DOI:10.16016/j.1000-5404.201511153

小鼠肠急性缺血再灌注模型中芳香烃受体活化对肠黏膜屏障功能的影响

韩 宾,盛百伐,张治草,蒲爱民,殷久恒,杨 桦 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院普通外科)

[摘要] **目的** 观察吲哚并[3,2-B]咔唑-6-甲醛[6-formylindolo(3,2-b) carbazole, FICZ]活化芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor,AhR)对 C57BL/6 小鼠肠急性缺血再灌注(I/R)后肠道屏障功能的影响。**方法** 取 C57BL/6 小鼠 18 只,分成假手术组、I/R 组和 FICZ 干预(I/R + FICZ)组,每组 6 只。小鼠肠 I/R 模型:肠系膜上动脉夹闭 30 min,再灌注 6 h。苏木精-伊红(HE)染色观察小肠组织形态学的变化。蛋白质印迹和免疫荧光检测观察肠黏膜 AhR 与 ZO-1 的表达与分布情况。**结果** 与假手术组比较,I/R 组肠黏膜明显肿胀,部分绒毛脱落、变粗,甚至倒伏、断裂,而 I/R + FICZ 组肠黏膜无明显肿胀,绒毛结构相对完整,形态接近正常;免疫荧光显示 I/R 后肠上皮表面 ZO-1 连续性明显破坏,而 I/R + FICZ 组肠上皮 ZO-1 连续性明显恢复。肠上皮蛋白定量分析显示:与假手术组比较,I/R 组和 I/R + FICZ 组小鼠小肠上皮 ZO-1 表达分别下降 50.7% 和 32.3%($P<0.05$);I/R + FICZ 组较 I/R 组小肠上皮 ZO-1 表达上调 37.2%($P<0.05$)。**结论** FICZ 预处理可有效缓解小鼠急性 I/R 对肠黏膜结构与功能的损伤,可能机制是上调 ZO-1 的表达。

[关键词] 芳香烃受体;肠黏膜屏障;紧密连接蛋白;肠缺血再灌注
[中图法分类号] R333.3;R364.12;R914.5 [文献标志码] A

Effect of aryl hydrocarbon receptor activation on intestinal mucosal barrier in mice after acute intestinal ischemia reperfusion injury

Han Bin, Sheng Baifa, Zhang Zhicao, Pu Aimin, Yin Jiuheng, Yang Hua (Department of General Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of aryl hydrocarbon receptor (AhR) activation on the intestinal barrier function after acute intestinal ischemia reperfusion (I/R) in a mouse model. **Methods** Eighteen 6-8-week-old C57B L/6 mice were divided into 3 groups randomly, with 6 in each group: sham group, I/R group, and I/R + 6-formylindolo(3,2-b)carbazole (FICZ) group. The mouse intestinal I/R model was established by mechanically blocking the superior mesenteric artery (SMA) temporarily for 30 min, following by reperfusion for 6 h. Histological changes in the small intestine were observed by hematoxylin-eosin staining (HE). The protein expression of AhR and tight junction protein ZO-1 in the intestine epithelium was detected by immunofluorescence assay and Western blotting. **Results** Both HE staining and immunofluorescence assay indicated the integrate intestinal villi with continuous ZO-1 expression on the surface of the villi alone in the sham group. The intestinal villi of the I/R group were partially dissociated, thickened, and fractured, meanwhile the destroyed continuity of ZO-1 turned up on the top of the villi. The intestinal villi of the I/R + FICZ group were neatly arranged and the damage to intestinal mucosa was alleviated obviously, with remarkable restoration of the continuity of ZO-1. Compared with the sham group, ZO-1 protein levels in the I/R group and the I/R + FICZ group were decreased by 50.7% and 32.3%, respectively ($P<0.05$),

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(813300335)
[通信作者] 杨 桦,E-mail:hwbyang@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160201.1434.029.html(2016-02-01)

and compared with the I/R group, ZO-1 protein level in the I/R + FICZ group was increased by 37.2% ($P < 0.05$). **Conclusion** Pretreatment with FICZ can effectively alleviate the damage of intestinal mucosal structure and function in acute I/R model, and the possible mechanism is to increase the expression of ZO-1.

