

盐酸小檗碱对肝纤维化大鼠肠道黏膜屏障的保护作用及机制

李震¹, 刘伟², 侯桂琴²

摘要 目的 建立肝纤维化大鼠模型, 观察盐酸小檗碱对肝纤维化大鼠肠道黏膜屏障的保护作用, 并探讨其机制。方法

将大鼠随机分为正常对照组(CON组)、模型组(MOD组)、乳果糖口服液组(LOL组)和盐酸小檗碱组(BH组), 除CON组外, 其他各组建立肝纤维化模型, LOL组按100 mg/kg的剂量灌胃乳果糖口服液, BH组按150 mg/kg的剂量灌胃盐酸小檗碱药液, CON组和MOD组按10 ml/kg的剂量灌胃生理盐水。各组连续灌胃12周。灌胃结束后, 计算肝脏指数和脾脏指数; 检测各组大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、透明质酸钠(HA)、层粘连蛋白(LN)、IV型胶原蛋白(IV-C)及血清内毒素的含量。用HE染色观察肝脏和回肠病理变化; 用实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)和蛋白质印迹法(Western blot)检测回肠中闭合蛋白(Claudins)、闭锁连接蛋白-1(ZO-1)的mRNA和蛋白表达水平。结果 乳果糖口服液和盐酸小檗碱可不同程度减轻大鼠肝脏指数和脾脏指数($P < 0.01$, $P < 0.05$)。乳果糖口服液和盐酸小檗碱可减少血清中ALT、AST、ALP的含量($P < 0.01$, $P < 0.05$)。乳果糖口服液和盐酸小檗碱可减少大鼠血清中HA、LN、IV-C及内毒素的含量($P < 0.01$, $P < 0.05$)。乳果糖口服液和盐酸小檗碱改善了大鼠肝细胞、肝小叶、肝索的结构, 并能减少炎性细胞浸润。乳果糖口服液和盐酸小檗碱可减少回肠肠黏膜充血、水肿及炎性细胞浸润。乳果糖口服液和盐酸小檗碱均提高大鼠回肠中Claudins、ZO-1 mRNA和蛋白表达水平($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论 盐酸小檗碱对肝纤维化大鼠肠道黏膜屏障具有保护作用, 其机制可能与其调节回肠中肠道屏障保护蛋白Claudins、ZO-1的表达有关。

关键词 盐酸小檗碱; 肝纤维化; 肠道黏膜屏障; 机制

中图分类号 R 392.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)12-1888-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.010

2019-06-27 接收

基金项目: 2018年度河南省重点研发与推广专项(编号: 182102310210)

作者单位: ¹ 郑州大学附属南阳中心医院(南阳市中心医院)药学部, 南阳 473000

² 郑州大学药学院, 郑州 450001

作者简介: 李震, 男, 硕士, 副主任药师;

侯桂琴, 女, 副教授, 博士, 责任作者, E-mail: hougq@zzu.edu.cn

肝纤维化是多种慢性肝病进展的共同病理过程, 是我国严重的公共卫生问题, 同时也是患者进展为肝硬化甚至死亡的主要病因^[1-3]。肝纤维化的发病机制十分复杂, 传统研究普遍认为肝脏纤维化的形成主要包括肌成纤维细胞的形成和细胞外基质沉积两个连续的过程。但近年研究^[3-4]显示肝纤维化与肠道黏膜屏障损伤有关。研究^[5-7]表明, 盐酸小檗碱具有抑菌和改善肠道菌群的作用, 但尚不确定其是否对肠道屏障有保护作用。基于此, 该实验拟通过肝纤维化模型探讨盐酸小檗碱对肝纤维化肠道黏膜屏障的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康SPF级雄性SD大鼠, 40只, 体重为200~220 g, 由湖北省实验动物研究中心提供, 许可证号: SCXK(鄂)2015-0018。

