

# 靶向抑制巨噬细胞 Act1 表达对溃疡性结肠炎的作用

郜一贺<sup>1</sup>, 王丽京<sup>1</sup>, 邓慧君<sup>2</sup>, 陈佳园<sup>2</sup>, 顾取良<sup>1\*</sup>

(广东药科大学 1. 基础学院血管生物学研究所; 2. 健康学院, 广州 510006)

**【摘要】** 目的 探讨巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 活化因子 1 (nuclear factor kappa B activator 1, Act1) 在炎症性肠病中的作用。方法 以巨噬细胞 Act1 表达被靶向抑制的小鼠 (anti-Act1) 为研究对象, 利用葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulfate, DSS) 诱导溃疡性结肠炎模型, 通过检测小鼠体重变化、便血情况、粪便黏稠度等进行疾病活动指数评分, 对结肠组织进行 HE 染色评价炎症严重程度, 免疫组化方法分析白细胞和巨噬细胞等的浸润情况并用 RT-qPCR 法检测相关细胞因子的表达变化。结果 在 DSS 诱导 7 d 后与 C57 小鼠相比, anti-Act1 小鼠结肠炎症指标评分较低, 巨噬细胞等浸润数量较少, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 mRNA 表达较低。结论 靶向抑制巨噬细胞 Act1 表达能够减轻 DSS 诱导的溃疡性结肠炎。

**【关键词】** Act1; 基因工程小鼠; 溃疡性结肠炎; 巨噬细胞

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0585-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.006

## Targeted suppression of Act1 in the macrophages ameliorates experimental ulcerative colitis in mice induced by dextran sodium sulfate

KUAI Yi-he<sup>1</sup>, WANG Li-jing<sup>1</sup>, DENG Hui-jun<sup>2</sup>, CHEN Jia-yuan<sup>2</sup>, GU Qu-liang<sup>1\*</sup>

(1. Vascular Biology Research Institute, School of Basic Sciences, 2. School of Health Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the role of macrophage-derived Act1 (nuclear factor kappa B activator 1) in the inflammatory bowel disease. **Methods** Genetically engineered mice carrying targeted suppression of Act1 in the macrophages (Anti-Act1) were used for the dextran sodium sulfate (DSS)-induced ulcerative colitis. The severity of colitis was assessed by weight loss, stool consistency, fecal blood index, colorectal length and H&E histology. The infiltration of CD45<sup>+</sup> leukocytes and CD68<sup>+</sup> macrophages in the inflammatory intestine was observed by immunohistochemical staining and expression levels of mRNA for inflammatory cytokines in colon tissues were analyzed by RT-qPCR. **Results** As compared with C57 mice, the anti-Act1 mice exhibited less severe acute colitis following DSS treatment, with reduced CD45<sup>+</sup> leukocyte and CD68<sup>+</sup> macrophage infiltrates in the colon tissue. Inflamed colons of the anti-Act1 mice expressed lower mRNA levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6. **Conclusions** Targeted suppression of Act1 in the macrophages ameliorates dextran sodium sulfate-induced intestinal inflammation.

**【Key words】** Act1; Genetically engineered mouse; Ulcerative colitis; Macrophage

Corresponding author: GU Qu-liang. E-mail: qlgu@gdpu.edu.cn

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 和克罗恩病 (Crohn's diseases, CD)。目前认为 IBD 发病是遗

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (编号:31471290)。

[作者简介] 郜一贺 (1991 -), 女, 硕士研究生, 专业: 病理生理学。Email: guiyihe1234@163.com

[通讯作者] 顾取良 (1979 -), 女, 副教授, 研究方向: 肠道炎症与肿瘤分子生物学。Email: qlgu@gdpu.edu.cn

传、环境、感染和免疫等多因素相互作用所致,其中肠道黏膜免疫异常导致的炎症反应起着重要作用<sup>[1]</sup>。肠道黏膜巨噬细胞既是一种固有免疫细胞,也作为重要的内在免疫调节者在刺激后续的适应性免疫中起着关键性的作用。越来越多的研究显示巨噬细胞参与了 IBD 的发生发展,在活动性 IBD 患者的肠道黏膜中巨噬细胞的数量明显增加<sup>[2,3]</sup>。

