

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01180

趋化因子 MIP-3 α 及其受体 CCR6 在溃疡性结肠炎中的表达及其意义

钟万锴¹, 周国雄^{1*}, 丁晓凌¹, 黄 华²

1. 南通大学附属医院消化内科, 南通 226001

2. 南通大学附属医院病理科, 南通 226001

[摘要] 目的: 研究趋化因子巨噬细胞炎症蛋白-3 α (MIP-3 α)及其受体 CCR6 在溃疡性结肠炎(UC)中的表达情况以及与 UC 病变程度和范围的关系, 探讨其在 UC 发病机制中的作用。方法: 用免疫组织化学法检测 35 例活动期 UC 及 20 例正常对照石蜡包埋组织中 MIP-3 α 及 CCR6 的表达情况。结果: UC 组 MIP-3 α 及 CCR6 均为阳性表达, 对照组为阴性或弱阳性表达。MIP-3 α 及 CCR6 在 UC 组的表达与对照组相比, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。UC 病变范围越广、程度越重, MIP-3 α 及 CCR6 表达阳性率越高; 且 MIP-3 α 和 CCR6 表达有明显相关性($r = 0.765, P < 0.01$)。结论: MIP-3 α 与 CCR6 均参与了 UC 的发生和发展, 两者的相互作用可能在 UC 局部结肠组织破坏和病理变化中起着重要作用。

[关键词] 溃疡性结肠炎; 巨噬细胞炎症蛋白-3 α ; CCR6 受体

[中图分类号] R 574.621

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2008)10-1180-04

Expression of chemokine MIP-3 α and its receptor CCR6 in ulcerative colitis and its significance

ZHONG Wan-e¹, ZHOU Guo-xiong^{1*}, DING Xiao-ling¹, HUANG Hua²

1. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China

2. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression of chemokine MIP-3 α and its receptor CCR6 in ulcerative colitis(UC) and to explore its relationship with the involvement and severity of UC, so as to assess their expression in the pathogenesis of UC. **Methods:** The expression of MIP-3 α and CCR6 protein in the colon mucosa was detected by immunohistochemistry method in 35 UC patients and 20 normal controls. **Results:** MIP-3 α and CCR6 were both positive in the UC group and negative or only weakly expressed in the normal control group. The expression of MIP-3 α and CCR6 in the UC group was significantly higher than that in normal controls ($P < 0.01$). The expression of MIP-3 α and CCR6 was related to the severity and involvement of UC. The expression of MIP-3 α was significantly correlated with that of CCR6($r = 0.765, P < 0.01$). **Conclusion:** The expression of MIP-3 α and CCR6 is positively correlated with each other, and both of them participate in the development and progression of UC. The interaction between the 2 may play an important role in the local damage and pathological changes in UC.

[KEY WORDS] ulcerative colitis; macrophage inflammatory protein-3 α ; CCR6 receptors

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(10):1180-1183]

溃疡性结肠炎(UC)是一种病因、发病机制未明的炎症性肠病(IBD)。目前认为其发病可能与遗传、免疫、感染及精神等多因素相互作用有关, 而免疫学因素是 UC 研究中的热点。在免疫学因素中, 细胞因子被认为在发病机制上起着重要作用。细胞因子常分为 3 类: 促炎细胞因子、抗炎细胞因子以及生长因子。促炎细胞因子与抗炎细胞因子之间的平衡失调被视为 UC 的一个重要的发病机制。趋化因子作为一类促炎细胞因子, 在 UC 发病发展中起着

重要作用。本研究通过免疫组织化学的方法研究巨噬细胞炎症蛋白-3 α (MIP-3 α)及其受体 CCR6 在 UC 中的表达情况以及与病变程度的关系, 了解 MIP-3 α 和 CCR6 在 UC 发病中的作用。

1 材料和方法

1.1 研究对象 收集 2005 年 10 月至 2007 年 12 月在南通大学附属医院门诊和住院患者中因腹痛、腹泻、便血、腹胀及里急后重等行结肠镜检查的患者,

