

肿瘤坏死因子 - α 在慢性血吸虫病患者结肠组织中的表达及意义

朱丽蓉¹⁾, 吴泽生²⁾, 王红蓉¹⁾, 夏媛³⁾, 冯林森⁴⁾, 段艳萍⁵⁾, 王金德⁶⁾

(1) 昆明医科大学基础医学院, 云南昆明 650500; 2) 大理学院附属医院消化内科, 云南大理 671000; 3) 昆明医科大学公共卫生学院; 4) 第一临床学院; 5) 昆明医科大学形态学教研室; 6) 研究生部, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 检测肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 在慢性血吸虫病患者结肠组织中的表达变化, 探讨血吸虫病对靶器官的损害, 为评价血吸虫病的危害及血吸虫病的防治提供一定的实验室依据. **方法** 运用免疫组织化学染色法检测 50 例慢性血吸虫病患者病变结肠组织及 9 例正常结肠组织标本中肿瘤坏死因子 - α 的表达情况. **结果** 与正常对照者相比, 慢性血吸虫病患者结肠腺中 TNF- α 阳性颗粒平均光密度值明显升高 ($P=0.017$), 结肠间质中 TNF- α 阳性颗粒平均光密度值略有升高 ($P=0.059$), 但其表达与性别无关. **结论** 慢性血吸虫感染可诱导患者结肠组织中 TNF- α 的浓度增高, 这可能在血吸虫病引起的结肠病理生理变化中起到重要作用.

[关键词] 肿瘤坏死因子 - α ; 慢性血吸虫病; 结肠; 核因子 - κ B

[中图分类号] R383.2*4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 09 - 0025 - 04

Expression and Significance of Tumor Necrosis Factor alpha in Colon Tissue of Patients with Chronic Schistosomiasis

ZHU Li-rong, WU Ze-sheng, WANG Hong-rong, XIA Yuan, FENG Lin-sen, DUAN Yan-ping,
WANG Jin-de

(1) Basic Medical College of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Gastrointestinal Dept. of Internal Medicine Affiliated Hospital of Dali University, Dali Yunnan 671000; 3) Public Health College; 4) The First Clinical College; 5) Morphological Department; 6) Postgraduate Faculty of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** Detect the tumor necrosis factor- α (TNF- α) expression changes in colon tissue of patients with chronic schistosomiasis, explore schistosomiasis target organ damage, and provide a laboratory basis for the evaluation of hazards and schistosomiasis prevention and control. **Methods** The tumor necrosis factor- α expression of colon tissue of 50 patients with chronic schistosomiasis and 9 cases of normal colon tissue were detected using immunohistochemistry staining. **Results** Compared with normal control, the colon gland in TNF- α - positive particles mean optical density value of chronic schistosomiasis patients was significantly higher ($P=0.017$), colon interstitium of TNF- α - positive particles mean optical density value was slightly higher ($P=0.059$), but its expression has nothing to do with sex. **Conclusion** Chronic schistosomiasis infection can induce increased concentration of TNF- α in patients with colon tissue of the colon, which may play an important role in causing schistosomiasis pathophysiological changes.

[Key words] Tumor necrosis factor-alpha; Chronic schistosomiasis; Colon; NF-kappa B

[基金项目] 云南省教育科学规划项目 (GY09006)

[作者简介] 朱丽蓉 (1993~), 女, 云南昆明市人, 在读本科生. 吴泽生和朱丽蓉对本文有同等贡献.

[通讯作者] 王金德. E-mail: wjdkm609@163.com; 段艳萍. E-mail: annekm1024@163.com

日本血吸虫病是我国常见的寄生虫病,血吸虫生活史中的尾蚴、童虫、成虫及虫卵均能引起病变,其中虫卵对人体的损害最重.虫卵长期沉积于结肠组织可诱导黏膜层和黏膜下层形成由钙化虫卵和虫卵碎片、坏死组织、巨噬细胞、类上皮细胞、淋巴细胞等组成的慢性虫卵结节(又称假结核结节).研究显示影响我国血吸虫病流行与传播的自然和社会因素尚未消除,钉螺面积和耕牛感染率均有所控制,防治工作任重道远^[1].肿瘤坏死因子家族(TNF)主要是由活化的巨噬细胞产生的重要的炎症介质,多年来发现它们能够参与病毒的复制,肿瘤发生及转移,移植排斥反应,类风湿关节炎,过敏、糖尿病、脓毒性休克等,其中最常见最重要的是肿瘤坏死因子- α (TNF- α)^[2].本实验旨在探讨慢性血吸虫病与患者结肠组织中 TNF- α 表达的情况,分析其可能对患者造成的影响,进一步探讨血吸虫病对结肠组织的损害.

