



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Microecology—Article

肠上皮细胞 Axin1 缺乏可改变肠道微生物群以预防结肠炎

Shari Garretti^{a,b}, Yongguo Zhang^a, Yinglin Xia^a, Jun Sun^{a,b,c,d,*}

^a Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Medicine, University of Illinois Chicago, Chicago, IL 60612, USA

^b Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, University of Illinois Chicago, Chicago, IL 60612, USA

^c Cancer Center, University of Illinois Chicago, Chicago, IL 60612, USA

^d Jesse Brown VA Medical Center, Chicago, IL 60612, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 August 2022

Revised 1 June 2023

Accepted 14 June 2023

Available online 25 July 2023

关键词

Axin1

细菌

微生物组炎症

炎症性肠病

免疫性

微生物组

帕内特细胞

摘要

肠道稳态由特殊的宿主细胞和肠道微生物群共同维持。Wnt/ β -联蛋白信号通路对胃肠道发育和稳态至关重要，其失调与炎症和结肠直肠癌有关。Axin1 负调控激活的 Wnt/ β -联蛋白信号通路，但人们对其在调节健康和疾病宿主微生物相互作用中的关系知之甚少。在此，我们旨在证明肠道 Axin1 决定了肠道稳态和宿主对炎症的反应。根据人炎症性肠病数据集分析 Axin1 的表达。为探讨肠道 Axin1 在调节肠道稳态和结肠炎中的作用和机制，我们在肠上皮细胞 (IEC; *Axin1*^{IEC}) 和帕内特细胞 (PC; *Axin1*^{APC}) 中建立了条件敲除 Axin1 的新小鼠模型与对照组 (*Axin1*^{LoxP}; LoxP: X-over 位点, P1) 小鼠。我们发现人炎症性肠病 (IBD) 的结肠上皮细胞中 Axin1 的表达增加, *Axin1*^{IEC} 小鼠表现出杯状细胞空间分布的改变、PC 形态改变、溶菌酶表达减少和嗜黏蛋白阿克曼菌 (*Akkermansia muciniphila*, *A. muciniphila*) 富集。肠上皮细胞和 PC 中 Axin1 的缺失降低了体内葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的结肠炎易感性。 *Axin1*^{IEC} 与 *Axin1*^{APC} 小鼠和对照组小鼠共同饲养后更易患葡聚糖硫酸钠 (DSS) 结肠炎。用嗜黏蛋白阿克曼菌治疗可降低 DSS-结肠炎的严重程度。抗生素治疗并未改变 *Axin1*^{LoxP} 小鼠中的肠上皮细胞增殖。然而, 与未经处理的 *Axin1*^{IEC} 小鼠相比, 抗生素处理后的 *Axin1*^{IEC} 小鼠肠道增殖细胞减少。这些数据表明, 肠道微生物群具有非致结肠炎性效应。总之, 我们发现肠道 Axin1 的缺失可以预防结肠炎, 这可能由上皮细胞 Axin1 和 Axin1 相关的嗜黏蛋白阿克曼菌驱动。我们的研究证明了 Axin1 在介导肠道稳态和微生物群中的新作用。进一步利用特异性的 Axin1 突变进行机制研究, 阐明 Axin1 如何调节微生物群和宿主炎症反应, 将为人 IBD 提供新的治疗策略。

© 2024 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

炎症性肠病 (IBD) 是一种慢性肠道炎症, 影响全球 600 多万人[1]。IBD 的发病机制尚不清楚, 但已知其涉及环境因素、肠道微生物群和宿主上皮细胞间的复杂相互作用, 以及遗传易感性背景下先天免疫和适应性免疫的失调

[2]。IBD 涉及的一个主要机制是肠道 Wnt/ β -联蛋白信号通路的失调[3–6]。Wnt/ β -联蛋白信号通路是胃肠道 (GI) 发育和稳态的重要调节因子[7]。Axin1 最初被发现是 Wnt/ β -联蛋白信号通路的抑制剂和胚胎轴形成的调节因子[8]。Axin1 是一种支架蛋白, 通过募集 β -联蛋白降解复合体, 促进糖原合酶激酶 3 β (GSK3 β) 磷酸化 β -联蛋白, 靶向

* Corresponding author.

E-mail address: junsun7@uic.edu (J. Sun).

2095-8099/© 2024 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

英文原文: Engineering 2024, 35(4): 241–256

引用本文: Shari Garretti, Yongguo Zhang, Yinglin Xia, Jun Sun. Intestinal Epithelial Axin1 Deficiency Protects Against Colitis via Altered Gut Microbiota. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.06.007>

促使 β -联蛋白被蛋白酶体泛素化和降解[9–11]。然而，Axin1在调节肠道炎症和IBD的发展中的作用尚不清楚。

Axin1在细菌感染中发挥着独特的生物学作用，特别是宿主-病原体相互作用[12]。沙门氏菌在转录后水平降低了肠上皮细胞（IEC）中Axin1蛋白的表达，而其过表达在体外抑制了沙门氏菌的侵袭和炎症[12]。然而，肠道Axin1信号在维持黏膜健康中的作用尚未被完全了解。由于全身Axin1缺失是致命的，少量研究者利用条件敲除Axin1小鼠模型进行机制研究[8]。

在本研究中，我们假设肠上皮细胞Axin1在调节微生物群和炎症易感性中发挥作用。在人IBD样本中，我们发现Axin1在信使RNA（mRNA）和蛋白质水平上的表达增加。为了研究肠上皮细胞Axin1调控的分子机制，我们建立了一个新的肠上皮细胞条件敲除Axin1（Axin1^{ΔIEC}）小鼠模型[13]。肠道Axin1表达的改变损害了肠上皮分泌细胞和细胞分化。此外，我们还建立了Axin1^{ΔAPC}的小鼠模型研究帕内特细胞（PC）Axin1在炎症反应中的组织特异性作用。我们的研究首次证实了肠道Axin1与维持肠道和微生物稳态之间的关系。了解宿主因子（如Axin1）、细胞变化（如PCs）和微生物群[如嗜黏蛋白阿克曼菌（*A. muciniphila*）]将有助于为人IBD提供新的治疗方法。

2. 材料和方法

2.1. 人肠道活检

溃疡性结肠炎（UC）、克罗恩病（CD）患者和健康对照组的石蜡包埋结肠活检样本切片的组织芯片来自美国Biomax公司（CO246；USA）。

2.2. 基因表达数据集

我们使用了高通量基因表达数据库（GEO）存储库已注册的微阵列数据[†]。从GEO存储库中，我们获得了来自UC、CD的IBD患者炎症黏膜和健康对照组的结肠黏膜活检数据。总RNA通过微阵列分离并报道（GEO登录号GSE 16879）。我们提取了UC对照（ $n = 6$ ）、UC（ $n = 24$ ）、CD对照（ $n = 6$ ）和CD（ $n = 18$ ）患者的Axin1基因表达数据进行分析。

2.3. 实验动物

Axin1^{LoxP}（LoxP: X-over位点, P1）对照小鼠最初由Xie等[8]报道。Axin1^{ΔIEC}小鼠是通过将Axin1^{LoxP}小鼠与villin-cre小鼠杂交获得的（Jackson Laboratory, USA）。防

御素阿尔法6（*Defa6*）-cre小鼠来自哈佛大学的Richard Blumberg博士[14]。Axin1^{ΔAPC}小鼠是通过将Axin1^{LoxP}小鼠与*Defa6-cre*小鼠杂交获得的。对6~8周龄的雄性和雌性同笼小鼠进行实验，这些小鼠可以自由饮水，并保持在12 h的暗/光周期内。所有的动物均在伊利诺伊大学芝加哥分校（UIC）的生物资源实验室中，并根据UIC动物护理委员会（ACC）与动物护理办公室和机构生物安全指南进行使用。动物工作得到了UIC动物护理办公室的批准（ACC15-231、ACC17-218和ACC18-216）。

2.4. 小鼠品系的遗传背景

将Axin1靶向载体电穿孔导入SV129胚胎干细胞（ES）。筛选这些胚胎干细胞并评估外显子2处Axin1的破坏情况。将合适的ES克隆注射到C57BL/6J囊胚中，形成嵌合动物。然后嵌合动物进一步杂交产生可育且无可识别表型的Axin1^{LoxP}小鼠。在C57BL/6基础上培育了villin-cre（库存号：004586）转基因小鼠。将设计的质粒注射到C57BL/6小鼠的原核中，得到PC特异性的*Defa6-cre*小鼠品系[14]，使cre-重组酶在PC特异性启动子*Defa6*下表达。

2.5. 嗜黏蛋白阿克曼菌的菌株及生长条件

嗜黏蛋白阿克曼菌（ATCC BAA-835）在Oxoid AnaeroJar（AG0025A；Thermo Fisher Scientific, USA）中用厌氧产气包（AnaeroGen Pack）（AN0025A；Thermo Fisher Scientific, USA），于添加了3% L-半胱氨酸（Sigma-Aldrich, USA）的脑心浸液培养基（BD Diagnostics, USA）中37 °C培养48 h。培养物在12 000 g下离心10 min，然后在无菌磷酸盐缓冲液（PBS）中重悬至每1.5 mL含有10⁹ CFU（菌落形成单位）。立即将培养物置于冰上直至灌胃。

2.6. 诱导结肠炎

结肠炎的诱导如前所述[15–16]。实验期间，小鼠自由摄取溶解于过滤净化水中的5%葡聚糖硫酸钠（DSS）[分子量（MW）：40–50 kDa；USB Corp., USA]。动物每天都要称重。第7天，麻醉处死小鼠，通过疾病活动指数（DAI）来量化结肠炎的严重程度，测定体重减轻百分比、便血和腹泻的百分比。

2.7. 同笼实验

雄性及雌性Axin1^{LoxP}与Axin1^{ΔIEC}或Axin1^{ΔAPC}小鼠（6~8周龄）被共置于新笼。每笼有3只Axin1^{LoxP}小鼠和2只Axin1^{ΔIEC}或2只Axin1^{ΔAPC}小鼠，如前所述[17]。同笼4周，

[†] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>.

自由摄取溶解于过滤净化水中的5% DSS。动物每天都要称重。在DSS给药后第7天，麻醉处死小鼠，用DAI定量结肠炎的严重程度，测定体重减轻百分比、便血和腹泻的百分比。

2.8. DSS-结肠炎模型和嗜黏蛋白阿克曼菌治疗

动物实验使用7~13周龄小鼠进行。在5% DSS处理开始前6 h用嗜黏液阿克曼菌（100 μL PBS悬液）治疗小鼠。喂食5%的DSS水溶液7 d。小鼠持续7 d每日灌胃 1.79×10^9 CFU的嗜黏蛋白阿克曼菌。7 d后，处死小鼠，并采集组织样本。

2.9. 小鼠的抗生素治疗

Axin1^{Loxp}和*Axin1*^{ΔIEC}小鼠（6~8周龄）随机分为两组：非治疗组6只（雄性3只、雌性3只），抗生素治疗组6只（雄性3只、雌性3只）。在过滤后的饮用水中使用抗生素（1 mg·mL⁻¹甲硝唑和0.3 mg·mL⁻¹克林霉素）。对照组饮用不含抗生素的过滤水。在抗生素治疗后的第3周，收集组织样本用于指定研究。

2.10. 小鼠结肠和小肠的组织学研究

按已有研究所述采集肠道[15–16,18–19]，并在10%福尔马林溶液（pH 7.4）中固定，经过处理，然后石蜡包埋。4 μm 的切片用苏木精-伊红（H&E）染色[20]。组织学损伤的评分如前所述[13]。

2.11. 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)迁移

年龄相当的6~9周龄的雄性和雌性*Axin1*^{Loxp}、*Axin1*^{ΔIEC}和*Axin1*^{ΔPC}小鼠腹腔注射BrdU（160 mg·kg⁻¹，PBS稀释；Sigma-Aldrich），并在2、12、24 h后处死。迁移距离是指空肠切片中从隐窝底部到最前端的BrdU阳性肠上皮细胞的微米距离。

2.12. 免疫印迹

通过刮取组织收集小鼠回肠和结肠上皮细胞，并按如前所述进行均质化[17,21]。如前所述，用十二烷基硫酸钠（SDS）-聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）分离等量的标准化蛋白质，转移到硝化纤维素中，并用一抗进行免疫印迹[12,22]。用增强化学发光法显示抗体。用一种以上抗体探测的膜在重新探测之前，需进行剥离处理。

2.13. 免疫组化(IHC)

如前所述，肠组织在10%福尔马林缓冲液中固定，并使用标准技术进行处理[15–16,22–23]。切片用抗*Axin1*（34-5900；Invitrogen, USA）、BrdU（1893；Abcam,

USA）、 β -联蛋白（610154；BD Transduction, USA）和磷酸化- β -联蛋白-S552（9566；Cell Signaling, USA）染色，染色强度的测定如前所述[15,24]。

2.14. 免疫荧光(IF)

新解分离的肠组织经10%的中性缓冲福尔马林固定后，用石蜡包埋。对小鼠肠组织石蜡包埋切片（4 μm ）进行IF染色。制备载玻片后[15]，将切片与抗溶菌酶（Santa Cruz Biotechnology Inc., USA）抗体在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。然后将样品与驴抗山羊Alexa Flour 488（D1306；Santa Cruz Biotechnology Inc., USA）在室温下孵育1 h。组织用SlowFade（S2828；Thermo Fisher Scientific）封闭，盖上盖子并密封。切片用徕卡SP5激光扫描共聚焦显微镜（LSM 710；Carl Zeiss, Germany）或奥林巴斯BX51荧光显微镜（Olympus Life-Sciences, USA）进行检测。

2.15. 肠道细菌的荧光原位杂交(FISH)

