



报告正文

正文：参照以下提纲撰写，要求内容翔实、清晰，层次分明，标题突出。**请勿删除或改动下述提纲标题及括号中的文字。**

（一）立项依据与研究内容（建议 8000 字以内）：

1. 项目的立项依据（研究意义、国内外研究现状及发展动态分析，需结合科学研究发展趋势来论述科学意义；或结合国民经济和社会发展中迫切需要解决的关键科技问题来论述其应用前景。附主要参考文献目录）；

炎症性肠病（inflammatory bowel disease, IBD）作为结直肠癌重要诱发因素，其发病率逐年攀升^[1]。然而，发病机理不清导致相关药物及治疗手段进展缓慢已成为有效治疗 IBD 的最大阻碍。**因此，全面阐明 IBD 发生、发展的分子机制，为加速有效治疗药物研发提供理论支持是临床亟待解决的问题。**肠黏膜失衡的免疫应答是 IBD 发生发展的核心环节^[2]。研究显示，在 IBD 发病过程中巨噬细胞、树突状细胞等炎症细胞异常激活，而免疫抑制性细胞，如：髓系来源的抑制性细胞（myeloid-derived suppressor cells, MDSCs）却存在数量或功能的缺陷^[3]。**因此，深入研究肠炎状态下免疫细胞的分子调控机制，是恢复肠道免疫稳态，防治 IBD 的关键。**

已有研究表明，肠道免疫稳态受组蛋白修饰调控^[4, 5]。组蛋白修饰是指组蛋白在相关酶作用下发生的甲基化、乙酰化、泛素化等修饰，是表观遗传学中调控基因表达的重要机制。研究者在小鼠肠炎模型中及 IBD 患者活检样本中均观察到组蛋白修饰异常^[6, 7]。抑制组蛋白乙酰转移酶活性可促进肠道免疫耐受治疗小鼠肠炎^[6, 8]，提示组蛋白修饰在调节肠道免疫、促进肠炎发生中扮演重要角色。Zeste 增强子同源物 2（enhancer of Zeste homolog2, EZH2）是一种重要的组蛋白甲基化修饰酶，其主要功能是通过催化组蛋白 H3 第 27 位的赖氨酸位点发生三甲基化（形成 H3K27Me3），进而沉默下游基因表达^[9]。研究证实，通过组蛋白甲基转移酶活性，EZH2 能在多方面调节免疫应答：EZH2 能促进造血干细胞（hematopoietic stem cell, HSC）自我更新^[10]；还可维持外周 Treg、Th1、Th2、Th17、巨噬细胞（Macrophage）等的数量及功能^[11-14]。已知 EZH2 活性丧失将显著损害 T、B 细胞发育过程^[15, 16]，促进 NK 细胞前体分化发育，导致骨髓及外周组织中 T、B 细胞比例降低，NK 细胞数量增多^[17]，提示 EZH2 还能通过调节造血前体细胞向淋巴系或髓系分化发育，影响免疫细胞生成。新近报道



显示, IBD 病人结肠活检标本中 EZH2 表达异常^[18]。因此我们推测: EZH2 可能通过其组蛋白甲基转移酶活性改变肠道免疫状态影响肠炎进展。目前, 已有大量 EZH2 小分子活性抑制剂进入肿瘤治疗的临床试验^[19]。靶向 EZH2 活性可能为肠炎治疗提供新思路。

为明确 EZH2 在肠炎发生发展及肠道免疫调控中的作用, 我们课题组前期建立了葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导的小鼠肠炎模型, 并预防性地给予 EZH2 甲基转移酶活性抑制剂 (GSK343, GSK126) 处理。结果发现, 抑制 EZH2 活性能显著延缓肠炎发生, 改善小鼠病情, 延长其生存【图 1-图 2】。我们在小鼠出现肠炎症状时, 治疗性地尾静脉注射 GSK343, 也观察到类似结果【图 3】, 进一步证实 EZH2 参与肠炎发生发展。通过在缺乏适应性免疫系统的 NOD/SCID 小鼠中建立肠炎模型, 我们发现, GSK343 治疗肠炎并不依赖于适应性免疫【图 4a-c】, 而很可能是通过影响固有免疫细胞发挥作用。因此, 我们系统地分析了 GSK343 处理后小鼠肠道固有免疫细胞的变化, 证实 GSK343 处理显著增加了小鼠结肠组织中 MDSC 的数量【图 4f-g】。为明确增加的 MDSC 是否就是 EZH2 活性抑制剂发挥抗炎作用的关键, 我们设计了 MDSC 清除实验。结果显示, 成功清除 MDSC 后, GSK343 对肠炎的保护效果消失【图 5】。综上, 我们前期工作证实: EZH2 能通过其组蛋白甲基转移酶活性限制肠道中 MDSC 数量促进肠炎发生发展 (以上结果已被 Nature Communications 期刊接收)。然而, EZH2 调控肠道内 MDSC 富集的分子机制尚未完全阐明。

MDSC 来源于骨髓造血干细胞, 炎症状态会促发其扩增, 并向外周迁移^[20]。为明确抑制 EZH2 活性引起肠炎环境下 MDSC 富集的可能原因, 我们前期针对上述几个环节进行了分析。结果发现, GSK343 处理显著增加了肠炎鼠骨髓和外周血中 MDSC 的比例【图 6a】, 而不影响 MDSC 本身的增殖、凋亡【图 6b】及趋化【图 6c】。由此, 我们推测: 肠炎状态下抑制 EZH2 活性可能影响了某些调控 MDSC 生成的分子/信号通路, 促进了 MDSC 的生成增加。MDSC 是一群重要的免疫抑制性细胞, 在包括 IBD 的急慢性炎症、感染及肿瘤中大量存在, 负向调节机体免疫, 影响疾病进展^[21-23]。研究表明, 向肠炎鼠回输 MDSCs 能有效减轻小鼠炎症, 促进肠道组织修复, 最终缓解其病情^[24, 25], 可见 MDSC 在肠炎发病过程中起到重要的保护作用。然而, 以往对肠炎环境下 MDSC 生成的调控机制却缺乏深入关注。该方面的深入研究将为肠炎治疗开辟新视野。

为阐明肠炎状态下 EZH2 甲基转移酶活性调控 MDSC 生成的分子机制, 我们在 DSS 诱导早期, 分别提取 GSK343 处理与未处理小鼠的骨髓细胞, 送检 RNA 芯片, 并对差



异基因进行通路富集分析。结果发现，GSK343处理后肠炎小鼠骨髓中多个与造血细胞分化发育相关的基因发生改变，其上调的关键通路主要有：Toll样受体信号通路、JAK/STAT信号通路、TNF信号通路等【图7a】。查阅文献发现，JAK/STAT信号通路在MDSC生成的诸多环节中发挥重要作用：a. 促进HSC向MDSC分化：髓系细胞内的JAK/STAT信号活化，能促进下游多种调控造血干细胞向MDSC分化的关键转录因子（如：C/EBP β ）活化，抑制MDSC负向调节因子IRF8的表达从而增加骨髓MDSC生成^[26,27]；b.促进MDSC自身增殖；c.抑制MDSC向下游分化成熟：活化造血前体细胞中JAK/STAT信号，能通过上调S100A8和S100A9，下调PKC β II抑制MDSC进一步向下游分化为巨噬细胞和树突状细胞，促进MDSC富集^[28]。更重要的是，前期结果显示，GSK343有效抑制EZH2活性后，肠炎小鼠骨髓细胞中磷酸化JAK2表达增加【图7b】。综合以上结果及文献提示，我们提出科学假说：在肠炎发生发展过程中，EZH2可能通过其组蛋白甲基转移酶活性抑制JAK2/STAT信号通路活化，抑制HSC向MDSC分化、促进MDSC向下游分化成熟，从而限制肠炎状态下免疫抑制性的MDSC富集，最终促进肠炎进展。

本项目拟在前期工作基础上，利用在C57BL/6J及造血系统特异性EZH2敲除鼠中构建多种肠炎模型、通路阻断实验及ChIP-Seq等方法，阐明EZH2调控肠炎状态下MDSC富集的分子机制。并从动物实验及临床标本双层次系统验证EZH2-H3K27Me3-JAK2/STAT-MDSC参与肠炎的作用。通过本项目的研究，不但能深入阐明肠炎状态下EZH2调控MDSC生成的分子机制，也将为炎症性肠病的防治提供新靶点和治疗策略。

参考文献：

1. Kaplan GG, Ng SC. Understanding and Preventing the Global Increase of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2017;152:313-321 e2.
2. de Souza HS, Fiocchi C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;13:13-27.
3. Park JH, Peyrin-Biroulet L, Eisenhut M, et al. IBD immunopathogenesis: A comprehensive review of inflammatory molecules. *Autoimmun Rev* 2017;16:416-426.
4. Dabritz J, Menheniott TR. Linking Immunity, Epigenetics, and Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2014;20:1638-1654.
5. Ray G, Longworth MS. Epigenetics, DNA Organization, and Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2019;25:235-247.
6. Bai AH, Wu WK, Xu L, et al. Dysregulated Lysine Acetyltransferase 2B Promotes Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis Through Transcriptional Repression of Interleukin-10. *J Crohns Colitis* 2016;10:726-34.



