

• 实验研究 •

帕瑞昔布钠对脓毒症小鼠肠黏膜屏障的保护作用

吴友平 杨静 彭捷 郝文斌 屠伟峰

【摘要】 目的 研究帕瑞昔布钠对脓毒症小鼠肠黏膜屏障功能的影响及可能机制。**方法** 21 只 C57BL/6 小鼠随机分为三组:假手术组(Sham 组)、脓毒症模型组(CLP 组)、脓毒症模型+帕瑞昔布钠 2 mg/kg 治疗组(P 组),每组 7 只。术后 24 h 用襻环结扎法检测各组小鼠小肠通透性。另 21 只 C57BL/6 小鼠随机分为三组,分组及治疗同前,术后 24 h 处死小鼠,收集小鼠回肠。小肠组织行 HE 染色观察肠病理损伤。采用 Western blot 法检测小肠 ZO-1、Occludin、Claudin-1 等紧密连接蛋白的表达。采用 ELISA 法检测小肠黏膜 IL-6、PGE₂ 的浓度。**结果** 与 Sham 组比较,CLP 组小鼠小肠明显损伤,门静脉血内 FD4 浓度明显升高,小肠黏膜内 ZO-1、Occludin、Claudin-1 蛋白表达明显减少、IL-6 与 PGE₂ 浓度明显升高($P<0.05$)。与 CLP 组比较,P 组小鼠小肠损伤明显减轻($P<0.05$),门静脉血内 FD4 浓度明显降低($P<0.05$),小肠黏膜内各蛋白表达水平明显增加、IL-6 与 PGE₂ 浓度明显降低($P<0.05$)。**结论** 帕瑞昔布钠治疗可以明显降低脓毒症导致的肠黏膜屏障功能损伤,其机制可能与降低肠组织炎症水平,增加肠紧密连接蛋白表达相关。

【关键词】 帕瑞昔布钠;脓毒症;肠黏膜屏障功能;紧密连接蛋白

Protective effect of parecoxib on intestinal barrier function of septic mice WU Youping, YANG Jing, PENG Jie, XI Wenbing, TU Weifeng. Department of Anesthesiology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China

Corresponding author: TU Weifeng, Email: wftuyx02@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of parecoxib on intestinal barrier function of septic mice. **Methods** Sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP) model. Twenty-one male C57BL/6 mice were randomly divided into three groups ($n=7$ in each group): group Sham, group CLP, group P (parecoxib 2 mg/kg was administered via gastric tube 2 h after CLP). In vivo intestinal permeability was measured using an in vivo ligated loop model 24 h after surgery. Twenty-one male C57BL/6 mice were randomly divided into three groups as before. The small intestine tissue sample was harvested 24 h after surgery. The intestinal pathological changes were observed under light microscope. The expression of tight junction proteins ZO-1, Occludin, and Claudin-1 in the ileum were measured by Western blot. IL-6 and PGE₂ level in the ileum were measured by ELISA. **Results** Compared with group Sham, the intestinal permeability was significantly increased and there was a significant intestinal pathological injury in group CLP. IL-6 and PGE₂ level in the ileum was significantly increased and the expression of tight junction protein ZO-1, Occludin, and Claudin-1 in the ileum were reduced in the group CLP ($P<0.05$). Compared with the group CLP, intestinal permeability and pathological injury was significantly reduced in the group P. The levels of IL-6 and PGE₂ were significantly decreased ($P<0.05$), the expression of ZO-1, Occludin, and Claudin-1 were up-regulated in group P ($P<0.05$). **Conclusion** Parecoxib can decrease the levels of proinflammatory factors and up-regulate the expression of tight junction to reverse intestinal barrier dysfunction caused by sepsis in mice.

