

慢病毒介导 PDIA3 过表达对溃疡性结肠炎小鼠肠黏膜屏障的影响及其机制

黄靖¹, 闫圣玉², 许志杰², 刘婉莹², 刘丽兵³

摘要 目的 探讨蛋白质二硫键异构酶 A3 (PDIA3) 对溃疡性结肠炎 (UC) 小鼠的保护作用及其可能机制。方法 将 60 只 C57BL/6 小鼠随机分成正常对照组 (Control 组)、模型组 (Model 组)、空载慢病毒组 (Lv-NC 组) 和 PDIA3 过表达慢病毒组 (Lv-PDIA3 组), 每组 15 只。采用连续 7 d 自由饮用 3% 葡聚糖硫酸钠 (DSS) 溶液建立 UC 小鼠模型, 造模成功后开始注射慢病毒干预。慢病毒干预 7 d 后结束实验, 对各组小鼠进行疾病活动指数 (DAI) 评分, HE 染色观察结肠组织病理学变化, ELISA 法检测血清中炎症因子白介素 1 β (IL-1 β)、白介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 以及肠黏膜屏障通透性标志物 D-乳酸 (D-Lac)、二胺氧化酶 (DAO) 含量, qRT-PCR 检测结肠组织中 PDIA3 mRNA 水平, Western blot 检测结肠组织中 PDIA3、ZO-1、Occludin、Claudin-1、I κ B α 、p-NF- κ B p65 (Ser536)、NF- κ B p65 蛋白表达水平。结果 与 Control 组比较, Model 组小鼠结肠组织受损严重, DAI 评分、血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、D-Lac、DAO 含量以及结肠组织中 I κ B α 和 p-NF- κ B p65 (Ser536) 蛋白表达水平均升高, 而 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 等蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 Model 组比较, Lv-PDIA3 组小鼠结肠组织受损程度减轻, DAI 评分、血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、D-Lac、DAO 含量以及结肠组织中 I κ B α 和 p-NF- κ B p65 (Ser536) 蛋白表达水平降低, 同时 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 蛋白表达水平增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而 Lv-NC 组差异无统计学意义。结论 过表达 PDIA3 能明显改善 UC 小鼠肠黏膜屏障功能, 其机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路的激活有关。

关键词 蛋白质二硫键异构酶 A3; 溃疡性结肠炎; 肠黏膜屏障; NF- κ B 信号通路

中图分类号 R 574.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)11-1768-06

2021-07-08 接收

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目 (编号: 16C1408); 衡阳市科技局 2019 年指导性项目 (编号: 2019jh011029)

作者单位: ¹ 湖南中医药大学第二附属医院重症医学科, 长沙 415900

² 南华大学附属第二医院肛肠科, 衡阳 421001

³ 南华大学附属南华医院肛肠科, 衡阳 421002

作者简介: 黄靖, 男, 主治医师;

闫圣玉, 男, 主治医师, 责任作者, E-mail: yanshengyu976510@163.com

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.11.017

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种主要累及直肠、结肠黏膜和黏膜下层的慢性非特异性炎症病变, 由于病因及发病机制尚未完全明确, 临床上缺乏特异性的治疗方法^[1]。有研究^[2-3]认为, UC 发生时肠道大量炎症细胞浸润释放炎症因子, 可使肠道黏膜通透性增加, 肠道黏膜屏障功能降低。蛋白质二硫键异构酶 (protein disulfide isomerase, PDI) 是一种主要存在于哺乳动物和酵母内质网腔的多功能蛋白, 有研究^[4]表明 PDI 家族蛋白具有抗炎作用, 可通过抑制 NF- κ B 的转录活性来调控促炎基因的表达^[5]。蛋白质二硫键异构酶 A3 (protein disulfide isomerase A3, PDIA3) 是 PDI 家族重要成员, 目前与 PDIA3 相关的肠道疾病主要涉及肠易激综合征和肠道肿瘤^[6], 尚未有在 UC 中的相关研究, 但 Naito et al^[7]发现 PDIA3 在结肠炎肠黏膜组织中低表达, 推测 PDIA3 可能在 UC 中具有某种调控作用。该研究采用葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 建立 UC 小鼠模型, 观察 PDIA3 过表达对 UC 小鼠肠黏膜屏障的影响及可能机制, 以期为 UC 的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 6~7 周龄雄性 C57BL/6 小鼠共 60 只, 体质量 (22 \pm 2) g, 由湖南嘉泰实验动物有限公司提供, 实验动物生产许可证编号为 SCXK (湘) 2019-0003, 饲养温度 15~25 $^{\circ}$ C, 相对湿度 45%~60%。

