

转录组测序分析脓毒症小鼠小肠类器官 基因表达差异及髓样分化因子 88 抑制剂的保护效应

郭丽艳¹ 薛娜² 王晴¹ 滕洪云¹ 白丽丽¹ 魏凯¹ 李元涛¹ 冯庆国¹

¹天津市第五中心医院重症医学科,天津 300450; ²天津市第五中心医院中心实验室,天津市早产儿器官发育表观遗传重点实验室,天津 300450

通信作者:冯庆国, Email: anginagi@163.com

【摘要】 目的 探讨小鼠小肠类器官脓毒症损伤机制,从分子水平分析髓样分化因子 88 抑制剂 TJ-M2010-5 (TJ5) 治疗小鼠小肠类器官脓毒症损伤的可能机制或潜在药物靶点。**方法** 提取 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠小肠组织进行原代类器官培养及传代。采用免疫荧光法检测小肠类器官中细胞生长及增殖标志物细胞核抗原 Ki-67、杯状细胞标志物黏液素-2 (MUC-2)、上皮细胞标志物 E-钙黏蛋白及潘氏细胞标志物溶菌酶 (Lyz) 阳性表达,进行表型鉴定。取传代培养 3 d 小肠类器官,分为正常对照组 (用含 0.2% 二甲基亚砜 (DMSO) 的培养液处理 10 h)、脂多糖 (LPS) 组 (用含 200 mg/L LPS 和 0.2% DMSO 的培养液处理 10 h) 和 TJ5 组 (用含 10 mmol/L TJ5 的培养液预处理 2 h, 然后加入终浓度为 200 mg/L 的 LPS 培养液继续处理 10 h)。采用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测小鼠小肠类器官白细胞介素-6 (IL-6) 和紧密连接蛋白 ZO-1 的 mRNA 表达; 对各组小肠类器官进行 RNA 转录组测序,分析组间差异表达基因,并进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书数据库 (KEGG) 显著富集分析。**结果** 小鼠小肠组织经原代培养 7 d 形成成熟的类器官,传代后小肠类器官生长速度加快,经免疫荧光鉴定,可观察到 Ki-67、MUC-2、E-钙黏蛋白、Lyz 阳性表达,表明小鼠小肠类器官在体外培养条件下能够维持其细胞组成和功能特性。RT-qPCR 结果显示,与正常对照组比较,LPS 组小肠类器官 IL-6 mRNA 表达显著升高 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.83 ± 0.16 比 1.02 ± 0.28 , $P < 0.05$), ZO-1 mRNA 表达显著降低 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.53 ± 0.11 比 1.01 ± 0.18 , $P < 0.05$); 而 TJ5 组 IL-6 和 ZO-1 的 mRNA 表达趋势均得到逆转,与 LPS 组比较差异均有统计学意义 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: IL-6 mRNA 为 1.24 ± 0.01 比 1.83 ± 0.16 , ZO-1 mRNA 为 1.97 ± 0.29 比 0.53 ± 0.11 , 均 $P < 0.05$)。RNA 转录组测序分析显示,与正常对照组比较,LPS 组有 49 个差异表达基因,其中 42 个上调,7 个下调; 与 LPS 组比较,TJ5 组有 84 个差异表达基因,其中 47 个上调,37 个下调。对这些差异表达基因进行 GO 显著富集分析显示,正常对照组与 LPS 组差异表达基因显著富集的生物过程主要包括细菌 LPS 代谢过程、细菌分泌的各种分子及细菌整体代谢过程、细菌与细胞因子及其受体作用过程等; LPS 组与 TJ5 组差异表达基因显著富集的生物过程主要包括谷胱甘肽代谢过程、应激反应、细胞对化学刺激的反应等。在分子功能分组中,谷胱甘肽结合、寡肽结合是差异表达基因显著富集的类型; 在细胞组分分类中,差异表达基因主要富集在细胞质、内质网与微粒体。KEGG 通路显著富集分析显示,正常对照组与 LPS 组差异表达基因显著富集在 IL-17 及肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路、病毒与细胞因子及其受体反应信号通路、细胞因子及其受体作用信号通路等; LPS 组与 TJ5 组差异表达基因主要富集在流体剪切应力与动脉粥样硬化信号通路、铁死亡信号通路、谷胱甘肽代谢信号通路、细胞色素 P450 药物代谢信号通路等。**结论** 成功提取培养了小鼠小肠类器官; TJ5 可能通过调控脓毒症损伤小鼠小肠类器官基因表达及其相关信号通路 (流体剪切应力与动脉粥样硬化、铁死亡、谷胱甘肽代谢、细胞色素 P450 药物代谢等) 发挥保护作用,这些基因及信号通路可能是治疗脓毒症损伤肠道的关键靶点。

【关键词】 小肠类器官; 脓毒症; TJ-M2010-5; 转录组测序分析

基金项目: 天津市卫生健康科技项目 (TJWJ2022QN102); 国家临床重点专科建设项目 (2023283)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250324-00291

Transcriptome sequencing analysis of gene expression differences in intestinal organoids of septic mice and the protective effects of myeloid differentiation factor 88 inhibitor

Guo Liyan¹, Xue Na², Wang Qing¹, Teng Hongyun¹, Bai Lili¹, Wei Kai¹, Li Yuantao¹, Feng Qingguo¹

¹Department of Critical Care Medicine, Tianjin Fifth Central Hospital, Tianjin 300450, China; ²Central Laboratory, Tianjin Fifth Central Hospital, Tianjin Key Laboratory of Epigenetic for Organ Development of Preterm Infants, Tianjin 300450, China

Corresponding author: Feng Qingguo, Email: anginagi@163.com

【Abstract】 Objective To elucidate the molecular mechanisms underlying sepsis-induced injury in mouse intestinal organoids and investigate the possible mechanisms or potential drug targets of myeloid differentiation factor 88 inhibitor [TJ-M2010-5 (TJ5)] on this condition. **Methods** Small intestinal organoids from C57BL/6 mice aged