【Key words】 Parecoxib; Sepsis; Intestinal barrier function; Tight junction protein

肠黏膜屏障功能损害是脓毒症发生发展的关键因素之一。保护肠黏膜屏障对于预防脓毒症时

多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)发生、提高脓毒症的预后至关重要^[1]。相关研究已证实环氧酶(COX-2)与脓毒症时肠黏膜屏障功能损害相关^[2]。帕瑞昔布钠属于选择性 COX-2 抑制剂的一种,是临床围术期常用的镇痛药物,其对脓毒症时肠黏膜屏障功能的影响尚不

基金项目:国家自然科学基金(81501647);广东省科技计划项目(2014A020212555)

作者单位:510010 广州军区广州总医院麻醉科

通信作者:屠伟峰, Email: wftuyx02@163.com

清楚。为此,本实验采用小鼠脓毒症模型,研究帕瑞昔布钠对脓毒症小鼠肠黏膜屏障功能的影响及可能机制。

材料与方法

动物与主要试剂 本实验通过医院实验动物伦理委员会审查。10 周龄左右雄性健康清洁级 C57BL/6 小鼠。帕瑞昔布钠,FD4,兔源性抗 Occludin 抗体,兔源性抗 ZO-1 抗体、兔源性抗 Caludin-1 抗体,羊抗兔二抗,小鼠 IL-6、PGE₂ ELISA 试剂盒,BCA 法蛋白定量试剂盒。

分组与模型制作 21 只小鼠共分为三组用于肠通透性检测:假手术组(Sham 组)、脓毒症模型组(CLP 组)、脓毒症模型+帕瑞昔布钠组(P 组),每组 7 只。另取 21 只小鼠,分组及治疗同前,用于 HE 染色、Western Blot 及 ELISA 检测实验。制作模型步骤如下:戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉小鼠。麻醉满意后,剃去腹部毛发,碘伏常规消毒。沿下腹正中作一长约 1.5 cm 切口。用无菌镊探查并暴露盲肠。在盲肠中部结扎,以 22G 针头将盲肠贯通穿孔 1 次,挤出少许粪便于腹腔内,随即将盲肠还纳于腹腔内,关腹。假手术组开腹后即缝合关腹。术后皮下注射小量预热生理盐水,预热垫上复苏。造模成功后,P 组小鼠术后 2 h 用帕瑞昔布钠溶液按 2 mg/kg 灌胃一次,CLP 组小鼠给予等剂量生理盐水。帕瑞昔布钠溶液的给药剂量通过前期预实验结果得出。

肠通透性检测 采用在体襻环结扎的方法检测肠通透性^[1],具体步骤如下:术后 24 h,麻醉小鼠,开腹,距回盲瓣 0.5 cm 处选取回肠 10 cm,两端丝线结扎,从近端小肠向肠腔内灌注 FD4 0.5 ml (浓度 4 g/L),以盐水纱布覆盖该段小肠。30 min 后,细针抽取门静脉血 0.1 ml,并用 0.9 ml PBS 稀释,离心取上清。转移到 96 孔板,每个标本做一复孔,每孔 100 μ l。然后用荧光分光光度计测定标本

FD4 浓度,激发波长和发射波长分别设定为 480 nm 和 528 nm。

HE 染色 剪取部分小肠黏膜置于 10% 中性甲醛溶液中固定 24 h,石蜡包埋,连续切片,切片厚度为 5 μ m,作 HE 染色,光镜下观察组织病理学改变,评估肠道上皮组织损伤程度。

Western blot 法检测 参照蛋白提取试剂盒说明提取小鼠小肠组织总蛋白,煮沸变性,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度。蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳,转移至硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶粉封闭 2 h。用 ZO-1、Occludin、Caludin-1 多克隆抗体(1:1 000 稀释)进行孵育,4℃ 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。 β -actin 为内参,以 Sham 组小鼠小肠组织中的蛋白表达水平为基准,计算其他组小鼠小肠组织中 ZO-1、Occludin 及 Caludin-1 蛋白的相对表达量。

ELISA 法检测 回肠组织匀浆后,按照 BCA 法测定蛋白浓度,用去离子水将蛋白浓度调成一致,按照试剂盒说明书检测各组小肠组织匀浆内 IL-6 及 PGE₂ 的浓度。

统计分析 采用 GraphPad Prism 5.0 软件分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Dunnett 检验;非正态分布计量资料组间比较采用 Kruskal-Wallis 非参数检验,两两比较采用 Dunns 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

