

大麻素受体-2 对小鼠结肠炎作用机制研究

李 凯¹, 吴正祥¹, 杨 枫²

摘要 目的 观察大麻素受体-2(CB2)对急性实验性小鼠结肠炎的作用,探讨CB2对肠黏膜内质网应激(ERS)影响。方法 32只SPF小鼠随机分为正常组、模型组、CB2激动剂组、CB2拮抗剂组,每组8只。记录小鼠疾病活动度及结肠组织病理学评分,ELISA法检测结肠组织中炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-10(IL-10)水平,免疫组化法检测结肠组织CB2及ERS相关蛋白GRP78、CHOP表达,RT-PCR法检测结肠组织中GRP78、CHOP mRNA水平。结果 与正常组比较,模型组TNF- α 水平显著上调,IL-10水平下降($P < 0.05$),GRP78、CHOP蛋白及mRNA显著增高($P < 0.05$)。与模型组比较,CB2激动剂组CB2表达明显增多($P < 0.05$),TNF- α 水平下降($P < 0.05$),IL-10水平增多($P < 0.05$),GRP78、CHOP蛋白及mRNA显著下降($P < 0.05$)。CB2拮抗剂组TNF- α 、IL-10、ERS标记物水平与模型组差异无统计学意义。结论 实验性结肠炎小鼠肠黏膜存在剧烈的ERS,CB2激动剂激活CB2表达后缓解结肠炎小鼠肠道炎症,可能与CB2抑制肠黏膜ERS有关。

关键词 结肠炎;大麻素受体-2;内质网应激;GRP78

中图分类号 R 574.62

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0954-04

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一类胃肠道慢性免疫异常疾病,包括克罗恩病和溃疡性结肠炎。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是IBD发生的重要机制之一,抑制ERS对缓解肠内炎症有重要作用。大麻素受体-2(cannabinoid receptor-2, CB2)是体内新近发现的新型物质,研究^[1]显示CB2能够改善肠内炎症,但其具体机制不明。该实验通过建立急性实验性结肠炎小鼠模型,观察CB2对小鼠结肠炎的作用,并从ERS方面探讨CB2改善结肠炎的可能机制。

2015-03-02 接收

基金项目:安徽省卫生厅医学科研项目(编号:13zc041)

作者单位:¹安徽省立医院消化内科,合肥 230001

²安徽医科大学第一附属医院病理学教研室,合肥 230022

作者简介:李 凯,男,硕士研究生;

吴正祥,男,教授,主任医师,硕士生导师,通讯作者,E-mail: zxiangwu@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 50只SPF级雄性C57BL/6小鼠,6周龄,体重18~22g,购自安徽医科大学动物实验中心。

1.1.2 主要试剂 葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS, 相对分子质量5000)、CB2激动剂JWH-133(美国Sigma公司);CB2拮抗剂AM630(英国Tocris公司);肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白介素-10(interleukin-10, IL-10)ELISA试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司);CB2单克隆抗体(美国Santa Cruz公司);GRP78、CHOP多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);过氧化物酶标记的链酶卵白素SP染色试剂盒及DAB显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司);TRIzol试剂(上海Roche公司);RT试剂盒、DNA Marker(DL1000, 大连TaKaRa公司);RT-PCR引物(上海生工生物工程技术有限公司);大便隐血检测试剂盒(杭州艾康生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及急性结肠炎模型建立 将50只C57BL/6小鼠适应性饲养1周后,挑选体重、健康程度接近的小鼠32只,编号后随机分为正常组、模型组、干预组(CB2激动剂组和CB2拮抗剂组),每组8只。模型组和干预组小鼠连续饮用5% DSS蒸馏水7d,正常组饮用普通蒸馏水,以大便带血(大便隐血试剂盒检测)、稀便、体重减轻作为急性结肠炎造模成功标志^[2]。造模结束后,将CB2激动剂JWH-133、CB2拮抗剂AM630溶于3% DMSO,按10 mg/(kg·d)剂量分别给予对应干预组小鼠腹腔注射,每天1次,连续干预7d^[3],正常组、模型组腹腔注射等体积3% DMSO + 0.9% NaCl溶媒作为对照。

1.2.2 观察指标及检测方法 ①疾病活动度(disease activity index, DAI)评分,DAI=(体重指数+大便形状+出血情况)/3^[4];②病理学评分:给药结束后,禁食1d,取出结肠组织,PBS冲洗后纵切,在结肠末端(距肛门1cm处)剪取0.5cm结肠,经中性福尔马林固定、石蜡包埋后切片,行HE染色,根据

