

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.20170321.1344.013.html>

miR-21 介导肠上皮细胞凋亡维持肠道稳态 参与溃疡性结肠炎相关癌变研究

周海新¹, 方健松², 张涛², 马媛萍², 黄晓燕³

摘要 目的 观察溃疡癌变小鼠结肠黏膜 miR-21、Caspase-8、肠上皮细胞凋亡及 β -防御素表达, 探讨溃疡相关癌变的可能发病机制。方法 40 只雄性清洁级 Balb-c 小鼠按体质量随机分 2 组即正常组和模型组, 其中正常组 10 只, 模型组 30 只。采用二甲胍/葡聚糖硫酸钠 (DMH/DSS) 复合法制备溃疡癌变相关模型, 造模 30 周结束后处死全部小鼠, 应用光镜检测小鼠结肠黏膜组织形态学变化, 电镜检测超微组织结构及上皮细胞凋亡变化; 应用现代分子生物学技术检测 miR-21、Caspase-8 及 β -防御素表达变化。结果 与正常组比较, 溃疡相关癌变小鼠结肠黏膜光镜下见结肠黏膜不同程度缺损, 表面渗出及坏死物, 细胞形态异型, 呈浸润癌改变; 电镜下见肠黏膜层上皮细胞表面微绒毛稀疏, 长短不一, 细胞连接间隙增宽, 见大量上皮细胞凋亡小体及细胞自噬, 线粒体肿胀, 结构不清, 嵴结构消失, 造模成功率约 70%。与

正常组比较, 溃疡癌变小鼠结肠黏膜 miR-21、Caspase-8、 β -防御素蛋白及 mRNA 表达均呈明显上升趋势, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 溃疡相关癌变的发生及发展可能是由于溃疡性结肠炎 (UC) 炎症持续, 诱导 miR-21、Caspase-8 及 β -防御素表达增加, 破坏肠道免疫平衡, 导致肠黏膜通透性增加, 肠上皮细胞凋亡/自噬加剧, 造成恶性循环, 进一步破坏肠道稳态, 上皮细胞异型增生, 甚则癌变。

关键词 miR-21; 肠上皮细胞凋亡; 肠道稳态; 溃疡相关癌变
中图分类号 R 574.62

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)04-0523-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.013

“炎癌转化”这一理念已被广为接受, 但是其具体发病机制尚未完全明晰, 微小 RNA (microRNA) 作为一类非编码的内源性小分子 RNA, 能在转录后水平负性调节靶基因 mRNA 表达, 结肠黏膜 miRNA 差异性表达参与维持肠道黏膜免疫和肠屏障通透性完整而发挥重要作用^[1-2], 有研究^[3-4]推测 miRNA 在细胞内源性和外源性免疫调节系统中起重要作用, 且参与炎症调节过程及炎癌转化, 调节肠道黏膜 miRNA 表达可能为溃疡相关癌变 (ulcerative colitis associated carcinogenesis, UCAC) 靶向治疗提供新的

2016-12-30 接收

基金项目: 海南省卫生计生行业科研项目 (编号: 14A210219); 广西自然科学基金项目 (编号: 2013GXNSFAA019116)

作者单位: ¹ 海南省中医院消化科, 海口 570203

² 广西中医药大学附属瑞康医院消化科, 南宁 530011

³ 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530011

作者简介: 周海新, 男, 副主任医师, 本科;

张涛, 男, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 327664246@qq.com

Screening of proteins interacting with Intelectin-1 in Crohn disease by co-immunoprecipitation and MALDL-TOF/TOF-MS

Gu Wen, Zhou Zheng, Wu Wenyong, et al

(Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To screen the proteins interacted with Intelectin-1 in Crohn disease *via* comparing Crohn disease and normal tissues and investigate the function of Intelectin-1 in the development of Crohn disease. **Methods** The proteins interacting with Intelectin-1 were screened by co-immunoprecipitation and identified by MALDL-TOF/TOF-MS and finally confirmed by immunoprecipitation and Western blot analysis. **Results** Data of Western blot showed that Intelectin-1 was overexpressed in Crohn disease tissues compared with normal tissues. In addition, four novel proteins (ATPase, HSP90, TRAF3 and ZNF) interacted with Intelectin-1 were successfully verified by MALDL-TOF/TOF-MS. **Conclusion** Intelectin-1 involves in the development of Crohn disease *via* interacting with TRAF3, ATPase, HSP90 and ZNF.

