

· 论 著 ·

## 黄芩黄素减轻脱氧胆酸对食管上皮细胞损伤机制的探讨

柳刚<sup>1</sup>, 张玲<sup>1</sup>, 郭晓军<sup>2</sup>, 李桂香<sup>1</sup>, 邹多武<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的 考察黄芩黄素(Baicalein)对脱氧胆酸诱导的人食管黏膜上皮细胞损伤的治疗作用。方法 原代培养人食管黏膜上皮细胞,使用脱氧胆酸(deoxycholate, 500  $\mu\text{mol/L}$ )进行刺激,同时给以不同浓度的黄芩黄素(1  $\mu\text{mol/L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$ )进行干预治疗。12 h 后,采用 Western blotting 和 ELISA 等方法观察细胞凋亡及炎症相关指标的变化。结果 黄芩黄素治疗抑制脱氧胆酸诱导的细胞凋亡,剂量依赖地降低了 caspase-3 剪切体的生成和 Bax 蛋白的表达,同时增加 Bcl-2 蛋白的表达;黄芩黄素亦治疗剂量依赖地抑制了脱氧胆酸诱导的炎症因子白介素 8(IL-8)和巨噬细胞趋化性和激活性因子(macrophage chemoattractant protein 1, MCP-1)的生成,抑制了脱氧胆酸诱导的食管上皮细胞中诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的蛋白表达和细胞中的一氧化氮(nitric oxide, NO)的生成。结论 黄芩黄素通过抑制炎症,抑制 iNOS/NO 通路,减少凋亡,从而减轻了脱氧胆酸诱导的人食管黏膜上皮细胞的损伤。

**[关键词]** 黄芩黄素;脱氧胆酸;食管黏膜上皮细胞;凋亡;炎症;诱导性一氧化氮合酶

**[中图分类号]** R571;R932 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.02.001

## Baicalein attenuates deoxycholate-induced injury in human esophageal epithelial cells

LIU Gang<sup>1</sup>, ZHANG Ling<sup>1</sup>, GUO Xiao-jun<sup>2</sup>, LI Gui-xiang<sup>1</sup>, ZOU Duo-wu<sup>1</sup>. 1. Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Second Department of Gerontology, Qingdao Second Sanatorium, Jinnan Military Command, Qingdao, Shandong 266071, China

**[Abstract]** **Objective** The present study was designed to investigate whether Baicalein protected against deoxycholate-induced injury in human esophageal epithelial cells. **Methods** Primary cultured human esophageal epithelial cells were stimulated with deoxycholate (500  $\mu\text{mol/L}$ ), and treated with Baicalein (1  $\mu\text{mol/L}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$ ) simultaneously. 12 hours later, the cells were collected for analysis of inflammation and apoptosis by Western blotting and ELISA. **Results** Baicalein treatment reduced formation of cleaved caspase-3 and protein expression of Bax and enhanced protein expression of Bcl-2, dose-dependently, indicating that Baicalein suppressed apoptosis induced by deoxycholate. Baicalein treatment suppressed deoxycholate-induced formation of pro-inflammatory cytokines including IL-8 and macrophage chemoattractant protein 1 (MCP-1). Baicalein treatment suppressed deoxycholate-induced upregulation of protein expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and reduced intracellular nitric oxide (NO) levels. **Conclusion** Baicalein attenuated deoxycholate-induced injury in human esophageal epithelial cells, via suppressing apoptosis, inflammation, and iNOS/NO.

**[Key words]** Baicalein; deoxycholate; human esophageal epithelial cells; apoptosis; inflammation; nitric oxide

过去的 30 年里,全球食管癌的发生率增加了近四倍,当前该病 5 年生存率只有 10% ~ 20%<sup>[1-2]</sup>。我国是世界上食管癌高发地区之一,每年平均病死约 15 万人。十二指肠内容物在反流时对食管黏膜的损伤在食管癌的发生发展过程中起到重要作用<sup>[3]</sup>。脱氧胆酸(deoxycholate)是胆酸的重要成分,参与了胆汁反流时对食管黏膜的损伤。如何治疗脱氧胆酸诱导的食管黏膜上皮的损伤成为当前的研究热点之一。

