

# 大黄通过调控紧密连接蛋白治疗大鼠脓毒症

于彤彧<sup>1\*</sup>, 高巧营<sup>2</sup>

(1. 天津医科大学第二医院, 天津 300211; 2. 天津市南开医院, 天津 300100)

**[摘要]** **目的:**探究大黄治疗脓毒症大鼠的分子机制。**方法:**100 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组, 模型组, 大黄高、中、低剂量组 (150, 100, 50 mg·kg<sup>-1</sup>), 除假手术组只暴露盲肠, 不进行结扎与穿孔, 其余各组采用盲肠结扎法制作大鼠脓毒症模型, 记录各组大鼠死亡情况, 采用细菌 16S rRNA 实时荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR) 检测大鼠结肠及肠系膜淋巴结、血液中金黄色葡萄球菌及大肠埃希菌数量, 采用 qPCR 和蛋白质免疫印迹 (Western blot) 法检测大鼠结肠紧密连接蛋白紧密连接相关蛋白-1 (ZO-1) 和闭锁蛋白 (Occludin) 水平。**结果:**与假手术组比较, 脓毒症模型组大鼠病死率最高, 不同标本的金黄色葡萄球菌及大肠埃希菌检出率和数量明显升高, ZO-1 和 Occludin mRNA 及蛋白表达明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 大黄高、中剂量组大鼠病死率降低, 大鼠不同标本的上述两细菌检出率和数量有所减低, 细菌移位情况减少, 大鼠结肠的 ZO-1 和 Occludin mRNA 及蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论:**大黄可调控结肠紧密连接蛋白表达保护肠黏膜屏障, 从而抑制脓毒症大鼠细菌移位治疗脓毒症。

**[关键词]** 大黄; 紧密连接蛋白; 细菌移位; 脓毒症

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)13-0146-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016130146

## Therapeutic Effect of Rhei Radix et Rhizoma on Septic Rats Via Regulating Tight Junction Protein

YU Tong-yu<sup>1\*</sup>, GAO Qiao-ying<sup>2</sup>

(1. The Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China;  
2. Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the molecular mechanism of Rhei Radix et Rhizoma on septic rats. **Method:** Totally 100 Wistar rats were randomly divided into sham-operation group, model group, Rhei Radix et Rhizoma high dose, middle dose and low dose groups (150, 100, 50 mg·kg<sup>-1</sup>). The rats in sham-operation group only exposed the cecum, without ligation and perforation; and the rats in other groups received cecum ligation method to establish rat sepsis models. The mortality of rats was recorded in various groups. The number of colon and mesenteric lymph nodes, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in blood was detected by bacterial 16S rRNA Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The levels of zonula occludens-1 (ZO-1) and Occludin were detected by qPCR and Western blot. **Result:** As compared with the sham-operation group, the mortality was the highest in septic model group, the detectable rate and number of *S. aureus* and *E. coli* in the samples of septic model group were significantly increased, while ZO-1 and Occludin mRNA and protein expression levels were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). As compared with the model group, the mortality was decreased in Rhei Radix et Rhizoma high dose and middle dose groups; the detectable rate and number of *S. aureus* and *E. coli* in the samples of these two groups were decreased, bacterial translocation was reduced, ZO-1 and Occludin mRNA and protein expression levels in rat colon were significantly increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Rhei Radix et Rhizoma can regulate the expression of tight junction protein to protect the intestinal

**[收稿日期]** 20150810(014)

**[基金项目]** 天津市中医药管理局科研项目(11020)

**[通讯作者]** \* 于彤彧, 从事药学研究, Tel: 13920436082, E-mail: yutongyu1987@sohu.com

mucosal barrier and inhibit bacterial translocation in septic rats.

