

网络出版时间: 2017-3-21 13:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170321.1344.007.html>

IRE1 α 和 IRE1 β 在 DSS 诱导的小鼠慢性结肠炎中的表达及意义

戴发亮^{1,2}, 董仕桢^{1,3}, 轩青霞¹, 陈梦露^{1,3}, 陈攀¹, 冯丹丹¹, 范永刚^{1,2}, 高强^{1,4}

摘要 目的 探讨肌醇需求酶 1 (IRE1) α 和 IRE1 β 在葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的小鼠慢性结肠炎中的表达及意义。方法 选择 8~10 周龄的 C57BL/6 雌性小鼠随机分为两组: 对照组 10 只, 正常饮水; 慢性炎症组 10 只, 先给予 1.0% DSS 自由饮用 7 d, 然后正常饮水 14 d 如此作为一个周期, 循环 3 个周期建立小鼠慢性结肠炎模型。通过疾病活动指数 (DAI) 评分、结肠长度测定和 HE 染色等方法评估肠道炎症程度。采用实时定量 PCR 技术检测小鼠结肠组织中炎症因子、内质网应激因子 IRE1 α 、IRE1 β 、非剪接型 X-盒结合蛋白 1 (XBP1u)、剪接型 X-盒结合蛋白 1 (XBP1s) 和黏蛋白 (MUC) 2 mRNA 表达, 免疫组织化学方法检测 IRE1 α 、IRE1 β 和 MUC2 表达。结果 对照组小鼠无结肠炎表现, 而慢性炎症组在 3 个周期末结肠出现炎症表现。实时定量 PCR 结果显示白介素 (IL) -6、IL-8 和肿瘤坏死因子 (TNF) - α mRNA 在慢性炎症组高于对照组 ($P < 0.05$); XBP1s 和 IRE1 α mRNA 在两组表达无明显差异; XBP1u mRNA 在慢性炎症组表达低于对照组 ($P < 0.05$)。IRE1 β 和 MUC2 mRNA 在慢性炎症组表达均低于对照组 ($P < 0.05$)。IRE1 α 蛋白主要表达于结肠上皮的刷状缘、浆细胞等细胞的胞质中, 其表达量在炎症组高于对照组, IRE1 β 蛋白和 MUC2 蛋白主要表达于结肠上皮细胞胞质中, 两者表达量在炎症组低于对照组 ($P < 0.05$)。结论 IRE1 α 可能通过对 XBP1 进行剪接来参与肠道炎症反应, 并且 IRE1 α 还有可能通过其他机制来调节自身的表

达来参与炎症过程; IRE1 β 和 MUC2 可能与结肠上皮的功能维持有关, 在肠道炎症过程中 IRE1 β 和 MUC2 表达功能受到抑制而影响炎症的发生和发展。

关键词 炎症性肠病; 慢性结肠炎; IRE1 α ; IRE1 β ; 黏蛋白 2
中图分类号 R 363; R 574

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)04-0495-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.007

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一组非特异性肠道炎症性疾病, 其病因不明, 目前多认为其发生与遗传、免疫、肠道菌群和环境等多种因素有关^[1-2]。内质网应激是真核细胞应对胞内环境改变的一种功能状态, 随着对其研究的深入, 其在 IBD 发生发展中的作用也越来越受到关注^[3]。当内质网发生应激时, 细胞通过 3 条信号传导通路激活未折叠蛋白反应, 在肌醇需求酶 1 (inositol requiring enzyme 1, IRE1) 通路中 IRE1 有两个同系物, 即 IRE1 α 和 IRE1 β 。IRE1 α 在人体内广泛表达, 而 IRE1 β 主要在胃肠道和气管上皮细胞中表达^[4-5], 同时研究^[6]显示 IRE1 β 有影响 MUC2 分泌作用。