1.2 主要试剂与仪器 DSS (美国 MP Biomedicals 公司); 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒、二喹啉甲酸蛋白浓度测定试剂盒和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳凝胶配制试剂盒 (上海碧云天生物技术公司); 小鼠白介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白介素 6 (interleukin 6, IL-6)、D-乳酸 (D-lactic acid, D-Lac) 和二胺氧化酶 (diamine oxidase, DAO) ELISA 检测试剂盒 (武汉博士德生物工

程公司);实时荧光定量 PCR 试剂盒(南京诺唯赞生物技术有限公司);PDIA3、ZO-1、Occludin、Claudin-1、I κ B α 、p-NF- κ B p65 (Ser536)、NF- κ B p65 和 GAPDH 抗体(美国 Abcam 公司);PDIA3 过表达慢病毒质粒载体以及空载慢病毒质粒载体的构建以及慢病毒包装、浓缩和纯化(慢病毒滴度为 2×10^8 TU/ml,上海汉恒生物科技有限公司);DYY-12C 电泳仪、DYCZ-20E 电泳槽(北京市六一仪器厂);Multiskan FC 酶标仪(美国 Thermo 公司);RM2016 病理切片机(德国 Leica 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 造模、分组及给药 60 只 C57BL/6 小鼠随机分成正常对照组(Control 组)、模型组(Model 组)、空载慢病毒组(Lv-NC 组)和 PDIA3 过表达慢病毒组(Lv-PDIA3 组),每组 15 只。采用 3% DSS 饮用建立 UC 小鼠模型^[8]:除正常对照组给予蒸馏水外,其余各组小鼠均自由饮用 3% DSS 溶液连续 7 d,当小鼠出现体质量减轻、腹泻及便血时说明造模成功。造模成功后,Lv-NC 组和 Lv-PDIA3 组小鼠分别通过尾静脉注射空载慢病毒和 PDIA3 过表达慢病毒进行干预,Control 组和 Model 组小鼠注射等量 0.9% 氯化钠溶液,注射体积 100 μ l/只。慢病毒干预 7 d 后,腹腔注射过量的 3% 戊巴比妥钠(100 mg/ml),使小鼠麻醉致死,取材进行后续检测。

1.3.2 疾病活动指数(disease activity index, DAI)评分 造模及给药期间每日称量各组小鼠体质量,观察其大便性状和便血情况,对每组小鼠进行 DAI 评分,评分标准见表 1。

表 1 DAI 评分标准

评分	体质量下降(%)	大便性状	血便
0	0	正常	正常(-)
1	1~5	松散	隐血阳性(+)
2	6~10	半成型稀便	轻微血便(++)
3	11~15	稀便	肉眼血便(+++)
4	>15	水样稀便	显性出血(####)

1.3.3 HE 染色观察小鼠结肠组织病理学变化并评分 处死各组小鼠后迅速取出结肠组织,于生理盐水中漂洗干净后置于 4% 多聚甲醛溶液中固定,48 h 后取出进行石蜡包埋操作并置于切片机上切片(厚度为 3~4 μ m),随后按照染色试剂盒中的步骤染色。最后在显微镜下对结肠组织进行病理观察,同时采用 Chui's 评分^[9]评价肠损伤状况。

