

严重腹腔感染时小肠隐窝中 Tcf-4 表达的变化及意义

吴承堂 刘晋峰

【摘要】 目的 探讨大鼠严重腹腔感染时 T 细胞因子 4(Tcf-4)表达的变化规律及意义。**方法** 健康成年 Wistar 大鼠 40 只被随机分为对照组(仅行单纯剖腹手术)和腹腔感染[采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备严重腹腔感染模型]后 12、24 和 48 h 组,每组 10 只。应用免疫组化及逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测各组大鼠小肠隐窝 Tcf-4 阳性细胞及 Tcf-4 mRNA 表达的改变。**结果** 免疫组化结果表明,对照组大鼠肠黏膜隐窝底部细胞中 Tcf-4 仅有微弱表达,而 CLP 后 12 h 肠黏膜隐窝底部细胞中 Tcf-4 阳性细胞数明显增多,24 h 达峰值,至 48 h 仍显著高于对照组(P 均 <0.01)。RT-PCR 结果表明,与对照组(0.19 ± 0.01)比较,CLP 后 12 h Tcf-4 mRNA 明显上升(0.21 ± 0.01 , $P<0.01$),至 24 h 达峰值(0.28 ± 0.02 , $P<0.01$),随后逐渐下降,到 48 h(0.20 ± 0.01)仍显著高于对照组($P<0.05$)。**结论** 严重腹腔感染早期可诱导 Tcf-4 表达,提示 Tcf-4 可能与肠上皮干细胞的增殖分化密切相关。

【关键词】 腹腔感染; 干细胞; T 细胞因子 4

A study of expression of Tcf-4 in the small intestine mucosa crypt during severe abdominal infection WU Cheng-tang, LIU Jin-feng. Department of General Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

【Abstract】 Objective To explore the expression of T cell factor 4(Tcf-4) in the process of severe abdominal infection in rats. **Methods** Forty healthy adult Wistar rats were randomly divided into control group (celiotomy only) and groups of 12, 24, 48 hours after establishment of abdominal infection. The latter groups included rats receiving cecal ligation and puncture (CLP) to establish the severe abdominal infection. Each group consisted of 10 rats. Immunohistochemistry (IHC) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect the number of Tcf-4-positive cells and expression of Tcf-4 mRNA in the crypts of the mucosa of the small intestine. **Results** It showed that the expression of Tcf-4 in the mucosal crypts of the small intestine in control group was weak but the number of cells with positive Tcf-4 expression was increased in crypts of small intestinal mucosa 12 hours after CLP, reaching its peak level at 24 hours, and remained higher than control group at 48 hours (all $P<0.01$). The transcription level of Tcf-4 was associated with the stages of the severe abdominal infection. RT-PCR showed that Tcf-4 mRNA was upregulated rapidly 12 hours after CLP (0.21 ± 0.01 , $P<0.01$), and it reached peak level after 24 hours (0.28 ± 0.02 , $P<0.01$), decreased slowly but still obviously higher (0.20 ± 0.01 , $P<0.05$) than that of control group (0.19 ± 0.01). **Conclusion** The expression of Tcf-4 is induced by severe abdominal infection. The results suggest that Tcf-4 might be related with the proliferation and differentiation of intestinal stem cell during severe abdominal infection, and plays an important role in damage and repair of enteric mucosa.

【Key words】 abdominal infection; stem cell; T-cell factor 4

严重腹腔感染可引起肠黏膜损伤、肠通透性增加、肠道细菌/内毒素移位,导致全身性炎症反应^[1]。近年来研究发现,T 细胞因子/淋巴细胞强化因子(T cell factor/Lymphocyte potentiating factor, Tcf/Lef)家族成员 Tcf-4 在 Wnt 下游信号转导中起重要作用,并与肠上皮干细胞的增殖分化密切相关^[2]。本研究拟通过观察 Wistar 大鼠严重腹腔感染时肠上皮细胞 Tcf-4 表达的变化,探讨 Tcf-4 在

肠黏膜损伤修复中的意义及作用。

1 材料和方法

1.1 材料: Tcf-4 单克隆抗体(T5817)、3,3'-二氨基联苯胺(DBA)显色试剂盒(AR1022)、辣根酶标记的链霉卵白素、山羊血清均购自博士德生物工程有限公司;免疫组化玻片购于威佳科技有限公司;Tcf-4 引物序列由北京赛百盛公司合成;Tap DNA 聚合酶购于宝生物工程有限公司;TRIzol 总 RNA 提取试剂盒购于 Gibco 公司;逆转录试剂盒购于 Invitrogen 公司;其余试剂均为国产分析纯。实验用大鼠均购于南方医科大学(原第一军医大学)实验动物中心。

