



IL-6/STAT3 信号通路与溃疡性结肠炎肠道屏障功能障碍相关性的研究

崔友 何安琪 李凯钰 高森阳 张迎迎 刘刚* (天津医科大学总医院 300000)

摘要:目的 探索 UC 患者肠道屏障相关蛋白的表达变化,研究 IL-6/STAT3 信号通路与肠道屏障功能障碍的相关性。方法 收集 200 例 UC 患者肠道黏膜组织,依据 Mayo 评分标准分为轻度(62 例)、中度(70 例)、重度(68 例)。收集 50 例健康人群肠道黏膜组织作为对照组。通过免疫组化检测 Occludin、Claudin-1、 β -防御素、sIgA、STAT3 的表达,通过 PCR 检测 IL-6 mRNA 的表达,并分析 IL-6、STAT3 与肠道屏障相关蛋白的相关性。**结果** 与对照组相比, Occludin、Claudin-1、sIgA 的表达在 UC 患者中明显降低($P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.001$),且 Occludin、Claudin-1 与疾病严重程度呈负相关($RS = -0.563$, $P < 0.001$; $RS = -0.779$, $P < 0.001$); β -防御素的表达明显增高($P < 0.01$),并与疾病严重程度呈正相关($RS = 0.698$, $P < 0.001$); IL-6 和 STAT3 表达明显升高,且与 Occludin、Claudin-1、sIgA 的表达呈负相关,与 β -防御素表达呈正相关。**结论** IL-6/STAT3 信号通路可能通过调节多种肠道屏障相关蛋白的表达,引起肠道屏障功能障碍,从而诱导并加重 UC。

关键词: 白细胞介素-6 信号转导与转录活化因子 3 结肠炎 溃疡性 肠屏障

中图分类号: R574.62 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-5187(2017)04-005-04

Correlation Between IL-6/STAT3 Signal Pathway and Intestinal Barrier in Ulcerative Colitis

Abstract: Aim To detect the expression levels of intestinal barrier related proteins in UC patients, and to explore the relationship between IL-6/STAT3 and intestinal barrier dysfunction. Methods We collected 200 Biopsies from UC patients and divided them into mild (62 cases), moderate (70 cases) and severe (68 cases) groups according to Mayo scores. Specimens from normal persons without colonic abnormalities were served as control group. The expressions of Occludin, Claudin-1, β -defensin, sIgA and STAT3 proteins were determined by immunohistochemistry and the expression of IL-6 mRNA was determined by RT-PCR. Results Compared with the control group, the expression levels of Occludin, Claudin-1 and sIgA decrease significantly in UC groups ($P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.001$), meanwhile Occludin and Claudin-1 are negatively correlated with the severity of the disease ($RS = -0.563$, $P < 0.001$; $RS = -0.779$, $P < 0.001$). The expression of β -defensin increases significantly ($P < 0.01$) and is positively related with the severity of the disease ($RS = 0.698$, $P < 0.001$). IL-6 and STAT3 increase significantly in the UC groups. What's more, they are negatively correlated with the expression of Occludin, Claudin-1 and sIgA, and are positively correlated with β -defensin expression. Conclusions IL-6/STAT3 signaling pathway can regulate the expression of a variety of intestinal barrier associated proteins, cause intestinal barrier dysfunction, and thereby induce and aggravate UC.

Key words: Interleukin-6 STAT3 Transcription Factor Colitis Ulcerative Intestinal barrier

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 以黏膜免疫反应紊乱和肠道屏障功能受损为特征^[1]。多项研究结果表明^[2] IL-6 与细胞上特异受体结合后通过 JAK / STAT3 信号转导途径活化 STAT3, 活化的 STAT3 能引起结肠炎症的持续存在, 从而加重 UC。然而, IL-6/STAT3 信号通路与肠道黏膜屏障的关系尚未明确。本研究通过选取不同程度 UC 患者肠道黏膜组织, 检测肠屏障相关蛋白、IL-6 及 STAT3 的表达水平, 并对其相关性进行分析, 以期探索 IL-6/STAT3 信号通路与肠道屏障功能障碍的内在联系及其在 UC 发生发展中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集自 2008-2014 年因具有 UC 症状于天津医科大学总医院内镜中心行内镜检查且临床、内镜和组织病理学诊断为 UC 的患者肠道黏膜标本 200 例 [诊断标准参照“炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012)”]^[3], 其中女性 93 例, 男性 107 例, 年龄 15~82 岁, 平均年龄 42 岁。根据 Mayo 评分系统, 将 UC 患者分为三组: 轻度(62 例)、中度(70 例)、重度(68 例)^[4]。患者基本特征和组织学情况见表 1。收集同年份便潜血阳性但内镜、组织病理学诊断结果正常的受检者肠道黏膜标本为对照组, 其中女性 24 例, 男性 26 例, 年龄 33~75 岁, 平均年龄 40 岁。所有患者均签署知情同意书, 并经天津医科大学总医院伦理委员会批准。