[Key words] Rhei Radix et Rhizoma; zonula occludens; bacterial translocation; sepsis

脓毒症是由感染引起的全身炎症反应综合征,临床上证实脓毒症患者多存在细菌感染或高度可疑感染灶。细菌移位是指肠道内细菌和/或内毒素越过肠黏膜屏障,经过淋巴结、门静脉进入远端器官的过程。而肠道菌群移位一直是脓毒症发展机制研究中的重点之一<sup>[1]</sup>,肠源性脓毒症主要致病菌为大肠埃希菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)<sup>[2]</sup>,两致病菌移位脓毒症发生发展过程中扮演着重要角色。肠屏障功能障碍是引起肠道菌群移位的重要前提条件,肠屏障中以肠上皮的紧密连接蛋白构成的机械屏障最为重要。近年来,中医药已经成为了治疗脓毒症的重要手段,其中大黄在治疗脓毒症方面具有独特效果<sup>[3]</sup>。本文旨在探究大黄是否通过调控肠上皮紧密连接蛋白表达,稳定肠屏障功能,抑制致病菌移位,以达到治疗脓毒症的目的。

## 1 材料

**1.1 动物** 100 只 Wistar 大鼠,雄性,体重(200 ± 20) g,由军事医学科学院环境所动物中心提供,动物合格证号 SCXK(军)2009-0003。

**1.2 药物及试剂** 大黄粉(杭州中药饮片厂,批号 20140509),细菌基因组 DNA 提取试剂盒(美国 QIAGEN 公司,批号 142315812),动物组织总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒及荧光定量试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号分别为 N3205, N3128, N3113),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 20140806),兔抗大鼠闭锁蛋白(Occludin)和紧密连接相关蛋白-1(ZO-1)多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 G2204, J2604)。

**1.3 仪器** iQ5 型实时荧光定量-聚合酶链式反应(qPCR)仪(美国 BioRad 公司)。

## 2 方法

**2.1 分组及模型制备** 大鼠随机分为假手术组(10 只),模型组(30 只),大黄治疗高、中、低剂量组(每组 20 只)。术前大鼠禁食 12 h,不限水。术前以 10% 水合氯醛 ip 麻醉。无菌操作开腹,距盲肠末端 2 cm 处丝线结扎,12 号针头盲肠末端穿孔,将盲肠放回腹腔,并逐层关腹。假手术组只暴露盲肠,不进行结扎与穿孔。高、中、低剂量大黄治疗组大鼠给予大黄粉 ig 治疗(剂量分别为 150, 100, 50 mg ·

kg<sup>-1</sup>);假手术组和模型组大鼠给予生理盐水 ig 治疗。5 组大鼠给予生理盐水或大黄粉 2 次/d,治疗 3 d。

**2.2 标本采集** 术后 72 h,各组大鼠在无菌条件下麻醉、开腹,收集肠系膜淋巴结、血标本及结肠组织,于 -80 °C 冻存备用。

**2.3 *E. coli* 及 *S. aureus* 检测** 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒步骤提取血标本、肠系膜淋巴结、结肠组织细菌总 DNA。GenBank 中查询 *E. coli* 及 *S. aureus* 的 16S rRNA 序列,并设计特异性引物见表 1。应用 qPCR 法检测结肠组织、肠系膜淋巴结及血标本中 *E. coli* 及 *S. aureus* 数量,具体实验方法参照文献[4]。

表 1 *E. coli* 和 *S. aureus* 的引物序列

Table 1 Primer sequences of *E. coli* and *S. aureus*

菌种	引物序列
<i>E. coli</i>	上游 5' -CATGCCCGTGTATGAAGAA-3'
	下游 5' -CGGTAACCTCAATGAGCAAA-3'
<i>S. aureus</i>	上游 5' -CGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTG-3'
	下游 5' -GCCGTTTCGCTACCCTTGTATTGT-3'

**2.4 ZO-1 及 Occludin mRNA 检测** 参照试剂盒说明提取各组大鼠结肠总 RNA,逆转录,ZO-1 及 Occludin 及 β-肌动蛋白(β-actin)引物由北京六合通经贸有限公司合成见表 2。qPCR 法对每份样本均进行 3 个复孔的检测,测得的样品阈值循环数参照 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>法<sup>[5]</sup>分析结果。

