

· 基础研究 ·

巨细胞病毒感染小鼠结肠中肠三叶因子的表达及更昔洛韦的干预作用*

刘芹, 王军[△], 叶黎离, 郑玉艳, 刘文强, 杨倩倩

(徐州医学院附属医院, 江苏徐州 221000)

摘要:目的 观察肠三叶因子(ITF/TFF3)在鼠巨细胞病毒(MCMV)感染小鼠结肠中的表达及更昔洛韦的干预作用。方法 将 48 只 4 周龄 BALB/c 小鼠, 随机分为空白组、病毒组及更昔洛韦(GCV)组, 每组 8 只。病毒组和 GCV 组分别腹腔接种致半数细胞感染量(TCID₅₀ = 10^{5.31}/mL)的 MCMV 病毒悬液 100 μL, GCV 组在接种 MCMV 24 h 后 GCV 50 mg/kg, 每天 1 次, 腹腔注射, 连续 14 d, 同时病毒组和空白组分别给予同等剂量的生理盐水作为对照。定量 PCR 检测肝脏、结肠 MCMV-DNA; 采用实时定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 ITF mRNA 表达水平。结果 病毒组小鼠明显出现食欲差、活动少; 皮毛稀松、对刺激反应迟钝、生长迟缓、体质量不增等表现。病毒组肝脏、结肠组织有 MCMV-DNA 表达, GCV 组亦有表达, 但弱于病毒组。GCV 组与病毒组相比 ITF mRNA 表达升高, 差异有统计学意义(P < 0.05); 病毒组与空白组相比 ITF mRNA 表达水平升高, 差异有统计学意义(P < 0.05)。结论 ITF 是一类较新的肠黏膜保护因子, 在 MCMV 感染后所导致的急性肠道炎症损伤过程中发挥着重要的保护作用。

关键词:巨细胞病毒感染; 小鼠; 结肠; 肠三叶因子; 更昔洛韦

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.30.024

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)30-3653-03

The expression of intestinal trefoil factor(ITF) in colon of cytomegalovirus infected mouse and the involvement of ganciclovir*

Liu Qin, Wang Jun[△], Ye Lili, Zheng Yuyan, Liu Wenqiang, Yang Qianqian

(Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221000, China)

Abstract: Objective To observe the expression of ITF in colon of mice infected by mouse cytomegalovirus(MCMV) and the involvement of ganciclovir(GCV). **Methods** Forty-eight BALB/c young mice were randomly divided into blank group, virus group and GCV group, each with 8 mice. Mice in virus group and GCV group received injection of 100 μL MCMV virus suspension (TCID₅₀ 105.31 /mL), and GCV group was given intraperitoneal injection of GCV once a day at the dose of 50 mg/kg from day 0 (24 hours after vaccination of virus), for 14 days. At the same time the virus group and blank group were given the same dose of normal saline as controls. Murine cytomegalovirus loads in livers and colons were measured by PCR. The expression levels of ITF in mRNA in colon were detected by RT-PCR. **Results** After MCMV injection, mice in virus group manifested aggressively apparent poor appetite, less activity, fur laxly, unresponsiveness to stimuli, growth retardation, body weight not increased. All liver and colon tissue MCMV-DNA PCR electrophoresis of virus group had positive strip, while the blank group did not. GCV group also showed less bright positive strip when compared with the virus group. Expression level of ITF mRNA was significant higher in GCV group than virus group, there was statistically significant difference(P < 0.05). Expression of ITF mRNA in virus group were higher than that in blank group, there was statistical difference(P < 0.05). **Conclusion** ITF is regarded as a fast reaction peptide in the course of mucosa impairments, so ITF plays a protective role in delayed healing process after acute MCMV infection.

