

抵抗素样分子 β 在坏死性小肠结肠炎新生小鼠组织中的表达

陈超丽¹, 罗俊^{1*}, 徐芬¹, 晋贞超¹, 林鸿志² (1.暨南大学附属深圳市宝安区妇幼保健院新生儿科, 广东深圳 518102; 2.台湾中国医药大学儿科学院新生儿科, 台湾台中 404)

摘要:目的 探讨抵抗素样分子 β (RELM β)在坏死性小肠结肠炎(NEC)新生小鼠组织中的表达。方法 24只新生C57BL/6J小鼠随机分为2组, NEC组行人工喂养、缺氧、冷刺激、脂多糖灌胃(5 mg/kg)造模, 而对照组行母乳喂养。ELISA检测血液中RELM β 水平, Western blot检测小肠组织中RELM β 表达。结果 NEC组血液中RELM β 水平明显高于对照组($P<0.01$), 但小肠组织中RELM β 表达在两组间差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 NEC新生小鼠血液中RELM β 水平升高。

关键词: 坏死性小肠结肠炎; 新生小鼠; 抵抗素样分子 β

中图分类号: R 722.6

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2022)02-0141-03

Expression of resistin-like molecule β in newborn mice with necrotizing enterocolitis

CHEN Chao-li¹, LUO Jun^{1*}, XU Fen¹, JIN Zhen-chao¹, LIN Hong-zhi² (1.Department of Neonatology, Affiliated Bao'an District Maternal and Child Health Hospital, Jinan University, Shenzhen 518102, China; 2.Department of Neonatology, School of Pediatrics, China Medical University, Taichung 404, Taiwan)

Abstract: Objective To investigate the expression of resistin-like molecule β (RELM β) in newborn mice with necrotizing enterocolitis (NEC). Methods Twenty-four C57BL/6J newborn mice were randomized to two groups. NEC group were treated with artificially feeding, hypoxia, cold stimulation, and intragastric lipopolysaccharide (5 mg/kg), while control group with breast feeding. RELM β level in blood and small intestine was determined by ELISA and Western blot, respectively. Results Blood RELM β level was higher in NEC group than in control group ($P<0.01$), while RELM β expression in small intestine was comparable between two groups ($P>0.05$). Conclusion RELM β overexpression is present in blood of newborn mice with NEC.

Key words: necrotizing enterocolitis; newborn mice; resistin-like molecule β

坏死性小肠结肠炎(NEC)是新生儿期最严重的消化道炎症,进展快、死亡率高。目前研究认为NEC与喂养、炎症反应、肠道免疫、缺氧、缺血等相关^[1]。有研究报道,在发达地区如澳大利亚、加拿大及意大利小于28周的早产儿NEC的发病率高达7%~9%,病死率为23.5%^[2-3]。2020年我国一项多中心超低出生体质量儿研究调查显示,超低出生体质量儿NEC发病率为11.9%^[4],病死率为10%~50%^[5]。怎样更好预防NEC发生、降低其病死率及改善预后是目前面临的难题。抵抗素样分子 β (RELM β)是人体重要的肠道免疫和炎症因子。研究证实,在感染线虫的小马肠道

内杯状细胞大量分泌RELM β 参与黏膜局部免疫^[6];此外,RELM β 作为一种肠源性激素,其在肠道黏膜局部免疫中具有十分重要的意义,而且能够维持肠道上皮细胞屏障功能,保护黏膜屏障的完整性,诱导肠上皮细胞分化,故又称之为肠道特异性抵抗分子,为维持胃肠道功能屏障蛋白之一^[7],故我们推测RELM β 可能参与NEC的炎症反应。本研究通过对小鼠NEC血液及肠道组织中RELM β 表达水平的检测,探讨RELM β 在小鼠NEC血液和肠黏膜组织中的变化及其意义,为下一步研究NEC的可能机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 从广东省实验动物中心购入8周龄C57BL/6J小鼠24只[动物批号:SCXK(粤)2004-0011,雌性:雄性=1:2],于动物房适应性养1周后按雌性:雄性=1:2交配合笼,1周后雌雄分笼,待雌鼠分

