

基于 PERK-eIF2 α -NF- κ B 信号通路研究甘草酸苷对小鼠肠上皮细胞内质网应激的保护作用

沈雁^a, 王章流^a, 钟继红^a, 倪思忆^a, 林敏^{b*} (浙江中医药大学附属第二医院, a.消化内科, b.放射科, 杭州 310005)

摘要: 目的 从蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)-真核细胞起始因子 2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α)-核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)信号通路角度观察甘草酸苷(glycyrrhizin, GL)对肠上皮细胞(intestinal epithelial cells, IECs)的保护作用, 并探讨其治疗溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的可能作用机制。方法 体外培养并通过免疫荧光法鉴定小鼠 IECs, H₂O₂ 刺激法建立细胞内质网应激模型, GL 组于造模同时给予不同剂量的 GL 干预。采用 CCK8 法检测细胞的存活率; 流式细胞术检测细胞的凋亡水平; 细胞跨膜电阻抗和异硫氰酸荧光素标记的右旋糖酐(fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-dextran)法共同明确细胞屏障的通透性; Western blotting 检测细胞中 PERK-eIF2 α -NF- κ B 通路核心蛋白的表达水平。结果 与模型对照组相比, GL 中、高剂量组的存活率均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 凋亡率均下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$); GL 各剂量组单层膜细胞的细胞跨膜电阻抗值均显著升高($P<0.01$)、FITC-dextran 浓度均显著下降($P<0.01$), p-PERK、p-eIF2 α 和 NF- κ B 蛋白的水平均下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 GL 通过抑制 PERK-eIF2 α -NF- κ B 信号通路的活化, 从而提高小鼠体外细胞内质网应激状态下 IECs 的存活率, 降低其凋亡水平, 并改善细胞屏障的通透性, 这可能是 GL 保护 IECs、治疗 UC 的部分作用机制。

关键词: 甘草酸苷; 溃疡性结肠炎; 肠上皮细胞; 内质网应激; PERK-eIF2 α -NF- κ B 信号通路

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)11-1389-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.11.001

引用本文: 沈雁, 王章流, 钟继红, 等. 基于 PERK-eIF2 α -NF- κ B 信号通路研究甘草酸苷对小鼠肠上皮细胞内质网应激的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(11): 1389-1394.

Protective Effect of Glycyrrhizin on Endoplasmic Reticulum Stress in Mouse Intestinal Epithelial Cells Based on PERK-eIF2 α -NF- κ B Signaling Pathway

SHEN Yan^a, WANG Zhangliu^a, ZHONG Jihong^a, NI Siyi^a, LIN Min^{b*} (The Second Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, a. Department of Gastroenterology, b. Department of Radiology, Hangzhou 310005, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the protective effect of glycyrrhizin(GL) on intestinal epithelial cells(IECs) from the perspective of protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase(PERK)-eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α)-nuclear factor kappa B(NF- κ B) signaling pathway, and to explore the possible therapeutic mechanism of GL on treating ulcerative colitis(UC). **METHODS** Mice's IECs were cultured and identified by immunofluorescence assay *in vitro*, endoplasmic reticulum stress model was established by H₂O₂ stimulation, and GL groups were given different doses of GL intervention simultaneously while modeling. The cell's survival rate was assessed by CCK8 method. The apoptosis rate was tested by flow cytometry. The cell barrier permeability was determined by transepithelial resistance and fluorescein isothiocyanate-dextran(FITC-dextran) method. And the proteins' expression levels of PERK-eIF2 α -NF- κ B pathway were detected by Western blotting. **RESULTS** Compared with model control group, the survival rates of GL middle and high dose groups were increased($P<0.05$ or $P<0.01$), their apoptosis rates were decreased($P<0.05$ or $P<0.01$). The transepithelial resistance values in GL groups were all distinctly elevated($P<0.01$), their FITC-dextran concentration were all markedly declined($P<0.01$), and their expression levels of p-PERK, p-eIF2 α and NF- κ B were all descended($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSION** GL can increase the survival rate and reduce the apoptosis rate of IECs *in vitro* under endoplasmic reticulum stress state in mice, and improve the permeability of cell barrier by inhibiting the activation of PERK-eIF2 α -NF- κ B signaling pathway, which might be partial mechanism of GL protecting IECs and treating UC.

