

· 论 著 ·

大黄素对肠上皮细胞损伤的保护作用及机制研究

丁博文, 嵇 武, 白小武, 车金辉, 张 强, 李秋荣

[摘要] **目的** 观察缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)损伤条件下大黄素(Emodin)对肠上皮细胞表达紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 的影响,以研究大黄素对肠黏膜屏障的保护作用机制。**方法** 体外培养肠上皮细胞株 Caco-2 建立 H/R 模型,将细胞随机分为正常细胞(N)组、缺氧复氧(H/R)组、缺氧复氧+Hank 平衡盐溶液(H/R+HBSS)组、缺氧复氧+大黄素(H/R+EN)组。检测跨上皮细胞电阻(transsepithelial electrical resistance, TEER)值;使用透射电子显微镜观察紧密连接的变化;用 Western blot 法测定 Occludin 和 ZO-1 蛋白的表达水平;半定量 RT-PCR 法测定 Occludin 和 ZO-1 的 mRNA 表达水平。**结果** 与 H/R 组、H/R+HBSS 组相比, H/R+EN 组的紧密连接破坏明显减少; H/R+EN 组的 TEER 值、Occludin 和 ZO-1 的蛋白及 mRNA 表达水平明显高于 H/R 组、H/R+HBSS 组($P < 0.05$)。**结论** 大黄素可通过减少 Occludin、ZO-1 的破坏并增加其表达来保护肠黏膜屏障。

[关键词] 大黄素;紧密连接;Caco-2 细胞;缺氧/复氧

[中图分类号] R329.445 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2012)03-0199-04

Protective effects of emodin on intestinal epithelial cells injury

DING Bo-wen, JI Wu, BAI Xiao-wu, Che Jin-hui, ZHANG Qiang, LI Qiu-rong. 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** Through observing the effects of emodin on the tight junction (TJ) protein Occludin and ZO-1 of intestinal epithelial cells damaged by hypoxia/reoxygenation (H/R), to study the mechanism of the protective effects of emodin on the intestinal mucosa barrier. **Methods** Bowel epithelial cell lines Caco-2 cells were cultured in vitro to establish H/R model. The cells were averagely randomized into four groups: N (normal cells) group, H/R (hypoxia/reoxygenation) group, H/R+HBSS (hypoxia/reoxygenation and Hanks balanced solution) group, H/R+EN (hypoxia/reoxygenation and Emodin) group. The transepithelial electrical resistance (TEER) value was measured; transmission electron microscope was used to observe the changes of TJ; Western blot analysis was employed to detect the expression level of Occludin and ZO-1 protein; Semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA expression level of Occludin and ZO-1. **Results** Comparing with the H/R group and H/R+HBSS group, the damage extent of TJ was significantly reduced in the H/R+EN group. The TEER value, the protein and mRNA expression level of Occludin and ZO-1 in the H/R+EN group were obviously higher than that of the H/R group and H/R+HBSS group ($P < 0.05$). **Conclusion** Emodin can decrease the damage of Occludin and ZO-1, and increasing their expression to protect the intestinal mucosa barrier.

[Key words] emodin; tight junction; Caco-2 cells; hypoxia/reoxygenation

肠黏膜屏障包括机械屏障、免疫屏障、微生物屏障和化学屏障,机械屏障是肠黏膜屏障的基础和最重要的部分^[1]。紧密连接形成的连续环周上皮细胞间连接,是构成肠黏膜机械屏障最重要的结

构^[2]。大黄素是中药大黄的重要单体,具有多种功效,如抑菌、抗炎、改善微循环、抗癌等,具有较好的临床应用价值^[3],近来有研究证实大黄素对肠黏膜屏障具有一定的保护作用。本实验通过建立肠上皮细胞缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)模型,研究大黄素对紧密连接蛋白的影响,探讨大黄素保护肠黏膜屏障的内在机制。

基金项目: 南京军区医药卫生科研基金课题(09Z027)

