

# 信号转导和转录激活因子6在溃疡性结肠炎中的表达

庞艳华, 郑长青, 宁 斌, 胡刚正, 张文杰

庞艳华, 郑长青, 胡刚正, 中国医科大学附属二院消化内科  
辽宁省沈阳市 110004

宁斌, 中国医科大学基础医学院组胚教研室 辽宁省沈阳市 110001

张文杰, 武汉大学中南医院肿瘤研究所 湖北省武汉市 430020

项目负责人: 郑长青, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属二院消化内科, zhengchangqing@163.com

收稿日期: 2004-07-09 接受日期: 2004-09-04

## 摘要

**目的:** 探讨信号转导和转录激活因子6(STAT6)在溃疡性结肠炎(UC)中的表达和作用。

**方法:** 对50例经过结肠镜和病理检查证实的UC患者和50例正常对照者结肠黏膜病变, 采用免疫组化方法进行STAT6和磷酸化的STAT 6 (pSTAT6)的检测。

**结果:** UC黏膜组织中STAT6免疫组化反应产物主要定位于细胞质, 与对照组相比有显著性差异( $P<0.05$ )。pSTAT6免疫组化反应产物主要定位于细胞质和细胞核, 与对照组相比亦有显著性差异( $P<0.05$ )。

**结论:** STAT6在UC黏膜组织中表达上调, STAT6可能在UC的发病机制中起重要作用。

庞艳华, 郑长青, 宁斌, 胡刚正, 张文杰. 信号转导和转录激活因子6在溃疡性结肠炎中的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2484-2486  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2484.asp>

## 0 引言

信号转导和转录激活因子(signal transducers and activators of transcription, STATs)蛋白家族是近年来发现的一类转录因子, 包括STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b和STAT6等7个成员<sup>[1]</sup>, 通过JAK-STAT途径介导许多由细胞因子诱导的反应. 其中的信号转导和转录激活因子6(signal transducers and activators of transcription 6, STAT6)与炎症反应密切相关, 正日益受到人们的关注, 但STAT6在溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者黏膜内的蛋白表达情况国内尚未见报道. 我们对STAT6在UC发病中的作用做了初步探讨. 鉴于磷酸化在STAT6的活化过程中起关键作用<sup>[2-3]</sup>, 我们选择了非磷酸化的STAT6和磷酸化的STAT6(pSTAT6)2种抗体作为一抗, 用免疫组化方法检测STAT6蛋白在UC黏膜中的表达。

## 1 材料和方法

1.1 材料 从中国医科大学附属第一医院胃癌研究室及

第二医院病理科2001/2004年经结肠镜活检的归档蜡块中选取UC病例50例, 男27, 女23, 年龄18-70(平均39.4岁)和正常对照者50名, 男26名, 女24名, 年龄20-65(平均37.8岁), 所有病例均经结肠镜和病理学检查确诊. 所有标本各切出3片, 其中1片行HE染色, 另2片行免疫组织化学染色。

1.2 方法 应用链霉菌素-生物素免疫组化染色法(SP法). 4  $\mu$ m石蜡切片脱蜡至水, 30 mL/L过氧化氢阻断, 微波抗原修复, 加正常山羊血清封闭液, 滴加一抗和二抗, DAB显色. 然后经苏木素复染, 逐步脱水, 二甲苯透明, 最后用中性树脂封片. 抗STAT6抗体为兔抗人多克隆抗体, 抗pSTAT6为羊抗人多克隆抗体(购自美国Santa Cruz公司), 免疫组化试剂盒为北京中山生物技术有限公司产品. 以细胞质或核内出现黄色为阳性, 以PBS缓冲液代替一抗作为空白对照. 从以下两方面综合评分: (1)阳性染色深度(未见染色为0分, 轻度染色为1分, 中度染色为2分, 深度染色为3分). (2)阳性细胞率, 即阳性细胞占计数细胞的比例, 以高倍镜( $\times 400$ 倍)下观察10个视野为准(染色细胞 $\leq 5\%$ 为0分, 6-30%为1分, 31-70%为2分, 71-100%为3分). 将这两方面得分相加, 最高分为6分. 得分0-1分为(-), 2分为(+), 3-4分为(++), 5-6分为(+++).