1.2 试剂与方法

1.2.1 相关试剂: 本实验所用兔抗人 Occludin 多克隆抗体由英国 Abcam 公司生产; 兔抗人 Claudin-1、STAT3、 β -防御素多克隆抗体, BSA 封闭液, 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 试剂盒和 SABC 的羊抗兔 / 羊抗小鼠二抗试剂盒均由中国武汉博士德生物工程有限公司生产。

1.2.2 免疫组化法: 首先将两组肠黏膜标本用 4% 甲醛溶液固定,

脱水制成蜡块, 将组织蜡块以 4 μ m 连续切片, 脱蜡、水化、热修复抗原后, 浸泡在 3% 的过氧化氢溶液中, 依次加入一抗、链霉素和素酶、人生物素化二抗, 室温孵育, 经 DAB 显影、苏木精复染、酸性乙醇分化、脱水、氨溶液漂白后在显微镜下镜检并拍照。显微镜下观察到细胞质或细胞核中染成棕色或暗褐色的细胞为阳性细胞; 背景中无差别染色的细胞为阴性细胞。每个切片均由病理科医师在 400 倍视野下随机选取 5 个细胞密集区, 计数阳性细胞个数, 得出阳性细胞百分率, 最终以平均百分数字得出每张切片的结果。

1.2.3 RT-PCR 分析: 组织样本被置于 RNA 缓冲液中。应用保护试剂盒 (Qiagen 公司; 上海、中国) 提取总 RNA, 将其置于 25mL 含引物酶与 1 μ g cDNA 的反应混合物中进行 PCR。通过热循环实验进行扩增, 循环条件: 95 $^{\circ}$ C 30s, 1 个循环; 40 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 95 个循环。通过融解曲线来确保引物二聚体和其他非特异性扩增最小化, 用 $\Delta\Delta$ CT 法分析目标基因的相对表达量。

1.3 统计分析

采用 SPSS 19 软件统计实验数据, 所有计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用独立样本 t 检验, 等级资料进行了相关分析和 Kruskal Wallis 检验, 且 P 值 ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肠道机械屏障、化学屏障及免疫屏障相关蛋白在各组中的表达 分别通过检测 Occludin、Claudin-1、 β -防御素、sIgA 的表达, 来观察 UC 患者肠道机械屏障、化学屏障及免疫屏障功能。免疫组化分析表明, Occludin (图 A1-A4)、Claudin-1 (图 B1-B4) 主要在肠道黏膜正常上皮细胞和腺体细胞中表达, 与对照组相比, 二者在 UC 患者肠黏膜细胞中表达减少, 重度 UC 患者尤为明显 ($P < 0.05$; $P < 0.01$) (详见图 2 和图 3), 且与疾病严重程度呈负相关 ($RS = -0.563$, $P < 0.001$; $RS = -0.779$, $P < 0.001$)。 β -防御素 (图 C1-C4) 主要在肠上皮细胞中表达^[5], 与对照组相比, 在 UC 患者肠粘

* 通讯作者: 刘刚



道膜细胞中表达显著增加, 重度 UC 患者尤为明显 ($P < 0.05$) (图 2 和图 3), 且与疾病严重程度呈正相关 ($RS = 0.698, P < 0.001$)。sIgA (图 D1-D4) 在肠道免疫系统中起重要作用。与对照组相比, 在 UC 患者肠粘膜细胞中表达显著减少 ($P < 0.001$) (图 2)。同时, 本次研究结果表明, 不同严重程度的 UC 组中 sIgA 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 IL-6、STAT3 在各组中的表达。

