

辛伐他汀对大鼠克罗恩病结肠纤维连接蛋白表达的影响

梁美兰,徐新寓,巩尧瑶,林琳

(南京医科大学第一附属医院消化科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:观察辛伐他汀对大鼠克罗恩病(Crohn's disease, CD)结肠纤维连接蛋白(fibronectin, FN)表达的影响和机制。方法:采用 2,4,6-三硝酸苯磺酸(TNBS)灌肠制备大鼠克罗恩病模型。SD 大鼠分为对照组、模型组、辛伐他汀(5,20 mg/kg)组,21 d 后进行结肠组织学和纤维化评分;RT-PCR 测定结肠组织中 FN, FN ED-A 及 FN ED-B mRNA, Western blot 检测 FN 及 p-MYPT-1(Rho 激酶活化的标志)蛋白表达。结果:与对照组相比,模型大鼠结肠组织学和纤维化评分明显升高, FN 表达增多($P < 0.01$),辛伐他汀干预后,结肠纤维化评分、FN 及 p-MYPT-1 的表达均下降($P < 0.05$)。结论:辛伐他汀能抑制 TNBS 诱导的大鼠结肠炎结肠 FN 的表达,其机制可能与抑制 Rho 激酶活化有关,提示辛伐他汀对 CD 肠纤维有抑制作用。

[关键词] 辛伐他汀; 克罗恩病; 纤维连接蛋白; Rho 激酶; 纤维化

[中图分类号] Q786;R574

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)05-655-04

Effect of simvastatin on fibronectin expression in the colon in rats with Crohn's disease

LIANG Mei-lan, XU Xin-yu, GONG Yao-yao, LIN Lin

(Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of simvastatin on fibronectin expression in the colon of rats with Crohn's disease (CD). **Methods:** The CD model was established in rats by intracolonic administration of 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS). SD rats were divided into the control group, model group, model group with simvastatin (5,20 mg/kg) group. Colonic histologic and fibrotic scores were assessed after 21 days. RT-PCR was used to detect the mRNA expression of FN, FN ED-A and FN ED-B. Western blotting was used to detect the protein expression of FN and p-MYPT-1 (representing activity of Rho-kinase). **Results:** In comparison with the control group, the score of histology and fibrosis, and the expression of FN and p-MYPT-1 in colonic tissue were increased obviously in the model group ($P < 0.01$), and reduced after administration of simvastatin ($P < 0.05$). **Conclusions:** Simvastatin is effective in preventing colonic FN expression in TNBS-induced colitis, which may result from the inhibition of the activity of Rho-kinase. It is suggested that simvastatin may prevent intestinal fibrosis in CD.

[Key words] simvastatin; Crohn's disease; fibronectin; Rho-kinase; fibrosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 655-658]

肠纤维化是克罗恩病 (Crohn's disease, CD) 常见并发症, 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度积聚是 CD 肠纤维化的特征性改变^[1]。ECM 包括多种胶原 (I 型、III 型和 IV 型)、层连蛋白、纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 等^[2], 它的产生涉及多种细胞和生长因子。近年来研究发现, FN 不仅是 ECM 的主要成分, 而且介导结肠固有层成纤维细胞 (colonic lamina propria fibroblasts, CLPF) 迁移、增殖和分化, 在肠纤维化中起重要作用^[3]。辛伐他汀 (simvastatin) 是 3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶 (HMA-CoA) 抑制剂, 除降血脂作用外, 还具有抗炎、

抗氧化及抗纤维化等作用^[4-5]。本文通过 2,4,6-三硝酸苯磺酸 (TNBS) 诱导的大鼠 CD 模型, 观察辛伐他汀对大鼠 CD 结肠纤维化 FN 表达的影响, 探讨辛伐他汀对肠纤维化的防治作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

32 只健康雄性 SD 大鼠, 体重 200~250 g (南京医科大学动物实验中心提供), 普通饲料喂养 1 周后, 随机分为 4 组 ($n = 8$): 对照组、模型组、辛伐他汀低剂量组和辛伐他汀高剂量组。模型组按参考

