

网络出版时间: 2021-3-18 16:17 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210317.1520.006.html>

亮菌多糖对 LPS 诱导的肠上皮细胞 炎性损伤的保护作用及机制探讨

张 梅^{1,2}, 吴 悦^{1,2}, 苏 丽^{1,2}, 朱耀东^{1,2}, 李 平^{1,2}, 王 婷^{1,2}

摘要 目的 观察在脂多糖(LPS)诱导的 IEC-6 肠上皮细胞损伤的情况下,亮菌多糖(ATPS)对细胞活性、闭合素(Occludin)、细胞紧密连接蛋白 1(ZO-1)的影响,并探讨 ATPS 对肠黏膜屏障损伤的保护机制。方法 利用 LPS 构建的 IEC-6 肠上皮细胞体外损伤模型,将细胞随机分为对照组、LPS 组、LPS + ATPS 组、LPS + Matrine 组(阳性对照),使用普通显微镜和 MTT 法观察细胞的活性;免疫荧光和流式细胞术检测细胞的凋亡情况;Western blot 检测膜蛋白 ZO-1 和跨膜蛋白 Occludin 的表达水平。同时 Western blot 检测与介导细胞凋亡密切相关的内质网应激(ERS)通路磷酸化蛋白激酶 R 样内质网调节激酶(p-PERK)、磷酸化真核细胞翻译起始因子(p-eIF2 α)、葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、内质网应激相关蛋白(CHOP)以及调节肠黏膜损伤重要分子 β -抑制蛋白 1(Arrb1)的表达水平。结果 与对照组、LPS 组比较,随着 ATPS 的浓度增加,LPS + ATPS 组中细胞的活性越多且免疫荧光和流式检测也表明细胞的凋亡率减少;Occludin、ZO-1 的表达水平增多,明显高于 LPS 组;与 LPS 组相比,LPS + ATPS 组中 p-PERK、p-eIF2 α 、GRP78、CHOP 及 Arrb1 蛋白的水平降低。结论 ATPS 可通过抑制 Occludin、ZO-1 的破坏来保护 LPS 介导的肠上皮细胞炎性损伤,其机制可能与介导细胞凋亡的内质网应激蛋白以及调节肠黏膜损伤的重要分子 Arrb1 有关。

关键词 IEC-6 肠上皮细胞损伤;脂多糖;亮菌多糖;紧密连接

中图分类号 R 329.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)04-0533-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.006

肠黏膜屏障作为机体最重要的屏障之一,能够抵御毒素和肠外病原体预防炎症的发生^[1]。多种因素均可以导致该屏障的损害,如临床上化疗性肠黏膜损伤(chemotherapy-induced intestinal mucosal

injury, CIMI),严重影响了患者的治疗效果,甚至缩短生长期^[2]。对于 CIMI 的防治,集中在症状控制上,不能从根源上解决障碍。因此,寻找防治 CIMI 的有效手段已成为目前肿瘤学领域研究的热点问题。

亮菌口服液(Armillariella oral solution, AOS)是一种拥有完全知识产权的中成药,临床上被用于放化疗引起的白细胞减少的辅助治疗等^[3]。AOS 能够缓解 5-FU 诱导的小鼠肠黏膜的损伤^[4]。亮菌多糖(Armillariella tabescens polysaccharides, ATPS)作为其中最主要成分,研究^[5]表明其能够保护顺铂所导致的小鼠肠黏膜损伤。然而,ATPS 如何保护肠黏膜损伤的分子机制尚未有报道。现通过体外构建细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的 IEC-6 肠上皮细胞损伤为模型,观察 ATPS 对肠上皮细胞活性以及紧密连接蛋白表达的影响,并探讨 ATPS 对肠上皮细胞功能损伤的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器 全自动酶标仪(Molecular Devices 公司,美国);荧光共聚焦显微镜(Laica 公司,德国);凝胶成像仪(Bio-Rad 公司,美国);EPS300 型电泳仪(北京天龙公司,中国);流式细胞仪(Beckman Coulter FC500 公司,美国);超净工作台(苏州净化公司,中国);光学倒置显微镜(Olympus 公司,日本);细胞培养箱(Sanyo 公司,日本);微量取样枪(Eppendorf 公司,德国);恒温摇床(北京六一生物科技有限公司,中国);低温高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司,中国)。

