

谷氨酰胺对体外肠上皮细胞缺血再灌注损伤后 occludin 蛋白表达的影响

潘璠 刘成霞

【摘要】 目的 探讨谷氨酰胺(GLN)对体外肠缺血再灌注损伤后肠上皮细胞活性及紧密连接蛋白 occludin 表达的影响,以研究 GLN 对肠黏膜保护作用的机制。**方法** 利用 Caco-2 细胞建立缺氧/复氧模型,模仿肠缺血再灌注,然后用含有不同浓度 GLN 的培养液继续培养。利用 MTT 检测细胞活性,利用 RT-PCR 和 Western blot 检测 occludin 蛋白的表达情况。**结果** MTT 结果显示,与 0 mmol/L GLN 组(0.635 ± 0.041 、 0.690 ± 0.032)相比,补充 GLN 后细胞 OD 值明显增加(4 mmol/L GLN 组: 0.716 ± 0.040 、 0.904 ± 0.089 , 8 mmol/L GLN 组: 0.768 ± 0.040 、 0.856 ± 0.073 , P 均 < 0.05)。RT-PCR 结果显示,与 0 mmol/L GLN 组(0.244 ± 0.037 、 0.591 ± 0.031)相比,GLN 影响 occludin 蛋白 mRNA 的相对表达量(4 mmol/L GLN 组: 0.371 ± 0.057 、 0.799 ± 0.054 , 8 mmol/L GLN 组: 0.714 ± 0.030 、 0.547 ± 0.064 , P 均 < 0.05)。Western blot 结果显示,与 0 mmol/L GLN 组(35.056 ± 2.313 、 74.309 ± 1.528)相比,GLN 可以增加紧密连接蛋白 occludin 表达(4 mmol/L GLN 组: 63.432 ± 0.649 、 101.759 ± 1.214 , 8 mmol/L GLN 组: 99.453 ± 0.526 、 99.573 ± 2.082 , P 均 < 0.05)。**结论** GLN 促进肠上皮的增殖,同时在基因和蛋白水平上影响紧密连接蛋白 occludin 的表达。

【关键词】 谷氨酰胺; 再灌注损伤; occludin 蛋白

Effect of glutamine on tight junction protein occludin during ischemia-reperfusion injury in vitro PAN Fan, LIU Cheng-xia, Department of Digestive System, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256603, China Corresponding author: LIU Cheng-xia, Email: park1115@163.com

【Abstract】 Objective To determine the effects of glutamine (GLN) on the activity of intestinal epithelial cells and the expression of tight junction protein occludin in ischemia-reperfusion injury *in vitro*. To study the mechanisms of protecting intestinal mucosa by GLN. **Methods** The experimental models were made by hypoxic/reoxygenation, then cells were cultured in the culture medium with indicated concentration of GLN. The activity of cells were measured by MTT and the expression of occludin were detected by RT-PCR and Western blot. **Results** MTT: compared with 0 mmol/L (0.635 ± 0.041 , 0.690 ± 0.032), GLN increase the OD of the intestinal epithelial cells (4 mmol/L: 0.716 ± 0.040 , 0.904 ± 0.089 , 8 mmol/L: 0.768 ± 0.040 , 0.856 ± 0.073 , $P < 0.05$). RT-PCR: compared with 0 mmol/L (0.244 ± 0.037 , 0.591 ± 0.031), and the relative expression of occludin protein mRNA was promoted by GLN (4 mmol/L: 0.371 ± 0.057 , 0.799 ± 0.054 , 8 mmol/L: 0.714 ± 0.03 , $P < 0.05$). Western blot: compared with 0 mmol/L (35.056 ± 2.313 , 74.309 ± 1.528), the expression of occludin protein was promoted by GLN (4 mmol/L: 63.432 ± 0.649 , 101.759 ± 1.214 , 8 mmol/L: 99.453 ± 0.526 , 99.573 ± 2.082 , $P < 0.05$). **Conclusions** GLN promotes the proliferation of intestinal epithelial cell, and up-regulates the expression of tight junction protein occludin at the level of gene and protein.

