

外周血黏蛋白分子-3 mRNA 表达量 预测克罗恩病病情程度的意义

吴冲 孙华文 曾放 刘顺 吴红学

【摘要】 目的 探讨 T 细胞免疫球蛋白及黏蛋白分子-3 (Tim-3) 在不同病情程度的克罗恩病 (CD) 小鼠模型建模前后的差异性表达及机制, 寻找 CD 的新型血液标志物。方法 80 只小鼠采用 3 种不同浓度的 2, 4, 6-三硝基苯磺酸乙醇溶液经肛门灌肠建立克罗恩小鼠疾病模型, 分为 4 组, 高浓度组 ($n=10$), 中浓度组 ($n=50$), 低浓度组 ($n=10$), 对照组 ($n=10$), 中浓度组于给药前、给药第 2 天, 给药第 7 天, 给药第 14 天, 给药第 21 天 5 个时间点随机取 10 只小鼠, 其余各浓度组以及对照组于造模后 14 d 取小鼠外周血行 RT-PCR 实验测定 Tim-3 mRNA 的含量, 同时 ELISA 实验测定外周血中 IL-4 以及 INF- γ 的含量, 取小鼠结肠切片后行 HE 染色, 了解 Tim-3 mRNA 含量与其他各指标的关联性。结果 成功构建了小鼠的 CD 模型, 造模药物浓度越高, 小鼠的病理学评分越高, 病情越重, 各组间差异有统计学意义 ($P<0.05$)。造模后 14 d 内, Tim-3 mRNA 的表达量逐渐增加, 14 d 后表达量趋于平稳。平稳期, 外周血中 Tim-3 mRNA 的表达量在高浓度 2, 4, 6-三硝基苯磺酸组 (2.12 ± 0.24), 中浓度组 (1.68 ± 0.18), 低浓度组 (1.37 ± 0.12) 以及正常对照组中 (1.00 ± 0.00) 的表达依次降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。结论 外周血中 Tim-3 的含量在 CD 小鼠模型起病急性期渐进性增加, 给药 7 d 后趋于稳定, 稳定期的 Tim-3 含量与疾病的严重程度呈正相关, 可以作为 CD 病情程度的预测指标, 具有较好的稳定性和敏感性。

【关键词】 Tim-3; Crohn 病; 模型, 动物; 预测

Significance of the expression of Tim-3 mRNA in peripheral blood predict the severity of Crohn's disease

WU Chong, SUN Hua-wen, ZENG Fang, LIU Shun, WU Hong-xue. Department of Gastrointestinal Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: SUN Hua-wen, Email: sunhuawenmail@gmail.com

【Abstract】 Objective Investigate the dysregulated expression of T-cell immunoglobulin and mucin molecules -3 (Tim-3) in mice models with different severity of Crohn's disease, Looking for a new type of Crohn's disease blood marker. **Methods** the Crohn's disease animal model was made by the anus enema using three different concentrations of 2, 4, 6 - trinitrobenzene sulfonic acid ethanol solution, 80 mice were randomly divided into four groups: high concentration group ($n=10$), moderate concentration group ($n=50$), low concentration group ($n=10$), control group ($n=10$), the expressions of Tim-3 mRNA in peripheral blood were detected by RT-PCR at two days, one week, two weeks, three weeks after we got the mice models in moderate concentration group, we did it two weeks later in the other three groups, At the same time, the content of IL-4 and INF- γ in peripheral blood were measured by ELISEA, and colon section from mice underwent HE staining. **Results** Models of Crohn's disease in mice were successfully constructed, The higher concentration result in higher pathology score as well as more severe disease in mice. the expressions of Tim-3 mRNA in peripheral blood were gradually increased in two weeks after we made the mice models and remained stable after two weeks. At stationary phase, the expressions of Tim-3 mRNA were gradually reduced in high concentration group (2.12 ± 0.24), moderate concentration group (1.68 ± 0.18), low concentration group (1.37 ± 0.12) and Control group (1.00 ± 0.00). And the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of Tim-3 mRNA in Peripheral blood of a mice model with Crohn's Disease was gradually increased during the first 14 days, and then keep stable, at stationary phase, the expression of Tim-3 mRNA is positively correlated with the severity of the disease. It can be a predictor

of disease severity and has good stability and sensitivity.

