

CRF 及其受体在 DSS 诱导的实验性结肠炎中的表达

杨 丽 郑鹏远 于 咏

摘 要 **目的** 研究 CRF 及其受体在实验性 DSS 结肠炎中的表达,探讨其在肠道炎症形成中的可能作用。**方法** 将 6~8 周的雌性 BALB/c 小鼠分为正常对照组和实验组,建立 DSS 诱导的实验性结肠炎小鼠模型,小鼠进行 DAI 和组织病理学评分。免疫荧光检测小鼠肠黏膜组织中 CRF1 受体和 CRF2 受体的表达。Western blot 法检测小鼠肠黏膜组织中 CRF、CRF1 和 CRF2 受体的表达。**结果** 根据肠黏膜 DAI 评分和组织学评分提示 DSS 组肠黏膜组织炎症明显,造模成功。免疫荧光检测显示 CRF1 受体在 DSS 组和正常肠黏膜组织中表达差异无统计学意义($P>0.05$),而 DSS 组小鼠肠黏膜组织中 CRF2 受体表达明显高于对照组($P<0.05$)且主要分布在肠上皮细胞和固有层单个核细胞中。Western blot 法检测显示 CRF1 受体在 DSS 组和正常肠黏膜组织中表达差异无统计学意义($P>0.05$),而 DSS 组小鼠肠黏膜组织中 CRF 和 CRF2 受体表达明显高于对照组($P<0.05$)。**结论** DSS 结肠炎模型周围肠黏膜炎症组织中存在着 CRF 和 CRF2 受体的表达增高,而这种增高可能与肠道炎症发生有关。

关键词 促肾上腺皮质激素释放因子 结肠炎 CRF 受体

中图分类号 R574.62

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.038

CRF and CRF Receptors Expression in DSS Colitis Model in Mice. Yang Li, Zheng Pengyuan, Yu Yong. Department of Gastroenterology, Zhengzhou People's Hospital, Henan 450003, China

Abstract **Objective** To detect the expression of CRF and CRF receptors in colonic mucosa of DSS induced colitis in mice model and to study the effect of CRF and CRF receptors on the development. **Methods** Six to eight weeks healthy female BALB/c mice were divided into control group and DSS group. Setting up DSS colitis model and colitis was evaluated by the disease activity index(DAI) and histological score. The immunofluorescence technique was used to assay the CRF1 and CRF2 receptors expression in colonic mucosa. The expression of CRF and CRF receptors protein were analyzed by western blotting. **Results** DSS colitis was set up successfully with significant inflammation in colonic mucosa by the disease activity index(DAI) and histological score. Immunofluorescence staining evidenced that expression of CRF1 receptor in DSS colitis group has no significant deviation compared to control group($P>0.05$), while the expression of CRF2 receptor was elevated in DSS colitis group compared to control group($P<0.05$). CRF2 receptor was localized in epithelial cells and mononuclear cells in the lamina propria. The levels of CRF and CRF2 receptor protein by western blotting were higher in DSS colitis group compared to control group($P<0.05$). The level of CRF1 receptor protein in DSS colitis group had no significant deviation compared to control group($P>0.05$). **Conclusion** The higher expression of CRF and CRF2 in colonic mucosa of DSS colitis may participate in the development of colitis.

Key words Corticotropin-releasing factor; Colitis; CRF receptor

近年研究显示精神心理压力不但可以诱发和(或)加剧炎症性肠病症状,还可直接促进结肠炎的发生,促肾上腺皮质激素释放因子(corticotrophin-releasing factor, CRF)是下丘脑-垂体-肾上腺轴产生的主要应激因子,不仅脑组织中存在,周围组织也发现有 CRF 的表达,并且研究还显示周围组织中的 CRF 与炎症的发生有关^[1~3]。CRF 通过与 CRF1 或