【Key words】 Glutamine; Reperfusion injury; Occludin protein

缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是指在缺血的基础上,恢复血供后,组织的缺血性损伤和功能障碍未减轻,反而加重的现象,严重的感染、创伤、休克等均可引起 IRI。肠是对缺血反应最敏感的组织之一,肠缺血再灌注不仅可以引起肠黏膜的局部组

织损害,甚至引发肠道细菌移位及内毒素血症,损害远处器官,所以它被认为是全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的“起动机”^[1-3]。紧密连接是上皮细胞间重要的连接方式,在肠黏膜屏障中起到举足轻重的作用^[4]。occludin 蛋白是紧密连接的主要蛋白成分之一,对维护紧密连接的基本结构和功能发挥着至关重要的作用^[5]。谷氨酰胺(glutamine, GLN)具有保护肠黏膜屏

障的作用,但其具体机制尚未完全阐明。本研究利用 Caco-2 细胞,通过缺氧/复氧的方法,模拟临床上的肠缺血再灌注。通过测量缺氧/复氧后,GLN 对肠上皮细胞的细胞增殖及对 occludin 蛋白表达的影响,来探讨 GLN 对肠上皮细胞活性的影响及对肠道保护作用的机制。

材料和方法

1. 实验材料及主要试剂:Caco-2 细胞株,购自中科院上海细胞库;兔抗人 occludin 多克隆抗体,购自美国 Invitrogen 公司;FITC 标记羊抗兔 IgG 抗体,购自北京中杉金桥公司;DMEM 高糖培养基(含丙酮酸钠型),胎牛血清,非必需氨基酸,GLN,购自美国 Sigma 公司;实时定量 PCR(real time quantitative PCR, RT-PCR)试剂盒,购自大连宝生物工程有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔 IgG 抗体,购自碧云天生物技术有限公司;MINIVE 垂直蛋白电泳仪,购自美国 Amersham Biosciences 公司。

2. 细胞培养:细胞均用含 200 ml/L 胎牛血清、10 g/L 非必需氨基酸和青霉素-链霉素双抗液的 DMEM 高糖培养液,NaHCO₃ 调节 pH 值。细胞在 37 °C、5% CO₂ 条件下进行培养。细胞按每 7 d,1:2 传代,传代后 7 d 细胞生长达融合状态^[6]。

3. Caco-2 细胞缺氧/复氧模型的建立方法:取传代后 7 d 生长达到融合的 Caco-2 细胞,吸取细胞培养基,将细胞置于厌氧培养箱中(1% O₂,5% CO₂,94% N₂) 孵育 90 min(缺氧),取出,加培养液至原量后,再置于原培养箱(5% CO₂,95% 空气)中孵育 30 min。加入含有不同浓度 GLN 的细胞培养液,继续培养^[7]。

4. MTT:取同代细胞接种于 96 孔板上,接种密度为 5000/100 μl/孔,待细胞生长达到融合状态后造模,然后用不同浓度的 GLN (0 mmol/L, 4 mmol/L, 8 mmol/L, 12 mmol/L, 16 mmol/L) 处理。分别在 24 h、48 h,向每个孔中加入 MTT(5 g/L)20 μl,于 37 °C 细胞培养箱中孵育 4 h,小心吸弃孔内培养上清液,每孔中加入 150 μl 二甲基亚砜。选择 560 nm 波长,在全自动酶标仪上进行测定。

5. 荧光 RT-PCR:提取各实验组细胞的 RNA,将每个样本 RNA 各取 1 μg 反转录为 cDNA,进行荧光实时定量 PCR 反应。occludin 的引物为:occludin-F:5'-AGT-GCCACTTTGGCATTATGAGA-3', occludin-R:5'-CTTGTG-GCAGCAATTGGAAAC-3';GAPDH-F:5'-GCACCGTCAAG-GCTGAGAAC-3', GAPDH-R:5'-TGCTGAAGACGCCACT-GGA-3'。PCR 反应条件:95 °C,30 s;95 °C,5 s;60 °C,20 s,循环 40 次,4 °C 结束。

