

黄龙汤对脓毒症大鼠肠黏膜上皮 Claudin-1 和 Occludin 的 mRNA 及蛋白表达水平的影响

付瑜¹ 姜树民² 黄煜²

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁 沈阳 110032)

【摘要】 **目的** 探讨黄龙汤对脓毒症大鼠肠黏膜上皮紧密连接蛋白 Claudin-1 和 Occludin 的 mRNA 及蛋白表达水平的影响。**方法** 将 55 只 Wistar 大鼠按随机数字表法分为假手术组 ($n=10$)、模型组 ($n=15$)、西药治疗组 ($n=15$) 和中西药联合组 ($n=15$)。采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 复制脓毒症模型, 假手术组只手术不行 CLP。假手术组和模型组灌胃 2 mL 生理盐水, 西药治疗组腹腔注射美罗培南每次 50 mg; 中西药联合组在西药治疗基础上灌胃中药黄龙汤 [生大黄 (后下) 15 g, 芒硝 10 g, 枳实 15 g, 厚朴 10 g, 人参 10 g, 当归 20 g, 黄芩 15 g, 甘草 10 g 煎浓成 150 mL] 每次 2 mL (含生药 0.68 g/mL), 4 组均每日 2 次。给药 4 d 后处死大鼠, 取临近回盲部的部分回肠组织约 10 cm, 用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测肠组织 Claudin-1 和 Occludin 的 mRNA 表达水平, 用蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测 Claudin-1 和 Occludin 的蛋白表达水平。**结果** 与假手术组比较, 模型组、西药治疗组及中西药联合组大鼠小肠上皮 Claudin-1 和 Occludin 的 mRNA [积分吸光度 (IA) 比值] 及蛋白表达水平 (灰度值比值) 均明显下降 (Claudin-1 mRNA: 0.327 ± 0.029 、 0.387 ± 0.035 、 0.420 ± 0.053 比 0.561 ± 0.035 , Occludin mRNA: 0.364 ± 0.058 、 0.422 ± 0.033 、 0.442 ± 0.048 比 0.616 ± 0.036 , Claudin-1 蛋白: 0.307 ± 0.015 、 0.337 ± 0.017 、 0.355 ± 0.027 比 0.426 ± 0.017 , Occludin 蛋白: 0.326 ± 0.028 、 0.355 ± 0.017 、 0.366 ± 0.025 比 0.455 ± 0.018 , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 西药治疗组和中西药联合组 Claudin-1、Occludin 的 mRNA 及蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 且以中西药联合组升高更显著 (均 $P < 0.05$)。**结论** 黄龙汤对脓毒症大鼠肠黏膜屏障的保护作用可能是通过上调脓毒症模型大鼠小肠组织中 Claudin-1 和 Occludin 的 mRNA 及蛋白表达水平而实现的。

【关键词】 黄龙汤; 脓毒症; 肠黏膜屏障; 紧密连接蛋白

Effects of Huanglong decoction on mRNA and protein expression levels of intestinal mucosal epithelial Claudin-1 and Occludin in sepsis rat Fu Yu*, Jiang Shumin, Huang Yu. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning, China

Corresponding author: Jiang Shumin, Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning, China, Email: shuminj@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Huanglong decoction on mRNA and protein expression levels of intestinal epithelial tight junction protein Claudin-1 and Occludin in rat with sepsis. **Methods** Fifty-five Wistar rats were randomly divided into sham operation group ($n=10$), model group ($n=15$), western medicine treatment group (15 rats) and combined traditional Chinese and western medicine group ($n=15$). In sepsis model group, cecal ligation with puncture (CLP) was reproduced. In the sham operation group, the steps of operation performed were similar to those in the model group, but without CLP. Normal saline 2 mL was given to sham operation group and model group by gavage; meropenem 50 mg was given to the western medicine treatment group by intra-peritoneal injection; in the combined traditional Chinese and western medicine treatment group, besides meropenem 50 mg was injected intra-peritoneally, 2 mL Huanglong decoction (containing raw herbal medicine 0.68 g/mL) was administered by gavage [ingredients of the decoction: rhubarb 15 g (put into water the latest), Glauber salt 10 g, fructus aurantii immaturus 15 g, mangnoliae officinalis 10 g, ginseng 10 g, Angelica sinensis 20 g, Scutellaria baicalensis 15 g, Radix Glycyrrhizae 10 g, concentrated to a decoction 150 mL], in the four groups, the respective drugs or normal saline were given twice a day. After 4 days, the rats were sacrificed, and a partial ileal tissue close to the ileocecal region about 10 cm in length was taken; and mRNA expression levels of Claudin-1 and Occludin were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and protein expression levels of Claudin-1 and Occludin were detected by Western Blot. **Results** Compared with the sham operation group, the expression levels of Claudin-1 and Occludin mRNA [integrated absorbance (IA) ratio] and protein (gray value ratio) were significantly lowered in model group, western medicine group and combined therapy group (Claudin-1 mRNA: 0.327 ± 0.029 , 0.387 ± 0.035 , 0.420 ± 0.053 vs. 0.561 ± 0.035 , Occludin mRNA: 0.364 ± 0.058 , 0.422 ± 0.033 , 0.442 ± 0.048 vs. 0.616 ± 0.036 , Claudin-1 protein: 0.307 ± 0.015 , 0.337 ± 0.017 , 0.355 ± 0.027 vs. 0.426 ± 0.017 , Occludin protein: 0.326 ± 0.028 , 0.355 ± 0.017 , 0.366 ± 0.025 vs. 0.455 ± 0.018 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the expression

