维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)01－0038－03

尿胰蛋白酶抑制剂对鼠溃疡性结肠炎结肠组织中蛋白酶活性的抑制作用

朱代华，张兴明，郭　丹

(重庆医科大学第二临床学院普外科，重庆　400010)

【摘　要】目的：确定尿胰蛋白酶抑制剂(UTI)对鼠溃疡性结肠炎(UC)结肠组织中蛋白酶的作用。方法：用 18% 的 DNBS 乙醇溶液 0.25ml 灌肠，在 Wistar 大鼠上建立 UC 模型；经尾静脉注射 UTI；用明胶酶谱法测定病变结肠组织中的蛋白酶活性。结果：经 UTI 处理后，鼠 UC 结肠组织中蛋白酶活性仅为对照组的 1/3。结论：UTI 能显著降低鼠 UC 结肠组织中蛋白酶活性。

【关键词】尿胰蛋白酶抑制剂；结肠炎；溃肠性；疾病模型，动物；鼠

【中国图书分类法分类号】R656.9　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－05－28

Inhibitory effect of urinary trypsin inhibitor on protease activity in the colonic tissues of ulcerative colitis rats

ZHU Daihua, et al

(*Department of General Surgery, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To determine the effect of urinary trypsin inhibitor(UTI)on protease activity in the colonic tissues of ulcerative colitis(UC) rats. *Methods*: The experimental UC was induced in Wistar rats by enema with 0.25ml of 18% 2,4－dinitrobenzene-sulfonic acid (DNBS) dissolved in ethanol. UTI was injected into the rats through the caudal vein. Protease activity present in colonic tissues was determined on gelatin zymograms. *Results*: The protease activity which presented in colonic tissues of the group treated with UTI was only 1/3 that of the control. *Conclusion*: The protease activity decreased significantly after we treated the rats with UTI.

【Key words】Urinary trypsin inhibitor; Ulcerative colitis; Protease; Disease model, animal; Rat

近年来的研究表明，蛋白酶在溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的发病中起着重要的作用。本实验的目的在于确定尿胰蛋白酶抑制剂(urinary trypsin inhibitor, UTI)对实验性 UC 结肠组织中蛋白酶有无抑制作用，为 UC 的治疗提供一个新的思路。

1　材料与方法

1.1　材料

雄性 Wistar 大鼠，体重 200～250g，重庆医科大学实验动物中心提供。2,4－二硝基苯磺酸(2,4－dinitrobenzene-sulfonic acid, DNBS)：购自美国 Acros Organics 公司。猪胰蛋白酶：购自美国 Hyclone 公司。UTI：购自天普生化医药股份有限公司。The Discovery Series™ Quantity One®图像采集和分析软件，BIO－RAD 公司开发。

1.2　方法

1.2.1　动物的处置和病变观察

参考 Hawkins 等介绍的方法，用 DNBS 来诱导鼠 UC[1]。将大鼠禁食 48h 后，分成生理盐水组、DNBS 组、UTI－1 组、UTI－2 组，每组各 18 只鼠。用乙醚麻醉鼠后，将直径 1mm 的硅胶管从鼠肛门插入 8cm 达结肠脾曲。经该管对照组用生理盐水 0.25ml 灌肠，其余的 3 个组用 18% DNBS 乙醇溶液 0.25ml(0.25ml 50% 乙醇中含 DNBS 45mg)灌肠建立 UC 动物模型。UTI－1 组同时经尾静脉注射 UTI2.5 万 U/kg 体重，UTI－2 组在灌肠后 12、24、36h 分别经尾静脉注射 UTI 1 万^{U}/kg 体重。分别在第 1、3、7 天各处死 6 只鼠。DNBS/乙醇灌肠后实验鼠出现血性腹泻。大体标本的观察显示，在 DNBS/乙醇灌肠后的第 1 天即可引起结直肠多发

作者介绍：朱代华(1966－　)，男，副主任医师，主要研究方向：肛直肠疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

的、大小不等的溃疡，最大直径达 0.5cm。石蜡切片的观察显示：溃疡多数局限在粘膜层内，部分深达粘膜下层，伴有粘膜剥脱，肠壁全层嗜酸细胞、中性粒细胞、淋巴细胞为主的炎症细胞浸润，未坏死粘膜出现弥漫性杯状细胞排空，灶性隐窝脓肿等 UC 急性期的表现。病变在第三天达高峰，出现结肠膨胀和粘连。经静脉注射 UTI 处置后，特别是 UTI2 组的实验鼠腹泻缓解，结肠的膨胀、粘连和水肿减轻，溃疡变小、与 DNBS/乙醇组比较，病变中央在镜下尚可见残存的肠腺。

