

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620120153790

UDC _____

廈門大學

博 士 学 位 论 文

转录协同因子 SRC-3 在细菌性肠炎中对肠道的保护作用及其机理研究

Transcriptional coactivator SRC-3 plays a protective role in host defense against bacteria-induced colitis and study of mechanism

陈文博

指导教师姓名: 俞春东 教授

专 业 名 称: 细胞生物学

论文提交日期:

论文答辩时间:

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

200 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

类固醇激素受体辅激活子 3 (Steroid receptor coactivator, SRC-3) 是一种转录协同因子, 它能够与多种核受体及其它转录因子相互作用而增强它们的转录活性。我们以前的研究表明由于 SRC-3 敲除导致过度的炎症反应和巨噬细胞清除细菌能力的损伤, SRC-3^{-/-}小鼠对大肠杆菌诱导的腹膜炎更敏感, 说明 SRC-3 在宿主防御细菌感染中起着重要作用。最近, 我们发现 SRC-3 在结肠上皮细胞中特异性高表达, 并且在小鼠感染 *Citrobacter rodentium* 后小鼠结肠中 SRC-3 蛋白量显著上调, 说明 SRC-3 可能参与宿主防御 A/E 细菌感染。本研究中, 我们通过比较 SRC-3^{-/-}小鼠和野生型小鼠对肠道感染 *C. rodentium* 的反应来证明这个假设。我们发现在小鼠感染 *C. rodentium* 后, 与野生型小鼠相比, SRC-3^{-/-}小鼠表现出清除 *C. rodentium* 能力损伤和严重的组织损伤。虽然 SRC-3^{-/-}小鼠表达正常的抗菌肽和杯状细胞特异性蛋白比如 Muc1 和 Muc2, 但是在募集中性粒细胞到结肠粘膜中存在缺陷。然而, 在 SRC-3^{-/-}小鼠结肠和结肠上皮细胞中, 负责募集中性粒细胞的趋化因子 Cxcl2 的表达也被延迟。在 CMT93 细胞中, SRC-3 能够调节 Cxcl2 的表达。同时, CMT93 细胞能够通过 TLR4 和 LT β R 信号通路表达 Cxcl2。因此, SRC-3 可能通过上调 Cxcl2 的表达来募集中性粒细胞, 从而对宿主防御肠病原菌起一定的作用。

关键词: SRC-3; *C. rodentium*; 中性粒细胞; Cxcl2

Abstract

Steroid receptor coactivator 3 (SRC-3) is a transcriptional coactivator which interacts with nuclear receptors and other transcription factors to enhance their effects on target gene transcription. Previously, we reported that SRC-3-deficient (SRC-3^{-/-}) mice were markedly more susceptible to *E. coil*-induced septic peritonitis due to an uncontrolled overwhelming inflammation and a defect in bacterial clearance, which highlights a pivotal role of SRC-3 in the host defense system against bacterial infection. Recently, we found that SRC-3 is specifically expressed in colon enterocytes and up-regulated in response to *C. rodentium* infection, suggesting that SRC-3 may be involved in host defense against A/E bacterial infection. In this study, we tested this hypothesis by comparing the response of SRC-3^{-/-} and wild-type mice to intestinal *C. rodentium* infection. We found that SRC-3^{-/-} mice exhibited impaired clearance of *C. rodentium* and more severe tissue pathology after oral infection with *C. rodentium* compared to wild-type mice. Although SRC-3^{-/-} mice expressed normal antimicrobial peptides and goblet cell-specific proteins such as Muc1 and Muc2, SRC-3^{-/-} mice exhibited delayed recruitment of neutrophils into colonic mucosa compared to the wild-type mice. The induction of chemokine Cxcl2, which is responsible for the recruitment of neutrophils, in colon and intestinal epithelial cells of SRC-3^{-/-} mice was also delayed. And SRC-3 can regulate Cxcl2 expression in CMT93 cells. Cxcl2 can also be expressed through TLR4 signaling and LTβR signaling in CMT93 cells. Therefore, SRC-3 may contribute to host defense against enteric bacterium via upregulating chemokine Cxcl2 expression to recruit neutrophils.