脓毒症小鼠小肠损伤 光镜下观察各组小鼠小肠 HE 染色病理切片。结果显示,Sham 组小肠各层结构清晰,黏膜表层完整,腺体排列整齐;CLP 组小鼠小肠黏膜萎缩、绒毛结构模糊,部分区域绒毛脱落、断裂,P 组小鼠小肠绒毛结构破坏相对较轻,黏膜萎缩减轻,炎性细胞浸润相对减少(图 1)。

脓毒症小鼠肠通透性 与 Sham 组比较,CLP

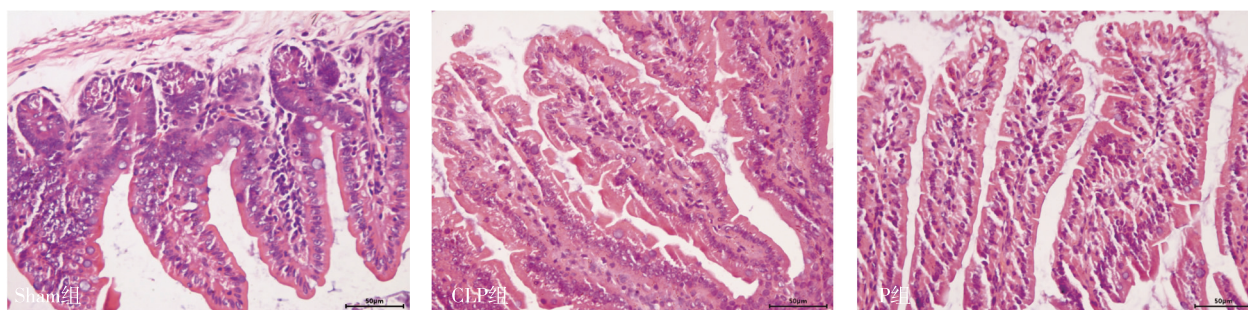
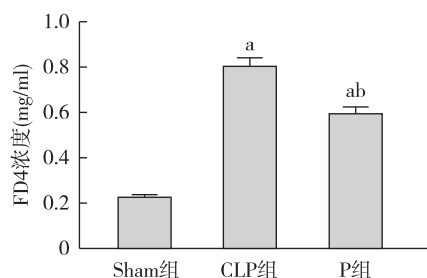


图 1 三组小鼠小肠组织光镜下病理改变(HE 50 μ m $\times$ 500)

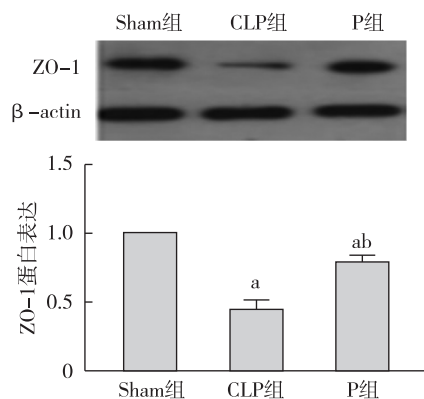
组和 P 组小鼠门静脉血内 FD4 浓度明显升高 ($P < 0.05$)。与 CLP 组比较, P 组小鼠门静脉血内 FD4 浓度明显降低 ($P < 0.05$) (图 2)。



注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 CLP 组比较,^b $P < 0.05$

图 2 三组小鼠门静脉血内 FD4 浓度的比较

脓毒症小鼠肠紧密连接蛋白表达 与 Sham 组比较, CLP 组小鼠 ZO-1、Occludin 及 Claudin-1 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$); P 组小鼠 ZO-1、Occludin 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$), Claudin-1 蛋白表达两组差异无统计学意义。与 CLP 组比较, P 组小鼠 ZO-1、Occludin 及 Claudin-1 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$) (图 3~5)。



