

黄芩苷对梗阻性黄疸幼鼠肠黏膜保护作用的研究

冯文玉 胡凤爱 李丽 高向前 陈强谱 傅廷亮 韩新令

【摘要】 目的 探讨黄芩苷对梗阻性黄疸幼鼠肠黏膜损害的保护作用。**方法** 40只Wistar幼鼠随机分为假手术组、梗阻性黄疸组(OJ组)、梗阻性黄疸+黄芩苷处理2周组(OJ₁组)和梗阻性黄疸+黄芩苷处理3周组(OJ₂组),每组10只。假手术组仅游离胆总管,OJ、OJ₁、OJ₂组幼鼠于近肝门处游离并部分结扎胆总管。OJ₁和OJ₂组术后1d开始给予黄芩苷(80 mg·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃,其余组相同时间给予生理盐水1.5 ml灌胃。观察实验鼠回肠黏膜结构改变及分级;应用免疫组化技术检测肠黏膜金属基质蛋白酶-9(MMP-9)和核因子-κBp65(NF-κBp65)的表达及TUNEL法检测肠黏膜细胞凋亡,对所得数据进行统计学处理。**结果** (1)假手术组、OJ₁组和OJ₂组较OJ组实验鼠回肠黏膜损伤轻,黏膜损伤分级为0.4±0.3、1.9±0.2、1.5±0.3 vs. 3.2±0.5,差异有统计学意义($P < 0.01$)。(2)MMP-9与NF-κBp65表达的平均光密度检测OJ组显著高于假手术组、OJ₁组及OJ₂组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。(3)细胞凋亡指数OJ组(27.6±2.1)明显高于OJ₁组(15.1±1.6)、OJ₂组(14.3±2.2)及假手术组(7.5±1.6),差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 黄芩苷通过抑制NF-κB的激活,减少MMP-9的表达,减少细胞凋亡,减轻了黏膜损伤,对梗阻性黄疸导致的幼鼠肠黏膜损害起到保护作用。

【关键词】 黄疸,阻塞性; NF-κB; 基质金属蛋白酶9; 原位缺口末端标记; 黄芩苷

Protective effects of baicalin on intestinal mucosa injury of immature rats with obstructive jaundice FENG Wen-yu, HU Feng-ai, LI Li, GAO Xiang-qian, CHEN Qiang-pu, FU Ting-liang, HAN Xin-ling. Department of Pediatric Surgery, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256603, China
Corresponding author: FU Ting-liang, Email: drfutl@sina.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of baicalin on intestinal mucosa injury of immature rats with obstructive jaundice (OJ). **Methods** Forty immature male Wistar rats were randomly divided into four groups: sham operation, OJ, OJ₁ and OJ₂. Rats in groups OJ, OJ₁ and OJ₂ were subjected to partial common bile duct ligation, while in sham operation group, bile duct was mobilized but not tied. Baicalin (80 mg/kg per day) was fed in groups OJ₁ and OJ₂, while in the other groups, normal saline was fed. Ileum mucosa were prepared for light microscopic examination. Expression levels of NF-κBp65, MMP-9 and apoptosis indexes in intestinal mucosa were determined. **Results** (1) Compared to OJ group (3.2±0.5), the pathological severity scores of intestinal mucosa significantly declined ($P < 0.01$) in groups sham operation (0.4±0.3), OJ₁ (1.9±0.2) and OJ₂ (1.5±0.3). (2) Rats in OJ group presented significantly upregulated the expression of NF-κBp65 and MMP-9 in intestinal mucosa, when compared with sham operation group, OJ₁ group and OJ₂ group, $P < 0.01$. (3) The apoptosis indexes significantly decreased in sham group (7.5±1.6), OJ₁ group (15.1±1.6) and OJ₂ group (14.3±2.2) ($P < 0.01$), when compared with OJ group (27.6±2.1). **Conclusions** Through inhibiting NF-κBp65 and down-regulating MMP-9 protein expression, Baicalin reduces apoptosis of intestinal mucosa in immature rats with OJ. It is suggested that baicalin exert protective effects on the intestinal mucosa injury of immature rats with OJ.