Key words: SRC-3; *C. rodentium*; Neutrophils; Cxcl2

目录

摘要.....	I
Abstract.....	II
第一章 前言	1
1.1 病原菌、宿主、环境关系及传染病的发生	1
1.2 胃肠道结构和功能	3
1.2.1 肠道屏障.....	3
1.2.1.1 分泌屏障.....	3
1.2.1.2 细胞屏障.....	5
1.2.2 肠道结构组成.....	5
1.2.2.1 肠细胞 (enterocytes)	6
1.2.2.2 M 细胞 (microfold cells)	6
1.2.2.3 潘氏细胞 (Paneth cells)	7
1.2.2.4 杯状细胞 (goblet cells)	7
1.2.2.5 肠内分泌细胞 (enteroendocrines)	7
1.2.3 肠道中防御微生物的固有免疫系统.....	8
1.2.3.1 TLRs.....	8
1.2.3.2 NLRs	9
1.2.3.3 CLR s	10
1.2.4 肠上皮细胞和肠免疫细胞识别微生物.....	11
1.2.4.1 肠上皮细胞.....	11
1.2.4.2 免疫细胞.....	12
1.3. <i>C. rodentium</i>	13
1.3.1 <i>C. rodentium</i> 血统和流行病学.....	13
1.3.2 <i>C. rodentium</i> 细菌负担量研究方法.....	14
1.3.3 毒力因子.....	15
1.3.3.1 肠上皮细胞抹除基因座 (locus of enterocyte effacement, LEE) 和三	

型分泌系统 (type III secretion system, T3SS)	15
1.3.3.2 其它毒力因子.....	16
1.3.4 <i>C. rodentium</i> 作为 A/E 病原菌感染的小鼠模型	16
1.3.5 <i>C. rodentium</i> 为 IBD 提供小鼠感染模型.....	17
1.3.6 <i>C. rodentium</i> 感染后的免疫反应.....	17
1.3.6.1 固有粘膜免疫反应.....	17
1.3.6.2 适应性粘膜免疫反应.....	19
1.4 类固醇激素受体辅激活子 3	20
1.4.1 SRC-3 分子结构.....	20
1.4.2 SRC-3 生物学功能.....	21
1.4.3 SRC-3 基因定位与表达.....	22
1.4.4 SRC-3 功能分子机制.....	22
1.4.4.1 NF- κ B 信号通路	22
1.4.4.2 E2F1 信号通路.....	23
1.4.4.3 HER2/neu/MAPK 信号通路.....	23
1.4.4.4 Notch 信号通路.....	23
1.4.4.5 激素依赖信号转导通路.....	23
1.4.4.6 激素非依赖信号转导通路.....	24
1.4.4.7 胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) /AKT 信号通路	24
1.4.4.8 C/EBP β 信号通路	24
1.5 立题背景	25
第二章 材料与方法	27
2.1 材料.....	27
2.1.1 小鼠.....	27
2.1.2 菌株.....	27
2.1.3 细胞.....	27
2.1.4 主要试剂.....	27
2.1.5 主要仪器.....	29
2.2 方法.....	30