有关 IRE1 在 IBD 中的作用机制仍不十分清楚, 该研究为通过使用葡聚糖硫酸钠 (dextran sulphate sodium, DSS) 来建立小鼠慢性结肠炎模型, 并观察小鼠慢性结肠炎的发生发展, 以及对 IRE1 α 、IRE1 β 、X-盒结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, XBP1) u、XBP1s 和黏蛋白 2 (Mucin 2, MUC2) 等表达情况的检测, 来探讨内质网应激相关分子与慢性结肠炎之间的关系, 以期对 IBD 深入研究和未来 IBD 治疗提供理论依据。

2016-12-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (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

¹ 消化内科、² 肝胆外科、³ 检验科, 洛阳 471023⁴ 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: 戴发亮, 男, 硕士研究生;

高强, 男, 教授, 主任医师, 责任作者, E-mail: gaoq@ccmu.edu.cn

group was increased markedly ($P < 0.05$), and compared with blank group and negative control RNA group, there was no statistically significant difference. Compared with blank group and negative control RNA group, the migration distance in siRNA-FBXO11 group was increased significantly ($P < 0.05$), and compared with blank group and negative control RNA group, there was no statistically significant difference. **Conclusion** FBXO11 might inhibit the migration of lung adenocarcinoma A549 cells via the regulation of Snail.

Key words lung adenocarcinoma; FBXO11; Snail; migration

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康清洁级 C57BL/6 雌性小鼠(北京维通利华公司) 8~10 周龄, 19~23 g, 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, 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。

1.1.2 试剂 DSS(相对分子量为36 000~50 000, 美国 MP Biomedicals 公司); 逆转录试剂盒和实时定量 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司); 免疫组织化学检测用 IRE1 β 一抗(美国 Genetex 公司); IRE1 α (美国 Santa 公司) 和 MUC2 一抗(美国 GeneTex 公司); SABC 免疫组织化学检测试剂盒(武汉博士德生物公司); 浓缩型 DAB 显色试剂盒(北京索莱宝公司)。引物由上海生工生物工程公司合成(表 1)。

表 1 引物序列

引物	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
IL-6	F: AACGATGATGCACTTGCAGA	128
	R: TGGTACTCCAGAAGACCAGAGG	
TNF- α	F: CCACCACGCTCTTCTGTCTACT	161
	R: TGCTACGACGTGGGCTACA	
IL-8	F: CTAGGCATCTTCGTCCGCTCC	217
	R: TTGGGCCAACAGTAGCCTTC	
XBP1u	F: GGTCTGCTGAGTCCGAGCACTC	150
	R: AGGCTTGGTGATACATGG	
XBP1s	F: GGTCTGCTGAGTCCGAGCAGG	200
	R: AGGCTTGGTGATACATGG	
IRE1 α	F: GCATGACCAACTGGAAGTATC	115
	R: ACCATTGAGGGAGAGGCATAG	
IRE1 β	F: CACAACCTATCGCCGCTACT	165
	R: CATCCTGGTGCCATGTGTAA	
MUC2	F: CTGACCAAGAGCGAACACAA	282
	R: CATGACTGGAAGCAACTGGA	
β -actin	F: GGCTGTATTCCCTCCATCG	154
	R: CCACTTGGTAAACAATGCCATGT	

1.2 方法

1.2.1 分组及造模 小鼠适应性喂养 1 周, 室内温度保持 20~22 $^{\circ}\text{C}$, 湿度为 50% 左右, 明暗交替周期为 12 h。随机分为两组, 每组 10 只。对照组: 正常饮水; 慢性炎症组: 先给予 1.0% DSS 自由饮用 7 d, 然后正常饮水 14 d, 如此循环 3 次。各组小鼠均给予足量饲料。DSS 溶液的配制: 称取适量 DSS 加入蒸馏水中, 配制成 1.0% DSS 溶液, 配制好的溶液储存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 要求现配现用。

1.2.2 取材 于造模第 10 周末脱颈椎处死所有小

鼠, 剖腹, 取全结肠并测量长度, 剖开结肠后, 肉眼观察结肠内血性内容物情况, PBS 漂洗, 自远端结肠始取约 0.5 cm 福尔马林液固定, 经脱水后石蜡包埋 4 μm 厚度切片, 备免疫组织化学及 HE 染色使用。再取 1.0 cm 加入 RNAlater 液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h 后, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 行实时定量 PCR 检测。