**统计学处理** 采用SPSS10.0软件包进行 $\chi^2$ 检验, 以精确概率法计算P值, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

2.1 STAT6蛋白的表达 STAT6的阳性表达位于大部分黏膜固有层的淋巴细胞、浆细胞以及腺上皮等处. 免疫组化反应产物呈黄色, 主要定位于细胞质(图1A), 阳性率为42%. 其中有2例在细胞质着色的同时可见散在1-2个细胞核着色, 但按评分标准视为阴性表达. 正常对照组细胞质也有着色, 阳性率为20%, 但多数染色浅淡(图1B), 未见细胞核染色. UC组与对照组相比, 差异有显著性( $P<0.05$ )。

2.2 pSTAT6蛋白的表达 免疫组化反应产物主要定位于细胞核和细胞质, 阳性表达位于黏膜固有层的淋巴细胞、浆细胞和腺上皮等处. UC组有12例阳性表达, 而对照组有2例弱阳性(+)表达, UC组与对照组染色的阳性率分别为30%和4%, 差异有显著性( $P<0.05$ ). 其中UC组中有9例在细胞质表达的同时还可见少量细胞核着色(图1C), 均为弱阳性(+)表达, 对照组中则未见细胞核着色(图1D), 两组相比亦有统计学意义( $P<0.05$ )。

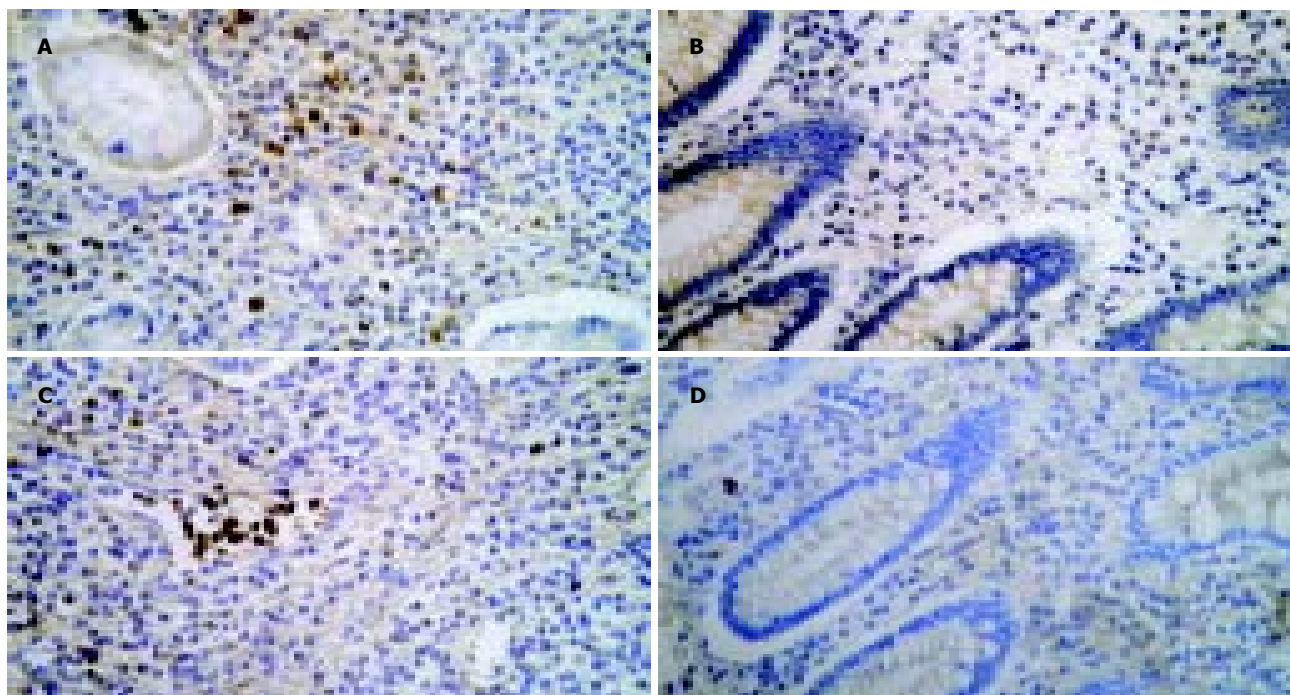


图1 UC肠黏膜STAT6和pSTAT6表达 SP  $\times 400$ . A: UC组 STAT6胞质着色, B:对照组 STAT6胞质染色浅淡, C: UC组 pSTAT6胞核和胞质着色, D:对照组 pSTAT6胞质无染色或染色浅淡.