CRF2 两种不同受体结合而发挥不同的生物学作用,既往的研究多集中在 CRF 及其受体在胃肠动力方面的作用,随着对 CRF 在周围组织中的免疫作用研究,人们也开始注意 CRF 受体在外周组织中炎症反应的作用^[4,5]。本实验即以病理学特征与人类溃疡性结肠炎非常相似的葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导的急性结肠炎模型作为研究对象,观察 CRF 及其受体在胃肠组织中的分布特征和表达情况,探讨其在肠道炎症形成中的可能作用。

材料与方法

1. 材料: 雌性 BALB/c 小鼠, 6~7 周龄, 体重 15~18g, 购自郑州大学动物实验中心。实验动物合格证号: SCXK 豫 2005-0001。小鼠饲养于动物房内, 饮用水及饲料全部消毒, 恒温 (24℃) 衡湿 (49% RH) 饲养。兔抗鼠 CRF、CRF1 和 CRF2 多克隆抗体购自美国 Santa 公司, 葡聚糖硫酸钠 (DSS) 相对分子质量 36~44kDa, 购自美国 Sigma 公司。

2. 方法: (1) 动物分组及模型制备: 小鼠随机分为实验组和对照组, 每组 10 只。实验组小鼠参照文献报道^[6] 每日饮用 5% DSS 溶液, 共 7 天, 建立急性 DSS 结肠炎模型, 对照组小鼠自由饮用蒸馏水, 每日记录小鼠体重、大便性状和隐血 (联苯胺法检测) 情况, 进行小鼠疾病活动指数 (disease activity index DAI) 评估。7 天后处死小鼠取出结肠组织, 常规石蜡包埋、切片、HE 染色, 余组织冻存, 同时进行结肠大体形态及组织学评估。(2) 免疫荧光检测: 小鼠肠黏膜组织切片、固定、血清封闭, 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline PBS) 冲洗 5min, 分别滴加 1:200 稀释兔抗鼠 CRF1 和 CRF2 单抗, 室温孵育 2h, PBS 洗涤 3 次, 滴加荧光二抗, 室温避光孵育 2h, PBS 洗涤 3 次, 封片, 荧光显微镜拍照。(3) Western blot 法: 提取蛋白, Bradford 方法测定蛋白浓度, 配置 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 凝胶, 蛋白加样, 横压电泳, 横流转膜, 脱脂奶粉封闭, 加一抗兔抗鼠 CRF、CRF1 受体和 CRF2 受体多克隆抗体, 孵育 2h, PBS 洗涤 2 次, 加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 孵育 2h, ECL 显色, 暗室曝光。将所有 Western blot 法检测结果进行图像分析, 用 UVIBand 成像系统进行扫描分析。

3. 统计学方法: 所有数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析, 以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 动物实验观察结果: 正常组小鼠饮食活动正常, 毛色光泽, 粪便呈颗粒状、体重逐天增加。DSS 结肠炎组小鼠饮用 DSS 溶液后逐渐出现厌食、懒动、竖毛和体重下降, 大便表现为稀便, 大便潜血阳性或血便。两组小鼠体重变化见图 1, 两组小鼠 DAI 评分结果见图 2。7 天后颈椎脱臼法处死两组小鼠, 正常对照组小鼠肠黏膜上皮完整, 固有层腺体形态及排列正常, 隐窝结构正常, 黏膜及黏膜下层无炎性细胞或仅可见少量炎性细胞浸润, 未见糜烂及溃疡 (图 3)。

DSS 结肠炎组小鼠肠黏膜上皮完全缺损或仅有少许上皮残留, 隐窝结果部分或全部破坏、扭曲变形, 固有层腺体排列紊乱、变形、腺体数目减少。黏膜和黏膜下层可见大量炎性细胞密集浸润, 少数可达浆膜层 (图 4)。