RT-PCR 分析结果显示 IL-6 在 UC 患者肠道组织中表达明显增多 ($P < 0.01$) (图 4A), 而且其表达水平随着 UC 严重程度而增加 ($RS = 0.584, P < 0.001$)。免疫组化分析表明 STAT3 蛋白主要表达在 UC 患者结肠黏膜固有层的浆细胞中 (图 E1-E4), 而在对照组标本中不表达。与轻度 UC 和对照组相比, STAT3 蛋白在中、重度 UC 患者肠粘膜中的表达水平显著增高 ($P < 0.01$) (图 4A), 且其表达水平随 UC 严重程度而增加 ($RS = 0.781, P < 0.001$)。且相关分析显示: UC 患者结肠粘膜中 STAT3 的表达水平与 IL-6 的表达呈正相关 ($RS = 0.747, P < 0.001$)。

2.3 IL-6/STAT3 表达与肠道屏障相关蛋白存在相关性。

在 UC 患者结肠粘膜中 IL-6 与 Occludin、Claudin-1 的表达水平呈负相关 ($RS = -0.711, P < 0.001; RS = -0.727, P < 0.001$), 与 β -防御素的表达呈正相关 ($RS = 0.678, P < 0.001$); 而 STAT3 与 Occludin、Claudin-1、sIgA 的表达水平呈负相关 ($RS = -0.594, P < 0.001; RS = -0.606, P < 0.001; RS = -0.217, P < 0.001$), 与 β -防御素呈正相关 ($RS = 0.558, P < 0.001$)。

表 1: 患者基本特征和组织学情况

临床病理特征	对照组 (n=50)	Mayo 分级		
		轻度 (n=62)	中度 (n=70)	重度 (n=68)
性别 (n)				
男	26	30	39	38
女	24	32	31	30
年龄 1, yr	40.6±12.5	41.5±12.4	42.8±17.3	43.2±17.1
病变范围 (n)				
广泛结肠		15	19	27
左半结肠		23	25	20
直肠		24	26	21

