

CEACAM6、Syndecan-1、PDGFA、HLA-DRB5在溃疡性结肠炎中的表达和意义

陈丽芳, 缪应雷, 杜艳, 李红纳, 肖玉良

陈丽芳, 缪应雷, 李红纳, 肖玉良, 昆明医学院第一附属医院消化科 云南省昆明市 650032

杜艳, 昆明医学院第一附属医院检验科 云南省昆明市 650032

陈丽芳, 2007级昆明医学院在读硕士, 现工作于云南省楚雄州人民医院消化科, 主要从事消化系统疾病方面的研究。

云南省科技厅-昆明医学院联合专项基金资助项目, No. 2007C0010R

作者贡献分布: 此课题由缪应雷设计; 研究过程由缪应雷, 陈丽芳, 杜艳, 李红纳及肖玉良共同操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由缪应雷提供; 数据分析由陈丽芳与李红纳完成; 本论文写作由缪应雷与陈丽芳完成。

通讯作者: 缪应雷, 副教授, 650032, 云南省昆明市, 昆明医学院第一附属医院消化内科, myldu@sina.com

收稿日期: 2010-06-09 修回日期: 2010-08-24

接受日期: 2010-08-31 在线出版日期: 2010-10-08

Significance of CEACAM6, Syndecan-1, PDGFA and HLA-DRB5 expression in patients with ulcerative colitis

Li-Fang Chen, Ying-Lei Miao, Yan Du, Hong-Na Li, Yu-Liang Xiao

Li-Fang Chen, Ying-Lei Miao, Hong-Na Li, Yu-Liang Xiao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Yan Du, Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Supported by: the Joint Foundation of Yunnan Provincial Department of Science and Technology and Kunming Medical College, No. 2007C0010R

Correspondence to: Associate Professor Ying-Lei Miao, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China. myldu@sina.com

Received: 2010-06-09 Revised: 2010-08-24

Accepted: 2010-08-31 Published online: 2010-10-08

Abstract

AIM: To analyze the significance of the expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6), Syndecan-1, platelet-derived growth factor alpha (PDGFA) and HLA-DRB5 genes in the development and progression of ulcerative colitis.

METHODS: The mRNA expression of CEACAM6, Syndecan-1, PDGFA and HLA-DRB5 was detected

by semiquantitative RT-PCR in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and colon specimens from 21 patients with ulcerative colitis.

RESULTS: The mRNA expression levels of CEACAM6, Syndecan-1 and PDGFA in patients with ulcerative colitis were significantly higher than those in normal controls (0.77 ± 0.23 vs 0.58 ± 0.14 , 1.16 ± 0.39 vs 0.85 ± 0.16 , 0.90 ± 0.18 vs 0.78 ± 0.13 , all $P < 0.01$). The expression of HLA-DRB5 mRNA was also up-regulated in patients with ulcerative colitis compared with normal controls (0.58 ± 0.19 vs 0.42 ± 0.19 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: CEACAM6, Syndecan-1, PDGFA and HLA-DRB5 are highly expressed in ulcerative colitis and may therefore play an important role in the pathogenesis of ulcerative colitis.

Key Words: Ulcerative colitis; Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6; Syndecan-1; Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

Chen LF, Miao YL, Du Y, Li HN, Xiao YL. Significance of CEACAM6, Syndecan-1, PDGFA and HLA-DRB5 expression in patients with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(28): 2971-2975

摘要

目的: 探讨差异表达的CEACAM6、Syndecan-1、PDGFA和HLA-DRB5基因在溃疡性结肠炎发生发展中的意义。

方法: 半定量RT-PCR检测21例溃疡性结肠炎患者及21例健康对照者外周血单个核细胞中CEACAM6、Syndecan-1、PDGFA、HLA-DRB5的表达水平。

