

网络出版时间: 2017-3-13 18:10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170313.1810.014.html>

## 双氧化酶 2 在 5-羟色胺加重的小鼠结肠炎模型中的表达及作用

董仕桢<sup>1,2</sup>, 陈梦露<sup>2</sup>, 戴发亮<sup>1,3</sup>, 轩青霞<sup>1</sup>, 陈攀<sup>1</sup>, 冯丹丹<sup>1</sup>, 常永超<sup>2</sup>, 高强<sup>1,4</sup>

**摘要** 目的 探讨 5-羟色胺(5-HT)对双氧化酶 2(Duox2)在小鼠结肠组织中的表达情况及其在炎症中的意义。方法 选取 6~8 周龄的健康清洁级 C57BL/6J(B6) 雄性小鼠,随机分为 5 组( $n=8$ ): 对照组自由饮用无菌蒸馏水; 葡聚糖硫酸钠(DSS)(1.0%、2.5%)组自由饮用相应浓度的 DSS 溶液; 5-HT 组采用直肠灌药方式(1.0 mg/kg)给药,每 3 d 1 次; DSS + 5-HT 组同时给予 1.0% DSS 和 5-HT。于造模第 6 天处死小鼠取结肠组织。通过结肠长度、疾病活动指数(DAI)评分和 HE 染色等方法评估肠道炎症程度,采用实时定量 PCR(RT-PCR)检测小鼠结肠组织中白介素(IL)-1 $\beta$ 、

IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 和 Duox2 mRNA 表达水平,应用免疫组化检测结肠组织中 Duox2 蛋白的表达情况。

**结果** 对照组和 5-HT 组小鼠无结肠炎表现; DSS(1.0%)组小鼠表现为轻度结肠炎; DSS + 5-HT 组和 DSS(2.5%)组有严重急性结肠炎表现。IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  等表达量随炎症程度加重而增加。Duox2 mRNA 在 5-HT 组和 DSS(1.0%)组表达增高(均  $P < 0.05$ ),在 DSS + 5-HT 和 DSS(2.5%)组表达下调(均  $P < 0.05$ )。免疫组化结果显示 Duox2 蛋白主要表达于小鼠结肠上皮刷状缘及上皮细胞胞质中,与 mRNA 表达一致。**结论** 5-HT 可能通过影响 Duox2 的表达在小鼠结肠炎的发生发展中发挥作用。

**关键词** 结肠炎; 葡聚糖硫酸钠; 双氧化酶 2; 5-羟色胺; NADPH 氧化酶

**中图分类号** R 574.62

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0337-06  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.007

2016-12-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(编号: 81370487)

作者单位: 河南科技大学临床医学院, 河南科技大学第一附属医院

<sup>1</sup> 消化内科, <sup>2</sup> 检验科, <sup>3</sup> 肝胆外科, 洛阳 471003

<sup>4</sup> 首都医科大学附属北京康复医院消化内科, 北京 100114

作者简介: 董仕桢, 男, 硕士研究生;

高强, 男, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: gaoq@cemu.edu.cn

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种慢性非特异性肠道炎症性疾病, 包括溃疡性

logical mechanism. **Methods** Sixty Wistar mouse were selected. All the rats' teeth were complete dentition, no caries, normal occlusion. The rats were randomly divided into blank group, model group, Yang-xi group, Jia-che group, each group including 15 rats. The blank group: normal feeding and don't implement any intervention. The model group: made the acute pulpitis rats with opening sealing and put in lipopoly saccharides. The Yang-xi group: made the acute pulpitis rats, and sticking acupoint of the same side Yangxi point. The Jia-che group: made the acute pulpitis rats, and sticking acupoint of the same side Jiache point. The toothache point sticks were homemade. Immunohistochemistry was used to detect Notch1 protein and Notch2 protein expression in acute pulpitis rats at the first day, the third day and the fifth day. **Results** The Notch1 protein, at the first day that treated with toothache point stick, the blank group was lower expression than model group, Yang-xi group and Jia-che group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The third day, the model group was lower expression than Yang-xi group and Jia-che group, but higher than blank group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The fifth day, the blank group was lower expression than the other groups ( $P < 0.01$ ). The Notch2 protein, at the first day that was treatment by toothache point stick, the Yang-xi group and Jia-che group were all higher expression than model group and blank group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The third day, the model group was higher expression than blank group, and the lower expression than Yang-xi group and Jia-che group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The fifth day, the blank group was lower expression than the other groups ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The toothache point stick can indirect improve dental pulp stem cells activity, through accelerating the speed of Notch signal protein impressed time. And it can improve the ability of self-repair after acute pulp injury.

