

# Expresión del gen de IL-6 y TNF- $\alpha$ en la mucosa rectal de pacientes con colitis ulcerosa crónica idiopática y controles

Fonseca-Camarillo GC,<sup>1</sup> Villeda-Ramírez MA,<sup>1</sup> Sánchez-Muñoz F,<sup>1</sup> Barreto-Zúñiga R,<sup>2</sup> Domínguez-López A,<sup>1</sup> Uribe-Esquivel M,<sup>1</sup> Yamamoto-Furusko JK.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Clínica de Enfermedad Inflamatoria Intestinal, Departamento de Gastroenterología.

<sup>2</sup> Departamento de Endoscopia.

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, D. F.

**Correspondencia:** Dra. Gabriela Columba Fonseca Camarillo, Laboratorio del Departamento de Gastroenterología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Vasco de Quiroga No. 15, Delegación Tlalpan. México, DF, CP. 14000. Correo electrónico: gabrielafaster@gmail.com

## Resumen

**Antecedentes:** Se ha informado que niveles de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$  pueden determinar el grado de inflamación de la colitis ulcerosa crónica idiopática (CUCI).

**Objetivo:** Medir la expresión del gen de IL-6 y TNF- $\alpha$  en pacientes con CUCI y compararla con la de sujetos sanos y con inflamación inespecífica, así como determinar su correlación con la actividad histológica.

**Pacientes y métodos:** Se estudiaron 36 pacientes con CUCI, 13 controles sanos y 11 con inflamación sin enfermedad inflamatoria intestinal (EEI). A partir de la extracción del ácido desoxirribonucleico total, se sintetizó ácido desoxirribonucleico de cadena complementaria mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La cuantificación relativa de la expresión se realizó a través de la PCR en tiempo real para IL-6 y TNF- $\alpha$ . El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba de Kruskal-Wallis y la correlación de Spearman.

**Resultados:** La expresión de IL-6 aumentó en pacientes con CUCI activa en comparación con los controles ( $p = 0.004$ ) y con los enfermos con CUCI en remisión ( $p = 0.014$ ). No existió diferencia significativa entre los pacientes con CUCI activa y controles inflamados ( $p = 0.446$ ). La expresión

## Abstract

**Background:** It has been reported that pro-inflammatory cytokines levels like IL-6 and TNF- $\alpha$  can determine the degree of inflammation of ulcerative colitis (UC).

**Aims:** To measure the gene expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  in patients with UC and controls and to correlate with histological activity.

**Patients and methods:** We studied 36 patients with UC, 13 healthy controls and 11 with inflammation. After total ribonucleic acid (RNA) extraction, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) was synthesized by polymerase chain reaction (PCR) and relative expression was determined through real-time PCR for IL-6 and TNF- $\alpha$ . Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test and Spearman correlation.

**Results:** The expression of IL-6 increases in patients with active UC compared to controls ( $p = 0.004$ ) as well as UC patients in remission ( $p = 0.014$ ). There was no significant difference between patients with active UC and controls with inflammation. ( $p = 0.446$ ). Gene expression of TNF- $\alpha$  was higher in biopsies from patients with UC activity compared with control subjects ( $p = 0.004$ ), as well as those in remission

del gen de TNF- $\alpha$  es mayor en biopsias con CUCI en actividad en comparación con sujetos controles ( $p = 0.004$ ) y en remisión ( $p = 0.001$ ). La expresión de IL-6 correlacionó de manera significativa ( $p = 0.02$ ) con la actividad histológica.

**Conclusiones:** La expresión del gen de IL-6 y TNF- $\alpha$  está aumentada en pacientes con CUCI activa. La IL-6 es mejor marcador de inflamación intestinal ya que su expresión correlaciona con la actividad histológica.

**Palabras clave:** colitis ulcerativa, expresión genética, interleucina 6, factor de necrosis tumoral alfa, recto. México.

( $p = 0.001$ ). The expression of IL-6 correlated significantly ( $p = 0.02$ ) with histological activity.

**Conclusions:** The gene expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  is increased in active UC. Interleukin 6 is better marker of bowel inflammation because its expression correlates with histological activity.

**Key words:** ulcerative colitis, gene expression, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, rectum, Mexico.