【Key words】 Tim-3; Crohn disease; Models, animal; Forecasting

克罗恩病(Crohn's disease, CD)是一种胃肠道的慢性,反复发性的非特异性全肠壁炎,病变呈阶段性分布。其具体发病机制目前尚未明确,研究证明,CD的发生与机体的免疫紊乱有关,在CD发病期出现了Th1/Th2的偏移,Th1细胞的过渡活化是目前认为的主要致病机制^[1],T细胞免疫球蛋白及黏蛋白分子-3(Tim-3)是新近发现的T细胞免疫球蛋白及黏蛋白家族的一员,其特异性地表达于活化的Th1细胞表面^[2],Tim-3可能介导了对Th1增殖与活化的调节,并抑制Th1介导的对自体的免疫反应^[3]。目前对CD临床严重程度的评估缺乏一个敏感性高的血清标志物,这导致部分患者形成了全结肠的严重病变,失去了手术机会^[4]。作为主要致病因子,Th1细胞表面的特异性分子Tim-3在CD的发病过程中起着怎样的作用,其在外周血中的表达与CD严重程度是否存在关联,我们通过制作不同病情程度的CD小鼠疾病模型来探讨其中的关系。

材料与方 法

一、材料与仪器

健康的雌性Balb/c小鼠80只,胎龄为6~8周,体重14~20g(武汉大学动物实验中心),2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)50g/L溶液(Sigma公司),10%戊巴比妥液,EDTA抗凝剂,4%的甲醛液(武汉谷歌生物)Trizol(Invitrogen公司),PCR试剂(rTaq酶、dNTP、10×buffer、MgCl₂)(Sigma公司),INF-γ、IL-4 ELISA试剂盒,PCR仪(Hangzhou Bioer Technology),荧光定量PCR仪(上海宏石医疗科技有限公司)等。

二、CD小鼠模型的建立与评价

80只小鼠分四组饲养于武汉大学人民医院动物实验中心(SPF级),适应性饲养7d后禁食不禁水饲养1d,A组(对照组)给予以300g/L乙醇溶液灌肠1次。B组(低浓度组)小鼠给予含50mg/kg TNBS的300g/L乙醇溶液灌肠处理,C组(中浓度组)小鼠给予含100mg/kg TNBS的300g/L乙醇溶液灌肠处理,D组(高浓度组)小鼠给予含150mg/kg TNBS的300g/L乙醇溶液灌肠处理。所有小鼠灌肠前均禁食24h。让小鼠前爪自由抓住笼面,抓取小鼠尾部,使小鼠倒立。从肛门插入涂抹利多卡因凝胶的医用头皮针套管,深度为3.0~4.0cm,缓缓注入药液0.1~0.2ml,拔管。继续保持倒立姿势,让药液在肠道中停留30s^[5]。小鼠模型的评价根据各组小鼠的疾病活动度指数,病理组

织学观察结果来进行^[6]。

三、标本处理

无菌条件下用10%戊巴比妥钠(45mg/kg)腹腔注射进行小鼠麻醉,麻醉成功后迅速行胸腹联合剖开,暴露小鼠心脏,直视下1ml注射器心腔内取血2管,采血过程中注意间断性抽血,利于外周血的心脏回流,增加取血量,一管0.8ml置于EP管中,4℃静置2h,3000r/min离心10min,取上清液分装,于-80℃冰箱保存,作ELISA分析用。一管约0.8ml置于EDTA抗凝试管中,留作RT-PCR实验用。取小鼠近肛门处结直肠约10cm,4%甲醛固定行切片以及HE染色。

四、指标测定

结直肠肠管的HE染色:取小鼠的结肠组织,4%的甲醛液浸泡固定2d,烘干后切片,行HE染色制作切片,倒置显微镜下观察。ELISA法检测外周血中INF-γ、IL-4的含量:ELISA双抗体夹心法检测血浆中INF-γ和IL4的水平,INF-γ、IL-4试剂盒最低检测限为2pg/ml,严格按照试剂盒说明操作。RT-PCR检测小鼠外周血中Tim-3 mRNA的表达:采用Trizol试剂提取外周血中单个核细胞的总RNA,合成cDNA,实时荧光RT-PCR的条件:扩增条件为,95℃,2min,95℃,15s退火15s,72℃,45s,40个循环,72℃,5min,72℃→95℃,每20s升温1℃,结果处理采用ΔΔCT法(其中对照蛋白为β-Actin):A=CT(目的基因,待测样本)-CT(内标基因,待测本),B=CT(目的基因,对照样本)-CT(内标基因,对照样本),K=A-B,表达倍数 $n=2^{-K}$ 。