Key words: cytomegalovirus infection; mice; colon; intestinal trefoil factor; ganciclovir

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)属于疱疹病毒亚科, 是导致胃肠道感染的常见病原体^[1]。在发展中国家, 高达 80% 的儿童在 3 岁前就已经感染 HCMV。HCMV 结肠炎患者的结肠内可见的大面积的溃疡, 患者因久治不愈会造成中毒性结肠扩张、肠穿孔、肠息肉、肠癌、肠狭窄和肠梗阻等, 甚至危及生命^[2]。CMV 具有严格的种属特异性, 但鼠巨细胞病毒(murine cytomegalovirus, MCMV)和 HCMV 在基因及核酸水平有很多相似性^[3], 为本研究 CMV 感染机制提供了依据。肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF/TFF3)属于三叶因子家族肽^[4], 是一类较新的肠黏膜保护因子, 在肠黏膜的保护和损伤修复中发挥重要作用。它既能与黏液糖蛋白结合成凝胶, 增强黏膜防御功能, 又可以促上皮细胞移动, 加速损伤修复, 保持肠黏膜完整, 从而限制了组织流动, 电解质丢失, 减轻了免疫所致的肠道炎症反应^[5-7]。本文参照文献^[8]建立小鼠

CMV 感染模型。并在其基础上研究 ITF 的表达情况, 探讨 ITF 在 MCMV 感染中的作用。

1 材料与方法

1.1 病毒和细胞培养 小鼠 NIH/3T3 细胞及 MCMV Smith 毒株由山东省医学科学院微生物研究所提供。小鼠 NIH/3T3 细胞按常规方法培养传代^[8]。MCMV Smith 毒株小鼠体内传毒健康纯系 BALB/c 小鼠(购自徐州医学院实验动物中心, 饲养在徐州医学院动物室清洁层柜内), 雌性, 6~8 周龄, 体质量 18~22 g。甲基泼尼松龙注射液每只 2 mg, 每 4 天肌肉注射 1 次; 第 1 次药物注射后第 2 天每只小鼠腹腔接种 10^{5.31}/mL PFU MCMV Smith 病毒悬液; 病毒接种后第 14 天用眼球摘除法处死小鼠取唾液腺; 每个唾液腺用无血 Dubecco MEM Eagle 培养液 1 mL 充分匀浆; 离心取上清分装, 置 -80 °C 冰箱保存待用。测定病毒致半数细胞感染量 TCID₅₀ = 10^{5.31}/mL。

* 基金项目: 江苏省六大人才高峰资助项目(2011-WS-075)。 作者简介: 刘芹(1987~), 硕士, 主要从事巨细胞病毒感染的胃肠道表现的研究。 [△] 通讯作者, Tel: (0516)85802160; E-mail: 664586331@qq.com。

1.2 方法

1.2.1 实验动物模型制备及分组 雌性 BALB/c, 4 周龄, 体重 8~12 g, 采用酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒检测 MCMV IgM、IgG, MCMV IgM、IgG 均阴性者判断为无 MCMV 感染, 纳入研究。在 12/12 h 昼夜循环条件下自由进食, 实验前适应 1 周。实验动物随机分为空白组、病毒组和更昔洛韦(ganciclovir, GCV)组, 每组 8 只小鼠, 小鼠腹腔接种含病毒 $10^{5.31}$ /mL 的病毒液 100 μ L, 建立播散型 MCMV 感染小鼠模型, 自病毒接种后 24 h 为 0 d, GCV 组在接种病毒悬液 24 h 后给予 GCV (国药准字: H111101-1, 湖北科益药业有限公司) 50 mg/kg 腹腔注射每日 1 次, 14 d, 同时空白组和病毒组在相应时间点分别给予同等剂量的生理盐水。实验小鼠分别于第 3、7、14 天处死后取出肝脏、结肠放于 4 $^{\circ}$ C 预冷的无 RNA 酶的冻存管中, 液氮保存。

1.2.2 MCMV-DNA PCR 检测 购买天根公司 DNA 提取试剂盒(目录号为 DP304), 提取 DNA 后于紫外分光光度计下测定 A260/A280, 稳定 1.8~2.0 为可用, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。引物由上海生工生物工程有限公司合成。上游引物: 5'-TCA GCC ATC AAC TCT GCT ACC AAC-3', 下游引物: 5'-ATC TGA AAC AGC CGT ATA TCA TCT TG-3' 产物长度为 100 bp, 退火温度为 59 $^{\circ}$ C。PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 紫外线灯下观察有无 MCMV-DNA 电泳条带。

