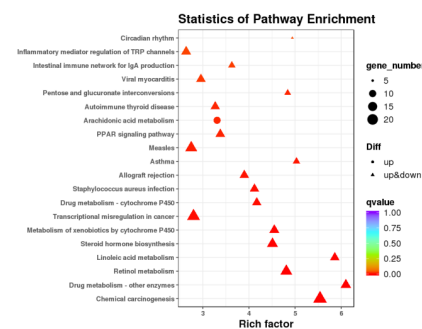
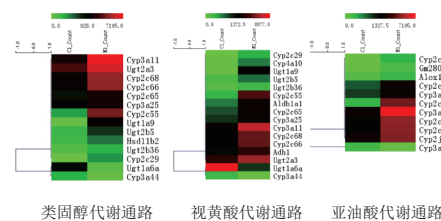


Figure 6 | Kyoto encyclopedia of genes and genomes pathway enrichment analysis of differentially expressed genes (top 20)

图注: 差异基因在 KEGG 通路富集前 20 位分析图, 其中前 5 位的差异基因通路富集分别是化学致癌、药物代谢、视黄酸代谢、亚油酸代谢和类固醇生物合成 图 6 | 差异表达基因京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析图 (前 20 位)



图注: 为富集通路中的类固醇代谢通路、视黄酸代谢通路和亚油酸代谢通路差异表达基因热图, 其中颜色越接近红色表示基因表达越高, 越接近绿色表示基因表达越低 图 7 | 富集通路中差异表达基因热图
Figure 7 | Heatmap for the differentially expressed genes in the enriched pathways

3 讨论 Discussion

SIRT6 是沉默信息调节因子家族的一员, 被称为“长寿基因”, 研究表明 SIRT6 发挥“长寿作用”的机制与其在维持基因组和表观基因组稳定性方面的作用息息相关^[9]。亦有研究表明, SIRT6 可优化老年时的能量稳态, 以延缓虚弱并保持健康的衰老^[10]。

此外, SIRT6 在细胞应激、细胞衰老及代谢、干细胞稳态等方面亦发挥重要作用。研究表明, SIRT6 在调节干细胞稳态和不同类型成体干细胞的功能方面具有关键作用。SIRT6 的组蛋白去乙酰化修饰对维持间充质干细胞稳态十分重要, SIRT6 缺陷的间充质干细胞在体内移植时表现为成骨细胞和软骨细胞分化受损、细胞衰老和细胞早衰等; 而 SIRT6 过表达可以促进大鼠间充质干细胞的成骨分化, 增强新骨形成和骨修复^[11-12]。SIRT6 也可维持造血干细胞的长期自我更新能力, SIRT6 通过 H3K56 去乙酰化, 抑制调控造血干细胞稳态的关键因子 Wnt 通路的基因转录; 而 SIRT6 的缺失会导致细胞静息期的减少, 进而导致造血干细胞更新失衡。刘芳宜^[13]的研究表明 SIRT6 与结肠炎的关系密切, SIRT6 的表达会随着结肠炎的发生发展而降低。LU 等^[14]的研究表明, SIRT6 是维持黏膜稳态和治疗肠道炎症的候选靶点。目前 SIRT6 参与肠干细胞稳态调控的研究尚少。

2007 年荷兰的 CLEVERS 发现 Lgr5 标记的阳性隐窝干细胞具有增殖分化功能, BARKER 等^[15]通过插入等位基因以及谱系追踪等实验技术手段证明 Lgr5 是人和小鼠肠道隐窝干细胞的标记物。潘氏细胞是小肠上皮中唯一产生溶菌酶的细胞类型^[16], 因此溶菌酶是潘氏细胞的经典标记物。潘氏细胞是唯一位于隐窝区域的分化细胞, 不仅可以产生抗菌肽调节肠道微生物, 而且可产生生长因子维持隐窝微环境影响干细胞的增殖分裂^[17]。干细胞的增殖、分化和凋亡过程依赖不同信号途径相互作用, 以维持干细胞的稳态, 其中 Wnt 信号与干细胞增殖调控息息相关, 而 Notch 信号更多参与干细胞的分化调控^[18]。此次研究结果发现 SIRT6^{-/-} 小鼠小肠绒毛及隐窝高度明显变浅, 其中黏膜杯状细胞的数量明显增多, 潘氏细胞数量明显降低, 而溶菌酶和 Lgr5 的表达明显下降, 提示 SIRT6 缺失导致隐窝干细胞增殖、分化稳态失衡, 隐窝区域细胞增殖能力减弱, 进而导致肠黏膜更新受损。

