

网络出版时间: 2025-06-30 13:11:20 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250630.0856.004>

25-羟基胆固醇参与小鼠炎症性肠病的机制

李雨桐^{1,2,3}, 罗小琦^{1,2,3}, 谭后发⁴, 陈明杰^{1,2,3}, 吴长有⁵, 沈娟^{1,2,3}(¹ 广州医科大学金域检验学院, 广州 511436; ² 广州传染病临床快速诊断与预警重点实验室, 广州 511436; ³ 广东省感染性疾病智能化诊断工程技术研究中心, 广州 511436;⁴ 赣州市第三人民医院检验科, 赣州 341000; ⁵ 中山大学中山医学院免疫学研究所, 广州 511400)

摘要 目的 探讨 25-羟基胆固醇(25-HC) 在小鼠炎症性肠病(IBD) 发生发展中的作用及其机制。方法 全部小鼠分为三组: 对照组正常喂养; DSS 组用 2.5% 葡聚糖硫酸钠(DSS) 溶液喂养; DSS + 25-HC 组用 2.5% DSS 溶液喂养, 且腹腔注射 25-HC 溶液。通过评估小鼠的疾病活动指数判断小鼠的症状变化, 通过组织学评分判断小鼠的组织改变并利用 Western blot、qRT-PCR、免疫组化、流式细胞术等检测小鼠白细胞介素-17(IL-17) 的表达情况及信号通路, 并结合小鼠肠上皮紧密连接蛋白的检测, 探究 25-HC 影响小鼠 IBD 的机制。结果 与 DSS 组比较, DSS + 25-HC 组小鼠体质量减轻($F = 30.1, P < 0.0001$), 结肠缩短($F = 63.8, P < 0.05$), 疾病活动指数($F = 774.5, P < 0.0001$) 和组织病理学评分升高($F = 141.5, P < 0.05$), 紧密连接相关蛋白(ZO-2、Occludin、JAM 和 Claudin-4) 表达显著降低, IL-17 水平显著降低, 且表达水平与紧密连接蛋白呈正相关。结论 25-HC 通过 ROR γ t 通路抑制结肠 $\gamma\delta$ T 细胞 IL-17 的产生, 加重黏膜损伤, 促进小鼠 IBD 发展。

关键词 白细胞介素-17; 25-羟基胆固醇; 炎症性肠病; ROR γ t; $\gamma\delta$ T 细胞; 黏膜损伤

中图分类号 R 392.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)07-1204-09

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.07.006

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD) 是一组慢性非特异性且无法治愈的胃肠道疾病, 主要包括溃疡性结肠炎和克罗恩病两大类。目前对 IBD 的病因及其发病机制研究尚不明确, 但普遍认为这是由于遗传和环境因素、免疫调节功能障碍和肠道微生物群之间极其复杂的相互作用引起的^[1]。中国 IBD 的发病率表现出强劲上升趋势及地缘聚集特点, 至 2025 年, 预计 IBD 患者将达到 150 万例^[2]。

胆固醇是哺乳动物细胞膜的关键组成成分, 在免疫系统中发挥着广泛作用^[3]。研究^[4]表明, 高胆固醇饮食能直接诱发急性 IBD, 而降胆固醇药物如他汀类药物能降低结直肠癌的风险及病死率, 且具有良好的疗效。白细胞介素(interleukin, IL) -17 作为一类重要的炎症介质, 具有广泛的生理学功能。多项研究^[5-7]显示, 肠炎患者肠道中 Th17/Treg 细胞比例出现严重失衡, 且与肠道组织 $\gamma\delta$ T 细胞密切相关。该研究旨在探讨 25-羟基胆固醇(25-hydroxy-

cholesterol, 25-HC) 对 IBD 小鼠的疾病影响以及对肠道组织 $\gamma\delta$ T 细胞 IL-17 产生的影响及其机制, 从而把握风险因素, 为 IBD 的预防和治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS) (货号: DR0597, 华中海威基因科技有限公司), 25-HC、离子霉素、佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、布雷菲德菌素 A、聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)、Triton X-100(货号: 700019P-40MG、56092-81-0、16561-29-8、20350-45-6、IPVH00010、9036-49-5, 美国 Sigma 公司), 小鼠 IL-17、IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 的酶联免疫分析(enzyme-linked immunoassay, ELISA) 试剂盒(货号: 88-7371-88、88-7013A-88、88-7064-88、BMS607-3, 美国 Invitrogen 公司), 逆转录酶(货号: RR047A, 日本 TaKaRa 公司), 2 $\times$ SYBR Green qPCR Master Mix(货号: G3324-45, 武汉塞维尔生物科技有限公司), 兔抗鼠 IL-17 抗体(货号: ab79056, 英国 Abcam 公司), PE 抗小鼠 IL-17(货号: 12-7177-81, 美国 eBioscience 公司), eFlourTM450 抗小鼠 CD3e、PE 抗小鼠 ROR γ t (货号: 48-0031-82、12-6181-82, 美国 Invitrogen 公

2025-03-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82001747); 广东省基础与应用基础研究基金(编号: 2020A15110562)

作者简介: 李雨桐, 女, 硕士研究生;

沈娟, 女, 副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: shenjuan_lenny@163.com

司), FITC 抗小鼠 $\gamma\delta T$ (货号: 553177, 美国 BD Bioscience 公司)。显微镜奥林巴斯(型号: BX53, 日本 Olympus Corporation 公司), 流式细胞仪(型号: Cyt-oFLEX, 美国 Beckman Coulter 公司)。PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 IBD 小鼠模型的建立 雌性 C57BL/6 小鼠(6~8 周) 购自广东省医学动物实验中心。小鼠随机分为三组: 对照组、DSS 组和 DSS + 25-HC 组。对照组喂食正常水, DSS 组和 DSS + 25-HC 组第 1~6 天喂食 2.5% 的 DSS 溶液, 第 7~9 天改喂正常水。自第 1 天起, DSS + 25-HC 组小鼠每隔 1 d 腹腔注射 1 次 25-HC (1 mg/kg), 其他两组注射等量 0.9% 氯化钠溶液。动物实验已获得广州医科大学动物伦理委员会批准(批准号: SL2020-170)。

1.3 疾病活动指数(disease activity index, DAI) 评估 小鼠的 DAI 参考评分标准^[8], 由体质量下降评分、粪便稠度评分和隐血评分的总和得出, 见表 1。