1.3.4 ELISA 检测 通过腹主动脉对每组小鼠取

血 4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 15 min,取上清液保存备用,严格按照试剂盒说明书的要求进行操作,并使用酶标仪测定各孔的 OD₄₅₀ 值,制作标准曲线并根据标准曲线计算各样品中的炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平以及肠黏膜屏障通透性标志物 DAO 和 D-Lac 的含量。

1.3.5 qRT-PCR 检测结肠组织中 PDIA3 mRNA 水平 将各组小鼠结肠组织在冰上匀浆器中剪碎并研磨均匀,添加 TRIzol 提取组织样本总 RNA 并通过紫外分光光度计测定其含量,取 2 μ g 总 RNA 采用逆转录试剂盒合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 扩增。PDIA3 上游引物序列:5'-GCCTCCGACGTGCTAGAAC-3',下游引物序列:5'-GCCAAGAAGCTCGACGAGCAT-3';GAPDH 上游引物序列:5'-TGAACGGGAAGCTCACT-3',下游引物序列:5'-GCTTCACCACCTTCTTGATG-3'。反应体系为:2 \times Talent qPCR PreMix 12.5 μ l,上、下游引物各 0.75 μ l,ddH₂O 11 μ l。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 15 s,95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 32 s,40 个循环。目的基因和内参基因(GAPDH)的拷贝数分别根据反应产生的 Ct 值从各自的标准曲线中获得,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 PDIA3 mRNA 相对表达量。

1.3.6 Western blot 检测 取各组小鼠结肠组织添加裂解液裂解组织,剪碎组织并充分碾磨 15 min,碾磨液经 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,用二喹啉甲酸法测定其蛋白浓度。取等量蛋白采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,以湿转法转至聚偏二氟乙烯膜,5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 3 h,加入稀释后的一抗[PDIA3、ZO-1、Occludin、Claudin-1、I κ B α 、p-NF- κ B p65 (Ser536)、NF- κ B p65 和 GAPDH 抗体,1:1 000]4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日,加入相应二抗室温孵育 1 h,ECL 试剂曝光显影,在全自动凝胶成像系统中曝光显影。计算目的蛋白和内参蛋白 GAPDH 的吸光度比值,该比值即为目的蛋白表达的相对水平。

1.4 统计学处理 数据采用 SPSS 19.0 统计分析软件处理,各组检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠 DAI 评分比较 与 Control 组比较,造模各组小鼠在第 3 天开始出现食量减少、体毛无光泽、腹泻等症状,第 5 天出现不同程度肉眼可见的

血便,伴有体质量下降、饮食饮水量活动量减少、毛色变差等症状,且随着造模时间的延长症状逐渐加重。注射病毒干预 7 d 后, Lv-PDIA3 组小鼠体质量下降程度、腹泻便血症状均有所减轻。Control 组、Model 组、Lv-NC 组和 Lv-PDIA3 组小鼠 DAI 评分分别为 0、(2. 71 ± 0. 21)、(2. 67 ± 0. 30)、(0. 96 ± 0. 14)。与 Control 组比较, Model 组小鼠 DAI 评分增加, 差异有统计学意义 ($P < 0. 01$); 与 Model 组比较, Lv-PDIA3 组小鼠 DAI 评分降低, 差异有统计学意义 ($P < 0. 01$), 而 Lv-NC 组差异无统计学意义 ($P > 0. 05$)。

2.2 各组小鼠结肠组织切片病理学比较 如图 1 所示, Control 组小鼠结肠组织黏膜完好, 黏膜下层无水肿, 隐窝结构存在; Model 和 Lv-NC 组小鼠结肠组织黏膜受损, 溃疡累及黏膜全层, 黏膜下层伴有大量炎症细胞浸润, 隐窝结构消失; Lv-PDIA3 组小鼠结肠组织黏膜病变程度得到明显改善, 各层结构相对清晰完整。Control 组、Model 组、Lv-NC 组和 Lv-PDIA3 组小鼠结肠组织 Chui's 评分分别为 (0. 900 ± 0. 100)、(4. 367 ± 0. 115)、(4. 200 ± 0. 265)、(2. 233 ± 0. 110)。与 Control 组比较, Model 组小鼠结肠组织 Chui's 评分增加, 差异有统计学意义 ($P < 0. 01$); 与 Model 组比较, Lv-PDIA3 组小鼠结肠组织 Chui's 评分降低, 差异有统计学意义 ($P < 0. 01$), 而 Lv-NC 组差异无统计学意义 ($P > 0. 05$)。

