

· 论 著 ·

大黄素对肠黏膜屏障损伤的保护作用及机制研究

白小武, 嵇 武, 丁博文, 张 强, 李秋荣, 李 宁

[摘要] **目的** 观察大黄素对大鼠肠缺血再灌注(IR)肠黏膜屏障功能的影响。**方法** 48 只雄性 SD 大鼠,随机分为假手术(S)组、模型(IR)组、模型+生理盐水(IRS)组和模型+大黄素(IRE)组。IRE 组给予 40mg/(kg·d)大黄素灌胃,IRS 组给予等量生理盐水灌胃,连续 7 d,于第 7 天给药 2 h 后,制备肠缺血再灌注模型。光镜和透射电镜下分别观察各组小肠病理改变和紧密连接损伤,并进行 Chiu's 评分。用 TUNEL 法检测肠黏膜细胞凋亡指数,Western Blot 半定量法测定肠黏膜 Claudin-1、Occludin 蛋白含量。**结果** IRE 组与 IR 组、IRS 组相比,小肠病理损伤和紧密连接结构破坏明显减轻,Chiu's 评分降低($P < 0.05$),细胞凋亡指数降低($P < 0.05$),两种连接蛋白 Claudin-1、Occludin 含量增加($P < 0.05$)。**结论** 大黄素可以缓解肠缺血再灌注造成的肠道损伤、减少肠黏膜细胞凋亡、保护肠上皮细胞间紧密连接,对肠黏膜屏障具有保护作用。

[关键词] 大黄素;大鼠;肠缺血再灌注;紧密连接蛋白;细胞凋亡;肠黏膜屏障

[中图分类号] R574.53 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2012)01-0012-04

Protective effects of emodin on intestinal mucosal barrier injury

BAI Xiao-wu, JI Wu, DING Bo-wen, ZHANG Qiang, LI Qiu-rong, LI Ning. Research Institute of General Surgery, Clinical School of Medical College of Nanjing University/Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, PLA, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of emodin on intestinal mucosal barrier in rat after intestinal ischemia reperfusion. **Methods** Forty-eight male SD rats were randomly divided into four groups; sham control group (S), model group (IR), model + saline group (IRS), model + emodin group (IRE). 40mg/(kg·d) emodin was administrated intragastrically in IRE group for 7 days. The same volume saline was administrated intragastrically in IRS group. 2 hours after last administration. We established intestinal ischemia reperfusion model. Pathological changes of intestinal tissues and damages of tight junction were observed respectively by using a light microscopy and a transmission electron microscopy in each group. Degree of injury to intestinal mucosa was evaluated by Chiu's assessment. Intestinal mucosal apoptotic index was measured by TUNEL staining. Semi-quantitative assessment of Claudin-1 and Occludin was measured by Western Blot. **Results** Pathological intestinal damages and tight junction damages were much lighter in IRE group than in IR group and IRS group. Degree of injury to intestinal mucosa and intestinal mucosal apoptotic index were significantly lower in IRE group than in IR group and IRS group (all $P < 0.05$). Contents of Claudin-1 and Occludin were significantly higher in IRE group than in IR group and IRS group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Emodin can alleviate intestinal pathological damages, reduce cell apoptosis, protect intercellular tight junction and intestinal mucosal barrier in intestinal ischemia reperfusion rats.

[Key words] emodin; rat; intestinal ischemia reperfusion; tight junction protein; cell apoptosis; intestinal mucosal barrier

肠缺血再灌注(IR)是临床多种疾病的病理生理过程,进一步发展可以导致全身炎症反应综合征

(SIRS)和多器官功能障碍综合征(MODS)等的发生。研究表明大黄素对肠缺血再灌注损伤有保护作用,故本实验采用大鼠肠缺血再灌注模型,观察大黄素对肠缺血再灌注肠黏膜细胞凋亡及紧密连接破坏的影响,探讨大黄素保护肠黏膜屏障的机制,为临床治疗肠缺血再灌注提供理论依据,现将研究结果报告如下。

基金项目: 南京军区医药卫生科研基金(09Z027)

作者简介: 白小武(1985-),男,山西吕梁人,硕士研究生,医师,研究方向:普通外科胃肠专业

作者单位: 210002 江苏南京,南京大学医学院临床学院(南京军区南京总医院)解放军普通外科研究所

通讯作者: 嵇 武, E-mail: jiwusky@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 动物 雄性健康清洁级 SD 大鼠 48 只, 8~9 周龄, 体重 200~250 g, 由南京军区南京总医院比较医学科提供, 实验动物使用许可证号: SYXK(军) 2007-029; 饲养室温度 22~23℃, 环境湿度 50%, 喂以标准的大鼠饮食。

