

柚叶总多酚对 LPS 所致 Caco-2 细胞间高通透性的保护作用

宋家乐^{1,2,3}, 陈聪¹, 黄柳燕¹, 曾榛^{1,3}, 高扬⁴, 吴华⁴

(1. 桂林医学院公共卫生学院, 广西桂林 541100) (2. 东南大学公共卫生学院, 江苏南京 210009)

(3. 广西高校预防医学重点实验室, 广西桂林 541100) (4. 扬州大学附属苏北人民医院药学部, 江苏扬州 225001)

摘要: 本文探讨了柚叶总多酚对脂多糖(LPS, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)致 Caco-2 细胞高通透性的保护作用。MTT 法测定细胞生存率, 细胞内乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)水平依说明书使用试剂盒测定。酶联法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定白介素(Interlukin, IL)-1 β 、IL-8 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 分泌水平。跨上皮细胞电阻(trans epithelial electrical resistance, TEER)值和异硫氰酸荧光素-右旋糖酐(FD40)透过度用于评估细胞通透性水平。实时定量 PCR(Quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测细胞 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、闭锁蛋白(Occludin)、紧密连接蛋白-1(claudin-1)、ZO-1 和肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)的 mRNA 表达。柚叶总多酚能显著提高受损细胞生存率, 抑制 LDH 溢出, 有效抑制受损细胞炎性细胞因子(IL-1 β 、IL-8、TNF- α)的分泌及 mRNA 转录。柚叶总多酚可增强细胞紧密连接因子(Occludin、claudin-1、ZO-1)的 mRNA 转录, 抑制 MLCK 的 mRNA 转录从而改善细胞间高通透性。结果提示, 柚叶总多酚具有较强的抗炎活性, 能通过上调细胞内细胞紧密连接相关因子的 mRNA 转录显著改善 LPS 造成的 Caco-2 细胞间高通透性的发生。

关键词: 柚叶多酚; LPS; 肠上皮细胞; 屏障完整性

文章编号: 1673-9078(2018)08-1-7

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.8.001

Protective Effect of Total Polyphenolic Extracts from Pomelo Levels on LPS-induced Intercellular Hyperpermeability in Caco-2 Cells

SONG Jia-le^{1,2,3}, CHEN Cong¹, HUANG Liu-yan¹, ZENG Zhen^{1,3}, GAO Yang⁴, WU Hua⁴

(1. School of Public and Health, Guilin Medical University, Guilin 541100, China)(2. School of Public and Health, Southeast University, Nanjing 210009, China)(3. Guangxi Colleges and University Key Laboratory of Preventive Medicine, Guilin Medical University, Guilin 541100, China)(4. Department of Pharmacy, Affiliated Northern Jiangsu People's Hospital of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

Abstract: To investigate the protective effect of total polyphenolic extracts from pomelo levels (PLTPE) on lipopolysaccharide (LPS, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induced hyperpermeability in Caco-2 cells in this paper. The cell survival rate was measured by MTT assay. The cellular level of lactate dehydrogenase (LDH) was determined by kit. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the level of Interlukin (IL)-1 β , IL-8, and tumor necrosis factor (TNF)- α . The transepithelial cell resistance (TEER) and fluorescein dextran (FD40) permeability were used to evaluate the permeability of cells. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of IL-1 β , IL-8, TNF- α , occludin, claudin-1, ZO-1, and myosin light chain kinase (MLCK). PLTPE treatment significantly increased the cell survival rate and inhibited the spillover of LDH in Caco-2 cells. PLTPE treatment effectively inhibited the secretion of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-8, TNF- α) and reduced their mRNA transcription in Caco-2 cells. At the same time, PLTPE also significantly increased the mRNA levels of occludin, claudin-1, ZO-1, and inhibit the MLCK mRNA transcription to improve the intercellular permeability in LPS treated Caco-2 cells. These results suggest

收稿日期: 2018-04-18

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81760589、81560530); 广西中医药大学广西中药药效研究重点实验室开放课题 (17-259-20-K3); 桂林医学院引进人才科研启动基金 (04010150001); 教育部中西部高等学校青年骨干教师国内访问学者计划资助; 广西教育厅广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划资助 (桂人教[2018]18)

作者简介: 宋家乐 (1983-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 分子营养学, 功能性食品学

通讯作者: 吴华 (1974-), 女, 主管药师, 研究方向: 药理学, 药事管理学

that the PLTPE showed a strong anti-inflammatory activity, and can improve the LPS induced high permeability of Caco-2 cells may associate with regulating the mRNA transcription of tight junction related factors.

Key words: pomelo levels polyphenolic extracts; lipopolysaccharide (LPS); intestinal epithelial cells; barrier integrity

肠黏膜屏障是由肠黏膜上皮结构所构成的机械屏障, 肠黏膜组织分泌的黏液和消化液所构成的化学屏障, 由肠道固有微生物菌落所构成的生物屏障及主要肠道组织中免疫系统与其所分泌的免疫物质构成的免疫屏障等所构成的具有维持肠内环境稳定功能, 阻隔外源性有害物质进入血液循环系统的生物结构^[1]。肠黏膜屏障功能的异常是导致炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD), 肠应激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)及肠道肿瘤发生的重要原因^[2]。肠上皮细胞和细胞间紧密连接所构成肠上皮结构在防止病原微生物入侵, 细菌移位等方面具有重大意义^[3]。临床IBD患者肠上皮组织中的细胞间紧密连接结构遭受破坏, 上皮细胞通透性增大, 肠黏膜屏障损毁严重^[4]。因此, 改善肠上皮功能, 维持细胞间紧密结构完整则有助于改善IBD的临床症状^[5]。