作者简介: 丁博文(1982-),男,江苏徐州人,硕士研究生,医师,从事普通外科临床工作

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 材料 肠上皮细胞株 Caco-2 细胞(中国科学院上海细胞生物学研究所)、大黄素(江苏食品药品检定所,纯度 > 99.9%)、Millicell 插入式培养皿(Millipore 公司)、兔抗鼠多克隆紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 抗体(Santa Cruz 公司)、辣根过氧化物酶(HRP)-羊抗兔二抗(Sigma 公司)、RT-PCR 试剂盒(北京全式金生物公司)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物(北京全式金生物公司)。

1.2 主要实验仪器 紫外分光光度计(Beckman Coulter)、JEM-1010 透射电子显微镜(日本电子株式会社)、MillicellTM 电阻测定系统(Millipore 公司)。

1.3 Caco-2 细胞的培养 Caco-2 细胞在 37℃、5% CO₂ 和 90% 相对湿度的 CO₂ 培养箱中培养,2~3 d 换液一次,每 5 d 按 1:3 的比例传代。Caco-2 细胞接种于 6 孔培养板内,供 Western-blot 及 RT-PCR 分析;接种于 Millicell 聚碳酸酯膜(4.5 cm², 0.4 μm),供跨上皮电阻值(trans epithelial electrical resistance, TEER)的检测及透射电镜分析。

1.4 Caco-2 细胞 H/R 损伤模型的建立方法 取生长达到 80%~90% 融合的 Caco-2 细胞,随机分为四组:正常细胞(N)组、H/R 组、缺氧复氧 + Hanks 平衡盐溶液(H/R + HBSS)组、缺氧复氧 + 大黄素(H/R + EN)组。H/R + EN 组细胞在 H/R 前 30 min 用 10 μmol/L 大黄素处理。将细胞置入密闭容器中,通入 95% N₂、5% CO₂ 的混合气体后将容器置于培养箱中孵育 90 min(缺氧),取出,置入培养箱中孵育 2 h(复氧)。

1.5 TEER 值的检测 用 MillicellTM 电阻测定系统测定 Caco-2 细胞单层的 TEER 值。TEER 是反映肠黏膜屏障通透性的主要指标之一,与细胞单层的通透性在一定范围内呈负相关。

1.6 透射电镜观察细胞间紧密连接的变化 将 Millicell 聚碳酸酯膜剪下,依次经固定、脱水、包埋、修块、切片,用醋酸铀、硝酸铅双重染色,透射电镜照相。

1.7 Western blot 检测 将刮取得到的 Caco-2 细胞加入细胞裂解液提取蛋白,考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度。取样品蛋白 40 μg,以聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳分离蛋白质,湿转移法将蛋白条带转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜。加入兔抗鼠 Occludin、ZO-1 一抗(1:500 稀释),4℃ 下孵育过夜,加入羊抗兔 HRP-IgG 抗体(1:3000 稀释),室温孵育 1 h,ECL 法显色。相应蛋白表达值为条带的灰度值除以 β-actin 灰度值。

1.8 RT-PCR 检测 按照 Trizol 说明书方法提取 Caco-2 细胞总 RNA,紫外分光光度计测量计算 RNA

纯度和浓度。在 20 μl 逆转录反应体系中,以 2.0 μg 的 mRNA 为模板将 mRNA 逆转录为 cDNA。PCR 反应以 GAPDH 为内参,使用 Primer5.0 软件设计引物序列(表 1)。反应条件:95℃ 5 min,95℃ 5 s,62℃ 15 s,72℃ 1 min。PCR 扩增循环 35 次。PCR 反应产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,数字成像仪照相分析,结果以 Occludin/GAPDH、ZO-1/GAPDH 的整合光密度值(integrated density value, IDV)的比值表示。

表 1 RT-PCR 引物序列及长度

引物名称	引物序列	长度
GAPDH	5'-TGAACGGGAAGC TCACTGG-3'	306bp
	5'-TCCACCACCTGTGTCTGTA-3'	
Occludin	5'-AAGAGTTGACAGTCCCATGGCATA-3'	132bp
	5'-ATCCACAGCGGAAGTTAATGGAAG-3'	
ZO-1	5'-GAATGATGTTGTTGTTGTTGCG-3'	191bp
	5'-TCAGAAGTGTGTCTACTGTCCG-3'	