使用靶向细菌16S基因高度保守区域的反义单链DNA（ssDNA）探针EUB 388（5'-GCTGCCTCCCGTAG-GAGT-3'）进行FISH。组织切片（4 μm ）在60 $^{\circ}\text{C}$ 下烘烤30 min。切片在二甲苯中脱蜡，用100%乙醇脱水，干燥，在0.2 mol·L⁻¹盐酸（HCl）中孵育20 min，然后在1 mol·L⁻¹ NaSCN中80 $^{\circ}\text{C}$ 加热10 min。切片用胃蛋白酶（4%胃蛋白酶溶于0.01 mol·L⁻¹ HCl中）在37 $^{\circ}\text{C}$ 下消化20 min。切片用洗涤缓冲液（0.30 mol·L⁻¹氯化钠，0.03 mol·L⁻¹柠檬酸钠，pH值为7.0）洗涤。切片在10%福尔马林缓冲液中固定15 min。探针在90 $^{\circ}\text{C}$ 下于5 ng· μL^{-1} 杂交缓冲液（0.9 mol·L⁻¹氯化钠，30%甲酰胺，20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl，pH 7.4）中和0.01% SDS杂交5 min，并在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。载玻片在45 $^{\circ}\text{C}$ 的洗涤缓冲液中洗涤5次，每次5 min。为了观察细胞核，切片用4',6-二脒基-2-苯基吡啶（DAPI）/抗褪色溶液染色。用奥林巴斯BX51荧光显微镜检测载玻片。

2.16. 透射电子显微镜(TEM)

小肠在4%多聚甲醛/3%戊二醛的10 mmol·L⁻¹磷酸钠缓冲液（pH 7.4）中固定48 h。所有样品均按照前述方法制备[15]。树脂聚合后，将样品切成1 mm×2 mm的小块，用飞利浦CM 100电子显微镜（荷兰）在80 kV的加速电压下进行检测，以在UIC电子显微镜核心上成像。

2.17. 多重酶联免疫吸附试验(ELISA)

采用小鼠特异性的ProcartalPlex小鼠细胞因子/趋化因

子便捷26联多重免疫分析板 (EPXR260-26088-901; Invitrogen, USA) 检测血清细胞因子水平。根据制造商的使用说明书, 使用适当的标准进行检测。使用 Magpix 机器 (Luminex, USA) 读取平板。

2.18. 杯状细胞(GCs)的阿尔辛蓝染色

对用卡诺氏固定剂固定的结肠组织石蜡切片进行阿尔辛蓝/过碘酸-希夫染色[25]。载玻片用于计数GCs。每个隐窝中计数酸性(蓝色)、中性(粉红色)和混合(紫色)GCs。GC数是通过将三个隐窝的平均GC数作为一个点来计算的。每只小鼠随机选取3个点。采用 Welch's *t* 检验计算和分析GCs数的平均值。

2.19. 帕内特细胞(PCs)的溶菌酶免疫荧光(IF)

PC采用溶菌酶IF法进行染色。形态学变化定义为D0=正常PCs, D1-D3=异常PCs, 如之前的文献所述[15,17,26]。

2.20. 帕内特细胞(PCs)的分离

收集小肠。用PBS洗涤小肠并纵向切开, 置于冰冷的PBS中并冷藏5 min。吸除PBS并以2 mmol·L⁻¹乙二胺四乙酸(EDTA) PBS替代, 样品在冷室中摇晃30 min。去除2 mmol·L⁻¹ EDTA, 用54.9 mmol·L⁻¹ D-山梨醇和43.4 mmol·L⁻¹蔗糖替代。用力摇晃样品以分离隐窝, 然后用100 μm的细胞过滤器过滤。样品在4 °C 150 g离心10 min。弃上清, 将用TrypLE表达酶以37 °C重悬隐窝15 min, 每5 min轻轻摇晃一次。单细胞悬液通过70 μm过滤器过滤, 在4 °C下200 g离心10 min。用含2 mmol·L⁻¹ EDTA和1%胎牛血清(FBS)的PBS洗涤沉淀两次。离心后, 用含2 mmol·L⁻¹ EDTA和1%胎牛血清的PBS重悬细胞, 与分化群24(CD24)-PE抗体在4 °C黑暗中孵育30 min。将细胞离心, 在流洗缓冲液中洗涤两次, 然后在流洗缓冲液中重悬并进行分选[15]。

2.21. 粪便数据中16S核糖体RNA(rRNA)测序的生物信息学分析

如前所述, 收集和准备粪便样本[17]。在UIC基因组研究中心利用Illumina测序平台对样本进行分析。用QIIME pipeline [27]处理原始序列数据, 包括读取合并、适配、质量微调以及嵌合检查, 并使用UCLUST方法以封闭参考的方式生成可操作分类单元(OTUs), 序列相似性阈值为97%。利用Illumina Curated GreenGenes参考数据库的具有代表性的序列数据[28], 对每个物种进行分类注释。

2.22. 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

用TRIzol试剂从小鼠结肠和原代小肠上皮细胞中提取总RNA。根据制造商的说明(Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), 使用iScript互补DNA(cDNA)合成试剂盒进行RNA逆转录。根据制造商的说明, 使用iQ SYBR green supermix对cDNA反应产物进行qRT-PCR。在同一样本中, 所有表达水平均归一化为绒毛蛋白水平。百分比表达式计算为每个样本的归一化值与相应对照的比值。所有qRT-PCR反应均重复进行。

2.23. 细菌DNA的qRT-PCR

根据制造商的说明, 使用粪便DNA试剂盒(Omega Bio-Tek, 美国)从小鼠的粪便中提取DNA。在CFX-Connect实时系统上进行16S核糖体DNA(rDNA) qRT-PCR反应(Bio-Rad实验室, 美国), 并使用iTaq Universal SYBR Green supermix (1725121; Bio-Rad实验室, 美国)进行扩增。使用16S rRNA特异性引物作为内源性对照, 对样本间进行归一化处理。使用 $\Delta\Delta C_T$ 方法估计每个样本中16S rDNA的相对量。引物序列使用Primer BLAST设计或从附录A中的表S1和表S2中获得。

本文中使用的材料列于附录A中的表S3。

2.24. 统计分析

除另有说明外, 则仅对一只动物进行单独测试。数据以平均数±标准差(SEM)表示, *P*值≤0.05被认为差异有统计学意义。运用Shapiro-Wilks正态性检验, 以检测数据是否显著偏离正态性。根据变量是否正态分布来确定参数分析或非参数分析。采用方差相等的*F*检验来检验两个正常群体具有相同的方差的零假设。正态分布的两组之间的差异通过不等方差的非配对学生*t*检验和不等方差的Welch's *t*检验进行分析。两组非正态分布数据间的差异采用Wilcoxon秩和检验进行分析。三组或三组以上之间的差异酌情采用单因素方差分析(ANOVA)或双向方差分析。为适用多重比较, *P*值通过Tukey方法进行了调整。采用Spearman相关分析和散点图检测Axin1和白细胞介素6(IL-6)与肿瘤坏死因子α(TNF-α)细胞因子之间的相关性。如前所述, 对分类和OTU丰度进行了分析[29]。简而言之, 采用R包phyloseq和vegan进行主坐标分析(PCA)和Shannon多样性分析。使用Windows GraphPad Prism 8.0.0版本(GraphPad Software, USA)和R软件[R Core Team (2021); R Foundation for Statistical Computing, Austria]进行统计分析。

3. 结果

3.1. 人 IBD 中 Axin1 的增加

Axin1 在炎症肠中的状态尚不清楚。我们使用 GEO 数据库分析了人类结肠样本的微阵列数据。我们发现 *Axin1* mRNA 表达水平在人 UC 和 CD 中升高[28][图 1 (a)]。Spearman 相关分析显示, CD 中 *Axin1* 的表达与促炎细胞因子 *IL-6* [图 1 (b)] 和 *TNF- α* [图 1 (c)] 呈正相关。为了研究 Axin1 在蛋白质水平上的变化和定位, 我们对健康对照组、UC 和 CD 受试者的结肠组织进行了 IHC 检测。UC [图 1 (d)] 和 CD [图 1 (e)] 结肠组织显示, 与正常结肠相比, 炎症黏膜中 Axin1 的表达显著增加。

3.2. *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠模型的建立

我们假设肠上皮 Axin1 在结肠炎的发病机制中起作用。我们通过将 *Axin1*^{LoxP} 小鼠品系与 *villin-cre* 小鼠杂交, 产生了一种新的条件敲除肠上皮细胞的小鼠。小鼠结肠和小肠中 *Axin1* mRNA 的表达显示 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠中 *Axin1* mRNA 的显著降低[图 2 (a)]。我们使用肠黏膜刮片通过蛋白质印迹分析蛋白质水平, 发现 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠小肠和结

肠中的肠上皮 Axin1 表达显著降低[图 2 (b)]。

我们检测了 Axin1 在肠道中的表达定位。*Axin1*^{ΔIEC} 小鼠的小肠或结肠中均未检测到 IEC Axin1 染色[图 2 (c) 和 (d)]。此外, 我们通过 FISH 间接测定了黏液层厚度和共生菌群的位置。我们发现, *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠的回肠[图 2 (e)] 和结肠[图 2 (f)] 的共生细菌入侵量有所增加。该数据证实了 *Axin1* 的 IEC 特异性敲除, 且该敲除有助于减少黏液层厚度。我们通过该 *Axin1*^{ΔIEC} 模型能够确定肠上皮 Axin1 调节肠道稳态和结肠炎的机制。

3.3. 肠道 Axin1 对小肠中 GC 分布和 PC 形态的调控

接下来, 我们确定 Axin1 的敲除是否会损害肠道细胞的分化。*Axin1*^{ΔIEC} 小鼠的阿尔辛蓝阳性率显著增加[图 3 (a)]。此外, *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠小肠中 GC 标记物 mucin 2 (*MUC2*) 的 mRNA 表达增加[图 3 (b)], 表明 Axin1 参与了肠道 GC 的分化。我们通过透射电镜分析了 GCs 的结构[图 3 (c)]。*Axin1*^{ΔIEC} 小鼠的黏蛋白颗粒比 *Axin1*^{LoxP} 小鼠的大, 尽管每个 GC 的黏蛋白颗粒数量相似[图 3 (d)]。

PCs 特异性存在于小肠, 分泌抗菌肽, 对塑造微生物群和调节先天免疫至关重要[14–15,30]。考虑到其生理作

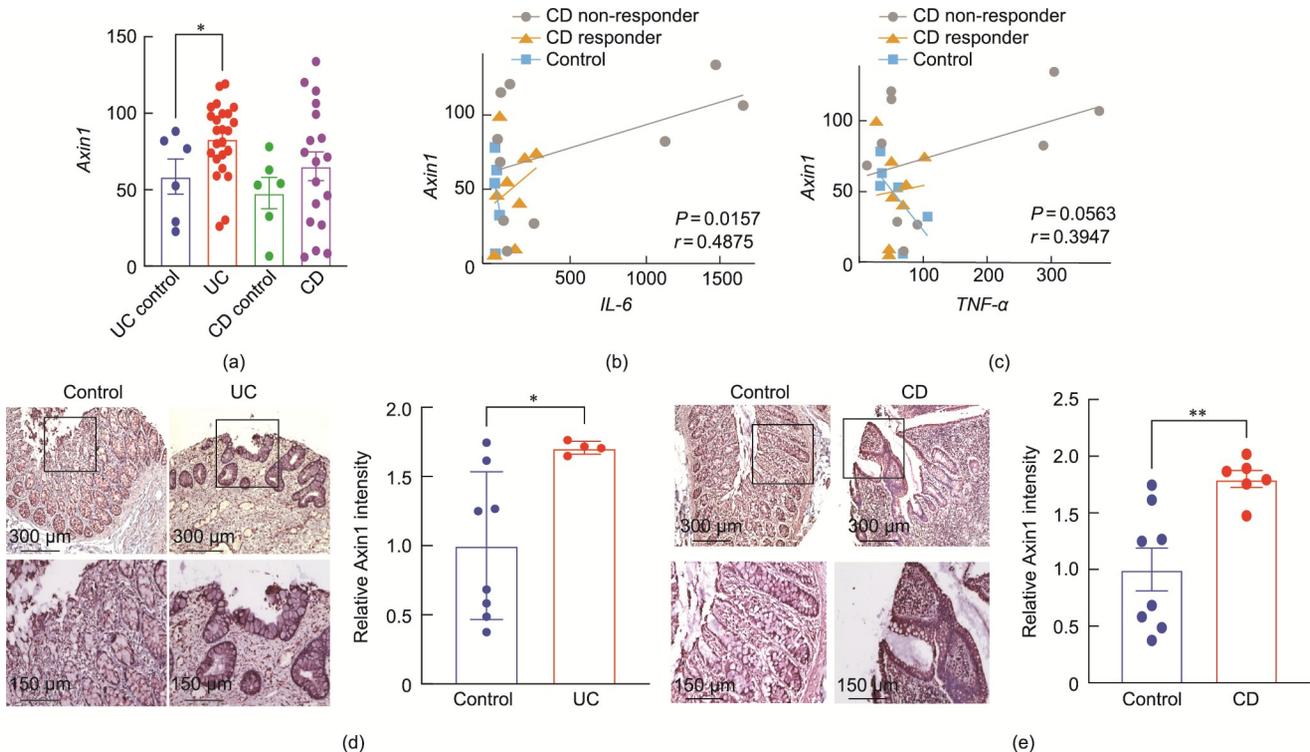


图 1. Axin1 在人 IBD 中表达上调。(a) *Axin1* mRNA 在 UC 和 CD 患者中的表达。健康对照、CD 和 UC 患者的数值来自 GEO 数据库 GSE 16879。数据以平均数 (mean) \pm SEM 表示; UC 对照组 ($n=6$)、UC ($n=24$)、CD 对照组 ($n=6$)、CD ($n=18$); 单因素方差分析 (one-way ANOVA); $*P < 0.05$ 。(b)、(c) 在 CD 患者中, *Axin1* 和 *IL-6* (b) 或 *TNF- α* (c) 的显著协同表达。我们在 GEO 数据库 GSE 16879 中对治疗前对 IBD 药物英夫利昔单抗有响应 (CD 响应) 和无响应 (CD 无响应) 的患者进行了 *Axin1* 与 *IL-6* 或 *TNF- α* 相关分析。对照组 ($n=6$)、CD 响应 ($n=8$)、CD 无响应 ($n=10$), $P=0.0157$, $r=0.4875$ (*IL-6*); 对照组 ($n=6$)、CD 响应 ($n=8$)、CD 无响应 ($n=10$), $P=0.0563$, $r=0.3947$ (*TNF- α*)。 (d) UC 患者 ($n=4$) 和健康对照组 ($n=8$) 结肠中 Axin1 蛋白的 IHC 染色。(e) CD 患者 ($n=6$) 和健康对照组 ($n=8$) 结肠中 Axin1 蛋白的 IHC 染色。非配对学生 *t* 检验, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

