

扶肾颗粒改善肠上皮细胞屏障损伤的作用机制研究

姜 晨¹, 杨洪涛^{1*}, 耿 芳², 刘睿昕², 忽星歌²

1. 天津中医药大学第一附属医院 肾病科, 天津 300381

2. 天津中医药大学, 天津 301608

摘要: **目的** 探讨扶肾颗粒对脂多糖(LPS)诱导的肠上皮(IEC-6)细胞屏障损伤的保护机制。**方法** IEC-6细胞分为对照组、模型组、扶肾颗粒组、p38MAPK抑制剂组,除对照组外,其余各组加入1 µg/mL LPS,给药组分别加入10%含药血清、10 µmol/L p38MAPK抑制剂(SB203580)。流式细胞仪检测细胞凋亡情况;Transwell法检测细胞屏障通透性、跨膜电阻;Real-time PCR法检测细胞ICAM-1、IL-1β mRNA水平;免疫印迹检测细胞内细胞紧密连接蛋白Occludin、ZO-1和磷酸化p38MAPK、DUSP1蛋白表达的变化。**结果** 与对照组比较,模型组IEC-6细胞凋亡、炎症因子ICAM-1和IL-1β水平显著增加($P < 0.01$),紧密连接蛋白Occludin、ZO-1表达显著降低($P < 0.01$),肠黏膜通透性显著增加($P < 0.05$)。与模型组比较,扶肾颗粒能明显抑制IEC-6细胞内炎症因子ICAM-1、IL-1β mRNA水平,降低肠黏膜屏障通透性($P < 0.05$),上调DUSP1、Occludin、ZO-1水平($P < 0.05, 0.01$),抑制p38MAPK表达($P < 0.01$),与p38MAPK抑制剂作用一致。**结论** 扶肾颗粒可能通过调控DUSP1,抑制p38MAPK信号通路的激活,上调Occludin和ZO-1,改善IEC-6细胞紧密连接,从而改善LPS引起的细胞屏障功能破坏。

关键词: 扶肾颗粒;大鼠肠上皮细胞;肠黏膜屏障;紧密连接;p38MAPK

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)21-5496-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.21.013

Mechanism of Fushen Granule on improving intestinal epithelial barrier injury

JIANG Chen¹, YANG Hong-tao¹, GENG Fang², LIU Rui-xin², HU Xing-ge²

1. Department of Nephrology, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China

2. Tianjin university of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301608, China

Abstract: Objective To investigate the protection mechanism of Fushen Granule on LPS-induced intestinal epithelial cell (IEC-6) barrier injury. **Methods** IEC-6 were divided into control group, model group, Fushen granule group, and p38MAPK inhibitor group. In addition to the control group, 1 µg/mL LPS was added to the other groups, 10% drug-containing serum and 10 µmol/L SB203580 were respectively added to the administration group. The apoptosis of IEC-6 were detected by flow cytometry; The permeability and transmembrane resistance of IEC-6 barrier were detected by Transwell assay; The mRNA levels of ICAM-1 and IL-1β were assessed by Real-time PCR; The expressions of occludin, ZO-1, p38MAPK, and DUSP1 were detected by western blotting. **Results** Compared with the control group, the apoptosis of IEC-6 were significantly increased in model group ($P < 0.01$), the levels of ICAM-1 and IL-1β were significantly increased ($P < 0.01$), the occludin and ZO-1 were significantly decreased ($P < 0.01$), the intestinal permeability was significantly increased ($P < 0.05$), the mRNA levels of ICAM-1 and IL-1β in IEC-6 were significantly inhibited, the permeability of intestinal mucosal barrier was reduced ($P < 0.05$), the expressions of DUSP1, occludin and ZO-1 were increased ($P < 0.05, 0.01$), the expression of p38MAPK was inhibited ($P < 0.01$), which showed a similar effect with p38MAPK inhibitor. **Conclusion** Fushen Granule could regulate DUSP1 which inhibits the activation of p38MAPK signaling pathway, up-regulate Occludin and ZO-1, improve the tight junction of IEC-6, thereby improving the cell barrier function damage caused by LPS.