levels of Claudin-1 and Occludin mRNA and protein in western medicine group and combined therapy group were significantly higher ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the up-regulation was more marked in combined therapy group (all $P < 0.05$). **Conclusion** The protective effect of Huanglong decoction on intestinal mucosal barrier in rats with sepsis is possibly related to the up-regulation of expression levels of Claudin-1 and Occludin mRNA and protein.

【Key words】 Huanglong decoction; Sepsis; Intestinal mucosal barrier; Tight junction protein

脓毒症是由感染引起的全身炎症反应,最终导致免疫功能缺陷和多器官功能衰竭(MOF)^[1-2]。脓毒症发生过程中胃肠道结构和功能的改变促使肠道屏障功能缺失,细菌及毒素通过受损的肠黏膜屏障迁移到肠周淋巴组织、淋巴液、血液和肠外组织器官,发生肠源性脓毒症(GOS),甚至脓毒性休克和 MOF。因此,脓毒症治疗中对肠黏膜屏障功能的保护也日益受到重视。目前认为肠上皮细胞是肠黏膜屏障的主要组织结构基础,细胞间的连接复合体参与维持上皮细胞的完整性^[3],其中紧密连接是细胞间最重要的连接方式。研究已经证实 Claudin 蛋白和 Occludin 蛋白是肠屏障的重要组成部分^[4-5]。

本研究拟采用中药黄龙汤干预脓毒症模型大鼠,通过观察其对各组大鼠小肠黏膜组织中 Claudin 和 Occludin 的 mRNA 及蛋白表达水平影响,探讨中药黄龙汤对大鼠肠黏膜屏障的保护机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 主要试剂:反转录-聚合酶联反应(RT-PCR)试剂盒、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗购自北京全式金生物技术有限公司。引物由北京三博远志生物技术有限公司代为合成。抗 Occludin 抗体购自英国 Abcam 公司;蛋白提取试剂盒、四甲基乙二胺(TEMED)购自北京康为世纪生物科技有限公司;化学发光(ECL)试剂盒购自碧云天生物研究所;丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、苯甲基磺酰氨(PMSF)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)购自北京索莱宝生物科技有限公司;甘氨酸购自北京博奥拓达生物科技有限公司。

1.1.2 主要仪器:PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司)、UV300 紫外分光光度计(英国 Spectronic Unicam 公司)、PowerPac 200 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)、Chemi Imager 5500 凝胶电泳成像分析系统(美国 Alpha Innotech 公司)、DYY31D 水平电泳槽(北京六一仪器厂)、微波炉(韩国 LG 公司)。

1.2 实验动物分组:健康 Wistar 大鼠 55 只,由辽宁中医药大学动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK2010-0001,平均体质量(200 ± 30)g,雌雄不限。实验室室温(20 ± 2)℃、相对湿度为 40%~

60%。按随机数字表法分为假手术组($n=10$)、模型组($n=15$)、西药治疗组($n=15$)、中西药联合组($n=15$)。

1.3 药物制备:将生大黄 15 g(后下),芒硝 10 g(后下),枳实 15 g,厚朴 10 g,人参 10 g,当归 20 g,黄芩 15 g,甘草 10 g(均购自辽宁中医药大学附属医院)浸泡 2 h,煎液为 150 mL,去渣,制成含生药 0.68 g/mL 的药液备用。