[收稿日期] 2008-01-26

[接受日期] 2008-03-18

[作者简介] 钟万锴, 硕士生, 住院医师。

* 通讯作者(Corresponding author). E-mail: zhouguoxiong@medmail.com.cn

经内镜和病理证实为溃疡性结肠炎,符合 2000 年成都全国炎症性肠病学术会议研讨会制定的 UC 诊断标准^[1]。男性 21 例,女性 14 例,年龄 16~76 岁(中位年龄 44 岁),均为疾病活动期。按 Truelove-Witts 标准进行病情轻重分级:轻度 13 例,中度 14 例,重度 8 例;按 Truelove 标准进行内镜分级^[1]: I 级 12 例, II 级 16 例, III 级 7 例;按病变累及部位分:直结肠炎 10 例,直乙结肠炎 14 例,左半结肠炎 8 例,全结肠炎 3 例。对照组 20 例为性别年龄相匹配的健康志愿者(8 例)和结肠息肉行肠镜检查者,取其正常肠黏膜,其中男性 12 例,女性 8 例,年龄 18~75 岁(中位年龄 42.5 岁)。20 例标本均经病理检查确认为正常肠黏膜。MIP-3 α 多克隆抗体购自美国 R&D 公司,CCR6 多克隆抗体购自美国 ALEXIS,均为山羊来源。兔抗羊 IgG 二抗购自美国 Jackson 公司。EliVison 试剂盒购于北京中杉生物技术开发公司。所用仪器:LEICA 全自动组织脱水机;LEICA 组织包埋机;LEICA2035 切片机;常州中威组织漂烘仪;上海宝尔纯水处理仪;LAB VISION 自动免疫组化染色仪;OLYMPUS BX51 显微镜;无锡朗珈病理图文分析系统。

1.2 标本采集 所有研究对象常规进行肠道准备,然后作肠镜检查,在病变最明显处取组织 2 块,立即置于 10% 甲醛中固定。健康志愿者和肠道肿瘤行肠镜检查者取其正常肠黏膜 2 块,立即置于 10% 的甲醛固定。制备组织切片,部分切片行 H-E 染色,光学显微镜下评价炎症、溃疡等组织学改变;另一部分用于检测 MIP-3 和 CCR6 的表达。

1.3 免疫组化检测步骤 采用 LAB VISION 2D 全自动免疫组化染色仪,EliVison 二步法进行染色。10% 甲醛固定的组织,用 LEICA 自动脱水机脱水,透明,浸蜡处理,包埋成蜡块,切成厚度为 4~5 μm 的薄片,置于 67 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘片 2 h,脱蜡至水。PBS 冲洗,按照每种一抗的要求用酶消化以及微波抗原修复进行预处理。处理完毕后放入自动免疫组化染色仪当中,编程。每张切片加 1 滴 3% 的 H_2O_2 ,室温下孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性,PBS 冲洗;除去 PBS 液,每张切片加 1 滴 MIP-3 α (工作浓度 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$)及 CCR6(工作浓度 1:300)第一抗体,在室温条件下孵育 1 h,PBS 冲洗;除去 PBS,每张切片加 1 滴聚合物增强剂,室温下孵育 20 min,PBS 冲洗;除去 PBS,每张切片加 1 滴兔抗羊二抗(工作浓度 1:500),室温下孵育 30 min,PBS 冲洗;除去 PBS 液,每张切片加一滴新鲜配制的 DAB,室温条件下显色 5 min,蒸馏水冲洗。0.1% HCl 分

化,自来水冲洗,蓝化,切片经梯度乙醇脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固,光镜观察。MIP-3 α 和 CCR6 表达阳性的细胞为棕黄色着色,背景为淡蓝色。所有切片均在同一条件的光学显微镜下观察,结果以胞核或胞质中发现棕黄色或褐色颗粒状物者为阳性细胞。阴性对照应无棕黄色反应产物。采用以下染色积分评价标准^[2]:染色强度分为 4 级,0=阴性染色,1=弱阳性染色,2=中度阳性染色,3=强阳性染色;每张切片按所见阳性细胞范围分为 5 级,0=阴性,1=阳性细胞占 1%~25%,2=阳性细胞占 26%~50%,3=阳性细胞占 51%~75%,4=阳性细胞占 76%~100%。每张切片的染色积分以这二者乘积表示。

1.4 统计学处理 应用 Sestata 10.0 统计软件,采用方差分析比较 UC 组、正常对照组 MIP-3 α 和 CCR6 的表达有无差别。采用成组 t 检验分析 UC 组不同病变程度的病变肠黏膜 MIP-3 α 和 CCR6 的表达,MIP-3 α 和 CCR6 的相关性采用线性相关分析。