1.2.3 观察指标 每 3 d 定时测量小鼠体重、摄食和饮水情况, 观察其活动度、大便性状、便血等情况, 参照 Jackson et al^[7] 的方法, 进行疾病活动指数(disease activity index, DAI) 评分。DAI 评分 = (体重质量下降 + 大便性状 + 便血分数) / 3(表 2)。参照张静等^[8] 的方法进行便血评分, 结肠内血性内容物用 0~3+ 标准评价: 0: 无出血; 1+: 结肠 1/3 出血; 2+: 结肠 2/3 出血; 3+: 整个结肠均有出血。

表 2 DAI 评分标准

体质量下降(%)	大便性状	便血	评分
0	正常	正常	0
1~5	-	-	1
5~10	松散	隐血阳性	2
10~15	-	-	3
>15	稀便	肉眼血便	4

正常为成形大便, 松散为糊状、半成形、不黏附于肛门的大便; 稀便为黏附于肛门的稀水样便; DAI 评分为 3 项分别评分之和/3

1.2.4 病理组织学观察 采用 HE 染色法对结肠组织进行病理分析。在高倍显微镜($\times 400$) 下进行细胞计数, 每张切片随机选择 10 个视野, 每个视野观察 100 个细胞。用经改良后的 Esworthy et al^[9] 的评分标准进行肠道炎症评分, 见表 3。

表 3 组织学评分标准

观察指标	评分(分)
淋巴细胞和中性粒细胞浸润	0~3
潘氏细胞和杯状细胞脱颗粒	0~2
隐窝破坏	0~3
炎性病灶深度	0~3
病变范围	0~3

炎症的临界值定义为 6 分

1.2.5 实时定量 PCR 检测 检测两组结肠组织中 IRE1 α 、IRE1 β 、XBP1u/s 和 MUC2, 以及炎症因子白介素(interleukin, IL)-6、IL-8、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 等 mRNA 表达水平。TRIzol 法提取总 RNA, 用核酸定量仪测定 RNA 纯度和浓度。取总 RNA 2 μg , 按照逆转录试剂盒说明书逆转录合成 cDNA, 合成的 cDNA 在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存

备用。冰上配制 PCR 反应液,反应体系 25 μ l: cD-NA 2 μ l, SYBR Premix EX Taq II (2 \times) 12.5 μ l, DEPC 水 8.5 μ l, 上下游引物各 1 μ l。于 BIO-RAD Real-time PCR 仪中进行 PCR 反应,反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C .5 s, 58 $^{\circ}$ C .30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 40 个循环。结果以阈循环(Ct)值表示,每个样本 3 个复孔,取平均 Ct 值, β -actin 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 mRNA 相对表达量。

1.2.6 免疫组织化学方法检测 IRE1 α 、IRE1 β 和 MUC2 的蛋白表达 免疫组织化学染色 IRE1 α 、IRE1 β 和 MUC2 的一抗工作浓度分别为 1:150、1:100、1:900, DAB 显色,苏木精复染。在 400 倍的光学显微镜下进行细胞计数,每张切片随机选择 10 个视野,每个视野观察 100 个细胞。染色细胞比率评分标准: <5% 计 0 分, 5% ~ 25% 计 1 分, 26% ~ 50% 计 2 分, 51% ~ 75% 计 3 分, 76% ~ 100% 计 4 分; 染色强度评分标准: 细胞质内无染色计 0 分, 淡黄色计 1 分, 棕色计 2 分, 棕褐色计 3 分, 根据两项评分之积进行免疫组织化学染色评分。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件分析,数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察及 DAI 评分 对照组小鼠摄食和饮水正常,活动如常,反应机警,皮毛黝黑发亮有光泽,生长发育良好,体重增加。慢性炎症组于开始饮用 1.0% DSS 后第 6 天出现懒动,摄食、饮水减少,体重下降,出现稀便、肛周潮湿现象,并有部分小鼠出现肉眼血便,第 7 天 10 只小鼠均出现稀血便,在停用 DSS 后小鼠体重将继续下降,持续到停药后的第 4 天体重开始回升,在第 1 个周期中平均体重下降最多达到 11.48%,但在第 1 个周期结束时炎症组小鼠粪便以稀软便为主,大多成形,无肉眼血便,小鼠毛色发亮,精神状态基本正常,造模过程中体重变化情况见图 1。在以后的 2 个周期中平均小鼠体重下降均未超过 10%; 在造模结束时,两组小鼠均无死亡,但慢性炎症组小鼠以稀便为主,大便不成形,但无肉眼血便。对照组结肠内无血便,且大便成形;慢性炎症组结肠内存有稀软便,未见肉眼血便。在造模结束时的 DAI 评分中慢性炎症组与对照组相比得分明显增高 ($P < 0.05$),见表 4。