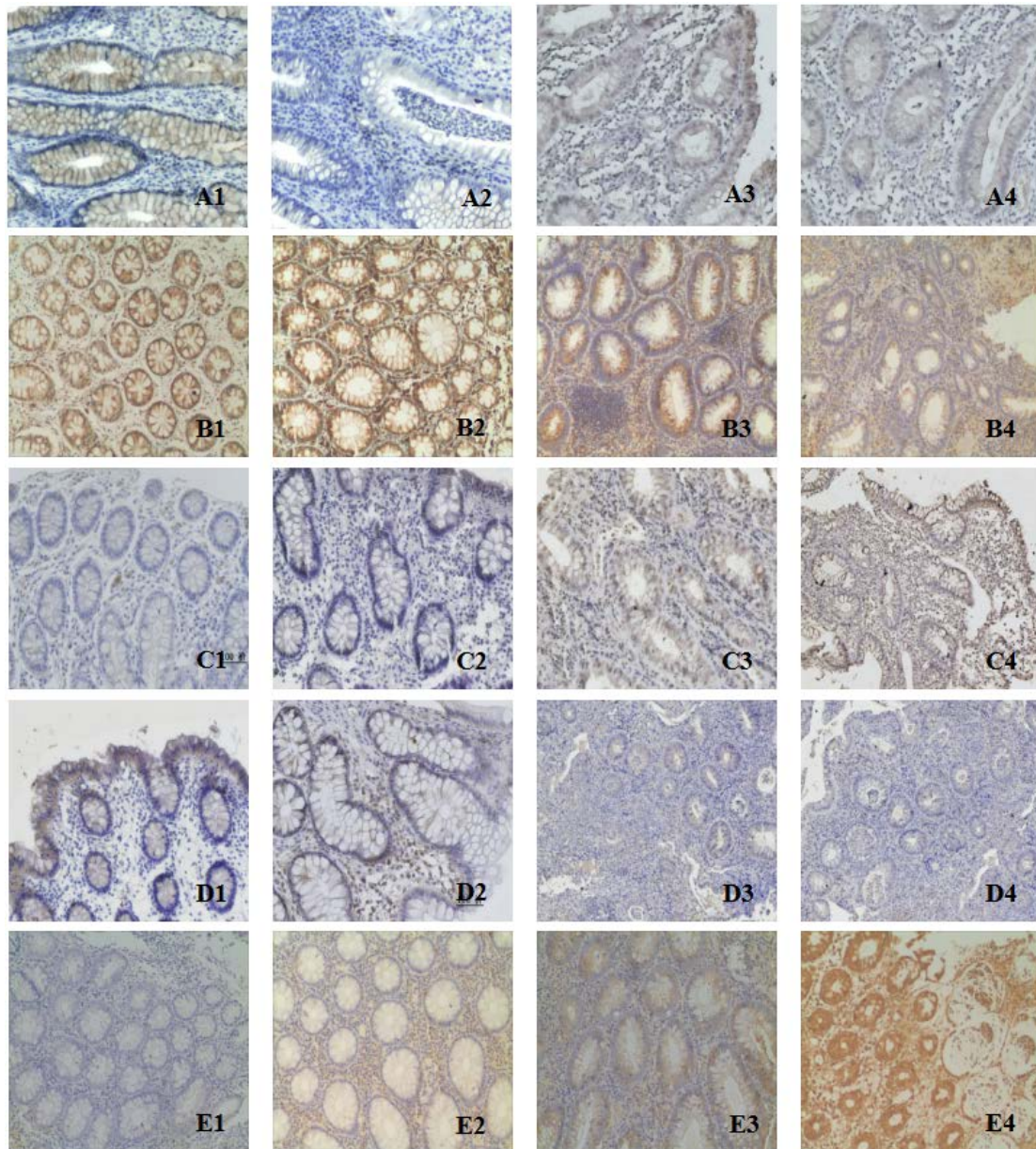


图 1: 对照组和不同程度 UC 组肠道黏膜 Occludin、Claudin-1、 β -防御素、sIgA 及 STAT3 的表达 (免疫组化法 $\times 200$)。A1-A4: Occludin 在对照组和不同程度 UC 组中的表达; B1-B4: Claudin-1 在对照组和不同程度 UC 组中的表达; C1-C4: β -防御素在对照组和不同程度 UC 组中的表达; D1-D4: sIgA 在对照组和不同程度 UC 组中的表达; E1-E4: STAT3 在对照组和不同程度 UC 组中的表达。

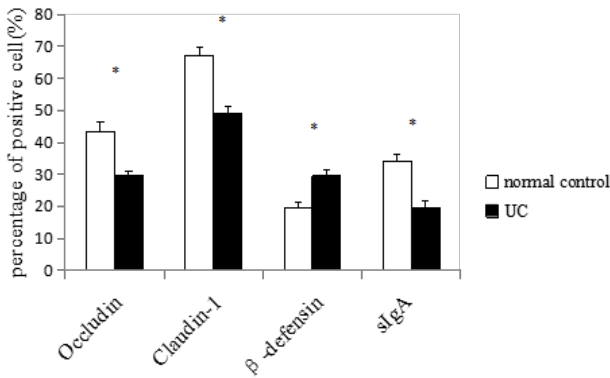


图2: Occludin, Claudin-1, β -防御素和 sIgA 在UC组与对照组中的表达. (* $P < 0.001$)

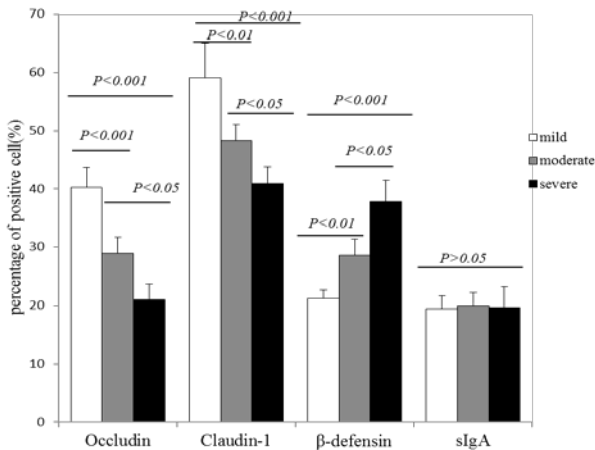
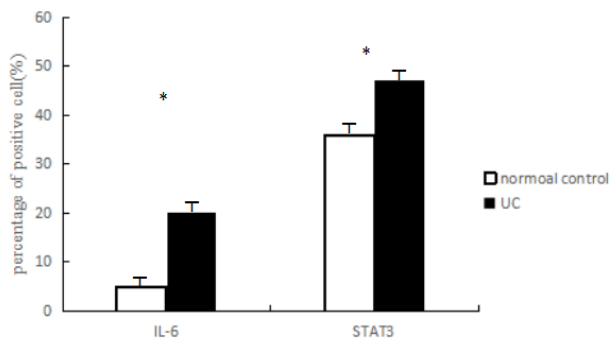
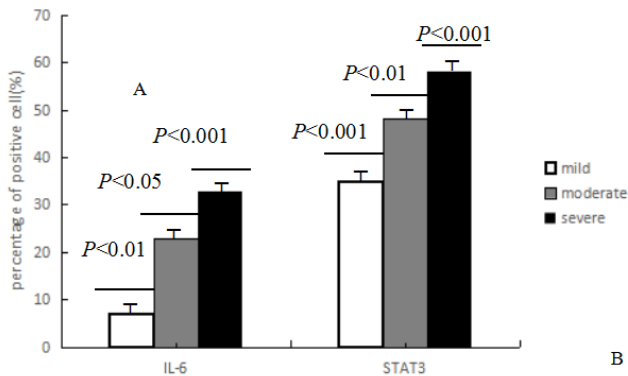


