

TNBS 诱发大鼠结肠炎中三叶因子 3 的表达

宋 敏, 李 瑾, 夏 冰

宋敏, 李瑾, 夏冰, 武汉大学中南医院内科 湖北省武汉市 430071
武汉大学科技创新基金资助项目, No. 301270059
项目负责人: 夏冰, 430071, 湖北省武汉市, 武汉大学中南医院内科.
bingxia@public.wh.hb.cn
电话: 027-67812985
收稿日期: 2004-07-05 接受日期: 2004-07-15

摘要

目的: 研究三叶因子 3(trefoil factor 3, TFF3)基因在三硝基苯磺酸(TNBS)诱发的大鼠结肠炎肠黏膜表达的变化, 探讨其在结肠炎发生发展中的作用。

方法: 采用 TNBS/乙醇灌肠制作大鼠结肠炎模型($n=15$), 观察大鼠腹泻、便血情况, 评价疾病活动性指数(DAI)并记录体重改变, 分别于制模后 1, 7 及 14 d 处死大鼠。生理盐水灌肠作为正常对照组。大体及镜下观察肠黏膜损伤及组织学变化, 并进行评分。生化法检测 MPO 活性。逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)检测 TFF3 基因表达。

结果: 结肠炎组 1, 7 及 14 d 时间点 DAI(3.8 ± 0.5 vs 0 , 3.3 ± 0.5 vs 0 , 2.3 ± 0.5 vs 0)、体质量(-3.2 ± 0.7 vs 4.7 ± 2.2 , -7.2 ± 2.0 vs 10.9 ± 0.2 , 2.9 ± 0.4 vs 30.5 ± 2.9)、大体评分(7.2 ± 0.9 vs 0 , 6.2 ± 1.3 vs 0 , 4.6 ± 0.5 vs 0)和组织学评分(8.2 ± 1.2 vs 0 , 10.4 ± 0.5 vs 0 , 8.4 ± 0.5 vs 0)以及 MPO 活性(1745 ± 55 vs 303 ± 21 , 1789 ± 77 vs 315 ± 20 , 1736 ± 127 vs 313 ± 35)较正常对照组均存在显著差异($P<0.05$)。TFF3 在结肠组织炎症的各个时间点均有表达, 致炎后 1 d 组较正常对照组减少, 7 和 14 d 组明显升高(0.63 ± 0.05 vs 0.72 ± 0.02 , 0.94 ± 0.19 vs 0.72 ± 0.02 , 1.25 ± 0.74 vs 0.72 ± 0.02 , $P<0.05$)。

结论: TNBS 诱发的大鼠结肠炎有 TFF3 基因的表达, 提示 TFF3 在结肠炎黏膜损伤修复中发挥作用。

宋敏, 李瑾, 夏冰. TNBS 诱发大鼠结肠炎中三叶因子 3 的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(9):2212-2214

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2212.asp>

0 引言

肠黏膜损伤主要是通过细胞增生以及上皮移行重建而修复。三叶因子 3(trefoil factor 3, TFF3)是一类对肠黏膜有保护作用的小分子多肽, 其对肠黏膜保护作用的机制可能在于 TFF3 与黏液糖蛋白结合, 增强黏液糖蛋白的稳定性, 防止有害物质对肠黏膜细胞的损伤^[1-2]。此外, TFF3 具有很强的促进细胞增生与移行的能力, 可促进受损区域上皮细胞重建并加快上皮细胞移行速度, 从而修复受损肠黏膜^[3-7]。TFF3 能促进肠黏膜的修复及愈合^[4, 8], 仅有少数文献涉及 TFF3 在炎症性肠病