核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)在炎症反应和宿主免疫起着重要作用,是 IBD 发生发展中一种重要的转录因子,参与免疫反应早期和炎症反应各阶段的多种因子基因表达均受 NF- $\kappa$ B 调控,包括 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、COX2、趋化因子、集落刺激因子等<sup>[4]</sup>。Act1 是 NF- $\kappa$ B 活化因子 1(nuclear factor kappa B activator 1)<sup>[5]</sup>,又称为 TRAF3 作用蛋白 2、CIKS(connection to I $\kappa$ B kinase and stress-activated protein kinases)。Act1 在不同细胞的免疫反应中发挥了双重作用,既可作用于 T 细胞和 B 细胞介导的免疫反应,又是 IL-17 信号通路必需的衔接蛋白,参与 IL-17 介导的 NF- $\kappa$ B 通路的活化及炎症反应<sup>[6-8]</sup>。

葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)诱导的小鼠炎症性肠病模型,常出现以血便、肠道黏膜溃疡和粒细胞浸润为特征的结肠炎症,其病理改变接近人类 UC<sup>[9,10]</sup>。研究表明,上皮细胞特异性缺失 Act1 的小鼠对 DSS 诱导结肠炎的敏感性降低<sup>[8]</sup>。鉴于巨噬细胞及 NF- $\kappa$ B 转录因子在 IBD 中的作用,本研究以巨噬细胞 Act1 表达被靶向抑制的小鼠(anti-Act1)为研究对象,利用 DSS 诱导 UC 模型,探讨巨噬细胞 Act1 在 UC 中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠(简称 C57)购自广东省医学实验动物中心【SCXK(粤)2013-0002】,anti-Act1 小鼠由中国科学院上海细胞生物研究所构建(C57BL/6 背景)赠送<sup>[11]</sup>,雄性,各 10 只,体重 18~22 g,8 周龄。实验在广东药科大学进行【SYXK(粤)2012-0125】。

### 1.2 anti-Act1 小鼠的鉴定

剪取鼠尾组织,提取基因组 DNA,PCR 扩增目的片段,PCR 上游引物为:5'-CTG GTG CAG ACA GCC TAG CTG-3',下游引物为:5'-CCT GCG AGC TAA AGT CCT GGA-3'(Invitrogen)。PCR 产物电泳

后观察条带大小,阳性扩增条带为 250 bp。对 DNA 鉴定阳性的小鼠,采用免疫荧光法检测巨噬细胞上 Act1 的表达情况,所用抗体为兔抗鼠 CD68(Proteintech)、Act1(Santa Cruz)、FITC 荧光标记二抗(Life Technologies)。荧光显微镜拍摄记录分析。

### 1.3 DSS 诱导小鼠 UC 模型的建立

将 C57 和 anti-Act1 雄性小鼠各 10 只,随机分为对照组和实验组,每组 5 只,参考 Cooper 等<sup>[10]</sup>的方法建立急性 UC 模型,即实验组小鼠自由饮用 2% DSS(MW 36 × 10<sup>3</sup> ~ 50 × 10<sup>3</sup>, MP Biomedicals)水溶液连续 7 d,每隔一天更换新鲜的 DSS 溶液,对照组小鼠饮用蒸馏水代替 DSS 溶液。实验期间每天监测小鼠体重变化,观察粪便性状、黏稠度,联苯胺法检测大便隐血情况,比较各组小鼠结肠炎症程度<sup>[12]</sup>。

### 1.4 结肠组织病理形态学评分

DSS 诱导 UC 模型第 7 天,处死小鼠,取肛门末端直肠至远端盲肠间的组织,测量结直肠长度后,纵向剖开平铺在滤纸上,4% 多聚甲醛过夜固定,卷肠、脱水后石蜡包埋,切片,HE 染色,显微镜下观察结肠组织损坏及炎症浸润程度。病理组织学评分分为 5 级:0 分:正常结肠黏膜;1 分:隐窝腺体丢失 1/3;2 分:隐窝腺体丢失 2/3;3 分:隐窝腺体全部丢失,黏膜上皮完整,伴有轻度炎症细胞浸润;4 分:黏膜上皮糜烂、破坏,伴有炎症细胞浸润<sup>[10-12]</sup>。

