

- 科治疗[J]. 中国综合临床, 2012, 28(4):418-421
- 3 苏存华, 谈梦伟, 陆方林, 等. 268 例急性 A 型主动脉夹层临床资料分析[J]. 国际心血管病杂志, 2013, 40(5):189-191
- 4 Chikwe J, Cavallaro P, Itagaki S, *et al.* National outcomes in acute aortic dissection: influence of surgeon and institutional volume on operative mortality[J]. *Ann Thorac Surg*, 2013, 95(5):1563-1569
- 5 Okina N, Ohuchida M, Takeuchi T, *et al.* Utility of measuring C-reactive protein for prediction of in-hospital events in patients with acute aortic dissection[J]. *Heart Vessels*, 2013, 28(3):330-335
- 6 Parolari A, Pesce L L, Pacini D, *et al.* Risk factors for perioperative acute kidney injury after adult cardiac surgery: role of perioperative management[J]. *Ann Thorac Surg*, 2012, 93(2):584-591
- 7 Yacoub R, Patel N, Lohr JW, *et al.* Acute kidney injury and death associated with renin angiotensin system blockade in cardiothoracic surgery: a meta-analysis of observational studies[J]. *Am J Kidney Dis*, 2013, 62(6):1077-1086
- 8 张旭环, 方辉, 王辉. 糖尿病肾病患者感染导致急性肾损伤临床分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(14):3238-3240
- 9 于海亮, 王海英, 蒋桦, 等. 红花黄色素注射液对不稳定心绞痛患者 C 反应蛋白, 血流变, 血脂的临床疗效观察[J]. 血栓与止血学, 2015, 21(1):19-21
- 10 Garvin P, Nilsson E, Ernerudh J, *et al.* The joint subclinical elevation of CRP and IL-6 is associated with lower health-related quality of life in comparison with no elevation or elevation of only one of the biomarkers[J]. *Qual Life Res*, 2016, 25(1):213-221
- 11 孙其桓. CRP, 尿微量白蛋白与血脂联合检测对心血管疾病早期诊断的临床价值[J]. 河北医药, 2016, 38(2):206-208
- 12 Sah JP, Yadav CK, Yadav DK, *et al.* Correlation of hs-CRP with environmental risk factors of nephropathy in type 2 diabetes[J]. *J Adv Veterin Animal Res*, 2015, 2(2):217-220
- 13 Norihito O, Masanao O, Tomohiro T, *et al.* Utility of measuring C-reactive protein for prediction of in-hospital events in patients with acute aortic dissection[J]. *Heart Vessels*, 2013, 28(3):330-335
- 14 尚蔚, 马敏, 张巍, 等. 急性主动脉夹层术后急性肾损伤进展风险的相关因素研究[J]. 中国体外循环杂志, 2015, 13(3):161-164
- 15 Tang Y, Huang X R, Lv J, *et al.* C-reactive protein promotes acute kidney injury by impairing G1/S-dependent tubular epithelium cell regeneration[J]. *Clin Sci*, 2014, 126(9):645-659

(收稿日期:2016-07-28)

(修回日期:2016-07-28)

E2F2 在类风湿关节炎滑膜成纤维样细胞中的表达研究

张蕊 王林 潘继红

摘要 目的 研究 E2F2 在类风湿关节炎滑膜成纤维样细胞(RA FLs)中的表达,分析其表达与类风湿关节炎病理特征的关系,以及调控 E2F2 表达的机制。**方法** 采用瞬时转染的方法将 E2F2 siRNA 转染入 RA FLs 后,应用 RT-PCR 法筛选干扰效率最高的 siRNA,并应用 MTS 法检测干扰 E2F2 表达后对 RA FLs 增殖的影响,采用 ELISA 法检测 E2F2 下游基因表达的变化。采用 RT-PCR 法检测分别使用 TNF- α 和 PDTC 刺激 RA FLs 以及共同使用 TNF- α 和 PDTC 刺激 RA FLs 后 E2F2 的表达。通过染色质免疫沉淀法(ChIP)检测调控 E2F2 表达的方式。**结果** 在 siE2F2 后,与对照组相比 E2F2 在 mRNA 水平表达显著降低($P < 0.01$),细胞增殖能力减弱($P < 0.05$)。在 RA FLs 中 TNF- α 通过 NF- κ B 信号通路调控 E2F2 表达。**结论** 在 RA FLs 中 E2F2 存在高表达现象,并且 E2F2 的高表达参与 RA 的病变过程,TNF- α 通过 NF- κ B 信号通路调控 E2F2 表达,可作为治疗类风湿关节炎的新靶点。

