

网络出版时间: 2015-12-30 14:38 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20151230.1438.016.html>

抗巨噬细胞移动抑制因子单抗对溃疡性结肠炎 小鼠发病的干预机制研究

王柏涛¹, 张启芳², 邱小芬³, 杨红杰⁴, 孟云超², 郑 奕²

摘要 目的 探讨抗巨噬细胞移动抑制因子单抗(抗 MIF 单抗)对小鼠急性溃疡性结肠炎(UC)发病的干预作用及其可能调控机制。方法 以葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导制备小鼠急性 UC 模型,小鼠分为正常组、UC 模型组、抗 MIF 单抗干预组和生理盐水组。造模及药物干预期间观察小鼠一般情况并行疾病活动指数(DAI)评分,7 d 后断颈处死全部小鼠,行结肠大体损伤评分,HE 染色后光镜下观察结肠病理改变,免疫组化染色观察巨噬细胞移动抑制因子(MIF)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)等促炎因子在结肠组织炎症细胞的表达情况,实时荧光定量 PCR(real-time PCR)检测结肠组织核因子- κ B(NF- κ B) p65 mRNA 的表达水平。结果 与正常组相比,其余三组小鼠结肠炎症病变明显,MIF、TNF- α 、IL-6 等促炎因子的表达水平明显升高($P < 0.05$);与模型组相比,干预组结肠黏膜损伤程度减轻,抗 MIF 单抗显著改善 MIF、TNF- α 、IL-6 等促炎因子的表达水平($P < 0.05$),而生理盐水组与其差异无统计学意义($P > 0.05$)。real-time PCR 结果显示应用抗 MIF 单抗的小鼠能显著抑制结肠组织 NF- κ B p65 mRNA 的表达水平。结论 抗 MIF 单抗对小鼠 UC 的发病有明显的干预作用,可能通过抑制 NF- κ B 信号通路,减少促炎因子的表达发挥作用。

关键词 抗巨噬细胞移动抑制因子单抗; 葡聚糖硫酸钠; 溃疡性结肠炎; 炎症因子; 核因子- κ B

中图分类号 R 574.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)01-0031-05

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种主要累及结肠黏膜及黏膜下层的非特异性自身免疫性疾病,其病因及发病机制尚未明确。肠道黏膜免疫耐受的异常表达和细胞因子的失衡与 UC 的发病密切相关,其中因 NF- κ B 作为一种多向转录调节因

子,可以促使效应细胞分泌多种炎症因子,从而被证实 UC 的发病中起重要作用^[1]。巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是一种特殊结构的炎症趋化因子,通过抑制巨噬细胞的游走、移动,促使巨噬细胞在炎症部位聚集、增生,从而发挥其促炎作用。既往研究^[2]已证实其作为促炎因子参与 UC 的发病。因此该研究通过对小鼠结肠组织的检测,评价应用抗 MIF 单抗抑制 MIF 促炎作用后对小鼠结肠的炎症浸润情况,及各组小鼠 MIF、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6(interleukin-6, IL-6)等促炎因子和核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) p65 mRNA 在结肠组织的表达水平,旨在证实抗 MIF 单抗对 UC 的保护作用及其作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 40 只,鼠龄 8~9 周, (24 ± 2) g, 购自湖南斯莱克景达实验动物公司。适应性喂养 1 周后,随机分为正常对照组、UC 模型组、抗 MIF 单抗干预组、生理盐水组,每组 10 只。