### 1.5 免疫组化法检测结肠组织 CD45、CD68 表达

常规石蜡组织切片,高温高压抗原修复,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/甲醇灭活过氧化物酶,10% BSA 封闭,一抗为兔抗鼠 CD45(Proteintech)、兔抗鼠 CD68(Proteintech),DAB 显色,苏木素复染。光学显微镜拍摄记录分析。

### 1.6 RT-qPCR 法检测结肠组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达

采用 TRIzol 试剂(Invitrogen)分别提取对照组和实验组的 C57 和 anti-Act1 小鼠结肠组织总 RNA,经紫外分光光度法检测纯度并定量后,再按 RT-qPCR 试剂盒(Takara)说明书操作。各引物序列如下,以 GAPDH 为内参:

GADPH-F5' - GGTGAAGGTCGCTGTGAACG -3',  
GADPH-R5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG -3';  
TNF- $\alpha$ -F5'-CAGGCGGTGCCATATGCTC-3',  
TNF- $\alpha$ -R5'-CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG-3';  
IL-1 $\beta$ -F5'-GCAACTGTTCTGAACTCAACT-3',

IL-1 $\beta$ -R5'-ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT-3';  
 IL-6-F5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC-3',  
 IL-6-R5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'。

1.7 数据统计学处理

实验数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 Graph Pad Prism 5 软件进行统计分析。多组间比较采用一维方差分析,两组间比较采用配对 *t* 检验统计分析。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Anti-Act1 小鼠的鉴定

Anti-Act1 小鼠基因型鉴定的 PCR 扩增产物为约 250 bp 大小的条带,野生型小鼠无此特异性扩增条带。即 1、2 为 anti-Act1 小鼠,3、4 为野生型(图 1)。免疫荧光分析结果(图 2)显示,在 C57 小鼠结肠组织中,巨噬细胞标记物 CD68 和 Act1 均有表达,且存在大量共定位;而在 DNA 鉴定阳性的小鼠结肠组织中,巨噬细胞标记物 CD68 表达但 Act1 表达量明显减少,且二者共定位甚少,进一步表明 anti-Act1 小鼠中巨噬细胞 Act1 表达被靶向抑制。

2.2 靶向抑制巨噬细胞 Act1 对 DSS 诱导 UC 小鼠体重、疾病活动指数和结直肠长度的影响

与对照组相比,2% DSS 连续诱导 UC 7 d 时,小鼠体重明显下降,出现腹泻、粪便隐血程度加重,取材测量结直肠长度,结直肠明显缩短。与 C57 小鼠相比,anti-Act1 小鼠体重变化百分比(A)、粪便粘稠度(B)、便血程度(C)和结直肠长度变化(D)等各项结肠炎指标均减轻(图 3)。

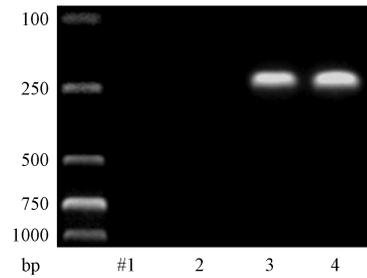


图 1 Anti-Act1 小鼠基因型鉴定

Fig. 1 Genotype characterization of the anti-Act1 mouse

2.3 靶向抑制巨噬细胞 Act1 对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织病理学形态的影响

建模第 7 天取材进行病理组织分析发现,对照组小鼠结肠组织腺体和上皮组织结构完整;实验组 DSS 诱导后,C57 小鼠结肠组织黏膜层出现大量炎症细胞浸润,并且伴有明显的腺体溶解及腺体上皮细胞增生,anti-Act1 小鼠则组织结构相对较完整,炎症细胞浸润较少,部分腺体发生溶解(图 4)。对结肠分段进行病理组织学评分结果显示,靶向抑制巨噬细胞 Act1 对 DSS 所致横结肠(Trans)和远端结肠(Dist)的炎症减轻作用更显著,对近端结肠(Prox)也有一定的保护作用。

2.4 靶向抑制巨噬细胞 Act1 对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织炎症细胞浸润的影响

免疫组化结果显示,DSS 诱导 UC 模型小鼠的结肠组织中白细胞标记物 CD45 和单核-巨噬细胞标记物 CD68 主要表达于间质;与 C57 小鼠相比,anti-Act1 小鼠这两种标记物的表达量明显减少,提示白细胞和

