

消退素 D1 调节巨噬细胞自噬对实验性结肠炎小鼠的影响

余沛君, 方晨, 梅咏玉, 杨彬, 刘晓昌, 许建明, 梅俏

摘要 目的 探讨消退素 D1 对实验性结肠炎的保护作用及其可能机制。方法 将小鼠随机分为正常对照组、RvD1 对照组、模型对照组、RvD1 给药组。以 5% DSS 溶液自由饮用的方法制备结肠炎模型, RvD1 (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 于第 2、4、6 天行小鼠腹腔注射。实验过程中进行疾病活动指数 (DAI) 评分; 实验结束制备小鼠腹腔巨噬细胞并留取小鼠结肠组织。测定组织损伤指数 (HI)、髓过氧化物酶 (MPO) 和细胞因子水平; 电镜观察腹腔巨噬细胞自噬体结构; 实时荧光定量 PCR 法、Western blot 法检测 Beclin-1、p62、LC3-II、pro-IL-1 β 等相关标志物的表达水平并进行评价分析。结果 相比模型对照组, RvD1 给药组 DAI 评分、HI 指数、MPO 含量、促炎细胞因子含量降低 ($P < 0.05$)。小鼠腹腔巨噬细胞 Beclin-1、LAMP-2、LC3-II/LC3-I 表达增加, iNOS、IL-1 β 、p62 表达减低 ($P < 0.05$)。结论 RvD1 具有改善实验性结肠炎作用, 机制可能与调节巨噬细胞中的自噬受损有关。

关键词 炎症性肠病; 葡聚糖硫酸钠; 消退素 D1; 自噬

中图分类号 R 332; R 322.45; R 392.12

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)06-0860-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.06.008

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是临床常见的慢性消化道疾病, 复发率高, 其发生发展与炎症免疫反应的失调密切相关^[1]。研究^[2]表明巨噬细胞参与 IBD。相关分子模式经识别后, 触发 NF- κ B 信号通路激活和炎症体活化, 促进炎症因子合成^[3]。炎症反应产生的线粒体活性氧等物质通过细胞自噬清除, 维持机体稳态^[4]。自噬流的动态过程出现障碍, 将导致自噬受限, 加重炎症发生发展过程。因此, 自噬可能通过不同机制调控机体炎症过程。消退素 D1 (resolvin D1, RvD1) 是一种多不饱和脂肪酸衍生物, 具有抗炎作用。Bento et al^[5]、Liao et al^[6] 研究提示 RvD1 可以减轻机体炎症反应, 但 RvD1 影响结肠炎的作用机制尚不清楚。该研究通过 RvD1 对实验性结肠炎小鼠自噬的影响, 探究

RvD1 对结肠炎的作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料与动物

1.1.1 实验动物 C57BL/6 雄性小鼠 32 只, 体重 (20 $\pm$ 2) g, 由安徽省动物中心提供。标准环境饲养 1 周。

1.1.2 主要药品与试剂 葡聚糖硫酸钠购自美国 Sigma 公司; RvD1 购自美国 Cayman 公司; 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素-1 (interleukin 1, IL-1)、IL-6、IL-10 等的 ELISA 试剂盒购自武汉新启迪生物科技有限公司; MPO 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 抗 LC3-I、LC3-II、Beclin1 抗体购自美国 Abcam 公司; 抗诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、IL-1 β 、IL-1 β 前体、溶酶体相关膜蛋白 2 (lysosomal-associated membrane protein 2, Lamp2) 抗体购自北京 Bioss 生物科技有限公司; 抗 β -actin 抗体购自北京市中杉生物科技有限公司; DNA 合成试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司; 荧光定量 PCR 试剂盒购自德国 Qiagen 公司。