【Key words】 Jaundice, obstructive; NF-kappa B; Matrix metalloproteinase 9; In situ nick-end labeling; BAICALIN

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.11.015

作者单位: 256603 山东省,滨州医学院附属医院儿外科(冯文玉、傅廷亮),临床实验中心(胡凤爱),病理科(高向前),肝胆外科(陈强谱);滨州市人民医院儿科(李丽);曹县人民医院(韩新令)

通讯作者: 傅廷亮, Email: drfutl@sina.com

临床和实验研究表明,梗阻性黄疸(obstructive jaundice, OJ)可导致机体肠黏膜损伤。这一过程涉及小肠上皮细胞损伤、炎症介质和细胞因子的产生以及细胞凋亡等一系列相互关联的过程,严重者会导致肠道细菌移位、内毒素血症,甚至多器官功能障碍^[1]。我

们通过完全结扎胆总管致梗阻性黄疸模型中也得到证实^[2],后来我们对模型进行了改进,采取部分结扎胆总管致梗阻性黄疸,并取得了成功^[3]。研究发现黄芩苷具有抗炎、抗氧化、抗微生物、抗凋亡、消除自由基等药理作用。本实验旨在探讨黄芩苷对梗阻性黄疸幼鼠肠黏膜的保护作用及其机制。

材料与方 法

1. 实验动物:SPF级雄性Wistar大鼠40只,1.5~2月龄,体重160~180g,由山东大学动物实验中心提供,合格证号SCXK(鲁)20090004。适应性喂养1周,随机数字表法将实验鼠随机分为四组:假手术组、梗阻性黄疸组(OJ组)、梗阻性黄疸+黄芩苷处理2周(OJ₁组)和梗阻性黄疸+黄芩苷处理3周组(OJ₂组),每组10只。模型制作成功后将大鼠置于室温22~26℃、相对湿度40%~70%,安静、通风的环境中分笼喂养。

2. 动物模型的建立:大鼠术前禁食12h,禁水4h。OJ、OJ₁、OJ₂组大鼠经10%水合氯醛(30mg/100g)腹腔注射麻醉后,下腹部备皮,碘伏严格消毒,取腹部正中纵切口入腹,找到并游离胆总管后将胆总管与直径0.55mm的输液针头用3-0慕丝线共同结扎,将针头抽出后所形成的线圈将胆总管直径缩窄至0.55mm。假手术组仅切开腹腔后行胆总管游离,不做结扎。模型制作成功后各组动物置相同环境中分笼饲养。OJ₁、OJ₂组术后1d开始给予黄芩苷药物(郑州荔诺科技生物有限公司,含量95%)灌胃(80mg·kg⁻¹·d⁻¹),其余组给予相同时间生理盐水1.5ml灌胃。

3. 取材:幼鼠处死后,切取距回盲部5cm处一段长3cm的小肠,用生理盐水将肠道内容物冲洗干净,置10%的中性甲醛中固定24h后,石蜡包埋,5μm切片,经烤片、烘片后保存备用。

4. 肠黏膜损伤评估:石蜡切片经苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察。按照Chiu等^[4]描述的肠黏膜损伤分级进行肠黏膜损伤程度的评估。评分标准:0级,正常肠黏膜;1级,绒毛顶端上皮间隙增宽伴毛细血管充血;2级,上皮间隙进一步增宽伴随上皮层与固有膜分离;3级,大片上皮层从绒毛两边分离并有少量绒毛脱落;4级,大片绒毛脱落后固有膜裸露;5级,

固有膜被消化、分解、缺血改变和溃疡形成。

5. 凋亡检测:石蜡切片脱蜡至水,滴加20μg/ml不含DNase的蛋白酶K,37℃作用20min,PBS洗涤3次。将TDT酶、荧光标记液(FITC)、TUNEL稀释液配制成TUNEL检测液。在样品上加50μl TUNEL检测液,37℃避光孵育60min。PBS洗涤3次,用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜观察,绿色荧光者为阳性细胞,即凋亡细胞。镜下随机取10个肠绒毛计数凋亡细胞,然后取平均值作为细胞凋亡指数^[5]。