黄芩黄素(Baicalein)是富含于黄芩根中的一种

类黄酮化合物,具有抗炎、抗过敏和抗氧化作用<sup>[4]</sup>。在溃疡性结肠炎中已经证实口服黄芩黄素可以抑制炎症,减轻肠黏膜损伤<sup>[5]</sup>。本研究尝试采用黄芩黄素治疗,观察其在体外对脱氧胆酸诱导的食管黏膜上皮细胞损伤的治疗作用。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂与材料** 脱氧胆酸(Deoxycholate, 美国 Sigma 公司),黄芩黄素(Baicalein, 美国 Sigma 公司),人角朊细胞培养液(KSFM, Gibco 公司),白介素 8(IL-8)和巨噬细胞趋化性和激活性因子(macrophage chemoattractant protein 1, MCP-1)检测试剂盒(美国 R&D 公司),一抗抗体(美国 Santa Cruz 公司),二抗(南京碧云天生物科技公司),GAPDH 单克隆抗体(上海康成生物工程公司)。RIPA 细胞裂解试剂盒

**基金项目:** 国家自然科学基金青年科学基金(81200273)

**作者单位:** 1. 200433 上海,第二军医大学附属长海医院消化内科;2. 266071 山东青岛,济南军区青岛第二疗养院干部二科

**通讯作者:** 邹多武, E-mail: duowuzou@hotmail.com

(南京碧云天生物科技公司)。BCA 蛋白定量试剂盒(上海申能博彩生物科技有限公司), ECL 试剂盒(上海申能博彩生物科技有限公司), 细胞中一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒(DAF-FM DA)、细胞中诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)试剂盒(南京碧云天生物科技公司)。

**1.2 人食管黏膜上皮细胞的培养** 无菌条件下取食管癌患者手术切除的一段正常食管长约 2~3 cm, 沿纵轴切开后, 将黏膜层与肌层分离, 仔细修剪去黏膜下组织, 浸于含 0.5% 的 Dispase 分离酶(Gibco 公司)的消化液中, 摇床 37 °C 热消化 2~3 h, 将鳞状上皮细胞层与其基底间质细胞分离, 随后将上皮层剪碎, 置于 0.05% 胰蛋白酶溶液中 37 °C 热消化 20 min, 得到单细胞悬液。加入 10% 小牛血清液终止消化, 经 200 目不锈钢网过滤。滤液离心 5 min (1500 r/min, 半径 8 cm) 弃上清液, PBS 溶液洗涤 3 次, 使用 KSFM 培养液接种细胞, 24 h 后首次换液, 于 37 °C 含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中常规培养及传代。选取第 3~5 代的食管黏膜上皮细胞进行试验。细胞使用脱氧胆酸(500 μmol/L) 刺激, 同时给以不同浓度的黄芩黄素(1 μmol/L, 10 μmol/L) 进行干预治疗。12 h 吸取培养液并提取细胞蛋白进行各项检测。

**1.3 Western blotting 分析蛋白表达水平** 以 4 °C 预冷的 PBS 洗细胞 3 次, 吸除残液, 加 1 × SDS 凝胶加样缓冲液(含蛋白酶抑制剂) 100 μL/孔, 使用一次性细胞刮板将培养板底细胞全部刮起后离心 15 min (4 °C, 12000 r/min, 半径 8 cm), 收集上清液后 100 °C 变性 10 min。制备 8% 的 SDS-PAGE 凝胶, 加样 8 μL 电泳; 湿转法转膜, 将 NC 膜室温封闭 4 h, 之后依次加入相应的一抗和二抗。最终显色试剂盒显色。GAPDH 作为内参蛋白。所得蛋白条带扫描照片, 以软件 Image J 3.0 进行灰度值分析, 计算出相对值。

**1.4 酶联免疫吸附测定(ELISA) IL-8 和 MCP-1** 吸取培养液, 离心 10 min (4 °C, 1500 r/min, 半径 8 cm), 吸取上清液, 使用 IL-8 和 MCP-1 的 ELISA 试剂盒进行检测, 按说明书操作。