Key words Crohn disease; Intelectin-1; co-immunoprecipitation; mass spectrometry; protein-protein interaction

思路。该课题组基于前期研究,拟采用二甲胍/葡聚糖硫酸钠(2-dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium, DMH/DSS)复合法制备溃疡癌变模型,观察小鼠结肠黏膜组织病理结构、肠上皮细胞凋亡、及 miR-21、Caspase-8、 β -防御素等表达变化,探讨 UCAC 的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 40 只清洁级雄性 Balb-c 小鼠,4 周龄,体重(20 ± 2) g,购自湖南斯莱尔克生物有限公司,饲养于广西中医药大学动物实验中心,饲养环境为恒温(26 ± 0.5) °C,恒湿 60%,自然光线,昼夜循环。

1.2 试剂及仪器 DMH、DSS(美国 Sigma 公司);苏木精-伊红染液、电镜固定液等(广西博仁生物技术有限公司);miR-21、Caspase-8、 β -防御素一抗(美国 Abcam 公司);miR-21、Caspase-8、 β -防御素引物设计及合成委托上海生工生物技术有限公司完成;H-600 透射电镜(日本 Hitachi-日立公司);德国蔡司光镜(LSM-880,德国蔡司公司);BIO-RAD 电泳仪-PowerPac 系列(上海拜力生物科技有限公司);Te-can 酶标仪(瑞士帝肯公司);ABI7500 荧光定量 PCR 仪(美国罗氏公司)等。

1.3 方法

1.3.1 模型制备 参照文献^[5]报道,将 4 周龄清洁级 Balb-c 小鼠按体质量,分为正常组、模型组,其中正常组 10 只,模型组 30 只。除外正常组,模型组采用 DMH/DSS 复合法制备 UCAC 模型,即将 DMH 溶于生理盐水中,使其终浓度为 20 mg/kg(0.4% DMH 0.05 ml/10 g),用 1 mol/L NaOH 调整 pH 值至 6.5,腹腔注射 DMH 20 mg/kg,每周 1 次,继而在小鼠饮用水中添加 3% DSS(浓度为 30 g/L),连续自由饮用 1 周,正常组同步饲养,以上述过程为 1 个循环,连续 5 个循环,继而饲养 20 周,总计 30 周。30 周后脱椎处死全部小鼠,截取从回盲部-直肠全部肠段,在放大镜下观察结肠黏膜糜烂、溃疡及腺瘤改变,并标记。分别置于 10% 中性甲醛、2.5% 戊二醛及 -70 °C 超低温冰箱保存备测。

1.3.2 指标检测

1.3.2.1 小鼠结肠黏膜组织学变化 石蜡包块常规梯度脱蜡至水,由病理科专业人员采用 HE 染色法,中性树胶封片后,目镜下观察结肠黏膜组织形态学改变。

1.3.2.2 小鼠结肠黏膜超微结构及肠上皮细胞凋

亡变化 由病理科专业人员应用 H-600 透射电镜,超薄切片 1 μ m,电镜下观察结肠黏膜组织超微结构,肠黏膜屏障及肠上皮细胞凋亡变化。

1.3.2.3 小鼠结肠黏膜 miR-21、Caspase-8、 β -防御素蛋白表达变化 应用 Western blot 法,检测 miR-21、Caspase-8、 β -防御素蛋白表达变化,具体实验由广州蓝吉生物技术有限公司完成,具体步骤依次为总蛋白提取、SDS-PAGE 胶配制、蛋白上样、分离电泳、转膜、一抗孵育、二抗孵育、显色、拍照,两种蛋白都用 GAPDH 做为内参蛋白,采用凝胶成像系统扫描,以特异性条带浓度与面积的乘积为有效值,反映蛋白表达水平。

1.3.2.4 小鼠结肠黏膜 miR-21、Caspase-8、 β -防御素 mRNA 表达变化 应用实时荧光定量 PCR 法(Real-time PCR),以 GAPDH 为内参,检测 miR-21、Caspase-8、 β -防御素 mRNA 表达,具体实验由广州蓝吉生物技术有限公司进行操作,以目的基因与 GAPDH mRNA 比值作为目的基因的相对表达量。在 Gen-Bank 查询基因信息,CDS 区合成引物,由上海生工生物技术有限公司完成 miR-21、Caspase-8、 β -防御素、GAPDH 引物序列。见表 1。