表 1 DAI 评分标准

Tab. 1 Scoring criteria for disease activity index

Score	Weight loss	Stool consistency	Occult blood
0	<0%	Normal	-
1	0% ~ <5%	Soft stool	+
2	5% ~ <10%	Viscous	++
3	10% ~ <20%	Loose	+++
4	20% ~ <50%	Diarrhea	Massive bleeding

1.4 组织学评估 采用四分法进行评价^[8], 组织学评分为炎症浸润、溃疡数量和上皮细胞的变化 3 项评分之和, 见表 2。

表 2 组织学评估标准

Tab. 2 Histological evaluation criteria

Score	Ulcer	Infiltration	Changes in epithelial cells
0	None	None	Normal
1	One	Pericrypt	Goblet cell loss
2	Two	Mucosal muscularis	Massive goblet cell loss
3	Three	Mucosal muscularis infiltration and thickening	Crypt loss
4	More than three	Submucosa	A large area of crypt loss/Polypoid regeneration

1.5 qRT-PCR 使用 Trizol 试剂从组织样本中获得总 RNA, 检测 RNA 浓度, 构建反转录系统, 合成第一链 cDNA。根据生产商的指示配制反应体系进行扩增。反应条件为 95 ℃、30 s, 95 ℃、15 s, 55 ℃、

10 s, 72 ℃、30 s, 共 40 个循环。扩增过程中使用的引物见表 3。

表 3 实时定量聚合酶链反应的引物序列

Tab. 3 Primer sequences for real-time quantitative

polymerase chain reaction

Name	Sequences (5'-3')
IL-17	F: GTCAATGCCGAGGGAAAG R: CACGAAGCAGTTTGGGAC
ROR γ t	F: GATCTAAGGGCTGAGGCACC R: GCCAACTTGACAGCATCTCG
RUNX1	F: CCTGGCAGTGTCAGAAGTGT R: CTCGTGCTGGCATCTCTCAT
IRF4	F: TCCCATTTGAGCCAAGCATAA R: ACCAAAGCACAGACTCACCT
GAPDH	F: AACGGGAAGCCCATCACC R: CAGCCTTGGCAGCACCAG
Claudin-4	F: AAGGTGTACGACTCGCTGCT R: GGGTTGTAGAAGTCCCGGAT
ZO-2	F: GTTTGCCGTTACAGAGCTTAG R: CTTCAAACCTCGGTCGTCAT
JAM	F: TCTCTTCACGTCTATGATCCTGG R: TTTGATGGACTCGTTCTCGGG
Occludin	F: TGAAAGTCCACCTCCTTACAGA R: CCGGATAAAAAGACTACGCTGG

1.6 免疫组化与荧光染色 石蜡组织切片脱蜡后放入枸橼酸钠抗原修复液中进行抗原修复处理, 用 1% Triton X-100 室温破膜, 然后脱氧和封闭。4 ℃ 孵育相应一抗过夜。清洗后滴加二抗室温孵育 1 h, 进行染色后封片, 在显微镜下观察并拍摄图像。

1.7 ELISA 实验 分离的细胞经 PMA 和离子霉素刺激培养 48 h 后收集上清液。使用 ELISA 试剂盒, 根据说明进行包板、洗涤、孵育、显色等步骤, 用酶标仪检测血清或细胞上清液中的 IL-17、IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平。

1.8 Western blot 实验 用 RIPA 提取组织蛋白, 用 BCA 蛋白检测试剂盒检测样品中的蛋白质含量。制备 12% SDS-PAGE 凝胶用于样品蛋白质分离。剥离凝胶, 将蛋白质转移到 PVDF 膜上。室温下封闭 1 h, 洗涤后与 GAPDH、IL-17、Claudin-4 和 Phospho-Claudin-4 抗体孵育过夜。清洗后, 第二抗体孵育 1 h。在黑暗中显影和拍照。使用 ImageJ 软件分析图像。

1.9 流式细胞术 用 PMA、离子霉素和布雷菲德菌素 A 在 5% CO₂ 培养箱中处理分离的细胞 5 h。对细胞表面抗原进行染色完成后进行破膜过夜, 而后对细胞内因子和转录因子进行染色。使用 CytExpert 和 FlowJo 软件进行分析。

1.10 统计学处理 采用 Graphpad Prism 9.0 软件进行统计分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异采用 t 检验,多组间差异采用单因素方差分析,相关性分析采用一元线性回归。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 25-HC 影响 DSS 诱导的小鼠急性结肠炎的发生发展 与 DSS 组比较,DSS + 25-HC 组小鼠体质量显著降低($F = 30.1, P < 0.0001$,图 1A),DAI 指数显著升高($F = 774.5, P < 0.0001$,图 1B)。对比各组小鼠结肠长度,结果显示 DSS + 25-HC 组小鼠的结肠长度相较于对照组($P < 0.0001$) 和 DSS 组($P < 0.05$) 均显著缩短($F = 63.8$),差异有统计学意义(图 1C、1D)。HE 染色观察小鼠结肠发现,与 DSS 组比较,DSS + 25-HC 组小鼠的结肠黏膜肌层浸润变薄、隐窝大面积消失,组织学病理评分升高($F = 141.5, P < 0.05$),组织损伤严重(图 1E、1F)。

2.2 25-HC 体内调节小鼠肠道组织 IL-17 的表达

Western blot 结果显示,DSS + 25-HC 组小鼠结肠组织 IL-17 的水平显著低于 DSS 组,提示 25-HC 抑制肠道组织中 IL-17 的蛋白表达水平(图 2A、2B)。分离获得小鼠肠道黏膜固有层淋巴细胞(lamina propria lymphocytes, LPL) 和肠系膜淋巴结(mesenteric lymph node cells, MLN) 细胞,在 α -CD3 和 α -CD28 作用下分别培养 48 h 后,利用 ELISA 检测上清液中 IL-17 的产生情况。结果显示,MLN 和 LPL 中,DSS + 25-HC 组肠道相关淋巴细胞产生的 IL-17

