

核转录因子- κ B/ β -连环蛋白信号通路介导肠产毒性大肠杆菌引致 IPEC-J2 细胞损伤

窦彩霞¹ 李海花² 孙泽阳¹ 王倩¹ 尚智援¹ 乔家运^{1*}

(1.天津师范大学生命科学学院天津市动植物抗性重点实验室,天津 300387;2.天津农学院动物科学与动物医学学院,天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室,天津 300384)

摘要: 本试验旨在探讨肠产毒性大肠杆菌 (ETEC) 造成 IPEC-J2 细胞损伤的分子机制。ETEC K88 感染、核转录因子- κ B (NF- κ B) 抑制剂处理 IPEC-J2 细胞以及小干扰 RNA (siRNA) 沉默 IPEC-J2 细胞中 β -连环蛋白 (β -catenin) 基因的表达后,采用定量 PCR (qPCR) 法检测细胞中 NF- κ B、闭锁小带蛋白-1 (ZO-1)、闭锁蛋白 (occludin)、Toll 样受体 2 (TLR2)、Toll 样受体 4 (TLR4)、 β -连环蛋白 (β -catenin)、细胞周期蛋白 D1 (cyclin D1) 和人类细胞增生原癌基因 (*c-Myc*) 的 mRNA 表达量,用 Western blotting 法检测细胞中 ZO-1、occludin 的蛋白表达量和 p65 NF- κ B 的磷酸化水平,用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法检测细胞培养上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-8 (IL-8) 含量和乳酸脱氢酶 (LDH) 活性。结果表明:ETEC K88 作用细胞 6 或 24 h 时,ZO-1 和 occludin 的蛋白表达量以及 β -catenin 和 *c-Myc* 的 mRNA 表达量均极显著降低 ($P < 0.01$),TNF- α 、IL-8 含量和 LDH 活性显著上升 ($P < 0.05$),p65 NF- κ B 的磷酸化水平在 ETEC K88 作用细胞 1、3 和 6 h 时均极显著上升 ($P < 0.01$),TLR2、TLR4 的 mRNA 表达量在 ETEC K88 作用细胞 6 和 12 h 时均极显著上升 ($P < 0.01$)。NF- κ B 被抑制后,TNF- α 、IL-8 和 LDH 的活性均极显著降低 ($P < 0.01$),ZO-1 和 occludin 的蛋白表达量以及 NF- κ B 的 mRNA 表达量均极显著升高 ($P < 0.01$)。siRNA 沉默 β -catenin 基因后,各时间点 β -catenin、cyclin D1 和 *c-Myc* 的 mRNA 表达量均极显著降低 ($P < 0.01$),LDH 的活性显著上升 ($P < 0.05$)。综上所述,ETEC K88 通过上调 NF- κ B 信号通路引起炎症反应,下调 β -catenin 信号通路活化抑制 IPEC-J2 细胞的增殖,从而诱导 IPEC-J2 细胞损伤。

关键词: ETEC K88; IPEC-J2 细胞; NF- κ B 信号通路; β -catenin 信号通路

中图分类号: S828

文献标识码: A

文章编号: 1006-267X(2020)12-5893-10

肠产毒性大肠杆菌 (ETEC) 是引起仔猪腹泻的主要致病菌之一^[1],ETEC 通过多种类型的菌毛黏附素与小肠黏膜上皮细胞的微绒毛和细胞表面的受体相结合,从而在肠道内大量繁殖,释放肠毒素引致腹泻^[2],同时可损伤肠上皮细胞结构的完整性、增加肠道的通透性^[3-4]。闭锁小带蛋白-1 (ZO-1) 和闭锁蛋白 (occludin) 是构成肠上皮细胞

紧密连接结构的重要蛋白,能够有效封闭细胞间隙,阻止病原菌侵入,紧密连接蛋白的表达异常将导致肠道屏障功能损伤、肠道通透性增加。现有研究表明,ETEC 通常会引起肠黏膜发炎和上皮细胞凋亡,随后导致肠内稳态和肠屏障功能的破坏^[5]。核转录因子- κ B (NF- κ B) 是一种多亚基核转录因子,在许多基因的调控中起重要作用,包括

收稿日期:2020-05-13

基金项目:天津市自然科学基金项目 (18JCYBJC30000);天津市自然科学基金项目“Wnt/ β -catenin 信号通路介导嗜酸乳杆菌调节仔猪肠黏膜上皮屏障功能的分子机制”;天津市“131”创新型人才团队 (20180338);天津市高校“学科领军人才培养计划”

作者简介:窦彩霞 (1995—),女,山西大同人,硕士研究生,研究方向为动物营养与饲料。E-mail: 1490191412@qq.com

* 通信作者:乔家运,研究员,硕士生导师,E-mail: qiaojy1979@126.com

参与免疫和炎症、促进或抑制趋化性及相关凋亡蛋白的表达、细胞增殖以及肿瘤发生^[6]。有研究表明,当细胞被炎症介质或氧化应激等因素诱导时,NF- κ B 进入细胞核调节细胞因子和炎症介质的表达,从而调节组织和细胞的生理和病理过程^[7]。Toll 样受体(TLR)是一种先天性免疫模式识别受体,其中 TLR2 和 TLR4 主要参与细菌及其产物的识别,一旦被激活就会通过信号级联反应激活其通路中关键分子 NF- κ B,进而产生肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素(IL)等免疫分子,调节机体炎症反应^[8]。Kim 等^[9]已经证实 TNF- α 诱导的相关促炎因子能在肠上皮细胞中过度表达和分泌。很少有研究检测肠部位 TLR 介导的细胞因子对 ETEC 感染的反应。本课题组前期研究发现,ETEC 处理显著增加了断奶仔猪肠系膜淋巴结中 TLR2 和 TLR4 的 mRNA 表达量以及血清中 TNF- α 、IL-8 的含量^[10]。

Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)信号通路在调节细胞增殖、极性、凋亡以及组织的内环境平衡中起着重要作用^[11],在肠上皮中,Wnt 信号通路促进肠隐窝中干细胞的增殖和分化^[12]。 β -catenin 是 Wnt/ β -catenin 信号通路的核心转录因子, β -catenin 一旦被激活便转位到细胞核,启动人髓细胞增生原癌基因(*c-Myc*)和细胞周期蛋白 D1(*cyclin D1*)等 Wnt 特异性基因的转录,从而促进细胞增殖,有助于受损细胞的修复^[13-14]。脂多糖(LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁的组成成分,是大肠杆菌致病的主要因素,可引起机体的炎症反应。Shu 等^[15]研究表明,LPS 能够激活小鼠软骨细胞 ATDC5 中 NF- κ B 信号通路产生炎症反应,同时 LPS 刺激显著降低细胞中 β -catenin、*c-Myc* 和 *cyclin D1* 的蛋白表达量。

由此可见,LPS 能够通过 NF- κ B/ β -catenin 信号通路影响细胞生理功能。然而,NF- κ B/ β -catenin 信号通路是否参与 ETEC 引起的细胞损伤目前尚不清楚。因此,本试验拟通过 ETEC 感染建立 IPEC-J2 细胞炎症损伤模型,研究 ETEC 感染 IPEC-J2 细胞后对细胞中紧密连接蛋白、TLR、 β -catenin、*c-Myc* 和 *cyclin D1* 的 mRNA 表达量以及细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-8 含量和 LDH 活性的影响,并基于 NF- κ B/ β -catenin 信号通路研究 ETEC 引起 IPEC-J2 细胞损伤的分子机制,为有效改善仔猪肠道屏障功能奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞和菌株

IPEC-J2 细胞购于上海某生物工程有限公司,ETEC K88 为天津农学院动物科学与动物医学学院实验室保存菌株。

1.2 主要试剂

RPMI 1640 基础培养基、0.25% 胰酶-乙二胺四乙酸(EDTA)胎牛血清(FBS)均购自 Gibco 公司;青链霉素、二甲基亚砷(DMSO)和辣根过氧化物酶(HRP)-山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)均购自北京索莱宝生物公司;IL-8、TNF- α 、LDH 检测试剂盒均购自美国 BD 公司;RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒均购自美国 GeneCpocia 公司;BAY11-7082 购自 Sigma-Aldrich 公司; β -catenin 干扰 RNA 由上海生工生物工程有限公司合成;兔抗 ZO-1 多抗和兔抗 occludin 单抗均购自 Abcam 公司;兔抗 NF- κ B p65 和磷酸化 NF- κ B p65(p-NF- κ B p65)单抗均购自 Cell Signaling 公司。

1.3 细胞培养及处理

将复苏后的 IPEC-J2 用含 10% 胎牛血清、1% 青链霉素的 RPMI 1640 培养基培养,将生长至对数生长期的细胞接种于 6 孔细胞培养板中,待细胞融合度达到 80% (细胞浓度为 2×10^6 个/孔),在培养基中加入浓度为 1×10^3 CFU/mL 的 ETEC K88 刺激细胞,同时以未经 ETEC K88 处理的细胞作为对照组,每组设 3 个重复。作用一定时间后,收集细胞培养上清液及细胞,于 -80°C 保存备用。

1.4 细胞培养上清液中 IL-8、TNF- α 含量和 LDH 活性的测定

按照相应的酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒说明书检测细胞培养上清液中 IL-8、TNF- α 含量和 LDH 活性。

1.5 细胞中紧密连接蛋白表达量的测定

将裂解后的细胞与上样缓冲液充分混匀后煮沸 10 min,即为待测蛋白样品。待测蛋白样品经 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,参考 Li 等^[16]的方法进行 Western blotting 试验以鉴定目的蛋白的表达,其中一抗用兔抗 ZO-1 多克隆抗体、兔抗 occludin 单克隆抗体、兔抗 NF- κ B p65 单克隆抗体和兔抗 p-NF- κ B p65 克隆抗体,二抗选用

HRP 标记的山羊抗兔 IgG。使用 Gel-Pro analyzer 软件分析各组条带浓度,并进行定量分析。

1.6 细胞中 NF- κ B/ β -catenin 信号通路相关基因 mRNA 表达量的测定

按照 Taco 公司的核酸提取试剂盒说明书对细胞进行 RNA 的提取。根据反转录试剂盒说明书对 RNA 进行反转录。将 RNA 反转录产物 cDNA 作为模板进行定量分析。以甘油醛-3-磷酸

脱氢酶(*GAPDH*)为内参基因,参考李海花等^[17]的方法检测目的基因的 mRNA 表达量。

参考文献设计 *ZO-1*^[18]、*occludin*^[18]、*TLR2*^[19]、*TLR4*^[19] 和 *GAPDH*^[19] 的引物。在 NCBI 上搜索猪 *NF- κ B*、 *β -catenin*、*cyclin D1* 和 *c-Myc* 基因的全序列,使用 Primer Premier 5 软件设计特异性引物(表 1),引物序列均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 引物序列信息

Table 1 Primer sequence information

基因名称 Gene names	引物序列 Primer sequence (5'—3')	片段大小 Product size/bp	退火温度 Annealing temperature/°C
核转录因子- κ B <i>NF-κB</i>	F: AGTACCCTGAGGCTATAACTCG R: TGAGAAGTCCATGTCCGCAAT	146	62
β -连环蛋白 β -catenin	F: AGACAGAAAAGCGGCTGTTAGTCAC R: CCTCTTCTTCAGGATTGCCTTTACC	119	64
细胞周期蛋白 D1 <i>cyclin D1</i>	F: TGGAGCCCGTGAAAAAGAGC R: GATGGAGTTGTCTGGTGTAGATGC	125	64
人髓细胞增生原癌基因 <i>c-Myc</i>	F: CCCTACCCGCTCAACGACA R: GAGCCAAGGGTTCGGGACT	113	64

