

## 摘要

慢性胰腺炎 (chronic pancreatitis, CP) 是由遗传和环境等多因素引起的永久、反复且不可逆的胰腺纤维化-炎症性疾病,其特征是胰腺组织纤维化,导致细胞外基质堆积,进而使得内分泌和外分泌功能受损。CP 常见病症有腹痛、胰腺纤维化、肠道菌群紊乱,以及糖尿病、代谢性骨病和胰腺癌等并发症。

大量的研究表明, CP 患者肠道菌群与健康人群存在差异,致病菌特别是大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) 异常富集。*E.coli* 发挥毒力作用主要依赖于高温 G 蛋白 (high temperature protein G, HtpG), 其同源物热休克蛋白 90 在 CP 纤维化发展过程中发挥重要作用,且上调蛋白质精氨酸甲基转移酶 5 (protein arginine methyltransferase 5, PRMT5) 表达的调控。PRMT5 作为表观遗传学和信号转导相关的翻译后修饰蛋白酶,在肿瘤和炎症中通过组蛋白修饰关键转录因子发挥重要作用,参与细胞表型转化。近期研究表明巨噬细胞的极化可影响胰腺纤维化-炎症微环境,进而激活胰腺星状细胞 (pancreatic stellate cells, PSCs), 参与 CP 的发展。而 PRMT5 可通过结合巨噬细胞极化的转录因子 Krüppel 样因子 4 (krüppel-like factor 4, KLF4), 并甲基化修饰 KLF4 促进其蛋白积累。基于以上研究背景,本文推测 CP 发展过程中 *E.coli* 释放 HtpG 上调 PRMT5 的表达,甲基化 KLF4 参与调控巨噬细胞的极化。结合动物实验和细胞实验,从菌群的角度,阐明 *E.coli* 来源的 HtpG 上调 PRMT5 对 CP 的作用及机制。主要结果如下:

(1) 为了明确 CP 发展过程中 *E.coli* 对胰腺 PRMT5 表达的影响,通过腹腔注射雨蛙素构建小鼠 CP 模型。采用 16S 扩增子测序方法对 C57BL/6J 小鼠 CP 模型中肠道菌群组成进行分析,结果发现 *E.coli* 的丰度变化显著,检测到 HtpG 的表达升高、CD91 受体增加和 NF- $\kappa$ B 通路的激活。此外,还发现胰腺组织中 PRMT5 表达的上调。通过免疫荧光实验,确认 CP 患者和小鼠 CP 模型中 PRMT5 主要表达于巨噬细胞。通过对小鼠分离出的骨髓源巨噬细胞 (bone marrow derived macrophages, BMDM) 进行 HtpG (*E.coli* 来源) 以及热休克蛋白 90 的抑制剂 17AAG 干预,进一步论证 HtpG 对 PRMT5 表达的调控作用。结果表明 *E.coli* 释放的 HtpG 通过 CD91 受体激活 NF- $\kappa$ B 通路上调 PRMT5 的表达。

(2) 为了探究胰腺 PRMT5 对 CP 的作用,采用巨噬细胞特异性敲除 PRMT5 小鼠和外源使用 PRMT5 特异性抑制剂 EPZ015666 的方式,对 CP 小鼠进行 PRMT5 干预,检测 CP 表型、巨噬细胞极化以及纤维化程度。结果表明,PRMT5 的缺失可以缓解 CP 发展过程中对胰腺的损伤和纤维化程度,降低  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白和 I 型胶原蛋白  $\alpha 1$  的表达,并抑制 M2 巨噬细胞表型转化。

(3) 为了阐明 PRMT5 加剧 CP 的作用机制, 首先检测胰腺组织中 KLF4 的表达变化, 结果表明 CP 小鼠胰腺中 KLF4 表达显著降低, 且敲除 PRMT5 后抑制 KLF4 表达。体外实验通过敲除或过表达 PRMT5, 结合突变质粒转染, 并用白细胞介素 4 刺激 BMDM。结合分子模拟、质谱分析和体内实验, 结果表明, PRMT5 与 KLF4 之间存在相互结合关系。进一步证实, PRMT5 介导 KLF4 的甲基化, 抑制其泛素化降解, 从而稳定 KLF4 的表达。采用 BMDM 和 PSCs 体外共培养实验, 结合小干扰、过表达质粒和突变质粒, 探究巨噬细胞极化对 PSCs 的激活作用, 结果表明, PRMT5 介导 KLF4 调控巨噬细胞极化成 M2 型, 释放转化生长因子  $\beta$  激活 PSCs。最后, 通过构建 KLF4 腺相关病毒, 对巨噬细胞 PRMT5 缺失的 CP 小鼠实现 KLF4 体内过表达, 验证 PRMT5 对 CP 发展过程的作用机制。结果显示, 敲除 PRMT5 同时过表达 KLF4 逆转了敲除 PRMT5 缓解 CP 小鼠胰腺萎缩、损伤和纤维化程度的作用。

本文揭示 CP 小鼠中 *E.coli* 释放 HtpG 促进胰腺 PRMT5 表达, 结合并甲基化 KLF4, 进而调控 M2 巨噬细胞极化, 激活 PSCs, 从而加剧 CP。本研究为肠道菌群-PRMT5 轴或可防治 CP 提供理论基础。

**关键词:** 慢性胰腺炎, 肠道菌群, 大肠杆菌高温 G 蛋白, 蛋白质精氨酸甲基转移酶 5, 巨噬细胞

## Abstract

As a permanent, recurring, and irreversible pancreatic-fibrosis-inflammatory disease, chronic pancreatitis (CP) is caused by a combination of genetic and environmental factors. CP is characterized by continuous pancreatic damage that eventually results in significant impairment of exocrine as well as endocrine functions of the gland. Common symptoms of CP include abdominal pain, pancreatic fibrosis, intestinal flora disorders, and complications such as diabetes, metabolic bone disease and pancreatic cancer.

A large number of studies have shown that the intestinal flora of CP patients is different from that of healthy people, and pathogenic bacteria, especially *Escherichia coli* (*E.coli*), are abnormally enriched, besides, CP can be alleviated by antibiotics or probiotics. The virulence of *E.coli* is mainly dependent on high temperature protein G (HtpG). Heat shock protein 90, the ortholog of HtpG, plays an important role in the development of CP fibrosis, and upregulates the expression of protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5). As a post translational modification enzyme related to epigenetics and signal transduction, PRMT5 plays a significant role in tumor and inflammation through histone modification of key transcription factors, and participates in cell phenotypic transformation. Recent studies have shown that the polarization of macrophages can affect the pancreatic fibrosis-inflammatory microenvironment, thereby activating pancreatic stellate cells (PSCs) and participating in the development of CP. PRMT5 promotes the accumulation of KLF4 protein by binding to and methylation modifying the transcription factor Krüppel-like factor 4 (KLF4) of macrophage polarization. Based on the above research background, this article speculates that the release of HtpG from *E.coli* upregulates the expression of PRMT5 during the development of CP, and methylation of KLF4 is involved in regulating the polarization of macrophages.

Combining animal experiments and cell experiments, this article elucidates the role and mechanism of *E. coli* derived HtpG in regulating PRMT5 on CP from the perspective of flora. The main results are as follows:

(1) In order to clarify the effect of *E.coli* on the expression of PRMT5 in pancreas during the development of CP, a mouse CP model was constructed by intraperitoneal injection of caerulein. The composition of intestinal flora in C57BL/6J mouse CP model was analyzed by using 16S amplification sequencing method. The results showed that the abundance of *E.coli*

was significantly changed, and elevated the expression of HtpG, increased CD91 receptor and NF- $\kappa$ B pathway was activated. In addition, it was found that the expression of PRMT5 was upregulated in pancreatic tissues. Immunofluorescence experiments confirmed that PRMT5 was mainly expressed in macrophages in CP patients and mouse CP models. To further demonstrate the regulatory effect of HtpG on the expression of PRMT5, we conducted intervention on bone marrow derived macrophages (BMDM) isolated from mice with a treatment of HtpG (*E.coli*) and 17AAG, which is the inhibitor of heat shock protein 90. The results showed that the HtpG released by *E.coli* upregulated the expression of PRMT5 through activating NF- $\kappa$ B pathway by the CD91 receptor.

(2) In order to explore the effect of pancreatic PRMT5 on CP, macrophage-specific knockout of PRMT5 mice and exogenous application of PRMT5 specific inhibitor EPZ015666 were used to detect CP phenotype, macrophage polarization, and fibrosis degree. The results showed that the PRMT5 knockout could alleviate damage and fibrosis of the pancreas during the development of CP, and reduce the expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin and type I collagen alpha 1, and inhibit the phenotypic transformation of M2 macrophages.

(3) In order to clarify the mechanism of PRMT5 exacerbating CP, the expression of KLF4 in pancreatic tissues was detected first. The results showed that the expression of KLF4 in the pancreas of CP mice was significantly lower than that of the control group, while the expression of KLF4 was decreased after PRMT5 downregulation. This study indicated that PRMT5 and KLF4 had a mutual binding relationship. It was further confirmed that PRMT5 mediated the methylation of KLF4, and inhibited its ubiquitination degradation, thereby stabilizing the expression of KLF4. Using a co-culture experiment of BMDM and PSCs in vitro, combined with small interference, overexpressed plasmid and mutant plasmid, to explore the activation effect of macrophage polarization on PSCs. The results showed that PRMT5 mediated KLF4 to regulate macrophage polarization into M2 type, and released transforming growth factor  $\beta$  to activate PSCs. Finally, M $\phi$ - PRMT5-KO mice with CP model were constructed by injecting packaged KLF4 adeno-associated virus into the tail vein to verify the mechanism of PRMT5 on the development of CP. The results showed that the overexpression of KLF4 while knocking out PRMT5 reversed the effect of knocking out PRMT5 on alleviating pancreatic atrophy, injury and fibrosis in CP mice.

This article revealed that the release of HtpG by *E. coli* in CP mice promoted the expression of pancreatic PRMT5, bound to and methylated KLF4, and then regulated M2

macrophage polarization, activated PSCs, and exacerbated CP. This study provides a theoretical basis for the gut microbiota - PRMT5 axis or the prevention and treatment of CP.