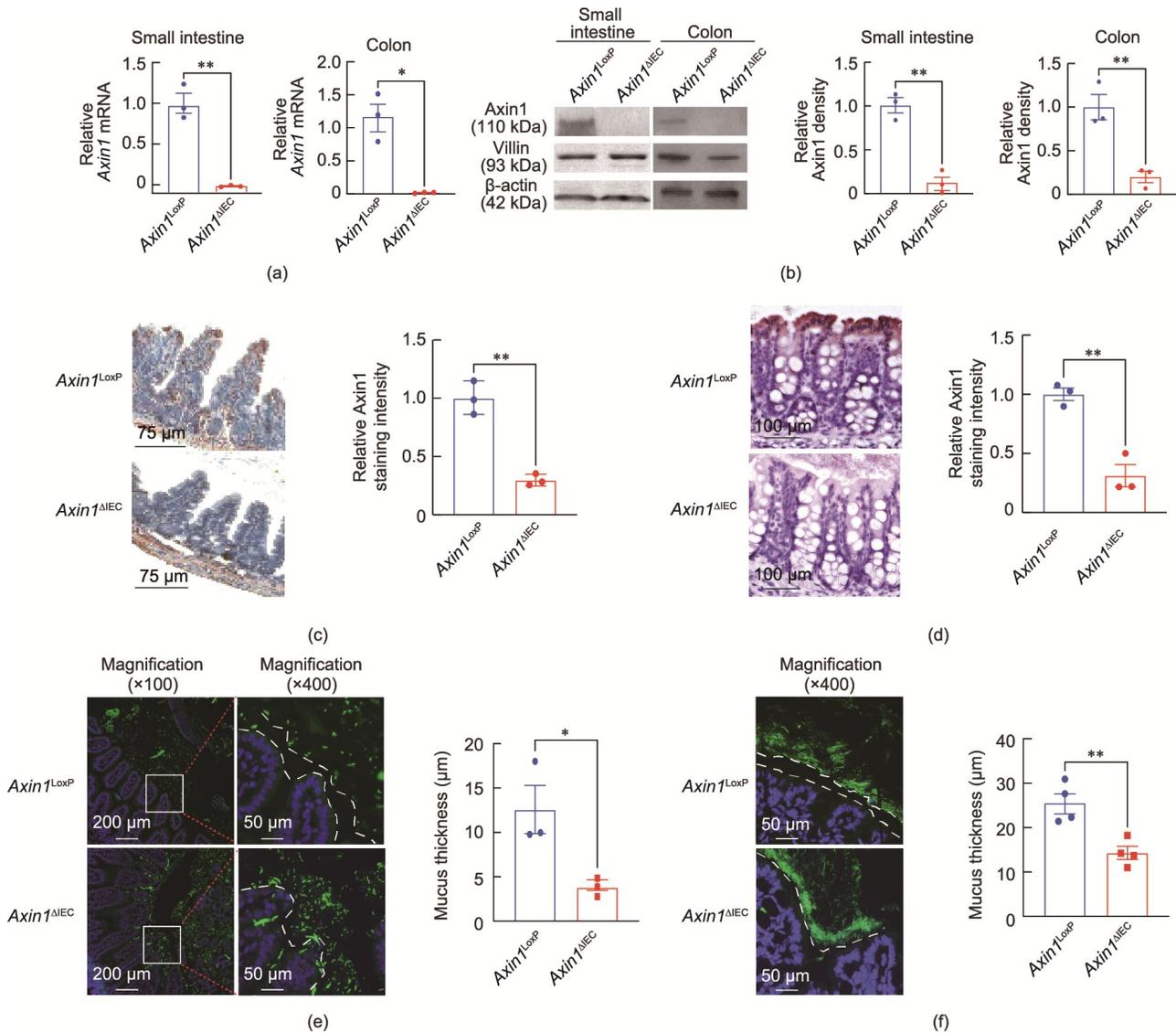


图2. *Axin1*^{ΔIEC}的建立小鼠模型 *Axin1*^{ΔIEC}通过杂交 *Axin1* 有条件地敲除 IEC 产生 *Axin1*^{LoxP} 的小鼠表达绒毛蛋白的小鼠。Villin 仅在 iec 中表达。(a) 实时荧光定量 qPCR 检测小肠和结肠中 *Axin1* mRNA 的表达。以绒毛蛋白作为 IEC 标记物的肠道 *Axin1* 的 (b) *Axin1* 免疫蛋白印迹分析。(c)、(d) *Axin1* 的小肠 (c) 和结肠 (d) 中 *Axin1*^{LoxP} 的 IHC 染色 *Axin1*^{ΔIEC} 老鼠。(e)、(f) 使用一般细菌探针 EUB388 (绿色) 对小肠 ($n=3$) (e) 和结肠 ($n=4$) (f) 进行 FISH 染色和间接定量。白色虚线表示黏液屏障的间接厚度。所有数据均以平均 \pm SEM 表示；每组 $n=3$ ；(a) 中结肠使用的 Welch 双样本 t 检验；所有其他数字都使用未配对的学生 t 检验进行分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

用，我们接下来评估 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠中的 PC 状态。我们根据 Wu 等[17]之前描述的 IF 染色，根据其溶菌酶形态对 PC 进行了分类[图 3 (e)]。正常 PC 被标记为 D0，而异常 PC 被分为 D1 (无序)、D2 (耗尽) 和 D3 (弥散) 溶菌酶颗粒形态。我们发现，与 *Axin1*^{LoxP} 相比，*Axin1*^{ΔIEC} 回肠中正常的 PC 较少。最重要的是，我们看到 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠中异常 PC 的数量显著增加[图 3 (f)]。这些异常的 PCs 与 mRNA 水平上的溶菌酶 (*Lyz1*) 降低有关[图 3 (g)]。我们进一步通过透射电镜评估了 PC 的结构形态，发现 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠中电子致密颗粒较少的 PC 数量显著增加[图 3 (h)]。总而言之，这些数据与蛋白质水平上溶菌酶表达的降低有关[图 3 (i)]。

3.4. *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠肠道微生物群的变化

众所周知，PC 和 GCs 可以调节肠道微生物群的特征和功能。我们通过 16S rRNA 测序检测了 *Axin1*^{LoxP} 和 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠的细菌丰度，发现粪便扩增子谱显示 *Axin1*^{LoxP} 和 *Axin1*^{ΔIEC} 微生物群之间的 α -和 β -多样性没有变化[图 3 (j) 和 (k)]。然而，*Axin1*^{ΔIEC} 小鼠中，优势属的丰度显示在阿克曼菌属 (*Akkermansia*) 中富集，Rikenellaceae 和梭菌目 (Clostridiales) 减少[图 3 (l)]。阿克曼菌是一种潜在的益生菌和一种存在于肠道黏液层中的黏液溶解细菌[31]。这些数据表明，肠上皮 *Axin1* 调节肠道分泌细胞稳态和微生物组成，有助于阿克曼菌属丰度的增加。

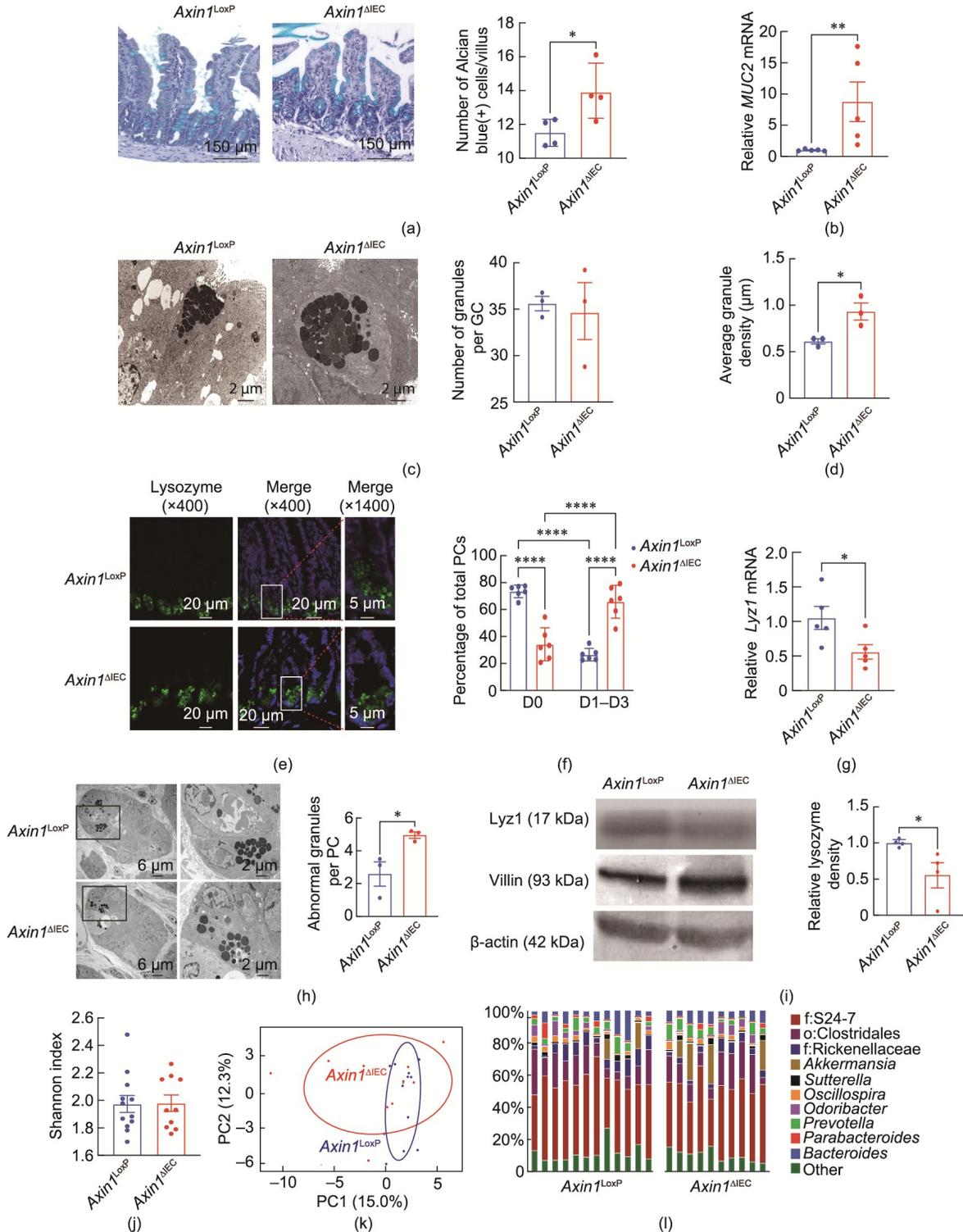


图 3. 肠上皮 Axin1 调控小肠内 GC 分布和 PC 形态。(a) 小肠绒毛中 GCs 的阿尔辛蓝染色 ($n = 4, > 15$ 绒毛 · 小鼠⁻¹)。 (b) qRT-PCR 检测小肠中 MUC2 mRNA 的表达 ($n = 5$)。 (c) 通过透射电镜观察 *Axin1^{LoxP}* 和 *Axin1^{ΔIEC}* GC 颗粒。 GCs 通过细胞质颗粒的存在及其顶端位置进行鉴定 ($n = 3$)。 (d) *Axin1^{LoxP}* 和 *Axin1^{ΔIEC}* 小鼠黏蛋白颗粒的平均大小 ($n = 3, > 15$ 细胞 · 小鼠⁻¹)。 (e) *Axin1^{LoxP}* 和 *Axin1^{ΔIEC}* 小鼠小肠隐窝中溶菌酶的 IF 染色。 (f) 溶菌酶形态正常 (D0) 和异常 (D1~D3) 的 PC 的百分比 ($n = 6, > 15$ 隐窝 · 小鼠⁻¹)。 (g) *Axin1* 小鼠的溶菌酶 (*Lyz1*) mRNA ($n = 6$)。 (h) 通过透射电镜观察 *Axin1* 中 PC 颗粒异常。 PC 通过细胞质颗粒和基底位置的存在来鉴定 ($n = 3, > 50$ 颗粒 · 小鼠⁻¹)。 (i) 蛋白质印迹检测 *Axin1* 小鼠中溶菌酶蛋白的表达 ($n = 4$)。 (j) *Axin1^{LoxP}* 和 *Axin1^{ΔIEC}* 小鼠间粪便细菌香农多样性指数, 数据以平均数 (mean) ± SEM 表示; 每组 $n = 10\sim 12$; Welch's *t* 检验。 (k) PCA 图显示了 *Axin1^{LoxP}* (浅蓝色) 和 *Axin1^{ΔIEC}* (红色) 粪便细菌的差异。 这些轴解释了两组之间 27.3% 的分离变化 (每组 $n = 10\sim 12$)。 (l) *Axin1^{LoxP}* 和 *Axin1^{ΔIEC}* 小鼠粪便中顶级属的丰度百分比。 所有未确认或其他已确认的物种都被归为“其他”。 如图例所示, 属的颜色与图例指示协调一致。 多个条表示每个条有一个小鼠。 上述所有数据均以平均数 (mean) ± SEM 表示; (f) 采用 Tukey 方法的双向方差分析, (b) 和 (h) 采用 Wilcoxon 秩和检验; 其他图中均采用非配对学生 *t* 检验进行分析。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ 。 PC1: 第一个主成分, PC2: 第二个主成分。