Key words: Fushen Granule; IEC-6; intestinal barrier; tight junctions; p38MAPK

收稿日期: 2020-03-19

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81673909); 国家自然科学基金青年项目(81302920)

作者简介: 姜 晨(1982—), 女, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为中西医结合治疗肾脏病。

Tel: 18622662919 E-mail: jcdactor_tcm@163.com

*通信作者 杨洪涛(1963—), 男, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为中西医结合治疗肾脏病。

Tel: (022)27986565 E-mail: tjcmhtr@126.com

肠黏膜屏障在人体营养吸收及维持内环境稳态中具有重要作用,肠隐窝上皮细胞(IEC-6)是肠黏膜屏障主要的构成细胞。完整连续的肠黏膜屏障能防御肠道细菌与毒素进入内环境,是获得性免疫系统中重要的一部分^[1]。尿毒症患者由于肾功能下降,尿毒症毒素大量蓄积在肠道,形成微炎症环境,导致肠道黏膜水肿、胃肠道动力不足、免疫力下降、肠黏膜屏障受损,继而肠道功能紊乱。扶肾颗粒由黄芪、鬼箭羽、当归、熟军、仙灵脾、丹参、陈皮、半夏组成,具有健脾益肾、活血化浊之功效,为保护肾功能、改善尿毒症胃肠道功能紊乱的经验复方,临床上广泛应用于慢性肾衰竭治疗。研究证实,扶肾颗粒具有调节免疫、减少糖基化产物、改善尿毒症状态下的肠功能紊乱、改善肠道营养吸收等疗效^[2-5]。扶肾颗粒对肠黏膜屏障的保护机制尚未阐明,本研究基于课题组前期实验结果^[4],以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作用于 IEC-6 细胞,从分子水平考察扶肾颗粒对肠黏膜上皮细胞完整性、通透性的保护作用,以期扶肾颗粒改善尿毒症肠道功能紊乱提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 细胞

IEC-6 细胞购于中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。

1.2 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,体质量(180±20)g,购自北京华阜康生物科技公司,动物合格证号 SCXK(京)2014-0004。

1.3 药品

扶肾颗粒由天津中医药大学第一附属医院药剂科提供。其组方药材黄芪、熟大黄(批号分别为 160101、151001,安国市光明饮片加工厂);陈皮(批号 15081906,安徽协和成药业饮片有限公司);清半夏(批号 G1510081,天津市中药饮片厂有限公司);淫羊藿、鬼箭羽(批号分别为 151102、150901,安国圣山药业有限公司);当归、丹参(批号分别为 150903、160101,安国美津中药材有限公司)。以上中药饮片由天津中医药大学中药学院马琳教授鉴定,均符合《中国药典》2015 年版标准。

1.4 试剂

RPMI 1640 培养基、胎牛血清、青链霉素双抗(Gibco 公司);RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit、Western show 预染蛋白 Marker

(Thermo Scientific 公司);Hot start fluo-PCR mix SYBR Green I、引物(IL-1 β 、ICAM-1、GAPDH)、高灵敏 ECL 发光试剂盒(上海生工生物技术有限公司);山羊抗小鼠 IgG-HRP 二抗(中杉金桥公司); β -actin 鼠抗人单克隆抗体、p38MAPK 兔单克隆抗体、Occludin 兔单克隆抗体、DUSP1 羊抗单克隆抗体、ZO-1 兔抗单克隆抗体(Abcam 公司);0.25% 胰酶、PMSF、高效 RIPA 细胞蛋白提取裂解液、ANNEXIN V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(北京索莱宝生物技术有限公司);Transwell 小室(Corning 公司);MTT 染液、p38MAPK 抑制剂 SB203580、异硫氰酸荧光素右旋糖酐(fluorescein isothiocyanate-dextran, FD4),(Sigma 公司)。

1.5 仪器

9600 型 PCR 仪(ABI 公司);BX51 型倒置荧光显微镜及成像系统(Olympus 公司);DG-III 型电泳仪、Mini-protein tetra electrophoresis system、ChemiDoc XRS 凝胶成像系统、Powerpac Basic 电泳仪、CFX96 型荧光定量 PCR 仪(BIO-RAD 公司);Nanodrop 超微量核酸蛋白测定仪(Thermo 公司);Millicel-ERS 电阻仪(美国 Millipore 公司)。

2 方法

2.1 扶肾颗粒浓缩液制备

扶肾颗粒按组方比例取黄芪 15 g、当归 10 g、淫羊藿 15 g、陈皮 10 g、清半夏 15 g、熟大黄 10 g、丹参 30 g、鬼箭羽 30 g,由天津中医药大学第一附属医院中药房代煎,煎至含生药量 2.02 g/mL 的药液 100 mL,滤过、消毒后无菌装瓶密封,置 4 °C 冰箱保存备用。

