DOI:10.16016/j.2097-0927.202307121

腺相关病毒过表达 IL22 可有效改善葡聚糖硫酸钠诱导的小鼠结肠炎

吴天宇[1],宋娅岚[1],吴静峰[1],郑植元[2],张 宁[2],周子默[2],唐 红[2],王锋超[2],陈文生[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学):第一附属医院消化内科[1],军事预防医学系复合伤研究所[2]

[**摘要**] **目的** 探讨白介素 22(IL22)在小鼠葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium salt, DSS)诱导的急性结肠炎中的作用及其机制。**方法** 选取 8 周龄雄性同窝 IL22 敲除小鼠($IL22^{-/-}$)及对照基因型小鼠($IL22^{+/+}$)各 3 只,给予 2 组小鼠 2.5%DSS 自由饮水 6 d、正常饮水 2 d 构建小鼠急性结肠炎模型,记录小鼠体质量变化及疾病活动指数(disease activity index,DAI),干预 8 d 后行小鼠肠道内窥镜检查,测量 2 组小鼠结肠长度以及主要免疫器官脏器指数,采用 Western blot 检测白介素 1α(IL1α)、白介素 1β(IL1β)、白介素 6(IL6)、肿瘤坏死因子 α(TNFα)等促炎细胞因子蛋白水平表达;选取 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠建立腺相关病毒(adeno-associated virus,AAV)转染模型,给予 DSS 诱导结肠炎模型,设置 PBS 组($n=5$)、AAV-mock+DSS 组($n=5$)、AAV-IL22+DSS 组($n=5$),采用免疫荧光检测各组结肠闭合小环蛋白 1(ZO-1)、钙粘附蛋白(E-claudin)表达,采用 Western blot 检测 IL22、闭合蛋白(Occludin)、信号传导及转录激活蛋白 3(Stat3)、p-Stat3 蛋白表达水平。**结果** 与 $IL22^{+/+}$组比较,$IL22^{-/-}$组小鼠在 DSS 诱导后第 8 天体质量显著降低($P<0.05$),DAI 评分($P<0.01$)和肠镜评分显著升高($P<0.05$),组织损伤加重,病理评分显著升高($P<0.01$),促炎细胞因子 IL1α、IL1β、cleaved-IL1β、IL6、TNFα 表达上调($P<0.05$)。与 AAV-mock+DSS 组相比,AAV-IL22+DSS 组可逆转 DSS 诱导结肠炎,结肠组织炎症水平显著降低($P<0.05$),免疫荧光结果示 E-claudin 表达显著升高($P<0.05$),Western blot 结果显示 Occludin、p-Stat3 表达水平显著增高($P<0.01$)。**结论** IL22 缺乏加重小鼠 DSS 诱导结肠炎,而通过 AAV 过表达 IL22 能增强结肠紧密连接蛋白表达,减少炎症浸润,缓解 DSS 肠炎,其机制可能与 Jak/Stat3 通路激活有关。

[**关键词**] 白细胞介素 22;腺相关病毒;炎症性肠病;葡聚糖硫酸钠;Jak/Stat3 通路
[**中图法分类号**] R-332; R574.62; R976 [**文献标志码**] A

Overexpression of IL22 by adeno-associated virus effectively ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice

WU Tianyu[1], SONG Yalan[1], WU Jingfeng[1], ZHENG Zhiyuan[2], ZHANG Ning[2], ZHOU Zimo[2], TANG Hong[2], WANG Fengchao[2], CHEN Wensheng[1] [1]Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, Faculty of Military Preventive Medicine; Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of interleukin22 (IL22) in acute colitis induced by dextran sulfate sodium salt (DSS) in mice and its underlying mechanism. **Methods** Three IL22 knockout mice ($IL22^{-/-}$) and 3 control mice ($IL22^{+/+}$) of 8-week-old males were subjected from the same litter, and then had free-choice drinking of 2.5% DSS water for 6 d followed by normal water for 2 d to construct a mouse model of acute colitis. The changes in body mass weight and disease activity index (DAI) were measured and

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81872556);陆军军医大学创新能力提升项目(2021XJS03);重庆市院士专项(基础研究与前沿探索类)(cstc2018jcyj-yszxX0004)

[**通信作者**] 陈文生,E-mail:wenshengchen@hotmail.com

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

calculated. After the intervention of 8 d, mouse enteroscopy was performed, and the length of colon and the organ index of major immune organs were measured in both groups. Protein levels of pro-inflammatory cytokines, such as IL1α, IL1β, IL6 and TNFα were detected by Western blotting. Adeno-associated virus (AAV) transfection model was established in 8-week-old male C57BL/6 mice, which were then treated by 2.5%DSS drinking. The mice were randomly divided into PBS group (n=5), AAV-mock+DSS group (n=5) and AAV-IL22+DSS group (n=5). The expression levels of colonic closed small loop protein 1 (ZO-1) and calcium adhesion protein (E-claudin) in different groups were detected by immunofluorescence assay. The protein levels of IL22, Occludin, Stat3 and p-Stat3 were detected by Western blotting. **Results** Compared with the $IL22^{+/+}$ group, the mice in the $IL22^{-/-}$ group had significantly decreased body weight on day 8 (P<0.05), obviously increased DAI score (P<0.01), endoscopy score (P<0.05) and pathological score (P<0.01) after DSS induction, and notable up-regulation of pro-inflammatory cytokines including IL1α, IL1β, cleaved-IL1β, IL6, and TNFα in the colon tissues (P<0.05). While AAV-IL22 transfection reversed DSS-induced colitis. Significantly reduced inflammation in colonic tissues (P<0.05), enhanced E-claudin expression (P<0.05) and up-regulation of p-Stat3 and Occludin (P<0.01) were observed in the AAV-IL22+DSS group than the AAV-mock+DSS group. **Conclusion** IL22 deficiency aggravates DSS-induced colitis in mice, and its overexpression by AAV-IL22 alleviates DSS enteritis by enhancing colonic tight junction proteins and reducing inflammatory infiltration, which may be related to the activation of Jak/Stat3 pathway.

[**Key words**] IL22; adeno-associated virus; inflammatory bowel disease; dextran sulfate sodium; Jak/Stat3 pathway

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81872556), the Project of Innovation Capacity Promotion of Army Medical University (2021XJS03), and the Chongqing Academician Program (Basic Research and Frontier Exploration, cstc2018jcyj-yszxX0004). Corresponding author: CHEN Wensheng, E-mail: wenshengchen@hotmail.com

炎症性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)是克罗恩病(Crohn's disease,CD)和溃疡性结肠炎(ulcer colitis,UC)的总称,该病具有慢性、复发性及难治性的特点,严重影响患者的生活质量,已成为世界性的健康挑战[1-2]。许多研究表明,遗传因素、免疫调节障碍和环境因素可能是IBD的主要致病因素[3],甚至年龄与IBD的发生也有着潜在的联系[4],然而IBD的发病机制尚不清楚,这使得开发有效的诊断和治疗策略更具挑战性[5]。

IL22是众所周知的上皮稳态调节剂,被认为是理想的IBD治疗靶点,因其通过激活(磷酸化)上皮Jak/Stat3通路,从而维持肠道稳态并促进上皮屏障修复[6]。IL22是白介素10(IL10)细胞因子家族中的一员,可由多种免疫细胞分泌,主要包括先天性淋巴细胞3群(ILC3)、辅助性T细胞17(Th17)、辅助性T细胞22(Th22)、调节性T细胞(Treg)等[7]。IL22受体(IL22R)由异源二聚体的IL22R1和IL10R2构成,IL10R2为组织非特异性受体,而IL22R1多表达于肺、胃肠道、胸腺、皮肤、胰腺、肝脏和肾脏等具有上皮组织特异性的器官,在免疫细胞不表达,从而提供了从免疫系统到上皮组织的信号传导方向性[8]。目前相关研究多采用腹腔注射重组IL22蛋白(rIL22)的给药方式。这种治疗方式能够起到较好的治疗作用,但存在着治疗时效短、单价高等缺点[9]。HSUEH等[10]探明了重组IL22腺相关病毒(adreno-associated virus-IL22,AAV-IL22)在2-辛炔酸(2-octynoic acid)诱发的小鼠原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cirrhosis,PBC)模型中,可以减低炎症反应并减少肝脏纤维化的产生。这一研究提示在较长的时间窗内提高IL22表达水平,有助于探讨葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium salt,DSS)诱导肠炎的治疗新策略。