1.1.2 主要药品及试剂 CCl₄ 购自上海展云化工有限公司, 批号20180112; 盐酸小檗碱购自吉林省临江市健今药业有限责任公司, 批号20180412; 果糖口服液购自莱阳江波制药有限公司, 批准文号: 国药准字H20074010, 生产批号: 180721; 丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)生化试剂盒购自南京建成生物技术有限公司, 批号分别为20180712、20180614、20180523。大鼠透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白(laminin, LN)、IV型胶原蛋白(type IV collagen, IV-C)及内毒素ELISA试剂盒、二抗(HRP标记山羊抗大鼠抗体)、内参(β -actin)均购自武汉巴菲尔生物技术有限公司, 批号分别为1800405、180610、180326、180617、20180528、20180412; Takara逆转录试剂盒、SYBR Premix Ex TaqTM购自大连Takara公司, 批号分别为M9004、A2801; 闭合蛋白(Claudins)、闭锁连接蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)为兔抗鼠抗体, 购自英国Abcam公司, 批号分别为ab216327、ab150077。

1.1.3 主要仪器 AE224型分析天平购自上海舜

宇恒平科学仪器有限公司;FastTrack™ 型紫外分光光度计购自上海梅特勒-托利多有限公司;Genova Bio 型核酸蛋白分析仪购自苏州艾泰赫生化科技有限公司;9700 型 PCR 扩增仪购自美国 ABI 公司;WD-9413C 型凝胶成像分析系统购自北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 适应性饲养 1 周后将大鼠随机分为正常对照组(control group, CON 组)、模型组(model group, MOD 组)、乳果糖口服液组(lactulose oral liquid group, LOL 组)和盐酸小檗碱组(berberine hydrochloride group, BH 组),每组 10 只,除 CON 组外,其他各组制作肝纤维化模型。

1.2.2 肝纤维化模型的建立 参考文献^[8]制作肝纤维化模型:MOD 组、LOL 组和 BH 组按 0.1 ml/100 g 的剂量腹腔注射 50% CCl₄ 橄榄油溶液,2 次/周,共 12 周。CON 组按 0.1 ml/100 g 的剂量腹腔注射橄榄油溶液,2 次/周,共 12 周。

1.2.3 给药 灌胃和给药同时进行,每天上午定时造模,下午定时给药,即 LOL 组按 100 mg/kg 的剂量灌胃乳果糖口服液,BH 组按 150 mg/kg 的剂量灌胃盐酸小檗碱药液,灌胃容积均为 10 ml/kg,CON 组和 MOD 组按 10 ml/kg 的剂量灌胃生理盐水,连续灌胃 12 周,1 次/d。

1.2.4 指标检测

1.2.4.1 肝脏指数和脾脏指数 末次灌胃结束后 24 h 取材,称重,用 10% 水合氯醛溶液按 0.3 ml/100 g 的剂量麻醉,麻醉好后经腹主动脉取血,分离肝脏和脾脏,剥离脂肪韧带,擦干血水,称取肝脾重量,计算脏器指数,脏器指数 = 脏器质量(g)/体质量(g) × 100%。

1.2.4.2 血清酶检测 采血后离心取上清液,检测各组大鼠血清酶的表达水平,检测步骤按照各指标的说明书进行。

1.2.4.3 血清 HA、LN、IV-C 及血清内毒素检测 采血后离心取上清液,用 ELISA 检测各组大鼠 HA、LN、IV-C 和内毒素的表达水平,检测步骤按照各指标的说明书进行。

1.2.4.4 肝脏和肠道病理学检测 称重后,取肝右叶和回肠,置 4% 多聚甲醛固定 48 h,用 HE 染色观察肝脏和回肠的病理改变。

1.2.4.5 RT-PCR 检测回肠中 Claudins、ZO-1 mRNA 表达水平 用 RT-PCR 检测检测回肠中 Claudins、ZO-1 mRNA 表达水平。取血后,分离回肠,称

取 50 mg。参照 TRIzol 说明书提取回肠总 mRNA,用核酸蛋白仪检测纯度,纯度为 1.8 ~ 2.2 即可进行下一步;按照 Takara 逆转录试剂盒说明书逆转录合成 cDNA,按照 SYBR Premix Ex Taq^[10] 试剂盒说明书依次添加试剂,用 PCR 仪进行基因扩增。每个基因重复 3 次,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示 mRNA 相对表达水平。Claudins、ZO-1 及内参 β -actin 序列见表 1。