1.9 统计学方法 计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS17.0 统计软件包分析,各组间的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TEER 值的检测 与 N 组比较,H/R、H/R + HBSS 和 H/R + EN 三组 TEER 值显著降低($P < 0.05$);H/R、H/R + HBSS 两组 TEER 值明显低于 H/R + EN 组($P < 0.05$);H/R、H/R + HBSS 两组间差异无统计学意义($P > 0.05$,表 2)。

表 2 各组 Caco-2 细胞 TEER 值检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	检测结果(% 初始 TEER)
N 组	12	100.38 ± 4.28
H/R + EN 组	12	46.83 ± 11.83*
H/R 组	12	24.50 ± 9.19**
H/R + HBSS 组	12	25.25 ± 8.11**

注:与 N 组比较,* $P < 0.05$;与 H/R + EN 组比较,** $P < 0.05$

2.2 透射电镜检测紧密连接 N 组紧密连接完整清晰;H/R + EN 组紧密连接可见肿胀,但结构仍比较清晰;H/R、H/R + HBSS 组紧密连接结构肿胀模糊,破坏明显(图 1)。

2.3 Western blot 检测 Occludin 和 ZO-1 蛋白的表达 与 N 组相比,H/R + EN、H/R、H/R + HBSS

三组 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$); H/R、H/R + HBSS 两组的 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达水平显著低于 H/R + EN 组 ($P < 0.05$); H/R、H/R + HBSS 两组间差异无明显统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2、表 3)。

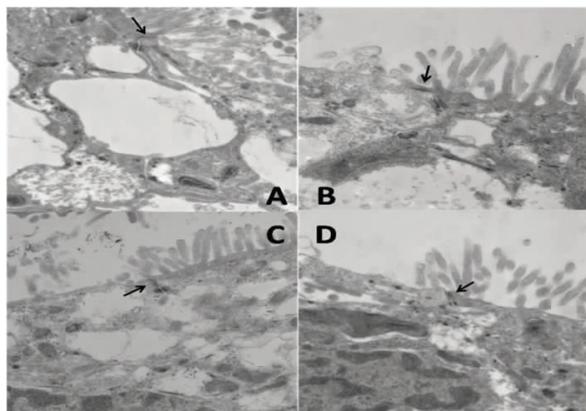


图 1 Caco-2 细胞的透射电镜变化 (醋酸铀、硝酸铅双重染色 $\times 25\ 000$)

注: A: N 组 B: H/R + EN 组 C: H/R 组 D: H/R + HBSS 组 →: 紧密连接

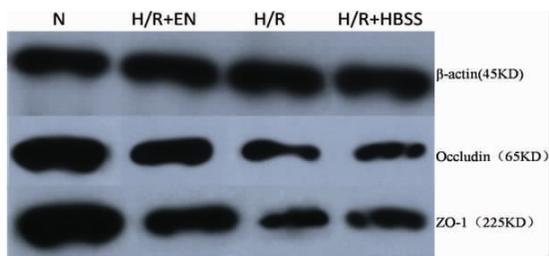


图 2 各组 Caco-2 细胞中 Occludin、ZO-1 蛋白的表达

表 3 各组 Caco-2 细胞中 Occludin、ZO-1 蛋白的相对表达 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Occludin 蛋白	ZO-1 蛋白
N 组	6	100 ± 14.73	100 ± 9.56
H/R + EN 组	6	64.35 ± 7.10*	57.45 ± 8.17*
H/R 组	6	38.30 ± 4.20**	29.51 ± 6.39**
H/R + HBSS 组	6	34.37 ± 4.82**	32.49 ± 5.81**

注: 与 N 组比较, * $P < 0.05$; 与 H/R + EN 组比较, # $P < 0.05$

2.4 RT-PCR 检测 Occludin 和 ZO-1 的 mRNA 表达

相对于 N 组, H/R + EN、H/R、H/R + HBSS 三组 ZO-1 和 Occludin 的 mRNA 表达水平明显下调 ($P < 0.05$); H/R、H/R + HBSS 两组的 ZO-1 和 Occludin 的 mRNA 表达水平显著低于 H/R + EN 组 ($P < 0.05$); H/R、H/R + HBSS 两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 3、表 4)。