**Keywords:** chronic pancreatitis, intestinal flora, *Escherichia coli* high temperature protein G, protein arginine methyltransferase 5, macrophages

## 缩略符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
AP	acute pancreatitis	急性胰腺炎
BMDM	bone marrow derived macrophages	骨髓源巨噬细胞
Col- $\alpha$ 1	type I collagen alpha 1	I型胶原蛋白 $\alpha$ 1
CP	chronic pancreatitis	慢性胰腺炎
ECM	extracellular matrix	细胞外基质
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠杆菌
Hsp90	heat shock protein 90	热休克蛋白 90
HtpG	high temperature protein G	高温 G 蛋白
KLF4	krüppel-like factor4	Krüppel 样因子 4
NF- $\kappa$ B	nuclear factor- $\kappa$ B	核转录因子- $\kappa$ B
PDGF- $\beta$	platelet derived growth factor- $\beta$	血小板衍生生长因子- $\beta$
PRMT5	protein arginine methyltransferase 5	蛋白质精氨酸甲基转移酶 5
PSCs	pancreatic stellate cells	胰腺星状细胞
qRT-PCR	quantitative real-time PCR	实时荧光定量 PCR
TGF- $\beta$	transgrowth factor- $\beta$	转化生长因子- $\beta$
WB	western blot	蛋白质印迹
$\alpha$ -SMA	alpha smooth muscle actin	$\alpha$ -平滑肌肌动蛋白

## 目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
缩略符号对照表.....	VI
1 绪论.....	1
1.1 慢性胰腺炎概述.....	1
1.1.1 慢性胰腺炎流行病学研究.....	1
1.1.2 慢性胰腺炎的发病因素.....	1
1.1.3 慢性胰腺炎的发病机制.....	2
1.1.4 慢性胰腺炎的动物模型.....	3
1.1.5 慢性胰腺炎的纤维化研究进展.....	3
1.1.5.1 腺泡细胞与纤维化.....	3
1.1.5.2 胰腺星状细胞与纤维化.....	4
1.1.5.3 巨噬细胞与纤维化.....	5
1.2 肠道菌群与慢性胰腺炎.....	5
1.2.1 慢性胰腺炎肠道菌群变化.....	5
1.2.2 靶向肠道菌群的干预策略.....	6
1.3 组蛋白质精氨酸甲基转移酶 5 概述.....	7
1.3.1 PRMT5 的结构和功能.....	7
1.3.2 PRMT5 的应用.....	8
1.4 立题依据及意义.....	9
1.5 论文主要研究内容.....	10
2 实验材料与方法.....	11
2.1 实验材料.....	11
2.1.1 实验动物饲养.....	11
2.1.2 实验动物信息及分组.....	11
2.1.3 主要材料与试剂.....	12
2.1.4 主要实验仪器.....	13
2.2 实验方法.....	13
2.2.1 M $\phi$ -PRMT5-KO 小鼠的鉴定.....	13
2.2.2 慢性胰腺炎模型的建立.....	15

---

2.2.3 胰腺重量与体重比重分析.....	16
2.2.4 胰腺组织切片苏木精-伊红染色及形态学分析.....	16
2.2.5 胰腺组织切片马松三色和天狼星红染色及纤维化程度分析.....	17
2.2.6 胰腺组织切片免疫荧光染色实验.....	18
2.2.7 细胞和胰腺组织总蛋白的提取及蛋白质免疫印迹实验.....	19
2.2.8 免疫共沉淀.....	20
2.2.9 细胞和胰腺组织总 RNA 提取与实时荧光定量 PCR 分析.....	21
2.2.10 小鼠肠道菌群的测定.....	23
2.2.11 小鼠骨髓源巨噬细胞提取及培养.....	23
2.2.12 小鼠原代胰腺星状细胞提取及传代.....	24
2.2.13 细胞转染实验.....	24
2.2.14 骨髓源巨噬细胞和胰腺星状细胞共培养实验.....	25
2.2.15 HEK293T 细胞的复苏及培养.....	25
2.2.16 腺相关病毒质粒的提取、包装与浓缩.....	25
2.2.17 数据统计与分析.....	27
3 实验结果与讨论.....	28
3.1 大肠杆菌对慢性胰腺炎小鼠胰腺中 PRMT5 的影响.....	28
3.1.1 慢性胰腺炎小鼠肠道菌群的变化.....	28
3.1.2 大肠杆菌对 CP 小鼠胰腺组织中 PRMT5 表达的影响.....	29
3.1.3 慢性胰腺炎病人胰腺中 PRMT5 的表达情况.....	32
3.1.4 PRMT5 在慢性胰腺炎小鼠胰腺中的表达情况.....	33
3.1.5 大肠杆菌 HtpG 对巨噬细胞 PRMT5 表达的作用.....	34
3.2 PRMT5 在慢性胰腺炎中的作用.....	35
3.2.1 巨噬细胞特异性敲除 PRMT5 对小鼠 CP 的作用.....	35
3.2.2 PRMT5 特异性抑制剂 EPZ015666 对小鼠 CP 的作用.....	39
3.2.3 PRMT5 对慢性胰腺炎小鼠巨噬细胞极化的影响.....	42
3.3 PRMT5 对小鼠慢性胰腺炎作用机制研究.....	44
3.3.1 KLF4 在慢性胰腺炎小鼠胰腺中的变化.....	44
3.3.2 PRMT5 对 IL-4 刺激巨噬细胞中 KLF4 表达的影响.....	44
3.3.3 PRMT5 通过甲基化 KLF4 稳定其蛋白累积.....	45
3.3.4 PRMT5 对巨噬细胞极化和 PSCs 激活的作用.....	48
3.3.5 PRMT5 介导 KLF4 调控小鼠胰腺纤维化的作用.....	51



## 目 录

---

主要结论与展望.....	54
致谢.....	56
参考文献.....	57
附录：作者在攻读硕士学位期间发表的论文.....	67

# 1 绪论

## 1.1 慢性胰腺炎概述

### 1.1.1 慢性胰腺炎流行病学研究

慢性胰腺炎（chronic pancreatitis, CP）是多种病因引起的胰腺组织和功能进行性、永久性且不可逆性的损害，胰腺组织发生不同程度的腺泡细胞萎缩、胰胆管汇合异常、纤维化及钙化<sup>[1]</sup>。全国流行病学研究表明近几十年来 CP 的发病率和死亡率均成逐年上升趋势，导致居民健康负担加重，医疗费用增加，生活质量下降，影响社会经济发展<sup>[2]</sup>。目前，全世界每百万人有 3000 人~5000 人患有 CP，其中大约 200 人会持续病变，发展成胰腺导管癌，给患者带来精神上和生活上的巨大压力<sup>[3]</sup>。CP 在欧美国家每 10 万人有 5 人~10 人发病，每 10 万人有 25 人~30 人患病。在亚太地区发病率和患病率分别是 10/10 万人和 14/10 万人<sup>[4]</sup>。近年来，我国 CP 的发病率呈逐年上升趋势，但是关于其流行病学的研究尚未有确切的资料，主要以胆道疾病诱发为主<sup>[5]</sup>。根据每个国家人口的研究报道，男性的患病率高于女性的患病率，但最近研究报道，女性的患病率正逐年上升，造成这种现象的差异是因为男性酗酒和抽烟，而女性常见病因为特发性和阻塞性<sup>[6-9]</sup>。目前 CP 治疗仍然面临着巨大的挑战，迄今为止，还没有任何一种药物或者方法能够彻底治愈 CP，以减缓 CP 的发展。

### 1.1.2 慢性胰腺炎的发病因素

CP 最常见的病因为急性胰腺炎（acute pancreatitis, AP）反复发作<sup>[10]</sup>。CP 其他病因还有非正常损伤与手术、肠道菌群失调、代谢功能障碍、遗传因素和内分泌功能异常等<sup>[11]</sup>。美国流行病学研究报告中心揭示将近一半是由于过度酒精引起的<sup>[12]</sup>。酒精可引起胃泌素分泌增多，胃酸分泌也随之增加，这将刺激十二指肠粘膜出现水肿，进而引发胰液的分泌增多，同时增加蛋白质和碳酸氢盐浓度，使钙离子与其中的蛋白质结合形成稳定的胶原沉积物粘附在胰管壁上，从而造成导管狭窄和梗阻，腺泡细胞萎缩和坏死，最后形成细胞间质炎症及纤维化<sup>[13]</sup>。酒精中毒相关的基因位点 CLDN2 存在胰腺炎的风险，有可能直接引起胰胆管附近脂质堆积，造成胰胆管上皮细胞损伤，腺泡细胞浆的退行性病变，最后发展成 CP<sup>[14]</sup>。

胆道疾病也是 CP 的诱发原因之一，主要为胆管结石，胆管结石在组织中镶嵌和游动时造成胰液滞流，导致胰导管内部压强升高，胰导管和腺泡细胞破裂，胰液进入细胞

间质，激活胰蛋白酶，引发一系列胰酶消化反应<sup>[15]</sup>。胰液大量淤滞和持续分泌，造成胰腺反复炎症，最终导致胰腺纤维化，形成 CP<sup>[16]</sup>。

此外，遗传因素也是 CP 一个重要的诱发因素，研究表明阳离子胰蛋白酶相关编码基因位于 7 号染色体，突变主要发生在与钙结合的部位起到过早激活胰蛋白酶原的作用，导致酶错误折叠，引发内质网应激<sup>[17]</sup>。之前的研究发现，羧肽酶 A1 作为水解肽链羧基末端肽键的胰腺金属蛋白酶，在羧肽酶 A1 突变后造成酶错误折叠，细胞内的羧肽酶 A1 堆积和降解，可能导致非酒精性 CP，尤其是早期发病人群<sup>[18]</sup>。此外，囊性纤维化突变也是比较重要的一个 CP 潜在风险基因，囊性纤维化跨膜传导调节因子基因编码形成一条氯离子通道，该基因发生突变，引起组织内 pH 值下降，形成酸性环境，使得组织发生炎症损害，同时造成胰酶异常分泌和激活，最终导致胰腺纤维化，发展成 CP<sup>[19]</sup>。

除上述病因外，CP 还有一些病因暂未找到确切的发病机理，比如肠道菌群紊乱。研究发现，在 CP 临床患者粪便中检测到病原菌显著增加，如粪肠球菌、大肠杆菌等，这些肠道菌群迁移到胰腺，可能会改变胰腺炎症微环境，促进继发性感染，导致胰腺损伤<sup>[20]</sup>。临床上针对肠道菌群可能造成 CP 发展这一情况，采用复合益生菌制剂和益生元来治疗肠道菌群紊乱导致的 CP<sup>[21]</sup>。

### 1.1.3 慢性胰腺炎的发病机制

CP 的发病机制十分复杂，目前的研究总结了四种假说来阐述 CP 的发病机理，包括氧化应激学说、坏死-纤维化学说、中毒-代谢学说和结石-胰管梗塞学说<sup>[22, 23]</sup>，其中氧化应激对胰腺组织造成的氧化损伤越来越受重视。体内活性氧增多，释放更多的氧自由基。一旦活性氧生成，许多下游氧化还原信号通路被激活，引起机体氧化应激反应，破坏抗氧化防御系统，调节细胞的生长、增殖、分化和凋亡，引起生物大分子的氧化损伤<sup>[24]</sup>。有研究表明，CP 患者组织中能产生还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶，生成大量的活性氧，促进胰腺星状细胞（pancreatic stellate cells, PSCs）的活化和增殖，引起炎症反应，造成胰腺纤维化的发生和组织损害<sup>[25, 26]</sup>。CP 的一个重要病征为胰腺纤维化，表现为成纤维细胞增殖，纤维化组织替代实质组织，细胞外基质（extracellular matrix, ECM）沉积，造成胰腺腺泡细胞坏死和纤维化。多数研究学者提出坏死-纤维化假说。过量酒精的摄入造成胰腺合成更多的蛋白质，引起胰管阻塞，腺泡细胞萎缩，炎症细胞浸润，最终发展成纤维化<sup>[27]</sup>。在 CP 进程中，肥大细胞合成并释放胃食糜酶，迁移到成纤维细胞，促进成纤维细胞的增殖分化，合成并分泌 ECM，促进胰腺发生纤维化<sup>[28]</sup>。

此外，近几年 Whiteo 等提出一个全新的假说-AP 事件理论假说<sup>[29]</sup>。这一假说表明 CP 是一种以 AP 为特征的免疫介导过程，当腺泡细胞受到氧化应激或其他有害因素刺

激时会激活该免疫系统。当刺激因素长期存在或者 AP 反复发作,在炎症因子的作用下,逐渐发展为 CP<sup>[30,31]</sup>。这种 AP 被称为“前哨事件”。

#### 1.1.4 慢性胰腺炎的动物模型

CP 动物模型的建立对研究 CP 的发病机理和病变十分重要,所以有很多学者对 CP 动物模型的构建做了大量的研究。不同的药物和给药方式,构建 CP 模型的时间,难易程度和发病机制,对胰腺组织的损害程度也各不相同。目前国际上最常见的三种造模方式为:手术结扎胰管<sup>[32]</sup>、静脉注射二丁基二氯化锡<sup>[33]</sup>、反复注射雨蛙素<sup>[34]</sup>。除此之外还有二乙基二硫代氨基甲酸盐、乙醇喂养和静脉注射内毒素脂多糖结合乙醇喂养法等方法<sup>[35-37]</sup>。