腺相关病毒(adeno-associated virus,AAV)是一种复制缺陷型单链DNA细小病毒,对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力,并已证明在用于具有免疫活性细胞的基因表达时,AAV载体效果更好[11]。目前使用AAV作为载体的基因治疗已经成为一种新的治疗模式出现,并已获得美国食品药品监督管理局(FDA)授权许可。KUZMIN等[12]对广泛开展的AAV基因治疗的临床试验进行了充分评估,认为AAV基因治疗是一种安全、耐受性良好的有效方式。本研究基于AAV具有表达时间长、安全性高、免疫原性低和高稳定性的特性,将目的基因IL22的蛋白编码区(coding

sequence,CDS)插入 AAV 表达质粒中,并在小鼠体内稳定转染,构成了一种较为理想的基因治疗方式,从而初步探究 AAV-IL22 转染小鼠在 DSS 结肠炎动物模型中的作用及机制,为探讨 IBD 的发病机制及其潜在的治疗方法提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

采用 8 周龄 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠,体质量 23~25 g,由成都集萃药康生物科技有限公司提供[SCXK(川)2020-034]。饲养环境为陆军军医大学动物实验中心 SPF 级动物房,环境温度和湿度为中央空调统一控制[室温(22±2)℃,湿度 60%~70%,12 h 昼夜交替照明],每笼 5 只,自由摄食饮水。

1.2 试剂与仪器

AAV-IL22/mock 购自吉凯基因公司,DSS 购自 MP Biomedical 公司;RT-qPCR 采用 SYBR Green 染料法 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司);抗体:IL22(Bioss)、stat3(Bioss)、p-stat3(CST)、IL1α(CST)、IL1β(CST)、cleaved-IL1β(CST)、IL6(Bioworld)、TNFα(Bioworld)。Western blot 仪器(美国 Bio-Rad 公司);电泳凝胶试剂盒、电泳液(上海雅酶生物医药公司);化学发光成像仪(美国 acuronBio 公司);PCR 仪(荧光定量 CFX connect,美国 Bio-rad 公司)。

1.3 小鼠实验模型构建

1.3.1 $IL22^{-/-}$基因敲除鼠 DSS 模型构建 $IL22^{+/-}$小鼠由欧阳文军(美国南圣弗朗西斯科大学免疫系)提供,将 8~10 周龄基因型为 $IL22^{+/-}$小鼠按 1 雄 2 雌合笼,新生小鼠 10 d 左右剪脚趾行琼脂糖凝胶电泳鉴定小鼠基因型,鼠龄 4 周时雌雄分笼饲养,鼠龄 8~10 周时选用同笼出生基因型为 $IL22^{-/-}$、$IL22^{+/+}$雄性小鼠各 3 只,体质量在 23~25 g 之间,给予 2.5%DSS 溶液(质量/体积,g/L)自由饮水 6 d,换正常饮水 2 d,行小鼠肠道内窥镜检查后麻醉取材,造模期间记录小鼠体质量、粪便性状、血便情况以确定 DAI 评分(评分标准见表 1)。行 2 次重复实验。

表 1 小鼠 DSS 诱导肠炎疾病活动指数评分(DAI 评分)

评分项目	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
体质量下降率	0%~1%	>1%~5%	>5%~10%	>10%~18%	>18%
粪便粘稠度	正常	软	粘液便	稀便	稀水样便
粪便潜血	阴性	浅蓝	蓝色	深蓝	肉眼血便

1.3.2 AAV-IL22/mock 转染小鼠 1 个月模型构建

选取 15 只 SPF 级 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,适应性饲养 7 d,依据随机数字表法分为 PBS 组($n=5$)、AAV-mock 组($n=5$)、AAV-IL22 组($n=5$)。AAV-mock 组和 AAV-IL22 组均采用尾静脉注射,无菌 PBS 溶液稀释病毒原液至 200 μL/只,AAV 滴度为 1×10^{11} v.g/只,PBS 对照组采用等体积无菌 PBS 尾静脉注射。观察 1 个月并记录体质量变化。

1.3.3 AAV-IL22/mock 转染小鼠 2 个月模型构建

选取 25 只 SPF 级 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,适应性饲养 7 d,采用随机数字表法分为 PBS 组($n=5$)、低剂量 AAV-mock 组(滴度=1×10^{11} v.g/只,$n=5$)、低剂量 AAV-IL22 组(滴度=1×10^{11} v.g/只,$n=5$)、高剂量 AAV-mock 组(滴度=2×10^{11} v.g/只,$n=5$)、高剂量 AAV-IL22 组(滴度=2×10^{11} v.g/只,$n=5$)。观察并记录原始体质量和 AAV 转染 2 个月后体质量。

1.3.4 AAV-IL22/mock 转染小鼠 DSS 模型构建

选取 15 只 SPF 级 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,适应性饲养 7 d,采用随机数字表法分为 AAV-mock+DSS 组($n=5$)、AAV-IL22+DSS 组($n=5$),在 AAV-IL22/mock(1×10^{11} v.g/只)转染小鼠 1 个月模型基础上给予 2.5%DSS 溶液自由饮水 6 d,换正常饮水 2 d,行小鼠肠道内窥镜检查后麻醉取材,造模期间记录小鼠体质量、粪便性状、血便情况。PBS 空白对照组($n=5$)予以正常饮水,与造模小鼠同时取材。

1.4 小鼠肠道内窥镜

隔夜禁食 12 h 后使用高分辨率小鼠视频内窥镜系统(Karl STORZ,Tuttlingen,德国)对实验小鼠进行肠道内窥镜检查。2.5%异氟烷诱导麻醉,1.5%异氟烷维持麻醉,生理盐水冲洗肠腔后适量空气充气显示近端结直肠。根据内窥镜结果评分,评分标准见表 2。

表 2 小鼠肠道内窥镜评分标准

评分项目	0 分	3 分
肠壁透明情况	不透明	透明
肠壁附着纤维蛋白	无	大量
黏膜颗粒状态	无	明显
血管形态	不可见	透见
粪便特征	正常	稀便
管腔内有血液	无	大量

1.5 动物标本采集及处理

所有小鼠麻醉后脱颈椎处死,摘取肝、肾、脾,滤纸

吸干多余水分后称重,分离及结肠组织,测量结肠长度,剪取部分结肠组织迅速放入液氮速冻后于-80 ℃冰箱保存,其余肠段于 zinc 溶液中固定 24 h。

1.6 实验方法

1.6.1 HE 染色 结肠组织常规固定、脱水,包埋制成石蜡标本,3 μm 切片脱蜡后苏木精染色 3 min,1%盐酸-酒精分化 5 s,自来水冲洗反蓝 10 min,伊红染色 10 s,透明后中性树脂封片,光镜下拍照并评分。结肠组织病理学评分见表 3。

1.6.2 免疫组化及免疫荧光 将石蜡切片脱蜡后于 1×柠檬酸盐中煮沸抗原修复 15 min,3%过氧化氢阻断 15 min、5%山羊血清+0.5%PBST 封闭后一抗 4 ℃孵育过夜,0.1%PBST 洗片 5 次,每次 5 min,2 抗孵育 1.5 h,光镜下 DAB 显色,苏木精染色 2 min,二甲苯透明后中性树脂封片。免疫荧光步骤基本同上,注意避光孵育荧光二抗,DAPI 染色后防荧光淬灭封片剂封片。

