

TGF- β_1 中和抗体对TNBS慢性结肠炎动物模型纤维化的影响

戴萌, 金雷, 徐维田, 熊毅敏, 王一鸣, 郑国荣

戴萌, 徐维田, 熊毅敏, 王一鸣, 郑国荣, 中国人民解放军武汉总医院消化内科 湖北省武汉市 430000

金雷, 湖北省第三人民医院消化内科 湖北省武汉市 430000

戴萌, 主治医师, 主要从事炎症性肠病方向的研究.

作者贡献分布: 戴萌与金雷对此文所作贡献均等; 此课题由戴萌、金雷、徐维田、熊毅敏、王一鸣及郑国荣设计; 研究过程由戴萌与金雷操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由熊毅敏提供; 数据分析由戴萌与徐维田完成; 本论文写作由戴萌与金雷完成.

通讯作者: 金雷, 主治医师, 430000, 湖北省武汉市中山大道26号, 湖北省第三人民医院消化内科. 15634619@qq.com
电话: 027-83743302

收稿日期: 2016-12-15

修回日期: 2017-01-21

接受日期: 2017-02-17

在线出版日期: 2017-03-28

Effect of TGF- β_1 neutralizing antibody on intestinal fibrosis in a mouse model of chronic colitis induced with trinitrobenzene sulfonic acid

Meng Dai, Lei Jin, Wei-Tian Xu, Yi-Min Xiong, Yi-Ming Wang, Guo-Rong Zheng

Meng Dai, Wei-Tian Xu, Yi-Min Xiong, Yi-Ming Wang, Guo-Rong Zheng, Department of Gastroenterology, Wuhan General Hospital of Chinese PLA, Wuhan 430000, Hubei Province, China

Lei Jin, Department of Gastroenterology, the Third General Hospital of Hubei Province, Wuhan 430000, Hubei Province, China

Correspondence to: Lei Jin, Attending Physician, Department of Gastroenterology, the Third General

Hospital of Hubei Province, 26 Zhongshan Avenue, Wuhan 430000, Hubei Province, China. 15634619@qq.com

Received: 2016-12-15

Revised: 2017-01-21

Accepted: 2017-02-17

Published online: 2017-03-28

Abstract

To evaluate the effect of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) neutralizing antibody on intestinal fibrosis in a mouse model of chronic colitis induced with trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS).

METHODS

Forty-eight Balb/c mice were randomly divided into a normal control group, a model control group, a treatment control group, and a TGF- β_1 antibody group. Chronic colitis and intestinal fibrosis were induced with TNBS/ethanol enema for 6 wk. Mice in the TGF- β_1 antibody group and treatment control group were administered with TGF- β_1 neutralizing antibody and physiological saline, respectively, at 24 h after the administration of TNBS/ethanol enema. The pathological changes in intestine tissue were detected by HE and VG collagen staining. Expression of TGF- β_1 and collagen types I, III, and V mRNAs in the colon was detected.

RESULTS

HE and VG collagen staining showed that pathologic histology was improved in the TGF- β_1 antibody group. The expression of

背景资料

肠道纤维化性狭窄是克罗恩病(Crohn's disease, CD)患者肠道慢性炎症发展的必然结果,但目前临床上常用的治疗手段对已形成肠道纤维化均无明显的疗效.虽然已有以促纤维化因子关键因子转化生长因子- β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1)为靶点的TGF- β_1 中和抗体的抗纤维化的治疗研究,但其对肠道纤维化的影响尚未见报道.

同行评议者

冯百岁, 教授, 郑州大学第五附属医院消化内科; 靖大道, 教授, 主任医师, 上海交通大学附属第一人民医院消化科; 吴巧凤, 副研究员, 成都中医药大学针灸推拿学院

■ 研究前沿

肠纤维化是多种炎症性肠病比较棘手的并发症, TGF- β_1 在此过程中起了关键作用. TGF- β_1 中和抗体对于纤维化的治疗作用已有文献报道, 但对于肠道纤维化的作用尚未见报道研究, 另是否有致免疫性疾病甚至肿瘤的可能未见研究.

collagen types I, III, and V and TGF- β_1 mRNAs decreased significantly in the TGF- β_1 antibody group compared with the model control group and the treatment control group ($P < 0.05$). The protein expression of TGF- β_1 also decreased significantly in the TGF- β_1 antibody group compared with the model control group and the treatment control group ($P < 0.05$).

CONCLUSION

TGF- β_1 neutralizing antibody can effectively down-regulate the expression of TGF- β_1 and collagen in mice with chronic colitis, and intestinal fibrosis can be abrogated by targeting TGF- β_1 .

© The Author(s) 2017. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: TGF- β_1 neutralizing antibody; Intestinal fibrosis; Collagen

Dai M, Jin L, Xu WT, Xiong YM, Wang YM, Zheng GR. Effect of TGF- β_1 neutralizing antibody on intestinal fibrosis in a mouse model of chronic colitis induced with trinitrobenzene sulfonic acid. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2017; 25(9): 783-791 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v25/i9/783.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v25.i9.783>

摘要

目的

观察转化生长因子- β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1)中和抗体对2,4,6-三硝基苯磺酸(trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)慢性结肠炎动物模型中小鼠肠道纤维化的影响.