1.2 主要试剂 大鼠肠上皮细胞系 IEC-6 购自 ATCC 细胞库;ATPS 购自合肥诚志生物制药有限公司;苦参碱购自北京索莱宝科技有限公司;PERK(ab229912)、p-eIF2 α (ab169528)、GRP78(ab108615)、Occludin(ab216327)、ZO-1(ab96587)抗体均购自英国 abcam 公司;p-PERK(CST#3179)、CHOP(CST#5554)、Arrb1(CST#12697)抗体均购自德国 CST 公司;内参 β -actin 抗体购自美国 Santa-

2021-02-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81774051)

作者单位:¹安徽医科大学中西医结合肿瘤中心,合肥 230022

²安徽医科大学第一附属医院中西医结合肿瘤科,合肥 230022

作者简介:张 梅,女,副教授,主任医师;

王 婷,女,助理研究员,责任作者, E-mail: wangting921204@163.com

Cruz 公司; MTT 购自美国 Sigma 公司; RIPA 裂解液(组织/细胞)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司; Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒、DAPI 染色液均购自江苏碧云天生物技术有限公司。

1.3 体外肠上皮细胞损伤模型建立方法 根据参考文献^[6]的模型建立方法,并在此基础上进行改进,进行 LPS 处理 IEC-6 细胞建立体外肠上皮细胞损伤模型,LPS 的最佳作用浓度通过此部分结果来选取。具体的实验方法如下:收集对数生长期的细胞,调整细胞浓度为 4×10^4 个/ml;将 100 μ l 的细胞悬液接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后,弃去培养基,使用不含血清的培养基配制不同浓度的 LPS(0、10、20、40、80、160 μ g/ml),分别加入 100 μ l 对应浓度的 LPS 置各对应孔中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 细胞培养箱中处理 24 h 后,各孔中分别加入 10 μ l MTT(浓度:5 mg/ml)溶液,置培养箱培养 3 h,吸去孔内上清液终止培养,每孔加入 150 μ l DMSO,温和振荡 10 min;通过酶标仪在 570 nm 波长下测量各孔的吸光度(OD)值。细胞存活率(%) = 实验组 A 孔 OD 值/对照组 A 孔 OD 值 $\times 100\%$ 。

1.4 光学显微镜观察和 MTT 法检测 ATPS 对 LPS 诱导损伤的 IEC-6 肠上皮细胞活性的影响

设置分组:对照组、LPS 组、LPS + ATPS 组、LPS + Matrine 组,收集对数生长期的细胞,调整细胞浓度为 4×10^4 个/ml;将 100 μ l 的细胞悬液接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后,弃去培养基,使用不含血清的培养基配制不同浓度的 ATPS(30、60、120 μ g/ml)分别加入至 LPS + ATPS 组细胞中,LPS + Matrine 组加入不含血清的培养基配制 Matrine 100 μ g/ml,对照组加入不含血清的培养基,37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h 后,弃去培养基,LPS、LPS + ATPS、LPS + Matrine 组分别加入不含血清的培养基配制的 20 μ g/ml LPS,37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后,光学显微镜观察拍照记录各组细胞形态学,各孔中分别加入 10 μ l MTT,按照 1.3 方法检测细胞活性。

1.5 流式细胞术检测 ATPS 对 LPS 诱导损伤的 IEC-6 肠上皮细胞凋亡的影响 按照 1.4 方法中的分组,收集对数生长期的细胞,调整细胞浓度为 3.5×10^5 个/ml;将 1 ml 的细胞悬液接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,弃去培养基,按照 1.4 的加药方法操作,37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后,收集细胞,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液,用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。取 5×10^5 个细胞,1 200 r/min 离心 5 min,弃上清液,用

195 μ l Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞,加入 5 μ l FITC-Annexin V 和 10 μ l PI 染色液轻轻混匀。室温避光孵育 15 min,随后置于冰浴中。可以使用铝箔进行避光,立即上机检测。