Cooper et al^[5] 组织学评分标准进行病理学评分 (histopathological score, HS); ③ ELISA 法检测结肠组织 TNF- α 、IL-10 表达: 严格按照试剂盒说明书步骤; ④ 免疫组化法检测结肠组织 CB2、GRP78、CHOP 表达: 组织包埋、切片、抗原修复, 滴加抗体, DAB 显色 苏木精复染 封片; CB2 一抗浓度 1:500, GRP78 一抗浓度 1:300, CHOP 一抗浓度 1:300 阴性对照采用 PBS 代替, 光镜下随机观察 5 个不同高倍视野 ($\times 400$), 采用 Imagepro plus 6.0 软件进行图像分析, 以平均光密度 (optical density, OD) 值代表表达强度; ⑤ RT-PCR 法检测 GRP78、CHOP mRNA 表达: TRIzol 法提取结肠组织 RNA, 逆转录合成 cDNA 用于 PCR 扩增, 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, GRP78、CHOP、 β -actin 退火温度分别为 58、59、57 $^{\circ}\text{C}$, 循环数分别为 34、34、32 个, 扩增结束后行凝胶电泳, 电压 100 V, 电泳时间 40 min, 采用凝胶成像分析系统观察结果, 分析 GRP78、CHOP mRNA 相对表达量, 结果以 GRP78、CHOP mRNA 与 β -actin 的比值表示。各基因引物序列及扩增片段见表 1。

表 1 目的基因引物序列、扩增片段

基因	引物序列(5'-3')	扩增片段 (bp)
GRP78	F: TCCAAAGATTTCAGCAACTGG	310
	R: GGGTCGTTACCTTCATAGAC	
CHOP	F: ACAGAGGTCACACGCACATC	305
	R: ACTGTTTCATGCTTGGTGCAG	
β -actin	F: CGTTGACATCGGTAAGACC	281
	R: AACAGTCCGCCTAGAAGCAC	

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间数据比较采用单因素方差分析, 方差不齐采用秩和检验, 相关性分析采用双变量 Bivariate 相关分析法。

2 结果

2.1 DAI、HS 评分及 TNF- α 、IL-10 表达 与正常组比较, 模型组 DAI、HS、TNF- α 水平明显升高 ($P < 0.05$), IL-10 水平下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, CB2 激动剂组 DAI、HS、TNF- α 水平明显下降 ($P < 0.05$), IL-10 水平升高 ($P < 0.05$); CB2 拮抗剂组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

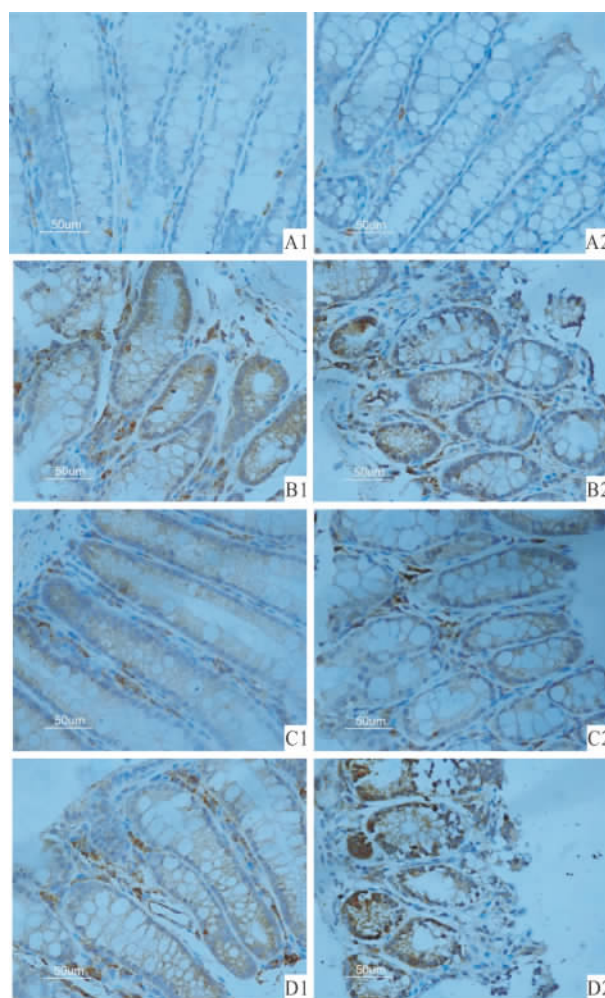
2.2 免疫组化法检测 CB2、GRP78、CHOP 表达 CB2 激动剂组 CB2 表达明显高于正常组、模型组、