1.6.3 RNA 提取及定量逆转录 PCR(RT-qPCR) 使用 TRIzol(Thermo Fisher Scientific,USA)从远端结肠组织中提取总 mRNA,并使用 Nanodrop 2000 测定 mRNA 浓度,采用 cDNA 反转录试剂盒[Rneasy Mini kit(TaKaRa)]逆转录合成 cDNA,RT-qPCR 反应体系:引物 1 μL,cDNA 2 μL,ddH_2O 2 μL,Master Mix 5 μL,总体积 10 μL。反应条件预变性:95 ℃ 5 min,共 40 个循环:95 ℃ 5 s,59 ℃ 15 s,72 ℃ 20 s,65~95 ℃,得到各组样品扩增反应的 Ct 值,以 GAPDH 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对表达量。引物序列:IL22 上游引物 5′-ATGAGTTTTTCCCTTATGGGGAC-3′,下游引物 5′-GCTGGAAGTTGGACACCTCAA-3′。

1.6.4 蛋白质免疫印迹(Western blot) 将冷冻组织加入含蛋白酶和磷酸酶抑制剂 cocktail 的蛋白裂解液(RIPA),电动匀浆机研磨离心(15 000 r/min,4 ℃,20 min)后取蛋白上清液,BCA 法测定浓度后于 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离,湿转法转至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h,一抗 4 ℃摇床孵育过夜,次日洗膜缓冲液(TBST)洗涤 3 次后加入二抗孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次后加入发光液曝光。所测目标蛋白的灰度值/GAPDH 的灰度值作为所测蛋白的相对表达。

1.7 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.3 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD-t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

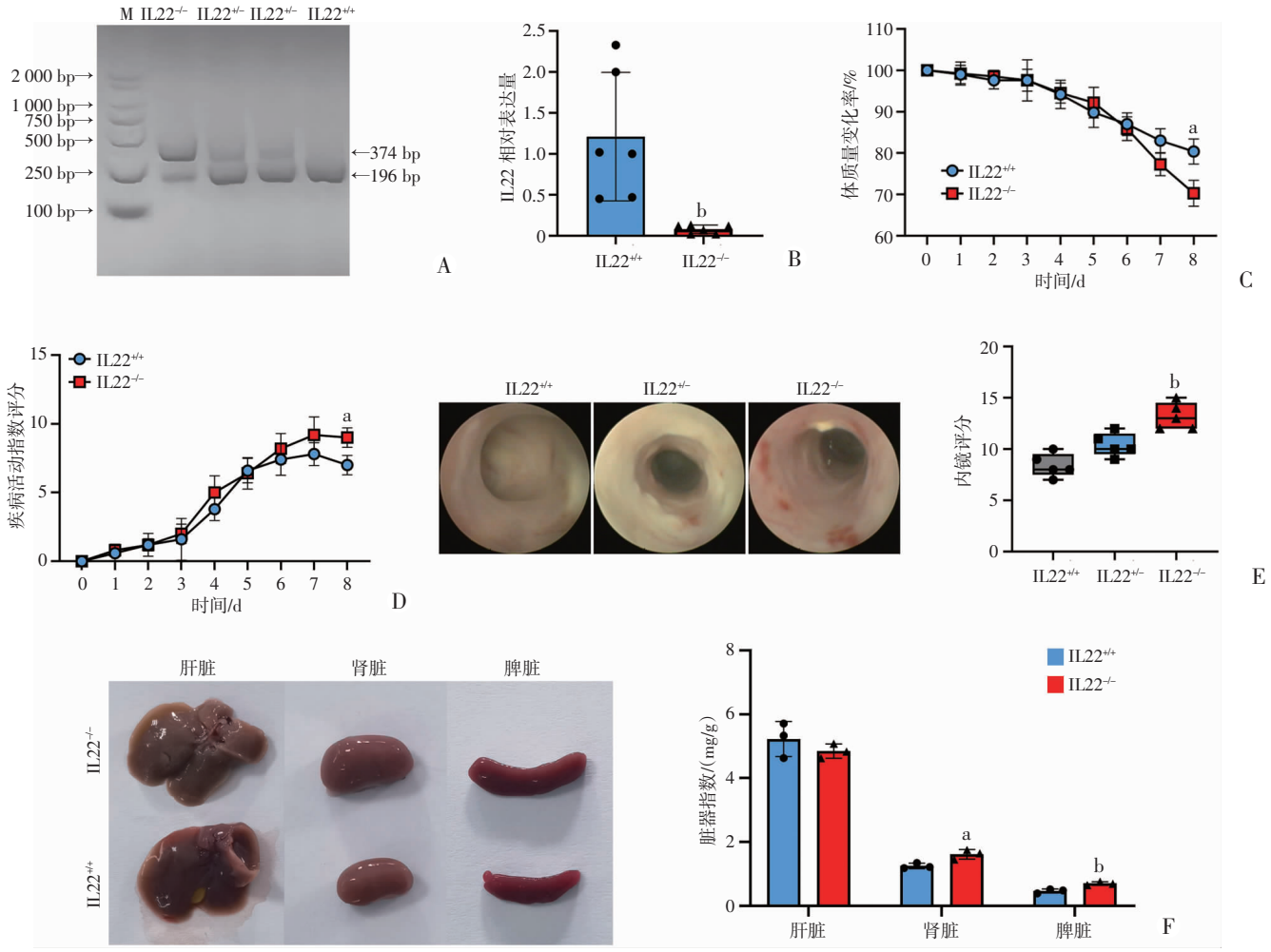
2 结果

2.1 $IL22^{-/-}$小鼠 DSS 诱导结肠炎表型

为明确 IL22 对 DSS 诱导的结肠炎作用,选取 IL22 敲除小鼠($IL22^{-/-}$)建立 DSS 诱导的结肠炎模型,并选用同窝 $IL22^{+/+}$作为对照组(图 1A)。首先使用琼脂糖凝胶电泳法对 IL22 敲除小鼠的基因型进行鉴定,为明确 IL22 敲除效率,取结肠组织行 RT-qPCR 检测 IL22 的 mRNA 相对表达水平,与 $IL22^{+/+}$相比,$IL22^{-/-}$小鼠结肠 IL22 mRNA 表达水平明显降低($P<0.01$,图 1B),表明 IL22 敲除小鼠模型构建无误。在此基础上,同时给予 2 组小鼠 2.5%DSS 自由饮水,造模前期 2 组体质量下降情况、粪便性状及便血情况均未出现统计学差异,DSS 造模 6 d 换用正常饮水后,$IL22^{-/-}$组相较 $IL22^{+/+}$组腹泻和便血程度进一步加重,体质量降低比例($P<0.05$,图 1C)、DAI 评分较对照组出现统计学差异($P<0.05$,图 1D)。造模第 8 天,$IL22^{-/-}$组小鼠出现不喜活动、弓背及体温减低等情况。为防止小鼠死亡,对 2 组小鼠行肠道内窥镜检查并取材,肠镜结果显示 $IL22^{-/-}$组肠道病变更为明显,肠道内窥镜评分较 $IL22^{+/+}$组明显增高($P<0.01$,图 1E)。DSS 诱导结肠炎同时可以引起其他免疫相关器官的变化,因此在取材时观察了小鼠肝、肾、脾的大体形态变化,并对其质量进行称量。虽未观察到 $IL22^{-/-}$组肝脏指数有明显升高,但其肝脏大体观颜色晦暗,而其他免疫相关脏器(肾、脾)出现炎症反应性水肿增大、脏器指数升高($P<0.05$,图 1F),提示 IL22 缺陷加重了 DSS 诱导结肠炎症。

表 3 小鼠 DSS 诱导肠炎结肠组织病理学评分

评分	溃疡(个)	上皮细胞变化	炎症浸润	淋巴结(个)
0	0	正常	无	无
1	1	杯状细胞缺失	隐窝周围浸润	1
2	2	杯状细胞大面积缺失	黏膜肌层出现浸润	2
3	3	隐窝缺失	黏膜肌层普遍浸润,黏膜增厚	3
4	>3	隐窝大面积缺失或息肉状再生	黏膜下层浸润	>3



