

溃疡性结肠炎小鼠模型肠粘膜中细胞因子的表达和核转录因子 κ B 的激活

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是炎症性肠病的一种,近年来其发病率呈上升趋势,但其发病机制和病因至今仍不十分清楚。在UC发生、发展过程中,细胞因子扮演了重要角色。有许多细胞因子,如IFN- γ 、TNF- α 、IL-1 β 和IL-12等,能够诱导或激活T细胞或B细胞,并能诱导多种致炎因子的产生,使炎症局部的中性粒细胞或巨噬细胞聚集,损坏肠粘膜。现已证实,UC中细胞因子的表达是由核因子- κ B(NF- κ B)调控的。已知NF- κ B在正常肠上皮细胞内无激活,而在UC的肠上皮细胞内表达升高。

本研究建立了UC小鼠模型并对UC的发病机制进行了初步探讨。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

20只8~9 w龄BALB/c小鼠,雌雄各半,体质量16~18 g,随机均分为正常对照组和葡聚糖硫酸钠(DSS)组。

1.2 主要试剂

Taq酶(鼎国公司)、polydI/dC(sigma)、Klenow片断(Promega)、NF- κ B寡核苷酸(上海生工生物工程公司合成)5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'; 3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5', [α -³²P] dATP(北京亚辉生物医学工程公司)。其余均为国产分析纯试剂。

1.3 主要仪器

PERKIN ELMER DNA Thermal Cycler 480 PCR扩增仪(美国)、Bio-Rad 垂直电泳仪、Bio-Rad MODEL 583 GEL DRYER干胶仪、Curix HT-330U(AGFA产品)胶片自动冲洗仪。

1.4 方 法

1.4.1 动物处理 对照组:一直自由饮用蒸馏水。葡聚糖硫酸钠(DSS)组:小鼠自由饮用5% DSS溶液,连续7 d后处死小鼠,取30~50 mg肠粘膜提取RNA,剩余部分提取肠上皮细胞核蛋白。

1.4.2 RNA提取和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 提取总RNA采用异硫氰酸胍二步法。以GA-PDH为内参照。GAPDH、TNF- α 、IL-1 β 引物由软件设计合成,引物序列如下:GAPDH(294 bp), 顺义链为:5'-CTGGTGCTGAGTATGTCGTG-3', 反义链为:5'-CAG TCTTCTGAGTGGCAGTG-3'; TNF- α (334 bp)顺义链为:5'-AACTAGTGGTGCCAGCCGAT-3', 反义链为:5'-CTTCACAGAGCAATGACTCC-3'; IL-1 β (377 bp)顺义链为:5'-AGCTTCCTTGCAAGTGTC-3', 反义链为:5'-CACACCAGCAGGTTATCATC-3'。RT-PCR方法:10 \times buffer 5 μ l, 2.5 mmol/L 4 \times dNTP各2 μ l, 20 mmol/L Mgcl₂ 3.5 μ l, 引物各2 μ l, DNA模板2 μ l, 三蒸水34.5 μ l, Taq 酶1 μ l, 总反应体系50 μ l。在PERKIN ELMER DNA Thermal Cycler 480 PCR扩增仪上完成。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 逆转录5 min, PCR 反应温度:94 $^{\circ}$ C 30 s、56 $^{\circ}$ C 20 s、72 $^{\circ}$ C 40 s, 最后72 $^{\circ}$ C 延伸6 min。采用Gel-Pro Analyzer 4.0软件(美国Media Cybernetics公司)根据电泳条带的面积和亮度计算出每个条带的积分光密度。以待测细胞因子的光密度对同一标本GAPDH(内对照)光密度的比值表示该细胞因子mRNA

的表达水平。

1.4.3 EMSA实验方法

1.4.3.1 小鼠肠上皮细胞的分离 取小鼠整段结肠，挤出肠内容物，翻转使肠内膜向外，用冷D-hanks液充分冲洗3次，置含1.0 mmol/L EDTA、DTT D-Hanks液中，37℃下摇床摇1~2 h，离心，沉淀即为肠上皮细胞。