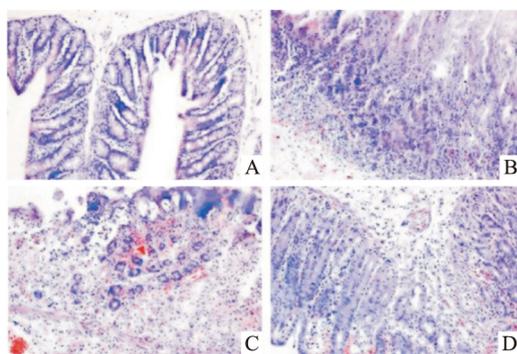


图 1 各组小鼠结肠组织病理学观察 HE × 200
A: Control 组; B: Model 组; C: Lv-NC 组; D: Lv-PDIA3 组

2.3 各组小鼠血清中炎症因子含量比较 与 Control 组比较, Model 组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量上升, 差异有统计学意义 ($P < 0. 01$); 与 Model 组比较, Lv-PDIA3 组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量下降, 差异有统计学意义 ($P < 0. 01$), 而 Lv-NC 组差异无统计学意义 ($P > 0. 05$)。见表 2。

表 2 各组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量比较 (ng/ml $\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
Control	55. 96 ± 8. 03	29. 47 ± 6. 06	42. 25 ± 6. 78
Model	160. 43 ± 20. 37**	65. 07 ± 8. 80**	124. 06 ± 17. 51**
Lv-NC	154. 56 ± 16. 00	63. 77 ± 8. 05	119. 03 ± 14. 20
Lv-PDIA3	94. 06 ± 7. 22##	37. 32 ± 4. 08##	66. 74 ± 8. 49##
F 值	77. 504	326. 600	258. 767
P 值	0	0	0

与 Control 组比较: ** $P < 0. 01$; 与 Model 组比较: ## $P < 0. 01$

2.4 各组小鼠血清中 DAO 和 D-Lac 含量比较 与 Control 组比较, Model 组小鼠血清中 DAO 和 D-Lac 含量上升, 差异有统计学意义 ($P < 0. 01$); 与 Model 组比较, Lv-PDIA3 组小鼠血清中 DAO 和 D-Lac 含量下降, 差异有统计学意义 ($P < 0. 01$), 而 Lv-NC 组差异无统计学意义 ($P > 0. 05$)。见表 3。

表 3 各组小鼠血清中 DAO 和 D-Lac 含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 15$)

组别	DAO(U/ml)	D-Lac(ng/ml)
Control	1. 67 ± 0. 29	2. 03 ± 0. 17
Model	6. 83 ± 0. 77**	9. 80 ± 1. 01**
Lv-NC	6. 60 ± 0. 51	9. 33 ± 0. 78
Lv-PDIA3	3. 47 ± 0. 45##	4. 56 ± 0. 40##
F 值	50. 496	33. 451
P 值	0	0

与 Control 组比较: ** $P < 0. 01$; 与 Model 组比较: ## $P < 0. 01$

2.5 各组小鼠结肠组织中 PDIA3 mRNA 和蛋白表达水平比较 与 Control 组比较, Model 组小鼠结肠组织中 PDIA3 mRNA 和蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0. 01$); 与 Model 组比较, Lv-PDIA3 组小鼠结肠组织中 PDIA3 mRNA 和蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0. 01$), 而 Lv-NC 组差异无统计学意义。见图 2。

