DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2018.06.004

IL-16 在炎症性肠病模型小鼠结肠组织的表达及意义*

杨艳丽[1]　于　露[2▲]　李春霞[1]　朱玉贞[1]　马　群[1]　董冠军[1△]
([1] 济宁医学院基础医学院,[2] 济宁医学院 ,济宁 272067)

摘　要　目的　探究 IL-16 在恶唑酮诱导的小鼠炎症性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)模型中的表达及意义。**方法**　雌性 7 周龄 C57BL/6 小鼠随机分为正常对照组和模型组,每组 10 只。正常对照组做乙醇对照处理,模型组经恶唑酮诱导建立小鼠 IBD 模型。观测小鼠活动度以及便血情况并记录体重变化,7d 后眼球静脉取血处死小鼠,分离小鼠结肠组织,制作结肠组织 HE 切片染色,q-PCR 检测小鼠结肠组织中细胞因子 IL-16 mRNA 的变化,ELISA 检测小鼠结肠组织中 IL-16 蛋白水平的变化。**结果**　与正常对照组相比,模型组小鼠结肠组织中 IL-16 mRNA 的水平明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);模型组 IL-16 蛋白水平明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论**　IL-16 在恶唑酮诱导的小鼠 IBD 模型中高表达,可能参与小鼠 IBD 的发生发展。

关键词　IL-16;恶唑酮;炎症性肠病
中图分类号:R392-3　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1000-9760(2018)12-393-04

Expression and significance of IL-16 in colon tissue of mice with inflammatory bowel disease

YANG Yanli[1], *YU Lu*[2▲], *LI Chunxia*[1], *ZHU Yuzhen*[1], *MA Qun*[1], *DONG Guanjun*[1△]
([1] *College of Basic Medicine, Jining Medical University*, [2] *Jining Medical University, Jining* 272067, *China*)

Abstract: ***Objective***　To investigate the expression and significance of IL-16 in the model of oxazolone-induced inflammatory bowel disease in mice. ***Methods***　Twenty female 7-week-old C57BL/6 mice were randomly divided into normal control group and model group. The normal control group was treated with Ethanol control and the model group was induced by oxazolone to establish an inflammatory bowel disease model in mice. The mouse activity and blood in the stool were observed and body weight changes were recorded. Seven days later, the mice were sacrificed by intraocular vein blood sampling. Colon tissue was isolated from mice for HE section staining. q-PCR was used to detect the change of cytokine IL-16 mRNA in colon tissue, and ELISA was used to detect the changes of IL-16 protein in colon tissue of mice. ***Results***　Compared with the normal control group, the level of IL-16 mRNA in the colon tissue of mice in the experimental model group was significantly increased ($P<0.05$). The level of IL-16 protein in the model group was also increased and the difference was statistically significant ($P<0.05$). ***Conclusion***　IL-16 is highly expressed in oxazolone-induced inflammatory bowel disease in mice which is involved in the development of inflammatory bowel disease in mice.

Keywords: IL-16; Oxazolone; Inflammatory bowel disease

炎症性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)是一组累及肠道的慢性非特异性炎症疾病,主要包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis,UC)和克罗恩病(Crohn's disease,CD)。其病因和发病机制尚不明确,但有研究表明,机体多种免疫成分在 IBD 的发病过程中扮演着十分重要的角色,如 T 细胞、NK 细胞等免疫细胞浸润以及 IL-6、TNF-α、IFN-γ 等细胞因子的大量分泌[1-3]。目前我国 UC 发病率明显高于 CD,UC 患病率在近 10 年里显著增加[4]。

*[基金项目]国自然青年科学基金项目(81601426);地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目(201610443043)
△[通信作者]董冠军,E-mail:guanjun0323@126.com
▲ 于露,济宁医学院临床医学院 2014 级学生

IL-16 是一种免疫分子,在多种细胞生命活动和疾病发生中起重要作用,与风湿性关节炎、过敏性哮喘、肾移植等有密切的关系,有数据显示 IL-16 在 IBD 患者体内高表达[5]。目前,IL-16 在 IBD 中的作用和功能尚不明确。本文拟利用恶唑酮诱导建立小鼠 IBD 模型,观察 IL-16 在 IBD 中的表达水平,进一步探究 IL-16 在 IBD 中的作用和功能。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　动物与分组　C57BL/6 小鼠,雌性,7 周龄,体重约 18g,购于济南朋悦实验动物技术有限公司,SPF 级饲养。20 只 C57BL/6 小鼠适应喂养 1 周后,随机分为正常对照组和模型组,各 10 只。动物实验符合实验动物福利和动物伦理学要求。

1.1.2　试剂器材　恶唑酮(Sigma 公司);Trizol、反转录试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司);SYBR Green MasterMix(美国 Vazyme 公司);IL-16 ELISA 试剂盒(武汉华美公司)。