1.7 NF- κ B 信号通路的抑制

将 IPEC-J2 细胞接种至 6 孔细胞培养板中,待细胞贴壁后,用 DMSO 溶解 BAY11-7082 (NF- κ B 抑制剂),用终浓度为 10 μ mol/L^[20] 的 NF- κ B 抑制剂处理细胞 1 h,再用 1×10^3 CFU/mL 的 ETEC K88 分别刺激 IPEC-J2 细胞 6 和 24 h。试验设空白对照组(Control 组)、仅用 ETEC K88 感染细胞组(ETEC 组)、用 NF- κ B 抑制剂处理细胞后再添加 ETEC K88 感染细胞组(Inhibitor+ETEC 组)、仅用 10 μ mol/L DMSO 处理细胞组(DMSO 组)、用 10 μ mol/L DMSO 处理细胞后再用 ETEC K88 感染细胞组(DMSO+ETEC 组),每组设 3 个重复。收集细胞培养上清液及细胞后按照 1.6 方法提取细胞 RNA 并反转录。按照 1.6 的方法分析细胞中 *ZO-1*、*occludin* 和 *NF- κ B* 的 mRNA 表达量,按照 1.4 的方法检测细胞培养上清液中 IL-8、TNF- α 含量和 LDH 活性。

1.8 细胞转染

猪 β -catenin 干扰序列:正向 5' - GC-CCAUGAUGUCUCUGUTT - 3' 和反向 5' - AU-

CAGAGAUGAUGGCTT - 3' 序列委托生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成。将 IPEC-J2 细胞接种至 6 孔细胞培养板,待细胞贴壁后,用 β -catenin 的小干扰 RNA (siRNA) 处理细胞 6 h,再用完全培养基培养 18 h 后用 1×10^3 CFU/mL 的 ETEC K88 分别刺激 IPEC-J2 细胞 6 和 24 h。试验设空白对照组(Control 组)、转染阴性对照组(NC 组)、用 siRNA 处理细胞组(siRNA 组)、用 siRNA 处理细胞后再用 ETEC K88 感染细胞组(siRNA+ETEC 组)、用转染阴性对照处理细胞后再用 ETEC K88 感染细胞组(NC+ETEC 组),每组设 3 个重复。收集细胞及其培养上清液,按照 1.6 的方法分析细胞中 β -catenin、*cyclin D1* 和 *c-Myc* 的 mRNA 表达量,按照 1.4 的方法检测细胞培养上清液中 LDH 活性。

1.9 数据处理与分析

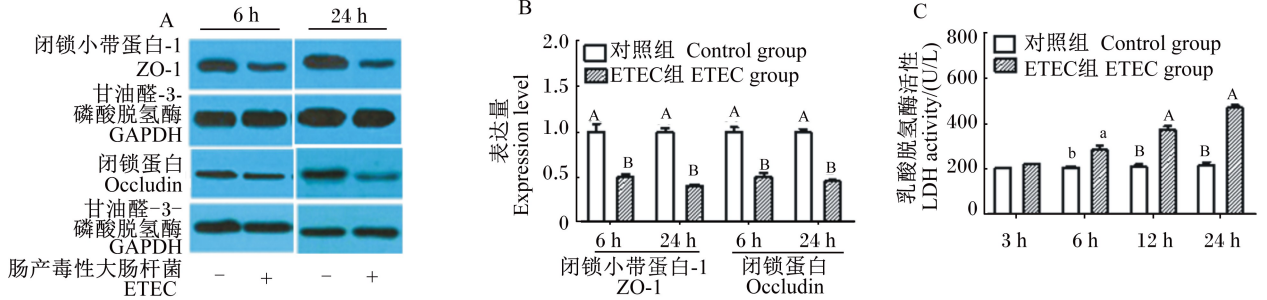
使用 Excel 2016 软件对数据进行初步处理,采用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA),用 *t* 检验进行组间差异性分析,以 $P < 0.05$ 作为差异显著性判断标准。

2 结果与分析

2.1 ETEC K88 对 IPEC-J2 细胞的影响

由图 1 可知,与对照组相比,ETEC 组紧密连接蛋白 ZO-1 和 occludin 的蛋白表达量在 6 和 24 h 时均极显著降低 ($P < 0.01$) (图 1-A、图 1-B);

ETEC 组 LDH 活性在 3 h 时无显著变化 ($P > 0.05$),在 6 h 时显著升高 ($P < 0.05$),在 12 和 24 h 时极显著升高 ($P < 0.01$) (图 1-C)。上述结果表明,ETEC K88 能引起紧密连接蛋白表达量降低、LDH 活性升高,破坏细胞紧密连接的屏障作用引起 IPEC-J2 细胞损伤。



数据柱上标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。下图同。

Value columns with different small letters mean significant difference ($P < 0.05$), while with different capital letters mean extremely significant difference ($P < 0.01$). The same as below.

图 1 ETEC K88 对紧密连接蛋白表达量 (A、B) 和 LDH 活性 (C) 的影响

Fig.1 Effects of ETEC K88 on tight junction protein expression levels (A and B) and LDH activity (C)

2.2 ETEC K88 对 NF- κ B 信号通路的影响

由图 2 可知,与对照组相比,ETEC 组 *TLR2* 的 mRNA 表达量在 3 h 时没有显著变化 ($P > 0.05$),在 6 和 12 h 时极显著上升 ($P < 0.01$),*TLR4* 的 mRNA 表达量在 3、6 和 12 h 时均极显著上升 ($P < 0.01$) (图 2-A)。与对照组相比,ETEC 组 TNF- α 含量在 6、12 和 24 h 时均极显著上升 ($P < 0.01$),

且呈现时间依赖性 (图 2-B);ETEC 组 IL-8 含量在 3 h 时无显著变化 ($P > 0.05$),在 6、12 和 24 h 时均极显著升高 ($P < 0.01$) (图 2-C)。p65 NF- κ B 的磷酸化水平在 1、3 和 6 h 时均极显著上升 ($P < 0.01$) (图 2-D、图 2-E)。这说明 ETEC K88 处理增加了细胞 *TLR2* 和 *TLR4* 的 mRNA 表达量,从而激活 NF- κ B 信号通路,刺激下游促炎性细胞因子的释放。