1.2 动物模型制备与分组: 健康成年 Wistar 大鼠

基金项目:广东省自然科学基金课题(032901)

作者单位:510515 广东广州,南方医科大学南方医院普外科

作者简介:吴承堂(1967-),男(汉族),广西壮族自治区人,硕士,硕士生导师,副教授,研究方向为肠源性感染(E-mail: wct66@163.com)。

40 只,体重(220±20)g。按随机数字表法分为对照组(仅行单纯剖腹手术)及盲肠结扎穿孔术(CLP)后 12、24 和 48 h 组 4 组,每组 10 只。采用 CLP 制备严重腹腔感染模型^[3],分别于 CLP 后 12、24 和 48 h 处死大鼠,取距回盲部 10 cm 处的回肠组织 4 cm 备检,其中 2 cm 放入体积分数为 10% 的中性甲醛溶液中固定 2 h,用于免疫组化检查和苏木素-伊红(HE)染色;另 2 cm 放入液氮罐中-70℃保存,待行逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检查。

1.3 免疫组化染色检测 Tcf-4 阳性细胞表达:切片常规脱蜡入水后,磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)冲洗 3 次,每次 5 min(下同)。每张切片加 50 μl 过氧化物阻断溶液,室温孵育 10 min,PBS 冲洗 3 次,微波修复抗原 30 min;加封闭用正常山羊血清工作液,室温孵育 10 min;加 50 μl Tcf-4 单克隆抗体(一抗),37℃孵育 60 min,PBS 冲洗 3 次;加 50 μl 生物素化二抗工作液,室温孵育 10 min,PBS 冲洗 3 次;加 50 μl 辣根酶标记链霉卵白素工作液,室温孵育 10 min,PBS 冲洗 3 次;加 100 μl DBA 溶液显色 10 min,苏木素淡染,中性树脂胶固封,普通光镜下观察。结果判断:细胞核着色判定为阳性细胞,在 10×40 倍视野下,按确定的方向(从左至右或逆时针方向)依次计数 10 个结构显示良好的隐窝(切面在隐窝中心,可见清晰、完整的隐窝腔)中 Tcf-4 染色阳性细胞数,总数即为每 10 个隐窝 Tcf-4 染色的细胞数,每组大鼠可得 10 个数值。

1.4 RT-PCR 测定 Tcf-4 mRNA 表达

1.4.1 总 RNA 抽提:称取-70℃冰冻保存的标本 80 mg,于液氮中夹碎,将组织碎块加入 1 ml TRIzol 变性缓冲液中,在匀浆器中充分研磨至细小组织块为止,并按照操作说明书提取组织中的总 RNA,-70℃保存备用。

1.4.2 基因片段扩增:利用 Primer5.0 软件设计 Tcf-4 引物,上游引物 5'-CAGTCTTCCTCCGA TGTCAC-3',下游引物 5'-CCCATGCTCCA TTGTGAGA-3',长度 467 bp。以 β-actin 为对照,上游引物 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3',下游引物 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAAC A-3',长度 597 bp。采用两步法进行 RT-PCR 检测,试剂盒购自 Invitrogen 公司,按说明书要求严格进行操作。反应条件为 94℃预处理 5 min,随后以 94℃裂解 15 s、58℃退火 25 s、72℃延伸 60 s,进行 35 个循环,72℃延伸 5 min 后,电泳 PCR 产物,观察结果。

1.4.3 PCR 产物定量分析:Tcf-4 和 β-actin 产物各 10 μl 混合后于质量分数为 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳 60 min(电压 5 V/cm),凝胶成像系统中分析各条带的灰度值,以 Tcf-4 和 β-actin 的比值表示 Tcf-4 mRNA 表达水平。

