

严重腹腔感染时肠黏膜 β -catenin 的表达及意义

刘晋峰, 吴承堂 (南方医科大学南方医院普通外科, 广东 广州 510515)

摘要:目的 探讨严重腹腔感染时大鼠肠黏膜 β -连环蛋白 (β -cat) 表达的变化规律及意义。方法 健康成年 Wistar 大鼠 40 只, 随机分为空白对照组 (仅行单纯剖腹手术) 和腹腔感染 [采用盲肠结扎加穿孔法 (CLP) 制作严重腹腔感染模型] 术后 12、24、48 h 组, 每组 10 只, 应用免疫组织化学及 RT-PCR 检测大鼠小肠隐窝严重腹腔感染前后 β -cat 表达的变化, 以及严重腹腔感染后不同时期 β -cat mRNA 水平的改变。结果 正常大鼠肠黏膜隐窝底部细胞中 β -cat 仅有微弱表达, 而感染后肠黏膜隐窝底部细胞中强表达 β -cat; RT-PCR 结果表明与对照组比较, β -cat mRNA 在 CLP 术后 12 h 明显上升 (0.74 ± 0.10 vs 0.52 ± 0.06 , $P < 0.01$), 在 CLP 术后 24 h 后达到峰值 (0.90 ± 0.09 vs 0.52 ± 0.06 , $P < 0.01$), 随后逐渐下降, 到 48 h 仍显著高于对照组 (0.80 ± 0.09 vs 0.52 ± 0.06 , $P < 0.01$)。结论 严重腹腔感染早期可诱导 β -cat 表达, 提示 β -cat 可能与肠上皮干细胞的增殖分化密切相关。

关键词: 腹腔感染; 干细胞; β -连环蛋白

中图分类号: R63; Q253; Q254 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)12-1733-03

β -catenin expression in intestinal mucosa of rats with severe abdominal infection

Liu Jin-feng, Wu Cheng-tang

Department of General Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of β -catenin in the intestinal mucosa of rats with severe abdominal infection. **Methods** Forty healthy adult Wistar rats were randomly divided into a control group ($n=10$, with celiotomy only) and 3 abdominal infection groups ($n=10$) sacrificed at 12, 24, 48 h after cecal ligation plus puncture for inducing severe abdominal infection, respectively. Immunohistochemistry and RT-PCR were performed to detect β -catenin expression in the crypt of the small intestine during severe abdominal infection and in normal conditions. **Results** Rats with severe abdominal infection showed stronger β -catenin expression in the crypt of the small intestine than normal rats, and the transcription level of β -catenin was associated with the stages of severe abdominal infection. RT-PCR showed that β -catenin mRNA increased rapidly 12 h after the infection (0.74 ± 0.10 vs 0.52 ± 0.06 , $P < 0.01$), reaching the peak level at 24 h (0.90 ± 0.09 , $P < 0.01$), followed then by gradual decrease but remained still obviously higher than the control level at 48 h (0.80 ± 0.09 , $P < 0.01$). **Conclusions** Severe abdominal infection may induce β -catenin expression which might be related with the proliferation and differentiation of intestinal stem cells in such condition and play an important role in intestinal mucosa damage and repair.

Key words: abdominal infection; stem cells; β -catenin

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

收稿日期: 2006-02-11

基金项目: 广东省自然科学基金 (032901)

Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province (032901)