表 1 引物序列

目的基因	引物序列	产物长度 (bp)
Claudins	Forward: 5'-AGGGGGATGTGGAGCTGTGAG-3'	130
	Reverse: 5'-TTCCAACCATCACTCCCTGG-3'	
ZO-1	Forward: 5'-CGAGGAAGCTCCAAAGGTA-3'	112
	Reverse: 5'-CTCCTTCACTTTTATTTTCACAGTGCAA-3'	
β -actin	Forward: 5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3'	221
	Reverse: 5'-CCCATACCCACCATCACACC-3'	

1.2.4.6 Western blot 检测回肠中 Claudins、ZO-1 的蛋白表达 用 Western blot 检测 4 组大鼠回肠中 Claudins、ZO-1 的蛋白表达量,内参为 GAPDH。取肺组织 50 mg,加蛋白裂解液,冰上研磨,以 4 ℃、12 000 r/min 离心 30 min,取上清液,用 BCA 蛋白质试剂盒分别测定 4 组蛋白量;依次加样、凝胶电泳、转膜和室温封闭;按抗体说明书加入一抗 Claudins (1:300)和一抗 ZO-1 (1:200),置 4 ℃ 冰箱过夜,洗膜,再加入二抗 (1:1 000),ECL 显色;置于凝胶图像成像分析系统,曝光各组蛋白条带,拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间的比较采用单因素方差分析,方差齐性时,多组间比较采用 LSD 法,方差不齐时,采用 Dunnett's 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝脏指数和脾脏指数 与 CON 组相比,MOD 组大鼠肝脏指数和脾脏指数都明显升高 ($P < 0.01$);与 MOD 组相比,LOL 组和 BH 组大鼠肝脏指数和脾脏指数均有不同程度降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),其中 BH 组下降最为明显。见表 2。

2.2 血清酶的检测结果 与 CON 组相比,MOD 组大鼠血清中 ALT、AST、ALP 明显升高 ($P < 0.01$);MOD 组相比,LOL 组和 BH 组大鼠血清中 ALT、AST、ALP 均有不同程度降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),其中 BH 组下降最为明显,见表 3。

2.3 血清 HA、LN、IV-C 及血清内毒素检测结果

表2 各组大鼠肝脏指数和脾脏指数检测结果($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	剂量(mg/kg)	肝脏指数	脾脏指数
CON	—	4.78 ± 0.19	0.26 ± 0.08
MOD	—	6.50 ± 0.51 ^{**}	0.54 ± 0.14 ^{**}
LOL	100	5.53 ± 0.56 ^{##}	0.38 ± 0.11 [#]
BH	150	5.65 ± 0.48 ^{##}	0.40 ± 0.09 [#]
F 值		1.744	0.871
P 值		0.175	0.016

与 CON 组比较:^{**} $P < 0.01$;与 MOD 组比较:[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

表3 各组大鼠血清酶检测结果(U/L, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(mg/kg)	ALT	AST	ALP
CON	—	42.47 ± 14.71	60.17 ± 10.98	73.52 ± 11.43
MOD	—	69.75 ± 15.16 ^{**}	94.67 ± 11.59 ^{**}	100.47 ± 9.81 ^{**}
LOL	100	47.79 ± 14.29 ^{##}	71.68 ± 14.21 ^{##}	81.40 ± 11.18 ^{##}
BH	150	52.25 ± 9.15 ^{##}	78.28 ± 9.51 ^{##}	86.84 ± 15.23 [#]
F 值		1.076	0.854	1.063
P 值		0.372	0.474	0.377

与 CON 组比较:^{**} $P < 0.01$;与 MOD 组比较:[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