KEYWORDS: glycyrrhizin; ulcerative colitis; intestinal epithelial cells; endoplasmic reticulum stress; PERK-eIF2 α -NF- κ B signaling pathway

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(81804005); 浙江省医药卫生科技计划青年人才项目(2019306249)

作者简介: 沈雁, 女, 硕士, 副主任医师 E-mail: shendanxi61115@163.com *通信作者: 林敏, 男, 硕士, 主任医师, 硕导

E-mail:

lmdg1027@163.com

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种复发性肠道炎症性疾病,临床上易慢性化、重症化,已被世界卫生组织列为现代难治病之一^[1]。UC的确切病理机制仍在探索中,其发病机制涉及多种因素的交互作用,其中免疫异常是迄今公认的致病机制之一^[2],而肠黏膜屏障损伤则是导致UC结肠免疫炎症反应持续存在的核心事件^[3-4]。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)状态下激活的蛋白激酶 R 样内质网激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)-真核细胞起始因子 2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α)信号通路是介导重要炎症介质——核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)活化的途径之一^[5],肠道局部 NF- κ B 过度活化后促进肠上皮细胞(intestinal epithelial cells, IECs)发生免疫炎症损伤和凋亡,破坏肠黏膜屏障的完整性,从而引起UC的发生发展。甘草酸苷(glycyrrhizin, GL)是从中药甘草中提取的三萜苷,具有较强的抑制炎症和免疫调节作用^[6]。研究表明, GL 抗炎效果确切,对实验性结肠炎具有良好的保护作用,但具体作用机制尚不明确^[7-9]。本研究通过建立体外肠细胞 ERS 模型,从细胞功能、分子水平方面综合评价 GL 对 ERS 状态下 IECs 的保护作用,并探讨其可能的作用机制,为临床使用 GL 治疗 UC 提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

GL 对照品[货号: 50531; 纯度 $\geq 95.0\%$ (NT)]、PERK 一抗(货号: P0074)、eIF2 α 一抗(货号: SAB4500729)、NF- κ B 一抗(货号: SAB4502609)、胶原酶 XI(货号: C7657)、中性蛋白酶 I(货号: D4818)、山梨醇(货号: S3889)和 DAPI 液(货号: D9542)均购自 Sigma-Aldrich 公司; Anti-Phospho-PERK(Bioss, 货号: bs-23340R); Anti-Phospho-eIF2 α (CST, 货号: 3398S); Cytokeratin18 一抗(Santa cruz, 货号: SC28264); 羊抗兔、羊抗鼠二抗(货号分别为 GAR0072, GAM007)、CCK8 试剂盒和凋亡试剂盒(货号分别为 A96640123, AP105-60-kit)均购自上海联科生物有限公司; DMEM 培养基、胎牛血清和胰蛋白酶(货号分别为 C11995500BT, 10099141, 27250018)均购自 GIBCO 公司。

3111 型 CO₂ 细胞培养箱、1384A2 型生物安全操作柜和 MicroCL Fresco 离心机均购自美国

Thermo 公司; IX73 型倒置生物荧光显微镜(Olympus 公司); SpectraMax Plus 384 型全波长酶标仪、Accuri C6 型流式细胞仪均购自美国 BD 公司; Mini-Proten Tetra System 电泳系统和 ChemiDoc XRS+System 凝胶成像仪均购自美国 Bio-Rad 公司; Millicell-ERS 跨膜电阻仪(美国 Millipore 公司)。

健康 SPF 级、怀孕 16~19 d 的♂ BALB/c 小鼠 45 只, 体质量(20 $\pm$ 2)g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 动物生产许可证号: SCXK(沪)2017-0005; 动物使用许可证号: SYXK(浙)2020-0013。本研究已获得杭州赫贝科技有限公司实验动物伦理委员会批准(批件编号: HB2012030)。

1.2 小鼠 IECs 的培养和鉴定

参照孙秀梅等^[10]的方法取一次性细胞培养皿, 加入质量分数 0.2%明胶铺满整个皿底, 置于 37℃作用 4 h 后取出, 吸去明胶, 用 PBS 洗 3 遍, 超净台中晾干备用。