1 对象与方法

1.1 对象与分组

选取 50 例大理学院附属医院收治的云南省慢性血吸虫病患者结肠黏膜活检组织归档蜡块,其中女 26 例,男 24 例,年龄 18~82 岁,平均(50±15.3)岁.所有患者行结肠镜检或手术治疗前,均长期居住于大理白族自治州血吸虫病流行区,未接受过吡喹酮治疗,粪便检查未发现虫卵及尾蚴.患者全结肠镜检查时发现肠壁增厚、黏膜粗糙不平、部分黏膜呈息肉样增生等改变,活体组织活检后确诊为慢性血吸虫病或慢性血吸虫性结肠炎.9 例正常对照组均为因不同原因须行结肠镜组织活检时取出的结肠黏膜组织,经结肠镜下大体观察及病理检查均未见特殊.2 组检查者血常规、大便常规检查正常,排除结肠癌.

1.2 主要试剂和仪器

TNF- α 多克隆抗体、免疫组织化学 SABC 试剂盒购自北京博奥森生物科技公司;0.01 M 柠檬酸盐缓冲液与 0.01 M PBS 购自北京中杉金桥公司;Triton X-100 购自上海索莱宝科技公司;DAB 试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司;光学显微镜购自日本 Olympus 公司;YD400 高清显微摄像系统及 MiPrd 数字显微图像处理软件购自山东易创电子有限公司;电热鼓风干燥箱购自上海一恒科学仪器有限公司;电热恒温培养箱购自上海跃进医疗器械有限公司;电热恒温水浴锅购自北京市永光明医疗仪器厂.

1.3 免疫组织化学染色

用免疫组化 SABC 法标记血吸虫病组及正常对照组结肠组织中的 TNF- α .将收集的归档蜡块石蜡切片脱蜡和水化后,用 PBS 冲洗 3×3 min/次,再用柠檬酸盐缓冲液修复,滴加内源性过氧化酶阻断剂,室温下孵育 10 min, PBS 冲洗 3×3 min/次,滴加动物非免疫性血清室温下孵育 20 min 后,加 TNF- α 多克隆抗体,室温下孵育 60 min,4℃过夜.第 2 天室温复温 30 min,滴加生物素标记的第二抗体室温下孵育 30 min,滴加链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶,室温下孵育 60 min, PBS 冲洗 3×3 min/次后参照说明书行 DAB 显色 5~10 min,显微镜下观察,阳性显色为棕色.自来水冲洗,苏木素复染,0.1% 盐酸乙醇分化,0.1% 氨水乙醇反蓝.梯度乙醇脱水干燥,中性树胶封片.

1.4 显微图像及统计学分析

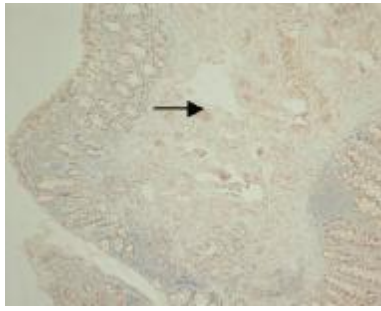
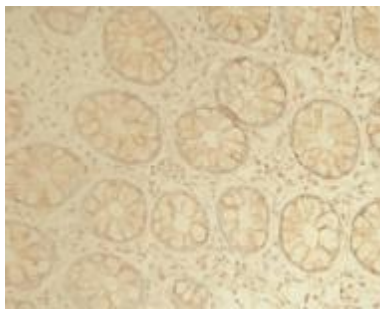
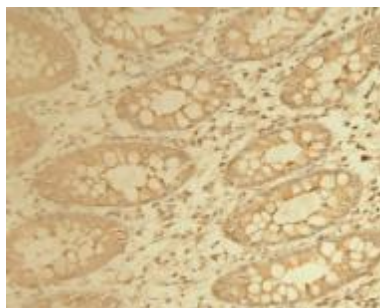
在每个样本切片中选取 4 个包含结肠腺及黏膜下层的高倍视野(×400),应用 Olympus 光学显微镜及易创 YD400 显微摄像系统进行观察并采集高清显微照片,采用 MiPrd 数字显微图像处理软件计算结肠腺上皮与黏膜下层间质细胞的平均光密度值.平均光密度值以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS 统计软件进行 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