2.6 各组小鼠结肠组织中紧密连接蛋白表达水平比较 如图 3 所示, 与 Control 组比较, Model 组小鼠结肠组织中 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0. 01$); 与 Model 组比较, Lv-PDIA3 组小鼠结肠组织中 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0. 01$), 而 Lv-NC 组差异无统计学意义 ($P > 0. 05$)。

2.7 各组小鼠结肠组织中 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达水平比较 与 Control 组比较, Model 组小鼠结肠组织中 I κ B α 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0. 01$); 与 Model 组比较, Lv-PDIA3 组小鼠结肠组织中 I κ B α 和 p-NF- κ B

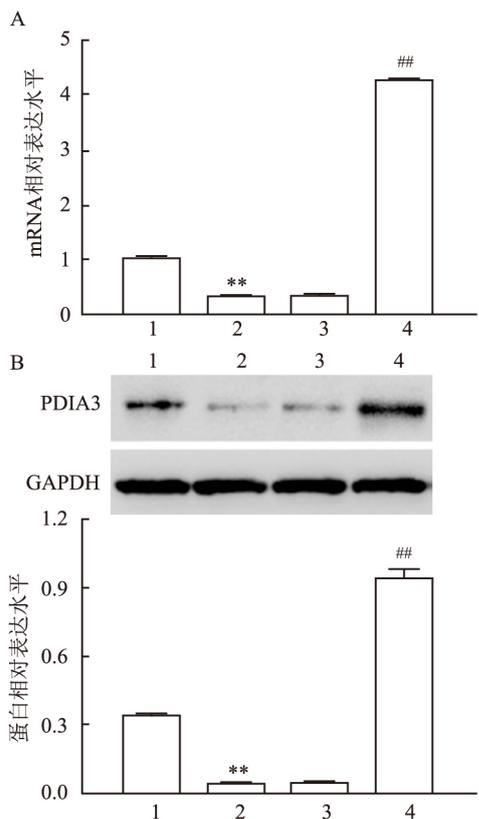


图2 各组小鼠结肠组织中 PDIA3 mRNA 和蛋白表达水平比较
A: qRT-PCR 检测 PDIA3 的 mRNA 水平; B: Western blot 检测 PDIA3 的蛋白表达水平; 1: Control 组; 2: Model 组; 3: Lv-NC 组; 4: Lv-PDIA3 组; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Model 组比较: ## $P < 0.01$

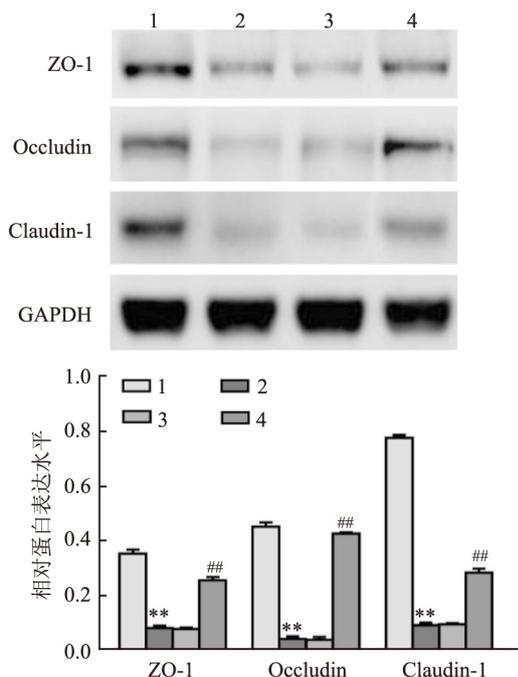


图3 各组小鼠结肠组织中 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 蛋白表达水平比较

1: Control 组; 2: Model 组; 3: Lv-NC 组; 4: Lv-PDIA3 组; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Model 组比较: ## $P < 0.01$

p65 蛋白表达水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而 Lv-NC 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 4。