## Introducción

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) comprende dos entidades clínicas, la colitis ulcerativa crónica idiopática (CUCI) y la enfermedad de Crohn (EC), cuya etiología se desconoce y en las que factores genéticos, ambientales e inmunológicos contribuyen a su patogénesis.<sup>1-4</sup>

La inflamación es una reacción del organismo en que las células inmunitarias producen una variedad de citocinas que favorecen esta condición.<sup>5</sup> En la actualidad se desconoce si lo que ocurre es una respuesta exagerada a la microbiota intestinal con un proceso de hipersensibilidad o si se trata de un proceso de hiposensibilidad que podría actuar como factor desencadenante. Sin duda, ambas condiciones pueden suscitarse, siempre en combinación con el factor ambiental y la predisposición genética. El conocimiento de los mecanismos inmunológicos desencadenados en la EII ha permitido identificar nuevas estrategias terapéuticas mediante el bloqueo directo de citocinas proinflamatorias como la IL-6 y el TNF- $\alpha$ . La CUCI presenta una respuesta inmunitaria anormal en la mucosa intestinal.<sup>6</sup> En la CUCI se informa un aumento en la respuesta del sistema inmunitario que conduce a la producción de mediadores inflamatorios como citocinas y moléculas de adhesión que causan destrucción celular.<sup>7</sup> Por lo anterior, es importante considerar el papel que pueden tener las citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$  en las diferentes situaciones de la enfermedad (como actividad y

remisión) con el fin de desarrollar nuevos métodos diagnósticos y terapéuticos.<sup>8</sup>

Existen estudios en los que se informan diferencias en la expresión génica de citocinas entre los pacientes con EII y controles.<sup>9</sup> Sin embargo, en pocos se analiza la relación entre la expresión génica y la actividad (clínica e histológica) o las diferentes situaciones de la enfermedad (remisión, actividad leve, moderada y grave). En este trabajo se realiza un análisis cuantitativo del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) del gen de IL-6 y TNF- $\alpha$  en la mucosa intestinal de pacientes con CUCI y se evalúa su correlación con el grado de actividad histológica para identificar un marcador molecular de inflamación.

## Pacientes y métodos

### Pacientes

Se estudiaron 36 pacientes con CUCI, 19 con actividad (12 mujeres, edad media  $37 \pm 2$  años) y 17 en remisión (9 mujeres, edad media  $40 \pm 2$  años) que acudieron a la Clínica de Enfermedad Inflamatoria Intestinal del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Todos los sujetos del estudio dieron su consentimiento para participar en el estudio. El diagnóstico de CUCI se confirmó por histopatología. La actividad inflamatoria se evaluó en forma clínica y por endoscopia según la puntuación de MAYO y la actividad histológica se estableció usando el sistema de gradiente

**Tabla 1.**

Cantidad de biopsias de diferentes regiones de intestino empleadas en el estudio

	Pacientes con CUCI		Controles	
	Infl amado	Remisión	Infl amado	No infl amado
Íleon terminal-ciego	4	3	0	4
Colon ascendente-transverso	6	4	0	4
Colon descendente	6	4	0	4
Colon sigmoide	3	2	0	2
Recto	22	19	13	14

descrito por Riley.<sup>10</sup> Se incluyeron 13 controles sanos (8 mujeres, edad media  $40 \pm 2$  años) que adquirieron por pérdida de peso en estudio o que habían cursado con anemia (ya resuelta) sin otras enfermedades asociadas (cáncer, enfermedad autoinmunitaria, colitis medicamentosa, colitis postradiación, colitis infecciosa, colitis isquémica, etc.), sin datos clínicos o endoscópicos de EII y que mostraran una biopsia colónica de características normales. También se incluyó un grupo de 11 pacientes (5 mujeres, edad media  $44 \pm 2$  años), con datos de inflamación (proctitis crónica leve), sin hallazgos histológicos compatibles con EII y sin etiología conocida.

### Tejido

Se obtuvo un total de 60 biopsias de mucosa rectal a las cuales se les cuantificó la expresión génica de IL-6 y TNF- $\alpha$ . Para el gradiente de expresión de IL-6, se tomaron biopsias de distintos segmentos del intestino grueso (ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente, colon sigmoide y recto), como se ilustra en la **Tabla 1**.

Las biopsias se colocaron en tubos crioviales con 1 mL de preservador de ácidos nucleicos (RNA later<sup>®</sup>), se mantuvieron a temperatura ambiente por un periodo de 6 a 8 horas, y más tarde fueron almacenadas a  $-70$  °C hasta el momento de la extracción del RNA.