1.4.4 测序:用 PCR 产物纯化试剂盒纯化 PCR 产物,交由上海博亚生物技术公司进行测序。

1.5 统计学方法:采用 SPSS11.5 软件进行统计学处理,检测数值以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(方差齐性时采用组间多重比较,应用 LSD 法,方差不齐性时用 Dunnett's 法), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肠黏膜病理学改变:对照组光镜下小肠黏膜各层结构完整,肠绒毛排列整齐;感染组光镜下小肠黏膜和黏膜下层间质水肿、血管充血,黏膜层有中性粒细胞浸润,肠绒毛毛细血管充血,部分区域有黏膜上皮脱落,浆膜层明显炎性渗出。

2.2 免疫组化染色结果(表 1,彩色插页图 1):对照组小肠隐窝中 Tcf-4 表达较弱;CLP 后 12 h 小肠隐窝中阳性细胞明显增多;24 h 时表达最强,随着时间的延长,Tcf-4 表达逐渐降低;到 48 h 小肠隐窝仍有表达,各组总体均数比较差异具有显著性($F = 58.996, P < 0.01$)。

表 1 各组小肠隐窝中 Tcf-4 阳性细胞数及 Tcf-4 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the positive cell quantity of the Tcf-4 and expression of Tcf-4 mRNA in the small intestine mucosa crypt in each group($\bar{x} \pm s$)

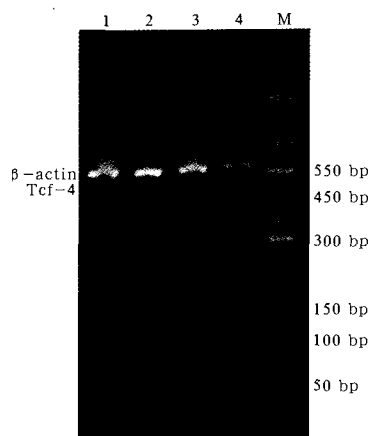
组别	动物数 (只)	Tcf-4 阳性 细胞数(个)	Tcf-4 mRNA
对照组	10	49.00±10.45	0.19±0.01
CLP 后 12 h 组	10	73.20±11.23**	0.21±0.01**
CLP 后 24 h 组	10	112.00±11.60**	0.28±0.02**
CLP 后 48 h 组	10	63.70±11.04**	0.20±0.01*
F 值		58.996	85.467
P 值		<0.01	<0.01

注:与对照组比较;* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2.3 RT-PCR 检测结果(表 1,图 2):CLP 后 12 h Tcf-4 mRNA 表达迅速上升,24 h 达峰值,随后表达量逐渐下降,48 h 仍显著高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组总体均数比较差异具有显著性($F = 85.467, P < 0.01$)。

2.4 测序结果:PCR 扩增的产物与大鼠 GengBank 中的序列完全一致。说明 RT-PCR 扩增的确实为

相应引物。



1~4 依次为 CLP 后 48、24 和 12 h 组,对照组;M:Marker

图 2 RT-PCR 法检测各组小肠隐窝中 Tcf-4 mRNA 表达

Figure 2 Expression of Tcf-4 mRNA in the small intestine mucosa crypt detected by RT-PCR in each group

3 讨论

Tcf-4 是通过“guessmer”PCR 在人的基因组 DNA 上发现的一种 Tcf/Lef 家族成员因子^[4],也是 Tcf 活化的必要辅助因子,在 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)途径的下游信号转导中起重要作用。在 Wnt 途径中, Wnt 信号缺如发育条件下, β -catenin 在细胞的泛素蛋白酶体途径中经过一系列破坏性混合物标记的丝氨酸磷酸化而降解,从而维持细胞浆内 β -catenin 处于较低水平,这些破坏性混合物包括致癌基因结肠腺瘤性息肉蛋白(APC)、axin (conductin homolog)、糖原合成激酶(GSK3 β)和酪蛋白激酶(CKI)^[5]。当 Wnt 配体与 Frizzled (Fz) 7-跨膜分子受体以及低密度脂蛋白受体关联蛋白家族 5/6(LRP5/6)结合后,激活了胞质内的磷蛋白 Disherelled (Dsh),从而引发了一个细胞内的级联信号,导致 Axin 降解或与破坏性混合物分离,同时

GSK3 β 也与破坏性混合物分离,阻断了 β -catenin 磷酸化、泛素化, β -catenin 分子在细胞浆内集聚,随后移入核内与 Tcf-4 结合,导致繁多的靶基因(c-myc 等)转录和表达,这在干细胞增殖中起了重要的作用^[2,6]。因此,Tcf-4 可在一定程度上反映肠上皮干细胞增殖状态,检测 Tcf-4 表达变化即可反映肠黏膜上皮损伤修复状况。

