doi:10.11659/jjssx.12E015197

肾上腺髓质素对肠上皮细胞缺氧/复氧损伤后屏障功能的影响

田 铸[1],周维均[2],苟亚军[1] (1.第三军医大学西南医院急救部,重庆 400038;2.解放军 77113 部队卫生队,四川 成都 610000)

[摘 要] **目的** 研究肾上腺髓质素(AM)在缺氧/复氧(H/R)条件下对肠上皮细胞屏障功能的影响,对其机制进行了初步探讨。**方法** 建立单层肠上皮 Caco-2 细胞缺氧/复氧损伤模型,实验分为 3 组:正常细胞培养(N)组、缺氧/复氧损伤模型(H/R)组、缺氧/复氧损伤 + 肾上腺髓质素(H/R + AM)组。检测跨上皮细胞电阻(TEER)值,使用激光共聚焦显微镜观察紧密连接的变化,Western blot 方法检测细胞紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 的表达及核因子-κB(NF-κBp65)蛋白表达水平。**结果** 与 H/R 组相比,H/R + AM 组的紧密连接破坏明显减少;N 组,H/R 组和 H/R + AM 组的 TEER 值分别为(157.68 ± 5.54)、(96.06 ± 3.42)、(134.56 ± 4.72)Ohm/cm^2, H/R + AM 组较 H/R 组升高了 40.00%(P < 0.05)。N 组,H/R 组和 H/R + AM 组的 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达量分别为(0.43 ± 0.03)和(0.27 ± 0.04)、(0.20 ± 0.03)和(0.15 ± 0.07)、(0.32 ± 0.15)和(0.21 ± 0.03),H/R + AM 组的 Occludin 和 ZO-1 蛋白表达量较H/R 组分别升高 60.00% 、40.00%(P < 0.05),N 组、H/R 组、H/R + AM 组的 NF-κBp65 蛋白表达量分别为(0.53 ± 0.30)、(2.89 ± 0.16)、(1.75 ± 0.25),H/R + AM 组的 NF-κBp65 蛋白表达量较 H/R 组降低了 40.00%。**结论** AM 可通过减少 H/R 损伤诱导的紧密连接的破坏来保护肠上皮屏障,其机制可能与抑制 NF-κB 信号通路有关。

[关键词] 肾上腺髓质素;缺氧/复氧;肠上皮屏障;紧密连接蛋白

[中图分类号] R333.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2015-12-25

Effect of adrenomedullin on intestinal epithelial barrier function under hypoxia/reoxygenation injury and possible mechanism

TIAN Zhu[1], ZHOU Wei-jun[2], GOU Ya-jun[1] (1. Emergency Department, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2. 77113 Medical Team of Liberation Army, Chengdu Sichuan 610000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of adrenomedullin on epithelial barrier function of Caco-2 cells under hypoxia/reoxygenation injury and the molecular mechanism. **Methods** Build hypoxia/reoxygenation injury model, Caco-2 cells were randomly divided into three groups: normal control group(N), hypoxia/reoxygenation group(H/R) and hypoxia/reoxygenation plus 1 μmol/L adrenomedullin

[通信作者] 苟亚军,E-mail:runnerupgou@163.com

[4] Zhao X, Das AV, Thoreson WB, et al. Adult corneal limbal epithelium: a model for studying neural potential of non-neural stem cells/progenitors [J]. Dev Biol, 2002, 250(2): 317 – 331.

[5] Ahmad I, Das AV, James J, et al. Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation[J]. Semin Cell Dev Biol, 2004, 15(1): 53 – 62.

[6] Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(6): 3156 – 3161.

[7] Lyngholm M, Hϕyer PE, Vorum H, et al. Immunohistochemical markers for corneal stem cells in the early developing human eye[J]. Exp Eye Res, 2008, 87(2): 115 – 121.

[8] Ostadsharif M, Ghaedi K, Hossein Nasr-Esfahani M, et al. The expression of peroxisomal protein transcripts increased by retinoic acid during neural differentiation[J]. Differentiation, 2011, 81(2): 127 – 132. doi: 10.1016/j.exer.2008.05.004.

