

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00339

## 5-LOX 和 NF- $\kappa$ B P65 在溃疡性结肠炎患者黏膜组织中的表达及相互关系 Expression of 5-LOX and NF- $\kappa$ B P65 in mucosal tissues of patients with ulcerative colitis and their relationship

苗新普<sup>1</sup>, 欧阳钦<sup>2</sup>, 韦 红<sup>1</sup>

1. 海南省人民医院消化科, 海口 570311

2. 四川大学华西医院消化内科, 成都 610041

**[摘要]** **目的** 研究 5-脂氧合酶(5-LOX)和核因子  $\kappa$ B P65(NF- $\kappa$ B P65)在溃疡性结肠炎(UC)患者结肠黏膜的表达,并探讨二者的关系。**方法** 取 32 例 UC 患者结肠黏膜标本进行组织学分级,同时收集正常对照者结肠黏膜标本 26 例。分别采用实时荧光定量 RT-PCR 和免疫组织化学法检测 UC 患者结肠黏膜 5-LOX、NF- $\kappa$ B P65 的表达,并分析其相互关系。**结果** 32 例 UC 患者组织学分级 I 级 11 例,2 级 17 例,3 级 4 例。UC 患者结肠黏膜 5-LOX、NF- $\kappa$ B P65 表达高于正常对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),二者的阳性表达率随 UC 组织学分级增加而增加;5-LOX 与 NF- $\kappa$ B P65 呈正相关。**结论** 5-LOX 和 NF- $\kappa$ B P65 在 UC 结肠炎症发生发展中可能发挥重要作用。

**[关键词]** 溃疡性结肠炎;NF- $\kappa$ B;5-脂氧合酶

**[中图分类号]** R 574.621

**[文献标志码]** B

**[文章编号]** 0258-879X(2011)03-0339-03

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是我国临床常见的消化道疾病,近年来发病率和患病率有明显增加的趋势,但病因和发病机制尚不明确<sup>[1]</sup>。目前认为它是由于多因素相互作用,引起易感患者肠免疫功能紊乱,产生过量炎症细胞因子和炎症介质而导致的肠黏膜组织炎症。

5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)是花生四烯酸(arachidonic acid, AA)LOX 代谢途径的关键酶,可以催化 AA 生成白三烯 B<sub>4</sub>(LTB<sub>4</sub>),后者被认为是 UC 中起主要作用的炎性介质<sup>[2]</sup>。研究发现,实验性大鼠结肠炎的肠黏膜中 5-LOX 表达增高,应用 5-LOX 抑制剂或敲除 5-LOX 基因能明显减轻其结肠炎症程度<sup>[3-5]</sup>;5-LOX 抑制剂能够明显减轻 UC 临床症状和内镜下炎症程度<sup>[6-7]</sup>。这说明 5-LOX 在 UC 的发生发展中可能起着重要作用。核因子  $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)是炎症过程中最重要的调控因子,可以促进多种炎性细胞因子的转录,是治疗 UC 的关键靶位<sup>[8]</sup>,与 AA 的代谢密切相关。本研究拟对 5-LOX 和 NF- $\kappa$ B P65 在 UC 患者结肠黏膜组织中的表达情况进行研究。

### 1 资料和方法

**1.1 研究对象** 选择 2007 年 8 月至 2008 年 12 月在华西医院消化科门诊或住院部诊治的 32 例活动性 UC 患者,其临床表现、消化道钡餐、肠镜和病理检查均符合 2006 年中华医学会消化分会炎症性肠病协作组制定的 UC 诊断标准<sup>[3]</sup>。所有患者均为初治病例,诊断前 3 个月内未服用柳氮磺胺嘧啶类药物和激素。排除标准:(1)诊断不明确的各种肠炎;(2)患有严重心、肝、肺、肾疾病,不能耐受结肠镜检查者;(3)拒绝取活检者;(4)缓解期病例。其中男 18 例,女 14 例,年