1.2 药物与试剂 大黄素购于中国药品生物制品检定所; 兔抗大鼠 Claudin-1 抗体和 Occludin 抗体购于 Santa Cruz 公司; 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的末端标记法 (TUNEL) 染色试剂盒、山羊抗兔 IgG-HRP 二抗、牛血清白蛋白 (BSA) 购于南京碧波生物科技有限公司; β -actin 抗体购于北京博奥森生物技术有限公司; 考马斯亮蓝蛋白浓度试剂盒购于南京建成生物工程研究所; 全蛋白酶抑制剂混合片购于罗氏公司; Western Blot 上样缓冲液购于 Fermentas 公司。

1.3 主要实验仪器 JEM-1010 透射电子显微镜 (日本电子株式会社)。

1.4 动物分组及模型制作 48 只 SD 大鼠正常喂养 1 周后随机分为假手术 (S) 组、模型 (IR) 组、模型 + 生理盐水 (IRS) 组和模型 + 大黄素 (IRE) 组, 每组 12 只。大黄素用生理盐水配制成 10 g/L 的混悬液备用。IRE 组按 40mg/(kg·d) 剂量给予大黄素灌胃, IRS 组给予等量的生理盐水灌胃, 两组均为 1 次/d, 连续 7 d。实验第 7 天给药 2 h 后, 采用肠系膜上动脉 (SMA) 夹闭/松夹方法制备肠缺血再灌注模型^[1]。假手术组只分离 SMA, 不夹闭; 缺血 30 min, 再灌注 2 h 后麻醉大鼠、开腹取距回盲部 5 cm 处回肠标本。

1.5 病理组织学观察 取 2 cm 回肠标本置于 10% 的中性甲醛中固定, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光学显微镜下观察病理变化, 按照 Chiu's 损伤分级评分^[2]。

1.6 透射电镜观察 将回肠标本修成 1 mm × 1 mm × 5 mm 大小, 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定, 脱水、浸透、包埋、超薄切片, 透射电子显微镜观察肠黏膜上皮细胞间紧密连接的变化。

1.7 肠黏膜细胞凋亡指数检测 取 1 cm 回肠标本迅速冻于液氮中, 冰冻切片, 按照 TUNEL 试剂盒说明书染色, 光学显微镜下观察。400 倍视野内每组随机选取 100 个相邻视野, 计算凋亡指数。

1.8 Western Blot 半定量测定 Claudin-1、Occludin 蛋白含量 取 3 cm 回肠标本, 纵向剪开肠腔, 用载玻片轻轻刮取并收集肠黏膜, 置于 -20℃ 保存。将保存组织放入组织匀浆器内, 每 100 mg 加 1 ml 全

蛋白提取液 (0.15 mol/L 氯化钠 + 0.05 mol/L 三羟甲基氨基甲烷 + 1.0% 聚氧乙烯辛基苯基醚, 每 10 ml + 全蛋白酶抑制剂混合片 1 片) 研磨。12 000 r/min (离心半径 6 cm), 4℃ 离心 20 min, 取上清液, 测定总蛋白含量。分别取 40 μ g 的总蛋白加入上样缓冲液, 煮沸 10 min 后, 先行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 后转移至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 加入 5 g/L BSA 室温封闭 1 h, 加入 Claudin-1、Occludin 和 β -actin (1:500) 抗体, 4℃ 孵育过夜, 漂洗后加入 IgG-HRP 二抗 (1:3000), 室温孵育 1 h, 漂洗、曝光成像。QuantityOne 软件分析测定结果, 计算目标蛋白相对含量 = 目标蛋白灰度值/ β -actin 灰度值。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD 法 (Claudin-1、Occludin 的含量), 方差不齐时用 Dunnett T3 法 (Chiu's 评分、凋亡指数), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大黄素对肠黏膜组织细胞超微结构的影响 S 组肠道黏膜形态完整, 绒毛结构清晰, 有部分绒毛尖端上皮下间隙略增宽, 紧密连接和桥粒结构清晰, 形态完整, 可见大量微绒毛, 排列整齐。IR 组肠道黏膜结构紊乱, 绒毛破损, 上皮细胞大量脱落, 固有层暴露, 出血, 炎症细胞在内皮下聚集, 微绒毛大量脱落、断裂, 紧密连接结构模糊、肿胀, 致密物质减少。IRS 组病理表现、电镜表现与 IR 组相似。IRE 组与 IR 组和 IRS 组比较, 肠黏膜损伤程度较轻, 上皮下间隙扩张, 部分绒毛顶端破损、脱落, 毛细血管充血, 电镜下破坏明显减轻, 微绒毛增多, 紧密连接结构大致可见, 肿胀缓解 (图 1、图 2)。统计分析, 与 S 组相比, IR 组、IRS 组、IRE 组病理损伤明显严重 ($P < 0.05$); IR 组与 IRS 组比较无明显差别 ($P > 0.05$); 而 IRE 组与 IR 组、IRS 组相比病理损伤明显减轻 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 大黄素对肠黏膜细胞凋亡指数的影响 S 组上皮及隐窝处可见少量凋亡细胞。IR 组可见弥散性分布的凋亡细胞, 数量明显增加。IRS 组与 IR 组结果相似。IRE 组与 IR 组相比凋亡细胞数量明显减少 (图 3)。统计分析, 与 S 组相比, IR 组、IRS 组、IRE 组凋亡细胞数量增多 ($P < 0.05$); IR 组与 IRS 组相比无明显差别 ($P > 0.05$); 而 IRE 组与 IR 组、IRS 组相比凋亡细胞数量减少 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 大黄素对肠黏膜紧密连接蛋白 Claudin-1、Occludin 含量的影响 S 组正常表达 Claudin-1、Occludin 蛋白;IR 组和 IRS 组 Claudin-1、Occludin 蛋白表达明显下调($P<0.05$),两者之间无明显差异($P>0.05$);IRE 组 Claudin-1、Occludin 蛋白表达明显高