3.5. 肠上皮细胞 Axin1 缺陷小鼠对 DSS 诱导的结肠炎的易感性较低

为了评估 IEC Axin1 缺失的生理影响, 我们使用了葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的结肠炎小鼠模型。Axin1^{LoxP} 和 Axin1^{ΔIEC} 小鼠用 5% DSS 处理 7 天, 并测定结肠炎参数。我们发现, 与 Axin1^{ΔIEC} 小鼠相比, Axin1^{LoxP} 小鼠在 DSS 给药期间体重减轻更多[图 4 (a)]。根据疾病活动指数 (DAI), Axin1^{LoxP} DSS 小鼠的粪便中有明显的出血和腹泻[32][图 4 (b)]。相应地, 与 DSS 处理的 Axin1^{ΔIEC} 小鼠相比, DSS 处理的 Axin1^{LoxP} 小鼠的结肠和盲肠缩短[图 4 (c) 和 (d)]。DSS 处理小鼠的组织学分析显示有严重的炎症, 表现为肠上皮破坏和炎症细胞浸润[图 4 (e)]。相比之下, DSS 喂养的 Axin1^{ΔIEC} 小鼠的组织学炎症评分显著

降低[图 4 (f)]。我们还检测了血清细胞因子谱, 发现与 DSS 处理的 Axin1^{LoxP} 小鼠相比, Axin1^{ΔIEC} 小鼠的 TNF- α 、IL-6 和 IL-18 显著降低[图 4 (g) ~ (i)]。IL-5 和嗜酸性粒细胞趋化因子在没有 DSS 刺激的 Axin1^{ΔIEC} 小鼠中升高[图 4 (j) 和 (k)]。相比之下, 在没有 DSS 刺激的 Axin1^{LoxP} 小鼠中, IL-27 水平升高[图 4 (l)]。这些数据强烈表明, 在 DSS 介导的结肠炎期间, IEC Axin1 缺陷小鼠的炎症反应减少。

3.6. Axin1^{ΔIEC} 小鼠与 Axin1^{LoxP} 小鼠同笼饲养增加了 DSS 结肠炎的易感性

Axin1^{ΔIEC} 小鼠的肠道微生物群发生了变化, 这与肠道炎症结果的改善有关。我们假设 Axin1 的基因缺失改变了

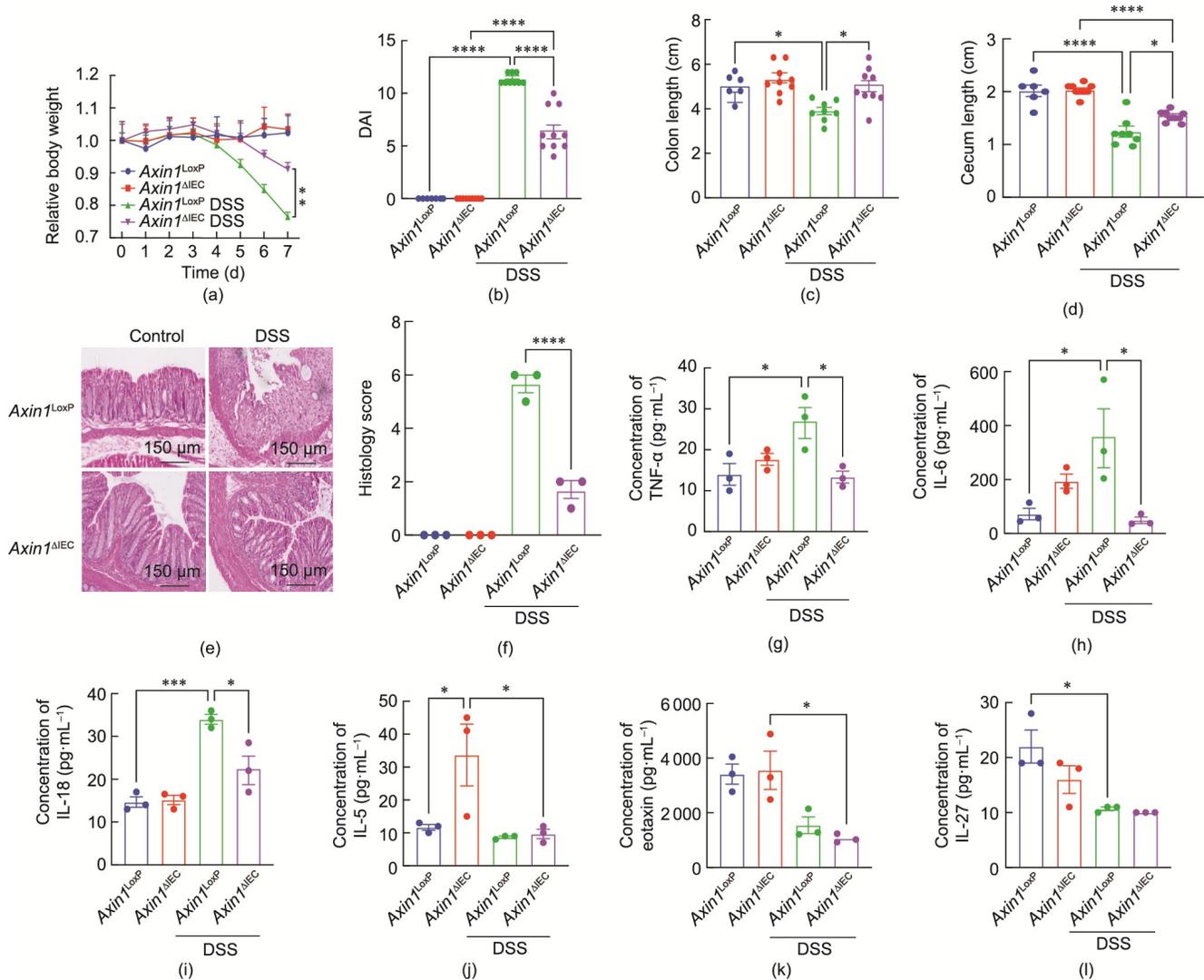


图 4. 肠上皮细胞 Axin1 的缺失对 DSS 诱导的结肠炎具有保护作用。(a) 连续 7 天给予 5% DSS, 小鼠相对体重变化情况。每个点代表至少 6 只老鼠。数据用平均数 (mean) \pm SEM 表示; $n = 6-9$; 双向方差分析 (two-way ANOVA); ** $P < 0.01$ 。在 Axin1 小鼠第 7 天结肠炎的严重程度 (b)、结肠长度 (c) 和盲肠长度 (d)。(e) 第 7 天远端结肠的 H&E 组织学检查。(f) 对照组和 DSS 处理小鼠的组织学评分 ($n = 3$)。(g-l) Axin1 小鼠 ($n = 3$) 血清 TNF- α (g)、IL-6 (h)、IL-18 (i)、IL-5 (j)、嗜酸性粒细胞趋化因子 (k) 和 IL-27 (l) 的血清细胞因子水平。上述数据用平均数 (mean) \pm SEM 表示; 双向方差分析 (two-way ANOVA); * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

导致其非结肠杆菌表型的微生物群。我们同笼饲养 *Axin1*^{ΔIEC} 和 *Axin1*^{LoxP} 小鼠 4 周，然后用 5% 的 DSS 刺激 7 天。我们发现，同笼饲养降低了 DSS *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠的体重和 DAI [图 5 (a) 和 (b)]。同笼饲养还将 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠的结肠和盲肠缩短到 *Axin1*^{LoxP} 小鼠的水平 [图 5 (c) 和 (d)]。同笼饲养后，*Axin1*^{ΔIEC} 小鼠的嗜黏蛋白阿克曼菌数量减少 [图 5 (e)]。同笼饲养的 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠肠上皮损伤较单独饲养 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠增加 [图 5 (f) 和 (g)]。DSS 处理过的 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠血清 TNF-α、IL-6 和 IL-18 水平降低。然而，同笼饲养将 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠的血清细胞因子水平提高到与 *Axin1*^{LoxP} 小鼠相似的水平 [图 5 (h) ~ (j)]。我们的结果表明，*Axin1*^{ΔIEC} 小鼠对 DSS 诱导的结肠炎的抵抗力取决于它们的肠道微生物群。

3.7. 嗜黏蛋白阿克曼菌治疗 (AKK) 改善 *Axin1*^{LoxP} 小鼠的 DSS 结肠炎

我们假设嗜黏蛋白阿克曼菌可能是驱动 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠 DSS-结肠炎保护的微生物。为验证这一点，我们在 DSS-结肠炎攻击期间将 AKK 应用于 *Axin1*^{LoxP} 和 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠。我们发现 AKK 改善了 *Axin1*^{LoxP} 小鼠的体重减轻情况 [图 6 (a)]。此外，AKK 降低了 *Axin1*^{LoxP} 小鼠结肠炎的严重程度，并延长了结肠和盲肠的长度 [图 6 (b) ~ (d)]。与 DSS 组小鼠相比，DSS + AKK 组 *Axin1*^{LoxP} 和 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠的 AKK 增加了 1000 多倍 [图 6 (e)]。在 DSS 处理下，*Axin1*^{ΔIEC} 小鼠在有 AKK 或无 AKK 的情况下，小鼠的体重、DAI 或器官长度均无显著差异 (图 6)。该数据表明，嗜黏蛋白阿克曼菌可能在 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠中形成了非结肠杆菌表型。

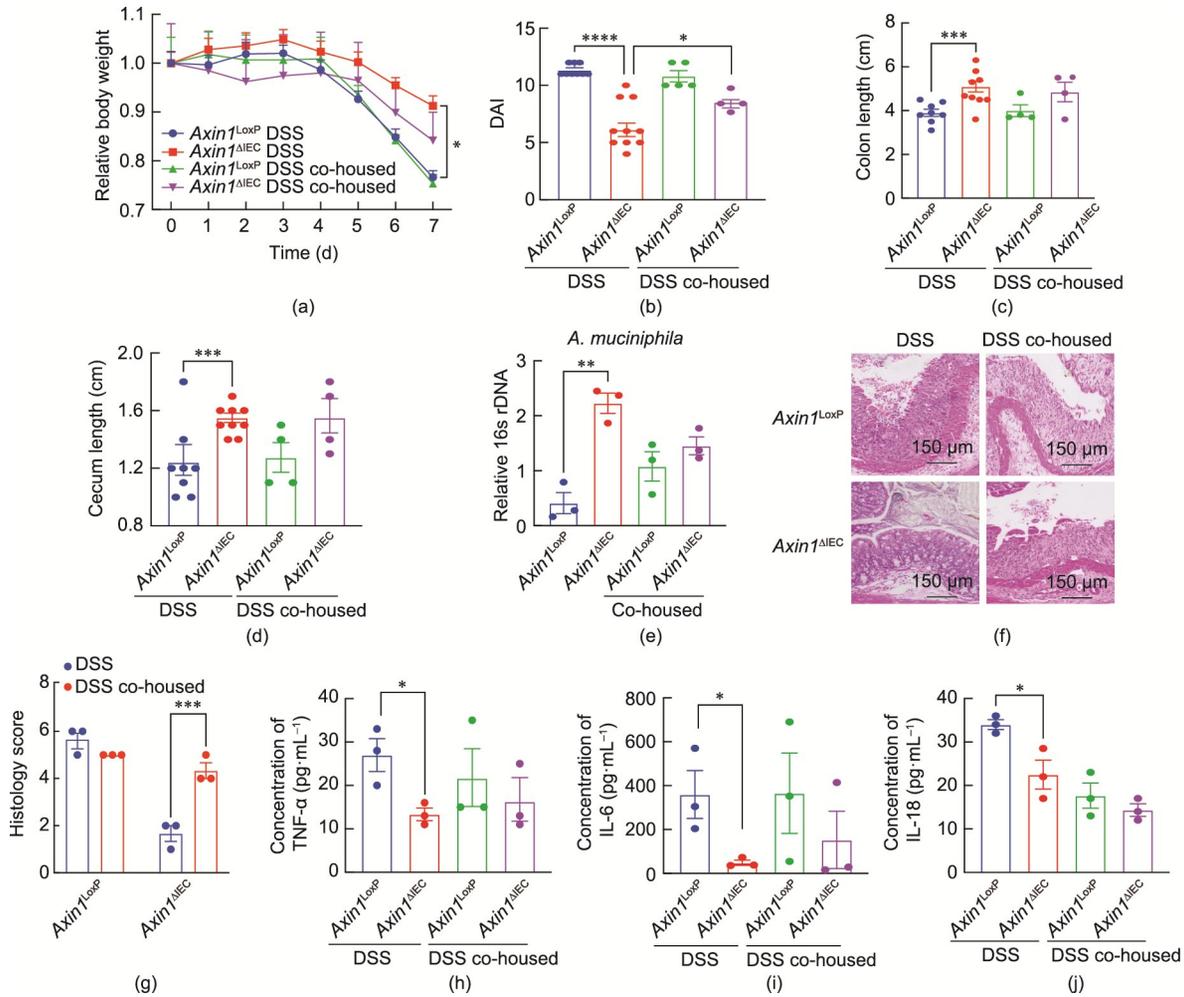


图 5. 与 *Axin1*^{LoxP} 小鼠同笼饲养后，*Axin1*^{ΔIEC} 小鼠对 DSS 诱导的结肠炎的易感性增加，*Axin1*^{LoxP} 和 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠同笼饲养 4 周，然后用 5% 的 DSS 处理 7 天。(a) DSS 小鼠的相对体重变化。每个点代表至少 4 只老鼠。数据用平均数 (mean) ± SEM 表示； $n = 4-8$ ；双向方差分析 (two-way ANOVA)； $*P < 0.05$ 。Axin1 小鼠第 7 天结肠炎的严重程度 (b)、结肠长度 (c) 和盲肠长度 (d)。上述数据用平均数 (mean) ± SEM 表示； $n = 4-8$ ；双向方差分析 (two-way ANOVA)； $*P < 0.05$ ， $***P < 0.001$ ， $****P < 0.0001$ 。(e) 通过 qRT-PCR 检测单独饲养和共同饲养 Axin1 小鼠嗜黏蛋白阿克曼菌 rDNA 表达水平 [平均数 (mean) ± SEM； $n = 3$ ；单因素方差分析 (one-way ANOVA)； $**P < 0.01$]。(f) 第 7 天远端结肠的 H&E 组织学检查。(g) Axin1 DSS 小鼠的组织学评分 [平均数 (mean) ± SEM； $n = 3$ ；单因素方差分析 (one-way ANOVA)； $***P < 0.001$]。DSS *Axin1*^{LoxP} 和 DSS *Axin1*^{ΔIEC} DSS 小鼠血清细胞因子 TNF-α (h)、IL-6 (i)、IL-18 (j) [平均数 (mean) ± SEM； $n = 3$ ；未配对学生 *t* 检验比较 *Axin1*^{LoxP} 和 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠； $*P < 0.05$]。