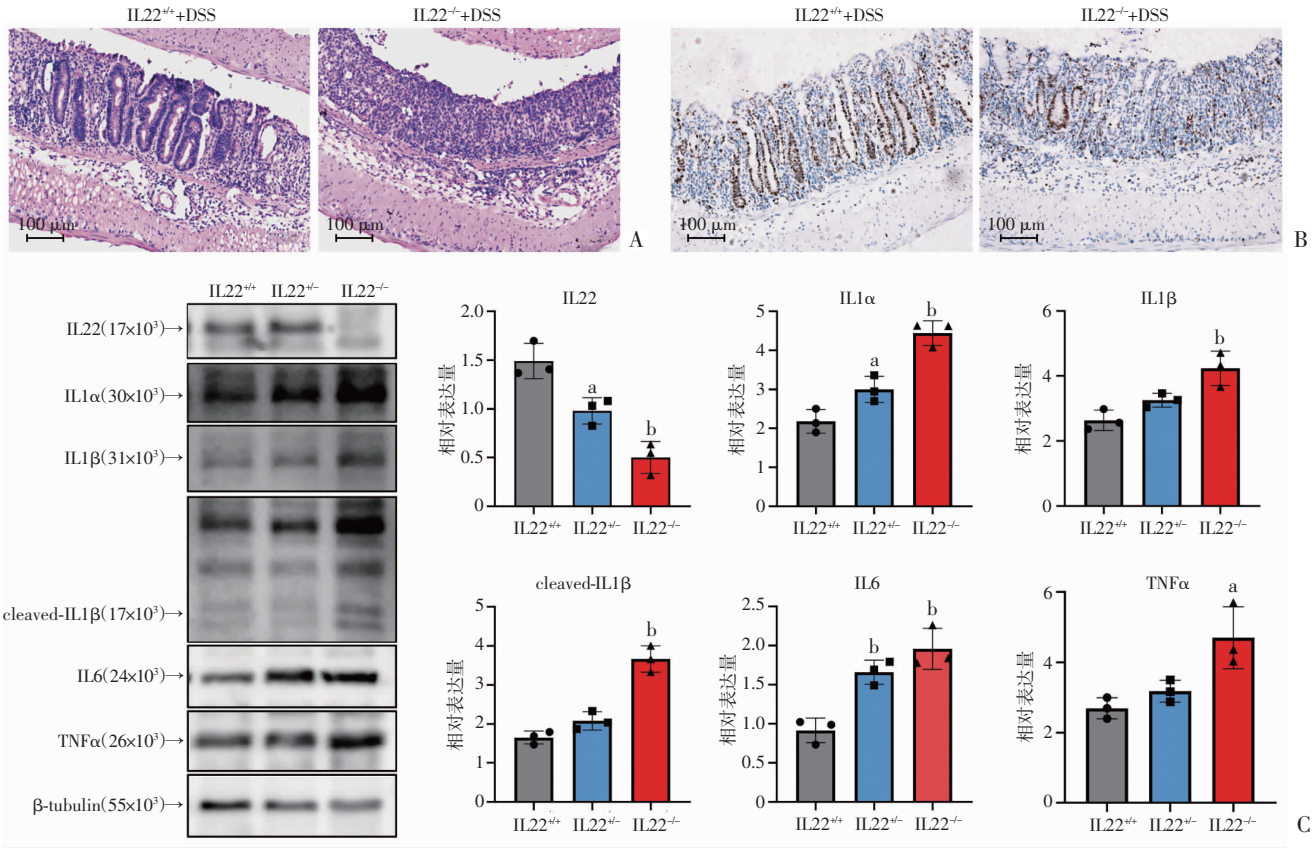
M:标准;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 $IL22^{+/+}$组比较

A:琼脂糖凝胶电泳法鉴定 $IL22^{-/-}$和 $IL22^{+/+}$基因型;B:RT-qPCR 检测小鼠结肠 IL22 mRNA 水平;C:2.5%DSS 饮水 6 d、正常饮水 2 d 各组小鼠体质量变化率;D:疾病活动指数(DAI)评分;E:DSS 诱导后小鼠肠镜及内镜评分统计;F:小鼠肝、肾、脾脏器大体及脏器指数

图 1 $IL22^{-/-}$小鼠增加 DSS 所致结肠炎的严重程度

2.2 $IL22^{-/-}$小鼠 DSS 诱导结肠炎炎症水平

根据上述结果,IL22 敲除小鼠可能在 DSS 诱导的结肠炎模型中具有更高的炎症水平表达,进一步从微观病理和炎症因子蛋白水平进行验证。HE 染色结果显示 $IL22^{-/-}$组小鼠结肠壁整体增厚,黏膜下固有层大量炎性细胞浸润,黏膜受损明显,隐窝结构紊乱,有大面积溃疡形成,提示 IL22 缺乏进一步破坏了肠组织完整性,并加重炎症水平。Ki67 免疫组化结果提示 IL22 敲除小鼠结肠隐窝增殖细胞数量明显减少,提示其修复能力减弱。通过 Western blot 检测结肠组织中促炎细胞因子 IL1α、IL1β、cleaved-IL1β、IL6、TNFα 的表达水平,结果显示 IL22 纯合子敲除小鼠较杂合子小鼠在 DSS 模型中肠道炎症因子蛋白表达水平升高($P<0.05$),且均高于野生型小鼠,表明 IL22 缺失加剧炎症反应。见图 2。



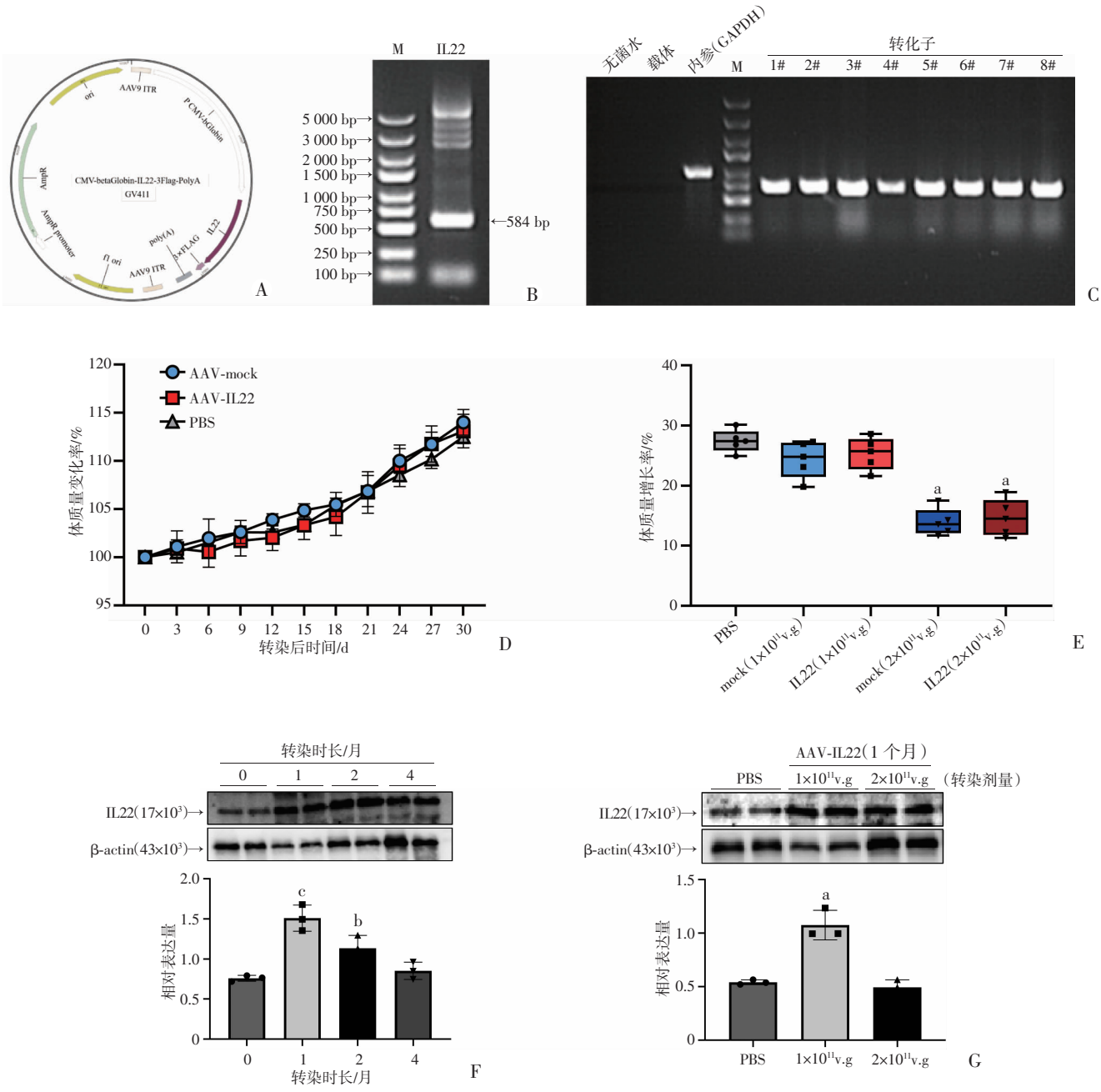
A:结肠 HE 染色;B:免疫组化 Ki67 染色;C:Western blot 检测 IL22、IL1α、IL1β、cleaved-IL1β、IL6、TNFα 表达水平及统计结果;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 $IL22^{+/+}$ 比较