雨蛙素是一种胆囊收缩素和胃泌素类似物,作用于腺泡细胞。当腹腔注射雨蛙素后,胆囊收缩素受体与其结合,刺激胰腺外分泌胰液和消化酶,使得蛋白质的合成速度远超过于分泌速度,同时胰蛋白水解酶的分泌量也大大增加,造成腺泡细胞的自溶<sup>[38]</sup>。在雨蛙素的刺激下,早期胰蛋白酶原异常激活、胶原沉积和纤维组织大量增生<sup>[39]</sup>。雨蛙素广泛应用于急性水肿型胰腺炎动物模型。通过反复注射雨蛙素,引起 AP 反复发作,随着时间延长发展成 CP<sup>[40]</sup>。反复注射雨蛙素模拟临床 CP 发病特征,即 AP 反复发作,引起胰腺组织损伤,小叶结构破坏,腺泡细胞空泡样变性,最终导致腺泡细胞萎缩和胰腺纤维化<sup>[41]</sup>。该模型操作简单、稳定性高、对小鼠损伤小且可以模拟临床中反复发作的 AP 以诱导 CP 的方式,是研究 CP 最广泛的动物模型。

#### 1.1.5 慢性胰腺炎的纤维化研究进展

CP 的炎症微环境主要包括腺泡细胞、PSCs 和巨噬细胞。其组织学特征主要包括腺泡细胞萎缩、炎症细胞浸润、胰腺导管损伤和胰腺纤维化<sup>[42]</sup>。以往研究认为异常激活胰蛋白酶原是导致 CP 发生的重要病因,近期研究揭示,胰蛋白酶原的激活是诱发 AP,导致胰腺水肿,在 CP 中作用不是很显著,反而是胰腺纤维化是关键诱因<sup>[43]</sup>。纤维化是一种损伤后修复反应,结缔组织取代正常的实质组织,在细胞因子和炎症介质的刺激下,组织稳态遭到破坏,发生纤维增生,导致器官组织内纤维细胞大量增殖,ECM 堆积,当修复过程持续发生,就会产生病理现象,可致器官结构破坏和功能减退,实质细胞发生坏死<sup>[44]</sup>。

##### 1.1.5.1 腺泡细胞与纤维化

随着对腺泡细胞的研究越来越多,有研究发现,CP 前期发生的事件是腺泡细胞内发生的胰蛋白酶原异常激活造成的腺泡细胞空泡样变性或坏死凋亡。坏死的腺泡细胞会

导致部分 PSCs 被激活并开始增殖<sup>[45]</sup>。凋亡的腺泡细胞会释放 DAMP，促进 PSCs 的激活以及免疫细胞的浸润，进而发生胰腺纤维化<sup>[46, 47]</sup>。

除此之外，腺泡细胞的表型转化也是现在的研究重点。Backx 等研究发现，小鼠发生急性胰腺损伤后，腺泡细胞会重新表达仅在胚胎时期表达的 MDS1 和 EVI1 复合体基因座，促进腺泡细胞的分化，使腺泡细胞得以在应激情况下存活下来<sup>[48]</sup>。Del Poggetto 等揭示在急性炎症损伤后腺泡细胞产生一种特殊的记忆细胞亚型，该细胞在炎症损伤作用下，加速组织完整性修复，同时协调先天免疫系统的激活，来应对外界刺激带来的组织损伤，减少胰腺组织纤维化<sup>[49]</sup>。

### 1.1.5.2 胰腺星状细胞与纤维化

PSCs 最早发现于 20 世纪 90 年代，是一种位于胰腺腺泡细胞和胰腺小叶间的，携带维生素 A 脂滴的多功能细胞<sup>[50]</sup>。在健康人群的胰腺组织中，PSCs 占胰腺实质细胞的 4%~7%<sup>[51]</sup>，分布在腺泡细胞附近，主要负责胰腺细胞外基质蛋白的合成和降解，通过调节基质蛋白的合成和降解之间的动态平衡来调节纤维化的发生，维持外分泌细胞的基底膜结构。在正常生理条件下，PSCs 保持静息状态，生理特征为细胞基质中富含维生素 A 脂滴，有丝分裂指数低，通过表达波形蛋白、结蛋白等来维持静息状态<sup>[52]</sup>。在静息状态下基本上不表达基质蛋白，尚不具备促纤维化作用，会分泌促进生长的因子，维持胰腺的基本结构和促进胰腺导管和血管的调节作用<sup>[53]</sup>。当炎症或损伤等刺激胰腺组织时，PSCs 就会由静止状态转化为活化型，这些炎症刺激因子主要是转化生长因子  $\beta$  (transgrowth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )、IL-10、IL-22 和血小板衍生生长因子- $\beta$  (platelet derived growth factor- $\beta$ , PDGF- $\beta$ )<sup>[53]</sup>。活化型的 PSCs 表现为维生素 A 脂滴消失，有丝分裂指数增高，运动性和收缩性增强，代谢活跃，具备增殖和迁移能力<sup>[54]</sup>。此外，细胞形态转变为肌成纤维样表型，合成并分泌  $\alpha$  平滑肌肌动蛋白 (alpha smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 和 I 型胶原蛋白  $\alpha 1$  (type I collagen alpha 1, Col- $\alpha 1$ ) 等<sup>[55]</sup>。

目前越来越多的研究表明，抑制 PSCs 的激活就可以缓解 CP 的发展。PSCs 的激活过程涉及多个信号通路，如 MAPK 途径，TGF- $\beta$ /Smad 途径、NF- $\kappa$ B 途径、Hedgehog 和 JAK-STAT 途径等。通过使用药物和小分子物质刺激这些信号通路中的关键靶点，进而改变 PSCs 的状态以改善胰腺纤维化，如 Schwer 等通过姜黄素诱导血红素氧合酶-1 的表达，使 ERK 通路受到抑制，从而抑制了 PSCs 的激活<sup>[56]</sup>。异喹硫磺酮和栀子通过抑制 c-Jun 氨基末端激酶和 ERK 的活化来抑制 PSCs 的活化，减轻 CP 的纤维化程度<sup>[57, 58]</sup>。确定激活 PSCs 的信号通路网络，有利于阐明胰腺纤维化的分子机制并针对不同的分子机制发掘新的治疗方案。

### 1.1.5.3 巨噬细胞与纤维化

巨噬细胞代表了一系列被激活的表型，而不是一个离散的稳定亚型<sup>[59]</sup>。在不同的生理和病理条件下，处于不同激活状态或混合表型的巨噬细胞可能共存<sup>[60]</sup>。近年来巨噬细胞成为研究 CP 热点之一。已有研究发现，巨噬细胞是通过炎症微环境的改变和 PSCs 的激活来参与 CP 的发展。巨噬细胞作为免疫细胞的重要组成部分，在 CP 发展过程中能够分化成具有多种功能的类型<sup>[61]</sup>，主要分为两种类型：一种称为 M1 型，M1 表型巨噬细胞表达多种促炎因子和炎症介质，包括肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、活性氧和一氧化氮等，发挥较强的促炎作用；另一种称为 M2 型，M2 巨噬细胞表面表达 CD206, Arg-1, Fizz-1 等抑炎因子，发挥较强的抑炎作用，释放 TGF- $\beta$  促进纤维化的发展<sup>[62]</sup>。在 CP 发展的后期，即胰腺组织修复再生期，M2 型发挥主要作用，分泌 TGF- $\beta$  和 PDGF- $\beta$  等促纤维化因子激活 PSCs，同时分泌基质金属蛋白酶和组织抑制因子等参与细胞外基质蛋白的降解，与 PSCs 共同调节胰腺纤维化<sup>[63, 64]</sup>。

通过调控巨噬细胞极化可干预胰腺纤维化的发展。最近研究表明，使用成纤维细胞生长因子 21 建立 CP 小鼠模型，通过改变巨噬细胞的表型转化来改善胰腺纤维化<sup>[65]</sup>。除此之外，也有研究表明，巨噬细胞和 PSCs 相互作用来参与 CP 的发展。将小鼠的巨噬细胞和 PSCs 体外共培养，发现巨噬细胞产生更多的炎症介质和促纤维化因子，激活 PSCs，而 PSCs 也会分泌更多的 TGF- $\beta$  和 PDGF- $\beta$  诱导巨噬细胞极化成 M2 型。这种相互作用的方式加快了胰腺纤维化的进程<sup>[66]</sup>。NF- $\kappa$ B 作为重要的转录因子，在 CP 发展过程中 NF- $\kappa$ B 通路起着关键作用，当该通路被激活后，激活静息状态下的 PSCs 转变成活化状态，分泌趋化因子单核细胞趋化蛋白 1 募集巨噬细胞迁移到发生炎症区域，使得胰腺损伤变得更加严重，加重 CP 病征<sup>[67]</sup>。

## 1.2 肠道菌群与慢性胰腺炎

### 1.2.1 慢性胰腺炎肠道菌群变化

人体中存在 100 万亿个微生物，其中 95% 为肠道微生物，已知肠道微生物种类超过 1000 种。在新陈代谢、食物消化、调节免疫系统等生理生化反应中发挥着重大作用。肠道菌群的主要作用是调节免疫系统和维持人体稳态。肠道菌群平衡依赖于肠道菌群的平衡性和多样性、肠道屏障的完整性以及免疫系统，当遭受外界因素的刺激就会打破这种平衡，进而导致菌群失衡，这就是“肠道菌群紊乱”。在机体健康的情况下，肠道菌群被完整的肠粘膜屏障阻挡未能易位至肠外组织，但肠道菌群紊乱、免疫系统破坏，肠黏膜屏障受损的情况下，肠道菌群经外周循环发生移位，进入腹腔，易位的细菌导致循环

中的细胞因子失衡，引发多器官功能障碍综合征。近几年，肠道菌群在疾病健康领域中是一个研究热点和重点。临床研究表明，胰腺外分泌功能受损的 CP 病人，胰腺功能受损，造成合成的抗菌肽大大减少和肠道蠕动功能受损，导致小肠细菌过度增长，肠道菌群紊乱，细菌的过度增长又会加重 CP 的发展<sup>[68]</sup>。

研究发现，CP 患者的胰腺中抗菌肽合成减少，导致运动能力减弱，消化不良，胃肠道微生态失调，进而使得肠道菌群丰度降低，导致肠道微生态失衡。此外，由于胰腺分泌能力减弱，导致胃肠道菌群的生长繁殖受到影响，进而使得肠道微生态失衡。在肠道菌群丰度方面，CP 小鼠肠道菌群多样性改变和数量减少，类杆菌和变形菌门水平升高，拟杆菌门和放线菌门细菌丰度降低<sup>[69]</sup>。在研究 CP 患者血清中的总胆固醇、血红蛋白水平与肠道菌群的关系实验中观察到总胆固醇水平随着双歧杆菌等益生菌的减少而升高，随着粪肠球菌、*E.coli* 等有害菌的增多而升高，而血红蛋白则恰恰相反<sup>[70]</sup>。细菌易位如 *E.coli* 释放高温 G 蛋白（high temperature protein G, HtpG）会激活天然免疫系统如 Toll 样受体，CD91 受体产生相应的信号分子激活下游的炎症通路如 NF- $\kappa$ B，使得胰腺组织内部组蛋白和细胞因子得以发挥作用，加重 CP 炎症。一些研究发现，在 CP 患者中，普氏栖粪杆菌和布氏瘤胃球菌的丰度显著降低，导致体内的丁酸盐的合成减少，从而加速炎症的发生。CP 导致肠道微生物多样性减少，进而使得有害菌（如 *E.coli*）过度生长、有益菌（如双歧杆菌）普遍减少及丁酸和乳酸产生菌株丰度下降，进而加速疾病的发展。有大量的研究表明，肠道菌群紊乱调控 CP 的进程，调节肠道菌群可以预防或延缓 CP 及其并发症的发生。