2.2 含药血清的提取

将 SPF 级 SD 大鼠随机分为对照组、扶肾颗粒组,每组 15 只。对照组 ig 蒸馏水,扶肾颗粒组 ig 浓缩液(0.1 g/mL),给药体积为 21 mL/kg,1 次/d,连续 1 周。大鼠腹主动脉取血,4 000×g 离心 15 min,吸取血清,于 56 °C 灭活 30 min,置-80 °C 保存备用^[6]。

2.3 IEC-6 细胞的培养、分组

IEC-6 细胞复苏,悬于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,接种于 75 cm² 培养瓶,于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养,当细胞融合度达到 80%时传代。细胞分为对照组、模型组、扶肾颗粒组、p38MAPK 抑制剂组。除对照组外,其余各组加入 LPS(1 μ g/mL);扶肾颗粒组在加入 LPS 前 60 min,

将细胞培养液更换为 10% 含药血清; p38MAPK 抑制剂组在加 LPS 前 60 min, 加入 SB203580 (10 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 60 min 后弃去。各组孵育 24 h 后, IEC-6 细胞用于凋亡检测、RNA 和总蛋白提取。

2.4 IEC-6 细胞凋亡检测

IEC-6 细胞以 PBS 洗涤 2 次, 加入 500 μL 缓冲液、5 μL 膜联蛋白 V-FITC、5 μL 碘化丙锭, 流式细胞仪进样检测。

2.5 Real-time PCR 法检测 IEC-6 细胞 ICAM-1、IL-1 β mRNA 水平

弃去培养液, 加入 PBS 洗涤 2 次, 加入 1 mL Trizol 试剂反复吹打, 将 Trizol 裂解液转移至试管, 室温静置 5 min。加入 0.2 mL 氯仿涡旋 15 s, 室温静置 3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\times g$ 离心 15 min, 取上层水相加入 0.5 mL 异丙醇, 室温静置 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\times g$ 离心 10 min。弃去上清, 加入 1 mL 75% 乙醇涡旋, 4 $^{\circ}\text{C}$ 7 500 $\times g$ 离心 5 min, 弃去上清, 于室温干燥。加入 20 μL RNase-free water 溶解, 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。按照 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行反转录, 将 cDNA 样品稀释 10 倍作为模板, 进行 Real-time PCR 检测, 每个循环于 72 $^{\circ}\text{C}$ 采集荧光, 40 个循环后测定溶解曲线。引物序列如下: IL-1 β 上游为 5'-GCCAACAAGTGG TATTCTCCA-3'、下游为 5'-CCGTCTTTCATCACA CAGGAC-3'; ICAM-1 上游为 5'-TATGGACGCTC ACCTTTAGCA-3'、下游为 5'-CTCCCAGGCATTC TCTTTGA-3'; GAPDH 上游为 5'-CTGACTTCAA CAGCGACACC-3'、下游为 5'-GTGGTCCAGGG GTCTTACTC-3'。

2.6 Transwell 法建立肠细胞屏障模型

IEC-6 细胞以 1×10^5 /孔的密度接种于 Transwell

小室内室, 倒置小室于培养箱中培养 4 h, 小室正置于培养箱中培养 5 d, 每 2 天更换 1 次培养液, 形成双层细胞模型。

2.7 IEC-6 细胞屏障通透性检测

IEC-6 细胞于 Transwell 小室中培养 48 h 后, 通过 Millipore Millicel-ERS 检测细胞跨膜电阻; 加入 0.1 nmol/L FD4 检测细胞通透性, 分别于 0、2、4、8、10、12 h 吸取 Transwell 小室内室和下室培养液, 用荧光酶标仪检测 FD4 浓度, 计算各组 IEC-6 细胞对 FD4 的通透率, 以时间为横坐标, 细胞通透率为纵坐标, 绘制曲线图。

