

NF- κ B 在溃疡性结肠炎激素抵抗中的意义

刘一品, 李延青

■背景资料

迄今, 溃疡性结肠炎(UC)的病因和发病机制尚未明确, 治疗主要手段之一是使用激素, 但在临床中约1/4左右的UC患者对激素治疗不敏感, 即激素抵抗, 给患者增加了不必要的激素副作用及经济负担, 也为临床治疗带来了新的课题。

刘一品, 烟台毓璜顶医院消化内科 山东省烟台市 264000
李延青, 山东大学齐鲁医院消化内科 山东省济南市250012
通讯作者: 李延青, 250012, 山东省济南市文化西路107号, 山东大学齐鲁医院消化内科. mx8902@163.com
电话: 0531-2169508
收稿日期: 2005-06-30 接受日期: 2005-07-15

Role of nuclear factor-kappa B expression in steroid-resistant ulcerative colitis

Yi-Pin Liu, Yan-Qing Li

Yi-Pin Liu, Department of Gastroenterology, Yuhuangding Hospital of Yantai, Yantai 264000, Shandong Province, China

Yan-Qing Li, Department of Gastroenterology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong Province, China

Correspondence to: Dr. Yan-Qing Li, Department of Gastroenterology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong Province, China. mx8902@163.com

Received: 2005-06-30 Accepted: 2005-07-15

Abstract

AIM: To investigate the relationship between nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and the occurrence of ulcerative colitis (UC), and to explore the role of NF- κ B expression in steroid resistance of UC.

METHODS: The activation of NF- κ B was investigated in the UC biopsies from 15 steroid-resistant cases of the 20 steroid-sensitive patients with an acute episode of moderate or severe UC. Sixteen normal persons were used as controls.

RESULTS: Before the steroid treatment, the expression of NF- κ B p65 were significantly different between the steroid-resistant patients and the normal controls (6.1 ± 2.9 vs 1.1 ± 0.8 , $P < 0.01$), as well as between the steroid-sensitive patients and the normal controls (5.9 ± 2.7 vs 1.1 ± 0.8 , $P < 0.01$). There was no significant difference between the steroid-sensitive group and the steroid-resistant group before the steroid treatment ($P > 0.05$), while there was significant difference between them after the steroid treatment (1.3 ± 0.8 vs 5.4 ± 2.4 , $P < 0.01$). The expression of NF- κ B p65 in the

steroid-sensitive group has significant difference before and after the steroid treatment (5.9 ± 2.7 vs 1.3 ± 0.8 , $P < 0.01$), while no significant difference in the steroid-resistant group ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The expression of NF- κ B p65 is closely related with the occurrence and development of UC. The changes of NF- κ B expression before and after the steroid treatment may be helpful for the identification of steroid resistance and can be used as an index for the early recognition of steroid resistance.

Key Words: Nuclear factor κ B; Ulcerative colitis; Steroid resistance; Immunohistochemistry

Liu YP, Li YQ. Expression of nuclear factor-kappa B in steroid-resistant ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(2):238-241

摘要

目的: 探讨NF- κ B与溃疡性结肠炎(UC)发病关系及其在激素抵抗中的意义。

方法: 选择活动期中度以上UC患者35例, 均予强的松治疗(20-40 mg/d)4 wk. 根据治疗反应分为激素敏感组和激素耐药组, 均作为实验组, 检测激素治疗前、治疗后结肠病变黏膜组织中的NF- κ B表达水平. 设立正常对照组16例。

结果: 在激素治疗前, 激素敏感组、激素抵抗组NF- κ B p65表达水平分别与正常对照组比较, 差异有显著性(5.9 ± 2.7 , 6.1 ± 2.9 vs 1.1 ± 0.8 , $P < 0.01$). 在激素治疗前, 激素敏感组和激素抵抗组之间比较, 差异无显著性($P > 0.05$). 在激素治疗后, 激素敏感组和激素抵抗组之间比较, 差异有显著性(1.3 ± 0.8 vs 5.4 ± 2.4 , $P < 0.01$). 在激素治疗前后, 激素敏感组自身比较, 差异有显著性(5.9 ± 2.7 vs 1.3 ± 0.8 , $P < 0.01$). 而激素抵抗组在前后结果的比较中, 差异无显著性($P > 0.05$).