1.2 方法

1.2.1 分组 将小鼠采用随机分组法均分为正常对照组、RvD1 对照组、模型对照组和 RvD1 给药组。对正常对照组及 RvD1 对照组小鼠, 让其自由饮用等量蒸馏水处理; 对模型对照组及 RvD1 给药组小鼠, 让其自由饮用由实验室制备的 5% DSS 溶液处理, 搭建实验性结肠炎模型^[7]。RvD1 溶于含 3% DMSO 的生理盐水, 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。实验第 2、4、6 天, RvD1 对照组和 RvD1 给药组腹腔注射 RvD1, 正常对照组和模型对照组腹腔注射等体积含 3% DMSO 的生理盐水。实验 7 d 后处死小鼠, 留取小鼠结肠组织待测, 同时制备腹腔巨噬细胞。

1.2.2 小鼠结肠炎严重程度评价 用疾病活动指数 (disease activity index, DAI) 进行实验评分^[8], 评价各组小鼠结肠炎严重程度。取小鼠结肠组织 HE 染色, 光学显微镜下观察, 进行组织学损伤指数 (histological index, HI) 评分^[9]。

1.2.3 腹腔巨噬细胞分离提取和透射电镜观察

2020-03-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81470809)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院消化内科, 安徽省消化病重点实验室, 合肥 230022

作者简介: 余沛君, 男, 硕士研究生;

梅俏, 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: meiqiao@hotmail.com

按文献^[10]方法, PBS 溶液冲洗小鼠腹腔, 灌洗液离心后在 RPMI-1640 完全培养基(含 10% FBS 和 1% 青-链霉素)中进行细胞培养。经 PBS 洗涤, 收集的黏附细胞即为腹腔巨噬细胞。将腹腔巨噬细胞离心, 固定, 脱水, 环氧丙烷处理, 包埋, 切片, 于电镜下观察腹腔巨噬细胞内自噬体结构。

1.2.4 ELISA 法检测各组结肠组织髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)和细胞因子含量 结肠组织匀浆离心取上清液, 检测结肠组织中 MPO、IL-1、IL-6、IL-10 和 TNF- α 含量。

1.2.5 qPCR 法检测小鼠腹腔巨噬细胞中 IL-1 β 、iNOS 及自噬相关基因 mRNA 的表达 取小鼠腹腔巨噬细胞, 提取总 RNA, 经 DNA 合成试剂盒辅助, 促进 RNA 生物反转录为 cDNA。经实时荧光定量 PCR 试剂盒开始 PCR。该生化反应过程需要如下基本条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 共计 40 个反应循环。根据实验结果绘制扩增曲线, 产生熔解曲线, 以 β -actin 基因作为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算相对表达量。引物的主要序列情况见表 1。

1.2.6 Western blot 法检测小鼠腹腔巨噬细胞中 iNOS、IL-1 β 及自噬相关蛋白的表达 将小鼠腹腔中的巨噬细胞取出并进行离心操作, PBS 洗涤 3 次弃上清液, 加入裂解液, 离心收集上清液, SDS-PAGE 凝胶电泳转移至 PVDF 膜, 封闭 2 h。膜与一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 一抗为: LC3-I (1 : 10 000); LC3-II (1 : 900); LAMP2 (1 : 300); Beclin1 (1 : 1 000); p62 (1 : 300); IL-1 β (1 : 300); pro-IL-1 β (1 : 300); iNOS

抗体(1 : 300)。PBST 洗膜 3 次, 加入一定量的辣根过氧化物酶进行二抗标记, 在室温条件下孵育, 并进行 3 次 PBST 洗涤, 显影。该实验以 β -actin 作为内参, 应用 ECL 发光试剂盒对蛋白检测, 应用 ImageJ 软件系统分析评价蛋白条带的灰度值。

1.3 统计学处理 SPSS 22 统计学软件被全方位应用于本次实验研究, 实验产生的所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 形式表达, 组间比较应用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RvD1 对实验性结肠炎小鼠肠道炎症的影响

相比较正常对照组, 模型对照组 DAI 评分提升, HI 评分有所增加, MPO 含量上升, 与模型对照组比较, RvD1 给药组 DAI 评分、HI 评分和 MPO 含量减低($P < 0.05$), 见图 1A、B、C。结肠组织病理学观察发现模型对照组结肠组织可见大量炎性细胞浸润, 黏膜上皮细胞形态改变, 杯状细胞、隐窝减少; RvD1 给药组结肠组织炎性细胞浸润减少, 隐窝数量基本正常。见图 1D。

