

· 论著 ·

缺氧 / 再复氧与脂多糖激活肠上皮细胞核转录因子 κ B 和低氧诱导因子 -1α 信号通路以及大黄素对其的干预作用

祁蕾 苑博 傅强

【摘要】 目的 以缺氧 / 再复氧(H/R)和脂多糖(LPS)刺激人结肠上皮细胞株(FHC)模拟体内肠上皮细胞遭受缺血、缺血 / 再灌注和炎症打击的病理过程,探讨大黄素干预的可能作用靶点。**方法** 常氧组:在 37 °C 下用 95%空气和 5%CO₂ 培养。缺氧(H)组:于 37 °C 下用 1%O₂、5%CO₂ 和 94%N₂ 的混合厌氧气体使细胞缺氧 1、2、3、4 h。H + LPS 组:在 H 组基础上给予 LPS 1 mg/L 刺激。H/R 组:于缺氧 3 h 后分别复氧 1、2、3、4 h。H/R+LPS 组:在 H/R 基础上给予 LPS 1 mg/L 刺激。大黄素干预组:在 H3 h/R2 h + LPS 基础上给予 20、40、60、80 μ mol/L 大黄素进行干预。用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测磷酸化核转录因子 κ B(NF- κ B)抑制蛋白 $-\alpha$ (pI κ B- α)、磷酸化 NF- κ Bp65(pNF- κ Bp65)、环氧合酶-2(COX-2)、低氧诱导因子 -1α (HIF- 1α)蛋白表达。相差显微镜下观察各组肠上皮细胞的形态学改变;用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测大黄素对肠上皮细胞增殖情况的影响。**结果** ① H 组:pI κ B- α 、pNF- κ Bp65、COX-2 表达量均于 H1 h 达峰值,分别为 0.350 ± 0.018 、 1.083 ± 0.054 、 0.903 ± 0.045 ,然后递减(F 值分别为 3.011、7.247、5.754, P 值分别为 0.013、0.000、0.005);HIF- 1α 在 H3 h 表达最高(1.511 ± 0.076),但各时间点间比较无差异($F=1.881$, $P=0.062$)。H + LPS 组:pI κ B- α 、pNF- κ Bp65、COX-2、HIF- 1α 表达量均随缺氧时间延长而增加,H3 h 达峰值,分别为 0.504 ± 0.025 、 1.255 ± 0.063 、 0.812 ± 0.041 、 1.209 ± 0.075 (F 值分别为 2.683、8.774、9.765、2.432, P 值分别为 0.011、0.000、0.000、0.026)。H/R 组:随着再复氧时间延长,pI κ B- α 、pNF- κ Bp65、COX-2 表达递减,于 H3 h/R4 h 降至最低,分别为 0.712 ± 0.034 、 1.202 ± 0.048 、 0.691 ± 0.042 (F 值分别为 1.923、6.765、2.719, P 值分别为 0.063、0.000、0.016);与 H 组相比,H/R 组 HIF- 1α 在再复氧过程中表达明显减少,但各时间点间无差异($F=1.280$, $P=0.081$)。H/R+LPS 组:随着再复氧时间延长,pI κ B- α 、pNF- κ Bp65、COX-2、HIF- 1α 并无降解,于 R2 ~ 3 h 达峰值,分别为 3.302 ± 0.061 、 2.315 ± 0.055 、 2.017 ± 0.043 、 2.413 ± 0.098 (F 值分别为 4.614、1.652、5.970、2.076, P 值分别为 0.001、0.067、0.000、0.037)。大黄素共同干预组:大黄素可以抑制 NF- κ B 和 HIF- 1α 通路蛋白表达,存在量效关系($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。80 μ mol/L 大黄素可使 pI κ B- α 、pNF- κ Bp65、COX-2、HIF- 1α 蛋白表达量降至最低,分别为 2.599 ± 0.130 、 1.772 ± 0.089 、 2.590 ± 0.129 、 2.518 ± 0.125 ;大黄素后处理细胞则无此效果。② 经过 H/R+LPS 处理的细胞内发生空泡样变、形态改变、细胞融合,相比 H 组生长速度缓慢。③ MTT 法检测结果显示,20 ~ 80 μ mol/L 大黄素对细胞增殖无明显影响,说明大黄素在此浓度范围不仅产生了生物学效应,且对细胞无药物毒性。**结论** 缺氧或炎症均可激活 HIF- 1α 的缺氧通路和 NF- κ B 的炎症通路,在 H/R 过程中,这两条通路蛋白随着再复氧时间延长表达降低,但在 H/R+LPS 过程中蛋白仍相对高表达,缺血 / 再灌注损伤可能与内毒素共同作用破坏肠上皮细胞,导致肠源性脓毒症的发生。在炎症早期阶段而非晚期阶段,用大黄素可以阻断 NF- κ B/HIF- 1α -COX-2 信号通路,从而发挥抗炎作用。