文献[6]造模:大鼠禁食不禁水 24 h,乙醚轻度麻醉,将聚乙烯管自肛门插入约 8 cm,按 150 mg/kg 给予 TNBS (美国 Sigma 公司)50%乙醇溶液一次性灌肠,保持肛门抬高 3 min。对照组以等体积的 0.9%氯化钠溶液一次性灌肠。辛伐他汀治疗组每日分别给予辛伐他汀 (美国默克公司)5、20 mg/kg 溶于等体积的生理盐水灌胃,从造模后第 1~21 天结束;对照组和模型组均灌入等体积的 0.9%氯化钠溶液。

1.2 方法

1.2.1 结肠大体及组织学评分

21 d 后,予大鼠 10%水合氯醛腹腔麻醉,取肛门至回盲瓣全部肠段,先进行肉眼大体形态评分,并取结肠病变最明显处 1 cm 肠管,4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,用于 HE、Masson 染色并进行结肠纤维化评分^[7]。其余结肠组织置-80℃液氮冻存用于检测其他指标。

1.2.2 RT-PCR 检测结肠组织 FN、FN ED-A、FN ED-B mRNA 的表达

结肠组织总 RNA 按 TRIzol 试剂说明书提取,并用逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA,以此 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。取 5 μl 反应产物行琼脂糖凝胶电泳后照相,用凝胶成像系统进行灰度扫描,以 β-actin 作为参考标准,以目的条带与 β-actin 积分吸光度的比值表示。

1.2.3 Western blot 检测结肠组织 FN 及 p-MYPT-1 (Rho 激酶活化标志)的表达

常规提取组织蛋白,ABC 法测定蛋白浓度,蛋白上样量为 80 μg,10%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭

1.5 h,加入稀释的 FN 一抗(工作浓度 1:1 000)、和 p-MYPT-1 一抗(工作浓度 1:500)、MYPT-1 一抗(工作浓度 1:1 000)或 β-actin 一抗(工作浓度 1:4 000),4℃过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,37℃孵育 1.5 h,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加 ECL 显色液至膜上 3~5 min、曝光、显影。凝胶成像分析系统处理数据,目的蛋白与 β-actin 灰度比值代表目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS17.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结肠组织学及 Masson 胶原染色

模型组大鼠结肠可见大量的炎性细胞浸润,黏膜下水肿、增厚,纤维结缔组织增生。Masson 胶原染色可见黏膜层及黏膜下层有胶原纤维强表达,以黏膜下层最明显;辛伐他汀治疗组大鼠结肠黏膜全层少量炎性细胞浸润,Masson 染色见少量胶原表达;正常大鼠结肠组织无明显改变(图 1)。Masson 染色纤维化评分:与对照组比较,模型组明显增加($P < 0.01$);低剂量和高剂量辛伐他汀组纤维化评分较模型组明显下降($P < 0.05$),仍高于正常大鼠($P < 0.05$),高低剂量组间无显著差异($P > 0.05$,图 2)。

