



严重腹腔感染时肠黏膜 β -catenin的表达及意义

严重腹腔感染可引起肠黏膜损伤, 肠通透性增加, 肠道细菌和内毒素移位, 导致全身性炎症反应[1]。近年来研究发现, β -连环蛋白(β -catenin, β -cat)是一种信号传导的多功能蛋白质, 在细胞间黏附和Wnt信号传导中起重要作用, 并与肠上皮干细胞的增殖分化密切相关[2]。本研究拟通过观察Wistar大鼠严重腹腔感染时肠上皮细胞 β -cat表达的变化, 探讨肠黏膜 β -cat与肠上皮干细胞增殖分化的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

兔抗大鼠 β -cat单克隆抗体(BA0426)、DBA显色试剂盒(AR1022)、辣根酶标记链霉卵白素、山羊血清均购自博士德生物工程有限公司; 免疫组化玻片购于威佳科技有限公司; β -cat引物序列由北京赛百盛公司合成; Taq DNA聚合酶购于宝生物工程有限公司; TRIZOL总RNA提取试剂盒购于Gibco公司; 逆转录试剂盒购于Invitrogen公司; 其余试剂均为国产分析纯。实验用大鼠均购置于南方医科大学实验动物中心。

1.2 模型制备与分组

健康成年Wistar大鼠40只, 体质量(220 ± 20)g。随机分为空白对照组(仅行单纯剖腹手术)、感染后12、24、48h 4组, 每组10只。采用盲肠结扎加穿孔法(CLP)制作严重腹腔感染模型[3], 分别于CLP术后12、24、48h处死, 取距回盲部10cm处回肠组织4cm作检测: 2cm加入10%中性甲醛溶液中固定2h, 用于免疫组织化学检查和HE染色。另2cm投入液氮罐, -70°C 保存, 待行RT-PCR检查。

1.3 免疫组化染色

切片常规脱蜡入水后, 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)冲洗3次, 每次5min(下同)。每张切片加 $50\mu\text{l}$ 过氧化物阻断溶液, 室温孵育10min, PBS冲洗3次, 微波抗原修复30min, 加封闭用正常山羊血清工作液, 室温孵育10min, 加 $50\mu\text{l}$ 兔抗大鼠 β -cat单克隆抗体(一抗), 37°C 孵育60min, PBS冲洗3次。加 $50\mu\text{l}$ 生物素化二抗工作液, 室温孵育10min, PBS冲洗3次。加 $50\mu\text{l}$ 辣根酶标记链霉卵白素工作液, 室温孵育10min, PBS冲洗3次。加 $100\mu\text{l}$ 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)溶液显色10min, 苏木素复染, 中性树脂胶封片, Olympus显微镜观察。结果判断, 细胞浆着色判定为阳性细胞, 在 10×40 视野下, 按确定的方向(从左至右或逆时针方向)依次计数10个结构显示良好的隐窝(切面在隐窝中心, 可见清晰、完整的隐窝腔)中 β -cat染色阳性细胞数, 总数即为每10个隐窝 β -cat染色的细胞数, 每组大鼠可得10个数值。

1.4 RT-PCR反应

1.4.1 总RNA抽提 称取 -70°C 冰冻保存的标本80mg, 于液氮中夹碎, 将组织碎块加入1ml Trizol变性缓冲液中, 在匀浆器中充分研磨至无明显大的组织块为止, 并按操作说明书提取组织中的总RNA, -70°C 保存备用。

1.4.2 基因片段扩增 利用Primer5.0软件设计 β -cat引物, 上游引物为5'-AGTGCGCACCATGCAGAATA-3', 下游引物为5'-CCACCACTGGCCAGAATGAT-3', 长度365bp。以 β -actin为对照, 上游引物为5'-

CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'，下游引物为5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3'，长度597bp。采用两步法进行RT-PCR，并按说明书进行操作。反应条件为94℃预处理3min，随后以94℃裂解45s、58℃退火45s、72℃延伸45s进行35个循环，72℃延伸5min后，电泳PCR产物，观察结果。

1.4.3 PCR产物定量分析β-cat和β-actin产物各10μl混合后于1.2%琼脂糖凝胶电泳60min(电压5V/cm)，凝胶成像系统中分析各条带的灰度值，求β-cat和β-actin之比值，应用统计学检验方法对各组数据分析。

1.4.4 测序 用PCR产物纯化试剂盒纯化PCR产物，交由上海博亚生物技术公司进行测序。

1.5 统计学方法

采用SPSS11.5软件进行统计学处理，多组的β-cat染色阳性细胞数及β-cat和β-actin灰度值的比值采用单因素方差分析，方差齐性时，采用组间多重比较应用LSD法；方差不齐性时，采用Dunnett's法；检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 肠黏膜病理学改变