表 2 各组小鼠 DAI、HS 评分及 TNF- α 、IL-10 表达 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

项目	正常组	模型组	CB2 激动剂组	CB2 拮抗剂组
DAI(分)	0.00 \pm 0.00	3.21 \pm 0.35*	1.21 \pm 0.31#	3.33 \pm 0.44
HS(分)	0.00 \pm 0.00	7.38 \pm 3.42*	4.50 \pm 1.41#	7.63 \pm 3.02
TNF- α ($\mu\text{g/L}$)	57.67 \pm 6.78	123.49 \pm 10.46*	92.67 \pm 10.62#	125.68 \pm 8.76
IL-10($\mu\text{g/L}$)	375.22 \pm 16.91	122.46 \pm 9.79*	235.39 \pm 21.05#	121.74 \pm 13.92

与正常组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

CB2 拮抗剂组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。4 组小鼠间结肠组织 GRP78、CHOP 表达差异有统计学意义 ($F = 197.20, 98.121, P < 0.05$)。正常组结肠组织上皮细胞中可见少量 GRP78、CHOP 表达, 以细胞质表达为主; 与正常组比较, 模型组结肠组织中 GRP78、CHOP 表达显著增多 ($P < 0.05$); 与模型组比较, CB2 激动剂组 GRP78、CHOP 表达减少 ($P < 0.05$); CB2 拮抗剂组与模型组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1、表 3。

图 1 各组小鼠结肠组织中 GRP78、CHOP 蛋白表达 SP $\times 400$

A: 正常组; B: 模型组; C: CB2 激动剂组; D: CB2 拮抗剂组; 1: GRP78; 2: CHOP

表3 各组小鼠结肠组织 CB2、GRP78、CHOP 及 mRNA 表达 (n=8 $\bar{x} \pm s$)

项目	正常组	模型组	CB2 激动剂组	CB2 拮抗剂组
CB2	0.21 ± 0.08	0.23 ± 0.05	0.76 ± 0.09* #△	0.15 ± 0.05
GRP78	0.42 ± 0.06	1.48 ± 0.10*	0.71 ± 0.09#	1.39 ± 0.15
CHOP	0.45 ± 0.07	0.90 ± 0.05*	0.66 ± 0.07#	0.92 ± 0.06
GRP78 mRNA	0.13 ± 0.04	0.72 ± 0.08*	0.46 ± 0.07#	0.74 ± 0.11
CHOP mRNA	0.16 ± 0.05	0.84 ± 0.14*	0.50 ± 0.08#	0.86 ± 0.12

与正常组比较: * P < 0.05; 与模型组比较: # P < 0.05; 与 CB2 拮抗剂组比较: △ P < 0.05

2.3 GRP78、CHOP mRNA 表达 各组小鼠结肠组织 GRP78、CHOP mRNA 表达总体差异有统计学意义 (F = 104.610、85.269, P < 0.05)。正常组 GRP78、CHOP mRNA 表达较少,条带微弱,模型组条带明亮,mRNA 表达显著升高,差异有统计学意义 (P < 0.05); 与模型组比较,CB2 激动剂组条带稍暗,mRNA 表达减少,差异有统计学意义 (P < 0.05); CB2 拮抗剂组与模型组差异无统计学意义 (P > 0.05)。见图 2、表 3。