无菌条件下取出 16~19 d 龄的胎鼠小肠, 放入预冷的 PBS 中, 剔除肠系膜及血管, 将肠管剪成 1 mm³的组织块, 用无血清的 DMEM 清洗数次后, 157 $\times$ g 离心 3 min, 弃上清, 向沉淀中加入适量胶原酶 XI 和中性蛋白酶 I 在 37℃下消化 20 min, 用移液枪吹打 150 次, 静置 1 min, 取上清, 重复 2 次; 向上清液中加入 10 mL 分散液(分散液配方: DMEM 中添加体积分数 2%山梨醇和体积分数 2.5% FBS, 0.2 μ m 过滤除菌, 4℃保存), 混匀, 157 $\times$ g 离心 3 min, 弃去上清液, 沉淀用分散液重悬, 重复 5~6 次, 直到上清液澄清且隐窝单位明显。将细胞后接种于明胶包被的培养皿中, 培养 48 h 后换液(P1 代)。当细胞密度达 80%后传代 1~2 次(P2~P3 代)。取 P2 代 IECs, 接种 24 孔板, 爬片, 培养过夜, 待细胞贴壁后行免疫荧光染色: 4%多聚甲醛固定, 漂洗, 10%BSA 封闭, Cytokeratin18 一抗(1:100) 4℃孵育过夜, 漂洗, 羊抗兔二抗(1:500)孵育 1 h, 漂洗, 10 ng $\cdot$ mL⁻¹的 DAPI 工作液孵育 30 min, 漂洗, 荧光显微镜下观察并鉴定细胞。

1.3 分组和药物干预

试验共分 5 组: 正常对照组、模型对照组和 GL 低、中、高剂量组。采用 H₂O₂ 刺激法(0.4 mmol $\cdot$ L⁻¹的 H₂O₂ 作用细胞 2 h)建立细胞 ERS 模型^[11]。

1.4 CCK8 法检测细胞的存活率

调整 IECs 浓度为 1 $\times$ 10⁴ $\cdot$ mL⁻¹, 接种于 96 孔

培养板, 每孔 200 μL , 培养 24 h 后吸弃上清。各组细胞的药物干预方案如下: ①正常对照组: 用不含药物的完全培养基孵育 24 h; ②模型对照组: 用含 $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ 的培养基孵育 2 h 后, 再用不含药物的完全培养基孵育 22 h; ③GL 低、中、高剂量组: 用含 $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ 的培养基孵育 2 h 后, 再分别用含 0.5, 1.0, 2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ GL 的培养基孵育 22 h。各孔含药培养基的终容积均为 200 μL 。药物干预结束后, 用 PBS 洗涤, 每孔加入 10 μL CCK8 工作液, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 2 h, 450 nm 读板, 记录 OD 值。每组重复 6 次。

1.5 流式细胞术检测细胞的凋亡率

调整 IECs 浓度为 $1\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$, 取 3 mL 接种于中号培养皿, 培养 24 h 后吸弃上清。按“1.3”项下分组和药物方案进行干预, 各组含药培养基的终容积均为 3 mL。药物干预结束后, 以不含 EDTA 的胰酶消化细胞, PBS 漂洗 2 次, 366 $\times g$ 离心 5 min。后续步骤按照凋亡试剂盒说明进行。每组重复 3 次。

1.6 Millicell-ERS 电阻仪检测细胞的跨膜电阻抗 (transepithelial resistance, TEER)

调整 IECs 浓度为 $2\times 10^4\cdot\text{mL}^{-1}$, 接种至 Transwell 顶室中, 每孔 200 μL 。底室中加入完全培养基 600 μL 。12 h 顶室中细胞贴壁完全后吸弃上清。按“1.3”项下分组和给药方案进行干预, 各孔含药培养基的终容积均为 200 μL 。药物干预结束后, 检测单层膜细胞的 TEER。每组重复 3 次。

1.7 异硫氰酸荧光素标记的右旋糖酐 (fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-dextran) 法检测细胞旁通透性

按“1.3”项下方法分组和药物干预后, 继续作用 24 h, 用 Hank 盐平衡液清洗顶室、底室, 向顶室内加入 100 μL FITC-dextran ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 下室