对照组光镜下小肠黏膜各层结构完整，肠绒毛排列整齐；实验组光镜下小肠黏膜和黏膜下层间质水肿、血管充血，黏膜层有中性粒细胞浸润，肠绒毛毛细血管充血，部分区域有黏膜上皮脱落，浆膜层明显炎性渗出。

2.2 免疫组化染色

比较手术前后大鼠小肠隐窝中β-cat的表达，术前β-cat表达较弱，而CLP术后12h肠隐窝中阳性细胞明显增多，24h后表达最强，随着时间的延长，β-cat表达逐渐降低，到48h小肠隐窝仍有表达。F=35.918，P<0.001，认为各处理组总体均数的具有显著性差异(表1、图1-3)。

表 1 CLP 手术前后不同时期 β-cat 染色阳性细胞数的比较
Tab.1 Comparison of β-catenin-positive cell quantity in different periods perioperatively (n=10, Mean±SD)

Group	Positive cells	F	P
Control	134.80±10.56	35.918	<0.000
12 h	145.70±8.31*		
24 h	178.20±10.51†		
48 h	146.60±9.92*		

*P<0.05, †P<0.01 vs control group

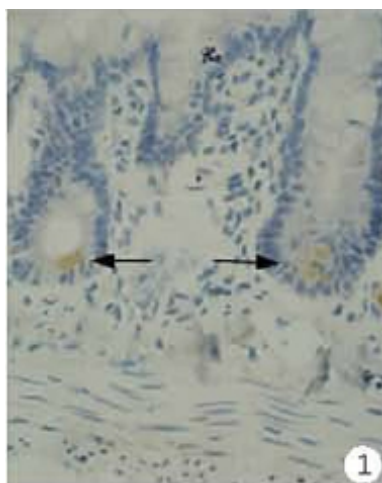


图1 正常小肠隐窝中β-cat表达较弱

Fig. 1 Weak β -catenin expression in normal intestinal crypts (arrow, SP staining, original magnification: $\times 400$)

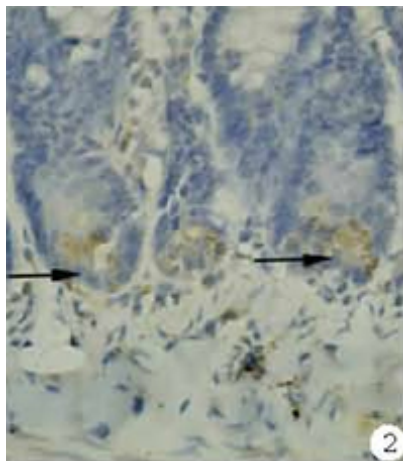


图2 感染后24h小肠隐窝中强表达 β -cat

Fig. 2 Strong β -catenin expression in the intestinal crypts (arrow) 24h after infection (SP staining, original magnification: $\times 400$)

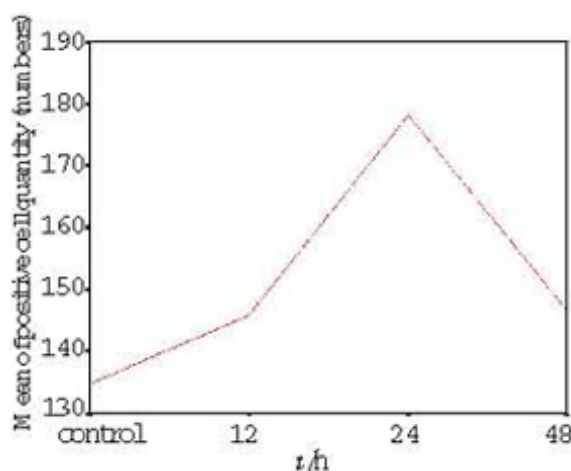


图3 CLP手术前后不同时期 β -cat染色阳性细胞数

Fig. 3 Changes in the quantity of β -catenin-positive cells perioperatively

2.3 RT-PCR

应用RT-PCR方法扩增CLP术后不同时期的 β -cat基因, 结果显示, CLP术后12h mRNA水平迅速上升, 在术后24h达到峰值, 随后表达量逐渐下降, 48h仍显著高于对照组。以 β -cat和 β -actin灰度值的比值为基础进行统计学分析, 可见CLP术后12h、24h和48h β -cat mRNA表达水平显著高于对照 (P 均 < 0.01)。 $F=36.831$, $P<0.001$, 认为各处理组总体均数的具有显著性差异 (表2、图4)。

表 2 CLP 手术前后不同时期 β -cat 和 β -actin 灰度值的比较

Tab.2 Comparison of the gray scale value of β -catenin and β -actin in different periods perioperatively ($n=10, Mean \pm SD$)

Group	n	Comparison of gray scale value	F	P
Control	10	0.52±0.06	36.831	<0.000
12 h	10	0.74±0.10*		
24 h	10	0.90±0.09*		
48 h	10	0.80±0.09*		