表 1 miR-21、Caspase-8、 β -防御素、GAPDH 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	扩增片段(bp)
miR-21	F: GGGAGCTTATCAGACTGATG	194
	R: TGCCTGTCTGGAGTCCGA	
Caspase-8	F: GGGAGCATGTGAATGCCATC	118
	R: GGCTCCTGGAGGTCAAACAT	
β -防御素	F: TGGGATCGGCCATTGAACAA	167
	R: CAGAAGAACTCCTCAAGAAG	
GAPDH	F: GTTGTCTCCTCGACTTCA	93
	R: GCCCCTCCTGTTATTATGG	

1.4 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 *t* 检验;计数资料应用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况变化 正常组小鼠同步生长,体重呈自然增长,耗食量正常,研究过程中未见死亡;模型组小鼠造模过程中分别在造模第 9 周死亡 2 只,经解剖未见肠穿孔及腹腔积液,死因不明;第 16、20 周死亡 2 只,经解剖考虑肠穿孔死亡,剩余 14 只小鼠,其中 3 只可见脱肛,模型总死亡率为 20%。

2.2 UCAC 小鼠结肠组织病理学变化 正常组:结肠黏膜完整,腺体排列整齐,未见炎性细胞浸润改

变; 模型组: 结肠黏膜不同程度缺损, 表面渗出及坏死物, 细胞形态异型, 呈浸润癌改变。总体模型成功率为 70%。见图 1。

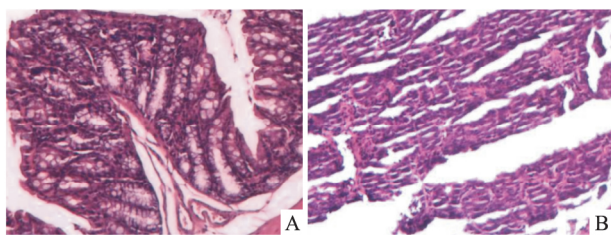


图1 UCAC 小鼠结肠组织病理学变化 SP×100
A: 正常组; B: 模型组

2.3 UCAC 小鼠结肠组织超微结构及上皮细胞凋亡变化 正常组: 肠黏膜屏障完整, 微绒毛列阵整齐, 杯状细胞分泌较多颗粒, 线粒体嵴结构清晰, 可见少许上皮细胞凋亡小体; 模型组: 肠黏膜层上皮细胞表面微绒毛稀疏, 长短不一, 细胞连接间隙增宽, 见大量上皮细胞凋亡小体及细胞自噬, 线粒体肿胀, 结构不清, 嵴结构消失。见图 2。

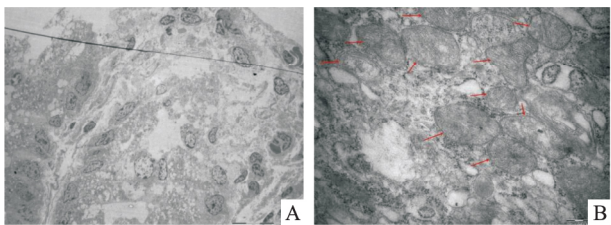


图2 UCAC 小鼠结肠组织超微结构及
上皮细胞凋亡变化 SP×10 000
A: 正常组; B: 模型组

2.4 UCAC 小鼠结肠 miR-21、Caspase-8、β-防御素蛋白表达 模型组小鼠结肠黏膜 miR-21、Caspase-8、β-防御素蛋白表达明显上升, 均高于正常组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2、图 3。

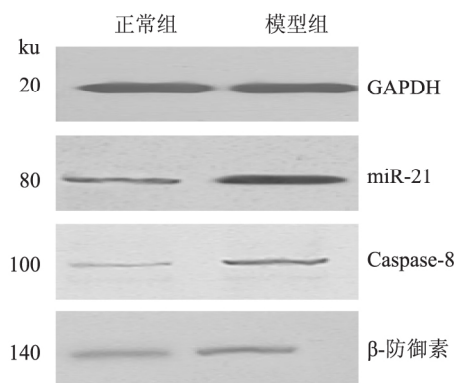


图3 UCAC 小鼠结肠 miR-21、Caspase-8、
β-防御素蛋白表达

表2 UCAC 小鼠结肠 miR-21、Caspase-8、β-防御素蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

项目	正常组($n=10$)	模型组($n=30$)	P 值
miR-21	0.67 ± 0.09	1.87 ± 0.14	0.000
Caspase-8	0.81 ± 0.12	1.96 ± 0.22	0.000
β-防御素	0.78 ± 0.08	1.98 ± 0.13	0.000