6–8 weeks were established and characterized using immunofluorescence for cell growth and proliferation marker nuclear antigen Ki-67, goblet cell marker mucin-2 (MUC-2), epithelial cell marker E-cadherin, and Paneth cell marker lysozyme (Lyz). Small intestinal organoids after 3 days of passaging were divided into different groups: a normal control group treated with culture medium containing 0.2% dimethyl sulfoxide (DMSO) for 10 hours, a lipopolysaccharide (LPS) group treated with culture medium containing 200 mg/L LPS and 0.2% DMSO for 10 hours, and a TJ5 group pre-treated with 10 mmol/L TJ5 for 2 hours followed by treatment with culture medium containing 200 mg/L LPS for 10 hours. Real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to measure the expression levels of interleukin-6 (IL-6) and zonula occludens-1 (ZO-1) in the small intestinal organoids. RNA transcriptome sequencing was performed on the small intestinal organoids from each group to analyze differentially expressed genes between groups, and significant enrichment was analyzed using gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). **Results** By the 7th day of primary culture, mature organoids had formed, and their growth rate increased after passaging. Immunofluorescence identification showed expressions of Ki-67, MUC-2, E-cadherin, and Lyz, indicating that the mouse small intestinal organoids maintained their cellular composition and functional characteristics under *in vitro* culture conditions. RT-qPCR results showed that compared with the normal control group, the mRNA expression of IL-6 in the small intestinal organoids of the LPS group was significantly increased ($2^{-\Delta\Delta C_t}$: 1.83 ± 0.16 vs. 1.02 ± 0.28 , $P < 0.05$), while the mRNA expression of ZO-1 was significantly decreased ($2^{-\Delta\Delta C_t}$: 0.53 ± 0.11 vs. 1.01 ± 0.18 , $P < 0.05$). In contrast, the mRNA expression trends of both IL-6 and ZO-1 were reversed in the TJ5 group, showing statistically significant differences as compared with the LPS group ($2^{-\Delta\Delta C_t}$: IL-6 mRNA was 1.24 ± 0.01 vs. 1.83 ± 0.16 , ZO-1 mRNA was 1.97 ± 0.29 vs. 0.53 ± 0.11 , both $P < 0.05$). RNA transcriptome sequencing showed 49 differentially expressed genes in the LPS group compared to the normal control group, with 42 upregulated and 7 downregulated. Compared to the LPS group, the TJ5 group showed 84 differentially expressed genes, with 47 upregulated and 37 downregulated. GO enrichment analysis of these differentially expressed genes showed that the significantly enriched biological processes of the differentially expressed genes between the normal control group and the LPS group included responses to LPS, responses to molecule of bacterial origin and responses to bacterium. The significantly enriched biological processes of the differentially expressed genes between the LPS group and the TJ5 group included glutathione metabolic processes, responses to stress cellular and responses to chemical stimulus. In molecular function groups, glutathione binding and oligopeptide binding were significantly enriched by the differentially expressed genes. In cellular component classifications, the enrichment of the differentially expressed genes was mainly observed in the cytoplasm, endoplasmic reticulum, and microsomes. KEGG pathway enrichment analysis indicated that the differentially expressed genes between the normal control group and LPS group were enriched in IL-17 signaling pathways, tumor necrosis factor (TNF) signaling pathways, viral protein interactions with cytokines and cytokine receptors signaling pathways, and cytokine-cytokine receptor interaction signaling pathways. In contrast, the differentially expressed genes between the LPS and TJ5 groups were mainly enriched in atherosclerosis signaling pathways, ferroptosis signaling pathways, glutathione metabolism signaling pathways, and cytochrome P450-mediated drug metabolism signaling pathways. **Conclusions** Mouse small intestinal organoids were successfully extracted and cultured. TJ5 may exert its protective effects by regulating gene expression and related signaling pathways (fluid shear stress and atherosclerosis, ferroptosis, glutathione metabolism, cytochrome P450 drug metabolism, etc.) in sepsis-injured mouse small intestinal organoids. These genes and signaling pathways may be key targets for treating sepsis-induced intestinal injury.

[Key words] Small intestine organoids; Sepsis; TJ-M2010-5; Transcriptome sequencing analysis

Fund program: Tianjin Health Technology Project (TJWJ2022QN102); National Key Clinical Specialty Construction Project of China (2023283)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250324-00291

脓毒症已成为全球重症医学科患者死亡的主要病因之一^[1],发病率逐年增加,近年来每年新增数百万例脓毒症病例,超过 1/4 的患者最终死亡^[2]。脓毒症患者的肠道具有独特的病理生理变化,参与脓毒症的进程,其中肠道消化吸收功能在疾病过程中受损,使得此类患者营养状态进一步恶化,而这种恶化会反作用于脓毒症的发生发展。

TJ-M2010-5 (TJ5) 是髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 的抑制剂,而 MyD88 是 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 信号转导通路中的关键蛋白^[3]。TLR/MyD88 通路参与调节肠道免疫、黏膜修复功能,从而使肠黏膜屏障完整性

破坏,细菌和内毒素更容易移位,形成恶性循环,促进脓毒症的发展^[4-5]。目前有关 TJ5 对肠道脓毒症损伤的治疗作用仍未完全明确。

小肠类器官是小肠干细胞增殖的 3D 模型,能够分化出基本全部的肠上皮细胞,形成包含许多隐窝的空腔样管状结构,保留了肠干细胞的增殖和分化能力^[6];其凭借高度的基因稳定性,保留了组织的基因型和表现型,目前已成为临床疾病研究及药物作用与疗效评价等的常用模型^[7-9]。本研究拟提取培养出小鼠小肠类器官,构建脓毒症损伤模型,采用转录组测序 (RNA sequencing, RNA-Seq) 技术,了解基因表达的差异,并从分子水平分析 TJ5 作用于小

鼠小肠类器官脓毒症损伤的可能机制或潜在药物靶点,以期为临床治疗和预防脓毒症导致的肠道炎症反应提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物:SPF 级 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠 5 只, 体重约 20 g, 常规条件下饲养, 饲养过程中自由获取食物和水。所有涉及活体动物的实验操作均符合动物伦理学要求, 并通过天津市第五中心医院动物伦理委员会的批准(审批号: TJFCH2024032)。