关键词 类风湿关节炎 滑膜成纤维样细胞 E2F2

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.019

Review of E2F Transcription Factor 2 Expression in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-like Synovial Cells (RA FLs). Zhang Rui, Wang Lin, Pan Jihong. School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan-Shandong Academy of Medical Sciences, Shandong Medicinal Biotechnology Centre, Shandong 250062, China

Abstract Objective To study the relationship between E2F2 and the pathological features of RA and the mechanism of E2F2 expression. **Methods** The interference efficiency was detected by RT-PCR after RA FLs transfected with E2F2 siRNA. The cell proliferation

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2015YL029)

作者单位:250062 济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院、山东省医药生物技术研究中心

tion was analyzed by MTS and the expression of numerous genes was tested by ELISA. To analyze the influence of E2F2 in the immune response by RT-PCR, RA FLs were separately treated with TNF- α and PDTC. The way of regulating E2F2 expression was tested by Chip. **Results** Compared with negative control groups, the level of E2F2 mRNA were decreased in the cells transfected with E2F2 siRNA ($P < 0.01$). Silencing E2F2 suppresses the proliferation of RA FLs ($P < 0.05$). TNF- α regulates the expression of E2F2 in RA FLs via the NF- κ B pathway. **Conclusion** Up-regulation of E2F2 is associated with the process of RA and TNF- α regulates the expression of E2F2 in RA FLs via the NF- κ B pathway. Thus E2F2 might be a potential target for use in the development of new therapeutic approaches of RA.

Key words Rheumatoid arthritis; Fibroblast-like synovial cells; E2F2

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种系统性自身免疫性疾病, 其主要病理特征为关节滑膜慢性炎性病变、滑膜成纤维样细胞 (fibroblast-like synovial cells, FLs) 异常增生、滑膜衬里层增厚、骨及软骨进行性破坏, 并伴有严重的关节疼痛感^[1, 2]。有研究证实, 滑膜中 FLs 的异常增生在 RA 发病过程中起重要作用。在 RA 的发病过程中, FLs 具有大量增殖、凋亡不足等生物学活性, 但其具体调控机制尚不清楚^[3, 4]。

20 世纪 80 年代人们认为 E2F 转录因子家族是腺病毒 E2 基因启动子的激活因子, 此后, 越来越多的研究对该转录因子家族的结构及功能不断深入研究, 已经证明该转录因子家族在细胞增殖, 分化和凋亡的过程中起重要作用^[5]。有研究表明抑制 RA FLs 中 E2F 转录因子家族的活性可以降低滑膜细胞的增殖速率从而减缓骨组织的破坏^[6]。E2F2 是 E2F 转录因子家族中重要的一员。本课题组前期通过分析基因表达谱发现, E2F2 在 RA 滑膜组织中高表达^[7]。Ivey-Hoyle 等^[8]首次发现 E2F2 基因, 该基因位于 1p36, 编码的蛋白相对分子质量为 47.5 kDa。E2F2 具有口袋蛋白 (pRB) 结合域, pRB 与该区域结合。在 G₁ 末期, 细胞周期素 (CDKs) 引起 pRB 的磷酸化会使 pRB/E2F2 复合物分解, 从而释放并激活 E2F2, 调控下游基因表达 (例如编码 DNA 复制所需蛋白及酶), 最终影响细胞活性^[9~11]。有研究证实, E2F2 在骨肉瘤细胞和胶质瘤中参与调控细胞的增殖、分化、凋亡, 细胞因子的合成分泌, 最终影响了肿瘤的病变进程^[4, 12~14]。由于 RA 具有炎性病变、滑膜异常增殖等特点, 而前期实验发现 E2F2 在 RA 中异常高表达, 需要深入探讨 E2F2 与 RA 的病理特征的关系。