结果: CEACAM6、Syndecan-1、PDGFA在溃疡性结肠炎组表达水平较正常组高, 差别有统计学意义(0.77 ± 0.23 vs 0.58 ± 0.14 , 1.16 ± 0.39 vs 0.85 ± 0.16 , 0.90 ± 0.18 vs 0.78 ± 0.13 , 均 $P < 0.01$), 与基因芯片结果吻合; HLA-DRB5

■背景资料

UC的发生可能与多种因素的综合作用有关, 其病因和发病机制的研究应强调综合性。首先, 基因决定机体的遗传易感性是内因, 其次, 环境和微生物致病因素是外因, 最后通过人体的自身免疫反应机制, 引起肠上皮和组织细胞持久损伤, 导致UC的发生。

■同行评议者

杨柏霖, 副主任医师, 南京中医药大学附属医院结直肠外科

■ 相关报道

本研究小组运用基因芯片技术,发现与健康对照组相比,UC患者中CEACAM6表达上调约10倍。

在溃疡性结肠炎组中较正常组中表达上调(0.58 ± 0.19 vs 0.42 ± 0.19 , $P < 0.01$),与基因芯片结果不相吻合(HLA-DRB5在UC组中的表达量是正常组的0.28倍)。

结论: 基因芯片和RT-PCR分析基因表达变化都是可信的,CEACAM6、Syndecan-1、PDGFA、HLA-DRB5在溃疡性结肠炎的发病机制中有重要作用,通过对其功能进一步的研究,他们有可能成为溃疡性结肠炎诊治和病情监测的指标。

关键词: 溃疡性结肠炎; 癌胚抗原相关细胞黏附分子6; 多配体聚糖-1; 半定量逆转录酶聚合酶链反应

陈丽芳, 缪应雷, 杜艳, 李红纳, 肖玉良. CEACAM6、Syndecan-1、PDGFA、HLA-DRB5在溃疡性结肠炎中的表达和意义. 世界华人消化杂志 2010; 18(28): 2971-2975
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/2971.asp>

0 引言

如果希望筛选特定疾病发生、发展和转移等病理过程牵涉的所有基因表达,基因芯片是目前最有效的工具。我们已用人基因表达芯片对溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者和健康对照者外周血单个核细胞进行基因表达差异分析,发现2倍以上表达差异的基因/EST共270条,其中206条表达上调,64条表达下调,这些表达变化显著的基因涉及细菌黏附、炎症反应等。为提高芯片结果的可信度,我们选取基因表达谱芯片中表达差异明显的癌胚抗原相关细胞黏附分子6(carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6, CEACAM6)、多配体聚糖1(Syndecan-1)、PDGFA、HLA-DRB5应用半定量逆转录酶聚合酶链反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)方法进行实验验证,同时探讨这些差异表达的基因在UC发生发展中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 选择2008-10/2009-05在昆明医学院第一附属医院消化内科住院及门诊的UC患者21例,诊断均采用2007年中华医学会消化病学分会制定的诊断标准。男女比1.1:1,年龄30-63(平均 43.10 ± 11.71)岁。对照组21例,均来自昆明医学院第一附属医院门诊健康体检者,排除感染和免疫性疾病,男女比1.1:1,年龄22-71(平均 43.67 ± 11.83)岁。两组年龄差异无统计学意义($P = 0.395$)。入选对象均签署知情同意书。TRIzol

试剂盒购自Invitrogen公司, Oligo(dT)₁₈ Primers购自Promega公司, DEPC购自SIGMA AND AMERSCO公司, RNase inhibitor、M-MLV RTase、Taq酶、dNTP、100 bp Marker均购自宝生物工程(上海)有限公司, 琼脂糖、溴化乙锭均购自上海生物工程技术有限公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取及逆转录: 抽取UC组及对照组肘静脉新鲜全血5 mL, 立即用EDTA抗凝。分离提取单个核细胞, 常规TRIzol法提取总RNA。总RNA随即被Oligo(dT)₁₈逆转录成cDNA, 反应条件如下: RNA处理物10 μ L、Oligo(dT)₁₈ 2 μ L、dNTP 2 μ L共14 μ L混匀, 离心。70 $^{\circ}$ C变性5 min, 冰上骤冷2 min, 然后依次添加5 \times SSII Buffer 4 μ L, 0.1 mol/L DTT 1 μ L, RNase inhibitor 0.5 μ L、M-MLV(200 U)1 μ L混匀, 离心, 放入42 $^{\circ}$ C水浴中反应1 h, 95 $^{\circ}$ C加热, 5 min终止反应。反应产物保存于-20 $^{\circ}$ C或进行PCR检测。