### Extracción del RNA total y reacción de la transcriptasa inversa (RTR)

El RNA total se obtuvo empleando un estuche de extracción (High Pure RNA Tissue Kit de Roche), según la metodología sugerida por el fabricante. Las biopsias se mezclaron en un homogeneizador durante 1 minuto con amortiguador de lisis, la mezcla se lavó con etanol al 100%, empleando las

**Tabla 2.**

Características de los iniciadores empleados en la PCR en tiempo real

Gen	Iniciador sentido	Iniciador antisentido
IL-6	5'tctgctcccacaatgaacat3'	3'gatgccagggagacag5'
TNF- $\alpha$	5'cagcctcttctctctctga3'	3'gccagagggtgattagaga5'
RPLP0	5'gaagctctatctcgctcca3'	3'agcaggcaacaccaggag5'

columnas de purificación, se centrifugó a 13 000 xg durante 15 segundos, se lavó con amortiguador a 13 000 xg durante 15 segundos, y para finalizar se agregó 100  $\mu$ L de amortiguador de elución para diluir el RNA total.

La síntesis de DNA de cadena complementaria se realizó mediante la RTR en tiempo real. La reacción se llevó a cabo con 20  $\mu$ L de la siguiente forma: preincubación, 25 °C x 10 minutos; incubación, 55 °C x 30 minutos, seguida de la desnaturalización, 85 °C x 5 minutos en un termociclador (Perkin-Elmer 9600 Co. Norwalk, CT).

### Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR)

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó empleando como sustrato el DNA complementario que resultó de la retrotranscripción. Para la amplificación de las regiones de interés, la reacción se llevó a cabo en 10  $\mu$ L. Para determinar la expresión relativa de los genes de IL-6, TNF- $\alpha$  y RPLP0 (ribonucleoproteína larga humana P0, como gen de referencia), se utilizó el termociclador Light Cycler 2.0 Roche<sup>®</sup> e iniciadores sentido y antisentido de Amplio byosystem<sup>®</sup> y sondas Taq Man para cada gen (Universal Probe Library Set, Human de Roche<sup>®</sup>), como se ilustra en la **Tabla 2**.

**Tabla 3.**

Características clínicas y demográficas de los pacientes

	CUCI activa	CUCI remisión	Grupo control
<b>Edad promedio</b>	37.31	40.88	40.72
<b>Género</b>			
Femenino	12	9	13
Masculino	7	8	11
<b>Edad al diagnóstico</b>			
<40 años	14	11	
>40 años	5	6	
<b>Extensión</b>			
Pancolitis	16	10	
Distal	3	7	
<b>Manifestaciones extraintestinales</b>			
No	10	15	
Sí	9	2	
<b>Respuesta al tratamiento</b>			
Sí	18	17	
No	1		

**Tabla 4.**

Correlación de las variables clínicas con la expresión del gen IL-6

	N	Media	Desviación	Valor p
Edad promedio	36	8.660	19.730	0.327
<b>Duración de la enfermedad</b>				
Reciente diagnóstico	0			0.016
Menos de 1 año	3	1.282	1.213	
1 a 3 años	9	24.735	35.370	
3 años en adelante	24	3.432	4.686	
<b>Edad de diagnóstico</b>				
<40 años	31	10.8354	22.418	
>40 años	5	3.426	2.651	
<b>Extensión</b>				
Pancolitis	10	1.575	1.899	0.185
Distal	26	11.384	22.713	
<b>Manifestaciones extraintestinales</b>				
Sin manifestaciones	25	6.497	15.951	
Artritis o artralgiás	7	19.583	32.743	0.617
Colangitis	1	3.26		
Pioderma gangrenoso	2	1.955	1.237	
Eritema nodoso	1	5.08		
<b>Respuesta al tratamiento</b>				
Con respuesta	27	9.792	22.172	
Dependiente de esteroides	8	5.285	10.031	0.844
Resistente a los esteroides	0	5.08		
Resistente a los inmunomoduladores	0			
Intolerante a inmunomoduladores	1			

La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones: un programa de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, 45 ciclos de amplificación (95 °C-10 segundos, alineación 60 °C 10 segundos, extensión 40 °C-30 segundos) y un ciclo de enfriamiento a 40 °C durante 30 segundos.