**Key words** toothache point stick; acute pulpitis; Notch signaling proteins

结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)。IBD确切病因尚未明确,目前普遍认为是遗传、肠道菌群等多种因素相互作用的结果<sup>[1]</sup>,近年来IBD在我国的发病率不断增高<sup>[2]</sup>。在生理情况下双氧化酶2(dual oxidase 2, Duox2)有抵御细菌侵入和调控肠道菌群的作用<sup>[3]</sup>,临床研究<sup>[4]</sup>表明IBD患者炎症组织肠道上皮Duox2表达上调,并且动物模型的研究<sup>[5]</sup>中显示结肠炎的严重程度与Duox2有关。5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)含量的改变与IBD的发生发展相关,表明5-HT参与了炎症的发病过程<sup>[6]</sup>。然而,5-HT介导的胃肠道病理生理中Duox2的作用机制尚不清楚,为此,该研究采用5-HT作用于小鼠结肠,探讨5-HT对Duox2表达的影响,并在葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)肠炎模型中分析5-HT影响Duox2表达在肠炎发病中的作用。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 健康清洁级C57BL/6J(B6)雄性小鼠,6~8周龄,18~25g,购自北京维通利华公司,饲养于河南科技大学第一附属医院新区医院动物实验中心,使用混合配方颗粒饲料(北京华阜康生物科技股份有限公司)饲养,动物实验中心室内温度保持在(22±2)℃,湿度在50%左右,明暗交替12h。

**1.2 试剂与仪器** DSS(相对分子质量:36 000~50 000,美国MP Biomedicals公司);5-HT(分子量为212.68,德国SIGMA公司);RNA Later(德国QIGEN公司);总RNA提取试剂盒TRIzol Reagent(美国Invitrogen公司);逆转录试剂盒和实时定量PCR试剂盒(日本TaKaRa公司);引物由上海生工生物工程有限公司合成;抗Duox2抗体(美国GeneTex公司)(GTX60130);SABC免疫组化检测试剂盒(武汉博士德生物公司)(SA1020);浓缩型DAB显色试剂盒(北京索莱宝公司)(DA1010)。光学显微镜拍照系统设备(日本Nikon公司)。

### 1.3 实验设计与方法

**1.3.1 动物分组** 小鼠适应性喂养1周后随机分为5组,每组8只,分别为对照组、5-HT组、DSS(1.0%)组、DSS(2.5%)组和DSS+5-HT组。对照组自由饮用水,DSS组自由饮用相应浓度的DSS溶液,5-HT组采用灌肠方式进行药物灌注(1.0mg/kg,每3d1次),DSS+5-HT组同时给予1.0%DSS和5-HT。于第6天实验结束时,采用脱颈椎处死小

鼠,消毒固定后,打开腹腔,取其全结肠并测量长度,记录血便情况,使用PBS溶液清理结肠并进行翻转,处理后的结肠自远端结肠始取第一段约0.5cm,浸泡于4%甲醛固定,用于石蜡包埋,4μm厚切片,用于HE和免疫组化染色;接着取第二段长度约为1.0cm,放于盛有RNA Later的1.5ml离心管中,4℃过夜,随后存放于-80℃冰箱,以备提取mRNA用于实时定量PCR测定。

**1.3.2 观测指标** 每天定时称量各组小鼠体质量,记录小鼠摄食、饮水量,观察小鼠活动度、体毛光泽、大便性状、便血等情况,进行疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分,其中DAI评分=(体质量下降+大便性状+便血分数)/3。取材时测量结肠长度,观察结肠内血性内容物情况,并进行便血评分。对切片进行HE染色和组织病理学观察、病理分析。在高倍镜(×400)下进行细胞计数,每张切片选择10个视野,每个视野观察100个细胞进行评分。