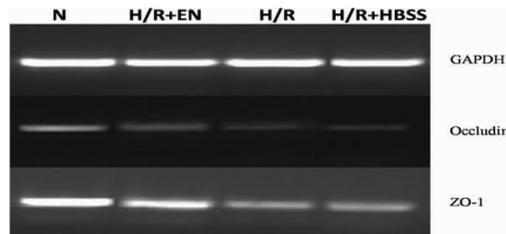


图 3 各组 Caco-2 细胞中 ZO-1、Occludin mRNA 的表达

表 4 各组 Caco-2 细胞中 ZO-1、Occludin mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Occludin mRNA	ZO-1 mRNA
N 组	6	0.808 ± 0.117	0.952 ± 0.101
H/R + EN 组	6	0.648 ± 0.061*	0.752 ± 0.031*
H/R 组	6	0.431 ± 0.014#	0.535 ± 0.016**
H/R + HBSS 组	6	0.464 ± 0.025**	0.484 ± 0.051**

注: 与 N 组比较, * $P < 0.05$; 与 H/R + EN 组比较, # $P < 0.05$

3 讨论

肠黏膜屏障具有防止肠道内病原微生物及毒素由肠腔侵入肠外器官的作用, 以机械屏障最为重要, 其基础为单层上皮细胞和细胞间的紧密连接^[4]。ZO-1、Occludin 是构成紧密连接的两种重要组成部分^[5]。ZO-1 与 ZO-2 形成稳定的复合体, 直接结合 Occludin 蛋白, 形成一个网络支架, 将 Occludin 和肌动蛋白系统连接在一起形成稳定的连接系统, 在信号传导过程中起转化作用, 从而控制细胞周围屏障^[6]。

肠黏膜屏障功能的损害是一复杂的过程, 诸多因素可能参与了这一过程的调控。目前的治疗有给予肠内营养支持等^[7], 但其具体的作用机制未完全阐明。大黄素曾长期作为导泻、抗炎药使用。许多研究证实大黄素可以显著降低肿瘤坏死因子 (TNF- α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 的表达水平以及过氧化物酶 (MPO) 的活性^[8-9]。大黄素具有的潜在细胞因子抑制作用是由于它抑制了核因子 (NF- κ B) 的活性。大黄素还具有清除氧自由基抗氧化作用, 增加超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化酶的活性, 减少丙二醛含量等^[10]。

本研究通过体外培养肠上皮细胞株 Caco-2 细胞制作 H/R 模型模拟肠缺血/再灌注 (I/R) 损伤。肠缺血时, 肠系膜血管处于低灌注状态, 导致肠绒毛上皮细胞坏死脱落, 肠黏膜屏障功能受损, 肠通透性增加; 再灌注后, 产生大量氧自由基, 造成组织细胞氧化应激损伤, 进一步削弱肠屏障功能^[11]。H/R 损伤后 Western blot 和 RT-PCR 检测结果显示, Caco-2 细胞 Occludin、ZO-1 蛋白的表达量和 mRNA 的表达

水平明显下降。ZO-1 蛋白表达减少会引起 Occludin 等跨膜蛋白从细胞骨架上解离, Occludin 蛋白表达减少可使其封闭细胞旁缝隙的能力缺失, 引起紧密连接开放^[12]。透射电镜下观察到 Caco-2 细胞间紧密连接结构破坏明显, TEER 值显著下降, Caco-2 单层细胞通透性大幅上升进一步证实肠黏膜屏障的完整性受到严重破坏, 屏障功能下降。大黄素处理组 Occludin、ZO-1 的蛋白表达量和 mRNA 的表达水平明显上升, 表明大黄素对紧密连接结构蛋白在蛋白表达水平和基因转录水平都具有显著的保护作用。电镜观察也显示细胞间紧密连接结构的破坏减轻, TEER 值升高, 证实大黄素可以有效抑制 Caco-2 单层细胞通透性增加, 保护肠上皮细胞的屏障功能。