(IBD)黏膜表达的研究。我们以 TNBS/乙醇诱发的大鼠结肠炎为模型, 研究结肠炎大鼠 TFF3 基因表达变化, 为探讨 TFF3 对 IBD 肠黏膜损伤的修复作用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 三硝基苯磺酸(TNBS)购自 Sigma 公司; 髓过氧化物酶(MPO)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; RT-PCR 相关试剂购自深圳晶美生物工程有限公司; 相关引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成。采用 TNBS 结肠炎动物模型^[9]: 30 只 Wistar 成年 δ 大鼠, 体质量 200-250 g, 由湖北省实验动物研究中心提供。置于温度为 22 ± 1 °C 的净化实验室内, 混合食料喂养, 自由饮水。随机分成 A, B 两组, 每组各 15 只, 分别于 1, 7 及 14 d 各时间点处死 5 只大鼠。A 组为正常对照组, B 组为结肠炎组。大鼠在实验前 1 d 禁食, 用 20 g/L 异戊巴比妥钠 40 mg/kg ip 麻醉。将一输液管经大鼠肛门插入结肠深约 8 cm。B 组每只大鼠缓慢注入 TNBS(溶于 500 mL/L 乙醇中至终浓度 100 g/L) 0.25 mL, 制成大鼠结肠炎模型^[9]。正常对照组缓慢注入生理盐水 0.25 mL。观察大鼠大便秘性状改变和有无便血作为疾病活动指数(disease activity index, DAI)^[10], 记录体质量变化, 以及进行大体形态^[11]及组织学评分^[12]。

1.2 方法 取远端结肠组织 0.1 g, 按质量体积比为 1:19 加入均浆液 1.9 mL 进行匀浆, 按试剂盒操作步骤进行检测。用 UV-2000 型紫外可见分光光度计于波长 460 nm, 1 cm 光径, 蒸馏水调零, 测定各管 A 值, 计算酶活力单位。每克组织湿片在 37 °C 的反应体系中 H_2O_2 被分解 1 μ mol 为 1 个酶活力单位。另取远端结肠组织, 用 1 g/L DEPC 水反复冲洗至少 3 次, 放入冷凝管, 迅速放入液氮保存。总 RNA 抽提按 Trizol™ 方法: 取 50-100 mg 冻存组织, 捣碎; 加 Trizol 试剂 1 mL, 匀浆; 加氯仿 0.2 mL, 振荡 15 s, 4-8 °C 离心(12 000 r/min)15 min; 取上清液, 加异丙醇 0.5 mL, 4-8 °C 离心(12 000 r/min)10 min; 750 mL/L 乙醇 1 mL 洗涤沉淀, 4-8 °C 离心(7 500 r/min) 5 min, 自然晾干; 加 DEPC-H₂O 30 μ L, 55-60 °C 孵育 10 min。将总 mRNA 1 μ g 置于 20 μ L 的反应体系中进行逆转录(42 °C 60 min, 70 °C 10 min); 取反应产物 2 μ L 置于 50 μ L PCR 反应体系, 同时加入 β -actin 引物作为内对照共同扩增。TFF3 正义引物: 5' -ATGGAGACCAGAGCCTTCTGGAC-3'; 反义引物: 5' -AGAGGTTTGAAGCACCAGGCG-3', 扩增片断 422 bp。 β -actin 正义引物: 5' -TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3'; 反义引物: 5' -GATCTTGATCTTCATGCTGCTAGG-3', 扩增

片断 754 bp. 95 °C 40 s, 60 °C 40 s, 72 °C 60 s, 经历 35 个循环. PCR 扩增产物用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察并照相. 用计算机凝胶图像分析系统进行吸光度分析.

统计学处理 实验数据以 mean±SD 表示, 统计方法通过 SPSS11.0 软件包采用 *t* 检验分析, $P<0.05$ 认为差异显著.

2 结果

2.1 病理组织学以及 MPO 活性 结肠炎组大鼠 1 d 后出现腹泻、便血, 与正常对照组比较, DAI 显著增高($P<0.05$). 正常对照组大鼠 1 d 即出现体质量增加 4.7 ± 2.2 g; 而结肠炎组大鼠下降 7.2 ± 2.0 g, 7 d 开始回升. 炎症组大鼠表现为肠管浆膜湿润, 光泽, 可见瘀点状出血. 黏膜表面颗粒状、质脆. 结肠与周围组织粘连伴近端肠腔扩