细胞通透率 = (内室浓度 - 下室浓度) / 时间

2.8 免疫印迹法检测 IEC-6 细胞 Occludin、ZO-1、磷酸化 p38MAPK、DUSP1 蛋白表达

IEC-6 细胞以 PBS 洗涤 3 次, 加入 200 μL 含 PMSF 的 RIPA 裂解液, 30 min 后 12 000 $\times g$ 离心 20 min, 吸取上清液, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样本经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转膜, 于 5% 脱脂奶粉封闭 2.5 h, 分别滴加一抗、二抗孵育, 加入 ECL 显影液曝光条带。以 β -actin 作为内参, 通过 Quantity One 软件分析。

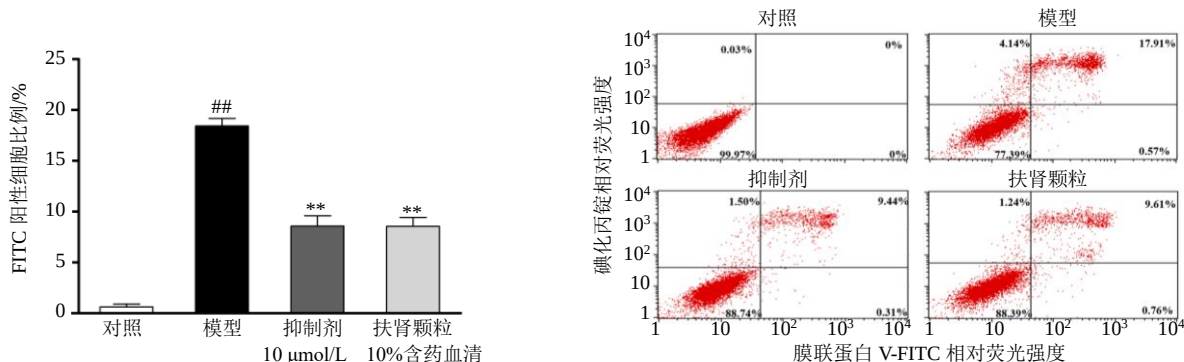
2.9 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件, 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据符合正态分布和方差齐性采用单因素方差分析, 不满足正态分布采用非参数检验。

3 结果

3.1 扶肾颗粒对 LPS 致肠上皮细胞凋亡的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组 IEC-6 细胞凋亡显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, p38MAPK 抑制剂组、扶肾颗粒组 IEC-6 细胞凋亡显著降低 ($P < 0.01$)。



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as belows

图 1 扶肾颗粒对 IEC-6 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 1 Effect of Fushen Granule on apoptosis in IEC-6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

3.2 扶肾颗粒对 IEC-6 细胞 ICAM-1、IL-1 β 表达的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组 ICAM-1、IL-1 β mRNA 水平显著升高 ($P<0.01$),提示 LPS 介导的炎症反应促进 IEC-6 细胞黏附白细胞、炎症细胞,使炎症因子穿透肠黏膜细胞屏障。与模型组比较, p38MAPK 抑制剂组和扶肾颗粒组均可显著抑制 ICAM-1、IL-1 β mRNA 水平 ($P<0.01$),指示扶肾颗粒可减轻 IEC-6 细胞炎症反应。

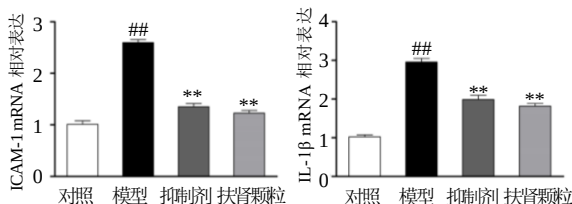


图 2 扶肾颗粒对 IEC-6 细胞 ICAM-1、IL-1 β mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 2 Effect of Fushen Granule on mRNA levels of ICAM-1 and IL-1 β in IEC-6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

3.3 扶肾颗粒对 LPS 致 IEC-6 细胞屏障损伤的影响

如图 3 所示,与对照组比较,模型组 IEC-6 细胞 FD4 通透率显著增加 ($P<0.05$),跨膜电阻显著降低 ($P<0.05$),提示 LPS 导致 IEC-6 细胞屏障受损。与模型组比较, p38MAPK 抑制剂组和扶肾颗粒组显著降低 FD4 通透率 ($P<0.05$),增加跨膜电阻 ($P<0.05$),改善 LPS 导致的 IEC-6 细胞屏障损伤情况。