1.2 药品与试剂 抗 MIF 单抗购自重庆探生科技有限公司; 葡聚糖硫酸钠(DSS, MW 36 000~50 000) 购自美国 MP Biomedicals 生物医学公司; MIF 多克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 兔抗 TNF- α 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司; IL-6 多克隆抗体购自美国 Bioworld 公司; 二抗 HRP 鼠兔通用型购自广州安必平医药科技有限公司; TRIzol A + 总 RNA 提取试剂购自天根生化科技(北京)有限公司; M-MLV 逆转录试剂盒购自英潍捷基(上海)贸易有限公司; Power SYBR Green PCR Master Mix(2 $\times$) 购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.3 模型制备及药物干预 正常对照组自由饮水,其余三组每日饮用 5% DSS 溶液连续 7 d。抗 MIF 单抗(4 mg/ml)与生理盐水 1:3 体积比稀释后,抗 MIF 单抗干预组与生理盐水组于 1、2、4、6 d 分别腹

2015-09-30 接收

基金项目: 广西医疗卫生重点科研课题(编号: 重 2011018); 桂林市科学研究与技术开发计划项目(编号: 科技攻关 20140120-7-2)

作者单位: ¹ 桂林医学院研究生学院 桂林 541004

广西壮族自治区南溪山医院² 消化内科、³ 病理科、⁴ 中医科 桂林 541002

作者简介: 王柏涛,男,硕士研究生;

张启芳,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: zhangqifang-gl@163.com

腔注射抗 MIF 单抗和生理盐水 0.2 ml/只。造模及给药期间观察并记录各组小鼠体重变化、精神状态、毛色、粪便性状等一般情况,并根据 Cooper 的经典评分方法^[3]进行疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分。

1.4 标本收集与处理 第 8 天断颈处死小鼠,暴露结肠,截取盲肠末端至肛门的整个肠段,沿肠系膜纵轴切开,预冷生理盐水冲洗后,滤纸吸干,对结肠进行大体损伤评分^[4]。一部分置于冻存管液氮速冻后于 -80 ℃ 保存,用于实时荧光定量 PCR(real-time PCR)检测;另一部分分别行 HE 染色镜下观察各组小鼠结肠组织病理改变并行组织学损伤评分^[5];免疫组化染色镜下观察 MIF、TNF- α 、IL-6 等促炎因子的表达水平,一抗稀释浓度依次为 1:300、1:130、1:150。阳性结果判断:高倍镜下选取 3 个不重叠视野,以胞质出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性细胞,计数各视野阳性细胞率(阳性细胞/该视野细胞总数 $\times 100\%$)。结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。

1.5 实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) TRIzol 法提取各组小鼠结肠组织的总 RNA,1% 琼脂糖凝胶电泳进行完整性分析,紫外分光光度计进行逆转录定量。 β -actin 引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司设计合成,NF- κ B 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成,引物序列见表 1。扩增条件:50 ℃ 2 min,95 ℃ 10 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,共循环 40 次。反应结束后采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对结果进行分析,以 β -actin 为内参校对 NF- κ B 的相对表达量。

表 1 基因引物序列

基因	上游引物	下游引物
β -actin	5'-ACTGTGACCTTGACATCCG-3'	5'-CGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'
NF- κ B p65	5'-GCCTCATCCACATGAACCTG-3'	5'-ATGGCTTGCTCAGGTCTCG-3'

1.6 统计学处理 所得数据资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,Graphpad Prism 5.0 统计绘图,多组间均数的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

2 结果

2.1 小鼠一般情况 正常对照组小鼠毛色亮泽、顺滑,反应迅捷,体重均不同程度增加,粪便成条形、无便血和腹泻现象;与正常对照组对比,UC 模型组和生理盐水组小鼠毛色混杂、无光泽、严重者毛发干

枯,反应迟滞,活动度明显减低,出现拱背、扎堆现象,体重下降明显,粪便稀样、次数增多、便血严重;抗 MIF 单抗干预组小鼠毛色较正常对照组略黯淡、部分稍显杂乱,但不如模型组和生理盐水组明显,精神状态良好,体重减轻幅度小,部分小鼠出现轻微便血现象。