龄 18~72 岁(中位年龄 41.5 岁)。收集同期在我科行结肠镜检查的健康体检者和结肠单发息肉切除术后复查肠镜检查正常者 26 例,其性别、年龄与 UC 病例组差异无统计学意义。所有 UC 患者均在患者病变最明显肠段黏膜的溃疡边缘或充血水肿最明显处多点取材(8~10 点),健康对照者均在乙状结肠处取材(8~10 点)。一部分结肠组织予液氮快速冷冻后置 -80℃ 保存行实时荧光定量 RT-PCR 检测;另一部分组织经 10% 甲醛固定,常规脱水、石蜡包埋、切片,行免疫组化检测。病例组和对照组各有 14 例患者均进行实时荧光定量 RT-PCR 和免疫组化检测,其余因肠黏膜标本量不足,仅做免疫组化检测。

**1.2 UC 患者的评分** 纳入的 UC 患者由 2 位病理科医生阅片,按 Truelove 标准进行组织学分级<sup>[5]</sup>。I 级:无明显炎症;II 级:轻到中度炎症;III 级:重度炎症。

**1.3 免疫组化 SP 法检测结肠黏膜 5-LOX 和 NF- $\kappa$ B P65 蛋白的表达** 切片脱蜡,3% 过氧化氢处理,高压锅加压修复抗原,3% 正常小牛血清封闭,依次滴加羊抗人 5-LOX 多克隆抗体(1:400,美国 Cayman Chemical 公司)、鼠抗人 NF- $\kappa$ B P65 单克隆抗体(1:200,美国 Santa Cruz),滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,SP 复合物、DAB 显色、苏木精复染。用缓冲盐液替代一抗作阴性对照,用已知阳性切片作阳性对照。染色阳性标准:以胞质出现棕黄色颗粒为阳性。每张切片在 400 倍视野中分别计数 200 个细胞计算阳性细胞百分率。

**1.4 实时荧光定量 RT-PCR 检测结肠黏膜 5-LOX mRNA 和 NF- $\kappa$ B P65 mRNA 的表达** 结肠黏膜组织总 RNA 提取按 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂说明书进行,紫外分光光度计测定

**[收稿日期]** 2010-09-24

**[接受日期]** 2011-01-26

**[基金项目]** 海南省卫生厅资助课题(琼卫 2009-8)。Supported by Fund of Health Department of Shanghai Municipal Government(Qiongwei 2009-8)。

**[作者简介]** 苗新普,博士,主治医师。E-mail: miaoxinpu@163.com

RNA 含量及纯度,并证实其  $D_{260}/D_{280}$  为 1.8~2.0。5-LOX、NF- $\kappa$ B P65、GAPDH 引物参照 GenBank 序列应用 Primer Express 2.0 软件设计,由上海生工生物工程技术有限公司合成。5-LOX 引物上游序列为 5'-TAT CGA TGG ATG GAG TGG AA-3',下游序列为 5'-GAC TGG AAC ATG TGC ATG AAG-3'(173 bp);NF- $\kappa$ B P65 引物上游序列为 5'-CAC AAG GAG ACA TGA AAC AG-3',下游序列为 5'-CCA GAG ACC TCA TAG TTG T-3'(187 bp);GAPDH 引物上游序列为 5'-CCT CAA GAT CAT CAG CAA T-3',下游序列为 5'-CCA TCC ACA GTC TTC TGG GT-3'(141 bp)。扩增条件:(1)94℃预变性 2 min。(2)5-LOX为 94℃ 20 s,56℃ 20 s,72℃ 30 s,80℃ 20 s,45 个循环;NF- $\kappa$ B P65 为 94℃ 20 s,54℃ 20 s,72℃ 30 s,80℃ 20 s,45 个循环;GAPDH 为 94℃ 20 s,54℃ 20 s,72℃ 30 s,80℃ 20 s,45 个循环。采用 FTC2000 实时荧光定量基因扩增仪(加拿大 Funglym 公司)进行实时荧光定量 PCR;确定每个样品的循环阈值(即 Ct 值),将每个样本目的基因的 Ct 值与管家基因 GAPDH 的 Ct 值进行比较,换算为基因的相对表达量。

1.5 统计学处理 所得实验数据用 SPSS 11.5 软件进行分析,计数资料采用  $\chi^2$  检验进行比较;计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析进行比较;相关性分析用 Pearson 相关性检验。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