方法

将48只Balb/c小鼠分为正常对照组、TNBS模型组、治疗对照组和TGF- β_1 抗体组, TNBS 6 wk灌肠造模, TGF- β_1 抗体组于每次TNBS灌肠后24 h给予TGF- β_1 抗体灌肠治疗, 光镜下观察结肠组织学变化, RT-PCR检测各组小鼠肠道中I、III、V型胶原蛋白及TGF- β mRNA水平, 免疫组织化学、Western blot检测各组小鼠结肠中TGF- β_1 水平并分析结果.

结果

(1)HE染色和VG胶原蛋白染色发现, TGF- β_1 抗体组小鼠未见大量胶原蛋白聚集, 固有肌层明显增厚, 较TNBS模型组、治疗对照组

改善; (2)TGF- β_1 抗体组结肠I、III、V型胶原蛋白及TGF- β mRNA较TNBS模型组及治疗对照组均降低($P < 0.05$); (3)免疫组织化学、Western blot发现TGF- β_1 抗体组较TNBS模型组及治疗对照组结肠内TGF- β_1 均降低($P < 0.05$).

结论

TGF- β_1 中和抗体拮抗TGF- β_1 , 下调小鼠结肠组织中胶原蛋白的表达, 抑制TNBS慢性结肠炎动物模型纤维化.

© The Author(s) 2017. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: TGF- β_1 中和抗体; 肠道纤维化; 胶原蛋白

核心提要: 通过反复的2,4,6-三硝基苯磺酸灌肠构建模拟克罗恩病(Crohn's disease, CD)慢性肠道纤维化的小鼠动物模型, 应用转化生长因子中和抗体灌肠进行干预性治疗, 发现该中和抗体对CD模型小鼠肠道纤维化形成的治疗效应.

戴萌, 金雷, 徐维田, 熊毅敏, 王一鸣, 郑国荣. TGF- β_1 中和抗体对TNBS慢性结肠炎动物模型纤维化的影响. *世界华人消化杂志* 2017; 25(9): 783-791 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v25/i9/783.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v25.i9.783>

0 引言

克罗恩病(Crohn's disease, CD), 以透壁性炎症为特征, 导致大量异常的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉淀, 从而引发肠道纤维化性狭窄, 并最终导致肠梗阻^[1,2]. 有数据表明, 40%以上病例有程度不等的肠梗阻, 且反复发生, 多数患者在有生之年最终需要手术治疗^[3-5]. 动物模型极大地促进了我们对慢性肠道炎症及纤维化性狭窄机制的了解, 2,4,6-三硝基苯磺酸(trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)慢性结肠炎动物模型是目前较为成功的动物模型之一^[6]. 转化生长因子- β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1)是组织器官纤维化中进程中的关键调节因子, 可直接作用成纤维细胞合成大量的ECM产生促纤维化作用, 可被作为纤维化治疗的靶点^[7]. 我们的前期研究中通过重复的TNBS灌肠建立了TNBS慢性结肠炎动物模型, 可致小鼠结肠肠壁产生纤维化, 以肠道慢性炎症、肠道大量

表 1 各指标RT-PCR引物序列、产物、退火温度及循环次数

指标	引物	产物大小(bp)	退火温度(°C)	循环次数
β -actin	上游引物: 5'-ATGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'	348	55	30
	下游引物: 5'-ATAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'			
Col-I α 2	上游引物: 5'-GGGAGCACCAAGAAGACC-3'	174	45	35
	下游引物: 5'-GCTGGAAAGGAAGGGATT-3'			
Col-III α 1	上游引物: 5'-ACCCATTCTCCCACTCC-3'	241	48	30
	下游引物: 5'-CCCACAGCCTTCTACACCT-3'			
Col-V α 2	上游引物: 5'-CTACATTTCATTTCGCTTA-3'	494	42	30
	下游引物: 5'-CCGCACCTTGATGATTT-3'			
TGF- β	上游引物: 5'-CCATGACATGAACCGACCCT-3'	296	58	30
	下游引物: 5'-CCGGGTTGTGTTGGTTGTAG-3'			

■ 相关报道

有文献报道发现局部注射TGF- β_1 抗体可抑制移植入裸鼠的增生性疤痕, 这种局部注射治疗有助于减少全身不良反应。

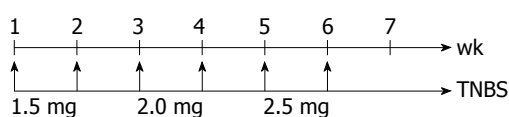


图 1 6 wk TNBS灌肠剂的给予剂量及时间. TNBS: 2,4,6-三硝基苯磺酸.

ECM聚集沉淀为特征, 模拟CD中的疾病特点, 以此为桥梁, 在本研究中采用中和抗体阻断细胞因子拮抗TGF- β_1 , 研究TGF- β_1 中和抗体对肠道纤维化的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组: Balb/c小鼠48只, 体重20-23 g左右, 由武汉大学动物实验中心提供, 许可证号: SCXK(鄂)2008-0004. 实验方案报医院实验动物伦理委员会批准. Balb/c小鼠称质量、编号后, 随机分为正常对照组、TNBS模型组、治疗对照组和TGF- β_1 抗体组, 常规饲料及自由饮水, 饲养室温度为23 °C \pm 1.0 °C, 湿度30%-60%, 中国解放军武汉总医院医学实验中心饲养。

1.1.2 主要试剂和药物: TNBS(购自Sigma公司)5%(W/V)水溶液, 与无水乙醇按比例配成TNBS灌肠剂. TGF- β_1 多克隆抗体、免疫组织化学试剂盒由Santa Cruz工程有限公司提供. 抗兔IgG多克隆抗体购自SIGMA公司。