真核生物的基因组 DNA 以染色质的形式存在。因此, 研究蛋白质与 DNA 在染色质环境下的相互作用是阐明真核生物基因表达机制的基本途径。染色质免疫沉淀技术 (chromatin immunoprecipitation as-

say, ChIP) 也称结合位点分析法, 是目前唯一研究体内 DNA 与蛋白质相互作用的方法。它的基本原理是在活细胞状态下固定蛋白质-DNA 复合物, 并将其随机切断为一定长度范围内的染色质小片段, 然后通过免疫学方法沉淀此复合体, 特异性地富集目的蛋白结合的 DNA 片段, 通过对目的片段的纯化与检测, 从而获得蛋白质与 DNA 相互作用的信息。该方法是基于体内分析发展起来的方法, 在过去 10 年已经成为表观遗传信息研究的主要方法^[13, 14]。

本研究目的是通过抑制 RA FLs 中 E2F2 的表达, 探究其在细胞增殖方面的影响以及在 RA FLs 中调控 E2F2 表达的机制。

材料与方法

1. 材料: 本课题样本均来自山东省立医院, 膝关节置换手术中采集标本, 患者知情并同意, 且经山东省立医院伦理委员会通过。主要试剂: DMEM 高糖培养基 (美国 Corning 公司); 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液, 0.25% 胰蛋白酶-无 EDTA 的消化液, 青链霉素混合液 (以下简称双抗) (中国 Solarbio 公司); 澳洲胎牛血清, II 型胶原酶 (美国 Gibco 公司); Hiperfect 转染试剂, siE2F2 (德国 Qiagen 公司); Trizol Reagent (美国 Invitrogen 公司); SYBR (中国康为世纪公司); MTS (美国 Promega 公司); ReverTra Ace qPCR RT Kit (日本 Toyobo 公司); ChIP 试剂盒 (美国 Millipore 公司)。

2. 方法: (1) 原代培养及加药刺激: RA 患者的膝关节滑膜病变组织置于含有 1% 青链霉素混合液的 Hank's 平衡盐中冲洗 5 次, 组织充分剪碎置于无菌培养皿中, 加入 DMEM 高糖培养基及 II 型胶原酶 (DMEM 高糖培养基: II 型胶原酶 = 100:3), 置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中 8h。继续加入等体积的 0.25% 胰蛋白酶-无 EDTA 的消化液, 反复吹打至浆状, 过筛, 1500r/min 离心 5min, 收集细胞沉渣, 加入含 1% 双抗和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (以下简称全培养基), 吹打均匀并转移至培养瓶中, 置于

37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中。用含 1% 双抗和 2% 胎牛血清的 DMEM 培养基混悬 RAFLs, 种板, 18 h 后给予以下刺激: ① 分别加入肿瘤坏死因子 - α (tumor necrosis factor - α , TNF - α), NF - κ B 信号通路抑制剂氨 芑 酸 吡 咯 烷 (pyrrolidinedithiocarbamic acid, PDTC) 刺激 24h; ② 同时加入 TNF - α 与 PDTC 刺激 24h。(2) 瞬时转染: 全培养基混悬 RAFLs 并接种于 24 孔板中, 设置实验组, 阴性对照组 (NC 组) 和空白组 (MOCK 组), 按 siRNA: HiPerfect 转染试剂 = 2.5:3 的比例置于 100 μ l DMEN 高糖培养基中, 预先混合 10min, 转移至孔板中, 终体积为 500 μ l, siRNA 终浓度为 100nmol/L。(3) Trizol 法提取总 RNA: 弃掉 24 孔板中的培养基, 每孔加入 400 μ l Trizol, 吹打、收集转移至 1.5ml 无 RNA 酶的 EP 管中, 加入 200 μ l 氯仿, 剧烈摇晃, 4℃ 静置 10min, 12000r/min 4℃ 离心 15min, 收集上清, 加入等体积的异丙醇, 剧烈摇晃, 4℃ 静置 10min, 12000r/min 4℃ 离心 10min, 弃上清, 加入 500 μ l 无水乙醇, 剧烈摇晃, 12000r/min 4℃ 离心 5min, 弃上清, 晾干, 用无 RNA 酶的水溶解。(4) 采用 RT - qPCR 法检测基因在 mRNA 水平的表达: 依据 ReverTra Ace qPCR RT Kit 的步骤将 RNA 反转录为 cDNA, 并以此为模板进行 PCR 扩增。(5) MTS 法检测细胞增殖速率: RAFLs 接种于 96 孔板中, 瞬时转染同上, 每孔设置 3 个重复孔, 转染 24、48、72h 时, 每孔避光加入 20 μ l MTS, 37℃ 避光孵育 1h, 使用酶标仪检测 492nm 处的吸光度 (A) 值。(6) ELISA 法检测基因的表达: 收集细胞培养基置于酶标板中, 每孔 100 μ l, 3 个重复孔, 4℃ 静置 24h, 弃去孔中液体, 冷的 PBS 冲洗 3 遍, 加入酶标抗体 0.1ml, 37℃ 孵育 1h, 冲洗, 加底物显色液, 终止反应。在 45nm 出检测吸光度。(7) 染色质免疫共沉淀实验 (chromatin immunoprecipitation, ChIP): 50ng/ml TNF - α 刺激 RAFLs 48h, 同时设置空白对照组。根据 ChIP 试剂盒的步骤固定 RA FLs 的核染色质, 使其发生免疫沉淀反应。纯化的核染色质的 1/10 作为对照组 (Input), 剩余部分分别加入 2ng p65 抗体 (美国 Cell Signaling 公司), p60 抗体 (美国 Cell Signaling 公司), IgG 抗体 (美国 Santa Cruz 公司)。待 DNA 纯化, 通过 PCR 及 q RT - PCR 来扩增目的 DNA。使用的 E2F2 的引物序列如下, 上游序列: 5' - CCTTGGAGGCTACTGACAGC - 3'; 下游序列: 5' - CCACAGGTAGTCGTCCTGGT - 3'。