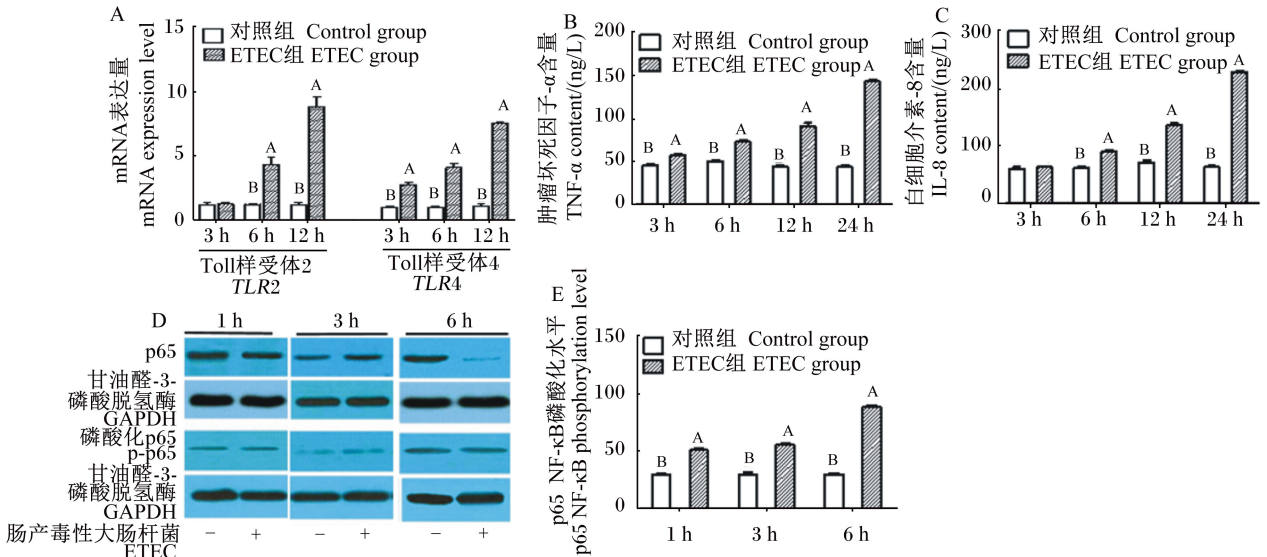


图 2 ETEC K88 对 NF- κ B 信号通路的影响

Fig.2 Effects of ETEC K88 on NF- κ B signaling pathway

2.3 抑制 NF- κ B 信号通路对 ETEC K88 引起的 IPEC-J2 细胞损伤的影响

由图 3 可知,与 Control 组相比,DMSO 组 NF- κ B 的 mRNA 表达量在 6 h 时无显著变化 ($P > 0.05$) (图 3-A),ZO-1 (图 3-B) 和 occludin 的 mRNA 表达量 (图 3-C) 及 TNF- α (图 3-E) 和 IL-8 的含量 (图 3-F) 在 6 和 24 h 时均无显著变化 ($P > 0.05$),LDH 的活性在 24 h 时亦无显著变化 ($P > 0.05$) (图 3-D)。与 Control 组相比,ETEC 组 NF- κ B 的 mRNA 表达量在 6 h 时极显著降低 ($P < 0.01$),ZO-1 的 mRNA 表达量及 TNF- α 、IL-8 的含

量和 LDH 的活性在各时间点均无显著变化 ($P > 0.05$)。与 Control 组相比,DMSO+ETEC 组 NF- κ B 的 mRNA 表达量及 TNF- α 、IL-8 的含量和 LDH 的活性在各时间点均极显著升高 ($P < 0.01$),ZO-1 和 occludin 的 mRNA 表达量在各时间点均极显著降低 ($P < 0.01$)。与 DMSO+ETEC 组相比,Inhibitor+ETEC 组 TNF- α 、IL-8 的含量和 LDH 的活性在各时间点均极显著降低 ($P < 0.01$),ZO-1、occludin 和 NF- κ B 的 mRNA 表达量在各时间点均极显著升高 ($P < 0.01$)。上述结果表明,抑制 NF- κ B 信号通路可降低 ETEC K88 引起的 IPEC-J2 细胞损伤。

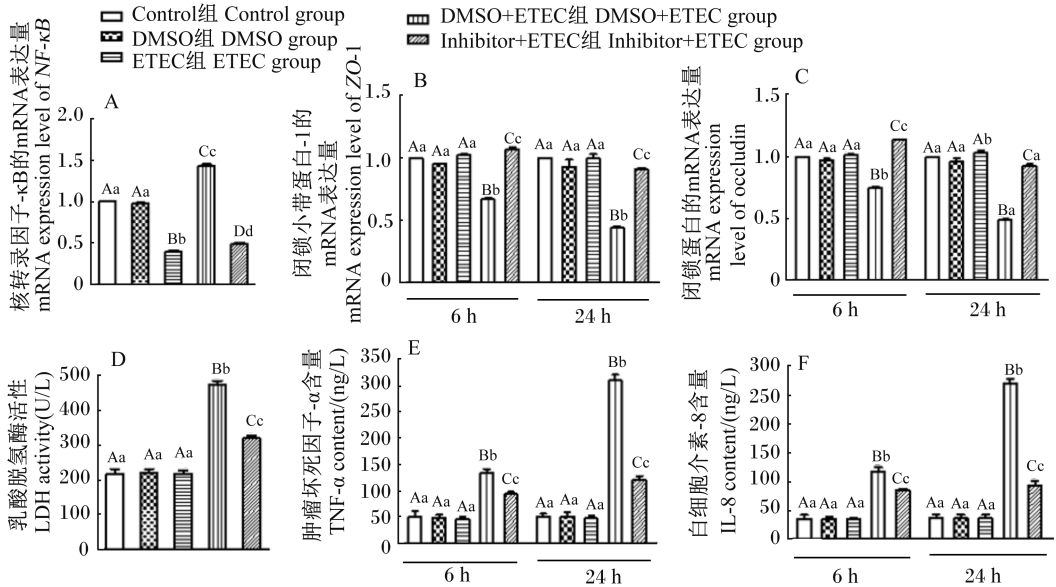


图 3 NF- κ B 信号通路在 ETEC K88 引起的 IPEC-J2 细胞损伤中的作用

Fig.3 Role of NF- κ B signaling pathway in IPEC-J2 cell injury caused by ETEC K88

2.4 ETEC K88 对 β -catenin 信号通路的影响

由图 4 可知,与对照组相比,ETEC 组 cyclin D1 的 mRNA 表达量在 6 和 12 h 时分别显著 ($P < 0.05$) 和极显著降低 ($P < 0.01$) (图 4-A), β -catenin 和 *c-Myc* 的 mRNA 表达量在 6 和 24 h 时