细胞角蛋白 20 属于细胞骨架成分之一, 具有调节细胞分化的作用, 有严格的特异性分布, 在小肠中主要位于小肠绒毛的上皮细胞的细胞纤维索中^[19], 是上皮细胞的经典标记物。杯状细胞分布于整个肠上皮, 可分泌黏液并合成黏蛋白, 与水、无机盐共同组成肠道上皮的黏液屏障, 对肠黏膜起到保护和润滑作用^[20]。黏蛋白 2 是一种分泌型肠黏液蛋白, 是组成肠黏液的主要成分^[21]。黏蛋白 2 的表达及定位具有细胞特异性^[22], 大部分在杯状细胞中分布, 可用来标记杯状细胞。在体外实验中, 通过分离肠道隐窝干细胞, 构建肠道类器官模型发现, SIRT6^{-/-} 小鼠来源的肠类器官中 SIRT6 蛋白明显缺

失, 其类器官的成球及出芽形态明显减少, 免疫荧光结果显示 Lgr5 的蛋白表达明显降低, 而类器官中成熟的吸收上皮细胞标记物细胞角蛋白 20、杯状细胞标记物黏蛋白 2 的蛋白表达增高; 可见 SIRT6 缺失表型主要体现在对隐窝干细胞的影响, 表现为干细胞增殖功能减弱, 而分化功能相对增强, 进而可能导致肠黏膜更新稳态受损。

近年来, 高通量测序技术被广泛应用于肠道的差异转录组研究, 为肠黏膜更新机制解析提供基础数据。为全面了解 SIRT6^{-/-} 小鼠肠组织全转录水平的变化情况, 此次研究对 SIRT6^{-/-} 小鼠肠组织与对照小鼠肠组织差异表达基因进行分析, 发现 KEGG 功能显著富集通路中差异表达基因以 Cyp2、Cyp3、Cyp4 家族的上调为主, 提示 SIRT6 参与肠黏膜更新机制可能与细胞色素 P450 家族的调控有关。P450 酶是植物界、动物界及微生物界生长过程中不可或缺的部分, 参与催化类固醇激素的合成、调控脂溶性激素及药物代谢等^[23]。1990 年 NEBERT^[24] 提出 P450 酶的生物学功能可能在于负责调控与生物体细胞增殖、分化、独立和肿瘤诱发有关的信号分子的稳态水平。此次研究中 SIRT6^{-/-} 小鼠肠组织显著上调的 Cyp3a11 是人 Cyp3a4 的同源基因, Cyp3a4 是人体 CYP450 酶系中最重要的成员之一, 主要分布于肝脏和肠道, 随着人出生后肠道菌群的定植而逐渐上调, 无菌小鼠研究也显示, 其肝脏 Cyp3a11 的表达水平显著低于正常饲养条件的小鼠^[25-26]。成人 Cyp3a4 介导的三级胆汁酸代谢在一定程度上参与了胆汁酸代谢稳态调控, 而胎儿肠道中没有微生物定植, 其胆汁酸代谢清除可能主要经 Cyp3a7 完成, 随着肠道菌群的定植和肝 Cyp3a 的发育, 逐步过渡到成人胆汁酸的初级-次级-三级代谢模式^[27]。胆汁酸及其相关核受体 FXR、PXR、VDR 在维持肠黏膜屏障的完整性中都发挥重要作用^[28-29], 可见肠道 SIRT6 缺失引起的 Cyp3 酶家族基因改变可能是其参与肠黏膜更新稳态调控的机制之一。

总之, SIRT6 对成体干细胞结构与功能的调控研究正逐步成为热点, 尤其是对肠道干细胞的调控机制研究亟待深入。此次研究中 SIRT6^{-/-} 小鼠肠黏膜形态及差异转录组的表达特征, 从分子水平上初步表明了 SIRT6 与肠干细胞稳态调控关系密切, 为进一步探讨 SIRT6 参与肠黏膜形态及功能的生理病理研究提供了思路, 可为临床炎症性肠病等难治性疾病提供新的治疗靶点。

致谢: 感谢高永老师馈赠基因敲除小鼠, 让此次研究得以顺利完成。

作者贡献: 实验设计为宋宁、李燕舞; 实验实施为游弋晖, 宋春晖; 资料收集为陈曦; 数据处理为姚晓宏、柯俊羽和杜群; 文章写作校对为游弋晖、李燕舞。全体作者均阅读并同意最终的文本。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为