水平皆明显低于 DSS 组($F = 1516.0, 461.7$,均 $P < 0.0001$,图 2C、2D)。同时,用 ELISA 检测各组血清中 IL-17、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的表达,结果发现,与 DSS 组比较,DSS + 25-HC 组小鼠血清中 IL-17 的水平明显降低($F = 120.9, P < 0.001$),TNF- α 略有升高($F = 98.4, P < 0.05$),IL-6 和 IL-1 β 水平无显著差异(图 2E)。通过对结肠组织的石蜡切片进行免疫组化和免疫荧光染色观察,同样证实与 DSS 组比较,25-HC 显著抑制了小鼠结肠组织 IL-17 的表达水平,尤其是 CD3 $^{+}$ T 细胞中 IL-17 的水平(图 2F、2G)。

2.3 25-HC 调节肠组织定居 $\gamma\delta$ T 细胞产生 IL-17

$\gamma\delta$ T 细胞作为 IL-17 的重要来源,在免疫反应的早期阶段发挥重要作用。流式分析结果显示,LPL 和 MLN 中的 $\gamma\delta$ T 细胞高表达 CD44 记忆分子,进一步分析发现,所有 $\gamma\delta$ T 细胞均表达组织定居分子标记 CD69,近一半细胞表达 CD103,提示小鼠肠道 $\gamma\delta$ T 细胞主要为组织定居 $\gamma\delta$ T 细胞(图 3A)。分离对照组、DSS 组和 DSS + 25-HC 组的 MLN 和 LPL 细胞,PMA 联合离子霉素体外刺激后,利用流式检测各组 $\gamma\delta$ T 细胞 IL-17 的表达情况,结果显示:与对照组比较,DSS 组的 MLN 和 LPL 中 $\gamma\delta$ T 细胞表达高水平 IL-17,而 DSS + 25-HC 组显著抑制了小鼠肠道 $\gamma\delta$ T 细胞产生 IL-17($F = 8.2, 10.9$,均 $P < 0.05$,图 3B)。qPCR 结果同样证实 25-HC 也可在 mRNA 分子水平抑制 MLN 和 LPL 中 IL-17 的表达($F = 21.8, 7.3$,均 $P < 0.05$,图 3C)。

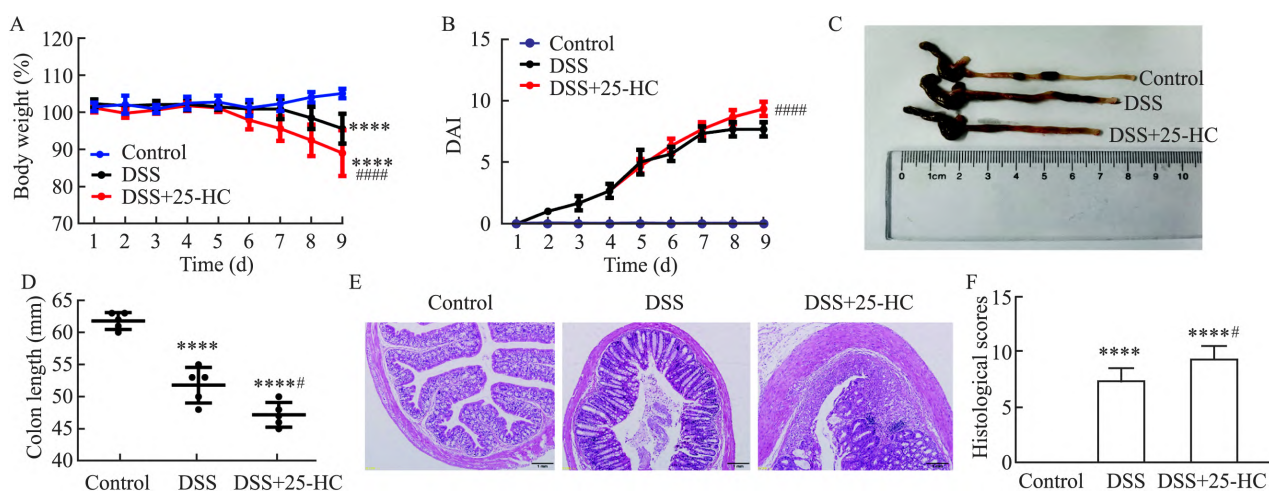


图 1 25-HC 影响 DSS 诱导的小鼠结肠炎发生发展

Fig. 1 The effect of 25-HC on the occurrence and development of DSS-induced colitis in mice

A: Daily body weight changes of mice; B: Daily DAI changes of mice; C: Comparison of colon lengths of mice; D: Statistical chart of colon lengths of mice; E: Representative images of HE staining of colon tissues $\times 100$; F: Comparison of histopathological scores of colon tissues in each group; *** $P < 0.0001$ vs Control group; # $P < 0.05$, #### $P < 0.0001$ vs DSS group.