于 IR 组和 IRS 组($P<0.05$)。见表 1。

3 讨论

肠缺血再灌注损伤是休克、创伤、感染等多种临床常见疾病重要的病理生理环节,可以引起肠黏膜

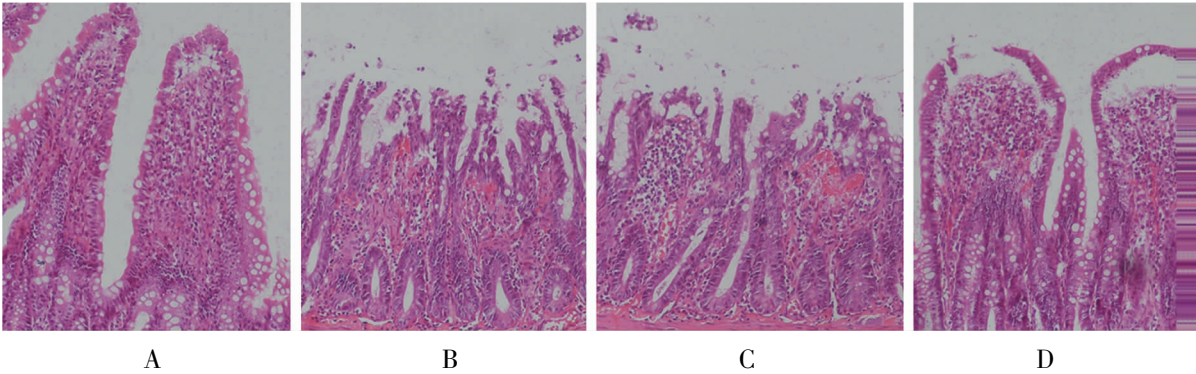


图 1 四组大鼠回肠病理改变(HE ×200)
A:S 组;B:IR 组;C:IRS 组;D:IRE 组

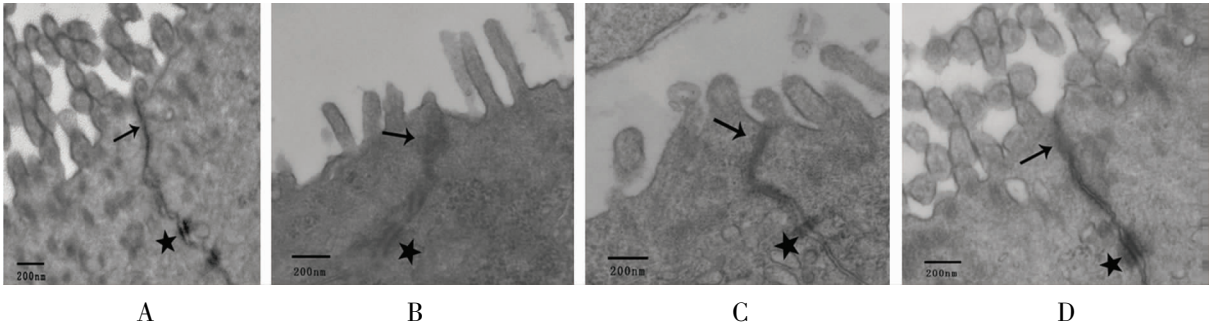


图 2 四组大鼠肠黏膜上皮细胞超微结构电镜变化(×50000)
A:S 组;B:IR 组;C:IRS 组;D:IRE 组;图中箭头所指为紧密连接,星号所指为桥粒

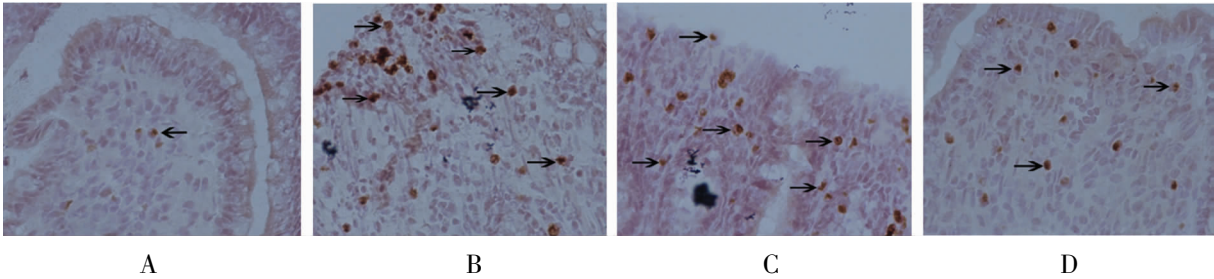


图 3 四组大鼠肠黏膜细胞凋亡的 TUNEL 检测(二氨基联苯胺染色 ×400)
A:S 组;B:IR 组;C:IRS 组;D:IRE 组;图中箭头所指为凋亡细胞

表 1 四组大鼠肠黏膜屏障损伤指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Chiu's 病理评分	凋亡指数(%)	Claudin-1(相对含量)	Occludin(相对含量)
S 组	12	0.44 ± 0.66 ^{#Δ}	1.04 ± 0.96 ^{#Δ}	7.22 ± 0.85 ^{#Δ}	2.24 ± 0.53 ^{#Δ}
IR 组	12	3.40 ± 0.97 [*]	10.77 ± 2.22 [*]	3.68 ± 0.85 [*]	1.26 ± 0.46 [*]
IRS 组	12	3.36 ± 1.02 [*]	10.69 ± 2.22 [*]	3.46 ± 0.78 [*]	1.13 ± 0.38 [*]
IRE 组	12	2.47 ± 0.98 ^{*#Δ}	6.54 ± 1.94 ^{*#Δ}	7.34 ± 1.28 ^{#Δ}	2.29 ± 0.48 ^{#Δ}