图 2 $IL22^{-/-}$ 加重 DSS 诱导的结肠炎炎症水平

2.3 在体转染 AAV9-IL22 建立 IL22 高表达模型

为进一步明确 IL22 在 DSS 模型中的保护作用,通过对质粒载体插入 IL22 目的基因片段(图 3A),检测目的基因和转化子的表达(图 3B、C),并检测病毒滴度后实现了 AAV-IL22 的构建。在明确 AAV 转染效能之前,先对 AAV 的安全性进行了验证。在分别对小鼠行 PBS 以及不同剂量 AAV-mock 和 AAV-IL22 尾静脉注射之后,对小鼠体质量变化进行追踪,结果显示 AAV-mock 组与 AAV-IL22 组小鼠体质量变化与 PBS 组无明显差异(图 3D),小鼠毛色黑亮,活动度好。为进一步明确病毒的致损剂量和长期效应,以不同的浓度梯度 AAV 尾静脉注射转染小鼠,并在转染后对小鼠进行连续性观察,结果显示转染 AAV 后 2 个月,高剂量组 AAV-mock 组与 AAV-IL22 组小鼠体质量增长均受滞($P<0.01$,图 3E),毛色及活动度稍差于对照组,而低剂量组体质量稍低于 PBS 对照组,但二者间无统计学差异。这一结果提示高表达 IL22 本身并非导致上述现象的原因,而过高空载病毒颗粒的毒性积蓄效应可能是产生全身性不良反应的"元凶"。根据上述结果,将低剂量组小鼠在病毒转染后 1 个月进行取材,并将小鼠的组织学形态和主要脏器(肝、肾、脾)的脏器指数与正常对照组进行比较,结果显示低剂量 AAV-mock 组、AAV-IL22 组与正常对照组间无统计学差异,表明转染病毒颗粒数在 1×10^{11} v. g/只为安全剂量。

在安全效能研究的基础上,为进一步明确 AAV 在结肠的转染效能,在分别检测转染 AAV 后 0、1、2、4 个月检测结肠组织 IL22 蛋白表达水平,结果显示 AAV-IL22 转染 1 个月后可在结肠组织实现长期稳定的 IL22 高表达($P<0.01$,图 3F)。另外,转染不同剂量 AAV 的结肠组织行 Western blot 验证 IL22 蛋白水平表达,结果表明低剂量 AAV 转染即可引起结肠 IL22 表达明显增高,而高剂量组 IL22 表达低于低剂量组表达,这一现象可能是由于高剂量病毒损伤 IL22 分泌细胞所致($P<0.01$,图 3G)。综合安全性及经济性因素,本研究选用低剂量组作为进一步研究的治疗剂量。

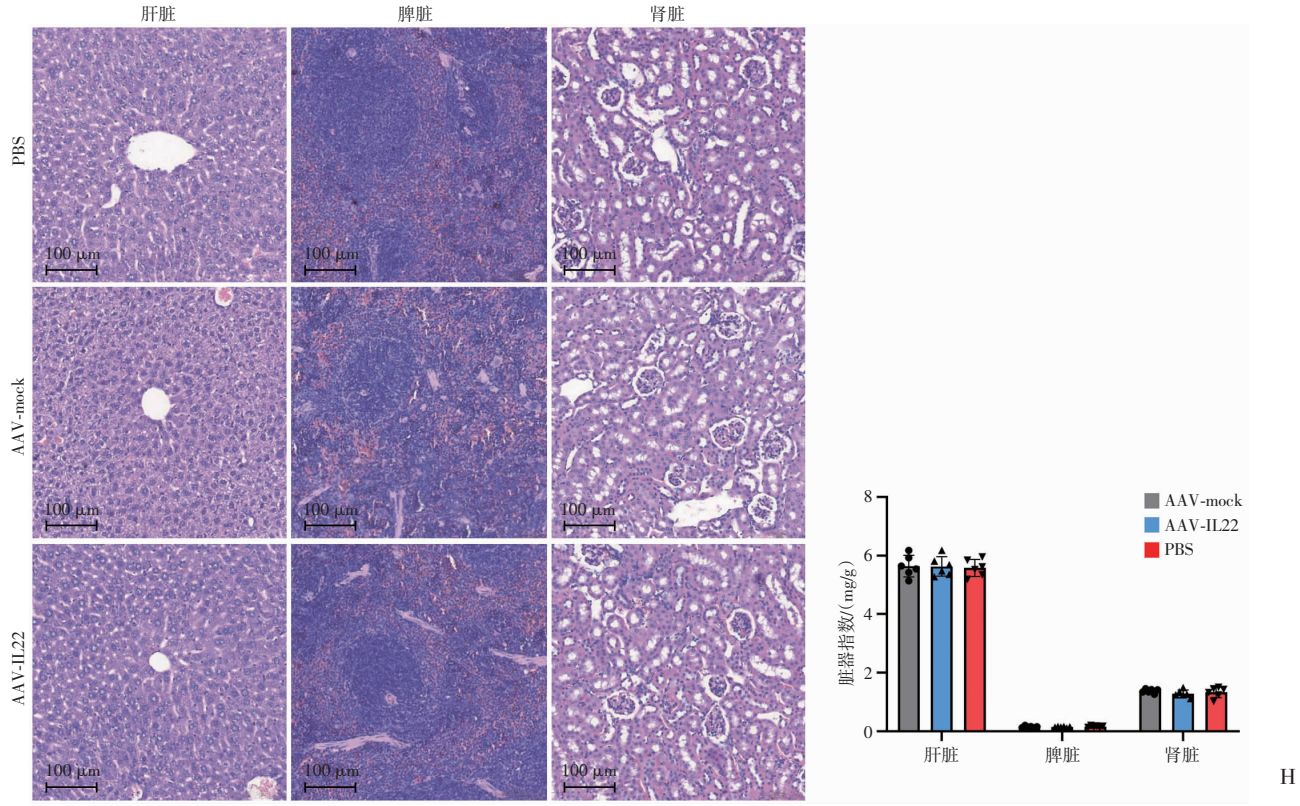


a:$P<0.01$,与 PBS 比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与转染 0 个月比较

A:腺相关病毒载体构建图谱;B:目的基因琼脂糖凝胶电泳;C:阳性转化子琼脂糖凝胶电泳;D:在体 AAV 转染 30 d 内小鼠体质量变化(滴度=1×10^{11} v.g/只);E:不同剂量 AAV 转染后 2 个月体质量增长率;F: Western blot 验证 AAV(滴度=1×10^{11} v.g/只)转染后 0、1、2、4 个月结肠 IL22 蛋白表达水平;G:低剂量 AAV(滴度=1×10^{11} v.g/只)及高剂量 AAV(滴度=2×10^{11} v.g/只)转染后 1 个月结肠 IL22 表达

图 3 AAV-IL22 转染小鼠表型验证

(图 3H 续下页)