1.2　方法

1.2.1　IBD 模型的建立及标本采集　小鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠致麻,暴露小鼠背部皮肤 0.2cm ×0.2cm,分别在第 1、2 天用 0.2ml 的 3% 恶唑酮(溶于 100% 乙醇中)涂擦皮肤致敏 1 次,对照组用 100% 乙醇涂抹皮肤,5d 后将直径约 1.5mm 细导管插入小鼠肛门约 4cm 处,100μl 1% 恶唑酮(溶于 100% 乙醇中)灌肠,注入后捏紧肛门倒置小鼠约 1min,以便药液与结肠充分接触,对照组同样做 100% 乙醇处理,待麻醉清醒后正常喂养,7d 后重复灌肠 1 次。7d 后眼球取血处死小鼠,75% 乙醇浸泡消毒 5min,置动物于解剖台,固定四肢,剪开腹壁暴露腹腔分离全结肠,冲洗干净内容物保存样本。

1.2.2　HE 染色　取部分结肠组织冲洗干净内容物,卷起固定于 4% 多聚甲醛,经脱水透明、浸蜡包埋、切片、脱蜡染色等步骤制作 HE 染色组织切片。

1.2.3　实时荧光定量 PCR　取部分结肠组织剪碎,加入 5ml 0.01% 胶原酶中 37℃温箱孵育 1.5h,1500rpm 离心 5min 收集细胞,加入 700μl Trizol 提取总 RNA,RevertAid FirstStand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒合成 cDNA,按照说明书进行实时荧光定量 PCR 反应。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参对照,引物序列如下:

IL-16

上游引物:5'-AGTGAGAACCAT AGCCATACA-3'

下游引物:5'-ACCCAGGAGACCAGAAAA-3'

GAPDH

上游引物:5'-CTAGAG AGCTGACAGTGGG-TAT-3'

下游引物:5'-AGACGACCAATGCGTCCAAA-3'

1.2.4　ELISA 检测　取部分结肠组织剪碎加入 500μl RIPA 强裂解液中,强烈涡旋充分裂解后 14000rpm 离心 5min,取上清,使用 IL-16 的 ELISA 试剂盒检测其在结肠组织中的浓度,按照试剂盒说明书操作。

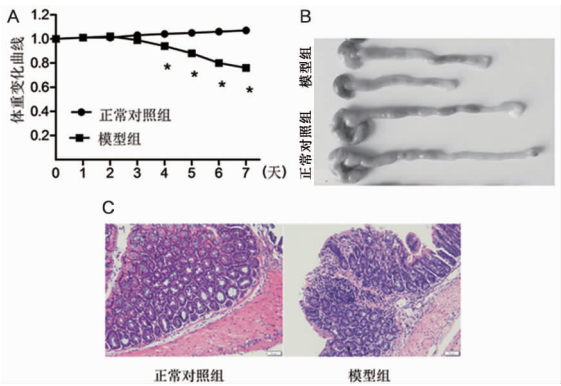
1.3　统计学方法

数据采用 GraphPad Prism 5 统计软件进行分析。

2　结果

2.1　两组小鼠体重变化、全结肠长度及结肠 HE 染色情况

与正常对照组相比,恶唑酮诱导模型组小鼠体重从第 4 天开始显著降低且具有统计学差异,造模期间模型组小鼠便血较为严重,解剖分离小鼠全结肠可见模型组小鼠结肠充血、水肿,粪便不成颗粒状。镜下观察小鼠结肠 HE 染色切片,模型组小鼠结肠黏膜上皮细胞脱落、糜烂和溃疡形成,杯状细胞减少,肠腺萎缩或消失,密度减低。见图 1。



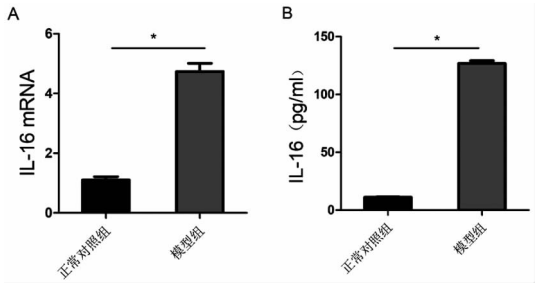
注:A. 小鼠造模期间体重变化及体重变化曲线;B. 两组小鼠全结肠照片;C. 两组小鼠部分结肠制作切片 HE 染色,200 × 镜下观察组织损伤;与正常对照组相比,$*P<0.05$。

图 1　两组小鼠体重变化,全结肠长度及结肠 HE 染色情况

2.2　两组小鼠结肠 IL-16 的表达情况

与正常对照组相比,模型组小鼠结肠组织 IL-16 mRNA 水平表达明显升高,差异具有统计学意

义($t=5.80$, $P<0.05$)。与正常对照组相比,模型组小鼠结肠组织中 IL-16 蛋白水平明显升高,差异具有统计学意义($t=44.62$, $P<0.05$)。见图 2。