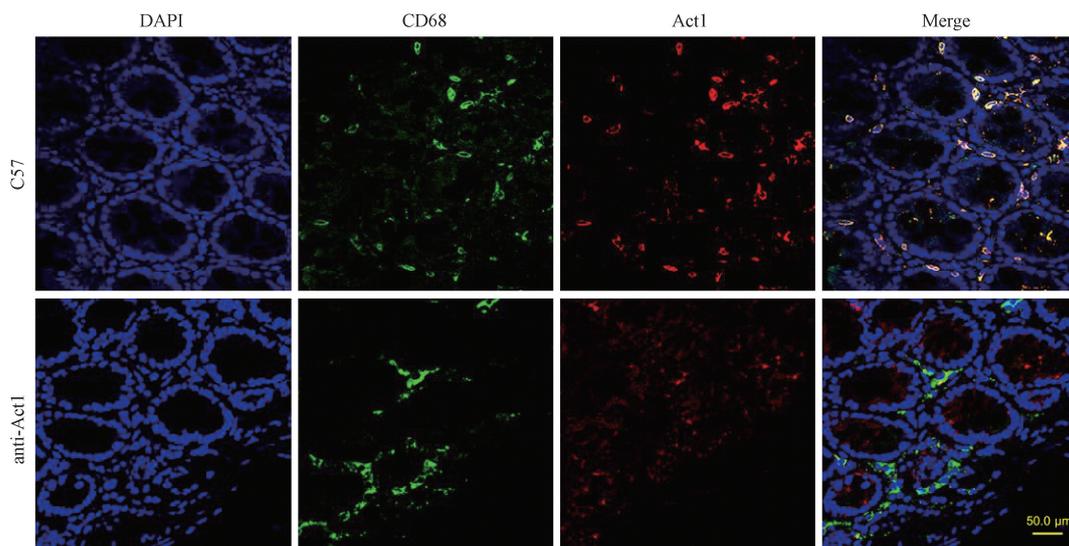


图 2 免疫荧光法检测小鼠结肠组织巨噬细胞 Act1 表达

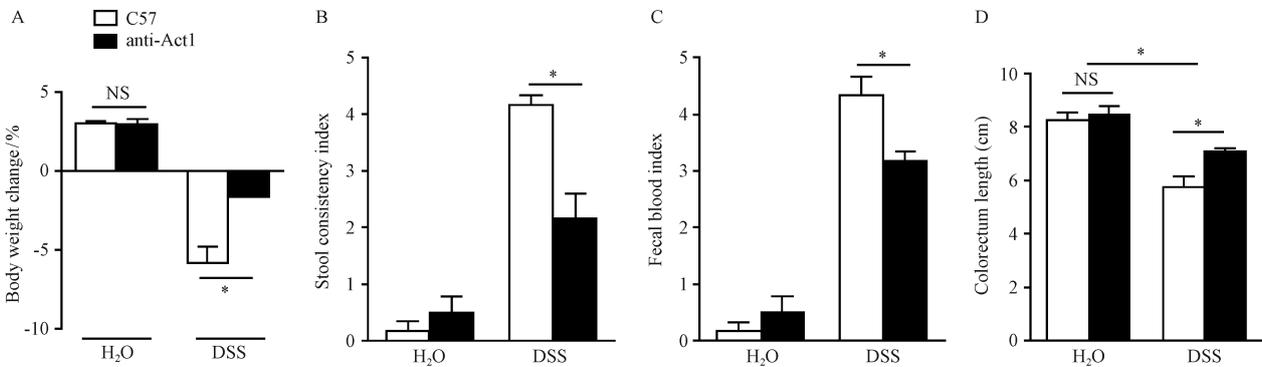
Fig. 2 Act1 expression on macrophages in the colon tissues detected by immunofluorescence

巨噬细胞在炎症部位浸润明显减少(图5)。

## 2.5 靶向抑制巨噬细胞 Act1 对 DSS 诱导 UC 小鼠结肠组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA 表达的影响

RT-qPCR 结果显示, DSS 诱导 UC 模型中两组

小鼠的结肠组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  mRNA 表达均高于正常饮水对照组 ( $P < 0.05$ ), IL-6 mRNA 表达升高仅见于 C57 小鼠; 实验组 anti-Act1 小鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 mRNA 表达均低于实验组 C57 小鼠 ( $P < 0.05$ ) (图6)。