H:转染腺相关病毒 1 个月后肝、肾、脾 HE 染色及肝、脾、肾脏器指数统计

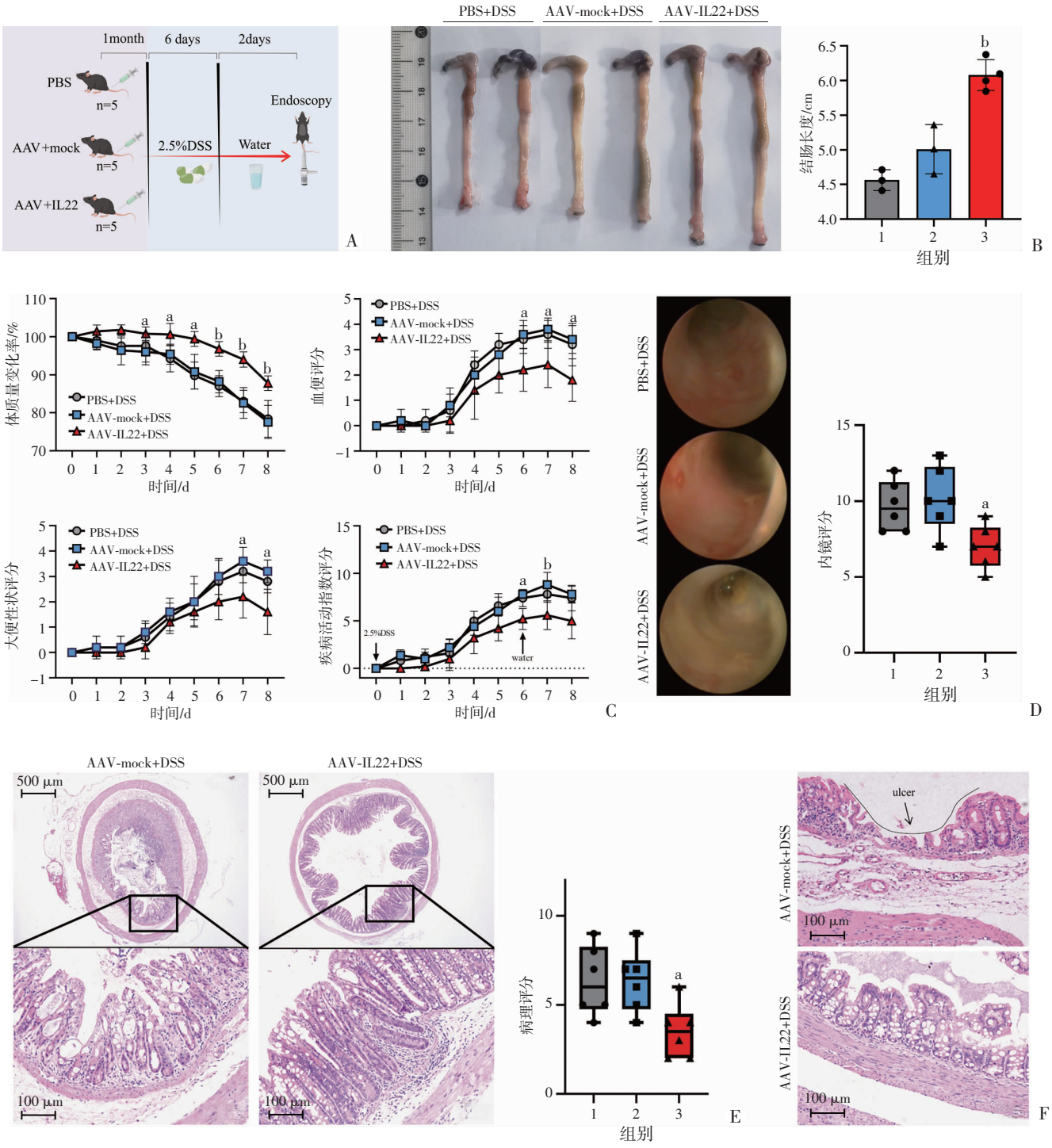
续图 3 AAV-IL22 转染小鼠表型验证

2.4 AAV-IL22 缓解 DSS 诱导性结肠炎

为明确 IL22 过表达背景下对于 DSS 肠炎的影响,分别对小鼠尾静脉注射低剂量(1×10^{11} v. g/只)的 AAV-mock 和 AAV-IL22,并设置 PBS 对照组用以排除空载病毒的影响。为保持与 IL22 敲除小鼠的 DSS 模型一致,待 AAV 稳定转染 1 个月后再次按原方案建立了 DSS 模型(图 4A)。研究发现 AAV-IL22 转染小鼠仍能在 DSS 刺激下保持结肠长度($P<0.01$,图 4B),并逆转疾病活动指数($P<0.01$,图 4C),内镜评估黏膜破损、肠道出血情况也较对照组明显减轻($P<0.05$,图 4D)。DSS 可引起小鼠结肠形态学严重损害,而 IL22 可明显缓解 DSS 所致的结肠组织学改变,评估 HE 染色病理结果表明 AAV-IL22 治疗组可更大程度减少杯状细胞的损失,保存隐窝细胞存活并减少炎性细胞浸润($P<0.05$,图 4E)。考虑到盲肠临近结肠,DSS 可能同样具有损伤作用,通过 HE 染色病理结果显示相较 AAV-IL22 组,AAV-mock 组在盲肠亦可发生较为严重的黏膜损伤。通过 AAV 实现基因靶向治疗,提高本底 IL22 水平可以对 DSS 诱导的结肠炎起保护作用。