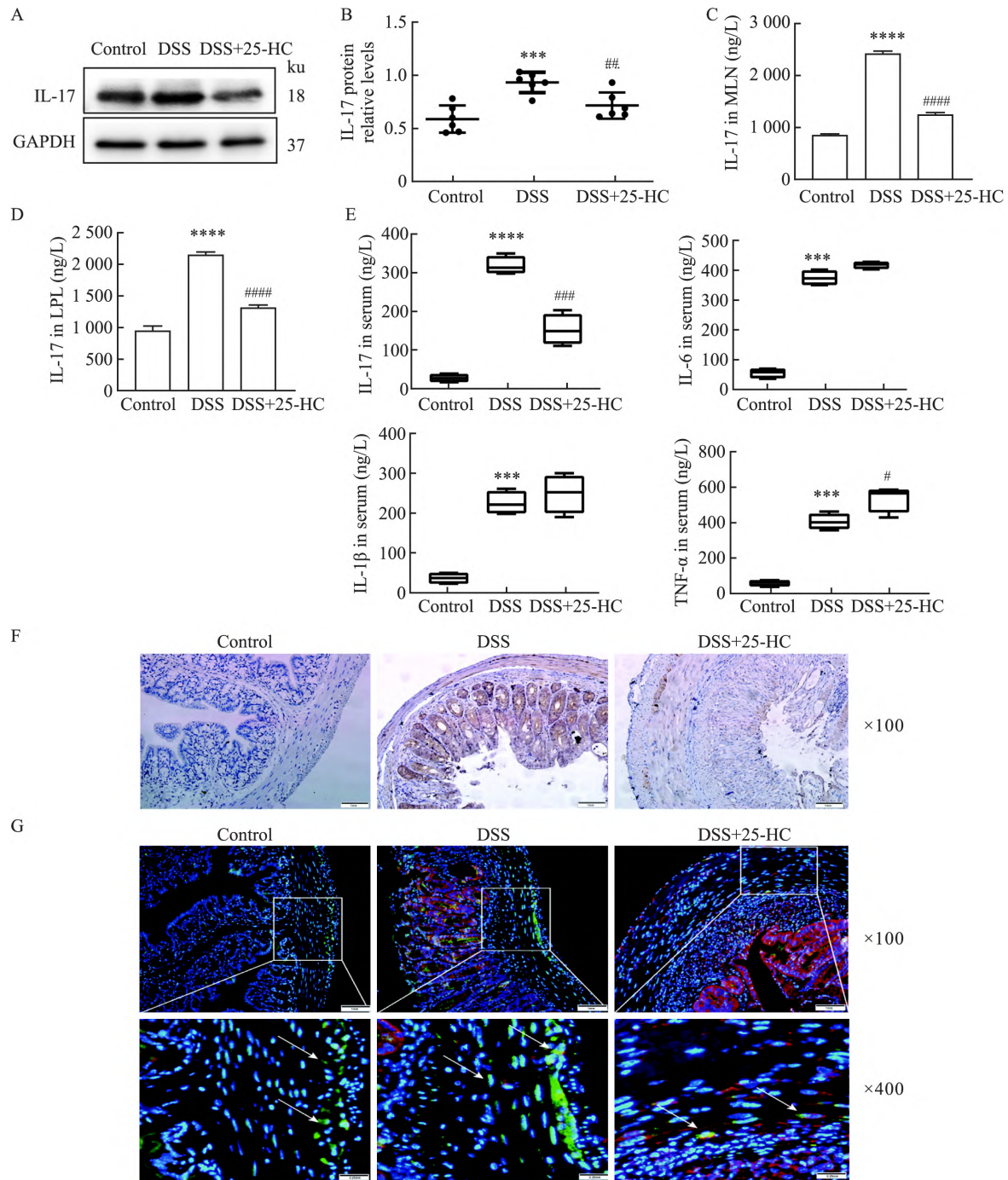


图2 25-HC 调节抑制小鼠肠道组织 IL-17 的表达

Fig. 2 25-HC regulated the expression of IL-17 in the intestinal tissues of mice *in vivo*

A: Representative diagram of IL-17 expression in intestinal tissues detected by Western blot; B: Statistical graph of IL-17 expression in intestinal tissues detected by Western blot; C: Detection of IL-17 levels in the supernatant of mouse MLN cultures by ELISA; D: Detection of IL-17 levels in the supernatant of mouse LPL cultures by ELISA; E: Detection of the levels of IL-17, IL-6, IL-1 β and TNF- α in mouse serum by ELISA; F: Observation of IL-17 expression in mouse colon tissues by immunohistochemical staining, with a magnification of $\times 100$; G: Observation of the expression and distribution of CD3 and IL-17 in mouse colon tissues by immunofluorescence, blue fluorescence represents DAPI $^{+}$, green fluorescence represents IL-17 $^{+}$, and red fluorescence represents CD3 $^{+}$, the arrows indicate CD3 $^{+}$ IL-17 $^{+}$ cells in tissue sections of mice from different groups; *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs DSS group.

A

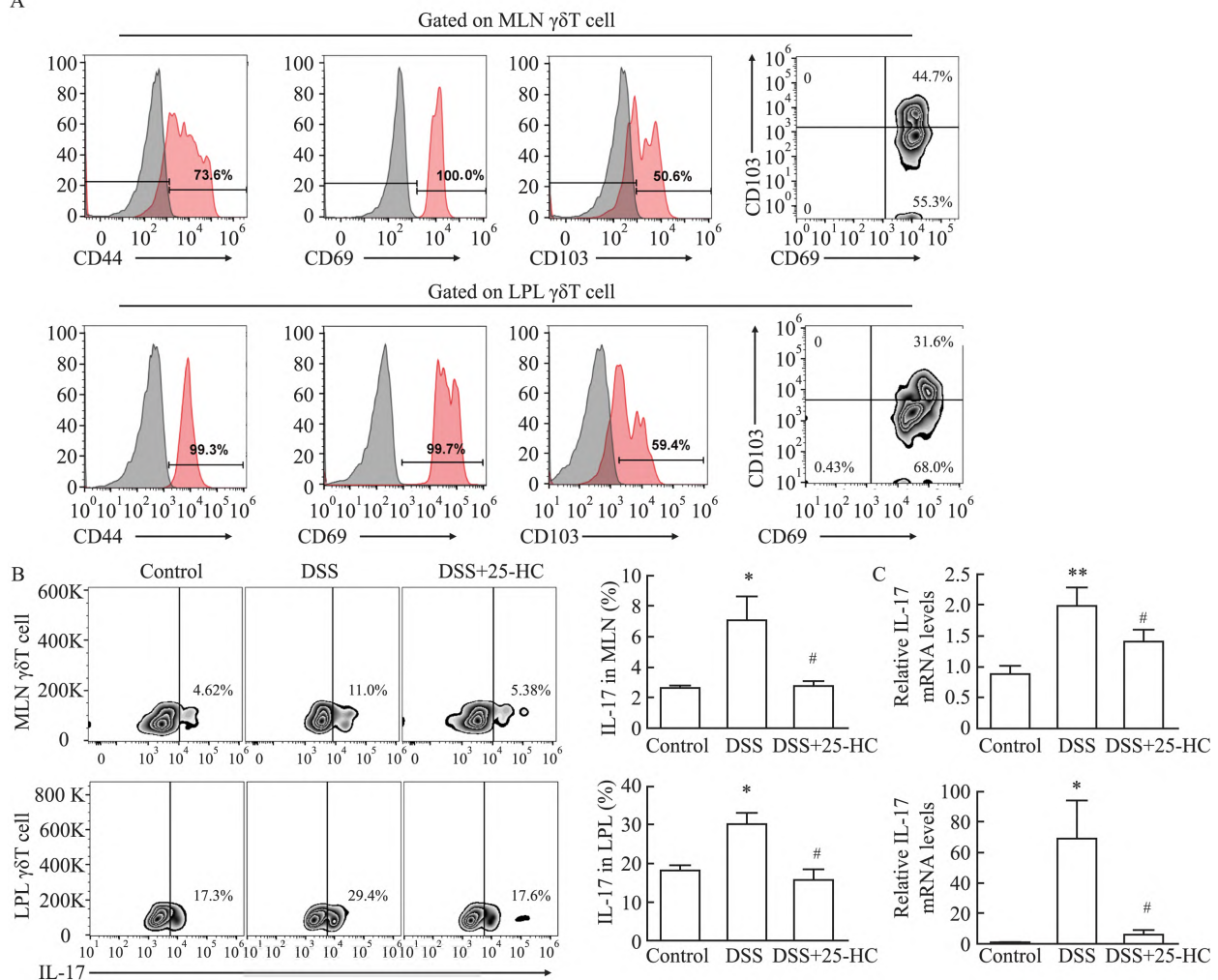


图3 25-HC 调节肠组织定居 γδT 细胞产生 IL-17

Fig. 3 25-HC Regulated the production of IL-17 by γδT cells residing in the intestinal tissue

