

网络出版时间:2016-4-19 11:04:48 网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160419.1104.026.html

贯叶连翘提取物对免疫性肝损伤小鼠肠道屏障功能损伤保护作用

李芳群¹, 樊紫青¹, 方海明¹, 王佳佳², 程启闰¹, 章礼久¹

摘要 目的 研究急性免疫性肝损伤对肠道屏障功能影响及贯叶连翘提取物(HPE)的作用。方法 60只ICR小鼠随机分为正常组、模型组、HPE低剂量组(25 mg/kg)、HPE中剂量组(50 mg/kg)、HPE高剂量组(100 mg/kg)和地塞米松组(2.5 mg/kg)。HPE组小鼠灌胃给予不同剂量HPE,连续10 d后除正常组外小鼠禁食不禁饮,12 h后采用尾静脉注射刀豆蛋白A(Con A)20 mg/kg,8~12 h后处死小鼠,取小肠组织,ELISA法测定肠匀浆二胺氧化酶(DAO)含量,免疫组化法测定肠组织闭锁蛋白(Occludin)、紧密连接相关蛋白-1(ZO-1)蛋白表达情况。结果 与正常组比较,模型组小鼠肠匀浆DAO水平明显降低,Occludin、ZO-1蛋白表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,HPE各剂量组DAO水平显著升高,Occludin、ZO-1蛋白表达增强,差异有统计学意义($P < 0.01$)。HPE高剂量组与HPE低剂量组比较,DAO、Occludin、ZO-1差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 急性免疫性肝损伤时存在肠道屏障功能损伤,HPE对损伤的肠道屏障功能有保护作用,机制可能与增强Occludin、ZO-1蛋白表达有关。

关键词 贯叶连翘提取物;急性免疫性肝损伤;肠道屏障;DAO;ZO-1;Occludin

中图分类号 R 575.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)05-0669-04

1998年“肝-肠轴”学说提出以来,肠道功能屏障损伤在肝脏病变及相关并发症的发病机制研究中价值更加受到研究者重视^[1]。研究^[2-3]证实,肠道菌群与肝细胞再生过程中基因表达调控有关,肝硬化等慢性肝脏病变存在肠道屏障功能障碍,肠道菌群失调、易位在肝硬化及并发症发生机制中起到重要作用。急性肝脏损伤临床多见,但是否同时合并肠道屏障损伤,国内外相关研究较少。贯叶连翘(*Hypericum perforatum L.*, HPL)为藤黄科金丝桃属多年生草本植物,HPL提取物(*Hypericum perforatum extract*, HPE)在美欧等国用于治疗抑郁症已有上百年历史,有抗抑郁、抗病毒、抗炎、抗肿瘤、抗氧化等多种药理学作用^[4-9]。研究^[10]表明HPE对小鼠急性免疫性肝损伤有保护作用,机制可能与抗氧化应激有关。该研究旨在初步探讨刀豆蛋白A(Con A)建立急性免疫性肝损伤模型中是否合并存在肠道屏障功能障碍,进一步探讨HPE对急性免疫性肝损伤肠道屏障障碍是否存在作用及可能机制,为后续研究提供实验基础。

2016-02-22 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1408085MH178)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院消化内科,合肥 230601

²安徽医科大学药理学教研室,合肥 230032

作者简介:李芳群,女,硕士研究生;

方海明,男,博士,副主任医师,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: haimingfang@163.com;

王佳佳,女,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: ljedu@163.com

day, the mice were injected with 0.2% CCl₄ (0.1 ml/10 g) to induce mouse model of acute liver injury except the normal group. To observe the level of liver homogenate about serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and the influence of the malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-px) level; liver tissue has been stained by HE. The expression of CYP2E1 in liver tissue was measured by immunohistochemistry and Western blot. The expression level of CYP2E1 mRNA in the mice liver was detected by qRT-PCR. **Results** HY-12 could decrease ALT, AST activity in mice serum of the acute liver injury, reduce the level of MDA in liver homogenate, increase SOD and GSH-px levels, inhibit the CYP2E1 level in liver cells, and significantly reduce the degree of liver tissue lesions in mice. **Conclusion** HY-12 has certain protective effect on acute liver injury in mice and its mechanism may be related to the body lipid peroxidation and inhibited CYP2E1 expression.