【关键词】 脂多糖; 低氧诱导因子 -1α ; 肠上皮细胞; 环氧合酶-2; 核转录因子 κ B; 大黄素

Hypoxia/reoxygenation and lipopolysaccharide induced nuclear factor- κ B and hypoxia-inducible factor- 1α signaling pathways in intestinal epithelial cell injury and the interventional effect of emodin Qi Lei*, Yuan Bo, Fu Qiang. * Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Corresponding author: Fu Qiang, Tianjin Fourth Centre Hospital, Tianjin 300140, China, Email: fq@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To observe pathological process of intestinal epithelial cells subjected to ischemia, ischemia/reperfusion injury and inflammation simulated hypoxia/reoxygenation (H/R) and lipopolysaccharide (LPS) challenged human fetal normal colonic cell (FHC) line in vivo, and to observe the changes when the assaulted intestinal epithelial cells were treated with emodin, in order to explore the possible intervention targets of emodin. **Methods** Normoxia group: the FHC cells were cultured in 95% air and 5% CO₂ at 37 °C. Hypoxia (H) group: the cells were

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.06.009

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973)项目(2009CB522703)

作者单位:300070 天津医科大学(祁蕾、苑博);300140 天津市第四中心医院(傅强)

通信作者:傅强,Email: fq@medmail.com.cn

cultured with a mixed anaerobic gas of 1% O₂, 5% CO₂ and 94% N₂ at 37 °C for 1, 2, 3, 4 hours. H + LPS group: the cells were cultured in hypoxic condition as H group with simultaneous challenge of LPS (1 mg/L). H/R group: the cells were cultured in hypoxia for 3 hours followed by reoxygenation for 1, 2, 3 and 4 hours, respectively. H/R + LPS group: the cells were cultured in H/R as H/R group and LPS (1 mg/L) simultaneously. Emodin intervention group: the cells were cultured in H3 h/R2 h + LPS and emodin (20, 40, 60, 80 μmol/L) simultaneously. The variation trends of phosphorylation nuclear factor-κB pIκB-α, phosphorylation NF-κBp65 (pNF-κBp65) and their downstream target gene cyclooxygenase-2 (COX-2), and hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) were determined by Western Blot. The morphological changes in intestinal epithelium in different groups were observed using light microscope. The effect of emodin on the proliferation of intestinal epithelial cell was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. **Results** ① H group: the expressions of pIκB-α, pNF-κBp65 and COX-2 were upregulated, peaking at H1 h (0.350 ± 0.018, 1.083 ± 0.054, 0.903 ± 0.045), and then they gradually lowered (*F* value was 3.011, 7.247, 5.754, *P* value was 0.013, 0.000, 0.005, respectively). The expression of HIF-1α peaked at H3 h (1.511 ± 0.076), but there was no significant difference among different groups (*F*=1.881, *P*=0.062). H + LPS group: the expressions of pIκB-α, pNF-κBp65, COX-2, HIF-1α were increased with elongation of duration of hypoxia, and a maximal induction was observed at H3 h (0.504 ± 0.025, 1.255 ± 0.063, 0.812 ± 0.041, 1.209 ± 0.075, *F* value was 2.683, 8.774, 9.765, 2.432, and *P* value was 0.011, 0.000, 0.000, 0.026, respectively). H/R group: with the prolonged duration of reoxygenation, the expressions of NF-κB signaling pathway proteins (pIκB-α, pNF-κBp65, COX-2) were decreased and dropped to nadir at H3 h/R4 h (0.712 ± 0.034, 1.202 ± 0.048, 0.691 ± 0.042, *F* value was 1.923, 6.765, 2.719, and *P* value was 0.063, 0.000, 0.016, respectively). Compared with H group, HIF-1α was decreased with a prolonged duration of reoxygenation in H/R group, but there was no significant difference in value among different time points (*F*=1.280, *P*=0.081). H/R + LPS group: pIκB-α, pNF-κBp65, COX-2, HIF-1α showed no sign of degradation with the prolonged duration of reoxygenation, and their expression increased to maximum analogously at R2-3 h (3.302 ± 0.061, 2.315 ± 0.055, 2.017 ± 0.043, 2.413 ± 0.098, *F* value was 4.614, 1.652, 5.970, 2.076, and *P* value was 0.001, 0.067, 0.000, 0.037, respectively). Emodin group: emodin when co-treated with H/R + LPS inhibited the expression of HIF-1α and NF-κB pathways with a dose-effect relationship (*P*<0.05 or *P*<0.01). Emodin at the dose of 80 μmol/L showed most marked inhibition (2.599 ± 0.130, 1.772 ± 0.089, 2.590 ± 0.129, 2.518 ± 0.125). However, after treatment of emodin did not show such effect. ② After treatment with H/R + LPS, there were morphological changes in cells: vacuoles, deformation and fusion. The speed of cell growth became much slower compared with H group. ③ Emodin (20-80 μmol/L) had no significant effect on cell proliferation. Although emodin produced biological effect in this concentration range, it had no cellular toxicity. **Conclusions** Both hypoxia and inflammation can activate the hypoxia pathway of HIF-1α and the pro-inflammatory pathway of NF-κB, but different stimuli cause varying degrees of activation in these two pathways. In H/R group, both pathways were weakened during reoxygenation. However, in H/R + LPS group, the proteins remained to show a relatively high expression during the process of reoxygenation. This may be related to the pathophysiological mechanism of intestinal ischemia/reperfusion injury: hypoxia/reperfusion injury and LPS act together to destroy the intestinal epithelial cells and induce gut-derived sepsis. Emodin may inhibit inflammation by blocking HIF-1α/NF-κB-COX-2 signaling pathways.