2 结果

2.1 UC 组、正常黏膜 MIP-3 α 和 CCR6 表达的比较 UC 患者病变肠组织和对照组肠组织 H-E 染色及免疫组化染色情况见图 1。MIP-3 α 主要表达局限在与淋巴滤泡相连的上皮细胞;CCR6 的表达主要在邻近 MIP-3 α 表达区域的 T 淋巴细胞上,在上皮下区域的非淋巴细胞上也有表达。在正常结肠黏膜组织中,MIP-3 α 和 CCR6 无或仅有弱阳性表达;UC 患者肠黏膜 MIP-3 α 、CCR6 表达水平分别为 4.43 ± 1.74 和 5.00 ± 2.11 ,均较正常对照组明显升高(分别为 0.55 ± 0.51 和 0.70 ± 0.47),差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 MIP-3 α 、CCR6 与 UC 病变程度之间的关系 MIP-3 α 、CCR6 表达随 UC 病情加重明显增加,差异有统计学意义($P < 0.01$,表 1)。

2.3 MIP-3 α 与 CCR6 相关性分析 经线性相关分析发现,MIP-3 α 与 CCR6 表达显著相关($r = 0.765$, $P = 0.0074$)。

3 讨论

趋化因子是一类可诱导的、相对分子质量为 7 000~10 000 的促炎细胞因子,趋化因子通过其相应受体对多种细胞如淋巴细胞、中性粒细胞、单核细胞、树突状细胞(DC)等的趋化作用而在多种疾病的免疫反应和炎症损伤中发挥重要作用。MIP-3 α 通

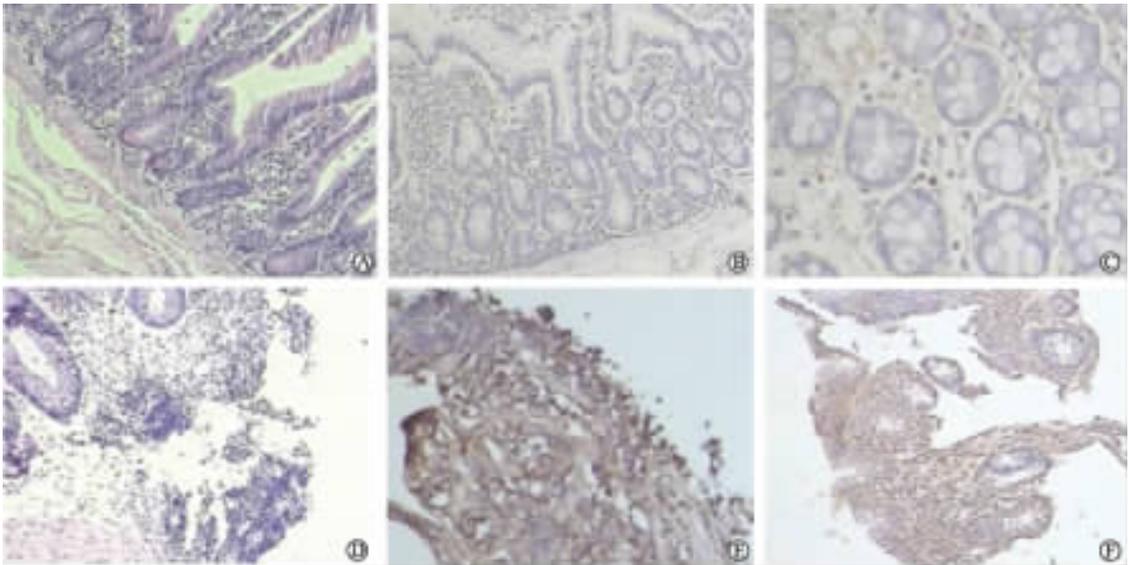


图 1 UC 患者病变肠组织和对照组肠组织 H-E 染色及免疫组化染色

Fig 1 H-E staining and immunohistochemistry of colon mucosa in UC and control groups