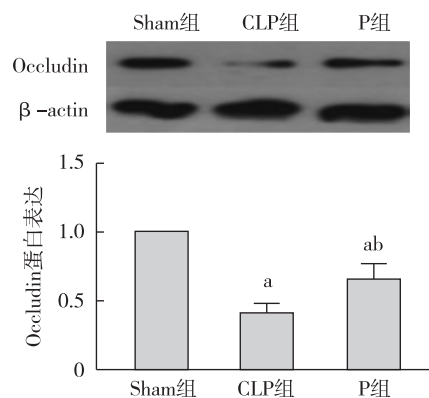
注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 CLP 组比较,^b $P < 0.05$

图 3 三组小鼠肠紧密连接蛋白 ZO-1 表达的比较

脓毒症小鼠肠炎症水平 与 Sham 组比较, CLP 组小鼠 IL-6 及 PGE₂ 浓度明显升高 ($P < 0.05$); P 组小鼠 PGE₂ 浓度明显升高 ($P < 0.05$), 而 IL-6 浓度两组差异无统计学意义。与 CLP 组比较, P 组小鼠 IL-6 及 PGE₂ 浓度明显降低 ($P < 0.05$) (图 6, 7)。

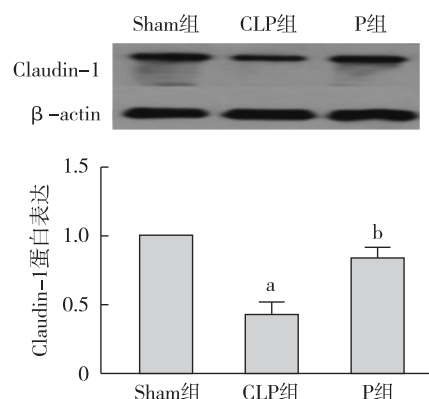
讨 论

脓毒症是指机体对感染的反应失调而导致危及生命的器官功能障碍^[3]。脓毒症可通过多种机制



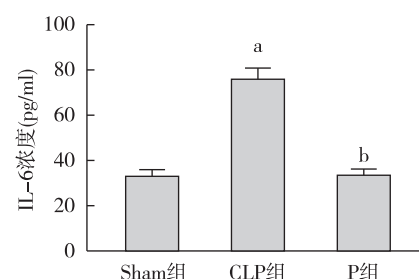
注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 CLP 组比较,^b $P < 0.05$

图 4 三组小鼠肠紧密连接蛋白 Occludin 表达的比较



注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 CLP 组比较,^b $P < 0.05$

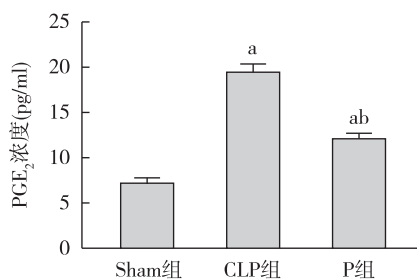
图 5 三组小鼠肠紧密连接蛋白 Claudin-1 表达的比较



注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 CLP 组比较,^b $P < 0.05$

图 6 三组小鼠小肠内 IL-6 浓度的比较

导致肠屏障功能破坏,其结果将导致肠道内的细菌及毒素入血,加重全身炎症反应。防止肠道屏障功能障碍是防治脓毒症、MODS 的最重要措施之一^[4]。相关研究已表明 COX-2 与脓毒症肠屏障功能损害相关^[2,5~7]。本实验结果显示选择性 COX-2 抑制剂帕瑞昔布钠对脓毒症小鼠肠屏障功能具有保护作用,可以减轻肠黏膜损伤、降低肠黏膜通透性,其机制可能与增加脓毒症小鼠肠紧密连接蛋白



注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 CLP 组比较,^b $P < 0.05$

图 7 三组小鼠小肠内 PGE₂ 浓度的比较

表达、降低脓毒症小鼠肠组织炎症水平有关。

本研究结果显示,发现帕瑞昔布钠治疗可以明显改善脓毒症导致的小鼠肠损伤,肠组织结构破坏及形态异常均明显减轻。Schildberg 等^[8]研究也表明帕瑞昔布钠对移植小肠的肠缺血-再灌注损伤起减轻作用,其机制可能与其抗炎作用有关。