1.2.2 引物的设计: 在PubMed中的GenBank里面查找基因序列后经primer premier 5.0引物软件设计, 引物序列见表1, 经基因文库核对无误后, 交由昆明晨绿生物科技开发有限公司合成。

1.2.3 基因表达检测: 用设计的引物在UC及健康对照者中扩增基因, PCR反应体系: cDNA模板1 μ L, 上游引物(10 μ mol/L)2 μ L, 下游引物(10 μ mol/L)2 μ L, 10 \times 反应缓冲液2.5 μ L, dNTP(2.5 mmol/L)2 μ L, Taq DNA聚合酶0.5 μ L, ddH₂O 15 μ L, 总体积共25 μ L。反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s; 62 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 25个循环; 最后, 产物在72 $^{\circ}$ C延伸10 min, 4 $^{\circ}$ C保存。扩增产物取5 μ L在1.2%琼脂糖上电泳, 紫外灯下观察结果并照相, 采用Quantity one凝胶分析软件进行半定量分析, RT-PCR产物比值 = (靶mRNA灰度值/内对照GAPDH mRNA灰度值) \times 100%, 以上结果重复3次, 取平均值。

统计学处理 实验数据处理及分析结果采用SPSS16.0统计软件进行数据分析, 数据分析采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

目的基因和内参基因(GAPDH)扩增片段结果检测, 经琼脂糖凝胶电泳图显示见图1。根据目的基因和GAPDH基因的电泳条带吸光度比值, 计算出CEACAM6、Syndecan-1、PDGFA和HLA-DRB5 4种基因在UC组中相对于正常组中的表

表 1 引物序列

基因	引物序列	产物长度(bp)
CEACAM6	5'GGGGACTTCTGTATTATGCTAAC3'	187
	5'GTGGTGCTAAATGCTACATACTC3'	
Syndecan-1	5'GGGTGTCTTGGGCAGAG3'	157
	5'CCCATTTGGATTAAGTAGAGTTTTG3'	
PDGFA	5'CGTAGGGAGTGAGGATTCTTTGG3'	264
	5'CACTTGACACTGCTCGTGTTC3'	
HLA-DRB5	5'GAGTACAGATGCACGGGAGG3'	299
	5'TCTGGACTTCAGCCAACAGG3'	
GAPDH	5'CCCTGGACTTCGAGCAAGAGAT3'	530
	5'GTTTTCTGCGCAAGTTAGG3'	

■应用要点
CEACAM6、Syndecan-1、PDGFA、HLA-DRB5在溃疡性结肠炎的发病机制中有重要作用, 通过对其功能进一步的研究, 他们有可能成为溃疡性结肠炎诊治和病情监测的指标。