本实验结果显示,严重腹腔感染大鼠肠黏膜上皮损伤后 Tcf-4 表达增高,且损伤初期 Tcf-4 水平上升迅速,表明严重腹腔感染时可能迅速启动了 Wnt/ β -catenin 途径,使得 Tcf-4 靶基因 c-myc 等高度表达,导致肠上皮干细胞的增殖分化活性增强,从而促进肠黏膜损伤修复。但随着感染的进一步加重,其 Tcf-4 表达下降,说明肠上皮干细胞受损,其数量减少,增殖能力逐渐下降,提示 Tcf-4 表达与严重腹腔感染时肠黏膜损伤修复密切相关。当然,在短时间内增高的 Tcf-4 是否启动了其他信号途径的活性,并与之共同作用还有待进一步研究。

参考文献:

- 黎君友,孙丹,吕艺,等.脓毒症大鼠小肠功能变化的研究[J].中国危重病急救医学,2004,16(6):352-354.
- Barker N, Morin P J, Clevers H. The Yin-Yang of TCF/beta-catenin signaling[J]. Adv Cancer Res, 2000, 77:1-24.
- Wichterman K A, Baue A E, Chaudry I H. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal [J]. J Surg Res, 1980, 29(2):189-201.
- Castrop J, van Norren K, Clever H. A gene family of HMG-box transcription factors with homology to TCF-1 [J]. Nucleic Acids Res, 1992, 20(3):611.
- Liu C, Li Y, Semenov M, et al. Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism [J]. Cell, 2002, 108(6):837-847.
- Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling [J]. Cell, 2000, 103(2):311-320.

(收稿日期:2006-10-27 修回日期:2007-01-21)

(本文编辑:李银平)

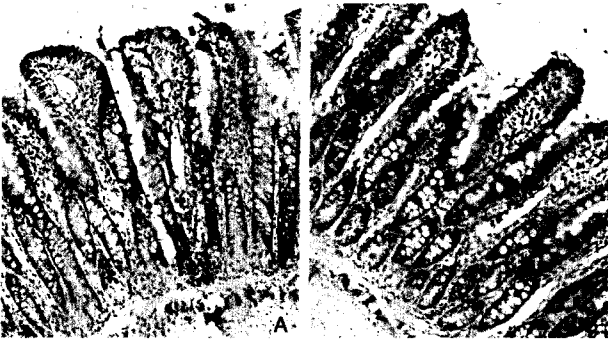
• 科研新闻速递 •

盐酸戊乙奎醚对脓毒症小鼠的保护作用及其机制

抗胆碱类药物对脓毒性休克有保护作用。盐酸戊乙奎醚(PHC)为临床常用抗胆碱药物,心血管不良反应较少。本实验研究了 PHC 对脓毒症小鼠的保护作用及其作用机制。研究人员将 40 只小鼠用盲肠结扎穿孔术制成脓毒症模型,随机分为 4 组:空白对照组、手术对照组、0.3 mg/kg PHC 组和 0.45 mg/kg PHC 组,每组 10 只。各组于术前 1 h 腹腔注射 PHC (PHC 治疗组)及生理盐水(空白及手术对照组)。术后 12 h 测量血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量以及肺、肝组织中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达。结果显示 0.45 mg/kg PHC 组的 TNF- α 、MDA、iNOS 均显著减少(P 均 <0.05),SOD 活性增加($P<0.01$)。研究者认为,0.45 mg/kg PHC 对脓毒症小鼠有保护作用,其机制可能为抑制炎症因子和 iNOS 的产生以及脂质过氧化反应。

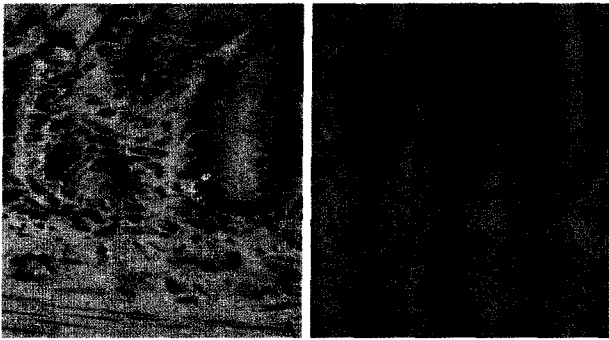
田易军,编译自《Shock》,2007-07-05(电子版);胡森,审校

急性坏死性胰腺炎时P物质在肠壁的表达
及与肠黏膜通透性之间的关系
(正文见452页)