镜检发现结肠组织中的 TNF- α 主要分布于结肠腺上皮细胞及黏膜下层的部分间质细胞,组织间隙中偶可见少量棕色免疫复合物(图 1).正常对照者结肠腺上皮细胞及黏膜下层间质细胞中的 TNF- α 免疫反应物染色较淡,呈散在分布(图 2);慢性血吸虫患者的免疫反应物分布较集中,染色较正常对照组深(图 3).经显微图像采集与分析得到,慢性血吸虫病患者结肠组织 TNF- α 结肠腺中阳性区域平均光密度显著高于正常对照组($P=0.017$),结肠间质中阳性区域平均光密度也略高于正常对照组($P=0.059$),见表 1.但 TNF- α 的表达与性别无关.

3 讨论

TNF- α 是介导多种炎症反应的内源性细胞因子,在正常人体内表达量极低,大多产生于炎症级联反应的起始阶段,主要在脂多糖、免疫复合物、感染等因素的刺激下由激活状态的单核-巨噬细

图1 虫卵沉积结肠组织→虫卵结节 ($\times 100$)Fig. 1 Deposits of eggs within the colon tissue ($\times 100$)图2 正常对照组结肠组织 ($\times 400$)Fig. 2 The normal colon tissue ($\times 400$)图3 血吸虫病组结肠组织 ($\times 400$)Fig. 3 The colon tissue of patients with schistosomiasis ($\times 400$)表1 TNF- α 阳性颗粒的平均光密度值 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 1 TNF- α - positive particles mean optical density value ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	结肠腺	结肠间质
正常对照组	9	154.15 \pm 7.05	159.79 \pm 7.37
血吸虫病组	50	167.64 \pm 8.46*	172.22 \pm 6.70
女性患者	26	168.18 \pm 5.79	171.54 \pm 7.05
男性患者	24	167.19 \pm 10.15	172.53 \pm 6.59

与正常对照组比较, * $P < 0.05$.

胞分泌, 活化的 T 淋巴细胞、NK 细胞、肥大细胞也可分泌少量的 TNF- α . 研究表明 TNF- α 可通过核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路, 介导多种炎症性疾病、感染性疾病、恶性肿瘤、自身免疫性疾病的发生发展^[3-5]. 血吸虫感染引起的病变主要是虫卵沉积导致的肉芽肿炎症反应. 既往动物实验发现: 急性期血吸虫病的小鼠肝脏中 TNF- α 表达量较正常对照组明显升高; 而进入慢性期后免疫应答逐渐由 Th1 型向 Th2 型转变, 虫卵肉芽肿巨噬细胞 TNF- α 诱生能力降低, 使其表达量随时间的推移缓慢回落, 但表达量仍高于正常对照组, 高表达的 TNF- α 可致敏 T 细胞, 使之释放淋巴因子引起炎症反应, 与血吸虫性肉芽肿的形成及组织纤维化密切相关, 但动物模型远不及人感染血吸虫病复杂, 仍需进一步论证^[6-8].

