

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.03.004

Poly I:C 对急性期溃疡性结肠炎小鼠肠黏膜屏障的影响*

赵红伟¹,岳月红²,郎晓猛³,和丽丽⁴,朱叶珊^{5△}

(1. 河北省人民医院消化内科,石家庄 050051;2. 河北省人民医院神经内科,石家庄 050051;

3. 河北省中医院脾胃科,石家庄 050051;4. 河北省人民医院老年病科,石家庄 050051;

5. 河北省唐山市中医医院脾胃科 063000)

[摘要] **目的** 研究 Poly I:C 对急性期溃疡性结肠炎模型小鼠肠道黏膜屏障调节作用。**方法** 30 只小鼠随机分为正常对照组、模型组、Poly I:C 组,建立急性溃疡性结肠炎动物模型;观察小鼠一般活动情况及结肠病理学变化、应用免疫组织化学荧光染色法测定结肠组织水闸蛋白(claudin-1)、闭锁小带(zo-1)蛋白表达的变化。**结果** 实验期间,Poly I:C 干预治疗后模型小鼠的一般情况有明显改善;模型组小鼠结肠黏膜缺损,腺体破坏或消失,可见黏膜、黏膜下层甚至肌层大量炎性细胞浸润;Poly I:C 组可见炎性细胞浸润少,炎症程度较模型组明显减轻。与模型组比较,经过 Poly I:C 治疗后结肠组织黏膜中 claudin-1、zo-1 蛋白的荧光表达明显增强。**结论** Poly I:C 对急性期溃疡性结肠炎模型小鼠肠道黏膜屏障有调节作用。

[关键词] 结肠炎,溃疡性;结肠疾病;疾病模型,动物;黏膜;Poly I:C;肠道黏膜屏障**[中图分类号]** R574.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)03-0299-03

Effects of Poly I:C on intestinal mucosal barrier in mice acute ulcerative colitis*

Zhao Hongwei¹, Yue Yuehong², Lang Xiaomeng³, He Lili⁴, Zhu Yeshan^{5△}

(1. Department of Gastroenterology, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang,

Hebei 050051, China; 2. Department of Neurology, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang,

Hebei 050051, China; 3. Department of Spleen and Stomach, Hebei Provincial Hospital of

Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang, Hebei 050051, China; 4. Department of Geriatrics,

Hebei Provincial People's Hospital, Hebei 050051, China; 5. Department of Spleen and Stomach,

Tangshan Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the regulatory effects of polyinosinic polycytidylic acid (Poly I:C) on the intestinal mucosal barrier in acute ulcerative colitis model mice. **Methods** Thirty mice were randomly grouped as the normal group, model group and Poly I:C group. The acute ulcerative colitis animal model was established. The general condition and colon pathological changes in mice were observed. The expressions of claudin-1 proteins and zonula occluden-1 (zo-1) proteins were detected by immunohistochemical fluorescence staining. **Results** During the experiment, the general condition after Poly I:C intervention in the model group was significantly changed, colonic mucous membrane were defected, glands were destroyed or disappeared, a large number of inflammatory cells infiltration could be seen in the mucous membrane, submucous layer and even muscle layer, but little inflammatory cells infiltration was seen in the Poly I:C group, the inflammatory degree was significantly alleviated compared with the model group; compared with the model group, the fluorescence expression of claudin-1 and zo-1 protein after Poly I:C treatment in colonic mucous membrane tissue was significantly enhanced. **Conclusion** Poly I:C has the regulatory effect on the intestinal mucosal barrier in the acute ulcerative colitis model mice.

[Key words] colitis, ulcerative; colonic disease; disease model, animal; mucous membrane; Poly I:C; intestinal mucosal barrier

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种高复发的肠道炎症性疾病。近年来,研究学者认为本病发病基础是:肠黏膜屏障削弱,肠道致病菌群及其有害成分穿过黏膜屏障,引发局部免疫反应^[1-2]。Poly I:C(polyinosinic polycytidylic acid)可诱导分泌的 I 型干扰素,可增强机体的初期抗体应答^[3],对急性 UC 模型小鼠的肠道黏膜屏障是否有调节作用仍需进一步研究。

1 材料与方

1.1 材料 右旋葡聚糖硫酸钠(DSS, Sigma 公司,美国); Poly I:C(Sigma 公司,美国);兔多抗 zo-1 抗体(invitrogen);鼠抗 claudin-1 抗体(Santa Cruz 公司,美国);Cy3 标记的山羊抗小

鼠免疫球蛋白 G(IgG)抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗兔 IgG 抗体(碧云天分进口产品)。