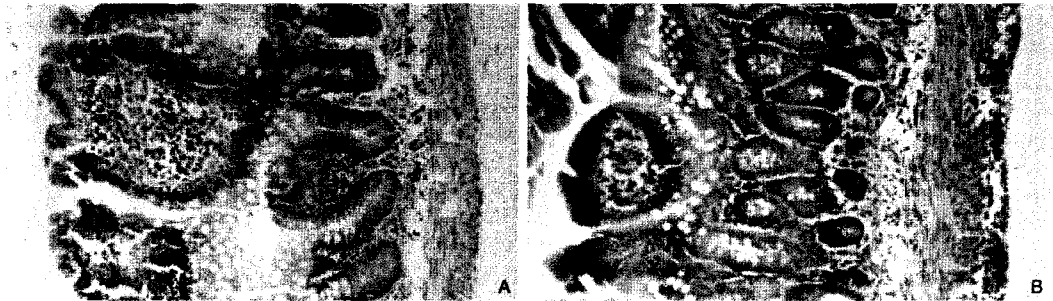
注：A：假手术组，B：ANP组
图5 两组肠壁组织中P物质的表达(免疫组化, ×100)
Figure 5 Expression of substance P in intestinal tissue in sham operation control group (A) and ANP model group(B) (immunohistochemistry, ×100)

严重腹腔感染时小肠隐窝中
Tcf-4表达的变化及意义
(正文见471页)



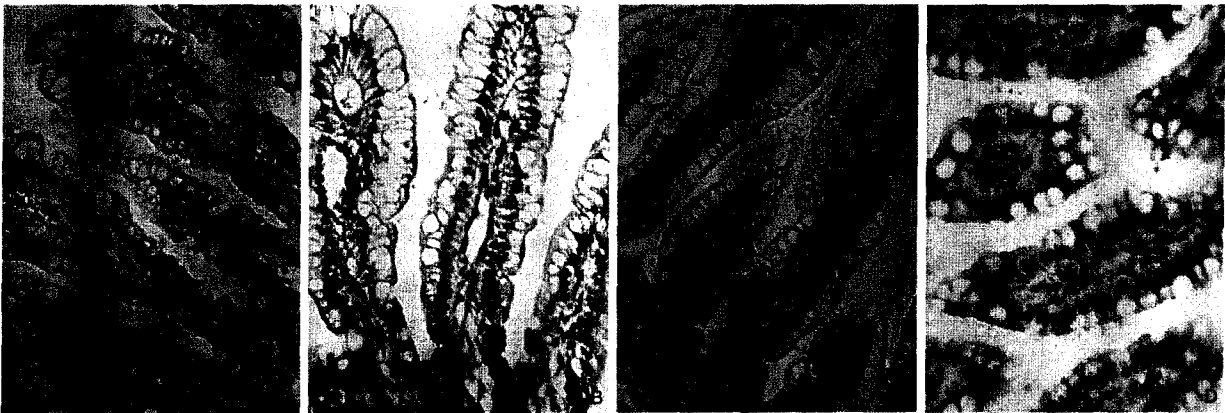
注：A：对照组，B：CLP后24 h组，箭头示小肠隐窝
图1 各组小肠隐窝中Tcf-4阳性表达(免疫组化, ×400)
Figure 1 Positive expression of Tcf-4 in the small intestine mucosa crypt of each group (immunohistochemistry, ×400)

L-精氨酸对严重腹腔感染大鼠肠黏膜上皮的保护作用
(正文见474页)



注：A：模型组，B：L-Arg组
图1 两组光镜下回肠黏膜病理学改变(HE, ×100)
Figure 1 Pathological change of the ileum mucosa of rats under optical microscope in two groups (HE, ×100)

血小板活化因子受体拮抗剂对内毒素血症幼年大鼠
肠黏膜上皮细胞间连接蛋白的影响
(正文见477页)



注：A：对照组，B：内毒素组，C：预防组，D：治疗组
图1 幼年大鼠LPS后6 h回肠 β -catenin蛋白表达(免疫组化, ×400)
Figure 1 Expression of β -catenin protein in ileum of young rats at 6 hours after LPS (immunohistochemistry, ×400)