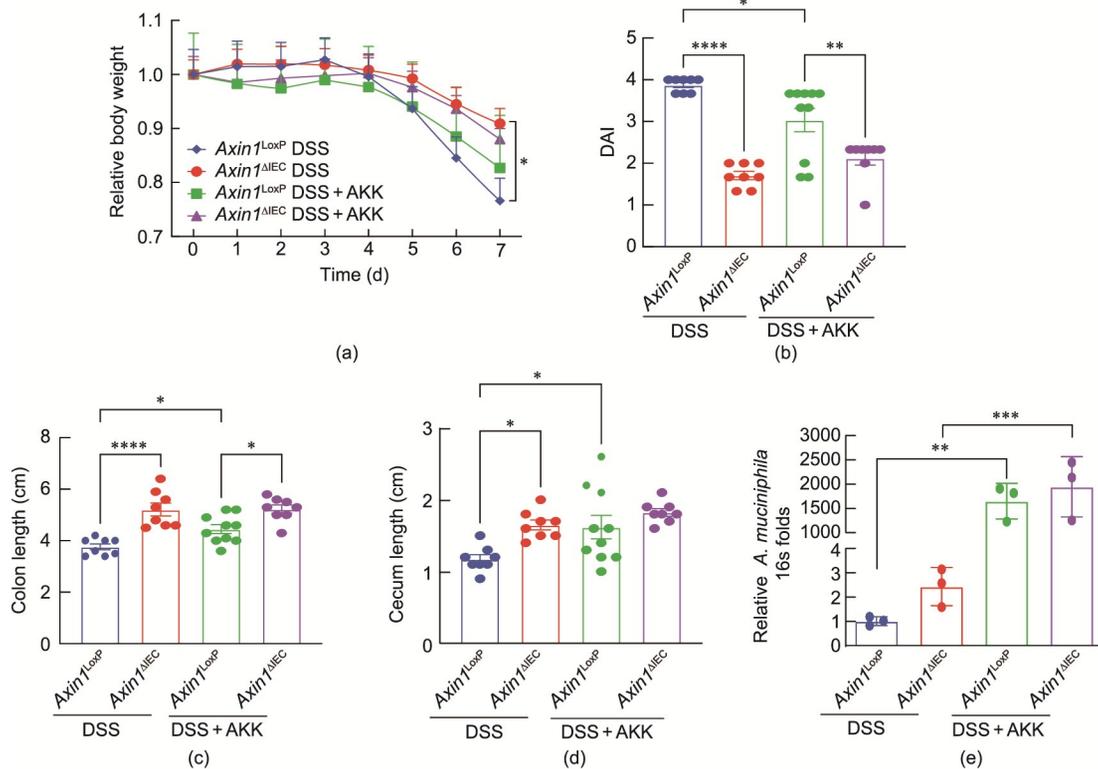


图6. 嗜黏蛋白阿克曼菌 (AKK) 治疗的 *Axin1*^{LoxP} 小鼠对DSS诱导的结肠炎的易感性降低。 *Axin1*^{LoxP} 和 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠在7天的5% DSS刺激下给予AKK治疗。(a) DSS刺激小鼠和DSS+AKK刺激小鼠的相对体重变化。每个点至少代表8只老鼠。数据用平均数 (mean) ± SEM; $n = 8\sim 10$; 未配对学生 *t* 检验比较 *Axin1*^{LoxP} 和 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠; $*P < 0.05$ 。 *Axin1* 小鼠第7天结肠炎的严重程度 (b)、结肠长度 (c) 和盲肠长度 (d)。上述数据用平均数 (mean) ± SEM表示; $n = 8$; 双向方差分析 (two-way ANOVA); $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$ 。(e) 通过qRT-PCR检测DSS+AKK处理组 *Axin1*^{LoxP} 和 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠粪便样本中嗜黏蛋白阿克曼菌 rDNA 的表达水平。数据用平均数 (mean) ± SD; $n = 3$; 单因素方差分析 (one-way ANOVA); $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。

3.8. 帕内特细胞 *Axin1* 特异性缺失导致肠道分泌细胞谱系的改变

众所周知, PC会影响微生物群的组成[33-34], 并在肠道稳态和炎症[14,26,30,35]中发挥关键作用。我们通过构建 *Axin1*^{APC} 小鼠模型, 研究了 *Axin1* PC对肠道分化的影响。接下来, 我们通过用抗 CD24 抗体标记它们来分离 PC, 并将其分为 CD24⁺ 和 CD24⁻ 非组分[图7 (a)]。我们通过qRT-PCR检测了分离细胞中 *Axin1* mRNA 的表达。与 *Axin1*^{LoxP} PC 相比, 在 PC 特异性敲除 *Axin1* (*Axin1*^{APC}) 的小鼠中的 PC *Axin1* 和溶菌酶表达降低[图7 (b) 和 (c)]。IF 染色显示, 与 *Axin1*^{LoxP} 相比, *Axin1*^{APC} 小鼠的 PC 的溶菌酶形态异常[图7 (d) 和 (e)]。阿尔辛蓝染色显示, *Axin1*^{APC} 小鼠小肠内 GCs 增加[图7 (f)]。我们的数据表明, PC *Axin1* 的缺失导致了 *Axin1*^{ΔIEC} 模型中分泌细胞分化的改变。

3.9. *Axin1*^{APC} 小鼠对 DSS 诱导的结肠炎的易感程度较低, 并依赖于肠道微生物群

接下来, 我们确定了 PC *Axin1* 缺失对 DSS-结肠炎疾病进展的影响。DSS 给药后, *Axin1*^{APC} 小鼠对体重减轻和

严重疾病的易感程度较低[图8 (a) 和 (b)]。 *Axin1*^{APC} 小鼠的结肠比 *Axin1*^{LoxP} 小鼠长[图8 (c)]。与 *Axin1*^{ΔIEC} DSS 小鼠一样, *Axin1*^{APC} DSS 小鼠的炎症反应较少[图8 (d) 和 (e)], IL-6 水平降低[图8 (f)]。与 DSS 处理的 *Axin1*^{LoxP} 小鼠相比, TNF- α 在 *Axin1*^{APC} DSS 小鼠中表达也降低[附录 A 中图 S1 (a)]。即使没有 DSS 刺激, *Axin1*^{APC} 小鼠的 IL-27 水平也会降低[附录 A 中图 S1 (b)]。有趣的是, 在 DSS 诱导结肠炎后, 两种小鼠品系的嗜酸性粒细胞趋化因子和 gro- α 分别有降低和升高[附录 A 中 S1 (c) 和 (d)]。IL-17A 在未经 DSS 刺激的 *Axin1*^{LoxP} 小鼠中升高, 而在 *Axin1*^{APC} DSS 小鼠表达显著降低[附录 A 中的图 S1 (e)]。因微生物群被证明是 *Axin1*^{LoxP} 小鼠易患 DSS-结肠炎的关键因素, 我们通过同笼饲养实验来检测该表型的传播性。我们用 DSS 刺激 *Axin1*^{LoxP} 和 *Axin1*^{APC} 小鼠。 *Axin1*^{APC} 与 *Axin1*^{LoxP} 小鼠共同饲养后, *Axin1*^{APC} 小鼠更易受到 DSS 损伤[图8 (g)]。同笼饲养增加了 *Axin1*^{APC} 小鼠的 DAI, 并将其结肠缩短到 *Axin1*^{LoxP} 小鼠的水平[图8 (h) 和 (i)]。此外, 我们还发现 *Axin1*^{APC} 小鼠的粪便中嗜黏蛋白阿克曼菌增加, 同笼饲养后显著降低[图8 (j)]。同 *Axin1*^{ΔIEC} 小

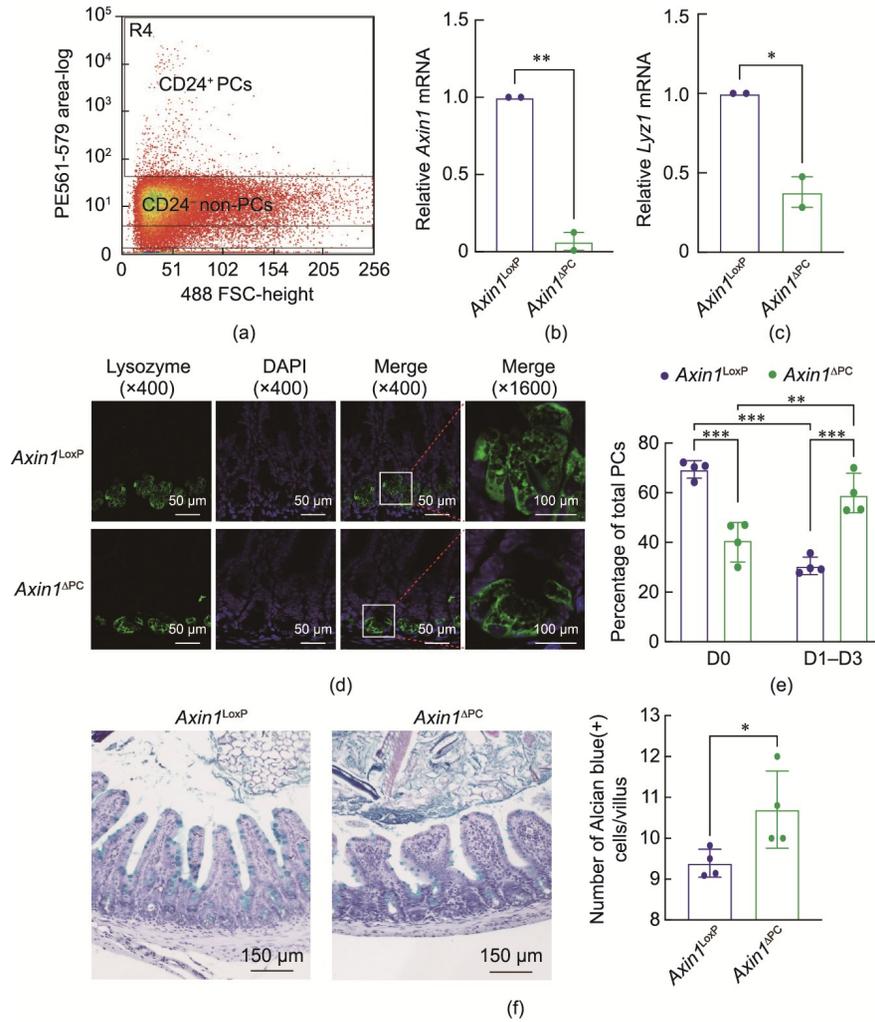


图7. 构建PC形态和GC分布改变的 *Axin1*^{ΔPC} 小鼠。杂交 *Axin1*^{LoxP} 小鼠与 *Defa6-cre* 小鼠获得PC特异性敲除 *Axin1* (*Axin1*^{ΔPC})。Defa6仅在PC中表达。(a) 将原代小肠上皮细胞消化成单细胞, 然后用抗CD24抗体染色, 并通过流式细胞术分选 ($n = 3$ 只小鼠池)。(b) 通过qRT-PCR从CD24⁺细胞 ($n = 3$ 只小鼠池)中证实PC *Axin1*基因敲低。(c) *Axin1*^{LoxP}和 *Axin1*^{ΔPC}分离的PC的溶菌酶 (*Lyz1*) mRNA的表达 ($n = 3$ 只小鼠池)。(d) *Axin1*^{LoxP}和 *Axin1*^{ΔPC}小鼠小肠隐窝中溶菌酶的IF染色。(e) *Axin1*^{ΔPC}小鼠的PC中异常(D1~D3)溶菌酶形态数量增加 ($n = 4$, > 15隐窝·小鼠⁻¹)。(f) *Axin1*^{LoxP}和 *Axin1*^{ΔPC}中小肠绒毛中GCs的阿尔辛蓝染色 ($n = 4$)。上述数据均用平均数 (mean) ± SEM表示; 在 (f)中, 采用Tukey调整多重比较方法的双向方差分析四组间的两个因素, 采用非配对学生 *t* 检验比较其他数据中两组间的差异。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

鼠一样, *Axin1*^{ΔPC}小鼠在共同饲养后, 组织炎症加重, IL-6和TNF- α 水平升高[图8(k)~(m); 附录A中的图S1(f)]。这一数据表明, PC *Axin1*的缺失可能是预防DSS诱导的结肠炎的驱动因素。