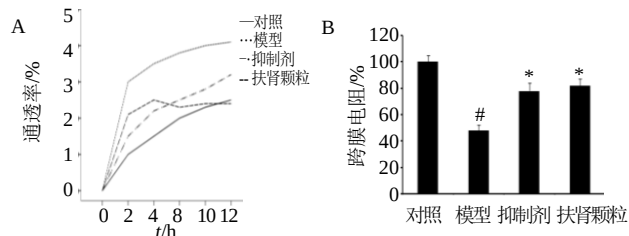


图 3 扶肾颗粒对 IEC-6 细胞屏障通透率 (A) 与跨膜电阻 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 3 Effect of Fushen Granule on cell barrier permeability (A) and transmembrane resistance (B) in IEC-6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

3.4 扶肾颗粒对 IEC-6 细胞 Occludin、ZO-1 蛋白表达的影响

如图 4 所示,与对照组比较,模型组显著下调 Occludin、ZO-1 蛋白表达 ($P<0.01$);与模型组比较, p38MAPK 抑制剂组和扶肾颗粒组显著上调 Occludin、ZO-1 蛋白表达 ($P<0.05$)。

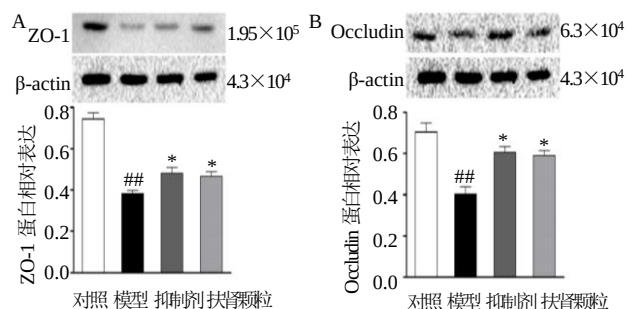


图 4 扶肾颗粒对 IEC-6 细胞 Occludin (A)、ZO-1 (B) 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 4 Effect of Fushen Granule on expressions of Occludin(A) and ZO-1 (B) in IEC-6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

3.5 扶肾颗粒对 IEC-6 细胞胞质内 p-p38MAPK 和 DUSP1 蛋白表达的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组显著上调磷酸化 p38MAPK 蛋白表达 ($P<0.01$),显著下调 DUSP1 蛋白表达 ($P<0.01$);与模型组比较,抑制剂组和扶肾颗粒组磷酸化 p38MAPK 表达明显降低 ($P<0.01$),DUSP1 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$)。

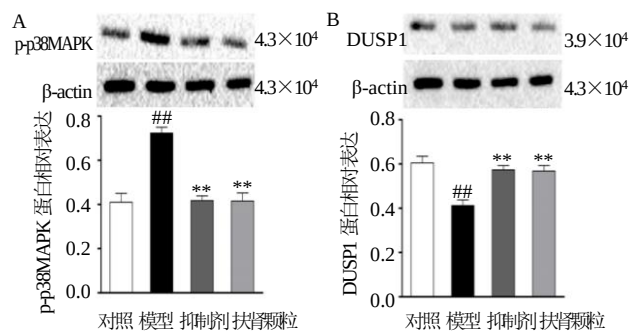


图 5 扶肾颗粒对 IEC-6 细胞磷酸化 p38MAPK (A)、DUSP1 (B) 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 5 Effect of Fushen Granule on expressions of p-p38MAPK (A) and DUSP1 (B) in IEC-6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

4 讨论

肠道功能障碍是尿毒症临床常见并发症,尿毒症毒素和代谢性酸中毒导致肠道微炎症、肠黏膜屏障损伤、肠道功能障碍,患者出现营养不良、毒素蓄积、肠道菌群紊乱等症状,进而发展为全身炎症性反应,加重肾脏病。因此调节肠道功能紊乱是改善尿毒症患者营养状态、提高患者生存质量的有效途径。中医认为尿毒症属于脾肾亏虚、肾阳衰微之“肾衰”,为肾病迁延日久而来,日久瘀血、浊毒蕴结肠腑,导致肠腑不畅,治疗应以扶正驱邪为主。课题组前期研究发现扶肾颗粒可改善肾衰、尿毒症腹膜透析患者的生存质量和肠道功能,并网络药理

学预测出 IL-1 β /p38MAPK 可能是扶肾颗粒的相关作用靶点。因此,本研究以 LPS 刺激 IEC-6 细胞模拟肠黏膜屏障功能损伤,进一步探索扶肾颗粒保护肠黏膜屏障的作用机制。