2015;3:727-40.

28. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. Trends Immunol 2011;32:19-25.

2. 项目的研究内容、研究目标，以及拟解决的关键科学问题（此部分为重点阐述内容）；

2.1 研究内容

（1）进一步明确 EZH2 甲基转移酶活性在小鼠炎症性肠病中的作用：

- ①在C57BL/6J小鼠上建立多种IBD模型（DSS诱导的溃疡性结肠炎模型，TNBS诱导的克罗恩病模型），分别给予EZH2活性抑制剂（GSK343和GSK126）。观察抑制EZH2甲基转移酶活性对肠炎发生发展的影响（已部分完成，见图1-3）。
- ②通过 EZH2-Loxp/Loxp 小鼠和 Vav-Cre 小鼠杂交，构建造血系统特异性 EZH2 基因敲除（EZH2-cKO）小鼠。（课题组前期已构建完成）。
- ③明确 EZH2-cKO 小鼠中 H3K27Me3 表达缺失后，利用 EZH2-cKO 小鼠建立 DSS 及 TNBS 肠炎模型。观察肠炎发生发展情况，验证上述现象。

（2）深入阐明肠炎状态下 EZH2 调控 MDSC 富集的作用：

- ①检测肠炎发生早期骨髓细胞中 EZH2、H3K27Me3 的表达情况。
- ②观察体内抑制 EZH2 活性对肠炎小鼠 MDSC 数量及功能的影响（已部分完成，见图4）。
- ③体内外实验明确 EZH2 调控肠炎状态下 MDSC 富集的原因：调控 HSC 向 MDSC 分化或（和）调控 MDSC 向下游分化成熟。

（3）通过条件性基因敲除鼠及阻断实验，探索 EZH2 调控肠炎状态下 MDSC 富集的分子机制：

- ①.明确 JAK2/STAT 信号通路在 EZH2 调控肠炎状态下 MDSC 富集中的作用。

1) 探索 EZH2 是否通过 JAK2/STAT 信号通路调控 HSC 向 MDSC 分化：

A.检测 EZH2-cKO 小鼠肠炎状态下骨髓 JAK2/STAT 信号通路活化情况。

B.利用 JAK2 / STAT 信号通路抑制剂，体内外观察通路阻断对 HSC 向 MDSC 分化的影响。

C.通过通路阻断实验，明确 JAK2/STAT 通路下游调控 MDSC 生成的相关转录因



子：C/EBP β 、IRF8 的表达。

2) 探索 EZH2 是否通过 JAK2/STAT 信号通路调控 MDSC 分化成熟：

A.明确 EZH2-cKO 小鼠肠炎状态下骨髓 JAK/STAT 信号通路的活化情况。

B.抑制 JAK2 / STAT 信号通路，体内外观察通路阻断对 MDSC 分化的影响。

C.阻断JAK2 / STAT信号通路，明确通路下游调控MDSC分化成熟的关键分子：

S100A9、S100A8及PKC β II的表达。

② 根据研究内容（2）中明确的 MDSC 富集原因，利用 EZH2 敲除及过表达的 HSC 或 MDSC 细胞以及 Chip-sequence、ChIP-qPCR 等方法，结合 RNA 芯片结果，探索 EZH2 调控肠炎鼠 MDSC 富集的可能靶基因。

（4）检测肠炎患者骨髓中 EZH2、H3K27Me3、JAK2 的表达及相关性，分析其与患者 MDSC 比例及预后的关系，进一步明确本项目的临床意义。

① 收集 IBD 病人骨髓，统计患者临床病理资料及疾病严重程度。

② 检测 IBD 病人骨髓细胞中 EZH2、H3K27Me3、JAK2、本项目所得靶基因 X 的表达水平，分析 H3K27Me3 与 JAK2; H3K27Me3 与 X 靶基因表达的相关性。

③ 流式检测 IBD 病人骨髓中 MDSC 比例，分析其与 H3K27Me3、JAK2、X 靶基因表达的相关性。验证前述实验结果。

④ 随访患者预后，分析上述 H3K27Me3、JAK2、X 靶基因表达与患者疾病严重程度及预后的关系。

2.2 研究目标

深入阐明 EZH2 调控肠炎状态下 MDSC 富集的作用及分子机制，为炎症性肠病的诊断、防治、预后分析提供新靶点。

2.3 拟解决的关键科学问题

① 明确EZH2介导组蛋白甲基化修饰调控肠炎状态下MDSC富集的作用；

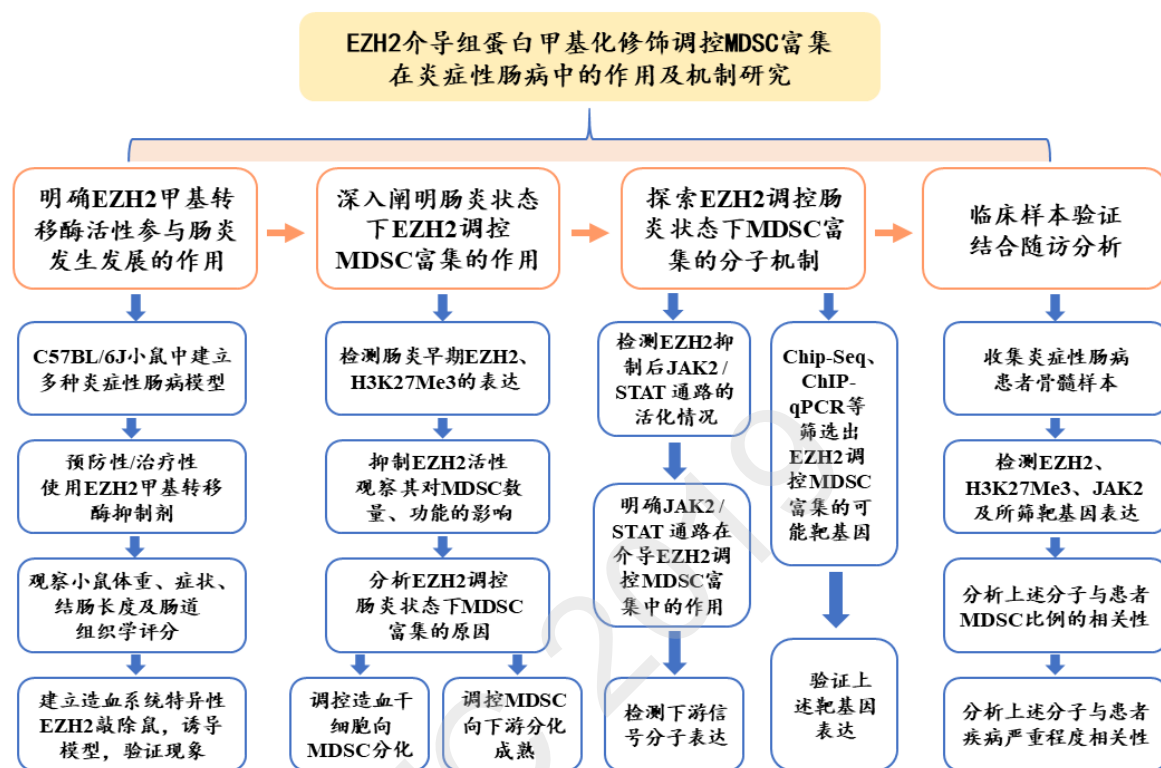
② 阐明EZH2调控MDSC富集的具体分子机制，为新的IBD有效治疗药物研发提供理论支持。