注: A. 体重下降百分比; B. 粪便粘稠度; C. 便血程度; D. 结肠长度。

图3 C57 和 anti-Act1 小鼠各项肠炎指标

Fig.3 Colitis severity of C57 and anti-Act1 mice assessed by weight loss (A), stool consistency (B), fecal blood index (C) and colorectal length (D)

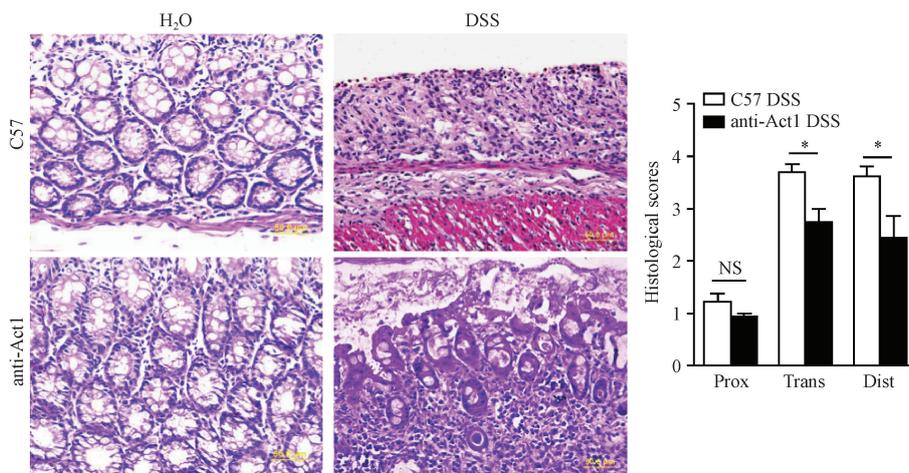


图4 C57 和 anti-Act1 小鼠结肠组织病理学分析

Fig.4 Histopathological changes in the colon tissues of C57 and anti-Act1 mice

## 3 讨论

肠道黏膜免疫功能紊乱目前被认为是 IBD 肠道炎症发生的主要机制, 免疫细胞以及与之相关的多种细胞因子成为当前 IBD 研究热点。巨噬细胞作为肠道免疫系统的主要细胞, 在静息状态时发挥监控感染、调节细胞更新、创伤修复和组织重构等作用, 维持肠道稳态。而在肠道黏膜损伤-修复平衡被打破时, 巨噬细胞异常激活, 介导促炎反应<sup>[1]</sup>。NF- $\kappa$ B 作为一种重要的转录因子, 是多种促炎细胞因子表达和分泌的强效诱导者。有研究发现, IBD 患者

肠道黏膜巨噬细胞中存在明显 NF- $\kappa$ B 信号通路的活化<sup>[13]</sup>。Act1 作为 NF- $\kappa$ B 信号通路的活化因子被发现, 后续研究表明 Act1 亦是 IL-17 信号通路必需的衔接蛋白, 也参与 IL-17 介导的 NF- $\kappa$ B 等信号通路的活化。研究发现, IBD 患者比正常人群的结直肠组织存在更多巨噬细胞浸润, 且血清 IL-17 水平升高<sup>[14]</sup>。这提示 Act1 在 IBD 发生发展中可能发挥重要作用。

研究显示, 特异性敲除星形胶质细胞 Act1 可以减轻小鼠实验性自身免疫性脑脊髓膜炎严重程度; Act1 缺失明显抑制 IL-25 诱导的 Th2 型细胞因子 IL-