A; H-E staining of control group(Original magnification: $\times 400$); B; MIP-3 α was not expressed or only weakly expressed in colon mucosa of control group (Original magnification: $\times 100$); C; MIP-3 α was not expressed or only weakly expressed in colon mucosa of control group (Original magnification: $\times 100$); D; H-E staining of colon mucosa of UC patients(Original magnification: $\times 400$); E; MIP-3 α expression increases in colon mucosa of UC patients, and MIP-3 α expression was confined to follicle-associated epithelium(Original magnification: $\times 400$); F; CCR6 expression increases in colon mucosa of UC patients mainly in T lymphoid cells in the vicinity of MIP-3 α^+ zone. CCR6 expression was also found in non-lymphocytic cells in the subepithelial area(Original magnification: $\times 400$)

表 1 MIP-3 α 、CCR6 表达与 UC 病变程度的关系

Tab 1 Relationship between expression of MIP-3 α , CCR 6 and severity of UC

($\bar{x} \pm s$)

Factor	n	MIP-3 α	CCR6
Healthy subject	8	0.52 \pm 0.48	0.59 \pm 0.57
The severity of disease			
Light	13	2.85 \pm 0.38	2.92 \pm 0.49
Moderate	14	4.57 \pm 0.76**	5.07 \pm 1.00**
Serious	8	6.75 \pm 1.39** $\Delta\Delta$	7.50 \pm 1.60** $\Delta\Delta$
Endoscope grade			
I grade	12	2.75 \pm 0.45	2.83 \pm 0.39
II grade	16	4.56 \pm 0.90**	5.31 \pm 1.40**
III grade	7	6.86 \pm 1.46** $\Delta\Delta$	7.29 \pm 1.60** $\Delta\Delta$

** P<0.01 vs light(I grade) group; $\Delta\Delta$ P<0.01 vs moderate(II grade) group

过其受体 CCR6 的作用趋化未成熟树突状细胞(im-DC)进入结肠黏膜,同时活化和趋化淋巴细胞^[3-5]。我们的研究结果发现, MIP-3 α 在 UC 组中阳性表达,表达的强弱与炎症程度成正相关,在对照组中不表达或仅有微弱的表达,差异具有统计学意义。CCR6 作为 MIP-3 α 的受体,其表达情况与 MIP-3 α 的表达情况相一致。MIP-3 α 和 CCR6 的表达具有相关性。因而 MIP-3 α 与 CCR6 反映了疾病的炎症

程度,可作为病情程度监测的指标之一。

肠上皮细胞的主要功能是通过吸收和分泌保持肠内微环境稳定,在炎症或病原微生物感染的刺激下,肠上皮细胞能吸引中性粒细胞和淋巴细胞等炎症细胞到受累肠黏膜表面,并释放细胞因子,在细胞因子 IL-1 α 、TNF- α 等的作用下 NF- κ B 表达上调, NF- κ B 进一步上调 MIP-3 α 以及 CCR6 的表达^[4]。在 UC 中,由于同样的原因 MIP-3 α 的水平明显升高,从而使更多的 imDC 和趋化淋巴细胞聚集于受累肠壁,使炎症进一步加重。DC 是一类专职抗原提呈细胞,具有强大的抗原提呈和处理功能。DC 前体细胞经血液循环进入非淋巴组织,分化为 imDC,定居于上皮组织、胃肠道、呼吸道、泌尿和生殖系统以及心、肝、肾等实质脏器,在局部微环境中,DC 在炎性细胞因子和抗原物质以及内毒素/脂多糖等的刺激下逐渐成熟,并通过输出淋巴管和血液循环进入引流淋巴结。成熟树突状细胞(mDC)可以激活 T 淋巴细胞发生免疫反应并表达重要的共刺激分子如 CD80、CD86、CD83、CD54 和 CD40 等^[5]。尽管产生炎症的原因各不相同,但最终导致炎症的途径是由 CD4 T 细胞分化的辅助性 T 细胞 1(Th1)或 Th2 所

介导。UC 通常被认为是 Th2 介导的肠道黏膜炎症。Watanabe 等^[6]的研究表明 DC 的浸润数量与炎症反应的严重性呈正相关。我们的研究结果与该研究结果相一致。