表 2 ZO-1 和 Occludin 的引物序列

Table 2 Primer sequences of ZO-1 and Occludin

引物名称	引物序列
ZO-1	上游 5' -CCATCTTTGGACCGATTGCTG-3'
	下游 5' -TAATGCCCGAGCTCCGATG-3'
Occludin	上游 5' -ACGGTGCCATAGAATGAGATGTTG-3'
	下游 5' -CAGCTAGTTGTTTCATTCTGCACCA-3'
β-actin	上游 5' -TGGATTCCTGTGCATCCATGAAAAC-3'
	下游 5' -TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

**2.5 ZO-1 及 Occludin 蛋白检测** 参照蛋白提取试剂盒说明提取大鼠结肠组织总蛋白,煮沸变性,BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度。ZO-1 及 Occludin 蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳,转移至硝酸纤维膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h。蛋白多克隆抗体(1:1 000 稀释)进行孵育,4 °C 过夜。二抗(1:5 000

稀释) 孵育 3 h。化学发光成像法检测蛋白条带。 $\beta$ -actin 为内参, 以对照组结肠组织中的蛋白表达水平为基准, 计算其他组 ZO-1 及 Occludin 蛋白的相对表达量。

**2.6 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件, 计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用方差分析, 计数资料两组间比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对脓毒症大鼠病死率的影响** 与假手术组比较, 模型组大鼠 72 h 病死率高达 63%, 明显升高 ( $P < 0.01$ ), 大鼠出现了明显的脓毒症体征; 治疗组大鼠 72 h 病死率均有所降低, 大黄高、中剂量组与模型组比较病死率明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 高剂量组尤其明显 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

**3.2 对脓毒症大鼠结肠组织、肠系膜淋巴结及血标**

表 3 大黄对脓毒症大鼠病死率的影响

Table 3 Effects of Rhei Radix et Rhizoma on mortality of septic rats

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	死亡数/只	病死率/%
假手术	-	10	0	0
模型	-	30	19	63 <sup>2)</sup>
大黄	150	20	2	10 <sup>4)</sup>
	100	20	5	25 <sup>3)</sup>
	50	20	10	50

注: 与假手术组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 4~8 同)。

本中 *E. coli* 及 *S. aureus* 检出率和数量的影响 假手术组大鼠全部存活, 结肠组织、淋巴结及血液中未检出 *E. coli* 及 *S. aureus*, 模型组和治疗组大鼠在各标本中均检出了上述 2 种菌, 但检出率和菌量有所不同。与假手术组比较, 模型组大鼠在 3 种标本中的 2 主要致病菌检出率和数量明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 大黄高、中剂量组 2 菌检出率和数量明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 4~6。

表 4 大黄对脓毒症大鼠结肠组织中 *E. coli* 及 *S. aureus* 检出率和数量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effects of Rhei Radix et Rhizoma on positive rate and number of *S. aureus* and *E. coli* of colon in septic rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	阳性率/%	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
				阳性率/%	lg N/g	阳性率/%	lg N/g
假手术	-	10	0	0	0	0	0
模型	-	11	100	100 <sup>2)</sup>	6.58 $\pm$ 0.58 <sup>2)</sup>	83 <sup>2)</sup>	3.98 $\pm$ 0.87 <sup>2)</sup>
大黄	150	18	30	20 <sup>4)</sup>	1.06 $\pm$ 0.37 <sup>4)</sup>	15 <sup>4)</sup>	0.99 $\pm$ 0.73 <sup>4)</sup>
	100	15	45	45 <sup>4)</sup>	2.57 $\pm$ 0.46 <sup>4)</sup>	35 <sup>4)</sup>	2.05 $\pm$ 0.64 <sup>4)</sup>
	50	10	90	85	4.72 $\pm$ 0.20 <sup>4)</sup>	60	3.46 $\pm$ 0.71

