

# 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 $\kappa$ B 的激活

王群英 袁陈村 袁王继德 袁马强 袁赖卓胜 袁张亚历 渊第一军医大学南方医院全军消化内科研究所 袁广东 广州 510515 冤

目的院建立小鼠溃疡性结肠炎动物模型并检测其肠粘膜中致炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ 的表达和 NF- $\kappa$ B 的激活遥方法用 5% 葡聚糖硫酸钠渊DSS冤口饲法制备小鼠 UC 模型院采用逆转录 - 聚合酶链反应渊RT-PCR冤技术袁对 UC 小鼠肠粘膜中 TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ 的表达水平进行半定量测定院应用免疫电泳迁移率改变分析渊EMSA冤检测急性期和慢性期 UC 小鼠肠粘膜细胞 NF- $\kappa$ B 的激活遥结果 模型组肠粘膜中 TNF- $\alpha$ 和 IL-1 $\beta$ 的表达较正常对照组显著增加渊 $P=0.009$ 冤袁NF- $\kappa$ B 的核内结合活性也显著增强遥结论 UC 的发生发展过程伴随致炎细胞因子表达的升高袁可以加剧炎症袁致上皮细胞凋亡遥该过程可能受 NF- $\kappa$ B 激活的调控遥

关键词 溃疡性结肠炎 细胞因子 反NF- $\kappa$ B 逆转录 - 聚合酶链反应

中图分类号 渊574.62 文献标识码 院 文章编号 院000-2588渊003冤1-1202-04

## Expression of pro-inflammation cytokines and activation of nuclear factor $\kappa$ B in the intestinal mucosa of mice with ulcerative colitis

WANG Qun-ying, CHEN Cun-long, WANG Ji-de, LAI Zhuo-sheng, MA Qiang, ZHANG Ya-li

Institute for Digestive Diseases of PLA, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 50515, China

Abstract: Objective To investigate the expression of pro-inflammation cytokines and activation of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in mouse models of ulcerative colitis. Methods Mouse models of ulcerative colitis were established by oral administration of 5% dextran sulfate sodium for 7 d, and the expression of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interleukin (IL)-1 $\beta$  in the intestinal mucosa were detected by semi-quantitative reverse transcriptional (RT) PCR. The activation of NF- $\kappa$ B in the intestinal mucosa was evaluated by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Results The expressions of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were increased in the intestinal mucosa ( $P=0.009$ ), and the nuclear binding activity of NF- $\kappa$ B was also up-regulated after the onset of colitis. Conclusion Pro-inflammatory cytokines play important roles in the pathogenesis of UC, and may exacerbate the inflammation of the intestinal mucosa and cause apoptosis of the epithelial cells, possibly under the regulation of NF- $\kappa$ B activation.

Key words: ulcerative colitis; cytokine; NF- $\kappa$ B; RT-PCR

溃疡性结肠炎渊ulcerative colitis, UC冤是炎症性肠病的一种袁近年来其发病率呈上升趋势袁但其发病机制和病因至今仍不十分清楚遥在 UC 发生发展过程中袁细胞因子扮演了重要角色遥有许多细胞因子袁如 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-12 等袁能够诱导或激活 T 细胞或 B 细胞袁并能诱导多种致炎因子的产生袁使炎症局部的中性粒细胞或巨噬细胞聚集袁损坏肠粘膜遥现已证实袁UC 中细胞因子的表达是由核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)调控的遥已知 NF- $\kappa$ B 在正常肠上皮细胞内无激活袁而在 UC 的肠上皮细胞内表达升高遥

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遥

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物及分组

收稿日期 院003-04-07

作者简介 院王群英渊973-冤袁女袁山东青岛人袁996 年毕业于潍坊医学院袁硕士袁电话 院20-61641544

20 只 8~9 w 龄 BALB/c 小鼠袁雌雄各半袁体重 16~18 g袁随机均分为正常对照组和葡聚糖硫酸钠渊DSS冤组遥

#### 1.2 主要试剂

Taq 酶 渊鼎国公司冤袁polydI/dC 渊Sigma冤袁klenow 片断渊romega冤袁NF- $\kappa$ B 寡核苷酸渊上海生工生物工程公司合成冤'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3''B'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5''袁[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP渊北京亚辉生物医学工程公司冤遥其余均为国产分析纯试剂遥

#### 1.3 主要仪器

PERKIN ELMER DNA Thermal Cycler 480 PCR 扩增仪(美国)尧Bio-Rad 垂直电泳仪尧Bio-Rad MODEL 583 GEL DRYER 干胶仪尧urix HT-330U 渊GFA 产品冤胶片自动冲洗仪遥