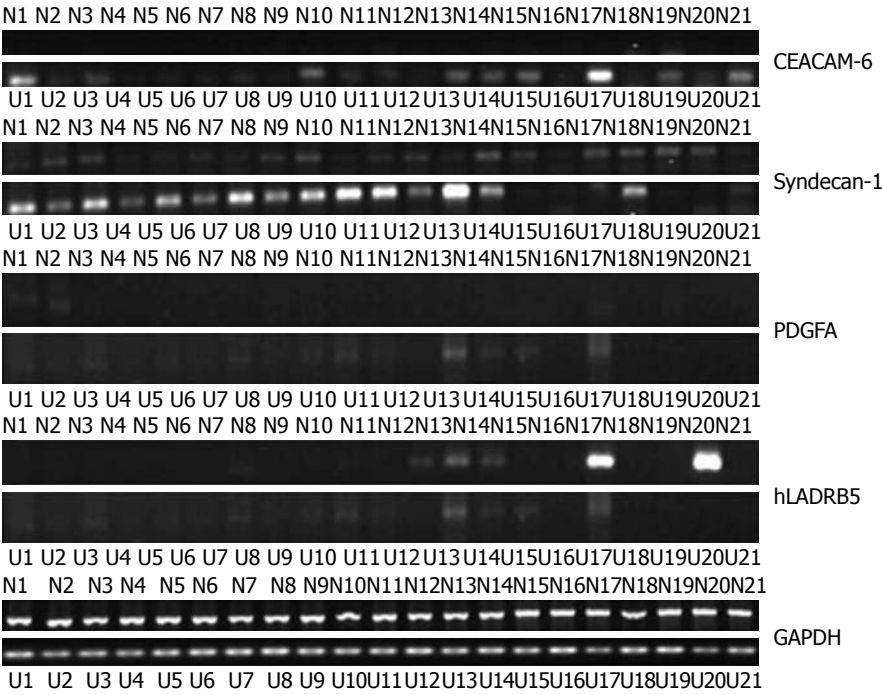


图 1 RT-PCR示目的基因和内参基因(GAPDH)的扩增片段. U: UC 患者; N: 健康对照者.

定量分别为 0.77 ± 0.23 、 1.16 ± 0.39 、 0.90 ± 0.18 、 0.58 ± 0.19 . 用t-test法进行分析, 各基因在两组中的表达量有统计学差异($P < 0.05$, 表2).

3 讨论

UC的发生可能与多种因素的综合作用有关, 其病因和发病机制的研究应强调综合性. 首先, 基因决定机体的遗传易感性是内因, 其次, 环境和微生物致病因素是外因, 最后通过人体的自身免疫反应机制, 引起肠上皮和组织细胞持久损伤, 导致UC的发生. 大量的研究发现^[1]肠道的细菌感染、病毒感染与肠道炎症的发生有关. 近年对炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)致病基因研究中也发现, 其异常基因主要涉及固有免疫、黏膜屏障、杀菌等生物作用^[2], 致使

这些基因异常表达, 引起黏膜屏障的破坏, 导致肠道免疫系统直接暴露在细菌等抗原下, 引起肠道慢性复发性炎症^[3], 其中细菌因素可能是IBD发病的始动因子和维持因子^[4]. 对IBD患者肠道异常增多的粘连-侵袭性大肠杆菌(adherent-invasive *Escherichia coli*, AIEC)研究发现, AIEC在IBD患者中具有高黏附性, 与患者黏膜上皮细胞中其受体-CEACAM6高表达关系密切^[5], CEACAM6与AIEC- I 型菌毛结合, 促进其穿透黏膜屏障, 侵入深层组织, 感染巨噬细胞并在其中繁殖, 持续刺激免疫细胞促使其释放TNF- α 等促炎介质和形成肉芽肿. 这一过程中CEACAM6的高表达起到起始及中心作用. 本研究小组^[6]已运用基因芯片技术, 发现与健康对照组相比, UC患者中CEACAM6表达上调约10倍. 本

■同行评价

本文新颖性较好,对指导临床诊断与治疗溃疡性结肠炎有一定意义。

表 2 RT-PCR检测目标基因mRNA的表达 ($n = 21$, mean \pm SD)

分组	CEACAM6	Syndecan-1	PDGFA	HLA-DRB5
UC组	0.77 \pm 0.23	1.16 \pm 0.39	0.90 \pm 0.18	0.58 \pm 0.19
正常组	0.58 \pm 0.14	0.85 \pm 0.16	0.78 \pm 0.13	0.42 \pm 0.19
<i>t</i> 值	3.503	3.053	3.967	4.097
<i>P</i> 值	0.002	0.006	0.001	0.001

