

细菌鞭毛蛋白衍生物CZLC331治疗小鼠溃疡性结肠炎的疗效

王寰, 徐阳, 屈亚威, 张成岗, 刘海峰

王寰, 徐阳, 屈亚威, 刘海峰, 中国人民武装警察部队总医院消化科 北京市 100039

张成岗, 中国人民解放军军事医学科学院放射与辐射医学研究所 蛋白质组学国家重点实验室 全军军事认知与心理卫生研究中心 北京市 100850

王寰, 主要从事消化系统相关疾病研究。

北京市自然科学基金资助项目, No. 7132171

作者贡献分布: 本文由王寰撰写; 徐阳与屈亚威进行实验操作; 张成岗与刘海峰进行实验设计、指导。

通讯作者: 刘海峰, 主任医师, 100039, 北京市海淀区永定路69号, 中国人民武装警察部队总医院消化科。 haifengliu333@163.com
电话: 010-57976549

收稿日期: 2014-07-21 修回日期: 2014-09-04

接受日期: 2014-09-21 在线出版日期: 2014-10-28

Therapeutic effects of CZLC331, a flagellum protein derivative, on ulcerative colitis in mice

Huan Wang, Yang Xu, Ya-Wei Qu, Cheng-Gang Zhang, Hai-Feng Liu

Huan Wang, Yang Xu, Ya-Wei Qu, Hai-Feng Liu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China
Cheng-Gang Zhang, Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences; State Key Laboratory of Proteomics; Research Center for Military Cognition and Mental Hygiene of Chinese PLA, Beijing 100850, China
Supported by: Beijing Natural Science Foundation, No. 7132171

Correspondence to: Hai-Feng Liu, Chief Physician, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, 69 Yongding Road, Haidian District, Beijing 100039, China. haifengliu333@163.com

Received: 2014-07-21 Revised: 2014-09-04

Accepted: 2014-09-21 Published online: 2014-10-28

Abstract

AIM: To assess the therapeutic effects of CZLC331 in mice with ulcerative colitis (UC).

METHODS: UC was induced in mice with 3,4,5-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS). Twenty-four male Balb/c mice were randomly and equally divided into a control group, a UC model group, and a CZLC331 treatment group. After treatment, indexes including general status, disease activity index (DAI), changes in

the colon mucosa and muscularis layer, colonic mucosa damage index (CMDI), and pathological changes of colon tissue were observed.

RESULTS: Compared with the model group, food and water intake and activity increased significantly, and DAI score decreased significantly in the treatment group ($P < 0.05$). Colonic serosal congestion, edema, mucosa bleeding and ulcers were significantly mitigated, and CMDI was significantly decreased in the treatment group compared with the model group ($P < 0.05$). Pathological changes of colon tissue were also significantly reduced, and only disappearance of few goblet cells and lymphocyte and neutrophil infiltration were observed.

CONCLUSION: CZLC331 has a significant therapeutic effect in UC mice.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Ulcerative colitis; CZLC331; Treatment

Wang H, Xu Y, Qu YW, Zhang CG, Liu HF. Therapeutic effects of CZLC331, a flagellum protein derivative, on ulcerative colitis in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(30): 4573-4577 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/4573.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i30.4573>

摘要

目的: 研究细菌鞭毛蛋白衍生物CZLC331对小鼠溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的治疗效果。

方法: 采用2,4,6-三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)溶液灌肠的方法建立小鼠UC模型, 将24只实验小鼠分为模型组、治疗组和对照组, 治疗组是针对模型小鼠造模后4 h腹腔注射3.2 mg/kg CZLC331蛋白。观察指标包括小鼠摄食水量、便血量、皮毛光泽度等一般状态、疾病活动指数(disease activity index, DAI), 小鼠结肠组织黏膜和浆膜