### 1.2.2 靶向肠道菌群的干预策略

研究表明，益生菌和益生元调节肠道菌群紊乱和免疫系统、改善肠道的完整性、稳定肠道屏障和防止细菌易位<sup>[71]</sup>。已有研究发现，通过给小鼠 CP 模型灌胃阿克曼氏活菌干预，阿克曼氏菌组可以减轻 CP 小鼠胰腺损伤和纤维化作用，其可能是通过稳定肠道屏障、恢复菌群稳态发挥保护作用的。在结肠产生的短链脂肪酸通过血液循环迁移至胰腺，抑制胰腺中的 HDAC1，激活 GPR41 和 GPR43，降低 TGF- $\beta$  的表达，进而减轻胰腺萎缩和纤维化程度<sup>[72]</sup>。然而，益生菌能否长期应用尚未可知，还需要进一步研究。益生元是一种通过促进宿主体内有益菌的生长和代谢，对机体产生好的影响，改善宿主健康的膳食补充剂<sup>[73]</sup>。多糖作为益生元，能有效地抑制代谢性疾病，调节肠道菌群。斜枝白杨多糖可调节 CP 小鼠中肠道菌群的组成和多样性，拟杆菌门丰度增加，厚壁菌门丰度减少，使得过氧化物酶和总抗氧化能力水平升高，肿瘤坏死因子  $\alpha$  和 TGF- $\beta$  表达下降，缓解 CP 症状<sup>[74]</sup>。根据研究表明，CP 中有害菌的丰度增加，可以促进 CP 的发展，

由于病原菌会产生一系列的代谢物，影响肠道菌群的组成，导致异常肠道菌群的过度生长。为了防止异常肠道菌群的过度生长，通过口服抗生素来治疗小肠细菌的过度增长，防治肠道微生态失衡，降低肠道通透性，保护肠道屏障，从而减轻细菌 2 位<sup>[75]</sup>。

### 1.3 组蛋白质精氨酸甲基转移酶 5 概述

蛋白质精氨酸甲基转移酶 5 (protein arginine methyltransferase 5, PRMT5) 作为组蛋白和非组蛋白的表观遗传修饰子，在细胞质和细胞核上发挥其生物学功能<sup>[76]</sup>。PRMT5 首先被定性为转录抑制因子，通过催化组蛋白对称二甲基化诱导肿瘤抑制基因的转录抑制<sup>[77]</sup>。PRMT5 还通过甲基化转录因子、mRNA 剪接因子和 RNA 结合蛋白来调控转录水平。在细胞质中，PRMT5 已被报道通过甲基化表皮生长因子受体，调控 RAS-ERK<sup>[78]</sup>。

#### 1.3.1 PRMT5 的结构和功能

PRMT5 是一种 II 型精氨酸甲基转移酶，可在胍基末端氮原子上发生对称二甲基化，主要分布于细胞质和细胞核中<sup>[79]</sup>。PRMT5 是由四种 PRMT5 蛋白与 WD40/MEP50/p44/WDR77 组成的独特且紧密的异八聚体复合物，中间存在一个中心核心结合其他配体，形成一个更大的多分子复合物，参与基因表达调控、细胞增殖和分化等多种细胞过程<sup>[80]</sup>。PRMT5 的 C 端存在两个催化域：Rossam 折叠域和  $\beta$ -桶域，分别执行结合甲基供体和底物的功能；N 末端只有一个结构域，称为 TIM 桶域 (图 1-1)<sup>[81]</sup>。在 PRMT5 异八聚体的中心形成由四个 MEP50 分子装饰的四聚体，该复合物具备更高的 SAM 和底物的亲和力，发挥更高的甲基化活性 (图 1-2)<sup>[82]</sup>。

PRMT5 主要发挥甲基化组蛋白以及其他蛋白的功能，包括参与调控基因转录程序、调节 RNA 转录延长和终止、DNA 复制、RNA 加工以及代谢等，进而调节各种生物学功能。2002 年，首次证明 PRMT5 发挥 II 型精氨酸甲基化酶的功能，参与调控基因表达和细胞分化<sup>[83]</sup>。此外，PRMT5 通过选择性剪接调节 TIP60 的活性，参与染色质重塑和同源重组介导的 DNA 修复<sup>[83]</sup>。



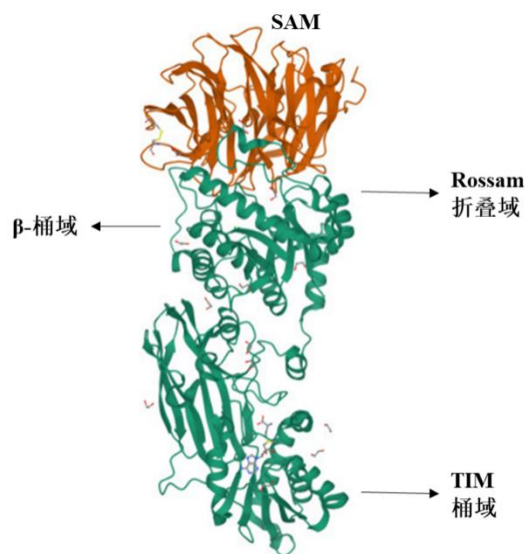


图 1-1 PRMT5 的功能域

Fig. 1-1 Functional domains of PRMT5

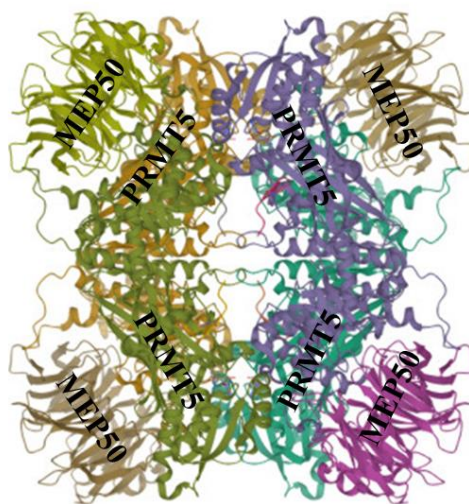


图 1-2 人源 PRMT5:MEP50 复合物的晶体结构

Fig. 1-2 Crystal Structure of the human PRMT5:MEP50 Complex

### 1.3.2 PRMT5 的应用

PRMT5 主要调节组蛋白的甲基化，不仅可以通过调控 H3R8 和 H4R3 来下调基因的转录水平<sup>[84]</sup>，而且还可以在特定条件下也能上调基因转录的水平<sup>[84]</sup>。

在前列腺癌中，被 ERG 招募来的 PRMT5 在雄激素受体的 Arg761 处介导其甲基化进而减弱了分化前列腺上皮中表达的雄激素受体募集和基因转录<sup>[85]</sup>。在乳腺癌中，PRMT5 通过二甲基化 Krüppel 样因子 4 (krüppel-like factor4, KLF4)，抑制其泛素化降解，稳定 KLF4，促进其蛋白累积，进而拮抗电离辐射诱导的细胞凋亡。PRMT5 介导的

KLF4 的积累是校准 DNA 损伤引起的 p21 上调和 Bax 下调的必要条件，在乳腺癌中发挥着重要作用<sup>[86]</sup>。在心血管方面，PRMT5 调节心脏重构相关转录因子 GATA4 的甲基化来调控心肌细胞肥厚性基因的表达，从而对心肌细胞肥大起到调节作用<sup>[87]</sup>。

目前在炎症反应相关研究尚浅，PRMT5 在 HOXA9 介导的内皮细胞炎症中，PRMT5 对 HOXA9 的 Arg-140 进行甲基化修饰，后者在促炎内皮-白细胞粘附分子的上调发挥着关键作用，进而在内皮细胞炎症中起着重要作用<sup>[87]</sup>。除此之外，PRMT5 在溃疡性结肠炎中也发挥着重要作用，通过增强 H3K27me3 与 Foxp3 启动子的结合，导致 Tregs 的分化受到抑制。此外，PRMT5 表达下调可调节 Tregs 的分化，升高 Tregs 的水平，抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-13 的分泌，参与肠道炎症的调节过程<sup>[88]</sup>。

## 1.4 立题依据及意义

CP 是一种进展性的胰腺炎症，至今仍困扰着全球人民健康，且发病率逐年升高，发病机制多样，病因不明。其病理特征为胰腺实质钙化、慢性炎症损伤、胰腺假性囊肿形成和胰腺间质纤维化等。临床症状表现为胰腺外分泌功能障碍、上腹部疼痛反复发作、并发症多（如腹痛、脂肪泻和糖尿病等）、发病周期长和治疗不彻底。以上临床特征给患者在精神上、生活上和经济上带来巨大的压力和负担。因此，深入了解 CP 的发病机制，探索新的治疗方法迫在眉睫。

由于目前对 CP 的发病机理还未探明，尚未发掘有效的临床治疗手段，因此建立与人类发病机制接近的小鼠模型，来探讨 CP 的发病机制和治疗手段十分必要。同时可为临床药物的开发提供可靠的数据，具有重要的临床意义。以往研究表明 CP 发展过程中肠道菌群失调，有害菌过度增长，破坏肠道屏障和免疫系统。而巨噬细胞和 T 细胞等免疫细胞会引起胰腺纤维化-炎症微环境的改变，进而激活 PSCs，参与 CP 的发展。巨噬细胞作为免疫系统中的重要组成部分，能够分化成具有多种功能的类型，可发生 M1 型和 M2 型不同类型的极化，发挥不同的功能。M2 型巨噬细胞与抗炎反应、纤维化和肿瘤疾病的发展密切相关。研究表明不同生理条件下，巨噬细胞表型有所差异。表观遗传调控是其中重要因素，然而，PRMT5 主要研究方向为肿瘤和心血管方面，在炎症方面较少，其在细胞表型转化的调控网络发挥重要作用。PRMT5 与 CP 和菌群之间潜在关系的揭示，可能为 CP 的治疗提供新的靶点。

## 1.5 论文主要研究内容

本论文旨在探究 *E.coli* 引起的 PRMT5 异常升高对腹腔注射雨蛙素构建的 CP 小鼠的影响和潜在的作用机制。主要研究内容如下：

### (1) 明确 CP 发展过程中肠道菌群变化对胰腺 PRMT5 的影响

首先通过腹腔注射雨蛙素构建 CP 模型，采用 16S rDNA 测序方法对小鼠肠道菌群组成进行分析；其次对胰腺组织中的 HtpG 的 mRNA 进行相对定量检测，通过蛋白免疫印迹法 (western blot, WB) 检测胰腺组织中 NF- $\kappa$ B 通路、CD91 等蛋白相对表达情况，采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 和 WB 检测 CP 小鼠胰腺组织 PRMT5 的表达情况；收集临床 CP 胰腺样本和小鼠 CP 胰腺样本。通过免疫荧光实验确定 PRMT5 在胰腺组织中细胞的表达位置；最后通过检测来源于 *E.coli* 的 HtpG 纯化蛋白和热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, Hsp90) 的抑制剂-17AAG 刺激下的 BMDM 中 PRMT5、NF- $\kappa$ B 通路和 CD91 等蛋白相对表达情况。

### (2) 探讨胰腺 PRMT5 对 CP 的作用

首先构建巨噬细胞特异性敲除 PRMT5 小鼠，其次在 EPZ015666 抑制剂处理后的 C57BL/6J 小鼠，建立 CP 模型，检测沉默 PRMT5 对 CP 发展过程胰腺萎缩、损伤和纤维化情况；同时对沉默 PRMT5 后巨噬细胞的极化进行检测。