实验应用半定量RT-PCR技术验证了上述结果, CEACAM6在UC组较健康对照组表达上调, 差别有统计学意义($P < 0.05$), 可能是由于进入UC患者肠道黏膜的细菌刺激巨噬细胞释放的促炎因子不仅作用于肠道上皮细胞表达CEACAM6, 而且还作用于全身免疫细胞, 肠道持续的炎症会增加UC患者罹患结肠癌的风险^[7]. 基于上述理论, 控制高表达的CEACAM6与AIEC- I型菌毛之间的相互作用, 在细菌感染起始环节阻断其后引发的一系列炎症反应, 有可能对UC治疗带来变革。

Syndecan-1(CD138)是一种由硫酸乙酰肝素链和硫酸软骨素链修饰的I型跨膜蛋白, 主要表达于上皮细胞和内皮细胞, 在炎症反应的许多环节中发挥作用. 本研究小组^[6]已运用基因芯片技术发现Syndecan-1与健康对照组相比表达上调约2.73倍, 本实验则应用半定量RT-PCR技术验证了上述结果, Syndecan-1在UC组较健康对照组表达上调, 差别有统计学意义($P < 0.05$). 本研究与Principi等学者研究结果不完全一致, 可能是以下原因所导致: 在就诊患者中, 多为发病时间较长, 病情较重患者, UC确诊患者亦多数处于炎症活动期; 在UC患者中, 炎症细胞包括淋巴细胞、前B淋巴细胞等细胞中Syndecan-1表达上调^[8,9]. 在UC患者中Syndecan-1表达异常, 表明Syndecan-1与UC的发生发展有重要联系, 但是具体机制未明. 目前多数学者认为, 肠道细菌感染、肠上皮屏障功能缺陷、肠黏膜免疫调节异常以及机体遗传易感性等共同参与了IBD的发生发展过程^[10,11]. 有研究提示TNF- α , IL-1 β 对肠上皮细胞中Syndecan-1的表达起下调作用^[12]. 但这种作用并不是特异性的, TNF- α 还能使细胞外基质氨基葡聚糖断裂. 新近的研究提示肠黏膜屏障的破坏导致细菌移位可能和UC发病有关. 在炎症发生时, 肠道的各种炎症因子大量增加, 其中包括促炎因子和抗炎因子, 促炎因子有IL-6, IL-8, TNF- α 等, 抗炎因子包括IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β 等. 而这些炎症因子大多对Syndecan-1有

调节作用, 但是在IBD发病机制中, 他们是扮演何种角色, 还待进一步研究.

血小板衍化生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是一种能刺激结缔组织增殖与分化的细胞因子, 可由多种细胞合成并释放. 其生物学特征主要有: (1)促分裂效应, PDGF刺激血管平滑肌细胞、成纤维细胞、胶质细胞的分裂增生; (2)趋化活性, 对中性粒细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞有趋化性; (3)参与细胞凋亡、转化过程的调控. PDGF不仅是修复阶段的微丝电感器, 而且涉及到炎症阶段单核炎症细胞的化学诱导物^[13]. 本实验应用半定量RT-PCR技术测定PDGFA在UC中的表达情况, 结果发现其在UC组比健康对照组表达上调, 与本研究小组^[6]运用基因芯片技术检测结果趋势一致, 证实UC患者单个核细胞PDGFA mRNA表达增高, 推测PDGF在肠道损伤后参与并发挥了修复作用.