3. 统计学方法: 采用 SPSS 17.0 统计学分析软件。RT - PCR 和 MTS 实验结果采用 *t* 检验进行数据

分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

在 RAFLs 中 E2F2 高表达, 为进一步研究其在 RAFLs 增殖能力方面的作用, 需要筛选出干扰效率最高的 E2F2 siRNA。分别用 siE2F2 - 1、siE2F2 - 2 以及 siE2F2 - 3 转染并培养 RA FLs 24h, 与阴性对照组 NC 相比, 通过 RT - PCR 法检测到 E2F2 在 mRNA 水平的表达在不同程度上降低, 其中在 siE2F2 - 3 组中, E2F2 的表达最低, siE2F2 - 3 抑制效果最显著, 抑制效率达 85% 以上 ($P < 0.01$, 图 1)。后续实验将继续选用 siE2F2 - 3。

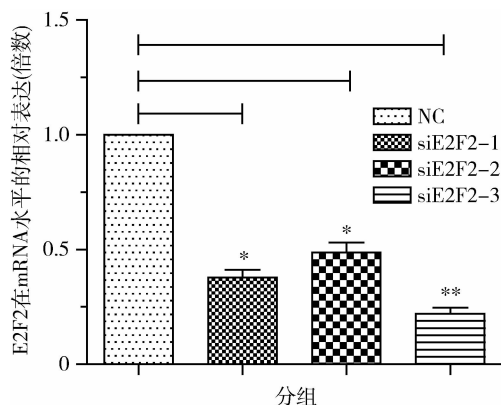


图 1 RT - PCR 法检测 siE2F2 干扰效率

与 NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

采用 MTS 法探究 E2F2 在 RAFLs 中的增殖作用, 与阴性对照组 NC 和空白对照组 MOCK 相比, RA FLs 转染 E2F2 siRNA 24、48、72h 后的增殖速率均降低, 转染 72h 后细胞增殖速率降低最显著 ($P < 0.05$, 图 2A)。以上数据表明 E2E2 可能与 RA 异常增殖有关, 随后进一步探究 E2F2 是否参与调控与增殖相关基因的表达。与阴性对照组 NC 相比, siE2F2 24h 后, 前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂), 细胞核增殖抗原 Ki67 (antigen identified by monoclonal antibody Ki - 67, Ki67) 和肿瘤抑制蛋白 53 (tumor protein p53, TP53) 在 mRNA 水平的表达受到抑制见图 2B。

为进一步探究炎症因子能否诱导 E2F2 的高表达以及在 RAFLs 中调控 E2F2 异常表达的病理学机制, 笔者选用 TNF - α 以及 PDTC 来刺激 RAFLs。与空白对照组相比, 用不同浓度的 TNF - α 刺激 RA FLs 24h 后, E2F2 的表达随浓度的增加而呈递增趋势, 其中诱导 E2F2 高表达最显著的是 50ng/ml TNF - α ($P < 0.05$, 图 3A)。