[Key words] Lipopolysaccharide; Hypoxia-inducible factor-1α; Intestinal epithelial cell; Cyclooxygenase-2; Nuclear factor-κB; Emodin

到目前为止,脓毒症的发病率和病死率仍然很高^[1-2],如何有效预防和早期控制脓毒症的进展就成为研究的重点。临床上发现,不仅在腹腔感染,而且在应激、烧伤、休克、创伤等危重疾病情况下,肠道都是首当其冲的靶点,缺血和炎症损伤造成肠屏障功能破坏,导致细菌和内毒素移位及序贯的急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、全身炎症反应综合征(SIRS)、脓毒症和多器官功能障碍综合征(MODS)^[3]。在各种危重病的病理生理过程中都涉及肠道缺血/再灌注(I/R)损伤,因此,治疗肠道损伤成为攻克脓毒症的方向之一。

近年来研究显示,低氧诱导因子-1α(HIF-1α)是一个进化高度保守的转录因子,在机体因素的调节也可影响 HIF-1α 表达,相关研究包括炎症反应、

脓毒症及缺氧所致肺损伤等疾病中起关键作用^[4-8]。近年来国内关于 HIF-1α 在肿瘤方面和血管病方面的作用也有很多新的报道^[9-12]。核转录因子-κB(NF-κB)除与炎症反应相关外,在缺氧时其表达也会增高,且与 HIF-1α 相互作用。缺氧诱导的炎症^[13]和炎症所致缺氧^[14]已被更多人认识。本研究采用缺氧、缺氧/再复氧(H/R)和脂多糖(LPS)处理人结肠上皮细胞株(FHC)来模拟体内肠上皮细胞遭受缺血、I/R 和炎症打击的病理过程,研究 HIF-1α 和 NF-κB 通路及其下游共同的靶基因环氧化酶-2(COX-2)在此过程中的变化规律,探讨大黄素阻断这两条炎症通路的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验材料:FHC 细胞株从美国模式培养物保藏

所(ATCC)购进。LPS(E. Coli, O111:B4, 美国 Sigma 公司), HIF-1 α 抗体、COX-2 抗体(美国 NOVUS 公司), 磷酸化 NF- κ Bp65(pNF- κ Bp65)抗体、磷酸化 NF- κ B 抑制蛋白- α (pI κ B- α)抗体(美国 Cell Signaling 公司), β -微管蛋白(β -tubulin)抗体(天津三箭生物技术有限公司), 辣根过氧化物酶(HRP)标记抗兔或小鼠的二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司), 大黄素(天津市药品检验所)。

1.2 细胞培养和实验分组: FHC 细胞株用含 10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司)的 DMEM/F12 培养基培养。常氧组: 在 37 $^{\circ}$ C 下用 95% 空气和 5% CO₂ 培养细胞。缺氧组(H 组): 在 37 $^{\circ}$ C 下用 1% O₂、5% CO₂ 和 94% N₂ 的混合厌氧气体使细胞分别缺氧 1、2、3、4 h。H + LPS 组: 在 H 组基础上给予 1 mg/L LPS(前期实验证实该浓度是在 0.01 ~ 1 000 mg/L 范围内能使 HIF-1 α 和 COX-2 达峰值的浓度)。H/R 组: 缺氧 3 h 后分别再复氧 1、2、3、4 h。H/R + LPS 组: H/R + LPS (1 mg/L)。大黄素干预组: 在缺氧 3 h、再复氧 2 h (H3 h/R2 h) LPS 的同时给予不同浓度大黄素(20、40、60、80 μ mol/L)共同作用 5 h 或在 H3 h/R2 h 与 LPS 共同作用 5 h 后给予不同浓度大黄素干预 2 h。

1.3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测蛋白含量: 用细胞裂解液提取细胞内总蛋白, BCA 法定量蛋白浓度。取 30 μ g 样品上样, 经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 电转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上, 用含有 5% 脱脂奶粉或 5% 牛血清白蛋白封闭 2 h 后, 分别加入 HIF-1 α 抗体(1:1 000)、COX-2 抗体(1:1 000)和 β -tubulin 抗体(1:5 000), pNF- κ Bp65 抗体(1:1 000)、pI κ B- α 抗体(1:1 000), 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, HRP 标记的相应二抗(1:5 000)于室温孵育 1 h, 化学发光(ECL)试剂显色。采用 Tanon 软件分析, 测量蛋白条带的吸光度(A)值, 目的蛋白的相对表达量以目的蛋白与 β -tubulin 的 A 值比值表示。