### 3 讨论

目前,免疫因素在IBD的发病学中最为肯定, Th1/Th2亚群的平衡失调可能是IBD发病的重要机制之一<sup>[4-5]</sup>. Th分化为Th1/Th2受多种因素调节<sup>[6-7]</sup>, 虽然现在已经发现了参与Th1细胞和Th2细胞分化的很多机制, 但是启动此分化的初始环节还不清楚<sup>[8-9]</sup>. 许多数据表明一些重要的转录因子对Th1细胞和Th2细胞的程序性基因表达有启动作用. STAT6即是介导Th2的关键转录因子之一, 在维持Th1/Th2的平衡反应中起重要作用<sup>[10-11]</sup>, 而且STAT6是炎症性肠病的候选基因<sup>[12]</sup>, 所以我们研究STAT6是否在UC的发病中起作用. 对于UC与Th1/Th2细胞的关系, 目前还没有定论, 我们的研究结果显示STAT6免疫组化反应产物主要定位于细胞质, 阳性表达位于黏膜固有层的淋巴细胞、浆细胞以及部分肠黏膜上皮细胞等处. 众所周知, 各种类型的细胞因子是由淋巴细胞、上皮细胞等分泌的, STAT6表达增强可能是UC患者细胞因子增加的一个原因, 而细胞因子在UC发病中的重要性已得到公认, 所以我们可以认为STAT6在UC的发病中是起一定作用的. 又由于依赖细胞因子的JAK-STAT途径在健康和疾病的免疫反应中起重要作用, STAT6也参与正常细胞的分化、增生、生存、凋亡和血管发生<sup>[13-14]</sup>, 正常对照组也可见STAT6升高, 我们的实验证实了这一点. STAT6在胞质内是作为一种潜伏的单体形式存在, 如果某种刺激因素使STAT6结合在IL-4受体上, STAT6的641位点上的酪氨酸残基发生磷酸化, STAT6即被激活. 激活的STAT6穿过核膜, 进入细胞核, 与特定基因的启动子结合, 诱导特定基因的表达<sup>[15]</sup>. 在以上过程中, STAT6的磷酸化是很重要的, 磷酸化的STAT6代表活化状态

的STAT6, 活化状态的STAT6参与Th2的分化<sup>[16]</sup>. 在我们的实验中, pSTAT6免疫组化反应产物可见一部分细胞核染色, 且与对照组相比有显著性差异, 表明在UC的发病过程中有STAT6进入细胞核发挥转录活性, 也就是有STAT6的活化, 说明STAT6参与了UC的发病. 但是, 在UC的发病过程中, STAT6升高是否与Th2直接相关, 是否由于STAT6对Th1类细胞因子的负调节作用增强从而使STAT6升高, 还有待于进一步研究.

总之, 我们对STAT6在UC黏膜中的表达做了初步探讨, 认为UC的发病与STAT6有关. STAT6在UC发病机制中的作用有待进一步研究.

### 4 参考文献

- 1 Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997;277:1630-1635
- 2 MacDonald TT, Monteleone G, Pender SL. Recent developments in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000;51:2-9
- 3 Christodouloulopoulos P, Cameron L, Nakamura Y, Lemiere C, Muro S, Dugas M, Boulet LP, Laviolette M, Olivenstein R, Hamid Q. TH2 cytokine-associated transcription factors in atopic and nonatopic asthma: evidence for differential signal transducer and activator of transcription 6 expression. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:586-591
- 4 Van Damme N, De Keyser F, Demetter P, Baeten D, Mielants H, Verbruggen G, Cuvelier C, Veys EM, De Vos M. The proportion of Th1 cells, which prevail in gut mucosa, is decreased in inflammatory bowel syndrome. *Clin Exp Immunol* 2001;125:383-390
- 5 Smerz-Bertling C, Duschl A. Both interleukin 4 and interleukin 13 induce tyrosine phosphorylation of the 140-kDa sub-unit of the interleukin 4 receptor. *J Biol Chem* 1995;270:966-970
- 6 Farrar JD, Asnagli H, Murphy KM. T helper subset development: Roles of instruction, selection, and transcription. *J Clin Invest* 2002;109:431-435
- 7 Ben-Sasson SZ, Gerstel R, Hu-Li J, Paul WE. Cell division is

- not a "clock" measuring acquisition of competence to produce IFN $\gamma$  or IL-4. *J Immunol* 2001;166:112-120
- 8 Bellinghausen I, Brand P, Bottcher I, Klostermann B, Knop J, Saloga J. Production of interleukin-13 by human dendritic cells after stimulation with protein allergens is a key factor for induction of T helper 2 cytokines and is associated with activation of signal transducer and activator of transcription-6. *Immunology* 2003;108:167-176
- 9 Lund RJ, Ylikoski EK, Aittokallio T, Nevalainen O, Lahesmaa R. Kinetics and STAT4- or STAT6-mediated regulation of genes involved in lymphocyte polarization to Th1 and Th2 cells. *Eur J Immunol* 2003;33:1105-1116
- 10 Wang Y, Malabarba MG, Nagy ZS, Kirken RA. Interleukin 4 regulates phosphorylation of serine 756 in the transactivation domain of Stat6. Roles for multiple phosphorylation sites and Stat6 function. *J Biol Chem* 2004;279:25196-25203
- 11 Zhang WJ, Koltun WA, Thompson JL, Tilberg AF, Galka E, Poritz LS, Chorney MJ. Human B lymphoblast cell lines defective of Stat6 signaling produce high levels of proinflammatory cytokines IL-12, TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$ . *Int J Oncol* 2004;24:447-453
- 12 Xia B, Crusius JB, Wu J, Zwiers A, van Bodegraven AA, Pena AS. Signal transducer and activator of transcription 6 gene G2964A polymorphism and inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2003;131:446-450
- 13 Wurster AL, Tanaka T, Grusby MJ. The biology of Stat4 and Stat6. *Oncogene* 2000;19:2577-2584
- 14 Calo V, Miglavec M, Bazan V, Macaluso M, Buscemi M, Gebbia N, Russo A. STAT proteins: from normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 2003;197:157-168
- 15 Kraus J, Borner C, Holtt V. Distinct palindromic extensions of the 5'-TTC...GAA-3' motif allow STAT6 binding *in vivo*. *FASEB J* 2003;17:304-306
- 16 Zhu J, Guo L, Watson CJ, Hu-Li J, Paul WE. Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J Immunol* 2001;166:7276-7281