1.2 方法

1.2.1 结肠炎模型的建立: 造模前小鼠在动物房饲养1 wk, 按照参考文献[6]方法(图1)采用6 wk TNBS灌肠剂诱导Balb/c小鼠慢性结肠炎模型, TNBS在灌肠剂中的剂量逐渐增加。

Balb/c小鼠禁食、不禁饮24 h后, 乙醚麻醉小鼠, 将石蜡油润滑3.5F导管从肛门插入肠道深约5 cm, 正常对照组灌注生理盐水100 μ L, TNBS模型组、治疗对照组和TGF- β_1 中和抗体组每只小鼠灌注TNBS/乙醇溶液100 μ L, 之后将小鼠倒置60 s. TNBS灌肠后24 h后, TGF- β_1 抗体组每只小鼠各自肛门灌浓度为2.0 μ g/mL的TGF- β_1 中和抗体100 μ L, 治疗对照组则灌注生理盐水100 μ L. 整个实验过程每天记录小鼠的体质量、大便性状等, 于最后一次TNBS灌肠后第7天处死所有存活小鼠, 大体观察小鼠结肠形态并收集小鼠结肠. 各组随机取9只进行结果分析。

1.2.2 光镜观察小鼠结肠炎症及纤维化: 在距肛门5 cm处取结肠组织, 制备石蜡切片, 行HE染色及VG染色, 以双盲法观察, 光镜观察肠黏膜损伤及纤维化情况, 于光学显微镜下观察全部切片病理组织学改变, 根据根据Powell等^[8]制定的半定量标准判断胶原纤维增生程度。

1.2.3 RT-PCR检测结肠组织中 I、III、V 型胶原蛋白及TGF- β_1 mRNA: 按照TRIzol试剂盒说明书提取结肠组织总RNA, 再按RT-PCR试剂盒说明书逆转录得cDNA. 合成的引物序列, 扩增条件及产物如表1, 以 β -actin为内参照, PCR反应产物置3%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 免疫组织化学检测肠道组织中TGF- β_1 蛋白表达: 免疫组织化学检查, 取出距肛门5 cm小鼠肠黏膜组织2块常规固定、切片, 染色程序严格按试剂说明书操作, 显微镜观察. 每次染色时用试剂公司提供的TGF- β_1 阳性片作阳性对照, PBS代替第一抗体作为阴性对照. 随机选择5个视野, 取每视野内的平均阳性细胞数

创新盘点

本文观察TGF- β_1 中和抗体灌肠对CD模型小鼠肠道纤维化形成的治疗作用, 目前国内外未见文献报道。

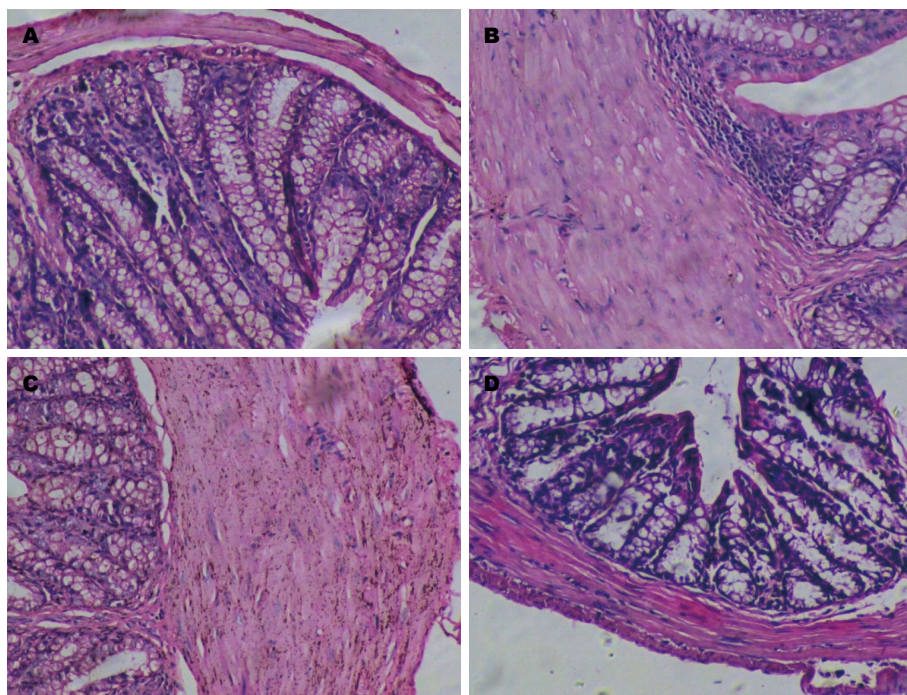


图2 HE染色观察各组小鼠结肠病理特征。A: 正常对照组小鼠结肠表现为正常肠壁; B, C: HE染色的TNBS模型组、治疗对照组小鼠结肠, 可观察上皮细胞破碎, 结肠固有层炎症细胞浸润, 主要位于黏膜及黏膜下层, 以慢性炎性细胞淋巴细胞、单核细胞浸润为主, 黏膜下及固有肌层小血管增生, 固有肌层明显增厚, 致肠腔相对狭窄; D: TGF- β_1 抗体组小鼠肠道炎症已明显改善, 未见固有肌层增厚。TNBS: 2,4,6-三硝基苯磺酸; TGF- β_1 : 转化生长因子- β_1 。