2.2.1 DNA 相关实验和方法.....	30
2.2.1.1 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞制备和转化 DH5 α	30
2.2.1.2 质粒的提取.....	31
2.2.1.2.1 质粒的小量提取（碱裂解法）.....	31
2.2.1.2.2 质粒的中量提取（Qiagen-tip 100）.....	31
2.2.1.3 Cxcl2 荧光素酶报告质粒的构建.....	32
2.2.1.3.1 小鼠基因组 DNA 的制备.....	32
2.2.1.3.2 Cxcl2 基因启动子的 PCR 扩增.....	32
2.2.1.3.3 PCR 产物纯化.....	33
2.2.1.3.4 双酶切 Cxcl2 启动子和 PGL3-Basic 载体.....	34
2.2.1.4 点突变（site-directed saturation mutagenesis）.....	35
2.2.1.4.1 引物设计.....	35
2.2.1.4.2 扩增点突变质粒.....	35
2.2.1.4.3 点突变质粒转化.....	36
2.2.2 RNA 相关实验及方法.....	36
2.2.2.1 总 RNA 提取.....	36
2.2.2.2 逆转录合成 cDNA.....	36
2.2.2.3 实时荧光定量 PCR（Real-time PCR）.....	37
2.2.3 蛋白质相关实验及方法.....	38
2.2.3.1 蛋白质样品制备.....	38
2.2.3.2 蛋白质浓度测定（BCA 法）.....	38
2.2.3.3 蛋白电泳和 western blot.....	39
2.2.4 细胞相关实验及方法.....	40
2.2.4.1 细胞培养.....	40
2.2.4.2 细胞转染.....	40
2.2.4.2.1 细胞瞬时转染（脂质体转染）.....	40
2.2.4.2.2 细胞稳定转染.....	41
2.2.4.2.3 细胞 siRNA 转染.....	41
2.2.4.3 细胞荧光素酶活性检测.....	42

2.2.4.4 结肠上皮细胞分离.....	42
2.2.4.5 结肠固有层白细胞分离.....	43
2.2.4.6 流式分析中性粒细胞.....	43
2.2.5 小鼠相关实验及方法.....	44
2.2.5.1 SRC-3 基因敲除小鼠的鉴定.....	44
2.2.5.2 <i>C. rodentium</i> 感染小鼠实验.....	45
2.2.5.2.1 <i>C. rodentium</i> 感染小鼠.....	45
2.2.5.2.2 <i>C. rodentium</i> 感染小鼠后样品制备.....	46
2.2.5.2.3 细菌含量测定.....	46
2.2.5.2.4 结肠培养.....	46
2.2.5.2.5 粪便含水量测定.....	46
2.2.6 切片相关实验及方法.....	47
2.2.6.1 石蜡切片及 H.E. 染色.....	47
2.2.6.1.1 石蜡切片.....	47
2.2.6.1.2 H.E. 染色.....	47
2.2.6.2 冰冻切片及 Hanker-Yates 染色.....	48
2.2.6.2.1 冰冻切片.....	48
2.2.6.2.2 Hanker-Yates 染色.....	48
2.2.6.3 组织病理学分析.....	49
2.2.6.4 X-gal 冰冻切片染色.....	49
2.2.6.5 SRC-3 免疫组化.....	50
2.2.7 ELISA 相关实验及方法.....	51
2.2.7.1 ELISA 检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 CCL2 等细胞因子.....	51
2.2.7.2 ELISA 检测细胞因子 CXCL2.....	51
2.2.7.3 ELISA 检测血清 anti-Citrobacter IgG.....	52
2.2.8 MPO 测定.....	52
第三章 结果和讨论.....	54
3.1 SRC-3 在结肠上皮细胞中特异性高表达并在应对 <i>C.rodentium</i> 感染时表达量上调.....	54