3.10. *Axin1*的缺失致使IEC中 β -联蛋白和Wnt靶基因的高水平转录和细胞增殖

在典型的Wnt/ β -联蛋白信号通路中, 已知 *Axin1*通过形成一种降解复合物来调节 β -联蛋白的表达, 该复合物靶向被蛋白酶体降解。接下来, 我们确定肠上皮 *Axin1*的缺失导致 β -联蛋白和Wnt靶基因表达的改变。*Axin1*^{ΔIEC}回肠增加了Wnt靶基因 *Axin2* mRNA表达[附录A中图S2(a)]。此外, 与 *Axin1*^{LoxP}小鼠相比, *Axin1*^{ΔIEC}小鼠的细胞周期蛋白D1 mRNA表达增加[附录S2(a)]。接下来, 我

们通过磷酸化的 β -联蛋白(S552)的表达来评估转录激活的 β -联蛋白。我们通过蛋白质印迹法发现 *Axin1*^{ΔIEC}小鼠体内的 β -联蛋白(S552)表达增加[附录A中的图S2(b)]。最后, 我们检测了干细胞标记物 *Lgr5*和Wnt靶基因的蛋白表达。*Axin1*^{ΔIEC}回肠中 *Lgr5*蛋白表达增加[附录S2(b)]。有趣的是, *Axin1*^{ΔPC} ilea显示Wnt靶基因 *Axin2*的mRNA表达增加[附录A中的图S3(a)]。我们还发现在 *Axin1*^{ΔPC}回肠中 *Lgr5*蛋白水平升高[附录A中的图S3(b)]。我们通过IHC染色发现, *Axin1*^{ΔPC}小鼠实验结果显示, 总 β -联蛋白和 β -联蛋白(S552)的表达显著增加[附录A中的图S3(c)和(d)]。这些数据表明, IEC和PC中 *Axin1*的缺失增加了 β -联蛋白的激活和随后Wnt靶基因的表达。

Wnt/ β -联蛋白信号通路与增殖和细胞分化的增加有

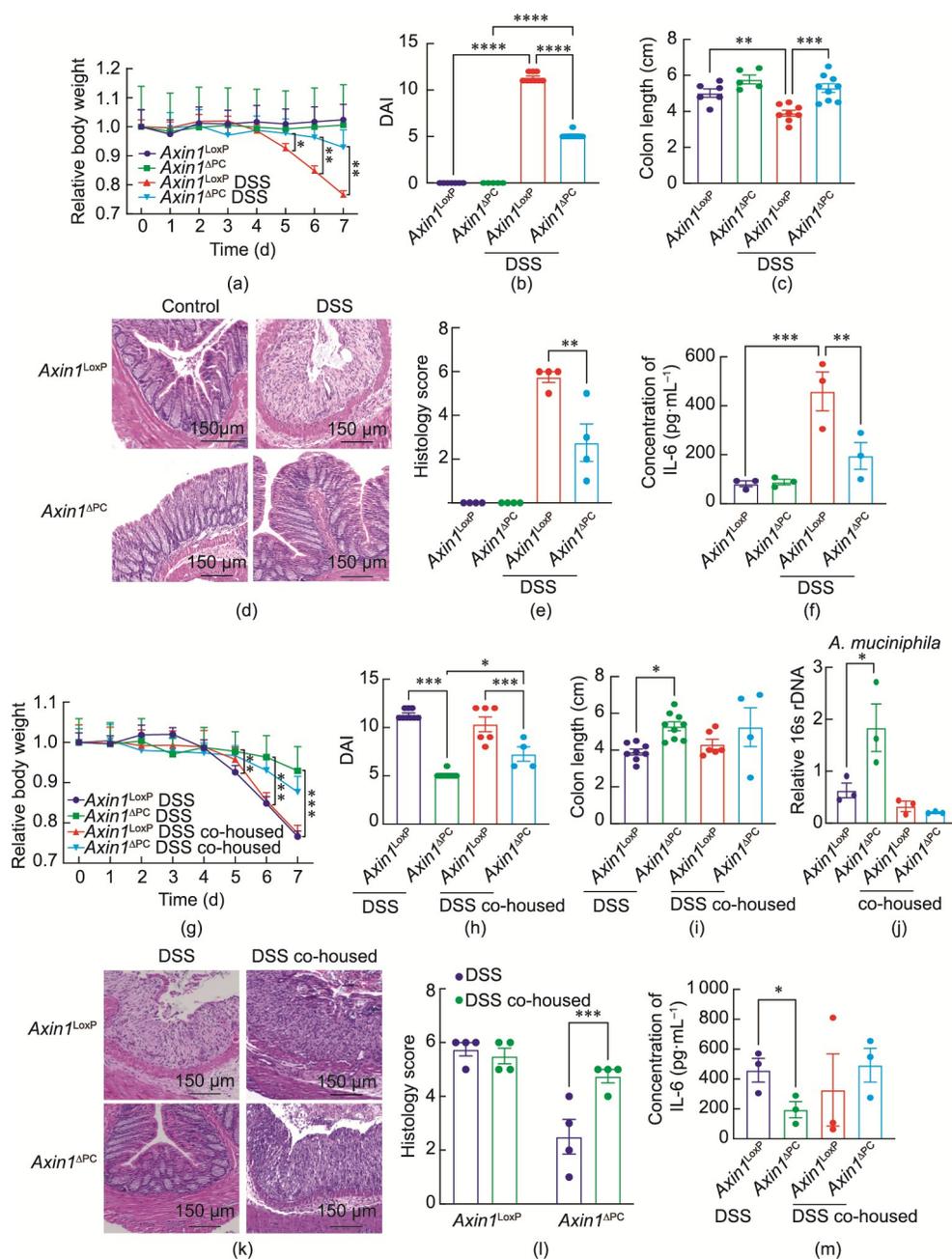


图8. *Axin1^{APC}* 小鼠对DSS诱导的结肠炎具有抗性，且与 *Axin1^{LoxP}* 同笼饲养后易感。*Axin1^{LoxP}* 和 *Axin1^{APC}* 小鼠同笼饲养4周，然后用5%的DSS处理7天。(a) *Axin1^{LoxP}* 小鼠在DSS给药期间的相对体重的变化。每个点代表至少5只老鼠；双向方差分析 (two-way ANOVA), $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。*Axin1* 小鼠第7天结肠炎的严重程度 (b) 和结肠长度 (c)。单因素方差分析 (one-way ANOVA), $**P < 0.01$, $***P < 0.01$, $****P < 0.01$ 。(d) 在第7天，远端结肠的H&E组织学检查。(e) 第7天远端结肠的组织学评分。数据用平均数 (mean) \pm SEM表示； $n = 4$ ；单因素方差分析 (one-way ANOVA), $**P < 0.01$ 。(f) *Axin1* 小鼠血清IL-6细胞因子水平。数据用平均数 (mean) \pm SEM表示； $n = 3$ ；双向方差分析 (two-way ANOVA), $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 。(g) *Axin1^{LoxP}* 和 *Axin1^{APC}* 小鼠同笼饲养4周，后用5%的DSS处理7天。DSS小鼠的相对体重变化。每个点代表至少5只老鼠；双向方差分析 (two-way ANOVA), $**P < 0.01$, $***P < 0.01$ 。第7天结肠炎的严重程度 (h) 和结肠长度 (i)。上述数据用平均数 (mean) \pm SEM表示； $n = 4-9$ ；双向方差分析 (two-way ANOVA), $*P < 0.05$, $***P < 0.001$ 。(j) 通过qRT-PCR检测单独饲养和同笼饲养的 *Axin1* 小鼠的嗜黏蛋白阿克曼菌的rDNA水平。数据用平均数 (mean) \pm SEM表示； $n = 3$ ；单因素方差分析 (one-way ANOVA), $*P < 0.05$ 。DSS给药第7天的H&E组织学 (k) 和组织学评分 (l)。数据用平均数 (mean) \pm SEM表示； $n = 4$ ；双向方差分析 (two-way ANOVA), $***P < 0.001$ 。(m) 单独饲养和同笼饲养的 *Axin1* 小鼠的血清IL-6水平。数据用平均数 (mean) \pm SEM表示； $n = 3$ ；*Axin1^{LoxP}* 和 *Axin1^{APC}* 小鼠之间采用未配对学生 *t* 检验比较， $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ 。

关。将BrdU注射到小鼠体内，2 h、12 h、24 h后处死。在DNA合成过程中，BrdU被掺入分裂细胞，保留不变，然后分裂后被子细胞遗传。本实验旨在评估 *Axin1^{ΔIEC}* 和 *Axin1^{APC}* 小鼠模型中的细胞增殖情况，并测量模型中Ax-

in1 缺失对IEC迁移的影响。空肠切片BrdU IHC染色显示 *Axin1^{ΔIEC}* 和 *Axin1^{APC}* 小鼠肠上皮细胞增殖增加[附录A中图S4 (a) 和 (b)]。在BrdU掺入2 h和12 h后，对照组和敲除小鼠之间的细胞迁移没有差异[附录A中的图S4 (a)

和(c)]。然而,24 h后发现 *Axin1*^{ΔIEC} 和 *Axin1*^{ΔPC} 的细胞迁移显著增加[附录A中的图S4(a)和S4(c)]。我们测定了小肠细胞的增殖,因为与结肠相比,小肠细胞增殖速度更快[36]。*Axin1*^{ΔIEC} 小鼠结肠中β-联蛋白和增殖的变化与小肠中的变化趋势相同(附录A中的图S5)。

3.11. 同笼饲养或抗生素治疗改变了 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠的增殖标志物增殖细胞核抗原(PCNA)

通过IF染色观察到与 *Axin1*^{L^{oxp}} 小鼠组同笼饲养的 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠回肠PCNA表达降低(附录A中的图S6)。为了进一步测试微生物群在改变肠道细胞增殖中的作用,小鼠分别在饮用水中添加抗生素(1.0 mg·mL⁻¹甲硝唑和0.3 mg·mL⁻¹克林霉素)治疗三周[图9(a)]。通过IF染色,我们发现用抗生素治疗的 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠回肠中PCNA的表达降低[图9(b)]。相比之下,在有或没有抗生素治疗的 *Axin1*^{L^{oxp}} 小鼠中没有发现任何差异。在结肠中,我们还发现了用抗生素治疗的 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠中PCNA的表达降低[图9(c)]。采用蛋白质印迹法检测蛋白质水平上PCNA表达的下降。*Axin1*^{ΔIEC} 小鼠接受抗生素治疗后,其回肠[图9(d)]和结肠[图9(e)]中的PCNA显著降低。

4. 讨论

我们已经证明肠道 *Axin1* 的缺失会导致肠上皮生物学特性的改变,包括GCs的增加、PC形态和溶菌酶表达的改变。研究发现 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠肠道上皮细胞的变化与肠道微生物群的改变特异性相关,这有利于增加有益微生物的多样性,如嗜黏蛋白阿克曼菌。*Axin1*^{ΔIEC} 小鼠中的嗜黏蛋白阿克曼菌的增加与黏液屏障的变薄有关。一旦经DSS诱导, *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠的炎症程度低于 *Axin1* 充足的动物。有趣的是, *Axin1*^{L^{oxp}} 和 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠的同笼饲养降低了 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠中嗜黏蛋白阿克曼菌的丰度,导致易患DSS结肠炎。此外,补充嗜黏蛋白阿克曼菌降低了对照组动物结肠炎的严重程度,而肠上皮细胞 *Axin1* 基因敲除小鼠的情况保持不变。*Axin1*^{ΔPC} 小鼠的小肠分泌谱系与 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠相似。*Axin1*^{ΔPC} 小鼠对DSS诱导的结肠炎有防御作用,但与 *Axin1*^{L^{oxp}} 小鼠同笼饲养后更容易患结肠炎(图10)。

在本研究中,我们建立了两个独特的实验模型来研究 *Axin1* 在肠道功能中的作用。由于 *Axin1* 的完全失活会导致早期胚胎死亡,因此不可能使用全 *Axin1* 敲除来确定 *Axin1* 在后期发育过程中的潜在作用[8]。关于 *Axin1* 在肠道中的蛋白质表达的文献有限。根据人类蛋白质图谱的总

结, *Axin1* 在人类样本的小肠中表达(<https://www.protein-atlas.org/ENSG00000103126-AXIN1/tissue/Small+intestine#mas-eq>)。然而,这些图像的分辨率并不高。目前还没有关于 *Axin1* 在肠上皮细胞中特定细胞类型的PC中的作用的报道。我们首次报道了它在改变微生物群和肠道稳态中的作用。为了研究 *Axin1* 的组织特异性功能,我们开发了一个系统,在该系统中,利用 *Defa6* 启动子驱动的 *cre*-重组酶从IEC和PC中条件敲除 *Axin1*。这些模型使我们能够了解 *Axin1* 在肠道和微生物稳态以及宿主对炎症刺激物反应中的基本作用。

我们目前使用 *Axin1* 条件敲除模型的研究揭示了 *Axin1* 在IEC和PC中的生理功能。小鼠染色分析表明, *Axin1* 在小鼠顶端的表达更强,而在人上皮细胞中的染色不太清楚。这一发现可能是由于很难找到高质量的 *Axin1* 抗体所致。未来我们可以在对照组小鼠和(或)人体组织中分离出绒毛和隐窝,并确定两个隔室间 *Axin1* 的表达差异。这样做将提供进一步了解 *Axin1* 对肠道增殖和分化的作用机制。

我们从PC *Axin1* 缺失小鼠中获得的数据证明了 *Axin1* 在先天免疫中的关键作用。我们已经证明,PC *Axin1* 对DSS诱导的结肠炎具有保护作用,并且肠道微生物群有助于 *Axin1*^{ΔPC} 小鼠的非结肠炎原性表型。我们研究了与 *Axin1* 状态相关的小肠和结肠变化,但重点关注于小肠中的PC,原因如下:

(1) PC主要存在于小肠中,然而,PC分泌的抗菌肽同时释放到小肠和结肠中。在人IBD和结肠炎模型中已观察到异常的PC[14-15,17,26,34]。

(2) PC在肠道干细胞生态位中发挥重要作用,从而有助于损伤后的细胞增殖[37-39]。

(3) 先前的研究表明,DSS在小肠中具有生化和组织学作用[40]。

(4) 用DSS-结肠炎来确定是否在 *Axin1*^{ΔIEC} 小鼠和 *Axin1*^{ΔPC} 小鼠发挥相同的保护作用。PC在塑造肠道微生物群中发挥作用,包括通过分泌抗菌肽,如溶菌酶。在UC患者的IEC中观察到溶菌酶mRNA的增加。此外,溶菌酶的表达与肠道炎症程度相关[41]。也有研究表明,缺乏PC溶菌酶(*Lyz1*^{-/-})的小鼠肠道细菌也发生了改变。这些改变与防御DSS结肠炎和增加黏液溶解细菌的增加有关。我们已经证明,肠道 *Axin1* 缺失产生的结果与 *Lyz1*^{-/-} 小鼠相似[34]。*Axin1* 常被称为Wnt/β-联蛋白信号调节因子。Wnt/β-联蛋白信号通路引发PC的分化和成熟,从而调节抗菌肽的产生。缺乏Wnt/β-联蛋白信号调节因子T细胞因子1(TCF1)的小鼠出现溶菌酶的下降[35]。*Axin1* 可能

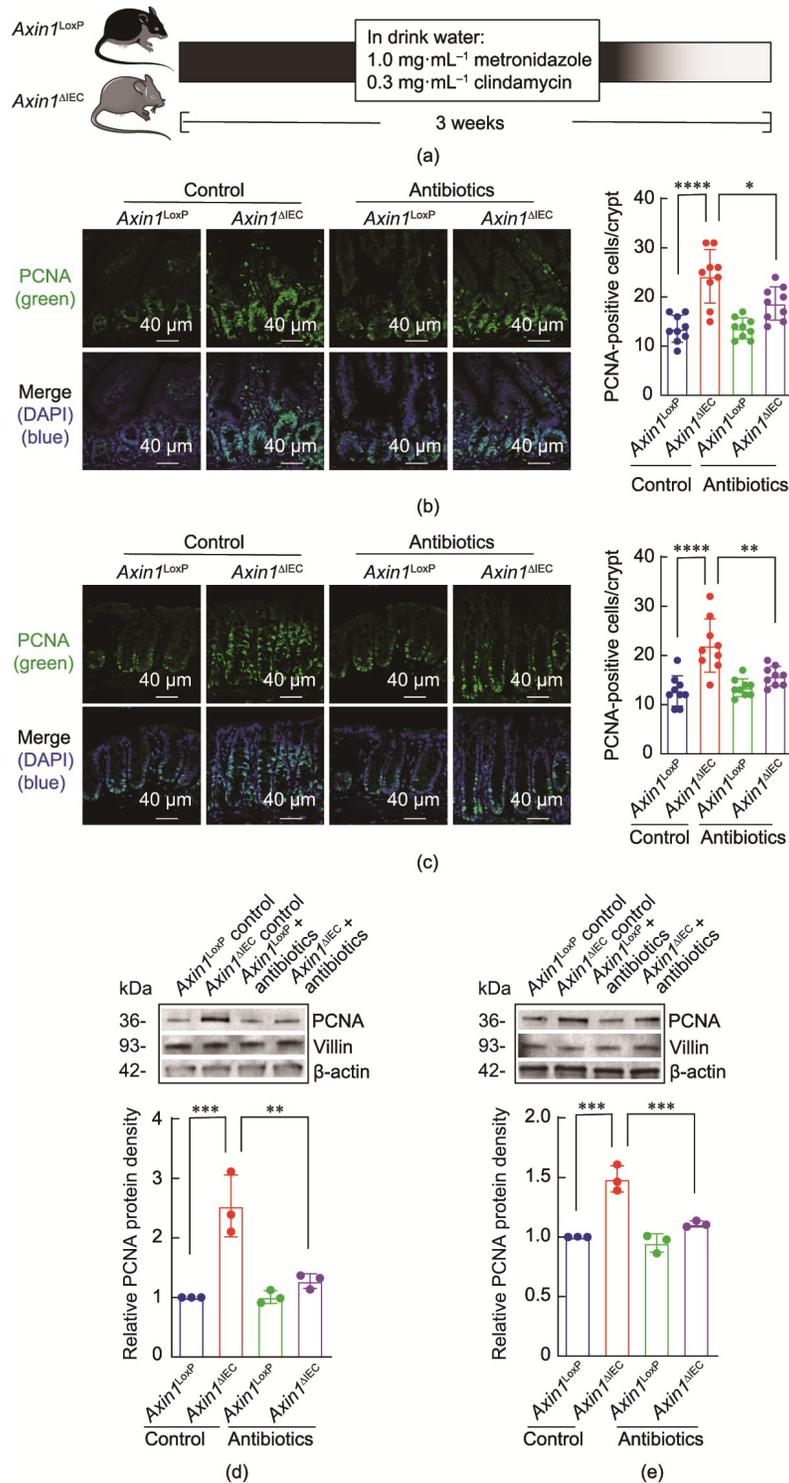


图9. 抗生素治疗降低了 *Axin1^{ΔIEC}* 小鼠回肠和结肠中的增殖标志物 PCNA。(a) 用抗生素治疗的小鼠的示意图概述。*Axin1^{LoxP}* 或 *Axin1^{ΔIEC}* 小鼠分别在饮用水中添加或不添加抗生素 (1.0 mg·mL⁻¹ 甲硝唑和 0.3 mg·mL⁻¹ 克林霉素) 治疗三周。(b) 通过 IF 染色, 抗生素治疗组 *Axin1^{ΔIEC}* 小鼠回肠中 PCNA 的表达降低。图像来自于一个单一的实验, 并代表了每组三只老鼠。每只小鼠随机选取三个隐窝的 PCNA 阳性计数进行测量。数据用平均数 (mean) ± SD 表示; *n* = 9; 单向方差分析 (one-way ANOVA), **P* < 0.05, *****P* < 0.0001。(c) 通过 IF 染色, 降低了使用抗生素治疗的 *Axin1^{ΔIEC}* 小鼠结肠中 PCNA 的表达。图像来自于一个单一的实验, 并代表了每组三只老鼠。每只小鼠随机选择三个隐窝进行测量。数据用平均数 (mean) ± SD 表示; *n* = 9; 单向方差分析 (one-way ANOVA), ***P* < 0.01, ****P* < 0.001。(d)、(e) 通过免疫印迹法发现, 抗生素治疗后 *Axin1^{ΔIEC}* 小鼠回肠 (d) 和结肠 (e) 中 PCNA 蛋白的表达降低。数据用平均数 (mean) ± SD 表示; *n* = 3; 单向方差分析 (one-way ANOVA), ***P* < 0.01, ****P* < 0.001。

以 Wnt/β-联蛋白依赖的方式调节溶菌酶的表达。我们的研究为可能通过肠上皮细胞和 PC Axin1 导致炎症的分子

机制提供了新的见解。

我们已经发现人类 UC 中 Axin1 在 mRNA 和蛋白质水

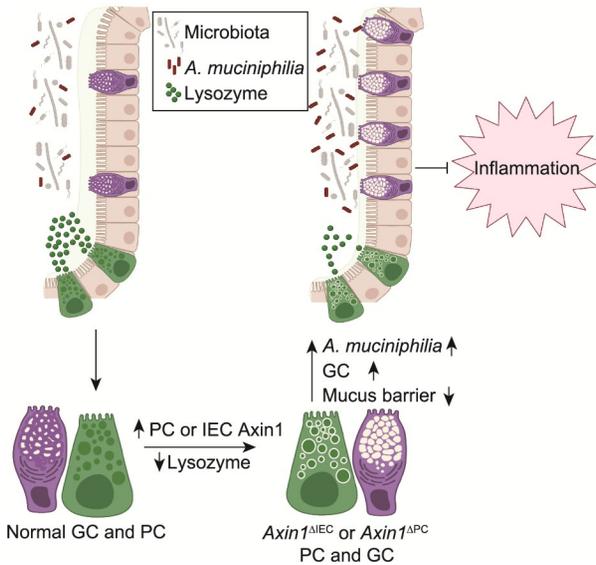


图 10. 提出了 Axin1 通过肠道微生物群改变保护结肠炎的模型。肠上皮细胞和 PC Axin1 的缺失导致杯状细胞和 PC 形态的改变, MUC2 增加, 溶菌酶表达降低。此外, Axin1 的缺失导致嗜黏蛋白阿克曼菌的增加, 黏液边界厚度减少。Axin1 敲除小鼠体内存在嗜黏蛋白阿克曼菌是保护其免受 DSS 诱导的肠道炎症的驱动因素。

平上的表达增加, 这之前的一项研究报道的 UC 患者中 Axin1 血清水平升高一致[42]。Wnt/ β -联蛋白信号通路的激活是人 IBD 和结肠炎动物模型的一个方面[6,43]。Axin1 可能通过负调控 Wnt/ β -联蛋白信号通路来调节肠道炎症和 IBD。然而, Axin1 是一种多结构域蛋白, 已被证明在多个信号通路中与许多蛋白质相互作用, 如应激激活的蛋白激酶 (SAPK) /Jun 氨基端激酶 (JNK)、p53、转化生长因子- β (TGF- β) 和 Wnt 信号通路[44–47]。目前尚不清楚 Axin1 如何同时调节炎症和感染中的多种信号通路。我们还检测了 Axin1 基因敲除小鼠中 Axin2- [48]和 Wnt/ β -联蛋白相关的细胞增殖。Axin1 基因敲除小鼠的增殖增加可能有助于保护其免受损伤。这种细胞保护可能依赖于微生物群, 因为与 Axin1^{LoxP} 小鼠同笼饲养降低了 Axin1 基因敲除小鼠中阿克曼菌属细菌的丰度, 并使其更容易受到 DSS 的影响。此外, 阿克曼菌属治疗对 Axin1^{LoxP} 小鼠 DSS 诱导的结肠炎有防御作用。然而, 本研究侧重于结肠炎发展过程中 Axin1 的微生物群和状态的变化。在未来的研究中, 我们将进一步研究 Axin1 在细胞水平上对 IEC 在健康和疾病中的调控作用。

我们的数据表明, Axin1 IEC 敲除为实验体提供保护作用是通过调节肠道微生物群实现的, 特别是嗜黏蛋白阿克曼菌。嗜黏蛋白阿克曼菌是一种潜在的益生菌, 也是阿克曼菌属的唯一成员, 在胃肠道中含量丰富, 在维持肠道和微生物稳态及免疫力中起着至关重要的作用。我们的研究表明, Axin1 的状态可以直接调节肠道中的嗜黏蛋白阿

克曼菌。在人 IBD 粪便和黏膜样本中已证实有嗜黏蛋白阿克曼菌的减少[49–50]。有证据表明, 嗜黏蛋白阿克曼菌在 IBD、2 型糖尿病和肥胖的疾病中具有保护作用[51–53]。此外, 通过嗜黏蛋白阿克曼菌可改善 DSS 诱导的小鼠结肠炎[32]、代谢紊乱[54]和肥胖[55]。被嗜黏蛋白阿克曼菌定植的小鼠对共生细菌产生免疫耐受[56]。我们发现了 Axin1^{ΔIEC} 小鼠对免受 DSS 诱导的炎症有保护作用, 但黏液屏障较弱。研究表明, 黏液屏障的耗尽导致了对 DSS 诱导的结肠炎的易感性[57–58]。然而, 我们发现 Axin1^{ΔIEC} 小鼠的 MUC2 增加[图 3 (b)]。在 IEC 中敲除 Axin1 基因并没有显著改变肠道通透性 (数据未显示)。此外, 嗜黏蛋白阿克曼菌含量在 Axin1^{ΔIEC} 小鼠中增加。MUC2 和嗜黏蛋白阿克曼菌增加证明可以防御 DSS-结肠炎[32,58], 与对照组相比, 这可能共同使 Axin1^{ΔIEC} 小鼠的结肠炎抵抗作用增强。

Axin1^{ΔIEC} 小鼠被发现在 Rikenellaceae 和梭菌目 (Clostridiales) 中有耗竭现象。梭菌目在小鼠结肠炎模型中增加, 并与 UC 和黏膜炎症的临床病程相关[59–60]。Rikenellaceae 的作用尚不清楚, 因为该科与小鼠的急性 DSS 治疗呈正相关[61], 而与其他 DSS 小鼠模型呈负相关[62]。然而, 肠易激综合征 (IBS) 和 IBD 患者的微生物群谱分析表明, 与对照组相比, Rikenellaceae 在 IBD 患者的粪便中没有代表性, 但在 IBS 患者中比 IBD 患者更丰富[63]。Rikenellaceae 主要存在于结肠的消化层和黏液层内[64]。它在 Axin1^{ΔIEC} 小鼠体内中耗尽可能是由于它们的黏液层厚度减少。在未来, 我们将对 Axin1/嗜黏蛋白阿克曼菌以及宿主 Axin1 可能调节嗜黏蛋白阿克曼菌的丰度, 进而影响肠黏膜免疫的细胞功能开展研究。总之, 我们的研究表明 Axin1 在调节肠道上皮发育和微生物稳态方面起着新的至关重要的作用。PC Axin1 维持肠道和微生物的稳态, 这可能是预防结肠炎的驱动因素。肠道 Axin1 的缺失可能通过 Axin1 调节 PC 功能来改变先天性肠道免疫, 进而调节抗结肠炎性菌群。我们的发现结果将为 IBD 的发展和人类 IBD 的潜在治疗策略提供见解。

Acknowledgements

We would like to acknowledge the VA Merit Award (1 I01BX004824-01), the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases/National Institutes of Health Grants (R01 DK105118 and R01DK114126), and the Crohn's & Colitis Foundation Senior Research Award (902766) to Jun Sun. We would like to thank Dr. Mrinalini C. Rao for reading

this manuscript and providing insightful suggestions; Figen Seller at the University of Illinois Chicago Electron Microscopy Core for assistance in obtaining TEM images; and the University of Illinois Chicago DNA Services facility for assistance with DNA sequencing. Working model was created using BioRender. R01DK114126 supplement is to promote Diversity in Health-Related Research for PhD student Shari Garrett. The study sponsors play no role in the study design, data collection, analysis, and interpretation of data. The contents do not represent the views of the US Department of Veterans Affairs or the US Government.