内加入 500 μL Hank 盐平衡液, 37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 2 h, 期间每 30 min 从基底侧收集 1 次上清液, 置于 96 孔板上, 用荧光分光光度计测定其荧光强度, 激发光波长为 480 nm, 发射光波长为 520 nm, 制作标准曲线并计算 FITC-dextran 浓度。每组重复 3 次。

1.8 Western blotting 检测细胞内通路蛋白的表达水平

按“1.3”项下方法分组和药物干预后, 胰酶消化、离心收集细胞沉淀, 裂解细胞, 离心收集上清液。BCA 法测定蛋白浓度, 各组蛋白均取 30 μg , 加等体积上样 Buffer 混合, 变性后以每孔 30 μL 的体积上样, 行 SDS-PAGE 电泳。200 mA 电转 2.5 h, PVDF 膜浸入封闭液室温封闭 1 h。TBST 缓冲液洗膜后移入分别含有 PERK、eIF2 α 、anti-Phospho-PEPK、anti-Phospho-eIF2 α 和 NF- κB 一抗 (稀释比例为 1:1 000) 的孵育盒中过夜; 洗膜 3 次, 转移到含二抗 (稀释比例为 1:5 000) 的孵育盒中孵育 1 h; 再次洗膜 3 次后用增强化学发光法检测阳性信号, 分析各电泳条带的性质。

1.9 统计学分析

应用 SPSS 20.0 统计软件对实验数据进行处理, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 2 组间均数比较采用独立样本 t 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析及 LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠 IECs 的鉴定

荧光显微镜明场下观察 P2 代小鼠 IECs 的形态 (图 1A)。免疫荧光染色后, 荧光显微镜紫外通道和蓝光通道下观察并鉴定细胞, 可见 IECs 的标志性蛋白 Cytokeratin 18 呈阳性 (图 1B~D), 表明细胞纯度较高。

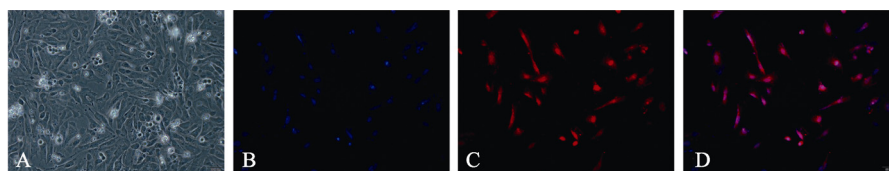


图 1 荧光显微镜下 P2 代 IECs 形态 (100 $\times$)

A-明场下观察的细胞形态; B-DAPI 标记的细胞核; C-荧光一抗及免疫二抗标记的细胞中表达阳性的 Cytokeratin 18 蛋白; D-通道叠加后显示的细胞核和阳性 Cytokeratin 18 蛋白。

Fig. 1 IECs morphology of P2 generation under the fluorescence microscope (100 $\times$)

A-cell morphology observed under a bright-field microscope; B-DAPI-labeled cell nucleus; C-positive Cytokeratin 18 expressed in the fluorescent primary antibody and immunosecondary antibody labeled cells; D-cell nucleus and positive Cytokeratin 18 shown under channel superposition.

2.2 GL 对应激状态 IECs 存活率和凋亡率的影响

CCK8 法结果显示,与正常对照组相比,模型对照组细胞的存活率明显下降($P<0.01$),提示 ERS 状态下细胞损伤严重;与模型对照组相比,GL 中、高剂量组细胞的存活率明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明 GL 能够对 H_2O_2 造成的细胞应激损伤发挥一定的治疗作用,结果见表 1。

流式细胞术的结果显示,与正常对照组相比,模型对照组细胞的凋亡率明显升高($P<0.01$),提示 ERS 状态下细胞发生大量凋亡;与模型对照组相比,GL 中、高剂量组细胞的凋亡率明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明 GL 能够抑制 H_2O_2 造成的细胞凋亡,结果见表 1 和图 2。

2.3 GL 对应激状态 IECs 屏障通透性的影响

TEER 检测和 FITC-dextran 法的结果显示,与正常对照组相比,模型对照组的 TEER 值明显下降($P<0.01$)、FITC-dextran 浓度明显升高

($P<0.01$),提示 ERS 状态下体外单层 IECs 膜通透性增加、细胞屏障受损;与模型对照组相比,GL 各剂量组的 TEER 值均明显升高($P<0.01$)、FITC-dextran 浓度均明显降低($P<0.01$),表明 GL 能够对 H_2O_2 造成的细胞屏障损伤发挥保护作用,结果见表 2。