[**Key words**] aryl hydrocarbon receptor; intestinal mucosal barrier; tight junction protein; intestinal ischemia reperfusion

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (813300335). Corresponding author: Yang Hua, E-mail: hwbyang@126.com

肠缺血再灌注(ischemia reperfusion, I/R)是急性战创伤以及各种大型手术如肠绞窄性疝等多种急性病理刺激下的一种潜在的病理生理过程,能够引起肠黏膜形态学的改变,造成肠黏膜屏障(intestinal mucosal barrier)功能受损,导致肠道细菌位移和肠源性感染,进一步加重原发疾病,诱发全身炎症反应综合征和多脏器功能衰竭[1]。而完整的肠黏膜上皮细胞(intestinal epthelial cell, IEC)以及上皮细胞间的紧密连接(tight junction, Tj)是IEB的结构基础,参与维系IEB功能[2]。作为配体依赖激活的核转录因子,芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)可通过与其配体如吲哚并[3,2-B]咔唑-6-甲醛[6-formylindolo (3,2-b) carbazole, FICZ]等结合并激活,诱导包括外源性代谢酶(xenobiotic-metabolizing enzyme, XME)在内的一系列下游目的基因表达[3]。研究发现,作为信号通路的关键调节分子,AhR可诱导多种细胞因子表达,参与机体多种重要生理学过程,如细胞的分化与凋亡、炎症反应等[4]。本实验模拟小鼠肠急性I/R,通过FICZ预处理活化AhR,观察其对肠黏膜形态功能以及紧密连接蛋白ZO-1表达与分布的影响,评估活化的AhR对小鼠肠急性I/R的防治作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与器材

蛋白酶抑制剂(PMSF)、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜购自美国Millipore公司,FICZ购自ENZO公司,AhR一抗、ZO-1一抗购自Abcam公司,CYP1A1一抗购自Beyotime Biotechnology公司,蛋白测定试剂盒、RIPA裂解液、化学发光(ECL)检测试剂盒、辣根过氧化物酶(HPR)、十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶试剂盒购自Boster公司,电泳仪与湿转仪购自Bio-Rad公司,凝胶成像分析系统购自Kodak公司,改良的Ussing灌流室(Using chambers)购自Physiologic Instruments公司,RT-PCR试剂盒购自TaKaRa公司。

1.2 实验动物及分组

雄性C57BL/6小鼠18只,6~8周龄,体质量20~23 g,购自第三军医大学新桥医院实验动物中心。分为3组($n=6$):假手术组、I/R组和FICZ干预组(I/R + FICZ组)。其中假手术组、I/R组术后腹腔注射200 mL生理盐水,而I/R + FICZ组给予腹腔注射等量的FICZ(剂量为1 mg/只)溶液[5]。术前12 h,自由饮水。以0.2 mL 0.1%的戊巴比妥钠腹腔注射,麻醉后经腹正中线切开,探查并游离肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA),夹闭30min后恢复血运。术毕缝合皮肤。术后6 h处死全部小鼠,分离提取小肠组织。

1.3 实验方法

1.3.1 观察小肠形态学变化 取回盲部10 cm以上的小肠组织2 cm,多聚甲醛固定后制备石蜡切片。按步骤对石蜡切片行苏木精-伊红(HE)染色。光学显微镜(×400)下观察肠黏膜形态学变化。

1.3.2 小肠参照Chiu肠黏膜损伤评分 根据小肠形态学改变,进行组织学评分,标准依据Chiu肠黏膜损伤评分[6]。

1.3.3 肠黏膜跨上皮电阻检测 取小肠组织长约3 cm,沿系膜方向剖开肠管,生理盐水洗净,显微镜下剥离肠黏膜,将其安装在调试好的尤斯灌流仪上,测量电阻值[7]。重复4次。