3.2 SRC-3^{-/-}小鼠清除 <i>C. rodentium</i> 能力受到损伤而 SRC-1^{-/-}小鼠清除 <i>C. rodentium</i> 能力不受影响	55
3.2.1 感染 <i>C. rodentium</i> 后比较 SRC-3 ^{-/-} 小鼠和野生型小鼠细菌负担量	55
3.2.2 感染 <i>C. rodentium</i> 后比较 SRC-3 ^{-/-} 小鼠和野生型小鼠体重、粪便含水量、结肠重量以及结肠长度.....	56
3.2.3 感染 <i>C. rodentium</i> 后比较 SRC-1 ^{-/-} 小鼠和野生型小鼠清除细菌能力	58
3.3 比较 SRC-3^{-/-}小鼠和野生型小鼠组织病理学	59
3.4 SRC-3^{-/-}小鼠和野生型小鼠结肠抗菌肽和杯状细胞特异性蛋白基因表达情况 .	60
3.5 SRC-3^{-/-}小鼠和野生型小鼠结肠中趋化因子表达情况	63
3.6 感染 <i>C. rodentium</i> 后 SRC-3^{-/-}小鼠和野生型小鼠募集中性粒细胞能力.....	66
3.7 比较 SRC-3^{-/-}小鼠和野生型小鼠感染 <i>C. rodentium</i> 后炎症反应.....	69
3.8 在 CMT93 细胞中 SRC-3 调节 Cxcl2 表达	71
3.9 <i>C. rodentium</i> 对 NF-κB 上游分子的影响	75
3.10 TLR 信号通路和 LTβR 信号通路对 Cxcl2 的影响	77
3.11 讨论.....	79
参考文献.....	82
附录 I 图表索引.....	99
附录 II 缩略语及中英文对照	101
致谢.....	106

Abstract (In Chinese)	I
Abstract (In English)	II
CHAPTER ONE Introduction	1
1.1 The relationship of pathogen, host, environment and development of infectious disease	1
1.2 Intestinal structure and functions	1
1.2.1 The intestinal barrier	3
1.2.1.1 The secreted barrier.....	3
1.2.1.2 The cellular barrier.....	5
1.2.2 The intestinal components	5
1.2.2.1 Enterocytes.....	6
1.2.2.2 Microfold cells.....	6
1.2.2.3 Paneth cells	6
1.2.2.4 Goblet cells	7
1.2.2.5 Enteroendocrines.....	7
1.2.3 Innate immune signaling in defense against intestinal microbes	7
1.2.3.1 TLRs.....	7
1.2.3.2 NLRs	9
1.2.3.3 CLRs	10
1.2.4 Sensing microbes by epithelial cells and immune cells.....	11
1.2.4.1 Epithelial cells.....	11
1.2.4.2 Immune cells.....	12
1.3. <i>C. rodentium</i>	13
1.3.1 Ancestry and epidemiology of <i>C. rodentium</i>	13
1.3.2 Research methods of <i>C. rodentium</i> burden	14
1.3.3 Virulence factors	15

1.3.3.1 Locus of enterocyte effacement and type III secretion system.....	15
1.3.3.2 Other virulence factors.....	16
1.3.4 <i>C. rodentium</i> is a murine model of A/E pathogen infection	16
1.3.5 <i>C. rodentium</i> provides murine infectious model of IBD	17
1.3.6 Immune responses during <i>C. rodentium</i> infection	17
1.3.6.1 Innate mucosal immune responses.....	19
1.3.6.2 Adaptive mucosal immune responses	19
1.4 SRC-3	20
1.4.1 Molecular structure of SRC-3	20
1.4.2 Biological functions of SRC-3.....	21
1.4.3 Location and expression of SRC-3 gene.....	21
1.4.4 Molecular mechanisms of SRC-3functions	21
1.4.4.1 NF- κ B signaling pathway	21
1.4.4.2 E2F1 signaling pathway.....	22
1.4.4.3 HER2/neu/MAPK signaling pathway.....	22
1.4.4.4 Notch signaling pathway.....	22
1.4.4.5 Hormone-dependent signaling transduction pathway.....	23
1.4.4.6 Hormone-independent signaling transduction pathway.....	23
1.4.4.7 IGF-1/AKT signaling pathway	23
1.4.4.8 C/EBP β signaling pathway	23
1.5 Background and significance of this thesis	24
CHAPTER TWO Materials and Methods	26
2.1 Materials	26
2.1.1 Mice	26
2.1.2 Strains.....	26
2.1.3 Cells	26
2.1.4 Reagents	26
2.1.5 Equipments	28
2.2 Methods.....	29