注:与 S 组比较,^{*} $P<0.05$;与 IR 组比较,[#] $P<0.05$;与 IRS 组比较,^Δ $P<0.05$

屏障受损,进一步发展可导致肠内细菌及内毒素移位,诱发 SIRS、MODS 和肠源性感染。肠缺血再灌注导致肠黏膜屏障受损的机制是一个复杂的过程,目前还未完全阐明,主要包括组织氧代谢障碍、氧自由基损伤、细胞因子和炎症介质的作用、白细胞与内皮细胞的相互作用等。西医预防和治疗肠黏膜屏障受损的措施一直存在不足之处,相关研究也未取得突破性进展^[3]。近年来,人们逐渐把治疗研究的重点转移到了中医药方面,并取得了一些成就^[4]。现代研究证实大黄素具有改善肠道血液循环、促进肠道蠕动、刺激肠道分泌和杀灭微生物、降低肠道黏膜通透性、抗炎及免疫调节等作用。在急性重症胰腺炎中,大黄素可以显著降低血清淀粉酶、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-6 的水平,减轻胰腺组织病理损伤,抑制 NF- κ B(核因子)活化,诱导细胞因子 TGF- β 1(人转移生长因子 β 1)基因的表达,促进多种细胞外基质成分合成,增加胰腺组织 DNA 合成和蛋白含量,参与胰腺组织的再生和修复。亦有研究证实大黄素对重症胰腺炎所致肠黏膜屏障损伤也具有保护作用,通过抑制小肠潘氏细胞分泌的隐凹素-4mRNA 的下调^[5],并下调 Bax(促凋亡因子)基因的表达抑制肠黏膜细胞过度凋亡,从而减轻肠黏膜屏障的损害,降低肠道内毒素的易位^[6]。大黄素可以通过增加大鼠肝移植后 Bcl-2(B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白)蛋白表达,抑制肝细胞的凋亡,从而减轻急性排斥反应程度^[7]。大黄素预处理在肝脏缺血再灌注时可以降低丙二醛的含量,减轻了脂质过氧化损害程度^[8]。本实验观察了大黄素对肠缺血再灌注肠黏膜病理组织学的影响,大黄素预处理组肠黏膜病理损伤明显减轻,Chiu's 评分降低,从而从病理学的角度明确了大黄素对肠缺血再灌注肠黏膜屏障具有保护作用。