2 结果

2.1 纳入的 UC 患者临床病理特点 纳入的 UC 患者临床类型多为慢性复发型,病变部位集中于直肠、乙状结肠。按 Southerland 疾病活动指数(Mayo 指数)进行分期<sup>[9]</sup>,入选患者均为活动期;组织学分级 1 级 11 例,2 级 17 例,3 级 4 例。  
2.2 UC 结肠黏膜组织 5-LOX、NF- $\kappa$ B P65 蛋白的表达 活动期 UC 组织中 5-LOX、NF- $\kappa$ B P65 蛋白表达率分别为 59.4%(19/32)、53.1%(17/32),正常结肠黏膜 5-LOX、NF- $\kappa$ B P65 蛋白表达率为 19.2%(5/26)、23.1%(6/26),UC 结肠黏膜炎症组织 5-LOX 和 NF- $\kappa$ B P65 蛋白表达率均高于正常对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。UC 组 5-LOX、NF- $\kappa$ B P65 蛋白阳性表达率随病理分级的增高而逐渐增高。详见图 1 和表 1。

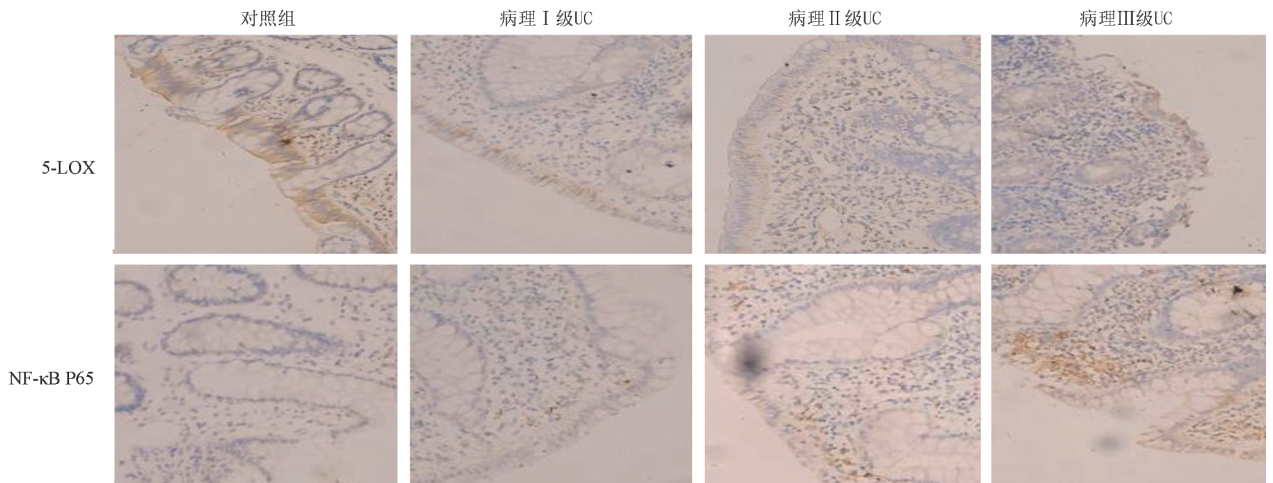


图 1 溃疡性结肠炎(UC)患者结肠黏膜 5-LOX 和 NF- $\kappa$ B P65 免疫组化染色(SP 法)

Original magnification:  $\times 400$

表 1 5-LOX、NF- $\kappa$ B P65 蛋白和 mRNA 在 UC 组织及正常组织中的表达

组别	例数	蛋白阳性率[n(%)]		mRNA 相对含量	
		5-LOX	NF- $\kappa$ B P65	5-LOX	NF- $\kappa$ B P65
对照组	26	5(19.2)	6(23.1)	8.92 $\pm$ 1.36	13.43 $\pm$ 2.23
病理 I 级	11	5(45.5)	5(45.5)	14.71 $\pm$ 1.86	21.45 $\pm$ 2.97
病理 II 级	17	11(64.7)	9(52.9)	20.17 $\pm$ 2.56	41.74 $\pm$ 4.16
病理 III 级	4	3(75.0)	3(75.0)	37.84 $\pm$ 3.27	69.87 $\pm$ 6.14