表 5 大黄对脓毒症大鼠肠系膜淋巴结中 *E. coli* 及 *S. aureus* 检出率和数量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Effects of Rhei Radix et Rhizoma on positive rate and number of *S. aureus* and *E. coli* of mesenteric lymph nodes in septic rats

( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	阳性率/%	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
				阳性率/%	lg N/g	阳性率/%	lg N/g
假手术	-	10	0	0	0	0	0
模型	-	11	60	60	3.52 $\pm$ 1.06 <sup>2)</sup>	30	3.08 $\pm$ 1.02 <sup>2)</sup>
大黄	150	18	30	20	1.87 $\pm$ 0.20 <sup>3)</sup>	20	0.89 $\pm$ 0.49 <sup>3)</sup>
	100	15	40	35	1.96 $\pm$ 1.03 <sup>3)</sup>	30	1.83 $\pm$ 1.05
	50	10	65	60	2.79 $\pm$ 1.18	50	2.46 $\pm$ 1.14

表 6 大黄对脓毒症大鼠血标本中 *E. coli* 及 *S. aureus* 检出率和数量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 6 Effects of Rhei Radix et Rhizoma on positive rate and number of *S. aureus* and *E. coli* of blood in septic rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	阳性率/%	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
				阳性率/%	$\log_{10} N/g$	阳性率/%	$\log_{10} N/g$
假手术	-	10	0	0	0	0	0
模型	-	11	50	50	3.03 $\pm$ 1.05 <sup>2)</sup>	20	2.65 $\pm$ 1.07 <sup>2)</sup>
大黄	150	18	15	10	1.34 $\pm$ 0.39 <sup>3)</sup>	10	0.65 $\pm$ 0.23 <sup>4)</sup>
	100	15	30	20	2.07 $\pm$ 0.24	15	1.80 $\pm$ 0.61
	50	10	45	25	2.03 $\pm$ 1.26	30	2.47 $\pm$ 0.86

**3.3 对脓毒症大鼠结肠组织 ZO-1 和 Occludin mRNA 表达的影响** 模型组 ZO-1 和 Occludin 的

mRNA 水平较假手术组明显降低 ( $P < 0.05$ ); 大黄高、中剂量组 ZO-1 和 Occludin mRNA 水平较模型组

有所升高,高剂量组抑制 ZO-1 和 Occludin 的 mRNA 降低趋势与模型组有差别( $P < 0.01$ )。见表 7。

表 7 大黄对脓毒症大鼠结肠组织 ZO-1 和 Occludin mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 7 Effects of Rhei Radix et Rhizoma on ZO-1 and Occludin mRNA expression levels of septic rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	ZO-1/ $\beta$ -actin	Occludin/ $\beta$ -actin
假手术	-	1.532 ± 0.086	0.934 ± 0.076
模型	-	0.753 ± 0.108 <sup>2)</sup>	0.347 ± 0.057 <sup>2)</sup>
大黄	150	1.274 ± 0.075 <sup>4)</sup>	0.630 ± 0.048 <sup>4)</sup>
	100	1.052 ± 0.049 <sup>4)</sup>	0.399 ± 0.054
	50	0.790 ± 0.063	0.368 ± 0.072

3.4 对脓毒症大鼠结肠组织 ZO-1 和 Occludin 蛋白相对表达量的影响 与假手术组比较,模型组 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,大黄高剂量组 ZO-1 和 Occludin 蛋白的表达水平明显升高( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 8。

表 8 大黄对脓毒症大鼠结肠组织 ZO-1 和 Occludin 蛋白相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 8 Effects of Rhei Radix et Rhizoma on ZO-1 and Occludin protein expression levels in colon of septic rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	ZO-1/ $\beta$ -actin	Occludin/ $\beta$ -actin
假手术	-	0.301 ± 0.028	0.435 ± 0.071
模型	-	0.156 ± 0.031 <sup>2)</sup>	0.193 ± 0.034 <sup>2)</sup>
大黄	150	0.267 ± 0.015 <sup>4)</sup>	0.321 ± 0.056 <sup>3)</sup>
	100	0.234 ± 0.026 <sup>4)</sup>	0.209 ± 0.047
	50	0.165 ± 0.018	0.198 ± 0.032