6. Western blot:分别收集各实验组的细胞,超声破碎提取总蛋白,采用 Bradford 法进行定量。取蛋白样品,加入 1/4 体积的 5 × Loading buffer 上样缓冲液,于沸水中煮沸 3 ~ 5 min。取 30 μg 总蛋白上样行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将分离后蛋白转移至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜,T-TBS 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 0.05% Tween 20)清洗膜 3 次,每次 5 min,加入多克隆兔抗人 occludin 抗体(一抗)孵育 4 h,洗膜 3 次 × 5 min,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(二抗)孵育 2 h,洗膜后加入 ECL 化学发光剂,放入暗盒中压片 1 min 后显影,定影。

7. 统计学分析:数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析,经方差齐性检验后采用方差分析,两组间的比较采用 *q* 检验。取显著性检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

结果

1. GLN 对细胞活性的影响:与 0 mmol/L GLN 组细胞相比,4 mmol/L、8 mmol/L GLN 组 OD 值明显增高;与 8 mmol/L GLN 组相比,12 mmol/L、16 mmol/L GLN 组 OD 值明显下降(表 1)。

表 1 不同浓度 GLN 对细胞的促增殖作用
(OD 值, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	24 h	48 h
0 mmol/L	0.635 ± 0.041	0.690 ± 0.032
4 mmol/L	0.716 ± 0.040 ^a	0.768 ± 0.040 ^a
8 mmol/L	0.904 ± 0.089 ^{bc}	0.856 ± 0.073 ^a
12 mmol/L	0.781 ± 0.045 ^d	0.719 ± 0.043 ^d
16 mmol/L	0.730 ± 0.020 ^d	0.758 ± 0.052 ^d

注:与 0 mmol/L 组相比,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 4 mmol/L 组相比,^c $P < 0.05$;与 8 mmol/L 组相比,^d $P < 0.05$

2. GLN 对 occludin mRNA 相对表达量的影响:以 0 mmol/L mRNA 相对表达量为 1,通过管家基因校正,得出各组的 mRNA 相对表达量(表 2)。24 h,与 0 mmol/L GLN 组细胞相比,4 mmol/L 和 8 mmol/L GLN 组 RER 值明显增高。48 h,4 mmol/L GLN 组与 0 mmol/L GLN 组对比,RER 明显上升,但 8 mmol/L GLN 组与 4 mmol/L GLN 组相比,RER 明显降低。与 24 h 比较,0 mmol/L GLN 组和 4 mmol/L GLN 组 48 h RER 明显增高($P < 0.05$),8 mmol/L GLN 组 RER 明显降低($P < 0.05$)。

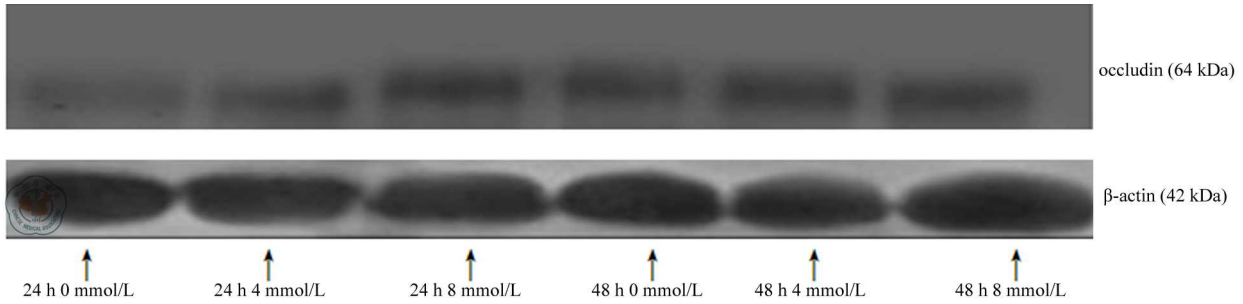


图1 各组细胞occludin蛋白表达量

表2 GLN对occludin蛋白mRNA相对含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	24 h	48 h
0 mmol/L	0.244 ± 0.037	0.591 ± 0.031 ^d
4 mmol/L	0.371 ± 0.057 ^a	0.799 ± 0.054 ^{ad}
8 mmol/L	0.714 ± 0.030 ^{bc}	0.547 ± 0.064 ^{dc}