2.2 结肠长度及结肠内血便评分 造模结束后,慢性炎症组小鼠结肠平均长度较对照组明显缩短

($P < 0.05$)。见表 4。

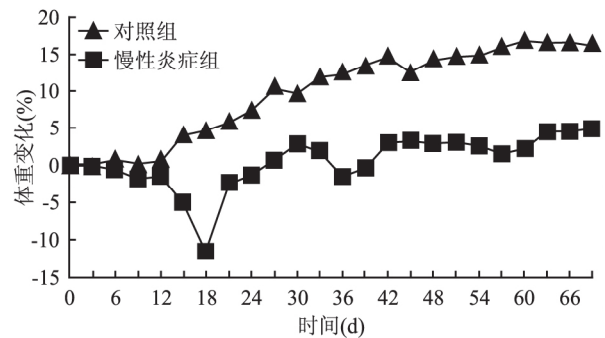


图 1 各组小鼠体重变化

表 4 各组小鼠 DAI 评分及结肠长度变化 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

项目	对照组	慢性炎症组	t 值	P 值
造模结束时 DAI (分)	0.0 \pm 0.0	3.0 \pm 0.8	11.619	<0.001
结肠长度 (cm)	8.7 \pm 0.6	6.0 \pm 0.5	11.431	<0.001

对照组小鼠在造模结束时,DAI 评分均为 0 分

2.3 组织病理学评分 对照组小鼠组织病理学观察可见结肠黏膜腺体结构完整,无炎性细胞浸润;慢性炎症组黏膜腺体结构失去完整性,隐窝结构被破坏,细胞结构排列紊乱,杯状细胞消失,局部并伴有弥漫性淋巴细胞、单核细胞等炎性细胞浸润,并可见隐窝不规则增生,呈慢性炎症改变;两组相比炎症程度有明显差别 ($t = 8.417, P < 0.01$) (图 2、3)。

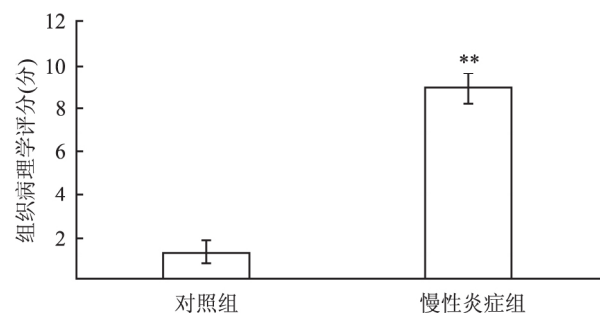


图 2 各组小鼠结肠组织学评分
与对照组比较: ** $P < 0.01$

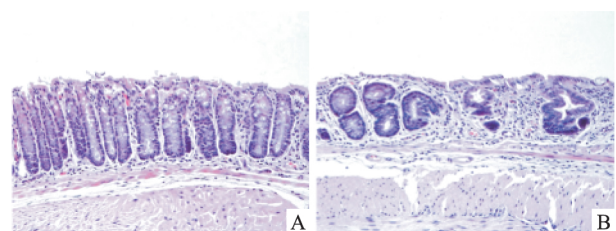


图 3 HE 染色结果 $\times 200$

A: HE 染色显示对照组黏膜结构正常,上皮细胞完整; B: 慢性炎症组黏膜结构不完整,炎症细胞浸润

2.4 实时定量 PCR 检测结果 两组结肠组织中 IL-6、IL-8、TNF-α、IRE1α、XBP1u、XBP1s、IRE1β 和 MUC2 的 mRNA 表达情况。