肠黏膜屏障功能障碍主要体现在肠通透性增加。研究已证实脓毒症可引起小鼠肠通透性显著增加^[1],本研究结果同样显示,帕瑞昔布钠术后给药可以降低脓毒症小鼠小肠的通透性。Schulz 等^[7]利用 LPS 腹腔注射模型也证实帕瑞昔布钠可以降低脓毒症大鼠小肠的通透性,本研究结果与其一致。

作为肠黏膜屏障的主要组成部分,机械屏障的破坏是引起肠通透性增加的主要原因。肠机械屏障由肠上皮细胞及细胞间的连接组成,Occludin、Claudin-1 和 ZO-1 等紧密连接蛋白是维系细胞间连接的重要成份^[9]。脓毒症导致的肠黏膜屏障的破坏常常伴随着肠上皮紧密连接结构和功能的改变。动物模型研究表明脓毒症可降低肠主要紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 的表达^[5]。为进一步探讨帕瑞昔布钠能够预防脓毒症导致的肠上皮通透性增加的机制,本实验检测了不同组小鼠手术后肠紧密连接蛋白的表达变化。结果发现,帕瑞昔布钠治疗可以增加脓毒症小鼠肠紧密连接蛋白表达。因此,恢复肠紧密连接蛋白表达可能是帕瑞昔布钠能够预防脓毒症导致的肠上皮通透性增加的机制之一。

炎症因子不仅是引起肠黏膜损伤的因素,也是导致肠紧密连接蛋白表达下降的原因之一。在体实验证实 IL-6 敲除可降低脓毒症导致的肠上皮通透性增加^[10],同时研究也发现 IL-6 可调节紧密连接蛋白 ZO-1 在肠组织的表达^[11]。COX 的功能就是催化炎症介质的产生,帕瑞昔布钠作为 COX-2 的

抑制剂能明显下调 IL-6 的表达。Osterberg 等^[12]研究发现 COX-2 抑制剂减轻肠黏膜损伤与降低腹水和血液中 IL-6 的浓度有关。本研究直接检测肠黏膜内的 IL-6 浓度,结果显示帕瑞昔布钠可以降低肠组织内炎症因子的水平,我们前期研究也表明降低肠组织内 TNF- α 、IL-6、MCP-1 等炎症因子的浓度对肠黏膜屏障功能具有保护作用^[1]。

PGE₂ 是 COX 催化的主要下游产物之一。先前研究已提示选择性 COX-2 抑制剂抑制 PGE₂ 表达或者抑制 PGE₂ 的高表达可能减轻脓毒症及肠黏膜屏障功能障碍^[6,13]。本研究结果也显示脓毒症小鼠肠黏膜内 PGE₂ 浓度明显增加,而帕瑞昔布钠治疗可以明显降低肠黏膜内 PGE₂ 的浓度,这可能也是其对肠黏膜屏障功能保护的机制之一。

虽然帕瑞昔布钠治疗组小鼠小肠损伤、小肠通透性、肠紧密连接蛋白表达及肠道内炎症因子 IL-6 和 PGE₂ 的浓度与脓毒症组小鼠比较有明显差异,但多数指标同样与假手术组小鼠比较也存在明显差异,表明帕瑞昔布钠治疗对脓毒症导致的肠道屏障功能损伤有一定的减轻作用,但因为脓毒症发病机制复杂,单凭一种药物治疗尚不能完全保护受损的肠屏障功能。

帕瑞昔布钠属于临床常用的选择性 COX-2 抑制剂的一种。相对于非选择性 COX 抑制剂,帕瑞昔布钠不抑制 COX-1,对患者胃肠功能的影响较小。Osterberg 等^[12]也比较过选择性 COX-2 抑制剂 SC-236 和非选择性 COX 抑制剂吲哚美辛对脓毒症小鼠肠免疫屏障功能的不同作用,发现非选择性 COX 抑制剂不能减轻脓毒症小鼠小肠黏膜损伤,再次证明了 COX-1 对于维持胃肠道黏膜的稳态的重要作用,也是我们选择研究帕瑞昔布钠的原因。