注:与0 mmol/L组相比,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与4 mmol/L组相比,^c $P < 0.05$;与24 h相比,^d $P < 0.05$

3. GLN对occludin蛋白表达的影响:利用Western blot方法对蛋白进行半定量分析。occludin蛋白的分子量约为64 kDa,结果表明在64 kDa位置有明显条带。24 h,随着GLN浓度的增加,occludin蛋白的含量增加。48 h,4 mmol/L、8 mmol/L GLN组与同时间点0 mmol/L GLN组相比,蛋白含量增加,但是4 mmol/L、8 mmol/L GLN组之间差异不明显(图1,表3)。

表3 GLN对occludin蛋白表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	24 h	48 h
0 mmol/L	35.056 ± 2.313	74.309 ± 1.528 ^d
4 mmol/L	63.432 ± 0.649 ^a	99.453 ± 0.526 ^{ad}
8 mmol/L	101.759 ± 1.214 ^{bc}	99.573 ± 2.082 ^a

注:与0 mmol/L组相比,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与4 mmol/L组相比,^c $P < 0.05$;与24 h相比,^d $P < 0.05$

讨 论

Caco-2细胞为人结肠癌细胞,可分化成有极性的肠上皮细胞。单层Caco-2细胞在结构上类似人正常的肠上皮细胞,在细胞生长达到融合后会出现类似于小肠微绒毛的柱状突起,在培养液侧形成刷状缘,并且有分化良好的紧密连接,同时它还可以分泌与人体相似的酶、转化因子等,是很好的体外肠黏膜屏障模型,特别是在关于紧密连接的研究中被广泛应用^[8]。紧密连接是肠上皮屏障的重要组成部分,它不仅在相邻细胞之间起到连接作用,同时还起到维持肠上皮细胞极性,调节肠黏膜屏障通透性,调控细胞信号转导和与紧密连接相关的转录因子,参与上皮细胞增殖分化等作

用^[9]。occludin蛋白是紧密连接上的一个四次跨膜蛋白,其分子量约为64 kDa,它的功能状态对紧密连接以及上皮细胞的变化起到重要作用,是目前的研究热点,也是多种临床疾病治疗的靶点。对occludin蛋白的检测,可以在一定程度上反映紧密连接和肠黏膜屏障的情况^[9]。

GLN是肠黏膜细胞的重要能源物质,也是核苷酸合成的重要底物,同时它还在在肠道相关免疫系统中扮演重要角色,对全身多脏器尤其是胃肠道具有保护作用^[10]。多项体内研究证明,GLN缺乏可导致肠黏膜萎缩,绒毛稀疏,细胞间连接破坏,肠黏膜屏障功能受损。已知GLN能够促进肠上皮更新,减少细菌易位,降低IRI对多器官尤其是肠黏膜屏障的损害,并已广泛应用于临床治疗,但其具体作用机制尚不明确,occludin蛋白是否参与其中也未见报道^[11-14]。

本实验中,我们利用缺氧/复氧在体外模拟肠IRI模型。通过MTT检测证明,添加GLN组细胞活性明显高于未添加GLN组细胞活性。而增加GLN浓度的细胞,8 mmol/L GLN组OD值明显高于4 mmol/L GLN组。说明GLN的浓度能够促进肠上皮细胞增殖,且具有一定的浓度依赖性。