收稿日期: 2021-11-15

基金项目: 深圳市科创委自由申请项目(JCYJ20180302153753968)

作者简介: 陈超丽(1993—),女,硕士,住院医师, E-mail:

963174575@qq.com

通信作者: 罗俊(1978—),男,博士,副主任医师, E-mail:

luojun-78@163.com

娩乳鼠后,将7日龄的乳鼠纳入实验。

1.1.2 试剂 RELM β 的 ELISA 试剂盒和兔抗大鼠 RELM β 多克隆抗体(产品编号 ELI05827)购于美国 R&D 生物公司,伊红染料、中性树胶购于索莱宝公司,苏木素染料购于 Servicebio 公司,二甲苯、无水乙醇购于国药集团化学试剂有限公司,LPS 购买于 Sigma 公司,早产奶粉购于雀巢公司,GAPDH 购自 Proteintech 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购于 Thermo 公司。

1.1.3 实验仪器显微镜购自明美,包埋机、脱水机、冷却台、切片机购于 Leica 公司,高低氧动物箱及冰箱分别购于南京普禾生物有限公司和澳柯玛公司。

1.2 实验方法

1.2.1 NEC 模型制备及标本采集 C57BL/6J 新生小鼠 24 只,随机分为对照组和 NEC 组,每组 12 只。对照组与代母鼠同笼每日人工喂养,不给予特殊处理,每日观察小鼠活动和体质量变化。NEC 组采用人工喂养+缺氧冷刺激+脂多糖(LPS)腹腔注射进行 NEC 造模^[8],具体过程如下:在每日人工喂养基础上,将小鼠置于缺氧箱中,调节氮气流量为 15 L/min 往缺氧箱内通气,当测氧仪下降至 0 时开始计时,90 s 后结束氮气通风并打开缺氧箱,随后将新生小鼠置于 4℃ 冰箱冷藏室中,持续 10 min。每天处理 3 次,连续处理 3 d,两次处理至少间隔 3 h,每日单次 LPS 腹腔注射(5 mg/kg)。经过 3 d 建模成功后心脏取血或者眼眶取血,之后打开腹腔取材十二指肠下端至直肠上端的肠道组织,拍照。将肠道组织分成 2 份,一份置于多聚甲醛中固定,一份液氮速冻后置于 -80℃ 保存。

1.2.2 小鼠肠道病理损伤检测 分离两组小鼠的肠道,10% 甲醛固定后制成切片,H&E 染色,盲法对其炎症反应和管腔扩张程度进行评分,组织学 NEC 评分确定疾病的严重程度如下:0 分,肠黏膜绒毛正常;1 分,黏膜下层或固有层有轻度分离;2 分,黏膜下层或固有层中度分离或黏膜下层和肌层有水肿;3 分,黏膜下层或固有层重度分离,黏膜下层和肌层严重水肿,该区的绒毛崩解分离;4 分,绒毛的缺失坏死。肠组织学评分 >2 分被定义为 NEC。

1.2.3 ELISA 法检测血液中 RELM β 水平取两组小鼠血液样品,按 ELISA 试剂盒操作说明书检测两组血液中 RELM β 表达水平。

1.2.4 Western blot 法检测肠道组织 RELM β 水平取组织剪碎后,加 RIPA 裂解液,用组织匀浆器研磨(加蛋白酶抑制剂 1:100+PMSF 1:100)冰上裂解 30 min。4℃ 离心机 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液至干净离心管。BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测总蛋白量,