1.6 免疫荧光检测 ATPS 对 LPS 诱导损伤的 IEC-6 肠上皮细胞凋亡的影响 按照 1.4 方法中的分组,收集对数生长期的细胞,调整细胞浓度为 2.5×10^5 个/ml;将 1 ml 的细胞悬液接种于含有载玻片的 6 孔板中,待细胞贴壁后,弃去培养基,按照 1.4 的加药方法操作,37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后,取出载玻片,4% 多聚甲醛固定细胞 2 min,PBS 洗涤,5 min/(次 $\times$ 3)。加入 DAPI 染色液,室温 10 min,室温 PBS 洗净,5 min/(次 $\times$ 3),凉干后用含荧光淬灭剂的封片液封片,荧光共聚焦显微镜下观察。

1.7 Western blot 检测 ATPS 对 LPS 诱导损伤的 IEC-6 肠上皮细胞紧密连接蛋白、内质网应激蛋白以及肠黏膜损伤重要蛋白 Arrb1 表达水平的影响

按照 1.4 方法中的分组、给药方法及 1.5 中的细胞种植密度操作。收集细胞加入 RIPA(含蛋白磷酸酶抑制剂)蛋白裂解液,并按 1:100 加入 PMSF 混匀。冰上摇床振荡 30 min。4 $^{\circ}$ C、15 000 r/min 离心 20 min 后,将上清液转入至新的 EP 管中并进行 BCA 定量。取所需体积蛋白样本与 5 $\times$ SDS loading buffer 以 4:1 的体积比例混匀,煮沸 10 min,冷却后置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱,分装备用。蛋白进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、转移到 5% 脱脂奶粉-TBST 封闭液于室温封闭 2 h(磷酸化的蛋白检测用 5% BSA-TBST 封闭)。PVDF 膜分别加入稀释的 PERK、p-PERK、GRP78、CHOP、Occludin、ZO-1、Arrb1、 β -actin 一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜;TBST 洗涤后加入相应的二抗,常温摇床孵育 1 h 后 TBST 洗涤,显影。

1.8 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据作图,采用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两独立样本比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 成功诱导 IEC-6 肠上皮细胞损伤 利用不同浓度(0、10、20、40、80、160 μ g/ml)的 LPS 作用于肠上皮 IEC-6 细胞 24 h 后,MTT 法检测细胞相对存活率,通过并按照改良寇式法计算 IC_{50} 。结果显示,与 0 μ g/ml 组比较,IEC-6 肠上皮细胞损伤随着 LPS 浓度的增加呈现浓度依赖性趋势,差异有统计学意义(0 μ g/ml 组细胞与低浓度 20 μ g/ml 的 LPS

组比较, $F = 1.999\ 8$, $P = 0.009\ 54$)。见图 1 和表 1, $IC_{50} = 20\ \mu\text{g/ml}$ 。

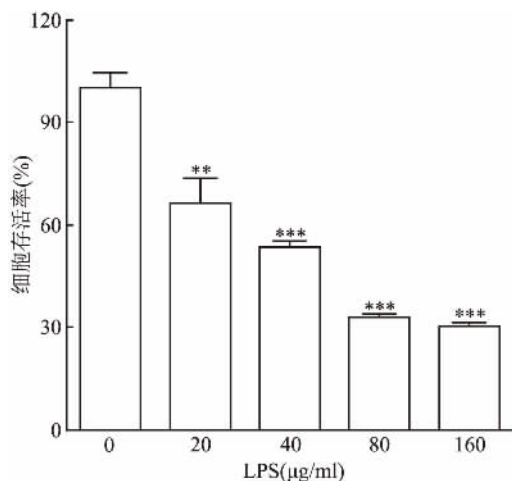


图 1 MTT 法检测不同浓度 LPS 对 IEC-6 肠上皮细胞活性的影响
与 0 $\mu\text{g/ml}$ 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

表 1 不同浓度 LPS 对 IEC-6 肠上皮细胞活性的影响 ($n = 4$, $\bar{x} \pm s$)