**1.3.3 白介素(interleukin, IL)-1β、IL-6、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)-α、Duox2 mRNA表达水平检测** RT-PCR检测过程如下:应用TRIzol法提取结肠标本总RNA,测定RNA纯度和浓度后进行逆转录合成cDNA,于-20℃保存备用。引物由上海生工生物工程有限公司合成,见表1。PCR总反应体系为25μl,其中SYBR Premix EX Taq II(2×)12.5μl, RNase-Free水8.5μl,上、下游引物各1.0μl(浓度10μmol/L),cDNA2μl。每个样本采用3个复孔,加样完成后于BIO-RAD Real-time PCR仪中进行PCR反应,反应条件为:95℃预变性30s,95℃变性5s;退火温度根据不同引物指标进行设置,退火时长30s;72℃延伸30s,共40个循环。结果以阈循环(CT)值表示,取平均CT值,选用

表1 引物名称、序列和产物长度

| 引物名称    | 引物序列(5'-3')               | 引物长度 产物大小 |      |
|---------|---------------------------|-----------|------|
|         |                           | (bp)      | (bp) |
| IL-1β   | F: TGCCACCTTTTGACAGTGATG  | 21        | 220  |
|         | R: AAGGTCCACGGGAAAGACAC   | 20        |      |
| IL-6    | F: AACGATGATGCACTTGACAGA  | 20        | 128  |
|         | R: TGGTACTCCAGAAGACCAGAGG | 22        |      |
| TNF-α   | F: CCACCAGGCTCTTCTGTCTACT | 22        | 161  |
|         | R: TGCTACGACGTGGGCTACA    | 19        |      |
| Duox2   | F: TGGTCCCAGCAATTATCTATG  | 21        | 155  |
|         | R: CCACTGCCCTGATTTGACTC   | 21        |      |
| β-actin | F: GGCTGTATTCCCCTCCATCG   | 20        | 154  |
|         | R: CCACTTGGAACAATGCCATGT  | 22        |      |

注: F代表上游引物, R代表下游引物

$\beta$ -actin 作为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算各指标的 mRNA 相对表达量。

**1.3.4 免疫组化(immunohistochemistry, IHC) 检测小鼠结肠 Duox2 蛋白表达** 按照免疫组化检测试剂盒进行操作,试验中 Duox2 一抗工作浓度为 1:300,二抗为生物素化山羊抗兔 IgG。分别以 PBS 缓冲液代替一抗和二抗的标本作为阴性对照。中性树胶封片干燥后在光学显微镜( $\times 400$ )下计数阳性细胞,每张切片选择 10 个视野,每个视野观察 100 个细胞。阳性细胞百分比计分标准如下:0 分: <5%,1 分:5%~25%,2 分:26%~50%,3 分:51%~75%,4 分:76%~100%;染色强度评分标准:细胞质无染色计 0 分,淡黄色计 1 分,棕色计 2 分,棕褐色计 3 分。两项评分之积:-(0 分)、+( <4 分)、+(4~8 分)、+(9~12 分)。

**1.4 统计学处理** 应用 SPSS 19.0 统计学软件对数据进行分析,计量资料数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组计量资料比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- $t$  检验。DAI 和血便评分采用独立样本的秩和检验,检验水准为  $\alpha = 0.05$ , $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 小鼠一般活动情况观察** 对照组、5-HT 组小鼠每天摄食和饮水正常,活动如常,反应机警,皮毛有光泽,生长发育良好,体质量呈不同程度的增加;DSS(1.0%)组于造模第 5 天出现懒动,摄食、饮水减少,体质量有所下降,出现稀便、肛周潮湿等现象;DSS+5-HT 组和 DSS(2.5%)组小鼠于造模第 4 天开始相继出现上述现象,体质量下降较大,于第 5 天

开始出现血便,第 6 天有 6 只出现严重肉眼血便,体质严重下降,DSS+5-HT 组和 DSS(2.5%)组在第 6 天均有 1 只小鼠血便严重发生死亡。

**2.2 小鼠肠炎表现情况和 DAI 评分** 各组小鼠结肠长度、血便和 DAI 评分见表 2,与对照组和 5-HT 组相比,DSS(1.0%)组小鼠结肠长度缩短( $P < 0.05$ ),DSS+5-HT 组和 DSS(2.5%)组小鼠结肠长度进一步缩短( $P < 0.05$ )。HE 染色并进行病理组织学分析显示,对照组、5-HT 组小鼠病理学观察可见结肠黏膜结构完整,无炎性细胞浸润;DSS(1.0%)组黏膜腺体大部分完整,局部有少量炎性细胞浸润或隐窝破坏,表现为轻度炎症;DSS+5-HT 组和 DSS(2.5%)组均可见黏膜上皮细胞广泛缺失,腺体大多数不完整,细胞结构排列紊乱,杯状细胞消失,炎症细胞大量浸润,呈严重炎症改变;这两组炎症程度明显高于 DSS(1.0%)组( $P < 0.05$ ),HE 染色图片见图 1,各组病理学评分见图 2。

