基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003636

利用 CRISPR-Cas9 技术探究肠道 ERβ 对肠源性 TPH1 和 5-HT 水平的影响

呼文强[1]，杨千嬉[1]，贺桂琼[1]，骆世芳[2]
（1.重庆医科大学神经科学研究中心，重庆 400016；2.重庆医科大学基础医学院人体解剖学教研室，重庆 400016）

【摘 要】**目的**：探索 C57BL/6J 小鼠结肠上皮雌激素受体 β（estrogen receptor β，ERβ）缺失对结肠色氨酸羟化酶-1（TPH1，tryptophan hydroxylase-1）和 5-羟色胺（5-hydroxytryptamine，5-HT）水平的影响。**方法**：利用 CRISPR-Cas9 技术获得 Pvillin-$Cre^{+/-}$小鼠、ERβ$flox^{+/-}$小鼠，通过配种繁殖最终获得肠道 ERβ 敲除纯合子组（ERβ$flox^{-/-}$-Pvillin-$Cre^{+/+}$，ERβCKO，n=5）、杂合子组（ERβ$flox^{+/-}$-Pvillin-$Cre^{+/+}$，ERβ$CKO^{+/-}$）（n=5）及同窝野生型（wild type，WT）小鼠。取 6 个月龄和 12 个月龄的各品系小鼠作为研究对象。结合苏木素-伊红染色（hematoxylin-eosin staining，HE）、酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）、免疫印迹（Western blot，WB）和免疫组化（immunohistochemistry，IHC）方法对各组小鼠肠道形态、肠道 ERβ、5-HT 和 TPH1 水平进行检测。**结果**：基因鉴定验证肠道 ERβCKO 小鼠成功构建后，WB 显示肠道 ERβ 水平明显下调（P<0.05）。HE 显示肠道 ERβ 敲除后，肠道结构完整性与肠道黏膜上皮的绒毛发育均异常。ELISA 结果显示，2 个月龄段 ERβCKO 小鼠肠道 5-HT 水平较 WT 组小鼠下降明显（P<0.05），且呈月龄依赖方式。IHC 结果显示，各组小鼠肠道均出现 TPH1 免疫阳性表达，与 WT 小鼠相比，ERβCKO 小鼠肠道 TPH1 免疫阳性细胞数量减少（P<0.05），免疫阳性物表达量更低（P<0.05），但 TPH1 未呈现月龄依赖方式。**结论**：结肠 ERβ 下调可引起结肠 TPH1 蛋白和 5-HT 水平含量降低，继而引发小鼠肠道功能异常，增加患肠道疾病的风险，这为以 ERβ 为靶点的肠道相关疾病的发病机制提供了实验室依据。

【关键词】雌激素受体 β；色氨酸羟化酶-1；5-羟色胺；肠道
【中图分类号】R361 【文献标志码】A 【收稿日期】2024-03-07

Exploring the effect of intestinal ERβ on enterogenic TPH1 and 5-HT levels using CRISPR-Cas9 technology

Hu Wenqiang[1]，*Yang Qianxi*[1]，*He Guiqiong*[1]，*Luo Shifang*[2]
（*1. Neuroscience Research Center，Chongqing Medical University；2. Department of Human Anatomy，School of Basic Medical Sciences，Chongqing Medical University*）

【**Abstract**】***Objective***：To investigate the effects of colonic epithelial estrogen receptor β（ERβ）deletion on colonic tryptophan hydroxylase-1（TPH1）and 5-hydroxytryptamine（5-HT）levels in C57BL/6J mice. ***Methods***：Pvillin-$Cre^{+/-}$ mice and ERβ$flox^{+/-}$ mice were obtained using CRISPR-Cas9 technology，and intestinal ERβ knockout homozygous（ERβ$flox^{-/-}$-Pvillin-$Cre^{+/+}$，ERβCKO，n=5），heterozygous（ERβ$flox^{+/-}$-Pvillin-$Cre^{+/+}$，ERβ$CKO^{+/-}$ n=5），and littermate wild-type（WT）mice were ultimately obtained by mating and breeding. Mice of each strain at 6 and 12 months of age were used for the study. Hematoxylin-eosin staining（HE），enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA），Western blotting（WB），and immunohistochemistry（IHC）were used for determining the intestinal morphology and measuring intestinal ERβ，5-HT，and TPH1 levels of mice in each group. ***Results***：After the successful construction of intestinal ERβCKO mice as verified by gene identification，WB showed that intestinal ERβ levels were significantly down-regulated（P<0.05）. HE showed abnormalities in intestinal structural integrity and intestinal mucosal epithelial villi development after intestinal ERβ knockdown. ELISA results showed that intestinal 5-HT levels of ERβCKO mice at 6 and 12 months of age were significantly decreased compared with those of WT mice（P<0.05），and the decrease was in a month-age-dependent manner. IHC results showed that TPH1 was expressed in the intestines of mice of all groups. However，ERβCKO mice showed a reduced number of TPH1 immunoreactive cells（P<0.05）and lower expression of immunoreactive substances（P<0.05）compared with WT mice，but the decline in TPH1 was not in a month-age-dependent manner. ***Conclusion***：Down-regulation of colonic ERβ induces a decrease in colonic TPH1 protein and 5-HT levels，which subsequently triggers abnormal intestinal function and increases the risk of developing intestinal diseases in mice. This study is expected to provide a laboratory basis for the pathogenesis of ERβ-targeted intestinal diseases.