组别	LPS 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	细胞存活率 (%)
LPS	0	96.25 $\pm$ 6.15
	20	66.31 $\pm$ 14.75
	40	53.45 $\pm$ 4.00
	80	33.15 $\pm$ 1.03
	160	30.00 $\pm$ 2.57

2.2 ATPS 抑制 LPS 诱导的 IEC-6 肠上皮细胞的凋亡 为了探索 ATPS 对 LPS 诱导的 IEC-6 肠上皮细胞损伤的作用,首先利用 MTT 法确定 ATPS 在 IEC-6 肠上皮细胞中的安全使用浓度,结果显示,与对照组(未加入 ATPS)和阳性对照组(苦参碱 Matrine)相比,ATPS 在 30、60、120 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度下对细胞的活性未有明显的影响,差异无统计学意义。见图 2A。当 ATPS 预先与 IEC-6 肠上皮细胞孵育后,再利用 LPS 诱导细胞损伤,结果显示与 LPS(20 $\mu\text{g/ml}$)处理组比较,随着 ATPS 浓度的增加,显微镜下观察细胞数目增多,MTT 统计结果也表明细胞的活性越明显,差异有统计学意义(20 $\mu\text{g/ml}$ 的 LPS 组与低浓度 20 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 30 $\mu\text{g/ml}$ ATPS 组比较, $F = 4.122\ 1$, $P = 0.028\ 975$)。见图 2B、C 和表 2。通过免疫荧光(DAPI 染色)、流式细胞术检测(FITC-Annexin V 和 PI 双染法)结果显示,ATPS 的保护作用主要是通过阻止 LPS 所诱导的肠上皮细胞的凋亡来实现的。见图 2D、E。

2.3 ATPS 促进 LPS 诱导的 IEC-6 肠上皮细胞紧密连接蛋白的表达 紧密连接蛋白及其相关蛋白

(膜蛋白 ZO-1、跨膜蛋白 Occludin)对于维持细胞与细胞之间的黏附性、上皮屏障结构的完整性是必不可少的,实验结果显示 LPS 在诱导 IEC-6 肠上皮细胞发生损伤时,ZO-1、Occludin 的表达减少,而 ATPS 能够起到逆转的作用,并与 ATPS 浓度呈正比,差异有统计学意义(针对 20 $\mu\text{g/ml}$ 的 LPS 组与低浓度 20 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 30 $\mu\text{g/ml}$ ATPS 组比较,ZO-1 的蛋白表达, $F = 1.014\ 4$, $P = 0.000\ 191$; Occludin 的蛋白表达, $F = 4.435\ 4$, $P = 0.000\ 072\ 8$)。见图 3。

表 2 不同浓度 ATPS 对经 LPS 诱导损伤的 IEC-6 细胞活性的影响 ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	LPS 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	ATPS 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	Matrine 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	细胞存活率 (%)
对照				100.00 $\pm$ 3.46
LPS	20			56.73 $\pm$ 6.27
LPS + ATPS	20	30		63.77 $\pm$ 2.94
	20	60		80.33 $\pm$ 3.12
	20	120		84.18 $\pm$ 7.95
LPS + Matrine	20		100	84.40 $\pm$ 6.19

2.4 ATPS 调控 Arrb1 及下游内质网应激途径 PERK/eIF2 α 信号通路的变化抑制 LPS 介导的细胞凋亡 研究表明具有多种功能如调节细胞的增殖、生存、凋亡及运动功能和基因转录过程的 Arrb1 分子(又名 β -arrestin 1),在调节肠黏膜损伤过程中发挥重要的作用,可能是介导肠上皮细胞凋亡的重要调控分子^[7-8]。而 Arrb1 介导肠上皮细胞增殖的抑制,其机制可能与近年来才发现的一种新的凋亡途径,即内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)介导的细胞凋亡通路密切相关。因此,探究 Arrb1 及 ERS 凋亡通路的相关蛋白分子在 ATPS 保护 IEC-6 肠上皮细胞免受 LPS 诱导损伤中的变化。Western blot 结果显示,与空白对照组相比,LPS 处理组中 Arrb1、ERS 介导的凋亡通路中 p-PERK、p-eIF2 α 、GRP78、CHOP 蛋白的表达升高,当 ATPS 预先处理细胞后再经 LPS 处理,上述蛋白的表达随着 ATPS 浓度的增加而逐渐降低,Matrine 作为阳性对照组。见图 4。