**2.3 小鼠结肠组织中的 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达** 与对照组相比,IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平在 5-HT 组轻度增高,而在 DSS 诱导的急性结肠炎中,DSS(1.0%)组 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达显著增高,在 DSS(2.5%)组进一步增高,DSS+5-HT 组与 DSS(2.5%)组结果一致,见表 3。

**2.4 小鼠结肠组织中的 Duox2 mRNA 的表达** Duox2 mRNA 在 5-HT 组中表达量是对照组的 2.5 倍( $P < 0.05$ ),见图 3,在 DSS(1.0%)组的轻度肠炎中表达也上调。随着炎症加重 Duox2 mRNA 在 DSS(2.5%)和 DSS+5-HT 组分别下降了 2.0 倍和 4.0 倍(均  $P < 0.05$ )。

表 2 各组小鼠结肠长度、血便评分、DAI 评分( $\bar{x} \pm s$ )

| 项目            | 对照组<br>(n=8)  | 5-HT 组<br>(n=8) | DSS(1.0%)组<br>(n=8) | DSS+5-HT 组<br>(n=7) | DSS(2.5%)组<br>(n=7) | F/ $\chi^2$ 值 | P 值    |
|---------------|---------------|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------|--------|
| 结肠长度(cm)      | 8.6 $\pm$ 0.4 | 8.4 $\pm$ 0.3   | 6.0 $\pm$ 0.7*      | 4.7 $\pm$ 0.6*#     | 4.4 $\pm$ 0.2*#     | 126.9         | <0.001 |
| 血便评分          | 0 $\pm$ 0     | 0 $\pm$ 0       | 1.1 $\pm$ 0.4*      | 2.7 $\pm$ 0.5*#     | 2.4 $\pm$ 0.8*#     | 43.2          | <0.001 |
| DAI 评分(第 6 天) | 0 $\pm$ 0     | 0 $\pm$ 0       | 1.4 $\pm$ 0.8*      | 3.8 $\pm$ 0.3*#     | 3.9 $\pm$ 0.4*#     | 43.8          | <0.001 |

与对照组、5-HT 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 DSS(1.0%)组比较: #  $P < 0.05$

表 3 各组小鼠结肠组织中 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达的相对倍数( $\bar{x} \pm s$ )

| 项目            | 对照组<br>(n=8)  | 5-HT 组<br>(n=8) | DSS(1.0%)组<br>(n=8) | DSS+5-HT 组<br>(n=7) | DSS(2.5%)组<br>(n=7)     | F 值  | P 值    |
|---------------|---------------|-----------------|---------------------|---------------------|-------------------------|------|--------|
| IL-1 $\beta$  | 1.0 $\pm$ 0.1 | 1.5 $\pm$ 0.2   | 63.1 $\pm$ 31.7*    | 197.7 $\pm$ 67.5*#  | 546.7 $\pm$ 415.6*#     | 61.2 | <0.001 |
| IL-6          | 1.0 $\pm$ 0.1 | 2.0 $\pm$ 0.2   | 108.1 $\pm$ 39.5*   | 565.0 $\pm$ 140.2*# | 20330.4 $\pm$ 12409.1*# | 79.6 | <0.001 |
| TNF- $\alpha$ | 1.0 $\pm$ 0.1 | 1.2 $\pm$ 0.1   | 5.3 $\pm$ 0.7*      | 8.5 $\pm$ 1.1*      | 9.6 $\pm$ 0.7*#         | 23.5 | <0.001 |

与对照组、5-HT 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 DSS(1.0%)组比较: #  $P < 0.05$