整上样蛋白量,把蛋白浓度调到统一浓度,100℃ 水浴变性 5 min,冷却后上样;80V 跑胶 25 min,160V 跑胶 60 min;200 mA 电转 2 h;5% 脱脂牛奶 TBST 封闭 2 h;一抗:按照抗体说明书稀释抗体,4℃ 孵育过夜;TBST 洗涤 5 次,5 min/次;二抗:按照兔 1:10 000、鼠 1:5 000 稀释抗体,室温 2 h,TBST 洗涤 5 次,5 min/次;显色:按 1:1 配制发光液,覆盖在膜表面,显色 2 min 后曝光;图像采集分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理和统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肠组织表现及病理结果

NEC 组病理结果显示绒毛不完整、出血、有炎症细胞浸润、黏膜下与肌肉层有不同程度的分离。肠组织学评分 >2 分,说明造模成功,符合实验要求。对照组空肠、回肠淡黄色,弹性好;NEC 组局部肠管扩张、积气,失去光泽,颜色为暗紫色或黑色,弹性差,见图 1。对照组为正常肠组织切片,腺体、绒毛结构完整;NEC 组绒毛结构崩解分离,见图 2。

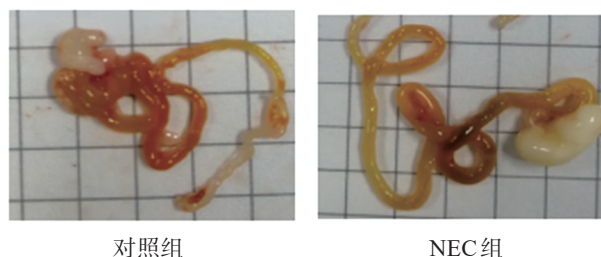


图1 两组肠组织对照结果

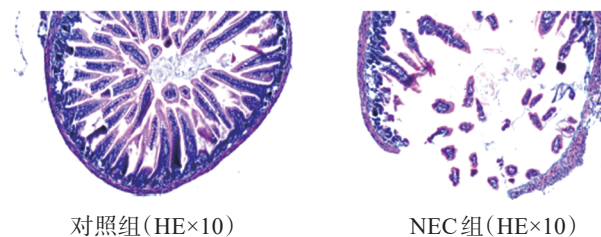


图2 两组病理切片 HE 染色结果

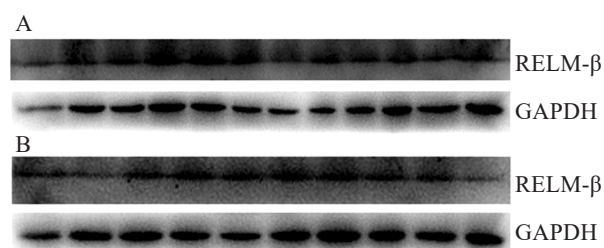
2.2 两组小鼠血液中 RELM β 表达水平的比较

NEC 组血液中 RELM β 表达水平明显升高,与对照组比较差异有统计学意义[(268.08±175.55) ng/L vs (35.83±28.58) ng/L, $P < 0.01$]。

2.3 两组小鼠小肠组织中 RELM β 蛋白表达水平比较

NEC 组与对照组肠组织中 RELM β 表达水平分

别为 0.89 ± 0.15 和 0.81 ± 0.11 ,两组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图3。



A为NEC组, B为对照组

图3 Western blot法检测两组肠组织RELM β 蛋白的表达水平

3 讨论

NEC是多种因素导致的肠道炎症性疾病,多见于早产儿,病死率高,预后差,具体发病机制目前尚不明确。本研究在前期研究的基础上^[9],进一步探讨了RELM β 在NEC的表达和意义,为下一步研究NEC的可能机制奠定基础。

RELM β 属于RELMs家族成员之一,在动物和人都具有特异性表达,最早发现于小鼠结肠上皮细胞,是参与消化道黏膜炎症反应的重要炎症因子^[8,11]。Bhinder等^[10]研究发现感染鼠伤寒沙门氏菌野生型大鼠盲肠组织中RELM β 水平明显升高,说明在体外LPS可诱导Goblet细胞类似的LS174T细胞RELM β mRNA表达增高。McVay等^[11]研究发现,RELM β 基因敲除大鼠由葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导发生肠炎的概率明显低于野生型大鼠,提示RELM β 可能是肠道重要的免疫和炎症因子。本研究中,NEC小鼠血液中RELM β 水平明显高于正常小鼠,这与He等^[7]研究结果一致,说明RELM β 是一种参与NEC炎症反应过程的重要炎症介质。