3. 拟采取的研究方案及可行性分析（包括研究方法、技术路线、实验手



段、关键技术等说明);

3.1 技术路线



3.2 研究方法及实验手段

(1) 进一步明确 EZH2 甲基转移酶活性在小鼠炎症性肠病中的作用:

① 明确EZH2活性抑制剂对DSS诱导的溃疡性结肠炎发生发展的影响

于北京华阜康生物科技公司购买 6-8 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠。建立小鼠 DSS 诱导的肠炎模型: 小鼠于第 0 天 (Day0) 始饮水饲喂 2.5% DSS, Day7 换动物饮用水。实验组小鼠于 Day0/半数以上小鼠出现症状时尾静脉注射 EZH2 活性抑制剂: GSK343/GSK126 (200 ug/kg, 隔两天一次)。对照组于相同时间尾静脉注射等体积生理盐水。每日记录小鼠体重及临床症状。实验终点处死小鼠, 记录结肠长度, 对结肠组织切片进行 HE 染色并做组织病理学评分 (已完成, 见图 1-3)

② 明确EZH2活性抑制剂对TNBS诱导的克罗恩病发生发展的影响

6-8 周 SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠禁食过夜后, 2.5% (w/v) TNBS 乙醇溶液灌肠以构建 TNBS 诱导的克罗恩病模型。诱导当日/半数以上小鼠出现症状时实验组小鼠尾静脉注射 EZH2 活性抑制剂: GSK343/GSK126 (200 ug/kg, 隔两天一次)。对照组小鼠尾静脉给予等体积生理盐水。



每日记录小鼠体重及临床症状。实验终点处死小鼠，记录结肠长度，对结肠组织切片进行 HE 染色并做组织病理学评分。

③ 明确造血细胞特异性 EZH2 敲除对小鼠炎症性肠病的作用

于 Jackson Lab 购买 C57BL/6J 背景的 EZH2-Loxp/Loxp 小鼠和 Vav-Cre 小鼠，将两种小鼠杂交以获得骨髓造血细胞特异性 EZH2 敲除鼠（EZH2-cKO）小鼠。qRT-PCR 及 Western blot 检测小鼠骨髓细胞中 EZH2、H3K27Me3 的表达，验证敲除是否成功。

利用上述 6-8 周龄的 EZH2-cKO 鼠，构建 DSS 及 TNBS 肠炎模型，记录小鼠体重变化、临床症状评分、结肠长度、结肠组织学评分以评价肠炎的严重程度。

(2) 深入阐明肠炎状态下 EZH2 调控 MDSC 富集的作用：

① 检测肠炎发生早期骨髓细胞中 EZH2、H3K27Me3 的表达

购买 6-8 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雌性小鼠。饮水饲喂 2.5% DSS 建立小鼠肠炎模型。于 Day0、day2、day4 处死小鼠，Western blot 检测骨髓细胞 EZH2 及 H3K27Me3 的表达。

② 观察体内抑制 EZH2 活性对小鼠 MDSC 数量及功能的影响

在 C57BL/6J 中建立 DSS 诱导的肠炎模型。实验组于 Day0 起尾静脉注射 GSK343（200 ug/kg，隔两天一次），对照组注射等体积生理盐水。于 day5 流式细胞术检测小鼠骨髓、外周血、脾脏、肠道中 MDSC（CD11b⁺Gr-1⁺）的比例、数量，并评估肠道中升高的 MDSC 功能（经流式细胞术，qRT-PCR 及 Western blot 检测 MDSC 功能分子：ROS、Arg-1、iNOS 的表达；分选出经 EZH2 抑制剂处理的 MDSC 细胞，与 T 细胞共培养，流式细胞术检测 T 细胞增殖情况）（前期已基本完成，见图 4）。

③ 明确 EZH2 调控肠炎状态下 MDSC 富集的原因：

根据文献报道和前期预实验结果，我们推测抑制 EZH2 活性可能促进 HSC 向 MDSC 分化增多或（和）抑制 MDSC 向下游分化。拟针对上述两种可能开展如下实验：

A. 促进 HSC 向 MDSC 分化：

1) 观察体外下调 EZH2 活性对 HSC 向 MDSC 分化的影响

C57BL/6J 小鼠中建立肠炎模型。分离肠炎鼠骨髓，流式分选 HSC (lineage⁻ Sca-1⁺CD117⁺) 细胞，取 2×10^5 个 HSC 细胞接种于 24 孔板，加入 GM-CSF 和 IL-6（各 10 ng/ml）体外诱导 HSC 向 MDSC 分化。qRT-PCR、Western blot 检测诱导不同时间点（0h, 24h, 48h, 72h, 96h）EZH2、H3K27Me3，以及 H3K27Me1（对照）、H3K27Me2 的表达（对照）。于诱导同时（0h）加/不加入 5 μ M GSK343。多个时间点（24h, 48h, 72h, 96h）收



集细胞，Western blot比较两组EZH2、H3K27Me3、H3K27Me1、H3K27Me2的表达水平，以确认GSK343是否特异性地抑制EZH2活性；流式检测上述不同时间点两组MDSC细胞的比例和数量。

2) 观察体内抑制 EZH2 活性对肠炎鼠髓系前体细胞及 MDSC 数量的影响

采用2.5%DSS诱导C57BL/6J小鼠。实验组于Day0尾静脉注射GSK343 (200 ug/kg, 隔两天一次); 对照组给予等体积生理盐水。Day4流式细胞术检测两组小鼠骨髓中髓系前体细胞: HSC(lineage⁻ Sca-1⁺CD117⁺)、髓样干细胞 (CMP: lineage⁻ Sca-1⁺c-kit⁺CD16/32⁻CD34⁺)、粒系/单核系祖细胞 (GMP: lineage⁻Sca-1⁺c-kit⁺CD16/32⁺CD34⁺) 及MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺) 细胞的比例及数量。

B. 抑制 MDSC 向下游分化成熟:

1) 检测肠炎鼠 MDSC 中 EZH2 及 H3K27Me3 的表达

在C57BL/6J小鼠中建立DSS肠炎模型。于Day5流式分选出骨髓MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺) 细胞, qRT-PCR及Western blot检测MDSC上EZH2、H3K27Me3、H3K27Me1 (对照)、H3K27Me2 (对照) 的表达水平。

2) 体内外观察抑制EZH2活性对MDSC分化的影响

体外实验: 分离肠炎鼠骨髓中的MDSC, 在10 ng/ml GM-CSF培养体系下诱导MDSC分化。诱导同时 (Day0) 加/不加入5 μ M GSK343。Day3、day 5收集细胞, Western blot检测EZH2、H3K27Me3、H3K27Me1、H3K27Me2的表达水平, 以确认GSK343作用的特异性; 流式细胞术分析GSK343对诱导体系中DC (MHC II⁺ CD11c⁺), Macrophage (CD11b⁺F4/80⁺) 比例和数量的影响。

体内实验: 采用2.5%DSS诱导C57BL/6J小鼠肠炎模型。Day0实验组尾静脉注射GSK343 (200 ug/kg, 隔两天一次); 对照组注射等体积生理盐水。Day5收集两组小鼠脾脏细胞, 流式细胞术检测其中MDSC, DC, Macrophage的比例和数量。

(3) 通过 EZH2 基因敲除小鼠模型和通路阻断实验, 探索 EZH2 调控肠炎状态下 MDSC 富集的分子机制:

① 明确 JAK2 / STAT 信号通路在 EZH2 调控肠炎鼠 MDSC 富集中的作用:

拟根据第二部分的结果, 就 EZH2 调控 HSC 向 MDSC 分化或 (和) EZH2 调控 MDSC 向下游分化成熟继续深入开展如下实验:

**A. 探索 EZH2 是否通过 JAK2/STAT 信号通路调控 HSC 向 MDSC 分化:**

1) 检测 EZH2-cKO 小鼠肠炎状态下骨髓 JAK2 / STAT 信号通路的活化情况, 明确 H3K27Me3 与 JAK2 表达的相关性。

在 EZH2-cKO 小鼠上建立 DSS 肠炎模型。流式细胞术检测不同时间点 (Day3,5,7) 小鼠骨髓、外周血、脾脏及肠道中 MDSC 的比例及数量。于 MDSC 变化最明显的时间点, 分离小鼠骨髓组织, 提取总蛋白, Western Blot 检测敲除组与 WT 对照组 EZH2、H3K27Me3、C/EBP β 、IRF8 的表达, 明确 JAK2 及 STAT1-6 的磷酸化水平。统计软件分析 H3K27Me3 与 JAK2 表达的相关性。