均极显著降低 ($P < 0.01$) (图 4-B、图 4-C)。这说明 ETEC K88 通过抑制 β -catenin 信号通路的活化,降低 β -catenin、cyclin D1 和 *c-Myc* 的 mRNA 表达量,引起 IPEC-J2 细胞损伤。

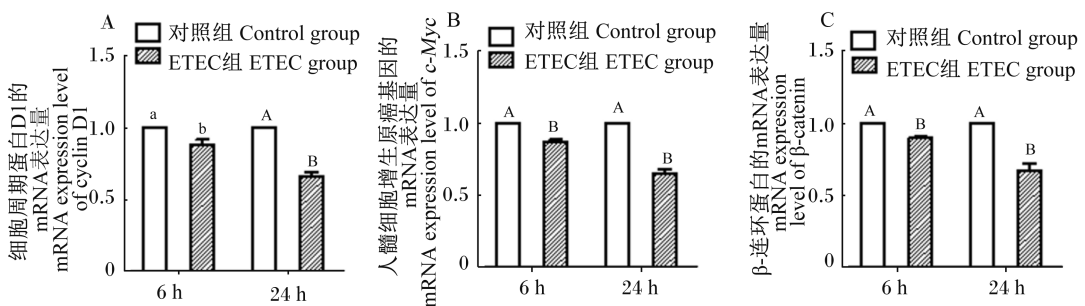


图 4 ETEC K88 对 β -catenin 信号通路的影响

Fig.4 Effects of ETEC K88 on β -catenin signaling pathway

2.5 β -catenin 基因沉默对 ETEC K88 引起的 IPEC-J2 细胞损伤的影响

由图 5 可知,与 Control 组相比,NC 组 cyclin D1(图 5-A)、 β -catenin(图 5-B)和 *c-Myc* 的 mRNA 表达量(图 5-C)在 6 和 24 h 时均无显著变化($P>0.05$),LDH 的活性在 24 h 时亦无显著变化($P>0.05$)(图 5-D)。与 Control 组相比,siRNA

组和 siRNA+ETEC 组 cyclin D1、 β -catenin 和 *c-Myc* 的 mRNA 表达量在各时间点均极显著降低($P<0.01$),LDH 的活性在各时间点均极显著升高($P<0.01$)。与 NC+ETEC 组相比,siRNA+ETEC 组 cyclin D1、 β -catenin 和 *c-Myc* 的 mRNA 表达量在各时间点均极显著降低($P<0.01$),LDH 的活性在各时间点均显著上升($P<0.05$)。

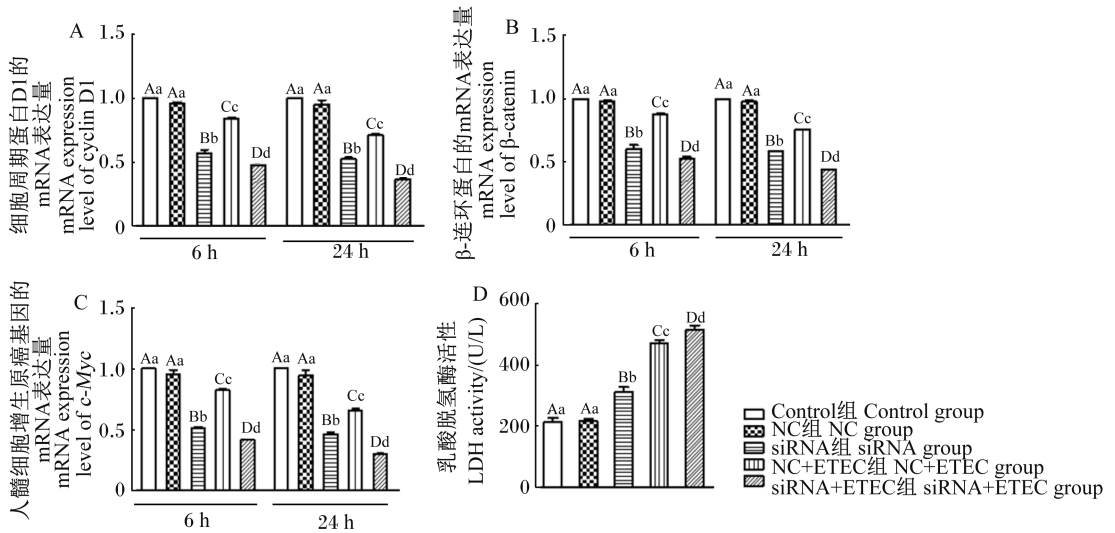


图 5 β -catenin 信号通路在 ETEC K88 引起的 IPEC-J2 细胞损伤中的作用

Fig.5 Role of β -catenin signaling pathway in IPEC-J2 cell injury caused by ETEC K88

3 讨论

肠道不仅是营养物质消化吸收的场所,而且是抵抗外部环境的重要防御线^[21]。仔猪肠道完整性在抵抗细菌感染和为生物体提供营养方面发挥着关键作用,肠道通透性增加会导致许多器官的功能障碍^[22]。肠道上皮细胞的完整性和通透性主要取决于细胞间的紧密连接作用。其中,ZO-1 和 occludin 是构成紧密连接结构和功能的重要蛋白^[23-24]。这 2 种重要蛋白表达的减少或结构损伤会破坏肠道的屏障功能,导致肠道的通透性增加^[25]。致病性大肠杆菌由 ETEC K88、肠致病性大肠杆菌 (EPEC) 和产志贺毒素大肠杆菌 (ESIEC) 等组成,其中 ETEC K88 是引起仔猪腹泻最主要的致病菌^[26]。但是,ETEC K88 引起 IPEC-J2 细胞炎症和对 IPEC-J2 细胞增殖影响的分子机制尚不清楚。本研究发现,ETEC K88 感染导致 IPEC-J2 细胞中 ZO-1 和 occludin 的蛋白表达量降低,这与 Yi 等^[27]的研究结果一致,表明 ETEC