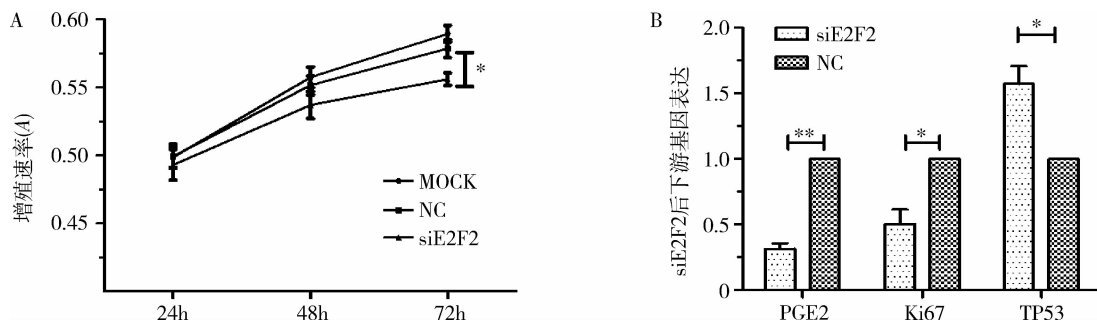


图2 siE2F2后 RA FLs 增殖能力以及下游基因表达

A. MTS 结果显示, siE2F2 后 RA FLs 增殖能力明显降低; B. siE2F2 后 PGE2, Ki67 和 TP53 表达显著降低; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

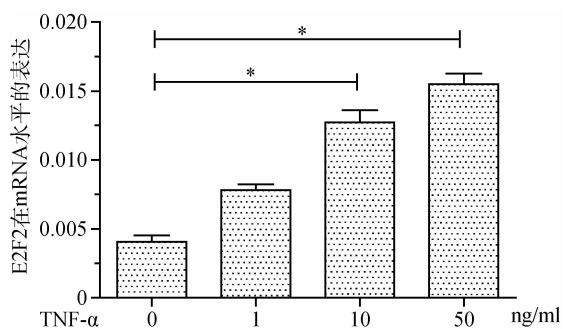


图3 TNF-α 诱导 E2F2 表达

* $P < 0.05$

为了进一步探究在 RA FLs 中调控 E2F2 表达的病理机制,笔者用不同浓度的 NF-κB 信号通路抑制

剂 PDTC 刺激 RA FLs 24h, 与空白对照组相比, 发现 E2F2 的表达明显受到抑制 ($P < 0.05$, 图 4A)。随后, 笔者用不同浓度的 PDTC 对 RA FLs 刺激不同的时间, 结果显示, PDTC 浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$, 刺激时间为 48h 时, E2F2 在 RA FLs 中的表达量最低 ($P < 0.05$, 图 4B)。同时, 笔者发现 PDTC 阻碍 NF-κB 信号通路后, TNF-α 对 E2F2 的诱导表达有显著的降低 ($P < 0.05$, 图 4C)。以上数据显示, E2F2 在 RA FLs 中的表达与 NF-κB 信号通路有关, 为进一步探究 E2F2 与该信号通路的关系, 笔者进行了 ChIP 实验。实验结果显示 p50 以及 p65 均能与 E2F2 的启动子区结合, 其中 TNF-α 刺激后 p65 与该区域的结合更多 (图 4D)。