表4 Duox2 蛋白在小鼠结肠中的表达( $\bar{x} \pm s$ )

| 项目    | 对照组<br>(n=8) | 5-HT 组<br>(n=8) | DSS(1.0%) 组<br>(n=8) | DSS + 5-HT 组<br>(n=7)   | DSS(2.5%) 组<br>(n=7)    | F 值  | P 值     |
|-------|--------------|-----------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|------|---------|
| Duox2 | 1.3 ± 0.5    | 4.1 ± 1.4*      | 4.4 ± 1.1*           | 0.8 ± 0.5 <sup>#△</sup> | 0.6 ± 0.5* <sup>△</sup> | 24.7 | < 0.001 |

与对照组比较: \* P < 0.05; 与 5-HT 组比较: # P < 0.05; 与 DSS(1.0%) 组比较: △ P < 0.05

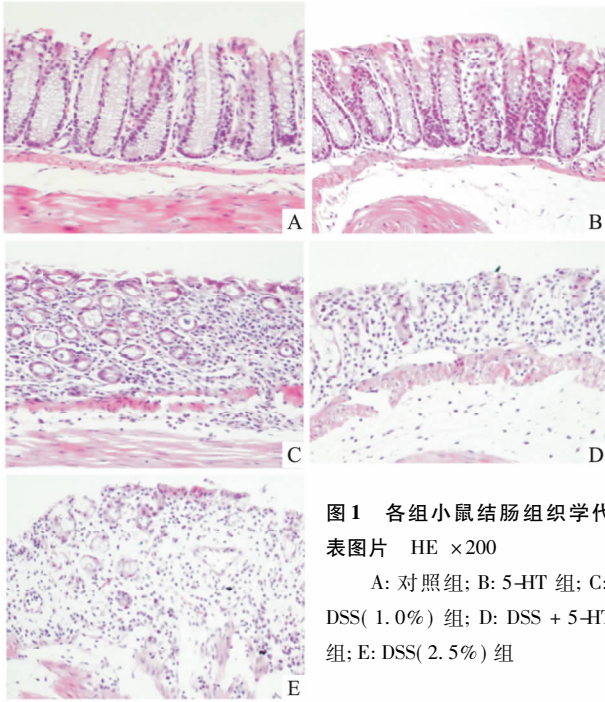


图1 各组小鼠结肠组织学代表图片 HE × 200

A: 对照组; B: 5-HT 组; C: DSS(1.0%) 组; D: DSS + 5-HT 组; E: DSS(2.5%) 组

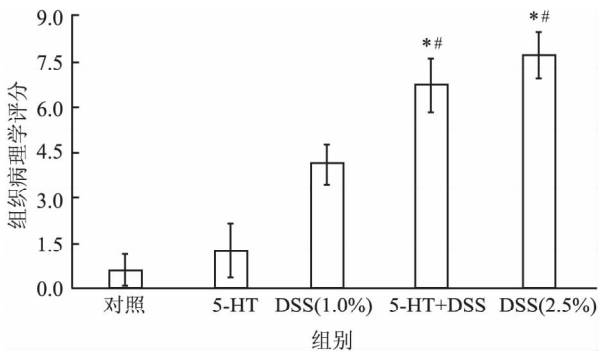


图2 各组小鼠结肠组织学评分

与对照组、5-HT 组比较: \* P < 0.05; 与 DSS(1.0%) 组比较: # P < 0.05

**2.5 小鼠结肠组织中的 Duox2 蛋白的表达** IHC 结果显示 Duox2 蛋白主要表达于结肠上皮细胞刷状缘,胞质中也有表达,见图4。Duox2 蛋白在对照组中表达较少,在 5-HT 组表达量增高(P < 0.05),在 DSS(1.0%) 组轻度炎症时其表达量也增高,而在 DSS(2.5%) 和 DSS + 5-HT 组其表达量却下降,见表4。