6. 免疫组织化学染色:石蜡切片经脱蜡至水后,3%过氧化氢封闭,微波炉热修复20min(枸橼酸盐缓冲液,pH 6.0);一抗4℃过夜;二抗37℃30min;3,3'-二氨基联苯二胺盐酸盐(DAB)显色,苏木素复染核,脱水、透明、封片。阳性结果判定标准:阳性信号主要位于细胞质,呈棕黄色。MMP-9和NF-κBp65表达的结果以平均光密度值表示,平均光密度越大,表示相关的抗原表达越强。

7. 统计学处理:所得数据采用SPSS 19.0统计学软件行统计学处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本比较采用One-Way ANOVA检验,各项指标之间作Spearman相关分析。按检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

结 果

1. 观察所见:OJ组幼鼠分别于术后1d和5d各死亡1只,OJ₁组术后2d、4d和7d各死亡1只,OJ₂组术后1d、3d和4d各死亡1只。死亡原因为术后胃扩张、肠麻痹、肠黏连及胆道穿孔。OJ、OJ₁和OJ₂组动物于术后3d耳朵和皮毛出现黄染,尿液呈豆油色,程度逐渐加重,持续约2d后逐渐消退,第7天黄疸消失,未再出现。OJ、OJ₁及OJ₂组幼鼠肠管颜色泛黄,肠壁僵硬,结扎处近端的胆总管明显扩张。

2. 光镜观察:假手术组和OJ₁、OJ₂组实验鼠回肠黏膜绒毛结构完整,上皮细胞成高柱状,无间质水肿和中性粒细胞浸润。OJ组幼鼠的回肠黏膜绒毛间隙增大,黏膜腺体排列稀疏,黏膜萎缩变薄。OJ组肠黏膜损伤评分明显高于假手术组和OJ₁、OJ₂组(表1)。

3. MMP-9和NF-κBp65的表达:MMP-9在假手术

表1 实验大鼠回肠黏膜损伤分级、细胞凋亡,免疫组织化学的检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	损伤指数	凋亡指数	MMP-9	NF-κBp65
假手术组	10	0.4 ± 0.3	7.5 ± 1.6	0.075 ± 0.013	0.066 ± 0.006
OJ组	8	3.2 ± 0.5 ^a	27.6 ± 2.1 ^a	0.200 ± 0.018 ^a	0.155 ± 0.012 ^a
OJ ₁ 组	7	1.9 ± 0.2 ^{ab}	15.1 ± 1.6 ^{ab}	0.102 ± 0.012 ^{ab}	0.107 ± 0.011 ^{ab}
OJ ₂ 组	7	1.5 ± 0.3 ^{ab}	14.3 ± 2.2 ^{ab}	0.098 ± 0.007 ^{ab}	0.098 ± 0.010 ^{ab}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与OJ组比较,^b $P < 0.01$