A: Flow cytometry was used to detect the expression of CD69 and CD103 on γδT cells in MLN and LPL of mice; B: Flow cytometry was employed to examine the expression of IL-17 in γδT cells from MLN and LPL of mice in the control group, DSS model group, and DSS + 25-HC experimental group; C: qPCR was utilized to measure the expression of IL-17 mRNA in MLN (upper) and LPL (lower) of mice; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs DSS group.

2.4 25-HC 通过抑制 RORγt 信号通路抑制 γδT 细胞产生 IL-17 RORγt、RUNX1 和 IRF4 是控制 IL-17 产生的关键转录因子。为了进一步探究 25-HC 抑制 γδT 细胞产生 IL-17 的机制,分离获得 MLN 细胞,提取细胞总 RNA,利用 qRT-PCR 检测 IL-17 相关转录因子包括 RORγt、RUNX1 和 IRF4 的 mRNA 的表达。结果显示:与 DSS 组比较,25-HC 对转录因子 RORγt 的 mRNA 有明显的抑制作用 ($F = 34.4$, $P < 0.05$,图 4A),但对其他转录因子 RUNX1 和 IRF4 的作用并不明显 ($P > 0.05$,图 4A)。同时,检测肠道组织中 RORγt 的 mRNA 水平,发现其同样受到抑制 ($F = 9.8$, $P < 0.05$,图 4B)。进一步通过

流式细胞术检测发现,与 DSS 组比较,25-HC 主要抑制了 MLN 和肠道组织 γδT 细胞 RORγt 的表达 ($F = 31.2$, $P < 0.01$; $F = 5.6$, $P < 0.05$),见图 4C、4D。以上结果提示,25-HC 通过负调控 RORγt 的表达抑制了肠道 γδT 细胞 IL-17 的产生。

2.5 25-HC 影响肠上皮细胞间紧密连接相关蛋白的表达 肠道细胞间的紧密连接是肠道屏障功能的重要结构基础,在调节肠道通透性和维持上皮细胞屏障方面发挥着重要作用。病理结果显示,DSS + 25-HC 组小鼠结肠黏膜肌层浸润增厚,大量隐窝消失,肠屏障损伤加重(图 1E)。为进一步探究 25-HC 对肠紧密连接蛋白的影响,进一步分析肠紧密连接

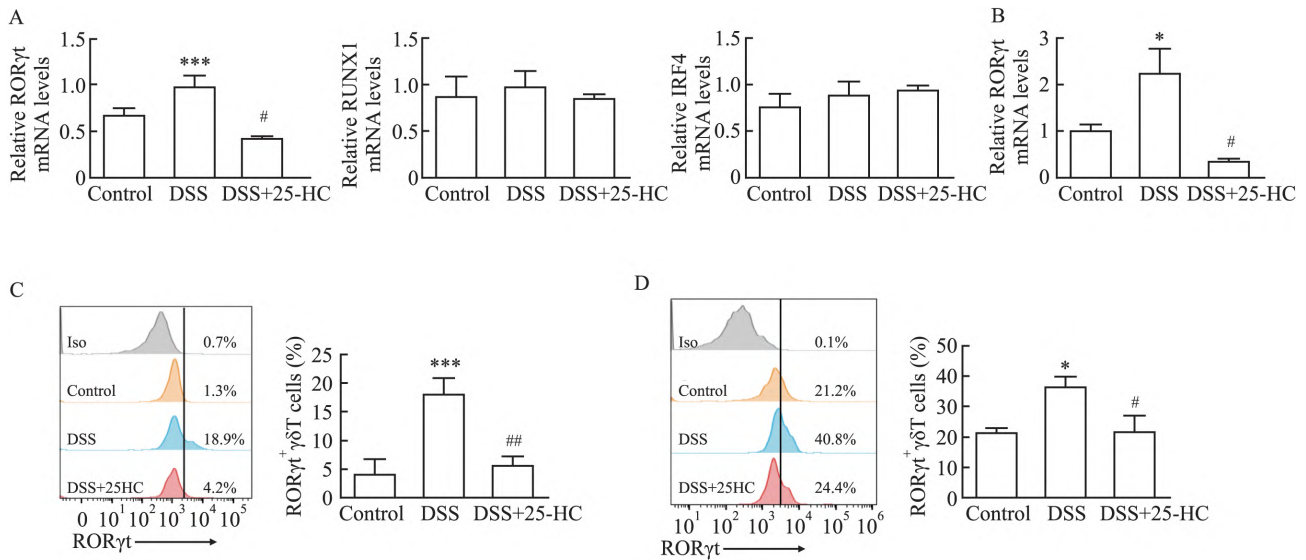


图4 25-HC 调节转录因子 RORγt 的表达

Fig. 4 25-HC regulated the expression of transcription factor RORγt

A: The expression of RORγt, RUNX1 and IRF4 mRNA in the MLN of mice was detected by qPCR; B: The expression of RORγt mRNA in the colon of mice was detected by qPCR; C: The expression of RORγt in γδT cells of the MLN of mice was detected by flow cytometry; D: The expression of RORγt in γδT cells of the colon tissue of mice was detected by flow cytometry; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs DSS group.