#### 4 讨论

肠道寄居着大量的正常菌群,数量高达  $1 \times 10^{14}$  个,其有规律的定居于机体肠道的某一特定位置。肠道被认为是危重病应激的中心器官和启动器官<sup>[6]</sup>,它在脓毒症发生发展过程中扮演着重要角色。肠道屏障由机械屏障、化学屏障、微生物屏障等组成。其中以机械屏障最为重要,其结构基础为上皮细胞间的紧密连接<sup>[7]</sup>,后者是决定肠黏膜通透性的最主要因素。当紧密连接表达减少或断裂时,肠上皮细胞间隙增大,通透性增加,细菌可发生移位。ZO-1 和 Occludin 是形成紧密连接的 2 个重要结构蛋白<sup>[8]</sup>,本文以此为切入点进行研究。

大黄是我国的传统中药,具有“通里攻下、荡涤肠胃、清热解毒、活血化瘀”等功效。大黄作为治疗脓毒症的重要中药,具有保护脓毒症患者的肠道黏膜机械屏障、化学屏障、免疫屏障及生物屏障的作用。以往研究已发现大黄可通过增强肠道蠕动,提高肠道水通道蛋白等机制产生泻下功能减少细菌位移。而本文侧重于大黄可否调控紧密连接蛋白保护

肠道机械屏障功能治疗脓毒症的研究。

本研究发现,脓毒症大鼠造模后结肠组织中 ZO-1, Occludin 的 mRNA 及蛋白水平较假手术组降低,肠上皮间的紧密连接减少,细胞间隙增大,肠道通透性增加,此时肠道内以主要致病菌 *E. coli* 及 *S. aureus* 等菌群顺势侵入结肠组织、淋巴结及血液,或其他无菌器官,细菌发生移位。此时脓毒症大鼠病死率高达 63%。脓毒症大鼠给予大黄粉进行口服治疗后,不同标本的主要致病菌 *E. coli* 及 *S. aureus* 的检出率减低,检出数量减少,这表明细菌移位现象受到抑制。高、中剂量组大鼠结肠组织 ZO-1, Occludin mRNA 及蛋白水平较模型组有所提高,高剂量组最为明显。故笔者推测大黄可调控肠道 ZO-1 及 Occludin 蛋白表达抑制脓毒症大鼠主要致病菌移位。

综上所述,脓毒症发生发展过程中肠黏膜屏障损伤,主要致病菌发生移位;大黄可调控紧密连接蛋白增强肠黏膜屏障功能,从而减少细菌移位治疗脓毒症。

#### [参考文献]

[1] Ohland C L, Macnaughton W K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, 298(6): 807-819.

[2] 高巧营, 刘大全, 吴尚为, 等. 清热解毒方与益生菌联合治疗大鼠脓毒症[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2014, 20(2): 160-163.

[3] 韦忠丽, 解建. 大黄在脓毒症治疗中的应用进展[J]. *中国中医急症*, 2011, 20(8): 1290-1291.

[4] 刘大全, 李东华, 刘洪斌, 等. 脓毒症大鼠肠道及腹水中菌群变化研究[J]. *中国实验诊断学杂志*, 2011, 15(5): 812-815.

[5] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.

[6] Clark J A, Coopersmith C M. Intestinal crosstalk; a new paradigm for understanding the gut as the “motor” of critical illness [J]. *Shock*, 2007, 28(4): 384-393.

[7] Forster C. Tight junctions and the modulation of barrier function in disease [J]. *Histochem Cell Biol*, 2008, 130(1): 55-70.

[8] Li Q, Zhang Q, Wang M, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha disrupt epithelial barrier function by altering lipid composition in membrane microdomains of tight junction [J]. *Clin Immunol*, 2008, 126(1): 67-80.

[责任编辑 周冰冰]