张, 但未见穿孔. 黏膜质脆, 可见充血水肿、红斑、浅表溃疡形成. 炎症和溃疡位于距肛门 8 cm 范围内, 溃疡呈白色线状或灶性, 周围黏膜增厚. 光镜下结肠炎组大鼠 1 d 表现为病变结肠区域出现溃疡, 肠黏膜及黏膜下血管高度扩张充血和水肿, 并伴有出血, 其间有大量炎性细胞浸润, 以中性粒细胞为主. 7 d 炎症镜下表现为节段性溃疡形成, 肠黏膜中度充血水肿, 大量嗜酸性白细胞浸润. 部分上皮坏死脱落、肠壁肉芽组织形成. 14 d 炎症期表现为结肠病变区仍有溃疡形成, 黏膜及黏膜下层慢性炎症细胞浸润, 小血管扩张, 肉芽组织形成, 另可见增生的纤维母细胞. 结肠炎组大鼠 MPO 活性明显高于对照组(表 1, $P<0.05$).

2.2 TFF3 mRNA 表达 TFF3 mRNA 在结肠正常组织以及结肠炎症组织的各个时间点均有表达(图 1), 但结肠炎症组灌肠后 1 d 减少, 7 和 14 d 明显升高(表 1, $P<0.05$).

表 1 结肠炎大鼠 DAI 和 TFF3 mRNA 表达($n=5$, mean±SD)

	正常对照组			结肠炎组		
	1 d	7 d	14 d	1 d	7 d	14 d
TFF3/ β -actin	0.72±0.02	0.72±0.02	0.72±0.02	0.63±0.05 ^a	0.94±0.19 ^a	1.25±0.74 ^a
DAI	0	0	0	3.8±0.4 ^a	3.3±0.5 ^b	2.3±0.5 ^b
MB	4.7±2.2	10.9±0.23	0.5±2.9	-3.2±0.7 ^a	-7.2±2.0 ^a	2.9±0.4 ^a
大体评分	0	0	0	7.2±0.9 ^b	6.2±1.3 ^b	4.6±0.5 ^b
组织学评分	0	0	0	8.2±1.2 ^b	10.4±0.5 ^b	8.4±0.5 ^b
MPO(nKat/g)	303±21	315±20	313±35	1 745±55 ^a	1 789±77 ^a	1 736±127 ^a

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 正常对照组.

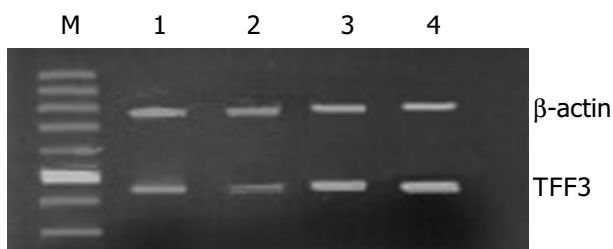


图 1 大鼠结肠炎 TFF3 mRNA 表达. 1: 正常对照组; 2: 1 d 组; 3: 7 d 组; 4: 14 d 组; M: DNA Marker (bp).

3 讨论

TNBS/乙醇诱发的大鼠远端结肠炎病理表现与人类 IBD 类似. TNBS 诱发结肠炎的确切机制尚未阐明, 可能是 TNBS 作为一种化学性半抗原, 与结肠上皮细胞大分子组织蛋白结合形成完全抗原, 使 T 淋巴细胞致敏, 溶解自身细胞所致. 此外, TNBS 与抗坏血酸盐相互作用时, 被代谢生成活性氧及过氧化物, 对组织上皮细胞产生毒性而导致损伤^[13]. 从对本实验结肠炎大鼠症状、大体及组织学的观察, 与上述免疫性炎症反应相符合. TFF3 是一种含独特三叶草结构的小分子多肽^[7, 14]. 现有大量证据表明三叶肽在肠黏膜的保护和修复中发挥重要作用. 目前认为 TFF3 对肠黏膜的保护作用与黏液的参与有