2.5 IL22 保护肠屏障完整性

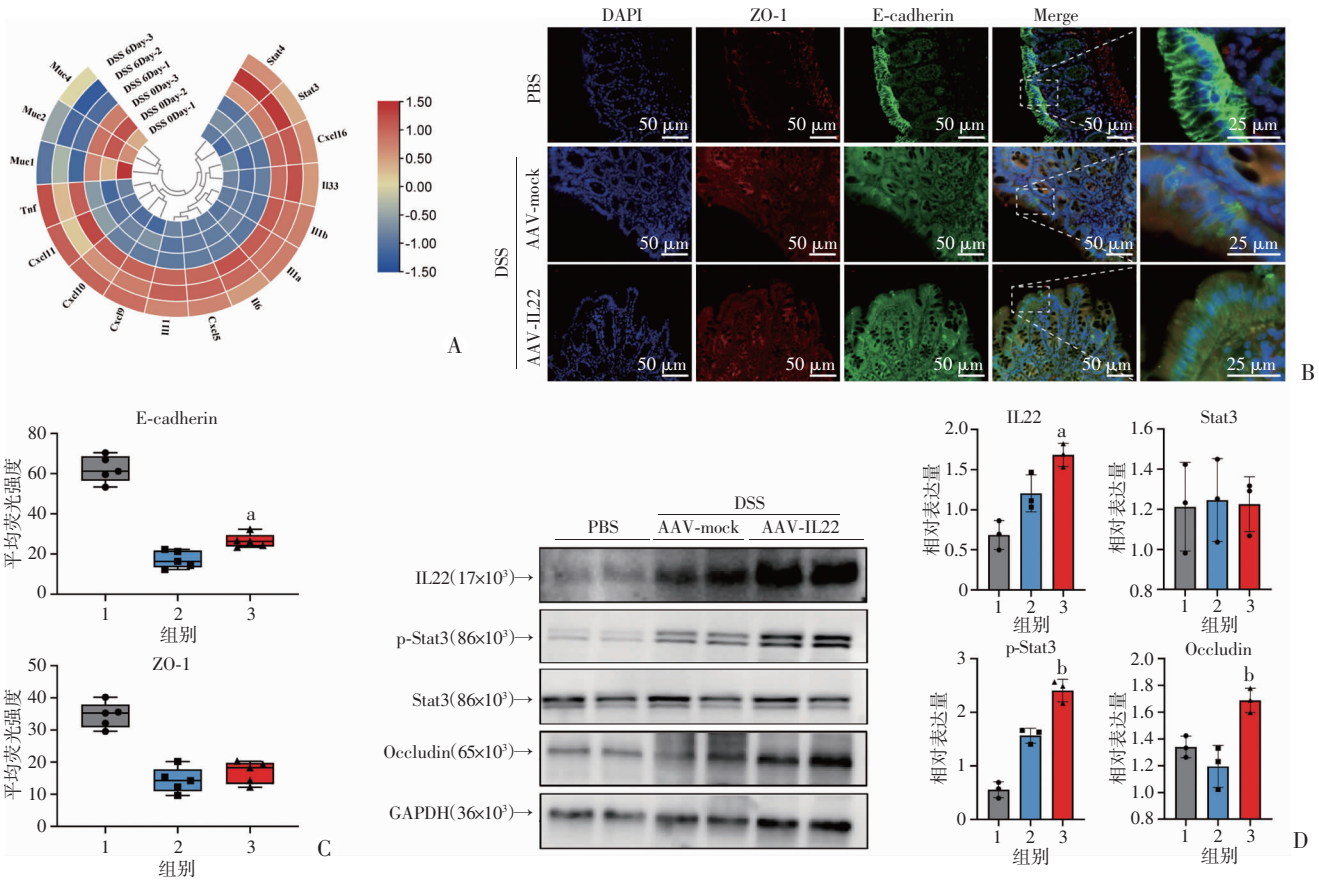
为进一步了解 DSS 肠炎中肠化学屏障损伤情况,从 GEO 数据库中挖掘出 DSS 诱导小鼠结肠炎模型第 0 天和第 6 天结肠测序结果,并挑选出相关基因进行比对,结果显示,DSS 诱导作用下,结肠总体黏蛋白基因水平表达明显降低,而趋化因子和部分炎症因子表达水平升高(图 5A)。由于紧密连接蛋白在维持肠道平衡和上皮物理屏障功能中起着至关重要的作用,本研究通过 IF 检测 IL22 治疗后的 ZO-1 和 E-cadherin 表达情况,并通过 Western blot 再次验证 Occludin 蛋白表达水平,结果显示 IL22 虽难以逆转 ZO-1 在 DSS 肠炎中的损伤,但可在结肠上皮刷状缘缓解 E-cadherin 损伤($P<0.05$,图 5B、C),同时提高 Occludin 表达水平($P<0.01$,图 5D)。而 IL22 可以激活(磷酸化)Stat3,从而促使信使分子 p-Stat3 入核并启动下游转录因子。通过 Western blot 验证了 AAV 基因靶向提高 IL22 本底水平,可以在 DSS 肠炎模型中激活 Jak/Stat3 通路($P<0.01$,图 5D),从而提高肠屏障相关分子的表达来保护受损的结肠组织,减轻 DSS 所致损伤。据此,本研究通过 AAV 转染在体小鼠,实现了 IL22 在体稳定长期表达,在 DSS 诱导的结肠炎模型中,IL22 过表达小鼠可以明显缓解肠上皮黏膜损伤,减少炎症细胞浸润,具有保护作用,而这一作用产生可能是由于 IL22 高激活 Jak/Stat3 通路,从而稳定肠上皮完整性所致。



1:PBS+DSS;2:AAV-mock+DSS;3:AAV-IL22+DSS;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 AAV-mock+DSS 组比较

A:DSS 肠炎建模示意图;B:结肠长度及统计;C:体质量变化率、粪便性状评分、血便评分、DAI;D:结肠内窥镜及评分;E:结肠 HE 染色;F:盲肠 HE 染色

图 4 AAV-IL22 可降低 DSS 所致结肠炎的病情严重程度



1:PBS;2:AAV-mock+DSS;3:AAV-IL22+DSS;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 AAV-mock+DSS 比较

A:GEO 数据库 DSS 诱导 0/6 d 相关目的基因热图分析;B:免疫荧光染色显示 ZO-1、E-cadherin 表达;C:ZO-1、E-cadherin 平均荧光强度统计;D:Western blot 检测 IL22、p-Stat3、Stat3、Occludin 蛋白表达水平及统计结果

图 5 IL22 通过激活 Jak/Stat3 通路维持肠上皮屏障功能

3 讨论

3.1 免疫调节障碍是 IBD 的致病因素之一

IBD 的免疫调节障碍主要表现为促炎症介质和抗炎介质之间的平衡受损,宿主免疫应答过度激活,先天性免疫细胞大量浸润肠道固有层,从而诱导促炎细胞因子的自发释放,如肿瘤坏死因子 α(TNFα)、干扰素 γ(IFNγ)、IL1β、IL6、IL8 和 IL12 等,所有这些细胞因子都可能诱导以效应 T 细胞调节失衡为特征的炎症级联反应,从而导致肠道黏膜屏障损伤[13]。许多研究报道了 Th17 细胞和 IBD 发病机理之间的密切关系,并从 IBD 患者结肠中发现了 Th17 相关性细胞因子,如 IL17A、IL17F、IL22 和 IL26 的过表达[14]。尽管 IBD 患者 IL22 表达上调,但屏障功能损伤和疾病发生发展仍然存在,这可能是由于生理水平的 IL22 不足以充分发挥损伤愈合作用,同时伴随着自然拮抗剂 IL22BP 的升高而阻碍了 IL22 潜在保护作用则是另一种可能的因素[15]。因此,稳定调节机体 IL22 水平升高成为了一种具有可行性的 IBD 治疗新策略[16]。

3.2 IL22 具有炎症调节作用

IL22 是一种具有争议性的细胞因子,常被称为“披着狼皮的羊”[17]或“双面细胞因子”[18],在不同疾病模型中由于组织微环境的改变,IL22 扮演的促炎和抑炎角色亦不明晰。然而更多证据表明,IL22 可以降低机体对外界病原体的易感性和致病性[6],如 IL22 缺陷小鼠在流感病毒感染中炎症加重,而 IL22-BP 缺陷小鼠中炎症减轻[19]。在 DSS 肠炎模型中,IL22 和 IL6 本身都存在反应性升高,且二者都可以激活 Jak/Stat3 通路,不同的是 IL22 通过激活上述通路起到增强肠道屏障、促进组织再生修复的作用;而通过抑制 IL6/Jak2/Stat3 通路则可以调节 Th17/Treg 细胞稳态,从而缓解 DSS 诱导的肠炎[20]。因此,靶向 IL22 激活的 Jak/Stat3 通路是明确 IL22 对于炎症调节的首要条件。据此,本研究利用 IL22 敲除小鼠并通过 AAV 过表达

IL22,在急性结肠炎模型中验证了 IL22 对炎症的调节作用,结果表明 IL22 缺乏可导致 DSS 结肠炎小鼠体内多种炎症因子表达上调,而过表达 IL22 可逆转结肠上皮结构损伤、修复肠屏障、减少炎症细胞浸润,从而抑制 DSS 结肠炎的炎症失衡。由于 DSS 模型是模拟 IBD 患者,尤其是 UC 患者最常用的研究方法之一,而 IBD 患者体内免疫调节的持续性失衡很可能是长期的肠屏障功能障碍引发的炎症级联反应,二者又互为因果,不断加重病情。因此我们推测 IL22 起到的屏障维稳作用是治疗 IBD 的关键一环。