【**Key words**】estrogen receptor β；tryptophan hydroxylase-1；5-hydroxytryptamine；intestine

作者介绍：呼文强，Email：2021110050@stu.cqmu.edu.cn，研究方向：肠道雌激素受体与阿尔茨海默病的关联性。
通信作者：骆世芳，Email：100425@cqmu.edu.cn。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：82371203）；重庆市基础与前沿研究计划资助项目（编号：CSTB2023NSCQ-MSX0161）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20241206.1116.008（2024-12-06）

5-羟色胺（5-hydroxytryptamine，5-HT）是一类单胺吲哚胺，其制备由必需氨基酸L-色氨酸（tryptophan，Trp）提供原料，然后通过色氨酸羟化酶（tryptophan hydroxylase，TPH）来实现。TPH可分成TPH1和TPH2这2个亚型。TPH1亚型主要表现在肠嗜铬细胞（enterochromaffin，EC）黏膜层上皮中，而TPH2亚型则主要在所有5-HT能神经元中表达[1-3]。肠道中90%的5-HT储存在EC细胞中，它能调节机体的进食行为、学习记忆能力以及肠道功能。已有研究报道，5-HT水平异常可引起小鼠出现焦虑抑郁样行为[4-6]。同时也有研究指出，在慢性偏头痛的啮齿动物模型中，焦虑和抑郁样行为会随着5-HT水平的升高而降低[7-8]。5-HT在癌症和胃肠道疾病中也发挥着不同程度的功能，如肠易激综合征（Irritable bowel syndrome，IBS）的发生可能与肠道内5-HT水平异常有关[9-10]。

近年研究报道，中缝背核区（dorsal raphe，DRN）的TPH水平会受到雌激素β受体（estrogen receptor β，ERβ）水平影响[11]。作为雌激素受体的一种亚型，ERβ主要存在于生殖器官、海马区以及结肠等部位[12-13]。已有研究表明，大脑中ERβ水平可影响5-HT合成过程的限速酶TPH，从而引起模型小鼠出现焦虑抑郁样行为[14-16]。5-HT作为一种结肠内重要的神经递质，其合成是否会受结肠ERβ水平的影响，目前少有报道。因此，本研究利用CRISPR-Cas9技术构建结肠上皮ERβ敲除（ERβ CKO）模型小鼠，观察ERβ CKO小鼠结肠TPH1以及5-HT含量的变化，从而进一步探讨结肠ERβ蛋白水平下降小鼠肠道功能异常的机制，以期为以ERβ为靶点的肠道相关疾病的发病机制提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

TPH1兔多克隆抗体购自美国Affinity公司（1∶1 000，DF6442），GAPDH购自艾博抗（上海）公司（1∶5 000，ab8245），标记山羊抗兔IgG购自美国Affinity公司（1∶5 000，AF7021），全蛋白提取试剂盒（KGP250）、SDS-PAGE凝胶电泳试剂盒（KGP113）、Western Blotting检测试剂盒（KGP1201）、ECL检测试剂盒（KGP1123）、Braford蛋白含量检测试剂盒（KGA801）、预染蛋白分子量Marker（KGP441）；5-HT试剂盒（武汉云克隆公司，CEA808Ge）。

1.2 实验动物

实验动物为Pvillin-Cre$^{+/-}$小鼠、ERβflox$^{+/-}$小鼠[购于赛业生物技术有限公司，ID：7，8，9（06-22-2021）]以及繁殖后产生的不同基因型的ERβ敲除小鼠，每5只1笼（笼子：545 mm×395 mm×200 mm），所有动物均在重庆医科大学实验动物中心饲养，室内维持温度在（22±2）℃，湿度在（55±5）%，光照与黑暗循环时间为12 h，所有小鼠均可自由进食和饮水。实验中小鼠的使用遵循3R原则，本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准[WDRM动（复）字第2020008号]。

1.3 方法

1.3.1 ERβ基因敲除小鼠的构建及实验分组 （1）小鼠配种繁殖步骤如下。①雌雄ERβflox$^{+/-}$种鼠杂交产生ERβflox$^{+/-}$小鼠。②雌雄Pvillin-Cre$^{+/-}$种鼠杂交获得Pvillin-Cre$^{+/-}$小鼠。③将Pvillin-Cre$^{+/-}$小鼠与ERβflox$^{+/-}$小鼠杂交，得到ERβflox$^{+/-}$-Pvillin-Cre$^{+/-}$小鼠。④将雌雄ERβflox$^{+/-}$-Pvillin-Cre$^{+/-}$小鼠配种，获得3种基因型小鼠：ERβflox$^{-/-}$-Pvillin-Cre$^{+/+}$（ERβCKO）、ERβflox$^{+/-}$-Pvillin-Cre$^{+/+}$（ERβCKO$^{+/-}$）和ERβflox$^{+/+}$-Pvillin-Cre$^{+/+}$（WT）。（2）小鼠基因鉴定如下。①剪鼠尾提取DNA。取出生后21 d小鼠鼠尾0.2 cm，使用快速提取试剂盒（购自Takara公司）提取小鼠基因组DNA。②PCR扩增。以各基因组为模板，Flox上游引物：5′-CGACTCTACCGATGGCTGTT-3′；下游引物：5′-ACCATCACCCTACAAGTAATGC-3′。Pvillin-Cre上游引物：5′-GGTGTTTGGTTTGGTTTCCTCTGCATAAGA-3′，下游引物：5′-GCAGGTTTGGTTTGGTTTCCTCTGCATAAGA-3′；GAPDH上游引物：5′-GGAGGTGAAGCAGGCTCAATC-3′，下游引物5′-GAACCAAAGCATCGACCAGT-3′。PCR体系参见Takara说明书。使用PrimeSTAR GXL DNA Polymerase（Takara Bio Inc，JPN）扩增鉴定片段，1%琼脂糖凝胶电泳后割胶回收条带。（3）小鼠分组如下。取6个月龄和12个月龄的WT、ERβCKO$^{+/-}$和ERβCKO小鼠作为研究对象，每组各5只。