2.4.1 IL-6、IL-8 和 TNF-α mRNA 的表达 慢性炎症组中的这些炎症因子基因表达水平明显高于对照组,分别升高 13.1、3.1 和 2.6 倍($t=6.825、3.410、4.600, P<0.01$)。见图 4。

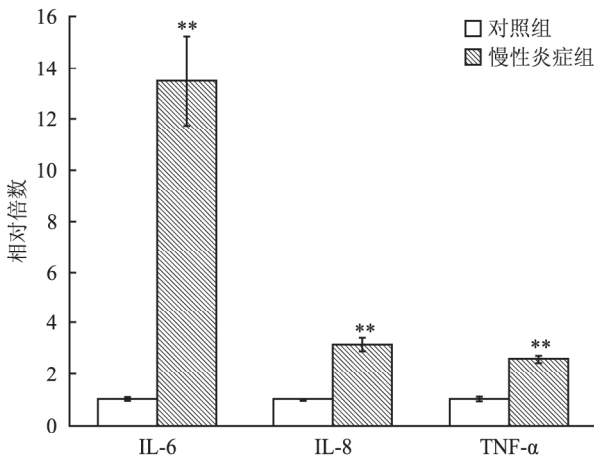


图4 各组小鼠结肠组织中 TNF-α、IL-8、IL-6 mRNA 的表达情况
与对照组比较: ** $P<0.01$

2.4.2 IRE1α、XBP1u 和 XBP1s mRNA 的表达 IRE1α 基因表达在慢性炎症组中的水平与对照组之间无变化(图 5)。虽然 XBP1s mRNA 表达在慢性炎症组中未见变化,而 XBP1u 与 XBP1s 比值却明显变化,从对照组的 31:1 下降到慢性炎症组的 17:1。

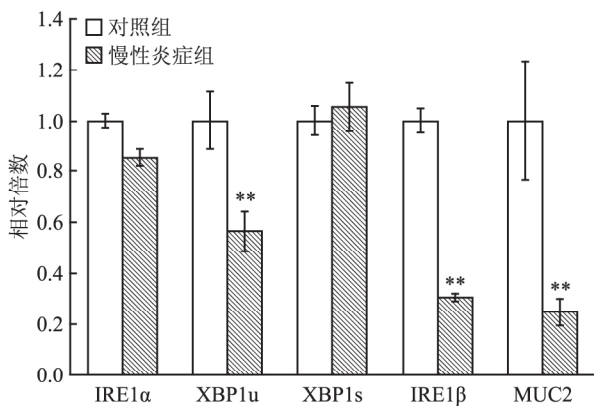


图5 各组小鼠结肠组织中 IRE1α、XBP1u、XBP1s、IRE1β 和 MUC2 mRNA 的表达
与对照组比较: ** $P<0.01$

2.4.3 IRE1β、MUC2 和 XBP1u mRNA 的表达 这 3 个基因的表达在慢性炎症结肠表达明显较正常结

肠组织明显降低,慢性炎症组分别是非炎症组织的 31%、25% 和 56% ($t=-9.985、-8.601、-3.275, P<0.01$) ,见图 5。

2.5 两组结肠组织中 IRE1α、IRE1β 和 MUC2 蛋白的表达情况

2.5.1 IRE1α 蛋白的表达 IRE1α 蛋白主要表达于结肠黏膜下层的细胞质中,在结肠上皮细胞尤其是刷状缘细胞的胞质中也可见到其少量表达,虽然 IRE1α mRNA 水平慢性炎症组与对照组之间相比没有明显变化,但蛋白表达量在慢性炎症组明显高于对照组($P<0.05$)。在炎症区的炎性细胞的胞质中可见到 IRE1α 的大量表达,胞质染色呈棕黄色。见表 5、图 6A。