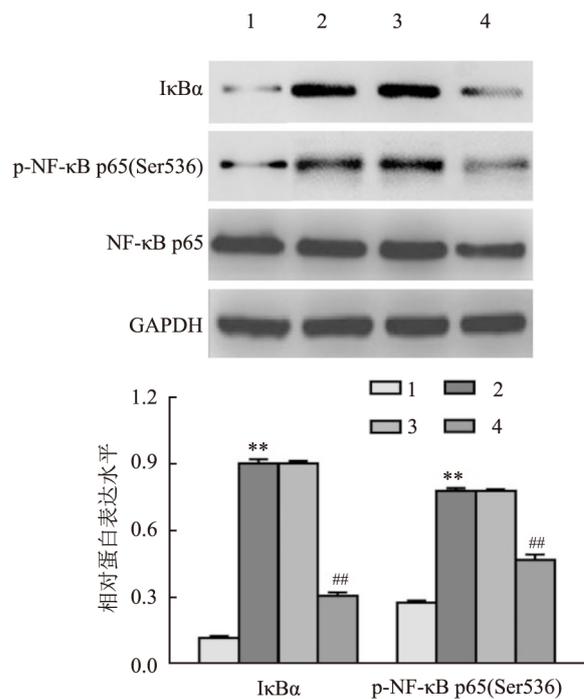


图4 各组小鼠结肠组织中 IκBα 和 p-NF-κB p65 (Ser536) 蛋白表达水平比较

1: Control 组; 2: Model 组; 3: Lv-NC 组; 4: Lv-PDIA3 组; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 Model 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

UC 的病因及发病机制尚未完全阐明, 其症状易反复发作, 难以治愈, 且有癌变风险, 目前临床治疗药物主要为氨基水杨酸类、糖皮质激素类和免疫抑制剂类, 但是这些药物的疗效都很有有限^[10], 深入探索其发病机制有助于发现新的治疗靶点。既往研究^[11]表明, PDIA3 可通过减少机体氧化损伤, 抑制内质网应激诱导的神经元凋亡发挥神经保护作用, 还可通过影响体内炎症反应调控肠易激综合征发生过程^[6], 同时在结肠炎肠黏膜组织中呈低表达状态^[7], 提示 PDIA3 与多种疾病发生发展密切相关, 检测或干预相关部位的 PDIA3 表达水平, 可能成为疾病早期诊断与治疗的新靶点。该研究采用 3% DSS 溶液诱导 UC 小鼠模型, 实验结果显示, 模型组小鼠出现不同程度的体质量减轻、腹泻及黏液血便等症状, 表明造模成功。与 Control 组比较, Model 组小鼠 DAI 评分升高、结肠组织病理改变严重、结肠组织中 PDIA3 mRNA 和蛋白表达水平均下降; 与

Model 组比较,PDIA3 过表达组小鼠 DAI 评分明显降低,结肠组织炎症浸润及损失程度得到明显改善,初步说明 PDIA3 过表达可减轻小鼠肠道炎症反应,促进溃疡愈合来缓解 UC。

在 UC 的发展过程中,一旦肠黏膜屏障受损,黏膜下层暴露在大量抗原中,机体便会激活天然免疫反应,其中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等促炎因子过度表达是导致肠道黏膜的炎症反应和溃疡发生的主要原因。DAO 是肠道黏膜上皮细胞中的细胞内酶,当肠道黏膜上皮细胞损伤时,DAO 便被释放入血;D-Lac 是细菌发酵的代谢产物,可通过受损黏膜入血,导致血清中 D-Lac 水平升高,因此血清中 DAO 和 D-Lac 含量可间接反映肠道黏膜通透性变化^[12]。本研究结果显示,与 Control 组比较,Model 组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量以及 DAO、D-Lac 水平均升高;与 Model 组比较,PDIA3 过表达组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量以及 DAO、D-Lac 水平均降低,提示 PDIA3 过表达可能是通过降低炎症因子水平、减少炎症细胞浸润、改善肠道黏膜屏障及减轻肠道上皮细胞受损,最终达到治疗 UC 的效果。