1.2 小鼠小肠类器官的培养和传代

1.2.1 小肠类器官培养:颈椎脱臼处死小鼠, 消毒后转移至超净台; 剪开腹膜, 取 10 cm 小肠中间部分, 置于预冷的杜氏磷酸盐缓冲液(Dulbecco phosphate-buffered saline, DPBS)中; 清洗后, 将小肠组织剪碎到 2 mm 直径大小, 用预冷的含 5 mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)的 DPBS 处理消化, 置于 4 ℃ 冰箱 30 min; 清洗后, 吹打、过滤, 离心收集隐窝并计数; 细胞外基质(extracellular matrix, ECM)重悬组织沉淀, 每 10 μ L ECM 悬液包含 200~600 个隐窝, 点入 24 孔板中央, 置于 37 ℃ CO₂ 恒温培养箱中孵育 20 min 待 ECM 凝固; 每孔加入 500 μ L 完全培养基, 放回恒温培养箱中培养。每隔 3 d 或培养基颜色变浅时更换培养基。

1.2.2 小肠类器官传代:用经过抗黏附液润洗的枪头吹打刮取类器官, 并将类器官和培养基悬液转移至经过抗黏附液润洗的 1.5 mL 小离心管中; 用经过抗黏附液润洗的枪头用力重悬类器官悬浮液, 使得类器官与 ECM 分离; 4 ℃ 下 150 $\times g$ 离心 3 min, 弃上清; 使用 DPBS 重悬底部类器官沉淀, 重复上述步骤后弃上清, 置于冰上; 用适量 ECM 重悬类器官沉淀, 重悬时间不超过 30 s, 此步骤需要始终于冰上操作, 以免 ECM 过早凝固。将 ECM 和类器官混合液点入 24 孔板中央, 每孔 30 μ L 左右, 置于 37 ℃ CO₂ 恒温箱 15~20 min; 待 ECM 完全凝固后, 加入已经配制好的完全培养基, 24 孔板每孔约 500 μ L, 最后置于 37 ℃ CO₂ 恒温箱中孵育培养。

1.3 小鼠小肠类器官表型鉴定:采用免疫荧光法进行表型鉴定。取 1.2 中建立的生长 6 d 的小鼠小肠类器官, 吸走培养基, 预冷的 DPBS 1 mL 冲洗 3~4 次, 37 ℃ 下 4% 多聚甲醛固定 30 min; 打孔 40 min 后, 用含 5% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)室温封闭约 40 min; 吸走封闭液, 加入一抗(按说明书稀释到

合适浓度), 4 ℃ 孵育 12 h, 用 DPBS 冲洗 3 次(每次 5 min); 加入二抗(按说明书稀释到合适浓度), 37 ℃ 孵育 1 h, DPBS 冲洗 3 次(每次 5 min), 封片。共聚焦倒置荧光显微镜下观察细胞生长及增殖标志物细胞核抗原 Ki-67、杯状细胞标志物黏液素-2(mucin-2, MUC-2)、上皮细胞标志物 E-钙黏蛋白和潘氏细胞标志物溶菌酶(lysozyme, Lyz)阳性表达。

1.4 小鼠小肠类器官分组和处理:取传代培养 3 d 的小鼠小肠类器官, 分为 3 组。① 正常对照组: 用含 0.2% 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)的培养液处理 10 h; ② 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)组: 用含 200 mg/L LPS 和 0.2% DMSO 的培养液处理 10 h; ③ TJ5 组: 用含 10 mmol/L TJ5 的培养液预处理 2 h, 然后再加入终浓度为 200 mg/L 的 LPS 培养液继续处理 10 h。

1.5 小鼠小肠类器官白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和紧密连接蛋白 ZO-1 的 mRNA 表达检测:采用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-qPCR)检测 IL-6 和 ZO-1 的 mRNA 表达。提取小肠类器官样本总 RNA, 反转录为 cDNA。反应体系: cDNA 模板 1 μ L, 正向引物 0.5 μ L, 反向引物 0.5 μ L, 荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂 10 μ L, 被动参考染料(passive reference dye, ROX)荧光标记 0.4 μ L, 无脱氧核糖核酸酶水 7.6 μ L; 总体积 20 μ L。反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 30 s, 48 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s; 共 40 次循环。溶解曲线采集程序为 95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s。以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示基因表达量。

1.6 核酸提取、文库构建及测序分析:TRIzol 试剂提取 RNA, 测定 RNA 纯度; 琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 完整性及有无 DNA 污染, 测定 RNA 浓度。将提取到的 mRNA 进行富集; 经磁珠纯化处理后, 利用高温将 mRNA 进行片段化, 反转录成 cDNA 第一链, 同时合成第二链, 对末端修复和加 A 尾; 纯化后选择目标片段, 进行 PCR 文库扩增。通过 Illumina Hiseq 6000 平台进行测序分析。

1.7 统计学方法:使用 Graph-Pad Prism 8.3.0 软件绘图并进行统计学分析。计量资料均符合正态分布, 以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 t 检验, 检验水准取双侧 α 值 0.05。将 Illumina Hiseq 测序分析得到的数据通过碱基识别形成原始序列“Raw reads”, 去掉接

头及低质量片段后获得“Clean reads”。通过每千碱基转录片段每百万映射片段(fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped, FPKM)得出不同样本间及组间的差异表达倍数。根据 $P \leq 0.05$ 和 ≥ 2 倍的差异表达区间获得两组间的差异表达基因,并进行基因本体(Gene Ontology, GO)及京都基因与基因组百科全书数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)显著富集分析。

2 结果

2.1 小鼠小肠类器官的建立(图 1): 随小肠组织原代培养时间延长,可见小肠类器官从形成圆圈状结构开始逐步增大、管壁逐渐增厚、出芽到形成成熟类器官的变化趋势;培养 7 d 进行第一次传代,传代后类器官生长速度加快,随着传代时间延长,可见传代后类器官再次从圆圈状结构开始逐步增大、管壁逐渐增厚、出芽至形成成熟类器官的生长变化。

2.2 小鼠小肠类器官免疫荧光表型鉴定(图 2): 共聚焦倒置荧光显微镜下观察显示,小鼠小肠类器官中成功检出相关标志物,包括细胞生长及增殖标志物 Ki-67、杯状细胞标志物 MUC-2、上皮细胞标志物 E-钙黏蛋白及潘氏细胞标志物 Lyz,表明小鼠小肠类器官在体外培养条件下能够维持其细胞组成和功能特性,为后续研究提供了可靠的实验模型。

2.3 小鼠小肠类器官 IL-6 和 ZO-1 的 mRNA 表达(图 3): 与正常对照组比较, LPS 组小肠类器官 IL-6 mRNA 表达显著增加, ZO-1 mRNA 表达显著降低(均 $P < 0.05$); 而 TJ5 组 IL-6 和 ZO-1 的 mRNA 表达趋