2.2 RvD1 对实验性结肠炎小鼠结肠组织细胞因子含量的影响 相比正常对照组, 模型对照组小鼠结肠组织 IL-1、IL-6、TNF- α 的含量提升, IL-10 水平降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。相比较模型对照组, 在 RvD1 给药组中, 小鼠结肠组织 IL-1、IL-6、TNF- α 的水平降低, IL-10 含量增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 实时荧光定量 PCR 法引物序列

mRNA	引物序列
IL-1 β	5'-GAAGAAGAGCCCATCCTCTG-3'和 5'-TCATCTCGGAGCCTGTACTG-3'
iNOS	5'-CCTTCTCTGCTGCTCAAC-3'和 5'-CTTCAGAGTCTGCCCATTCG-3'
LC3-I	5'-GAAGAAGAGCCCATCCTCTG-3'和 5'-TGACTCAGAAGCCGAAGGTT-3'
LC3-II	5'-TGAGTGTGTCCACTCCCATC-3'和 5'-ATGTCTCTGCGAGGCATAA-3'
Beclin1	5'-GCACCATGCAGGTGAGCTTC-3'和 5'-TTTCGCCTGGGCTGTGGTAA-3'
LAMP2	5'-AACACCCACTCCAACCTCAA-3'和 5'-GTAGCCAGCAGACAGGTAG-3'
p62	5'-AGGGAAGTGCAGCACACACT-3'和 5'-TGCCTGCCACCTTTCACTCA-3'
β -actin	5'-AGTGTGACGTTGACATCCGT-3'和 5'-TGCTAGGAGCCAGAGCAGTA-3'

表 2 RvD1 对实验性结肠炎小鼠结肠组织细胞因子含量的影响 (pg/ml $\bar{x} \pm s$ $n=8$)

组别	IL-1	IL-6	IL-10	TNF- α
正常对照	147.26 $\pm$ 17.77	72.62 $\pm$ 8.12	99.24 $\pm$ 4.57	112.25 $\pm$ 13.21
RvD1 对照	160.13 $\pm$ 16.11	71.4 $\pm$ 9.22	105.13 $\pm$ 10.42	113.66 $\pm$ 14.53
模型对照	608.26 $\pm$ 40.34*	413.28 $\pm$ 29.52*	53.22 $\pm$ 4.56*	554.52 $\pm$ 48.88*
RvD1 给药	291.23 $\pm$ 62.23 [#]	245.28 $\pm$ 31.23 [#]	73.32 $\pm$ 5.24 [#]	212.34 $\pm$ 18.72 [#]
F 值	242.266	428.766	104.062	449.495
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型对照组比较: [#] $P < 0.05$

2.3 RvD1 对实验性结肠炎小鼠腹腔巨噬细胞自噬体结构的影响 在实验中通过透射电镜观察小鼠腹腔巨噬细胞并对巨噬细胞自噬泡体积分析可以发现 相比较正常对照组,模型对照组自噬泡体积增大,RvD1 给药组小鼠腹腔巨噬细胞内自噬泡与模型对照组相比较体积缩小,见图2。

2.4 RvD1 对实验性结肠炎小鼠腹腔巨噬细胞中 IL-1 β 、iNOS 及自噬相关表达的影响 相比较正常对照组,在模型对照组中,小鼠腹腔巨噬细胞内 Beclin-1、LAMP-2、LC3-II / LC3-I mRNA 及其蛋白表达量降低,iNOS、IL-1 β 、p62 mRNA 及其蛋白表达量

增加($P < 0.05$)。与模型对照组比较,RvD1 给药组小鼠腹腔巨噬细胞内 Beclin-1、LAMP-2、LC3-II / LC3-I mRNA 及其蛋白表达量提升,iNOS、IL-1 β 、p62 mRNA 及其蛋白表达量降低($P < 0.05$)。见图3。