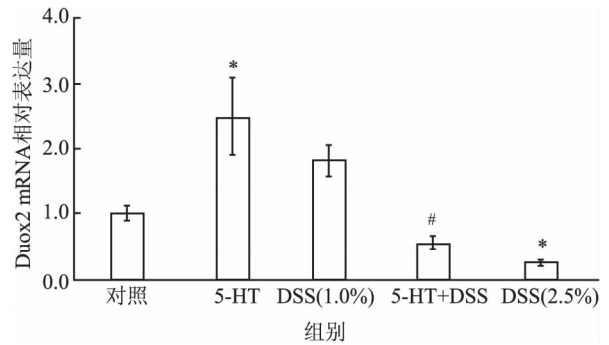


图3 各组小鼠结肠组织中 Duox2 mRNA 表达的相对倍数

与对照组比较: \* P < 0.05; 与 5-HT 组比较: # P < 0.05

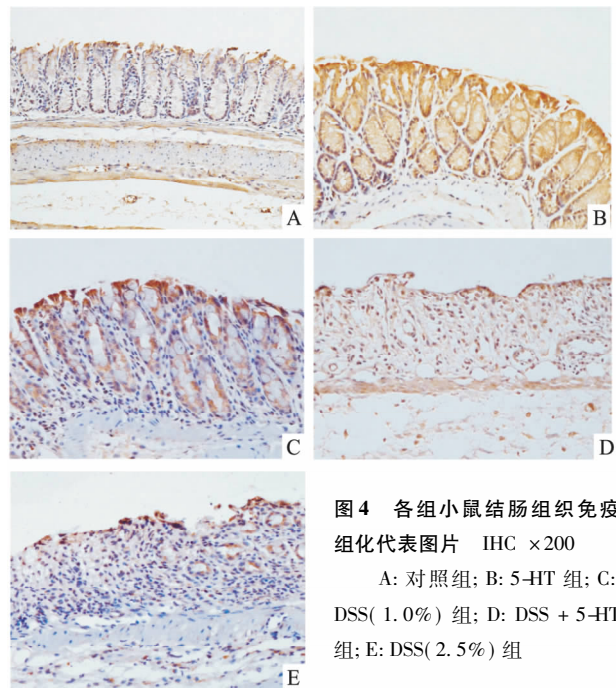


图4 各组小鼠结肠组织免疫组化代表图片 IHC × 200

A: 对照组; B: 5-HT 组; C: DSS(1.0%) 组; D: DSS + 5-HT 组; E: DSS(2.5%) 组

### 3 讨论

IBD 是欧美等西方国家的常见病,近年来,随着生活条件和饮食习惯的改变及全球化的发展,IBD 在我国总的报道病例不断增高,在近十年内增加了 2.5 倍<sup>[7]</sup>。腹泻、腹痛、血便等是 IBD 患者的主要临床表现,并且多数患者反复发作,迁延不愈,当前治疗 IBD 的药物有一定的局限性和副作用<sup>[8]</sup>。IBD 严重影响了患者的生活质量,并且也是导致结肠癌的

一个危险因素<sup>[9]</sup>。尽管 IBD 的发病原因尚不明确,人们认为活性氧类(reactive oxygen species, ROS)产生的氧化应激参与肠道炎症过程<sup>[10]</sup>,但其具体引起肠道损伤机制仍不清楚。5-HT 主要有肠嗜铬细胞(enterochromaffin cell, EC)合成,体内约 90% 的 5-HT 合成并定位在于肠道<sup>[11]</sup>,5-HT 能够调节白细胞趋向性、活化,细胞因子分泌、增殖等多种细胞功能,有报道<sup>[12]</sup>显示 ECs 数量和 5-HT 含量的变化与 IBD 有一定的关系,通过基因敲除或者药物抑制色氨酸羟化酶(tryptophan hydroxylase, Tph) 1 可减少肠道中 5-HT 的含量,能有效降低小鼠结肠炎的损伤程度<sup>[13]</sup>。Regmi et al<sup>[14]</sup>进一步研究发现 5-HT 可能通过还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 2(NADPH oxidase 2, Nox2)产生的 ROS 来调节肠上皮细胞的固有免疫。

实验应用不同浓度的 DSS 作用于 B6 小鼠,进行小鼠结肠炎造模,肠炎小鼠表现为体重下降、腹泻、血便等症状;随着肠炎的发生,结肠长度有所缩短,并且随着炎症的发展、加重,结肠进一步缩短,同时伴有 DAI 评分的增高。病理学伴有溃疡性损伤、隐窝消失、黏膜破坏及炎症细胞浸润等。实验结果显示炎症组小鼠 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  等促炎因子表达明显上调,并且与炎症程度呈正相关性。而单独使用 5-HT 时小鼠并无肠炎表现,但 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  等促炎因子亦有不同程度的上调表达,如 IL-6,5-HT 组是对照组的 2 倍,提示尽管 5-HT 单独应用虽然不能导致小鼠产生明显的肠炎变化,但参与了炎症的发生发展,而 DSS 与 5-HT 联合组能够达到与高剂量 DSS 一样诱导小鼠严重急性结肠炎,说明 5-HT 结合 DSS 能加重肠炎反应,与以往报道<sup>[6,14]</sup>5-HT 能够加重肠炎的结果相一致。