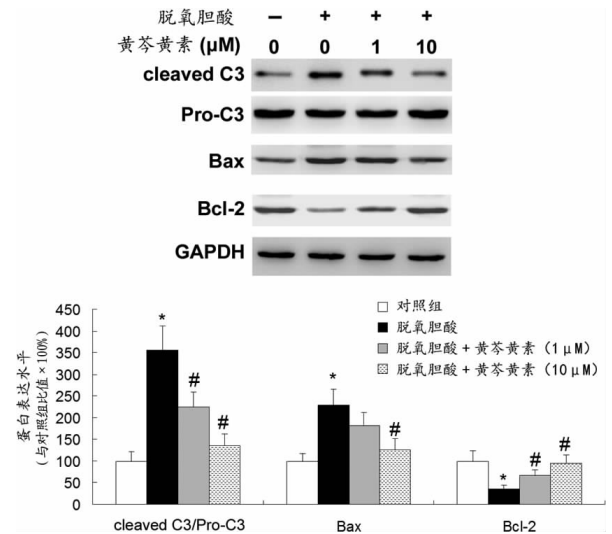
**1.5 细胞中 NO 含量检测** 按照 1:1000 比例, 用其 DAF-FM DA 试剂盒提供的稀释液稀释 DAF-FM DA, 终浓度为 5 μmol/L。细胞收集后, 用稀释好的 DAF-FM DA 溶液重悬细胞, 细胞浓度为 1 × 10<sup>7</sup>/mL, 细胞培养箱内 37 °C 孵育 20 min, 每隔 3~5 min 颠倒混匀。酶标仪记录吸光度值。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS 12.0 统计软件分析。每组实验独立重复 3 次, 结果以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm$

s) 表示, 组间比较采用 ANOVA (方差分析),  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 实验结果

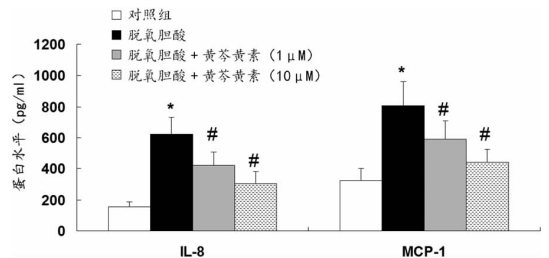
**2.1 黄芩黄素治疗对脱氧胆酸诱导的食管上皮细胞凋亡的影响** Western blotting 结果显示脱氧胆酸刺激增加食管上皮细胞中凋亡标志蛋白 caspase-3 剪切体(cleaved caspase-3)的生成, 提示脱氧胆酸诱导了食管上皮细胞凋亡。黄芩黄素剂量依赖性地降低了 caspase-3 剪切体的生成, 从而减轻了脱氧胆酸诱导的食管上皮细胞凋亡。另外同时也发现黄芩黄素剂量依赖性地增加 Bcl-2 蛋白的表达并降低了 Bax 蛋白的表达。见图 1。



与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与脱氧胆酸刺激组比较, #  $P < 0.05$

图 1 黄芩黄素对脱氧胆酸诱导的食管上皮细胞凋亡的影响

**2.2 黄芩黄素减轻脱氧胆酸诱导的食管上皮细胞炎症因子的生成** 实验结果显示脱氧胆酸增加食管上皮细胞生成并分泌的 IL-8 和 MCP-1 蛋白水平。黄芩黄素可剂量依赖性地降低了食管上皮细胞生成并分泌的 IL-8 和 MCP-1 蛋白水平, 提示黄芩黄素可减轻脱氧胆酸诱导的食管上皮细胞炎症因子的生成。见图 2。