1.2 方法

1.2.1 急性期造模及 Poly I:C 干预 30 只雄性 C57BL/6 小鼠(体质量 18~22 g, 7~12 周),购于北京维通利华实验动物技术有限公司。按随机数字表法分入正常对照组、模型组和 Poly I:C 组,每组 10 只。模型组自由饮用 2% DSS 7 d,正常对照组和 Poly I:C 组小鼠自由饮用蒸馏水 7 d; Poly I:C 组只在造模前给予 0.3 mg/kg Poly I:C,一次性肌肉注射给药;空白对照组和模型组同时给予生理盐水同等剂量肌肉注射作为对照,时间均为 1 周,第 8 天处死所有小鼠。

* 基金项目:河北省卫生厅科研基金项目(20160483)。 作者简介:赵红伟(1979-),主治医师,博士,主要从事消化病方面研究。

△ 通信作者, E-mail: zhuyeshan@sina.com。

1.2.2 小鼠一般情况及结肠病理组织染色 每天观察小鼠的精神状态、体质量、活动情况、毛发光泽度、食欲、大便性状等。在实验结束时处死大鼠,取部分肠段置于多聚甲醛内固定,包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色,行组织病理学观察。

1.2.3 肠组织免疫荧光染色 新鲜肠组织以 $5\ \mu\text{m}$ 的厚度进行连续冰冻切片,按以下步骤进行闭锁小带(zo-1)、水闸蛋白(claudin-1)的免疫荧光染色:4%多聚甲醛固定 10 min,免疫染色洗涤液洗 5 min 3 次,封闭液封闭,室温 1 h,加兔抗 zo-1 多克隆抗体/小鼠抗 claudin-1 单克隆抗体,4℃过夜,洗涤液洗 5 min 3 次,滴加标记绿色荧光的抗兔 FITC/标记红色荧光的抗小鼠 Cy3,室温 1 h。绿色荧光/红色荧光为阳性表达。阴性对照用磷酸盐缓冲液(PBS)替代一抗,其余步骤同上。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 SNK 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

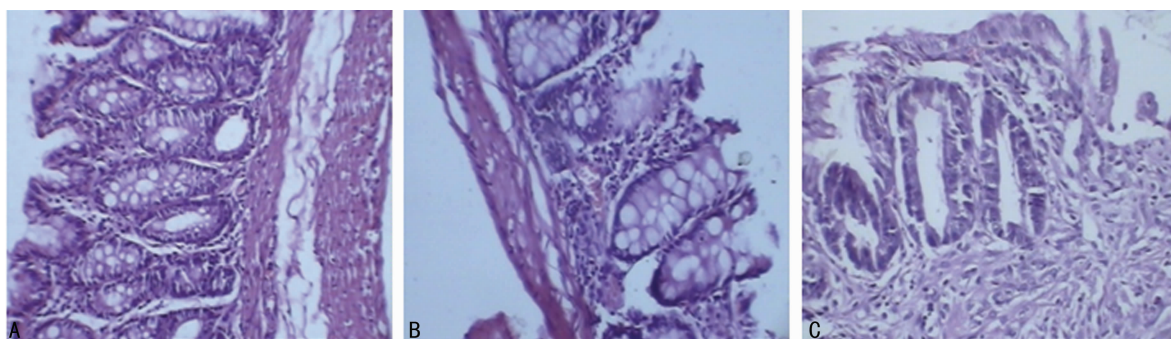
2 结 果

2.1 动物的一般状况 实验期间,正常对照组小鼠大小便正常,体质量持续增加,毛发有光泽,活动、精神状态均正常。急

性期模型组动物饮用 2% DSS 水后第 1 天,体质量增长,饮水、进食较多;饮用 2% DSS 第 3 天,开始精神萎靡,懒于活动,被毛松散无泽,食量下降,拉黏液血便,体质量下降,粪便潜血试验呈强阳性;实验第 8 天模型组小鼠体质量明显减轻,肛周可见肉眼血便。Poly I:C 组第 5~7 天,便稀,但未见脓血便,状态接近正常,但体质量仍明显减轻。