势均得到逆转,与 LPS 组比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

2.4 数据质量统计: 正常对照组、LPS 组、TJ 组每组 5 个样本经 Illumina Hiseq 测序分析得到的 Raw reads 与去掉接头及低质量片段后获得的 Clean reads 统计见表 1,后续分析均基于 Clean reads。表 1 显示,每个样本 Clean reads 总量均超过了 36 000 000 bp,每个样本质量 ≥ 20 和质量 ≥ 30 的碱基与高质量片段碱基的比值(Q20、Q30)分别超过了 98%、95%,提示转录测序得到的数据质量合格。

2.5 差异表达基因的筛选(图 4): 根据 $P \leq 0.05$ 和 ≥ 2 倍差异表达区间获得两组间的差异表达基因。与正常对照组比较, LPS 组有 49 个差异表达基因,其中 42 个上调, 7 个下调; 与 LPS 组比较, TJ5 组有 84 个差异表达基因,其中 47 个上调, 37 个下调。

2.6 差异表达基因 GO 显著富集分析(图 5; 表 2): 对筛选出的差异表达基因进行 GO 显著富集分析,结果显示,差异表达基因注释到的生物学过程主要体现在细胞和代谢过程等; 细胞组分包括细胞部分、细胞质膜、细胞内过程调控等; 分子功能主要有水解酶、氧化还原酶活性等。正常对照组与 LPS 组差异表达基因显著富集的生物过程主要包括细菌 LPS 代谢过程、细菌分泌的各种分子及细菌整体代谢过程、细菌与细胞因子及其受体作用过程、细胞因子与细胞因子作用过程、脂质代谢过程、含氧有机酸代谢过程等。LPS 组与 TJ5 组差异表达基因显著富集的生物过程主要包括谷胱甘肽代谢过程、应激反

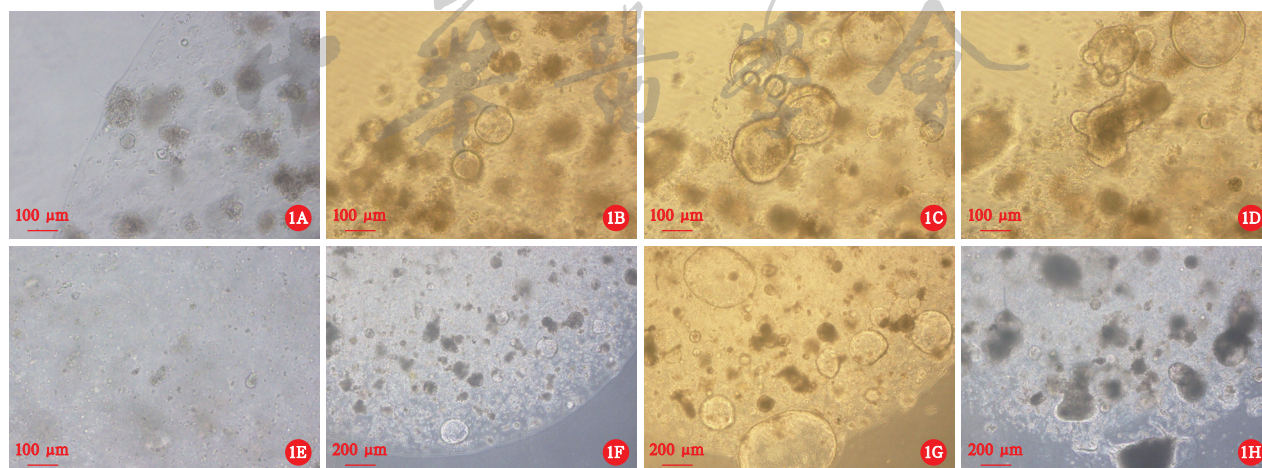


图 1 倒置相差显微镜下观察小鼠小肠类器官体外连续培养及传代的形态变化 小鼠小肠组织经原代培养 5~6 h,开始形成边界清楚的圆圈状结构(低倍放大, A); 2 d 时,圆圈状结构开始增大,中间可见空泡状管腔(低倍放大, B); 5 d 时,圆圈状结构继续增大,管壁逐渐增厚,并开始有出芽趋势(低倍放大, C); 7 d 时,类器官形成不规则的环状结构,管腔内部颜色变深,形成成熟类器官(低倍放大, D)。于培养 7 d 进行第一次传代,传代后约 0.5 h,可见大量散在的边界清楚的小圆圈细胞团块(低倍放大, E); 1 d 时,圆圈状结构开始增大(高倍放大, F); 3 d 时,类器官体积明显增大,管壁明显增厚,再次出现出芽趋势(高倍放大, G); 5 d 时,类器官形成不规则的环状结构,管腔中间颜色加深,形成成熟类器官(高倍放大, H)