2.2 小鼠 DAI 评分 与正常对照组相比,其余三组差异有统计学意义($P < 0.05$),表明模型制备成功;与抗 MIF 单抗干预组相比,UC 模型组和生理盐水组差异均有统计学意义($P < 0.05$);而 UC 模型组和生理盐水组间差异无统计学意义($P > 0.05$, $F = 28.910$)。见表 2。

2.3 结肠大体损伤评分 肉眼观察正常对照组小鼠结肠无充血水肿、无出血点,肠壁均匀光滑,血管清晰;UC 模型组和生理盐水组结肠肠壁充血水肿、色泽晦暗,局部出现明显溃疡,伴有糜烂,与周围组织粘连,管壁有僵硬感;抗 MIF 单抗干预组小鼠结肠肠壁色泽暗淡,充血水肿,出现微小出血点,但其范围、程度、溃疡个数均不及 UC 模型组和生理盐水组显著($F = 31.494$)。见表 2。

表 2 小鼠 DAI 评分及结肠大体损伤评分(分 $n = 10 \bar{x} \pm s$)

分组	DAI 评分	结肠大体损伤评分
正常对照	0.00 $\pm$ 0.00 [#] ▲	0.00 $\pm$ 0.00 [#] ▲
UC 模型	3.40 $\pm$ 0.49 [*] ▲	2.50 $\pm$ 0.71 [*] ▲
抗 MIF 单抗干预	2.23 $\pm$ 1.45 [*] #	1.80 $\pm$ 0.79 [*] #
生理盐水	3.03 $\pm$ 0.87 [*] ▲	2.60 $\pm$ 0.70 [*] ▲

与正常对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 UC 模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与抗 MIF 单抗干预组比较: [▲] $P < 0.05$

2.4 HE 染色组织学评分 正常对照组小鼠结肠黏膜及黏膜下层结构完整无缺损,上皮细胞排列整齐,腺体形态规则,浆膜层血管无充血现象;UC 模型组结肠黏膜上皮糜烂严重,黏膜固有层大部分腺体结构破坏,肉芽组织形成,提示可能曾存在浅溃疡,黏膜固有层及黏膜下层被大量炎症细胞浸润;抗 MIF 单抗干预组结肠黏膜上皮无糜烂,腺体结构正常,血管内红细胞聚集,呈充血现象,黏膜固有层炎症细胞浸润,但炎症细胞数量及浸润深度不及 UC 模型组和生理盐水组;生理盐水组结肠黏膜上皮缺损、断裂,轻度糜烂,炎症细胞主要集中在黏膜固有层($F = 58.456$)。见图 1、表 3。

2.5 免疫组化结果 各组小鼠结肠黏膜腺上皮均不表达 MIF、TNF- α 、IL-6。正常对照组结肠黏膜炎症细胞不表达或极微量表达;而在 UC 模型组和生

理盐水组中,结肠黏膜炎症细胞均强表达;抗 MIF 单抗干预组中结肠黏膜炎症细胞 MIF、TNF- α 、IL-6 呈弱表达,介于正常对照组和其余两组之间;MIF、TNF- α 、IL-6 的 F 值依次为 766.448、308.356、1 626.643。见图 2~4、表 3。