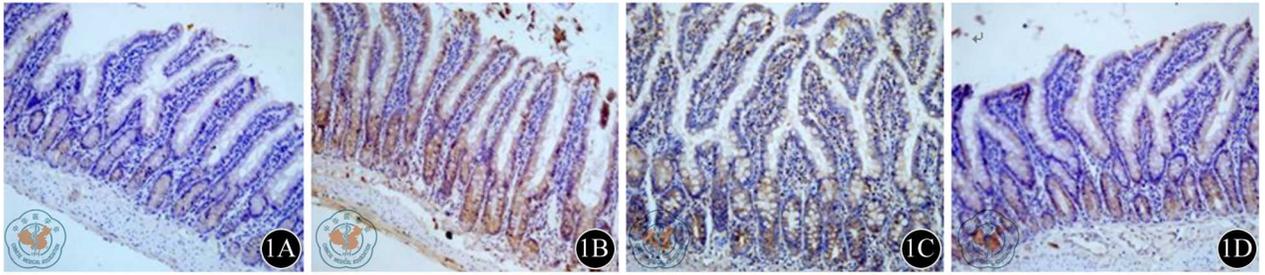


图1 各组幼鼠肠黏膜MMP-9的表达(SP×200)。1A:假手术组;1B:OJ组;1C:OJ₁组;1D:OJ₂组

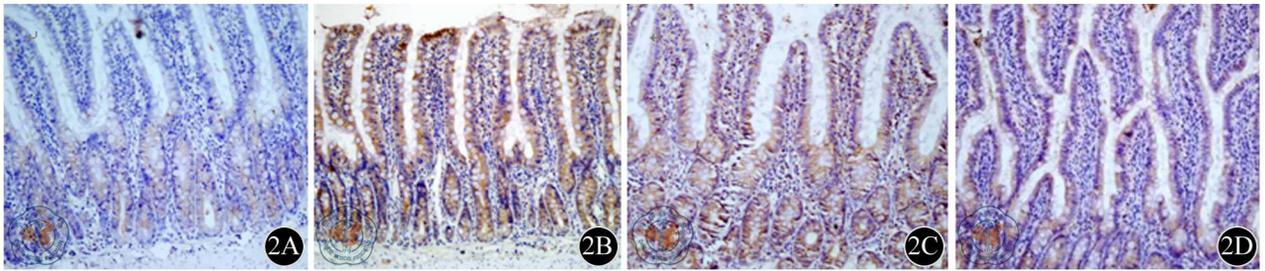


图2 各组幼鼠肠黏膜NF-κBp65的表达(SP×200)。2A:假手术组;2B:OJ组;2C:OJ₁组;2D:OJ₂组

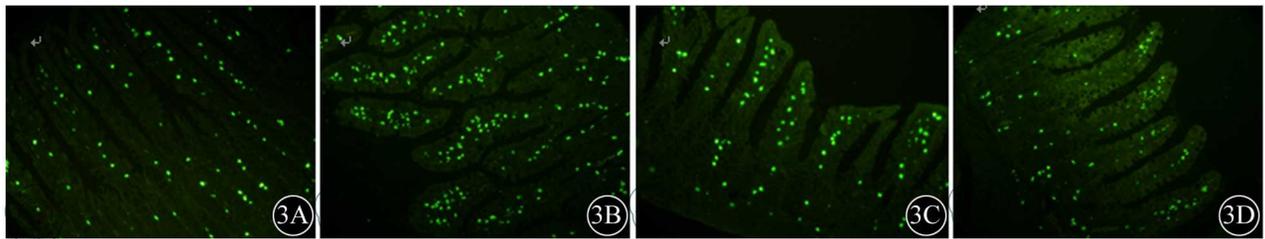


图3 各组幼鼠肠黏膜细胞的凋亡情况(TUNEL×200)。3A:假手术组;3B:OJ组;3C:OJ₁组;3D:OJ₂组

组有少量的表达,OJ组可见明显的阳性表达,其与假手术组和OJ₁、OJ₂组比较MMP-9表达明显升高,差异具有统计学意义(图1,表1)。NF-κBp65的表达假手术组和OJ₁、OJ₂组较低,OJ组表达明显增高,差异具有统计学意义(图2,表1)。

4. 细胞凋亡检测:OJ组细胞凋亡指数(27.6±2.1)明显高于假手术组(7.5±1.6)、OJ₁组(15.1±1.6)和OJ₂组(14.3±2.2),差异有统计学意义(图3,表1)。

5. 实验幼鼠回肠黏膜MMP-9、细胞凋亡与NF-κBp65相关性分析:实验幼鼠回肠黏膜MMP-9表达与NF-κBp65表达呈正相关($r=0.905, P<0.01$),肠黏膜细胞凋亡与NF-κBp65表达呈正相关($r=0.945, P<0.01$)。

讨 论

梗阻性黄疸时,肠黏膜屏障受损,肠道细菌易位,产生肠源性内毒素血症及全身炎症反应综合征,严重者可导致多器官功能障碍。Assimakopoulos等^[1]发现梗阻性黄疸大鼠肠黏膜萎缩伴有绒毛密度和黏膜厚度