1.3.4 Western blot检测AhR、CYP1A1、ZO-1的蛋白表达变化 提取3组样品蛋白质,利用蛋白测定试剂盒检测蛋白浓度。蛋白上样,凝胶电泳恒压60 V,湿转恒流240 mA,转至甲醛浸泡过的PVDF膜。5% TBST脱脂奶粉室温封闭2 h,适当比例稀释一抗于4 ℃过夜,依次进行洗膜15 min、二抗室温孵育2 h、洗膜15 min后,加入化学发光试剂曝光,利用分子成像软件分析数据。重复3次。

1.3.5 实时荧光定量PCR分析CYP1A1 mRNA水平变化 用TRIzol(Invitrogen)依照说明说提取肠上皮细胞总mRNA,用TaKaRa试剂盒将mRNA逆转录生成cDNA。按照SYBR Green试剂盒说明书进行扩增。

Rotor-Gene Q 分析软件处理数据,重复 3 次。见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物核苷酸序列与长度

引物名称	引物序列	产物长度(bp)
CYP1A1	上游 5′-CCAAGAGCTGCTCAGCATAG-3′	188
	下游 5′-GGCATCCAGGGAAGAGTTAG-3′	
β-actin	上游 5′-CTTCTTTGCAGCTCCTTCGTT-3′	206
	下游 5′-AGGAGTCCTTCTGACCCATTC-3′	

1.3.6 组织免疫荧光观察 AhR、ZO-1 表达与分布

将小肠组织行冰冻切片,4% 多聚甲醛固定,PBS 溶液清洗 3 次,每次 10 min,5% BSA 溶液封闭 2 h,按比例稀释一抗于 4 ℃过夜。依次进行 PBS 清洗 10 min、Cy3 标记的荧光二抗室温孵育 2 h、PBS 清洗 10 min、DAPI 染色 15 min,PBS 清洗 10 min。封片后于激光共聚焦显微镜观察荧光变化。结果重复 3 次。

1.4 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,行单因素方差分析。

2 结果

2.1 小肠组织形态学改变

缺血再灌注 6 h 后处死小鼠,观察发现,与假手术组相比,I/R 组小肠明显充血,水肿、变粗,而加入 FICZ 处理的小肠黏膜损伤得到明显改善。HE 染色显示:假手术组绒毛整齐有序,结构完整,清晰可辨;I/R 组绒毛排列紊乱,绒毛表面部分游离,肠上皮细胞大量坏死,结构不连续,破坏明显;I/R + FICZ 组肠上皮细胞少量坏死,绒毛部分节段结构不连续,未见明显水肿,较 I/R 组显著改善,提示 FICZ 可明显改善小鼠肠急性 I/R 引起的肠黏膜形态学损伤(图 1)。根据 Chiu 肠黏膜损伤评分比较发现,I/R 组评分明显升高(3.333 ± 0.516),而加入 FICZ 处理后评分降低(2.167 ± 0.408)。