1.2.3 总 RNA 提取 采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法提取总 RNA, 于紫外分光光度计下测定 A260/A280, 稳定于 1.8~2.0 为可用, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。引物设计及合成, 均由上海生工生物工程有限公司合成。ITF 序列如下, 正义引物: 5'-ACA ACC CTG CTG CTT GGT CCT -3', 反义引物: 5'-TCT GTC TCT TGC AGA GGT TTG -3'; 扩增片段为: 212 bp, 退火温度为 59 $^{\circ}$ C。内参序列鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH), 正义引物: 5'-CCA AAA GGG TCA TCA TCT CC -3', 反义引物: 5'-CAA CCT GGT CCT CAG TGT AGC -3', 扩增片段: 498 bp, 退火温度为 58 $^{\circ}$ C。实时定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)以 RT-PCR 二步法进行 ITF mRNA 检测, PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 采用凝胶成像分析系统(GIS-2008 型, 上海天能科技有限公司)进行吸光度扫描分析, 结果以 ITF mRNA 扩增条带与 GAPDH 内参扩增条带的扫描峰面积比值表示 mRNA 的相对含量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行数据分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 组间两两比较采用 q 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生长发育情况 病毒组小鼠出现食欲差、活动少; 皮毛稀松、对刺激反应迟钝、生长迟缓、体质量不增等表现。

2.2 PCR 检测结果 病毒组肝脏、结肠组织 MCMV-DNA PCR 电泳可见阳性条带, 空白组无阳性条带, GCV 组亦可见阳性条带, 但和病毒组比较明显变暗、模糊。见图 1、2。

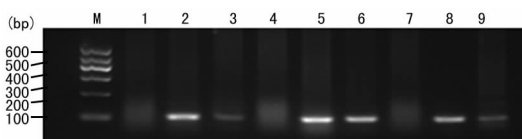


图 1 肝脏组织 MCMV-DNA PCR 结果

2.3 各组小鼠结肠黏膜 ITF 的表达比较 空白组 ITF mRNA 表达量在 3、7 和 14 d 时类似; 病毒组在 3 d 时增加, 14 d

时达高峰, 3 个时间点表达量差异有统计学意义($P < 0.05$); GCV 组在 3 d 时开始增加, 14 d 时达高峰, 3 个时间点表达量差异有统计学意义($P < 0.05$)。7、14 d 时, GCV 组 ITF mRNA 表达量高于病毒组和空白组($P < 0.05$), 3、7、14 d 时, 病毒组高于空白组($P < 0.05$)。见图 3、表 1。

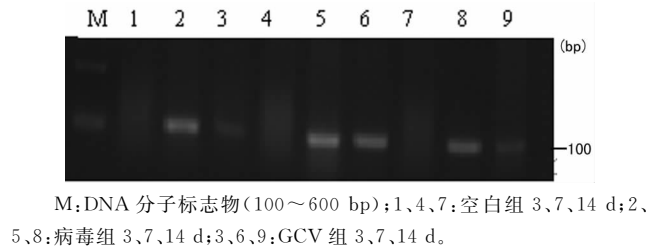


图 2 结肠组织 MCMV-DNA PCR 结果

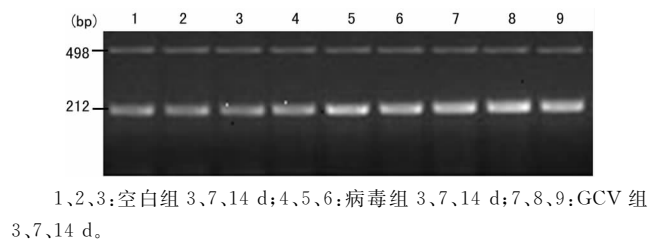


图 3 结肠组织 ITF RT-PCR 结果

表 1 实验小鼠 ITF 表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	3 d	7 d	14 d
空白组	0.930 \pm 0.051 ^a	0.950 \pm 0.056 ^a	1.050 \pm 0.072 ^a
病毒组	0.970 \pm 0.041 ^c	1.120 \pm 0.075	1.360 \pm 0.085
GCV 组	1.250 \pm 0.110 ^c	1.450 \pm 0.120 ^b	1.700 \pm 0.140 ^b