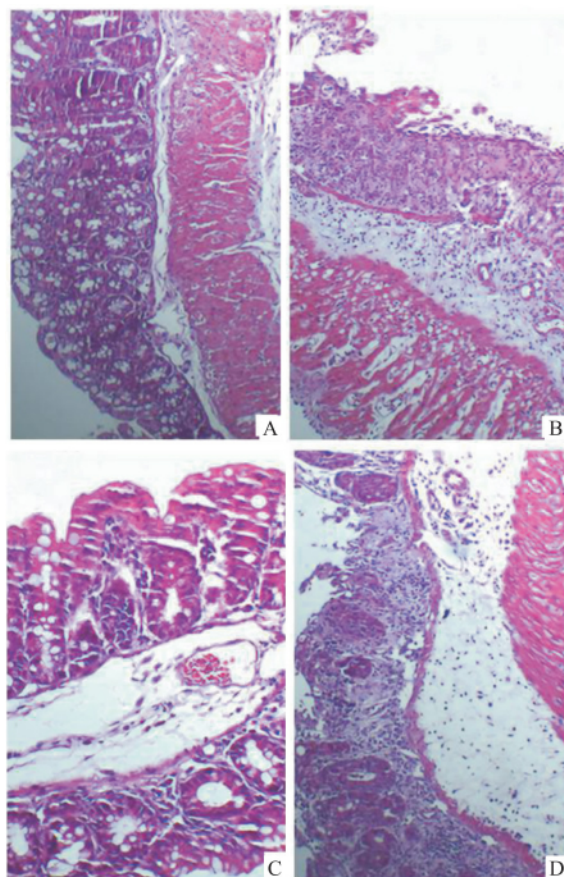


图 1 小鼠结肠组织病理切片 HE $\times 200$

A: 正常对照组; B: UC 模型组; C: 抗 MIF 单抗干预组; D: 生理盐水组

2.6 real-time PCR 结果 UC 模型组小鼠结肠组织 NF- κ B p65 mRNA 相对表达量 (2.011 ± 0.137) 显著高于正常对照组 (1.01 ± 0.018) 与抗 MIF 单抗干预组 (0.84 ± 0.211), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 UC 模型组相比, 抗 MIF 单抗干预组的相对表达量较低 ($P < 0.05$), 而生理盐水组 ($2.00 \pm$

0.12) 与其差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 抗 MIF 单抗干预组的相对表达量较正常对照组略低, 二者差异无统计学意义 ($P > 0.05$); $F = 63.658$ 。