2.5 UCAC 小鼠结肠 miR-21、Caspase-8、β-防御素 mRNA 表达 模型组小鼠结肠黏膜 miR-21、Caspase-8、β-防御素蛋白表达明显上升, 均高于正常组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3、图 4。

表3 UCAC 小鼠结肠 miR-21、Caspase-8、
β-防御素 mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)

项目	正常组($n=10$)	模型组($n=30$)	P 值
miR-21	0.71 ± 0.11	1.92 ± 0.16	0.000
Caspase-8	0.92 ± 0.07	1.73 ± 0.15	0.000
β-防御素	0.85 ± 0.06	1.93 ± 0.12	0.000

3 讨论

UCAC 的发病是涉及多环节、多因素共同参与的过程, 其癌变与溃结炎症反复发作刺激破坏肠黏膜屏障, 导致肠道免疫失衡, 肠道共生菌群与肠道免疫细胞之间交互作用, 清除外来抗原时损伤靶器官, 造成肠上皮细胞凋亡、坏死、异常增殖, 破坏肠道稳态甚则癌变^[6-8]。显然, 寻找有效调控缓解肠道炎症靶标对于防治 UCAC 无疑是有利的。研究^[9-10]提示, miRNAs 在肠道黏膜中的差异表达, 调节转录后基因表达水平, 参与肠道炎症乃至肿瘤的发生, miRNAs 通过干预肠道免疫, 可能在 UCAC 发病中有着重要作用。miRNAs 是一类长度为 19~23 个核苷酸的单链内源性小分子 RNA, 属于非编码 RNA 的一部分, 在 RNA 聚合酶 II 的作用下从 DNA 转录而来, 通过与靶基因 3'UTR 的完全或不完全配对来降解靶基因的 mRNA 或抑制其翻译, 从而影响组织和细胞的功能^[11]。本研究结果显示, UCAC 小鼠结肠黏膜肠黏膜屏障破坏, 肠上皮细胞自噬及凋亡变化, 伴见 miR-21 及肠上皮细胞凋亡相关蛋白 Caspase-8 呈高表达变化。众所周知, 在哺乳动物的许多细胞类型中, miR-21 是最高度表达的小非编码 RNA, 其在许多病理组织中的表达是上调的, 包括实体肿瘤、炎症组织等。研究^[12]证实, miR-21 在由外界刺激引发的炎症改变中起负向调节作用, 尤其在巨噬细胞中, miR-21 已成为抗炎反应的一个关键媒介。在溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC) 动物模