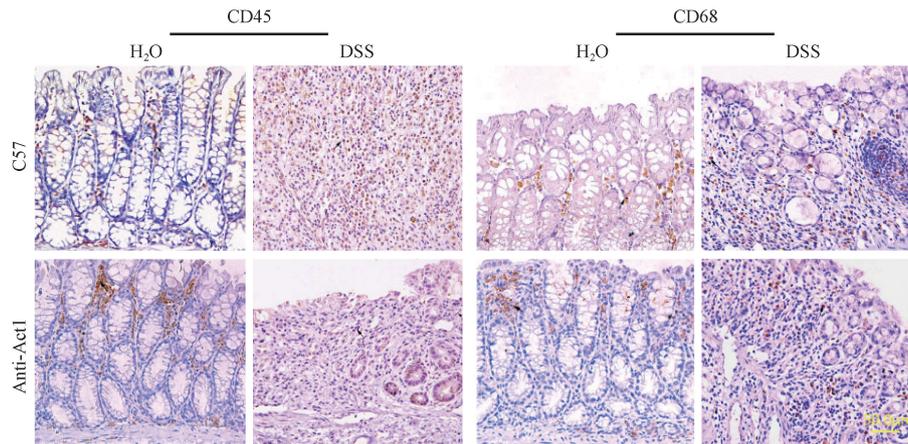


图 5 C57 和 anti-Act1 小鼠结肠炎症细胞浸润情况

Fig. 5 Inflammatory cell infiltration in the colon tissues of C57 and anti-Act1 mice

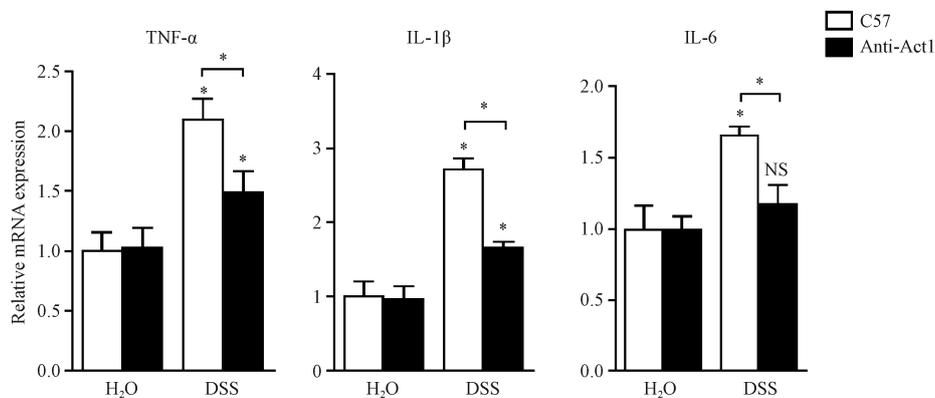


图 6 C57 和 anti-Act1 小鼠结肠组织炎症因子 mRNA 表达变化

Fig. 6 Changes of the colonic expression of mRNA for target genes in the anti-Act1 mice

4、IL-5、IL-13 和趋化因子的表达,从而减少过敏原诱发的嗜酸性粒细胞增多;上皮细胞特异性 Act1 缺失减轻了 IL-25 引发的 Th2 型免疫反应和肺部炎症<sup>[15]</sup>。在上皮细胞特异性缺失 Act1 的小鼠中,DSS 诱导的结肠炎严重程度明显减轻<sup>[8]</sup>。

本实验利用巨噬细胞 Act1 表达被靶向抑制的小鼠,探讨研究与 NF- $\kappa$ B 活化相关的 Act1 在对 UC 的影响。结果显示,巨噬细胞 Act1 表达被抑制后,DSS 诱导的结肠炎严重程度明显减轻。同时,炎症部位白细胞和巨噬细胞的浸润明显减少,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 表达明显低于相应的 C57 小鼠。其中,IL-1 $\beta$  是诱导 IBD 肠道炎症的重要细胞因子之一。有研究报道,IBD 患者血清和肠黏膜固有层单核细胞分泌 IL-1 $\beta$  明显增加。IL-6 在 IBD 肠道炎症和免疫反应中起放大效应,患者血清和肠黏膜 IL-6 水平显著高于对照。此外,活化的 M2 型巨噬细胞可通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路,引起 TNF- $\alpha$  和 IL-6 等炎症因子上调<sup>[2]</sup>。本研究结果中 anti-Act1 小鼠在 DSS

诱导后 IL-6 mRNA 表达有所升高但没有统计学差异,亦有类似的研究报道,IL-17 基因敲除的小鼠在 DSS 诱导时肠炎加重但 IL-6 mRNA 表达没有变化<sup>[16]</sup>。对此,我们将在蛋白水平检测 IL-6 表达变化,进一步检测其他促炎因子和抑炎因子的表达变化,同时也提示抑制巨噬细胞 Act1 表达对炎症微环境的影响可能是不仅与炎症因子的表达改变有关,还存在其他作用机制。