之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] 蒋智, 田子林, 胡帅, 等. NAD⁺ 代谢与衰老及其运动适应研究进展 [J]. 体育科研, 2021,42(5):12-19.
- [2] 陈杰, 万剑华, 吴当彦, 等. SIRT 在肠屏障中作用的研究进展 [J]. 基础医学与临床, 2018,38(1):103-106.
- [3] MOSTOSLAVSKY R, CHUA KF, LOMBARD DB, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*. 2006;124(2):315-329.
- [4] LIU F, BU HF, GENG H, et al. Sirtuin-6 preserves R-spondin-1 expression and increases resistance of intestinal epithelium to injury in mice. *Mol Med*. 2017;23:272-284.
- [5] PAN H, GUAN D, LIU X, et al. SIRT6 safeguards human mesenchymal stem cells from oxidative stress by coactivating NRF2. *Cell Res*. 2016; 26(2):190-205.
- [6] ZHANG P, LIU Y, WANG Y, et al. SIRT6 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through BMP signaling. *Sci Rep*. 2017;7(1):10229.
- [7] ETCHEGARAY JP, CHAVEZ L, HUANG Y, et al. The histone deacetylase SIRT6 controls embryonic stem cell fate via TET-mediated production of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Cell Biol*. 2015;17(5):545-557.
- [8] KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Database issue):D480-484.
- [9] KOROTKOV A, SELUANOV A, GORBUNOVA V. Sirtuin 6: linking longevity with genome and epigenome stability. *Trends Cell Biol*. 2021;31(12): 994-1006.
- [10] ROICHMAN A, ELHANATI S, AON MA, et al. Restoration of energy homeostasis by SIRT6 extends healthy lifespan. *Nat Commun*. 2021; 12(1):3208.
- [11] SUN H, WU Y, FU D, et al. SIRT6 regulates osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells partially via suppressing the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Stem Cells*. 2014;32(7): 1943-1955.
- [12] WANG H, DIAO D, SHI Z, et al. SIRT6 Controls Hematopoietic Stem Cell Homeostasis through Epigenetic Regulation of Wnt Signaling. *Cell Stem Cell*. 2016;18(4):495-507.
- [13] 刘芳宜. SIRT6 在溃疡性结肠炎发病机制中的作用研究 [D]. 北京: 北京协和医学院; 中国医学科学院; 清华大学医学部; 北京协和医学院中国医学科学院内科学 (消化内科), 北京协和医学院, 2015.
- [14] LU H, LIN J, XU C, et al. Cyclosporine modulates neutrophil functions via the SIRT6-HIF-1 α -glycolysis axis to alleviate severe ulcerative colitis. *Clin Transl Med*. 2021;11(2):e334.
- [15] BARKER N, VAN ES JH, KUIPERS J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*. 2007; 449(7165):1003-1007.
- [16] CRAY P, SHEAHAN BJ, DEKANEY CM. Secretory Sorcery: Paneth Cell Control of Intestinal Repair and Homeostasis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2021;12(4):1239-1250.
- [17] GEHART H, CLEVERS H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(1):19-34.
- [18] 夏青松, 徐丽君, 陈广, 等. 信号分子通路网络对肠干细胞增殖和分化的调控 [J]. 生理科学进展, 2020,51(4):305-310.
- [19] 刘睿, 杨垒, 颜浩. CK20、Nm23 与 Ki67 蛋白在结直肠癌组织中的表达及意义 [J]. 中国现代普通外科进展, 2020,23(10):797-800.
- [20] 李冰, 于岩波. 肠黏液屏障在肠道中的作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2017,25(19):1764-1771.
- [21] LEE SY, CHOI DW, JANG KT, et al. High Expression of Intestinal-Type Mucin (MUC2) in Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms Coexisting With Extrapancreatic Gastrointestinal Cancers. *Pancreas*. 2006;32(2): 186-189.
- [22] BUISINE MP, DEVISME L, DEGAND P, et al. Developmental mucin gene expression in the gastroduodenal tract and accessory digestive glands. II. Duodenum and liver, gallbladder, and pancreas. *J Histochem Cytochem*. 2000;48(12):1667-1676.
- [23] 黄玉松, 李力. 细胞色素 P450 酶参与动物体内代谢的研究与展望 [J]. 药物生物技术, 2021,28(1):94-98.
- [24] NEBERT DW. Drug metabolism. Growth signal pathways. *Nature*. 1990; 347(6295):709-710.
- [25] STEVENS JC, HINES RN, GU C, et al. Developmental expression of the major human hepatic CYP3A enzymes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003; 307(2):573-582.
- [26] KUNO T, HIRAYAMA-KUROGI M, ITO S, et al. Effect of Intestinal Flora on Protein Expression of Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters in the Liver and Kidney of Germ-Free and Antibiotics-Treated Mice. *Mol Pharm*. 2016;13(8):2691-2701.
- [27] 兰轲. 药物代谢酶 CYP3A 在胆汁酸宿主 - 肠道微生物协同代谢中的生物学功能假说 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019,35(22):2923-2929.
- [28] MROZ MS, LAJZAK NK, GOGGINS BJ, et al. The bile acids, deoxycholic acid and ursodeoxycholic acid, regulate colonic epithelial wound healing. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2018;314(3): G378-G387.
- [29] SONG M, YE J, ZHANG F, et al. Chenodeoxycholic Acid (CDCA) Protects against the Lipopolysaccharide-Induced Impairment of the Intestinal Epithelial Barrier Function via the FXR-MLCK Pathway. *J Agric Food Chem*. 2019;67(32):8868-8874.

(责任编辑: GD, ZN, ZJP)