作为计数标准, 以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。

1.2.5 Western blot检测肠道组织中TGF- β_1 蛋白表达: 取结肠组织0.1 g, 按照1:10 (m/V)加入300 μL 组织裂解液和3 μL 蛋白酶抑制剂, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰浴超声匀浆, 15000 r/min离心10 min, 取上清用BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白质浓度。取相同质量的蛋白经DS-PAGE凝胶电泳, 转膜, 转移后的硝酸纤维素膜分别加入分别加入兔抗小鼠TGF- β_1 多克隆抗体(1:500)、HRP标记的抗兔IgG(1:1000), 洗膜后显色、曝光, 通过Image tool图像分析软件读取X光片上目的条带的激光光密度扫描值, 结果用与 β -actin的比值作为内参照。

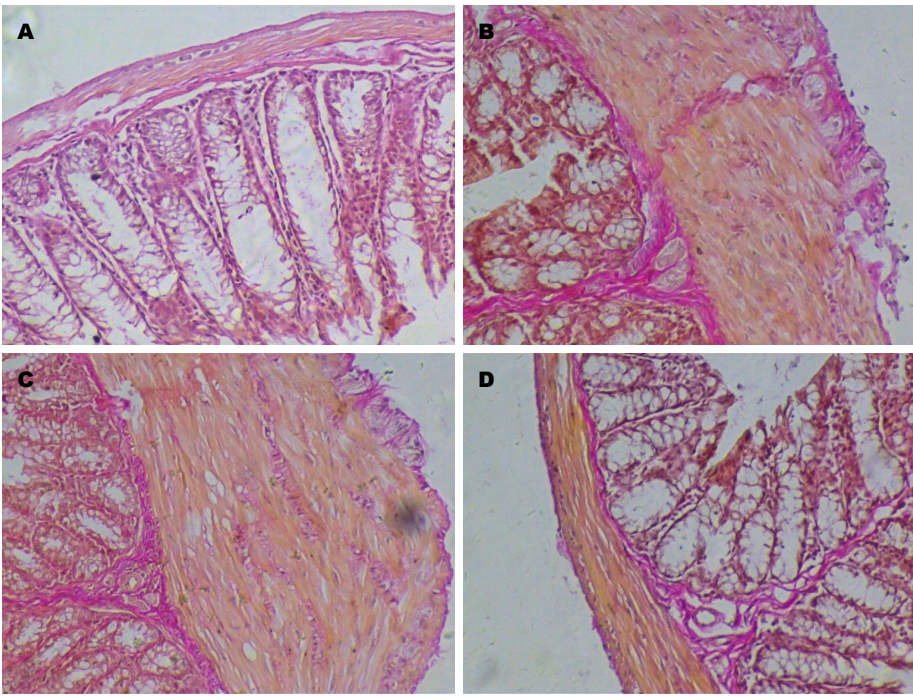
统计学处理 用SPSS11统计软件处理, 检测的计量数据采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 计量资料的分析方法为方差分析, 对方差分析有意义者再采用LSD法进行两两比较; 计数资料采用相对数进行描述, 对其分析方法为 χ^2 检验或精确概率计算; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 从第1次TNBS灌肠开始, TNBS模型组、治疗对照组Balb/c小鼠在灌肠后第1

天起出现不同程度的稀便、少动、毛发无光泽、身体蜷缩、食量减少、体质量下降, 于第2、3天最为明显; 上述症状于第3周达到顶峰, 但在随后的4-6 wk存活的小鼠症状逐渐改善、恢复体质量, 且再无小鼠死亡。TGF- β_1 抗体组小鼠在灌肠后第1天出现与上述对照组小鼠相似的情况, 在TGF- β_1 中和抗体灌肠后则发生变化, 并在此后的每周出现血便、稀便等情况的小鼠减少, 活动性较TNBS模型组、治疗对照组好, 疾病活动指数评分较TNBS模型组、治疗对照组低($P < 0.05$)。各组小鼠DAI评分如下, 正常对照组为 1.38 ± 0.98 ; TNBS模型组为 4.03 ± 1.36 ; 治疗对照组为 3.25 ± 1.58 ; TGF- β_1 抗体组为 1.01 ± 0.06 。正常对照组小鼠则反应灵活、食量正常、体质量增加。TNBS灌肠后1-3 wk内, 治疗对照组、TNBS模型组3只Balb/c小鼠死亡, TGF- β_1 抗体组1只小鼠死亡, 此后再无小鼠死亡。

2.2 小鼠结肠大体病理及组织学改变 TNBS模型组、治疗对照组小鼠远端5-6 cm左右结肠扭曲变形, 肠壁僵直, 增厚, HE染色及VG染色观察各组小鼠的结肠病理特征(图2, 3), 发现TNBS模型组、治疗对照组小鼠结肠可观察



应用要点
此次实验证实TGF- β_1 中和抗体对于2,4,6-三硝基苯磺酸慢性结肠炎模型小鼠肠道纤维化的治疗作用,此实验结果有可能为CD患者肠道纤维化的防治提供新的治疗方法。

图 3 VG染色观察各组小鼠结肠. A: 正常对照组小鼠结肠表现为正常肠壁; B, C: VG染色的TNBS模型组、治疗对照组小鼠结肠,可观察结肠黏膜下和浆膜层的区域显现出大量红色的胶原蛋白沉淀,固有肌层明显增厚,偶可见纤维分隔,致肠腔相对狭窄; D: TGF- β_1 抗体组小鼠肠道红色的胶原蛋白明显减少,未见固有肌层增厚. TNBS: 2,4,6-三硝基苯磺酸; TGF- β_1 : 转化生长因子- β_1 .