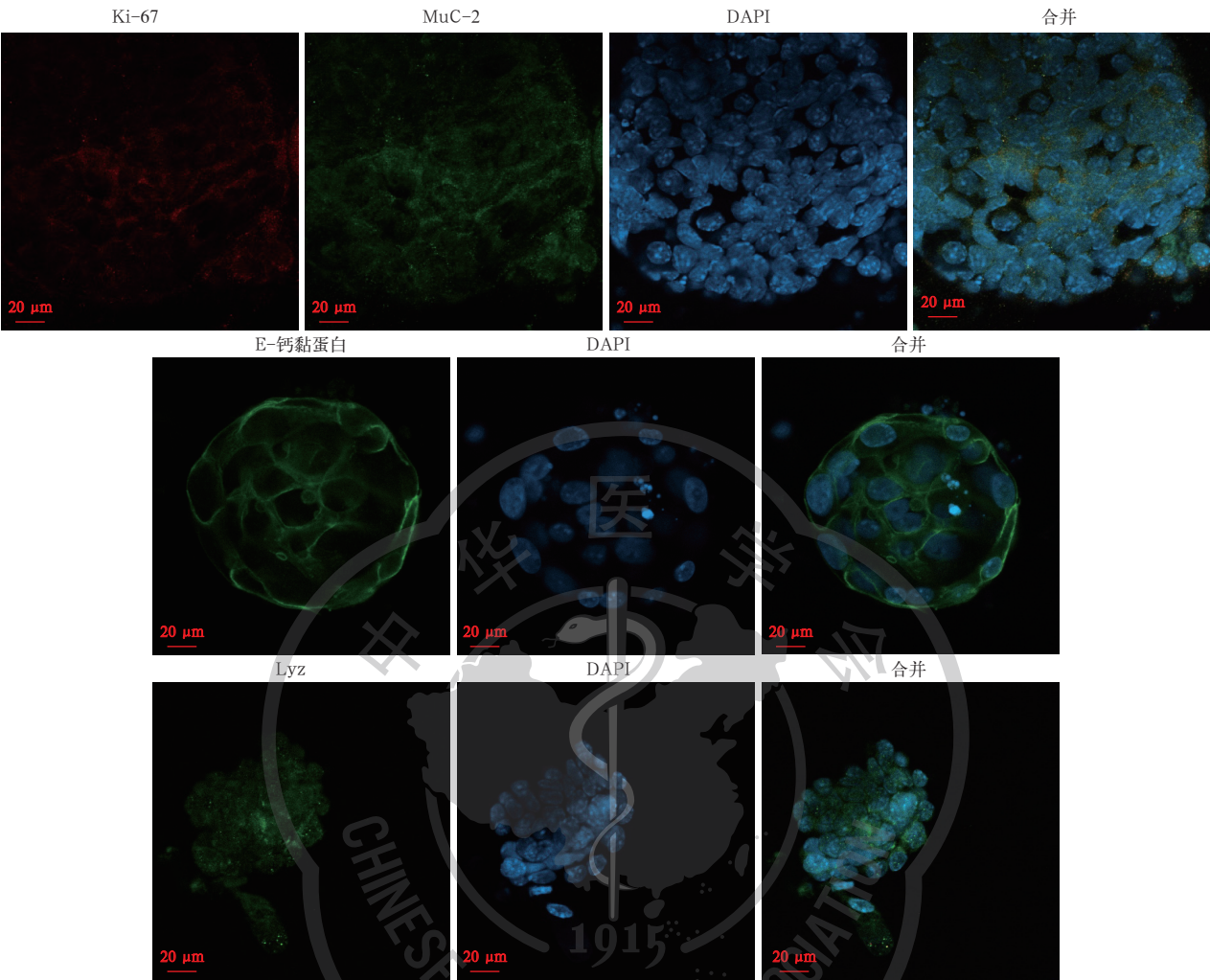
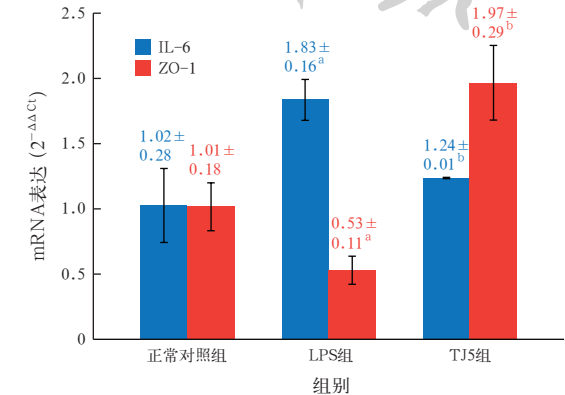


图2 共聚焦倒置荧光显微镜下进行小鼠小肠类器官表型鉴定。小肠类器官生长6 d时,可观察到细胞生长及增殖标志物细胞核抗原Ki-67(红色荧光)、杯状细胞标志物黏液素-2(MUC-2,绿色荧光)、上皮细胞标志物E-钙黏蛋白(绿色荧光)和潘氏细胞标志物溶菌酶(Lyz,绿色荧光)阳性表达;蓝色荧光为4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色的细胞核。免疫荧光染色。高倍放大。

应、细胞对化学刺激的反应、硫化化合物代谢过程等;在分子功能分组中,谷胱甘肽结合、寡肽结合是差异表达基因显著富集的类型;在细胞组分分类上,差异表达基因主要富集在细胞质、内质网与微粒体。



注:LPS为脂多糖,TJ5为髓样分化因子88抑制剂TJ-M2010-5,IL-6为白细胞介素-6,ZO-1为紧密连接蛋白;与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与LPS组比较,^b $P<0.05$ 。

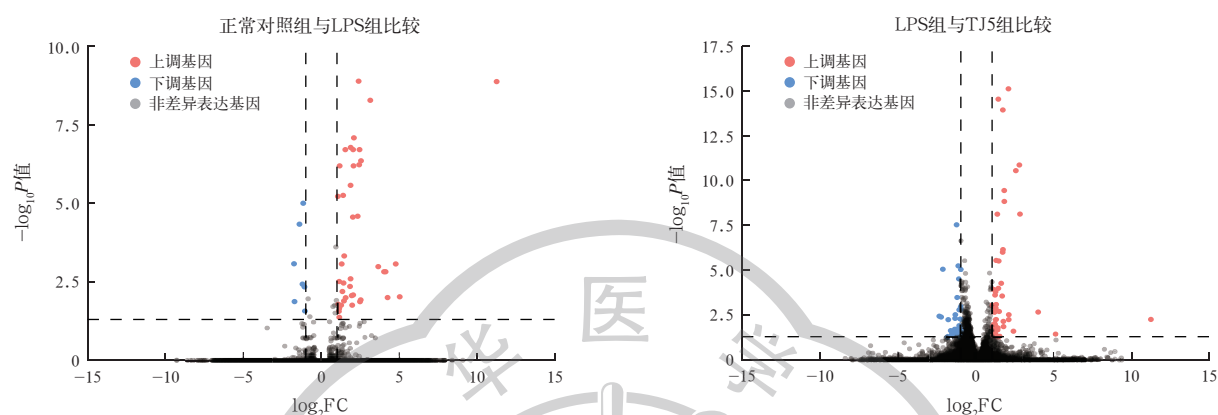
图3 各组小鼠小肠类器官IL-6和ZO-1的mRNA表达比较

表1 小鼠小肠类器官 RNA 转录组测序数据质量统计						
组别	样本	Raw reads (bp)	Clean reads (bp)	Clean reads% (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
正常对照组	1	40 288 808	40 207 894	99.80	98.52	95.81
	2	36 644 700	36 562 226	99.77	98.93	96.77
	3	47 500 268	47 396 392	99.78	98.96	96.86
	4	46 129 422	46 038 632	99.80	99.00	96.97
	5	48 156 288	48 056 622	99.79	98.91	96.69
LPS 组	1	51 902 872	51 787 418	99.78	98.95	96.83
	2	40 776 180	40 691 802	99.79	98.94	96.78
	3	39 129 084	39 043 554	99.78	98.96	96.85
	4	41 935 432	41 852 058	99.80	98.99	96.96
	5	39 702 606	39 625 190	99.81	98.97	96.85
TJ5 组	1	38 111 938	38 031 968	99.79	98.95	96.84
	2	38 492 412	38 419 304	99.81	98.93	96.73
	3	41 967 630	41 888 080	99.81	98.97	96.86
	4	42 213 664	42 099 634	99.73	98.53	95.88
	5	37 739 516	37 629 374	99.71	98.88	96.59