^a: $P < 0.05$, 与病毒组和 GCV 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与病毒组比较; ^c: $P < 0.05$, 与同组 7、14 d 时比较。

3 讨论

巨细胞病毒属于疱疹病毒家族中的一员, 成人的感染率在 40%~100%。大部分感染并没有临床症状出现, 通常有终身的潜伏期, 但 CMV 感染能够引起严重的胃肠道疾病。临床上严重的胃肠道 CMV 疾病通常发生在免疫受损的患者中^[9], 在免疫正常人群中感染很少报道。CMV 感染可使炎症性肠病患者病情更加复杂, 导致重症率和死亡率升高^[10]。

ITF 通过疏水键同黏液糖蛋白(mucin, MUC)结合, 形成稳定的凝胶复合物, 此凝胶复合物可以抵抗胃肠道胃酸、蛋白酶和机械损伤等, 从而增强了胃肠道黏膜屏障的防御能力, 并能促进上皮细胞向损伤处的迁移^[11]。细胞迁移是黏膜受损后早期修复的关键过程, 损伤区域周边细胞迁移到损伤部位, 重建上皮的完整性和黏膜屏障。Vandenbroucke 等^[12]在口服硫酸葡聚糖诱导肠道炎症的实验中发现, 实验组予胃饲有生物活性的 ITF, 只发生轻度的上皮损伤; 而对照组则死于广泛性结肠炎, 证实了 ITF 在维持黏膜屏障中的作用。组织学检查发现 ITF 基因剔除小鼠没有早期修复过程, 而给予重组 ITF 后, ITF 基因剔除的小鼠能够恢复正常的黏膜修复功能^[13]。大量实验证明, ITF 在胃肠道中的保护和修复过程中发挥重要的作用。

肠道 HCMV 感染主要出现于免疫功能低下的人群如艾滋病患者、器官移植患者、恶性肿瘤患者及炎症性肠炎患者等, 但 CMV 感染后能否导致人体免疫功能的进一步损伤尚未得到证实。本研究发现, 4 周龄小鼠接种 MCMV 后出现生长发育减缓, 体质量减低, 与空白组相比, 病毒组结肠组织 ITF 蛋白表达升高。提示 MCMV 造模后 3 d, 小鼠结肠黏膜可能处

于修复早期,ITF 的表达有上调的趋势。与病毒组相比,GCV 组结肠组织中 ITF 表达明显升高,提示 GCV 在 CMV 肠道感染中的治疗作用可能是通过上调 ITF 基因表达,促进受损区域上皮细胞的重建,可能是药物发挥黏膜修复重建作用的机制之一。

综上所述,ITF 在 CMV 感染肠道的发生、发展中起着重要作用,这也为 CMV 的发病机制研究及其临床治疗提供了一个新方向。引用外源性 ITF 或者提升 ITF 活性可能成为治疗 CMV 感染的新靶点。

参考文献:

- [1] Kim HC, Hwang EA, Park SB, et al. Historical comparison of prophylactic ganciclovir for gastrointestinal cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients[J]. *Transplant Proc*, 2012, 44(3):710-712.
- [2] Maher MM, Nassar MI. Acute cytomegalovirus infection is a risk factor in refractory and complicated inflammatory bowel disease[J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54(11):2456-2462.
- [3] Torres-Madrizg T, Boucher HW. Immunocompromised hosts: perspectives in the treatment and prophylaxis of cytomegalovirus disease in solid-organ transplant recipients[J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 47(5):702-711.
- [4] Kjelle S. The trefoil factor family-small peptides with multiple functionalities[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(8):1350-1369.
- [5] 王焕, 吴修文, 万千雪, 等. 肠三叶因子和黏蛋白对烧伤血清所致肠上皮细胞增殖移行能力变化的影响[J]. *中华烧伤杂志*, 2011, 27(5):347-352.
- [6] Neal MD, Richardson WM, Sodhi CP, et al. Intestinal stem cells and their roles during mucosal injury and re-

pair[J]. *J Surg Res*, 2010, 167(1):1-8.