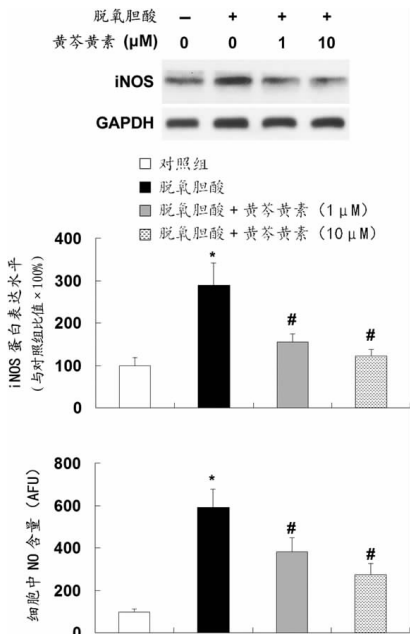


与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与脱氧胆酸刺激组比较, #  $P < 0.05$

图 2 黄芩黄素对脱氧胆酸诱导的食管上皮细胞炎症因子生成的影响

### 2.3 黄芩黄素对脱氧胆酸诱导的食管上皮细胞 iNOS 蛋白表达和 NO 生成的影响

Western blotting 结果显示脱氧胆酸增加食管上皮细胞中 iNOS 蛋白表达,并相应对增加细胞中 NO 的含量。黄芩黄素可剂量依赖性地降低了食管上皮细胞中 iNOS 的蛋白表达和细胞中的 NO 的水平。见图 3。



与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与脱氧胆酸刺激组比较, #  $P < 0.05$

图 3 黄芩黄素对脱氧胆酸诱导的食管上皮细胞 iNOS 表达和 NO 生成的影响

### 3 讨论

脱氧胆酸诱导的食管黏膜上皮细胞的凋亡是通过 Caspase-3 的激活来介导的。黄芩黄素抑制脱氧胆酸诱导的 Caspase-3 的激活,其机制涉及 Bcl-2 和 Bax。作为线粒体凋亡的主要物质,Bax 蛋白表达增加将促进细胞凋亡,而 Bcl-2 蛋白则可以通过与前者作用起到抑制凋亡的作用<sup>[6]</sup>。本实验中黄芩黄素减少了 Bax 蛋白表达同时增加 Bcl-2 蛋白表达,从而抑制了脱氧胆酸诱导的食管黏膜上皮细胞的凋亡。

炎症介导的食管黏膜上皮损伤是胃肠反流性疾病的一个重要发病机制。胃肠吻合术后,IL-8 (也被称为中性白细胞激活肽-1) 的大量生成与其介导的炎性细胞浸润在食管黏膜损伤的早期就被发现<sup>[7]</sup>。临床研究也发现胃肠反流患者血清中 IL-8 的水平与内窥镜观察得到的食管黏膜损伤评分高度相关<sup>[8]</sup>。IL-8 和巨噬细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 共同负责启动初始的受损黏膜部位单核细胞和巨噬细胞的募集<sup>[9]</sup>。本研究发现脱氧胆酸刺激增加了食管

黏膜上皮细胞中 IL-8 和 MCP-1 的表达,证实了脱氧胆酸刺激诱导了食管黏膜上皮炎症的发生。同时 MCP-1 可抑制细胞中 IL-8 和 MCP-1 的表达,从而抑制脱氧胆酸诱导的炎症反应。

NO 作为一种小分子信号因子广泛参与了许多生理过程。细胞产生过多的 NO,它们一方面会与过氧化物反应生成“过氧化亚硝基”导致细胞膜脂质氧化并造成损伤,另一方面会抑制细胞三羧酸循环系统的一系列酶的活性,减少细胞的有氧呼吸,从而破坏能量代谢<sup>[10]</sup>。在病理损伤的应激条件下,作为合成 NO 的主要酶,iNOS 被发现在胃肠反流性疾病和食管癌患者的食管黏膜组织中高表达,而 NO 的主要代谢产物硝基酪氨酸(也被作为细胞蛋白损伤的标志物之一)在受损黏膜组织中的堆积亦提示 iNOS/NO 在黏膜损伤过程中的重要作用<sup>[11-13]</sup>。本研究亦发现脱氧胆酸刺激可以诱导 iNOS 的表达并增加 NO 的合成,也发现黄芩黄素则抑制了细胞中 iNOS 的表达,减少了 NO 的合成,由此部分阐明了在胃肠反流性疾病和食管癌患者的食管黏膜组织 iNOS/NO 激活的原因,为进一步采用黄芩黄素治疗胃肠反流性疾病及食管癌提供了一定的实验基础。