由于巨噬细胞是一种异质性、可塑性较强的免疫细胞,不同组织微环境对其增殖、分化、激活和极化产生不同影响,使其呈现出不同表型,发挥不同生物学功能。正常肠黏膜巨噬细胞的极化表型与其他组织有一定差异,并对于维持肠道健康具有重要意义。而 IBD 患者体内巨噬细胞功能常有不同程度受损,极化表型发生改变,导致免疫异常<sup>[17]</sup>。本研究中关于靶向抑制巨噬细胞 Act1 表达降低结肠对 DSS 敏感性的机制尚不明确,是通过直接抑制 NF- $\kappa$ B 信号活化而减轻炎症还是 Act1 表达抑制影响了

巨噬细胞的极化,仍有待进一步研究揭示。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Al-Ghadban S, Kaissi S, Homaidan FR, et al. Cross-talk between intestinal epithelial cells and immune cells in inflammatory bowel disease [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29783.
- [ 2 ] Singh UP, Singh NP, Murphy EA, et al. Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients [J]. *Cytokine*, 2016, 77: 44-49.
- [ 3 ] Wang, W, Li X, Zheng D, et al. Dynamic changes and functions of macrophages and M1/M2 subpopulations during ulcerative colitis-associated carcinogenesis in an AOM/DSS mouse model [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(4): 2397-2406.
- [ 4 ] McDaniel DK, Eden K, Ringel VM, et al. Emerging roles for noncanonical NF- $\kappa$ B signaling in the modulation of inflammatory bowel disease pathobiology [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2016, 22(9): 2265-2279.
- [ 5 ] Li X, Commane M, Nie H, et al. Act1, an NF- $\kappa$ B-activating protein [J]. *PNAS*, 2000, 97(19): 10489-10493.
- [ 6 ] Sønder SU, Saret S, Tang W, et al. IL-17-induced NF- $\kappa$ B activation via CIKS/Act1: physiologic significance and signaling mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(15): 12881-12890.
- [ 7 ] Hartupée J, Liu C, Novotny M, et al. IL-17 signaling for mRNA stabilization does not require TNF receptor-associated factor 6 [J]. *J Immunol*, 2009, 182(3): 1660-1666.
- [ 8 ] Qian, Y, Liu C, Hartupée J, et al. The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(3): 247-256.
- [ 9 ] 张忠,程富胜,贾宁,等.小鼠溃疡性结肠炎模型的建立及病理组织学比较[J].中国实验动物学报,2012,20(6):69-72.
- [ 10 ] Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, et al. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis [J]. *Lab Invest*, 1993, 69(2): 238-249.
- [ 11 ] 李艺丹.第一部分:核定位 Act1 介导组蛋白 H3 第 14 位赖氨酸乙酰化和组织因子的转录调控;第二部分:穿心莲内酯(Andro)抗炎与抗血栓机制的研究[D].中国科学院研究生院,2009.
- [ 12 ] Murano M, Maemura K, Hirata I, et al. Therapeutic effect of intracolonic administered nuclear factor kappa B (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2000, 120(1): 51-58.
- [ 13 ] Andresen L, Jørgensen VL, Perner A, et al. Activation of nuclear factor kappaB in colonic mucosa from patients with collagenous and ulcerative colitis [J]. *Gut*, 2005, 54(4): 503-509.
- [ 14 ] Fujino S, Andoh A, Bamba S, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease [J]. *Gut*, 2003, 52(1):65-70.
- [ 15 ] Swaidani S, Bulek K, Kang Z, et al. The critical role of epithelial-derived Act1 in IL-17- and IL-25-mediated pulmonary inflammation [J]. *J Immunol*, 2009, 182(3): 1631-1640.
- [ 16 ] Nishikawa K, Seo N, Torii M, et al. Interleukin-17 induces an atypical M2-like macrophage subpopulation that regulates intestinal inflammation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108494.
- [ 17 ] Cosín-Roger J, Ortiz-Masió D, Calatayud S, et al. The activation of Wnt signaling by a STAT6-dependent macrophage phenotype promotes mucosal repair in murine IBD [J]. *Mucosal Immunol*, 2016, 9(4): 986-998.

[收稿日期] 2016-10-09