K88 能破坏肠道屏障功能,增加肠道的通透性。此外,Li 等^[16]证明经 ETEC K88 处理的断奶仔猪也得到了同样的结果。LDH 是细胞内的酶,正常情况下细胞外的活性很低,但是当细胞受损时 LDH 就会从细胞内释放出来,因此可以用细胞培养上清液中 LDH 的活性来评价细胞的损伤情况^[28]。Wu 等^[29]报道,LPS 处理增加了 IPEC-J2 细胞中 LDH 的释放。本研究发现,ETEC K88 感染导致 IPEC-J2 细胞培养上清液中 LDH 的活性增加且呈时间依赖性,表明培养时间越长细胞受损越严重。

NF- κ B 是一种多亚基核转录因子,可启动不同细胞因子和趋化因子的转录。在健康状态下,非活性形式的 NF- κ B 复合物通过与其抑制物核因子- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α) 非共价相互作用被隔离在细胞质中^[30]。TLR 是一种在多种组织和细胞中广泛表达的免疫受体^[31]。TLR 信号通路一旦被病原菌激活,I κ B α 就会解除对 NF- κ B 的束缚,导致 NF- κ B 的核易位^[32],进入胞核内的 NF- κ B 启

动核内相关基因表达,产生相应的 mRNA,合成细胞因子,如 IL-8 和 TNF- α 等,最终释放到胞外,引起炎症反应。有研究表明,ETEC 的 LPS 可通过识别 TLR4 和引发 TLR4 来触发炎症反应,从而激活 NF- κ B 信号途径,导致促炎性细胞因子分泌增加^[33]。TLR/NF- κ B 信号通路在 ETEC K88 引起 IPEC-J2 细胞炎症反应中的作用尚不明确。为了探明 NF- κ B 信号通路在 ETEC K88 感染 IPEC-J2 细胞产生炎症反应的作用,本试验在 ETEC K88 感染 IPEC-J2 细胞后,检测了细胞中 NF- κ B、TLR2 和 TLR4 的 mRNA 表达量以及细胞培养上清液中 TNF- α 和 IL-8 含量的变化,发现 ETEC K88 可诱导 IPEC-J2 细胞大量表达 NF- κ B、TLR2 和 TLR4,且其 mRNA 表达量与细胞培养上清液中 TNF- α 和 IL-8 含量呈正相关。与此相似,Sargeant 等^[34]研究发现,ETEC 感染显著增加了 IPEC-J2 细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-8 的含量以及细胞中 TLR4 的 mRNA 表达量。Lan 等^[35]的研究同样表明,LPS 上调了 IPEC-J2 细胞中 TLR4 的 mRNA 表达量,降低了细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-8 的含量,同时紧密连接蛋白的表达量也有所下降。IL-8 是一种白细胞趋化激活细胞因子,由各种类型的细胞在受到炎症刺激后产生,并在白细胞尤其是中性粒细胞中发挥多种功能^[36]。因此,推测 ETEC K88 感染 IPEC-J2 细胞后细胞中白细胞增多,引起炎症反应,造成细胞损伤,可能与细胞因子 TNF- α 和 IL-8 的分泌增加有关。

当前,NF- κ B 信号通路的抑制对 IPEC-J2 细胞影响的相关研究较少,仅 Shi 等^[37]用 TLR4 抑制剂预处理 IPEC-J2 细胞后发现,LPS 诱导的 NF- κ B 信号通路激活受到了一定程度的抑制,促炎性细胞因子含量显著降低,表明 LPS 诱导 IPEC-J2 相比过度分泌促炎性细胞因子是 TLR4/NF- κ B 信号通路的重要机制。此外,彭成璐等^[38]的研究表明,添加 NF- κ B 抑制剂后 IPEC-J2 细胞的存活率及贴壁细胞数量显著提高。本研究发现,利用 NF- κ B 抑制剂处理 IPEC-J2 细胞后,细胞中 NF- κ B 的 mRNA 表达量与对照组相比显著降低,说明 NF- κ B 抑制剂抑制了细胞中 NF- κ B 的活化;与 DMSO+ETEC 组相比,抑制剂+ETEC 组细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-8 含量和 LDH 活性均极显著降低,ZO-1、occludin 和 NF- κ B 的 mRNA 表达量均极显著升高。本试验研究结果证明了 TLR 是通过激活

NF- κ B 信号通路而诱导促炎性细胞因子的产生,进而引起机体炎症反应,破坏紧密连接结构,引起肠黏膜屏障通透性的改变,最终造成 IPEC-J2 细胞损伤。

Wnt 信号通路是高度进化保守的,可调节细胞增殖和细胞形态等多个生物学过程^[39]。 β -catenin 是经典 Wnt/ β -catenin 信号通路中的中心介质,是将信号传递到细胞核,启动 Wnt 特异性基因转录并决定各种细胞和组织特异性的重要因子^[13]。c-Myc 和 cyclin D1 参与细胞和组织的广泛发育,是细胞增殖的关键下游效应因子^[14]。有研究发现,cyclin D1 和 c-Myc 是 Wnt/ β -catenin 信号通路重要的调控因子,当这个信号通路被激活时,大量的 β -catenin 进入细胞质和细胞核中,促进下游 cyclin D1 和 c-Myc 基因的表达,从而促进细胞增殖^[40]。据报道, β -catenin 表达量增加对肠道细胞增殖有促进作用^[41]。当前,有关 β -catenin 信号通路在 ETEC K88 引起的 IPEC-J2 细胞损伤中的作用的研究还未见报道。鉴于此,本试验检测了 ETEC K88 感染 IPEC-J2 细胞后 β -catenin、cyclin D1 和 c-Myc 基因的表达情况,发现 ETEC K88 感染 IPEC-J2 细胞 6 和 24 h 时 β -catenin、cyclin D1 和 c-Myc 的 mRNA 表达量均显著降低。本研究结果显示,用 siRNA 干扰 β -catenin 基因后再用 ETEC K88 处理细胞,细胞中 β -catenin、cyclin D1 和 c-Myc 的 mRNA 表达量均极显著降低,细胞培养上清液中 LDH 的活性显著上升。Fan 等^[42]和 Li 等^[43]研究均发现,激活 Wnt/ β -catenin 信号通路能刺激 IPEC-J2 细胞增殖,抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路可抑制 IPEC-J2 细胞增殖。这些结果提示,ETEC K88 通过抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化,降低 β -catenin、cyclin D1 和 c-Myc 的 mRNA 表达量,引起 IPEC-J2 细胞损伤,Wnt/ β -catenin 信号通路在机体抗炎反应中发挥着重要的调节作用。