1.4 细胞形态观察: 用 1% O₂ 混合厌氧气体 + H3 h/R2 h + LPS 处理细胞, 在相差显微镜下观察细胞形态改变。

1.5 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测

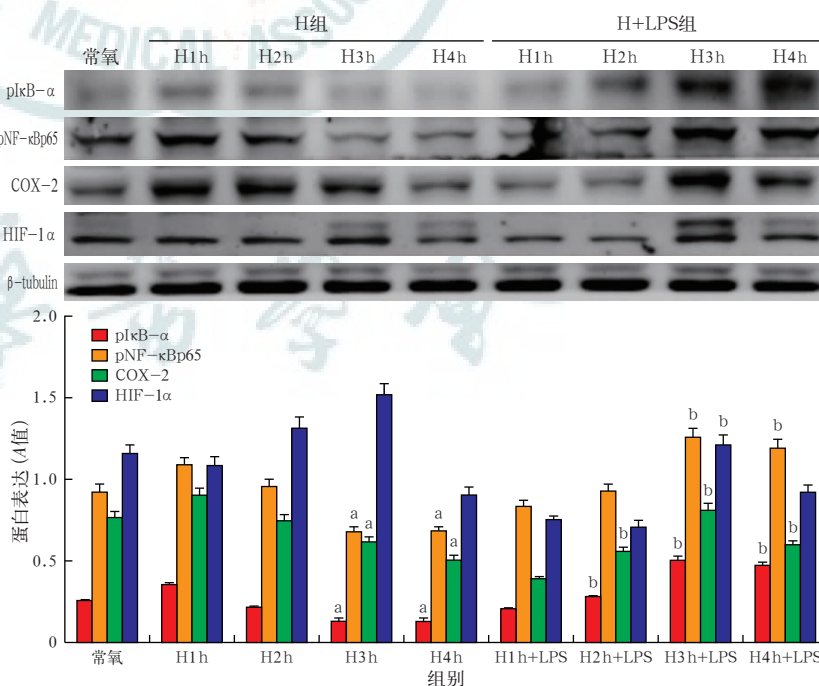
不同浓度大黄素对细胞增殖的影响: 调整细胞悬液浓度, 使细胞密度为 5×10^3 个/孔; 孵育至细胞对数生长期, 加入不同浓度大黄素(20、40、60、80 μ mol/L)孵育 6 h, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 遍, 每孔加入 0.5% MTT 溶液继续培养 2 h; 终止培养, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。用酶联免疫检测仪测量各孔细胞的 A 值。

1.6 统计学处理: 用 SPSS 16.0 统计软件处理数据。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较先进行方差齐性检验, 方差齐用 Dunnett *t* 检验, 不齐用 Mann-Whitney *U* 检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 NF- κ B、HIF-1 α 通路变化趋势

2.1.1 H 组(图 1): 与常氧组相比, H1 h 时 NF- κ B 通路 pI κ B- α 、pNF- κ Bp65 和 COX-2 的表达量均增高达峰值(0.350 ± 0.018 、 1.083 ± 0.054 、 0.903 ± 0.045); 随缺氧时间的延长, 各蛋白表达量均逐渐减少(pI κ B- α : $F=3.011$, $P=0.013$; pNF- κ Bp65: $F=7.247$, $P=0.000$; COX-2: $F=5.754$, $P=0.005$)。H3 h 时 HIF-1 α 表达量最高(1.511 ± 0.076), 但各缺氧时间点间差异无统计学意义($F=1.881$, $P=0.062$)。



注: LPS 为脂多糖, pI κ B- α 为磷酸化核转录因子- κ B 抑制蛋白- α , pNF- κ Bp65 为磷酸化核转录因子- κ Bp65, COX-2 为环氧化酶-2, HIF-1 α 为低氧诱导因子-1 α , β -tubulin 为 β -微管蛋白; 与 H2 h 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 H1 h + LPS 组比较, ^b $P < 0.05$

图 1 蛋白质免疫印迹试验检测缺氧(H)预处理不同时间点对 LPS 诱导肠上皮细胞 pI κ B- α 、pNF- κ Bp65、COX-2 和 HIF-1 α 蛋白表达的影响

2.1.2 H + LPS 组(图 1):随着缺氧时间的延长,培养细胞中 pI κ B- α 、pNF- κ Bp65、COX-2、HIF-1 α 的蛋白表达量均增加,至 H3 h 时达峰值(0.504 ± 0.025 、 1.255 ± 0.063 、 0.812 ± 0.041 、 1.209 ± 0.075),随后各指标均逐渐减少(pI κ B- α : $F=2.683$, $P=0.011$; pNF- κ Bp65: $F=8.774$, $P=0.000$; COX-2: $F=9.765$, $P=0.000$; HIF-1 α : $F=2.432$, $P=0.026$)。