■背景资料

目前溃疡性结肠炎缺乏有效的治疗方法和特效药物。细菌鞭毛蛋白是一种抗原物质, 是5型Toll-like受体激动剂。既往研究显示细菌鞭毛蛋白能对造血系统及胃肠道系统均表现出较显著的保护作用。细菌鞭毛蛋白是否对溃疡性结肠炎有保护治疗作用文献中鲜有报道。

■同行评议者

宋新明, 教授, 主任医师, 中山大学附属第一医院胃肠外科

■ 相关报道

Burdelya等研究表明细菌鞭毛蛋白能有效地预防致死剂量照射引起的小鼠死亡。Vijay-Kumar等研究表明细菌鞭毛蛋白能够有效提高小鼠骨髓中造血干细胞数量,提高照射后小鼠的存活率。Hossain等研究表明:应用鞭毛蛋白成功地减弱了异基因造血干细胞移植后急性移植物抗宿主病的发生,提高了移植后小鼠的存活时间,增强了供者T细胞的植入及Treg细胞的产生。

层变化及结肠黏膜损伤指数(colonic mucosa damage index, CMDI),小鼠结肠组织HE染色的病理改变。

结果:与模型组相比,治疗组小鼠摄食($7\text{ g/d} \pm 1.12\text{ g/d}$)、摄水量($3\text{ mL/d} \pm 0.78\text{ mL/d}$)、活动性($14\text{ min} \pm 5.32\text{ min}$)明显增加,DAI评分(1.55 ± 0.28)显著降低($P < 0.05$);治疗组小鼠结肠浆膜层充血、水肿,黏膜层出血及溃疡等现象亦有所减轻,CMDI评分(2.08 ± 0.46)与模型组比较显著降低($P < 0.05$);治疗组结肠黏膜病理观察细胞排列结构比较整齐、少量杯状细胞消失及淋巴细胞和中性粒细胞浸。

结论:腹腔注射细菌鞭毛蛋白CZLC331可以有效对抗结肠炎症对肠黏膜的损伤,对UC模型小鼠有明显的治疗作用。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 溃疡性结肠炎; CZLC331; 治疗

核心提示: 本实验探索鞭毛蛋白衍生物CZLC331作为治疗溃疡性结肠炎(ulcerative colitis)的全新药物,具有一定的临床指导意义。

王震, 徐阳, 屈亚威, 张成岗, 刘海峰. 细菌鞭毛蛋白衍生物CZLC331治疗小鼠溃疡性结肠炎的疗效. 世界华人消化杂志 2014; 22(30): 4573-4577 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/4573.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i30.4573>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种病因尚未完全明确的慢性非特异性炎症性肠病,多浸润黏膜及黏膜下层^[1-5]。主要表现为腹痛、腹泻、黏液便和血便,并伴有多发性硬化症、视神经炎、骨质疏松等肠外表现。目前临床上缺乏有效的治疗方法和特效药物,主要是对症处理,治疗缺乏特异性,疗程长而且治愈后易于复发,治疗难度极大,已被世界卫生组织确认为现代难治病之一。细菌鞭毛蛋白是一种抗原物质,鞭毛抗原又称H抗原,是5型Toll-like受体(Toll like receptor 5, TLR5)激动剂。既往研究表明细菌鞭毛蛋白能有效地预防致死剂量照射引起的小鼠死亡,也能够有效提高小鼠骨髓中造血干细胞数量,提高照射后小鼠的存活率,对造血系统及胃肠道系统均表现出较显著的保护作用^[6-10]。细菌鞭毛蛋白是否对UC有保护治疗作用文献中鲜有报道。我们采用常规原