因此, 我们推测大黄素对肠黏膜屏障功能的保护作用可能是通过减少紧密连接结构蛋白 Occludin、ZO-1 的破坏, 增加其表达, 维持肠黏膜屏障的完整性来实现的。本研究对于大黄素对肠黏膜屏障损伤的治疗提供了部分理论依据, 提示大黄素在治疗消化系统疾病中具有很大潜力。

【参考文献】

[1] 丁凯, 汪志明, 吴波, 等. 放大肠镜在重症急性胰腺炎早期的结肠黏膜损害中的诊断价值[J]. 外科理论与实践, 2010, 15(1): 23-26.
 [2] 张明鸣, 程惊秋, 陆燕蓉, 等. 不同营养支持途径对外科创伤应激后相关肠黏膜形态和屏障功能影响的实验研究[J]. 四川大学学报: 医学版, 2009, 40(4): 615-618.

[3] 张喜平. 大黄素的药理作用研究概况[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(8): 851-854.
 [4] 赵允召, 龚冠文, 李宁, 等. 腹腔间隙综合征小肠黏膜显微和超微结构改变的观察[J]. 医学研究生学报, 2011, 24(5): 456-459.
 [5] 孙晔珣, 初桂兰. 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤 ZO-1 和 occludin 的动态变化研究[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 20(21): 3210-3213.
 [6] Segretain D, Fiorini C, Decrouy X, et al. A proposed role for ZO-1 in targeting connexin 43 gap junctions to the endocytic pathway[J]. Biochimie, 2004, 86(4-5): 241-244.
 [7] 邵洁, 陈邦元, 李雯, 等. 早期肠内营养对休克后患者炎症反应的疗效研究[J]. 东南国防医药, 2011, 13(3): 226-227.
 [8] Wu Y, Tu X, Lin G, et al. Emodin-mediated protection from acute myocardial infarction via inhibition of inflammation and apoptosis in local ischemic myocardium[J]. Life Sci, 2007, 81(17-18): 1332-1338.
 [9] 刘瑞林, 张嘉, 吴薇, 等. 大黄素对肠缺血/再灌注损伤保护作用的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(1): 45-47.
 [10] 吴小明. 大黄素对大鼠混合型高脂血症的影响[J]. 安徽医药, 2008, 12(11): 1026-1028.
 [11] 张敏, 胡毓华, 张伟. 胰高血糖素样肽-2 对幼鼠肠缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. 江苏医药, 2009, 35(12): 1473-1475.
 [12] 刘丽波, 薛一雪, 王萍. 缓激肽对脑胶质瘤大鼠 occludin 和 ZO-1 mRNA 的调节机制[J]. 中国医科大学学报, 2010, 39(7): 497-500.

(收稿日期: 2011-09-29; 修回日期: 2012-03-20)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)

· 个 案 ·

左氧氟沙星注射液致皮疹、皮肤瘙痒 1 例

沈达涛, 沈弘

【关键词】 左氧氟沙星注射液; 皮疹; 皮肤瘙痒
 【中图分类号】 R978.1 【文献标志码】 B
 【文章编号】 1672-271X(2012)03-0202-02

1 病例报告

患者, 男, 50 岁, 管理人员。因咽痛、咳嗽、发热及胃纳差 1 d, 于 2010 年 5 月 19 日就诊。患者发病后未服任何药

物, 既往无药物过敏史。体格检查: T 38.5℃, P 80 次/min, R 20 次/min, BP 110/72 mmHg, 咽部充血, 扁桃体不肿大, 颈无抵抗, 双肺呼吸音清, 未闻及干湿啰音, 心率 80 次/min, 心律齐, 各瓣膜听诊区未闻及病理性杂音。腹部平软, 无压痛反跳痛, 肝脾肋下未触及, 双下肢无水肿。实验室检查: 白细胞 $10 \times 10^9/L$, 尿常规、X 线胸片正常。诊断: 急性上呼吸道感染。给予盐酸左氧氟沙星注射液 100 ml (重庆莱美药业有限公司, 生产批号 091119) 2 次/d, 静脉滴注; 利巴韦林 0.4 g 加入生理盐水 250ml, 1 次/d, 静脉滴注。先静脉滴注

(下转第 215 页)

作者单位: 210016 江苏南京, 南京陆军指挥学院第一干休所卫生所