明显减低,脂质过氧化和蛋白氧化增加,隐窝上皮细胞有丝分裂活性降低,细胞凋亡增加。Yang等^[6]报道梗阻性黄疸幼大鼠回肠黏膜结构异常,肠黏膜明显萎缩,黏膜绒毛脱落,间质明显水肿,部分上皮细胞凋亡。肠黏膜上皮维持稳定依赖于上皮细胞增殖与凋亡之间的动态平衡,细胞非正常凋亡的增加是肠黏膜屏障功能受损的关键原因^[7],引起肠黏膜的通透性增加、肠道细菌和内毒素移位,激活和释放炎症介质,引发全身炎症反应综合征。本研究结果显示,OJ组幼鼠肠黏膜损伤分级和细胞凋亡指数显著高于假手术、OJ₁及OJ₂组($P<0.01$),提示黄芩苷减轻了肠绒毛损伤,减少了肠黏膜细胞凋亡。

NF-κB是一种多效调节因子,涉及机体防御反应、组织损伤和应激、细胞分化和凋亡等过程的信息传递,调控参与炎症反应的多种炎性介质和细胞因子。大多数细胞中,NF-κB以p50/p65异源二聚体形式存在。在静息状态下,NF-κB与抑制蛋白家族IκBs紧密结合以无活性状态存在于细胞质中,不具有基因转录作用。各种刺激信号通过细胞膜上的受体或配体将信号传至胞质,激活IκB激酶复合体,使IκB蛋白磷酸化,IκB随

之被降解, NF- κ B 活化^[8]。NF- κ B 激活后, 诱导细胞因子的级联反应, 造成多器官结构和功能异常^[9], 从而引起一系列病理生理改变。Fujishima 等^[10]发现脂多糖诱导激活 NF- κ B, 加重吞噬细胞对肠上皮细胞的吞噬作用, 增加炎症细胞因子 TNF- α 与 IL-1 β 的产生。MMP 是一组锌依赖的蛋白水解酶, 具有降解多种细胞外基质成分的作用。炎症发生时, MMP 基因的启动子和增强子的 κ B 序列位点发生特异性的结合, MMP 表达增加, 并产生级联反应, 介导过度的全身炎症反应^[11]。Meijer 等^[12]研究显示, 炎症性肠病患者肠黏膜金属蛋白酶高度表达, 加重肠黏膜损伤, 导致肠道通透性增加, 进而引起肠细胞凋亡和内毒素损害发生, 其中 MMP-9 的作用最为显著。本研究发现 OJ 组幼鼠肠黏膜 MMP-9 的表达明显高于假手术、OJ₁ 及 OJ₂ 组 ($P < 0.01$), 证实 MMP-9 的过度表达介导了肠黏膜的炎症反应, 加重了肠黏膜损伤。梗阻性黄疸时, NF- κ Bp65 表达增加, 并且其表达与 MMP-9 及肠黏膜细胞凋亡呈正相关, 表明梗阻性黄疸时通过激活 NF- κ B, 进而调控 MMP-9 表达, 并参与细胞凋亡过程, 最终导致肠黏膜损伤。

黄芩苷具有抗菌、抗病毒、抗氧化、清除自由基等药理活性, 并可抑制多种细胞因子和炎症介质的产生, 预防细胞因子的级联反应, 减轻多种蛋白酶与炎症介质对组织的损害^[13-14], 避免全身炎症反应进一步发展。Zhu 等^[15]报道黄芩苷能降低缺氧损伤引起的血脑屏障通透性变化, 增加脑微血管内皮细胞紧密连接蛋白的表达。Zhang 等^[16]研究证实黄芩苷处理重症胰腺炎大鼠, 能减少血液中内毒素和 TNF- α 的含量, 减轻肠黏膜损伤, 降低细胞因子 NF- κ B 的产生, 抑制炎症反应, 从而保护肠黏膜。研究表明^[17], 黄芩苷通过抑制 NF- κ B 抑制物 (I κ B α) 降解, 抑制 NF- κ B-DNA 复合物的形成以及 NF- κ B 依赖性的启动基因的表达, 抑制血浆 TNF- α 水平的升高, 减少 NO、超氧阴离子和 iNOS 蛋白产生, 具有强有力的抗内毒素血症的作用。本实验中, 黄芩苷处理组幼鼠降低了 NF- κ B 的表达, 减少 MMP-9 的表达, 并抑制肠黏膜细胞凋亡, 对梗阻性黄疸引起的肠黏膜损伤起到保护作用。

黄芩苷通过抑制 NF- κ B 的激活, 减少 MMP-9 的表达, 减少细胞凋亡和黏膜损伤, 对梗阻性黄疸导致的幼鼠肠黏膜损害起到保护作用。

参 考 文 献

[1] Assimakopoulos SF, Scopa CD, Zervoudakis G, et al. Bombesin and neurotensin reduce endotoxemia, intestinal oxidative stress, and apop-

toxis in experimental obstructive jaundice. *Ann Surg*, 2005, 241: 159-167.