注:LPS为脂多糖,TJ5为髓样分化因子88抑制剂TJ-M2010-5,Raw reads为原始序列,Clean reads为去掉接头及低质量片段的序列,Clean reads(%)为Clean reads与Raw reads比值,Q20、Q30分别为质量 ≥ 20 和质量 ≥ 30 的碱基与高质量片段碱基的比值。

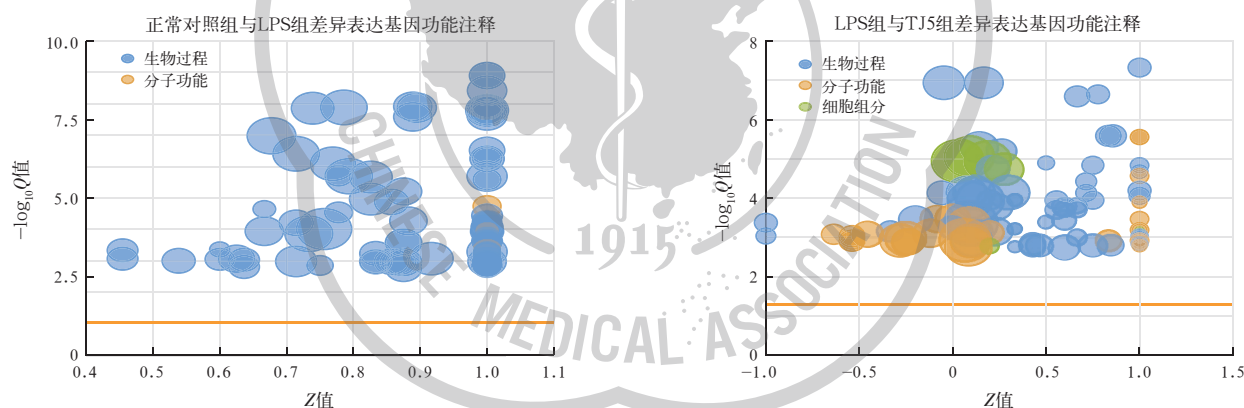
2.7 KEGG 通路显著富集分析(图 6):对筛选出的差异表达基因进行 KEGG 通路显著富集分析,结果显示,正常对照组与 LPS 组差异表达基因显著富集的信号通路主要包括 IL-17 及肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)信号通路、病毒与细胞因子及其

受体反应信号通路、细胞因子及其受体作用信号通路等;LPS 组与 TJ5 组差异表达基因显著富集的信号通路主要包括流体剪切应力与动脉粥样硬化信号通路、铁死亡信号通路、谷胱甘肽代谢信号通路、细胞色素 P450 药物代谢信号通路等。



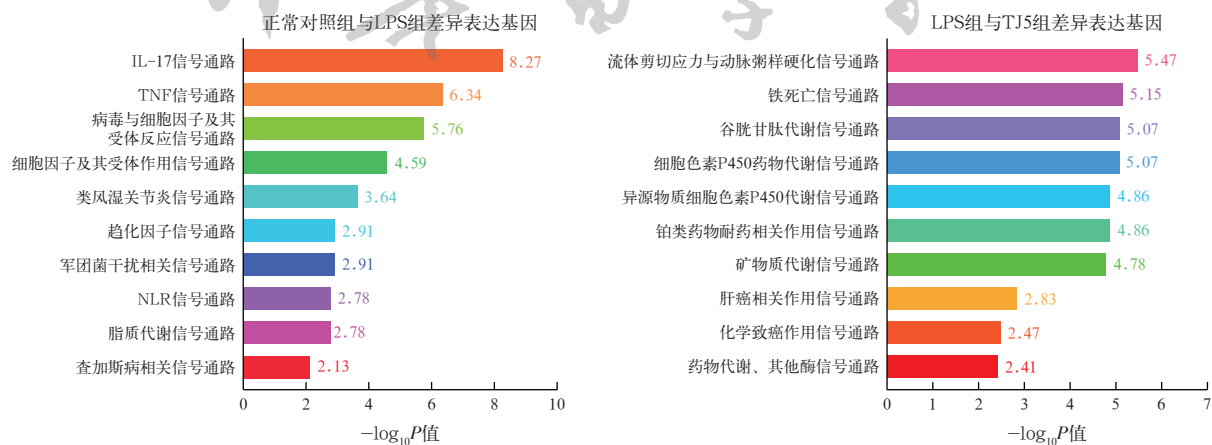
注: LPS 为脂多糖, TJ5 为髓样分化因子 88 抑制剂 TJ-M2010-5, FC 为差异倍数

图 4 各组小鼠小肠类器官差异表达基因火山图



注: LPS 为脂多糖, TJ5 为髓样分化因子 88 抑制剂 TJ-M2010-5, GO 为基因本体; Q 值为校正 P 值, Z 值为上调差异表达基因数和下调差异表达基因数的差值与总差异表达基因数的比值

图 5 各组小鼠小肠类器官差异表达基因的 GO 显著富集分析气泡图



注: LPS 为脂多糖, TJ5 为髓样分化因子 88 抑制剂 TJ-M2010-5, KEGG 为京都基因与基因组百科全书数据库, IL-17 为白细胞介素-17, TNF 为肿瘤坏死因子, NLR 为细胞内模式识别受体