本研究还存在一些不足。研究未进行毒素或细菌移位的检测。毒素或细菌移位也是肠屏障功能损害的主要表现,本实验中检测的是肠通透性的改变,未检测其它炎症因子浓度,包括促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 及抗炎性细胞因子 IL-10 等的浓度。另外,虽然本研究旨在观察帕瑞昔布钠减轻脓毒症小鼠肠屏障功能障碍的效果,但研究中未加入帕瑞昔布钠治疗假手术小鼠作为对照。

综上所述,本实验结果显示选择性 COX-2 抑制剂帕瑞昔布钠可减轻脓毒症小鼠肠屏障功能的损害,其机制与其减轻局部炎症、减少肠紧密连接破坏等有关。

参 考 文 献

- [1] Wu Y, Chung CS, Chen Y, et al. A novel role for programmed cell death receptor ligand-1 (pd-l1) in sepsis-induced intestinal dysfunction Mol Med, 2016, 22.
- [2] 吴友平, 刘玉玲, 屠伟峰. COX-2 与脓毒症肠屏障功能障碍关系的研究进展. 中国现代医药杂志, 2017, 19(1): 97-100.
- [3] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). JAMA, 2016, 315(8): 801-810.
- [4] 屠伟峰. 肠源性 MODS 的治疗进展. 临床麻醉学杂志, 2003, 19(2): 124-126.
- [5] Fredenburgh LE, Velandia MM, Ma J, et al. Cyclooxygenase-2 deficiency leads to intestinal barrier dysfunction and increased mortality during polymicrobial sepsis. J Immunol, 2011, 187(10): 5255-5267.
- [6] Short SS, Wang J, Castle SL, et al. Low doses of celecoxib attenuate gut barrier failure during experimental peritonitis. Lab Invest, 2013, 93(12): 1265-1275.
- [7] Schulz K, Sommer O, Jargon D, et al. Cytokine and radical inhibition in septic intestinal barrier failure. J Surg Res, 2015, 193(2): 831-840.
- [8] Schildberg FA, Liu B, Afify M, et al. Cyclooxygenase inhibitors as a new therapeutic strategy in small bowel transplantation. Transplantation, 2016, 100(11): 2324-2331.
- [9] Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. J Allergy Clin Immunol, 2009, 124(1): 3-20; quiz 21-22.
- [10] Wang Q, Fang CH, Hasselgren PO. Intestinal permeability is reduced and IL-10 levels are increased in septic IL-6 knockout mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001, 281(3): R1013-R1023.
- [11] Yang R, Han X, Uchiyama T, et al. IL-6 is essential for development of gut barrier dysfunction after hemorrhagic shock and resuscitation in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 285(3): G621-G629.
- [12] Osterberg J, Ljungdahl M, Haglund U. Influence of cyclooxygenase inhibitors on gut immune cell distribution and apoptosis rate in experimental sepsis. Shock, 2006, 25(2): 147-154.
- [13] Reddy RC, Chen GH, Tateda K, et al. Selective inhibition of COX-2 improves early survival in murine endotoxemia but not in bacterial peritonitis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 281(3): L537-L543.

(收稿日期:2017-03-09)

· 消息 ·

《临床麻醉学杂志》再次入选“中国精品科技期刊”

2017 年 10 月 31 日,由科技部中国科学技术信息研究所主办的“中国科技论文统计结果发布会”在北京国际会议中心举行,会上揭晓了“第四届中国精品科技期刊”、“2016 年百种中国杰出学术期刊”的评选结果。《临床麻醉学杂志》继 2014 年首次入选“第三届中国精品科技期刊”后,再次入选“第四届中国精品科技期刊”。本刊有 20 篇论文入选中国精品科技期刊顶尖论文(F5000)。

会上同时发布了 2017 年版《中国科技期刊引证报告(核心版)》。共有 2008 种期刊入选本年度中国科技核心期刊。《临床麻醉学杂志》2016 年核心总被引频次 3 156,核心影响因子 1.538,在 23 种外科学综合类期刊中排在第 3 位。