### Análisis estadístico

La comparación de los datos de grupos independientes se analizó mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Para determinar la correlación entre la expresión del gen de IL-6 con la actividad histológica como marcador de inflamación se utilizó la prueba de correlación de Spearman. Se tomó como significativo un valor de  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 15.0.

### Resultados

Se incluyeron 60 individuos en el análisis final, de los cuales 17 tenían CUCI en remisión, 19 CUCI activa y 24 fueron del grupo control. Las características clínicas y demográficas se muestran en la **Tabla 3**.

### Expresión del gen IL-6 y TNF- $\alpha$

La expresión de IL-6 se encontró significativamente más elevada en los pacientes con CUCI activa en comparación con los enfermos con CUCI en remisión ( $p = 0.004$ ) y con los controles sanos ( $p = 0.001$ ). No se encontró diferencia significativa entre los pacientes con CUCI activa y los controles

con inflamación ( $p = 0.446$ ). La expresión del gen de TNF- $\alpha$  fue mayor en las biopsias rectales de pacientes con CUCI activo que en sujetos controles ( $p = 0.004$ ) o en remisión ( $p = 0.007$ ). No se observó diferencia significativa entre individuos controles sanos y los pacientes con CUCI en remisión ( $p = 0.196$ ) (Figuras 1 y 2).

### Gradiente de expresión de IL-6 en el intestino

El patrón de expresión del gen de IL-6 en los pacientes con CUCI activa y pancolitis fue mayor en las biopsias de colon sigmoide y recto respecto a los pacientes en remisión. En los sujetos control la expresión estuvo disminuida y fue homogénea en todas las regiones del intestino (Figura 3).

### Expresión del gen de IL-6 y su correlación con la actividad histológica

La correlación fue significativa entre la expresión del gen de IL-6 y la actividad histológica ( $p = 0.002$ ) (Figura 4).

### Asociación de la expresión de IL-6 y las características clínicas

Los pacientes con mayores grados de expresión del gen de IL-6 tenían una evolución de la enfermedad de más de 3 años ( $p = 0.016$ ). La respuesta al tratamiento médico y el curso clínico no mostraron diferencia significativa ( $p = 0.844$  y  $p = 0.680$ , respectivamente). No se encontraron diferencias entre la expresión de IL-6 en variables clínicas como extensión de la enfermedad, género, edad al momento del diagnóstico y manifestaciones extraintestinales (Tabla 4).

### Discusión

En el presente trabajo se cuantificó la expresión del gen de IL-6 y de TNF- $\alpha$  en la mucosa rectal de pacientes con CUCI activa, en remisión y en un grupo control. Los hallazgos obtenidos de la expresión del gen de IL-6 en los diferentes grupos de estudio mostraron que la expresión en biopsias de recto en pacientes con CUCI activa estaba aumentada en comparación con CUCI en remisión y controles sanos. Los niveles de expresión del gen de IL-6 y de TNF- $\alpha$  disminuyeron en pacientes con CUCI en remisión comparados con el grupo control. Determinar la expresión de la IL-6 y correlacionarla con la actividad histológica permitió confirmar los hallazgos histopatológicos para seleccionar de manera adecuada los grupos de estudio (CUCI activa

o en remisión) y sirvió para confirmar que la IL-6 es un buen marcador molecular de inflamación y en consecuencia de actividad. Existen diferencias en la expresión de esta interleucina entre sujetos con CUCI activa e inactiva, los del grupo control sano y los del grupo control con inflamación. Su expresión aumenta de manera sustancial en los pacientes con CUCI activa comparados con los del grupo control inflamado y esto se debe a que la expresión no es similar en cualquier proceso inflamatorio.

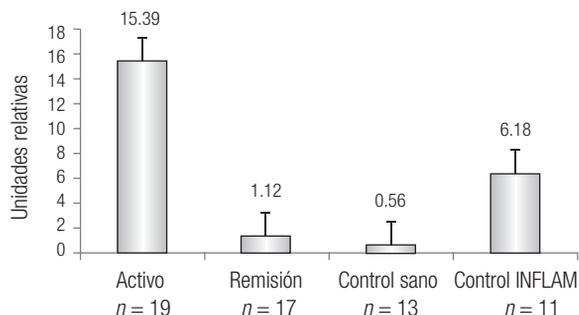
Estos hallazgos confirman los resultados obtenidos por Raddatz y colaboradores<sup>9</sup> quienes encontraron mayor expresión de IL-6 en recto y sigmoide de pacientes con CUCI activa con respecto a los pacientes en remisión.