- [7] Poulsen SS, Kissow H, Hare K, et al. Luminal and parental TFF2 and TFF3 dimer and monomer in two models of experimental colitis in the rat [J]. *Regul Pept*, 2005, 126(3):163-171.
- [8] 徐翼, 方峰, 董永绥, 等. 小鼠巨细胞病毒全身播散型感染模型的建立[J]. *临床儿科杂志*, 2008, 26(6):517-520.
- [9] Onyeagocha C, Hossain MS, Kumar A, et al. Latent cytomegalovirus infection exacerbates experimental colitis[J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(5):2034-2042.
- [10] Suzuki H, Kato J, Kuriyama M, et al. Specific endoscopic features of ulcerative colitis complicated by cytomegalovirus infection[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(10):1245-1251.
- [11] Sasaki M, Ikeda H, Nakanuma Y. Expression profiles of MUC mucins and trefoil factor family (TFF) peptides in the intrahepatic biliary system; physiological distribution and pathological significance[J]. *Prog Histochem Cytochem*, 2007, 42(2):61-110.
- [12] Vandembroucke K, Hans W, Van Huysse J, et al. Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice[J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(2):502-513.
- [13] Beck PL, Wong JF, Li Y, et al. Chemotherapy- and radiotherapy-induced intestinal damage is regulated by intestinal trefoil factor[J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(3):796-808.

(收稿日期:2013-06-02 修回日期:2013-06-20)

(上接第 3652 页)

- J Cardiovasc Electrophysiol, 2007, 18(3):342-347.
- [3] Ishii TM, Takano M, Xie LH, et al. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation Channel in rabbit heart sinoatrial node[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(18):12835-12839.
- [4] Robinson RB, Siegelbaum SA. Hyperpolarization-activated cation currents; from molecules to physiological function [J]. *Annu Rev Physiol*, 2003, 65:453-480.
- [5] DeBakker JM, Ho SY, Hocini M. Basic and clinical electrophysiology of pulmonary vein ectopy[J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 54(2):287-294.
- [6] Nakajima Y, Yoshimura K, Nomura M, et al. Expression of HNK1 epitope by the cardiomyocytes of the early embryonic chick; in situ and in vitro studies[J]. *Anat Rec*, 2001, 263(3):326-333.
- [7] Hocini M, Ho SY, Kawara T, et al. Electrical conduction in canine pulmonary veins; electrophysiological and anatomic correlation [J]. *Circulation*, 2002, 105(20):2442-2448.
- [8] Deruiter MC, Gittenberger-De Groot AC, Wenink AC, et al. In normal development pulmonary veins are connected to the sinus venosus segment in the left atrium[J]. *Anat Rec*, 1995, 243(1):84-92.

- [9] Masani F. Node-like cells in the myocardial layer of the pulmonary vein of rats; an ultrastructural study [J]. *J Anat*, 1986, 145:133-142.
- [10] Cheung DW. Electrical activity of the pulmonary vein and its interaction with the right atrium in the guinea-pig[J]. *J Physiol*, 1981, 314:445-456.
- [11] Wang B, Du RY, Zheng QS, et al. P-like cells in myocardial sleeves of pulmonary veins in dogs[J]. *J Fourth Milit Med Univ*, 2001, 22(12):12-15.
- [12] Block MI, Said JW, Siegel RJ, et al. Myocardial myoglobin following coronary artery occlusion. an immunohistochemical study[J]. *Am J Pathol*, 1983, 111(3):374-379.
- [13] Ludwig A, Zong X, Hofmann F, et al. Structure and function of cardiac pacemaker channels[J]. *Cell Physiol and Biochem*, 1999, 9(4/5):179-186.
- [14] Lai LP, Su MJ, Lin JL, et al. Measurement of funny current(I_f) Channel mRNA in human atrial tissue; correlation with left atrial filling pressure and atrial fibrillation [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1999, 10(7):947-953.
- [15] Qu J, Kryukova Y, Potapova IA, et al. MiRP1 modulates HCN2 Channel expression and gating in cardiac myocytes [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(42):43497-43502.

(收稿日期:2013-05-09 修回日期:2013-06-17)