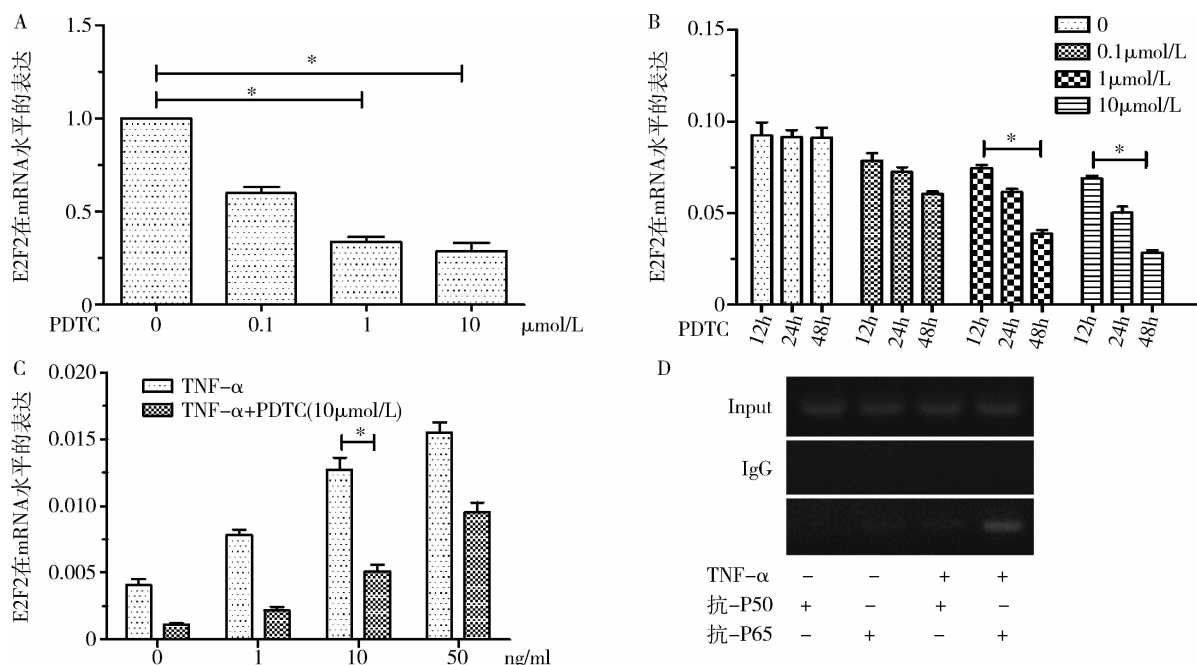


图4 TNF-α 通过 NF-κB 信号通路调控 E2F2 表达

A. PDTC 抑制 E2F2 表达; B. E2F2 对 PDTC 的抑制作用具有时间依赖性; C. PDTC 阻碍 NF-κB 信号通路后, TNF-α 对 E2F2 的诱导作用显著减弱; D. ChIP 结果显示, P65 直接与 E2F2 的启动子区结合; * $P < 0.05$

讨 论

RA 的主要病理特征为滑膜细胞异常增生,炎症因子浸润,最终导致骨及软骨的进行性破坏,既往研究发现 FLs 在 RA 病变过程中发挥重要作用^[1,15]。由于 RA 是一种多基因疾病,Tomita 等抑制 RA FLs 中 E2F 的活性后,FLs 的增殖受到抑制并且软骨的侵袭减缓^[2,6]。所以本课题组前期进行了基因表达谱芯片分析,发现 E2F2 在 RA 滑膜组织中高表达,这说明 E2F2 可能与 RA 病变过程有关。E2F2 是 E2F 转录因子家族中的重要一员,能够以异二聚体的形式结合在 E2 区,而该区域与细胞周期和 DNA 的反转录相关^[16]。在此基础上,笔者通过沉默 E2F2 发现 RA FLs 的增殖速率显著降低。为进一步探究 E2F2 在 RA 病变过程的作用,笔者选择检测与 RA 滑膜增殖相关基因的表达情况^[17,18],沉默 E2F2 后 PGE2 和 Ki67 的表达显著降低,而 TP53 的表达显著增加。PGE2 在促进成骨细胞增殖与分化过程中扮演重要角色,Ki67 是增殖性细胞核的标志物,而 TP53 能够调节细胞周期,影响细胞增殖速率^[19,20]。所以推测 E2F2 参与调控 FLs 的异常增殖,加剧 RA 的病变过程。

RA 病变的关节处炎性反应强烈并集聚大量炎症因子,为 FLs 的生长提供了适宜的环境,促进了 FLs 的异常增殖。TNF- α 是 RA 病变过程中的一个重要炎症因子,而 E2F2 参与调控 RA FLs 的细胞活性,所以笔者将进一步探讨 E2F2 的功能是否与该因子有关。通过实验发现 TNF- α 能够引起 E2F2 在 RA FLs 中高表达,且有浓度依赖性。有研究表明在 RA FLs 中炎症因子能够诱导 NF- κ B 信号通路的激活。通过实验发现 PDTC 能够显著减弱 TNF- α 对 E2F2 的诱导作用。同时,实验结果显示 PDTC 阻断 NF- κ B 信号通路后 E2F2 的表达显著降低,并且具有时间和浓度的依赖性。ChIP 实验证实 P65 直接与 E2F2 的启动子区结合。