### (3) 阐明 PRMT5 加剧 CP 的作用机制

首先检测小鼠胰腺中 KLF4 的 mRNA 和蛋白相对表达水平，通过分子对接和质谱分析确定 PRMT5 和 KLF4 的相互作用，免疫共沉淀进一步验证；紧接着使用免疫共沉淀检测 PRMT5 对 KLF4 甲基化和泛素化的修饰作用。此外，通过检测体外先转染 PRMT5 过表达质粒、KLF4 过表达质粒和 KLF4 甲基化位点突变质粒后在 IL-4 刺激的 BMDM 极化的情况；随后采用 BMDM 和 PSCs 体外共培养实验，检测巨噬细胞标记物的 mRNA 相对表达水平和 PSCs 细胞激活标志物的蛋白相对表达水平；最后构建并包装 KLF4 过表达的腺相关病毒，对巨噬细胞特异性敲除 PRMT5 小鼠尾静脉注射，探究 PRMT5 对 CP 发展过程的作用机制。检测敲除 PRMT5 的同时过表达 KLF4 对 CP 小鼠胰腺萎缩、损伤和纤维化的作用。

## 2 实验材料与方法

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 实验动物饲养

本实验中所有动物实验均已获得江南大学动物伦理委员会批准（动物伦理编号：JN.NO20210630C0400130[200]和 JN.No20230515c0401130[215]），饲养于江南大学医学院动物中心，具体饲养环境如表 2-1。

表 2-1 小鼠饲养环境

Tab. 2-1 The feeding environment of mice

指标	数值
饲养温度	22°C~26°C
相对湿度	40%~60%
空气流速	0.1 m/s~0.2 m/s
空气清洁度	一万级
小鼠洁净度	无特定病原体级
静态压强	20 Pa~50 Pa
光照时长	12 h
换气频率	10 次/h~20 次/h
饲养状态	自由饮食、饮水

#### 2.1.2 实验动物信息及分组

本实验所用实验动物 C57BL/6J 和 PRMT5<sup>flox/flox</sup> 小鼠，购于江苏集萃药康生物科技公司，LYZ-2-Cre（B6.129P2-*Lyz2*<sup>[tm1cre]lfo</sup>/J）购于 Jackson Laboratory，配种纯化得到 PRMT5<sup>flox/flox</sup>/LYZ-2-Cre（Mφ-PRMT5-KO）小鼠。本实验所有动物均在检疫间饲养一周，期间自由饮食和饮水，然后进驻到正常饲养间进行后续的模式构建。

PRMT5<sup>flox/flox</sup> 小鼠的鉴定引物序列如下：

F1: 5'-TTCTCTAGGGCCTTGAAGACTGGG-3',

R1: 5'-GGGCACATCACTTTCCTACTACTGT-3'。

LYZ-2-Cre 小鼠的鉴定引物序列如下：

F1: 5'-GCGGTCTGGCAGTAAAACTATC-3',

R1: 5'-CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC-3'。

F2: 5'-TTACAGTCGGCCAGGCTGAC-3'，

R2: 5'-CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC-3'。

本文第一批实验通过 8 周龄的 C57BL/6J 小鼠构建 CP 模型，具体分组信息见表 2-2，用于 3.1: *E.coli* 对 CP 小鼠胰腺 PRMT5 的影响；第二批实验使用 C57BL/6J 小鼠和 M $\phi$ -PRMT5-KO 小鼠构建 CP 模型，具体分组信息见表 2-3，用于 3.2: PRMT5 对 CP 的作用；第三批实验采用 M $\phi$ -PRMT5-KO 小鼠构建 CP 模型，具体分组信息见表 2-4，用于 3.3: PRMT5 加剧 CP 的作用机制。

表 2-2 第一批小鼠分组信息  
Tab. 2-2 Group information of the first mice

组别名称	组别标记	小鼠类别及处理
对照组	对照组	C57BL/6J 小鼠+生理盐水
模型组	模型组	C57BL/6J 小鼠+雨蛙素

表 2-3 第二批小鼠分组信息  
Tab. 2-3 Group information of the second mice

组别名称	组别标记	小鼠类别及处理
对照组	WT+对照组	C57BL/6J 小鼠+生理盐水
模型组	WT+模型组	C57BL/6J 小鼠+雨蛙素
抑制剂对照组	WT+EPZ015666 对照组	C57BL/6J 小鼠+生理盐水
抑制剂模型组	WT+EPZ015666 模型组	C57BL/6J 小鼠+雨蛙素
敲除鼠对照组	M $\phi$ -PRMT5-KO 对照组	M $\phi$ -PRMT5-KO+生理盐水
敲除鼠模型组	M $\phi$ -PRMT5-KO 模型组	M $\phi$ -PRMT5-KO+雨蛙素

表 2-4 第三批小鼠分组信息  
Tab. 2-4 Group information of the third mice

组别名称	组别标记	小鼠类别及处理
敲除鼠对照组	M $\phi$ -PRMT5-KO 对照组	M $\phi$ -PRMT5-KO+生理盐水
敲除鼠模型组	M $\phi$ -PRMT5-KO 模型组	M $\phi$ -PRMT5-KO+雨蛙素
AAV 对照组	M $\phi$ -PRMT5-KO-KLF4-OE 对照组	M $\phi$ -PRMT5-KO+KLF4 过表达 AAV+生理盐水
AAV 模型组	M $\phi$ -PRMT5-KO-KLF4-OE 模型组	M $\phi$ -PRMT5-KO+ KLF4 过表达 AAV+雨蛙素

### 2.1.3 主要材料与试剂

雨蛙素, 吉泰肽业; 苏木精-伊红染色液, 雨露实验器材公司; 改良型马松三色和天狼星红染色液, 森贝伽生物科技公司; KLF4 过表达质粒及对照质粒, 云舟生物科技公司; TGF- $\beta$  siRNA 和 KLF4 siRNA, 吉玛基因生物公司; Flag-PRMT5-WT、Flag-KLF4-WT 和 Flag-KLF4-3K 质粒, 金唯智公司; 去内毒素质粒大提试剂盒, 美基公司生物公司; 青链霉素、红细胞裂解液、胰酶消化液、RIPA 裂解液、改进型柠檬酸钠抗原修复液、免疫荧光通透液、免疫染色一抗、二抗稀释液和封闭液、防荧光淬灭封片液和 His 标签蛋白纯化试剂盒, 碧云天生物技术公司; 人 CP 组织样本玻片, <https://www.biomax.us/>; Lipofectamine 3000、Alexa Fluor<sup>®</sup>647/555 荧光标记山羊抗鼠二抗、TRIzol 试剂和蛋白免疫印迹化学发光显影液, Invitrogen 公司(美国); 17AAG、HtpG 蛋白(*E.coli*)、EPZ015666 和 Protein A/G beads, MCE 公司(美国); BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 美仑生物技术公司; SYBR 荧光 DNA 结合染料, 翌圣生物科技公司; 反转录试剂盒, Takara 公司(日本); 兔抗 PRMT5、巨噬细胞标记物 F4/80 免疫荧光抗体和蛋白质免疫印迹山羊抗兔/鼠 IgG H&L 二抗, Abcam 公司(美国); 鼠抗 PRMT5, Sima-Aldrich 公司(美国); 兔抗  $\beta$ -Actin、p-IKK $\alpha/\beta$ 、IKK $\beta$ 、Flag 和  $\alpha$ -SMA、鼠抗 GAPDH 和 p65, 爱博泰克生物科技(ABclonal)公司; 兔抗 p-p65 和鼠抗 Col- $\alpha$ 1、KLF4 和  $\alpha$ -SMA, Cell Signaling Technology 公司(美国); 醋酸纤维素膜(NC 膜), GE 公司(美国); 脱脂奶粉, R&D 公司(美国); 粪便基因组提取试剂盒, MP 生物医药公司(美国); 小鼠基因型鉴定试剂盒, 诺唯赞生物科技公司; 其余常规试剂及耗材均购自于江南大学后勤试剂库。

### 2.1.4 主要实验仪器

生物安全柜、Multiscan GO 全波长自动酶标仪、CO<sub>2</sub> 细胞培养箱、Nano Drop 2000 分光光度计、超低温电冰箱和液质联用仪, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 5810R 低温超高速离心机和 ST40R 4 $^{\circ}$ C 冷冻离心机, 德国艾本德公司; Scientz-48 高通量组织研磨器, 宁波新芝生物科技公司; LSM880 超高分辨率激光共聚焦显微镜, 德国 Carl Zeiss 公司; 全自动数字切片扫描仪, 匈牙利 3DHitech 公司; MS 半微量精确天平和 ME 电子天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; VCX130 超声波细胞破碎仪, 美国 Sonics 公司; 电泳转膜电源、电泳槽、转印仪、ChemiDoc Touch 成像仪、PCR 仪 S1000、CFX Connect TM Real-time System qRT-PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; 1150H 石蜡包埋机和 RM2245 半自动手动轮转切片机, 德国 Leica。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 M $\phi$ -PRMT5-KO 小鼠的鉴定

## 1. 小鼠 DNA 的提取

准备 1.5 mL 的无菌 EP 管若干，灭菌的剪刀剪取适量的鼠尾；根据样本体积和数量配制适量的鼠尾 1X 裂解液，现配现用；取 200  $\mu\text{L}$  的 1X 裂解液加入鼠尾样本中，涡旋震荡 15 s 后，孵育条件为 55°C，20 min；将孵育后的鼠尾样本进行灭活 Proteinase K，灭酶条件为 95°C，5 min；将灭酶结束的鼠尾样本混匀后，离心吸上清用于 PCR 实验。

## 2. PCR 扩增实验

PCR 反应体系和程序如下：

试剂	使用量	终浓度
2X Taq Plus Master Mix	10 $\mu\text{L}$	1X
裂解产物	2 $\mu\text{L}$	
上游引物 (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{L}$	
下游引物 (10 $\mu\text{M}$ )	1 $\mu\text{L}$	
去离子水	补足至 20 $\mu\text{L}$	

## (1) LYZ-2-Cre 鉴定程序：

步骤	温度	时间	循环
1	94°C	2 min	
2	94°C	20 s	
3	65°C	15 s	-0.5°C
4	68°C	10 s	2~4, 10
5	94°C	15 s	
6	60°C	15 s	
7	72°C	10 s	5~7, 28
8	72°C	2 min	
9	10°C	hold	

(2) PRMT5<sup>fllox/fllox</sup> 鉴定程序

步骤	温度	时间	循环
1	95°C	5 min	
2	98°C	30 s	
3	65°C	30 s	-0.5°C
4	72°C	45 s	2~4, 20
5	98°C	30 s	
6	55°C	30 s	
7	72°C	45 s	5~7, 20
8	72°C	5 min	
9	10°C	hold	

## 3. PCR 产物鉴定

LYZ-2-Cre 的核酸胶浓度为 1.5%，PRMT5<sup>fllox/fllox</sup> 的核酸胶浓度为 2%；取 6  $\mu$ L PCR 产物溶液进行电泳，凝胶放置在 Bio-Rad 凝胶成像仪显示板上拍照记录电泳结果。