表 2 各组小鼠肠道纤维化评分 (n)

分组	-	+	++	+++
正常对照组	8	1	0	0
TNBS模型组 ^a	0	1	2	6
治疗对照组 ^a	1	0	3	5
TGF- β_1 抗体组 ^a	6	2	1	0

^a $P<0.05$ vs 正常对照组; ^b $P<0.05$ vs TNBS模型组; ^c $P<0.05$ vs 治疗对照组. TNBS: 2,4,6-三硝基苯磺酸; TGF- β_1 : 转化生长因子- β_1 .

上皮细胞破碎,杯状细胞减少,主要位于黏膜及黏膜下层,结肠固有层炎症细胞浸润,以慢性炎性细胞淋巴细胞、单核细胞浸润为主,淋巴滤泡增大、增多等慢性结肠炎的组织学改变,黏膜下及固有肌层小血管增生,结肠黏膜下和浆膜层的区域显现出大量胶原蛋白沉淀,固有肌层明显增厚,偶可见纤维分隔,致肠腔狭窄,病变以远端结肠为主.而TGF- β_1 抗体组小鼠肠道炎症已明显改善,未见肠腔狭窄,正常对照组小鼠则表现为正常肠壁. TGF- β_1 抗体组纤维化评分较TNBS模型组、治疗对照组低($P<0.05$),与正常对照组对比无统计学差异($P>0.05$ (表2).

2.3 结肠组织中I, III, V型胶原蛋白及TGF- β_1 的表达 PT-PCR检测发现TGF- β_1 抗体组、正常对照组小鼠结肠组织 I、III、V 型胶原蛋白及TGF- β mRNA表达均低于TNBS模型组、治疗对照组($P<0.05$),而TGF- β_1 抗体组与正常对照组之间无统计学差异($P>0.05$,表3,图4).在蛋白水平,免疫组织化学、Western blot发现TGF- β_1 抗体组、正常对照组小鼠结肠组织TGF- β_1 表达均低于TNBS模型组、治疗对照组($P<0.05$),而TGF- β_1 抗体组与NC组之间无统计学差异($P>0.05$,表4,图5,6).从而说明TGF- β_1 中和抗体灌肠治疗后可降低TGF- β_1 表达,并抑制 I、III、V 型胶原蛋白的mRNA产生.

■ 名词解释

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 为肽链内切酶, 可降解许多重要的细胞外基质蛋白, 如胶原蛋白、层黏连蛋白、纤维连接蛋白等, 其在细胞外基质的代谢调节中起着非常重要的作用, 受许多参与肠壁纤维化的细胞因子和生长因子的同步调控。相反, 组织金属蛋白酶抑制物可抑制MMPs的活性。

表 3 PT-PCR检测各组小鼠结肠组织TGF-β、I、III、V型胶原蛋白mRNA水平 (mean ± SD)

指标	正常对照组	TNBS模型组	治疗对照组	TGF-β ₁ 抗体组
TGF-β mRNA	0.27 ± 0.07	1.01 ± 0.06 ^a	0.99 ± 0.077 ^a	0.36 ± 0.06 ^{ce}
Col-I α2 mRNA	0.32 ± 0.05	1.18 ± 0.08 ^a	1.17 ± 0.11 ^a	0.49 ± 0.08 ^{ce}
Col-III α1 mRNA	0.26 ± 0.06	1.19 ± 0.13 ^a	1.17 ± 0.15 ^a	0.38 ± 0.07 ^{ce}
Col-V α2 mRNA	0.28 ± 0.06	1.20 ± 0.10 ^a	1.22 ± 0.11 ^a	0.37 ± 0.07 ^{ce}

^a*P*<0.05 vs 正常对照组; ^c*P*<0.05 vs TNBS模型组; ^e*P*<0.05 vs 治疗对照组. TNBS: 2,4,6-三硝基苯磺酸; TGF-β₁: 转化生长因子-β₁.

表 4 免疫组织化学、Western blot检测各组小鼠结肠组织TGF-β₁蛋白水平 (mean ± SD)

TGF-β ₁ 蛋白水平	正常对照组	TNBS模型组	治疗对照组	TGF-β ₁ 抗体组
Western blot	0.352 ± 0.03	2.34 ± 0.09 ^a	2.33 ± 0.08 ^a	1.04 ± 0.07 ^{ce}
免疫组织化学	2.11 ± 1.05	8.33 ± 1.80 ^a	8.33 ± 1.22 ^a	3.56 ± 0.73 ^{ce}

^a*P*<0.05 vs 正常对照组; ^c*P*<0.05 vs TNBS模型组; ^e*P*<0.05 vs 治疗对照组. TNBS: 2,4,6-三硝基苯磺酸; TGF-β₁: 转化生长因子-β₁.

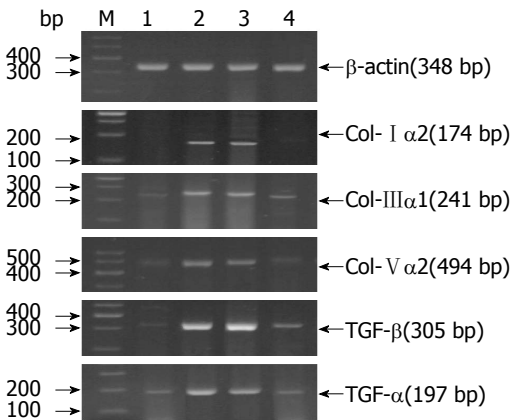


图 4 各组小鼠结肠各指标mRNA的表达. 1泳道: 正常对照组; 2泳道: TNBS模型组; 3泳道: 治疗对照组; 4泳道: TGF-β₁抗体组; TNBS模型组、治疗对照组TNF-α、IL-1β条带较正常对照组、TGF-β₁抗体组明显. TNBS: 2,4,6-三硝基苯磺酸; TGF-β₁: 转化生长因子-β₁.