五、统计学处理

计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用t检验,应用SPSS 17.0统计软件进行分析;P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. 小鼠造模后的一般情况:各组小鼠于造模后第2天出现懒动、竖毛、鼠毛无光泽、食量下降、稀便、腹泻,部分甚至出现血便,体重下降,3~7d后达到高峰,7d后各组小鼠活动趋于稳定,14d后不出现明显的加重症状,其中各组造模14d后体重的变化见表1。

2. 小鼠结肠组织的病理学改变:结肠的病理学改变主要表现为大体观:肠腔扩张,肠壁充血,水肿,

黏膜溃疡, 色泽变暗, 粗细不一, 镜下观: 炎症细胞的浸润, 腺体的紊乱或消失, 黏膜的损伤、中断(图1), 依据文献^[7]进行CD的病理学评分: 炎细胞浸润, 无0分, 轻度1分, 中度2分, 重度3分; 浸润深度, 黏膜层1分, 黏膜和黏膜下层2分, 结肠全层3分; 溃疡深度: 无0分, 上皮1分, 黏膜固有层2分, 黏膜肌层3分; 纤维化, 无0分, 轻度1分, 重度2分。各组别小鼠的病理学评分结果见表2, 各组别之间比较采用方差分析, 差异具有统计学意义。

3. 小鼠外周血中IFN- γ 、IL-4的含量的变化(图2): IFN- γ 在各组中的随药物浓度的增加而增加, IL-4在各组中的表达随药物浓度的增加而较少, IFN- γ /IL-4值随着药物浓度的增加而升高。

4. CD小鼠模型外周血中Tim-3 mRNA的表达量变化: C组(中浓度组)中小鼠在各个时间点的Tim-3 mRNA的表达量见表3, 各浓度组小鼠在造模后14 d的Tim-3 mRNA的表达量见图3, 各组别之间比较采用t检验, 差异具有统计学意义。

表1 各剂量组间的体重变化(kg, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重变化(处置时体重-造模前体重)
对照组(A组)	10	4.7 \pm 0.5
低剂量组(B组)	10	-1.1 \pm 0.4
中剂量组(C组)	8	-1.3 \pm 0.6
高剂量组(D组)	7	-2.2 \pm 0.5

表2 各组别小鼠的病理学评分结果($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	病理学评分
对照组(A组)	10	0
低剂量组(B组)	10	2.5 \pm 0.4
中剂量组(C组)	8	5.3 \pm 0.6
高剂量组(D组)	7	8.4 \pm 0.7

表3 C组小鼠造模后各阶段Tim-3 mRNA的表达情况($\bar{x} \pm s$)

时间	鼠数	Tim-3 mRNA的表达倍数($2^{-\Delta\Delta CT}$)
造模前	10	1.00 \pm 0.00
造模后2 d	9	1.39 \pm 0.34
造模后7 d	8	1.57 \pm 0.25
造模后14 d	8	1.62 \pm 0.27
造模后21 d	8	1.64 \pm 0.32

讨 论

CD是一种原因未明的炎症性肠病, 可累及胃肠道的任何部位, 以结肠为多, 临床表现多样, 缺乏特异性的诊断指标, 诊断、治疗难且易反复发作^[8]。有研究表明, 抗酿酒酵母抗体(ASCA)在欧美CD患者中表达的阳性率为60%左右, 但因为其人群种族差异性较大, 在亚洲人群中的表达率明显偏低, 不被普遍使用