1.3.2 组织样本制备 在敲除小鼠建立后于6个月龄和12个月龄处理小鼠取材。0.1%戊巴比妥钠麻醉小鼠，固定小鼠四肢后，快速打开胸腔，用预冷的30 mL 0.9%生理盐水进行心尖灌注，灌注完毕后，冰上快速断头取近盲肠端的1~2 cm结肠组织，放入4%多聚甲醛固定，梯度乙醇75%、80%、90%，无水乙醇脱水。二甲苯透明，包埋蜡块，冷却并凝固后取出蜡块。石蜡切片机切片，厚4 μm，进行后续染色实验。剩余结肠组织采用液氮碾碎处理，存放于-80 ℃冰箱，蛋白测定备用。

1.3.3 苏木精-伊红染色（haematoxylin and eosin stain，HE）实验 选取相同切面的石蜡切片放入37 ℃恒温箱复温60 min，常规脱蜡至水。使用HE试剂盒（Solarbio，G1120）进行染色。然后用梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，在显微镜下观察结肠结构。

1.3.4 免疫印迹（Western blot，WB）实验 取出液氮碾碎后的组织在冰上操作，在碾碎组织中加入RIPA裂解液（碧云天，P0013B），含1%蛋白酶抑制剂PMSF（Biosharp，BM507A-1）及1%磷酸酶抑制剂（碧云天，P1045-2）裂解，提取总蛋白，按说明书采用BCA法进行蛋白浓度测定。取10 μg总蛋白进行SDS-Page电泳，蛋白Maker 3 μL，恒压80伏特，半干

转法转至NC膜。NC膜放入5%脱脂奶粉（碧云天，P0216）室温2 h。抗体用一抗稀释液稀释（1∶1 000）后，4 ℃冰箱放置14~18 h。1×PBST漂洗10 min×3次，放入二抗兔或鼠稀释液（1∶5 000）中，孵育1 h。NC膜用1×PBST漂洗10 min×3次，滴加显影液，Image J软件对灰度值分析，测定各条带蛋白表达强弱。

1.3.5 免疫组织化学染色（immunohistochemical staining，IHC）实验 选取相同切面的石蜡切片放入37 ℃恒温箱复温60 min，常规脱蜡至水，3% H_2O_2去离子水室温孵育10 min，1×PBS洗片10 min×3次，柠檬酸钠抗原修复液95 ℃水浴锅中修复15 min，室温静置自然冷却，5%牛血清蛋白，37 ℃封闭30 min，滴加适当稀释的一抗（1∶200），4 ℃过夜。37 ℃复温30 min，PBS洗片，滴加生物素标记山羊抗兔IgG（1∶1 000），37 ℃孵育30 min，PBS洗片，滴加链霉亲和素-生物素复合物，37 ℃孵育30 min，在普通光学显微镜下DAB显色，苏木素染核，梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封片。在荧光显微镜下采图并计数分析。

1.3.6 ELISA测定 采用双抗体夹心酶联免疫吸附法测定小鼠结肠组织中5-HT的水平。将样品（20 μg）置于5-HT抗体涂层微孔板中（320 pg/mL），37 ℃孵育40 min。用PH7.2-7.4的1×PBST洗涤液洗板3次（每孔均要加满），每次3~5 min。加50 μL生物素化-5-HT抗体，37 ℃孵育20 min。然后向孔内加HRP-Strepavidine酶结合物并在37 ℃下孵育10 min。底物溶液在37 ℃下避光孵育15 min。加入100 μL停止液后，使用Bio-Rad分光光度计在450 nm波长处测量吸光度（absorbances，A）值。

1.4 统计学方法

使用Image J软件对图片结果进行分析，使用GraphPad Prism 9.0统计软件进行分析：3组样本及以上进行双因素方差分析检验，2组样本进行非配对t检验分析。使用GraphPad Prism 9.0制作统计图，检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 从基因和蛋白水平验证肠道ERβ敲除小鼠成功构建

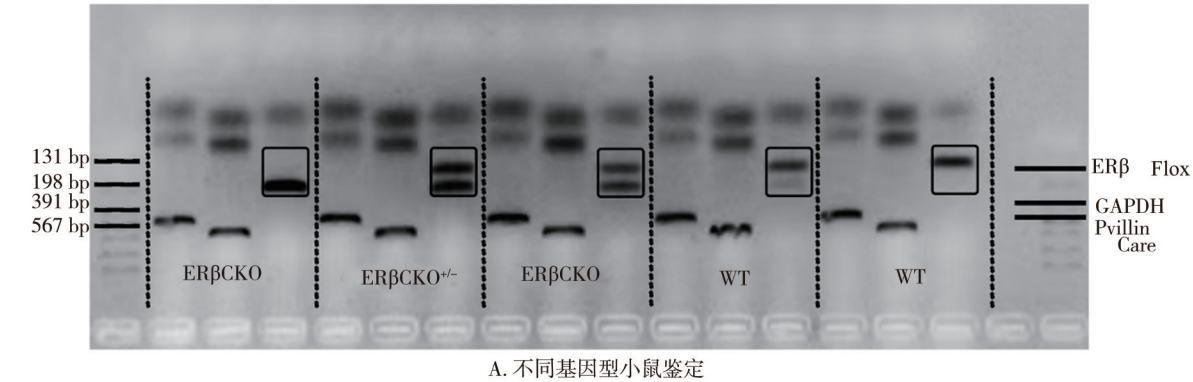
首先提取小鼠鼠尾DNA进行PCR检测，琼脂糖电泳结果显示，泳道上出现了不同大小的条带。经分析比对提示，131 bp条带对应为WT小鼠，出现131 bp和198 bp 2个规则条带对应为ERβCKO$^{+/-}$小鼠，而198 bp条带对应ERβCKO小鼠（图1A）。