2.3 UC 患者结肠黏膜 5-LOX、NF- $\kappa$ B P65 mRNA 的表达 实时定量 RT-PCR 仪检测显示,UC 结肠黏膜炎症组织 5-LOX 和 NF- $\kappa$ B P65 mRNA 相对含量均高于正常对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。UC 组 5-LOX、NF- $\kappa$ B P65 mRNA 相对含量随病理分级的增高而逐渐增高。

2.4 5-LOX、NF- $\kappa$ B P65 表达之间相关性 UC 患者结肠黏膜中 5-LOX 与 NF- $\kappa$ B P65 蛋白和 mRNA 的表达均正相关( $P < 0.05$ )。

3 讨论

UC 的病因及发病机制至今仍不清楚,目前大多数研究认为与免疫反应异常有关,尤与肠黏膜局部免疫反应的异常关系密切。各种细胞因子、炎性介质的相互作用形成复杂的甚至有自身放大作用的细胞因子网络,促进炎症反应,导致黏膜损伤,在 UC 的发生发展中起着十分重要的作用<sup>[10]</sup>。

5-LOX 是机体生成 LTB<sub>4</sub> 的关键酶,普遍存在于哺乳动

物的各种组织和血液细胞中,主要见于白细胞、巨噬细胞和肥大细胞。在肺泡巨噬细胞存在胞质型和膜结合型 2 种 5-LOX,而在大鼠嗜碱白血细胞则发现胞核及核膜有 5-LOX 存在,提示在不同的细胞、不同的状态可能有不同的 5-LOX 亚细胞定位<sup>[11]</sup>。2002 年, Hendel 等<sup>[12]</sup>用半定量 RT-PCR 方法检测 IBD 炎症组织中 5-LOX mRNA 的表达,发现尽管炎症组织中 5-LOX mRNA 的表达高于正常组织,但差异无统计学意义。2007 年 Jupp 等<sup>[13]</sup>检测 IBD 组织的 5-LOX 代谢通路发现炎症组织中 5-LOX 表达明显高于正常组织,差异有统计学意义。我们应用实时定量 RT-PCR 和免疫组化方法检测发现,5-LOX mRNA 和蛋白在 UC 结肠黏膜炎症组织的表达高于正常组织,炎症程度越重,其表达越高,提示 5-LOX 在 UC 炎症的发生发展中发挥重要作用。

NF- $\kappa$ B 是最重要的炎症调控因子,含有 P50 和 P65 两个亚基。在静息状态下,NF- $\kappa$ B P50/P65 二聚体与抑制性蛋白 I $\kappa$ B $\alpha$  结合于胞质,呈无活性状态;当受到炎症刺激时,I $\kappa$ B $\alpha$  降解,NF- $\kappa$ B 移位至核,结合于靶基因的 NF- $\kappa$ B 结合位点,启动基因转录。NF- $\kappa$ B 在 UC 炎症中发挥着关键的枢纽作用,是多种抗炎药物的靶标<sup>[14]</sup>。在 UC 组织中,NF- $\kappa$ B P65 在胞质中的表达是炎症状态的反映,即胞质中的 I $\kappa$ B 与 P65/P50 解离,随之游离的二聚体移位至核,同时 UC 组织中 P65 mRNA 的持续合成,也提供了胞质中 P65 的来源。新合成的 P65 移位至核,使 NF- $\kappa$ B 的激活得以持续。P65 在正常组织无或低表达,而在活动期 UC 有不同程度高表达<sup>[15]</sup>。我们的研究发现,UC 患者结肠黏膜炎症组织 NF- $\kappa$ B P65 mRNA 和蛋白表达较正常对照组增强,表明 NF- $\kappa$ B P65 的在 UC 炎症发生发展中起关键作用。