Duox2 属于 NADPH 氧化酶家族,NADPH 氧化酶的一个重要功能是产生 ROS,实验和临床研究<sup>[15]</sup>已证实 IBD 动物模型和 IBD 患者的结肠黏膜中氧化应激产生的 ROS 增加。ROS 经常出现在疾病早期且与疾病的严重程度及进展相关。Duox2 在胃肠道产生的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是 ROS 的一个重要成员,正常情况下包括 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在内的 ROS 在免疫调节、细胞周期和信号转导中发挥着重要作用,但 Duox2 过度活动产生过多的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可能会导致氧化应激,而后者可激活 NF- $\kappa$ B 信号通路,促进炎症发生。进一步研究<sup>[4]</sup>表明 IBD 患者中炎症组织肠道上皮 Duox2 表达上调,动物实验也发现结肠炎的严重程度可能与 Duox2 的活动相关。本实验中单独应用 5-HT 直接

作用于小鼠结肠以观察 5-HT 对 Duox2 表达的影响,显示 5-HT 有上调 Duox2 在结肠组织表达的作用。免疫组化结果显示 Duox2 蛋白主要表达于小鼠结肠上皮细胞的刷状缘以及胞质中。同时显示低浓度 DSS 组也上调 Duox2 的表达,但在高浓度 DSS 组 Duox2 mRNA 和蛋白表达均下调,说明轻度炎症时 Duox2 表达上调,提示其在炎症发生发展中起着一定的作用,而随着炎症的加重,Duox2 表达下调,这可能与重度炎症时结肠上皮细胞结构的损伤、破坏相关<sup>[16]</sup>。结果也表明 Duox2 在炎症的发生发展过程中发挥作用,当炎症进展到严重程度时 Duox2 并没有发挥重要作用。DSS 与 5-HT 合用时与高浓度 DSS 结果类似,即结肠炎加重,该实验结果也进一步验证了 5-HT 联合 DSS 能够加重小鼠肠炎的发生,5-HT 可能通过刺激肠上皮细胞以及炎症细胞的 5-HT 受体而参与肠炎的发生。

本研究显示 5-HT 加重了 DSS 诱导的小鼠结肠炎,5-HT 不仅参与了小鼠结肠组织炎症的发生发展并且可能通过上调 Duox2 的表达影响胃肠道的氧化应激和炎症的发生。

#### 参考文献

- [1] Corridoni D, Arseneau K O, Cominelli F. Inflammatory bowel disease [J]. Immunol Lett, 2014, 161(2): 231-5.
- [2] Ng W K, Wong S H, Ng S C. Changing epidemiological trends of inflammatory bowel disease in Asia [J]. Intest Res, 2016, 14(2): 111-9.
- [3] Allaoui A, Botteaux A, Dumont J E, et al. Dual oxidases and hydrogen peroxide in a complex dialogue between host mucosae and bacteria [J]. Trends Mol Med, 2009, 15(12): 571-9.
- [4] Lipinski S, Till A, Sina C, et al. DUOX2-derived reactive oxygen species are effectors of NOD2-mediated antibacterial responses [J]. J Cell Sci, 2009, 122(Pt19): 3522-30.
- [5] Esworthy R S, Kim B W, Rivas G E, et al. Analysis of candidate colitis genes in the Gdcl1 locus of mice deficient in glutathione peroxidase-1 and -2 [J]. PloS one, 2012, 7(9): e44262.
- [6] Ghia J E, Li N, Wang H, et al. Serotonin has a key role in pathogenesis of experimental colitis [J]. Gastroenterology, 2009, 137(5): 1649-60.
- [7] Ouyang Q, Xue L Y. Inflammatory bowel disease in the 21(st) century in China: turning challenges into opportunities [J]. J Dig Dis, 2012, 13(4): 195-9.
- [8] Blonski W, Buchner A M, Lichtenstein G R. Inflammatory bowel disease therapy: current state-of-the-art [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2011, 27(4): 346-57.
- [9] van den Heuvel T R, Wintjens D S, Jeuring S F, et al. Inflammatory bowel disease, cancer and medication: cancer risk in the Dutch population based IBDL cohort [J]. Int J Cancer, 2016,