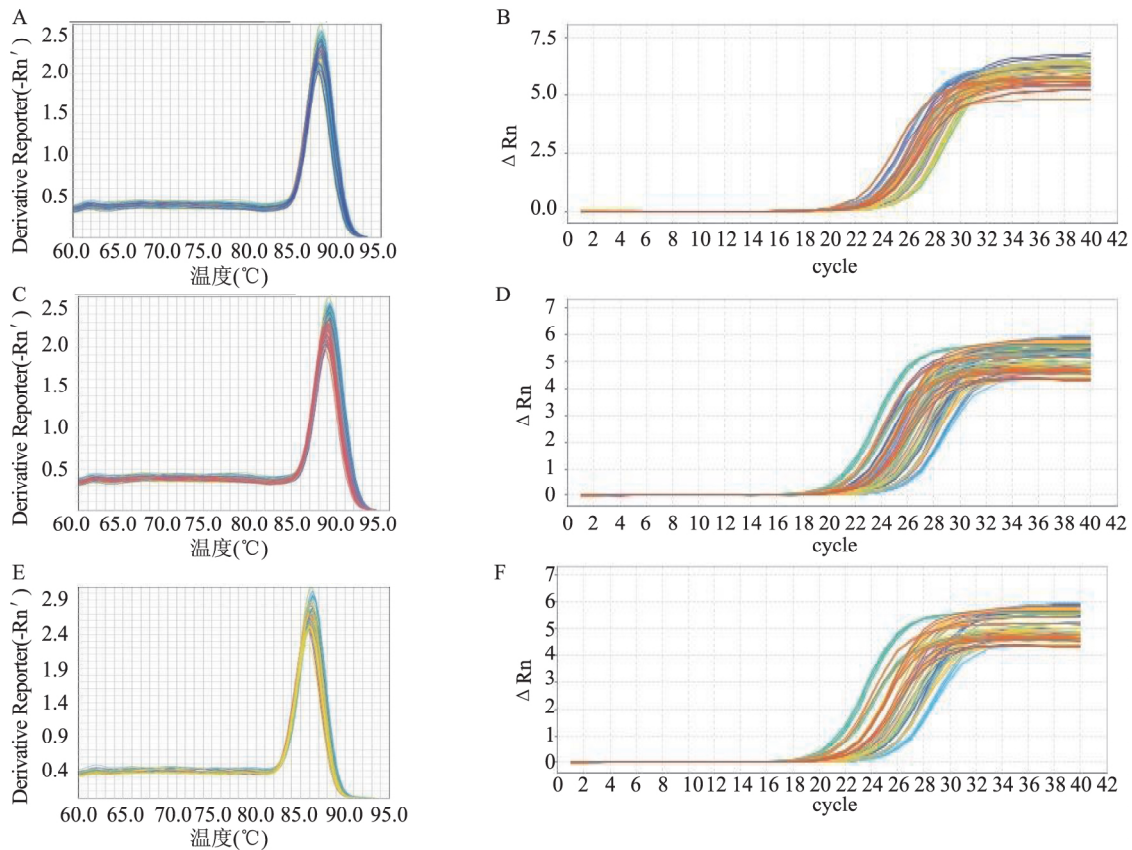


图4 UCAC 小鼠结肠 miR-21、Caspase-8、β-防御素 mRNA 表达

A: miR-21 熔解曲线; B: miR-21 扩增曲线; C: Caspase-8 熔解曲线; D: Caspase-8 扩增曲线; E: β-防御素熔解曲线; F: β-防御素扩增曲线

型中, miR-21 表达下调可以诱导疾病缓解; 而 miR-21 表达上调则通过引起 Rho-mRNA 降解导致肠上皮通透性增加, 破坏肠黏膜屏障, 加重炎症, 这说明 miR-21 具有明确促进 UC 炎症反应的效用^[13]。亦有研究^[14]证实, 活动性 UC 患者 miR-21 水平明显升高, 其与肿瘤抑制基因程序性凋亡因子-4 的表达呈负相关性。因此, miR-21 可以被视为有临床效用的防治 UCAC 的潜在生物标志物。

本研究结果同时显示, 与正常组比较, UCAC 小鼠 miR-21、Caspase-8 表达上升, β-防御素表达亦呈上升趋势。β-防御素是抗菌肽的一种, 是生物界广泛存在的一类富含半胱氨酸的小分子阳离子多肽, 属于生物体内天然防御系统的重要组成部分, 作为天然免疫和获得性免疫反应的桥梁, 能够迅速动员免疫系统, 对机体抵抗外界生物逆境起关键作用^[15]。生理情况下, 结肠黏膜上皮细胞内的 β-防御素没有可见的小囊泡, β-防御素及其 mRNA 持续的表达在小肠和结肠黏膜上皮细胞内, 发挥着基础防御的功能; 而病理状态下, 炎症时可诱导 β-防御素表达增加, 促进炎症发生、发展^[16]。本研究显示,

UCAC 小鼠结肠黏膜 β-防御素表达上升, 且与病情变化呈正相关性, 这说明模型小鼠始终处于炎症刺激的活动状态, 以下调 β-防御素为靶点阻断炎症的发生发展, 对于 UCAC 的防治无疑是有利的。综上所述, UCAC 发病中, 由于 UC 炎症持续, 诱导 miR-21、Caspase-8 及 β-防御素表达增加, 破坏肠道免疫平衡, 导致肠黏膜通透性增加, 肠上皮细胞凋亡/自噬加剧, 造成恶性循环, 进一步破坏肠道稳态, 上皮细胞异型增生, 甚则癌变。

参考文献

[1] 邬瑞金, 刘嫦钦, 刘占举. miRNA 在炎症性肠病发病过程中的作用[J]. 世界华人消化杂志 2013, 21(7): 602-6.

[2] 徐睿玲, 刘冰熔. MicroRNA 在炎症性肠病中的研究进展[J]. 医学综述 2012, 18(23): 3944-7.

[3] Witalison E E, Cui X, Causey C P, et al. Molecular targeting of protein arginine deiminases to suppress colitis and prevent colon cancer[J]. Oncotarget 2015, 6(34): 36053-62.

[4] Goel A. MicroRNAs as therapeutic targets in colitis and colitis-associated cancer: tiny players with a giant impact[J]. Gastroenterology 2015, 149(4): 859-61.