2) 体内外阻断 JAK2 / STAT 通路, 观察通路阻断对 HSC 向 MDSC 分化的影响。

体外实验: 在 C57BL/6J 小鼠中建立肠炎模型。流式分选出肠炎鼠骨髓 HSC, 取 2×10^5 个前体细胞接种于 24 孔板。分成四组: 一组加入 GM-CSF 和 IL-6 (各 10 ng/ml) 诱导 HSC 向 MDSC 分化。一组于诱导同时加入 JAK2 选择性抑制 TG101348; 一组诱导同时加入 5 μ M GSK343; 另一组于诱导同时加入 5 μ M GSK343 以及 TG101348; 多个时间点 (24h, 48h, 72h, 96h) 收集细胞, Western Blot 明确通路是否被成功阻断; 流式细胞术检测 MDSC 的比例和数量。取阻断剂对 MDSC 生成抑制最明显的时间点收集细胞, Western Blot 检测细胞中 C/EBP β 、IRF8 的表达。

体内实验: 在 EZH2-cKO 小鼠上建立 DSS 模型, 实验组体内给予 JAK2 抑制剂, 对照组给予等剂量生理盐水。于 MDSC 变化最明显的时间点, 收集两组小鼠骨髓细胞, Western Blot 检测 JAK2 及 STAT (前述有差异的 STAT 分子) 的磷酸化水平以及 C/EBP β 、IRF8 的表达, 以确定通路阻断情况及下游调控 MDSC 生成的相关转录因子表达情况; 流式细胞术分析两组骨髓中 HSC、CMP、GMP、MDSC 的细胞比例及数量。

B. EZH2 调控肠炎状态下 MDSC 分化成熟:

1) 明确 EZH2-cKO 小鼠肠炎状态下骨髓 JAK2 / STAT 信号通路的活化情况 (方法同前)。

2) 采用 JAK2 / STAT 信号通路抑制剂, 体内外观察通路阻断对 MDSC 分化的影响:

体外实验: 在 C57BL/6J 小鼠中建立肠炎模型。分离骨髓中的 MDSC, 于 10 ng/ml GM-CSF 培养体系下诱导 MDSC 分化。分成四组: 1. 单纯诱导组; 2. 诱导+阻断组 (阻断剂: TG101348); 3. 诱导+GSK343 (5 μ M) 处理组; 4. 诱导+GSK343 (5 μ M) + 阻断组 (阻断剂: TG101348)。Day3、day 5 收集细胞, Western Blot 检测 JAK2、STAT1-6 磷酸化水平; 流式细胞术检测各组 DC, Macrophage 的比例和数量。

体内实验: 采用 2.5% DSS 在 EZH2-cKO 及 WT 小鼠中构建肠炎模型, 分别给予 JAK2



选择性抑制TG101348及等剂量生理盐水（对照）。于MDSC变化最明显的时间点收集各组小鼠脾脏细胞，Western Blot确认通路阻断情况；流式细胞术检测各组MDSC, DC, Macrophage的比例、数量。

3)明确JAK2/STAT通路下游调控MDSC分化成熟关键分子：S100A9、S100A8及PKC β II在EZH2调控MDSC分化中的作用。

在C57BL/6J小鼠中建立肠炎模型。分离肠炎鼠骨髓中的MDSC, 于10 ng/ml GM-CSF培养体系下诱导MDSC分化。于阻断剂对MDSC分化影响最明显的时间点收集细胞，qRT-PCR及Western Blot检测S100A9、S100A8及PKC β II的表达。

② 筛选调控肠炎鼠 MDSC 生成的可能靶基因：

- A. 收集肠炎鼠骨髓细胞，送检 EZH2 及 H3K27Me3 的 ChIP-Seq 检测（该实验由深圳华大基因有限公司提供技术指导和支持）。
- B. 将 ChIP-Seq 筛查到的基因与 RNA 芯片筛查到的基因做比对，得到同时改变的基因，记作候选分子群 A。
- C. 根据前述现象，分选出肠炎鼠 HSC 或 MDSC 细胞，利用小分子 RNA（siRNA）和过表达质粒敲降或过表达 EZH2，qRT-PCR 及 Western Blot 筛选出有效干扰的细胞。
- D. 收集上述细胞，ChIP-qPCR 检测 H3K27Me3 在候选分子群 A 中富集的变化。找到 EZH2 过表达后 H3K27Me3 富集增多且 EZH2 敲降后 H3K27Me3 富集减少的基因，得到候选分子群 B。
- E. 分别收集 EZH2 过表达及表达受抑的细胞，ChIP-qPCR 检测 H3K27Me3 去甲基化酶 UTX 在前述候选分子群 B 中的富集变化，以进一步筛选出候选分子群 C。
- F. 分别收集过表达/敲降 EZH2 的细胞，ChIP-qPCR 检测 EZH2 甲基化协同分子 Suz12 在前述候选分子群 C 中的富集变化。进一步筛选出候选分子群 D。
- G. 查阅文献，在候选分子群 D 中筛选出与 MDSC 分化发育相关的基因（候选分子群 E）。过表达或敲低 EZH2 表达后，qRT-PCR 及 Western Blot 检测候选分子群 E 的表达。最终探明 EZH2 调控肠炎鼠 MDSC 富集的可能靶基因。



(4) 临床样本观察肠炎患者骨髓中 EZH2、H3K27Me3、JAK2 的表达及相关性, 分析其与患者 MDSC 比例及预后的关系, 进一步明确本项目的临床意义。

①收集 IBD 患者骨髓标本: 收集我院及医联体单位 IBD 患者骨髓标本。统计患者临床病理资料及疾病严重程度。

②qRT-PCR 或 Western blot 检测 IBD 病人骨髓细胞中 EZH2、H3K27Me3、JAK2、本项目所得靶基因 X 的表达水平, 分析 H3K27Me3 与 JAK2; H3K27Me3 与 X 靶基因表达的相关性。

③流式检测 IBD 病人骨髓中 MDSC 比例, 分析其与 H3K27Me3、JAK2、X 靶基因表达的相关性。验证本项目基础实验结果。

④随访患者预后, 统计分析上述 H3K27Me3、JAK2、X 靶基因表达与患者疾病严重程度及预后的关系。

3.3 可行性分析

①立项依据充分:

以往研究已证实, MDSC在肠炎发病过程中具有重要的保护作用。申请者前期研究发现: (1) 抑制EZH2甲基转移酶活性能有效缓解小鼠肠炎; (2) 促进肠道MDSC富集是EZH2甲基转移酶活性影响肠炎发生发展的重要机制; (3) 肠道MDSC富集增多的关键原因是骨髓中MDSC生成增多。(4)抑制EZH2活性促进骨髓细胞JAK2活化。基于JAK/STAT通路在MDSC分化发育中的重要作用, 我们有理由推测: 在肠炎发生发展过程中, EZH2可能通过其组蛋白甲基转移酶活性抑制JAK2/STAT信号通路活化, 抑制HSC向MDSC分化、促进MDSC向下游分化成熟, 从而限制肠炎状态下免疫抑制性的MDSC富集, 最终促进肠炎进展。因此, 本项目立项依据充分。

②技术可行:

申请者长期从事免疫相关研究, 具备扎实的实验设计、数据分析以及论文撰写能力。此外, 申请者对炎症性肠病免疫发病机制及免疫干预领域十分熟悉, 相关研究已在Frontiers in immunology等杂志发表, 本项目部分前期工作基础也已被Nature communications杂志接收。项目所需EZH2-cKO小鼠已由申请者所在课题组前期构建完成; 项目所需实验技术, 如体外诱导HSC/MDSC分化技术等, 申请者已完全掌握。

③人员及配备可行:



④预期参加国际会议交流 1 次，争取发表高水平学术论文 1-2 篇；

⑤培养博士生 1 名、硕士生 1 名。

(二) 研究基础与工作条件

1. 研究基础（与本项目相关的研究工作积累和已取得的研究工作成绩）；

(1) 与本项目直接相关的工作基础

① 课题组前期研究证实抑制 EZH2 甲基转移酶活性能有效缓解小鼠肠炎

工作基础一：

将 6-8 周雌性 C57BL/6J 小鼠分为三组，其中一组给予动物饮用水饮水，一组予 2.5%葡聚糖硫酸钠 (DSS) 饮水以诱导小鼠肠炎模型，并在诱导同时尾静脉注射 EZH2 甲基转移酶活性抑制剂 GSK343 (200 ug/kg, 隔两天一次)【图 1a】，另一组则在 DSS 诱导同时尾静脉注射等体积生理盐水。记录小鼠每日体重变化、临床症状评分以评估肠炎发展程度。诱导第七天 (Day7) 处死小鼠，留取各组小鼠结肠组织，提取总蛋白，用 ELISA 试剂盒检测肠道组织中促炎因子浓度；同上实验观察至小鼠体重回升【图 1a】，处死小鼠，记录结肠长度后留取远端结肠组织，制作成石蜡切片用于 HE 染色，染色结果由两位病理科医师根据肠道内炎症浸润及上皮损伤情况进行独立评分；将 DSS 浓度提高至 3%，观察各组小鼠生存情况。结果发现，预防性地给与 GSK343 处理后，小鼠发生肠炎的时间推迟，体重下降幅度显著降低【图 1b】，临床症状明显缓解【图 1c】，结肠缩短【图 1d】、肠道组织损伤及炎症浸润状况也有效改善【图 1e】。不仅如此，GSK343 处理后的肠道组织中促炎因子浓度明显下降【图 1f】，肠炎鼠生存率明显提高【图 1g】。

与本项目关系：此部分结果初步证实了抑制 EZH2 甲基转移酶活性对 DSS 诱导性肠炎的保护作用，这是本项目的重要预实验证据，申请者正是根据这一实验现象推测 EZH2 的甲基转移酶活性可能在肠炎发生发展中起作用。

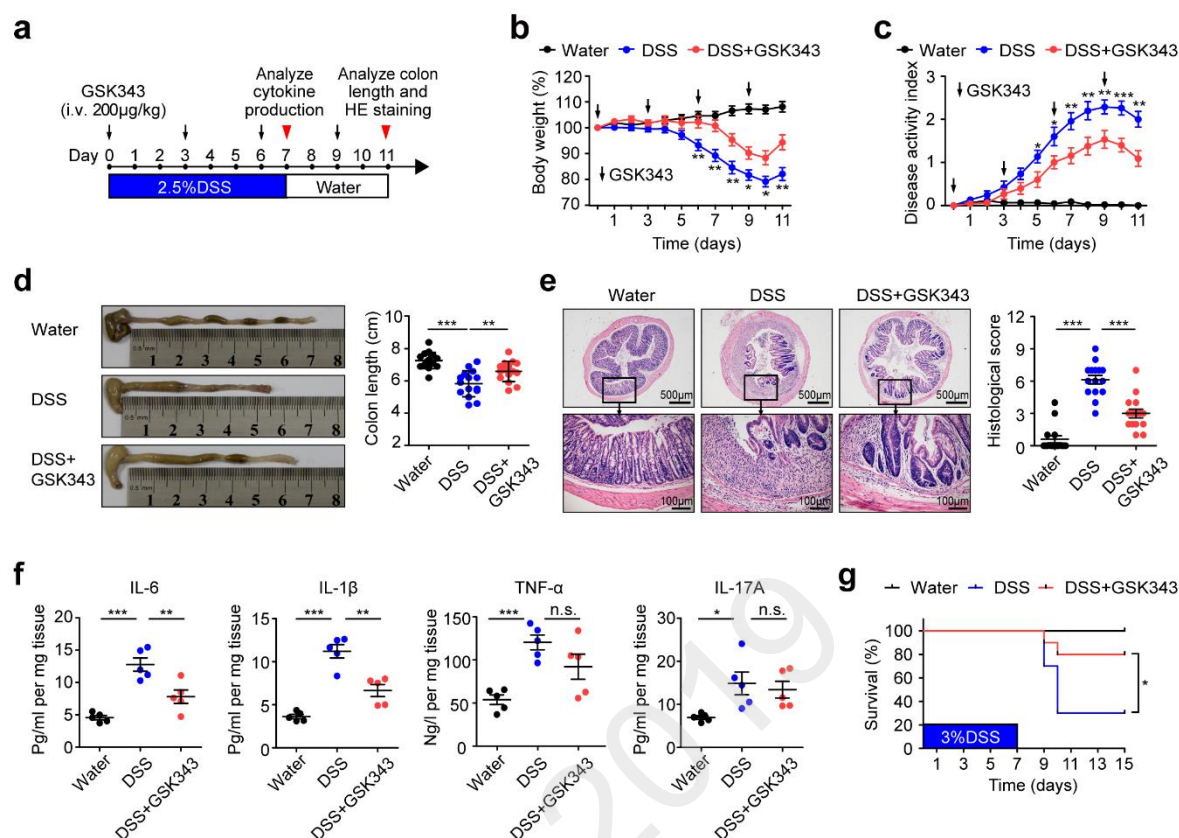


图 1：预防性地给予 EZH2 甲基转移酶活性抑制剂 GSK343 缓解小鼠 DSS 诱导的肠炎。 a. 诱导和处理流程图。b. 小鼠体重百分数变化 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)。c. 临床症状评分 (包括体重减轻程度、粪便性状及便血状况; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.005$)。d. 结肠代表性图像及结肠长度统计 (** $P<0.01$, *** $P<0.005$)。e. 结肠代表性 HE 图像及组织学评分 (包括上皮损伤及肠道炎症浸润情况) (** $P<0.005$)。f. ELISA 法检测结肠组织内促炎因子浓度 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.005$, n.s. = not significant)。g. 小鼠生存曲线 (* $P<0.05$)。

工作基础二：

采用 2.5% DSS 诱导建立小鼠肠炎模型，一组于诱导同时尾静脉注射 EZH2 活性抑制剂 GSK126 (200 µg/kg, 隔两天一次)【图 2a】，另一组则在诱导同时尾静脉注射等体积生理盐水。通过记录小鼠体重变化、临床症状评分、结肠长度、结肠组织学评分来评价肠炎的严重程度。结果发现，GSK126 处理也能显著改善小鼠病情 (包括体重下降程度【图 2b】、临床症状评分【图 2c】、结肠短缩程度【图 2d】、肠道组织损伤及炎症浸润状况【图 2e】)，延长肠炎鼠生存【图 2f】。