[9] Hatou S, Yoshida S, Higa K, et al. Functional corneal endothelium derived from corneal stroma stem cells of neural crest origin by retinoic acid and Wnt/β-catenin signaling[J]. Stem Cells Dev, 2012, 22(5): 828 – 839. doi: 10.1089/scd.2012.0286.

[10] Gong M, Bi Y, Jiang W, et al. Retinoic acid receptor beta mediates all-trans retinoic acid facilitation of mesenchymal stem cells neuronal differentiation[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(4): 866 – 875. doi: 10.1016/j.biocel.2013.01.002.

[11] Xu J, Wang H, Liang T, et al. Retinoic acid promotes neural conversion of mouse embryonic stem cells in adherent monoculture[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(2): 789 – 795. doi: 10.1007/s11033 – 011 – 0800 – 8.

[12] Okada Y, Shimazaki T, Sobue G, et al. Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells[J]. Dev Biol, 2004, 275(1): 124 – 142.

[13] Sabado V, Barraud P, Baker CV, et al. Specification of GnRH-1 neurons by antagonistic FGF and retinoic acid signaling[J]. Dev Biol, 2012, 362(2): 254 – 262. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.12.016.

[14] Fatimah SS, Tan GC, Chua KH, et al. Effects of epidermal growth factor on the proliferation and cell cycle regulation of cultured human amnion epithelial cells[J]. J Biosci Bioeng, 2012, 114(2): 220 – 227. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.03.021.

[15] Delcroix GJ, Curtis KM, Schiller PC, et al. EGF and bFGF pre-treatment enhances neural specification and the response to neuronal commitment of MIAMI cells[J]. Differentiation, 2010, 80(4-5): 213 – 227. doi: 10.1016/j.diff.2010.07.001.

(编辑:杨 颖)

group(H/R + AM). Transepithelial electrical resistance(TEER) was determined, and the laser confocal microscope was used to detect the construction of tight junction. The protein expressions of tight junction proteins (Occludin and ZO-1) and nuclear factor kappa B(NF-κBp65) were examined by using western blotting. **Results** Pretreatment of AM significantly attenuated the disruption of morphological structure of tight junction caused by H/R. The TEER of N group, H/R group and H/R + AM group were(157.68 ± 5.54),(96.06 ± 3.42),(134.56 ± 4.72) Ohm/cm^2 respectively. After AM pretreatment, the TEER were significantly raised compared with that in H/R group by 40.00% ($P < 0.05$). The relative protein expressions of Occludin and ZO-1 in N group, H/R group and H/R + AM group were [(0.43 ± 0.03), (0.27 ± 0.04)],[(0.20 ± 0.03),(0.15 ± 0.07)],[(0.32 ± 0.15),(0.21 ± 0.03)] respectively. After AM pretreatment, the protein expression of Occludin and ZO-1 were significantly raised compared with that in H/R group(by 60.00% and 40.00%). Simultaneously, the relative protein expressions of NF-κBp65 in N group, H/R group and H/R + AM group were (0.53 ± 0.30),(2.89 ± 0.16),(1.75 ± 0.25) respectively. And H/R induced NF-κBp65 activation was significantly inhibited by AM treatment (decreased as compared with H/R group by 40.00%). **Conclusion** AM can attenuate intestinal epithelial barrier dysfunction by regulating the expression of intestinal tight junction proteins. The inhibition of NF-κB activation may be involved in this mechanism.

Keywords: adrenomedullin; hypoxia reoxygenation; intestinal epithelial barrier; tight junction

肠上皮细胞最重要的功能之一就是形成机械屏障,抵御肠腔内的病原体、毒素以及抗原进入血液,细胞与细胞之间蛋白复合物特别是紧密连接在该屏障中发挥着重要作用[1],当紧密连接异常时,肠黏膜屏障功能将受到严重破坏。肾上腺髓质素(adrenomedullin,AM)是一种由 52 个氨基酸组成的缩氨酸,属于降钙素基因相关肽家族[2],研究表明 AM 在体内外能稳定内皮屏障功能,特别是对血脑屏障有着重要的保护作用[3-4]。也有研究证实,在 α-毒素和过氧化氢处理条件下,AM 可降低肠上皮细胞的通透性,对肠上皮屏障也发挥保护作用[5]。但是有关在缺氧/复氧条件 AM 是否能减轻上皮屏障功能受损的报道目前较少,本实验拟通过建立肠上皮细胞缺氧/复氧(H/R)模型,研究 AM 对紧密连接蛋白的影响,并对其可能作用机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