与 CON 组相比,MOD 组大鼠血清中 HA、LN、IV-C 及内毒素明显升高($P < 0.01$);与 MOD 组相比,LOL 组和 BH 组大鼠血清中 HA、LN、IV-C 及内毒素均有不同程度降低($P < 0.01, P < 0.05$),其中 BH 组下降最为明显,见表 4。

2.4 病理组织学结果 肝脏 HE 染色:CON 组大鼠

肝细胞大小均匀,排列整齐,肝索和肝小叶结构完整且排列整齐。MOD 组大鼠肝细胞大小不一,排列紊乱,肝小叶和肝索结构紊乱,可见气球样变、空泡样变和炎性细胞浸润。LOL 组和 BH 组大鼠肝细胞、肝小叶、肝索的病理形态都明显优于 MOD 组,也存在少量的炎性细胞浸润。见图 1。回肠 HE 染色:CON 组大鼠回肠肠绒毛结构较完整、整齐排列,未见绒毛脱落、倒伏的现象,上皮黏膜间无明显炎性细胞浸润。MOD 组大鼠回肠有绒毛排列紊乱,绒毛变短,肠黏膜充血、水肿,存有明显的炎性细胞浸润。LOL 组和 BH 组回肠肠黏膜充血、水肿及炎性细胞浸润明显改善。见图 2。

2.5 RT-PCR 检测结果 CON 组大鼠回肠中 Claudins、ZO-1 mRNA 表达水平较高,造模后,MOD 组大鼠回肠中 Claudins、ZO-1 mRNA 表达水平降低($P < 0.01$),给药后,LOL 组和 BH 组大鼠回肠中 Claudins、ZO-1 mRNA 表达水平升高($P < 0.05$),其中 BH 组上升最为明显。见表 5。

2.6 Western blot 检测结果 CON 组大鼠回肠中 Claudins、ZO-1 蛋白表达水平较高,造模后,MOD 组大鼠回肠中 Claudins、ZO-1 蛋白表达水平降低($P < 0.01$),给药后,LOL 组和 BH 组大鼠回肠中 Claudins、ZO-1 蛋白表达水平升高($P < 0.01, P < 0.05$),其中 BH 组上升最为明显。见表 6、图 3。

表4 各组大鼠血清 HA、LN、IV-C 及血清内毒素检测结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(mg/kg)	HA($\mu\text{g/L}$)	LN($\mu\text{g/L}$)	IV-C($\mu\text{g/L}$)	内毒素(mg/L)
CON	—	25.24 ± 9.78	73.35 ± 13.68	14.33 ± 7.28	0.26 ± 0.09
MOD	—	57.99 ± 5.37 ^{**}	112.34 ± 13.65 ^{**}	43.79 ± 10.76 ^{**}	0.54 ± 0.11 ^{**}
LOL	100	40.69 ± 10.45 [#]	86.17 ± 12.93 ^{##}	25.02 ± 5.15 ^{##}	0.41 ± 0.08 ^{##}
BH	150	42.63 ± 5.54 ^{##}	94.38 ± 14.73 [#]	32.23 ± 8.91 [#]	0.46 ± 0.08 [#]
F 值		3.705	0.152	3.762	0.233
P 值		0.020	0.928	0.019	0.873

与 CON 组比较:^{**} $P < 0.01$;与 MOD 组比较:[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