2.4 GL 对应激状态 IECs 中通路蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示,与正常对照组相比,模型对照组细胞中的磷酸化 PERK(p-PERK)、磷酸化 eIF2 α (p-eIF2 α)和 NF- κ B 蛋白的表达水平均显著升高($P<0.01$),提示 ERS 状态下 PERK-eIF2 α -NF- κ B 信号通路被激活;与模型对照组相比,GL 各剂量组细胞中上述蛋白的表达水平均下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明 GL 能够抑制该通路关键蛋白的活化;此外,GL 高剂量组中 p-PERK 和 NF- κ B 蛋白的水平与正常对照组相当,差异无统计学意义,结果见图 3。

表 1 不同浓度 GL 对 IECs 存活率和凋亡率的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effects of different concentrations of GL on survival rate and apoptosis rate of IECs($\bar{x} \pm s$)

组别	药物剂量	存活率($n=6$)/%	凋亡率($n=3$)/%
正常对照组	—	99.08 $\pm$ 3.20	12.65 $\pm$ 1.07
模型对照组	0.4 mmol·L ⁻¹ H ₂ O ₂	52.40 $\pm$ 4.71 ¹⁾	36.33 $\pm$ 5.82 ¹⁾
GL 低剂量组	0.4 mmol·L ⁻¹ H ₂ O ₂ +0.5 mmol·L ⁻¹ GL	54.05 $\pm$ 2.16 ¹⁾	32.10 $\pm$ 2.44 ¹⁾
GL 中剂量组	0.4 mmol·L ⁻¹ H ₂ O ₂ +1.0 mmol·L ⁻¹ GL	66.72 $\pm$ 4.25 ¹⁾²⁾	27.50 $\pm$ 1.35 ¹⁾²⁾
GL 高剂量组	0.4 mmol·L ⁻¹ H ₂ O ₂ +2.0 mmol·L ⁻¹ GL	79.93 $\pm$ 3.70 ¹⁾³⁾	20.03 $\pm$ 2.16 ¹⁾³⁾

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.01$;与模型对照组比较,²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model control group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

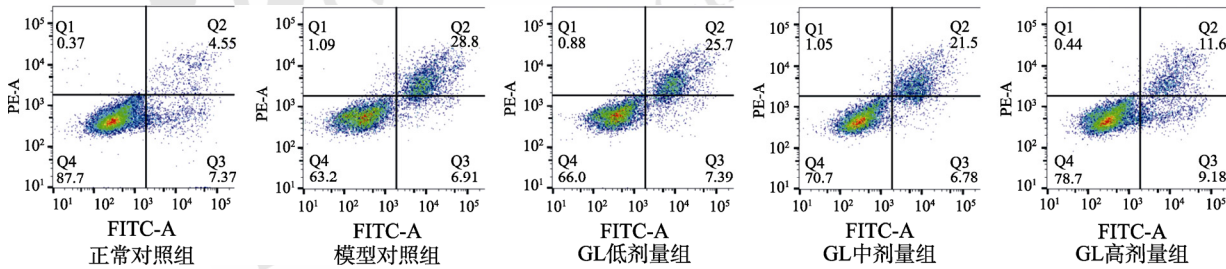


图 2 各组 IECs 凋亡情况的比较

Fig. 2 Comparison of IECs apoptosis in each group

表 2 不同浓度 GL 对 IECs 屏障通透性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 2 Effects of different concentrations of GL on cell barrier permeability of IECs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	药物剂量	TEER/ $\Omega \cdot \text{cm}^2$	FITC-dextran/mg·mL ⁻¹
正常对照组	—	572.50 $\pm$ 30.07	0.000 6 $\pm$ 0.000 1
模型对照组	0.4 mmol·L ⁻¹ H ₂ O ₂	280.77 $\pm$ 20.36 ¹⁾	0.014 9 $\pm$ 0.000 8 ¹⁾
GL 低剂量组	0.4 mmol·L ⁻¹ H ₂ O ₂ +0.5 mmol·L ⁻¹ GL	320.40 $\pm$ 19.76 ¹⁾²⁾	0.007 2 $\pm$ 0.000 6 ¹⁾²⁾
GL 中剂量组	0.4 mmol·L ⁻¹ H ₂ O ₂ +1.0 mmol·L ⁻¹ GL	398.12 $\pm$ 24.45 ¹⁾²⁾	0.004 3 $\pm$ 0.000 5 ¹⁾²⁾
GL 高剂量组	0.4 mmol·L ⁻¹ H ₂ O ₂ +2.0 mmol·L ⁻¹ GL	518.91 $\pm$ 22.43 ¹⁾²⁾	0.001 0 $\pm$ 0.000 3 ¹⁾²⁾