Key words HY-12; acute liver injury; carbon tetrachloride; lipid peroxidation

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 ICR 小鼠, SPF 级, 18 ~ 22 g, 购自安徽医科大学实验动物中心。

1.2 药物与试剂 HPE 购自天津马克生物技术公司(批号:20130225);地塞米松购自金陵药业股份有限公司(批号:20130422); ConA、二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)购自美国 Sigma 公司;紧密连接相关蛋白-1(zonula occludens-associated protein-1, ZO-1)、闭锁蛋白(Occludin)抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;SP 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 仪器 电热恒温水浴箱(北京医疗设备厂意成公司);SPetraMax 190 全波长酶标仪(美国 MD 公司);1.0 型高速低温离心机、分光光度仪(上海精密科学仪器有限公司);TGL-16H 高速离心机(珠海黑马医学仪器有限公司);Nikon ECLIPSE 80i 光学显微镜(尼康映像仪器销售中国有限公司);RXL 全自动生化仪(西门子有限公司)。

1.4 造模及给药 实验设:正常组、模型组、HPE 各剂量组(25、50、100 mg/kg)和地塞米松组(阳性对照)(2.5 mg/kg),共 6 组,每组 10 只。HPE 高剂量组、HPE 中剂量组、HPE 低剂量组及地塞米松组经灌胃给予相应剂量药物,正常组和模型组分别给予等体积生理盐水,1 次/d,连续 10 d。末次给药后除正常组,各组均经尾静脉注射 20 mg/kg Con A,正常组尾静脉注射等量生理盐水。

1.5 样本制备和检测

1.5.1 小肠组织中 DAO 含量测定 取小鼠小肠组织称重,洗净后 4 °C 预冷生理盐水于匀浆器制备匀浆,按照 ELISA 试剂盒操作步骤测定 DAO 含量。

1.5.2 肠道组织 HE 观察 按照常规方法制备石蜡切片后 HE 染色观察肠组织病理学改变。

1.5.3 肠道组织中 Occludin、ZO-1 蛋白表达测定 采取免疫组化法检测,取肠组织石蜡切片常规脱蜡水化、微波法抗原修复,按照操作步骤分别测定肠组织 Occludin、ZO-1 蛋白表达情况,再采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件对各免疫组化图片进行平均光密度检测和分析。以参数平均光密度代表 ZO-1、Occludin 蛋白的颗粒密度。

1.6 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 小鼠一般情况 正常组小鼠反应灵敏、性情活泼、肠管颜色鲜艳、有光泽。模型组小鼠反应迟钝、精神萎靡,肠管暗紫色。

2.2 HPE 对急性免疫性肝损伤小鼠肠道组织中 DAO 活性的影响 各组方差分析差异有统计学意义($F_{DAO} = 1.84, P < 0.01$)。地塞米松组、HPE 各剂量组肠匀浆中 DAO 含量较模型组明显增加($P < 0.01$),HPE 各剂量组间 DAO 含量差异有统计学意义,HPE 高剂量组肠匀浆中 DAO 含量较 HPE 低剂量组明显增加($P < 0.01$),见图 1。

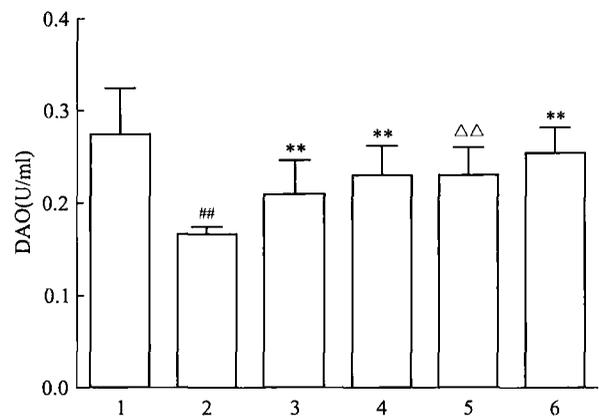


图1 HPE 对急性免疫性肝损伤小鼠肠道组织中 DAO 活性的影响 1:正常组;2:模型组;3:HPE 低剂量组;4:HPE 中剂量组;5:HPE 高剂量组;6:地塞米松组;与正常组比较:## $P < 0.01$;与模型组比较:** $P < 0.01$;与 HPE 低剂量组比较:△△ $P < 0.01$

