

# 溃结灵含药血清对 Caco-2 细胞损伤模型 ITF 基因和 MUC2 蛋白表达的影响

张涵<sup>1,2</sup>, 李燕舞<sup>1</sup>, 巫燕莉<sup>1</sup>, 杜群<sup>1</sup>, 王汝俊<sup>1\*</sup>

(1. 广州中医药大学脾胃研究所, 广州 510405; 2. 黑龙江省中医研究院, 哈尔滨 150036)

**[摘要]** 目的: 观察溃结灵含药血清对人克隆结肠腺癌(Caco-2)细胞损伤模型肠三叶因子(ITF)基因和 MUC2 蛋白表达的影响。方法: 三硝基苯磺酸(TNBS)灌肠法复制溃疡性结肠炎(UC)大鼠模型, 采用 UC 模型大鼠血清刺激 Caco-2 细胞, 造成细胞损伤模型, 分别用荧光实时定量-PCR (RT-PCR) 及免疫组化法检测溃结灵含药血清对 Caco-2 细胞损伤模型 ITF mRNA 及 MUC2 蛋白表达的影响。结果: 与正常血清组 ITF mRNA MUC2 蛋白相对表达量(1.00 ± 0.11), (8.62 ± 3.16) 比较, 模型血清组(1.20 ± 0.16, 11.22 ± 2.37), 均明显增高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与模型血清组比较, 溃结灵含药血清组 ITF mRNA (1.76 ± 0.37) 及 MUC2 蛋白表达量(13.94 ± 2.59) 均明显增高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ )。结论: 溃结灵含药血清可上调 Caco-2 细胞损伤模型 ITF 基因和 MUC2 蛋白表达。

**[关键词]** 溃结灵; Caco-2 细胞; 肠三叶因子; MUC2

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0180-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013080180

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130206.0901.004.html>

**[网络出版时间]** 2013-02-06 9:01

## Effect of Kuijieling Decoction Containing Serum on ITF mRNA and MUC2 Protein Expression in Caco-2 Cell Injury Model

ZHANG Han<sup>1,2</sup>, LI Yan-wu<sup>1</sup>, WU Yan-li<sup>1</sup>, DU Qun<sup>1</sup>, WANG Ru-jun<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Spleen and Stomach, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guangzhou 510405, China; 2. Heilongjiang Academy of TCM, Haerbin 150036, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Kuijieling decoction containing serum on intestinal trefoil factor (ITF) mRNA and mucin 2 (MUC2) protein expression in Caco-2 injury model. **Method:** Three trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) enema was used for replication of ulcerative colitis (UC) rat model. Cell injury model was established by serum of UC model rats, ITF mRNA and MUC2 protein expression were detected by real time fluorescent quantitative-PCR (RT-PCR) and immunohistochemistry. **Result:** ITF mRNA (1.20 ± 0.16) and MUC2 protein expression levels (11.22 ± 2.37) in model serum group were higher than that in normal group (1.00 ± 0.11, 8.62 ± 3.16) ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); Compared with the model serum group, ITF mRNA (1.76 ± 0.37) and MUC2 protein expression levels (13.94 ± 2.59) in Kuijieling decoction containing serum group increased significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Kuijieling decoction containing serum could promote ITF mRNA and MUC2 protein expression in Caco-2 cell injury model.

**[Key words]** Kuijieling; Caco-2 cell; ITF; MUC2

**[收稿日期]** 20121122(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30772754)

**[第一作者]** 张涵, 博士, 讲师, 从事中药新药与复方药理研究, Tel: 0451-55653086-6845, E-mail: zhanghan04@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 王汝俊, 硕士, 教授, 从事调理脾胃方药的机制研究, Tel: 86-20-36585078, E-mail: wangrujun8888@163.com

肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)属三叶肽家族,作为一种细胞生长因子,在溃疡性结肠炎(UC)黏膜损伤后的修复重建过程甚为重要;MUC2是结肠黏膜上主要的黏蛋白,与ITF相互协同,形成稳定的凝胶层,共同促进结肠黏膜的保护及修复作用。前期整体动物模型研究结果表明:溃结灵可促进三硝基苯磺酸(TNBS)法UC大鼠结肠组织ITF基因和MUC2蛋白表达上调<sup>[1]</sup>,在此基础上,本研究采用中药血清药理学方法,观察溃结灵含药血清对Caco-2细胞损伤模型ITF基因和MUC2蛋白表达的影响,以比较整体实验和细胞模型两者表达的异同。

## 1 材料

**1.1 动物** SD大鼠,SPF级,雌雄各半,体重180~220g,由广东省医学实验动物中心提供,合格证号粤监证字2008A003。

**1.2 细胞** Caco-2细胞,购自中国科学院上海细胞生物研究所。

**1.3 药物** 溃结灵(含救必应、水蛭、白术、白芍、炙甘草等中药)浓缩液由广州固志医药科技有限公司制备,批号080321。每1g浓缩液含21g生药,药物用蒸馏水配成(含生药)1830g·L<sup>-1</sup>。

**1.4 试剂** 5%三硝基苯磺酸(TNBS,美国Sigma,批号P2297),DMEM培养基(美国Gibco公司),胎牛血清(美国Gibco公司),RNA提取试剂盒(美国Invitrogen公司),逆转录试剂盒(Takara公司),SyBri荧光定量试剂盒(Stratagene公司),ITF及 $\beta$ -actin PCR引物(宝生物工程大连有限公司合成),Gold View<sup>TM</sup>核酸染料(北京赛百盛基因技术有限公司),兔抗大鼠MUC-2多克隆抗体(Abcam公司,批号bs-00665),羊抗兔生物素化二抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号bse-0295G)。

**1.5 仪器** 3110 Series II水套式二氧化碳培养箱(美国thermo公司),SW-CJ-1F型洁净工作台(江苏苏净集团有限公司),TH4-200型倒置显微镜(日本Olympus),Mx3005P荧光定量PCR扩增仪(美国Stratagene公司),2400型PCR扩增仪(美国PE公司)。

## 2 方法

**2.1 含药血清的制备** 45只SD大鼠,随机分为溃结灵组、模型组、空白组。溃结灵组给药剂量为18.3g·kg<sup>-1</sup>,给药体积为10mL·kg<sup>-1</sup>,按体表面积折算法,相当于临床等效剂量的3.2倍给药,每日2次,连续灌胃3d,末次给药前禁食12h,给药后2h

无菌条件下腹主动脉取血。模型组造模方法参照文献[1]:空白组灌胃予等容量生理盐水,各组同一时间点取血。血液经3000r·min<sup>-1</sup>,10min离心,取上清液,经56℃,30min灭活,于超净台内用0.22 $\mu$ m针式滤过滤器过滤分装,-20℃冰箱贮存备用。

**2.2 细胞培养** Caco-2细胞贴壁生长于含10%胎牛血清的高糖DMEM培养液中,37℃5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育,每2~3d更换培养液1次,常规传代培养。

**2.3 分组及给药** 试验分3组,分别为溃结灵含药血清组、空白血清组、UC模型血清组。取对数生长期Caco-2细胞常规消化成单细胞悬液,计数后以5×10<sup>5</sup>/mL接种于6孔板,1mL/孔,48h待细胞完全贴壁后,弃去培养液,UC模型血清组及溃结灵含药血清组分别给予含10%UC大鼠模型血清的高糖DMEM培养液,空白血清组给予含10%正常大鼠血清的高糖DMEM培养液,每组设3个平行孔,作用24h后弃去培养液,其中空白血清组及UC模型血清组给予含10%正常大鼠血清的高糖DMEM培养液,溃结灵含药血清组给予含10%溃结灵含药血清的高糖DMEM培养液继续培养24h,常规消化,收集细胞。