紧接着通过WB测定各组小鼠结肠组织中ERβ蛋白表达。结果显示，各组小鼠均出现55 kD大小的ERβ蛋白条带（图1B）。各组小鼠ERβ蛋白表达水平如下，6个月：WT组（1.000±0.157），ERβCKO$^{+/-}$组（0.753±0.299），ERβCKO组（0.137±0.068），12个月：WT组（1.000±0.229），ERβCKO$^{+/-}$组（0.580±0.192），ERβCKO组（0.205±0.032）。如图1C所示，95%CI=-0.156 1~0.349 0。

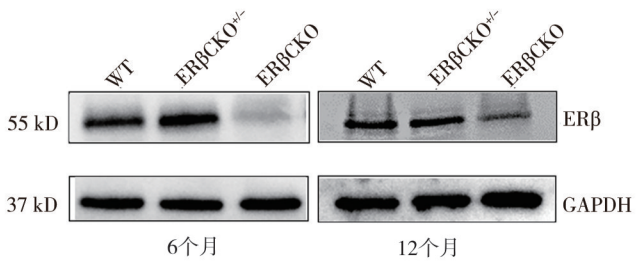
以上结果表明，基于CRISPR-Cas9技术构建的肠道ERβ敲除小鼠已成功获得。因ERβCKO$^{+/-}$组小鼠各指标较不稳定，以下实验不进行分析。

2.2 各组小鼠的结肠组织标本和病理形态HE染色

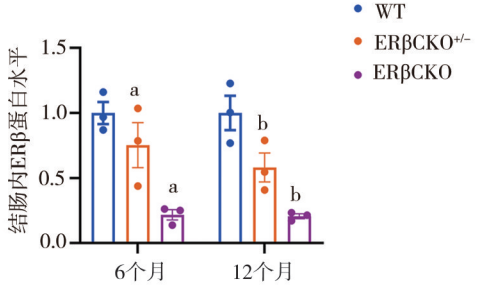
接下来本实验采用HE染色法观察小鼠结肠结构。由图2镜下观察可见，各月龄WT组小鼠肠道上皮中肠壁的腺



A. 不同基因型小鼠鉴定



B. 各组小鼠不同月龄ERβ蛋白条带



C. 不同月龄小鼠结肠ERβ蛋白水平分析

注：a，与6个月WT组相比，P<0.05；b，与12个月WT组相比，P<0.05；n=3，$\bar{x}\pm3$

图1 小鼠结肠ERβ水平验证

体数量丰富，结构排列整齐，隐窝结构完整（图 2A）。如图 2A 所示，ERβCKO 组小鼠结肠黏膜组织上皮绒毛萎缩且染色较浅，肠绒毛基底部完整性破坏（图 2A）。提示肠道 ERβ 缺失后可造成纯合子小鼠的结肠病理损伤和肠组织黏膜破坏。同时本研究发现：相比于 WT 组小鼠，ERβCKO 组小鼠的结肠长度未发生明显改变（图 2B）。

2.3　各组小鼠结肠 5-HT 水平变化

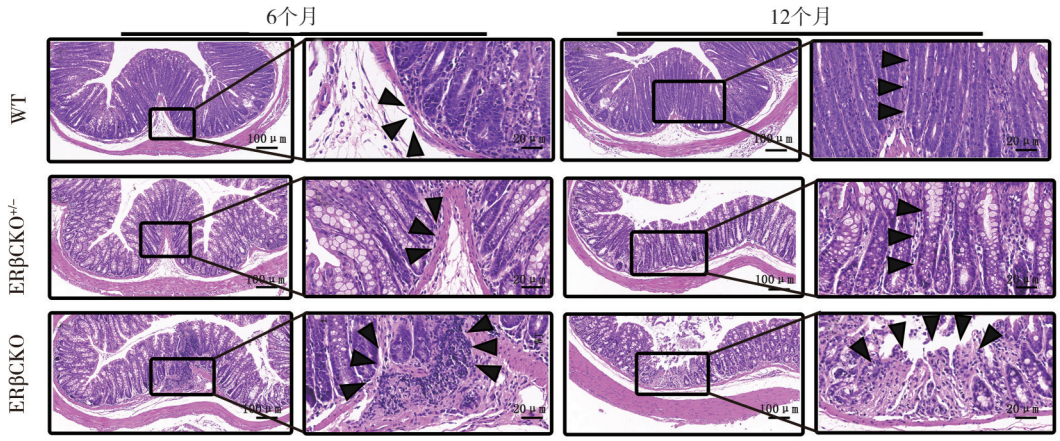
采用 ELISA 测定各组小鼠肠源性 5-HT 水平。结果表明（图 3A），与 WT 组[6 个月：（749.06 ± 62.61）pg/mL，12 个月：（558.55 ± 38.20）pg/mL]相比，ERβCKO 组小鼠肠道的 5-HT 水平[6 个月：（486.23 ± 58.70）pg/mL，12 个月：（270.90 ± 33.38）pg/mL]均呈下降趋势。经双因素方差分析发现（图 3A，95%CI=121.7~394.8），与 6 个月 WT 组小鼠比较，6 个月龄 ERβCKO 组小鼠结肠 5-HT 水平降低（t=3.219，P=0.010），12 个月龄 ERβCKO 小鼠结肠 5-HT 水平相比于 12 个月 WT 小鼠也明显下降（t=5.357，P=0.001），提示肠道 ERβ 敲除可明显减少 5-HT 水平。