1.2.2 蛋白酶活性的测定

用乙醚麻醉大鼠后，切除脾曲以下结、直肠，剖开肠腔，用生理盐水冲洗干净。剪取病变最明显的一小片结肠组织（约 300mg），用眼科剪剪碎，放入玻璃匀浆管中，再将匀浆管浸放在冰水中，手工将结肠组织匀浆。用 2ml 冷 PBS(pH 8.0) 冲洗匀浆管。将盛有匀浆液的试管浸放在水中，用超声匀浆仪处理 10s。将匀浆液冷却至 4℃ 后，用高速离心机离心 (12000r/min，8min)。取上清液测定蛋白质浓度（BCA 蛋白质浓度测定法），然后取含有 20μg 蛋白质的上清液，用明胶酶谱法作蛋白酶活性测定，方法如下：

用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶作垂直蛋白电泳。上层胶浓度为 5%(w/v)，下层胶浓度为 6%(w/v)并含 0.1% 明胶（1mg/ml），厚度均为 0.75mm。甘氨酸电泳缓冲液中含 0.1%SDS 但不含还原剂 β-巯基乙醇。将含 20μg 蛋白质的标本，用标本缓冲液[50mM Tris-HCl(pH 6.8)，20%(v/v)甘油，5% SDS (w/v)，0.03% 溴酚蓝(w/v)]稀释至 20μl(2～5 倍)，加样后，电泳 2.5h(室温、150V)。将凝胶浸泡在 100ml 2.5%(v/v) Trito X-100 液中，置于摇床上（室温，1h）以洗脱 SDS。再将凝胶用重蒸水冲洗后置于酶缓冲液[50mM Tris(pH 8.0). 1mM $CaCl_2$]中孵化(18h，37℃)，然后用含 0.5% 考马斯亮蓝 R-250(w/v)，30% 甲醇(v/v)，10% 冰醋酸(v/v)的染色液染色 3h。染色后，用含 30% 甲醇(v/v)，10% 冰醋酸(v/v)的脱色液脱色。在分别脱色 15min，30min 后更换脱色液，再脱色 1h。蛋白酶活性表现为蓝色背景上的一些白色的条带（意味着明胶底物的裂解）。在计算机上，用 BIO-RAD 研制 Quantity One 图像采集和分析软件，通过密度测定法定量蛋白酶活。

取不同浓度的猪胰蛋白酶溶液各 10μl（分别含 50、30、20、10、5、3、1、0.1、0.01ng 猪胰蛋白酶），在上述条件下，测定已知剂量的猪胰蛋白酶活性，绘制蛋白酶活性标准曲线。

1.3 统计方法

方差分析(AVONA)、q 检验(Post Hoc Tests)和 t 检验。

2 结 果

明胶酶谱法可检测出总量为 0.1ng（浓度为 10ng/ml）的猪胰蛋白酶，具有高度敏感性，并在 50ng～0.1ng(5000ng/ml～10ng/ml)的宽广范围内与 Volume 值（像素密度×面积 mm^2）呈线性关系。猪胰蛋白酶活性标准曲线见图 1。

病变结肠组织中蛋白酶活性的测定结果见表 1。

表 1 鼠病变结肠组织蛋白酶活性(ng/ml)检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别/时间	第 1d	第 3d	第 7d
生理盐水	786.03±87.14	833.77±54.21	791.43±117.06
DNBS/乙醇	3718.67±405.22*	7330.17±663.12*	4994.17±669.35
UTI 1	3111.50±331.28*	4269.67±721.27*	4836.23±743.35
UTI 2		2592.00±333.59*	4727.50±695.23

注：表中数值为猪胰蛋白酶当量。* $P<0.05$

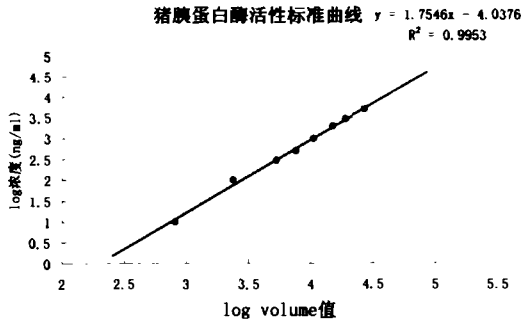


图 1 猪胰蛋白酶活性标准曲线

Volume 值 = 像素密度×面积(nm^2)

3 讨 论

近年来的研究表明，蛋白酶在 UC 的发病中起着重要的作用。Bohe[2]首先观察到 UC 患者粪便中的蛋白酶活性升高，并与疾病的严重程度一致。Hawkins 等[1]检测了 UC 实验动物和 UC 患者结肠组织中的蛋白酶活性，均比正常对照显著增高。本实验的结果与此相符。Andus 等[4]报道，UC 患者血清和粪便中多形核白细胞弹性蛋白酶明显升高，并与疾病的严重程度成正相关。有研究表明，活动期 UC 患者结肠粘膜中组织纤维蛋白溶解酶原激活物(tissue-type plasminogen activator，t-PA)——一种丝氨酸蛋白酶，是正常对照的 2～3 倍，并与疾病的严重程度成正相关[5]。Stallmach 等[6]测定了 UC 患者结肠粘膜中的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases，MMPs)发现 MMP-1 和 MMP-2 的含量和其 mRNA 的表达都增加，MMP-3 的含量也增加。蛋白酶的主要作用是使结肠粘膜间质降解，从而使组织结构遭到破坏，炎症扩散。t-PA