本实验利用人体结肠黏膜作为研究对象, 发现 TNF- α 是血吸虫病患者靶器官中一种重要的炎症因子, 在慢性血吸虫病感染者结肠腺上皮细胞的表达量明显高于正常对照组 ($P = 0.017$); 感染者结肠黏膜下层的间质细胞中的表达亦略高于正常对照组, 但不具有统计学意义 ($P = 0.059$). 据此结果分析, 可能是由于可溶性虫卵抗原的直接刺激、机体对虫卵的异物排斥反应等因素, 趋化并激活单核-巨噬细胞、淋巴细胞等聚集于结肠黏膜层及黏膜下层, 导致了 TNF- α 表达量升高. 此外, TNF- α 可通过直接损伤靶细胞或诱导凋亡、改变细胞酶代谢、激活 NF- κ B 信号通路、促进有丝分裂、诱导内皮细胞黏附分子表达等途径损伤内皮细胞, 导致结肠内毛细血管功能紊乱、血流动力学改变、血管微血栓形成、供血区组织缺血缺氧, 同时内皮损伤后血管通透性增强^[9], 使大量炎症细胞和细胞因子进入并聚集于组织间隙, 侵犯上皮细胞周围的健康组织, 进一步加重了的炎症反应, 最终造成整个黏膜层弥散性地出现肉芽肿结节. 有报道显示, 经缓激肽处理的 C6 细胞产生的 TNF- α 可以增加脑胶质瘤血瘤屏障的通透性, 并通过 NF- κ B 引起紧密连接蛋白 Occludin 表达下降^[10]. 同时, TNF- α 可抑制真核细胞延伸因子 2 等启动因子的活性, 改变蛋白质翻译的起始过程, 抑制蛋白质的合成并促进蛋白质的水解^[11]. 笔者在前期的研究中也发现慢性血吸虫病感染者体内参与构成结肠黏膜屏障的紧密连接的完整性受到破坏, 并推测可能与可溶性虫卵抗原 (soluble egg antigen, SEA) 促进巨噬细胞等炎症细胞增殖活化并释放大量炎症因子, 介导一系列分子生物学事件等有关. 本实验在前期实验的基础上进一

步证实血吸虫病感染者结肠黏膜高浓度的 TNF- α 等细胞因子可能是造成结肠黏膜紧密连接缺损、破坏黏膜屏障完整性的重要因素之一。

因此,今后的血吸虫病研究与防治中应该重视血吸虫感染对结肠黏膜屏障的损伤,保护肠黏膜屏障的完整性。

[参考文献]

- [1] 郑浩,张利娟,朱蓉,等. 2011年全国血吸虫病疫情通报[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2012,24(6):621-626.
- [2] AQQARWA L B B, SHISHODIA S, ASHIKAWA K, et al. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion [J]. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2002, 1(4): 327-341.
- [3] CRISOSTOMO P R, WANG Y, MARKEL T A, et al. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- α , LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF kappa B- but not JNK-dependent mechanism[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 294(3):675-682.
- [4] HAO S, BALTIMORE D. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(3): 281-288.
- [5] BEN-NERIAH Y, KARIN M. Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(8):715-723.
- [6] 贺永文,刘薇,罗端德. TNF- α 与日本血吸虫虫卵肉芽肿及肝纤维化关系的初步研究[J]. 中国寄生虫病防治杂志,1996,9(4):274-277.
- [7] 徐会娟,朱阳泉,帅连云. 日本血吸虫可溶性虫卵抗原诱导小鼠巨噬细胞增殖及TNF- α 、TGF-1的表达[J]. 苏州大学学报(医学版),2011,31(6):913-916.
- [8] CHANG D, RAMALHO L N, RAMALHO F S, et al. Hepatic stellate cells in human schistosomiasis mansoni: a comparative immunohistochemical study with liver cirrhosis[J]. *Acta Trop*, 2006, 97(3):318.
- [9] RIDKER P M, RIFAI N, PFEFFER M, et al. Elevation of tumor necrosis factor- α and increase risk if recurrent coronary events after myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2000, 101(18):149-153.
- [10] 秦丽娟,薛一雪,谷艳婷. 缓激肽开放血肿瘤屏障的作用及其与TNF- α 、MAPK 以及NF- κ B的关系研究[J]. 中国药理学通报,2012, 28(9):1276-1280.
- [11] WILLIAMSON D L, KIMBALL S R, JEFFERSON LS. Acute treatment with TNF- α attenuates insulin-stimulated protein synthesis in cultures of C2C12 myotubes through a MEK1-sensitive mechanism [J]. *Am J Physiol*, 2005, 289(1):95-104.

(2013-07-12 收稿)

版权声明

本刊已许可中国学术期刊(光盘版)电子杂志社在中国知网及其系列数据库产品中以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文,作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意编辑部上述声明。