图3: Occludin, Claudin-1, β -defensin 和 sIgA 在轻、中、重度UC组中的表达。



A



B

图4: IL-6与STAT3在UC组与对照组中的表达。(A) IL-6、STAT3在UC组与对照组中的表达, (B) IL-6、STAT3在轻、中、重度UC组中的表达. (* $P < 0.001$)

3 讨论

UC是一种主要累及肠道黏膜及黏膜下层的炎症性疾病,其发病机制较为复杂。肠道屏障功能障碍可导致结肠黏膜通透性增加及菌群移位,在遗传、环境、免疫等多因素的催化下最终导致UC的发生及病程进展。研究表明^[6],多种肠道屏障相关蛋白可从物理特性、化学防御、免疫调节等方面共同维护肠道屏障正常功能。本研究通过检测肠道屏障相关蛋白及IL-6、STAT3在结肠黏膜的表达水平,探索UC患者中IL-6/STAT3信号通路与肠道屏障功能障碍的内在联系。

紧密连接(tight junction, TJ)蛋白构成肠道机械屏障的重要组成部分,主要包括Occludin、Claudin-1。本研究中,UC患者肠道黏膜Occludin、Claudin-1的表达减低,可降低跨膜电阻^[7],导致上皮细胞极性破坏、变异和过早凋亡,进一步损害肠道机械屏障、增加肠黏膜通透性,造成微生物和毒素进入宿主组织,加剧肠道炎症反应^[8]。随着UC炎症程度的加重, Occludin、Claudin-1等蛋白表达降低更为明显,提示肠道机械屏障相关蛋白减少可破坏UC患者肠道稳态,并加速疾病进程。

防御素是肠道化学屏障的重要组成部分,是一组具有广谱抗微生物活性的多肽,主要包括 α -防御素和 β -防御素,而后者与UC关系更为密切^[9-10]。研究表明,UC患者机械屏障受损,细菌侵入宿主细胞,促炎因子增多,诱导 β -防御素表达^[11],而 β -防御素的过表达进一步增加肠道炎症反应,从而加重UC^[12]。在此基础上,本研究进一步探讨了 β -防御素表达水平与UC患者疾病严重程度的相关性,并得出满意结果。因此,我们认为结肠黏膜浆细胞中 β -防御素的表达水平可能成为评估UC疾病严重程度的指标。

肠道免疫屏障以sIgA介导的体液免疫为主,它是一种能够维持肠道内细菌区域化并限制细菌侵入宿主细胞的免疫球蛋白^[13-14]。sIgA的分泌受多种细胞因子的调节, Liu等^[15]的研究表明TGF- β 和IL-6能共同调节Th0细胞向Th17细胞分化,从而调节肠道表达pIgR和IL-21,诱导sIgA分泌,有助于维持肠道稳态。与对照组相比,UC患者sIgA表达明显下调,表明其肠道免疫屏障受损。但sIgA在不同疾病炎症程度的UC中表达无统计学差异,因此我们认为sIgA只参与疾病的启动阶段,而对疾病进展无明显影响。