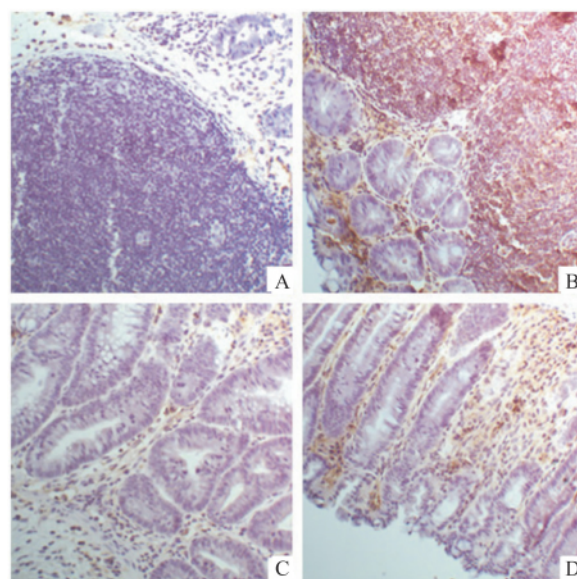


图 2 小鼠结肠组织 MIF 的表达 SP $\times 200$

A: 正常对照组; B: UC 模型组; C: 抗 MIF 单抗干预组; D: 生理盐水组

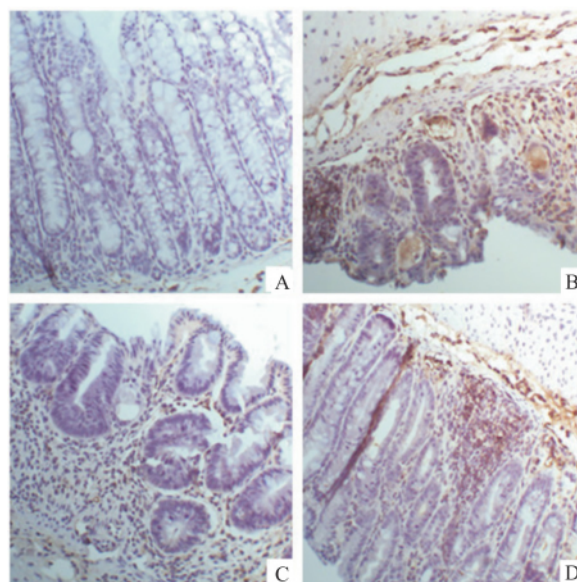


图 3 小鼠结肠组织 TNF- α 的表达 SP $\times 200$

A: 正常对照组; B: UC 模型组; C: 抗 MIF 单抗干预组; D: 生理盐水组

表 3 小鼠结肠组织学评分及免疫组化阳性细胞率 ($\bar{x} \pm s$ $n = 10$)

分组	病理评分	阳性细胞率 (%)		
		MIF	TNF- α	IL-6
正常对照	$0.30 \pm 0.48^{\#}\blacktriangle$	$8.10 \pm 1.32^{\#}\blacktriangle$	$7.97 \pm 1.59^{\#}\blacktriangle$	$11.10 \pm 1.32^{\#}\blacktriangle$
UC 模型	$13.60 \pm 1.17^{*}\blacktriangle$	$59.00 \pm 1.23^{*}\blacktriangle$	$60.40 \pm 2.40^{*}\blacktriangle$	$85.83 \pm 1.96^{*}\blacktriangle$
抗 MIF 单抗干预	$6.30 \pm 1.16^{*}\#$	$22.17 \pm 1.51^{*}\#$	$30.53 \pm 1.74^{*}\#$	$55.27 \pm 1.78^{*}\#$
生理盐水	$13.90 \pm 1.52^{*}\blacktriangle$	$59.00 \pm 1.22^{*}\blacktriangle$	$60.63 \pm 3.08^{*}\blacktriangle$	$83.90 \pm 2.75^{*}\blacktriangle$

与正常对照组比较: $^{*}P < 0.05$; 与 UC 模型组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与抗 MIF 单抗干预组比较: $\blacktriangle P < 0.05$

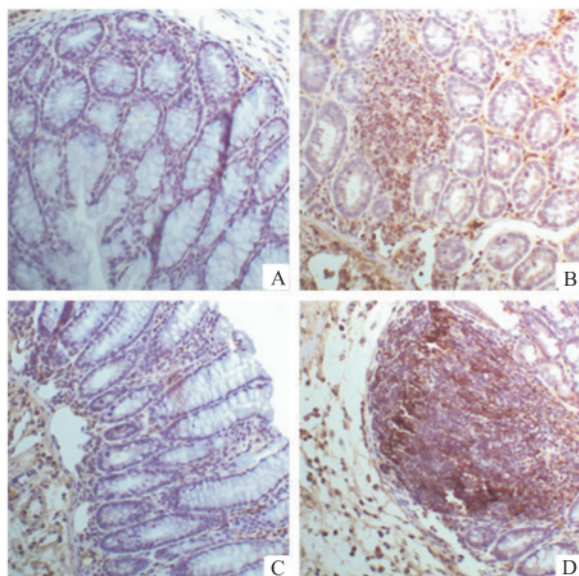


图4 小鼠结肠组织 IL-6 的表达 SP×200

A: 正常对照组; B: UC 模型组; C: 抗 MIF 单抗干预组; D: 生理盐水处理组

3 讨论

UC 发病率在我国呈明显上升趋势^[6],随着抗 TNF- α 类新型制剂的成功运用^[7],尝试生物制剂治疗 UC 已成为当前研究领域的热点。而 MIF 作为近年发现的多效能细胞因子,在机体内广泛存在,被认为是 TNF- α 、IL-6 等参与 UC 发病的炎症因子的上游调控因子。因此该实验通过应用抗 MIF 单抗抑制 MIF 的表达,评价抗 MIF 单抗是否对小鼠 UC 能起到显著的保护作用。