表5 结肠组织中 IRE1α、IRE1β 和 MUC2 蛋白表达($n=10 \bar{x} \pm s$)

项目	对照组	慢性炎症组	t 值	P 值
IRE1α	1.5 ± 0.2	6.3 ± 0.4	-5.019	<0.001
IRE1β	5.3 ± 0.4	1.9 ± 0.1	8.371	<0.001
MUC2	4.8 ± 0.5	1.5 ± 0.2	8.944	<0.001

2.5.2 IRE1β 蛋白的表达 IRE1β 蛋白主要表达于结肠黏膜上皮细胞的细胞质中,在少数细胞的细胞核中也可见其表达,其表达量与 mRNA 表达一致。IRE1β 蛋白在慢性炎症组中表达较对照组显著减少($P<0.05$)。见表 5、图 6B。

2.5.3 MUC2 蛋白的表达 MUC2 蛋白主要表达于结肠黏膜上皮细胞的细胞质中,尤其在正常黏膜组织的杯状细胞中表达较多,其表达量与 mRNA 表达一致。MUC2 蛋白在慢性炎症组的表达明显低于对照组($P<0.05$)。见表 5、图 6C。

3 讨论

随着近年来生活水平、饮食习惯的改变,以及结肠镜普遍应用和对疾病认识的深入,我国 IBD 的就诊人数呈明显的升高趋势,其发病率近 20 年内增加了近十倍,据报道的总病例数在近 10 余年内增加了 2.5 倍^[10]。在临床上,IBD 与多种因素有关,患者主要表现为腹泻、黏液血便及腹痛等,病程呈慢性经过,发作与缓解反复交替,少数症状持续并逐渐加重,可伴有各种肠道外症状和并发症,严重影响了患者的生活质量^[11]。

本实验为模拟人溃疡性结肠炎的发生和发病过程,采用 3 个周期 DSS 诱导小鼠的慢性结肠炎模

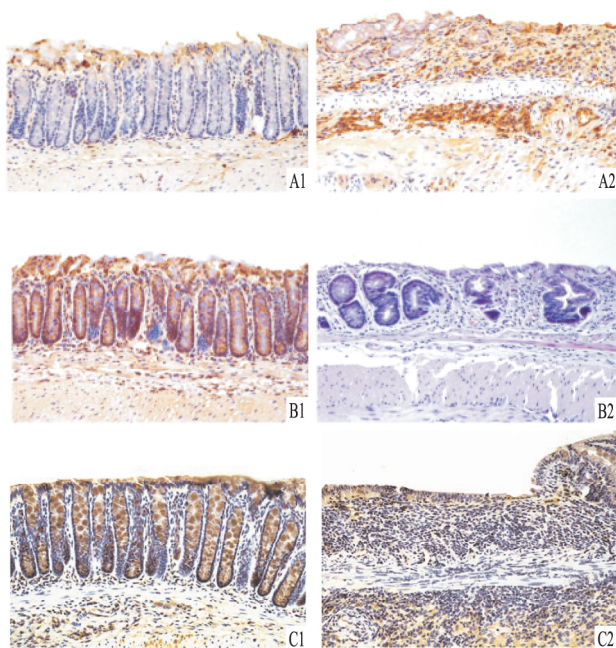


图6 免疫组化结果 ×200

A: IRE1 α ; B: IRE1 β ; C: MUC2; 1: 对照组; 2: 慢性炎症组

型 本模型在组织病理上表现出与人类结肠炎相似的症状,镜下显示小鼠的远端结肠黏膜隐窝结构紊乱,杯状细胞减少,炎性细胞浸润等。RT-PCR 结果显示 IL-6、IL-8 和 TNF- α 等炎症因子在慢性炎症组中均升高。这表明,肠炎模型呈慢性结肠炎的改变,在其缓解期也可看到病变的持续存在。