- [5] 张涛, 黄会云, 张志明, 等. DMH/DSS 复合法诱导小鼠溃疡性结肠炎相关癌变的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(7): 1744-6.
- [6] 方培植, 黄会云, 张涛, 等. PI3K/Akt-mTOR 信号通路介导溃疡性结肠炎相关癌变的实验研究[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2015, 24(7): 802-6.
- [7] 张涛, 梁建英, 黄会云, 等. Wnt/ β -catenin-TCF 信号通路介导溃疡性结肠炎相关癌变分子机制研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(6): 1536-7.
- [8] 张保静, 陈远能, 黄斌, 等. 健脾清热活血方介导 β -catenin, TCF-4 表达防治溃疡性结肠炎相关癌变研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20): 144-9.
- [9] Chen W X, Ren L H, Shi R H. Implication of miRNAs for inflammatory bowel disease treatment: systematic review [J]. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2014, 5(2): 63-70.
- [10] Gazouli M, Papaconstantinou I, Stamatis K, et al. Association study of genetic variants in miRNAs in patients with inflammatory bowel disease: preliminary results [J]. *Dig Dis Sci* 2013, 58(8): 2324-8.
- [11] Sohn J J, Schetter A J, Yfantis H G, et al. Macrophages, nitric oxide and microRNAs are associated with DNA damage response pathway and senescence in inflammatory bowel disease [J]. *PLoS One* 2012, 7(9): e44156.
- [12] Mima K, Nishihara R, Nowak J A, et al. MicroRNA mir21 and T cells in colorectal cancer [J]. *Cancer Immunol Res* 2016, 4(1): 33-40.
- [13] Song M S, Rossi J J. The anti-miR21 antagomir, a therapeutic tool for colorectal cancer, has a potential synergistic effect by perturbing an angiogenesis-associated miR30 [J]. *Front Genet* 2014, 4: 301.
- [14] Ludwig K, Fassan M, Mescoli C, et al. PDCD4/miR-21 dysregulation in inflammatory bowel disease-associated carcinogenesis [J]. *Virchows Arch* 2013, 462(1): 57-63.
- [15] Rahman A, Fahlgren A, Sitohy B, et al. Beta-defensin production by human colonic plasma cells: a new look at plasma cells in ulcerative colitis [J]. *Inflamm Bowel Dis* 2007, 13(7): 847-55.
- [16] Rahman A, Fahlgren A, Sundstedt C, et al. Chronic colitis induces expression of β -defensins in murine intestinal epithelial cells [J]. *Clin Exp Immunol* 2011, 163(1): 123-30.

miR-21 mediates intestinal epithelial cell apoptosis and maintains intestinal homeostasis in the onset of ulcerative colitis associated carcinogenesis

Zhou Haixin¹, Fang Jiansong², Zhang Tao², et al

(¹Dept of Gastroenterology, Traditional Chinese Medicine Hospital of Hainan Province, Haikou 570203;

²Dept of Gastroenterology, Rui Kang Hospital Guang Xi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530011)

Abstract Objective To investigate the pathogenesis of ulcerative colitis associated carcinogenesis (UCAC) by observing the expression of miR-21, caspase-8, β -defensin and intestinal epithelial cell (IEC) apoptosis. **Methods**

Forty male clean grade BALB/c rats were randomly divided into normal group and model group by weight. UCAC model was made by intraperitoneal injection with dimethylhydrazine (DMH) and free drinking dextran sulfate sodium (DSS). After thirty weeks, all rats were killed. The colon morphological changes were assayed by light microscope. The ultra microstructure and epithelial cell apoptosis were detected by electron microscope. The expression of miR-21, caspase-8 and β -defensin were detected by Real-time PCR and Western blot. **Results** Under light microscope the major pathological changes of colon mucosa in model group were as follows: different level defect of colonic mucosa, surface exudation, necrosis, atypical cells and invasive cancer changes. Electron microscope results reveal that intestinal mucosal epithelial cell layer of microvilli on the surface of different lengths and cell junction gap widened in model group. Meanwhile there were a lot of epithelial cells apoptosis and autophagy, mitochondrial swelling, cristae disappeared structure in model group. Compared with normal group, the expression of miR-21, caspase-8 and β -defensin increased significantly in model group ($P < 0.05$). **Conclusion** The occurrence and development of UCAC may be due to persistent inflammation in colon which led to high-expression of miR-21, caspase-8 and β -defensin and destruction of the intestinal immune balance, aggravation of IEC apoptosis / autophagy. These changes may be related to cause a vicious spiral, further damage to intestinal homeostasis, epithelial dysplasia, even carcinogenesis.

Key words miR-21; intestinal epithelial cell apoptosis; intestinal homeostasis; ulcerative colitis associated carcinogenesis