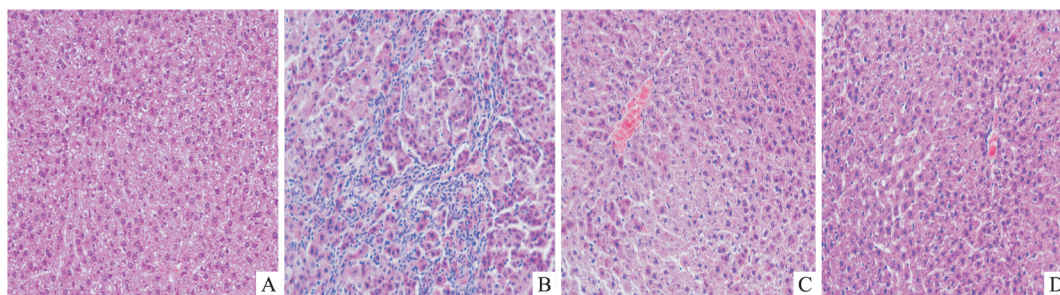


图1 各组大鼠肝组织 HE 染色结果 ×400

A:MOD 组;B:CON 组;C:LOL 组;D:BH 组

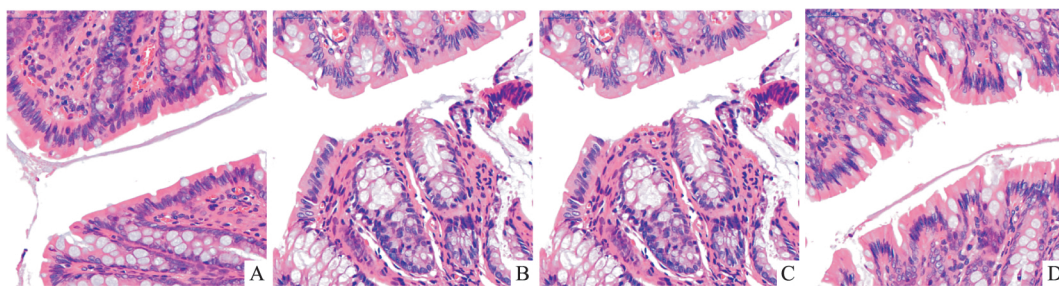


图2 各组大鼠回肠 HE 染色结果 ×400
A:MOD 组;B:CON 组;C:LOL 组;D:BH 组

表5 各组大鼠回肠中 Claudins、ZO-1 mRNA 的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量 (mg/kg)	Claudins mRNA	ZO-1 mRNA
CON	—	0.78 ± 0.24	0.61 ± 0.12
MOD	—	0.40 ± 0.20 **	0.33 ± 0.14 **
LOL	100	0.59 ± 0.15 #	0.46 ± 0.11 #
BH	150	0.61 ± 0.22 #	0.55 ± 0.15 ##
F 值		0.411	0.435
P 值		0.746	0.729

与 CON 组比较: ** $P < 0.01$; 与 MOD 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表6 各组大鼠回肠中 Claudins、ZO-1 的灰度值 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量 (mg/kg)	Claudins	ZO-1
CON	—	1.06 ± 0.26	0.87 ± 0.28
MOD	—	0.65 ± 0.17 **	0.35 ± 0.19 **
LOL	100	0.86 ± 0.22 #	0.59 ± 0.24 ##
BH	150	0.90 ± 0.24 #	0.65 ± 0.28 #
F 值		0.814	0.233
P 值		0.495	0.873

与 CON 组比较: ** $P < 0.01$; 与 MOD 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

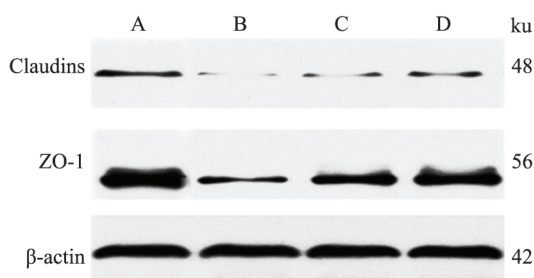


图3 各组大鼠回肠中 Claudins、ZO-1 蛋白条带图
A:CON 组;B:MOD 组;C:LOL 组;D:BH 组

3 讨论

CCl_4 是动物实验中诱导肝纤维化最广泛使用的药物,一般而言,腹腔注射吧 CCl_4 15 min 后即可造成肝损伤,48 h 肝损伤达高峰,此后肝脏进入修复期,因此给药 3 ~ 4 d 就可形成肝纤维化^[8]。该实