## 2.2.2 慢性胰腺炎模型的建立

选取 8 周龄左右的 20 g~23 g 雄性 C57BL/6J 小鼠和 M $\phi$ -PRMT5-KO 小鼠按照 2.1.2 的分组信息，随机分组。本实验参照 M. Lerch 等人的造模方法-连续腹腔注射雨蛙素，该方法能够模拟临床临床 CP 发病特征，即 AP 反复发作造成腺体持续刺激，腺泡细胞损伤，诱导 CP 的发生，是用于研究 CP 的最佳模型<sup>[89]</sup>。造模步骤如图 2-1，第一批实验为 C57BL/6J 小鼠连续 4 周反复给予腹腔注射雨蛙素，每周给药三天（二、四、六），每天给药 6 次（每次间隔 1 h）构建 CP 模型（图 2-1 a）；第二批实验为 M $\phi$ -PRMT5-KO 小鼠构建 CP 模型（图 2-1 b），在雨蛙素诱导 CP 的前三周，C57BL/6J 小鼠给予腹腔注射浓度为 15 mg/kg 的 EPZ015666（图 2-1 c）；第三批实验为 M $\phi$ -PRMT5-KO 小鼠造模前一周尾静脉注射 KLF4 腺相关病毒（10<sup>7</sup> TU/只），最后构建 CP 模型（图 2-1 d）。



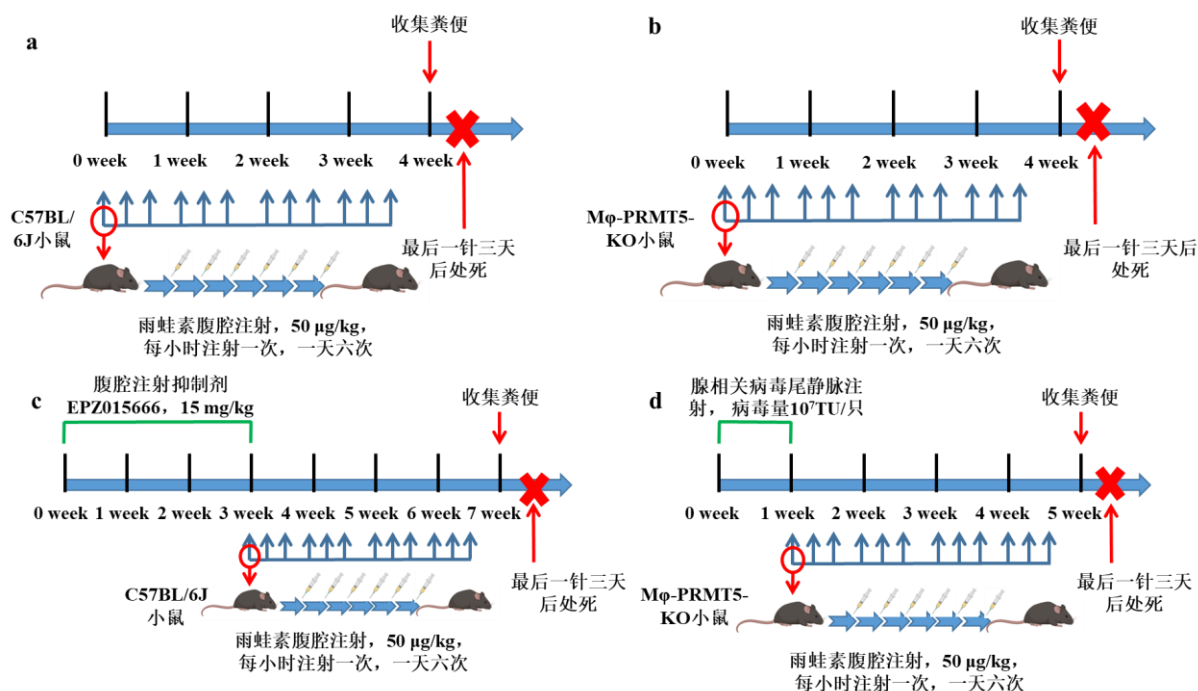


图 2-1 小鼠造模步骤

Fig. 2-1 The animal protocol

图注：(a) 第一批实验（用于 3.1: *E.coli* HtpG 对 CP 小鼠胰腺 PRMT5 的影响）；(b) 第二批实验-敲除鼠组（用于 3.2: PRMT5 对 CP 的作用）；(c) 第二批实验-抑制剂组（用于 3.2: PRMT5 对 CP 的作用）；(d) 第三批实验（用于 3.3: PRMT5 加剧 CP 的作用机制）。

### 2.2.3 胰腺重量与体重比重分析

称量小鼠处死前的体重并记录，处死后快速分离出胰腺组织。将新鲜的胰腺组织置于称重纸上，记录胰腺重量。对数据进行统计处理，将新鲜胰腺组织重量与小鼠体重进行比值，即胰腺重量/体重 (mg/g)，评估胰腺萎缩程度。

### 2.2.4 胰腺组织切片苏木精-伊红染色及形态学分析

取适当的胰腺组织放入 4% 的多聚甲醛中避光固定 2 天。将固定结束的组织进行脱水、包埋、切片和染色等。

(1) 脱水：将胰腺组织放入包埋盒中，进行流水冲洗以便后续透明操作。冲洗结束后，将胰腺组织浸泡于 60%~90% 梯度递增乙醇水溶液，每次 30 min。再分别用 95% 和 100% 乙醇浸泡 20 min。可将胰腺组织内的水分完全去除又可防止胰腺组织直接放入高浓度骤然失水，导致内部脱水不彻底，影响透明的效果。将其转移到二甲苯中，15 min，重复两次。二甲苯起到了一种透明作用，它可以代替残余在组织中的无水酒精，帮助石

蜡渗透到组织中。最后，将包埋盒从二甲苯溶液中迅速取出，转移到提前融化的石蜡I和石蜡II液体中浸泡，每次 1 h。

(2) 包埋：首先将包埋仪的左右加热器、控制台和蜡液流出温度设置为 62℃，细节夹的温度为 55℃，提前预热。将上述浸蜡结束的包埋盒与金属包埋托盘分别放入提前预热好的左右加热室中，待包埋托盘和包埋盒完全预热融化，用细节夹小心将组织取出，最大面积朝下，垂直放入盛满蜡液的包埋托盘中，确保胰腺组织的最大切面。待蜡液凝固成蜡块，取下托盘，常温保存胰腺组织蜡块，留以后用。

(3) 切片：将包埋组织的石蜡块固定在切片机中，调整刀片与石蜡块使二者切面保持平行状态。先用 20 μm 修整石蜡表面，直至胰腺组织完全暴露，之后采用 5 μm 进行切片。选择组织无明显裂痕、周围切面平滑完整且无刀痕的片段，使用毛笔将其平铺于 42℃温水中进行展片，当切片变得完全平整无褶皱，用粘附型载玻片缓慢捞出，置于烘片机内，让组织更好的粘附在载玻片上。

(4) 染色：使用 65℃烘箱烘烤粘附有胰腺组织的载玻片，加热软化石蜡，便于脱蜡的同时增加粘附性。将组织切片放入二甲苯进行脱蜡处理，根据脱蜡效果控制时间，再依次放入 70%~100%梯度递减乙醇溶液中进行复水 5 min，蒸馏水水洗 3 min。转移切片至苏木精染液染色 30 s，小心放入流水中缓慢冲洗 20 min，注意水流速度，以防脱片。之后放入 1%盐酸乙醇分化液中浸泡 5 s 进行返蓝，便于细胞核显色。流水缓慢冲洗 15 min，去除多余的苏木精染料防止干扰伊红染色，注意水流速度。转移切片至伊红染料进行细胞质染色，立即取出放入 70%~100%乙醇溶液中 30 s，二甲苯浸泡 1.5 min。最后中性树胶封片。通风橱中晾干，待中性树胶完全凝固，载玻片不再移动，擦除封片时多余的中性树胶和灰尘，在全自动数字切片扫描仪中进行扫片。可观察到细胞核呈蓝色，细胞质和各种纤维染成不同程度的红色。胰腺组织的实质率使用 Image J 软件进行分析。

### 2.2.5 胰腺组织切片马松三色和天狼星红染色及纤维化程度分析

#### 1. 马松三色染色

马松三色是观察纤维化比较经典的一种方法，本实验采用其来观察胰腺组织的纤维化程度。所谓三色染色通常是肌纤维、神经胶质和纤维素等呈红色，胶原纤维、粘液等呈蓝色，细胞核呈蓝紫色。其原理丽春红品红染料将肌纤维和胞质染为红色，苯胺蓝将胶原纤维染成蓝色，最后细胞核被苏木精所染成蓝紫色。具体操作步骤如下：

(1) 烤片和脱蜡复水：具体步骤同上述苏木精-伊红染色；

(2) 用吸水纸擦拭组织周围的水分，切记不要接触组织，使用免疫组化笔将组织圈住，之后在组织上滴加 Bouin 液，转移至湿盒中室温孵育过夜；

- (3) 蒸馏水缓慢冲洗，观察切片上的黄色消失后，停止冲洗，注意水流速度；
- (4) 天青石蓝 3 min，蒸馏水水洗；
- (5) Mayer 苏木素滴染组织 3 min，蒸馏水稍浸泡；
- (6) 1%盐酸乙醇分化处理，流水冲洗 15 min，注意水流速度；
- (7) 丽春红品红滴染 10 min，流水缓慢稍冲洗；
- (8) 磷钼酸 10 min，弱酸工作液洗 1 min；
- (9) 苯胺蓝滴染 5 min，弱酸工作液洗 1 min，重复 2 次；
- (10) 将切片从湿盒转移至染色架上，于 95%乙醇和无水乙醇快速脱水；
- (11) 二甲苯 3 次，每次 2 min，中性树胶封片；
- (12) 待中性树胶完全凝固时，擦除封片时多余的中性树胶和灰尘，在全自动数字切片扫描仪中进行扫片。

## 2. 天狼星红染色

天狼星红染液均为强酸性染料，可以牢牢的吸附住胶原之中的碱性集团。天狼星红和胶原纤维的碱性集团结合后，在偏振光显微镜的检查下可以增强胶原纤维自带的单轴的双折射效果，提高分辨率，从而使得胶原纤维成红色，肌纤维和胞质等为黄色用于区分两种纤维。具体操作步骤如下：

- (1) 烤片和脱蜡复水：具体步骤同上述苏木精-伊红染色；
- (2) 天狼星红染色：取出胰腺组织切片，吸干周围的水分，使用免疫组化笔圈出胰腺组织，天狼星红滴染胰腺组织，转移至湿盒室温孵育 1 h；
- (3) 洗片：轻轻甩掉天狼星红染色液，流水稍微冲洗，注意水速，谨防脱片；
- (4) 脱水：将切片从湿盒转移至染色架上，于 95%乙醇和无水乙醇快速脱水；
- (5) 透明：依次放入二甲苯I、二甲苯II、二甲苯III，每次 2 min；
- (6) 封片：使用盖玻片和适量中性树胶进行封片；
- (7) 镜检：待中性树胶完全凝固时，擦除封片时多余的中性树胶和灰尘，在全自动数字切片扫描仪中进行扫片。

### 2.2.6 胰腺组织切片免疫荧光染色实验

- (1) 烤片和脱蜡复水：具体步骤同上述苏木精-伊红染色；
- (2) 抗原修复：用 Milli-Q 水将 50X 的改良型柠檬酸钠抗原修复液稀释成 1X 抗原修复液，提前在 98°C 恒温水浴锅预热；将切片浸泡在 1X 抗原修复液中，98°C 孵育 20 min，取出恢复至室温，PBS 清洗；