核表达方法制备了一种沙门氏菌鞭毛蛋白衍生物,命名为CZLC331,包括Tat蛋白转导肽、沙门氏菌鞭毛蛋白自N端第1-176位氨基酸残基和第402-505位氨基酸残基的融合蛋白,自N端第1-176位氨基酸残基和第402-505位氨基酸残基可通过柔性连接肽连接,纯度>95%。本研究是以三硝基苯磺酸(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)/乙醇建立的小鼠UC动物模型为研究对象,观察CZLC331对UC模型小鼠的预防和治疗效果。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级♂ Balb/c小鼠,6-8周龄,体质量18-22 g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供;2,4,6-三硝基苯磺酸(Sigma公司);液体石蜡(国药集团化学试剂北京有限公司);VMR小动物麻醉机(北京益仁恒业科技有限公司);小鼠灌胃针(北京健力园医疗器械有限公司);1 mL注射器(山东新华安德医疗用品有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型制备: 首先将小鼠采用麻醉机麻醉,然后采用直径2.0 mm、长约5 cm的灌胃针由肛门经缓慢插入(深约3 cm)并将灌肠试剂(含有150 g/L TNBS+380 mL/L乙醇溶液,150 mg/kg)缓慢推入结肠以制备炎症性肠病模型。

1.2.2 实验分组: 分为模型组、治疗组和对照组,每组8只小鼠。对照组是针对正常小鼠用以上方法将380 mL/L乙醇溶液灌肠1次,正常喂养2 d;治疗组是针对模型小鼠,小鼠UC形成后4 h,腹腔注射CZLC331蛋白(3.2 mg/kg体质量),模型组是针对模型小鼠正常喂养2 d。

1.2.3 沙门氏菌鞭毛蛋白衍生物CZLC331蛋白的制备: 首先构建沙门氏菌鞭毛蛋白衍生物CZLC331的原核表达载体pET28b-Tat-CZLC331,然后对原核表达载体pET28b-Tat-CZLC331进行转化及菌体复苏,再对原核表达载体pET28b-Tat-CZLC331进行诱导表达,制备沙门氏菌鞭毛蛋白衍生物CZLC331蛋白样品,最后对沙门氏菌鞭毛蛋白衍生物CZLC331蛋白样品进行分离、纯化得到沙门氏菌鞭毛蛋白衍生物CZLC331蛋白,通过限制性内切酶酶切及测序确证,纯度达95%以上。

1.2.4 观察指标: (1)观察小鼠摄食/水量、活动度、便血等一般状态变化及疾病活动指数DAI评分。参照Jackson等^[11]的方法,计算DAI评分。DAI评分 = (大便性状分数+体质量下降分数+便

表 1 DAI评分标准

计分	体质量下降(%)	大便性状	便血
0	无	正常	阴性
1	1-5	-	-
2	6-10	半稀便	潜血阳性
3	11-15	-	-
4	>15	稀便	肉眼可见血便

表 2 CMDI评分标准

计分	损伤程度	大体形态
0	无	无黏膜充血、水肿和溃疡
1	轻度	黏膜略见充血、水肿, 无糜烂及溃疡形成
2	轻-中度	黏膜充血、水肿较明显, 并出现糜烂、小溃疡, 直径<1 mm
3	中度	黏膜充血水肿较重, 可见多处糜烂, 单个溃疡直径>1 mm
4	中-重度	弥漫充血水肿, 散在多处溃疡和糜烂, 单个溃疡直径1-2 mm
5	重度	弥漫性溃疡和糜烂, 充血水肿严重, 溃疡直径可>2 mm

表 3 小鼠一般情况比较

分组	摄食量(g/d)	摄水量(mL/d)	活动时间(min)
对照组	8 ± 1.01	4 ± 0.56	16 ± 8.34
模型组	4 ± 0.91 ^a	2 ± 0.32 ^a	9 ± 3.14 ^a
治疗组	7 ± 1.12 ^c	3 ± 0.78 ^c	14 ± 5.32 ^c

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组.

表 4 DAI评分比较

分组	DAI评分
对照组	0.00 ± 0.00
模型组	2.09 ± 0.25 ^a
治疗组	1.55 ± 0.28 ^c

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组.

血分数)/3. DAI评分标准如表1; (2)结肠黏膜大体形态观察及黏膜损伤情况评分(colonic mucosa damage index, CMDI). 将清洗洁净的病变组织平展开后置于10倍放大镜下观察, 参照Zingarelli等^[12]对结肠黏膜损伤情况进行CMDI评分. CMDI评分标准如表2; (3)观察组织病理形态学变化: 将结肠病变置于40 g/L甲醛溶液中固定后石蜡包埋、切片和HE染色, 显微镜下观察其病理改变.