采用非配对 t 检验法（图 3B、3C）对 6 个月龄和 12 个月龄小鼠做年龄纵向比较，图 3B：95%CI=−666.0~−116.3，图 3C：95%CI=−594.8~230.5。结果发现：ERβCKO 组小鼠中，12 个月龄组的 5-HT 水平较 6 个月组下降了 44.4%（t=5.808，P=0.010），而 WT 组 2 个月龄组也出现了下降，但仅下降 25.5%（t=4.016，P=0.030）。提示虽然年龄因素在 5-HT 水平下降上起了一定的作用，但 ERβ 缺乏导致的 5-HT 水平下降更为明显。

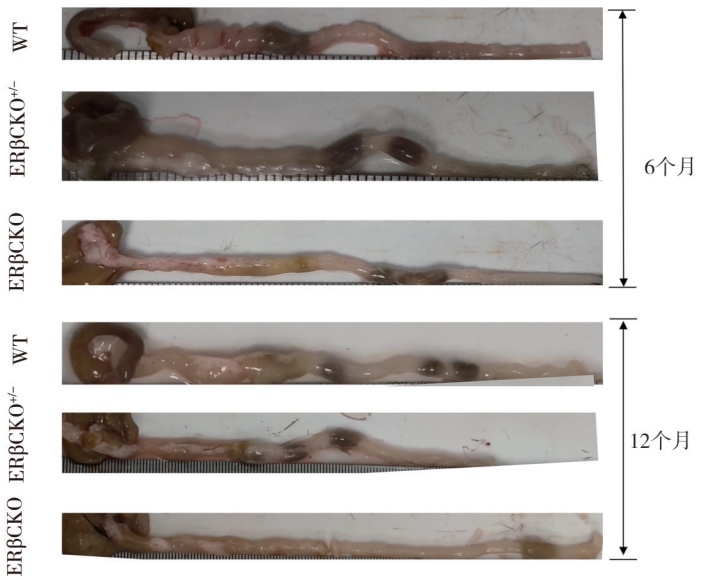
2.4　各组小鼠结肠内 TPH1 表达变化

明确 ERβ 敲除对肠源性 5-HT 的影响后，接下来对结肠组织进行免疫组化染色，观察 5-HT 合成过程关键限速酶 TPH1 的变化。结果显示，TPH1 免疫阳性细胞广泛见于各组小鼠结肠上皮黏膜层底部，免疫阳性物质主要表达于黏膜层细胞胞质内。经计数发现（图 4A），高倍视野下（40 倍）WT 组小鼠肠道 TPH1 免疫阳性细胞数量（表 1），非配对 t 检验结果表明，ERβCKO 组小鼠 TPH1 免疫阳性细胞数量明显下降（6 个月：t=8.633，P=0.002；12 个月：t=3.082，P=0.011）。

实验同时对各组小鼠 TPH1 免疫阳性细胞的染色深浅进行阳性面积百分比测定，结果显示，与 WT 组小鼠阳性面积百分比相比，ERβCKO 小鼠为也呈现明显下降趋势（表 1）。

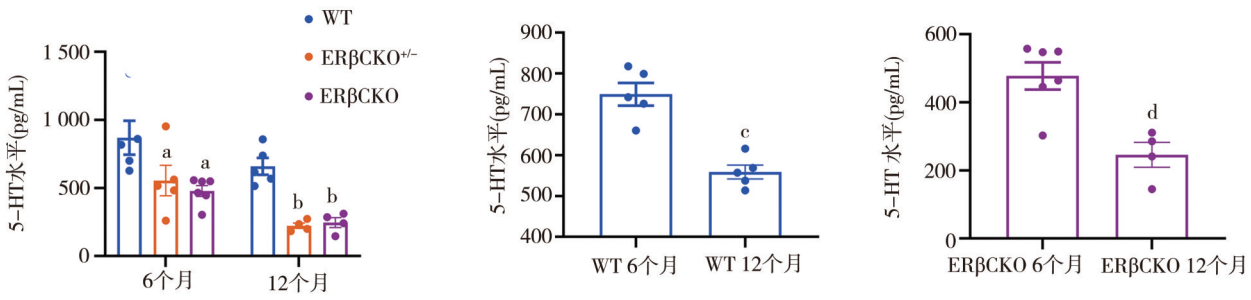


A. 不同视野下6个月与12个月龄小鼠结肠HE形态染色



B. 不同月龄各组小鼠结肠样本形态图示

图2　HE 染色下小鼠的结肠结构



A. 不同月龄小鼠5-HT表达水平　B. 不同月龄WT组小鼠组内5-HT变化　C. 不同月龄ERβCKO组小鼠结肠内5-HT的变化

注：a，与6个月WT组相比，$P<0.05$；b，与12个月WT组相比，$P<0.05$；c，与WT 6个月组相比，$P<0.05$；d，与ERβCKO 6个月组相比，$P<0.05$；$n=5$，$\bar{x}\pm5$