3 讨论

急性炎症可导致的致肠道间质细胞活化, 转化为能大量合成ECM的纤维型间质细胞, 但受到正常肠道修复机制的调控, 通过对胶原蛋白转录及翻译的调节措施及对活化的纤维型间质细胞促凋亡作用, 阻止了大量ECM沉淀。而慢性炎症可致机体对损伤的修复反应过度, 导致大量ECM的异常沉淀, 从而引发肠壁纤维化性狭窄, 并最终导致肠梗阻^[9,10]。克罗恩并便是典型的代表, 其狭窄肠段主要表现为肠壁各层的

增厚, 尤以黏膜下层及肌层平滑肌细胞区域为主^[11]。正常肠道中, 主要的胶原蛋白亚型为I (70%)、III(20%)和V (12%), 而在CD狭窄肠段中, 亚型I、III、IV、V亚型明显增多, 特别是III和V^[12,13]。大量的胶原蛋白过度沉积, 分隔、延伸至平滑肌细胞之间, 最终导致了肠壁结构破坏及增厚, 产生类似瘢痕收缩式的肠腔狭窄^[14,15]。

TGF-β家族在哺乳动物细中包括TGF-β₁、TGF-β₂和TGF-β₃ 3种形式, TGF-β₁在体细胞中所占比例最高(>90%), 活性最强。TGF-β₁是一种多效细胞因子, 是组织器官纤维化中进程中的关键调节因子^[16-20], 支持这一理论的有利证据是发现CD狭窄肠道中成纤维细胞中的TGF-β₁及其受体均过度表达^[21,22]。TGF-β₁在胶原大量合成时抑制ECM降解酶, 即基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)和纤溶酶原蛋白酶的活性, 通过刺激基质金属蛋白酶抑制剂-1的产生而抑制MMP-1和MMP-3的表达^[23]。另外, TGF-β₁可直接作用成纤维细胞合成大量的ECM产生促纤维化作用。大部分研究^[24-26]表明抑制TGF-β/Smad信号途径可抑制持续存在的慢性炎症和纤维化。因此TGF-β₁可作为治疗纤维化的靶点, 有研究表明采用细胞因子单克隆抗体拮抗TGF-β₁的生物学效应, 同时还能阻止肝星状细胞自分泌TGF-β₁, 另外有研究^[27]报

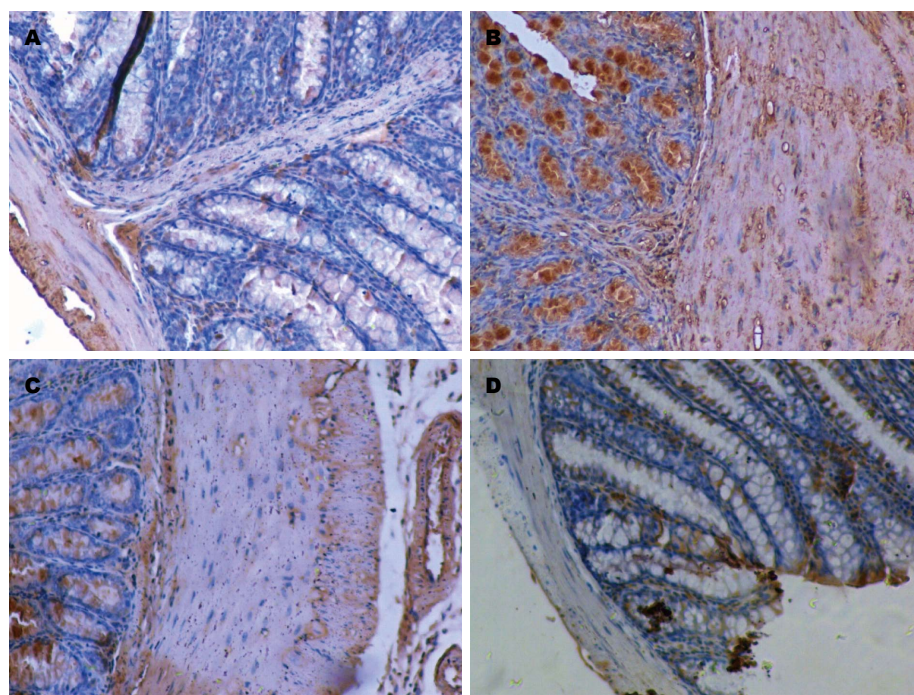


图 5 免疫组织化学观察各组小鼠肠道TGF- β_1 . A, D: 显示正常对照组未见、TGF- β_1 抗体组结肠组织中可见少量的TGF- β_1 阳性细胞; B, C: 显示TNBS模型组、治疗对照组小鼠结肠各层组织均可见大量的TGF- β_1 阳性细胞. TNBS: 2,4,6-三硝基苯磺酸; TGF- β_1 : 转化生长因子- β_1 .