1.4.3.2 核蛋白提取及定量 采用以下试剂，溶液A：10 mmol/L HEPES(pH7.9)、10 mmol/L KCL、1.0 mmol/L DTT、0.1 mmol/L EDTA、0.1 mmol/L EGTA。溶液B：20 mmol/L HEPES(pH7.9)、0.4 mmol/L KCL、1.0 mmol/L DTT、0.1 mmol/L EDTA、0.1 mmol/L EGTA。溶液C：10 μmol/L PMSF、5 mg/L Pepstain、5 mg/L Leupetin、5 mg/L Aprotinin。向收集的细胞中加入400 μl溶液A置冰上15 min，加入25 μl 10% NP-40，置振荡器上强烈震荡30 s，1 200 r/min 低温离心20 min，弃上清，用100 μl溶液B重悬沉淀，4℃震荡45 min，1 200 r/min低温离心5 min，收集上清即为核蛋白提取物，-70℃保存。G-250法，波长595 nm，测定蛋白浓度。

1.4.3.3 探针的标记和纯化 参照文献[1]设计NF-κB寡核苷酸探针序列，此序列选自TNF-α基因的促进子区域，为5' AGCTTGATGAGTCAGCCG 3'，3' ACTACTCAGTCGGCCTAG 5'。探针经过聚合、稀释至终浓度10 pmol/L。加入探针1 μl，再加10×Klenow片断缓冲液2 μl、[α-32P]dATP(10 nCi/μl)4 μl、三蒸水9 μl、无A dNTP(2.5 mmol/L)3 μl，最后加稀释的Klenow片断1 μl，总反应体积20 μl，37℃水浴30 min，进行3'末端标记反应。纯化后测定比放射活性，调整探针的比放射活性在80 000~100 000之间。其余的样品-20℃保存。

1.2.3.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳 所有样本核蛋白定量为5 μg，在20 μl的总反应体系中根据蛋白浓度调整蛋白体积，使蛋白与三蒸水的总体积为10 μl，再加入0.2 mol/L Tris.Cl、1mol/L NaCl、10 mmol/L EDTA、20 mmol/L MgCl、10 mmol/L DTT、2 μg/μl poly dI/dC各1 μl，25% 甘油3 μl，置冰上20 min后，加入标记探针1 μl。为保证显影条带的特异性，同一块胶上设冷探针(cold probe)预阻断组，即与32P标记探针结合前，加入未标记探针即冷探针预孵育，封闭结合蛋白。配制8%的聚丙烯酰胺凝胶、灌胶，待胶凝固后上样，置于1%的TBE缓冲液中，恒电压150 v电泳2 h。

1.4.3.5 干胶和放射自显影 干胶仪干胶40 min，置入暗盒中，覆盖2张胶片，-70℃低温冰箱过夜，冲洗胶片。

1.5 统计方法

用Wicoxon 秩和检验比较DSS组与对照组的TNF-α、IL-β的表达。

2 结果

2.1 症状

DSS组在饮用DSS后2 d即出现腹泻，第3天有部分出现肉眼血便，至第7天全部出现肉眼血便。组织学检查也可见到肠粘膜广泛缺失，腺体大多数不完整，炎症细胞广泛浸润等典型炎症改变。而对照组则无改变。

2.2 TNF-α、IL1-β、的表达变化

TNF-α、IL-β表达的RT-PCR凝胶电泳检测结果见图1、2，图3为TNF-α、IL-β表达的半定量图，可以看出，DSS组TNF-α、IL-β的表达较对照组显著增加。采用Gel-Pro Analyzer 4.0软件(美国Media Cybernetics公司)，根据电泳条带的面积和亮度计算出每个条带的积分光密度。以待测细胞因子的光密度对同一标本GAPDH(内对照)光密度的比值表示该细胞因子mRNA的表达水平。