**2.4 ITF mRNA表达** 按Trizol(美国Invitrogen)说明书提取各组Caco-2细胞总RNA,并反转录成cDNA,real time-PCR法检测ITF mRNA相对表达量。引物序列采用Primer Premier 5.0软件设计,ITF mRNA引物:上游5'-CTCCAGCTCTGCTGAG-GAGT-3',下游5'-CAGGGATCCTGGAG TCAAAG-3',扩增片段143bp;GAPDH引物:上游5'-ATCAT-CAGCAATGCCTCCTG-3',下游5'-ATGGACTGTGGT-CATGAGTC-3',扩增片段102bp。PCR扩增条件:95℃预变性10min,95℃变性10s,60℃退火30s,72℃延伸30s,共40个循环。采用 $\Delta\Delta Ct$ 法行PCR产物相对定量分析,计算方法如下:首先由软件分析得出各组Ct值,再按如下公式计算, $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{GAPDH管家基因})$ , $\Delta\Delta Ct = \text{实验组}\Delta Ct \text{值} - \text{对照组}\Delta Ct \text{值}$ ;以各组 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 作为最终统计数据,其中Ct是荧光达到阈值的循环数。

**2.5 MUC2蛋白的检测** 取已固定好的细胞,3%过氧化氢甲醇浸泡3min,灭菌双蒸馏水洗5min后PBS洗5min×2次,滴加5%的牛血清白蛋白在载玻片上封闭20min(载玻片放湿盒内),甩去血清。滴加1:40MUC2兔抗鼠多克隆抗体(1%的牛血清白蛋白稀释)20 $\mu$ L在载玻片上,放在湿盒内,4℃冰箱过夜,PBS

洗 5 min × 3 次。滴加 1:50 羊抗兔 IgG(1% 的牛血清白蛋白稀释)20 μL 在载玻片上,放在湿盒内,室温下放置 1.5 h, PBS 洗 5 min × 3 次。DAB 液 50 μL 滴加在载玻片,镜下观察显色,用自来水轻轻冲洗,停止反应。苏木素染色 30s(滴加在载玻片或浸泡在苏木素液体中),自来水冲洗 5 min。二甲苯和中性树胶按 1:1 稀释,滴在载玻片上,盖上盖玻片。每个样本拍摄 3 个不同区域, Image-Pro Plus 5.0 图像分析系统测定每个图片的吸光度(A)。

2.6 统计 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,使用 SPSS 11.0 统计软件处理,单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

表 1 溃结灵含药血清对 Caco-2 细胞损伤模型 ITF mRNA 表达及 MUC2 蛋白相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	$Ct_{ITF}$	$Ct_{GAPDH}$	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	MUC2 相对表达量
正常血清	23.56 ± 0.25	15.84 ± 0.11	7.71 ± 0.17	0 ± 0.17	1.00 ± 0.11	8.62 ± 3.16
模型血清	22.73 ± 0.18	15.27 ± 0.28	7.45 ± 0.18	0.26 ± 0.18	1.20 ± 0.16 <sup>1)</sup>	11.22 ± 2.37 <sup>1)</sup>
溃结灵血清	20.02 ± 0.47	15.36 ± 0.58	6.92 ± 0.30	-0.42 ± 0.30	1.76 ± 0.37 <sup>2,3)</sup>	13.94 ± 2.59 <sup>2,3)</sup>

注:与正常血清组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型血清组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ 。

### 4 讨论

目前,溃疡性结肠炎的病因及发病机制尚不完全明确,可能与免疫因素、感染因素、氧自由基损伤、精神因素、遗传因素及环境等多种因素有关<sup>[2]</sup>。

肠三叶因子是于 1991 年首次由鼠体内发现的新型生长因子,它与乳癌相关肽(PS2 或 TFF1)、解痉多肽(SP 或 TFF2)同属三叶肽家族<sup>[3]</sup>。TFF3 主要由杯状细胞合成和分泌,特异性分布在肠黏膜表面,可抵御蛋白酶的消化,在肠道上皮保护和促进黏膜修复过程中起着非常重要的作用<sup>[4]</sup>。ITF 在溃疡性结肠炎的不同时期可有异常表达,其表达的变化可能与溃疡性结肠炎的损伤后修复有关。本实验研究结果显示:UC 模型血清组 Caco-2 细胞 ITF mRNA 表达量较正常血清组多,与整体实验结果不完全吻合<sup>[1]</sup>。其原因可能是整体和细胞水平病变阶段不完全吻合;与模型血清组比较,溃结灵含药血清组 Caco-2 细胞 ITF mRNA 相对表达量较高,此结果与前期整体实验结果相吻合,提示,溃结灵治疗溃疡性结肠炎的作用机制可能与上调 ITF 基因的表达有关。