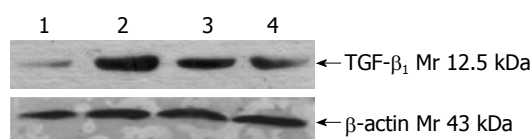


图 6 Western blot观察各组小鼠肠道TGF- β_1 蛋白水平. 1泳道: 正常对照组; 2泳道: TNBS模型组; 3泳道: 治疗对照组; 4泳道: TGF- β_1 抗体组; TNBS模型组、治疗对照组条带较正常对照组、TGF- β_1 抗体组明显. TNBS: 2,4,6-三硝基苯磺酸; TGF- β_1 : 转化生长因子- β_1 .

道, TGF- β_1 抗体可能通过抑制 I 型胶原蛋白及基质金属蛋白酶抑制因子-1的基因表达, 拮抗了TGF- β_1 的致肝纤维化作用, 对肝纤维化的逆转起到了一定的治疗作用. Qiu等^[28]发现局部注射TGF- β_1 抗体可抑制移植入裸鼠的增生性疤痕. 因此TGF- β_1 抗体可成为治疗纤维化的新方向^[29,30], 但目前国内外均无文献报道, TGF- β_1 抗体是否可治疗肠道纤维化.

此次实验中采用TNBS反复灌肠诱导小鼠结肠炎的反复, 这种反复的及扩大的肠道炎症促进间质细胞的激活并产生大量的ECM, 导致肠壁的纤维化的形成. 随后经TGF- β_1 中和抗体治疗后的TNBS慢性结肠炎模型小鼠, 无论是急性炎症期或慢性炎症期, 症状较模型及治疗对照组小鼠明显减轻, 减少 I、III、V 型胶

原蛋白的mRNA生成, 更为重要的是VG胶原蛋白染色显示, 治疗后小鼠缺少纤维化组织结构和异常胶原聚集. 这种TGF- β_1 中和抗体对TNBS慢性结肠炎动物模型小鼠的治疗作用, 考虑与抑制了TGF- β_1 促进纤维化作用相关. 但TGF- β_1 中和抗体是否因其广泛的抗纤维化及其他生物学效益从而引发不良反应, 且局部灌肠治疗是否有助于减少不良反应有待下一步在动物试验中继续观察.

总之, 本研究证实了TGF- β_1 中和抗体能有效抑制TNBS诱导Balb/c小鼠慢性结肠炎动物模型结肠组织中 I、III、V 型胶原蛋白的mRNA生成, 改善肠壁纤维化. 因此, 具有抗纤维化治疗效.

4 参考文献

- 1 Ince MN, Elliott DE. Immunologic and molecular mechanisms in inflammatory bowel disease. *Surg Clin North Am* 2007; 87: 681-696 [PMID: 17560420 DOI: 10.1016/j.suc.2007.03.005]
- 2 Thienpont C, Van Assche G. Endoscopic and medical management of fibrostenotic Crohn's disease. *Dig Dis* 2014; 32 Suppl 1: 35-38 [PMID: 25531351 DOI: 10.1159/000367824]
- 3 Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2011; 140: 1785-1794 [PMID: 21530745 DOI: 10.1053/j.gastro.2011.05.005]

同行评价

本研究立意较新颖, 课题设计合理, 数据统计分析可信. 此实验结果有可能为CD的临床治疗, 尤其是CD患者肠道纤维化的防治开辟一条新的途径.