验每周 2 次腹腔注射 50% CCl_4 橄榄油溶液,连续造模 12 周。肝脏 HE 染色结果显示,MOD 组大鼠肝细胞大小不一,排列紊乱,肝小叶和肝索结构紊乱,可见气球样变、空泡样变和炎性细胞浸润。ALT、AST、ALP 是评价肝功能的重要指标,该研究显示,造模后模型组大鼠血清中 ALT、AST、ALP 明显升高 ($P < 0.01$)。肝纤维化是许多慢性肝病的共同病理过程,肝脏细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 弥漫性沉积为其主要病理特征^[9-10]。ECM 的主要成分是胶原,IV-C 是 ECM 的重要成分之一,而 HA 和 LN 是 IV-C 形成的主要成分,因此 IV-C、HA 和 LN 对于肝纤维化的诊断具有重要意义。该实验表明,MOD 组大鼠血清中 IV-C、HA 和 LN 的含量明显高于 CON 组。综合 HE 染色结果、血清酶检测结果和 IV-C、HA、LN 检测结果,该实验成功通过 CCl_4 诱导建立了肝纤维化大鼠模型。

肠道黏膜屏障主要由机械屏障、免疫屏障、化学屏障和生物屏障四部分组成,是防止肠道内有害物质和病原体进入机体内环境,并维持机体内环境稳定的一道重要屏障。该屏障中任何一功能出现紊乱,均可引发细菌和内毒素的异位。

研究^[11]表明肝纤维化中有明显的肠道机械屏障损伤。肠道机械屏障损伤主要表现为肠道通透性增高。肠道黏膜机械屏障由肠上皮细胞及细胞间的紧密连接蛋白构成,因此肠道黏膜上皮间的紧密连接 (tight junctions, TJ) 对于维持肠道黏膜机械屏障的完整性尤为关键^[12]。TJ 由许多紧密连接蛋白组合构成,如咬合蛋白 (occludin)、闭合蛋白 (Claudin 家族) 和闭锁连接蛋白 (zonula occludens, ZOs),其中 Claudins 和 ZO-1 最具代表,二者常被视为肠道机械屏障的核心指标^[13]。Claudins 蛋白对肠道黏膜机械屏障起决定性作用,主要存在于肠道上皮细胞间的 TJ,一般情况下仅允许小分子进入。ZO-1 的氨基端与 Claudins 羧基端相连,可将 Claudins 与细胞

骨架连接起来^[4]。Claudins 和 ZO-1 相互连接构成肠道黏膜机械屏障,二者表达减少时会导致肠道黏膜的通透性增加,从而使肠道黏膜的保护作用减弱^[5]。该实验表明,MOD 组大鼠回肠有绒毛排列紊乱,绒毛变短,肠黏膜充血、水肿,存有明显的炎性细胞浸润,同时回肠中 Claudins、ZO-1 mRNA 和蛋白表达水平明显降低,因此,肝纤维化会伴随肠道机械屏障功能受损,其受损原因可能与回肠中 Claudins、ZO-1 的蛋白表达水平有关。

该实验显示盐酸小檗碱可以明显改善肝脏和回肠的病理特征,并能提高回肠中 Claudins、ZO-1 的 mRNA 和蛋白表达水平。这说明盐酸小檗碱对肝纤维化大鼠肠道黏膜屏障具有保护作用,其机制可能与其改善回肠中 Claudins、ZO-1 的表达有关。