注:A. 两组小鼠结肠组织 IL-16 mRNA 表达;B. 两组结肠组织中 IL-16 蛋白水平的变化;与正常对照组相比,$*P<0.05$。

图 2　两组小鼠结肠 IL-16 及 IL-16 mRNA 的表达情况

3　讨论

恶唑酮诱导的 IBD 模型小鼠结肠炎是一种 IL-4 介导的以一种 IL-4/IL-5 细胞因子表达量升高为主的 Th2 型炎症,其组织学特征主要表现为上皮细胞缺失导致糜烂和浅溃疡的形成,杯状细胞和腺体密度降低,黏膜和黏膜下层可见多种炎性细胞浸润,恶唑酮诱导的炎症性肠炎这些特征与人类 IBD 患者最相似[6]。因此,我们利用恶唑酮诱导小鼠肠炎模型来探究 IBD 的病因和发病机制,为临床治疗提供依据。

IL-16 不仅可以作为一种 T 细胞的趋化因子、对 T 细胞的增殖具有一定的促进作用[7],还可以趋化活化的单核细胞、树突状细胞以及嗜酸性粒细胞[8],IL-16 还参与急性间质性肾炎的发生发展[9]。目前已有临床报道显示 IBD 患者血清中 IL-16 异常表达[10]。研究表明,IBD 尤其是 UC 的发病过程中 T 细胞、巨噬细胞、骨髓来源的抑制性细胞[11]等免疫细胞均发挥重要的生理作用。由此,本文主要观察 IL-16 在炎症性肠病是否通过调控某种或多种免疫细胞从而参与炎症性肠病的发生发展过程。

本文结果显示建模过程中 IBD 模型小鼠较正常对照组小鼠体重逐渐下降且从第 4 天开始小鼠伴随腹泻和便血,全结肠 HE 染色也显示经典的肠炎损伤,这表明恶唑酮诱导的 IBD 模型成功建立。随后我们发现 IBD 模型组小鼠结肠组织中 IL-16 mRNA 水平和蛋白水平的表达均具有显著性的增强,说明 IL-16 的高表达可能参与小鼠 IBD 的发病。已有的研究中提及 IL-16 主要由 T 细胞分泌作用于自身或趋化其他免疫细胞参与炎症的发生发展,提示 IL-16 对 IBD 模型中效应细胞具有一定的调控作用。

综上所述,本研究采用恶唑酮成功诱导小鼠 IBD 模型,并发现 IL-16 在恶唑酮诱导的 IBD 模型小鼠全结肠组织中高表达,但是 IL-16 参与 IBD 中的具体调控机制尚不清楚,这是我们接下来进一步的研究方向。

参考文献:

[1] Giuffrida P, Corazza GR, Di Sabatino A. Old and new lymphocyte players in inflammatory bowel disease[J]. Dig Dis Sci, 2018, 63(2): 277-288. DOI: 10.1007/s10620-017-4892-4.

[2] 谢睿,李全朋,缪林. 炎症性肠病免疫发病机制研究进展[J]. 医学研究生学报,2013,26(2):206-210.

[3] 董冠军,司传平. IFN-α 在 SLE 发生发展中的作用[J]. 济宁医学院学报,2016,39(1):6-11. DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2016.01.002.

[4] Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(1): 158-161. DOI: 10.3748/wjg.v8.i1.158.

[5] Singh UP, Singh NP, Murphy EA, et al. Chemokine and cytokine levels in inflammatory bowel disease patients[J]. Cytokine, 2016, 77: 44-49. DOI: 10.1016/j.cyto.2015.10.008.

[6] Kojima R, Kuroda S, Ohkishi T, et al. Oxazolone-induced colitis in BALB/C mice: a new method to evaluate the efficacy of therapeutic agents for ulcerative colitis[J]. J Pharmacol Sci, 2004, 96(3): 307-313. DOI: 10.1254/jphs.fp0040214.

[7] Conti P, Kempuraj D, Kandere K, et al. Interleukin-16 network in inflammation and allergy[J]. Allergy Asthma Proc, 2002, 23(2): 103-108.

[8] Cruikshank W, Little F. lnterleukin-16: the ins and outs of regulating T-cell activation[J]. Crit Rev Immunol, 2008, 28(6): 467-483. DOI: 10.1615/critrevimmunol.v28.i6.10.

[9] Zand L, Monaghan M, Griffin BR, et al. The role of type I hypersensitivity reaction and IgE-mediated mast cell activation in acute interstitial nephritis[J]. Clinical Nephrology, 2015, 84(9): 138-144. DOI: 10.5414/cn108254.