2.2 小肠上皮通透性的变化

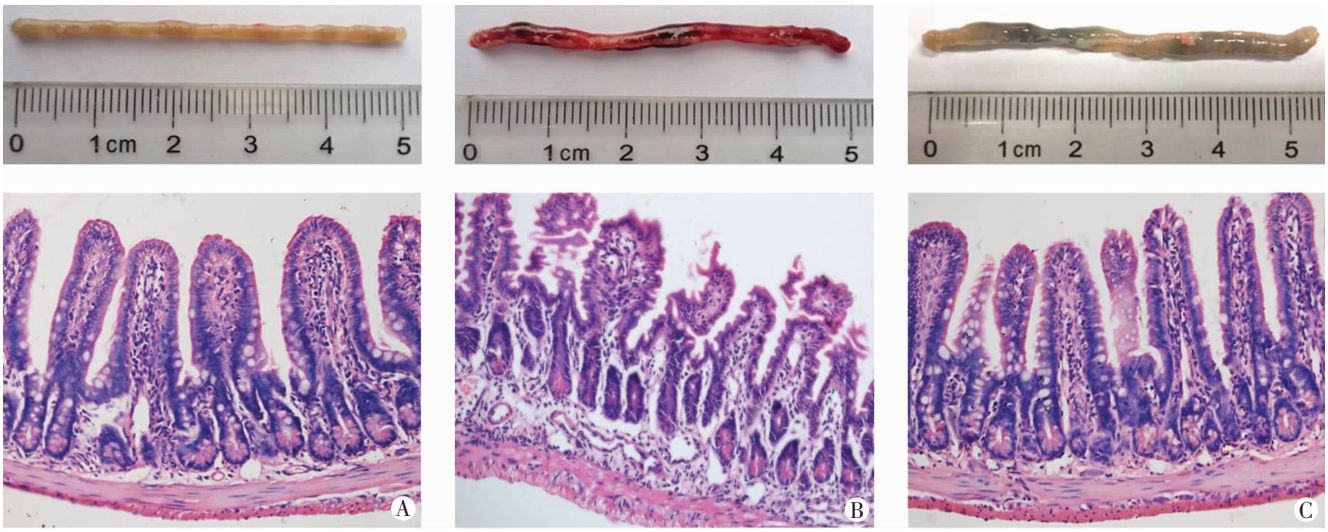
假手术组、I/R 组和 I/R + FICZ 组的 TER 分别为(147.60 ± 15.94)、(87.84 ± 10.87)、(108.60 ± 8.80) cm^2。相比 I/R 组,FICZ 处理组明显缓解了缺血再灌注引起的通透性增加($P < 0.05$)。

2.3 小肠黏膜 AhR 表达与活性

免疫荧光结果显示,与假手术组比较,I/R 组小肠绒毛中 AhR 表达略有下降,I/R + FICZ 组表达有所增加(图 2);Western blot 和 RT-PCR 结果显示,I/R 组 CYP1A1 蛋白(0.565 ± 0.081)和 mRNA(0.054 ± 0.066)水平均有所降低,提示 AhR 活性下降;加入 AhR 内源性激动剂 FICZ 后 CYP1A1 蛋白(6.702 ± 1.978)与 mRNA(17.210 ± 4.609)水平明显升高,说明 AhR 的活性得到显著提高(图 3)。与假手术组比较,I/R 组小肠绒毛中 AhR 表达略有下降,FICZ 处理后表达有所增加。

2.4 紧密连接蛋白 ZO-1 在肠黏膜中的表达变化

荧光免疫检测结果显示:紧密连接蛋白 ZO-1 沿着肠绒毛表面线性分布,荧光呈红色,胞浆、细胞核内未见表达。Sham 组荧光连续,均匀分布;I/R 组荧光明显弱化,表达分散,连续性受到破坏;而 I/R + FICZ 组有明显改善(图 4)。Western blot 结果显示,与假手术组相比,I/R 组 ZO-1 蛋白表达(0.338 ± 0.089)下降,而 FICZ 干预后蛋白水平(0.567 ± 0.066)得到恢复(图 5)。



A:假手术组;B:I/R 组;C:I/R + FICZ 组

图 1 各组小鼠小肠组织病理变化 (HE ×200)