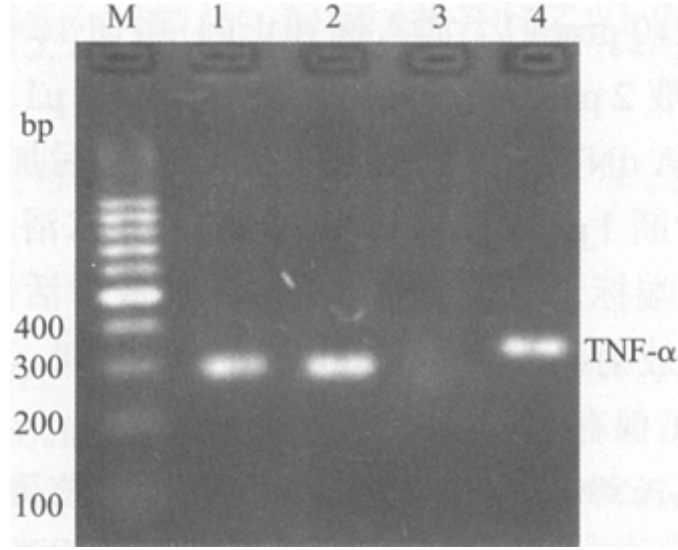


图1 溃疡性结肠炎小鼠肠粘膜中TNF- α 的表达

Fig.1 Expression of TNF- α in the intestinal mucosa of mice with ulcerative colitis
M: Marker; Lanes 1, 2: GAPDH; Lane 3: Control group; Lane 4: Dextran sulfate sodium group

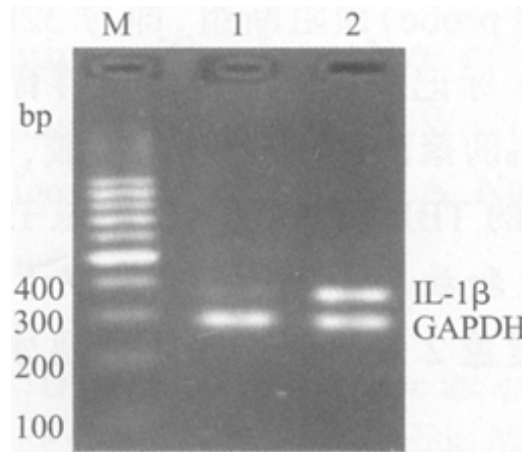


图2 溃疡性结肠炎小鼠肠粘膜中IL-1 β 的表达

Fig.2 Expression of IL-1 β in the intestinal mucosa of mice with ulcerative colitis
M: Marker; Lane 1: Control group; Lane 2: Dextran sulfate sodium group

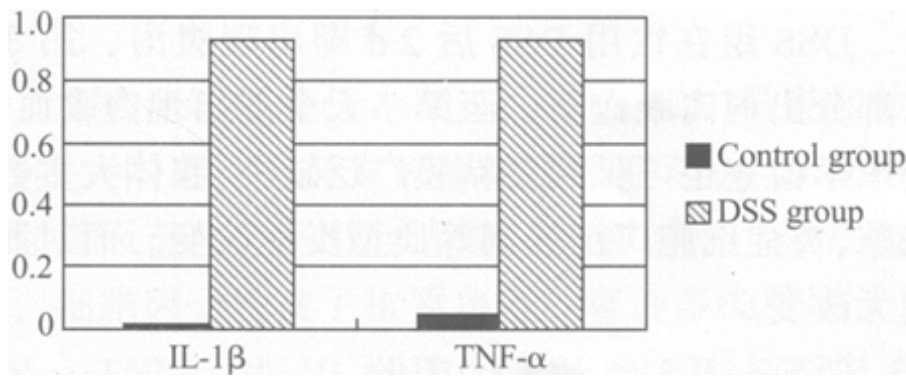


图3 对照组和DSS组小鼠肠粘膜中TNF- α 、IL-1 β 的表达 (P=0.009)

Fig.3 Expression of TNF- α and IL-1 β in the intestinal mucosa of mice in the control and dextran sulfate sodium group (P=0.009)

2.3 NF- κ B的激活

DSS组NF- κ B出现明显激活，而对照组则无NF- κ B的表达(图4)。

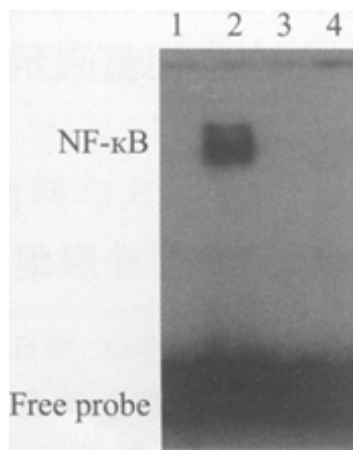


图4 溃疡性结肠炎小鼠肠粘膜中NF-κB 的激活

Fig.4 Activation of NF-κB in the intestinal mucosa of mice with ulcerative colitis
Lane 1: Control group; Lane 2: Dextran sulfate sodium group; Lanes 3, 4: Cryo-probe control