2.2 结肠组织中 FN 表达

与对照组相比,模型组大鼠结肠组织中 FN 表达均显著增加($P < 0.01$),辛伐他汀治疗组结肠中

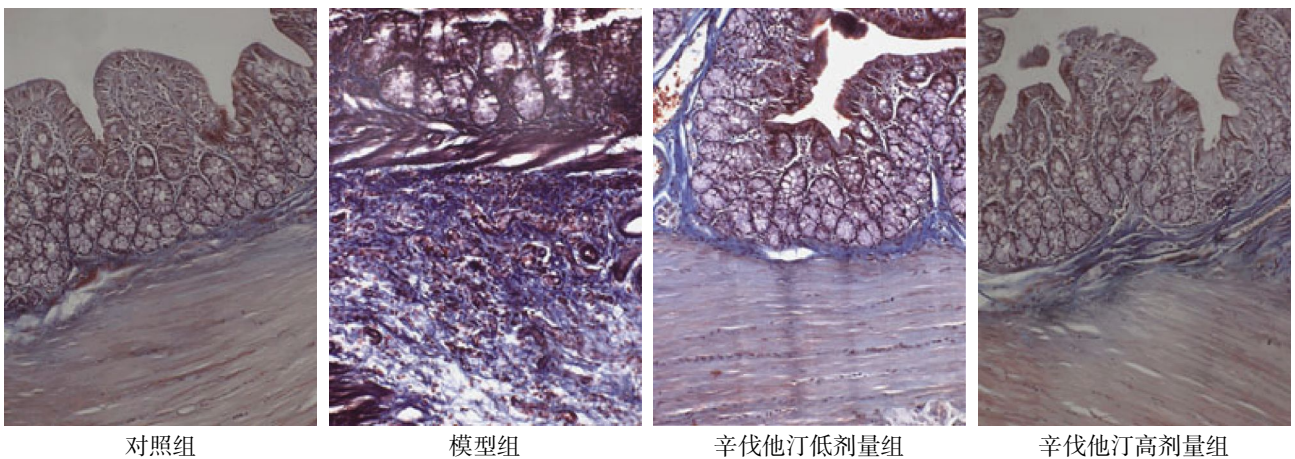
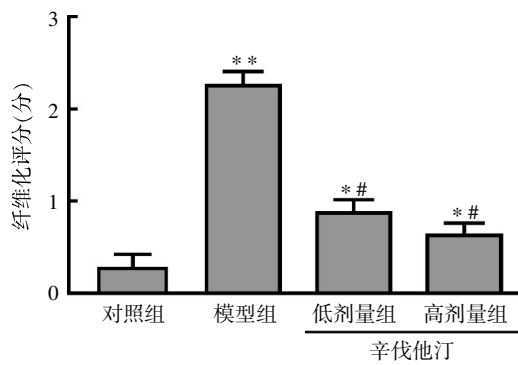


图 1 各组大鼠结肠组织(Masson, × 200)

Figure 1 The Masson staining of the colon tissues in each group (× 200)



与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠结肠组织纤维化评分

Figure 2 Colonic fibrotic scores in each group

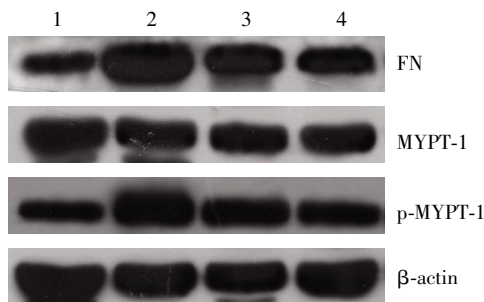
表 1 各组大鼠结肠 FN 及 p-MYPT-1 表达的比较

Table 1 Comparison of the mRNA and protein expressions of FN and p-MYPT-1 in each group

($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	FN		FN ED-A	FN ED-B	p-MYPT-1
	mRNA	蛋白			
对照组	0.59 ± 0.11	0.52 ± 0.13	0.54 ± 0.10	0.53 ± 0.16	0.47 ± 0.14
模型组	1.13 ± 0.27**	1.07 ± 0.14**	1.19 ± 0.36**	1.19 ± 0.29**	0.97 ± 0.30**
辛伐他汀低剂量组	0.84 ± 0.12**	0.76 ± 0.12**	0.83 ± 0.29**	0.89 ± 0.34**	0.68 ± 0.22**
辛伐他汀高剂量组	0.68 ± 0.12** Δ	0.62 ± 0.20** Δ	0.66 ± 0.11** Δ	0.70 ± 0.22** Δ	0.59 ± 0.27**

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$; 与辛伐他汀低剂量组比较, $\Delta P < 0.05$ 。