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.01$;与模型对照组比较,²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model control group, ²⁾ $P<0.01$.

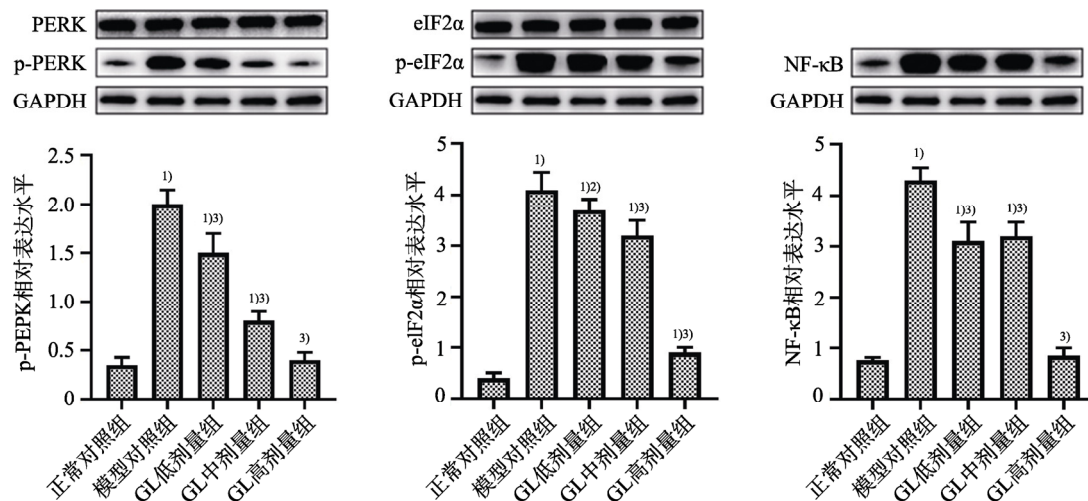


图3 GL对IECs中PERK-eIF2α-NF-κB通路蛋白表达水平的影响

与正常对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$; 与模型对照组比较, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effects of GL on expression level of PERK-eIF2α-NF-κB pathway protein of IECs

Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model control group, ²⁾ $P<0.05$, ³⁾ $P<0.01$.

3 讨论

NF-κB 是一类具有多向转录调节作用的核转录因子, 参与调节众多免疫炎症反应相关基因的转录和表达。研究证实^[12-13], UC 患者的结肠组织中普遍存在 NF-κB 的异常活化现象, 许多与 UC 密切相关的细胞因子基因启动子或增强子区域存在 κB 结合位点, 提示 NF-κB 的异常活化在 UC 病理机制中起关键作用。NF-κB 二聚体由 p50 和 p65 2 个亚基构成, 静息状态下与 NF-κB 抑制蛋白 (inhibitor of NF-κB, IκB) 结合形成三聚体, 后者以无活性形式存在于细胞质中。当细胞受到包括应激性损伤、细菌脂多糖等多种外界因素刺激时, 可使 NF-κB 游离并暴露核定位位点, 随后 NF-κB 迅速移位到细胞核内与 κB 序列结合, 引起多种致炎细胞因子的表达和分泌^[14]。ERS 是真核细胞中普遍存在的应激反应机制^[15]。作为 ERS 活跃性细胞, IECs 处于 ERS 状态下启动的 PERK-eIF2α 信号通路是介导肠道局部 NF-κB 异常活化的上游重要途径之一。研究表明^[16], PERK-eIF2α 信号通路介导的蛋白翻译减缓效应可直接导致 IκB 合成减少, 同时由于 IκB 的半衰期短于 NF-κB, 使得 NF-κB 与 IκB 的比值增高, NF-κB 过度活化并入核增加, 通过促进目标基因的转录而诱发免疫炎症反应。