统计学处理 各组数据采用mean ± SD表示, SPSS11.0统计软件进行分析, 采用 t 检验, $P < 0.05$

为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 一般情况状态观察及疾病活动指数DAI评分 对照组小鼠摄食、水量正常, 无便血及活动减少等现象. 模型组小鼠摄食/水量明显减少, 活动减少, 皮毛光泽度下降, 血便. 治疗组CZLC331经腹腔注射后, 小鼠便血、少食少动现象有所减轻(摄食/水量、活动性明显增加)(表3). 模型组DAI评分与对照组相比显著增高, 治疗组DAI评分与模型组比较显著降低(表4).

2.2 结肠黏膜大体形态观察及黏膜损伤CMDI评分 对照组小鼠肉眼观察结肠浆膜层光滑, 无充血、水肿, 黏膜层无出血及溃疡. 模型组小鼠肉眼观察结肠浆膜层出现明显的充血、水肿, 黏膜层出现明显的出血及溃疡. 治疗组小鼠CZLC331经腹腔注射后, 肉眼观察结肠浆膜层充血、水肿, 黏膜层出血及溃疡等现象亦有所减轻(图1, 2). 模型组CMDI评分与对照组相比显

■创新盘点

我们采用常规原核表达方法制备了一种沙门氏菌鞭毛蛋白衍生物, 我们命名他为CZLC331, 通过观察小鼠摄食水量、便血量、皮毛光泽度等一般状态、疾病活动指数(disease activity index, DAI), 小鼠结肠组织黏膜和浆膜层变化及结肠黏膜损伤指数(colonic mucosa damage index, CMDI), 小鼠结肠组织HE染色的病理改变, 研究CZLC331对小鼠溃疡性结肠炎的治疗效果.

■应用要点

本实验探索一种鞭毛蛋白衍生物CZLC331作为治疗溃疡性结肠炎的全新药物, 具有极高的现实意义。

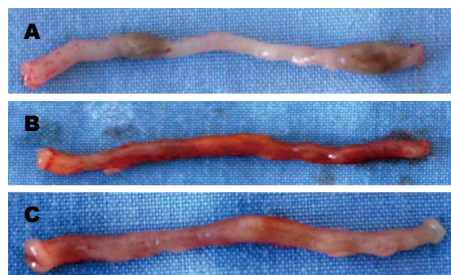


图1 小鼠的结肠浆膜层. A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组.

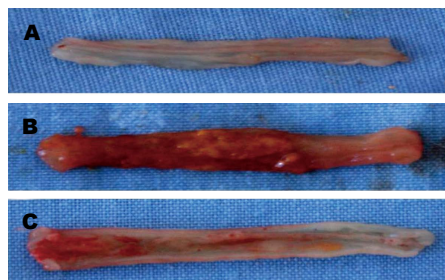


图2 小鼠的结肠黏膜层. A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组.

著增高, 治疗组CMDI评分与模型组比较显著降低(表5).

2.3 病理组织学观察 对照组小鼠病理观察可见细胞排列整齐, 无杯状细胞减少及淋巴细胞和中性粒细胞浸润等现象. 模型组小鼠病理观察可见细胞结构紊乱、杯状细胞消失、淋巴细胞和中性粒细胞浸润等现象. 治疗组小鼠CZLC331经腹腔注射后, 病理观察可见细胞排列结构比较整齐、少量杯状细胞消失及淋巴细胞和中性粒细胞浸(图3).

3 讨论

UC是严重影响人类健康的疾病, 由于UC的发病机理至今尚不明确, 因而在临床上无法进行针对病因进行有效的治疗, 从1888年至今, 5-氨基水杨酸始终是UC的一线治疗药物, 但其治疗效果并不理想. 即使在发病率较高的欧美发达国家, 也并无治疗UC的特效药^[13], 随着病情的恶化, 往往不得不进行全结肠切除术, 给患者带来了极大的痛苦. 因此迫切需要一种能针对病因进行有效治疗的临床药物, 来缓解患者的痛苦.