图 6 各组小鼠小肠类器官差异表达基因的 KEGG 通路显著富集分析

表 2 各组小鼠小肠类器官差异表达基因 GO 显著富集分析获得的前 20 个功能注释

正常对照组与 LPS 组 差异表达基因功能注释	LPS 组与 TJ5 组 差异表达基因功能注释
细菌 LPS 代谢过程	谷胱甘肽代谢过程
细菌分泌的各种分子 及细菌整体代谢过程	应激反应过程
细菌的作用过程	化学刺激对细胞的作用过程
LPS 对细胞的作用过程	化学物质代谢过程
细胞与细胞因子的作用过程	有毒物质的代谢过程
细菌分泌的各种因子的代谢过程	应激防御反应过程
外源性刺激的作用过程	含硫化合物代谢过程
脂质代谢过程	谷胱甘肽结合过程
含氧化合物代谢过程	寡肽结合过程
外源性生物体的作用	有机物代谢过程
病原体的作用过程	有机环状化合物的代谢过程
防御反应	细胞质
细胞对生物刺激的反应	细胞质部分
生物体对生物的刺激反应	细胞内内质网、微粒体部分
细胞因子的作用过程	细胞内部分
生物质量的调节过程	无机化合物代谢过程
炎症防御反应	金属离子结合
有机酸代谢过程	异源性生物分解代谢过程
肿瘤坏死因子的代谢过程	应激防御反应
细胞脂质代谢过程	细胞溶质

注:LPS 为脂多糖,TJ5 为髓样分化因子 88 抑制剂 TJ-M2010-5; 粉色代表生物过程,黄色代表分子功能,绿色代表细胞组分

3 讨论

目前,脓毒症仍是全球性医学难题,而脓毒症患者的肠道极易损伤,常并发肠道黏膜屏障破坏、通透性增加、肠道菌群移位,诱发或加重全身炎症反应,进一步发展为多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),互为因果,陷入恶性循环^[10-12]。TLR/MyD88 信号通路可参与调控肠道菌群与宿主间相互作用,肠道细菌及其产物(如内毒素等)可激活 TLR,进而通过 MyD88 介导下游信号转导,激活核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)等转录因子, NF- κ B 入核后启动一系列促炎细胞因子(如 TNF- α 、IL-6 等)基因转录,导致炎症反应过度激活及紧密连接蛋白(如 ZO-1 等)表达下调或分布异常,使肠道屏障功能受损,细菌及内毒素移位,形成恶性循环,加速脓毒症的进展^[4-5]。

类器官是利用成体干细胞在体外构建的与体内器官高度相似的 3D 细胞结构,相较于传统的 2D 细胞培养,在组织和分子水平上模拟了相应器官的生理和病理功能^[6]。RNA-Seq 技术通过对所有 mRNA 反转录生成的 cDNA 序列进行测序分析,可以完整快速获得细胞或组织内几乎全部的基因序列信息,并通过分析过滤筛选出差异表达基因,还可以对这

些差异表达基因进行预测及信号通路分析,探讨疾病发展经过及药物作用机制^[13]。基于此,本研究以转录组学为切入点,从类器官水平探讨脓毒症损伤小鼠小肠类器官的关键基因和信号通路,并探讨 TJ5 对脓毒症损伤小肠的干预机制,以期寻找预防及治疗靶点。

本研究中观察到了小鼠小肠类器官在体外培养过程中的生长形态变化。结果显示,类器官在培养 5~6 h 开始形成边界清楚的圆圈状结构,在随后几天内不断成熟,7 d 时形成了不规则的环状结构,管腔中间颜色变深,提示已形成成熟的类器官。传代后类器官的生长速度加快,可能是在传代培养过程中细胞被重新激活,处于更活跃的增殖阶段,1 d 时圆圈状结构开始增大,3 d 时类器官体积继续增大,管壁增厚,再次出现出芽趋势。表明小鼠小肠类器官在体外培养条件下具有良好的生长和增殖能力,且传代后能够维持其结构和功能的稳定性。对类器官进行免疫荧光表型鉴定发现,小鼠小肠类器官可表达 Ki-67、MUC-2、E-钙黏蛋白和 Lyz,提示小肠类器官可以保留肠道干细胞的增殖分化能力,具有小肠组织上皮的相同表型及基因型,同时发现与体内小肠组织相同的多细胞组成等形态特征^[14]。

本研究 RT-qPCR 结果显示, LPS 组小鼠小肠类器官 IL-6 mRNA 表达显著高于正常对照组,而 TJ5 组 IL-6 mRNA 表达显著低于 LPS 组。这可能是由于 LPS 通过激活 NF- κ B 等转录因子,促进了促炎细胞因子(如 TNF- α 、IL-6 等)的基因转录,从而引发炎症反应;而 TJ5 可能通过抑制 NF- κ B 等转录因子入核后启动的一系列促炎细胞因子(如 TNF- α 、IL-6 等)的基因转录,从而抑制了炎症反应过度激活。此外, LPS 组小鼠小肠类器官 ZO-1 mRNA 表达显著低于正常对照组,而 TJ5 组 ZO-1 mRNA 表达显著高于 LPS 组。这可能与 LPS 介导的炎症导致肠道屏障功能受损、紧密连接蛋白(如 ZO-1 等)表达下调或分布异常有关。表明脓毒症时产生的炎症介质不仅会破坏肠壁黏膜的完整性,还会导致肠壁黏膜超微结构(如紧密连接)发生改变及肠壁通透性改变,使得肠道菌群失调、移位;而 TJ5 可能通过抑制炎症反应的过度激活,减轻了肠道损伤程度,减少了肠道屏障完整性的破坏^[4-5]。

本研究中 RNA-Seq 分析发现,与正常对照组相比, LPS 组有 49 个差异表达基因,其中 42 个上调, 7 个下调;与 LPS 组相比,TJ5 组有 84 个差异表达基