参考文献

- [1] 田志良,秦春宏. 肝纤维化的诊断研究进展 [J]. 西南军医, 2018,20(3):379-82.
- [2] 张玲玲. 糖皮质激素受体伴侣蛋白 FKBP51 通过线粒体自噬调节小鼠 CCl₄ 诱导的肝脏纤维化 [J]. 北京:北京协和医学院,2017.
- [3] Chen P, Chen Y, Wang Y, et al. Comparative evaluation of hepatoprotective activities of geniposide, crocins and crocetin by CCl₄-induced liver injury in mice [J]. Biomol Ther (Seoul), 2016, 24(2):156-62.
- [4] 石鼎. 肝硬化患者十二指肠微生态及益生菌干预肝纤维化机制研究 [J]. 杭州:浙江大学,2018.
- [5] 罗方云,黄晨恺,朱莹. 肝硬化与肠屏障功能障碍相互影响的研究进展 [J]. 广东医学,2017,38(22):3543-6.
- [6] 朱超霞,仓桢,加孜热亚·再依拿提,等. 盐酸小檗碱对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病大鼠肠道菌群的影响 [J]. 上海交通大学学报(医学版),2015,35(4):483-8.
- [7] 黄佩. 黄连煎剂对代谢综合征 SD 大鼠肠道菌群及 GPR43 通路 glp-1 和 pyy 的影响 [J]. 北京:北京中医药大学,2017.
- [8] 万星,郭琼,刘向东,等. 鬼箭羽醇提物对四氯化碳诱导小鼠肝纤维化模型的作用 [J]. 中国药理学通报,2018,34(4):485-90.
- [9] Cao H, Li S L, Xie R, et al. Exploring the mechanism of Dang-guiliuhuang Decoction against hepatic fibrosis by Network Pharmacology and experimental validation [J]. Front Pharmacol, 2018, 9:187-97.
- [10] 李芳群. 肝纤维化大鼠肠道上皮屏障变化及贯叶连翘提取物保护作用研究 [J]. 合肥:安徽医科大学,2016.
- [11] 周莹,王振常. 从改善肠黏膜屏障论大黄煎保留灌肠治疗肝硬化自发性细菌性腹膜炎 [J]. 山东中医杂志,2018,37(6):452-5.
- [12] 崔勇鹤,孙少明,李占武,等. 肠道上皮细胞在肠道免疫屏障中的维护及炎性肠病发生机制 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2019,27(2):160-2.
- [13] Manabe A, Furukawa C, Endo S, et al. Chlorpheniramine increases paracellular permeability to marker fluorescein lucifer yellow mediated by internalization of Occludin in murine colonic epithelial cells [J]. Biol Pharm Bull, 2017, 40(8):1299-305.
- [14] Li X F, Zhang X J, Zhang C, et al. Ulinastatin protects brain against cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibiting MMP-9 and alleviating loss of ZO-1 and occludin proteins in mice [J]. Exp Neurol, 2018, 302:68-74.
- [15] 邹小慧,陆付耳,舒婷婷,等. 小檗碱改善肠黏膜屏障损伤及其可能机制的实验研究 [J]. 武汉大学学报(医学版),2018,39(2):207-12,218.

Protective effect of berberine hydrochloride on intestinal mucosal barrier in rats with hepatic fibrosis

Li Zhen¹, Liu Wei², Hou Guiqin²

(¹Dept of Pharmacy, Nanyang Central Hospital, Nanyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Nanyang 473000; ²School of Pharmacy, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001)

Abstract Objective To investigate the protective effects of berberine hydrochloride on intestinal mucosal barrier in rats with liver fibrosis and explore its mechanism. **Methods** Rats were randomly divided into control group (CON group), model group (MOD group), lactulose oral liquid group (LOL group) and berberine hydrochloride group (BH group). In addition to CON group, other groups established liver fibrosis models. In the LOL group, the lactulose oral liquid was administered at a dose of 100 mg/kg, the BH group was administered with berberine liquid at a dose of 150 mg/kg, and the CON group and the MOD group were orally administered with normal saline at a dose of 10 ml/kg. Each group was continuously administered for 12 weeks. After gastric administration, liver index and spleen index were calculated. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), sodium hyaluronate (HA), laminin (LN), type IV collagen (IV-C) and endotoxin in

网络出版时间: 2019-12-2 13:42 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20191126.1716.011.html>