1.4 模型复制:采用盲肠结扎穿孔术(CLP)方法^[6]复制脓毒症模型,结扎部位为盲肠末端 1/3 处,用 23 号针穿刺两次形成 2 个盲肠漏,然后轻轻挤出少许粪便,将盲肠还纳腹腔,逐层缝合腹壁切口。假手术组麻醉、腹部切开手术方法同模型组,但不行 CLP。动物术后皮下注射生理盐水 2~3 mL/kg,分笼喂养。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.5 给药方法:药物治疗组大鼠制模后当日开始连续给药 4 d,西药治疗组腹腔注射美罗培南(浙江海正制药有限公司,国药准字 H20030331,每支 0.5 g,使用时溶于 10 mL 生理盐水中)每次 50 mg,每日 2 次;中西药联合组在西药治疗组基础上加用中药黄龙汤灌胃,每次 2 mL,每日 2 次。假手术组和模型组均每次灌胃 2 mL 生理盐水,每日 2 次。

1.6 检测指标及方法:给药后 4 d 处死大鼠,取临近回盲部的部分回肠组织约 10 cm 备用。

1.6.1 RT-PCR 检测小肠黏膜上皮 Claudin-1 和 Occludin 的 mRNA 表达:取液氮冰冻后肠组织,按照 TRizol 说明书方法提取小肠黏膜上皮的总 RNA。在 10 μ L 反转录反应体系中,以 1.0 μ g mRNA 为模板,将 mRNA 反转录为 cDNA。PCR 反应以 β -肌动蛋白(β -actin)为内参照,其上游引物为 5'-CCAA GGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3',下游引物为 5'-AGGGTACATGGTGGTGGCGCCAGAC-3',扩增产物长度 577 bp。Occludin 上游引物为 5'-CTG TCTATGCTCGTCATCG-3',下游引物为 5'-CATT CCCGATCTAATGACGC-3',扩增产物长度 294 bp。Claudin-1 上游引物为 5'-AAAGATGTGGATGCC TGTCA-3',下游引物为 5'-AGGAGGCAGAGGGA GGC-3',扩增产物长度 189 bp。PCR 反应体积为 25 μ L,反应条件:95℃变性 5 min;95℃变性 30 s,

56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳并于凝胶成像分析系统中采集电泳条带图片, 测定目的基因及内参基因条带的积分吸光度 (IA) 值, 并以目的基因 IA 值 / 内参基因 IA 值的比值代表该基因表达的水平, 进行统计分析。

1.6.2 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测小肠黏膜上皮 Claudin-1 和 Occludin 的蛋白表达: 取小肠组织, 按 1:10 加入裂解液后进行匀浆, 4 °C 离心 15 min, 取上清液, 用考马斯亮蓝 G-250 结合法进行蛋白定量; 分别经 10%、15% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离后, 转印到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上; Occludin 和 Claudin-1 的一抗稀释度均为 1:1000, β -actin 抗体的稀释度为 1:2000, 4 °C 孵育过夜; 给予相应二抗后室温孵育 2 h; ECL 发光, 记录胶片曝光信号, Fluor Chem 2.0 图像分析仪测定目的蛋白及内参蛋白条带的灰度值, 并以目的蛋白灰度值 / 内参条带灰度值比值作为该蛋白的表达水平, 进行统计分析。

1.7 统计学处理: 使用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 将各组与假手术组资料进行单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

表 1 和图 1~2 结果显示, 与假手术组比较, 模

型组、西药治疗组及中西药联合组大鼠小肠上皮 Claudin-1 和 Occludin 的 mRNA 及蛋白表达水平均明显下降 (均 $P < 0.01$); 与模型组比较, 西药治疗组和中西药联合组 Claudin-1 和 Occludin 的 mRNA 及蛋白表达显著上调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 中西药联合组 Claudin-1 和 Occludin 的 mRNA 及蛋白表达明显高于西药治疗组 (均 $P < 0.05$)。

3 讨论

肠道屏障在维护肠功能中占有十分重要的地位, 正常的肠黏膜屏障由机械屏障、化学屏障、生物屏障和免疫屏障等组成^[7]。其中黏膜上皮细胞及其细胞间的紧密连接结构是肠道抵御有害物质或病原体入侵肠黏膜组织的关键, 是维持肠上皮的选择通透性及其屏障功能的结构基础。

肠上皮的通透性有两个途径, 即跨上皮途径和细胞旁通路 (紧密连接)。细胞旁通路是一组复杂的结构, 主要由上皮细胞之间的紧密连接控制^[8]。细胞旁通路对内毒素和细菌的其他产物等大分子物质的通过起到关键性调控作用^[9], 紧密连接和肠上皮细胞共同构成肠道的选择性屏障, 是肠道机械屏障的重要组成部分。