* $P < 0.01$ vs control group

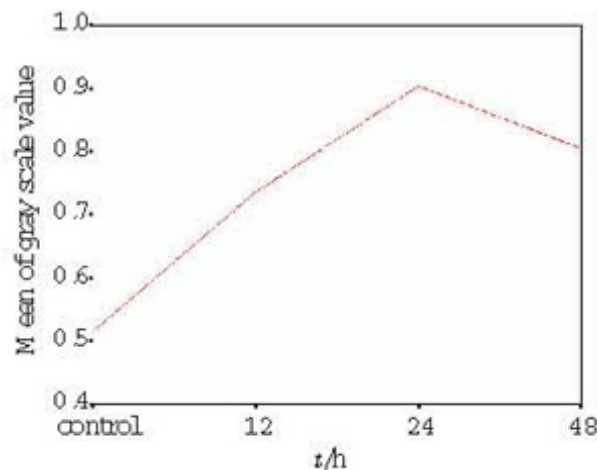


图4 CLP手术前后不同时期 β -cat和 β -actin灰度值

Fig.4 Gray scale value of β -catenin and β -actin in different periods perioperatively

2.4 测序结果

测序显示，PCR扩增的产物与大鼠GenBank中的序列完全一致。说明RT-PCR扩增的确为相应引物。

3 讨论

本实验结果与以往研究相似，腹腔感染后动物肠黏膜出现明显病理改变，提示严重腹腔感染可引起肠黏膜屏障损伤。肠道干细胞是位于小肠黏膜隐窝底部，潘氏细胞上方，具有终身自我更新和增殖分化功能的细胞，在肠黏膜损伤修复中起重要作用[4]。

β -cat是由Ozawa等人在脊椎动物的细胞中发现一种信号传导多功能蛋白质，其与肠干细胞的增殖分化有着密切的联系。 β -cat可通过以下途径来调节肠上皮干细胞的增殖分化：(1) β -cat可在Wnt途径失活时，通过磷酸化和泛素化而降解，从而维持胞浆内低水平；Wnt途径激活时，磷酸化和泛素化被抑制， β -cat在胞浆内积聚，随后进入核内与Tcf-4结合成转录复合体，并促进与肠干细胞增殖有关的基因表达[5][6][7]。(2) β -cat还可通过酪氨酸残基的磷酸化与去磷酸化实现其活性和量的调节，并且在调控肠干细胞增殖及其子代细胞的分化、迁移过程中起着重要的作用[8]。

国内外对 β -cat的研究较为广泛，在Moon等人[9]的研究中发现，Wnt/ β -cat途径在细胞的增殖分化中有着重要的作用。 β -cat是Wnt信号级联反应的主要成分，在Wnt信号途径中起着核心作用， β -cat在细胞内的增多或减少直接决定其本身的生物学功能[10]。因此 β -cat可在一定程度上反映肠上皮干细胞增殖状态，检测 β -cat表达变化即可反映肠黏膜上皮损伤修复状况。本实验结果显示，严重腹腔感染Wistar大鼠肠黏膜上皮损伤

后 β -cat表达增高,而且损伤初期 β -cat水平上升迅速,表明严重腹腔感染时可能迅速启动了以上两种途径,导致肠上皮干细胞的增殖分化活性增强,从而促进肠黏膜损伤修复。但随着腹腔感染的进一步加重,其 β -cat表达下降,说明肠上皮干细胞受损,其数量减少,增殖能力逐渐下降,提示 β -cat表达与严重腹腔感染时肠黏膜的损伤修复密切相关,但 β -cat调节肠上皮干细胞的增殖分化机制尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1]黎君友,孙丹,吕艺,等.脓毒症大鼠小肠功能变化的研究[J].中国危重病急救医学,2004,16:352-4.
- [2]Ernesto R. beta-catenin-one player, two games[J]. Nat Genet, 1997, 16:9-11.
- [3]Wichteerman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock: A review of laboratory models and a proposal [J]. J Surg Res, 1980, 29:189-201.
- [4]Leedham SJ, Brittan M, McDonald SA, et al. Intestinal stem cells[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(1):11-24.
- [5]Pinto D, Clevers H. Wnt, stem cells and cancer in the intestine[J]. Biol Cell, 2005, 97(3):185-96.
- [6]Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, et al. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine[J]. Gastroenterology, 2005, 129(2):626-38.
- [7]Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control [J]. Nat Rev Genet, 2006, 7(5):349-59.
- [8]Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, et al. Essential role of BCL9-2 in the switch between β -catenin's adhesive and transcriptional functions [J]. Genes Dev, 2004, 18:2225-30.
- [9]Moon RT, Bowerman B, Boutros M, et al. The promise and perils of Wnt signaling through β -catenin [J]. Science, 2002, 296:1644-6.
- [10]Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and