### 【参考文献】

- [1] Spechler SJ. Barrett esophagus and risk of esophageal cancer: a clinical review[J]. JAMA, 2013, 310(6):627-636.
- [2] 易云峰. 原发性食管小细胞瘤的临床特点及治疗[J]. 东南国防医药, 2003, 3(5):165-166.
- [3] Kauer WK, Peters JH, DeMeester TR, et al. Mixed reflux of gastric and duodenal juices is more harmful to the esophagus than gastric juice alone. The need for surgical therapy re-emphasized[J]. Ann Surg, 1995, 222(4):525-531.
- [4] Li-Weber M. New therapeutic aspects of flavones: the anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin[J]. Cancer Treat Rev, 2009, 35(1):57-68.
- [5] Zhang ZQ, Liu W, Zhuang L, et al. Comparative pharmacokinetics of baicalin, wogonoside, baicalein and wogonin in plasma after oral administration of pure baicalin, radix scutellariae and scutellariae-paeoniae couple extracts in normal and ulcerative colitis rats[J]. Iran J Pharm Res, 2013, 12(3):399-409.
- [6] Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics[J]. Dev Cell, 2011, 21(1):92-101.
- [7] Souza RF, Huo X, Mittal V, et al. Gastroesophageal reflux might cause esophagitis through a cytokine-mediated mechanism rather than caustic acid injury[J]. Gastroenterology, 2009, 137(5):1776-1784.
- [8] Monkemuller K, Wex T, Kuester D, et al. Interleukin-1beta and interleukin-8 expression correlate with the histomorphological changes in esophageal mucosa of patients with erosive and non-erosive reflux disease[J]. Digestion, 2009, 79(3):186-195.

等<sup>[21]</sup>对 38 例 PCOS 进行药物治疗的比较分析,发现经维生素 D 联合二甲双胍治疗后,患者卵巢内积液显著减少,子宫内膜血流存在率显著减少,这一结果与本研究的结论相符合,说明维生素 D 联合二甲双胍是治疗 PCOS 的有效药物;③两组患者治疗后总有效率 Salle 评分情况比较:治疗后,观察组患者 Salle 评分显著低于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Irani 等<sup>[22]</sup>对维生素 D 联合二甲双胍治疗 PCOS 的疗效进行了对比分析,发现 90.00% 的患者 Salle 评分大幅度降低,说明维生素 D 联合二甲双胍,对 PCOS 患者的排卵率、子宫容受性均有大幅度的优化作用,是治疗 PCOS 的高效药物。

【参考文献】

[1] 吴静静,刘锦霞,吴元赭. 观察二甲双胍和螺内酯对多囊卵巢综合征患者 ghrelin 的影响[J]. 东南国防医药,2009,11(4): 289-292.

[2] 闫文杰,杨菁,张博,等. 维生素 D 与多囊卵巢综合征相关性的初步研究[J]. 现代妇产科进展,2010,19(11):844.

[3] Muscogiuri G, Sorrice GP, Prioletta A, et al. 25-Hydroxyvitamin D concentration correlates with insulin-sensitivity and BMI in obesity[J]. Obesity,2010,18(10):1906.

[4] 邢福祺,孔令红. 多囊卵巢综合征的诊断标准[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2002,18(11):650-651.

[5] 袁梅,王正滨,李萍,等. 卵泡发育及预告排卵期的超声显像检测评价[J]. 中国医学影像技术,2003,19(6):720-721.

[6] Salle BI, Bied-Damon V, Benchaib M, et al. Preliminary report of an ultrasonography and colour Doppler uterine score to predict uterine receptivity in an in-vitro fertilization programme. [J] Hum Reprod,1998,13(6):1669-1673.

[7] 王伟丽. 女性不孕患者多囊卵巢综合征患病率及临床特征的研究[D]. 中南大学,2012.

[8] 王玲. 不同胰岛素增敏剂治疗多囊卵巢综合征疗效与安全性的 Meta 分析[D]. 吉林大学,2013.

[9] 王克华,刘艳,张丽红,等. 多囊卵巢综合征不孕患者心身症状及其影响因素[J]. 中国心理卫生杂志,2009(1):22-26.