作CD的血清学标志物^[9-10]。因此如何寻找一种可靠的标志物反应病情程度, 是临床上亟待解决的问题。

CD动物模型的制备多种多样, 如自发性结肠炎、基因敲除法、化学法等, 随着免疫反应在发病中的作用被普遍认同, 由TNBS乙醇溶液灌肠制作的CD小鼠模型作为一种理想的疾病模型被广泛应用, TNBS作为一种半抗原, 与肠道的高分子组织蛋白相结合, 形成完全抗原, 诱发机体产生免疫反应, 引发结肠炎^[11], 文献证明100 mg/kg TNBS是比较适中的造模剂量, 由该浓度诱导的CD小鼠模型症状典型, 小鼠的死亡率低^[12], 我们的研究在最适浓度的基础上分别设置一个较低浓度和一个较高浓度的造模剂量, 通过浓度梯度的设置我们得到了病情程度不同的四组CD小鼠模型, 通过对各组小鼠一般情况的观察以及病理学评分, TNBS浓度越高, 其诱发的CD病情越重。另外通过对中浓度组小鼠在不同时间点的观察, 我们发现7 d后, 本组小鼠病情活动趋于稳定, 14 d后不出现明显的加重变化, 因此我们其他各组小鼠的指标测定和取材均在造模后第14天进行。

TNBS造模诱发机体产生免疫反应, 我们首先研究体内免疫细胞的变化, IFN- γ 、IL-4分别是Th1和Th2细胞分泌的特征性细胞因子, 可以反映出体内Th1/Th2细胞的免疫应答情况^[13]。我们通过测定IFN- γ 、IL-4浓度, 计算IFN- γ /IL-4比值, 以此反映Th1/Th2比例情况, 通过对2种细胞因子的检测发现CD小鼠体内发生了Th1/Th2偏移。并且病情程度越重, Th1/Th2偏移越明显, 这与文献报道的CD主要是Th1介导的免疫反应相一致。

Tim-3首先报道于2002年, 在比较Th1和Th2细胞差异时, 发现Tim-3只表达于Th1细胞, 并且仅表达于成熟的后期的T细胞表面, 这说明Tim-3对T细胞的分化不起作用, 影响的是T细胞的定位以及效应功能, 研究Th1细胞表面的Tim-3分子的结构发现, 在Tim-3的IgV结构域存在4个非典型的半胱氨酸结构, 四个半胱氨酸形成一个特异性的结合裂, 这个结构在其他的球蛋白超家族的IgV结构域中不存在^[14], 有学者鉴定出Tim-3分子的配体galectin-9, Galectin-9属于内源性半乳糖苷结合凝集素蛋白家族, 它由两个凝集素样糖识别区域(CRD)通过连接肽连接, 能与半乳糖基团特异结合, 是一种广泛性表达的可溶性分子, 其在细胞聚集、黏附、分化、凋亡、调节肿瘤转移和炎症反应等方面发挥作用^[15]。Tim-3作为Th1细胞的一种特异性免疫标志物, 通过我们的实验, 其在CD小鼠模型外周血中的表达存在以下的变化: 造模后14 d内, 小鼠外周血中Tim-3 mRNA的表达量逐渐增

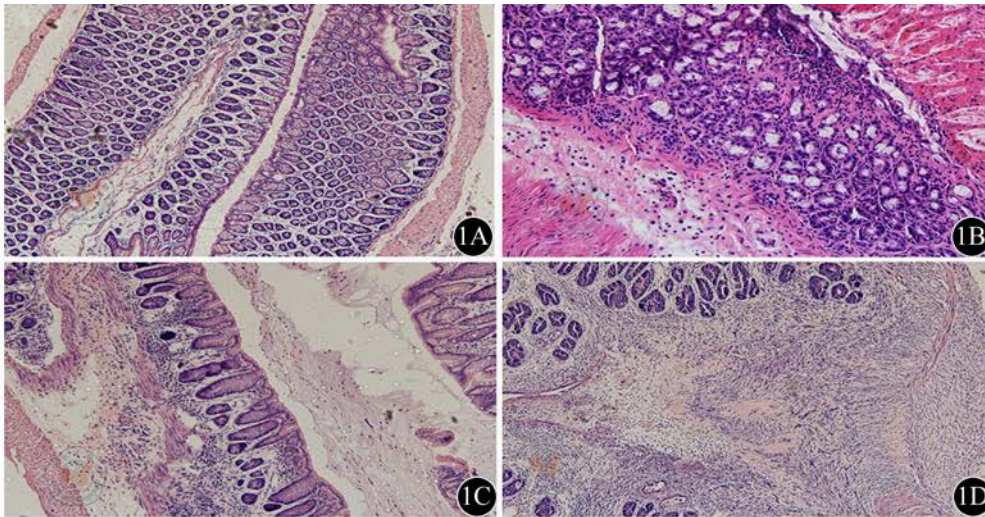


图1 1A~1D分别代表4个剂量组小鼠造模14 d处死后结肠HE染色的情况, 表现为炎症细胞的浸润, 腺体的紊乱或消失, 黏膜的损伤、中断, 4组的病理学改变依次加重