PERK 在肝癌中的表达及其 对肝癌细胞侵袭和索拉菲尼抵抗的影响

周 珩, 鲁倩倩, 范璐璐, 孙国平

摘要 目的 观察蛋白激酶 RNA 样内质网激酶 (PERK) 在肝细胞癌和对应癌旁组织中的表达, 探究 PERK 基因在肝癌细胞侵袭和索拉菲尼抵抗中的作用。方法 免疫组化法检测 PERK 在人肝癌组织中的表达水平并分析其表达差异与临床病理特征之间的关联性; 利用脂质体转染干扰序列至肝癌细胞, 分为 3 组: 对照组、si-NC 转染组、si-PERK 转染组, Western blot 分析 HepG2 细胞基质金属蛋白酶-2 (MMP2) 和基质金属蛋白酶-9 (MMP9) 的表达变化, Transwell 小室法检查肝癌细胞的侵袭性能; HepG2 细胞转染干扰序列后作用于索拉菲尼, 分为 4 组: 对照组、索拉菲尼组、索拉菲尼 + si-NC 转染组、索拉菲尼 + si-PERK 转染组, 流式细胞术分析各组凋亡细胞比率。结果 相比于癌旁组织, PERK 在肝癌组织中明显高表达, 同时 PERK 高表达与肿瘤的血管侵犯具有关联性; 相比于对照组和 si-NC 转染组, si-PERK 转染组 MMP2 和 MMP9 的蛋白表达明显降低、侵袭的细胞数目减少; PERK 的沉默显著提高 HepG2 细胞在索拉菲尼诱导下发生的凋亡。结论 PERK 蛋白在肝癌组织中高表达且与肿瘤的侵袭能力和索拉菲尼抵抗密切相关。

关键词 肝细胞癌; 蛋白激酶 RNA 样内质网激酶; 侵袭; 索

拉菲尼抵抗

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)12-1893-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.011

肝细胞癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一, 其发病率在所有肿瘤中排第六位, 但在肿瘤所致死亡原因中高居第二位, 肝癌患者 5 年生存率极低, 预后相比于其他肿瘤较差^[1]。肝癌细胞的高侵袭性和高频率发生的药物抵抗可能是肝细胞癌呈高度恶性的原因。基质金属蛋白酶介导的细胞外基质和基底膜降解参与肿瘤细胞侵袭的过程, 肿瘤细胞借助降解的屏障发生侵袭、转移等^[2]。另外, 肿瘤细胞可以通过细胞内一系列适应性机制应对缺氧、药物等不良刺激减少凋亡的发生以介导化疗抵抗。因此, 对肝癌细胞侵袭能力和化疗抵抗的相关机制研究将有益于提高肝细胞癌患者的预后和疗效^[3]。蛋白激酶 RNA 样内质网激酶 (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK) 是一种内质网跨膜蛋白, 细胞内外各种病理因素所诱导的内质网应激可以激活 PERK 的表达。PERK 广泛参与到肿瘤细胞凋亡和增殖、细胞存活、肿瘤微血管形成和肿瘤细胞的浸润、转移等生物事件中^[4]。因此, 分析 PERK 在肝癌中的表达及其与肿瘤生物学特征的关

2019-07-19 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81872047)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院肿瘤科, 合肥 230022

作者简介: 周 珩, 男, 硕士研究生;

孙国平, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: sungp@ahmu.edu.cn

serum of rats in each group were detected. Liver and ileal pathological changes were observed by HE staining. Real time-PCR and Western blot were used to detect the expression of mRNA and protein of occlusion protein (Occludin) and atresia connexin-1 (ZO-1) in ileum. **Results** Lactulose oral liquid and berberine could alleviate the liver index and spleen index of rats in different degrees ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Lactulose oral liquid and berberine could reduce the levels of ALT, AST and ALP in serum ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Lactulose oral liquid and berberine could reduce the content of HA, LN, IV-C and endotoxin in rat serum ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Lactulose oral liquid and berberine improve the structure of rat hepatocytes, hepatic lobules and hepatic cords, and could reduce inflammatory cell infiltration. Lactulose oral liquid and berberine could reduce collateral intestinal mucosal congestion, edema and inflammatory cell infiltration. Both lactulose oral liquid and berberine increased the expression of Claudins and ZO-1 mRNA and protein in rat ileum ($P < 0.01$, $P < 0.05$). **Conclusion** Berberine hydrochloride has protective effects on intestinal mucosal barrier in rats with liver fibrosis, and its mechanism may be related to the regulation of the expression of intestinal barrier proteins Claudins and ZO-1.

Key words berberine hydrochloride; liver fibrosis; intestinal mucosal barrier; mechanism