人肠上皮细胞株 Caco-2 细胞(中国科学院细胞库),缺氧培养箱(日本 Sanyo 公司),FBS 胎牛血清、MEM 培养基(美国 HyClone 公司),胰蛋白酶(美国 Sigma 公司),肾上腺髓质素 AM1-52(美国 GeneScript 公司)人 Occludin、ZO-1 抗体(美国 Santa Cruz 公司),NF-κB p65、组蛋白 H3(HistoneH3)抗体(美国 Abcam 公司),辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗、RIPA 裂解液、蛋白测定试剂盒、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配置试剂盒(武汉博士德公司),凝胶图像分析系统(美国 Kodak 公司),Millicell-TM 电阻测定仪、Transwell 小室、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国 Millipore 公司),垂直电泳仪、湿转电转仪(美国 Bio-Rad 公司),Cy3 荧光二抗(美国 Abcam 公司)。

1.2 Caco-2 细胞的培养

Caco-2 细胞在 37 ℃、5% CO_2 和 90% 相对湿度的 CO_2 培养箱中培养,所用 MEM 培养基需添加 20% 胎牛血清、1% 双抗、1% 非必须氨基酸,2 ~ 3 d 换 1 次液,培养 5 ~ 8 d。Caco-2 细胞接种于 6 孔培养板内,供 Western blot 分析;接种于 Millicell 聚碳酸酯膜(4.52 cm, 0.4 μm),供跨上皮电阻值(transepithelial electrical resistance,TEER)的检测。

1.3 H/R 损伤模型的建立及其分组

取生长融合达 80% ~90% 的 Caco-2 细胞,随机分成 3 组:正常细胞培养(N)组、缺氧/复氧损伤模型(H/R)组、缺氧/复氧损伤 + 肾上腺髓质素(H/R + AM)组。H/R + AM 组细胞在 H/R 前 1 h 用 1 μmol/L 的 AM1-52 进行预处理。将细胞置于 37 ℃缺氧培养箱中,通入 1% O_2,5% CO_2 及 94% N_2 的混合气体培养 6 h,取出置于正常培养箱中孵育 2 h。

1.4 Western blot 检测

将刮取得到的 Caco-2 细胞加入细胞裂解液提取蛋白(NF-κB 活化的检测则需要在冰上进行核蛋白的提取),用蛋白测定试剂盒测定蛋白质浓度。取样品蛋白 50 μg 上样,用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质,湿转移法将蛋白条带转移至 PVDF 膜。再用 50 g/L 的脱脂奶粉封闭 1 h,加入兔抗人 Occludin、ZO-1 抗体(1∶500 稀释),兔抗人 NF-κB-p65 抗体(1∶300 稀释)、组蛋白 H3 抗体(1∶500 稀释),4 ℃冰箱过夜,加入羊抗兔二抗(1∶5 000 稀释)后室温孵育 1 h,加入 ECL 化学发光液显色。经 Kodak Molecular Imaging 软件进行密度分析,以目的蛋白与甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)/或组蛋白 H3 灰度比值作为相应蛋白的表达值。

1.5 免疫荧光检测

将 Caco-2 细胞接种到盖玻片上,待生长融合达 80% ~90%,进行缺氧/复氧处理,取出盖玻片,40 g/L 多聚甲醛固定 15 min,加入 5 g/L TritonX-100 处理 10 min,10% 小牛血清清蛋白室温封闭 1 h,加入兔抗人 Occludin、ZO-1 一抗(1∶100 稀释),4 ℃冰箱过夜,

加入 Cy3、FITC 标记二抗(1∶200)室温孵育 1 h,甘油封片,激光共聚焦显微镜下观察。

1.6 TEER 值测定

用 MillicellTM 电阻测定仪测定 Caco-2 细胞单层的 TEER 值。TEER 可反映肠黏膜屏障通透性的高低,两者在一定范围内呈负相关的关系。按照公式:rcellmonolayer = rsample-rblank,其结果以实际数值减去空白对照(transwell 小室内未接种细胞)的数值表示。