3 讨论

越来越多的证据显示，UC的发生是由多因素共同作用的结果。免疫因素是重要的因素之一。细胞因子在调节肠道免疫中扮演重要角色，有诱导炎症(如TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8、IL-12等)和抗炎(如IL-10、IL-4、IL-11等)作用[2][3][4][5][6]。IL-1β是激活免疫和炎症细胞的重要介质，关于其在IBD (inflammatory bowel disease) 患者的表达存在相反意见，有的学者认为增加，有的则认为无表达[7]。但本研究显示在小鼠UC肠粘膜内TNF-α的表达明显增加。

TNF-α、IL-1β是由Th1细胞分泌的，现已证实，Th1细胞因子的表达由核因子-κB(NF-κB)调控[8][9][10][11]。NF-κB是一种快反应转录因子，正常情况下普遍存在于细胞质内，与抑制蛋白IκB结合而无活性。当细胞接受多种刺激信号，如IBD时T细胞和巨噬细胞释放的TNF、IL-1等后，IκB被磷酸化自复合体脱落，和蛋白移位至细胞核内与靶序列结合而激活受调节的基因。已知NF-κB在正常肠上皮细胞内无激活，而在IBD的肠上皮细胞内明显激活[12]。

本研究发现，在UC小鼠的肠粘膜内，TNF-α、IL-1β的表达都较对照组显著增加，同时NF-κB也明显激活，这说明NF-κB在UC的发生、发展过程中均有调控Th1细胞因子表达的作用，而细胞因子的增加，则可以引起UC的症状产生、组织损害和其它病理变化。DSS鼠UC以溃疡、上皮损害、粘膜和粘膜下炎性浸润、淋巴细胞增生为特点[13]。如果应用DSS的同时用NF-κB反义寡核苷酸给小鼠灌肠，则小鼠疾病活动指数、症状、组织损害均减轻，IL-1、IL-6、TNF-α的表达也同时降低[14]，这就从反方向证实NF-κB可调控细胞因子表达，而细胞因子表达的减少可以减轻炎症反应。

在本研究中，TNF-α、IL-1β的表达明显增加，它们在UC中起重要的诱发和延续炎症的作用。许多证据显示，TNF-α、IL-1β等炎症因子可激活NF-κB，而激活的NF-κB又可以调控炎症因子的表达。我们的研究发现，在UC过程中NF-κB和TNF-α、IL-1β的表达均明显增加，但两者表达的因果关系无法确定，考虑可能有其它的激活途径或者先诱发细胞因子的表达再激活NF-κB，或者直接激活NF-κB再调控细胞因子的表达。这些激活途径可能包括：炎症细胞的浸润、肠道菌群的变化、直接的细胞毒作用等，因为在DSS小鼠UC中，肠道炎症被认为有以下方面的原因引起：(1)直接的细胞毒作用；(2)肠淋巴细胞、上皮细胞、细胞外基质的正常相互作用；(3)干扰素β受体和其它细胞受体或功能异常表达；(4)肠道菌群改变[15]。综上所述，有必要进一步明确TNF-α、IL-1β等炎症因子与NF-κB间的关系，从而从分子水平对UC的发生、发展进行阐述。