2.2.1 DNA.....	29
2.2.1.1 Preparation of competent cell and transformation	29
2.2.1.2 Preparation of plasmid	30
2.2.1.2.1 Plasmid mini preparation	30
2.2.1.2.2 Plasmid midi preparation	30
2.2.1.3 Construct of Cxcl2 luciferase reporter gene.....	31
2.2.1.3.1 Preparation of mouse genomic DNA	31
2.2.1.3.2 PCR of Cxcl2 promoter	32
2.2.1.3.3 PCR product purification	32
2.2.1.3.4 Double enzyme digestion of Cxcl2 promoter and PGL3-Basic.....	33
2.2.1.4 Site-directed mutagenesis	34
2.2.1.4.1 Primer design	34
2.2.1.4.2 PCR amplification of site mutagenesis plasmid	35
2.2.1.4.3 Transformation of site mutagenesis plasmid.....	35
2.2.2 RNA.....	35
2.2.2.1 Isolation of total RNA.....	35
2.2.2.2 Reverse transcription cDNA	36
2.2.2.3 Real-time PCR	36
2.2.3 Protein.....	37
2.2.3.1 Preparation of protein sample	37
2.2.3.2 Quantitation of protein.....	38
2.2.3.3 SDS-PAGE and western blot	38
2.2.4 Cell.....	39
2.2.4.1 Cell culture.....	39
2.2.4.2 Transfection.....	40
2.2.4.2.1 Transient transfection.....	40
2.2.4.2.2 Stable transfection.....	40
2.2.4.2.3 siRNA transfection.....	41
2.2.4.3 Measurement of luciferase activity	41

2.2.4.4 Isolation of colon epithelial cells	42
2.2.4.5 Isolation of colon lamina propria leckocyte.....	42
2.2.4.6 Measurement of neutophils by FCM	43
2.2.5 Mouse.....	44
2.2.5.1 Genotyping.....	44
2.2.5.2 <i>C. rodentium</i> -infected mice.....	45
2.2.5.2.1 <i>C. rodentium</i> infection	45
2.2.5.2.2 Preparation of tissue sample after <i>C. rodentium</i> infection.....	45
2.2.5.2.3 Measurement of bacterial burden.....	45
2.2.5.2.4 Colon culture.....	46
2.2.5.2.5 Measurement of fical water content.....	46
2.2.6 Section.....	46
2.2.6.1 Paraffin section and H.E. staining	46
2.2.6.1.1 Paraffin section	46
2.2.6.1.2 H.E. staining.....	47
2.2.6.2 Frozen section and Hanker-Yates staining	47
2.2.6.2.1 Frozen section	47
2.2.6.2.2 Hanker-Yates staining	47
2.2.6.3 Tissue pathology scoring.....	48
2.2.6.4 X-gal staining.....	48
2.2.6.5 SRC-3 immunohistochemistry staining	49
2.2.7 ELISA work	50
2.2.7.1 Measurement of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and CCL2 by ELISA	50
2.2.7.2 Measurement of CXCL2 by ELISA	51
2.2.7.3 Measurement of anti-Citrobacter IgG by ELISA.....	51
2.2.8 Measurement of MPO.....	52
CHAPTER THREE Results and discussion.....	53
3.1 SRC-3 is highly expressed in colon enterocytes and up-regulated in response to <i>C.rodentium</i> infection.....	53