2.3 HPE 对急性免疫性肝损伤小鼠肠道病理组织学变化的影响 正常组小鼠的肠绒毛结构完整、排列整齐,无明显炎性细胞浸润。模型组可见肠黏膜充血、水肿,绒毛结构紊乱,部分出现断裂、坏死脱落及炎性细胞浸润。HPE 给药组组织充血、水肿明显改善,肠绒毛脱落、倒伏情况好转,部分完整。见图 2。

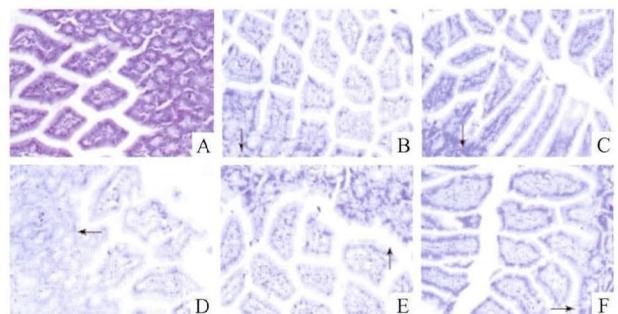


图2 肠道组织变化 HE × 200

A:正常组;B:模型组;C:地塞米松组;D:HPE 低剂量组;E:HPE 中剂量组;F:HPE 高剂量组

2.4 HPE 对急性免疫性肝损伤小鼠肠道组织中 Occludin、ZO-1 表达的影响 光镜下可见 Occludin、ZO-1 蛋白阳性颗粒定位于肠道细胞间,呈棕黄色。各组间方差分析差异有统计学意义($F_{Occludin} = 2.437, F_{ZO-1} = 6.637$),模型组小鼠肠道 Occludin、ZO-1 表达显著减弱,平均光密度显著低于正常组($P < 0.01$)。HPE 各剂量组 Occludin、ZO-1 表达显著增强,平均光密度显著高于模型组($P < 0.05, P < 0.01$),HPE 各剂量组间随 HPE 浓度增加, Occludin、ZO-1 表达增强($P < 0.01$)。见图 3~4、表 1。