与本项目关系：该结果进一步证实了 EZH2 的甲基转移酶活性在肠炎发生发展中的重要作用。

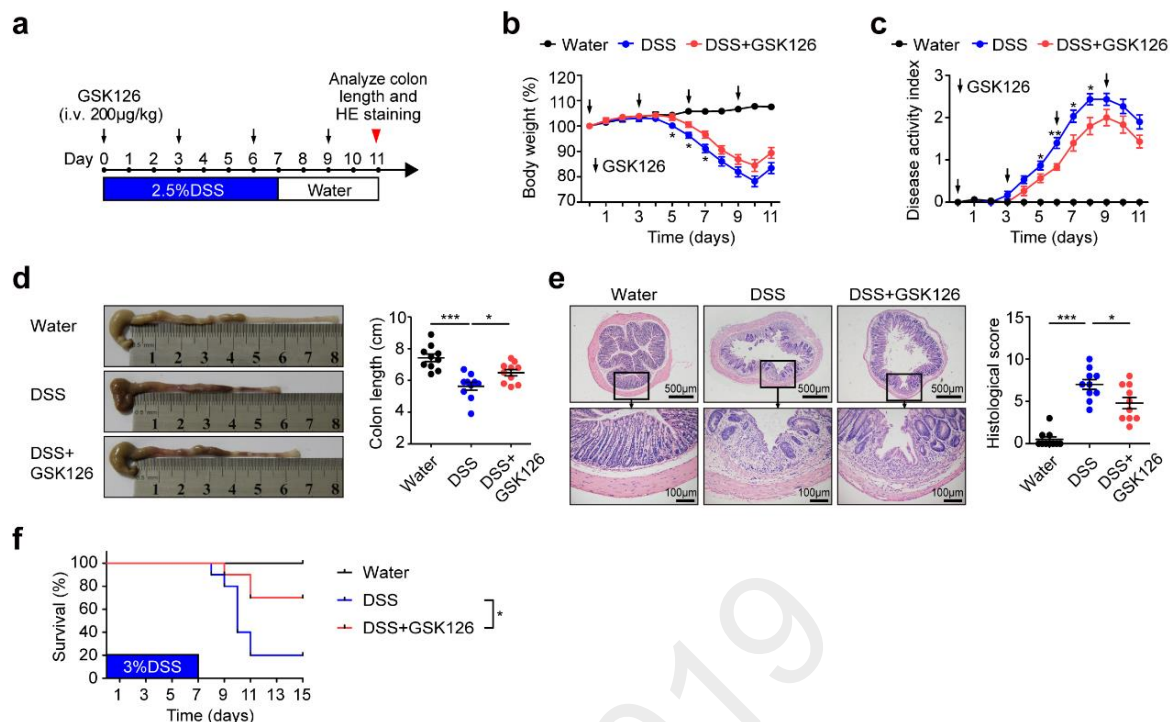


图 2: 预防性地使用 GSK126 抑制 EZH2 活性缓解小鼠 DSS 诱导的肠炎。a.诱导和处理流程图。b.小鼠体重百分数变化 (*P<0.05,**P<0.01)。c.临床症状评分 (*P<0.05,**P<0.01)。d. 结肠代表性图像及结肠长度统计 (**P<0.01,***P<0.005)。e. 结肠代表性 HE 图像及组织学评分 (*P<0.05,***P<0.005)。f. 小鼠生存曲线 (*P<0.05)。

工作基础三:

采用 2.5% DSS 诱导建立小鼠肠炎模型,当诱导组小鼠半数以上出现肠炎症状(稀便,血便,体重减轻)时,随机将诱导组小鼠再均分成两组,一组尾静脉注射 GSK343 (200ug/kg, 隔天一次),另一组尾静脉予相同体积的生理盐水,观察至各组小鼠体重回升【图 3a】。记录小鼠每日体重变化、临床症状评分,结肠长度、结肠组织学评分以评价小鼠肠炎的严重程度。将 DSS 浓度提高至 3%,观察小鼠生存情况。结果发现,尽管 GSK343 处理组和未处理组体重下降程度相仿【图 3b】,GSK343 治疗仍显著缓解了肠炎鼠的临床症状【图 3c】、结肠缩短程度【图 3d】以及结肠组织损伤【图 3e】,治疗后小鼠生存亦显著延长【图 3f】。

与本项目关系:此部分结果与工作基础一、二互为补充,相互印证。提示应用小剂量 EZH2 活性抑制剂能有效治疗肠炎,提高肠炎患者生活质量,并延长其生存。该结果是本项目临床应用价值的重要展示。

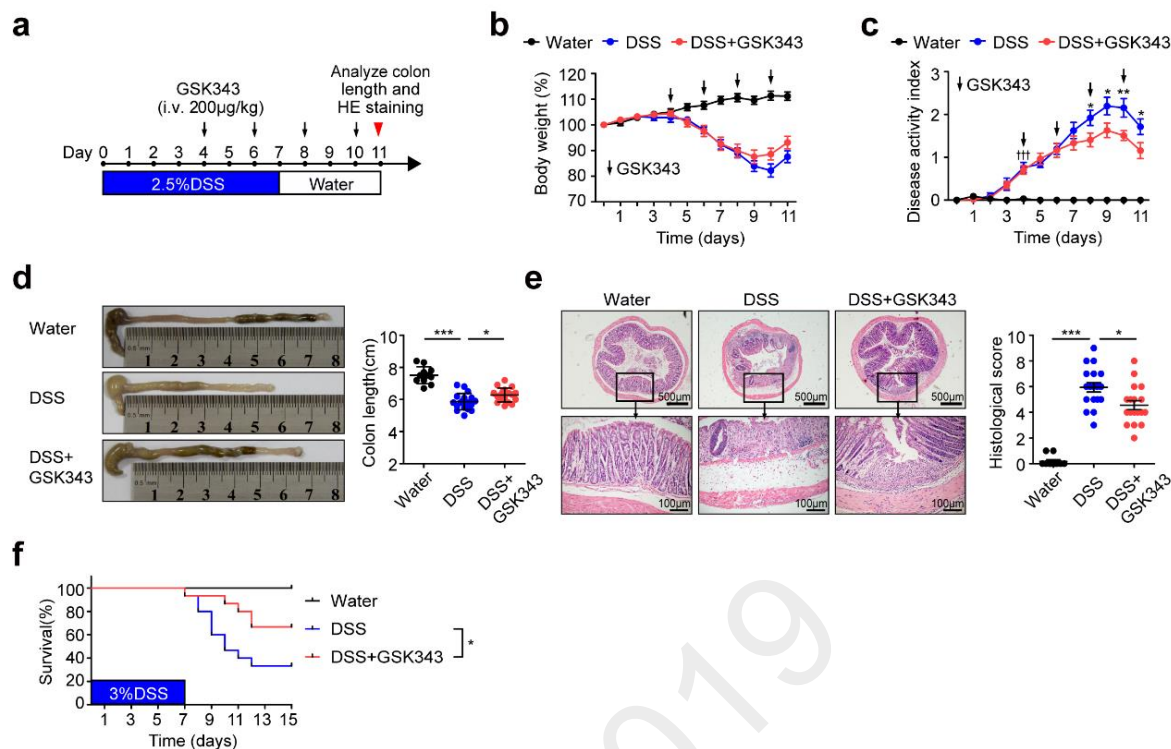


图 3: 抑制 EZH2 活性治疗小鼠 DSS 诱导的肠炎。a. 诱导和治疗流程图。b. 小鼠体重百分数变化。c. 临床症状评分 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。d. 结肠代表性图像及结肠长度统计 (* $P < 0.05$, *** $P < 0.005$)。e. 结肠代表性 HE 图像及组织学评分 (* $P < 0.05$, *** $P < 0.005$)。f. 小鼠生存曲线 (* $P < 0.05$)。

②促进肠道 MDSC 富集是 EZH2 甲基转移酶活性影响肠炎发生发展的重要机制

工作基础四:

将 6-8 周雌性 NOD/SCID 小鼠分为三组, 用 2.5% DSS 建立小鼠肠炎模型, 预防性地给予 GSK343 (200 μg/kg, 隔两天一次) 处理【图 4a】。结果显示, GSK343 在缺乏 T、B 淋巴细胞的小鼠中仍能发挥类似于免疫完全小鼠中的肠炎缓解作用【图 4b-e】。

在 C57BL/6J 小鼠中建立肠炎模型, 处理办法同前【图 1a】。于 DSS 诱导的第 5 天获得小鼠全结肠组织, 留取 1cm 远端结肠, 制作成冰冻切片用于 Gr-1 染色, 余结肠在无钙镁的 HBSS 缓冲液中 (含 HBSS, 0.5M EDTA, 0.5M DTT) 消化 20 分钟以去除肠上皮细胞。将剩余结肠组织剪碎, 在 D 型胶原酶中消化, 获得单细胞悬液。使用 40% 以及 80% 的 Percoll 分离液, 分离提取出肠道固有层 (cLP) 细胞。流式检测肠道固有层中固有免疫细胞: 巨噬细胞 (Macrophage)、树突状细胞 (DC)、嗜酸性粒细胞 (Eosinophil) 细胞、髓系抑制性细胞 (MDSC) 的比例及数量。结果发现 GSK343 处



理后肠道组织中 Macrophage、DC 及 Eosinophil 细胞数量无明显变化, MDSC 的比例及数量显著升高【图 4f】。免疫荧光染色也证实了处理组 MDSC 数量的增多【图 4g】。

与本项目关系: 该结果提示肠道微环境中 MDSC 富集增多极可能是 GSK343 缓解肠炎的重要机制。下一步可采用 MDSC 清除实验进一步明确升高的 MDSC 对肠炎的作用。