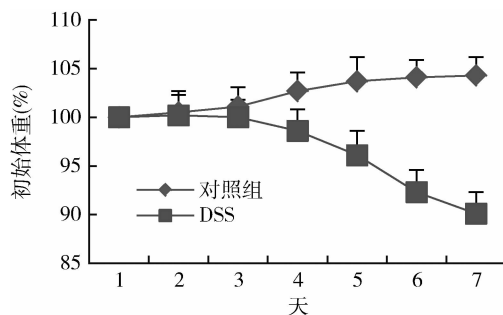


图 1 两组小鼠体重变化

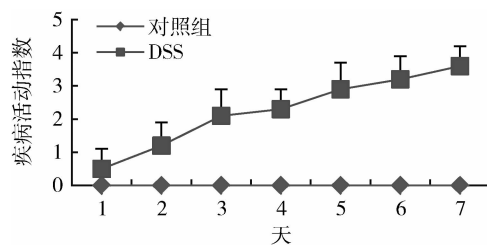


图 2 两组小鼠疾病活动指数 (DAI) 评分

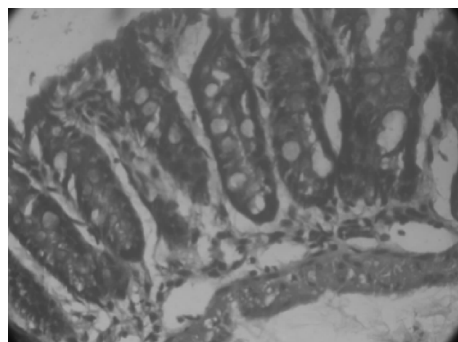


图 3 正常组小鼠肠黏膜组织 (HE, $\times 400$)

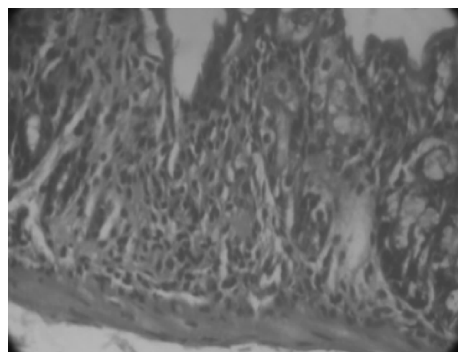


图 4 DSS 组小鼠肠黏膜组织 (HE, $\times 400$)

2. 免疫荧光检测结果:CRF1 受体和 CRF2 受体在肠黏膜组织中的免疫荧光表达见图 5 和图 6。图 5 显示红色荧光标记的 CRF1 受体在正常组与 DSS 组肠黏膜组织中表达信号无明显差异,而图 6 中显示绿色荧光标记的 CRF2 受体在 DSS 结肠炎肠黏膜组织中的表达信号明显强于正常组,且主要集中于肠黏膜上皮细胞和固有层单个核细胞中。

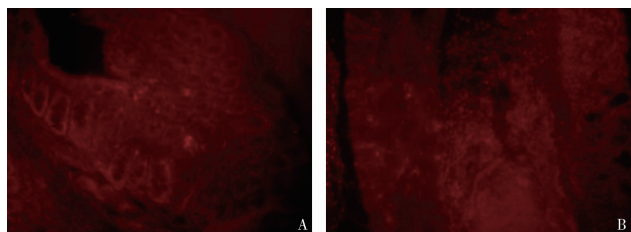


图 5 CRF1 受体的免疫荧光表达结果

A. 正常组;B. DSS 结肠炎组

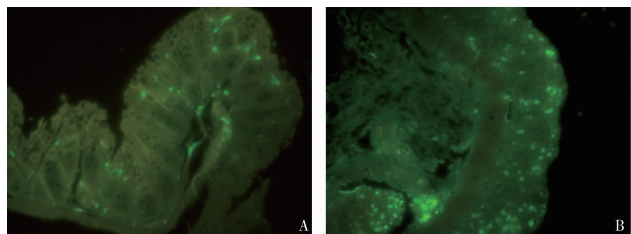


图 6 CRF2 受体的免疫荧光表达结果

A. 正常组;B. DSS 结肠炎组

3. Western blot 法检测结果:Western blot 法检测两组小鼠肠黏膜组织中的 CRF、CRF1 受体和 CRF2 受体的表达水平结果见图 7,DSS 组小鼠肠黏膜组织中 CRF 和 CRF2 受体的表达水平明显高于正常组小鼠($P < 0.05$),而 CRF1 受体在两组小鼠肠黏膜组织中的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