4 结 论

综上所述,ETEC K88 通过上调 NF- κ B 信号通路引起炎症反应,下调 β -catenin 信号通路活化抑制细胞增殖,从而诱导 IPEC-J2 细胞损伤。

参考文献:

[1] XU Y T, LAHAYE L, KE Z X, et al. 137 Effects of

- micro-encapsulated formula of organic acids and essential oils on performance and gut integrity of weaned piglets challenged with ETEC K88[J]. *Journal of Animal Science*, 2019, 97(Suppl.2): 77-78.
- [2] OSEK J. Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning[J]. *Veterinary Microbiology*, 1999, 68(3/4): 209-217.
- [3] ZKANG W P, ZHAO M J, RUESCH L, et al. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US[J]. *Veterinary Microbiology*, 2007, 123(1/2/3): 145-152.
- [4] NABUURS M J, HOOGENDOORN A, VAN ZIJDE-RVELD F G. Effects of weaning and enterotoxigenic *Escherichia coli* on net absorption in the small intestine of pigs[J]. *Research in Veterinary Science*, 1994, 56(3): 379-385.
- [5] SCHMIDT H, SECCHI A, WELLMANN R, et al. Effect of endotoxemia on intestinal villus microcirculation in rats[J]. *Journal of Surgical Research*, 1996, 61(2): 521-526.
- [6] WON S, SAYEED I, PETERSON B L, et al. Vitamin D prevents hypoxia/reoxygenation-induced blood-brain barrier disruption via vitamin D receptor-mediated NF- κ B signaling pathways[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0122821.
- [7] ZHAO W T, SUN Z W, WANG S, et al. Wnt1 participates in inflammation induced by lipopolysaccharide through upregulating scavenger receptor A and NF- κ B[J]. *Inflammation*, 2015, 38(4): 1700-1706.
- [8] WU J, NIU P, ZHAO Y Q, et al. Impact of miR-223-3P and miR-2909 on inflammatory factors IL-6, IL-1 β , and TNF- α , and the TLR4/TLR2/NF- κ B/STAT3 signaling pathway induced by lipopolysaccharide in human adipose stem cells[J]. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0212063.
- [9] KIM J A, KIM D K, KANG O H, et al. Inhibitory effect of luteolin on TNF- α -induced IL-8 production in human colon epithelial cells[J]. *International Immunopharmacology*, 2005, 5(1): 209-217.
- [10] LI H H, ZHANG L, CHEN L B, et al. *Lactobacillus acidophilus* alleviates the inflammatory response to enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 via inhibition of the NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in piglets[J]. *BMC Microbiology*, 2016, 16(1): 273.
- [11] KAGER L, TAMAMYAN G, BIELACK S. Novel insights and therapeutic interventions for pediatric osteosarcoma[J]. *Future Oncology*, 2017, 13(4): 357-378.
- [12] SEBIO A, KAHN M, LENZ H J. The potential of targeting Wnt/ β -catenin in colon cancer[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2014, 18(6): 611-615.
- [13] KUMAWAT K, KOOPMANS T, GOSENS R. β -catenin as a regulator and therapeutic target for asthmatic airway remodeling[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2014, 18(9): 1023-1034.
- [14] ROY P G, THOMPSON A M. Cyclin D1 and breast cancer[J]. *The Breast*, 2006, 15(6): 718-727.
- [15] SHU Y, LONG J P, GUO W X, et al. MicroRN-195-5P inhibitor prevents the development of osteoarthritis by targeting REG γ [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2019, 19(6): 4561-4568.
- [16] LI H H, LI Y P, ZHU Q, et al. Dietary supplementation with *Clostridium butyricum* helps to improve the intestinal barrier function of weaned piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 125(4): 964-975.
- [17] 李海花, 张蕾, 杨春蕾, 等. PCV2 通过 NF- κ B/NLRP3 信号通路调控体外培养 PAMs 分泌 IL-1 β [J]. *中国畜牧兽医*, 2016, 43(9): 2366-2372.
- [18] 李海花, 李玉鹏, 王柳懿, 等. 丁酸梭菌对 2 种遗传背景仔猪肠道屏障功能的影响及其分子机制[J]. *动物营养学报*, 2019, 31(10): 4647-4658.
- [19] 李海花, 朱琪, 王世琼, 等. 产肠毒素大肠杆菌 K88 诱导仔猪炎症反应的分子机制[J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(1): 262-267.
- [20] XIA Z B, MENG F R, FANG Y X, et al. Inhibition of NF- κ B signaling pathway induces apoptosis and suppresses proliferation and angiogenesis of human fibroblast-like synovial cells in rheumatoid arthritis[J]. *Medicine*, 2018, 97(23): e10920.
- [21] DOU X J, HAN J L, SONG W T, et al. Sodium butyrate improves porcine host defense peptide expression and relieves the inflammatory response upon Toll-like receptor 2 activation and histone deacetylase inhibition in porcine kidney cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(16): 26532-26551.
- [22] CHELAKKOT C, GHIM J, RYU S H. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2018, 50(8): 103.