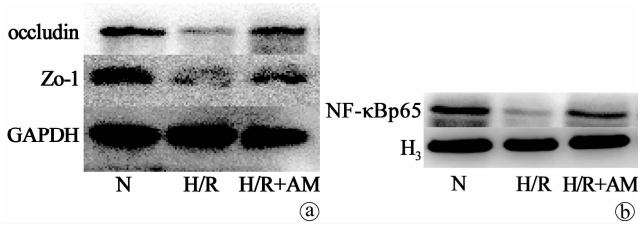
1.7 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件包分析,数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析进行组间比较,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Occludin、ZO-1 以及 NF-κBp65 蛋白水平的变化

采用 Western blot 检测 N 组、H/R 组及 H/R + AM 组的紧密连接蛋白表达以及 NF-κB 的激活情况(图 1)。缺氧/复氧处理后,肠上皮细胞中 Occludin、ZO-1 均较对照组降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。H/R + AM 组 Occludin、ZO-1 与 H/R 组比较,分别升高了 60.00%、40.00%,差异有统计学意义($P<0.05$)。缺氧/复氧处理后,肠上皮细胞中 NF-κBp65 较对照组升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。H/R + AM 处理后 NF-κBp65 与 H/R 组比较,降低了 40.00%,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1(每组 2 个样本,重复 3 次)。



a:Occludin、ZO-1 蛋白的表达;b:NF-κBp65 蛋白的表达

图 1 Western blot 检测结果

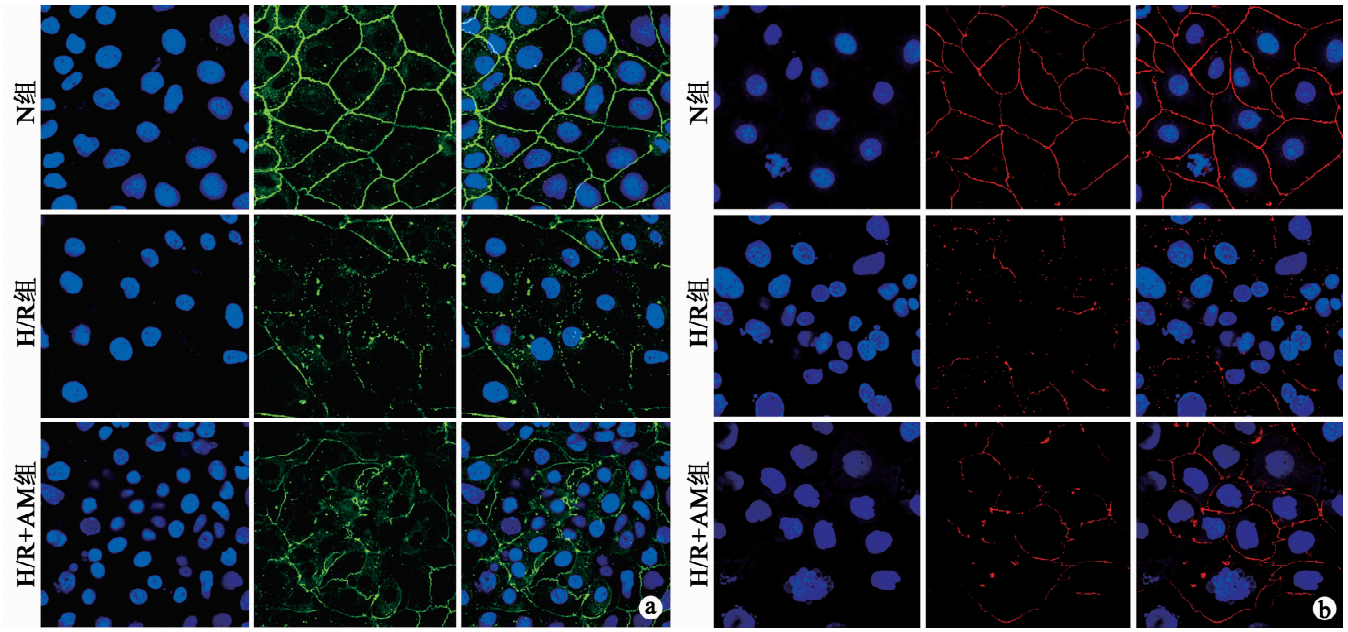
表 1 蛋白相对灰度值

组别	Occludin	ZO-1	NF-κBp65
N 组	0.43 ± 0.03	0.27 ± 0.04	0.53 ± 0.30
H/R 组	0.20 ± 0.03 *	0.15 ± 0.07 *	2.89 ± 0.16 *
H/R + AM 组	0.32 ± 0.15#	0.21 ± 0.03#	1.75 ± 0.25#