紧密连接在肠黏膜屏障中发挥着重要作用,UC 作为肠黏膜损伤性疾病,其发病与黏膜修复过程都与肠上皮屏障功能有关,ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 是构成紧密连接的主要跨膜蛋白,一旦减少、缺失、变异会引起肠上皮细胞通透性增加,细菌、内毒素和大分子物质会通过进入体循环,故这类紧密连接蛋白的表达水平在一定程度上可以反映肠屏障的受损与修复情况。已有结果显示,ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 在 UC 患者结肠组织中低表达^[13];四君子汤可以改善 UC 小鼠脓血便等症状,缓解肠黏膜的损伤,上调 Occludin 和 Claudin-1 的表达,对 UC 小鼠有治疗作用^[14]。该研究结果显示,PDIA3 过表达组小鼠结肠组织中 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 蛋白表达水平较模型组显著上调,说明其可能通过增强 UC 小鼠结肠紧密连接蛋白表达,维持 UC 肠上皮紧密连接的完整性和稳定性,修复肠黏膜屏障功能。NF- κ B 是调节免疫及炎症反应的重要因子,既往研究^[3]表明,活化的 NF- κ B 可调节与 UC 发生、发展相关的促炎性细胞因子,加重肠道的炎症反应,提示 NF- κ B 的激活在 UC 免疫调节及炎症反应中起关键作用。为进一步探究 PDIA3 改善 UC 肠黏膜屏障功能的具体作用机制,该研究对结肠组织中 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达水平进行了检测,研究结果显示,与正常组比较,模型组小鼠结肠组织中 I κ B α 和

p-NF- κ B p65 (Ser536) 蛋白表达水平升高,与相关研究^[15]一致;与 Model 组比较,PDIA3 过表达组小鼠结肠组织中 I κ B α 和 p-NF- κ B p65 (Ser536) 蛋白表达水平降低,提示 PDIA3 可能通过调节 NF- κ B 信号通路发挥对 UC 肠黏膜屏障的改善作用。

综上所述,PDIA3 过表达可能通过抑制 NF- κ B 信号通路,下调血清中促炎因子的表达,降低肠道黏膜通透性,从而发挥对 UC 小鼠肠道黏膜功能的保护作用。该研究结果为 UC 肠黏膜屏障损伤的防治提供了新的靶点,对于临床治疗有一定的参考意义。

参考文献

- [1] Ungaro R, Mehandru S, Allen P B, et al. Ulcerative colitis [J]. Lancet 2017, 389(8): 1756-70.
- [2] 徐凤,毛芝纯,周淑芬,等.半夏泻心汤对溃疡性结肠炎小鼠肠道黏膜屏障功能保护作用及 ZO-1 和 Occludin 表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2019,25(1): 44-7.
- [3] Yan Y X, Shao M J, Qi Q, et al. Artemisinin analogue SM934 ameliorates DSS-induced mouse ulcerative colitis via suppressing neutrophils and macrophages [J]. Acta Pharmacol Sin 2018, 39(10): 1633-44.
- [4] Zhou M, Jacob A, Ho N, et al. Downregulation of protein disulfide isomerase in sepsis and its role in tumor necrosis factor- α release [J]. Crit Care 2008, 12(4): 100-5.
- [5] Higuchi T, Watanabe Y, Waga I. Protein disulfide isomerase suppresses the transcriptional activity of NF- κ B [J]. Biochem Biophys Res Commun 2004, 318(1): 46-52.
- [6] 马丽娟,吕宾,孟立娜,等. PDIA3 在腹泻型肠易激综合征患者结肠黏膜中的蛋白表达及其意义[J]. 胃肠病学,2011,16(4): 218-21.
- [7] Naito Y, Takagi T, Okada H, et al. Identification of inflammation-related proteins in a murine colitis model by 2D fluorescence difference gel electrophoresis and mass spectrometry [J]. J Gastroenterol Hepatol 2010, 25(1): 144-8.
- [8] 李晴,胡丽红,曲波.不同浓度 DSS 诱导小鼠溃疡性结肠炎模型的比较[J]. 胃肠病学和肝病杂志,2016,25(10): 1106-10.
- [9] 陈朝板,屠伟峰,郗文斌.舒芬太尼预处理对大鼠肠缺血再灌注损伤肠黏膜屏障完整性的影响[J]. 实用医学杂志,2012,28(18): 3015-7.
- [10] 陈文杰,杨勤.溃疡性结肠炎中西医治疗进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2013,15(3): 251-4.
- [11] Castillo V, Oñate M, Woehlbier U, et al. Functional role of the disulfide isomerase ERp57 in axonal regeneration [J]. PLoS One, 2015, 10(9): 136-40.
- [12] 刘岩,李连泰,计小青,等.黄芩-白芍药对改善小鼠溃疡性结肠炎的作用及机制研究[J]. 中国药房,2017,29(3): 356-60.
- [13] Tan Y, Guan Y, Sun Y, et al. Correlation of intestinal mucosal healing and tight junction protein expression in ulcerative colitis