Authors' contribution

Shari Garrett performed the cellular and animal studies and the detailed analyses of the results; Yongguo Zhang performed animal studies and analyses of the results; Shari Garrett and Jun Sun prepared the figures and the draft text; Yinglin Xia contributed to the statistical analysis of data and the draft text; and Jun Sun obtained funds, designed the study, and directed the project. All authors contributed to the writing of the manuscript.

Compliance with ethics guidelines

Shari Garrett, Yongguo Zhang, Yinglin Xia, and Jun Sun declare that they have no conflict of interest. Appendix A. Supplementary data Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.06.007>.

References

- [1] Alatab S, Sepanlou SG, Ikuta K, Vahedi H, Bisignano C, Safiri S, et al. GBD 2017 Inflammatory Bowel Disease Collaborators. The global, regional, and national burden of inflammatory bowel disease in 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020;5(1):17–30
- [2] Alshehri D, Saadah O, Mosli M, Edris S, Alhindi R, Bahieldin A. Dysbiosis of gut microbiota in inflammatory bowel disease: current therapies and potential for microbiota-modulating therapeutic approaches. *Bosn J Basic Med Sci* 2021; 21(3):270–83
- [3] Schatoff EM, Leach BI, Dow LE. Wnt signaling and colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep* 2017;13(2):101–10
- [4] Moparthi L, Koch S. Wnt signaling in intestinal inflammation. *Differentiation* 2019;108:24–32
- [5] Gujral TS, Karp ES, Chan M, Chang BH, MacBeath G. Family-wide investigation of PDZ domain-mediated protein–protein interactions implicates β -catenin in maintaining the integrity of tight junctions. *Chem Biol* 2013;20(6): 816–27
- [6] Serafino A, Moroni N, Zonfrillo M, Andreola F, Mercuri L, Nicotera G, et al. WNT-pathway components as predictive markers useful for diagnosis, prevention and therapy in inflammatory bowel disease and sporadic colorectal cancer. *Oncotarget* 2014;5(4):978–92
- [7] Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, et al. Axin-mediated CKI phosphorylation of β -catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* 2002;16(9):1066–76
- [8] Xie R, Jiang R, Chen D. Generation of Axin1 conditional mutant mice. *Genesis* 2011;49(2):98–102
- [9] Arnold HK, Zhang X, Daniel CJ, Tibbitts D, Escamilla-Powers J, Farrell A, et al. The Axin1 scaffold protein promotes formation of a degradation complex for c-Myc. *EMBO J* 2009;28(5):500–12
- [10] Gavagan M, Fagnan E, Speltz EB, Zalatan JG. The scaffold protein Axin promotes signaling specificity within the Wnt pathway by suppressing competing kinase reactions. *Cell Syst* 2020;10(6):515–25. e5
- [11] Kikuchi A. Roles of Axin in the Wnt signalling pathway. *Cell Signal* 1999; 11(11):777–88
- [12] Zhang YG, Wu S, Xia Y, Chen D, Petrof EO, Claud EC, et al. Axin1 prevents *Salmonella* invasiveness and inflammatory response in intestinal epithelial cells. *PLoS One* 2012;7(4):e34932
- [13] Erben U, Loddenkemper C, Doerfel K, Spieckermann S, Haller D, Heimesaat MM, et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(8):4557–76
- [14] Adolph TE, Tomczak MF, Niederreiter L, Ko HJ, Böck J, Martinez-Naves E, et al. Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature* 2013; 503(7475):272–6
- [15] Lu R, Zhang YG, Xia Y, Zhang J, Kaser A, Blumberg R, et al. Paneth cell alertness to pathogens maintained by vitamin D receptors. *Gastroenterology* 2021;160(4):1269–83
- [16] Wu S, Yoon S, Zhang YG, Lu R, Xia Y, Wan J, et al. Vitamin D receptor pathway is required for probiotic protection in colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015;309(5):G341–9
- [17] Wu S, Zhang YG, Lu R, Xia Y, Zhou D, Petrof EO, et al. Intestinal epithelial vitamin D receptor deletion leads to defective autophagy in colitis. *Gut* 2015; 64(7):1082–94
- [18] Zhang YG, Zhu X, Lu R, Messer JS, Xia Y, Chang EB, et al. Intestinal epithelial HMGB1 inhibits bacterial infection via STAT3 regulation of autophagy. *Autophagy* 2019;15(11):1935–53
- [19] Zhang YG, Lu R, Wu S, Chatterjee I, Zhou D, Xia Y, et al. Vitamin D receptor protects against dysbiosis and tumorigenesis via the JAK/STAT pathway in intestine. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2020;10(4):729–46
- [20] Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol* 2014;1180:31–43
- [21] Wu S, Liao AP, Xia Y, Li YC, Li JD, Sartor RB, et al. Vitamin D receptor negative lyregulates bacterial-stimulated NF- κ B activity in intestine. *Am J Pathol* 2010;177(2):686–97
- [22] Jin D, Zhang YG, Wu S, Lu R, Lin Z, Zheng Y, et al. Vitamin D receptor is a novel transcriptional regulator for Axin1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017; 165(PtB):430–7
- [23] Chen H, Lu R, Zhang YG, Sun J. Vitamin D receptor deletion leads to the destruction of tight and adherens junctions in lungs. *Tissue Barriers* 2018;6(4):1–13
- [24] Cheon KW, Lee HS, Parhar IS, Kang IS. Expression of the second isoform of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-II) in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 2001;7(5):447–52
- [25] Zhang Y, Zhang J, Xia Y, Sun J. Bacterial translocation and barrier dysfunction enhance colonic tumorigenesis. *Neoplasia* 2023;35:100847
- [26] Liu TC, Gurrain B, Baldrige MT, Head R, Lam V, Luo C, et al. Paneth cell defects in Crohn's disease patients promote dysbiosis. *JCI Insight* 2016; 1(8): e86907
- [27] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010;7(5):335–6
- [28] McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, DeSantis TZ, Probst A, et al. An improved Green genes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J* 2012;6(3):610–8
- [29] Xia Y, Sun J, Chen DG. Statistical analysis of microbiome data with R. Singapore: Springer; 2018
- [30] Armbruster NS, Stange EF, Wehkamp J. In the Wnt of Paneth cells: immune-epithelial crosstalk in small intestinal Crohn's disease. *Front Immunol* 2017;8: 1204

- [31] Paone P, Cani PD. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners? *Gut* 2020;69(12):2232–43
- [32] Bian X, Wu W, Yang L, Lv L, Wang Q, Li Y, et al. Administration of *Akkermansia muciniphila* ameliorates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice. *Front Microbiol* 2019;10:2259
- [33] Lueschow SR, Stumphy J, Gong H, Kern SL, Elgin TG, Underwood MA, et al. Loss of murine Paneth cell function alters the immature intestinal microbiome and mimics changes seen in neonatal necrotizing enterocolitis. *PLoS One* 2018;13(10):e0204967
- [34] Yu S, Balasubramanian I, Laubitz D, Tong K, Bandyopadhyay S, Lin X, et al. Paneth cell-derived lysozyme defines the composition of mucolytic microbiota and the inflammatory tone of the intestine. *Immunity* 2020;53(2):398–416.e8
- [35] Beisner J, Teltschik Z, Ostaff MJ, Tiemessen MM, Staal FJT, Wang G, et al. TCF-1-mediated Wnt signaling regulates Paneth cell innate immune defense effectors HD-5 and -6: implications for Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014;307(5):G487–98
- [36] Berlanga-Acosta J, Playford RJ, Mandir N, Goodlad RA. Gastrointestinal cell proliferation and crypt fission are separate but complementary means of increasing tissue mass following infusion of epidermal growth factor in rats. *Gut* 2001;48(6):803–7
- [37] Roth S, Franken P, Sacchetti A, Kremer A, Anderson K, Sansom O, et al. Paneth cells in intestinal homeostasis and tissue injury. *PLoS One* 2012;7(6):e38965
- [38] Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 2011;469(7330):415–8
- [39] Mei X, Gu M, Li M. Plasticity of Paneth cells and their ability to regulate intestinal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2020;11(1):349
- [40] Yazbeck R, Howarth GS, Butler RN, Geier MS, Abbott CA. Biochemical and histological changes in the small intestine of mice with dextran sulfate sodium colitis. *J Cell Physiol* 2011;226(12):3219–24
- [41] Kim JM. Antimicrobial proteins in intestine and inflammatory bowel diseases. *Intest Res* 2014;12(1):20–33
- [42] Moraes L, Magnusson MK, Mavroudis G, Polster A, Jonefjäll B, Törnblom H, et al. Systemic inflammatory protein profiles distinguish irritable bowel syndrome (IBS) and ulcerative colitis, irrespective of inflammation or IBS-like symptoms. *Inflamm Bowel Dis* 2020;26(6):874–84
- [43] Bradford EM, Ryu SH, Singh AP, Lee G, Goretsky T, Sinh P, et al. Epithelial TNF receptor signaling promotes mucosal repair in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2017;199(5):1886–97
- [44] Luo W, Lin SC. Axin: a master scaffold for multiple signaling pathways. *Neurosignals* 2004;13(3):99–113
- [45] Furuhashi M, Yagi K, Yamamoto H, Furukawa Y, Shimada S, Nakamura Y, et al. Axin facilitates Smad3 activation in the transforming growth factor beta signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2001;21(15):5132–41
- [46] Salahshor S, Woodgett JR. The links between Axin and carcinogenesis. *J Clin Pathol* 2005;58(3):225–36
- [47] Zhang Y, Neo SY, Wang X, Han J, Lin SC. Axin forms a complex with MEK1 and activates c-Jun NH(2)-terminal kinase/stress-activated protein kinase through domains distinct from Wnt signaling. *J Biol Chem* 1999;274(49):35247–54
- [48] Harnack C, Berger H, Antanaviciute A, Vidal R, Sauer S, Simmons A, et al. Rspndin 3 promotes stem cell recovery and epithelial regeneration in the colon. *Nat Commun* 2019;10(1):4368
- [49] Png CW, Lindén SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI, et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment *in vitro* utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol* 2010;105(11):2420–8
- [50] Rajilić-Stojanović M, Shanahan F, Guarner F, de Vos WM. Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19(3):481–8
- [51] Xu Y, Wang N, Tan HY, Li S, Zhang C, Feng Y. Function of *Akkermansia muciniphila* in obesity: interactions with lipid metabolism, immune response and gut systems. *Front Microbiol* 2020;11:219
- [52] Shih CT, Yeh YT, Lin CC, Yang LY, Chiang CP. *Akkermansia muciniphila* is negatively correlated with hemoglobin A1c in refractory diabetes. *Microorganisms* 2020;8(9):1360.
- [53] Zhang T, Li P, Wu X, Lu G, Marcella C, Ji X, et al. Alterations of *Akkermansia muciniphila* in the inflammatory bowel disease patients with washed microbiota transplantation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2020;104(23):10203–15
- [54] Zhao S, Liu W, Wang J, Shi J, Sun Y, Wang W, et al. *Akkermansia muciniphila* improves metabolic profiles by reducing inflammation in chow diet-fed mice. *J Mol Endocrinol* 2017;58(1):1–14
- [55] Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Crosstalk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(22):9066–71
- [56] Derrien M, Van Baarlen P, Hooiveld G, Norin E, Müller M, de Vos WM. Modulation of mucosal immune response, tolerance, and proliferation in mice colonized by the mucin-degrader *Akkermansia muciniphila*. *Front Microbiol* 2011;2:166
- [57] Fang J, Wang H, Zhou Y, Zhang H, Zhou H, Zhang X. Slimy partners: the mucus barrier and gut microbiome in ulcerative colitis. *Exp Mol Med* 2021;53(5):772–87
- [58] Van der Sluis M, de Koning BAE, de Bruijn ACJM, Velcich A, Meijerink JPP, van Goudoever JB, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 2006;131(1):117–29
- [59] Pei LY, Ke YS, Zhao HH, Wang L, Jia C, Liu WZ, et al. Role of colonic microbiota in the pathogenesis of ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol* 2019;19(1):10
- [60] Nishihara Y, Ogino H, Tanaka M, Ihara E, Fukaura K, Nishioka K, et al. Mucosa-associated gut microbiota reflects clinical course of ulcerative colitis. *Sci Rep* 2021;11(1):13743
- [61] Munyaka PM, Rabbi MF, Khafipour E, Ghia JE. Acute dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis promotes gut microbial dysbiosis in mice. *J Basic Microbiol* 2016;56(9):986–98
- [62] Gao Z, Chen KY, Mueller O, Zhang H, Rakhilin N, Chen J, et al. Microbiota of inflammatory bowel disease models. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2018;2018:2374–7
- [63] Lo Presti A, Zorzi F, Del Chierico F, Altomare A, Cocca S, Avola A, et al. Fecal and mucosal microbiota profiling in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Front Microbiol* 2019;10:1655
- [64] Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2016;14(1):20–32.