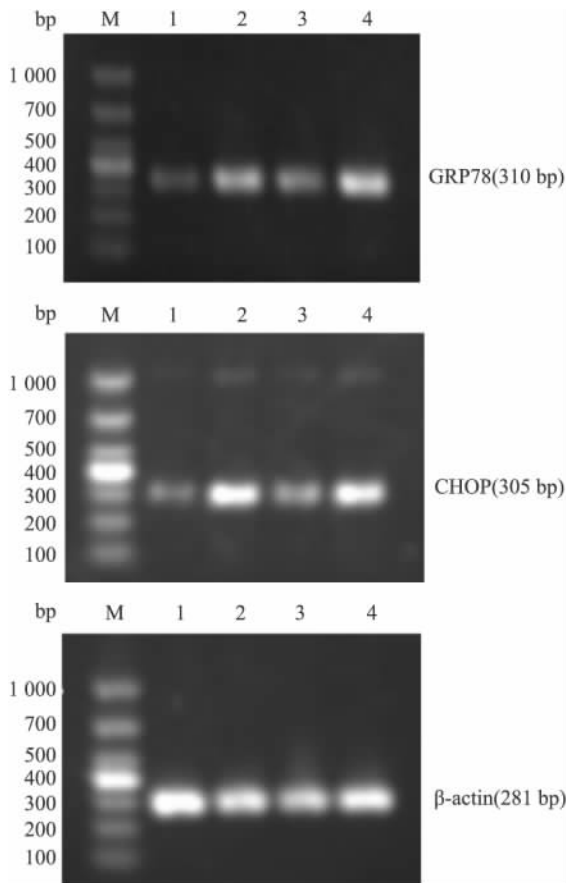


图2 各组小鼠结肠组织中 GRP78、CHOP mRNA 表达

M: Marker; 1: 正常组; 2: 模型组; 3: CB2 激动剂组; 4: CB2 拮抗剂组

组

2.4 相关性分析 CB2 激动剂组中 CB2 表达与 IL-10 呈正相关性 (r = 0.916, P < 0.05), 与 DAI、HS、TNF- α 表达呈负相关性 (r = -0.778、-0.749、-0.926, P < 0.05), 与 GRP78 及其 mRNA 表达呈负相关性 (r = -0.865、-0.932, P < 0.05), 与 CHOP 及其 mRNA 呈负相关性 (r = -0.744、-0.803, P < 0.05)。

3 讨论

CB2 在体内主要表达于外周免疫细胞,参与免疫调节,具有抗炎、抗氧化、抗增殖作用。众多研究^[3,6]证实,CB2 减少肠上皮炎症细胞浸润及黏膜炎症损害,对肠内炎症具有抑制作用。本实验诱导小鼠发生结肠炎后,小鼠 DAI、HS 评分增加,CB2 激动剂组 DAI、HS 评分较模型组明显减轻,证实 CB2 能够改善小鼠结肠炎症状。肠道炎症是 IBD 发展过程中的重要环节,大量促炎症因子分泌,抗炎因子减少。本实验显示,模型组小鼠肠黏膜中促炎因子 TNF- α 表达显著增加,抗炎因子 IL-10 表达减少,表明有肠道炎症发生。CB2 激动剂组给予 JWH-133 激活 CB2 表达后,CB2 表达增加,小鼠 DAI、HS 评分均减少,抗炎因子 IL-10 水平上调,促炎因子 TNF- α 水平下调;CB2 拮抗剂组使用 AM630 抑制 CB2 表达后,炎症因子变化不明显,推测 CB2 缓解实验性小鼠结肠炎与其抑制炎症免疫反应有关。

初期的 ERS 是一种适应性代偿过程,ERS 持续发生时,将启动 CHOP 途径等多种细胞凋亡通路,通过程序性死亡,清除过多的受损细胞^[7]。GRP78、CHOP 作为经典标记物反映 ERS 水平。研究^[8-9]显示 ERS 与 IBD 联系紧密。实验^[8]证明活动期克罗恩病患者肠上皮中 GRP78 表达高于正常人群,提示发生 ERS。研究^[9]显示,溃疡性结肠炎患者结肠黏膜组织存在大量 ERS,甚至可以发生于非炎症组织,而对照组中却未发现,认为可以把 ERS 作为溃疡性结肠炎的一般特征。本实验模型组小鼠肠黏膜中 ERS 标记蛋白 GRP78 及其 mRNA 表达显著增多,提示小鼠肠内已经存在剧烈的 ERS,与上述研究结果一致。CHOP 蛋白表达增加,提示肠上皮细胞中发生大量 ERS 相关凋亡反应,过多的细胞凋亡使肠上皮细胞数量急剧减少,促进肠内炎症进展。

研究^[10]显示,与野生型小鼠比较,IL-10^{-/-}小鼠发生慢性肠道炎症后,肠上皮细胞中 GRP78 蛋白表达增多,增加 IL-10 表达后,GRP78 表达减少,这可能与 IL-10 调节 p38 信号通路抑制 ATF6 转录,以