1: 对照组; 2: 模型组; 3: 辛伐他汀低剂量组; 4: 辛伐他汀高剂量组。

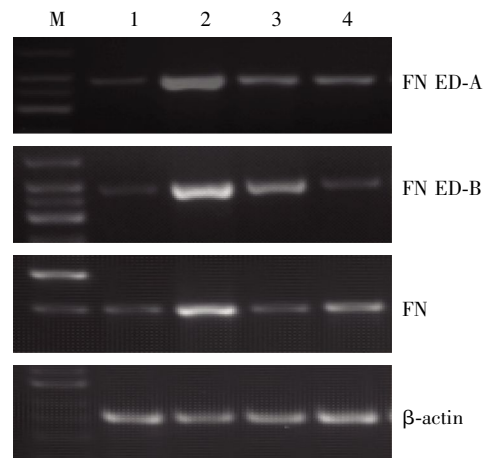
图 3 各组大鼠结肠 FN 及 p-MYPT-1 蛋白的表达

Figure 3 The protein expressions of FN and p-MYPT-1 in each group

FN 较模型组降低($P < 0.05$),但仍高于对照组大鼠($P < 0.05$)。高剂量组 FN 表达低于低剂量组($P < 0.05$,表 1,图 3)。FN、FN ED-A 及 FN ED-B mRNA 表达与蛋白一致(图 4)。

2.3 结肠组织中 p-MYPT-1 的表达

对照组中大鼠结肠组织中 p-MYPT-1 呈低表达,模型组大鼠结肠组织 p-MYPT-1 表达较对照组明显增加($P < 0.01$),辛伐他汀治疗组结肠中 p-MYPT-1 较模型组降低($P < 0.05$),仍高于对照组大鼠($P < 0.05$)。高低剂量组间无明显差异($P > 0.05$,表 1,图 3)。



M: DNA Marker; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: 辛伐他汀低剂量组; 4: 辛伐他汀高剂量组。

图 4 各组大鼠结肠 FN ED-A、FN ED-B 及 FN mRNA 的表达
Figure 4 The mRNA expressions of FN ED-A, FN ED-B and FN in each group

3 讨论

CD 是一种病因未明的胃肠肉芽肿性慢性炎症性疾病,长期慢性炎症刺激使肠道间质细胞过度增殖、肠壁 ECM 大量沉积、肠道肌层过度增生,导致肠壁纤维化、肠腔狭窄和梗阻,加重患者临床症状,是 CD 常见而严重并发症之一。据报道超过 1/3 的 CD 患者发生肠纤维化和狭窄^[2]。虽然目前 CD 的治疗取得了长足的进步,药物治疗能够有效缓解 CD 炎症反应,但不能改变疾病的自然病程和纤维化的发生。肠切除和狭窄成形术仍然是目前治疗 CD 肠纤维化、狭窄的主要治疗措施,但术后复发率高^[2],

仍缺乏有效的药物预防和治疗手段。

肠纤维化是多因素、多环节参与的过程,包括细胞、细胞因子、ECM 等因素的综合作用^[7]。FN 是 ECM 的主要成分,具有多种生物学活性和功能,介导细胞与基质的黏附、影响细胞生长、分化和运动。FN 合成增加说明 ECM 合成增多。FN 基因结构主要由 I 型、II 型、III 型 3 种同源重复的次级单元构成,

FN的mRNA存在3个剪切可变区,即V、ED-A和ED-B剪切位点区,这3个可变剪切区不同的剪切和拼接决定FN结构的多型性及功能的多样性。研究发现,在CD瘻管中, FN ED-A和ED-B几乎无表达,但在纤维化的肠黏膜中, FN总蛋白、FN ED-A、ED-B表达均明显增多^[8]。本研究观察到CD大鼠结肠组织FN mRNA和蛋白、FN ED-A及FN ED-B mRNA表达均显著增强,结合病理组织学特征,说明结肠纤维化是CD大鼠的主要病理表现,与文献报道一致^[8]。Brenmoehl等^[9]在成纤维细胞的无血清培养液中加入FN后,成纤维细胞I、III型前胶原合成增多,是纤维化逐渐加重的重要原因。本实验给予不同剂量的辛伐他汀均可减少FN的合成,并在一定范围内呈剂量依赖性,说明辛伐他汀可通过抑制FN的合成起到抗纤维化的作用。