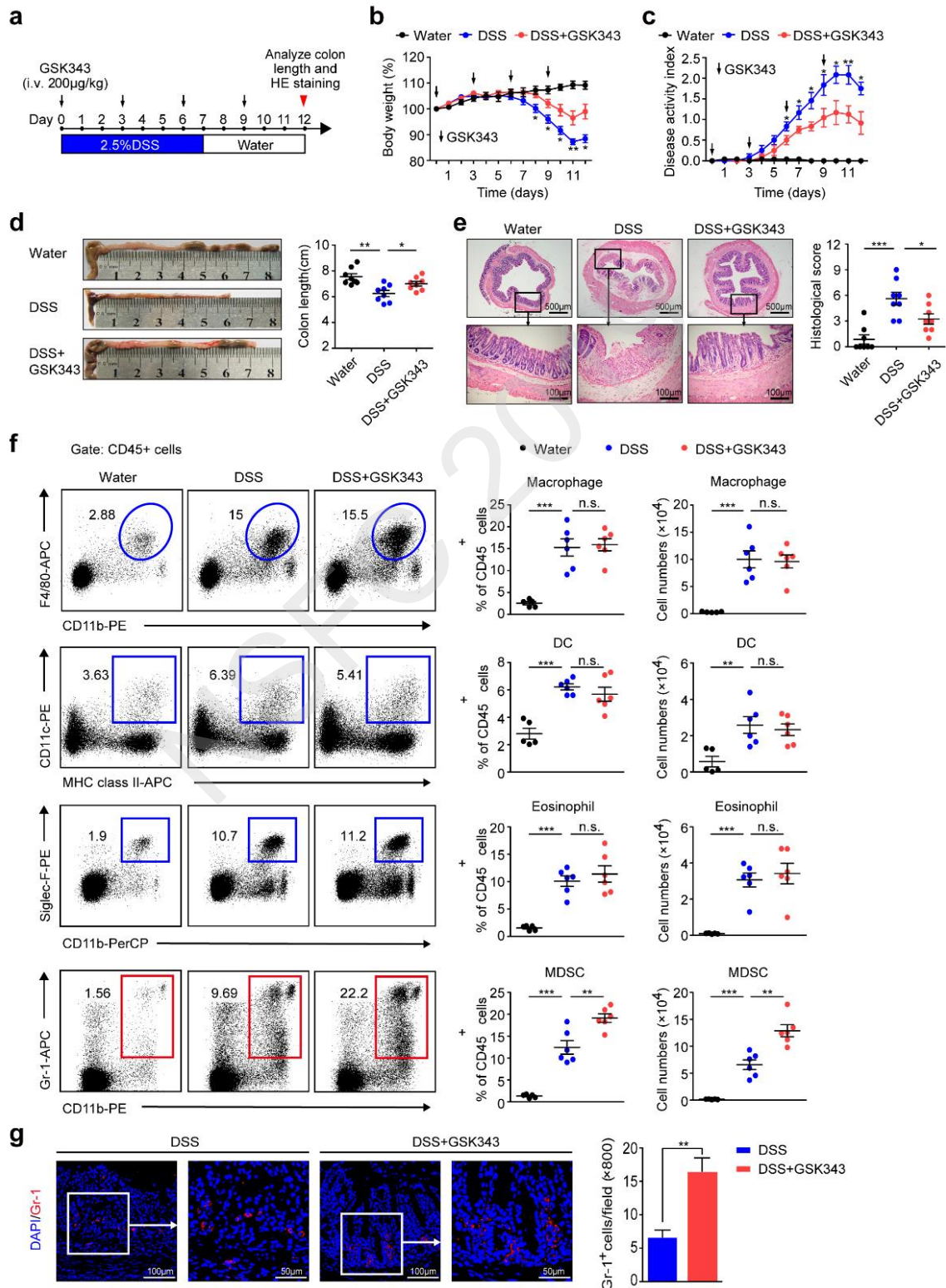


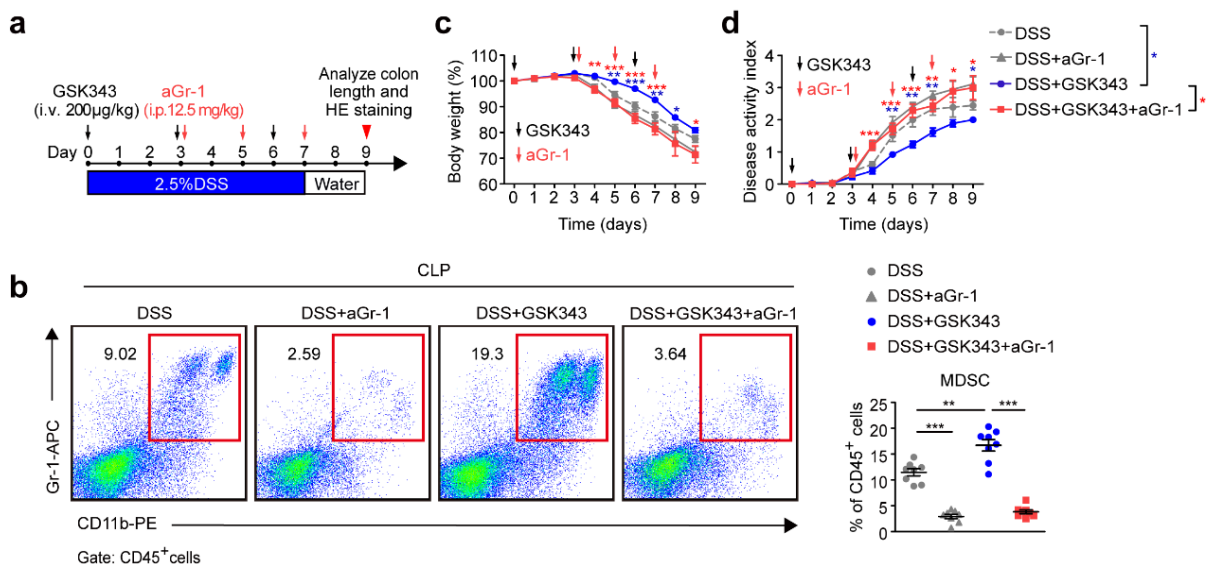


图 4：抑制 EZH2 活性增加肠道 MDSC 浸润。 a. 在 NOD/SCID 小鼠上建立肠炎模型；建立模型和药物处理流程图。 b. 小鼠体重百分数变化 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。 c. 临床症状评分 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。 d. 结肠代表性图像及结肠长度统计 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。 e. 结肠代表性 HE 图像及组织学评分 (* $P < 0.05$, *** $P < 0.005$)。 f. 小鼠结肠固有层中巨噬细胞 (CD11b⁺ F4/80⁺)、树突状细胞 (MHC-II⁺ CD11c⁺)、嗜酸性粒细胞 (Siglec-F⁺ Gr-1⁻) 细胞、髓系抑制性细胞 (CD11b⁺ Gr-1⁺) 的比例及数量。 (** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$, n.s. = not significant)。 g. 免疫荧光检测结肠组织中 MDSC 的浸润情况 (** $P < 0.01$)。

工作基础五：

将 6-8 周雌性 C57BL/6J 小鼠随机分为 4 组，2.5% DSS 诱导建立小鼠肠炎模型，一组尾静脉注射 GSK343 (200ug/kg, 隔两天一次)；一组尾静脉注射等体积生理盐水；一组尾静脉给予 GSK343，并于诱导第 3 天腹腔注射 anti-Gr-1 抗体 (RB6-8C5, 12.5mg/kg, 隔天一次)；最后一组尾静脉注射等体积生理盐水，并于诱导第 3 天腹腔给予 anti-Gr-1 抗体处理 (RB6-8C5, 12.5mg/kg, 隔天一次)【图 5a】。每日记录小鼠体重及临床症状评分。诱导第 5 天，流式细胞术检测肠道固有层中 MDSC 的细胞比例；诱导第 9 天处死小鼠，记录结肠长度，留取远端结肠组织，HE 染色评价各组肠道组织损伤及炎症浸润情况。结果显示，有效清除 MDSC 后【图 5b】，逆转了 GSK343 对肠炎的保护作用，小鼠体重下降幅度【图 5c】、肠炎症状【图 5d】、结肠缩短程度【图 5e】及组织学损伤【图 5f】均较单纯 GSK343 处理组明显加重，与 DSS 单纯诱导组相似。