IL-6是重要的促炎因子^[16],在DSS诱导的大鼠模型中,IL-6高度表达的结肠黏膜组织中可检测到更多的髓系细胞(巨噬细胞和中性粒细胞)^[17],提示IL-6有白细胞趋化作用,能引起炎症细胞聚集。IL-6识别sIL-6R并形成复合物,通过活化细胞表面的gp130激活JAK,使STAT3蛋白进行酪氨酸残基磷酸化,从而形成IL-6/STAT3信号通路^[18]。活化的IL-6/STAT3信号通路上调细胞间粘附因子表达并在肠道黏膜固有层诱导T细胞凋亡^[19],介导慢性炎症的发生,与UC密切相关^[20]。

与对照组相比,活动性UC患者的IL-6与STAT3在结肠黏膜细胞的表达水平明显升高,且与UC疾病严重程度呈正相关,这与既往研究结果一致^[21]。在此基础上,本研究对IL-6、STAT3与肠道屏障相关蛋白的联系进行数据分析,并得出IL-6、STAT3均分别与Occludin、Claudin-1的表达水平呈显著负相关、与 β -防御素表达呈正相关,且STAT3与sIgA呈负相关的结论。这可能与活化的IL-6/STAT3信号通路能够刺激炎症细胞过度表达,引起促炎症细胞因子增加有关,一方面破坏肠上皮的完整性,使Occludin、Claudin-1表达减少;另一方面增强急性炎症细胞趋化反应,使 β -防御素表达增加;还可以调控粘膜免疫系统,使sIgA表达减少,最终导致结肠功能受损。因此我们认为IL-6/STAT3信号通路可通过影响肠道屏障相关蛋白的表达,从机械、化学及免疫等多方面破坏肠道稳态,引起肠道炎症反应,从而诱导并加重UC。但是本研究并未得出IL-6与sIgA的表达水平呈明确相关性的结论,可能是由于IL-6/STAT3信号通路的中间环节参与sIgA的调控而与IL-6本身无关,但是也不能除外样本数量不足或检测技术不完备而导致未能发现其内在联系的可能。另外,本研究结果尚需多中心大样本研究进一步证实并对其更深层次的内在机制进行探索。

综上所述,肠屏障功能障碍与UC的发生发展密切相关,肠屏



障相关蛋白的表达障碍可能是UC患者病情恶化的重要机制。IL-6/STAT3信号通路的表达抑制可能是肠屏障相关蛋白表达降低的重要原因之一。据此,本研究认为IL-6/STAT3信号通路可能通过破坏肠屏障功能诱导并加重UC,针对IL-6/STAT3信号通路及肠屏障功能的治疗可缓解UC疾病进程,成为UC治疗的重要靶点之一。

参考文献

[1] Wildenberg ME, van den Brink GR. FXR activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in IBD [J]. GUT 2011,60(4): 432-433.

[2] Yang X, Zhang F, Wang Y, et al. Oroxylin A inhibits colitis-associated carcinogenesis through modulating the IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. INFLAMM BOWEL DIS 2013,19(9): 1990-2000.

[3] 中华医学会消化病学分会炎症性肠病学组. 炎症性肠病诊断与治疗的共识意见(2012年,广州)[J]. 中华消化杂志, 2012, 32(12): 796-813.

[4] D' Haens G, Sandborn WJ, Feagan BG, et al. A review of activity indices and efficacy end points for clinical trials of medical therapy in adults with ulcerative colitis [J]. GASTROENTEROLOGY 2007,132(2): 763-786.

[5] Wehkamp J, Koslowski M, Wang G, et al. Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease [J]. MUCOSAL IMMUNOL 2008, 1(1): 67-74.

[6] Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, et al. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease [J]. World J Gastroenterol 2014,20(5): 1165-1179.

[7] Das P, Goswami P, Das TK, et al. Comparative tight junction protein expressions in colonic Crohn's disease, ulcerative colitis, and tuberculosis: a new perspective [J]. VIRCHOWS ARCH 2012,460(3): 261-270.

[8] Poritz LS, Harris LR, Kelly AA, et al. Increase in the tight junction protein claudin-1 in intestinal inflammation [J]. Dig Dis Sci 2011,56(10): 2802-2809.

[9] Wehkamp J, Schmid M, Stange EF. Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease [J]. Curr Opin Gastroenterol 2007,23(4): 370-378.

[10] Ramasundara M, Leach ST, Lemberg DA, et al. Defensins and inflammation: the role of defensins in inflammatory bowel disease [J]. J Gastroenterol Hepatol 2009,24(2): 202-208.