[10] Bonakdaran S, Mazloom Khorasani Z, Davachi B, et al. The effects of calcitriol on improvement of insulin resistance, ovulation and comparison with metformin therapy in PCOS patients; a randomized

placebo-controlled clinical trial. [J] Iran J Reprod Med,2012,10(5):465-472.

[11] 伍丽群,周晓梅,韦端红. 罗格列酮与二甲双胍治疗多囊卵巢综合征的疗效评价[J]. 中国社区医师:医学专业,2012,14(11):153-154.

[12] 叶碧绿. 维生素 D 与多囊卵巢综合征相关性的研究进展[J] 生殖医学杂志,2014,23(6):431-434.

[13] Patra SK, Nasrat H, Goswami B, et al. Vitamin D as a predictor of insulin resistance in polycystic ovarian syndrome [J]. Diabetes Metab Syndr,2012,6(3):146-149.

[14] Wehr E, Pieber TR, Obemayer-Pietsch B. Effect of vitamin D3 treatment on glucose metabolism and menstrual frequency in polycystic ovary syndrome women: a pilot study [J]. J Endocrinol Invest,2011,34(10):757-763.

[15] Krul-Poel YH, Snackey C, Louwers Y, et al. The role of vitamin D in metabolic disturbances in polycystic ovary syndrome: a systematic review [J]. Eru J Endocrinol,2013,169(6):853-865.

[16] 郑铮. 二甲双胍用于多囊卵巢综合征患者促排卵周期的疗效观察[J]. 中国优生与遗传杂志,2004,12(5):117-118.

[17] 罗婷,韩阳,刘仪. 二甲双胍治疗多囊卵巢综合征合并胰岛素抵抗对改善内分泌、代谢及排卵功能的疗效观察[J]. 中国误诊学杂志,2008,8(8):1775-1777.

[18] Tehrani HG, Mostajeran F, Shahsavari S, The effect of calcium and vitamin D supplementation on menstrual cycle, body mass index and hyperandrogenism state of women with polycystic ovarian syndrome. [J] J Res Med Sci,2014,19(9):875-880.

[19] Firouzabadi Rd, Aflatoonian A, Modarresi S, et al. Therapeutic effects of calcium & vitamin D supplementation in women with PCOS [J]. Complement Ther Clin Pract,2012,18(2):85-88.

[20] Rashidi BI, Haghollahi F, Shariat M, et al. The effects of calcium-vitamin D and metformin on polycystic ovary syndrome: a pilot study [J]. Taiwan J Obstet Gynecol,2009,48(2):142-147.

[21] Varbiro S, Sara L, Antal P, et al. Lower-limb veins are thicker and vascular reactivity is decreased in a rat PCOS model; concomitant vitamin D3 treatment partially prevents these changes [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2014,307(6):848-857.

[22] Irani M, Merhi Z. Role of vitamin D in ovarian physiology and its implication in reproduction; a systematic review [J]. Fertil Steril, 2014,102(2):460-468.

(收稿日期:2014-12-30; 修回日期:2015-01-30)

(本文编辑:黄攸生; 英文编辑:王建东)

(上接第 115 页)

[9] Mukaida N, Harada A, Yasumoto K, et al. Properties of pro-inflammatory cell type-specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) [J]. Microbiol Immunol,1992,36(8):773-789.

[10] Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitrosocompounds [J]. Nature,1993,364(6438):626-632.

[11] Vaninetti NM, Geldenhuys L, Porter GA, et al. Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and p53 mutations in the molecular pathogenesis of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma

[J]. Mol Carcinog,2008,47(4):275-285.

[12] Ferguson HR, Wild CP, Anderson LA, et al. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of reflux esophagitis, Barrett's esophagus, and esophageal adenocarcinoma [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2008,17(3):727-731.

[13] 薛宁,邱红,朱月蓉. 血清中一氧化氮合酶在肠癌和食管癌及肺癌中的检测及意义[J]. 东南国防医药,2004,6(4):279-280.

(收稿日期:2015-02-09; 修回日期:2015-03-03)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)