作者简介: 刘晋峰 (1977-), 男, 在读硕士, 医师, 电话: 020-31396578, E-mail: ljf9119@sina.com

通讯作者: 吴承堂, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: wct66@163.com

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、48 h 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、48 h 处死, 取距回盲部 10 cm 处回肠组织 4 cm 作检测: 2 cm 加入 10% 中性甲醛溶液中固定 2 h, 用于免疫组织化学检查和 HE 染色。另 2 cm 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, pH 7.4)冲洗 3 次, 每次 5 min(下同)。每张切片加 50 μ l 过氧化物阻断溶液, 室温孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次, 微波抗原修复 30 min, 加封闭用正常山羊血清工作液, 室温孵育 10 min, 加 50 μ l 兔抗大鼠 β -cat 单克隆抗体(一抗), 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, PBS 冲洗 3 次。加 50 μ l 生物素化二抗工作液, 室温孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次。加 50 μ l 辣根酶标记链霉卵白素工作液, 室温孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次。加 100 μ l 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)溶液显色 10 min, 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 \times 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 $^{\circ}$ C 冰冻保存的标本 80 mg, 于液氮中夹碎, 将组织碎块加入 1 ml 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 $^{\circ}$ 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'-AGTGCACCCATGCAGAATA-3', 下游引物为 5'-CCACCACTGGCCAGAATGAT-3', 长度 365 bp。以 β -actin 为对照, 上游引物为 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3', 下游引物为 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3', 长度 597 bp。采用两步法进行 RT-PCR, 并按说明书进行操作。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预处理 3 min, 随后以 94 $^{\circ}$ C 裂解 45 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s 进行 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min 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 10 μ l 混合后于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳 60 min (电压 5 V/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 $\alpha=0.05$ 。

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 12 h 肠隐窝中阳性细胞明显增多, 24 h 后表达最强, 随着时间的延长, β -cat 表达逐渐降低, 到 48 h 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 \pm SD)

Group	Positive cells	F	P
Control	134.80 \pm 10.56	35.918	<0.000
12 h	145.70 \pm 8.31*		
24 h	178.20 \pm 10.51 [#]		
48 h	146.60 \pm 9.92*		

*P<0.05, [#]P<0.01 vs control group

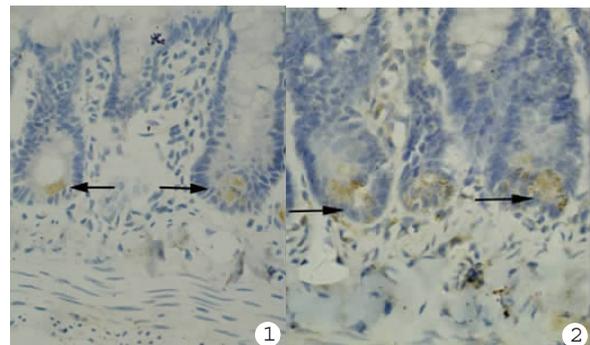


图 1 正常小肠隐窝中 β -cat 表达较弱

Fig.1 Weak β -catenin expression in normal intestinal crypts

(arrow, SP staining, original magnification: \times 400)

图 2 感染后 24 h 小肠隐窝中强表达 β -cat

Fig.2 Strong β -catenin expression in the intestinal crypts (arrow)

24 h after infection (SP staining, original magnification: \times 400)

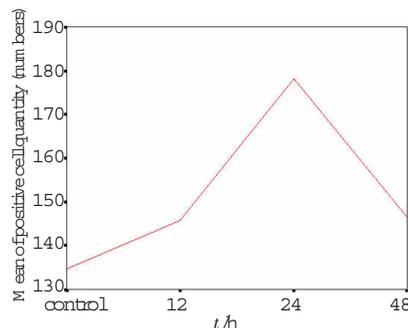


图 3 CLP 手术前后不同时期 β -cat 染色阳性细胞数

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 12 h mRNA 水平迅速上升,在术后 24 h 达到峰值,随后表达量逐渐下降,48 h 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、24 h 和 48 h 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 \pm 0.06	36.831	<0.000
12 h	10	0.74 \pm 0.10 [#]		
24 h	10	0.90 \pm 0.09 [#]		
48 h	10	0.80 \pm 0.09 [#]		

[#] $P<0.01$ vs control group

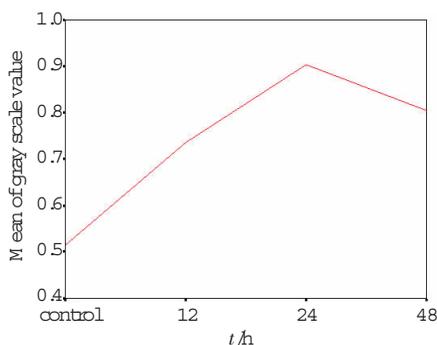


图 4 CLP 手术前后不同时期 β -cat 和 β -actin 灰度值

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] Wichtem an 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] Brambeck 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, Bowman B, Boutros M, et al. The promise and perils of Wnt signaling through β -catenin [J]. Science, 2002, 296:1644-6.
- [10] Logan CY, Nusser R. The Wnt signaling pathway in development and disease [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004, 20:781-810.