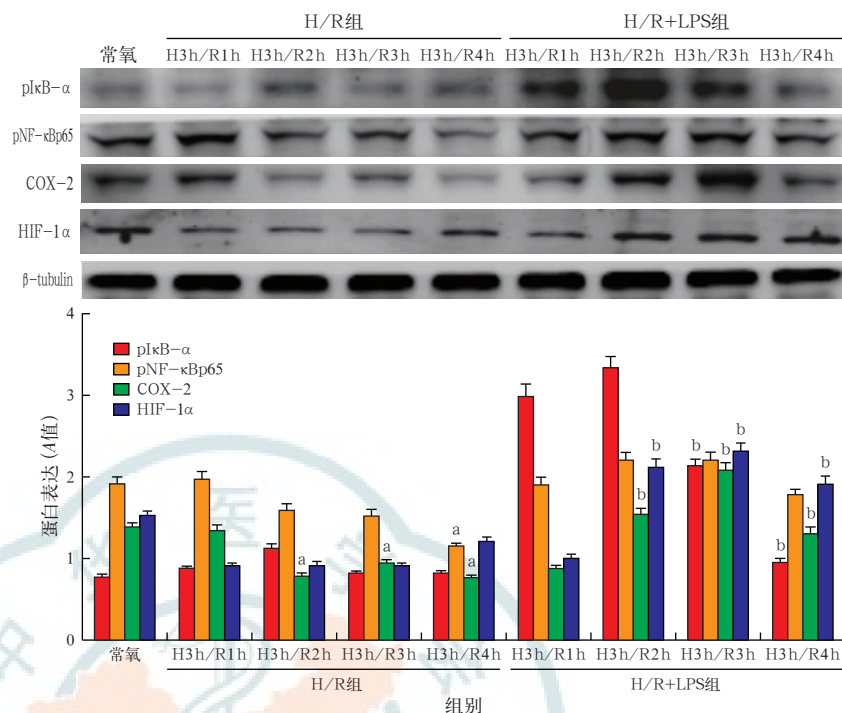
2.1.3 H/R 组(图 2):随着再复氧时间的延长,培养细胞中 pI κ B- α 、pNF- κ Bp65、COX-2 表达均呈递减趋势,R4 h 时表达量降至最低,分别为 0.712 ± 0.034 、 1.202 ± 0.048 、 0.691 ± 0.042 (pI κ B- α : $F=1.923$, $P=0.063$; pNF- κ Bp65: $F=6.765$, $P=0.000$; COX-2: $F=2.719$, $P=0.016$)。再复氧过程中 HIF-1 α 无明显变化($F=1.280$, $P=0.081$),但较 H 组明显减少。

2.1.4 H/R + LPS 组(图 2):加 LPS 后,随再复氧时间的延长,培养细胞中 pI κ B- α 、pNF- κ Bp65、COX-2、HIF-1 α 蛋白均无降解,均呈持续高表达状态,而且变化趋势相似,在 H3 h/R2 ~ 3 h 时表达量最高,分别为 3.302 ± 0.061 、 2.315 ± 0.055 、 2.017 ± 0.043 、 2.413 ± 0.098 (pI κ B- α : $F=4.614$, $P=0.001$; pNF- κ Bp65: $F=1.652$, $P=0.067$; COX-2: $F=5.970$, $P=0.000$; HIF-1 α : $F=2.076$, $P=0.037$)。在相同时间点,加 LPS 比不加 LPS 的蛋白表达量高。

2.1.5 大黄素预处理组(图 3):加 LPS 与 大黄素后,随着大黄素浓度递增,pI κ B- α 、pNF- κ Bp65、COX-2、HIF-1 α 表达均递减(pI κ B- α : $F=3.118$, $P=0.029$; pNF- κ Bp65: $F=9.810$, $P=0.000$; COX-2: $F=2.091$, $P=0.053$; HIF-1 α : $F=2.878$, $P=0.044$)。给予 80 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素时,pI κ B- α 、pNF- κ Bp65、COX-2、HIF-1 α 蛋白表达降至最低,分别为 2.599 ± 0.130 、 1.772 ± 0.089 、 2.590 ± 0.129 、 2.518 ± 0.125 。

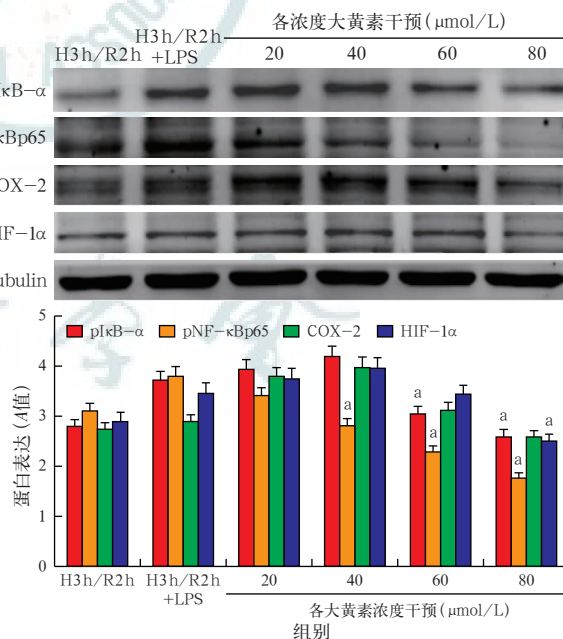
2.1.6 大黄素后处理组(图 4):不同浓度大黄素后处理对 NF- κ B 和 HIF-1 α 通路蛋白的表达并无抑制作用,反而使个别指标表达增高。