综上所述,笔者发现沉默 E2F2 可以抑制 RA FLs 的异常增殖。TNF- α 通过 NF- κ B 信号通路诱导 E2F2 的表达,而 NF- κ B 直接与 E2F2 的启动子区结合,这表明 E2F2 与加剧 RA 炎性病变的细胞因子有关,且通过 NF- κ B 信号通路调控 E2F2 的表达。笔者的发现表明在 RA 中存在 TNF- α -NF- κ B-E2F2 这样一条通路,并且 E2F2 在 RA FLs 增殖过程中起重要作用,可能引起滑膜组织增多,滑膜里衬增厚,最终导致骨及软骨的侵袭,这在 RA 的治疗中将

成为一个新的潜在治疗途径。

参考文献

- Ekwall A-KH, Whitaker JW, Hammaker D, *et al.* The rheumatoid arthritis risk gene LBH regulates growth in fibroblast-like synoviocytes [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(5):1193-1202
- Lou L, Zhou J, Liu Y, *et al.* Chlorogenic acid induces apoptosis to inhibit inflammatory proliferation of IL-6-induced fibroblast-like synoviocytes through modulating the activation of JAK/STAT and NF- κ B signaling pathways [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(5):2054-2060
- Kato M, Ospelt C, Gay RE, *et al.* Dual role of autophagy in stress-induced cell death in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(1):40-48
- Muller H. E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(3):267-285
- Del Rey MJ, Izquierdo E, Usategui A, *et al.* The transcriptional response of normal and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to hypoxia [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(12):3584-3594
- Tomita T, Kunugiza Y, Tomita N, *et al.* E2F decoy oligodeoxynucleotide ameliorates cartilage invasion by infiltrating synovium derived from rheumatoid arthritis [J]. *Int J Mol Med*, 2006, 18(2):257-265
- Chang X, Yue L, Liu W, *et al.* CD38 and E2F transcription factor 2 have uniquely increased expression in rheumatoid arthritis synovial tissues [J]. *Clin Exp Immunol*, 2014, 176(2):222-231
- Ivey-Boyle M, Conroy R, Huber HE, *et al.* Cloning and characterization of E2F-2, a novel protein with the biochemical properties of transcription factor E2F [J]. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(12):7802-7812
- Schaal C, Pillai S, Chellappan SP. The Rb-E2F transcriptional regulatory pathway in tumor angiogenesis and metastasis [J]. *Adv Cancer Res*, 2014, 121:147-182
- Jiang H, Martin V, Gomez-Manzano C, *et al.* The RB-E2F1 pathway regulates autophagy [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(20):7882-7893
- Vormer TL, Wojciechowicz K, Dekker M, *et al.* RB family tumor suppressor activity may not relate to active silencing of E2F target genes [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(18):5266-5276
- Pusapati RV, Weeks RL, Rounbehler RJ, *et al.* E2F2 suppresses Myc-induced proliferation and tumorigenesis [J]. *Mol Carcinogen*, 2010, 49(2):152-156
- Phillips W, Wang L, Zheng Y, *et al.* Investigate pathogenic mechanism of TXNDC5 in rheumatoid arthritis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):1-10
- Suzuki DE, Nakahata AM, Okamoto OK. Knockdown of E2F2 inhibits tumorigenicity, but preserves stemness of human embryonic stem cells [J]. *Stem Cell Dev*, 2014, 23(11):1266-1274
- Hayashida K, Shimaoka Y, Ochi T. Rheumatoid arthritis synovial stromal cells inhibit apoptosis [J]. *Am Assoc Immunol*, 2010, 9(1):1110-1124

(下转第 156 页)

炎症组织中表达亦无明显增高现象,并且 Western blot 法检测进一步证实 DSS 结肠炎模型中肠黏膜组织中 CRF1 受体与正常组织 CRF1 受体表达水平差异无统计学意义。而 DSS 结肠炎模型中肠黏膜组织中 CRF2 受体蛋白表达水平是增高的,明显高于对照组(图 7)。

Moss 等^[13]在体外研究也发现 CRF2 受体可介导肠上皮细胞中炎症因子 IL-8 和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的表达。Saruta 等^[14]还报道溃疡性结肠炎患者固有层巨噬细胞和浆细胞中 CRF2 受体表达也很明显。肠腔内存在着大量细菌、病原体和食物衍化抗原,肠黏膜上皮细胞构成了第 1 道免疫防御屏障,而固有层又是调控肠上皮细胞对腔内环境稳定关键^[15,16]。而笔者的免疫荧光检测发现正常小鼠肠黏膜组织中 CRF2 受体表达较低,多集中在隐窝上皮表面和黏膜下层血管,然而炎症组织中 CRF2 受体在上皮层中表达明显增高,不仅是上皮层,肠黏膜炎症活化的关键部位在固有层中也有表达。因此笔者推测肠道黏膜组织中 CRF 信号系统的活化与肠道炎症的发生有关,而这种 CRF 信号系统活化的促炎作用有可能与 CRF2 受体活化有关。