结论: NF- κ B与UC关系密切, 在UC的发病机制中起重要作用. NF- κ B在激素治疗前后的变

化有助于判断UC患者是否对激素抵抗, 可以作为进一步预测激素抵抗的一个较早期的诊断指标.

关键词: 核因子- κ B; 溃疡性结肠炎; 激素抵抗; 免疫组织化学法

刘一品, 李延青. NF- κ B在溃疡性结肠炎激素抵抗中的意义. 世界华人消化杂志 2006;14(2):238-241
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/238.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)又称慢性非特异性溃疡性结肠炎, 系原因不明的大肠黏膜的慢性炎症和溃疡性病变. 本病在我国近10 a发病率呈上升趋势, 报道增多^[1]. 核因子- κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)是在进化学上高度保守的一种转录因子, 广泛存在于各种组织中, 在免疫和炎症反应、细胞生长、病毒感染及某些疾病急性期反应等方面起着重要作用^[2-6]. 已证明, 许多UC临床治疗用药如糖皮质激素的药理作用均与抑制NF- κ B活性有关. 但同时我们在临床中发现相当一部分患者对激素治疗不敏感, 即激素抵抗, 其机制不清. 我们通过研究NF- κ B表达水平在UC患者进行激素治疗过程中的变化特点, 探讨NF- κ B在UC的发病机制中的作用, 以及在发生激素抵抗时的机制及意义, 从而为临床治疗开辟新的思路.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例选择 2002-10/2004-08选择我院门诊及住院的溃疡性结肠炎患者35例, 其中男18例, 女17例, 年龄20-65岁(平均38.4岁). 所有病例均为活动期中度以上患者(参照Truelove-Witts标准^[7]), 均需应用糖皮质激素治疗, 每位患者均给予强的松治疗, 每日剂量20-40 mg, 疗程4 wk. 根据激素治疗反应分为两个组: 病情缓解者为激素敏感组(glucocorticoid sensitive, CS)($n = 20$)和病情不缓解者为激素耐药组(glucocorticoid resistant, CR)($n = 15$), 均作为实验组, 检测激素治疗前、治疗后结肠病变黏膜组织中的NF- κ B表达水平. 同时设立正常对照组16例, 均为结肠镜、钡灌肠、生化检查正常者, 检测正常结肠黏膜组织中的NF- κ B表达水平.

1.1.2 溃疡性结肠炎诊断标准 2000年全国炎症性肠病学术研讨会, 中华医学会消化病学分会于成都

制定的"对炎症性肠病诊断治疗规范的建议"^[8].

1.1.3 溃疡性结肠炎入选标准 在开始研究之前4 wk未曾接受糖皮质激素、柳氮磺胺吡啶、5-ASA、环孢菌素A、环磷酰胺等免疫抑制剂治疗; 无严重的冠心病、高血压病、糖尿病、活动性肺结核、消化性溃疡、重症感染等禁忌证.

1.1.4 激素敏感组/激素抵抗组判断标准 在开始4 wk激素治疗前和治疗后均计算每个患者的疾病活动度, 即UC的临床活动性指数(colitis activity index, CAI)^[9]. 所有应用激素治疗的患者对激素治疗的反应均遵照以下规定: 患者接受4 wk强的松治疗(剂量 >20 mg/d)后病情缓解者($CAI \leq 4$), 被认为是激素敏感(glucocorticoid sensitive, CS); 4 wk内病情未缓解, CAI指数下降不低于5($CAI \geq 5$)或者需外科手术治疗者, 被认为是激素抵抗(glucocorticoid resistant, CR).

1.2 方法

1.2.1 主要试剂及仪器设备 鼠抗人NF- κ B p65单克隆抗体购自Santa Cruz biotechnology公司, SP试剂盒, DAB显色剂, edta抗原修复液(1 mmol/L, pH8.0); 日本fujinon EC-410HM电子结肠镜, olympus CF240电子结肠镜, olympus-BX51光学显微镜, 德国产leica -RM2135型病理石蜡切片机, 日本sakura Tissue-Tek型自动脱水机, 国产立鹤牌电热恒温培养箱, 容声牌RS-210型冰箱.