MUC (mucin)是由上皮特殊细胞合成和分泌的一种分泌型糖蛋白,广泛存在于胃肠道等上皮细胞表面,对上皮起润滑和保护作用,是黏膜层防止有害物质侵袭的第一道防线<sup>[5-6]</sup>。MUC2 基因是 1989 年

3.1 对 Caco-2 细胞损伤模型 ITF mRNA 表达的影响 RT-PCR 结果显示:与正常血清组比较,模型血清组及溃结灵含药血清组 ITF mRNA 相对表达量明显增高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与模型血清组比较,溃结灵含药血清组 ITF mRNA 相对表达量明显增高 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

3.2 对 Caco-2 细胞损伤模型 MUC2 蛋白表达的影响 MUC2 蛋白的表达主要定位在胞浆,呈弥漫性分布的棕色颗粒,与正常血清组比较,模型血清组及溃结灵含药血清组 MUC2 蛋白相对表达量增高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与模型血清组比较,溃结灵含药血清组 MUC2 蛋白相对表达量增高 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

由美国学者 Gum 等自人小肠 cDNA 表达文库中克隆到的一种黏蛋白核心肽基因, MUC2 蛋白主要在杯状细胞的高尔基体内合成,是构成结肠黏膜层的主要成分,发挥着屏障作用<sup>[7-8]</sup>。MUC2 基因敲除小鼠可自发结肠炎,提示其对结肠黏膜有屏障保护作用<sup>[9]</sup>。生理情况下,肠三叶因子与黏蛋白共同分泌、共同包被,相互交联,形成稳定的凝胶复合物,在黏膜保护和修复中起协同作用;肠黏膜损伤后,ITF 可迅速上调, MUC2 可与之共同作用,形成稳定的黏膜凝胶层,稳定肠黏膜,促进上皮细胞的修复<sup>[10-11]</sup>。本实验研究结果表明:与正常血清组比较,UC 模型血清作用 Caco-2 细胞 24 h, MUC2 蛋白表达有所升高 ( $P < 0.05$ ),可能此时,结肠上皮细胞处于修复阶段,ITF 与 MUC2 相互协同,表达都有所上调。与模型血清组比较,给予溃结灵含药血清培养后, Caco-2 细胞损伤模型的 MUC2 蛋白表达量也明显上调 ( $P < 0.05$ ),即溃结灵含药血清有促进损伤结肠上皮细胞修复的作用。

综上所述,溃结灵含药血清可促进 Caco-2 细胞损伤模型 ITF 基因及 MUC2 蛋白表达,两者表达有协同作用,此实验结果与整体实验相一致。溃结灵通过上调 UC 模型 ITF 基因及 MUC2 蛋白的表达,以促进损伤结肠上皮细胞的修复,增强结肠黏膜屏障的保护机制,可能是其治疗 UC 的作用机制之一。

# 高脂血症合并脑缺血对模型大鼠炎症因子的影响

张振强<sup>1</sup>, 贾亚泉<sup>1</sup>, 宋军营<sup>1</sup>, 李澎涛<sup>2\*</sup>, 潘彦舒<sup>2</sup>, 王丛笑<sup>1</sup>, 吕欢欢<sup>1</sup>