- 10.1053/j.gastro.2011.01.055]
- 4 Gearry RB, Richardson AK, Frampton CM, Dodgshun AJ, Barclay ML. Population-based cases control study of inflammatory bowel disease risk factors. *J Gastroenterol Hepatol* 2010; 25: 325-333 [PMID: 20074146 DOI: 10.1111/j.1440-1746.2009.06140.x]
- 5 Van Assche G, Geboes K, Rutgeerts P. Medical therapy for Crohn's disease strictures. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 55-60 [PMID: 15058528 DOI: 10.1097/00054725-200401000-00009]
- 6 Lawrance IC, Wu F, Leite AZ, Willis J, West GA, Fiocchi C, Chakravarti S. A murine model of chronic inflammation-induced intestinal fibrosis down-regulated by antisense NF-kappa B. *Gastroenterology* 2003; 125: 1750-1761 [PMID: 14724828 DOI: 10.1053/j.gastro.2003.08.027]
- 7 Loeuillard E, Bertrand J, Herranen A, Melchior C, Guérin C, Coëffier M, Aziz M, Déchelotte P, Savoye G, Marion-Letellier R. 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced chronic colitis with fibrosis and modulation of TGF- β_1 signaling. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 18207-18215 [PMID: 25561788 DOI: 10.3748/wjg.v20.i48.18207]
- 8 Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 1999; 277: C183-C201 [PMID: 10444394]
- 9 Pucilowska JB, Williams KL, Lund PK. Fibrogenesis. IV. Fibrosis and inflammatory bowel disease: cellular mediators and animal models. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G653-G659 [PMID: 11005750]
- 10 Fiocchi C, Lund PK. Themes in fibrosis and gastrointestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: G677-G683 [PMID: 21415411 DOI: 10.1152/ajpgi.00104.2011]
- 11 Latella G, Di Gregorio J, Flati V, Rieder F, Lawrance IC. Mechanisms of initiation and progression of intestinal fibrosis in IBD. *Scand J Gastroenterol* 2015; 50: 53-65 [PMID: 25523556 DOI: 10.3109/00365521.2014.968863]
- 12 McCormick BA. Using Salmonella enterica serotype typhimurium to model intestinal fibrosis. *Gastroenterology* 2008; 134: 872-875 [PMID: 18242605 DOI: 10.1053/j.gastro.2008.01.019]
- 13 Beddy D, Mulsow J, Watson RW, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Expression and regulation of connective tissue growth factor by transforming growth factor beta and tumour necrosis factor alpha in fibroblasts isolated from strictures in patients with Crohn's disease. *Br J Surg* 2006; 93: 1290-1296 [PMID: 16838391 DOI: 10.1002/bjs.5431]
- 14 Rieder F, Zimmermann EM, Remzi FH, Sandborn WJ. Crohn's disease complicated by strictures: a systematic review. *Gut* 2013; 62: 1072-1084 [PMID: 23626373 DOI: 10.1136/gutjnl-2012-304353]
- 15 Grassl GA, Valdez Y, Bergstrom KS, Vallance BA, Finlay BB. Chronic enteric salmonella infection in mice leads to severe and persistent intestinal fibrosis. *Gastroenterology* 2008; 134: 768-780 [PMID: 18325390 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.12.043]
- 16 Deng YL, Xiong XZ, Cheng NS. Organ fibrosis inhibited by blocking transforming growth factor- β signaling via peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2012; 11: 467-478 [PMID: 23060391 DOI: 10.1016/S1499-3872(12)60210-0]
- 17 Rieder F, Fiocchi C. Mechanisms of tissue remodeling in inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 2013; 31: 186-193 [PMID: 24030223 DOI: 10.1159/000353364]
- 18 Rieder F, Fiocchi C. Intestinal fibrosis in IBD-a dynamic, multifactorial process. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2009; 6: 228-235 [PMID: 19347014 DOI: 10.1038/nrgastro.2009.31]
- 19 Sans M, Masamunt MC. [Fibrogenesis and inflammatory bowel disease]. *Gastroenterol Hepatol* 2007; 30: 36-41 [PMID: 17266880 DOI: 10.1157/13097449]
- 20 Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors* 2011; 29: 196-202 [PMID: 21740331 DOI: 10.3109/08977194.2011.595714]
- 21 McKaig BC, Hughes K, Tighe PJ, Mahida YR. Differential expression of TGF-beta isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C172-C182 [PMID: 11742810 DOI: 10.1152/ajpcell.00048.2001]
- 22 Lawrance IC, Maxwell L, Doe W. Inflammation location, but not type, determines the increase in TGF-beta1 and IGF-1 expression and collagen deposition in IBD intestine. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7: 16-26 [PMID: 11233656 DOI: 10.1097/00054725-200102000-00003]
- 23 Warnaar N, Hofker HS, Maathuis MH, Niesing J, Bruggink AH, Dijkstra G, Ploeg RJ, Schuurs TA. Matrix metalloproteinases as profibrotic factors in terminal ileum in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 863-869 [PMID: 16954805 DOI: 10.1097/01.mib.0000231568.43065.ed]
- 24 Zanninelli G, Vetusch A, Sferra R, D'Angelo A, Fratticci A, Continenza MA, Chiaramonte M, Gaudio E, Caprilli R, Latella G. Smad3 knock-out mice as a useful model to study intestinal fibrogenesis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1211-1218 [PMID: 16534873 DOI: 10.3748/wjg.v12.i8.1211]
- 25 Gauldie J, Bonniaud P, Sime P, Ask K, Kolb M. TGF-beta, Smad3 and the process of progressive fibrosis. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 661-664 [PMID: 17635115 DOI: 10.1042/BST0350661]
- 26 Alonso-Merino E, Martín Orozco R, Ruiz-Llorente L, Martínez-Iglesias OA, Velasco-Martín JP, Montero-Pedrazuela A, Fanjul-Rodríguez L, Contreras-Jurado C, Regadera J, Aranda A. Thyroid hormones inhibit TGF- β signaling and attenuate fibrotic responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113: E3451-E3460 [PMID: 27247403 DOI: 10.1073/pnas.1506113113]
- 27 李书香. TGF- β_1 抗体对肝星状细胞 I 型胶原及 TIMP-1 基因表达的影响. 石家庄: 河北医科大学, 2008
- 28 Qiu SS, Dotor J, Hontanilla B. Effect of P144® (Anti-TGF- β) in an "In Vivo" Human Hypertrophic Scar Model in Nude Mice. *PLoS One* 2015; 10: e0144489 [PMID: 26720517 DOI: 10.1371/journal.pone.0144489]
- 29 Fan X, Zhang Q, Li S, Lv Y, Su H, Jiang H, Hao Z. Attenuation of CCl4-induced hepatic fibrosis

in mice by vaccinating against TGF- β_1 . *PLoS One* 2013; 8: e82190 [PMID: 24349218 DOI: 10.1371/journal.pone.0082190]

30 Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, Kos-

Kudła B. Transforming growth factor β_1 (TGF β_1) in physiology and pathology. *Endokrynol Pol* 2013; 64: 384-396 [PMID: 24186596 DOI: 10.5603/EP.2013.0022]

编辑: 马亚娟 电编: 李瑞芳



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 © 2017 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与《世界华人消化杂志》的合法权益, 本刊对修回稿要求如下.

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部.

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见发给作者修改, 而作者必须于15天内将单位介绍信、作者复核要点承诺书、版权转让信等书面材料电子版发回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期发回的, 作重新投稿处理.

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》等国外相关文摘与检索系统收录.



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
8226 Regency Drive, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