相关蛋白 (ZO-2、Occludin、JAM 和 Claudin-4) 的 mRNA 和蛋白水平的表达情况。结果显示: 与 DSS 组比较, 25-HC 显著抑制了 ZO-2 ($F = 21.7$, $P < 0.01$)、Occludin ($F = 26.9$, $P < 0.05$)、JAM ($F = 144.8$, $P < 0.01$) 和 Claudin-4 ($F = 22.2$, $P < 0.05$) 的 mRNA 的表达, 蛋白水平与之一致, 尤其 Claudin-4 的磷酸化表达水平明显下调 ($F = 57.2$, $P < 0.001$), 见图 5A-5C。IL-17 在维护肠道屏障完整性中发挥着重要作用, 尤其急性肠损伤中, 结肠组织中 γδT 细胞产生 IL-17 参与肠屏障保护。通过对 DSS 组和 DSS + 25HC 组中 IL-17 和紧密连接相关蛋白的相对表达进行相关性分析, 结果显示 IL-17 的表达与 ZO-2、Occludin、JAM 和 Claudin-4 的表达存在显著相关性, 且差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$, 图 5D)。25-HC 可能通过抑制肠组织定居记忆 γδT 细胞 IL-17 的表达, 加剧肠黏膜屏障损伤, 从而促进急性 IBD 的发展。

3 讨论

本研究中, 课题组以 DSS 诱导的小鼠 IBD 模型为对象, 旨在探究 IBD 与脂质代谢产物 25-HC 的关系。结果发现, 25-HC 能够通过抑制 IL-17 介导的炎症反应并破坏结肠屏障, 加重 IBD 的发生和发

展, 这种抑制通过 RORγt 信号通路产生。这阐明了机体内代谢过程与免疫调节有着密不可分的联系。

实际上, 代谢对免疫系统的调节作用已然获得广泛关注。本研究聚焦于炎症因子 IL-17, 通过观察小肠中产生 IL-17 的主要淋巴细胞——组织定居 γδT 细胞的增殖和分泌情况, 证实了 25-HC 对 γδT 细胞的显著抑制作用。与对照组比较, DSS + 25-HC 组小鼠结肠组织中 γδT 细胞比例和分泌活性明显降低, 这说明 25-HC 能够通过抑制炎症组织淋巴细胞的增殖及炎症因子的分泌来抑制免疫反应。

在 IL-17 的表达过程中, RORγt 的作用不容小觑。作为视黄酸相关孤儿受体家族转录因子, RORγt 在 Th17 细胞、γδT 细胞和先天淋巴细胞中皆有表达, 能够通过与 STAT3、IRF4 和 BATF 等合作, 促进 IL-17 的产生 [10-11]。本研究发现, 与 DSS 组比较, DSS + 25-HC 组小鼠 RORγt 表达显著降低, 证明了 25-HC 通过抑制 RORγt 通路负调控 IL-17 产生。

作为免疫系统的第一道防线, 肠道黏膜屏障保护肠道组织不受外界侵扰。其中紧密连接的肠黏膜上皮细胞是屏障的关键, 这些紧密连接与树突状细胞功能的发挥有关, 树突状细胞能够将树突插入到紧密连接从而捕获其中的抗原和细菌, 成为肠道免疫反应的重要一环。而紧密连接蛋白的破坏和结肠

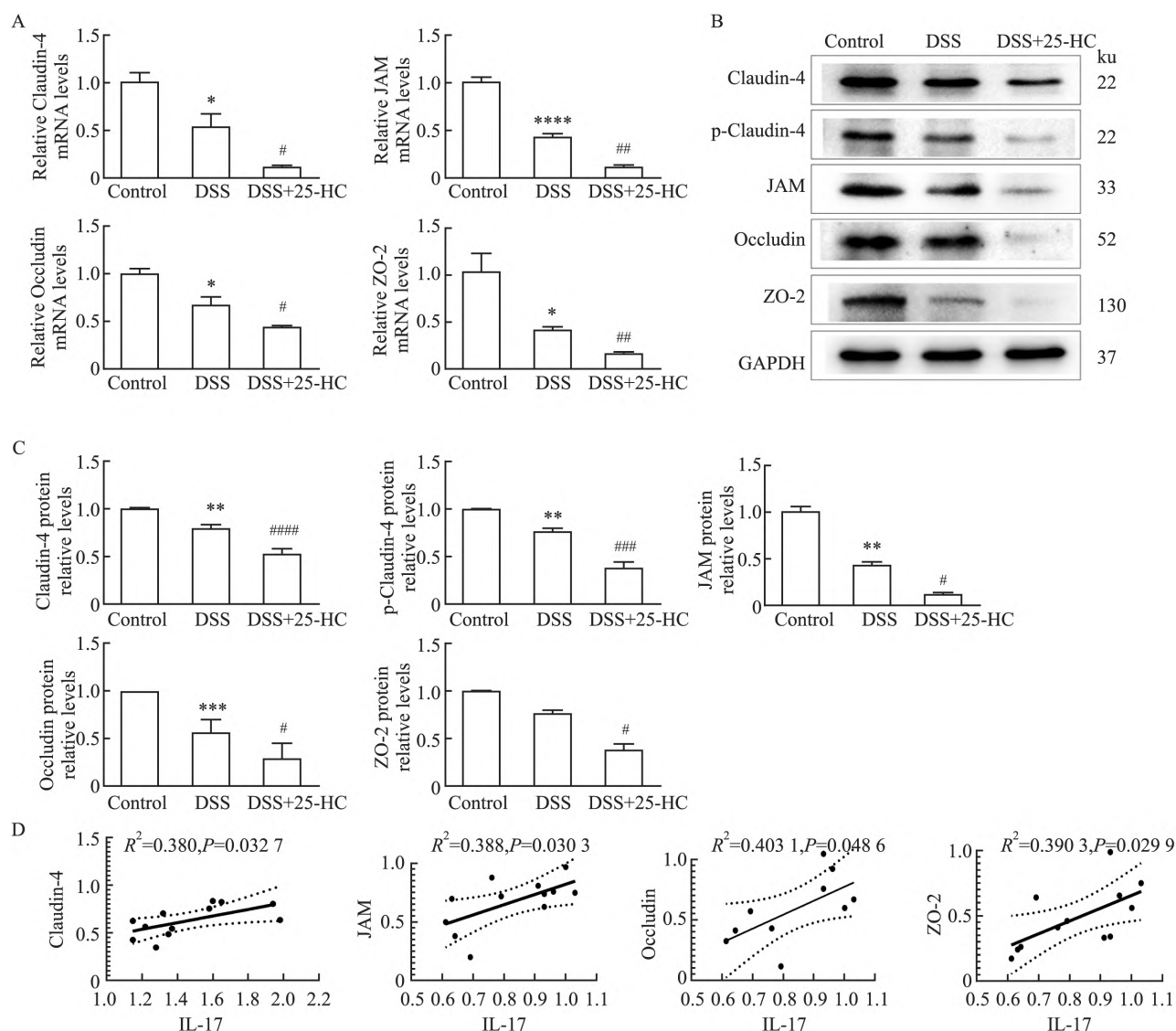


图5 25-HC影响肠上皮细胞间紧密连接相关蛋白的表达

Fig. 5 25-HC affected the expression of tight junction-related proteins in intestinal epithelial cells