参考文献

- Ye Y, Pang Z, Chen W, *et al.* The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(12): 22529-22542
- Santos J, Alonso C, Vicario M, *et al.* Neuropharmacology of stress-induced mucosal inflammation; implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome[J]. *Curr Mol Med*, 2008, 8, (4):258-273
- Melgar S, Engström K, Järgervall A, *et al.* Psychological stress reacts dextran sulfate sodium-induced chronic colitis in mice[J]. *Stress*, 2008, 11(5):348-362
- Taché Y, Million M. Role of Corticotropin-releasing factor signaling in stress-related alterations of colonic motility and hyperalgesia[J].

Neurogastroenterol Motil, 2015, 21(1):8-24

- Camilleri M. Physiological underpinnings of irritable bowel syndrome: neurohormonal mechanisms[J]. *J Physiol*, 2014, 592(14):2967-2980
- Koike Y, Uchida K, Tanaka K, *et al.* Dynamic pathology for circulating free DNA in a dextran sodium sulfate colitis mouse model[J]. *Pediatr Surg Int*, 2014, 30(12):1199-1206
- Radulovic M, Spiess J. Immunomodulatory role of the corticotropin-releasing factor[J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2001, 49(1):33-38
- Paschos KA, Kolios G, Chatzaki E. The corticotropin-releasing factor system in inflammatory bowel disease: prospects for new therapeutic approaches[J]. *Drug Discov Today*, 2009, 14(13-14):713-720
- Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action[J]. *Physiol Rev*, 1999, 79(1):1-71
- Yuan P Q, Wu S V, Wang L, *et al.* Taché Corticotropin releasing factor in the rat colon: expression, localization and upregulation by endotoxin[J]. *Peptide*, 2010, 31(2):322-331
- Gay J, Kokkotou E, O'Brien M, *et al.* Corticotropin-releasing hormone deficiency is associated with reduced local inflammation in a mouse[J]. *Model Exp Colitis Endocrinol*, 2008, 149(7):3403-3409
- Michal A, Zmijewski, Andrzej T, *et al.* Emerging role of alternative splicing of CRF1 receptor in CRF signaling[J]. *Acta Biochim Pol*, 2010, 57(1):1-13
- Moss AC, Anton P, Savidge T, *et al.* Urocortin II mediates pro-inflammatory effects in human colonocytes via corticotropin-releasing hormone receptor 2 α [J]. *Gut*, 2007, 56(9):1210-1217
- Saruta M, Takahashi K, Suzuki T, *et al.* Urocortin I in colonic mucosa in patients with ulcerative colitis[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(11):5352-5361
- McCole DF. IBD candidate genes and intestinal barrier[J]. *Regulation Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20(10):1829-1849
- Xu XR, Liu CQ, Feng BS, *et al.* Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(12):3255-3264

(收稿日期:2016-07-11)

(修回日期:2016-07-18)

(上接第 77 页)

- Indovina P, Marcelli E, Casini N, *et al.* Emerging roles of RB family: new defense mechanisms against tumor progression [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(3):525-535
- Perlman H, Bradley K, Liu H, *et al.* IL-6 and matrix metalloproteinase-1 are regulated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in synovial fibroblasts [J]. *J Immunol*, 2003, 170(2):838-845
- Johnson JL, Pillai S, Pernazza D, *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase genes by E2F transcription factors: Rb-Raf-1 interaction as a novel target for metastatic disease [J]. *Cancer Res*, 2011, 72

(2):516-526

- 王国保, 胡晓芳, 王永魁, 等. PGE2 和 NF- κ B 信号途径在骨再生中的相互作用 [J]. *中国临床解剖学杂志*, 2012, 30(3):315-319
- Hamard PJ, Barthelery N, Hogstad B, *et al.* The C terminus of p53 regulates gene expression by multiple mechanisms in a target- and tissue-specific manner in vivo [J]. *Genes Dev*, 2013, 27(17):1868-1885

(收稿日期:2016-09-08)

(修回日期:2016-09-27)