2.2 细胞形态变化及大黄素对细胞增殖的影响:常氧组细胞培养基颜色变黄,说明生长速度快,代谢旺



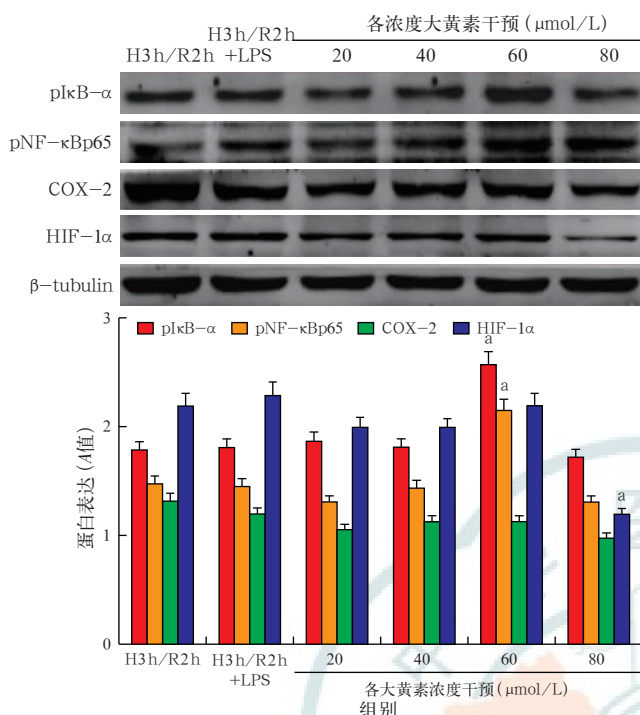
注: H/R 为缺氧/再复氧, LPS 为脂多糖, pI κ B- α 为磷酸化核转录因子- κ B 抑制蛋白- α , pNF- κ Bp65 为磷酸化核转录因子- κ Bp65, COX-2 为环氧化酶-2, HIF-1 α 为低氧诱导因子-1 α , β -tubulin 为 β -微管蛋白; 与 H3 h/R1 h 组比较, $^a P<0.05$; 与 H3 h/R1 h + LPS 组比较, $^b P<0.05$

图 2 蛋白质免疫印迹试验检测 H/R 对 LPS 诱导肠上皮细胞 pI κ B- α 、pNF- κ Bp65、COX-2 和 HIF-1 α 蛋白表达的影响



注: H/R 为缺氧/再复氧, LPS 为脂多糖, pI κ B- α 为磷酸化核转录因子- κ B 抑制蛋白- α , pNF- κ Bp65 为磷酸化核转录因子- κ Bp65, COX-2 为环氧化酶-2, HIF-1 α 为低氧诱导因子-1 α , β -tubulin 为 β -微管蛋白; 与 H3 h/R2 h + LPS 组比较, $^a P<0.05$

图 3 蛋白质免疫印迹试验检测不同浓度大黄素对 H/R + LPS 共同干预肠上皮细胞 pI κ B- α 、pNF- κ Bp65、COX-2 和 HIF-1 α 蛋白表达的影响



注: H/R 为缺氧/再复氧, LPS 为脂多糖, pIκB-α 为磷酸化核转录因子-κB 抑制蛋白-α, pNF-κBp65 为磷酸化核转录因子-κBp65, COX-2 为环氧化酶-2, HIF-1α 为低氧诱导因子-1α,

β-tubulin 为 β-微管蛋白; 与 H3 h/R2 h + LPS 组比较, ^aP<0.05

图 4 蛋白质免疫印迹试验检测不同浓度大黄素对 H/R + LPS 诱导肠上皮细胞 pIκB-α、pNF-κB p65、COX-2 和 HIF-1α 蛋白表达的影响

盛; 细胞形态规则完整。H3 h/R2 h + LPS 组细胞培养基颜色仍为红色; 细胞形态不规整、细胞融合、胞质空泡样变。加入 20、40、60、80 μmol/L 大黄素后, 细胞活性 (A 值: 0.89 ± 0.03 、 0.88 ± 0.04 、 0.91 ± 0.03 、 0.83 ± 0.03) 与空白对照组 (0.95 ± 0.02) 比较差异无统计学意义 ($F=1.940$, $P=0.083$)。说明在此浓度范围的大黄素不仅产生了生物学效应, 且对细胞无药物毒性作用, 未影响细胞活性。

3 讨论

缺氧与炎症的交互作用是复杂的双向系统^[15-17], 可以通过下列机制完成: ① 局部炎症造成毛细血管渗漏、组织水肿、血管炎、血管收缩、微循环障碍, 导致氧供减少, 同时炎性细胞大量聚集、吞噬会造成氧耗增加, 最终导致氧供需失衡, 故炎症会导致缺氧。② 缺氧状态激活 NF-κB 和 HIF-1α 等转录因子, 进而调节下游炎症相关靶基因的表达, 故缺氧会导致炎症^[18], 此概念被更多人接受^[13]。

作为缺氧和炎症的两条经典信号通路, HIF-1α 与 NF-κB 的作用是交互的、多水平的, HIF-1α 可以激活 NF-κB, NF-κB 通过控制 HIF-1α 的表达, 与其通路上游因子相互调节^[19-21]。NF-κB 和 HIF-1α 均可