关. TFF3 空间结构中有一个 0.8–1 nm 的间隙能与黏液糖蛋白结合, 对黏液糖蛋白的分子结构起支架作用, 增强黏液糖蛋白的稳定性, 防止有害物质对肠黏膜细胞的损伤^[15]. 此外, TFF3 具有很强的促进细胞增生与移行的能力, 可促进受损区域上皮细胞重建并加快上皮细胞移行速度, 从而修复受损肠黏膜. Cook *et al*^[5]观察到细菌胞壁内毒素脂多糖可诱导 TFF3 表达, 提示 TFF3 可能是单核细胞移行的刺激因子, 在肠道损伤的免疫应答中发挥作用. 本实验表明, TFF3 mRNA 在正常肠黏膜可有表达, 致炎 1 d 后减少, 7 和 14 d 可见显著升高($P<0.05$), 提示 TFF3 在 IBD 损伤恢复期发挥重要作用. 该结果与 Loncar *et al*^[16]的研究结果一致. Tran *et al*^[17]显示 TFF3 mRNA 在 TNBS 结肠炎 8 wk 内均有高表达.

本实验还表明, TFF3 mRNA 表达与 MPO、DAI 等炎症指标呈线性相关, 提示 TFF3 表达与炎症有关. MPO 是粒(单)细胞浆中所特有的糖蛋白颗粒. 当某些异物侵入或感染, 诱导产生炎症细胞因子如 IL-1, IL-8, TNF- α 等, 使中性粒细胞(PMN)趋化, 使原来处于静息的 PMN 内部的 MPO 向细胞表面移动释放, 故 MPO 含量的增高可以反映中性粒细胞在某一组织中的增高, 间接反映炎症组织的活动性. 本实验大鼠结肠炎肠黏膜 MPO

活性与 TFF3 表达同时增强,提示肠黏膜免疫炎症反应存在促炎与抗炎的平衡。

总之, TNBS 诱发的大鼠结肠炎肠黏膜有 TFF3 基因的表达,提示 TFF3 在结肠炎黏膜损伤修复中发挥作用。

4 参考文献

- 1 Emami S, Le Floch N, Bruyneel E, Thim L, May F, Westley B, Rio M, Mareel M, Gaspach C. Induction of scattering and cellular invasion by trefoil peptides in src- and RhoA-transformed kidney and colonic epithelial cells. *FASEB J* 2001;15:351-361
- 2 Gouyer V, Wiede A, Buisine MP, Dekeyser S, Moreau O, Lesuffleur T, Hoffmann W, Huet G. Specific secretion of gel-forming mucins and TFF peptides in HT-29 cells of mucin-secreting phenotype. *Biochim Biophys Acta* 2001;1539:71-84
- 3 Hahm KB, Im YH, Parks TW, Park SH, Markowitz S, Jung HY, Green J, Kim SJ. Loss of transforming growth factor beta signaling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;49:190-198
- 4 Taupin D, Pedersen J, Familiari M, Cook G, Yeomans N, Giraud AS. Augmented intestinal trefoil factor (TFF3) and loss of pS2 (TFF1) expression precedes metaplastic differentiation of gastric epithelium. *Lab Invest* 2001;81:397-408
- 5 Cook GA, Familiari M, Thim L, Giraud AS. The trefoil peptides TFF2 and TFF3 are expressed in rat lymphoid tissues and participate in the immune response. *FEBS Lett* 1999;456:155-159
- 6 Moro F, Levenez F, Durual S, Plaisancie P, Thim L, Giraud AS, Cuber J. Secretion of the trefoil factor TFF3 from the isolated vascularly perfused rat colon. *Regul Pept* 2001;101:35-41
- 7 Lin J, Nadroo AM, Chen W, Holzman AR, Fan QX, Babyatsky MW. Ontogeny and prenatal expression of trefoil factor 3/ITF in the human intestine. *Early Hum Dev* 2003;71:103-109
- 8 Shirazi T, Longman RJ, Corfield AP, Probert CS. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J* 2000;76:473-478
- 9 Xia B, Han H, Zhang KJ, Li J, Guo GS, Gong LL, Zeng XC, Liu JY. Effects of low molecular weight heparin on platelet surface P-selectin expression and serum interleukin-8 production in rats with trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis. *World J Gastroenterol* 2004;10:729-732
- 10 Porter SN, Howarth GS, Butler RN. An orally administered growth factor extract derived from bovine whey suppresses breath ethane in colitic rats. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:967-974
- 11 Bobin-Dubigeon C, Collin X, Grimaud N, Robert JM, Le Baut G, Petit JY. Effects of tumor necrosis factor-alpha synthesis inhibitors on rat trinitrobenzene sulphonic acid-induced chronic colitis. *Eur J Pharmacol* 2001;431:103-110
- 12 Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML, Willen R, Andersson R, Molin G, Bengmark S. The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic acid-induced colitis in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1993;28:155-162
- 13 Grisham MB, Volkmer C, Tso P, Yamada T. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produce reactive oxygen species. *Gastroenterology* 1991;101:540-547
- 14 Yu K, Jiang SF, Lin MF, Wu JB, Lin J. Extraction and purification of biologically active intestinal trefoil factor from human meconium. *Lab Invest* 2004;84:390-392
- 15 Blanchard C, Durual S, Estienne M, Bouzakri K, Heim MH, Blin N, Cuber JC. IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis. *J Immunol* 2004;172:3775-3783
- 16 Loncar MB, Al-azze ED, Sommer PS, Marinovic M, Schmehl K, Kruschewski M, Blin N, Stohwasser R, Gott P, Kayademir T. Tumour necrosis factor alpha and nuclear factor kappa B inhibit transcription of human TFF3 encoding a gastrointestinal healing peptide. *Gut* 2003;52:1297-1303
- 17 Tran CP, Cook GA, Yeomans ND, Thim L, Giraud AS. Trefoil peptide TFF2 (spasmolytic polypeptide) potently accelerates healing and reduces inflammation in a rat model of colitis. *Gut* 1999;44:636-642