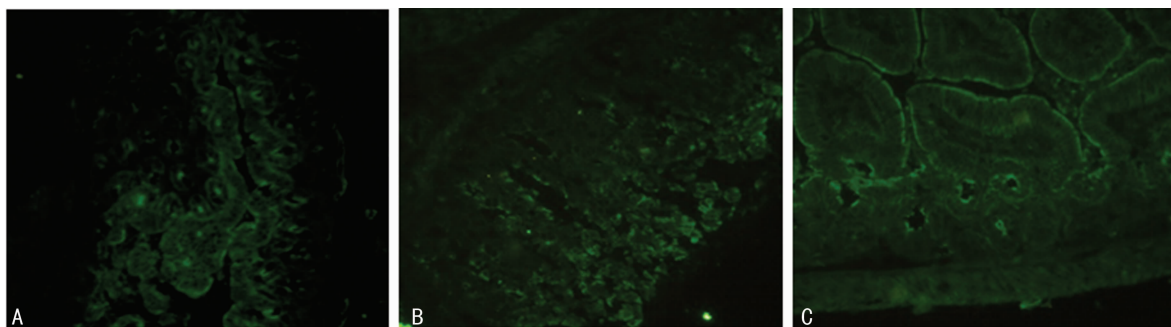
2.2 Poly I:C 对小鼠结肠组织病理学变化的影响 正常对照组结肠黏膜光滑,无水肿、充血等表现;模型组小鼠结肠黏膜缺损,可见黏膜、黏膜下层甚至肌层大量炎性细胞浸润。Poly I:C 组的小鼠结肠病理较模型组明显改善,见图 1。

2.3 免疫荧光染色检测结肠黏膜紧密连接蛋白(TJ)的定位分布 与免疫组织化学相比,TJ 的免疫荧光表达更具有特异性。激光共聚焦显微镜下见 zo-1 蛋白呈现绿光,claudin-1 蛋白呈现红光。急性期正常对照组 zo-1、claudin-1 蛋白表达可见荧光沿胞膜分布,荧光强度高,边缘光滑;模型组荧光分布较正常对照组分散,荧光强度减弱,边缘粗糙呈锯齿状;Poly I:C 组荧光仍沿胞膜分布,强度较正常对照组稍减弱,但仍强于模型组,见图 2、3。



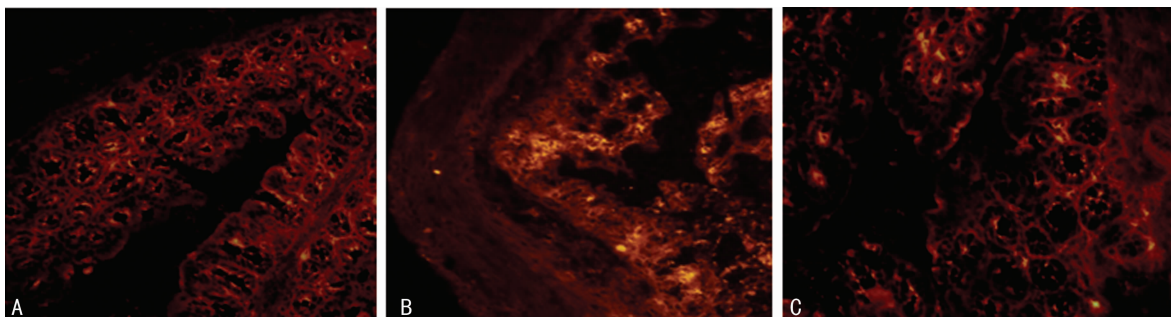
A:正常对照组;B:模型组;C:Poly I:C组。

图 1 各组小鼠结肠组织病理学变化($\times 200$)



A:正常对照组;B:模型组;C:Poly I:C组。

图 2 各组小鼠结肠组织 zo-1 蛋白表达($\times 200$)



A:正常对照组;B:模型组;C:Poly I:C组。

图 3 各组小鼠结肠组织 claudin-1 蛋白表达($\times 200$)

3 讨 论

目前研究显示,UC 的发病机制可能与肠道黏膜屏障功能减弱,诱导局部免疫反应有关^[4]。Poly I:C 是一种人工合成的 dsRNA,可形成长期的免疫记忆,对多种免疫系统疾病均有治疗作用^[5-7]。