Cantor y colaboradores encontraron que el polimorfismo (-174G/C) del gen IL-6 afecta la actividad y expresión del mRNA y por lo tanto de la proteína. El polimorfismo (-174G/C) del gen de IL-6 se relacionó con el desarrollo de EII.<sup>11</sup> Sawa y colaboradores<sup>12</sup> determinaron mediante la técnica de PCR en tiempo real un aumento significativo en la expresión de los niveles de mRNA del gen de TNF- $\alpha$  en biopsias de intestino en condiciones de inflamación aguda de sujetos con CUCI con respecto a los sujetos control. Los niveles de mRNA de las citocinas de Th1 y de Th2 están incrementados en la mucosa colónica de pacientes con CUCI, lo que sugiere la posibilidad del papel fundamental que desempeñarían la inmunidad celular y la humoral en la patogénesis de la CUCI.<sup>12</sup>

Hasta el momento no se han realizado estudios que asocien los grados de expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  con características clínicas de la CUCI. En este trabajo se observó que los pacientes con CUCI con mayores niveles de expresión de IL-6 fueron los que presentaban mayor grado de actividad histológica ( $p = 0.002$ ).

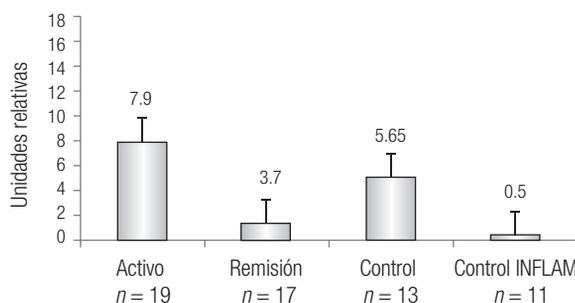
No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión del gen de IL-6 y TNF- $\alpha$  en variables como el género ya que los valores de expresión de ambos genes son similares en hombres y en mujeres. En relación con otra variable como la extensión de la CUCI, se demostró que la expresión de IL-6 difiere en las distintas regiones del colon en los pacientes con esa afección, ya que en personas normales se comprobó una expresión homogénea a lo largo de todos los segmentos del colon. Esta posible diferencia de expresión en las distintas regiones del colon puede marcar la diferencia para que algunos pacientes desarrollen

**Figura 1.**  
Expresión de IL-6 en mucosa de recto



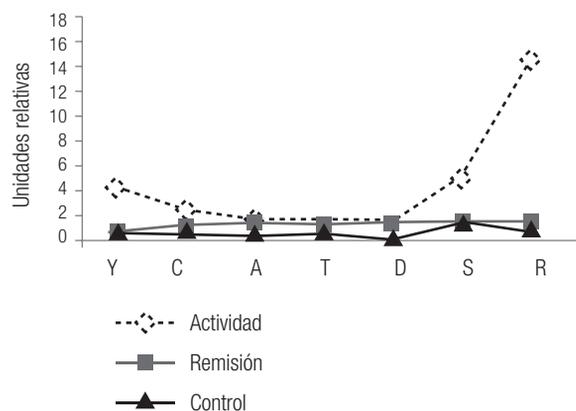
La expresión del IL-6 se encontró significativamente aumentada en los pacientes con CUCI activa en comparación con los enfermos con CUCI en remisión ( $p = 0.004$ ) y con los controles sanos ( $p = 0.001$ ). El valor  $p < 0.01$  se consideró significativo.

**Figura 3.**  
Expresión de TNF- $\alpha$  en mucosa de recto



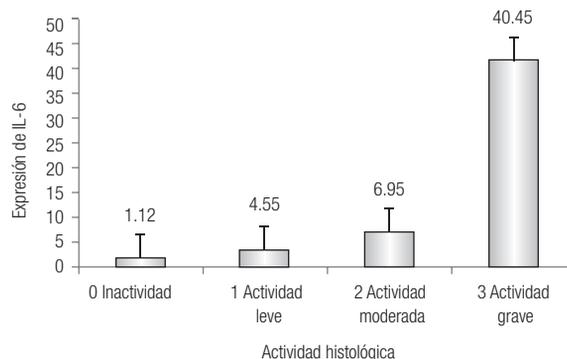
Patrón de expresión de IL-6 en biopsias de regiones de colon e íleon de pacientes con CUCI activa, en remisión y en sujetos sanos (Y = Íleon, C = Ciego, A = Ascendente, T = Transverso, D = Descendente, S = Sigmoide, R = Recto).