细菌鞭毛蛋白是一种抗原物质, 鞭毛抗原又称H抗原, 是TLR5激动剂, 对TLR5-NF- κ B信号通路具有激活作用^[7,14], 与TLR家族信号通路具有密切关系. TLR家族是一类参与病原微生物引起的先天免疫的蛋白受体家族. 近年来TLR在机体免疫应答中的作用受到高度关注. TLR不仅

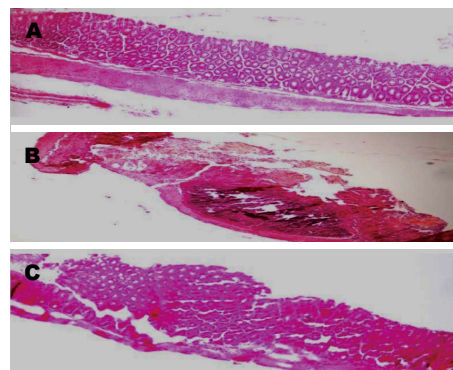


图3 小鼠结肠黏膜组织切片后HE染色结果. A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组.

表5 CMDI评分比较

分组	CMDI评分
对照组	0.00 \pm 0.00
模型组	3.03 \pm 0.42 ^a
治疗组	2.08 \pm 0.46 ^c

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$ vs 模型组.

在激活天然免疫中发挥重要作用, 而且还在诱导和调节获得性免疫中具有重要意义, 是连接天然免疫和获得性免疫的重要桥梁. 目前已发现13种TLR^[15], 细菌鞭毛蛋白是目前已知的唯一的TLR5特异性配体. 既往研究表明在放射损伤小鼠模型中, 鞭毛蛋白衍生物对造血系统及胃肠道系统均表现出较显著的保护作用. Burdelya等^[7]研究表明细菌鞭毛蛋白能有效地预防致死剂量照射引起的小鼠死亡. Vijay-Kumar等^[8]研究表明细菌鞭毛蛋白能够有效提高小鼠骨髓中造血干细胞数量, 提高照射后小鼠的存活率. Hossain等^[10]对小鼠的研究成果表明: 应用鞭毛蛋白成功地减弱了异基因造血干细胞移植后急性移植抗宿主病的发生, 提高了移植后小鼠的存活时间, 增强了供者T细胞的植入及Treg细胞的产生. 细菌鞭毛蛋白是否对UC有保护作用文献中鲜有报道. 我们采用常规原核表达方法制备了一种沙门氏菌鞭毛蛋白衍生物, 我们命名他为CZLC331, 包括Tat蛋白转导肽、沙门氏菌鞭毛蛋白自N端第1-176位氨基酸残基和第402-505位氨基酸残基的融合蛋白, 自N端第1-176位氨基酸残基和第402-505位氨基酸残基可通过柔性连接肽连接, 纯度>95%. 本研究是以TNBS/乙醇建立的小鼠UC动物模型为研究对象, 观察CZLC331对UC模型小鼠的治疗效果, 我们

研究发现, CZLC331对UC的治疗效果显著: 与模型组相比, 治疗组小鼠摄食/水量、活动性明显增加, DAI评分显著降低($P<0.05$); 治疗组小鼠结肠浆膜层充血、水肿, 黏膜层出血及溃疡等现象亦有所减轻, CMDI评分与模型组比较显著降低($P<0.05$); 治疗组结肠黏膜病理观察细胞排列结构比较整齐、少量杯状细胞消失及淋巴细胞和中性粒细胞浸。我们研究显示CZLC331对UC小鼠具有明显的预防和治疗效果。