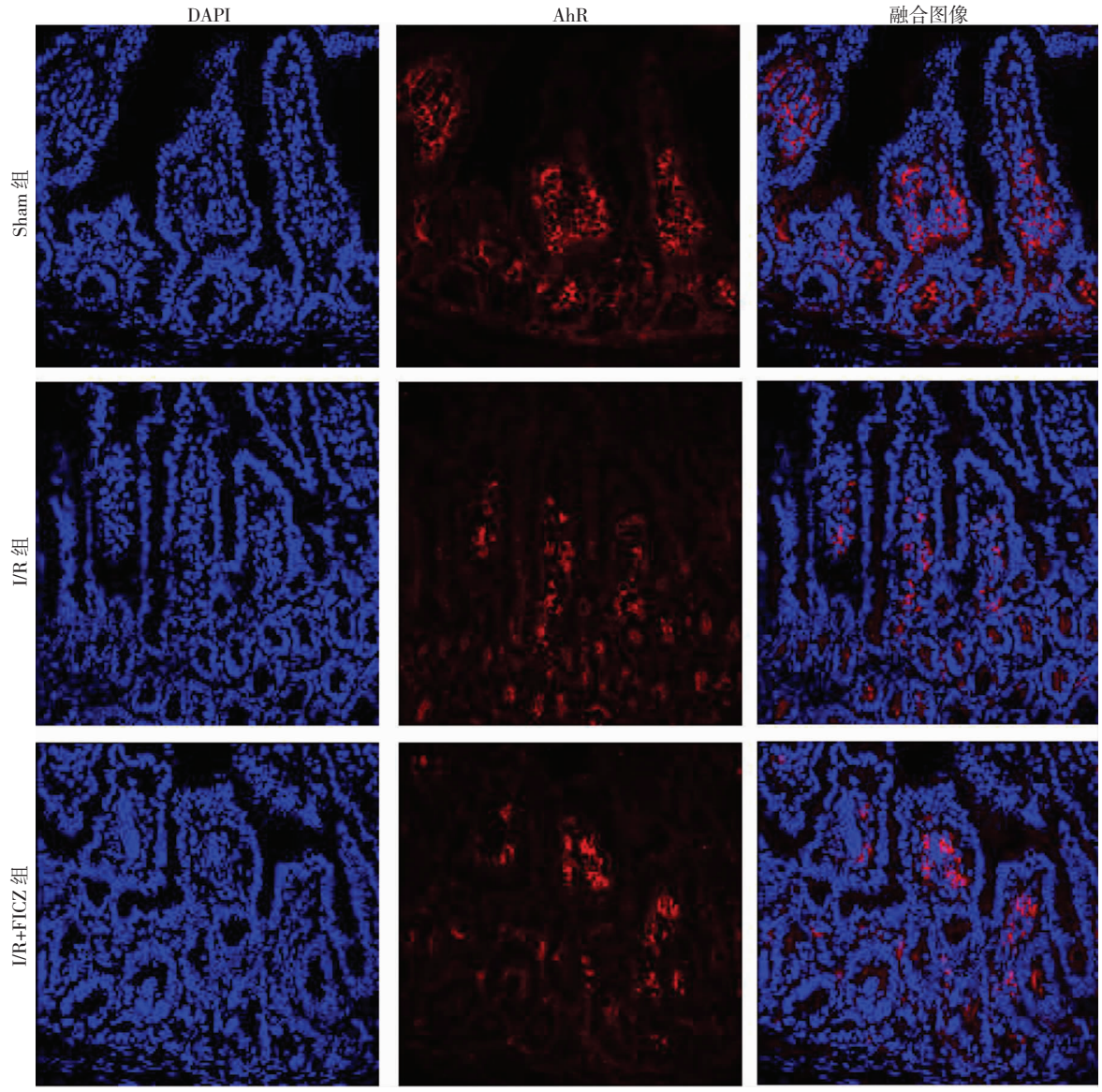
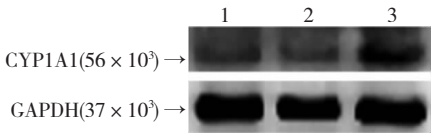


图 2　免疫荧光检测各组小鼠小肠黏膜 AhR 表达情况　(×400)



1:假手术组;2:I/R 组;3:I/R + FICZ 组

图 3　Western blot 检测各组小鼠小肠黏膜 CYP1A1 蛋白表达

3　讨论

正常肠黏膜屏障是由机械屏障、免疫屏障、化学屏障与生物屏障共同构成的复杂屏障系,参与抵御肠道细菌入侵,调控肠道内物质运输,维持机体内环境稳态。其中,机械屏障由完整紧密排列的肠上皮细胞和细胞间的紧密连接共同构成。然而,各种急慢性病理条件下,肠黏膜结构遭到破坏,屏障功能受损,引起肠道细菌转位,继发肠源性感染,诱发全身炎症反应综合征,严重时可导致多器官功能衰竭,危及患者生命[1,8-9]。