以调节下游靶基因 COX-2 的表达^[22-23]。

不同的刺激条件和刺激程度可能会激活不同的信号通路, 激活的程度也不同。本实验证实, H 组和 H/R 组中 COX-2 与 pIκB-α、pNF-κBp65 的变化趋势一致, 说明 COX-2 受 NF-κB 调节, 或者主要受此通路的调节。在 H + LPS 组和 H/R + LPS 组中, COX-2 与 pNF-κBp65、HIF-1α 的变化趋势大致相同, 说明两条通路可能共同调节 COX-2 的表达, 从而促进炎症反应。关于不同实验条件或不同刺激程度对不同通路激活的差异还有待深入研究。另外, 与 H/R 组相比, H/R + LPS 组的炎症相关蛋白持续高表达, 这可能与肠 I/R 损伤机制相关^[5]。

肠道是研究缺氧与炎症相互关系的天然器官: ① 肠道固有层有丰富的血液供应, 而肠腔内却是缺氧环境, 相对其他类型细胞, 肠上皮细胞的跨细胞氧梯度更大。即使在生理状态下, 肠上皮细胞也存在生理性缺氧。② 肠道内容物中存在大量细菌及毒素, 肠道相关淋巴组织时刻受到外界抗原的刺激, 而且肠道是外周最大的免疫器官, 故肠道与炎症、免疫反应的关系密切。Colgan 和 Taylor^[14]就曾提出, 肠道是生理性缺氧和炎症性缺氧的双重器官。

肠屏障功能是机体的第一道防线, 由机械屏障、化学屏障、免疫屏障与生物屏障共同构成, 以机械屏障最为重要。机械屏障是指完整的彼此紧密连接的肠黏膜上皮结构, 上皮紧密连接是由紧密连接蛋白如 Occludin、Claudins、ZO 等构成的相邻细胞间连接复合体^[24-27]。在危重病中, 肠屏障功能的破坏会使大量的细菌和内毒素入血, 造成肠源性脓毒症。故保护肠屏障功能至关重要^[28-29]。

研究表明, 大黄素具有抗肿瘤和抗病毒等多种功效^[30-32], 而大黄的肠道保护作用也早就被临床医生发现, 相关文献也有报道^[33-34], 但其机制尚不明确。本实验证实了中药大黄的有效提取成分大黄素可以阻断由于缺氧或炎症所引起的肠上皮细胞 NF-κB 和 HIF-1α 通路的激活, 抑制炎症反应, 保护肠上皮细胞, 从而改善肠屏障功能。

参考文献

- [1] Kumar G, Kumar N, Taneja A, et al. Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007) [J]. Chest, 2011, 140(5): 1223-1231.
- [2] Hall MJ, Williams SN, DeFrances CJ, et al. Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals [J]. NCHS Data Brief, 2011(62): 1-8.
- [3] Köksoy C, Kuzu MA, Kuzu I, et al. Role of tumour necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischaemia-reperfusion [J]. Br J Surg, 2001, 88(3): 464-468.
- [4] Shimoda LA, Semenza GL. HIF and the lung: role of hypoxia-