我们进一步检测GLN对紧密连接蛋白occludin表达的影响。我们应用RT-PCR从基因方面检测occludin蛋白mRNA相对含量,得出加入GLN的细胞,occludin蛋白mRNA表达明显增加。同时,我们还利用Western blot进行蛋白半定量检测,与未添加GLN组相比,加入GLN组细胞occludin蛋白表达增加。

综上所述,我们在体外构建了肠IRI模型,并通过改变GLN浓度,检测GLN对肠上皮的修复作用与occludin蛋白的关系。我们得出:在体外,对于缺血再灌注的肠上皮细胞,GLN可以促进细胞增殖,提高细胞活性,并且在分子和蛋白水平上增加occludin蛋白的表达。GLN是修复肠黏膜屏障的有效手段。GLN对肠黏膜的保护作用可能是由于:(1)GLN可以提供给细胞DNA合成和分裂所需要的能量;(2)GLN可以提供给细胞合成核苷酸的底物;(3)GLN的增加促进了谷胱甘

肽的合成,而谷胱甘肽是细胞内的重要的抗氧化剂和氧自由基清除剂,可以保护细胞免受氧自由基的损害;(4)抑制肠一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS),氧自由基的生成。我们后面的实验,将在体外构建肠 IRI 模型,进一步验证 GLN 对肠上皮 IRI 后的作用。

参 考 文 献

- [1] Ismail M, Wenxuan Y, Marc W, et al. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci*, 2004, 49:1359-1377.
- [2] Gwendolyn D, Thomas G, Erik H. Complement-Mediated Ischemia-Reperfusion Injury. *Ann Surg*, 2009, 249:889-899.
- [3] Yuxiang H, Fei Q, Carl A, et al. A Novel Targeted Inhibitor of the Alternative Pathway of Complement and Its Therapeutic Application in Ischemia-Reperfusion Injury. *J Immunol*, 2008, 181:8068-8076.
- [4] 吴鹏,陈强谱,张兴远,等. 梗阻性黄疸对大鼠肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白 ZO-1 和肠黏膜通透性的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2010, 12:2546-2548.
- [5] Ying C, Chunmin Y, Qingsen L, et al. Effects of simulated weightlessness on tight junction protein occludin and zonula occluden-1 expression levels in the intestinal mucosa of rats. *J Huazhong Univ Sci Technol*, 2011, 31:26-32.
- [6] Masafumi W, Hideki S, Yoshiyuki SH, et al. glutamine stimulate amino acid transport during ischemia-reperfusion in human intestinal epithelial cells. *J Surg Res*, 2005, 123:75-81.
- [7] Manuela N, Bruno L, Rossella B, et al. Cell Growing Density Affects the Structural and Functional Properties of Caco-2 Differentiated Monolayer. *J Cell Physiol*, 2010, 226:1533-1543.
- [8] Luca P, Laura T, Cristina V, et al. Structural organization of the tight junctions. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778:646-659.
- [9] Nicole H, David A. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36:1206-1237.
- [10] Katherine G, Simon H. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*, 2009, 124:3-20.
- [11] Shimizu M, Son D. Food-derived peptides and intestinal functions. *Curr Pharm Des*, 2007, 13:885-895.
- [12] Assimakopoulos SF, Nikolopoulou VN, Scopa CD, et al. Beneficial effects of glutamine on intestinal barrier function in obstructive jaundice. *World J Surg*, 2005, 29:935-936.
- [13] Karinch AM, Pan M, Lin CM, et al. Glutamine metabolism in sepsis and infection. *J Nutr*, 2001, 131:2535S-2538S; discussion 2550S-2551S.
- [14] Potsic B, Holliday N, Lewis P, et al. Glutamine supplementation and deprivation: effect on artificially reared rat small intestinal morphology. *Pediatr Res*, 2002, 52:430-436.

(收稿日期:2012-02-23)

(本文编辑:马超)

潘璠,刘成霞. 谷氨酰胺对体外肠上皮细胞缺血再灌注损伤后 occludin 蛋白表达的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2012, 6(10):2624-2627.

中 华 临 床 医 生 杂 志