AhR 是多环芳香烃类物质的重要代谢产物,在人体内分布广泛,表达水平非常低。近来研究发现,AhR 是一种依赖配体激活的转录因子。在未与配体结合时,AhR 与热休克蛋白 90(90 kDa heat shock protein, HSP90)、磷蛋白 P23 等多种蛋白结合均可形成受体复合物。一旦与其配体结合,会以配体依赖的方式进入细胞核,与 AhR 核转位子(AhR nuclear translocator, ARNT)形成异源二聚体,特异性结合于 AhR 反应元件(AhR-responsive elements, AhREs),诱导包括外源性代谢酶(Xenobiotic-Metabolizing Enzyme, XME)在内的一系列下游目的基因表达[3-4]。FICZ 是 AhR 最常见的内源性配体,在实验研究中作为强效激动剂被广

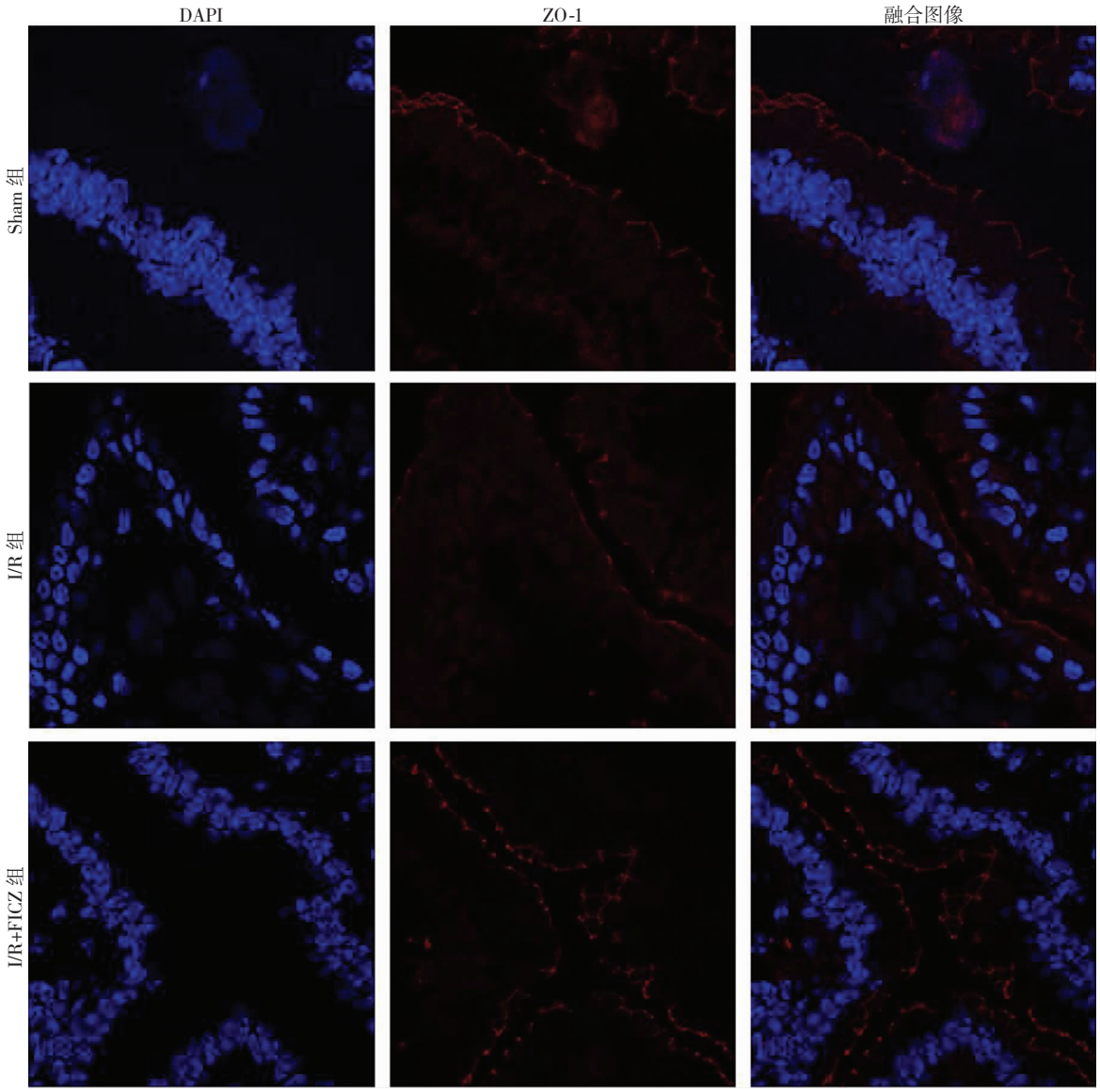
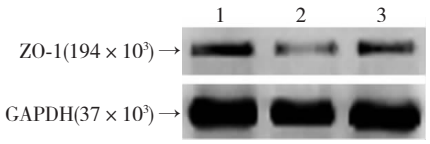