(1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

**[摘要]** **目的:**比较复合脑缺血模型和单纯脑缺血模型在不同时间炎症反应变化,分析高脂血症炎症因素对缺血脑组织的影响。**方法:**动物随机分为正常组、高脂对照组、假手术组、高脂假手术组、单纯缺血组和复合缺血组。取材时间是模型组脑缺血手术后 3 d 和 7 d。采用高脂饲料饲养大鼠,复制经典的高脂血症动物模型,检测大鼠血清中血脂的含量以确定模型成功;复制大脑中动脉缺血模型,观察大鼠脑部缺血损伤情况。采用线栓法复制大鼠大脑中动脉缺血模型,观察大鼠脑部缺血损伤情况。用酶联免疫法(ELISA)检测血清中单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )、C-反应蛋白(creactive protein, CRP)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的水平。**结果:**MCP-1, TNF- $\alpha$  和 CRP 在复合脑缺血组和单纯脑缺血组与相应假手术组组内比较,脑缺血组在缺血 3, 7 d 血清含量均多于相应的假手术组,差异显著( $P < 0.05$ );复合脑缺血组与单纯脑缺血组组间比较,MCP-1, TNF- $\alpha$  在复合脑缺血组在缺血 3, 7 d 血清含量均增多,差异显著( $P < 0.05$ );CRP 在复合脑缺血组组织 3 d 血清含量均增多( $P < 0.05$ ),缺血 7 d 血清含量均降低( $P < 0.05$ )。SOD 在复合脑缺血组和单纯脑缺血组与相应假手术组组内比较,脑缺血组在缺血 3, 7 d 活性均降低,差异显著( $P < 0.05$ );复合脑缺血组与单纯脑缺血组组间比较,复合脑缺血组在缺血 3 d 活性降低,差异显著( $P < 0.05$ )。**结论:**高脂血症条件下,炎症因子在缺血不同时期既有累积现象,又有特异性的表达,这可能在脑缺血恢复期有助于损伤的修复。

**[关键词]** 高脂血症; 脑缺血; 高脂血症模型; 高脂血症复合脑缺血模型; 炎症反应

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0183-05

**[doi]** 10.11653/syfy2013080183

**[收稿日期]** 20121001(001)

**[基金项目]** 国家科技重大专项(2009ZX09502-014);河南省基础与前沿技术研究(122300410026)

**[第一作者]** 张振强,医学博士,副教授,从事中西医结合防治脑病基础研究,E-mail:zhang\_zhenqiang@126.com

**[通讯作者]** \*李澎涛,教授,博士生导师,E-mail:Lipengtao0413@hotmail.com

## [参考文献]

[1] 李燕舞,黄秋凌,杜群,等. 溃结灵对溃疡性结肠炎大鼠结肠黏膜 ITF、MUC2、TGF- $\alpha$  动态变化的影响[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(6):68.

[2] 陈治水,陈宁. 溃疡性结肠炎中西医结合研究新进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(4):437.

[3] 章美元,韩真. 肠三叶因子对肠黏膜保护与修复的研究[J]. 胃肠病学, 2012, 17(3):186.

[4] Beck P L, Ihara E, Hirota S A, et al. Exploring the interplay of barrier function and leukocyte recruitment in intestinal inflammation by targeting fucosyltransferase VII and trefoil factor 3[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 299(1):G43.

[5] Ho S B, Niehans G A, Lyflogt C, et al. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues[J]. Cancer Res, 1993, 53(3):641.

[6] Allen H J. Glycoconjugates: composition, structure, and

function[M]. New York: Marcel Dekker, 1992:167.

[7] Allen A, Hutton D A, Pearson J R. The MUC2 gene product: a human intestinal mucin[J]. Int J Biochem Cell Biol, 1998, 30(7):797.

[8] Gum J R, Byrd J R, Hicks J W, et al. Molecularcloning of human intestinal mucins cDNAs[J]. J Biol Chem, 1989, 264(11):6480.

[9] Mizoguchi A, Mizoguchi E. Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models[J]. J Gastroenterol, 2008, 43(1):1.

[10] Playford R J. Trefoil peptides: what are they and what do they do? [J]. J R Coll Physicians Lond, 1997, 31(1):37.

[11] Kim Y S, Ho S B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress [J]. Curr Gastroenterol Rep, 2010, 12(5):319.

[责任编辑 聂淑琴]