- [23] FOSSUM C. Cytokines as markers for infections and their effect on growth performance and well-being in the pig [J]. *Domestic Animal Endocrinology*, 1998, 15 (5): 439-444.
- [24] TURNER J R. Molecular basis of epithelial barrier regulation; from basic mechanisms to clinical application [J]. *The American Journal of Pathology*, 2006, 169 (6): 1901-1909.
- [25] MÜLLER SL, PORTWICH M, SCHMIDT A, et al. The tight junction protein occludin and the adherens junction protein α -catenin share a common interaction mechanism with ZO-1 [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280 (5): 3747-3756.
- [26] 黄登桂, 周加义, 高春起, 等. 产肠毒素大肠杆菌对仔猪肠道黏膜屏障功能的影响及其损伤修复研究进展 [J]. *动物营养学报*, 2019, 31 (1): 48-56.
- [27] YI H B, WANG L, XIONG Y X, et al. *Lactobacillus reuteri* LRI improved expression of genes of tight junction proteins via the MLCK pathway in IPEC-1 cells during infection with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 [J]. *Mediators of Inflammation*, 2018, 2018: 6434910.
- [28] 王如波, 张勇, 戴哲娟, 等. DFMG 调节 TLR4-MyD88 信号转导保护内皮细胞受损 [J]. *湖南师范大学学报(医学版)*, 2018, 15 (2): 1-5.
- [29] WU J, YANG C L, SHA Y K, et al. Koumine alleviates lipopolysaccharide-induced intestinal barrier dysfunction in IPEC-J2 cells by regulating Nrf2/NF- κ B pathway [J]. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2020, 48 (1): 127-142.
- [30] BHARDWAJ R, SINGH B P, SANDHU N, et al. Probiotic mediated NF- κ B regulation for prospective management of type 2 diabetes [J]. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47 (3): 2301-2313.
- [31] TAKED K, AKIRA S. Toll-like receptors [J]. *Current Protocols in Immunology*, 2015, 109 (14): 11-10.
- [32] LEULIER F, LEMAITRE B. Toll-like receptors-taking an evolutionary approach [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9 (3): 165-178.
- [33] KAWAI T, AKIRA S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors [J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2007, 13 (11): 460-469.
- [34] SARGEANT H R, MILLER H M, SHAW M A. Inflammatory response of porcine epithelial IPEC J2 cells to enterotoxigenic *E. coli* infection is modulated by zinc supplementation [J]. *Molecular Immunology*, 2011, 48 (15/16): 2113-2121.
- [35] LAN J, DOU X J, LI J W, et al. *L*-arginine ameliorates lipopolysaccharide-induced intestinal inflammation through inhibiting the TLR4/NF- κ B and MAPK pathways and stimulating β -defensin expression *in vivo* and *in vitro* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68 (9): 2648-2663.
- [36] HARADA A, SEKIDO N, AKAHOSHI T, et al. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation [J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 1994, 56 (5): 559-564.
- [37] SHI L, FANG B, YONG Y H, et al. Chitosan oligosaccharide-mediated attenuation of LPS-induced inflammation in IPEC-J2 cells is related to the TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 219: 269-279.
- [38] 彭成璐, 张瑜, 丁雪东, 等. 7S β -伴大豆球蛋白通过 NF- κ B 信号通路引起 IPEC-J2 细胞的炎性反应 [J]. *畜牧兽医学报*, 2019, 50 (4): 870-878.
- [39] HUELSKEN J, VOGEL R, BRINKMANN V, et al. Requirement for β -catenin in anterior-posterior axis formation in mice [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2000, 148 (3): 567-578.
- [40] GORETSKY T, BRADFORD E M, RYU H, et al. A cytosolic multiprotein complex containing P85 α is required for β -catenin activation in colitis and colitis-associated cancer [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291 (8): 4166-4177.
- [41] REZNIKOV E A, COMSTOCK S S, YI C Y, et al. Dietary bovine lactoferrin increases intestinal cell proliferation in neonatal piglets [J]. *The Journal of Nutrition*, 2014, 144 (9): 1401-1408.
- [42] FAN H B, ZHAI Z Y, LI X G, et al. CDX2 stimulates the proliferation of porcine intestinal epithelial cells by activating the mTORC1 and Wnt/ β -catenin signaling pathways [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18 (11): 2447.
- [43] LI X G, WANG Z, CHEN R Q, et al. LGR5 and BMI1 increase pig intestinal epithelial cell proliferation by stimulating WNT/ β -catenin signaling [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19 (4): 1036.

Nuclear Transcription Factor- κ B/ β -Catenin Signaling Pathway Mediates Enterotoxigenic *Escherichia coli* Causing IPEC-J2 Cell Injury

DOU Caixia¹ LI Haihua² SUN Zeyang¹ WANG Qian¹ SHANG Zhiyuan¹ QIAO Jiayun^{1*}

(1. Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China;

2. Tianjin Key Laboratory of Agricultural Animal Breeding and Healthy Husbandry, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: This study aimed to explore the molecular mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) causing damage to IPEC-J2 cells. After ETEC K88 infection and nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) inhibitor treatment of IPEC-J2 cells and small interfering RNA (siRNA) silencing of β -catenin gene expression in IPEC-J2 cells, quantify PCR (qPCR) method was then performed to determine the mRNA expression levels of NF- κ B, zonula occludens-1 (ZO-1), occludin, Toll-like receptor 2 (TLR2), Toll-like receptor 4 (TLR4), β -catenin, cyclin D1 and myelocytomatosis oncogene (*c-Myc*) in cells, Western blotting method was conducted to determine the protein expression levels of ZO-1 and occludin as well as the phosphorylation level of p65 NF- κ B in cells, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was used to determine the tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-8 (IL-8) contents and lactate dehydrogenase (LDH) activity in cell culture supernatant. The results showed as follows: either 6 or 24 h ETEC K88 infection could enable the protein expression levels of ZO-1, occludin and the mRNA expression levels of β -catenin and *c-Myc* to extremely significantly decline ($P < 0.01$), and the contents of TNF- α , IL-8 and LDH activity to significantly rise ($P < 0.05$); the phosphorylation level of p65 NF- κ B was extremely significantly at 1, 3 and 6 h post ETEC infection ($P < 0.01$); plus, the mRNA expression levels of TLR2 and TLR4 were extremely significantly increased with 6 or 12 h ETEC infection ($P < 0.01$). After the successful inhibition of NF- κ B, the contents of TNF- α , IL-8 and LDH activity were extremely significantly decreased ($P < 0.01$), while the protein expression levels of ZO-1 and occludin and the mRNA expression level of NF- κ B were extremely significantly increased ($P < 0.01$). When the β -catenin gene was silenced by small interference RNA (siRNA), the mRNA expression levels of β -catenin, cyclin D1 and *c-Myc* were extremely significantly decreased ($P < 0.01$), and the LDH activity was significantly improved at each time point ($P < 0.05$). To sum up, ETEC K88 is able to generate inflammatory response by up-regulating NF- κ B signaling pathway accompanied by down-regulating the activation of β -catenin signaling pathway. In this case, the proliferation of IPEC-J2 cells is inhibited, thereby inducing IPEC-J2 cells injury. [*Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(12):5893-5902]

Key words: ETEC K88; IPEC-J2 cells; NF- κ B signaling pathway; β -catenin signaling pathway