此外,多项研究表明RELM β 在调控炎症反应过程中起到非常重要的作用。McVay等^[11]应用重组RELM β 刺激外周血分离的巨噬细胞,发现其可以诱导TNF- α 表达;而Hayes等^[12]研究发现,TNF- α 在体外培养可以刺激Goblet细胞类似的LS174T细胞分泌RELM β 增多,如果加入IL-13则更加明显^[13],考虑此正反馈作用可能是导致NEC炎症因子风暴的重要机制,而RELM β 为调控其中炎症反应的重要一环。本研究通过人工喂养、缺氧、冷刺激和LPS灌胃等多因素成功构建NEC模型,通过Western blot检测到NEC组肠组织中RELM β 蛋白稍高于对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。这与我们最初设想的不同,考虑

可能原因是样本量偏小,后续实验可加大样本量进一步明确。

参考文献:

- [1] NEU J, WALKER W A. Necrotizing enterocolitis[J]. N Engl J Med, 2011, 364(3):255-264.
- [2] BATTERSBY C, SANTHALINGAM T, COSTELOE K, et al. Incidence of neonatal necrotizing enterocolitis in high-income countries: a systematic review[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2018, 103(2):F182-F189.
- [3] JONES I C H, HALL N J. Contemporary outcomes for infants with necrotizing enterocolitis-a systematic review[J]. J Pediatr, 2020, 220:86-92.
- [4] 蔡岳鞠, 瞿柳红, 李薇, 等. 新生儿坏死性小肠结肠炎临床特点及预后不良危险因素多中心研究[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019, 34(1):24-29.
- [5] 超未成熟儿与超低出生体重儿研究协作组. 超未成熟儿与超低出生体重儿产前糖皮质激素使用情况及其对预后影响的多中心调查[J]. 中华围产医学杂志, 2020, 23(5):302-310.
- [6] STEUER A E, STEWART J C, BARKER V D, et al. Cytokine and goblet cell gene expression in equine cyathostomin infection and larvicidal anthelmintic therapy[J]. Parasite Immunol, 2020, 42(6):e12709.
- [7] HE W, WANG M L, JIANG H Q, et al. Bacterial colonization leads to the colonic secretion of RELM β /FIZZ2, a novel goblet cell-specific protein[J]. Gastroenterology, 2003, 125(5):1388-1397.
- [8] JUNG K, KIM J H, CHEONG H S, et al. Gene expression profile of necrotizing enterocolitis model in neonatal mice[J]. Int J Surg, 2015, 23(Pt A):28-34.
- [9] LUO J, LI H P, XU F, et al. Early diagnosis of necrotizing enterocolitis by plasma RELM β and thrombocytopenia in preterm infants: A pilot study[J]. Pediatr Neonatol, 2019, 60(4):447-452.
- [10] BHINDER G, STAHL M, SHAM H P, et al. Intestinal epithelium-specific MyD88 signaling impacts host susceptibility to infectious colitis by promoting protective goblet cell and antimicrobial responses[J]. Infect Immun, 2014, 82(9):3753-3763.
- [11] MCVAY L D, KEILBAUGH S A, WONG T M, et al. Absence of bacterially induced RELM β reduces injury in the dextran sodium sulfate model of colitis[J]. J Clin Invest, 2006, 116(11):2914-2923.
- [12] HAYES K S, BANCROFT A J, GRENCIS R K. The role of TNF- α in *Trichuris muris* infection II: global enhancement of ongoing Th1 or Th2 responses[J]. Parasite Immunol, 2007, 29(11):583-594.