- patients[J]. *Am J Med Sci* 2019 ,357(3):195-204.
- [14] 黄晓燕,郑超伟,罗莉川,等. 四君子汤对溃疡性结肠炎小鼠模型 occludin 和 claudin-1 表达的影响[J]. *现代生物医学进展*,2019,19(5):39-43.
- [15] 王康,缪志伟,董筠,等. 基于 STAT3/NF- κ B/IL-6 通路研究加味黄芩汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J]. *南方医科大学学报*,2020,40(2):196-202.

Effect of lentivirus-mediated PDIA3 overexpression on intestinal mucosal barrier in mice with ulcerative colitis and its mechanism

Huang Jing¹, Yan Shengyu², Xu Zhijie², et al

(¹Dept of Critical Medicine, The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 415900; ²Dept of Anorectal, The Second Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001)

Abstract Objective To investigate the protective effect of protein disulfide isomerase A3 (PDIA3) on ulcerative colitis (UC) mice and its possible mechanism. **Methods** Sixty C57BL/6 mice were randomly divided into a normal Control group (Control), Model group (Model), no-load lentivirus group (Lv-NC) and a PDIA3 overexpressed lentivirus group (Lv-PDIA3), with 15 mice in each group. The mouse model of UC was established by drinking 3% dextran sulfate sodium (DSS) solution for 7 consecutive days. After successful modeling, lentivirus intervention was started. After 7 days of lentivirus intervention, the mice in each group were evaluated by disease activity index (DAI) score. The histopathological changes of colon were observed by HE staining. The inflammatory cytokines of interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α), and the intestinal mucosal barrier permeability markers of D-lactic acid (D-Lac), diamine oxidase (DAO) levels in serum were detected by ELISA, PDIA3 mRNA levels in colon tissues were detected by qRT-PCR. The expression levels of PDIA3, ZO-1, Occludin, Claudin-1, I κ B α , p-NF- κ B p65 (Ser536) and NF- κ B p65 in colonic tissue were detected by Western blot. **Results** Compared with the Control group, the colon tissue of the Model group was severely damaged. DAI score, the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , D-Lac, DAO in serum, and the expression levels of I κ B α and p-NF- κ B p65 (Ser536) in colon tissues were increased ($P < 0.01$). The proteins expression levels of ZO-1, Occludin and Claudin-1 in colon tissues were reduced ($P < 0.01$). Compared with the Model group, the damage degree of colonic tissue in Lv-PDIA3 group was reduced. DAI score, the levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , D-Lac, DAO in serum, and the expression levels of I κ B α and p-NF- κ B p65 (Ser536) in colon tissues were decreased ($P < 0.01$). The proteins expression levels of ZO-1, Occludin and Claudin-1 in colon tissues were increased ($P < 0.01$). However, there was no significant difference in Lv-NC group ($P > 0.05$). **Conclusion** Overexpression of PDIA3 improved the impaired intestinal mucosal barrier function in UC mice, which may be related to inhibition of NF- κ B signaling pathway activation.

Key words PDIA3; ulcerative colitis; intestinal mucosal barrier; NF- κ B signaling pathway