*:与 N 组比较,$P<0.05$;#:与 H/R 组比较,$P<0.05$

2.2 激光共聚焦显微镜检测紧密连接变化

免疫荧光结果显示,N 组紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 是沿细胞膜分布的,且呈蜂窝状线性荧光,荧光信号较强。H/R 处理后,Occludin、ZO-1 蛋白的连续性中断,荧光信号明显减弱。与 H/R 组相比较,H/R + AM 组的荧光信号在一定程度上增强,紧密连接的结构破坏明显得以改善(图 2)。



a:Occludin 蛋白免疫荧光染色结果;b:ZO-1 蛋白免疫荧光染色结果

图 2 免疫荧光结果(×800)

2.3 肠上皮细胞 TEER 值的变化

用 MillicellTM 电阻测定仪测得 N 组、H/R 组、H/R + AM组的 TEER 值分别为(157.68 ± 5.54)、(96.06 ± 3.42)、(134.56 ± 4.72)Ohm/cm^2。肠上皮细胞缺氧/复氧后,TEER 值较 N 组降低 39.00%($P<0.05$),经 AM 预处理后,H/R + AM 组的 TEER 值较 H/R 组明显回升约 40%,但仍低于 N 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

肠上皮屏障的完整性有赖于肠上皮细胞表达的各种缝隙连接分子,分别包括紧密连接(ZO-1、occludin、JAM)、粘附连接(β-catenin、E-cadherin)以及细胞桥粒(desmoglein-2)。多种病理情况下会伴随不同程度的肠黏膜局部缺氧或复氧过程,从而引起肠黏膜屏障破坏,肠道通透性增加,肠内有害物质进入血液,进一步发生全身炎症反应(SIRS),甚至发展为多器官功能衰竭综合征(MODS),危及患者生命。

AM 是一种由 52 个氨基酸组成的多肽,最早从人的嗜铬细胞瘤中分离发现,属于降钙素肽类家族[6]。它广泛分布于组织细胞中,虽然最开始被认为是一种血管活性肽类物质,但是目前大量研究证实 AM 远不止具有血管活性的作用。缺氧条件可刺激 AM 的分泌,然后通过自分泌或旁分泌的形式发挥其作用[7]。大量研究表明,AM 与内皮屏障功能的关系密切,如通过调节紧密连接蛋白 Claudin-5 的表达来改善血脑屏障功能[8-10]。Ashizuka 等[11]发现在 DSS 诱导的肠炎模型里,AM 可通过调节紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 的表达,稳定肠黏膜屏障。Yi 等[12]也进一步证实了在大鼠的结肠炎模型中,AM 可通过下调 p-MLC(磷酸化的肌球蛋白轻链)的表达来保护肠屏障功能;本实验结果表明,在缺氧/复氧条件下,AM 可上调紧密连接蛋白的表达,使肠上皮细胞的 TEER 值明显增高,从而减轻了肠上皮屏障功能的破坏。

但是关于 AM 如何保护肠上皮屏障的作用机制尚不明确。在内皮屏障功能方面,大量研究证实 AM 稳定内皮屏障功能的机制与腺苷酸环化酶和 PKA 的激活有直接联系,即 cAMP/PKA 信号通路;更有直接证据表明,细胞内增加的 cAMP 可上调紧密连接蛋白 Claudin-5 的表达,发挥其保护作用[13]。因此,cAMP/PKA 信号通路被认为是 AM 调节血脑屏障中内皮屏障功能最重要的机制之一。然而,在肠上皮屏障功能方面,有研究发现在 Caco-2 细胞中含有大量的磷酸二酯酶(PDE),而 cAMP 主要通过 PDE 而被降解,因此 AM 不能促使 cAMP 在肠上皮细胞中的蓄积,即使加用 PDE 抑制剂或 cAMP 激动剂也未增加 AM 对上皮屏障的保护作用[5]。因此,AM 保护肠上皮屏障的作用机制并非依赖 cAMP/PKA 信号通路。