3 讨论

肠黏膜屏障在维持肠内稳态中起重要作用,其中肠黏膜上皮细胞屏障以单层上皮细胞和细胞间的紧密连接为基础,ZO-1、Occludin 是构成细胞间紧密连接的组成部分^[9]。当肠道黏膜屏障出现损伤时,会引起肠道的通透性变大,肠道的菌群失去正常比

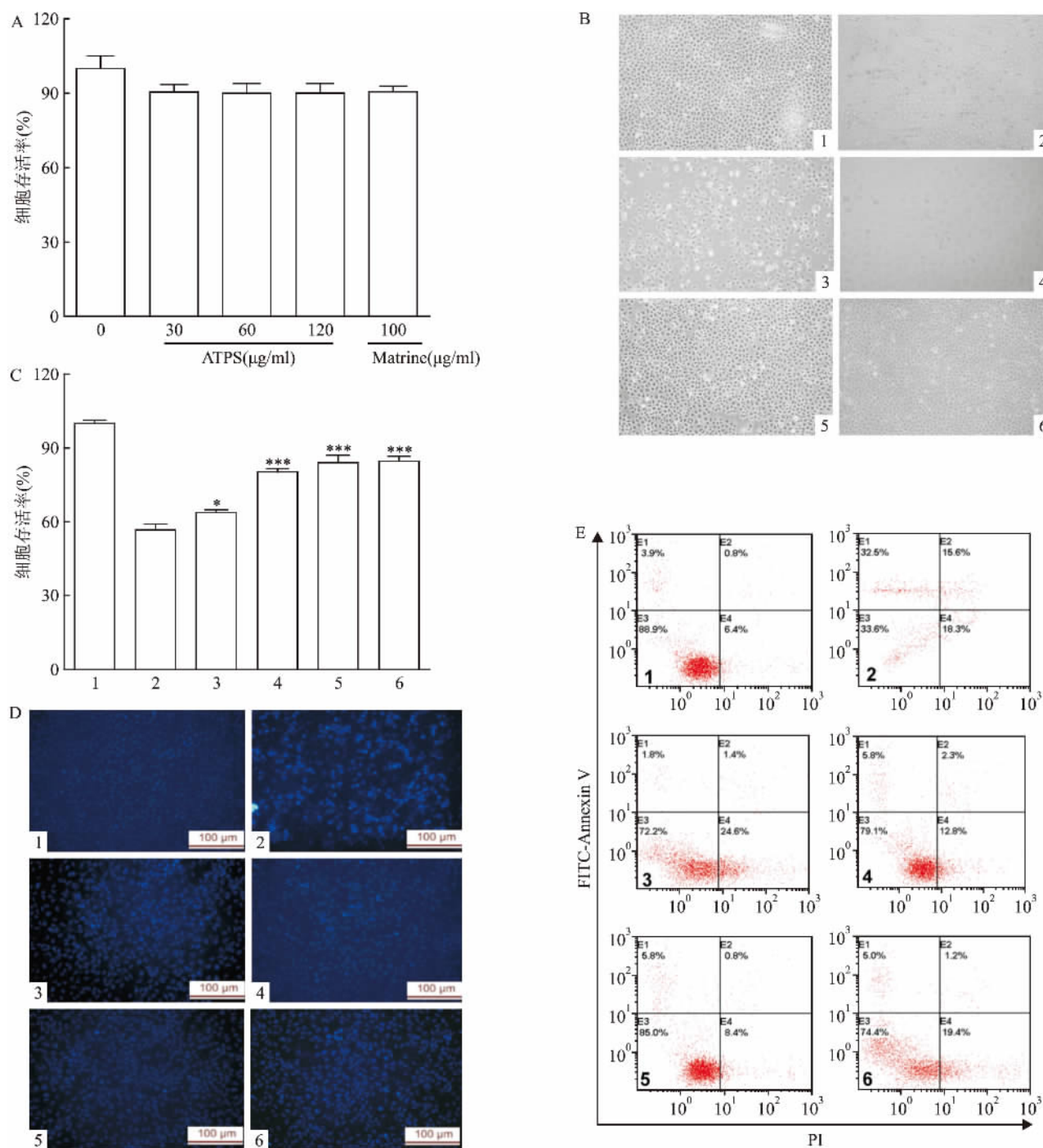


图2 ATPS 对 LPS 诱导的损伤 IEC-6 肠上皮细胞凋亡的影响

A: 各组不同浓度 ATPS 处理后的 IEC-6 细胞(每组 $n=6$ 个复孔)存活率; B: 显微镜下各组 IEC-6 细胞数目和形态变化, 光学显微镜 $\times 10$; C: 各组 IEC-6 细胞(每组 $n=6$ 个复孔)存活率; D: 免疫荧光显微镜各组 IEC-6 细胞 DAPI 染色, 免疫荧光图 $\times 10$; E: 各组 IEC-6 细胞凋亡的流式细胞图; 1: 对照组; 2: 20 $\mu\text{g/ml}$ LPS 组; 3: 20 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 30 $\mu\text{g/ml}$ ATPS 组; 4: 20 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 60 $\mu\text{g/ml}$ ATPS 组; 5: 20 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 120 $\mu\text{g/ml}$ ATPS 组; 