本研究显示鞭毛蛋白衍生物CZLC331对UC小鼠具有明显的治疗作用, 但机制不明确, 是否与调节白介素家族和肿瘤坏死因子的水平有关, 是否与TLR-NF- κ B通路存在一定联系, 有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 孔磊, 王威, 孙景武, 万玉良. 溃疡性结肠炎的研究进展. 临床荟萃 2009; 9: 823-825
- 2 Yamamoto-Furusho JK, Uscanga LF, Vargas-Alarcón G, Ruiz-Morales JA, Higuera L, Cutiño T, Rodríguez-Pérez JM, Villarreal-Garza C, Granados J. Clinical and genetic heterogeneity in Mexican patients with ulcerative colitis. *Hum Immunol* 2003; 64: 119-123 [PMID: 12507822]
- 3 Campieri M, Gionchetti P. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. *Gut* 2001; 48: 132-135 [PMID: 11115835]
- 4 侯庆芬, 王欣妮. 溃疡性结肠炎病因与发病机制的研究. 中外医疗 2009; 20: 168
- 5 王立春, 马鑫, 胡强基, 吴仕九. 溃疡性结肠炎的病因及相关问题探讨. 山东中医杂志 2001; 4: 10-14
- 6 Rhee SH, Im E, Riegler M, Kokkotou E, O'Brien M, Pothoulakis C. Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 13610-13615 [PMID: 16157881]
- 7 Burdelya LG, Krivokrysenko VI, Tallant TC, Strom E, Gleiberman AS, Gupta D, Kurnasov OV, Fort FL, Osterman AL, Didonato JA, Feinstein E, Gudkov AV. An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. *Science* 2008; 320: 226-230 [PMID: 18403709]
- 8 Vijay-Kumar M, Aitken JD, Sanders CJ, Frias A, Sloane VM, Xu J, Neish AS, Rojas M, Gewirtz AT. Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation. *J Immunol* 2008; 180: 8280-8285 [PMID: 18523294]
- 9 龚旭东, 马梁明, 朱镭, 郭慧敏, 任连生, 任瑞瑞, 张华屏, 卫芬, 牛燕燕. TLR5激动剂鞭毛蛋白预防小鼠异基因造血干细胞移植后急性移植物抗宿主病的初步研究. 中国实验血液学杂志 2012; 20: 965-970
- 10 Hossain MS, Roback JD, Gewirtz AT, Waller EK. Flagellin, A TLR5 Agonist, Facilitates Production of foxp3+CD4+CD25+ Regulatory T Cells to Maintain Balanced Immune Reconstitution in Allogeneic BMT without GvHD. *Biology Blood Marrow Transplantation* 2009; 15: Supplement 1-164
- 11 Jackson LN, Zhou Y, Qiu S, Wang Q, Evers BM. Alternative medicine products as a novel treatment strategy for inflammatory bowel disease. *Am J Chin Med* 2008; 36: 953-965 [PMID: 19051360]
- 12 Zingarelli B, Hake PW, Burroughs TJ, Piraino G, O'Connor M, Denenberg A. Activator protein-1 signalling pathway and apoptosis are modulated by poly(ADP-ribose) polymerase-1 in experimental colitis. *Immunology* 2004; 113: 509-517 [PMID: 15554929]
- 13 Liu Z, Yadav PK, Xu X, Su J, Chen C, Tang M, Lin H, Yu J, Qian J, Yang PC, Wang X. The increased expression of IL-23 in inflammatory bowel disease promotes intraepithelial and lamina propria lymphocyte inflammatory responses and cytotoxicity. *J Leukoc Biol* 2011; 89: 597-606 [PMID: 21227898]
- 14 Wang HD, Lu DX, Qi RB. Therapeutic strategies targeting the LPS signaling and cytokines. *Pathophysiology* 2009; 16: 291-296 [PMID: 19321321]
- 15 任美玉, 吴欣怡. Toll样受体的研究进展. 现代免疫学 2006; 26: 340-342

■同行评价

UC的药物治疗缺乏有效性。本实验在动物模型做一些尝试, 具有一定的临床指导意义。

编辑 田滢 电编 闫晋利