3.2 Impaired clearance of <i>C. rodentium</i> in SRC-3^{-/-} mice, not in SRC-1^{-/-} mice	54
3.2.1 Compare the burden between SRC-3 ^{-/-} mice and WT mice after <i>C. rodentium</i> infection	54
3.2.2 Compare body weight, fecal water, colon length and colon weight between SRC-3 ^{-/-} mice and WT mice after <i>C. rodentium</i> infection	55
3.2.3 Compare the ability of clearance between SRC-1 ^{-/-} mice and WT mice after <i>C. rodentium</i> infection	57
3.3 Compare colonic pathology between SRC-3^{-/-} mice and WT mice after <i>C. rodentium</i> infection.....	58
3.4 Gene expression of antimicrobial peptides and goblet cell-specific proteins in the colons of SRC-3^{-/-} and WT mice after <i>C. rodentium</i> infection	60
3.5 Expression of chemokines in the colons of SRC-3^{-/-} and WT mice after <i>C. rodentium</i> infection.....	63
3.6 The recruitment of neutrophils in the colons of SRC-3^{-/-} mice and WT mice after <i>C. rodentium</i> infection.....	66
3.7 Compare the inflammatory response between SRC-3^{-/-} mice and WT mice after <i>C. rodentium</i> infection.....	69
3.8 SRC-3 regulates Cxcl2 expression in CMT93 cell.....	71
3.9 The influence of <i>C. rodentium</i> on upstream signaling molecules of NF-κB pathway	75
3.10 The impact of TLR signaling and LTβR signaling on Cxcl2 expression.....	77
3.11 Discussion.....	79
REFERENCES.....	82
APPENDIX I LIST OF FIGURES	99
APPENDIX II ABBREVIATIONS	101
ACKNOWLEDGEMENTS	106

第一章 前言

1.1 病原菌、宿主、环境关系及传染病的发生

疾病是指生物体在一定条件下,由致病因素引起的具有一定复杂表型或症状的病理状态。疾病按病因可以分为传染性疾病(比如微生物病原性传染病和非微生物病原性传染病)和非传染性疾病(比如生理性疾病、遗传性疾病、癌症及机械损伤等等)。传染是指少量的内源或外源性病原体(pathogen)突破宿主的机械防御、非特异性免疫及特异性免疫系统后并在宿主一定部位生长繁殖,同时引起一系列生理病理状态的过程。若病原体长期处于潜伏或亚临床的感染状态,传染病就不发生,反之,若环境条件有利于病原体的大量繁殖,并可使其通过产生大量的酶或毒素来损害宿主,则宿主患了传染病。

决定传染结局的三要素包括病原菌、宿主和环境。病原菌能不能引起宿主患传染病取决于它的毒力(包括侵袭力和毒素)、侵入数量和侵入门径(包括呼吸道、消化道、皮肤伤口及多种途径)。毒力(virulence)表示病原菌致病能力的大小。比如,细菌性病原菌的毒力是指菌体对宿主体表的粘附、向体内的侵入、在一定部位生长繁殖、向周围部位扩散、抵抗宿主防御机能、并通过产生酶或毒素损害宿主等一系列能力的总和。其中,繁殖与扩散能力是病原菌引起宿主患传染病的重要条件,不同的病原菌有着其特有的繁殖扩散能力。不同的病原菌有不同的致病剂量,有些菌比如伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)需要摄入几亿到十几亿才会引起伤寒症,而有些菌比如痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)只需摄入7个即可患痢疾病。由于宿主不同组织部位对不同的病原菌的敏感性不同,因此,病原菌除了具备一定的毒力和侵入数量外,还需要一个合适的侵入途径,才能完成病原菌对宿主的传染并引发传染病。同时,由于不同个体间的免疫力(immunity)存在差异,因此不同的个体与病原菌接触后,有的患病,有的安然无恙。传染的发生与发展除了取决于病原菌的毒力、侵入数量和侵入门径及宿主免疫力外还取决于对两者都有影响的环境因素。环境因素包括宿主环境(先天的遗传素质和年龄及后天营养等)和外界环境(自然环境等)。良好的环境因素有助于提高机体的免疫力,也有助于限制、消灭自然疫源和控制病原菌的传播,

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.