6: 20 $\mu\text{g/ml}$ LPS + 100 $\mu\text{g/ml}$ Matrine 组; 与 LPS (20 $\mu\text{g/ml}$) 组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

例,甚至会诱发或加重机体全身的炎症反应,使得多个脏器的功能出现障碍^[10],如 CIMI,到目前为止,尚且缺乏有效的治疗方案。亮菌作为中国最初发现并拥有自主知识产权的一种真菌,其主要成分 ATPS

具有抗肿瘤、升白、抗菌等防护作用^[11]。本文采用 LPS 诱导的 IEC-6 肠上皮细胞损伤模型,探讨 ATPS 对肠上皮细胞的保护作用及机制。结果显示 ATPS 抑制 LPS 诱导的 IEC-6 肠上皮细胞的凋亡,并呈现

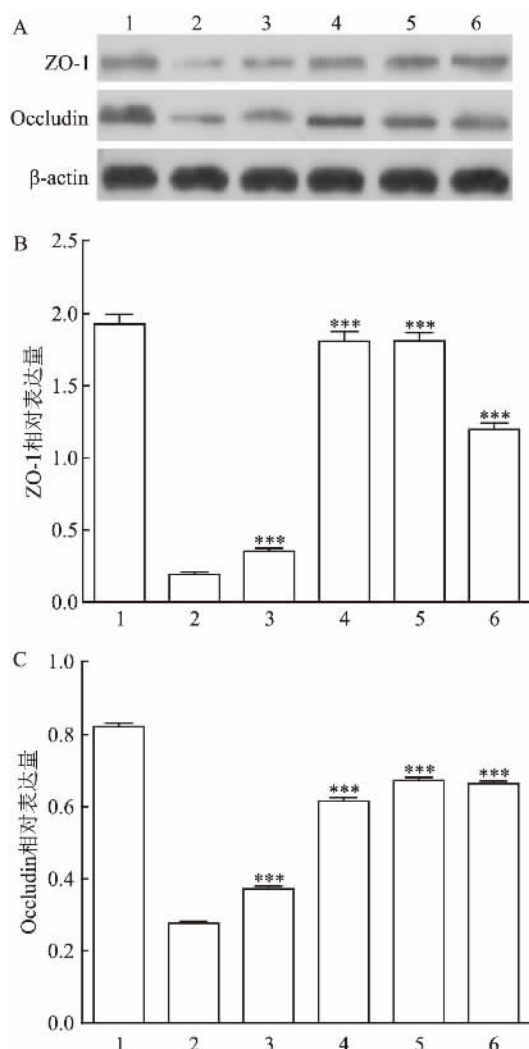


图3 ATPS对LPS诱导损伤的IEC-6肠上皮细胞紧密连接蛋白的影响

A: ZO-1、Occludin 蛋白条带图; B: ZO-1 蛋白相对表达量; C: Occludin 蛋白相对表达量; 1: 对照组; 2: 20 μg/ml LPS 组; 3: 20 μg/ml LPS + 30 μg/ml ATPS 组; 4: 20 μg/ml LPS + 60 μg/ml ATPS 组; 5: 20 μg/ml LPS + 120 μg/ml ATPS 组; 6: 20 μg/ml LPS + 100 μg/ml Matrine 组; 与 LPS (20 μg/ml) 组比较: *** $P < 0.001$