肠黏膜屏障主要由机械屏障、生物屏障、免疫屏障^[9-10]及化学屏障构成,其中机械屏障是肠黏膜屏障的根本。机械屏障的结构基础是肠黏膜上皮细胞及细胞与细胞之间完整的连接。其中肠黏膜上皮细胞死亡的主要方式是细胞凋亡,约占死亡细胞总数的 80%。在肠缺血再灌注的过程中,细胞凋亡起了非常重要的作用。肠黏膜细胞凋亡的增加与肠缺血再灌注损伤密切相关^[11]。大量的凋亡导致肠黏膜屏障功能障碍,上皮细胞通透性增加,肠内细菌和内毒素移位^[12]。本研究结果显示大黄素预处理可以减少肠缺血再灌注造成的肠黏膜细胞凋亡。

细胞与细胞之间的连接方式有多种,包括紧密连接、粘附连接和缝隙连接,最主要的方式是紧密连

接。紧密连接的破坏可以导致水和物质跨上皮转运的紊乱,是肠黏膜屏障受损的重要环节。紧密连接破坏的最重要的标志是紧密连接蛋白的减少。本实验结果显示,大黄素预处理组肠缺血再灌注肠黏膜上皮之间紧密连接的破坏明显减轻,微绒毛增多,紧密连接蛋白的含量增多。

上述研究证实大黄素可以保护肠黏膜细胞减少凋亡,保护紧密连接结构减少破坏,维护肠黏膜屏障的完整性,降低肠黏膜通透性,进一步证实了大黄素对肠道缺血再灌注所致肠黏膜屏障损伤具有保护作用,为大黄素在肠黏膜屏障损伤中的预防和治疗提供了理论依据。

【参考文献】

- [1] 陈宇鹏,张家衡,柯有力,等.加味枳术汤对鼠肠缺血-再灌注早期小肠黏膜细胞凋亡的影响[J].腹部外科,2010,23(1):49-50.
- [2] Chiu CJ,McArdle AH,Brown R,et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states[J]. Arch Surg,1970,101(4):478-483.
- [3] 张育才,匡重伸,曾因明.钙蛋白酶抑制剂 calpeptin 对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响[J].东南国防医药,2007,9(4):241-242,245.
- [4] Song WB,Wang YY,Meng FS,et al. Curcumin protects intestinal mucosal barrier function of rat enteritis via activation of MKP-1 and attenuation of p38 and NF-kappaB activation[J]. PLoS One,2010,5(9):12969.
- [5] 赵金锋,刘世宾,罗静,等.大黄及丹参注射液对实验性急性胰腺炎小鼠小肠隐凹素-4 基因表达影响的研究[J].中国中医药科技,2010,17(1):34-35.
- [6] 宁建文,季峰,骆丹东,等.大黄素对重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜细胞凋亡和血清瘦素表达的影响[J].中西医结合学报,2009,7(12):1167-1173.
- [7] 孟珂伟,宋古文,周先亭,等.大黄素对大鼠肝移植后急性排斥反应中肝细胞凋亡的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2009,13(5):833-836.
- [8] 林胜璋,余耀军,游涛,等.大黄素对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的预防作用[J].中国中西医结合外科杂志,2006,12(2):136-138.
- [9] Rescigno M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity[J]. Trends Immunol,2011,32(6):256-264.
- [10] Cario E. Heads up! How the intestinal epithelium safeguards mucosal barrier immunity through the inflammasome and beyond[J]. Curr Opin Gastroenterol,2010,26(6):583-590.
- [11] Lopez-Nebolina F,Toledo AH,Toledo-Pereyra LH. Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion[J]. J Invest Surg,2005,18(6):335-350.
- [12] Liu C,Li A,Weng YB,et al. Changes in intestinal mucosal immune barrier in rats with endotoxemia[J]. World J Gastroenterol,2009,15(46):5843-5850.

(收稿日期:2011-09-13;修回日期:2011-10-09)

(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)