辛伐他汀的抗纤维化作用机制尚不清楚,可能涉及多种信号通路。研究证实Rho激酶在CD纤维化病理机制中起关键作用。Rho激酶属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员,为小G蛋白Rho下游最主要信号分子。Rho激活后活化Rho激酶、p-MYPT-1^[10],从而调节细胞多种生物学功能。Haydont等^[11]发现有肠纤维化病变的患者结肠和回肠组织中Rho激酶显著活化,表现为p-MYPT-1水平上调。本实验发现,CD大鼠结肠中p-MYPT-1水平上调,Rho激酶活化增多;辛伐他汀可明显下调大鼠CD结肠p-MYPT-1水平,抑制Rho激酶活化。也有研究表明,他汀类药物可抑制Rho激酶活化、阻碍信号转导,减少ECM的合成,抑制肺、肾等器官纤维化^[12]。因此,辛伐他汀可能通过影响Rho激酶活化发挥抗纤维作用。

上述结果提示,辛伐他汀减少CD大鼠结肠组织中FN的合成,减轻肠纤维化,其机制可能与辛伐他汀抑制Rho激酶活化有关。

[参考文献]

- [1] Theiss AL, Fruchtmann S, Lund PK. Growth factors in inflammatory bowel disease: the actions and interactions of growth hormone and insulin-like growth factor- I [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2004, 10(6): 871-880
- [2] Burke JP, Mulsow JJ, O'Keane C, et al. Fibrogenesis in Crohn's disease [J]. *Am J Gastroenterol*, 2007, 102(2): 439-448
- [3] Leeb SN, Vogl D, Grossmann J, et al. Autocrine fibronectin-induced migration of human colonic fibroblasts [J]. *Am J Gastroenterol*, 2004, 99(2): 335-340
- [4] Ikeda M, Takeshima F, Isomoto H, et al. Simvastatin attenuates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis, but not oxazolone-induced colitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(7): 1869-1875
- [5] Abe Y, Murano M, Murano N, et al. Simvastatin attenuates intestinal fibrosis independent of the anti-inflammatory effect by promoting fibroblast/myofibroblast apoptosis in the regeneration/healing process from TNBS-induced colitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(2): 335-344
- [6] Latella G, Sferra R, Vetusch A, et al. Prevention of colonic fibrosis by *Boswellia* and *Scutellaria* extracts in rats with colitis induced by 2,4,5-trinitrobenzene sulphonic acid [J]. *Eur J Clin Invest*, 2008, 38(6): 410-420
- [7] Rieder F, Fiocchi C. Intestinal fibrosis in IBD--a dynamic, multifactorial process [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2009, 6(4): 228-235
- [8] Brenmoehl J, Lang M, Hausmann M, et al. Evidence for a differential expression of fibronectin splice forms ED-A and ED-B in Crohn's disease (CD) mucosa [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2007, 22(6): 611-623
- [9] Brenmoehl J, Falk W, Göke M, et al. Inflammation modulates fibronectin isoform expression in colonic lamina propria fibroblasts (CLPF) [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2008, 23(10): 947-955
- [10] Cardinale CJ, Washburn RS, Tadigotla VR, et al. Termination factor Rho and its cofactors NusA and NusG silence foreign DNA in *E. coli* [J]. *Science*, 2008, 320(5878): 935-938
- [11] Haydont V, Bourgier C, Pocard M, et al. Pravastatin inhibits the Rho/CCN2/extracellular matrix cascade in human fibrosis explants and improves radiation-induced intestinal fibrosis in rats [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(18 Pt 1): 5331-5340
- [12] Gojo A, Utsunomiya K, Taniguchi K, et al. The Rho-kinase inhibitor, fasudil, attenuates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 568(1-3): 242-247

[收稿日期] 2011-12-21