3 讨论

IBD 是一种肠道慢性复发性炎症性疾病,近年来发病率逐渐增高并且病程反复、难以治愈。目前主要临床治疗用药 5-氨基水杨酸制剂、糖皮质激素、免疫抑制剂等存在药物不良反应,开发新型高效

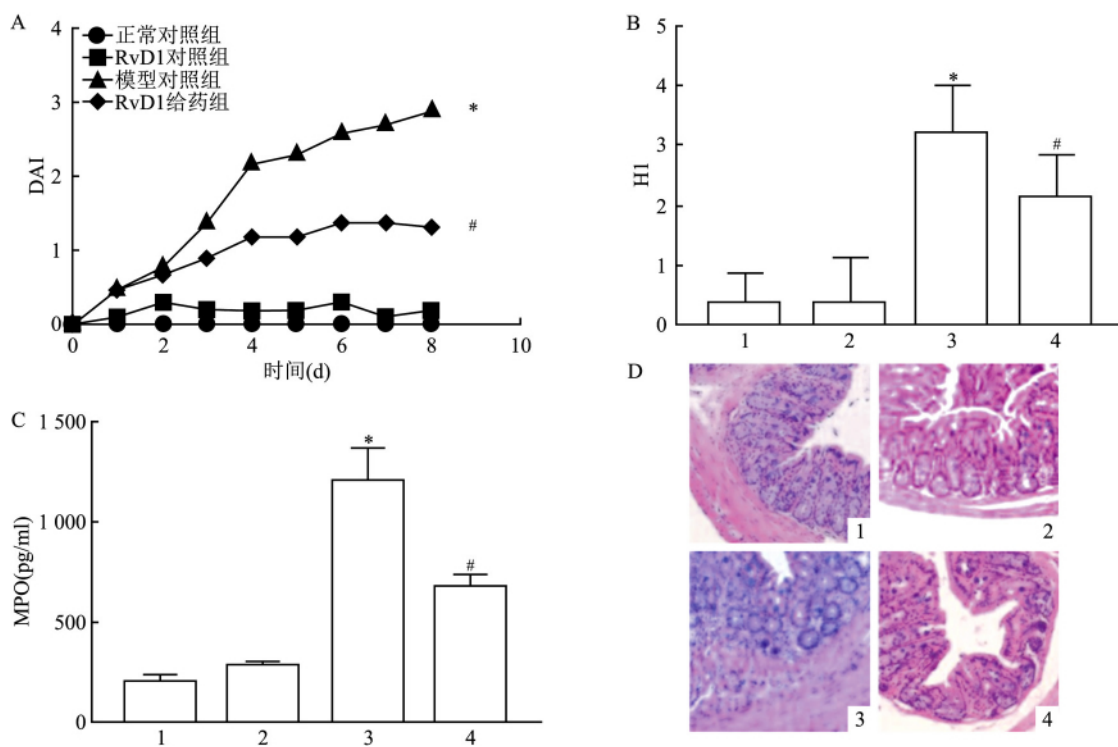


图1 RvD1 对 DSS 结肠炎小鼠肠道炎症的影响

A: 各组小鼠每日 DAI 变化比较; B: 各组小鼠每日 HI 变化比较; C: 各组小鼠每日 MPO 变化比较; D: 各组小鼠结肠组织病理变化(HE 染色 ×400); 1: 正常对照组; 2: RvD1 对照组; 3: 模型对照组; 4: RvD1 给药组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型对照组比较: # $P < 0.05$