#### 1.4 方法

1.4.1 动物处理 对照组院一直自由饮用蒸馏水遥葡聚糖硫酸钠渊DSS冤组院小鼠自由饮用 5% DSS 溶液袁连

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  
提取总 RNA 采用异硫氰酸胍二步法以 GAPDH 为内参照用 APDH 为引物由软件设计合成引物序列如下 GAPDH (294 bp) 正义链为 5'-CTGGTCTGAGTATGTCGTG-3' 反义链为 5'-CAG TCTTCTGAGTGGCAGTG-3' TNF- $\alpha$  (334 bp) 正义链为 5'-AACTAGTGGTGCCAGCCGAT-3' 反义链为 5'-CTTACAGAGCAATGACTCC-3' IL-1 (377 bp) 正义链为 5'-AGCTTCCTTGTGCAAGTGTC-3' 反义链为 5'-CACACCAGCAGTTATCATC-3' RT-PCR 方法用 0.5 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 3.5 mmol/L KCl, 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 3.5 mmol/L 引物各 2  $\mu$ mol/L dNTP, 2  $\mu$ mol/L Taq 酶, 1  $\mu$ mol/L 模板, 2  $\mu$ mol/L 三蒸水, 34.5  $\mu$ mol/L 反应体系 50  $\mu$ l 在 PERKIN ELMER DNA Thermal Cycler 480 PCR 扩增仪上完成反应条件为 95  $^{\circ}$ C 5 min, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ 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 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 的 D-Hanks 液中 7 益下摇床摇 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 院 10 mmol/L HEPES, 150 mmol/L KCl, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA 溶液 B 院 20 mmol/L HEPES, 150 mmol/L KCl, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA 溶液 C 院 0.5 mol/L PMSF, 5 mg/L Pepstatin, 5 mg/L Leupeptin, 5 mg/L Aprotinin 向收集的细胞中加入 400  $\mu$ l 溶液 A 置冰上 15 min 加入 25  $\mu$ l 10% NP-40 震荡器上强烈震荡 30 s 200 r/min 低温离心 20 min 弃上清用 100  $\mu$ l 溶液 B 重悬沉淀 益震荡 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 益保存 用 G-250 法测定蛋白浓度

1.4.3.3 探针的标记和纯化 参照文献 设计 NF- $\kappa$ B 寡核苷酸探针序列此序列选自 TNF- $\alpha$  基因的促进子区域为 5'-AGCTTGATGAGTCAGCCG-3' 反义链为 5'-ACTACTCAGTCGGCCTAG-5' 探针经过聚合酶稀

释至终浓度 10 pmol/L 加入探针 1  $\mu$ l 再加 10  $\mu$ l Klenow 片断缓冲液 2  $\mu$ l 32P dATP 0.5  $\mu$ mol/L 32P dATP 0.5  $\mu$ mol/L 三蒸水 9  $\mu$ l 无 A dNTP 0.5 mmol/L 最后加稀释的 Klenow 片断 1  $\mu$ l 反应体积 20  $\mu$ l 70 益水浴 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 益保存

1.2.3.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳 所有样本核蛋白定量为 5  $\mu$ g 在 20  $\mu$ l 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  $\mu$ l 再加入 0.2 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L NaCl, 0.1 mol/L EDTA, 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mol/L DTT, 0.5  $\mu$ l poly dI/dC 各 1  $\mu$ l, 5% 甘油 3  $\mu$ l 置冰上 20 min 后加入标记探针 1  $\mu$ l 为保证显影条带的特异性同一块胶上设冷探针 old probe 阻断组与 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 益低温冰箱过夜中洗胶片

#### 1.5 统计方法

用 Wilcoxon 秩和检验比较 DSS 组与对照组的 TNF- $\alpha$  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对照组则无改变

### 2.2 TNF- $\alpha$ 的表达变化

TNF- $\alpha$  表达的 RT-PCR 凝胶电泳检测结果见图 1 表 3 为 TNF- $\alpha$  表达的半定量图可以看出 DSS 组 TNF- $\alpha$  的表达较对照组显著增加采用 Gel-Pro Analyzer 4.0 软件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 对照光密度的比值表示该细胞因子 mRNA 的表达水平

### 2.3 NF- $\kappa$ B 的激活

DSS 组 NF- $\kappa$ B 出现明显激活而对对照组则无 NF- $\kappa$ B 的表达

## 3 讨论

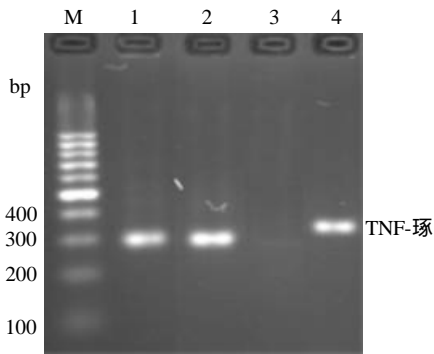


图 1 溃疡性结肠炎小鼠肠粘膜中TNF- $\alpha$ 的表达  
Fig.1 Expression of TNF- $\alpha$  in the intestinal mucosa of mice with ulcerative colitis  
M: Marker; Lanes 1, 2: GAPDH; Lane 3: Control group; Lane 4: Dextran sulfate sodium group