本实验通过 DSS 诱导制备小鼠急性 UC 模型,发现应用抗 MIF 单抗的小鼠较 UC 模型组而言,小鼠的体重减轻幅度、粪便性状、结肠的大体损伤、光镜下结肠组织病理改变等均有显著改善,免疫组化染色观察 MIF、TNF- α 、IL-6 等促炎因子的表达也有不同程度的下降。这就证明抗 MIF 单抗对小鼠 UC 的发病的确能起到保护作用。

近年来在对 UC 发病机制的研究中,发现 TLR4/NF- κ B 信号通路与 UC 的发病密切相关,主要通过 TLR4 $\rightarrow$ Myd88 $\rightarrow$ IRAK $\rightarrow$ TRAF $\rightarrow$ NIK $\rightarrow$ IKK $\rightarrow$ NF- κ B 发挥作用^[8-11]。而 NF- κ B 已被证实可以激活参与 UC 发病的 TNF- α 、IL-6 等促炎因子的启动子^[12],当这些炎症因子释放后,反过来可再次正反馈调节 NF- κ B 的表达^[13],如此则形成“级联效应”,炎症不断放大。

本实验通过 real-time PCR 检测小鼠结肠组织

NF- κ B p65 mRNA 的表达,发现应用抗 MIF 单抗的小鼠较 UC 模型组而言,其 NF- κ B p65 mRNA 的表达水平显著下降,证实抗 MIF 单抗可能通过抑制 NF- κ B 的表达,进而减少 NF- κ B 下游信号通路炎症因子的含量发挥其干预作用。但本研究显示应用抗 MIF 单抗干预的小鼠,其 NF- κ B p65 mRNA 的表达略低于正常对照组,理论上如果单纯通过 TLR4-NF- κ B 信号通路发挥作用,那么抗 MIF 单抗干预组的结肠组织学评分、阳性细胞率的表达等检测指标均应与正常对照组的表达水平相一致。因此,该研究也证实了有不同的信号通路参与 UC 的发病。

本次实验从分子信号转导通路层面对抗 MIF 单抗对小鼠 UC 可能产生的干预作用进行了探讨,初步判定抗 MIF 单抗通过抑制 NF- κ B 信号通路及其下游炎症因子的表达发挥作用,对其可能作用通路进行了大胆推测,肯定了抗 MIF 单抗的疗效。但是关于 UC 的信号通路是一个多因素参与的复杂网状结构,可能存在着分子间的重叠交叉激活,参与 UC 发病的很多关键的因子及其机制也尚未明确,且本次实验采用的小鼠样本量较少,故现阶段很难对抗 MIF 单抗对 UC 的保护作用有一个全面的定性,尚须进一步研究。

参考文献

- [1] 王怡薇,张会会,王彦礼,等. 黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠 NF- κ Bp65 调控作用研究[J]. 药理学,2015,50(1): 21-7.
- [2] Ohkawara T, Miyashita K, Nishihira J, et al. Transgenic over-expression of macrophage migration inhibitory factor renders mice markedly more susceptible to experimental colitis[J]. Clin Exp Immunol, 2005, 140(2): 241-8.
- [3] Cooper H S, Murthy S N, Shah R S, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis[J]. Lab Invest, 1993, 69(2): 238-49.
- [4] Ekström G M. Oxazolone-induced colitis in rats: effects of budesonide, cyclosporin A, and 5-aminosalicylic acid[J]. Scand J Gastroenterol, 1998, 33(2): 174-9.
- [5] Dieleman L A, Palmen M J, Akol H, et al. Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines[J]. Clin Exp Immunol, 1998, 114(3): 385-91.
- [6] Prideaux L, Kamm M A, De Cruz P P, et al. Inflammatory bowel disease in Asia: a systematic review[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2012, 27(8): 1266-80.
- [7] Sandborn W J, Feagan B G, Marano C, et al. Subcutaneous golimumab maintains clinical response in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis[J]. Gastroenterology, 2014, 146(1): 96-109.