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 新生鼠肠损伤时肝脏黄嘌呤氧化酶的变化

芦惠, 王丽杰

芦惠, 王丽杰, 中国医科大学附属第二医院儿科 辽宁省沈阳市 110004  
项目负责人: 芦惠, 110004, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院儿科. luhui66999@sina.com  
电话: 024-23930619 传真: 024-83955509  
收稿日期: 2004-07-20 接受日期: 2004-09-04

### 摘要

目的: 探讨新生鼠肠损伤时肝脏黄嘌呤氧化酶(XO)的变化。

方法: 新生大鼠随机分为对照组8只, 实验组每一时相点各8只。将 *E coli* O<sub>55</sub>: B<sub>5</sub> 脂多糖 5 mg/kg 注入新生鼠胃内, 分别于灌胃后3, 6, 12, 24, 72 h处死动物。取部分肝组织固定, 包埋, HE染色, 光镜下观察其组织学改变。其余肝组织用于测定XO活性。

结果: 实验组6, 12 h XO活性明显高于对照组(分别为  $4.719 \pm 0.793$  nkat/g vs  $3.961 \pm 0.387$  nkat/g,  $4.929 \pm 0.477$  nkat/g vs  $3.961 \pm 0.387$  nkat/g,  $P < 0.05$ ); 3, 24, 72 h XO活性与对照组无显著差异( $P > 0.05$ )。内毒素治疗后随着时间的进行逐渐出现中央静脉扩张, 肝窦充血、炎性细胞浸润, 肝细胞水肿, 胞质疏松, 空泡变性。6, 12 h可见大量肝细胞内出血, 肝细胞坏死。24, 72 h肝细胞水肿渐消失, 出血坏死不明显。

结论: 新生鼠肠损伤时可致肝脏受累, 且XO活性愈高, 肝损伤愈重。

芦惠, 王丽杰. 新生鼠肠损伤时肝脏黄嘌呤氧化酶的变化. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2486-2487  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2486.asp>

### 0 引言

坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)是新生儿期最常见的胃肠道疾病, 可导致多器官功能衰竭<sup>[1]</sup>。肝脏是人体重要的免疫器官, 在肠屏障功能受损时, 作为第一道防线, 一定程度上能抑制肠源性感染扩散, 但其本身炎性细胞也可被激活, 在倍增全身炎症反应的同时自身亦受到损伤<sup>[2]</sup>。我们通过内毒素(lipopolysaccharide, LPS)建立新生鼠肠损伤模型, 探讨肝脏黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)的变化及意义。

### 1 材料和方法

1.1 材料 健康1日龄Wistar新生大鼠, 平均体质量  $6.3 \pm 0.9$  g, 由中国医科大学第二临床学院动物部提供。随机分为对照组8只, 实验组每一时相点(3, 6, 12, 24, 72 h)各8只。将1.9F硅胶管(B-D Inc, Sandy, UT, USA)经口插入胃内, *E coli* O<sub>55</sub>: B<sub>5</sub> 脂多糖(LPS; Sigma Chemical CO., St. Louis, Mo) 5 mg/kg用无菌生理盐水稀释至0.2 mL注入胃内; 对照组则注入无菌生理盐水0.2 mL<sup>[3]</sup>。灌胃后各组均放回母鼠旁, 继续哺乳, 直至实验结束。动物处死后, 分离肝脏。取肝组织于40 g/L多聚甲醛中固定, 常规脱水, 包埋切片, 行HE染色, 光镜下观察其组织学变化。其余肝组织于-80℃超低温冰箱中保存, 以备检测。

1.2 方法 肝组织XO活性测定, 按测定试剂盒要求, 应用紫外/可见分光光度计(法国500-P型), 测定肝组