肠黏膜屏障是机体内具有高度选择性屏障效应的功能结构体系之一, 其屏障功能主要表现为肠上皮通透性, IECs 是该体系中的关键结构基础。正常情况下, IECs 的生理性凋亡和损伤死亡与隐

窝基底部肠道干细胞的分化更新之间维持动态平衡^[17]; 但当其受到肠腔内病原微生物、黏膜炎性介质、缺血缺氧等应激原的刺激时易发生 ERS, 激活 PERK-eIF2α-NF-κB 信号通路, 引起肠道局部免疫异常, 细胞因过度的炎症反应而大量损伤凋亡。当应激原持续存在时, 肠道干细胞的补充修复难以抵偿 IECs 的损失, 导致肠黏膜屏障受损, 肠上皮通透性增高^[3-4], 肠腔内的各种抗原物质异常暴露于固有层黏膜相关淋巴组织, 刺激后者释放大量的致炎细胞因子, 进一步加重免疫炎症反应, 最终引起持续和(或)严重的结肠黏膜损伤。

GL 是从中药甘草根部提取的一种三萜苷类化合物, 具有保肝、抗炎、抗病毒、免疫调节及抗肿瘤等多种重要的生物活性和药理作用^[18]。研究表明, GL 能有效缓解多种结肠炎模型的症状和组织病理损伤, 其可能机制包括减少致炎因子和趋化因子表达、提高抗炎因子水平、抑制氧化损伤、促进淋巴细胞增殖等^[7-9]。一项关于 GL 保护鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium, ST) 所致小鼠结肠炎的机制研究^[19]的结果显示, GL 可通过显著减少 ST 在回结肠中的定植、减少 ST 向肝脏和脾脏的移位, 降低回结肠和血清中致炎细胞因子的分泌, 提高抗炎细胞因子的分泌, 调节肠道有害菌-有益菌的比例, 促进小鼠骨髓来源的树突状细胞的表型和功能成熟, 从而减轻 ST 感染小鼠的肠道炎症和肠黏膜损伤。本课题组的前期研究发现^[20]: GL 能有效降低右旋葡聚糖硫酸钠诱导结肠炎小鼠的疾病活动指数和结肠

黏膜损伤,明显减少结肠 IECs 的凋亡,从而显示出良好的抗炎和肠黏膜保护效应。但 GL 是否通过调控 ERS 状态下 PERK-eIF2 α -NF- κ B 通路的信号转导,从而影响 IECs 的凋亡、发挥细胞和肠黏膜屏障的保护作用等值得深入探索。本课题组以 H₂O₂ 刺激法建立的小鼠 IECs 体外 ERS 模型为研究对象进行了一系列实验,结果显示:①H₂O₂ 作为一种应激原,能诱导 IECs 发生严重损伤和大量凋亡,引起肠上皮通透性增加、细胞屏障受损;而 GL 干预能减轻应激导致的细胞损伤、减少细胞凋亡、降低肠上皮通透性,保护细胞屏障。②H₂O₂ 作用后 IECs 中的 p-PERK、p-eIF2 α 和 NF- κ B 蛋白水平均显著升高,提示细胞在 ERS 状态下激活了 PERK-eIF2 α -NF- κ B 信号通路;而 GL 干预可抑制该通路的信号转导,抑制 NF- κ B 异常活化,保护 IECs。

本研究结果阐释了 GL 治疗 UC 的部分机制,即 GL 可通过抑制 ERS 状态下 PERK-eIF2 α -NF- κ B 信号通路的激活,抑制 IECs 的应激损伤和过度凋亡,降低上皮通透性,进而对 UC 时受损的 IECs 和肠黏膜屏障发挥保护作用。本研究为 GL 的后续药理研究奠定一定的实验基础,为 GL 的进一步开发应用于炎症性肠病的临床治疗提供客观依据。