因,其中 47 个上调,37 个下调。将这些差异表达基因进行 GO 显著富集分析显示,正常对照组与 LPS 组差异表达基因显著富集的生物过程主要包括细菌 LPS 代谢过程、细菌分泌的各种分子及细菌整体代谢过程、细菌与细胞因子及其受体作用过程、细胞因子与细胞因子作用过程、脂质代谢过程、含氧有机酸代谢过程等;LPS 组与 TJ5 组差异表达基因显著富集的生物过程包括谷胱甘肽代谢过程、应激反应、细胞对化学刺激的反应、硫化物代谢过程等,提示 TJ5 在小肠类器官中具有代谢调节作用。在分子功能分组中,谷胱甘肽结合、寡肽结合是差异表达基因显著富集的类型,表明 TJ5 在小肠类器官中参与了谷胱甘肽、寡肽相关的酶与蛋白质的结合过程;在细胞组分分类上,差异表达基因主要富集在细胞质、内质网与微粒体,提示 TJ5 在小肠类器官中明显参与了细胞大部分活动。KEGG 通路显著富集分析显示,正常对照组与 LPS 组差异表达基因显著富集在 IL-17 及 TNF 信号通路、病毒与细胞因子及其受体反应信号通路、细胞因子及其受体作用信号通路等。研究表明,肠道菌群失调可导致革兰阴性菌生成大量 LPS, LPS 可通过肠壁吸收入血,激活免疫应答,并激活 TLR4,开启下游信号转导通路,通过 MyD88 通路和 MyD88 依赖通路激活 NF- κ B 通路,使得各种炎症因子表达增加^[15]。LPS 组与 TJ5 组差异表达基因主要富集在流体剪切应力与动脉粥样硬化信号通路、铁死亡信号通路、谷胱甘肽代谢信号通路、细胞色素 P450 药物代谢信号通路等。溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7, member 11, SLC7A11) 是铁死亡信号通路中的一种主要蛋白,也是胱氨酸 / 谷氨酸的一种逆向转运蛋白,主要参与质膜上的氨基酸转运^[16]。已有研究表明,SLC7A11 表达下调能够抑制半胱氨酸代谢,导致胱氨酸水平下降和谷胱甘肽合成耗竭,间接抑制谷胱甘肽过氧化物酶 4 的活性,进而导致脂质过氧化物代谢异常,造成细胞发生铁死亡^[17]。这些结果表明, TJ5 能够调控脓毒症损伤小鼠小肠类器官基因表达,这些基因可能成为治疗脓毒症损伤肠道的关键靶点。

综上,本研究通过小鼠小肠类器官模型观察到 LPS 和 TJ5 对肠道屏障功能的影响。TJ5 可能通过调控脓毒症损伤小鼠小肠类器官基因表达及其相关信号通路(流体剪切应力与动脉粥样硬化、铁死亡、谷胱甘肽代谢、细胞色素 P450 药物代谢等)抑制炎症和调节代谢,减轻肠道受损,减少肠道屏障完整性的

破坏,发挥保护作用,这些基因及信号通路可能是治疗脓毒症损伤肠道的关键靶点。但本研究未通过相关信号通路进行验证,存在不足之处,后续还需对这些基因调控的通路和机制进一步开展研究验证。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 郭丽艳:研究构思,方案设计,小肠类器官的提取、培养,数据分析,论文初稿撰写等;薛娜:小肠类器官的功能鉴定,PCR 测定等;王晴、李元涛:小肠类器官的培养,炎症模型建立;滕洪云:课题设计及推进,数据分析;白丽丽:小肠类器官提取、培养、功能鉴定;魏凯:转录组测序、差异表达基因分析;冯庆国:研究构思,方案设计,研究指导,监督,论文初稿审阅、修改

参考文献

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. JAMA, 2016, 315 (8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [2] 中华医学会重症医学分会. 中国严重脓毒症 / 脓毒性休克治疗指南 (2014) [J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (6): 401-426. DOI: 10.3760/j.issn.2095-4352.2015.06.001.
- [3] Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways [J]. Semin Immunol, 2004, 16 (1): 3-9. DOI: 10.1016/j.smim.2003.10.003.
- [4] Lu Y, Li XR, Liu SS, et al. Toll-like receptors and inflammatory bowel disease [J]. Front Immunol, 2018, 9: 72. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00072.
- [5] Fukata M, Breglio K, Chen AL, et al. The myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is required for CD4⁺ T cell effector function in a murine model of inflammatory bowel disease [J]. J Immunol, 2008, 180 (3): 1886-1894. DOI: 10.4049/jimmunol.180.3.1886.
- [6] Serra D, Mayr U, Boni A, et al. Self-organization and symmetry breaking in intestinal organoid development [J]. Nature, 2019, 569 (7754): 66-72. DOI: 10.1038/s41586-019-1146-y.
- [7] Clevers H. Modeling development and disease with organoids [J]. Cell, 2016, 165 (7): 1586-1597. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.082.
- [8] Rahmani S, Breyner NM, Su HM, et al. Intestinal organoids: a new paradigm for engineering intestinal epithelium *in vitro* [J]. Biomaterials, 2019, 194: 195-214. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.12.006.
- [9] Sugimoto S, Sato T. Establishment of 3D intestinal organoid cultures from intestinal stem cells [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1612: 97-105. DOI: 10.1007/978-1-4939-7021-6_7.
- [10] 张笑婷, 纪文焘, 薄禄龙, 等. 脓毒症基础研究的进展及未来方向 [J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (8): 919-921. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210126-00132.
- [11] Vaishnavi C. Translocation of gut flora and its role in sepsis [J]. Indian J Med Microbiol, 2013, 31 (4): 334-342. DOI: 10.4103/0255-0857.118870.
- [12] 杨秀芬, 李栋梁, 周庆明. 脓毒症致肠功能衰竭研究进展 [J]. 河北医科大学学报, 2014, 35 (11): 1357-1360. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3205.2014.11.041.
- [13] 依米妮古丽·麦麦提, 麦麦提亚森·多力昆, 古丽那孜·别克达吾来提, 等. 胰岛素抵抗小鼠小肠类器官模型构建及黄诺玛昔对此模型肠黏膜屏障的保护作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2024, 38 (2): 105-112. DOI: 10.38667/j.issn.1000-3002.2024.02.004.
- [14] Hrdlickova R, Toloue M, Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2017, 8 (1): 10.1002/wrna.1364. DOI: 10.1002/wrna.1364.
- [15] Dolinay T, Kim YS, Howrylak J, et al. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 185 (11): 1225-1234. DOI: 10.1164/rccm.201201-0003OC.
- [16] Jyotsana N, Ta KT, DelGiorno KE. The role of cystine/glutamate antiporter SLC7A11/xCT in the pathophysiology of cancer [J]. Front Oncol, 2022, 12: 858462. DOI: 10.3389/fonc.2022.858462.
- [17] Koppula P, Zhuang L, Gan BY. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy [J]. Protein Cell, 2021, 12 (8): 599-620. DOI: 10.1007/s13238-020-00789-5.

(收稿日期: 2025-03-24)
(本文编辑: 孙茜 马英)