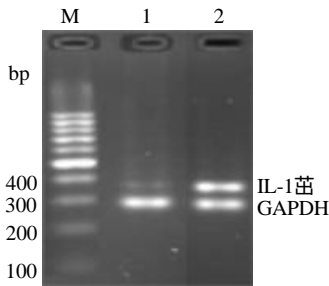


图 2 溃疡性结肠炎小鼠肠粘膜中IL-1 $\beta$ 的表达  
Fig.2 Expression of IL-1 $\beta$  in the intestinal mucosa of mice with ulcerative colitis  
M: Marker; Lane 1: Control group; Lane 2: Dextran sulfate sodium group

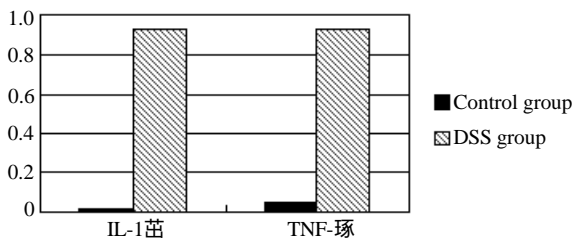


图 3 对照组和 DSS 组小鼠肠粘膜中TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的表达  
 $P=0.009$   
Fig.3 Expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the intestinal mucosa of mice in the control and dextran sulfate sodium group  $P=0.009$

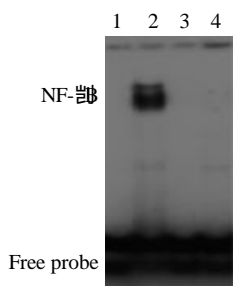


图 4 溃疡性结肠炎小鼠肠粘膜中NF- $\kappa$ B的激活  
Fig.4 Activation of NF- $\kappa$ B in the intestinal mucosa of mice with ulcerative colitis  
Lane 1: Control group; Lane 2: Dextran sulfate sodium group; Lanes 3, 4: Cryo-probe control

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。有诱导炎症细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-12 等。抗炎细胞 IL-10、IL-4、IL-11 等。作用。IL-1 $\beta$  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。但本研究显示在小鼠 UC 肠粘膜内 TNF- $\alpha$  的表达明显增加。

TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  是由 Th1 细胞分泌的。表现已证实。Th1 细胞因子的表达由核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 调控。NF- $\kappa$ B 是一种快反应转录因子。在正常情况下普遍存在于细胞质内。与抑制蛋白 I $\kappa$ B 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- $\alpha$ 、IL-1 等。后。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- $\kappa$ B 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。

本研究发现。在 UC 小鼠的肠粘膜内。NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$  的表达都较对照组显著增加。同时 NF- $\kappa$ B 也明显激活。这说明 NF- $\kappa$ B 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。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、粘膜和粘膜下炎症浸润、淋巴细胞增生为特点。如果应用 DSS 的同时用 NF- $\kappa$ B 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 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的表达也同时降低。这就从反方向证实 NF- $\kappa$ B 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。NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$  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。NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$  等炎症因子可激活 NF- $\kappa$ B。而激活的 NF- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  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- $\kappa$ B。或者直接激活 NF- $\kappa$ B。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、肠道菌群的改变、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。细菌直接的细胞毒作用。细菌毒素。淋巴细胞。上皮细胞。细胞外基质的正常相互作用。细菌干扰素受体和其它细胞受体或功能异常。表达。肠道菌群改变。综上所述。有必要进一步明确 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子与 NF- $\kappa$ B 间的关系。从而从分子水平对 UC 的