图3　小鼠结肠5-HT的表达水平

表1　TPH1不同年龄段阳性细胞数量与阳性面积比（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

项目	6个月		t值	P值	12个月		t值	P值
	WT	ERβCKO			WT	ERβCKO		
阳性细胞数量（个/mm²）	22.50 ± 4.370	4.20 ± 1.923	8.633	0.002	10.60 ± 3.361	6.50 ± 1.378	3.082	0.011
阳性面积百分比（%）	6.17 ± 1.161	3.24 ± 0.942	4.627	0.001	6.07 ± 0.331	3.61 ± 1.033	5.058	0.001

图4D的95%CI=−1.026~0.722。经双因素方差统计分析发现，与WT 2个月龄组小鼠相比，ERβCKO小鼠肠道TPH1免疫阳性细胞数量及染色深浅均明显下降（图4A，4C，$P<0.05$）。提示ERβ对TPH1水平无明显影响。采用非配对t检验法结果表明（图4A，4D），相比于6个月组小鼠，12个月组小鼠TPH1的染色深度均无明显变化（表1），图4E的95%CI=−23.10~13.50。图4F的95%CI=7.179~1.154。提示年龄因素对TPH1水平无明显影响。

以上结果跟WB检测到的结果一致（图4B，4C），各组小鼠TPH1蛋白表达：[6个月：WT组（1.000 ± 0.190），ERβCKO组（0.237 ± 0.066），12个月：WT组（1.000 ± 0.080），ERβCKO组（0.279 ± 0.037）]，图4C的95%CI=−0.156~0.349。即2个月龄段ERβCKO组小鼠肠道TPH1蛋白水平较同月龄段WT组[6个月：（$t=0.618$，$P=0.004$），12个月：（$t=0.248$，$P=0.01$）]明显下降（图4B，4C）。

以上结果均提示，肠道ERβ缺乏可降低TPH1的表达。

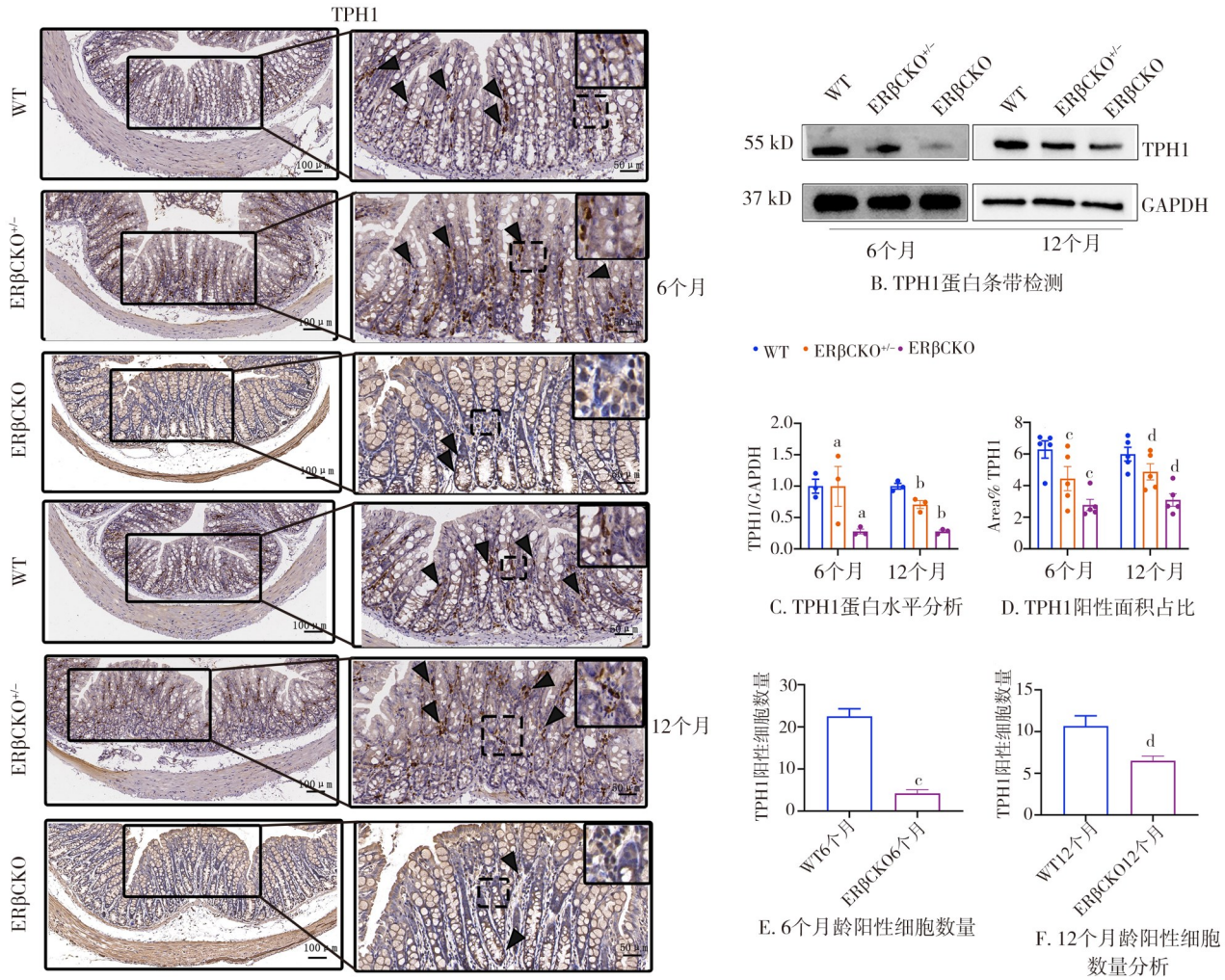
3　讨　论

肠道5-HT水平异常可能会诱发肠道疾病，有研究指出5-HT水平异常可能引起胃肠道感觉障碍和动力紊乱，与IBS的发生机制密切相关。关于肠道疾病如IBS，慢性结肠炎等，尚缺乏有效的治疗策略。因此，通过某种手段调控肠道5-HT水平，有望为肠道疾病治疗提供有效途径。本研究利用CRISPR/Cas9技术构建了ERβCKO小鼠发现：①ERβCKO小鼠结肠黏膜上皮完整性受损，绒毛形态紊乱。②肠道5-HT水平以及关键酶TPH1水平均下降。提示肠道ERβ缺失后，可能影响TPH1水平从而影响肠道5-HT合成。