- [8] 王群茹, 蒋明德, 吴晓玲, 等. Toll 样受体 4, 核转录因子- κ B p65 在小鼠溃疡性结肠炎中的表达及意义 [J]. 中国医药导报, 2012, 9(14): 17-9.
- [9] Scarpa M, Cardin R, Bortolami M, et al. Mucosal immune environment in colonic carcinogenesis: CD80 expression is associated to oxidative DNA damage and TLR4-NF κ B signalling [J]. *Eur J Cancer*, 2013, 49(1): 254-63.
- [10] 张超贤, 郭李柯, 郭晓凤. 三硝基苯磺酸/乙醇灌肠液诱导大鼠溃疡性结肠炎 TLR4/NF- κ B 和 PI3K/AKT/NF- κ B 信号通路的表达及电针的干预作用 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2015, 36(02): 263-70.
- [11] Eaton J E, Talwalkar J A, Lazaridis K N, et al. Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and advances in diagnosis and management [J]. *Gastroenterology*, 2013, 145(3): 521-36.
- [12] Gálvez-Llompart M, Recio M C, García-Domenech R. Topological virtual screening: a way to find new compounds active in ulcerative colitis by inhibiting NF- κ B [J]. *Mol Divers*, 2011, 15(4): 917-26.
- [13] Sakthivel K M, Guruvayoorappan C. Protective effect of *Acacia ferruginea* against ulcerative colitis via modulating inflammatory mediators, cytokine profile and NF- κ B signal transduction pathways [J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2014, 33(2): 83-98.

The protective effect of anti-macrophage migration inhibitory factor monoclonal antibody on ulcerative colitis in mice

Wang Baitao¹, Zhang Qifang², Qiu Xiaofen³, et al

(¹Dept of Graduate School, Guilin Medical College, Guilin 541004; ²Dept of Gastroenterology, ³Dept of Pathology, Nanxishan Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Guilin 541002)

Abstract Objective To investigate the protective effect and possible regulatory mechanism of anti-macrophage migration inhibitory factor monoclonal antibody (anti-MIF Ab) on acute ulcerative colitis (UC) in mice. **Methods** Acute ulcerative colitis model in mice was established by dextran sulfate sodium (DSS), to observe the protective effect of anti-MIF Ab on ulcerative colitis in mice. The experiment was divided into normal group, UC model group, anti-MIF Ab intervention group and saline group. During modeling and the period of administration, to observe general situations and score Disease Activity Index (DAI) of mice, after 7 days, all mice were killed, performing the gross damage score in colon, observing the colonic histopathological changes under the light microscope on HE staining, viewing the expression conditions of serum inflammatory cytokines such as MIF, TNF- α , IL-6 in intestinal inflammatory cells on immunohistochemical staining, using real-time quantitative (real-time PCR) to analyze the expression levels of NF- κ B p65 mRNA in colon tissue. **Results** Compared with the normal group, the degrees of colonic inflammation were significantly severe in the other three groups, the expression levels of serum inflammatory cytokines such as MIF, TNF- α , IL-6 were remarkably increased ($P < 0.05$); compared with the model group, the degrees of colonic mucosa damage were alleviated in intervention group. Anti-MIF Ab could obviously improve the expression levels of serum inflammatory cytokines such as MIF, TNF- α , IL-6 ($P < 0.05$), but no significant differences between saline group and model group. The results of real-time PCR showed that mice using anti-MIF Ab could apparently inhibit the expression level of NF- κ B p65 mRNA. **Conclusion** Anti-MIF Ab has a strongly protective effect against ulcerative colitis in mice, maybe the inhibition of NF- κ B signal pathway and the decrease of inflammatory cytokines play a central factor resulting from this conclusion.

Key words anti-macrophage migration inhibitory factor monoclonal antibody; dextran sulfate sodium; ulcerative colitis; inflammatory factor; nuclear factor- κ B