在本研究结果中虽然在转录水平上 IRE1 α mRNA 无明显变化,但 XBP1_u 与 XBP1_s 的比值在慢性炎症组明显下降,且免疫组化结果显示,IRE1 α 蛋白在炎症组织中明显增加,这可能与 IRE1 α 的非特异性的核酸内切酶活性对自身的调节有关,其可使内质网膜相关基因的快速降解,即 IRE1 依赖性调节衰减作用^[5];这说明在慢性结肠炎中 IRE1 α 通路曾被激活,参与了炎症过程。据研究^[12]报道,当内质网发生应激时,IRE1 α 可活化激活其特异性核酸内切酶活性,剪切 XBP1_u mRNA 为 XBP1_s mRNA,分别编码两种不同的蛋白质。当 IRE1 α 基因敲除时小鼠可发生自发性结肠炎,并伴有炎症因子的显著升高及肠上皮细胞凋亡增加,杯状细胞减少^[13],而当 XBP1 基因敲除时小鼠则可形成自发性的小肠炎伴内质网应激增强^[14]。本实验结果说明 IRE1 α -XBP1 通路在维持肠道正常结构、功能和炎症的发生发展中发挥着重要作用,并且 IRE1 还有可能通

过其他机制对自身基因的表达进行调节,来维护肠道的正常功能。

据有关报道^[4],IRE1 β 作为 IRE1 α 的同源体,主要表达于胃肠道和呼吸道上皮细胞中;并且 IRE1 β ^{-/-} 小鼠对 DSS 更加敏感^[15],其杯状细胞的内质网应激反应增强,并出现异常的 MUC2 在内质网上聚集。MUC2 作为肠道黏液凝胶屏障的主要成分,为保护肠道功能而发挥着重要的化学屏障作用^[6]。本研究结果显示 IRE1 β 与 MUC2 的基因和蛋白表达水平在慢性炎症组织中均明显下降,IRE1 β 有可能参与了 MUC2 蛋白的修饰及转运。IRE1 β 和 MUC2 的表达下调,一方面可能由结肠黏膜结构不完整,杯状细胞及肠上皮细胞损失过多造成;另一方面炎症反应抑制 IRE1 β 和 MUC2 的表达,使其对肠道的保护作用减弱,从而又促进了炎症的发生和发展。

综上所述,本实验证明在慢性结肠炎的发病过程中,内质网发生应激,IRE1 α -XBP1 通路可能被激活,并且 IRE1 α 还通过其他机制对自身进行了调节,其共同维护了肠道的正常功能;IRE1 β 和 MUC2 表达的降低,使其对肠道的保护作用减弱,促进了炎症的发生发展,通过提高其在结肠中的表达,来改变结肠黏膜上皮所直接面对的外环境,将有可能阻止 IBD 的发生和发展。本研究探讨了 IRE1 α 、IRE1 β 、XBP1 和 MUC2 在 DSS 诱导的小鼠慢性结肠炎中的表达情况,有关其具体表达调控机制还有待于进一步研究,以期 IBD 靶点治疗药物的开发提供新的思路。

参考文献

- [1] Peloquin J M, Goel G, Villablanca E J, et al. Mechanisms of pediatric inflammatory bowel disease [J]. Annu Rev Immunol, 2016, 34: 31-64.
- [2] Kostic A D, Xavier R J, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead [J]. Gastroenterology, 2014, 146(6): 1489-99.
- [3] Cao S S. Epithelial ER stress in Crohn's disease and ulcerative colitis [J]. Inflamm Bowel Dis, 2016, 22(4): 984-93.
- [4] Martino M B, Jones L, Brighton B, et al. The ER stress transducer IRE1 β is required for airway epithelial mucin production [J]. Mucosal Immunol, 2013, 6(3): 639-54.
- [5] Lencer W I, DeLuca H, Grey M J, et al. Innate immunity at mucosal surfaces: the IRE1-RIDD-RIG-I pathway [J]. Trends Immunol, 2015, 36(7): 401-9.
- [6] Tsuru A, Fujimoto N, Takahashi S, et al. Negative feedback by