3.3 IL22 是重要的肠道屏障保护因子

肠道内环境稳态是由肠上皮屏障和黏膜免疫系统等多因素共同维持的,肠道上皮屏障是肠道内环境稳定的基石,它提供了抵御病原体的物理屏障,同时维持了机体免疫应答[21]。上皮屏障功能障碍可引发过度炎症反应,引起促炎细胞因子上调,特别是 IL1β、TNFα 和 IL6 水平异常升高,从而加重肠上皮毁损抑制修复[24]。而 IL22 是公认的肠屏障保护因子,可以通过促进肠道隐窝细胞增殖分化修复黏膜屏障[22],同时促进潘氏细胞分泌抗菌肽和防御素起到化学屏障作用[23]。SERAFINI 等[24]发现,通过对小鼠在有限的时间窗内预感染鼠类柠檬酸杆菌,可诱导产生受到良好“训练”的 ILC3,这类 ILC3 可以在再次受到病原菌侵袭时快速增殖并释放大量 IL22,从而完成肠道黏膜屏障的修复,同时这种效应可持续 4 个月以上。与之异曲同工的地方是,我们通过 AAV 来实现持续性的 IL22 高表达背景,并展开了对 DSS 药物作用下肠屏障损伤修复的研究,从而明确 IL22 对于肠屏障的持续性保护作用,这一结果相较于使用 rIL22-Fc 一过性过表达 IL22 而言,具有靶向性、持久性的特点,其治疗模式更符合 IBD 慢性难治的病理生理特点,在未来可能具有更为广阔的应用前景。然而,本研究仍存在以下不足:首先,以尾静脉注射 AAV 为治疗策略并未以肠道为靶向组织,多器官感染 AAV 仍存在潜在风险,在研究方法上可以通过 AAV 载体上增加肠道特异性启动子或者采用肠系膜下静脉注射的方法靶向肠道达到过表达 IL22 的目的。其次,既往研究表明 IL22 可以在通过抑制 TGFβ1 受体表达及下游 Smad2/3 通路激活从而对原发性肺纤维化起到治疗作用[25]。另外,本研究主要探究了 IL22 对急性 DSS 肠炎的调控作用,而 IL22 对于慢性 DSS 诱导结肠炎的保护作用及对慢性纤维化的治疗作用尚有待探索。最后,本研究缺少对于 IL22 分泌相关免疫细胞的相关研究,未来可通过调控 ILC3、Th22 等 IL22 分泌的免疫细胞,精准实现 IL22 生理局部器官过表达,从而开拓 IBD 免疫治疗新策略。

综上所述,本研究探索了 IL22 对于 DSS 模型下肠道屏障功能修复、炎症稳态调节的重要作用,证实了 AAV-IL22 这一新型干预策略的高效性,为 IBD 的治疗提供新的思路。

参考文献:

[1] KAPLAN G G. The global burden of IBD: from 2015 to 2025[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015, 12(12): 720-727. DOI: 10.1038/nrgastro.2015.150.

[2] PARIGI T L, D'AMICO F, ABREU M T, *et al*. Difficult-to-treat inflammatory bowel disease: results from an international consensus meeting[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2023, 8(9): 853-859. DOI: 10.1016/S2468-1253(23)00154-1.

[3] PIOVANI D, DANESE S, PEYRIN-BIROULET L, *et al*. Environmental risk factors for inflammatory bowel diseases: an umbrella review of meta-analyses[J]. Gastroenterology, 2019, 157(3): 647-659.e4. DOI: 10.1053/j.gastro.2019.04.016.

[4] FAYE A S, COLOMBEL J F. Aging and IBD: a new challenge for clinicians and researchers[J]. Inflamm Bowel Dis, 2022, 28(1): 126-132. DOI: 10.1093/ibd/izab039.

[5] ORDÁS I, ECKMANN L, TALAMINI M, *et al*. Ulcerative colitis[J]. Lancet, 2012, 380(9853): 1606-1619. DOI: 10.1016/s0140-6736(12)60150-0.

[6] KEIR M, YI T S, LU T, *et al*. The role of IL-22 in intestinal health and disease[J]. J Exp Med, 2020, 217(3): e20192195. DOI: 10.1084/jem.20192195.

[7] SABAT R, OUYANG W, WOLK K. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system[J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(1): 21-38. DOI: 10.1038/nrd4176.

[8] NAMBU R, WARNER N, MULDER D J, *et al*. A systematic review of monogenic inflammatory bowel disease[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2022, 20(4): e653-e663. DOI: 10.1016/j.cgh.2021.03.021.

[9] KIM S, HONG E H, LEE C K, *et al*. Amelioration of DSS-induced acute colitis in mice by recombinant monomeric human interleukin-22[J]. Immune Netw, 2022, 22(3): e26. DOI: 10.4110/in.2022.22.e26.

[10] HSUEH Y H, CHANG Y N, LOH C E, *et al*. AAV-IL-22 modifies liver chemokine activity and ameliorates portal inflammation in murine autoimmune cholangitis[J]. J Autoimmun, 2016, 66: 89-97. DOI: 10.1016/j.jaut.2015.10.005.

[11] PUPO A, FERNÁNDEZ A, LOW S H, *et al*. AAV vectors:

the Rubik's cube of human gene therapy[J]. Mol Ther, 2022, 30(12): 3515-3541. DOI: 10.1016/j.ymthe.2022.09.015.

[12] KUZMIN D A, SHUTOVA M V, JOHNSTON N R, *et al*. The clinical landscape for *AAV* gene therapies[J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(3): 173-174. DOI: 10.1038/d41573-021-00017-7.

[13] BEZZIO C, DELLA CORTE C, VERNERO M, *et al*. Inflammatory bowel disease and immune-mediated inflammatory diseases: looking at the less frequent associations[J]. Therap Adv Gastroenterol, 2022, 15: 17562848221115312. DOI: 10.1177/17562848221115312.

[14] JIANG P, ZHENG C, XIANG Y, *et al*. The involvement of TH17 cells in the pathogenesis of IBD[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2023, 69: 28-42. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2022.07.005.

[15] PELCZAR P, WITKOWSKI M, PEREZ L G, *et al*. A pathogenic role for T cell-derived IL-22BP in inflammatory bowel disease[J]. Science, 2016, 354(6310): 358-362. DOI: 10.1126/science.aah5903.

[16] ROTHENBERG M E, WANG Y H, LEKKERKERKER A, *et al*. Randomized phase I healthy volunteer study of UTTR1147A (IL-22Fc): a potential therapy for epithelial injury[J]. Clin Pharmacol Ther, 2019, 105(1): 177-189. DOI: 10.1002/cpt.1164.

[17] LAURENCE A, SHEA J J, WATFORD W T. Interleukin-22: a sheep in wolf's clothing[J]. Nat Med, 2008, 14(3): 247-249. DOI: 10.1038/nm0308-247.

[18] SEIDERER J, BRAND S. IL-22: a two-headed cytokine in IBD? [J]. Inflamm Bowel Dis, 2009, 15(3): 473-474. DOI: 10.1002/ibd.20625.

[19] HEBERT K D, MCLAUGHLIN N, GALEAS-PENA M, *et al*. Targeting the IL-22/IL-22BP axis enhances tight junctions and reduces inflammation during influenza infection[J]. Mucosal Immunol, 2020, 13(1): 64-74. DOI: 10.1038/s41385-019-0206-9.

[20] ZHAO Y X, LUAN H F, JIANG H, *et al*. Gegen Qinlian Decoction relieved DSS-induced ulcerative colitis in mice by modulating Th17/Treg cell homeostasis *via* suppressing IL-6/JAK2/STAT3 signaling[J]. Phytomedicine, 2021, 84: 153519. DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153519.

[21] KAYAMA H, OKUMURA R, TAKEDA K. Interaction between the microbiota, epithelia, and immune cells in the intestine[J]. Annu Rev Immunol, 2020, 38: 23-48. DOI: 10.1146/annurev-immunol-070119-115104.

[22] ZWARYCZ B, GRACZ A D, RIVERA K R, *et al*. IL22 inhibits epithelial stem cell expansion in an ileal organoid model[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2019, 7(1): 1-17. DOI: 10.1016/j.jcmgh.2018.06.008.

[23] BEVINS C L, SALZMAN N H. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis[J]. Nat Rev Microbiol, 2011, 9(5): 356-368. DOI: 10.1038/nrmicro2546.

[24] SERAFINI N, JARADE A, SURACE L, *et al*. Trained ILC3 responses promote intestinal defense[J]. Science, 2022, 375(6583): 859-863. DOI: 10.1126/science.aaz8777.

[25] GU P Y, WANG D D, ZHANG J, *et al*. Protective function of interleukin-22 in pulmonary fibrosis[J]. Clin Transl Med, 2021, 11(8): e509. DOI: 10.1002/ctm2.509.

(收稿:2023-07-25;修回:2023-08-25)

(编辑 邓强庭)