维普资讯 http://www.cqvip.com

的激活发生于炎症区的毛细血管内皮的表面,从而激活纤溶酶原,使纤维蛋白和微血栓溶解,血管通透性增高,被认为与粘膜出血和粘膜脆性增加有关[7]。研究结果显示,实验鼠结肠组织中的蛋白酶活性比正常对照显著增高,并与病变的严重程度一致。

UTI 是一种广谱的酶抑制剂,可抑制多种蛋白酶如胰蛋白酶、糜蛋白酶、弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G、木瓜蛋白酶、纤溶酶等[8]。本实验利用其具有广谱蛋白酶抑制作用的特点,来抑制结肠组强中的蛋白酶活性。我们采用了两种方案:一是在 DNBS/乙醇灌肠时静脉注射 UTI 2.5 万 U/kg 体重;二是在 DNBS/乙醇灌肠后 12、24、36h 分别静脉注射 UTI1 万 U/kg 体重。研究证明,UTI 可使鼠 UC 结肠组织中的蛋白酶活性下降至对照组的 1/3,其中,第二种方案对蛋白酶活性的抑制作用更好。但是,在观察的第 7 天,UTI 对蛋白酶活性的抑制作用消失,这可能是由于 UTI 半衰期短(血浓度半衰期为 40min)而疗程又短所致。通过对实验鼠腹泻、病变标本的大体和镜下形态的观察,显示出 UTI 使病变的严重程度降低。

实验结果提示,蛋白酶与 UC 的发病有关,而尿胰蛋白酶抑制剂能显著降低病变结肠组织中的蛋白酶活性,因此有可能成为一种治疗 UC 的新手段。采用大动物、长疗程能进一步观察尿胰蛋白酶抑制剂对实验性 UC 的治疗效果。

参 考 文 献

[1] Hawkins JV, Emmel EL, Feuer JJ, et al. Protease Activity in a hapten - induced model of ulcerative colitis in rats[J]. Dig Dis Sci, 1997;42(9):1969 - 1980.

[2] Bohe M. Pancreatic and granulocytic endoproteases in faecal extracts from patients with active ulcerative colitis[J]. Scand J Gastroenterol, 1987;22(1):59 - 64.

[3] Stallmach A, Schafer F, Weber S, et al. Increased state of activation of CD4 - positive T cell and elevated interferon - γ production in pouchitis[J]. Gut, 1998;43(4):499 - 505.

[4] Andus T, Gross V, Caesar 1, et al. PMN - elastase in assessment of patients with inflammatory bowel disease[J]. Dig Dis Sci, 1993;38(9):1638 - 1644.

[5] Kurose 1, Miura S, Suematsu M, et al. Tissue - type plasminogen activator of colonic mucosa in ulcerative colitis - evidence of endothelium - derived fibrinolytic activation[J]. Dig Dis Sci, 1992;37(2):307 - 311.

[6] Stallmach A, Chan CC, Ecker KW, et al. Comparable expression of matrix metalloproteinases 1 and 2 in pouchitis and ulcerative colitis[J]. Gut, 2000;47(3):415 - 422.

[7] Kwaan HC, Cocco A, Mendeloff A1, et al. Fibrinolytic activity in the normal and inflamed rectal mucosa. Scand J Gastroenterol[J]. 1969;4(5):441 - 445.

[8] 潘 成,虞惠康,罗月娥. 注射用乌司他[J]. 中国新药杂志, 2000;9(1):123.

(上接第 33 页)

参 考 文 献

[1] Charlotte MN, Colin AS, Bernard MP, et al. Expression of human interleukin - 3(multi - CSF)is restricted to human lymphocytes and T - cell tumor lines[J]. Blood, 1989;73(4):945 - 951.

[2] 刘秀珍. 造血祖细胞培养技术实验手册[M]. 北京:北京出版社, 1993, 154 - 155.

[3] 陈鸿书,曹廷兵,姚家慧,等. RT - PCR 制备人 IL - 3cDNA 的改进[J]. 第三军医大学学报, 1996;18(3):253 - 254.

[4] Dorssers L, Burger L, Bot F, et al. Characterization of a human multilineage - colony - stimulating factor cDNA clone identified by a conserved noncoding sequence in mouse IL - 3 [J]. Gene, 1987;55:115 - 125.

[5] 王 璐,王亚平. 人参总皂甙对人淋巴细胞表达早期造血生长因子的影响[J]. 解剖学杂志, 2003;

[6] Sara CG, Gregory S, Laurence AT, et al. Regulation of interleukin - 3 gene induction in normal human T cell[J]. J Clin Invest, 1989;84:1701 - 1705.

[7] 叶治家,董燕麟,曹廷兵,等. 小鼠脾淋巴细胞白细胞介素 - 3 基因表达的调节[J]. 第三军医大学学报, 1996;18(1):19 - 21.

[8] Ryan GR, Milton SE, Lopez AF, et al. Human interleukin - 3 mRNA accumulation is controlled at both the transcriptional and posttranscriptional level[J]. Blood, 1991;77(6):1195 - 1202.