- IRE1 β optimizes mucin production in goblet cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(8): 2864–9.
- [7] Jackson L N, Zhou Y, Qiu S, et al. Alternative medicine products as a novel treatment strategy for inflammatory bowel disease [J]. *Am J Chin Med*, 2008, 36(5): 953–65.
- [8] 张静, 韩英, 纪欣, 等. GSH 在 DSS 诱导的小鼠实验性肠炎中的作用 [J]. *世界华人消化杂志*, 2005, 13(12): 1400–3.
- [9] Esworthy R S, Kim B W, Larson G P, et al. Colitis locus on chromosome 2 impacting the severity of early-onset disease in mice deficient in GPX1 and GPX2 [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17(6): 1373–86.
- [10] Hilmi I, Jaya F, Chua A, et al. A first study on the incidence and prevalence of IBD in malaysia—results from the kinta valley IBD epidemiology study [J]. *J Crohns Colitis*, 2015, 9(5): 404–9.
- [11] Malik T A. Inflammatory bowel disease: historical perspective, epidemiology, and risk factors [J]. *Surg Clin North Am*, 2015, 95(6): 1105–22.
- [12] Lin J H, Li H, Yasumura D, et al. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response [J]. *Science*, 2007, 318(5852): 944–9.
- [13] Zhang H S, Chen Y, Fan L, et al. The endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 α in intestinal epithelial cells is essential for protecting against colitis [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(24): 15327–36.
- [14] Kaser A, Lee A H, Franke A, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease [J]. *Cell*, 2008, 134(5): 743–56.
- [15] Bertolotti A, Wang X, Novoa I, et al. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 β -deficient mice [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107(5): 585–93.

Expression and significance of IRE1 α and IRE1 β in DSS induced mouse chronic colitis

Dai Faliang^{1,2}, Dong Shizhen^{1,3}, Xuan Qingxia¹, et al

(¹Dept of Gastroenterology and Hepatology, ²Dept of Hepatobiliary Surgery, ³Clinical laboratory, The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023)

Abstract Objective To investigate the expression and significance of IRE1 α and IRE1 β in chronic colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) in mice. **Methods** Seven-to-eight-week-old C57BL/6 mice were randomly divided into control group and chronic colitis group ($n = 10$ for each group). Chronic colitis group was given 1.0% DSS free to drink for 7 days and then water for 14 days as a cycle. After three cycles a mouse model of chronic colitis was established. Mice in the control group was only given drinking water. Disease activity index (DAI), colon length and pathological inflammation score of the colon were observed. The expression of pro-inflammation cytokines, IRE1 α , IRE1 β , XBP1u, XBP1s and MUC2 mRNA were detected by real-time quantitative PCR, and the expression of IRE1 α , IRE1 β and MUC2 protein were evaluated by immunohistochemistry. **Results** There was no inflammation in mouse colon of the control group; whereas mice showed the inflammatory manifestations at the end of third cycle in mouse colon of the chronic colitis group. IL-6, IL-8 and TNF- α mRNA in chronic colitis group were significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression of XBP1s and IRE1 between the two groups. The expression of IRE1 β , XBP1u and MUC2 mRNA in mice with chronic colitis were significantly lower than that of control group ($P < 0.05$). The protein of IRE1 α was mainly expressed in the cytoplasm of colonic epithelial brush margin and plasma cells and lymphocytes of some inflammatory cells. IRE1 α protein in the colitis group was higher than that of the control group. The protein of IRE1 β and MUC2 were mainly expressed in colonic epithelial cells, and their expression was decreased in chronic colitis group ($P < 0.05$). **Conclusion** ER stress molecule IRE1 α may be involved in the intestinal inflammatory response by splicing XBP1, and regulate its own expression through other mechanisms to participate in the inflammatory process. The pathway of IRE1 β /MUC2 is inhibited in the pathophysiology of chronic inflammation in the gut.

Key words inflammatory bowel disease; chronic colitis; IRE1 α ; IRE1 β ; MUC2