- inducible factors in pulmonary development and disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 183(2): 152-156.
- [5] Koury J, Deitch EA, Homma H, et al. Persistent HIF-1 α activation in gut ischemia/reperfusion injury: potential role of bacteria and lipopolysaccharide [J]. Shock, 2004, 22(3): 270-277.
- [6] 朱海云, 郑贵军, 李银平, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠低氧诱导因子-1 α 及其靶基因诱导型一氧化氮合酶表达的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17(2): 96-98.
- [7] 朱海云, 李银平. 缺氧诱导因子及其在炎症中的作用进展 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17(1): 60-62.
- [8] 杨生岳, 冯恩志, 闫自强, 等. 低氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子在玉树地震救援人员急性高原反应低氧性肺动脉高压发生中的作用 [J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23(9): 539-542.
- [9] 吴洁玲, 韩璐, 杨丽肖. 雷帕霉素联合顺铂对宫颈癌 Hela 细胞生长和对 HIF-1 α 与 VEGF 表达影响的观察 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(14): 1075-1078.
- [10] 俸瑞发, 柏璐, 刘晓萌, 等. HIF-1 α 对乳腺癌细胞增殖及血管生成影响的探讨 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(15): 1158-1161.
- [11] 范学政, 黄进能, 张鉴文, 等. 缺氧诱导因子-1 α 、基质金属蛋白酶-9、血管内皮生长因子在大鼠脑动脉瘤中的表达及强力霉素抑制动脉瘤形成的研究 [J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(6): 1320.
- [12] 陆文宝, 鲁雄兵, 余义, 等. 肾透明细胞癌多层螺旋 CT 征象与缺氧诱导因子-1 α 和血管内皮生长因子蛋白表达的关系 [J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(12): 2537-2539.
- [13] Karhausen J, Haase VH, Colgan SP. Inflammatory hypoxia: role of hypoxia-inducible factor [J]. Cell Cycle, 2005, 4(2): 256-258.
- [14] Colgan SP, Taylor CT. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010, 7(5): 281-287.
- [15] Frede S, Stockmann C, Freitag P, et al. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF- κ B [J]. Biochem J, 2006, 396(3): 517-527.
- [16] Sumbayev VV, Yasinska I, Oniku AE, et al. Involvement of hypoxia-inducible factor-1 in the inflammatory responses of human LAD2 mast cells and basophils [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e34259.
- [17] Kang DW, Park MK, Oh HJ, et al. Phospholipase D1 has a pivotal role in interleukin-1 β -driven chronic autoimmune arthritis through regulation of NF- κ B, hypoxia-inducible factor 1 α , and FoxO3a [J]. Mol Cell Biol, 2013, 33(14): 2760-2772.
- [18] Görlach A, Bonello S. The cross-talk between NF- κ B and HIF-1: further evidence for a significant liaison [J]. Biochem J, 2008, 412(3): e17-19.
- [19] Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, et al. RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1 α during hypoxia [J]. Cell, 2007, 131(2): 309-323.
- [20] Rius J, Guma M, Schachtrup C, et al. NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α [J]. Nature, 2008, 453(7196): 807-811.
- [21] Walmsley SR, Print C, Farahi N, et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity [J]. J Exp Med, 2005, 201(1): 105-115.
- [22] Liu YN, Pan SL, Peng CY, et al. Moscatilin repressed lipopolysaccharide-induced HIF-1 α accumulation and NF- κ B activation in murine RAW264.7 cells [J]. Shock, 2010, 33(1): 70-75.
- [23] Zhu Z, Zhong S, Shen Z. Targeting the inflammatory pathways to enhance chemotherapy of cancer [J]. Cancer Biol Ther, 2011, 12(2): 95-105.
- [24] Cao M, Wang P, Sun C, et al. Amelioration of IFN- γ and TNF- α -induced intestinal epithelial barrier dysfunction by berberine via suppression of MLCK-MLC phosphorylation signaling pathway [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e61944.
- [25] Liu H, Wang P, Cao M, et al. Protective role of oligomycin against intestinal epithelial barrier dysfunction caused by IFN- γ and TNF- α [J]. Cell Physiol Biochem, 2012, 29(5-6): 799-808.
- [26] Shiou SR, Yu Y, Guo Y, et al. Synergistic protection of combined probiotic conditioned media against neonatal necrotizing enterocolitis-like intestinal injury [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e65108.
- [27] Cai Y, Wang W, Liang H, et al. Keratinocyte growth factor improves epithelial structure and function in a mouse model of intestinal ischemia/reperfusion [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44772.
- [28] 郑亮亮, 徐军, 梁璐, 等. 高渗盐溶液对肠缺血/再灌注损伤兔肠屏障功能保护的时相性研究 [J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25(6): 365-368.
- [29] 肖元廷, 李国逊, 王西墨. NOD 样受体通路在急性腹腔感染早期对大鼠肠屏障的作用机制初探 [J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25(9): 527-532.
- [30] Liu Z, Wei F, Chen LJ, et al. In vitro and in vivo studies of the inhibitory effects of emodin isolated from Polygonum cuspidatum on Coxsackievirus B₄ [J]. Molecules, 2013, 18(10): 11842-11858.
- [31] Way TD, Huang JT, Chou CH, et al. Emodin represses TWIST1-induced epithelial-mesenchymal transitions in head and neck squamous cell carcinoma cells by inhibiting the β -catenin and Akt pathways [J]. Eur J Cancer, 2014, 50(2): 366-378.
- [32] Cha TL, Chuang MJ, Tang SH, et al. Emodin modulates epigenetic modifications and suppresses bladder carcinoma cell growth [J/OL]. Mol Carcinog, 2013 [2013-10-02]. <http://www.ncbi.nlm.gov/pubmed/?term=24115089> [published online ahead of print September 20, 2013].
- [33] Meng G, Liu Y, Lou C, et al. Emodin suppresses lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory responses and NF- κ B activation by disrupting lipid rafts in CD14-negative endothelial cells [J]. Br J Pharmacol, 2010, 161(7): 1628-1644.
- [34] 陈德昌, 景炳文, 杨兴易, 等. 大黄对危重症患者胃肠道的保护作用 [J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(2): 87-90.

(收稿日期: 2013-12-18)

(本文编辑: 李银平)

• 广告目次 •

- | | | | |
|---------------------------------|------|------------------------------|------|
| ①深圳迈瑞: 监护仪、呼吸机 | (封二) | ⑦珠海健帆: 血液灌流器 | (插页) |
| ②德尔格: Evita V300 | (插页) | ⑧天津红日药业: 血必净注射液 | (插页) |
| ③北京谊安: VT5250 呼吸机 | (插页) | ⑨广东宝莱特: 多参数监护仪 | (插页) |
| ④天津生化制药: 琥珀氢可 | (插页) | ⑩郑州德维: 脑电/肌电/意识水平监测仪 | (插页) |
| ⑤罗氏诊断产品(上海)有限公司: 血气分析仪 | (插页) | ⑪浙江医药: 来可信 | (封三) |
| ⑥珠海嘉润亚新: VIS-1000 多功能电子视频喉镜 ... | (插页) | ⑫江苏新晨: 艾贝宁® 盐酸右美托咪定注射液 | (封四) |