REFERENCES

- [1] LI X, SONG P G, LI J, et al. The disease burden and clinical characteristics of inflammatory bowel disease in the Chinese population: A systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2017, 14(3): 238.
- [2] BRESSLER B, MARSHALL J K, BERNSTEIN C N, et al. Clinical practice guidelines for the medical management of nonhospitalized ulcerative colitis: The Toronto consensus[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(5): 1035-1058.
- [3] VINDIGNI S M, ZISMAN T L, SUSKIND D L, et al. The intestinal microbiome, barrier function, and immune system in inflammatory bowel disease: A tripartite pathophysiological circuit with implications for new therapeutic directions[J]. *Therap Adv Gastroenterol*, 2016, 9(4): 606-625.
- [4] ZOU Y, LIN J T, LI W Y, et al. Huangqin-Tang ameliorates dextran sodium sulphate-induced colitis by regulating intestinal epithelial cell homeostasis, inflammation and immune response[J]. *Sci Rep*, 2016(6): 39299.
- [5] KOH S J, KIM J W, KIM B G, et al. Fexofenadine regulates nuclear factor- κ B signaling and endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells and ameliorates acute and chronic colitis in mice[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2015, 352(3): 455-461.
- [6] SU X T, WU L, HU M M, et al. Glycyrrhizic acid: A promising carrier material for anticancer therapy[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017(95): 670-678.
- [7] KUDO T, OKAMURA S, MASUO T, et al. Topical application of glycyrrhizin preparation ameliorates experimentally induced colitis in rats[J]. *World J Gastroenterol*(世界胃肠病学杂志: 英文版), 2011, 17(17): 2223-2228.
- [8] LIU Y, XIANG J, LIU M, et al. Protective effects of glycyrrhizic acid by rectal treatment on a TNBS-induced rat colitis model[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2011, 63(3): 439-446.
- [9] CHEN X Y, FANG D, LI L Y, et al. Glycyrrhizin ameliorates experimental colitis through attenuating interleukin-17-producing T cell responses via regulating antigen-presenting cells[J]. *Immunol Res*, 2017, 65(3): 666-680.
- [10] SUN X M, CHENG F, LIU W, et al. Comparison of four primary culture methods for mouse intestinal epithelial cells[J]. *J Northwest A F Univ Nat Sci Ed*(西北农林科技大学学报: 自然科学版), 2013, 41(5): 25-31.
- [11] CHAUDHARI N, TALWAR P, PARIMISSETTY A, et al. A molecular web: Endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress[J]. *Front Cell Neurosci*, 2014(8): 213.
- [12] LIN X Y, LIU J M. TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway and ulcerative colitis[J]. *Chin J Gastroenterol*(胃肠病学), 2013, 18(4): 244-246.
- [13] YU Z H, HUANG F, XU N, et al. Expression of Toll-like receptor 4, CD14, and NF- κ B in Chinese patients with ulcerative colitis[J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2011, 32(1): 47-56.
- [14] DOU W, ZHANG J J, LI H, et al. Plant flavonol isorhamnetin attenuates chemically induced inflammatory bowel disease via a PXR-dependent pathway[J]. *J Nutr Biochem*, 2014, 25(9): 923-933.
- [15] MÁRTON M, KURUCZ A, LIZÁK B, et al. A systems biological view of life-and-death decision with respect to endoplasmic reticulum stress-the role of PERK pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(1): 58.
- [16] THAKUR P C, DAVISON J M, STUCKENHOLZ C, et al. Dysregulated phosphatidylinositol signaling promotes endoplasmic-reticulum-stress-mediated intestinal mucosal injury and inflammation in zebrafish[J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7(1): 93-106.
- [17] CARTER S R, ZAHS A, PALMER J L, et al. Intestinal barrier disruption as a cause of mortality in combined radiation and burn injury[J]. *Shock*, 2013, 40(4): 281-289.
- [18] WANG L Q, YANG R, YUAN B C, et al. The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used Chinese herb[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(4): 310-315.
- [19] XU X G, GONG L, WANG B K, et al. Glycyrrhizin attenuates *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection: New insights into its protective mechanism[J]. *Front Immunol*, 2018(9): 2321.
- [20] SHEN Y, LYU B. Study of glycyrrhizin regulating caspase-12 apoptosis signaling pathway of endoplasmic reticulum stress to alleviate the colonic inflammatory response in ulcerative colitis[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*(中华中医药杂志), 2020, 35(8): 3872-3877.

收稿日期: 2021-03-22
(本文责编: 李艳芳)