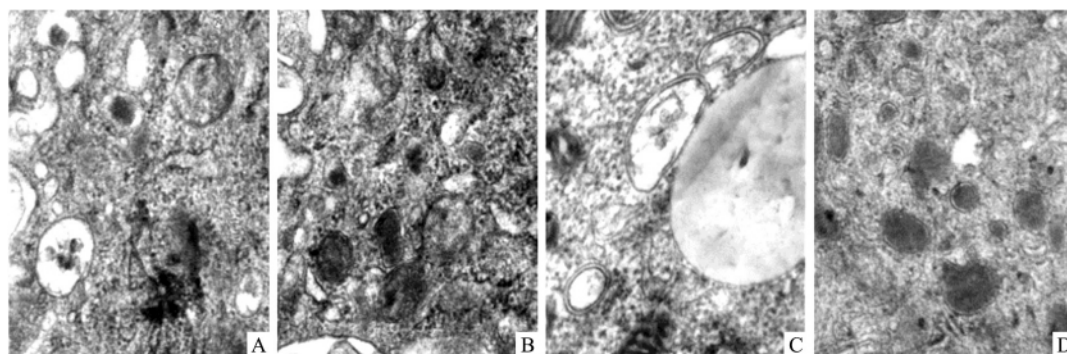


图2 RvD1 对实验性结肠炎小鼠腹腔巨噬细胞自噬体结构的影响 ×200

A: 正常对照组; B: RvD1 对照组; C: 模型对照组; D: RvD1 给药组

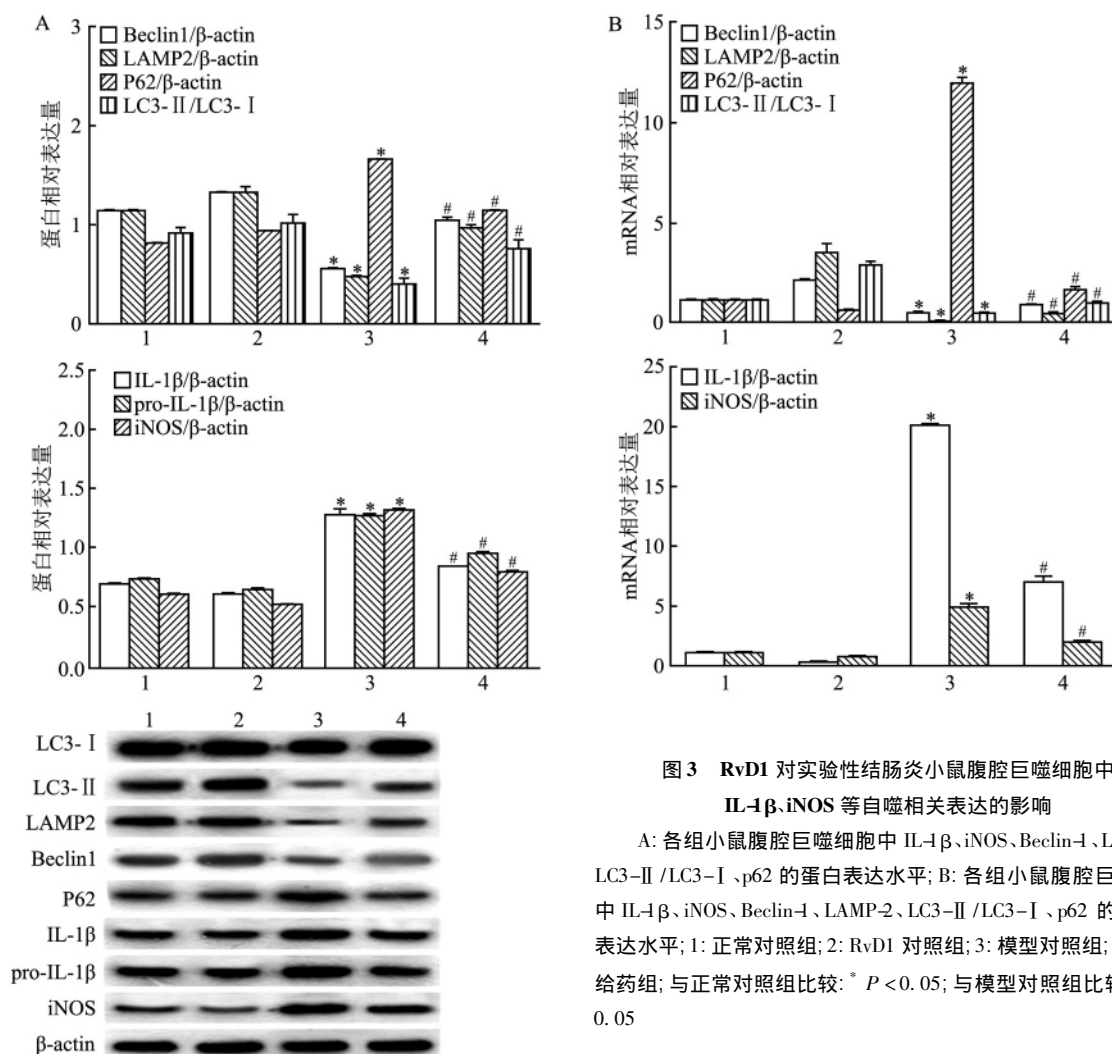


图3 RvD1对实验性结肠炎小鼠腹腔巨噬细胞中IL-1 β 、iNOS等自噬相关表达的影响

A: 各组小鼠腹腔巨噬细胞中IL-1 β 、iNOS、Beclin-1、LAMP-2、LC3-II/LC3-I、p62的蛋白表达水平; B: 各组小鼠腹腔巨噬细胞中IL-1 β 、iNOS、Beclin-1、LAMP-2、LC3-II/LC3-I、p62的mRNA表达水平; 1: 正常对照组; 2: RvD1对照组; 3: 模型对照组; 4: RvD1给药组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型对照组比较: # $P < 0.05$

安全的药物十分重要。

RvD1是一种具有抗感染作用的多不饱和脂肪酸衍生物,Bento et al^[5]、Liao et al^[6]研究提示RvD1可以减轻机体炎症反应,但RvD1对结肠炎的作用尚不清楚。本实验中RvD1给药组DAI评分、HI评分和MPO含量低于模型对照组,RvD1给药组结肠黏膜炎性细胞浸润减少。同时结肠组织内IL-1、IL-6、TNF- α 含量降低,IL-10含量提升。将RvD1应用于结肠炎中可以改善肠道炎症损伤。