剂量依赖效应。此外, LPS 能够诱导肠上皮细胞中 Occludin 和 ZO-1 表达降低, 而 ATPS 上调这些蛋白的表达。

Arrb1 分子作为衔接蛋白具有调节细胞的增殖、生存、凋亡、运动和基因转录过程等功能, 在调节 CIMI 病变过程中发挥了重要的作用, 可能是肠上皮细胞凋亡的重要调控分子^[8]。本结果显示, LPS 能够促进肠上皮细胞中 Arrb1 的表达, 而 ATPS 能够逆转这种作用, 呈现剂量依赖效应。

ERS 介导的细胞凋亡是近年来发现的一种新的凋亡途径, 多种信号通路、分子伴侣都参与其中。葡

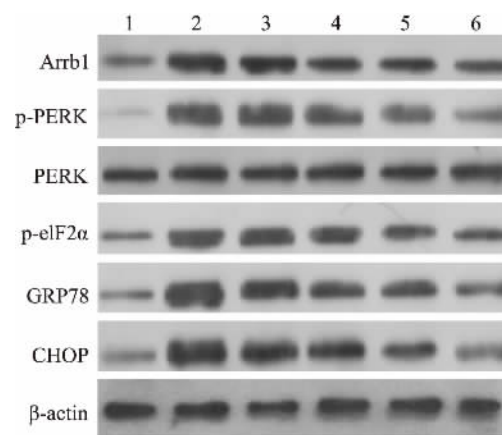


图4 ATPS对LPS诱导损伤的IEC-6肠上皮细胞内质网应激蛋白以及调节肠黏膜损伤蛋白Arrb1表达水平的影响

Arrb1、p-PERK、p-eIF2α、GRP78、CHOP 蛋白条带图; 1: 对照组; 2: 20 μg/ml LPS 组; 3: 20 μg/ml LPS + 30 μg/ml ATPS 组; 4: 20 μg/ml LPS + 60 μg/ml ATPS 组; 5: 20 μg/ml LPS + 120 μg/ml ATPS 组; 6: 20 μg/ml LPS + 100 μg/ml Matrine 组

萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GRP78) 和 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, CHOP) 是目前公认的 ERS 标志物, 在 ERS 介导的细胞凋亡中发挥重要作用。蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like ER kinase, PERK) /真核生物翻译起始因子 2α 亚基 (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit, eIF2α) 信号通路是 ERS 过程中的重要信号通路之一。文献^[12]报道, Arrb1 的减少能够保护肠黏膜损伤, 其机制可能与维持细胞稳态平衡有关。本结果显示, LPS 能够促进肠上皮细胞 p-PERK、p-eIF2α、GRP78、CHOP 蛋白的表达发挥促凋亡作用, 而 ATPS 以剂量依赖的方式干预 LPS 介导的凋亡作用。

综上所述, ATPS 可能是通过上调紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 的表达, 减少 IEC-6 肠上皮细胞的凋亡, 缓解 LPS 介导的肠上皮细胞损伤, 其机制可能与 Arrb1 分子、内质网应激及 PERK/eIF2α 信号通路有关。

参考文献

- [1] Neves A R, Queiroz J F, Costa Lima S A, et al. Cellular uptake and transcytosis of lipid-based nanoparticles across the intestinal barrier: relevance for oral drug delivery [J]. J Colloid Interface Sci, 2016, 46(3): 258-65.
- [2] Zhu Q, He G, Wang J, et al. Protective effects of fenofibrate against acute lung injury induced by intestinal in mice [J]. Sci Rep, 2016, 6(22): 44-52.