5-HT广泛分布于全身，其中大脑和肠道均为5-HT的重要来源，脑内5-HT能神经元主要位于脑干中缝核内，其产生的5-HT占全身来源的5%，它可以产生5-HT能投射，在对认知功能重要的区域，如隔膜核，额叶皮层，及海马体形成中起重要作用[17]。而全身95%的5-HT主要来源于肠道[18]，肠道内的5-HT主要由肠道黏膜上皮EC细胞合成并储存[19]，并释放到全身而参与生理过程。因此，通过调控肠道5-HT和合成5-HT限速酶TPH水平可能为认知功能障碍与肠道疾病的防治提供靶点。

研究表明，雌激素可以促进5-HT的合成，该过程与ERβ有关。ERβ主要分布于脑和外周器官如肠道、前列腺、肺等[20]。肠道尤其是结肠，主要表达ERβ，可维持结肠上皮正常的生理结构[21]，本研究的HE结果也表明，结肠ERβ缺失会损伤结肠绒毛与肠壁结构完整性，这与现有报道一致。肠道ERβ是肠道疾病如克罗恩病、胃食管反流病等的重要靶点，肠道ERβ的缺乏是否影响以及如何影响肠道5-HT及其关键酶类TPH1尚不清楚。

有研究报道，雌激素可通过脑内ERβ基因组调节质膜单胺转运体（PMAT）的表达，抑制5-HT的再摄取，提高脑内5-HT的水平[22]。雌激素还可通过脑干DRN区的ERβ水平提高5-HT能细胞的数量[23]。本研究发现：6个月龄ERβ肠敲杂合子小鼠肠道组织中5-HT水平出现下调，纯合子小鼠下降



注：a，与6个月WT组相比，$P<0.05$；b，与12个月WT组相比，$P<0.05$；c，与6个月WT组相比，$P<0.05$；d，与12个月WT组相比，$P<0.05$；$n=3$，$\bar{x}\pm3$

图4　小鼠结肠内TPH1检测

更明显。与6个月龄小鼠相比，12个月龄的同组小鼠，随年龄增加，肠道5-HT均出现了下调，尤其是纯合子小鼠变化最为明显。本研究结果与脑内报道一致。有报道称，ERβ可能通过5HT1A及其下游GABA能神经传递的调节来调节5-HT水平。本研究还发现，无论是正常还是ERβ肠敲小鼠，12个月龄小鼠5-HT水平均比同组6个月龄小鼠更低。说明5-HT水平会受到年龄因素影响，目前未有相关报道。

TPH1作为一种参与5-HT合成的限速酶，由肠内分泌细胞和脂肪细胞等其他非神经细胞表达[24]。TPH1已被证实与消化系统疾病相关，在一项关于结直肠癌小鼠模型的研究中观察到小鼠TPH1水平显著升高，这可能会促进肠道炎症发生[25]。本实验结果表明，相较于野生型组，纯合子组小鼠结肠上皮的TPH1阳性细胞与蛋白水平均下降。有研究指出，ERβ的核转录因子可与靶基因的启动子区域结合，或与其他转录因子相互作用，从而以组织特异性方式增加或减少基因表达。研究人员通过对绝育猕猴进行雌激素处理，增加了猕猴中缝背核中TPH1基因的表达[23]。结果支持ERβ与TPH1的启动子区域或转录因子结合改变基因表达的观点。另有报道指出，人类TPH基因启动子区域鉴定非典型的cAMP，它可结合转录因子NFY和SP1，并允许通过cAMP调节TPH1表达和丝裂原激活蛋白激酶[26]。因此，TPH1表达的激素调节可能是通过这些信号级联的雌激素受体激活来间接进行的。

综上，本研究通过CRISPR/Cas9技术构建了ERβCKO小鼠，观察到肠道ERβ缺乏会引起肠道TPH1和5-HT含量下降，进而会对肠道疾病产生影

响，为临床上肠道相关疾病的防治提供了实验依据。未来，本课题组将深入研究结肠 ERβ 对 5-HT 合成与代谢相关通路的影响，以阐明肠道 ERβ 对 5-HT 的调控机制以及其与疾病的关联性，这可能为肠道疾病的临床治疗提供有效策略。

参 考 文 献

[1] Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, et al. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform[J]. Science, 2003, 299(5603):76.

[2] Booij L, Turecki G, Leyton M, et al. Tryptophan hydroxylase(2) gene polymorphisms predict brain serotonin synthesis in the orbitofrontal cortex in humans[J]. Mol Psychiatry, 2012, 17(8):809-817.

[3] Zhang XD, Beaulieu JM, Sotnikova TD, et al. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis[J]. Science, 2004, 305(5681):217.

[4] Freeman EW. Associations of depression with the transition to menopause[J]. Menopause, 2010, 17(4):823-827.