自噬是一类高度保守的降解途径,机体炎症过程中产生的线粒体活性氧等物质,可以通过细胞自噬达到清除,维持机体的稳态^[4]。当自噬受到限制时,mtDNA释放,活性氧产生和P62堆积,触发NF- κ B信号通路激活和炎症体活化,促进炎症因子合成,加重器官炎症损伤。当自噬受损时细胞内可形成较大的液泡,自噬泡的半衰期延长^[11]。本实验显示模型对照组小鼠腹腔巨噬细胞内可见自噬泡数量增多及自噬泡体积增大,提示自噬通路受损。给予

RvD1处理,自噬泡数量减少。在自噬体形成的过程中,Beclin1与Vps34结合形成Beclin1-Vps34-Vps15复合体,介导自噬泡定位,促使自噬前体形成^[12]。LAMP2作为溶酶体膜上高度表达的蛋白,在自噬体与溶酶体的融合过程中发挥重要作用^[13]。LC3总量一般不会变动,可由自噬溶酶体降解导致LC3-II减少或LC3-I与LC3-II之间的相互转化,反映自噬流状态^[14]。当LC3-II/LC3-I比值减小表示自噬受限或自噬过度活化,比值增大表示自噬活化。P62在细胞自噬中起着识别以及转运待降解底物的重要作用,自噬抑制时P62含量增加^[15],自噬活化时P62水平降低。本研究显示模型对照组小鼠Beclin-1、LAMP-2、LC3-II/LC3-I表达水平减低,iNOS、IL-1 β 、p62表达增加,提示自噬受损,RvD1组小鼠巨噬细胞自噬相关蛋白异常表达改善。在结肠炎中应用RvD1可以进一步抑制炎症发生的相关机制,也许与修复小鼠细胞自噬通路,调控促炎细胞因子表达有关,这为IBD的药物治疗提供新的实验依