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 •

大鼠重症急性胰腺炎时免疫机制及 TAI 的影响

姚玮艳, 诸琦, 袁耀宗, 乔敏敏, 章永平, 翟祖康, 姚季生, 程琳琳, 沈天伟

姚玮艳, 诸琦, 袁耀宗, 乔敏敏, 章永平, 翟祖康, 上海第二医科大学附属瑞金医院消化科 上海市 200025

姚季生, 上海第二医科大学病理教研室 上海市 200025

程琳琳, 沈天伟, 上海第二医科大学免疫教研室 上海市 200025

上海市自然科学基金资助, No. 01ZB14026

项目负责人: 诸琦, 200025, 上海市瑞金二路 197 号, 上海第二医科大学附属瑞金医院消化科. zhuqi@medmail.com.cn

电话: 021-64370045 传真: 021-64150773

收稿日期: 2004-06-16 接受日期: 2004-07-22

摘要

目的: 研究重症急性胰腺炎(SAP)时细胞免疫功能的变化并通过给予外源性胸腺素 α_1 (TAI), 观察能否减轻SAP的严重程度并初步探讨其作用机制。

方法: δ SD 大鼠 54 只随机分为对照组、SAP 组和 TAI 治

疗组。SAP 模型采用 50 g/L 牛黄胆酸钠 1 mL/kg 胰胆管逆行穿刺注射建立, 治疗组造模成功后立即皮下注射 TAI (100 μ g/kg), 对照组仅给予开腹手术。三组大鼠分别在造模后 3, 6, 12 h 处死, 收集外周血与胰腺标本。观察 TAI 对血清淀粉酶、TNF- α 及胰腺组织炎症评分的影响; 同时应用流式细胞术观察外周血 CD3, CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$ T 细胞的变化。

结果: SAP 组与治疗组各时间点血清淀粉酶、TNF- α 水平及胰腺组织炎症评分均显著高于对照组 ($P < 0.01$); 12 h 治疗组与 SAP 组相比, TNF- α 水平明显下降, 胰腺组织炎症评分显著改善 ($P < 0.01$)。SAP 组 3, 6 h 外周血 CD3, CD4 $^{+}$ T 细胞百分率较对照组明显升高 ($P < 0.01$); 但在 12 h