黏膜屏障功能缺陷和 TJ 蛋白的减少均有利于微生物抗原进入肠黏膜固有层,诱发异常的黏膜免疫应答。故此,肠道黏膜屏障的功能受损可以被认为是 UC 发病的始动因素之一^[8-10]。肠上皮 TJ 对于屏障功能的维持和 TJ 的完整性具有重要作用,肠黏膜上皮 TJ 是由一系列的细胞质蛋白、细胞骨架元素和几种跨膜蛋白组成^[11]。UC 发生时,与肠黏膜通透性密切相关的 TJ 的 zo-1 和 claudin-1 首先从位置分布上发生了改变,正常情况下分布于细胞边缘,沿细胞膜分布;而 UC 发生时 zo-1 和 claudin-1 分布不均,染色变淡,线条模糊,边缘粗糙有刺状突起,分布散乱,稀疏,结肠黏膜紧密连接蛋白的表达明显下降,经过 Poly I:C 治疗后,结肠黏膜的上皮层紧密连接蛋白 zo-1 和 claudin-1 分布均匀,线条清晰,边缘整齐。可见 Poly I:C 在急性 UC 模型小鼠保护肠黏膜屏障过程中起重要作用,为临床上 UC 治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] Dupont A, Kaconis Y, Yang I, et al. Intestinal mucus affinity and biological activity of an orally administered anti-bacterial and anti-inflammatory peptide[J]. *Gut*, 2015, 64(2):222-232.
- [2] Long TM, Nisa S, Donnenberg MS, et al. Enteropathogenic escherichia coli inhibits type I interferon-and RNase L-mediated host defense to disrupt intestinal epithelial cell barrier function [J]. *Infect Immun*, 2014, 82(7):2802-2814.
- [3] Das A, Chai JC, Kim SH, et al. Transcriptome sequencing of microglial cells stimulated with TLR3 and TLR4 ligands[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1):517-538.
- [4] Nowarski R, Jackson R, Gagliani N, et al. Epithelial IL-18

equilibrium controls barrier function in colitis[J]. *Cell*, 2015, 163(6):1444-1456.

- [5] Ghaemi A, Sajadian A, Khodaie B, et al. Immunomodulatory effect of Toll-Like receptor-3 ligand 1 Poly I:C on cortical spreading depression[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(1):143-154.
- [6] Hartog A, Belle FN, Bastiaans J, et al. A potential role for regulatory T-cells in the amelioration of DSS induced colitis by dietary non-digestible polysaccharides[J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(3):227-233.
- [7] Rao YX, Chen J, Chen LL, et al. The impact of dietary methionine-restriction on tight junction expression and function in a rat colonitis model[J]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2013, 52(6):503-509.
- [8] Toumi R, Abdelouhab K, Rafa H, et al. Beneficial role of the probiotic mixture Ultrabiotique on maintaining the integrity of intestinal mucosal barrier in DSS-induced experimental colitis [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2013, 35(3):403-409.
- [9] Miyata R, Kakuki T, Nomura K, et al. Poly(I:C) induced microRNA-146a regulates epithelial barrier and secretion of proinflammatory cytokines in human nasal epithelial cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015(761):375-382.
- [10] Marafini I, Monteleone I, Di Fusco D, et al. TNF- α producing innate lymphoid cells (ILCs) are increased in active celiac disease and contribute to promote intestinal atrophy in mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5):e0126291.
- [11] Ko R, Park JH, Ha H, et al. Glycogen synthase kinase 3beta ubiquitination by TRAF6 regulates TLR3-mediated pro-inflammatory cytokine production[J]. *Nat Commun*, 2015(6):6765-6777.

(收稿日期:2016-07-24 修回日期:2016-09-10)

(上接第 298 页)

- 凋亡的研究进展[J]. *环境与健康杂志*, 2013, 30(2):182-185.
- [4] 金姝, 王颖, 张勇, 等. 肿瘤抗原-线粒体蛋白 12 对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响[J]. *现代免疫学*, 2011, 31(4):268-274.
- [5] Song W, Yang HB, Chen P, et al. Apoptosis of human gastric carcinoma SGC-7901 induce by deoxycholic acid via the mitochondrial-dependent pathway[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 171(4):1061-1071.
- [6] Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, et al. The role of Dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis[J]. *Dev Cell*, 2001(1):515-525.
- [7] 姚明忠, 赵伟康. $A\beta$ 诱导海马神经元凋亡的机制及补肾方的调控作用[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 21(6):450-452.

- [8] 陈伟, 陈宁, 浅析 c-JNK 在细胞凋亡线粒体途径中的作用机制及其运动性干预[J]. *南京体育学院学报(自然科学版)*, 2015, 14(6):20-24.
- [9] 冯泳, 何前松, 时京珍, 等. 小半夏加茯苓汤的研究概况[J]. *江苏中医药*, 2008, 40(2):84-86.
- [10] 杨长福, 冯泳, 何前松. 小半夏加茯苓汤方含药血清抑制 HepG2 细胞增殖及促进凋亡[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(8):168-171.
- [11] 杨林森, 何光志, 何前松, 等. 小半夏加茯苓汤及其组分对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用和脾脏 caspase-3 基因表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(3):868-871.
- [12] 韦佳, 杨长福, 陈倩, 等. 小半夏加茯苓汤对 H22 荷瘤小鼠瘤体中颗粒酶 B 和穿孔素表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(9):2086-2089.

(收稿日期:2016-07-11 修回日期:2016-09-26)