- [2] 傅廷亮, 张文同, 陈强谱, 等. 肠内营养对梗阻性黄疸幼鼠肠黏膜结构的影响. *中华小儿外科杂志*, 2006, 27: 166-168.
- [3] 韩新令, 冯文玉, 傅廷亮, 等. 胆管部分梗阻致大鼠肝纤维化模型的建立. *中华全科医学*, 2011, 9: 164-165.
- [4] Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. Amorphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg*, 1970, 101: 478-483.
- [5] Sukhotnik I, Slijper N, Pollak Y, et al. Parenteral omega-3 fatty acids (Omegaven) modulate intestinal recovery after intestinal ischemia-reperfusion in a rat model. *J Pediatr Surg*, 2011, 46: 1353-1360.
- [6] Yang ZW, Li JG, Mao XG, et al. Effects of recombinant human growth hormone on intestinal translocation of bacteria and endotoxin in rats with obstructive jaundice. *Hepatobiliary Pancreat Dia Int*, 2005, 4: 445-449.
- [7] Szalay L, Umar F, Khadem A, et al. Increased plasma D-lactate is associated with the severity of hemorrhagic/traumatic shock in rats. *Shock*, 2003, 20: 245-250.
- [8] Koh SJ, Kim JM, Kim IK, et al. Fluoxetine inhibits NF- κ B signaling in intestinal epithelial cells and ameliorates experimental colitis and colitis-associated colon cancer in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 301: 9-19.
- [9] Winning S, Spletstoesser F, Fandrey J, et al. Acute hypoxia induces HIF-independent monocyte adhesion to endothelial cells through increased intercellular adhesion molecule-1 expression; the role of hypoxic inhibition of prolyl hydroxylase activity for the induction of NF- κ B. *J Immunol*, 2010, 185: 1786-1793.
- [10] Fujishima Y, Nishiumi S, Masuda A, et al. Autophagy in the intestinal epithelium reduces endotoxin-induced inflammatory responses by inhibiting NF- κ B activation. *Archiv Biochem Biophys*, 2011, 506: 223-235.
- [11] Kim Y, Kang H, Jang SW, et al. Celestrol Inhibits Breast Cancer Cell Invasion via Suppression of NF- κ B-mediated Matrix Metalloproteinase-9 Expression. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 28: 175-184.
- [12] Meijer MJ, Mieremet-Ooms MA, van Duijn W, et al. Effect of the anti-tumor necrosis factor-alpha antibody infliximab on the ex vivo mucosal matrix metalloproteinase-proteolytic phenotype in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2007, 13: 200-210.
- [13] Jung SH, Kang KD, Ji D, et al. The flavonoid baicalin counteracts ischemic and oxidative insults to retinal cells and lipid peroxidation to brain membranes. *Neurochem Int*, 2008, 53: 325-337.
- [14] Chou TC, Chang LP, Li CY, et al. The anti-inflammatory and analgesic effects of baicalin in carrageenan-evoked thermal hyperalgesia. *Anesth Analg*, 2003, 97: 1724-1729.
- [15] Zhu H, Wang Z, Xing Y, et al. Baicalin reduces the permeability of the blood-brain barrier during hypoxia in vitro by increasing the expression of tight junction proteins in brain microvascular endothelial cells. *J Ethnopharmacol*, 2011.
- [16] Zhang XP, Feng GG, Weng WH, et al. Protective effects of baicalin and octreotide on intestinal mucosa of rats with severe acute pancreatitis. *Turk J Gastroenterol*, 2009, 20: 108-115.
- [17] Hu Q, Noor M, Wong YF, et al. In vitro anti-fibrotic activities of herbal compounds and herbs. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24: 3033-3041.

(收稿日期: 2011-12-28)

(本文编辑: 马超)