图 4　免疫荧光检测各组小鼠小肠黏膜 ZO-1 表达和分布情况　（×1200）



1:假手术组;2:I/R 组;3:I/R + FICZ 组

图 5　Western blot 检测各组小鼠小肠黏膜 ZO-1 蛋白表达

泛使用[10]。有研究表明,在各种病理模型中,AhR 参与肠道免疫,调控炎症反应,保护肠黏膜屏障。Furumatsu 等[11]研究发现,在 IBD 患者肠黏膜中,AhR 表达水平与对照组相比明显下降;同时给予 IBD 动物 AhR 激动剂可明显缓解肠道炎症症状,IFN-γ、TNF-α 等炎性细胞因子表达明显下降。然而 AhR 活化在 I/R 模型中对肠黏膜屏障的影响目前尚不十分清楚。

本实验发现,FICZ 活化 AhR 可以通过上调紧密连接蛋白 ZO-1 表达和维持其上皮细胞间分布来减轻小鼠在中对肠屏障的损伤作用。肠急性 I/R 机制是各种原因引起的肠急性缺血对机体造成明显损害,而再灌注后损伤在原有的基础上加重,导致再灌注损伤[12]。实验中,我们首先通过 HE 染色、组织学评分以及通透性检测明确了肠急性 I/R 的损伤,在此基础上加入 FICZ 后,肠道结构与功能损伤得到明显改善。文献[13]报道,细胞色素 P450 1A1(Cytochrome P450 1A1, CYP1A1)属重要的 I 相解毒酶,是 AhR 调控的直接靶基因,通常通过检测 CYP1A1 的蛋白与 mRNA 表达来反映 AhR 活性的高低。因此,实验运用 Western blot 和 RT-PCR 检测 CYP1A1 的表达,用以评估 AhR 的活性。结果显示,肠急性 I/R 条件下,

CYP1A1 表达下降,说明 AhR 活性降低;而在此基础上给予 FICZ 处理后 CYP1A1 表达升高,提示 AhR 活性增加。这表明激动剂 FICZ 在肠急性 I/R 下,可明显上调 AhR 的活性,确实起到激动作用。另文献证实,作为紧密连接蛋白主要成员,ZO-1 参与构成紧密连接,直接调节肠黏膜细胞间通透性,影响肠道菌群位移及物质运输[14]。我们发现,I/R 损伤条件下,ZO-1 表达下降,荧光显示其连续性断裂;给予 FICZ 预处理后,ZO-1 表达得以恢复,荧光下连续性得到维持。表明 FICZ 活化 AhR 可能参与调控紧密连接蛋白表达与分布,改善肠黏膜屏障通透性,从而起到保护作用。文献[15-16]报道,在缺氧 caco-2 细胞中,MLCK-pMLC 信号通路受到激活,降低了 ZO-1 的表达,并引起 ZO-1 的重新分布,继而损伤细胞屏障功能。据此,我们考虑 MLCK-pMLC 信号通路的抑制是否就是肠急性 I/R 条件下 AhR 活化维持 ZO-1 表达与分布的潜在作用机制,但尚需进一步验证。综上所述,小鼠肠急性 I/R 模型中 AhR 的活化能有效的缓解小鼠 IEB 功能损伤,而紧密连接蛋白 ZO-1 表达和分布的维系是保护机制的重要作用点。同时本实验结论为 AhR 激动剂 FICZ 在未来防治肠急性 I/R 损伤提供较可靠的理论依据。