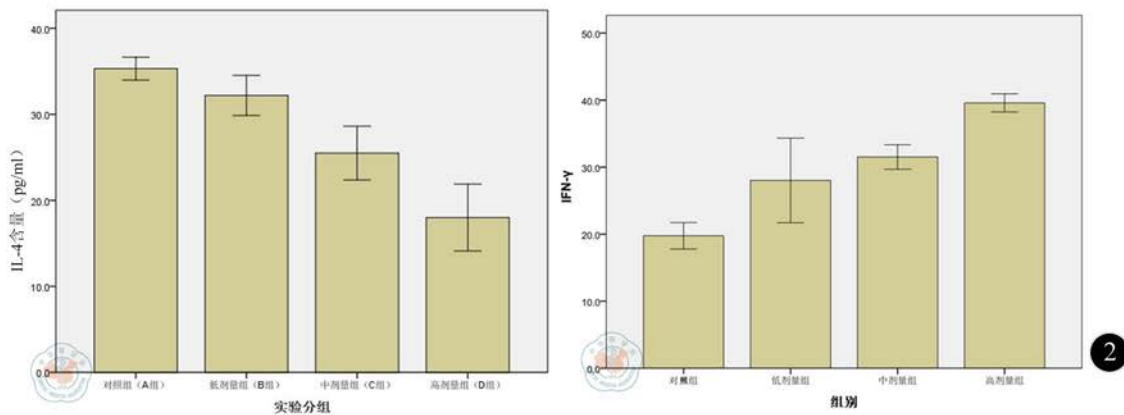


图2 各组小鼠模型外周血中IFN-γ、IL-4的含量的变化

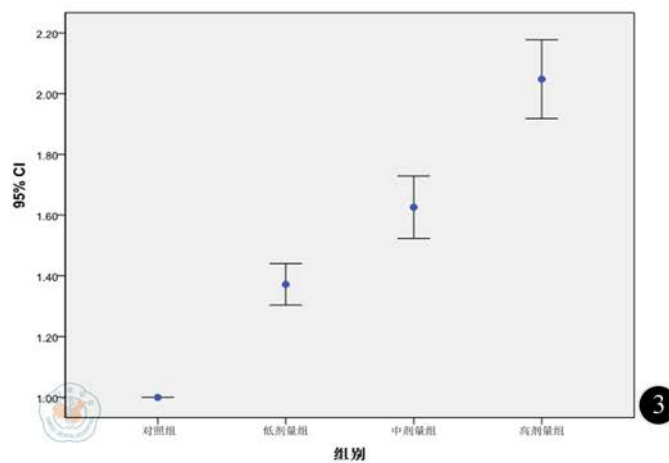


图3 各剂量组中造模前后Tim-3 mRNA的表达情况

高, 增高主要由于造模后小鼠体内持续出现 Th1/Th2 偏移引起, 而 Tim-3 作为 Th1 的特异性表面分子, 其表达量也随之增加, 并且通过识别 galectin-9 蛋白引导 Th1 细胞向刺激部位聚集。造模 14 d 后, 小鼠体内 Tim-3 mRNA 的表达量趋于平稳, 呈现一种动态的平稳状态。这可能因为 Tim-3 与肠道上的配体 galectin-9

蛋白结合后, 一方面引起肠道的炎性损伤, 一方面可以诱导 Th1 细胞的死亡或者凋亡^[16], 形成一个负反馈调节, 这样有效地抑制了 Th1 细胞的持续上升。因此, 对于造模后 14 d 的小鼠模型, 外周血中 Tim-3 mRNA 的表达量处于一种相对稳定的水平。因而我们测定各浓度组小鼠外周血中 Tim-3 mRNA 的表达量具有很好