1.2.2 标本制备 所有溃疡性结肠炎患者及正常对照组患者均行结肠镜检查, 分别在病变结肠黏膜上及正常黏膜上用活检钳取材, 福尔马林固定, 石蜡包埋, 制备4 μ m厚组织切片, 用于NF- κ B表达的检测.

1.2.3 步骤 二甲苯溶液脱蜡, 依次1 000, 950, 750 mL/L乙醇水化, 蒸馏水洗净; 30 mL/L过氧化氢浸泡孵育阻断内源性过氧化物酶, PBS冲洗; 置edta抗原修复液中, 95 $^{\circ}$ C 10 min, 自然冷却至室温, PBS冲洗; 滴加非免疫性动物血清, 37 $^{\circ}$ C 15 min, 封闭非特异性抗原; 滴加NF- κ B p65单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C过夜, 37 $^{\circ}$ C复温60 min, PBS冲洗; 生物素标记的二抗, 37 $^{\circ}$ C 12 min, PBS冲洗; 辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液, 37 $^{\circ}$ C孵育12 min, PBS冲洗; DAB溶液显色; 冲洗, 苏木素复染, 脱水, 中性树脂封片. PBS代替一抗作阴性对照.

1.2.4 结果判断 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(NF- κ Bp65), 阴性对照应无棕黄色反应产物. 采用以下染

■研究前沿

近年研究显示, NF- κ B与炎症性肠病关系密切, 在UC的发生、发展中具有重要地位. 而UC治疗过程中发生激素抵抗也是临床中的常见问题和治疗难点.

■创新盘点

目前有关NF- κ B在UC激素治疗时的变化特点及发生激素抵抗时的机制、意义,国内尚未见系统全面的研究报道。

表1 激素治疗前溃疡性结肠炎与正常组NF- κ Bp65表达水平比较

组别	<i>n</i>	NF- κ Bp65
正常组	16	1.1 \pm 0.8
激素敏感组	20	5.9 \pm 2.7 ^b
激素抵抗组	15	6.1 \pm 2.9 ^b

^b*P* < 0.01, vs 正常组。

色积分评价标准^[10]: 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之和表示。

统计学处理 结果以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 所有数据录入微机, 应用SPSS10.0统计软件, 将UC组病例与正常对照组的阳性细胞染色积分所得数据建立数据库, 进行*t*检验、秩和检验。所有分析显著性水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

在正常结肠黏膜组织中, NF- κ B p65无或仅有弱阳性表达。在激素治疗前, 溃疡性结肠炎激素敏感组、激素抵抗组分别与正常对照组表达水平的比较, 差异有显著性(^b*P* < 0.01)(表1)。

在激素治疗前, NF- κ B p65表达水平在激素敏感组和激素抵抗组之间比较无显著性差异(5.9 \pm 2.7 vs 6.1 \pm 2.9, *P* > 0.05)。在激素治疗后, NF- κ Bp65表达水平在激素敏感组和激素抵抗组之间比较, 具有显著性差异(1.3 \pm 0.8 vs 5.4 \pm 2.4, ^b*P* < 0.01)。

在激素治疗前后, 激素敏感组的NF- κ Bp65的表达水平比较具有显著差异性(5.9 \pm 2.7 vs 1.3 \pm 0.8, *P* < 0.01)。而激素抵抗组在前后结果的比较中无显著性差异(6.1 \pm 2.9 vs 5.4 \pm 2.4, ^b*P* > 0.05)。

3 讨论

迄今, UC的特异性致病因素和发病机制尚未明确, 近年研究显示, NF- κ B与UC关系密切^[11-13], 提示NF- κ B在UC的发生、发展中占有重要地位。已证明, 许多UC临床治疗用药如糖皮质激素均与抑制NF- κ B活性有关。糖皮质激素对NF- κ B活性的抑制正是其发挥广泛抗炎作用的基础。大多数患者对激素治疗有效, 但同时我们在临床中发现约1/4左右的UC患者对激素治疗不敏