## 发生发展进行阐述遥

## 参考文献院

- 咱暂 Vincenti MP, Burrell TA, Taffet SM. Regulation of NF-kappa B activity in murine macrophages: effect of bacterial lipopolysaccharide and phorbol ester咱暂 J Cell Physiol, 1992, 150(1): 204-13.
- 咱暂 Stevceva L, Pavli P, Husband A, et al. Dextran sulphate sodium-induced colitis is ameliorated in interleukin 4 deficient mice 咱暂 Genes Immun, 2001, 2(6): 309-16.
- 咱暂 Lakatos L. Immunology of inflammatory bowel diseases咱暂 Acta physiol Hung, 2000, 87(4): 355-72.
- 咱暂 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咱暂 Scand J Immunol, 2001, 53(2): 198-203.
- 咱暂 Brandtzaeg P. Inflammatory bowel disease;clinics and pathology. Do inflammatory bowel disease and peridental disease have similar immunopathogenesis咱暂 Acta Odontol Scand, 2001, 59(4): 235-43.
- 咱暂 Rogler G, Andus T. Cytokines in Inflammatory Bowel Disease咱暂 World J Surg, 1998, 22(4): 382-9.
- 咱暂 Rogler G, Gelbmann CM, Vogl D, et al. Differential activation of cytokine secretion in primary human colonic fibroblast/myofibroblast cultures咱暂 Scand J Gastroenterol, 2001, 36(4): 389-98.
- 咱暂 Kanauchi O, Andoh A, Iwanaga T, et al. Germinted barley food-stuffs attenuate colonic mucosal damage and mucosal nuclear factor kappa B activity in a spontaneous colitis model咱暂 J Gastroenterol Hepatol, 1999, 14(12): 1173-9.
- 咱0暂 Neurath MF, Fuss I, Schurmann G, et al. Cytokine gene transcription by NF-kappa Bfamily members in patients with inflammatory bowel disease咱暂 Ann N Y Acad Sci, 1998, 17(3): 859149-59.
- 咱1暂 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咱暂 Am J Respir Cell Mol Biol, 2002, 26(1): 114-26.
- 咱2暂 Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor? B in inflammatory bowel disease咱暂 Gut 1998, 42(4): 477-84.
- 咱3暂 Herfarth H, Brand K, Rath HC, et al. Therapeutic effect of intracolonicly administered nuclear factor ̢ (p65)antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis咱暂 Clin Exp Immunol, 2000 Apr, 120(1): 59-65.
- 咱4暂 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咱暂 Gut 1998, 42(4): 470-6.
- 咱5暂 Ni J, Chen SF, Hollander D. Effects of dextran sulfate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes咱暂 Gut, 1996 Aug, 39(2): 234-41.

## 同种带瓣外管道 Rastelli 术式矫治 Taussig-Bing 畸形 4 例报告

Anatomically repairing Taussig-Bing abnormality treated by Rastelli procedure and allograft valved external conduit: report of 4 cases

张 振 袁 武 军 袁 振 康 袁 冯 小 明 袁 蔡 开 灿 渊 第一军医大学南方医院胸心外科 袁 广东 广州 510515 冤

关键词 心脏缺损 先天性心脏外科手术 曰 Taussig-Bing 畸形

中图分类号 院 654.2 文献标识码 院 文章编号 院 000-2588 渊 003 冤 1-1205-02

Taussig-Bing 畸形为右室双出口 (DORV) 的一种少见类型 其主要特点为 DORV 合并大动脉转位 肺动脉骑跨于室间隔上方 肺动脉瓣同二尖瓣间由圆锥间隔分隔而缺乏纤维联系 该类型属复杂心脏畸形 手术矫治死亡率高 目前常用的左室 - 肺动脉内隧道及大动脉转位矫治术后早期死亡率达到了 40%~50% 遥 我院于 2000 年 5 月 ~2002 年 5 月采用同种异体带瓣外管道 Rastelli 术式对 4 例 Taussig-Bing 畸形 渊 例同种异体带瓣主动脉 尧 例同种异体带瓣肺动脉 冤 行解剖矫治 取得了较好的效果 遥

## 1 资料与方法

4 例男性患者均经超声或心导管造影确诊为 Taussig-Bing 畸形 年龄 12~21 岁 平均 16 岁 临床上均表现出明显紫绀 活动耐力降低 术前胸片检查 3 例患者表现为肺血增多 袁 例减少 曰 心电图提示不同程度的右室肥厚 袁 电轴右偏 104°~120° 袁 例为玉° 传导阻滞 遥 例均有不同程度的肺动脉及瓣环狭窄 袁 超声测量肺动脉瓣口直径约 7~10 mm 袁 室间隔缺损大小 28~36 mm 袁 超声或心导管测量狭窄远端肺动脉压力约 5.32~7.98 kPa (40~60 mmHg) 遥 术中探查见 4 例患者均为 SDL 渊 房正位 袁 室右襟 袁 主动脉位于肺动脉左侧 冤 型 DORV 袁 主动脉位于肺动脉正前方或左前方 袁 其中 1 例合并左上腔静脉 袁 例为右位心 合并左上腔静脉 袁 位下腔静脉 尧 房心及源于左冠状动脉根部异常分支横跨右室流出道 遥

收稿日期 院 003-05-17

作者简介 张 振 渊 976- 冤 男 袁 天津人 袁 2001 年毕业于第一军医大学 袁 主治医师 袁 电话 院 20-61647169