参考文献：

- [1] Vincenti MP, Burrell TA, Taffet SM. Regulation of NF-kappa B activity in murine macrophages: effect of bacterial lipopolysaccharide and phorbol ester[J]. *J Cell Physiol*, 1992, 150(1): 204-13.
- [2] Stevceva L, Pavli P, Husband A, et al. Dextran sulphate sodium-induced colitis is ameliorated in interleukin 4 deficient mice[J]. *Genes Immun*, 2001, 2(6): 309-16.
- [3] Lakatos L. Immunology of inflammatory bowel diseases[J]. *Acta physiol Hung*, 2000, 87(4): 355-72.
- [4] Olsen I, Wiker HG, Johnson E, et al. Elevated antibody responses in patients with Crohn's disease against a 14-kDa secreted protein purified from *Mycobacterium avium* subsp [J]. *Scand J Immunol*, 2001, 53(2): 198-203.
- [5] Brandtzaeg P. Inflammatory bowel disease;clinics and pathology. Do inflammatory bowel disease and perildontal disease have similar immunopathogeneses[J]? *Acta Odontol Scand*, 2001, 59(4): 235-43.
- [6] Rogler G, Andus T. Cytokines in Inflammatory Bowel Disease[J]. *World J Surg*, 1998, 22(4): 382-9.
- [8] Rogler G, Gelbmann CM, Vogl D, et al. Differential activation of cytokine secretion in primary human colonic fibroblast/myofibroblast cultures[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2001, 36(4): 389-98.
- [9] Kanauchi O, Andoh A, Iwanaga T, et al. Germinted barley foodstuffs attenuate colonic mucosal damage and mucosal nuclear factor kappa B activity in a spontaneous colitis model[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1999, 14(12): 1173-9.
- [10] Neurath MF, Fuss I, Schurmann G, et al. Cytokine gene transcription by NF-kappa Bfamily members in patients with inflammatory bowel disease[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 17(3): 859149-59.
- [11] Haddad JJ, Land SC. Amiloride blockades lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine biosynthesis in an IkappaB-Alpha/ NF-kappaB-dependent mechanism. Evidence for the amplification of an anti-inflammatory pathway in the alveolar epithelium [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 26(1): 114-26.
- [12] Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor κ B infammatory bowel disease[J]. *Gut* 1998, 42(4): 477-84.
- [13] Herfarth H, Brand K, Rath HC, et al. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor κ B (p65)antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2000 Apr, 120(1): 59-65.
- [14] Nikolaus S, Bauditz J, Gionchetti P, et al. Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation[J]. *Gut* 1998, 42(4): 470-6.
- [15] Ni J, Chen SF, Hollander D. Effects of dextran sulfate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes[J]. *Gut*, 1996 Aug, 39(2): 234-41.

参考文献:

- [1] Vincenti MP, Burrell TA, Taffet SM. Regulation of NF-kappa B activity in murine macrophages: effect of bacterial lipopolysaccharide and phorbol ester[J]. *J Cell Physiol*, 1992, 150(1): 204-13.
- [2] Stevceva L, Pavli P, Husband A, et al. Dextran sulphate sodium-induced colitis is

ameliorated in interleukin 4 deficient mice[J]. *Genes Immun*, 2001, 2(6): 309-16.

[3] Lakatos L. Immunology of inflammatory bowel diseases[J]. *Acta physiol Hung*, 2000, 87(4): 355-72.

[4] Olsen I, Wiker HG, Johnson E, et al. Elevated antibody responses in patients with Crohn's disease against a 14-kDa secreted protein purified from *Mycobacterium avium* subsp [J]. *Scand J Immunol*, 2001, 53(2): 198-203.

[5] Brandtzaeg P. Inflammatory bowel disease;clinics and pathology. Do inflammatory bowel disease and perildontal disease have similar immunopathogeneses[J]? *Acta Odontol Scand*, 2001, 59(4): 235-43.

[6] Rogler G, Andus T. Cytokines in Inflammatory Bowel Disease[J]. *World J Surg*, 1998, 22(4): 382-9.

[8] Rogler G, Gelbmann CM, Vogl D, et al. Differential activation of cytokine secretion in primary human colonic fibroblast/myofibroblast cultures[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2001, 36(4): 389-98.

[9] Kanauchi O, Andoh A, Iwanaga T, et al. Germinted barley foodstuffs attenuate colonic mucosal damage and mucosal nuclear factor kappa B activity in a spontaneous colitis model[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 1999, 14(12): 1173-9.

[10] Neurath MF, Fuss I, Schurmann G, et al. Cytokine gene transcription by NF-kappa Bfamily members in patients with inflammatory bowel disease[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 17(3): 859149-59.

[11] Haddad JJ, Land SC. Amiloride blockades lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine biosynthesis in an IkappaB-Alpha/ NF-kappaB-dependent mechanism. Evidence for the amplification of an anti-inflammatory pathway in the alveolar epithelium [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2002, 26(1): 114-26.

[12] Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor κ B infammatory bowel disease[J]. *Gut* 1998, 42(4): 477-84.

[13] Herfarth H, Brand K, Rath HC, et al. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor κ B (p65)antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2000 Apr, 120(1): 59-65.

[14] Nikolaus S, Bauditz J, Gionchetti P, et al. Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by circulating polymorphonuclear and regulation by interleukin 10 during intestinal inflammation[J]. *Gut* 1998, 42(4): 470-6.

[15] Ni J, Chen SF, Hollander D. Effects of dextran sulfate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes[J]. *Gut*, 1996 Aug, 39(2): 234-41.