- 139(6): 1270–80.
- [10] Zhu H, Li Y R. Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence [J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2012, 237(5): 474–80.
- [11] Kim D Y, Camilleri M. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection [J]. *Am J Gastroenterol*, 2000, 95(10): 2698–709.
- [12] Magro F, Vieira-Coelho M A, Fraga S, et al. Impaired synthesis or cellular storage of norepinephrine, dopamine, and 5-hydroxytryptamine in human inflammatory bowel disease [J]. *Dig Dis Sci*, 2002, 47(1): 216–24.
- [13] Kim J J, Wang H, Terc J D, et al. Blocking peripheral serotonin synthesis by telotristat etiprate (LX1032/LX1606) reduces severity of both chemical- and infection-induced intestinal inflammation [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 309(6): G455–65.
- [14] Regmi S C, Park S Y, Ku S K, et al. Serotonin regulates innate immuneresponses of colon epithelial cells through Nox2-derived reactive oxygen species [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 69: 377–89.
- [15] Achitei D, Ciobica A, Balan G, et al. Different profile of peripheral antioxidant enzymes and lipid peroxidation in active and non-active inflammatory bowel disease patients [J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(5): 1244–9.
- [16] 杨茉莉, 李宏谦, 李小珍. NADPH 氧化酶 Nox1 和 Duox2 在小鼠肠炎中的表达和意义 [J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(10): 1560–7.

## Evaluated Duox2 expression in mouse colon is associated with 5-HT aggravated DSS-induced colitis

Dong Shizhen<sup>1,2</sup>, Chen Menglu<sup>2</sup>, Dai Faliang<sup>1,3</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Gastroenterology and Hepatology, <sup>2</sup>Dept of Clinical Laboratory,

<sup>3</sup>Dept of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology;

College of Clinical Medicine of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003)

**Abstract Objective** To investigate the impact of 5-hydroxytryptamine (5-HT) on the expression of Duox2 in mouse colon and analyse its significance in pathogenesis of colitis. **Methods** Six-to-eight-week-old C57BL/6J (B6) male mice were randomly divided into 5 groups ( $n=8$  each group): Mice in control group drank water freely. Mice in DSS (1.0%) groups and DSS (2.5%) were exposed to 1.0% dextran sulfate sodium (DSS) or 2.5% DSS. Mice in 5-HT groups were treated with 5-HT (1.0 mg/kg) by enema every 3 days. Mice in DSS + 5-HT group were concurrently treated with 1.0% DSS and 1.0 mg/kg of 5-HT. At the end of 6th day of experiment, mice were scarified to collect colon tissue. The severity of colitis was evaluated by colon length, disease activity index (DAI) and pathological inflammatory scores of colon. Pro-inflammatory cytokine interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and Duox2 mRNAs in colon tissue were measured by quantitative real-time PCR (RT-PCR). The protein of Duox2 was evaluated by immunohistochemistry (IHC). **Results** Mice in control group and 5-HT group had no signs of inflammation. Mild colitis was found in mice treated with 1.0% DSS. Mice treated with 2.5% DSS suffered severe colitis. Mice receiving both DSS and 5-HT had a similar extent of colitis as those receiving 2.5% DSS. Furthermore, the expressions of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA were increased corresponding to the severity of colitis. The expressions of Duox2 mRNA in DSS (1.0%) and 5-HT group were increased compared to the control group (both  $P < 0.05$ ). Duox2 mRNA was decreased in DSS + 5-HT and DSS (2.5%) group (both  $P < 0.05$ ). IHC results showed that Duox2 protein was mainly expressed at the brush border membrane of colonic epithelium cell as well as in the cytoplasm; the expression of Duox2 protein was consistent with the gene expression. **Conclusion** 5-HT may be involved in the occurrence and development of colitis in mice by increasing Duox2 expression in colon.

**Key words** colitis; dextran sulfate sodium; Duox2; 5-hydroxytryptamine; NADPH oxidase