- [3] 王建军, 李平. 亮菌制剂研究概况 [J]. 中医药临床杂志, 2010, 22(5): 469–70.
- [4] Wenqin D, Yaodong Z, Wanji S, et al. *Armillariella* oral solution ameliorates small intestinal damage in a mouse model of chemotherapy-induced mucositis [J]. *Nutr Cancer*, 2019, 71(7): 1–11.
- [5] 尤伟, 张梅, 李平, 等. 亮菌多糖对顺铂致小鼠肠黏膜损伤的保护作用 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(22): 2683–7, 2691.
- [6] Richter J M, Schanbacher B L, Huang H, et al. LPS-binding protein enables intestinal epithelial restitution despite LPS exposure [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2012, 54(5): 639.
- [7] Shen H, Wang L, Zhang J, et al. ARRB1 enhances the chemosensitivity of lung cancer through the mediation of DNA damage response [J]. *Oncology Reports*, 2017, 37(2): 761–7.
- [8] Srivastava A, Gupta B, Gupta C, et al. Emerging functional divergence of β -Arrestin isoforms in GPCR function [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2015, 26(11): 628–42.
- [9] 向玲, 杜维霞, 刘依枫, 等. 双歧杆菌通过 Zonulin 影响坏死性小肠结肠炎新生大鼠模型肠道通透性 [J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(5): 469–75.
- [10] Harada S, Nakagawa T, Yokoe S, et al. Autophagy deficiency diminishes indomethacin induced intestinal epithelial cell damage through activation of the ERK/Nrf2/HO-1 Pathway [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2015, 355(3): 353–61.
- [11] Kostic, Marina, Smiljkovic, et al. Chemical, nutritive composition and a wide range of bioactive properties of honey mushroom *armillaria mellea*(Vahl: Fr.) Kummer [J]. *Food Funct*, 2017, 8(9): 3239–49.
- [12] Jia J J, Zeng X S, Zhou X S, et al. The induction of thioredoxin-1 by epinephrine withdraws stress *via* interaction with β -arrestin-1 [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(19): 3121–31.

Protective effect and mechanism of *Armillariella* polysaccharide on LPS induced inflammatory injury of intestinal epithelial cells

Zhang Mei^{1,2}, Wu Yue^{1,2}, Su Li^{1,2}, et al

(¹Dept of Integrative Medicine Oncology of First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²The Medicine(TCM)-Integrated Cancer Center of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effects of *Armillariella* tabescens polysaccharides(ATPS) on cell activity, occludin and ZO-1 in IEC-6 intestinal epithelial cells induced by lipopolysaccharide(LPS) , and to reveal the protective mechanism of *Armillariella* tabescens polysaccharides on intestinal mucosal barrier injury. **Methods** IEC-6 intestinal epithelial cell injury model induced by LPS was established. The injured cells were randomly divided into control group, LPS group, LPS + ATPS group and LPS + matrine group. The cell viability was observed by microscope and MTT; the cell apoptosis was detected by immunofluorescence and flow cytometry; the expression of ZO-1 and occludin was detected by Western blot. Meanwhile, Western blot was used to detect the expression of p-PERK, p-eIF2 α , GRP78, CHOP and Arrb1 proteins. **Results** With the increase of ATPS concentration, the cell activity in the LPS + ATPS group increased, and the apoptosis rate decreased by immunofluorescence and flow cytometry compared with control and LPS group. The expression levels of occludin and ZO-1 protein were significantly higher in LPS + ATPS group than those in LPS group. The levels of p-PERK, p-eIF2 α , GRP78, chop and arrb1 protein in LPS + ATPS group decreased compared with LPS group. **Conclusion** *Armillariella* polysaccharide can protect intestinal epithelial cells from LPS mediated inflammatory injury by inhibiting the damage of occludin and ZO-1 proteins. The mechanism may be related to endoplasmic reticulum stress protein which mediates apoptosis and Arrb1(an important molecule) regulating intestinal mucosal injury.

Key words IEC-6 intestinal epithelial cell injury; lipopolysaccharide; *Armillariella* tabescens polysaccharides; tight junctions