(3) 去除组织周围水分，使用免疫组化笔圈出胰腺组织，将免疫荧光通透液滴加到胰腺组织上进行通透处理，室温孵育 15 min，PBS 漂洗；

(4) 滴加 QuickBlock™ 免疫染色封闭液，封闭 10 min；

(5) 滴加一抗让其与目的蛋白结合，放置于湿盒中 4℃孵育过夜；

(6) 为去除未结合的一抗，PBS 清洗；

(7) 滴加二抗于样本上，与一抗结合形成荧光标记的复合物，放置于湿盒中室温避光孵育 1.5 h；甩掉二抗，PBS 清洗；

(8) 滴加 DAPI 核染色液，放置于湿盒中室温避光孵育 3 min，PBS 清洗；

(9) 使用抗荧光淬灭封片液和指甲油封片激光共聚焦显微镜拍照记录。

### 2.2.7 细胞和胰腺组织总蛋白的提取及蛋白质免疫印迹实验

#### 1. 细胞和组织总蛋白的提取

(1) 细胞样本：以 6 孔板为例，弃去细胞培养基，PBS 清洗，加入 RIPA 裂解液。将细胞裂解液转移至离心管中。冰上超声破碎细胞，离心吸取少量上清于 200 μL 离心管用于测定总蛋白浓度，剩余样本转移至离心管中按照 1:3 (v:v) 加入 4X 含有巯基乙醇的上样缓冲液，涡旋震荡后，98℃金属浴上加热 10 min，待其恢复至室温分装，-80℃保存待用。

(2) 胰腺组织样本：快速称取 20 mg 左右冻存的胰腺组织于离心管中，按照 1:20 (m:v) 加入 RIPA 裂解液和若干磁珠，组织置于高通量组织研磨器中破碎，得到的胰腺组织匀浆于 4℃，12000 g 离心 15 min。吸取少量上清用于测定总蛋白浓度，剩余样本按照 1:3 (v:v) 加入 4 X 含有巯基乙醇的上样缓冲液（此操作在通风橱进行），涡旋震荡后，98℃金属浴上加热 10 min，待其恢复至室温分装，-80℃保存待用。

#### 2. 蛋白浓度的测定

(1) 制备标准曲线：准备一系列已知浓度的蛋白标准溶液，使用 BCA 工作液孵育后，根据 562 nm 波长下蛋白标准品的吸光度值绘制标准曲线；

(2) 样品处理：将待测蛋白样品溶液，稀释到适当浓度加入到酶标板中；

(3) 孵育：加入 BCA 工作液的酶标板于孵育器中孵育，孵育条件为 37℃，30 min；

(4) 测定吸光度值：将孵育结束的酶标板放置于全波长酶标仪中，562 nm 波长下测定反应体系的吸光度值；

(5) 计算：计算蛋白浓度，按照每孔 30 μg 的蛋白总量计算所需的上样体积。

#### 3. 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)

(1) 配制 10%的分离胶，混匀后灌注至制胶板中，超纯水液封，室温凝固成胶；

(2) 倒去液封用的超纯水，晾干制胶板架中的水分。灌注 5% 浓缩胶，立即插入梳子，室温凝固成胶；

(3) 转移凝胶至装有电泳缓冲液的电泳槽中，小心去除梳子，按照上述计算方法得出的体积进行上样，恒压 80 V 电泳跑至蛋白样本和预染 Marker 通过浓缩胶后，调节电压至 120 V，观察目的蛋白分离完全后，关闭电源。

#### 4. 转膜

(1) 按照滤纸-NC 膜-凝胶-滤纸放置在转印夹上，使用玻璃棒挤压出胶和膜之间的气泡；

(2) 将处理好的转印夹插入装有预冷转膜液的转印槽中，进行冰水浴湿转，恒流 300 mA 转膜 1.5 h。

#### 5. 封闭及抗体孵育

(1) 转膜结束后，为了防止抗原抗体非特异性结合，封闭 NC 膜（条件：3% 脱脂乳，室温，2 h）；

(2) 待封闭完成，TBST 清洗，放入检测蛋白的一抗的抗体孵育盒中孵育（条件：4°C，过夜）；

(3) 一抗孵育完成，回收一抗，TBST 洗涤 NC 膜，根据一抗宿主来源加入适当浓度的二抗，摇床上孵育 2 h；

(4) 回收二抗，TBST 清洗。

6. 显影：将 NC 膜放置于显影液中避光浸泡 2 min，随后使用 Bio-Rad 凝胶成像仪拍照记录，Image Lab 软件进行灰度分析。

### 2.2.8 免疫共沉淀

(1) 蛋白提取同 2.2.7；

(2) 取出 20  $\mu$ L 裂解液转移至 200  $\mu$ L 离心管做 Input 用于 WB 分析。剩余裂解液，先测定蛋白浓度，使用 RIPA 裂解液调整到相同浓度，加入检测抗体，4°C 孵育过夜；

(3) 第二天取 20  $\mu$ L 的 Protein A/G 免疫沉淀磁珠，裂解液清洗免疫沉淀磁珠，4°C，800 g，5 min，清洗 2 次；

(4) 加入上述含有抗体的组织裂解液与预处理后的 Protein A/G 磁珠中，4°C 孵育 4 h；

(5) 4°C，800 g，5 min，吸去上清，使用裂解液洗涤；

(6) 加入 20  $\mu$ L 的 2X SDS 上样缓冲液，98°C 煮沸 5 min；

(7) 11000 rpm，2 min，上样，进行 WB 实验并分析。

## 2.2.9 细胞和胰腺组织总 RNA 提取与实时荧光定量 PCR 分析

### 1. 细胞和组织总 RNA 的提取

本实验采取 TRIzol 法提取细胞或组织中的总 RNA，全程使用无酶离心管，枪头，佩戴口罩手套等，所用试剂均提前预冷。

(1) 组织样本：快速称取 20 mg 冻存的胰腺组织样本，转移至装有 1 mL TRIzol 试剂和若干灭酶的磁珠无酶的离心管中；使用高通量组织研磨器裂解组织，冰上裂解 3 min；

细胞样本：以 6 孔板为例，吸走培养基，PBS 洗去多余的培养基和死细胞，加入适量的 TRIzol 试剂，缓慢吹打，吸入无酶离心管中，冰上静置 5 min，使其充分裂解细胞；加入 200  $\mu$ L 氯仿，12000 g，4 $^{\circ}$ C，15 min；

(2) 吸取约 400  $\mu$ L 最上层水相至无酶的离心管中，加入 400  $\mu$ L 异丙醇，轻轻混匀，静置 8 min；12000 g，4 $^{\circ}$ C，10 min，管底出现白色沉淀；

(3) 弃上清，加入 1 mL 75% 乙醇溶液，洗涤沉淀，重复 2 次；待乙醇完全挥发后，得到 RNA 沉淀；

(4) 加入适量 DEPC 水完全溶解 RNA 沉淀，测定 RNA 的浓度。剩余 RNA 用于后续反转录反应或 -80 $^{\circ}$ C 保存。

### 2. 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析

(1) 在 200  $\mu$ L 的无酶 PCR 管中配制反转录体系，配比见表 2-5：

表 2-5 反转录配制体系

Tab. 2-5 The system of transcription reversing

试剂名称	使用量
5 X Prime Script RT Master Mix	2 $\mu$ L
总 RNA	500 ng
DEPC 水	补足至 10 $\mu$ L

(2) 混匀离心后进行反转录反应，反应条件如下：

温度	时间
37 $^{\circ}$ C	15 min
85 $^{\circ}$ C	5 s
4 $^{\circ}$ C	hold

(3) 测定 cDNA 浓度，将 cDNA 稀释到 50 ng/ $\mu$ L，按照表 2-6 qRT-PCR 反应体系配制反应混合液。

表 2-6 实时荧光定量 PCR 反应体系

Tab. 2-6 The reaction system of qRT-PCR

试剂名称	使用量
2X SYBR Green Master Mix	10 $\mu$ L
cDNA	2 $\mu$ L
上游引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
下游引物 (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
去离子水	补足至 20 $\mu$ L

(5) qRT-PCR 反应程序如下:

步骤	温度	时间	循环
预变性	95°C	5 min	
变性	95°C	10 s	
退火	60°C	30 s	
延伸	72°C	20 s	变性~延伸, 39
冷却	4°C	hold	

(6) 根据 Bio-Rad CFX Manager 进行数据分析,  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算 mRNA 的变化。

表 2-7 目的基因引物序列

Tab. 2-7 Primes of RT-qPCR

基因名称	正向引物序列 (5'-3')	反向引物序列 (5'-3')
<i>Prmt5</i>	TGTAGGGAGAAGGACCGTGA	ATGGCTGAAGGTGAAACAGG
<i>Klf4</i>	ATATTCCTGGACTTACAA	CTCTTCTTCTAACATCATA
<i><math>\alpha</math>-SMA</i>	CTCCCTGGAGAAGAGCTACG	TGACTCCATCCCAATGAAAG
<i>Col-<math>\alpha</math>1</i>	AGAAGGCCAGTCTGGAGAAA	GAGCCCTTGAGACCTCTGAC
<i>CD206</i>	TGATTACGAGCAGTGGAAGC	G TTCACCGTAAGCCCAATTT
<i>Fizz-1</i>	AGGAACTTCTTGCCAATCCA	ACAAGCACACCCAGTAGCAG
<i>Arg-1</i>	AGACCACAGTCTGGCAGTTG	CCACCCAAATGACACATAGG
<i>iNOS</i>	ACCTTGFTTCAGCTACGCCTT	TCTTCAGAGTCTGCCCATTTG
<i>MMP-9</i>	TCCTTGCAATGTGGATGTTT	CTTCCAGTACCAACCGTCCT
<i>TIMP2</i>	CCAATATCCAACGAGACCAC	GGCGAAATCACAGAGGGCTTT
<i>Actb</i>	CCCGTGGACAGGTGACAGG	TGGAAGCATTGAAGTGAGGC

### 2.2.10 小鼠肠道菌群的测定

将小鼠结肠内容物于冷冻干燥机中干燥过夜，取 50 mg 的内容物置于含有陶瓷和二氧化硅颗粒的 Lysing Matrix 离心管中，加入 1 mL CLS-TC，涡旋 15 s，均质匀浆，离心收集上清至离心管中，加入等体积 Binding Matrix Solution，摇床混匀 15 min；离心留下沉淀，加入 Wash Buffer#1 洗涤；离心弃上清，加入混有乙醇的 Wash Buffer#2，重悬沉淀；离心弃上清，晾干吸附柱；加入 50  $\mu$ L DES 涡旋混匀，离心收集滤液；使用特定引物 16S rDNA 的 V3-V4 区域进行 PCR 扩增，用 1%核酸胶对 PCR 产物进行电泳，然后将琼脂糖凝胶移至紫外线照射下，剪切出含目的基因的条带，胶回收样本送至江南大学 PE300 MiSeq 平台进行测序。

反应程序如下：

步骤	温度	时间	循环
预变性	95°C	5 min	
变性	95°C	30 s	
退火	64°C	30 s	
延伸	72°C	30 s	变性~延伸，40
冷却	10°C	hold	

表 2-8 细菌引物序列

Tab. 2-8 Bacteria specific primers

物种名称	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
<i>Escherichia coli</i>	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC
<i>Shigella</i>	GCCTTCTGATGCCTGATGGA	CCACTGAGAGCTGTGAGGAC
<i>HtpG</i>	GCTTATCTCTAACGCCTCCGATGC	CAGTTCGCCATCACCTTCGTACAG
<i>16 S</i>	GCAGGCCTAACACATGCAAGTC	CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT

### 2.2.11 小鼠骨髓源巨噬细胞提取及培养

(1) 准备工作：眼科剪、镊子、注射器、培养皿、PBS、离心管等提前灭菌处理，放进超净工作台，紫外线照射 30 min；

(2) 经人道处死后，将小鼠置于 75%酒精中，浸泡 15 min；

(3) 转移至超净工作台中，快速分离出胫骨和股骨处的肌肉组织，取出完整的胫骨和股骨，PBS 清洗；将骨髓冲洗干净；

(4) 剪开胫骨和股骨两端，使用 PBS 冲出内部骨髓，骨头变透明即可；



- (5) 收集含有细胞的 PBS，离心；
- (6) 加红细胞裂解液，37°C水浴 5 min；
- (7) 将重悬的细胞过筛网，收集滤液，1000 rpm 离心 5 min；
- (8) 弃上清，接种至 6 cm 皿中；
- (9) 培养 6 h 后，将上清液转移至离心管，离心，加入培养基（10% FBS、1% 双抗和 25 ng/ml）混匀，显微镜下计数，使用 6 孔板进行铺板培养；
- (10) 每隔 3 天用诱导分化的培养基换液，连续培养到第 7 天用于后续实验。