A: The mRNA levels of Claudin-4, JAM, Occludin and ZO-2 in the colon of mice were detected by q-PCR; B: Representative graphs of the protein expression levels of Claudin-4, p-Claudin-4, JAM, Occludin and ZO-2 in the colon of mice detected by Western blot; C: Statistical analysis chart of protein expression levels detected by Western blot; D: Correlation analysis of the levels of tight junction proteins and the expression of IL-17; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs DSS group.

通透性的增加与 IBD 的发展息息相关,为进一步明确 25-HC 在 IBD 中的作用,本研究关注到作为机械屏障中的关键分子的紧密连接蛋白 Claudin-4、Occludin、ZO-2 以及连接附着分子 JAM1 的表达情况,结果显示这些紧密连接相关蛋白的表达在 DSS + 25-HC 组中被显著降低,这意味着 25-HC 虽然减轻了炎症反应,但加重了结肠的损害。为排除其他因素干扰,本研究直接对 IL-17 和紧密连接蛋白的表达做了相关性分析,结果也表明,这些紧密连接蛋白的损害的确与 IL-17 的降低有明显关联。

在过去,在自身免疫病和慢性炎症性疾病,尤其是肺病和皮肤病中,IL-17 更多被认为是作为促进疾病的参与者,介导组织炎症损伤^[12-13]。随着研究的深入,学者们也逐渐发现 IL-17 作用的多向性。在实验诱导的结肠炎症中,Huang et al^[14]发现,IL-17D 的缺乏影响小鼠三型先天性淋巴细胞产生 IL-22,进而减少 IL-22 依赖性抗菌肽的表达,加重 IBD 发展。本研究也发现 IL-17 的下调与紧密连接蛋白的损伤有着直接的关系,这也证实了 IL-17 通过多种途径在 IBD 中起保护作用,其作用的不同机制可能受到

免疫微环境的影响。

综上所述,本研究发现 25-HC 能够通过 ROR γ t 信号通路抑制 IL-17 介导的炎症反应,与此同时加重肠道屏障的损害,加速 IBD 的进程,进一步阐明了机体调节的整体性,说明了胆固醇代谢对免疫环境关键调节作用,有助于从源头上把握 IBD 的风险因素,为针对性预防和治疗提供新的思路。不仅如此,本研究还证明 IL-17 在 IBD 中并非是介导肠道损伤,而是起到了一定程度的保护作用,然其具体机制还需更多探索。

参考文献

- [1] Yan D, Ye S, He Y, et al. Fatty acids and lipid mediators in inflammatory bowel disease: from mechanism to treatment [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1286667. doi: 10.3389/fimmu.2023.1286667.
- [2] 李学锋, 彭 霞, 周明欢. 我国炎症性肠病流行病学研究进展 [J]. *现代消化及介入诊疗*, 2020, 25(9): 1265 - 7. doi: 10.3969/j.issn.1672-2159.2020.09.032.
- [3] Li X F, Peng X, Zhou M H. The progress of epidemiological studies on inflammatory bowel disease in China [J]. *Mod Dig Interv*, 2020, 25(9): 1265 - 7. doi: 10.3969/j.issn.1672-2159.2020.09.032.
- [4] Griffiths W J, Wang Y. Cholesterol metabolism: from lipidomics to immunology [J]. *J Lipid Res*, 2022, 63(2): 100165. doi: 10.1016/j.jlr.2021.100165.
- [5] Prohazky F, Sangha N J, Yoshida N, et al. Dietary cholesterol directly induces acute inflammasome-dependent intestinal inflammation [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5864. doi: 10.1038/ncomms5864.
- [6] Chen L, Ruan G, Cheng Y, et al. The role of Th17 cells in inflammatory bowel disease and the research progress [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1055914. doi: 10.3389/fimmu.2022.1055914.
- [7] Yan J B, Luo M M, Chen Z Y, et al. The function and role of the Th17/treg cell balance in inflammatory bowel disease [J]. *J Immunol Res*, 2020, 2020: 8813558. doi: 10.1155/2020/8813558.
- [8] Polese B, Thuraiajah B, Zhang H, et al. Prostaglandin E2 amplifies IL-17 production by $\gamma\delta$ T cells during barrier inflammation [J]. *Cell Rep*, 2021, 36(4): 109456. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109456.
- [9] Liu Y J, Tang B, Wang F C, et al. Parthenolide ameliorates colon inflammation through regulating Treg/Th17 balance in a gut microbiota-dependent manner [J]. *Theranostics*, 2020, 10(12): 5225 - 41. doi: 10.7150/thno.43716.
- [10] Neri B, Mossa M, Scucchi L, et al. Histological scores in inflammatory bowel disease [J]. *J Dig Dis*, 2021, 22(1): 9 - 22. doi: 10.1111/1751-2980.12937.
- [11] Kumar R, Theiss A L, Venuprasad K. ROR γ t protein modifications and IL-17-mediated inflammation [J]. *Trends Immunol*, 2021, 42(11): 1037 - 50. doi: 10.1016/j.it.2021.09.005.
- [12] Wang X, Han C, Yang D, et al. STAT3 and SOX-5 induce BRG1-mediated chromatin remodeling of RORCE2 in Th17 cells [J]. *Commun Biol*, 2024, 7(1): 10. doi: 10.1038/s42003-023-05735-9.
- [13] Fletcher J M, Moran B, Petrasca A, et al. IL-17 in inflammatory skin diseases psoriasis and hidradenitis suppurativa [J]. *Clin Exp Immunol*, 2020, 201(2): 121 - 34. doi: 10.1111/cei.13449.
- [14] Bianchi E, Rogge L. The IL-23/IL-17 pathway in human chronic inflammatory diseases -new insight from genetics and targeted therapies [J]. *Microbes Infect*, 2019, 21(5/6): 246 - 53. doi: 10.1016/j.micinf.2019.06.009.
- [15] Huang J, Lee H Y, Zhao X, et al. Interleukin-47D regulates group 3 innate lymphoid cell function through its receptor CD93 [J]. *Immunity*, 2021, 54(4): 673 - 86. doi: 10.1016/j.immuni.2021.03.018.