NF- $\kappa$ B 与 AA 的代谢密切相关。有研究发现,炎症条件下,5-LOX 与 NF- $\kappa$ B 密切相关,NF- $\kappa$ B/ERK 通路激活,可促进 5-LOX 代谢产物 TLB4 的合成增多<sup>[16]</sup>,但 UC 结肠黏膜组织中 5-LOX 与 NF- $\kappa$ B P65 关系如何,目前尚未见报道。我们的研究发现 UC 结肠黏膜组织中 5-LOX 与 NF- $\kappa$ B P65 之间存在正相关,推测在 UC 病程中二者可能相互作用,相互影响,共同在 UC 炎症中发挥作用。但由于研究中入选的样本量偏小,二者的确切关系及相互作用机制尚需进一步深入研究。

#### [参考文献]

[1] Isaacs K L, Lewis J D, Sandborn W J, Sands B E, Targan S R. State of the art: IBD therapy and clinical trials in IBD[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2005, 11(Suppl 1): S3-S12.

[2] Schmidt C, Baumeister B, Kipnowski J, Schiermeyer-Dunkhase B, Vetter H. Alteration of prostaglandin E2 and leukotriene B4 synthesis in chronic inflammatory bowel disease[J]. *Hepato-gastroenterology*, 1996, 43: 1508-1512.

[3] Sharon P, Stenson W F. Metabolism of arachidonic acid in acetic

acid colitis in rats. Similarity to human inflammatory bowel disease[J]. *Gastroenterology*, 1985, 88: 55-63.

[4] Mion F, Cuber J C, Minaire Y, Chayvialle J A. Short term effects of indomethacin on rat small intestinal permeability. Role of eicosanoids and platelet activating factor[J]. *Gut*, 1994, 35: 490-495.

[5] Mazzon E, Sautebin L, Caputi A P, Cuzzocrea S. 5-lipoxygenase modulates the alteration of paracellular barrier function in mice ileum during experimental colitis[J]. *Shock*, 2006, 25: 377-383.

[6] Laursen L S, Naesdal J, Bukhave K, Lauritsen K, Rask-Madsen J. Selective 5-lipoxygenase inhibition in ulcerative colitis[J]. *Lancet*, 1990, 35: 683-685.

[7] Collawn C, Rubin P, Perez N, Bobadilla J, Cabrera G, Reyes E, et al. Phase II study of the safety and efficacy of a 5-lipoxygenase inhibitor in patients with ulcerative colitis[J]. *Am J Gastroenterol*, 1992, 87: 342-346.

[8] Atreya I, Atreya R, Neurath M F. NF-kappaB in inflammatory bowel disease[J]. *J Intern Med*, 2008, 263: 591-596.

[9] Schroeder K W, Tremaine W J, Ilstrup D M. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis. A randomized study[J]. *N Engl J Med*, 1987, 317: 1625-1629.

[10] Schreiber S, Raedler A, Stenson W F, MacDermott R P. The role of mucosal immune system in inflammatory bowel disease [J]. *Gasrtroenterol Clin North Am*, 1992, 21: 451-502.

[11] Brock T G, Paine R 3rd, Peters-Golden M. Localization of 5-lipoxygenase to the nucleus of unstimulated rat basophilic leukemia cells[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 22059-22066.

[12] Hendel J, Ahnfelt-Rønne I, Nielsen O H. Expression of 5-lipoxygenase mRNA is unchanged in the colon of patients with active inflammatory bowel disease[J]. *Inflamm Res*, 2002, 51: 423-426.

[13] Jupp J, Hillier K, Elliott D H, Fine D R, Bateman A C, Johnson P A, et al. Colonic expression of leukotriene-pathway enzymes in inflammatory bowel diseases[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2007, 13: 537-546.

[14] Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease[J]. *Gut*, 1998, 42: 477-484.

[15] Andresen L, Jørgensen V L, Perner A, Hansen A, Eugen-Olsen J, Rask-Madsen J. Activation of nuclear factor kappaB in colonic mucosa from patients with collagenous and ulcerative colitis[J]. *Gut*, 2005, 54: 503-509.

[16] Lee S J, Kim C E, Seo K W, Kim C D. HNE-induced 5-LO expression is regulated by NF- $\kappa$ B/ERK and Sp1/p38 MAPK pathways via EGF receptor in murine macrophages[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 88: 352-359.

[本文编辑] 孙岩