与本项目关系：该部分结果进一步证实了前面的科学假说，即：肠道中增多的 MDSC 正是 GSK343 缓解肠炎的关键机制。后续将进一步分析肠道中 MDSC 增多的机制。



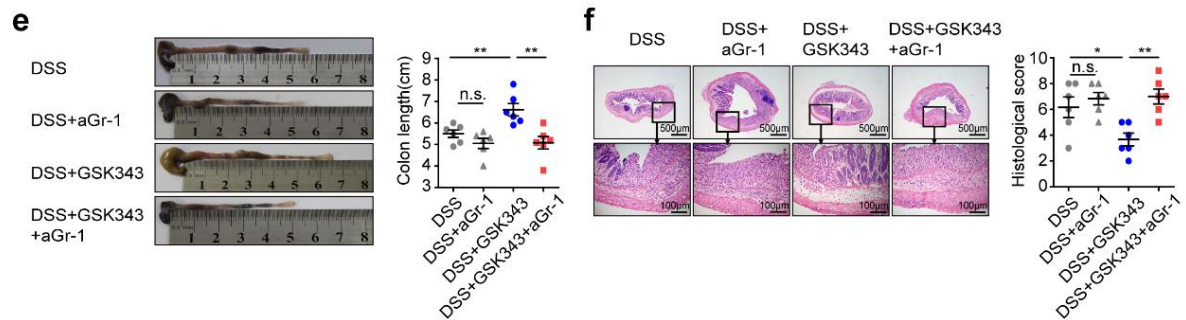


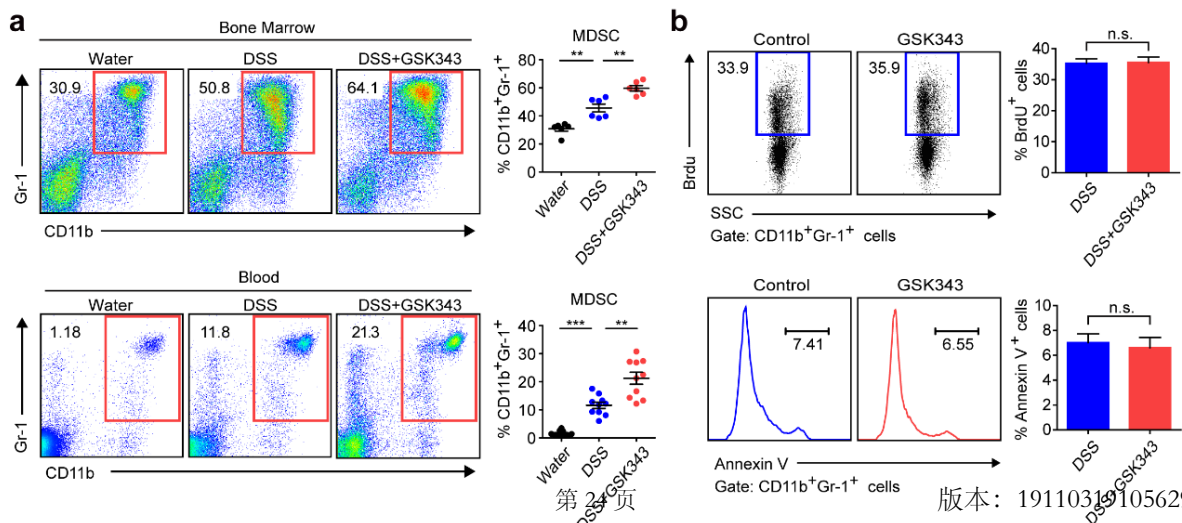
图 5: 清除 MDSC 后 GSK343 对肠炎的保护效果消失。a. 诱导和处理流程图。b. DSS 诱导第 5 天, 结肠固有层中 MDSC 比例。c. 小鼠体重百分数变化 (蓝色*号代表 DSS 组与 DSS+GSK343 组的统计差异; 红色*号代表 DSS+GSK343 组与 DSS+GSK343+aGr-1 组的统计差异; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.005$)。d. 临床症状评分。e. 结肠长度 (** $P<0.01$, n.s. = not significant)。f. 结肠组织代表性 HE 图像及组织学评分 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$, n.s. = not significant)。

③抑制 EZH2 甲基转移酶活性促进肠炎小鼠骨髓中 MDSC 生成增多

工作基础六:

采用 2.5% DSS 诱导小鼠, 并在诱导当日 (Day0) 及诱导第 3 天 (Day3) 尾静脉注射 GSK343 (200ug/kg) 或等体积的生理盐水。于诱导第 5 天, 流式细胞术检测骨髓和外周血中 MDSC 的比例, 发现 GSK343 处理后骨髓、外周血中 MDSC 比例明显升高【图 6a】。进一步分析肠道固有层内 MDSC 中 Brdu 及 Annexin V 阳性的细胞比例, 发现 GSK343 处理并不影响 MDSC 自身的增殖及凋亡【图 6b】。PCR 检测结肠组织中 MDSC 相关趋化因子 (CXCL1、CXCL2、CXCL5、CXCL12) 的表达, 发现 GSK343 处理与否对 MDSC 趋化因子表达并无明显影响【图 6c】。

与本项目关系: 此部分结果揭示肠炎状态下抑制 EZH2 活性可促进骨髓中 MDSC 产生。该结果指明了本项目的研究方向。



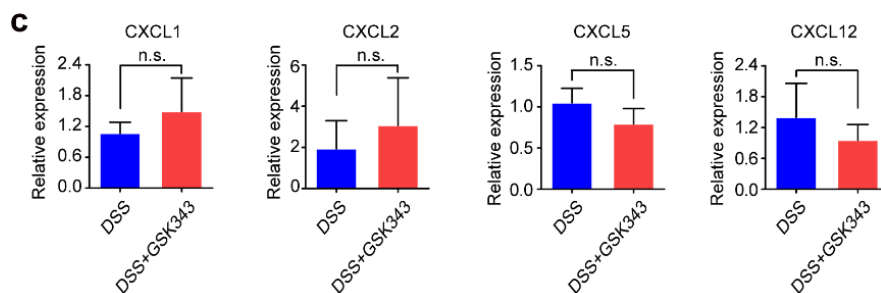


图 6: 抑制 EZH2 活性促进肠炎小鼠骨髓中 MDSC 生成。a. DSS 诱导第 5 天, 骨髓和外周血中 MDSC 比例 (**P < 0.01, ***P < 0.005)。b. DSS 诱导第 5 天, 结肠固有层里 MDSC 中 BrdU 及 Annexin V 的阳性细胞比例) (n.s. = not significant)。c. 结肠组织中 MDSC 相关趋化因子表达情况 (n.s. = not significant)。

④抑制 EZH2 活性可能通过激活 JAK2/STAT 信号通路调控肠炎环境下 MDSC 生成

建立小鼠肠炎模型, 于 Day0 及 Day3 尾静脉注射 GSK343 (200ug/kg) 或等体积的生理盐水。于 Day4 分别提取 GSK343 处理与未处理组小鼠的骨髓细胞, 送检 RNA 芯片分析, 筛查差异基因, 并基于 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 数据库对差异基因进行通路富集分析。结果显示, GSK343 处理后肠炎小鼠骨髓中多个与 MDSC 发育相关的基因发生改变, 上调的关键性通路有: Toll 样受体信号通路、JAK/STAT 信号通路、TNF 信号通路等。其中富集评分较高的 JAK / STAT 信号通路与 MDSC 发育、增殖、分化关系密切【图 7a】。Day4 分别提取 GSK343 处理与未处理组小鼠的骨髓细胞, Western blot 检测 H3K27Me3 及 JAK2/STAT 信号通路关键上游分子 JAK2 的磷酸化水平, 结果发现, 用 GSK343 有效抑制 H3K27Me3 的表达后, JAK2 的磷酸化水平升高。

与本项目关系: 此部分结果提示: 肠炎状态下, EZH2 活性抑制剂可能通过调控 JAK2/STAT 信号通路促进 MDSC 富集增多。该前期结果为本项目探讨 EZH2 甲基转移酶活性调控肠炎环境下 MDSC 生成的相关机制提供了重要思路。后续将通过 EZH2 条件性基因敲除鼠及 JAK2/STAT 信号通路抑制剂等方法, 进一步明确 EZH2 调控肠炎环境下 MDSC 生成的具体分子机制。