的稳定性。

通过对4个不同浓度组小鼠造模后14 d Tim-3 mRNA的表达量的测定,我们发现,造模组小鼠 Tim-3 mRNA 的表达量明显高于对照组,并且随着造模浓度的增加,测得的 Tim-3 mRNA 的表达量也随之增高,各组之间存在统计学差异,同时实验组取造模后小鼠的结肠组织行 wester-blot 检测肠管中 galectin-9 蛋白的表达情况发现:肠管中 galectin-9 蛋白的表达量高于正常对照组,并且随着造模浓度的增加,其表达量也有增加的趋势。Tim-3 与肠道配体 galectin-9 蛋白结合可以诱发 Th1 细胞分泌 IFN- γ 等炎症因子^[17],引起肠道的炎症反应,因此当 Tim-3 表达量越高时,其引起的肠道炎症越重。同时 Tim-3 与 galectin-9 蛋白的结合负反馈抑制炎症的进一步发展,达到一种病理状态下的平衡。通过对比各组小鼠的 Tim-3 mRNA 的表达量和病理学评分以及一般状况的观察,我们发现 Tim-3 的表达量可以作为一个敏感性比较好的指标来预测小鼠 CD 的病情程度。

目前,CD 的病情判断尚无比较理想的血清学物质, Tim-3 分子在 CD 的发生发展过程中起着重要的作用,通过我们的动物实验可以看出, Tim-3 mRNA 的表达量来预测 CD 病情具有比较好的稳定性和敏感性,但因为样本量比较小,具体的量化指标以及在人群的应用还需要进一步的实验探讨。

参 考 文 献

- [1] Warnaar N, Hofker HS, Maathuis MH, et al. Matrix metalloproteinases as profibrotic in terminal ileum in Crohns disaeae. *Inflamm Bowel Dis*, 2006, 12: 863-869.
- [2] Monney L, Sabat CA, Gaglia JL, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of antioimmune disease. *Nature*, 2002, 415: 536-541.
- [3] Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol*, 2005, 6: 1245-1252.
- [4] Amre DK, Lu SE, Costea F, et al. Utility of serological markers in predicting the early occurrence of complications and surgery in pediatric Crohn's disease patients. *Am J Gastroenter*, 2006, 101: 645-652.
- [5] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*, 1989, 96: 795-811.
- [6] Butzner JD, Parmar R, Bell CJ, et al. Butyrate enema therapy stimulates mucosal repair in experimental colitis in the rat. *Gut*, 1996, 38: 568-573.
- [7] Dieleman LA, Palmen MJ, Akol H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characted by Th1 and Th2 cytokines. *Clin Exp Immunol*, 1998, 114: 385-391.
- [8] Latella G, Sferri A, Vetusch A, et al. Prewention of colonic fibrosis by boswellia and scutellaria extracts in rat with colitis induced by 2, 4, 5-trinitrobenzenesulphonic acid. *Eur J Clin Invest*, 2008, 38: 410-420.
- [9] Spivak J, Landecs CJ, Vasiliauskas EA, et al. Antibodies to 12 predict clinical resperise to fecal divemion in disease. *Inflamm Bowel*, 2006, 12: 1122-1130.
- [10] Kim BG, Kim YS, Kim JS, et al. Diagnostic role of anti-Saecharomyees cerevisiae mmmlan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Dis Colon Rectum*, 2002, 45: 1062-1069.
- [11] Fidler JM. Induction of hapten-specific immunological tolerance and immunity in B lymphocytes. VII. Correlation between trinitrobenzenesulfonic acid administration, serum trinitrophenyl content, and level of tolerance. *Cell Immunol*, 1985, 94: 285-291.
- [12] Dargenio G, Farrace MG, Cosenza V, et al. Expression of apoptosis-related proteins in rat with induced colitis. *Int J Colorectal Dis*, 2004, 19: 451-460.
- [13] Constant S L, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD⁴⁺ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol*, 1997, 15: 297-322.
- [14] Cao E, Zang X, Ramagopal UA, et al. T cell immunoglobulin mucin-3 crystal structure reveals a galectin-9-independent ligand-binding surface. *Immunity*, 2007, 26: 311-321.
- [15] Rius J, Guma M, Schachtrup C, et al. NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. *Nature*, 2008, 453: 807-811.
- [16] Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, et al. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science*, 2007, 318: 1141-1143.
- [17] Kashio Y, Nakamura K, Abedin MJ, et al. Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. *J Immunol*, 2003, 170: 3631-3636.

(收稿日期: 2013-11-11)

(本文编辑: 马超)