紧密连接是一种肠黏膜上皮细胞间特殊的结构,由不同功能的蛋白质(如 Occludin、ZO-1 等)组成并包绕在细胞腔侧端,受细胞因子高度调节并影响肠黏膜屏障通透性^[7]。紧密连接可有效阻止肠腔内细菌、毒素、炎性介质等物质的旁细胞转运,维持肠黏膜上皮屏障功能完整,并参与粒子、离子的定向转运和蛋白转运。p38MAPK 是重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶信号转导通路,在细胞分化、凋亡、迁移、增殖中发挥重要作用。尿毒症微炎症环境下,促炎介质、细胞因子激活 p38MAPK 信号通路,增加肠黏膜上皮细胞通透性,导致肠黏膜屏障功能破坏^[8]。研究表明,多器官功能障碍综合征患者中肠上皮细胞 p38MAPK 信号通路活化,上调 iNOS、NO 水平,并影响紧密连接蛋白的表达,从而导致肠道屏障通透性增加^[9]。因此,p38MAPK 通路作为肠黏膜细胞内信号传导经典调控通路,对预防和治疗尿毒症肠道功能紊乱有重要作用。

ICAM-1 是介导黏附反应的重要黏附分子,在稳定细胞间相互作用中起到重要作用^[10]。IL-1 β 是参与组织破坏、水肿形成等的致炎因子之一^[11]。结果表明,LPS 可激活 p38MAPK 信号通路,抑制 Occludin、ZO-1 表达,增加 ICAM-1、IL-1 β 水平,增加肠屏障通透性并减弱跨膜电阻,造成肠黏膜屏障功能损伤;扶肾颗粒可抑制 IEC-6 细胞 ICAM-1、IL-1 β 的表达,降低肠黏膜屏障的通透性,改善肠黏膜屏障功能破坏,并与 p38MAPK 抑制剂作用一致,指示扶肾颗粒肠黏膜屏障的保护作用与抑制 p38MAPK 信号通路活化,继而上调 Occludin、ZO-1 有关。

综上,本研究初步探讨了扶肾颗粒治疗尿毒症肠功能紊乱的作用机制,为扶肾颗粒临床应用提供了一定的实验依据,其上游机制及药物作用靶点将在后期研究中进行深入探讨。

参考文献

- [1] Tsai M H, Jiang M J. Rho-kinase-mediated regulation of receptor-agonist-stimulated smooth muscle contraction [J]. *Pflugers Arch*, 2006, 453(2): 223-232.
- [2] 唐 阁,杨洪涛,林 燕,等.扶肾颗粒改善腹膜超滤功能的分子机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(23): 103-108.
- [3] 姜 晨,杨 波,范淑芳,等.中药干预腹膜透析肠功能障碍的疗效观察 [J]. *天津中医药*, 2014, 31(8): 462-465.
- [4] Jiang C, Lin W, Wang L Y, et al. Fushen Granule, a traditional chinese medicine, ameliorates intestinal mucosal dysfunction in peritoneal dialysis rat model by regulating p38MAPK signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 251: 112501.
- [5] 唐 阁,杨洪涛,林 燕,等.扶肾颗粒通过调节 AGEs 的生成抑制腹膜透析大鼠腹膜纤维化作用机制研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(7): 3052-3055.
- [6] 李仪奎. *中药药理实验方法学*(第二版) [M]. 上海:上海科学技术出版社, 2006.
- [7] Balda M S, Matter k. Tight junctions [J]. *J Cell Sci*, 1998, 111(5): 541-547.
- [8] 张剑彬,甘 华.连续性血液净化治疗患者的血清对体外培养的肠上皮细胞 P38MAPK 信号通路的影响 [J]. *中国血液净化*, 2012, 11(9): 505-509.
- [9] 张剑彬.连续性血液净化治疗对 MODS 患者肠黏膜屏障功能障碍的影响 [D]. 重庆:重庆医科大学, 2010.
- [10] 宋宜慧,黄 熙.细胞间黏附分子-1 与血管生成的研究进展 [J]. *免疫学杂志*, 2012, 23(6): 530-533.
- [11] 李 翔,何跃平,刘 胜,等.幽门螺杆菌经 ROS 通路激活 NLRP3 炎症复合体诱导 THP-1 细胞分泌 IL-1 β 和 IL-18 [J]. *中国免疫学杂志*, 2015, 31(3): 308-313.