此外, 遗传因素在UC发病中同样具有重要意义. 有研究^[14]证实HLA-II与IBD关系较密切. Stokkers收集了1966-1998年关于HLA与IBD的相关性报道, 进行Meta分析, 发现与UC显著正相关的是HLA-DR2、DRB1 \times 1502、DR9和DRB1 \times 0103; 与UC负相关的是DR4, 而对中国人群的研究结果未显示HLA、DRB1与UC及其亚型有关联^[15,16]. 新近发现位于人第6染色体短臂上的HLA-DR3, 对于UC是一个保护性基因^[17]. 本实验应用半定量RT-PCR技术测定HLA-DRB5在UC中的表达情况, 结果发现其在UC组比健康对照组表达上调, 与本研究小组^[6]运用基因芯片技术检测结果不一致(HLA-DRB5在UC组中的表达量是正常组的0.28倍, 表达下调). 造成这种差异性可能与下列因素有关: (1)HLA复合体的基因在群体中的分布与种族、地理环境等因素有关; (2)HLA-DR具有高度基因多态性; (3)入选病例数较少或者统计方法不同, 所以得出结论有一定的差异. 因此, 在以后的工作中, 需要更多的研究来进行验证.

总之, 基因芯片和半定量RT-PCR分析基因

表达变化都是准确可信的. 基因芯片筛选基因表达谱具有高通量大规模的特点, 而RT-PCR则适合单个基因表达变化的研究, 两者互为补充和印证; UC患者中不同基因的异常表达具有不同的意义, 而且随着各种研究手段的不断完善, 人们对UC易感基因的认识也将不断深入, 他们的发现对于UC易感基因的确立、进一步探索UC进展相关基因及诊断指标筛选研究具有极其重要的作用.

4 参考文献

- 1 Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 13780-13785
- 2 Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008; 134: 577-594
- 3 Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007; 448: 427-434
- 4 Balfour Sartor R. Bacteria in Crohn's disease: mechanisms of inflammation and therapeutic implications. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41 Suppl 1: S37-S43
- 5 Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantscheff P, Allez M, Peeters H, Bommelaer G, Desreumaux P, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 1566-1574
- 6 廖应雷, 肖玉良, 段丽平, 李小燕, 陈丽芳, 李红娜. 寡聚核苷酸芯片检测溃疡性结肠炎患者基因表达谱的研究. *中华消化杂志* 2009; 29: 775-777
- 7 Liu ES, Ye YN, Shin VY, Yuen ST, Leung SY, Wong BC, Cho CH. Cigarette smoke exposure increases ulcerative colitis-associated colonic adenoma formation in mice. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1407-1413
- 8 王霞, 陈烨, 王显飞, 何雅婧, 朱疆依, 宋于刚. Syndecan-1在小鼠结肠炎模型中的表达和意义. *胃肠病学* 2008; 13: 336-340
- 9 Principi M, Day R, Marangi S, Burattini O, De Francesco V, Ingrosso M, Pisani A, Panella C, Forbes A, Di Leo A, Francavilla A, Ierardi E. Differential immunohistochemical expression of syndecan-1 and tumor necrosis factor alpha in colonic mucosa of patients with Crohn's disease. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2006; 28: 185-195
- 10 Kim SC, Tonkonogy SL, Albright CA, Tsang J, Balish EJ, Braun J, Huycke MM, Sartor RB. Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria. *Gastroenterology* 2005; 128: 891-906
- 11 Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347: 417-429
- 12 Day RM, Mitchell TJ, Knight SC, Forbes A. Regulation of epithelial syndecan-1 expression by inflammatory cytokines. *Cytokine* 2003; 21: 224-233
- 13 Kumagai S, Ohtani H, Nagai T, Funa K, Hiwatashi NO, Shimosegawa, Nagura H. Platelet-derived growth factor and its receptors are expressed in areas of both active inflammation and active fibrosis in inflammatory bowel disease. *Tohoku J Exp Med* 2001; 195: 21-33
- 14 沈秀云, 施瑞华. 炎症性肠病易感基因研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1591-1601
- 15 Cho JH. Inflammatory bowel disease: genetic and epidemiologic considerations. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 338-347
- 16 Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* 2007; 369: 1627-1640
- 17 Gómez-García M, Oliver J, Márquez A, Mendoza JL, López-Nevot MA, Fernández-Arquero M, González-Escribano MF, Díaz-Rubio M, de la Concha EG, Urcelay E, Martín J, Martínez A. Strong protective effect of DR3 against ulcerative colitis in the Spanish population. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 2762-2766

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确.