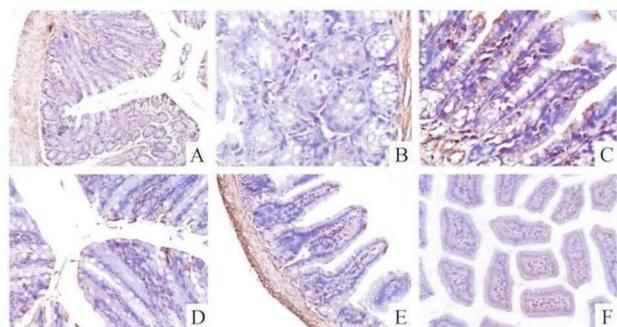


图 3 HPE 对急性免疫性肝损伤小鼠小肠 Occludin 表达的影响 SP×200

A: 正常组; B: 地塞米松组; C: 模型组; D: HPE 高剂量组; E: HPE 中剂量组; F: HPE 低剂量组

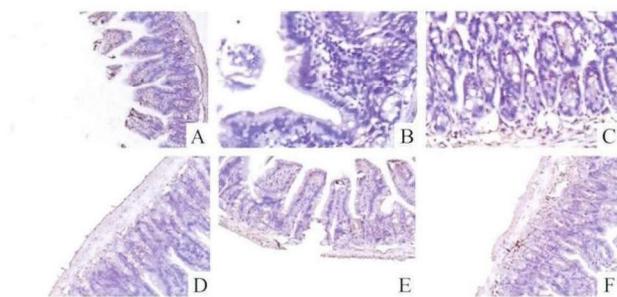


图 4 HPE 对急性免疫性肝损伤小鼠 ZO-1 表达的影响 SP×200

A: 正常组; B: 地塞米松组; C: 模型组; D: HPE 高剂量组; E: HPE 中剂量组; F: HPE 低剂量组

表 1 小鼠肠道组织 Occludin、ZO-1 表达情况($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	Occludin 平均光密度	ZO-1 平均光密度
正常	0.339 1 ± 0.032 3	0.864 8 ± 0.590 9
模型	0.225 1 ± 0.015 2**	0.306 6 ± 0.251 0**
地塞米松	0.282 4 ± 0.031 7**	0.764 2 ± 0.401 6**
HPE 低剂量	0.230 3 ± 0.030 3**	0.447 8 ± 0.314 7**
HPE 中剂量	0.259 2 ± 0.042 9 ^{△△}	0.572 9 ± 0.372 0 ^{△△}
HPE 高剂量	0.271 3 ± 0.024 5 ^{▽▽}	0.665 6 ± 0.337 9 ^{▽▽}

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$; 与 HPE 低剂量组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与 HPE 中剂量组比较: ^{▽▽} $P < 0.01$

3 讨论

肠道屏障包括机械屏障、化学屏障、免疫屏障和生物屏障等,机械屏障与肠黏膜通透性关系最密切。肠道黏膜上皮屏障功能的解剖基础源于肠上皮细胞间的紧密连接(tight junctions, TJs), TJs 由多种紧密连接蛋白组合构成,如 ZO-1、Occludin 和 Claudin 家族等,对维持上皮细胞极性及其调节肠道通透性起重要作用。这些紧密连接蛋白的表达异常或由于细胞骨架结构改变引起的紧密连接蛋白分布异常皆可导致 TJs 破坏^[11]。肠上皮细胞 TJs 中, Occludin 通过胞膜外部分与相邻细胞发生结合而产生细胞旁封闭, ZO-1 则在连接 Occludin 中起桥梁作用, ZO-1 仅起着 TJ 形成的装配平台作用,同时又是 Occludin 与细胞内骨架系统连接及信号传导机制中的一个重要结构,在维持肠黏膜上皮屏障功能的完整性方面具有重要作用^[12-13]。DAO 活性与绒毛高度和黏膜细胞的核酸和蛋白合成密切相关,肠黏膜上皮细胞受损或坏死后,引起血液和肠腔内 DAO 活性升高,肠黏膜 DAO 活性降低, DAO 是反映小肠黏膜结构功能的较为理想的指标^[14-15]。本研究结果表明急性免疫性肝损伤小鼠肠组织匀浆中 DAO 含量较正常组明显降低,提示急性肝损伤存在肠道通透性增加,存在肠道屏障功能受损。进一步测定肠组织 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达情况显示,模型组 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达情况较正常组明显降低,提示急性免疫性肝损伤引起屏障功能障碍可能与改变 Occludin 在细胞中的位置分布,减少 ZO-1 的表达有关。肠道通透性增加可能与 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达减少有关。

作为藤黄科金丝桃属多年生草本植物, HPE 有抗氧化、抗炎等广泛药理作用,研究^[10]表明, HPE 对急性免疫性肝损伤有保护作用。本研究进一步研究显示,通过预先灌胃给予 HPE,能够升高肠匀浆 DAO 含量,呈现剂量依赖性趋势,进一步免疫组化表明, HPE 能够增加肠组织 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达水平,随着 HPE 浓度增加呈现升高趋势,提示 HPE 对急性免疫性肝损伤引起的肠道屏障功能有保护作用,其机制可能与增加 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达有关。

综上所述,急性肝损伤存在肠道屏障功能障碍, HPE 对急性肝损伤引起的肠道屏障功能障碍具有保护作用,其机制可能与增加 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达有关。