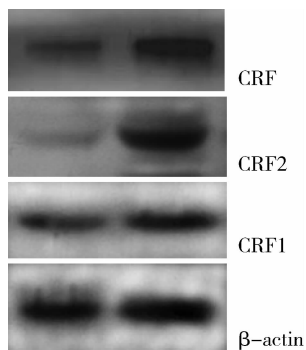


图 7 Western blot 法检测结果

讨 论

炎症性肠病的发病机制至今尚不明确,既往的研

究多集中在遗传、免疫及微生物等方面,近年发现神经肽也参与该病发生,其中促肾上腺皮质激素释放因子不仅在脑组织中存在,周围组织也有表达,研究已经发现中枢组织中的 CRF 通过 HPA 轴刺激垂体释放 ACTH,肾上腺释放糖皮质激素,进而限制炎症介质的进一步释放,间接的发挥抗炎作用,而周围组织的一些免疫细胞、神经细胞则通过释放 CRF 而在局部直接发挥着促炎作用^[7]。CRF 已不仅是应激因子,其在周围组织中更是促炎因子。最近已有发现炎症性肠病患者外周肠黏膜组织中存在 CRF 信号系统活化^[8]。

但是 CRF 及其受体在炎症性肠病肠道炎症发生中究竟起着怎样的作用尚不清楚。笔者利用与人类溃疡性结肠炎比较类似的 DSS 诱导的小鼠急性实验性结肠炎模型作为研究对象观察 CRF 及其受体在肠道炎症组织中的表达探讨其在肠道炎症发生中的可能作用。既往曾报道如避水试验、限制试验等应激动物模型中应激可造成肠黏膜组织中的 CRF 表达增高这已是不争事实,事实上 Turnbull 等^[9]报道免疫应激更易引起 CRF 的释放。近年来已有研究发现内毒素、艰难梭菌毒素 A 等也可引起肠黏膜组织中 CRF 的表达增高,而 CRF 基因敲除小鼠肠黏膜炎症会减轻^[10,11]。笔者的研究发现 DSS 结肠炎模型肠黏膜组织中 CRF 相对于正常组表达是增高的($P < 0.05$)。而很多临床研究也报道炎症性肠病患者外周肠黏膜组织中存在 CRF 信号系统活化^[8]。这都提示 CRF 的过度表达可能与肠黏膜的免疫反应异常有关。

但是增高的 CRF 通过何种受体通路促进肠黏膜炎症的产生? CRF 受体是属于 G 蛋白偶联受体(G-protein coupled receptor, GPCR)超家族成员,CRF1 和 CRF2 受体编码基因有 70% 序列同源性^[12]。既往的研究多集中在 CRF 及其受体在胃肠动力方面的作用^[4,5]。随着对 CRF 在外周组织中的免疫调节作用研究,人们也开始注意 CRF 受体在外周组织炎症反应中的作用,但是正如不同 CRF 受体在胃肠组织不同分布对胃肠动力有不同的调节作用一样,不同组织或细胞 CRF 受体亦发挥不同的促炎作用。周围组织中的免疫细胞如巨噬细胞、淋巴细胞和肥大细胞都存在着 CRF 受体,并可以在炎症过程中以自分泌或旁分泌的方式释放 CRF^[2]。

本研究通过免疫荧光检测显示肠黏膜组织中 CRF1 受体多在隐窝杯状细胞,上皮表面和固有层也有散在分布,此外肠肌层和黏膜下神经丛也有分布。

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)