Research on the mechanism of 25 - hydroxycholesterol in inflammatory bowel disease in mice

Li Yutong^{1,2,3}, Luo Xiaoqi^{1,2,3}, Tan Qifa⁴, Chen Mingjie^{1,2,3}, Wu Changyou⁵, Shen Juan^{1,2,3}

(¹KingMed School of Laboratory Medicine, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436;

²Guangzhou Key Laboratory for Clinical Rapid Diagnosis and Early Warning of Infectious Diseases, Guangzhou 511436; ³Engineering Technology Research Center of Intelligent Diagnosis for Infectious Diseases in Guangdong Province, Guangzhou 511436; ⁴Dept of Laboratory Medicine, The Third People's Hospital of Ganzhou City, Ganzhou 341000; ⁵Institute of Immunology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 511400)

Abstract Objective To explore the role and mechanism of 25-hydroxycholesterol (25-HC) in inflammatory bowel disease (IBD) in mice. **Methods** All mice were divided into three groups: the control group was fed normally; the DSS model group was fed with 2. 5% dextran sulfate sodium (DSS) solution; the DSS + 25-HC experimental group was fed with 2. 5% DSS solution and the mice in the experimental group were intraperitoneally injected with

网络出版时间: 2025 - 06 - 30 13: 11: 25 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250630.0856.005>

丰富环境通过调节 NF- κ B/NLRP3 通路对孕期 OSAHS 小鼠认知功能损害和 GAP-43 含量变化的影响

程云舟¹, 厉雪艳², 张月明², 危如梦², 王 杨³(安徽医科大学附属巢湖医院¹ 儿科、² 睡眠障碍科, 合肥 238000;³ 安徽医科大学第一附属医院新生儿科, 合肥 230022)

摘要 目的 探讨丰富环境对孕期阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(OSAHS) 造成的小鼠认知功能损害和生长相关蛋白 43 (GAP-43) 含量变化的影响及其相关炎症通路机制。方法 实验组 C57BL/6J 小鼠孕第 15 天予以连续 7 d 间歇性缺氧环境, 对应子鼠分别在第 21 天至 2 月龄放于丰富环境中饲养(OSAHS + EE 组) 和正常环境中饲养(OSAHS 组)。对照组孕鼠置于正常氧气环境, 对应子鼠在相同月龄期放于丰富环境饲养(Control + EE) 和正常环境饲养(Control 组)。在小鼠 2 月龄用 Morris 水迷宫评估空间学习记忆能力, 用实时荧光定量 PCR 检测小鼠海马 NF- κ B、NLRP3 和 GAP-43 mRNA 水平, Western blot 检测海马 NLRP3 和 GAP-43 蛋白含量。结果 与 Control 组比较, OSAHS 组游泳路程增加($P < 0.01$), 记忆期靶象限游泳路程百分比降低($P < 0.01$); 海马 NF- κ B mRNA、NLRP3 mRNA 和蛋白含量升高, GAP-43 mRNA 和蛋白含量降低($P < 0.01$)。与 Control 组比较, OSAHS + EE 组游泳路程、游泳路程百分比、NF- κ B mRNA、NLRP3 mRNA 和蛋白含量无明显差异。结论 孕期 OSAHS 导致子代小鼠学习记忆能力受损和 GAP-43 蛋白水平降低, 其机制可能与 NF- κ B/NLRP3 水平升高有关, 而丰富环境可改善这种损害。

关键词 丰富环境; OSAHS; 认知损害; GAP-43; NF- κ B; NLRP3**中图分类号** R 741.02**文献标志码** A **文章编号** 1000 - 1492(2025) 07 - 1212 - 06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2025.07.007

2025 - 03 - 15 接收

基金项目: 安徽省高等学校科研计划项目(编号: 2022AH050759)**作者简介:** 程云舟, 男, 硕士研究生;

王 杨, 男, 主任医师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail:

w.yang126@126.com

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(obstructive sleep apnea hypopnea syndrome, OSAHS) 可导致夜间频繁低氧血症、高碳酸血症、睡眠结构紊乱^[1], 甚至可引起认知障碍、心血管疾病、代谢障碍等严重并发症^[2]。研究^[3]显示, OSAHS 引起的认知功能障碍可

25-HC. The symptom changes of the mice were evaluated by assessing the disease activity index(DAI) , and the tissue changes were judged by histological scoring. The expression of interleukin-17 and its signaling pathways in the mice were detected by Western blot, qRT-PCR, immunohistochemistry/fluorescence, and flow cytometry. Combined with the detection of tight junction proteins in the intestinal epithelium of the mice, the mechanism by which 25-HC affects IBD in mice was explored. **Results** In comparison to the DSS control group, The DSS + 25-HC experimental group mice exhibited a reduction in body weight($F = 30.1, P < 0.0001$), a shortened colon ($F = 63.8, P < 0.05$), and elevated DAI($F = 774.5, P < 0.0001$) and histopathological scores($F = 141.5, P < 0.05$). Additionally, the expression of tight junction-associated proteins(ZO-2, Occludin, JAM and Claudin-4) was found to be significantly reduced. The level of IL-17 significantly decreased, and its expression level was positively correlated with tight junction proteins. **Conclusion** 25-HC inhibited IL-17 production by colonic $\gamma\delta$ T cells through the ROR γ t pathway, aggravated mucosal injury, and promoted the development of DSS-induced acute colitis in mice.

Key words interleukin-17; 25-hydroxycholesterol; inflammatory bowel disease; ROR γ t; $\gamma\delta$ T cells; mucosal damage**Fund programs** National Natural Science Foundation of China (No. 82001747) ; Basic and Applied Basic Research Foundation of Guangdong Province (No. 2020A1515110562)**Corresponding author** Shen Juan, E-mail: shenjuan_lenny@163.com