诸多紧密连接蛋白中, 以 Occludin 及 Claudins 最为重要^[4]。Occludin 蛋白是紧密连接中最重要的结构蛋白, 可通过外环以拉链式结合产生严密的细胞旁封闭, 还能与不同的分子结合, 参与紧密连接形成的信号调节^[10-11];

Claudins 蛋白的表达数量和分布结构变化直接影响紧密连接的结构和功能^[12], 对于上皮细胞屏障功能的维持和紧密连接的完整性具有重要作用^[13]。本研究结果表明, 脓毒症大鼠小肠上皮 Claudin-1 和 Occludin 的蛋白及 mRNA 表达明显下降, 提示脓毒症病变过程中, 肠上皮细胞紧密连接受损, 肠通透性增加。中西药联合组及模型组 Claudin-1 和 Occludin 的 mRNA 及蛋白表达高于西药治疗组, 提示黄龙汤加减具有保护肠上皮细胞紧密连接, 维持肠道屏障功能的作用。

表 1 各组大鼠小肠组织中 Claudin-1、Occludin mRNA 及蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	mRNA (IA 比值)		蛋白 (灰度值比值)	
		Claudin-1	Occludin	Claudin-1	Occludin
假手术组	5	0.561 \pm 0.035	0.616 \pm 0.036	0.426 \pm 0.017	0.455 \pm 0.018
模型组	5	0.327 \pm 0.029 ^a	0.364 \pm 0.058 ^a	0.307 \pm 0.015 ^a	0.326 \pm 0.028 ^a
西药治疗组	5	0.387 \pm 0.035 ^{ab}	0.422 \pm 0.033 ^{ab}	0.337 \pm 0.017 ^{ab}	0.355 \pm 0.017 ^{ab}
中西药联合组	5	0.420 \pm 0.053 ^{acd}	0.442 \pm 0.048 ^{abd}	0.355 \pm 0.027 ^{acd}	0.366 \pm 0.025 ^{abd}

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$; 与西药治疗组比较, ^d $P < 0.05$

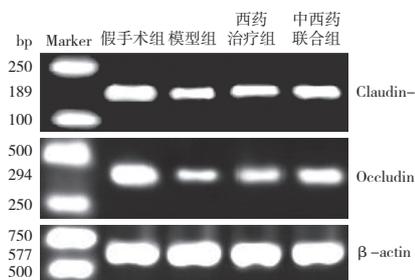


图 1 各组大鼠小肠黏膜上皮中 Claudin-1 和 Occludin 的 mRNA 表达

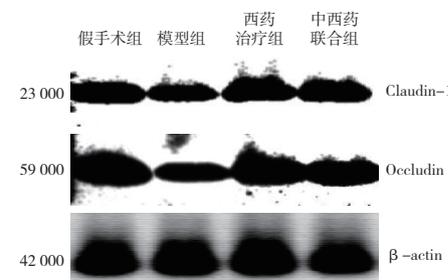


图 2 各组大鼠小肠黏膜上皮中 Claudin-1 和 Occludin 的蛋白表达

本研究结果证实,黄龙汤能够提高脓毒症大鼠肠黏膜 Claudin-1 和 Occlusion 的 mRNA 及蛋白表达,提示黄龙汤对脓毒症的作用机制可能是通过影响 Claudin-1 和 Occlusion 的 mRNA 及蛋白表达,保护肠黏膜紧密连接进而维护肠道机械屏障功能,减少内毒素等的吸收。

中医学认为,脓毒症以正虚为本,邪实与正虚并见^[14]。“虚”的本质在于中焦运化功能失司,不能运化水谷精微,化生气血,故气血亏虚。在脓毒症中,表现为肠黏膜组织缺血、缺氧,修复能力下降,肠通透性上升,免疫减弱,屏障功能受损;“实”的本质在于瘀热邪毒蕴集于肠,胃肠道麻痹、细菌和内毒素淤积在肠道并细菌生长繁殖。并进一步通过肠黏膜屏障,迁移到肠外淋巴组织、淋巴液、血液和肠外组织器官,发生肠源性脓毒症(GOS),甚至脓毒性休克和 MOF。因此治疗上既要通里清热解毒,又要顾护脾胃正气。运用“黄龙汤”加减以“清泻热毒、益气养血”的方法防治肠源性脓毒症,保护肠道屏障,为临床脓毒症治疗提供了新的思路。

综上,本研究证明,运用加减黄龙汤以清泻热毒、益气养血的方法防治肠源性脓毒症,可通过增加 Claudin 和 Occludin 的蛋白及 mRNA 表达,加强肠黏膜紧密连接,保护肠道屏障。

参考文献

[1] 张怡婧. 脓毒症大鼠小肠屏障功能损伤和药物干预及其作用机制的研究[D]. 济南: 山东大学, 2008.