感^[14], 即激素抵抗, 疗效欠佳, 其机制不清, 给患者增加了不必要的激素副作用及经济负担, 也为临床治疗带来了新的课题。目前NF- κ B在UC激素治疗时的变化特点及发生激素抵抗时的机制、意义, 国内尚未见研究报道。

我们对15例激素抵抗和20例激素敏感的UC患者进行分组研究, 分别给予4 wk的激素(强的松)治疗, 观察疗效, 并在激素治疗前后进行结肠黏膜活检, 通过免疫组织化学染色法检测NF- κ B表达活性。结果发现UC患者中NF- κ B表达水平明显增强, 激素抵抗组对激素治疗不敏感, 病情未得到缓解, 而激素敏感组对激素治疗效果理想, 进入了缓解期。在激素治疗前, NF- κ B p65表达水平在激素敏感组和激素抵抗组之间比较无显著性差异(*P* > 0.05), 说明在UC急性活动期NF- κ B表达水平在激素敏感组与激素抵抗组之间并无差异, 与病情的活动性相一致。而在激素治疗后, NF- κ B p65表达水平在激素敏感组和激素抵抗组之间比较具有显著性差异(^b*P* < 0.01), 激素敏感组NF- κ B表达水平明显下降, 同时病情得到缓解, 而激素抵抗组NF- κ B表达水平并无变化, 仍然处于高水平, 未能进入缓解期。这表明NF- κ B的表达水平与UC的病情活动性密切相关, 在病情活动期具有高表达活性, 病情缓解期活性降低或失活, 而通过检测其表达水平的强度, 亦有助于判断疾病处于活动期或缓解期。

在本研究中, 我们发现激素敏感组的NF- κ B的表达水平在激素治疗前后相比较具有显著性差异(^b*P* < 0.01), 呈现明显下降的趋势。而激素抵抗组在激素治疗前后比较中无显著性差异(*P* > 0.05), 基本保持治疗前的高水平表达。经过4 wk的激素系统治疗, 对激素敏感的UC患者, 病情缓解, 其黏膜组织中NF- κ B表达活性明显减弱, 说明NF- κ B表达活性受到了抑制, 而抑制NF- κ B有助于炎症的缓解。但是激素抵抗的UC患者NF- κ B水平无明显变化, 仍保持高水平状态, 这说明NF- κ B活性未能得到抑制, 病情未缓解。由此我们可以推测NF- κ B表达水平与疾病活动度、激素治疗反应相一致, 从激素治疗前后NF- κ B表达活性的变化上可以推测患者对激素治疗的反应与效果, 即激素抵抗亦或激素敏感。

体外实验发现糖皮质激素(GC)可通过以下途径抑制NF- κ B活化: (1)通过与糖皮质激素受体(GR)结合, 使其活化后在核内与NF- κ B p65相互作用, 抑制NF- κ B功能。(2)活化的GR激活糖皮质激素反应元件(GRE), 上调I κ B表达, 从而影响

NF- κ B活化^[11,15]. 糖皮质激素GC与GR结合是其发挥作用的一个重要环节.从理论上推断, UC的治疗过程中出现激素抵抗, 必定是由于以上某个环节或某些途径出现了障碍. 众多文献报道, GR的主要生理构型为GR α , 而GR β 不与GC结合, GR β 抑制内源性GR α 的活性, 且GR β 介导抑制作用广泛见于糖皮质激素启动子的诱导中, 故有人提出GR β 存在的意义就是拮抗GR α 的功能. Honda *et al*^[16]报道, 外周血单个核细胞(PBMC)表达的糖皮质激素受体(GR β)特异mRNA可见于83%的激素抵抗UC, 激素敏感和正常对照中为9%. 基于此发现, 遂提出检测PBMC的GR β mRNA的表达可预测UC中糖皮质激素的疗效. 但少数学者报道并未发现GR β 具有拮抗GR α 的功能. Bantel *et al*^[14]认为UC激素抵抗机制可能是NF- κ B阻止GR α 与DNA结合, 抑制其抗炎因子的产生, 导致激素不敏感. 上述论点均有一定的理论依据, 值得进一步前瞻性研究.