### 2.2.12 小鼠原代胰腺星状细胞提取及传代

- (1) 准备工作：眼科剪、镊子、注射器、培养皿、PBS、离心管等提前灭菌处理，于超净工作台中紫外线照射 30 min；
- (2) 小鼠人道处死后，将胰腺组织转移到无菌培养皿中；
- (3) 用 4°C 预冷的灭菌的 PBS 清洗三次，洗去上面的脂肪，血管和肠系膜等；
- (4) 更换新的无菌培养皿，将胰腺组织用眼科剪剪碎成 1 mm<sup>3</sup> 的组织块，注意不要过碎，然后加入 37°C 预热的 5 mL 的 2.5 g/L 胰酶消化液，消化 30 min，每隔 6 min 中轻柔的震荡一次；
- (5) 过滤消化液，1000 rpm，10 min，弃上清，加入 5 mL DMEM/F12 洗涤；
- (6) 将消化后的胰腺组织块均匀铺在培养瓶中，相互间距 0.5 cm 左右。拧紧瓶盖，将瓶底朝上，在培养箱中静置 2 h；
- (7) 加入 20% FBS、1% 的青链霉素的 DMEM/F12 培养基，切记不要冲走组织块；
- (8) 期间可添加少量培养基，显微镜下观察细胞爬出情况；
- (9) 将组织块去除后，继续培养 PSCs 5 天，待细胞长至 80% 左右，进行传代；
- (10) 将原来的培养液吸走，并在壁上添加 PBS 进行清洗，将死亡的细胞或者细胞碎片洗掉，反复进行 2 次，使用胰酶快速铺平整个皿底，一定时间后观察大部分细胞脱落后，终止消化，1000 rpm，5 min，接种至新的培养皿中；
- (11) 前两代使用 20% FBS，10% 的 DMEM/F12 培养基，之后使用 10% FBS，10% 的 DMEM/F12 培养基；
- (12) 使用 3 代~6 代的 PSCs 细胞用于后续实验。

### 2.2.13 细胞转染实验

- (1) 以 6 孔板为例，第一天将细胞均匀接种于 6 孔板中；
- (2) 转染实验开始前，观察细胞密度达到 70%~80% 时，将培养基换成无血清培养基；

(3) 4 h 后进行转染实验，取 2 个 EP 管，标注为I和II管，分别加入 200  $\mu$ L 的 Opti-MEM 培养基，于I管中加入适量的质粒和 1:2 (m:v) 的 P3000 助转染试剂，于II管中加入适当比例 (m:v) 的 Lipofectamine 3000 转染试剂；

(4) 将I和II两管混匀，室温孵育 12 min；

(5) 将制备好的质粒-脂质复合物缓慢滴加到 6 孔板中，绕 8 字混匀，6 h 后换成完全培养基；

(6) 根据实验目的在第二天提取 RNA 或第三天提取蛋白，进行后续实验。

#### 2.2.14 骨髓源巨噬细胞和胰腺星状细胞共培养实验

将 BMDM 按照  $5 \times 10^5$  接种于 Transwell 小室中，将 PSCs 按照  $5 \times 10^4$  接种于细胞培养板，共同培养 48 h。小室的 BMDM 按照实验所需处理进行操作，共培养结束后，收集细胞培养板中的 PSCs，提取细胞总蛋白质，进行 WB 实验。

#### 2.2.15 HEK293T 细胞的复苏及培养

(1) 将实验所需要的 HEK293T 细胞系冻存株从液氮罐转移至 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴锅不断摇动使其快速融化；

(2) 加入培养基混匀，转移至 15 mL 无菌离心管中；

(3) 在 1000 rpm, 5 min 参数下离心，弃上清；

(4) 重悬细胞，接种至 10 cm 皿中，待细胞密度达到 90% 时即可传代；

(5) 弃去培养基，PBS 清洗 2 次；

(6) 弃去 PBS，加入 0.25% 的胰酶，迅速铺平，保证充分接触细胞表面。一定时间后观察大部分细胞脱落后，终止消化；

(7) 移液枪轻轻吹打培养皿底部，尽可能多的将细胞吹打下来，在 1000 rpm, 5 min 条件下离心；

(8) 弃去上清，加入适量完全培养基，充分吹散、混匀，计数，按所需密度将细胞悬液接种至 10 cm 培养皿中；传代次日，观察细胞状态。若发现较多漂浮细胞，应予以换液；

(9) 传代到第 3 代后用于后续实验。

#### 2.2.16 腺相关病毒质粒的提取、包装与浓缩

##### 1. 腺相关病毒质粒的提取

(1) 根据广州云舟生物购买的 KLF4 的 pAV 过表达质粒，接种到 10 mL 含有氨苄青霉素 (100  $\mu$ g/mL) 的 LB 培养液中，37 $^{\circ}$ C, 220 rpm 摇床过夜；

(2) 在 500 mL 培养瓶中加入的含有氨苄青霉素的 LB 培养基，使用无菌的枪头接种适量小量扩增后的菌液，于 37°C，220 rpm 摇床进行 16 h 的大量扩增；

(3) 10000 rpm，3 min，将菌液收集到同一离心管中，倒置在吸水纸上，以尽量去除上清，用于后续处理；

(4) 加入 9 mL Buffer P1/RNase A 混合液至菌体中，剧烈斡旋重悬菌液，使底部无细胞团块，室温静置；

(5) 等体积加入 Buffer P2，轻柔颠倒离心管 6 次~8 次，不可剧烈震荡，以免打断基因组 DNA；

(6) 加入 Buffer LN3 至裂解液，立即颠倒 15 次~20 次，10000 rpm，15 min；

(7) 将 (6) 离心后的上清倒入过滤器中过滤，收集滤液；

(8) 彻底去除内毒素：加入 0.1 倍体积 Buffer ER2 至滤液中，轻轻混匀，冰上裂解 5 min，45°C 温水浴 6 min，10000 rpm 离心 15 min；

(9) 转移上清后，加入 0.33 倍体积的异丙醇，室温静置使其充分接触；

(10) 平衡柱子：将平衡液加入套在 50 mL 收集管中 HiPure DNA Maxi 柱子中央，室温静置 3 min，10000 rpm 离心 3 min；

(11) 弃滤液，将混合液 (9) 转移到同一柱上，10000 rpm，3 min；

(12) 弃废液，加入 10 mL Buffer PW2，10000 rpm，3 min；

(13) 弃滤液，空离，10000 rpm，5 min，打开盖子，室温晾干柱子，使乙醇挥发完全；

(14) 加入 1 mL 双蒸水至柱子膜中心，洗脱质粒，室温静置 3 min，10000 rpm，3 min；

(15) 测定质粒的浓度和吸光度 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 的比值，-20°C 冰箱保存备用。

## 2. 腺相关病毒的包装与浓缩

(1) 提前一天将 HEK293T 细胞按照接种量  $1 \times 10^6$  接种于 10 cm 皿中，待第二天细胞密度达到 70% 左右，提前 4 h 将培养基更换培养基；

(2) 取 1.5 mL 离心管，加入 200  $\mu$ L 的 Opti-MEM 培养基，标记为 A 管。按照合适比例加入三种质粒，总量为 10  $\mu$ g（转移质粒 KLF4 过表达质粒，辅助质粒 pHelper，Rep-cap 表达质粒：RCV9），轻柔混匀后静置 3 min；

(3) 另取一个 1.5 mL 离心管，加入 200  $\mu$ L 的 Opti-MEM 培养基，标记为 B 管，根据质粒质量加入一定体积的 Lipofectamine 3000 转染试剂（m:v=1:2~1:3），轻柔混匀后静置 3 min；

(4) 将 A 离心管中的液体缓慢滴加到 B 离心管中，缓慢涡旋震荡混匀，室温静置 15 min;

(5) 将步骤 (4) 的转染复合物滴加到 HEK293T 细胞中;

(6) 转染 6 h 后更换成新的完全培养基;

(7) 培养 48 h 收集富含腺相关病毒的培养基，重新加入新的完全培养基继续培养 24 h，继续收集，最后将所有腺相关病毒用 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜过滤，清除病毒液中的死细胞和细胞碎片等杂质;

(8) 取出超离管，逐层添加不同浓度的碘克沙醇，最后将处理过的病毒添加到最上层;

(9) 于 4°C，12000 rpm，2.5 h，收集腺相关病毒所在层于新的 15 mL 离心管中;

(10) 用灭菌的 PBS 将得到的病毒沉淀重悬后，分装于-80°C冰箱中保存备用。

### 2.2.17 数据统计与分析

所有数据都使用 Graphpad prism 8 统计软件进行了分析，结果显示为平均 $\pm$ 标准偏差 (Mean $\pm$ SD)。对于两组之间的显著性差异，使用了  $t$  值检定法；对于三组或三组以上的显著性差异，则使用了单一因素分散分析。 $P < 0.05$  被认定为具有统计学学差异 (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )。

### 3 实验结果与讨论

#### 3.1 大肠杆菌对慢性胰腺炎小鼠胰腺中 PRMT5 的影响

新近研究表明, 肠道菌群紊乱参与 CP 发病的发生发展。肠道菌群不仅在 CP 患者中丰度发生改变, 而且通过代谢产物影响先天免疫细胞的激活, 影响远端组织胰腺的免疫炎症疾病。在 CP 患者粪便中有益菌种如双歧杆菌和乳杆菌等丰度下降, 而潜在的致病菌如 *E.coli*, *Shigella* 等丰度上升<sup>[90]</sup>。因此本文推测 CP 发展过程中肠道菌群紊乱, 致病菌及其代谢物的增多, 加速 CP 的发展。

##### 3.1.1 慢性胰腺炎小鼠肠道菌群的变化

临床研究表明, CP 患者胰腺外分泌功能损伤, 导致肠道菌群紊乱, 加剧 CP 的发展。为了探究 CP 发病过程中肠道菌群组成的变化, 本文采用 16S rDNA 对 CP 小鼠结肠内容物 (V3~V4 区域) 进行测序分析。本文利用主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA) 探究对照组和模型组小鼠肠道菌群是否存在差异。如图 3-1 a 所示, CP 小鼠的肠道微生物落 (三角形) 与对照组 (圆形) 显著不同, 证实 CP 的发生显著改变小鼠肠道菌群结构。

接下来本文从多个水平上对肠道菌群丰度进行分析。从门水平上分析 (图 3-1 b), 结果发现与对照组相比, CP 小鼠结肠内容物中厚壁菌门 (Firmicutes) 丰度下降, 放线菌门 (Actinobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia) 等显著上升。使用 LEfSe 分析 (图 3-1 c), 发现 CP 小鼠结肠内容物中 *Escherichia-Shigella* 属的丰度显著升高, 这与临床 CP 患者结肠内容物的菌群变化相同。本研究使用 *E.coli* 和 *Shigella* 特异性引物对结肠内容物中两种菌的相对表达含量进行测定, 如图 3-1 d 所示, 与测序结果一致, CP 小鼠结肠内容物中 *E.coli* ( $P < 0.001$ ) 和 *Shigella* ( $P < 0.01$ ) 的含量均增加, 且 *E.coli* 丰度增加更显著。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/107034146003006046>