- [2] 孙萍, 王东强, 刘伟, 等. 脓毒症患者白细胞计数及血清降钙素原和 C-反应蛋白的动态变化[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26(7): 516-518.
- [3] 吴仲文. 肠道屏障与肠道微生态[J]. 中华危重病急救医学, 2004, 16(12): 768-770.
- [4] 秦环龙, 高志光. 肠上皮细胞紧密连接在肠屏障中的作用研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(4): 443-447.
- [5] 张媛莉, 李清泉, 郭卫, 等. 慢性乙醇摄取对急性肺损伤大鼠气道上皮细胞间连接蛋白 Occludin 和 E-cadherin 及屏障功能的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2008, 20(2): 95-99.
- [6] 常瑞明, 肖建强, 杨涛, 等. 盲肠不同部位结扎穿孔致脓毒症模型的研究[J]. 岭南现代临床外科, 2012, 12(1): 20-22, 44.
- [7] 中华医学会消化病学分会. 肠屏障功能障碍临床诊治建议[J]. 中华消化杂志, 2006, 26(9): 620.
- [8] 姜伟伟, 张文远. 紧密连接蛋白与炎症性肠病[J]. 国际消化病杂志, 2010, 30(2): 99-100, 114.
- [9] Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application[J]. Am J Pathol, 2006, 169(6): 1901-1909.
- [10] Chen YH, Lu Q, Goodenough DA, et al. Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells[J]. Mol Biol Cell, 2002, 13(4): 1227-1237.
- [11] Nusrat A, Chen JA, Foley CS, et al. The coiled-coil domain of occludin can act to organize structural and functional elements of the epithelial tight junction[J]. J Biol Chem, 2000, 275(38): 29816-29822.
- [12] Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins[J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 12): 2435-2447.
- [13] 崔巍, 刘冬妍, 马力, 等. TNF- α 对肠上皮细胞紧密连接蛋白表达的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(16): 1788-1793.
- [14] 徐力飞, 马海英, 申丽旻, 等. 参附注射液对严重脓毒症患者器官功能影响的临床观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19(2): 86-88.

(收稿日期: 2014-11-24)

(本文编辑: 李银平)

• 消息 •

《中华危重病急救医学》杂志再次荣获“RCCSE 中国权威学术期刊(A+)”

《中国中西医结合急救杂志》再次荣获“RCCSE 中国核心学术期刊(A)”

《中国学术期刊评价研究报告》由武汉大学中国科学评价研究中心发布。武汉大学中国科学评价研究中心是中国高等院校中第一个综合性的科学评价中心,是集科研、人才培养和评价咨询服务于一体的多功能中介性实体机构。中心由武汉大学信息管理学院、教育科学学院、图书馆、计算机中心、图书情报研究所、数学与统计学院等单位有关学科的研究人员组建而成,是一个文理交叉的跨学科重点研究基地。

《中国核心期刊评价研究报告》采用定量评价与定性分析相结合的方法,按照科学、合理的多指标评价体系,对 6 448 种中国学术期刊进行了分析评价,得出 65 个学科的学术期刊排行榜。

《中国学术期刊排行榜》是对我国所有学术期刊质量、水平和学术影响力的全面、系统的评价,对选刊投稿、期刊订购、学术评价、科研管理、人事管理等都有着非常重要的应用价值和实际指导作用。

第三届中国学术期刊评价既按照各期刊的指标综合得分排名,又按照排序将期刊分为 A+、A、A-、B+、B、C 6 个等级,以增加评价结果表示的合理性和充分性。本次共有 6 448 种中文学术期刊参与评价,经过综合评价后得到期刊相应的等级,在分学科评价中共计 1 939 种学术期刊进入核心期刊区,其中权威期刊(A+)327 种,核心期刊(A)964 种,扩展核心期刊(A-)648 种,准核心期刊(B+)1 298 种,一般期刊(B)1 922 种,较差期刊(C)1 289 种。

《中华危重病急救医学》(原刊名《中国危重病急救医学》)和《中国中西医结合急救杂志》在第三届“中国学术期刊评价”中被再次分别评为“RCCSE 中国权威学术期刊”和“RCCSE 中国核心学术期刊”,这是两种期刊第三次蝉联该等级的荣誉。