[11] Rahman A, Fahlgren A, Sitohy B, et al. Beta-defensin production by human colonic plasma cells: a new look at plasma cells in ulcerative colitis [J]. INFLAMM BOWEL DIS 2007,13(7): 847-855.

[12] Rahman A, Fahlgren A, Sundstedt C, et al. Chronic colitis induces expression of beta-defensins in murine intestinal epithelial cells [J]. CLIN EXP IMMUNOL 2011,163(1): 123-130.

[13] Asano M, Komiyama K. Polymeric immunoglobulin receptor [J]. J Oral Sci 2011,53(2): 147-156.

[14] Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria [J]. SCIENCE 2004,303(5664): 1662-1665.

[15] Liu HP, Cao AT, Feng T, et al. TGF-beta converts Th1 cells into Th17 cells through stimulation of Runx1 expression [J]. EUR J IMMUNOL 2015,45(4): 1010-1018.

[16] Sander LE, Obermeier F, Dierssen U, et al. Gp130 signaling promotes development of acute experimental colitis by facilitating early neutrophil/macrophage recruitment and activation [J]. J IMMUNOL 2008,181(5): 3586-3594.

[17] Grivennikov S, Karin E, Terzic J, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer [J]. CANCER CELL 2009,15(2): 103-113.

[18] Ernst M, Thiem S, Nguyen PM, et al. Epithelial gp130/Stat3 functions: an intestinal signaling node in health and disease [J]. SEMIN IMMUNOL 2014,26(1): 29-37.

[19] Mudter J, Neurath MF. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance [J]. INFLAMM BOWEL DIS 2007,13(8): 1016-1023.

[20] Matsumoto S, Hara T, Mitsuyama K, et al. Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model [J]. J IMMUNOL 2010, 184(3): 1543-1551.

[21] Nguyen PM, Putoczki TL, Ernst M. STAT3-Activating Cytokines: A Therapeutic Opportunity for Inflammatory Bowel Disease? [J]. J Interferon Cytokine Res 2015,35(5): 340-350.

(上接第4页)

理操作,存在安全隐患。目前,在常规护理的同时,增加人性化护理务,是明智选择,在实践中效果理想。人性化护理对降低患者在治疗中的紧张感和不适感,增强患者治疗信心,帮助患者改善治疗氛围,提升治疗效果,减少并发症方面优质卓越。以往临床上,患者的护理多采取传统模式,护理机械化,刻板化,但是具备着基础性。对患者提供优质护理可以说是改善患者预后的核心。前列腺电切术治疗患者的恢复过程当中,人性化护理可以借助于优质的服务服务,加速患者意识的恢复,降低后遗症的发生风险,改进治疗效果,有着不容忽视的影响,需要引起足够的重视。

人性化护理可以从多个不同的方面开展,尤其是要强调细节的护理,一方面满足患者要求,另一方面加快护理工作的完成速度。学习国内外先进护理经验,参考优质护理服务理念,制定人性化护理措施,按照病房中的实际情况,制定更为合理的护理措施。可以为护理人员提供良好的行为操作指南,建立完善的流程管理制度,能够有效提升围产期的护理水平,在维持良好护患关系方面起到积极的推进作用,还能够加强患者自身的医护意识。高质量护理服务一方面能够有效降

低患者住院的痛苦,另一方面可以让患者感受到护理人员的关怀,提高他们的治疗护理依从性,从而改善患者的预后。人性化护理可以从多个不同的方面开展,尤其是要强调细节的护理,一方面满足患者要求,另一方面加快护理工作的完成速度。

综上所述,本研究通过在前列腺电切术护理中实施综合护理干预后,调查表明研究组患者的满意度是相当高的;对于前列腺电切术患者,护理依从性明显好于对照组;医患纠纷减少;护理人员的操作护理水平大大提升,提高前列腺电切术患者的护理质量明显提高,能够促进患者康复,提高患者治疗后生活质量,具有很强的临床适应性,值得推广。

参考文献

[1] 唐媛,彭玲,叶木石.护患沟通及技巧在泌尿外科的应用[J].井冈山医专报,2009,16(2):55.

[2] 王曙红,严其明,周建辉,等.住院患者对护患沟通的需求调查[J].护理学杂志,2002,17(9):684.

[3] 秦法玲.浅谈加强沟通对预防护理纠纷的意义[J].泰山医学院学报,2006,27(4):371.