**Figura 2.**  
Expresión de IL-6 en intestino



La expresión de TNF- $\alpha$  se encontró aumentada en los pacientes con CUCI activa en comparación con los enfermos con CUCI en remisión ( $p = 0.007$ ) y en los controles sanos sólo se observó tendencia ( $p = 0.048$ ). El valor  $p < 0.01$  fue considerado significativo. NS = no significativo.

**Figura 4.**  
Correlación de la expresión de IL-6 con la actividad histológica



La correlación de Spearman fue significativa entre los niveles de expresión del gen de IL-6 con la actividad histológica ( $p = 0.002$ ). Se observa mayor expresión del gen de IL-6 en aquellos pacientes con actividad histológica grave.

pancolitis y otros CUCI distal. En relación con las manifestaciones extraintestinales, tampoco se encontró asociación con los grados de expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$ , lo que indicaría que los niveles de expresión de ambas citocinas en el recto se relacionan con el desarrollo de la CUCI, pero tal vez no guardan ninguna relación con complicaciones que la CUCI produce en otros órganos.

Lo anterior explicaría que los niveles de expresión de IL-6 se encuentran aumentados en pacientes con CUCI en remisión en comparación con el grupo control y confirmaría el aumento de la expresión de IL-6 como factor de riesgo para mantener una CUCI activa.

Este tipo de estudios básicos permite identificar marcadores bioquímicos de inflamación y

establecer diferentes grupos de estudio, además de apoyar su posible aplicación en la clínica y su uso potencial en la administración de terapias biológicas. Un mayor conocimiento de los mediadores implicados en la inflamación intestinal ha abierto nuevas líneas de investigación basadas en la manipulación de la respuesta inmunitaria con fines terapéuticos, como son la neutralización de citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ . El infliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico murino-humano contra el TNF- $\alpha$  que se desarrolló como agente terapéutico frente a las enfermedades mediadas por el TNF- $\alpha$ . El tocilizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une al receptor de la interleucina 6 (IL-6) y bloquea así la actividad de esta citocina, una proteína con una función importante en el proceso inflamatorio; en un ensayo clínico de fase II muestra buena tolerancia al tratamiento y mejora los síntomas durante la fase aguda de la inflamación.

En conclusión, la expresión del gen de IL-6 es un buen marcador molecular de inflamación com-

parada con la expresión de TNF- $\alpha$  ya que se encontró una correlación significativa de la expresión de IL-6 con el grado actividad histológica.

## Referencias

1. Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:390-400.
2. Yamamoto-Furusho JK. Clinical epidemiology of ulcerative colitis in Mexico. A single hospital-based study in a 20-year period (1987-2006). *J Clin Gastroenterol* 2009;43:221-24.
3. Xavier RJ, Podolsky DK. Unraveling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427-34.
4. Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK. Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterology* 2007;13:5577-80.
5. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, et al. Genetics of the innate immune response in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:338-55.
6. Mitsuyama K, Sata M, Rose-John S. Interleukin-6 trans-signalling in inflammatory bowel disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17:451-61.
7. Sánchez-Muñoz F, Domínguez-López A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterology* 2008;14:4280-8.
8. Matsumoto S, Tsuruta O. et al. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clin Rev Allergy Immunol* 2005;28:187-96.
9. Raddatz D, Bockemül M. Quantitative measurement of cytokine mRNA in inflammatory bowel disease: relation to clinical and endoscopic activity and outcome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:547-57.
10. Riley SA, Mani V, Goodman MJ, et al. Comparison of delayed-release 5-aminosalicylic acid (mesalazine) and sulfasalazine as maintenance treatment for patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1988;94:1383-9.
11. Cantor MJ, Nickerson P, Bernstein CN. The role of cytokine gene polymorphisms in determining disease susceptibility and phenotype in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1134-42.
12. Sawa Y, Oshitani N. Comprehensive analysis of intestinal cytokine messenger RNA profile by real-time quantitative polymerase chain reaction in patients with inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 2003;11:175-179.