据。

参考文献

- [1] Broderick L, De Nardo D, Franklin B S, et al. The inflammasomes and autoinflammatory syndromes [J]. *Annu Rev Pathol*, 2015, 10: 395–424.
- [2] 王跃, 王志斌, 李玲等. 巨噬细胞在炎症性肠病中作用的研究进展[J]. *国际消化病杂志*, 2016, 36(1): 18–21.
- [3] Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system[J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 693–733.
- [4] Zhou R, Yazdi A S, Menu P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation[J]. *Nature*, 2011, 469(7329): 221–5.
- [5] Bento A F, Claudino R F, Dutra R C, et al. Omega-3 fatty acid-derived mediators 17(R)-hydroxy docosahexaenoic acid, aspirin-triggered resolvin D1 and resolvin D2 prevent experimental colitis in mice[J]. *J Immunol*, 2011, 187(4): 1957–69.
- [6] Liao Z, Dong J, Wu W, et al. Resolvin D1 attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury through a process involving the PPAR γ /NF- κ B pathway[J]. *Respir Res*, 2012, 13: 110.
- [7] Chu C C, Hou Y C, Pai M H, et al. Pretreatment with alanyl-glutamine suppresses T-helper-cell-associated cytokine expression and reduces inflammatory responses in mice with acute DSS-induced colitis[J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(9): 1092–9.
- [8] Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice[J]. *Gastroenterology*, 1990, 98(3): 694–702.
- [9] Murano M, Maemura K, Hirata I, et al. Therapeutic effect of intracolonic administration of nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 120(1): 51–8.
- [10] Menon D, Coll R, O'Neill L A, et al. Glutathione transferase omega 1 is required for the lipopolysaccharide-stimulated induction of NADPH oxidase 1 and the production of reactive oxygen species in macrophages[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 73: 318–27.
- [11] Klionsky D J, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy(3rd edition) [J]. *Autophagy*, 2016, 12(1): 1–222.
- [12] He C, Levine B. The Beclin 1 interactome[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2): 140–9.
- [13] Fortunato F, Kroemer G. Impaired autophagosome-lysosome fusion in the pathogenesis of pancreatitis[J]. *Autophagy*, 2009, 5(6): 850–3.
- [14] Zois C E, Koukourakis M I. Radiation-induced autophagy in normal and cancer cells: towards novel cytoprotection and radio-sensitization policies[J]. *Autophagy*, 2009, 5(4): 442–50.
- [15] Gao W, Chen Z, Wang W, et al. E1-like activating enzyme Atg7 is preferentially sequestered into p62 aggregates via its interaction with LC3-I [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e73229.

Effect of resolvin D1 on experimental colitis mice by regulating macrophage autophagy

Yu Peijun, Fang Chen, Mei Yongyu, et al

(Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University,
The Key Lab of Digestive Diseases of Anhui Province, Hefei 230022)

Abstract **Objective** To investigate the protective effect of resolvin D1 (RvD1) on experimental colitis and its possible mechanism. **Methods** Mice were randomly divided into normal control group, RvD1 control group, model control group and RvD1 administration group. The colitis model was constructed by drinking 5% DSS solution freely and RvD1 (50 μ g/kg) was intraperitoneally injected into mice on 2nd day, 4th day and 6th day. Disease activity index (DAI) score was measured during the experiment. At the end of the experiment, the peritoneal macrophages and the colon tissues were collected. Histological index (HI), myeloperoxidase (MPO), cytokine levels were measured and the structure of autophagosome in peritoneal macrophage was observed by electron microscope. The expression levels of related genes such as Beclin-1, p62, LC3-II and pro-IL-1 β were detected and analyzed by real-time PCR and Western blot. **Results** Compared with the model control group, the DAI score, HI score, MPO activity level and the level of proinflammatory cytokine decreased in the RvD1 administration group ($P < 0.05$). The expression levels of Beclin-1, LAMP-2, LC3-II/LC3-I in peritoneal macrophages increased, and the expression levels of iNOS, IL-1 β and p62 decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** RvD1 has a protective effect on experimental colitis, and the mechanism may be involved in the regulation of impaired autophagy in macrophages.

Key words inflammatory bowel disease; DSS; resolvin D1; autophagy