(下转第 399 页)

3　讨论

泛素蛋白质酶系统一直是生物科学的研究热点之一,泛素蛋白与目标蛋白的共价结合介导蛋白的选择性降解是泛素参与的经典途径,这一途径广泛存在于真核生物中[8]。因此,为了维持功能的稳定,泛素基因序列从高等无脊椎动物到低等的真菌具有高度的保守性,例如人和酵母的泛素基因仅有 3 个氨基酸残基的差别[9]。本研究克隆得到的单环刺蛎泛素基因蛋白质序列与其他物种的序列也具有极高的保守性,仅仅在 C 端存在着一个氨基酸的不同,这些结果进一步说明泛素基因在生物进化过程中具有相同的祖先,而且进化过程中为了维持功能的稳定,序列几乎不发生变异,从另外角度也证明了其功能的重要性。

单环刺蛎泛素基因在各器官中广泛存在,而且除体腔液外在其他器官中的表达量无统计学差异,这一结果恰好与泛素基因的名字在各组织中广泛存在相对应,这也与拟穴青蟹中泛素在各器官中的分布规律一致[5]。但是泛素基因在精卵发生过程中发挥着重要作用,其表达量会出现显著性的变化,例如在小鼠精原细胞中含量很低,精母细胞含量开始升高,到达精子表达量最高[10]。对于单环刺蛎来说,其体腔液中会存在大量生殖细胞[11-12],这会导致泛素基因的相对表达量改变。此外,泛素参与的非经典途径参与多种生理生化反应,在低等的海洋无脊椎动物中,泛素具有抗菌的特性[6],单环刺蛎泛素的功能需要进一步的研究。

参考文献:

[1] Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway [J]. Cell, 1994, 79(1): 13-21. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90396-4.

[2] Pillay CS, Elliott E, Dennison C. Endolysosomal proteolysis and its regulation [J]. Biochemical Journal, 2003, 363(3): 417-429. DOI: 10.1042/bj3630417.

[3] 张宏,杜亚琼,李凤良,等. 小菜蛾泛素基因的克隆与分析[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2013, 36(3): 116-119. DOI: 10.3969/j.issn.1001-4616.2013.03.022.

[4] Schlesinger D H, Goldstein G. Molecular conservation of 74 amino acid sequence of ubiquitin between cattle and man [J]. Nature, 1975, 255(5507): 423-424. DOI: 10.1038/255423a0.

[5] 戴燕彬,韩坤煌,颜素芬,等. 拟穴青蟹泛素基因的克隆及其在性腺发育过程中的表达[J]. 中国水产科学, 2012(6): 946-955. DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00946.

[6] Seo JK, Min JL, Go HJ, et al. Purification and antimicrobial function of ubiquitin isolated from the gill of Pacific oyster, Crassostrea gigas [J]. Molecular Immunology, 2013, 53(1-2): 88-98. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.07.003.

[7] 刘峰,孙涛,纪元,等. 单环刺蛎生物学及生态学研究进展[J]. 海洋科学, 2017, 41(10): 125-131. DOI: 10.11759/hykx20170414001.

[8] 黄新敏,张艳霞,万小荣. 泛素蛋白的研究进展[J]. 广东农业科学, 2010, 37(6): 191-194. DOI: 10.3969/j.issn.1004-874X.2010.06.079.

[9] 王金昌,李燕萍. 泛素-蛋白酶体途径的生物学功能[J]. 江西科学, 2006, 24(2): 54-57, 85. DOI: 10.3969/j.issn.1001-3679.2006.02.016.

[10] 于晖,王永潮,费仁仁,等. 小鼠精子发生过程中泛素的表达[J]. 发育与生殖生物学学报(英文版), 2001(S1): 32.

[11] 王航宁,邵明瑜,张志峰. 单环刺蛎精巢年周期发育及精子发生[J]. 中国水产科学, 2011, 18(5): 1189-1195. DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01189.

[12] 李昀,王航宁,邵明瑜,等. 单环刺蛎生殖腺的发生及雌体的生殖周期[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2012, 42(6): 85-88. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5174.2012.06.013.

(收稿日期　2018-10-09)
(本文编辑:石俊强)

(上接第 395 页)

[10] Middel P, Reich K, Polzien F, et al. Interleukin 16 expression and phenotype of interleukin 16 producing cells in Crohn's disease [J]. Gut, 2001, 49(6): 795-803. DOI: 10.1136/gut.49.6.795.

[11] Kontaki E, Boumpas DT, Tzardi M, et al. Aberrant function of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in experimental colitis and in inflammatory bowel disease (IBD) immune responses [J]. Autoimmunity, 2017, 50(3): 170-181. DOI: 10.1080/08916934.2017.1283405.

(收稿日期　2018-05-30)
(本文编辑:石俊强)