通过阻断有关趋化因子和(或)阻断趋化因子受体来间接阻断趋化因子从而阻止炎症细胞募集到炎症部位是一种新的抗炎策略, 在一些慢性炎症性疾病中, 许多趋化因子和它们的受体已被成功地作为靶向治疗干预。Hyun 等^[7]在小鼠大肠炎动物模型研究表明: 在大肠炎的发展阶段, 给予 IP-10 单克隆抗体能减轻临床症状和组织损伤、减少 IP-10 mRNA 的表达以及减少单核细胞在淋巴结和结肠的累积。提示在 UC 中, 阻断 IP-10 有可能成为一种有用的辅助治疗。Rivera-Nieves 等^[8]通过自发鼠类动物模型研究发现, 在慢性回肠炎早期 CCR9 表达增多; CCL25, 即胸腺表达的趋化因子(TECK), 表达局限于小肠; 给予抗体阻断 CCL25/CCR9 能减轻早期慢性鼠类回肠炎, 而在后期阶段由于 CCR9 表达下降, 治疗效果不佳。由于 MIP-3 α 和 CCR6 在 UC 发病中起着重要作用, 表达的强弱与炎症程度成正相关, MIP-3 α 和 CCR6 的表达上调是 NF- κ B 介导的, 通过拮抗 NF- κ B 的活性理论上应该使 MIP-3 α 和 CCR6 的表达下调, 炎症损伤减轻。进一步研究 NF- κ B 和 MIP-3 α 、CCR6 的相互关系, 并寻找它们安全有效的拮抗剂, 通过拮抗它们的活性来减轻炎症损伤, 将给治疗 UC 带来希望。MIP-3 α 和 CCR6 在 UC 中的具体作用还不完全清楚, 我们的研究通过免疫组织化学的方法证实了它们在 UC 中的蛋白表达情况, 进一步研究它们的基因表达情况, 以及通过基因敲除动物模型等来研究它们在 UC 中的作用机制有着重要意义。

根据以上研究结果, 我们认为: MIP-3 α 和 CCR6 参与了 UC 的发生和发展。MIP-3 α 通过其受体 CCR6 趋化 imDC 和趋化淋巴细胞聚集在病变结肠, imDC 逐渐变为 mDC 并进一步激活淋巴细胞,

最终导致 Th2 介导的肠道黏膜炎症。由此可见, MIP-3 α 和 CCR6 在 UC 发病中起介导作用, DC 对淋巴细胞的激活直接导致了 UC 的病理变化。MIP-3 α 和 CCR6 反映了疾病的炎症程度, 可作为病情严重程度的评价指标和可能成为潜在治疗的靶点。

[参考文献]

- [1] 欧阳钦, 潘国宗, 温忠慧, 万学虹, 胡仁伟, 林三仁, 等. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议[J]. 中华消化杂志, 2001, 21: 236-239.
- [2] Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma; relevance to tumor differentiation[J]. *Hepatology*, 1999, 29: 688-696.
- [3] Banks C, Bateman A, Payne R, Johnson P, Sheron N. Chemokine expression in IBD. Mucosal chemokine expression is unselectively increased in both ulcerative colitis and Crohn's disease[J]. *J Pathol*, 2003, 199: 28-35.
- [4] Izadpanah A, Dwinell M B, Eckmann L, Varki N M, Kagnoff M F. Regulated MIP-3 α /CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 280: 710-719.
- [5] Jin Y, Fuller L, Ciancio G, Burke G W 3rd, Tzakis A G, Ricordi C, et al. Antigen presentation and immune regulatory capacity of immature and mature-enriched antigen presenting (dendritic) cells derived from human bone marrow[J]. *Hum Immunol*, 2004, 65: 93-103.
- [6] Watanabe S, Yamakawa M, Hiroaki T, Kawata S, Kimura O. Correlation of dendritic cell infiltration with active crypt inflammation in ulcerative colitis[J]. *Clin Immunol*, 2007, 122: 288-297.
- [7] Hyun J G, Lee G, Brown J B, Grimm G R, Tang Y, Mittal N, et al. Anti-interferon-inducible chemokine, CXCL10, reduces colitis by impairing T helper-1 induction and recruitment in mice[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2005, 11: 799-805.
- [8] Rivera-Nieves J, Ho J, Bamias G, Ivashkina N, Ley K, Oppermann M, et al. Antibody blockade of CCL25/CCR9 ameliorates early but not late chronic murine ileitis[J]. *Gastroenterology*, 2006, 131: 1518-1529.

[本文编辑] 李丹阳