核转录因子-κB(NF-κB)在免疫调节和炎症反应中扮演重要角色。研究表明,皮肤上皮细胞(HaCaTs)在 AM 作用下分泌的白介素-6(IL-6)可被 NF-κB 抑制剂 SN-50 阻断[14],即 AM 可激活 NF-κB 信号;而 Yang 等[15]发现,IFN-γ 可通过 NF-κB 信号途径引起紧密连接蛋白的表达降低,同时导致 TEER 值也降低,NF-κB 抑制剂 PDTC 能显著改善肠上皮屏障的破坏。表明 AM 可显著改善 H/R 诱导的肠上皮屏障功能破坏,具有明显的保护作用,其机制很可能与抑制 NF-κB 的激活有关。

[参考文献]

[1] Suzuki T,Yoshinaga N,Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium[J]. J Biol Chem,2011,286(36):31263 - 31271. doi:10.1074/jbc.M111.238147.

[2] Hinson JP,Kapas S,Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide[J]. Endocr Rev,2000,21(2):138 - 167.

[3] Brell B,Temmesfeld-Wollbruck B,Altzschner I,et al. Adrenomedullin reduces Staphylococcus aureus alpha-toxin-induced rat ileum microcirculatory damage[J]. Crit Care Med,2005,33(4):819 - 826.

[4] Hippenstiel S,Witzenrath M,Schmeck B,et al. Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability[J]. Circ Res,2002,91(7):618 - 625.

[5] Temmesfeld-Wollbruck B,Brell B,zu Dohna C,et al. Adrenomedullin reduces intestinal epithelial permeability in vivo and in vitro[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2009,297(1):G43 - 51. doi:10.1152/ajpgi.90532.2008.

[6] 吴 梦,谭颖徽. 降钙素家族中的肽和受体在骨代谢调节中的角色[J]. 局解手术学杂志,2010,19(6):545 - 547. doi:10.3969/j.issn.1672 - 5042.2010.06.057.

[7] Hofbauer KH,Jensen BL,Kurtz A,et al. Tissue hypoxygenation activates the adrenomedullin system in vivo[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,2000,278(2):R513 - 519.

[8] Kis B,Deli MA,Kobayashi H,et al. Adrenomedullin regulates blood-brain barrier functions in vitro[J]. Neuroreport,2001,12(18):4139 - 4142.

[9] Honda M,Nakagawa S,Hayashi K,et al. Adrenomedullin improves the blood-brain barrier function through the expression of claudin-5[J]. Cell Mol Neurobiol,2006,26(2):109 - 118.

[10] Temmesfeld-Wollbruck B,Hocke AC,Suttorp N,et al. Adrenomedullin and endothelial barrier function[J]. Thromb Haemost,2007,98(5):944 - 951.

[11] Ashizuka S,Inagaki-Ohara K,Kuwasako K,et al. Adrenomedullin treatment reduces intestinal inflammation and maintains epithelial barrier function in mice administered dextran sulphate sodium[J]. Microbiol Immunol,2009,53(10):573 - 581. doi:10.1111/j.1348 - 0421.2009.00159.x.

[12] Yi Z,Fan H,Liu X,et al. Adrenomedullin improves intestinal epithelial barrier function by downregulating myosin light chain phosphorylation in ulcerative colitis rats[J]. Mol Med Rep,2015,12(3):3615 - 3620. doi:10.3892/mmr.2015.3887.

[13] Kis B,Chen L,Ueta Y,et al. Autocrine peptide mediators of cerebral endothelial cells and their role in the regulation of blood-brain barrier[J]. Peptides,2006,27(1):211 - 222.

[14] Pleguezuelos O,Hagi-Pavli E,Crowther G,et al. Adrenomedullin signals through NF-kappaB in epithelial cells[J]. FEBS Lett,2004,577(1-2):249 - 254.

[15] Yang S,Yu M,Sun L,et al. Interferon-gamma-induced intestinal epithelial barrier dysfunction by NF-kappaB/HIF-1alpha pathway[J]. J Interferon Cytokine Res,2014,34(3):195 - 203. doi:10.1089/jir.2013.0044.

(编辑:杨 颖)