参考文献

- [1] Marshall J C. The gut as a potential trigger exercise-induced-inflammatory responses [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1998, 76(5):479-84.
- [2] Liu H X, Rocha C S, Dandekar S, et al. Functional analysis of the relationship between intestinal microbiota and the expression of hepatic genes and pathways during the course of liver regeneration [J]. *J Hepatol*, 2015: [Epub ahead of print].
- [3] Fukui H. Gut-liver axis in liver cirrhosis: How to manage leaky gut and endotoxemia [J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(3):425-42.
- [4] Wurglics M, Schubert-Zsilavecz M. *Hypericum perforatum*: a 'modern' herbal antidepressant: pharmacokinetics of active ingredients [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2006, 45(5):449-68.
- [5] Karioti A, Bilia A R. Hypericins as potential leads for new therapeutics [J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(2):562-94.
- [6] Merhi F, Tang R, Piedfer M, et al. Hyperforin inhibits Akt1 kinase activity and promotes caspase-mediated apoptosis involving Bad and Noxa activation in human myeloid tumor cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10):e25963.
- [7] 蒲秀瑛, 梁剑平, 王学红, 等. 贯叶连翘提取物抗甲1型流感病毒活性的研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(2):259-64.
- [8] 朱丽丽, 章礼久, 方海明. 金丝桃素光动力学治疗胆管癌的研究进展 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(7):856-8.
- [9] 胡小艳, 尚若峰, 刘宇, 等. 金丝桃素对免疫抑制小鼠免疫功能 and 抗氧化能力的影响 [J]. *西北农业学报*, 2012, 21(3):38-41.
- [10] 程启闰, 方海明, 李芳群, 等. 贯叶连翘提取物对小鼠急性免疫性肝损伤的保护作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(4):477-81.
- [11] Edelblum K L, Turner J R. The tight junction in inflammatory disease: communication break down [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(6):715-20.
- [12] Mankertz J, Schulzke J D. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2007, 23(4):379-83.
- [13] Yu A S, McCarthy K M, Francis S A, et al. Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005, 288(6):C1231-41.
- [14] Sun T, Gao G Z, Li R F, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates oxidative stress and restores intestinal mucosal permeability in chemically induced colitis in mice [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(5):891-901.
- [15] Li H, Qiu P, Wang J, et al. Effects of compound Ginkgo biloba on intestinal permeability in rats with alcohol-induced liver injury [J]. *Food Funct*, 2015, 6(2):470-8.

The protective effect of *Hypericum perforatum extract* on intestinal barrier injury in acute immunological liver injury mice

Li Fangqun, Fan Ziqing, Fang Haiming, et al

(Dept of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the protective effect of *Hypericum perforatum extract* (HPE) on intestinal barrier function in concanavalin A (Con A) induced acute immunological liver injury mice. **Methods** Sixty ICR mice were randomly divided into six groups: normal group, model group, HPE (25, 50, 100 mg/kg) groups and dexamethasone group (2.5 mg/kg). Different doses of HPE (25, 50, 100 mg/kg) were given to mice in HPE groups by gavage for 10 days. On day 10 Con A (20 mg/kg) was injected to mice by tail intravenous. After 8 to 12 h, mice were sacrificed. Diamine oxidase (DAO) levels in intestinal tissues were tested by ELISA assays. Expressions levels of Occludin, Zonula occludens-associated protein-1 (ZO-1) were analyzed by immunohistochemical method. **Results** Compared with the normal group, DAO levels and expressions levels of Occludin, ZO-1 were significantly decreased in the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, DAO levels and expressions levels of Occludin, ZO-1 were significantly increased in HPE group ($P < 0.01$). Compared with low dose group, DAO levels and expressions levels of Occludin, ZO-1 were significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Intestinal barrier function is damaged in acute immunological liver injury mice. HPE has obviously protective effects on the damaged intestinal barrier function, which may be associated with increasing expression of Occludin and ZO-1.

Key words *Hypericum perforatum extract*; acute immunological liver injury; intestinal barrier; DAO; Occludin; ZO-1