[5] 刘 畅，王 潇，刘 芳，等. 厚朴酚对便秘型肠易激综合征大鼠 5-HT 通路及肠道菌群的影响[J]. 中成药，2023，45(9)：3067-3072.

Liu C, Wang X, Liu F, et al. Effects of magnolol on 5-ht pathway and intestinal flora in rats with constipation irritable bowel syndrome[J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(9):3067-3072.

[6] Çaksen H. The effects of parental divorce on children[J]. Psychiatriki, 2022, 33(1):81-82.

[7] Cojocariu R, Ciobica A, Balmus IM, et al. Antioxidant capacity and behavioral relevance of a polyphenolic extract of *Chrysanthellum americanum* in a rat model of irritable bowel syndrome[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019:3492767.

[8] Zhang MJ, Liu YF, Zhao MS, et al. Depression and anxiety behaviour in a rat model of chronic migraine[J]. J Headache Pain, 2017, 18(1):27.

[9] Ye D, Xu HJ, Tang QL, et al. The role of 5-HT metabolism in cancer[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021, 1876(2):188618.

[10] Gao J, Xiong TT, Grabauskas G, et al. Mucosal serotonin reuptake transporter expression in irritable bowel syndrome is modulated by gut microbiota via mast cell-prostaglandin E2[J]. Gastroenterology, 2022, 162(7):1962-1974.

[11] Gundlah C, Alves SE, Clark JA, et al. Estrogen receptor-beta regulates tryptophan hydroxylase-1 expression in the murine midbrain raphe[J]. Biol Psychiatry, 2005, 57(8):938-942.

[12] 梅春霞，王嘉良，唐 楠，等. 应用雌激素受体β抑制剂建立肠道屏障受损的便秘动物模型[J]. 食品与发酵工业，2024，10(5)：35-41.

Mei CX, Wang JL, Tang N, et al. Establishment of constipation animal model with impaired intestinal barrier by estrogen receptorβinhibitors[J]. Food Ferment Ind, 2024, 10(5):35-41.

[13] 武 凤，刘俊岑，徐红丹，等. 补骨脂提取物对 APP/PS1 小鼠学习记忆能力及海马中雌激素受体表达的影响[J]. 中药材，2022，45(7)：1699-1704.

Wu F, Liu JC, Xu HD, et al. Effects of psoraleae fructus extract on learning and memory ability and estrogen receptor expression in hippocampus of APP/PS1 mice[J]. J Chin Med Mater, 2022, 45(7):1699-1704.

[14] Benmansour S, Privratsky AA, Adeniji OS, et al. Signaling mechanisms involved in the acute effects of estradiol on 5-HT clearance[J]. Int J Neuropsychopharmacol, 2014, 17(5):765-777.

[15] Wang B, Shi HX, Ren LY, et al. Ahi1 regulates serotonin production by the GR/ERβ/TPH2 pathway involving sexual differences in depressive behaviors[J]. Cell Commun Signal, 2022, 20(1):74.

[16] Donner N, Handa RJ. Estrogen receptor beta regulates the expression of tryptophan-hydroxylase 2 mRNA within serotonergic neurons of the rat dorsal raphe nuclei[J]. Neuroscience, 2009, 163(2):705-718.

[17] Bretsky PM, Buckwalter JG, Seeman TE, et al. Evidence for an interaction between apolipoprotein E genotype, gender, and Alzheimer disease[J]. Alzheimer Dis Assoc Disord, 1999, 13(4):216-221.

[18] Szőke H, Kovács Z, Bókkon I, et al. Gut dysbiosis and serotonin: intestinal 5-HT as a ubiquitous membrane permeability regulator in host tissues, organs, and the brain[J]. Rev Neurosci, 2020, 31(4):415-425.

[19] Dodds KN, Travis L, Kyloh MA, et al. The gut-brain axis: spatial relationship between spinal afferent nerves and 5-HT-containing enterochromaffin cells in mucosa of mouse colon[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2022, 322(5):G523-G533.

[20] Younes M, Honma N. Estrogen receptor B[J]. Arch Pathol Lab Med, 2011, 135(1):63-66.

[21] Principi M, Barone M, Pricci M, et al. Ulcerative colitis: from inflammation to cancer. Do estrogen receptors have a role?[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(33):11496-11504.

[22] Katzenellenbogen JA, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS. Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones[J]. Mol Endocrinol, 1996, 10(2):119-131.

[23] Pecins-Thompson M, Brown NA, Kohama SG, et al. Ovarian steroid regulation of tryptophan hydroxylase mRNA expression in rhesus macaques[J]. J Neurosci, 1996, 16(21):7021-7029.

[24] Côté F, Schussler N, Boularand S, et al. Involvement of NF-Y and Sp1 in basal and cAMP-stimulated transcriptional activation of the tryptophan hydroxylase (*TPH*) gene in the pineal gland[J]. J Neurochem, 2002, 81(4):673-685.

[25] Li T, Fu B, Zhang X, et al. Overproduction of gastrointestinal 5-HT promotes colitis-associated colorectal cancer progression via enhancing NLRP3 inflammasome activation[J]. Cancer Immunol Res, 2021, 9(9):1008-1023.

[26] Wood JL, Russo AF. Autoregulation of cell-specific MAP kinase control of the tryptophan hydroxylase promoter[J]. J Biol Chem, 2001, 276(24):21262-21271.

（责任编辑：曾 玲）

本文引用格式：

呼文强，杨千嬉，贺桂琼，等. 利用 CRISPR-Cas9 技术探究肠道 ERβ 对肠源性 TPH1 和 5-HT 水平的影响[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(1)：37-43.