此减轻 ERS 有关。推测肠道炎症反应与 ERS 存在一定关系。本实验显示,模型组小鼠 ERS 标记物 GRP78 表达上调与炎症水平相一致,激活 CB2 表达改善肠内炎症后,GRP78 表达下降,CB2 抑制 ERS 可能是缓解结肠炎症的机制之一。CB2 激动剂组 CHOP 表达减少,提示 CB2 抑制肠上皮细胞 ERS 相关凋亡通路,避免肠上皮细胞过度减少,有利于肠上皮组织恢复、愈合。本实验中,CB2 激动剂组 GRP78、CHOP 蛋白与基因下调水平同步,说明 CB2 主要通过抑制应激蛋白 mRNA 转录缓解 ERS。

参考文献

- [1] Engel M A, Kellermann C A, Burnat G, et al. Mice lacking cannabinoid CB1 - ,CB2 - receptors or both receptors show increased susceptibility to trenitrobenzene sulfonic acid(TNBS) -induced colitis[J]. *J Physiol Pharmacol* 2010 61(1): 89 - 97.
- [2] Stevceva L, Pavli P, Husband A J, et al. The inflammatory infiltrate in the acute stage of the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of DSS used to induce it[J]. *BMJ Clin Pathol* 2001 1(1): 3.
- [3] Singh U P, Singh N P, Singh B, et al. Cannabinoid receptor-2 (CB2) agonist ameliorates colitis in IL-10(-/-) mice by attenuating the activation of T cells and promoting their apoptosis[J].

- Toxicol Appl Pharmacol* 2012 258(2): 256 - 67.
- [4] Kihara N, de la Fuente S G, Fujino K, et al. Vanilloid receptor-1 containing primary sensory neurones mediate dextran sulphate sodium induced colitis in rats[J]. *Gut* 2003 52(5): 713 - 9.
- [5] 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.
- [6] Harvey B S, Nicotra L L, Vu M, et al. Cannabinoid CB2 receptor activation attenuates cytokine-evoked mucosal damage in a human colonic explant model without changing epithelial permeability[J]. *Cytokine* 2013 63(2): 209 - 17.
- [7] Sano R, Reed J C. ER stress-induced cell death mechanisms[J]. *Biochim Biophys Acta* 2013 1833(12): 3460 - 70.
- [8] Deuring J J, de Haar C, Koelewijn C L, et al. Absence of AB-CG2-mediated mucosal detoxification in patients with active inflammatory bowel disease is due to impeded protein folding[J]. *Biochem J* 2012 441(1): 87 - 93.
- [9] Treton X, Pedruzzi E, Cazals-Hatem D, et al. Altered endoplasmic reticulum stress affects translation in inactive colon tissue from patients with ulcerative colitis[J]. *Gastroenterology* 2011 141(3): 1024 - 35.
- [10] Shkoda A, Ruiz P A, Daniel H, et al. Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation[J]. *Gastroenterology* 2007 132(1): 190 - 207.

Research the mechanism of cannabinoid receptor-2 on colitis in mice

Li Kai¹, Wu Zhengxiang¹, Yang Feng²

(¹Dept of Gastroenterology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

²Dept of Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To observe the role of cannabinoid receptor-2 (CB2) in acute experimental colitis in mice, and to explore its effect on the endoplasmic reticulum stress(ERS) in the intestinal mucosa. **Methods** 32 SPF mice were randomly divided into normal group, model group, CB2 agonist group and CB2 antagonist group. Disease activity index(DAI) and colon histopathological score(HS) were evaluated. The levels of TNF- α and IL-10 in colon tissue were detected by ELISA. The expression of CB2 and ERS markers GRP78, CHOP in colon tissues were detected by immunohistochemical. The mRNA levels of GRP78 and CHOP were detected by RT-PCR. **Results** Compared with the normal group, the level of TNF- α was significantly higher and the level of IL-10 was significantly lower($P < 0.05$) in the model group, the expressions of GRP78, CHOP and its mRNA were significantly higher($P < 0.05$). Compared with the model group, the expression of CB2 in the CB2 agonist group was significantly higher($P < 0.05$), the level of TNF- α dropped and the level of IL-10 increased($P < 0.05$), and the expressions of GRP78, CHOP and its mRNA were significantly reduced($P < 0.05$). The level of IL-10, TNF- α and ERS markers had no significant difference between CB2 antagonist group and the model group ($P > 0.05$). **Conclusion** Severe endoplasmic reticulum stress exists in intestinal mucosa of experimental colitis mice. The CB2 agonist activates CB2 expression, reducing colitis in mice. Its mechanism may be related to inhibiting ERS in intestinal mucosa.

Key words colitis; cannabinoid receptor-2; endoplasmic reticulum stress; GRP78