总之, 我们的研究表明, NF- κ B在UC发病中占有重要地位, 它参与了一系列免疫炎症反应有关的基因转录调控, 其表达水平与UC的病情活动性密切相关, 通过检测其表达水平的强度, 有助于判断疾病处于活动期或缓解期, 这说明NF- κ B在UC的疾病活动中可能起到枢纽作用. 同时我们发现对NF- κ B活性的抑制, 有助于UC的治疗及病情的缓解, 监测激素治疗中NF- κ B表达水平的变化, 可以作为进一步预测激素抵抗的一个较早期的诊断指标, 避免今后多次重复治疗中激素的应用, 利于制定新的治疗方案, 从而为激素抵抗患者减少了大量的激素副作用及节省了医疗费用. 而由于激素抵抗的存在, 也说明NF- κ B并非UC唯一的发病因素, 是否涉及多个转录因子? 他们间的相互作用如何? 这些均有待于我们进一步去研究发现, 以便于更好的治疗UC患者.

4 参考文献

- 1 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10 218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 158-61
- 2 Chen YG, Zhang C, Chiang SK, Wu T, Tso MO. Increased nuclear factor-kappa B p65

- immunoreactivity following retinal ischemia and reperfusion injury in mice. *J Neurosci Res* 2003; 72: 125-131
- 3 Zaninoni A, Imperiali FG, Pasquini C, Zanella A, Barcellini W. Cytokine modulation of nuclear factor-kappaB activity in B-chronic lymphocytic leukemia. *Exp Hematol* 2003; 31: 185-90
- 4 Chen YM, Tu CJ, Hung KY, Wu KD, Tsai TJ, Hsieh BS. Inhibition by pentoxifylline of TNF-alpha-stimulated fractalkine production in vascular smooth muscle cells: evidence for mediation by NF-kappa B down-regulation. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 950-958
- 5 Kis A, Yellon DM, Baxter GF. Role of nuclear factor-kappa B activation in acute ischaemia-reperfusion injury in myocardium. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 894-900
- 6 Calder VL, Bondeson J, Brennan FM, Foxwell BM, Feldmann M. Antigen-specific T-cell downregulation by human dendritic cells following blockade of NF-kappaB. *Scand J Immunol* 2003; 57: 261-270
- 7 Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. *Br Med J* 1955; 2: 1041-1048
- 8 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. *中华内科杂志* 2001; 40: 138-141
- 9 Rachmilewitz D. Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial. *BMJ* 1989; 298: 82-86
- 10 Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, Kusaba T, Tanaka M, Kimura R, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M, Kurohiji T, Sata M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999; 29: 688-696
- 11 Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42: 477-484
- 12 Neurath MF. Pathogenesis of inflammatory bowel disease: transcription factors in the spotlight. *Gut* 1998; 42: 458-459
- 13 Nosti-Escanilla MP, Pena AS. NF-kappa B and inflammatory intestinal diseases. *Rev Esp Enferm Dig* 1998; 90: 113-119
- 14 Bantel H, Domschke W, Schulze-Osthoff K, Kaskas B, Gregor M. Abnormal activation of transcription factor NF-kappaB involved in steroid resistance in chronic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1845-1846
- 15 Thiele K, Bierhaus A, Autschbach F, Hofmann M, Stremmel W, Thiele H, Ziegler R, Nawroth PP. Cell specific effects of glucocorticoid treatment on the NF-kappaBp65/IkappaBalpha system in patients with Crohn's disease. *Gut* 1999; 45: 693-704
- 16 Honda M, Orii F, Ayabe T, Imai S, Ashida T, Obara T, Kohgo Y. Expression of glucocorticoid receptor beta in lymphocytes of patients with glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2000; 118: 859-66

■应用要点

监测UC激素治疗过程中NF- κ B表达水平的变化, 可以作为进一步预测激素抵抗的一个较早期的诊断指标, 避免今后多次重复治疗中激素的应用, 利于制定新的治疗方案, 从而为激素抵抗患者减少了大量的激素副作用及节省了医疗费用.

电编 李琪 编辑 管鑫妍 审读 张海宁