参考文献:

[1] Liu C, Liu Y, Shen Z, *et al*. Sevoflurane Preconditioning Reduces Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury: Role of Protein Kinase C and Mitochondrial ATP-Sensitive Potassium Channel[J]. PLoS One, 2015, 10(10):e0141426. DOI: 10.1371/journal.pone.0141426

[2] Ashida H, Ogawa M, Kim M, *et al*. Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier[J]. Nat Chem Biol, 2011, 8(1): 36-45. DOI:10.1038/nchembio.741

[3] Wincent E, Bengtsson J, Mohammadi-Bardbori A, *et al*. Inhibition of cytochrome P4501-dependent clearance of the endogenous agonist FICZ as a mechanism for activation of the aryl hydrocarbon receptor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(12): 4479-4484. DOI: 10.1073/pnas.1118467109

[4] Kiss E A, Vonarbourg C, Kopfmann S, *et al*. Natural aryl hydrocarbon receptor ligands control organogenesis of intestinal lymphoid follicles[J]. Science, 2011, 334(6062): 1561-1565. DOI:10.1126/science.1214914

[5] Monteleone I, Rizzo A, Sarra M, *et al*. Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract[J]. Gastroenterology, 2011, 141(1): 237-248, 248.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2011.04.007

[6] Generoso S V, Viana M L, Santos R G, *et al*. Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed Saccharomyces boulardii[J]. Eur J Nutr, 2011, 50(4): 261-269. DOI: 10.1007/s00394-010-0134-7

[7] Yang H, Finaly R, Teitelbaum D H. Alteration in epithelial permeability and ion transport in a mouse model of total parenteral nutrition[J]. Crit Care Med, 2003, 31(4): 1118-1125. DOI:10.1016/0039-6028(94)00761-6

[8] 许超, 彭柯, 王文生, 等. 甘露糖结合凝集素对肠上皮细胞屏障功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(11): 1091-1095. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201501120

[9] 彭柯, 许超, 于敏, 等. S-亚硝基谷胱甘肽对小鼠肠急性缺血再灌注损伤后肠屏障功能的影响[J]. 重庆医学, 2015, 44(6):724-726. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8348.2015.06.002

[10] 范恒, 徐萌, 唐庆. 芳香烃受体及其配体调节溃疡性结肠炎 Th17/Treg 细胞分化的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(19): 3101-3108. DOI: 10.11569/wcjd.v23.i19.3101

[11] Furumatsu K, Nishiumi S, Kawano Y, *et al*. A role of the aryl hydrocarbon receptor in attenuation of colitis[J]. Dig Dis Sci, 2011, 56(9): 2532-2544. DOI: 10.1007/s10620-011-1643-9

[12] Xiao W, Wang W, Chen W, *et al*. GDNF is involved in the barrier-inducing effect of enteric glial cells on intestinal epithelial cells under acute ischemia reperfusion stimulation[J]. Mol Neurobiol, 2014, 50(2): 274-289. DOI: 10.1007/s12035-014-8730-9

[13] 刘娟, 任慕兰. 二恶英对小鼠模型异位子宫内膜异位症的影响[J]. 中国妇幼健康研究,2009, 20(2): 161-163. DOI:10.3969/j.issn.1673-5293.2009.02.018

[14] Chen C, Wang P, Su Q, *et al*. Myosin light chain kinase mediates intestinal barrier disruption following burn injury[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e34946. DOI: 10.1371/journal.pone.0034946

[15] Qi H, Wang P, Liu C, *et al*. Involvement of HIF-1α in MLCK-dependent endothelial barrier dysfunction in hypoxia[J]. Cell Physiol Biochem, 2011, 27(3/4): 251-262. DOI:10.1159/000327951

[16] 曹敏, 黄家君. 小檗碱减轻炎症反应时肠上皮屏障功能损害的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(5): 447-450.

(**收稿**:2015-11-23;**修回**:2015-12-24)

(编辑 龙 亮)