柚子(*Citrus maxima* Merr.)是我国广大南方地区栽培面积和产量较高的经济水果之一, 属芸香科柑橘属作物。研究发现, 作为加工副产物的柚叶中含有丰富的多酚与黄酮类物质^[6,7], 是一种具有较好开发利用度的农业资源废弃物。近年来, 多酚和黄酮类植物活性成分因其具抗菌、抗炎、抗氧化、抗衰老和免疫调节等多种生物学功能而越来越成为可持续性农业和生物综合利用研究和开发利用的重点^[8]。

目前, 柚叶总多酚提取物对于肠道上皮细胞高通透性保护作用的研究鲜见报道。人结肠癌 Caco-2 细胞是一株具有与正常小肠上皮细胞类似的紧密连接、微绒毛等结构而被公认用于肠道屏障损伤与修复机制研究的经典细胞系^[9]。因此, 本实验通过利用 LPS 处理 Caco-2 肠上皮细胞制备细胞高通透性模型, 研究柚叶总多酚对细胞高通透性的保护效果并探讨可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

DMEM 高糖型细胞培养液、青霉素-链霉素双抗、胰蛋白酶-EDTA 消化液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT), 美国 Thermo Scientific 公司; Trizol 试剂、OligodT₁₈、RNase、dNTP、MLV 逆转录酶, 美国 Invitrogen 公司; ROX reference Dye 和 SYBR Premix

Ex Taq II, 日本 TAKARA 公司; 异硫氰酸荧光素(FITC)-右旋糖酐(FD40, 分子量 40000 u)、大肠杆菌脂多糖(LPS), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒, 南京建成生物工程研究所; IL-1 β 、IL-8、TNF- α 试剂盒, 美国 Cloud colon 公司。其他化学试剂均为国产分析纯。新鲜柚叶采自广西壮族自治区平乐县龙窝果园, 并经桂林医学院药学院生药学教研室鉴定。

1.2 仪器与设备

EYELA N-1001S 真空旋转蒸发仪, 东京理化器械株式会社; GR300 型超声波清洗机, 山东国锐超声机械有限公司; Biotek Elx808 酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; ND2000 超微量核酸蛋白测定仪、3110 型二氧化碳细胞培养箱, 美国 Thermo Scientific 公司; AL204 电子分析天平, 梅特勒-托利多公司上海有限公司; 电热恒温水浴锅 HWS-28, 上海一恒科学仪器有限公司; FLUOstar OPTIMA 荧光酶标仪, 德国 BMG 公司; MERS00002 Millicell-ERS 上皮跨膜细胞电阻仪, 美国 Millipore 公司。

1.3 柚叶总多酚提取物的制备

新鲜柚叶双蒸水冲洗除杂后, 真空冷冻干燥。冻干柚叶经粉碎后过 60 目筛备用。取柚叶粉(10 g)加入 250 mL 乙醇(60%, V/V)后在 63 °C 条件下超声提取 28 min(超声功率 245 W)^[6]。滤液经 3000 r/min 离心 15 min 后弃渣收集上清, 50 °C 真空减压旋转蒸发后, 制成柚叶总多酚提取物(收率为 30.54%), -80 °C 储存待用。

1.4 细胞培养与分组

Caco-2 人结肠腺癌细胞系(源自中国科学院上海细胞资源中心)由桂林医学院生物技术学院邹先琼教授馈赠。细胞用 DMEM 培养液(含 10%FBS 与 1%青-链霉素双抗液)置于 37 °C、5% CO₂ 环境下湿化培养。细胞贴壁长至 80%时, 胰蛋白酶-EDTA 液按比例消化传代, 取指数期细胞用于实验。

以 DMEM 培养液(含 LPS: 2 μ g/mL)处理细胞 24 h 制备细胞模型。模型细胞以柚叶总多酚提取物(10 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL、150 μ g/mL)继续培养 24 h 并进行后续实验。正常组为未经过任何处理的正常 Caco-2 细胞。

1.5 MTT 法测定细胞存活率及 LDH 脱氢酶水平

细胞按前述分组处理后, 移除内培养基(用于后续 LDH 酶活性测定)并加入 100 μL 的 MTT 试剂(终质量浓度: 0.5 mg/mL)继续培养 24 h。培养结束后弃上清液, 每孔加入 DMSO (100 μL)避光振荡 30 min, 测定 OD_{490 nm} 后按公式: 细胞生存率(%)=OD_{样品组}/OD_{正常组}×100 来计算细胞生存率。LDH 脱氢酶水平采用比色试剂盒按照说明书操作要求进行测定。

1.6 模型细胞中细胞因子 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 分泌水平的测定

细胞接种到培养板并依前述方法处理后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下收集细胞培养上清液。取适量培养上清液按照 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 测定试剂盒说明书步骤操作(单位以 pg/mL 表示)。

1.7 模型细胞的膜通透性水平测定

依前述处理后的细胞接种至 Transwell 小室中, 实验前测定跨上皮细胞电阻(trans epithelial electrical resistance, TEER)检查细胞融合状态和肠上皮屏障的完整性, 取细胞屏障完整的细胞(TEER \geq 100 $\Omega\cdot\text{cm}^2$)用于实验。移除 Transwell 小室外外的培养液, HBSS 液(pH 7.4)冲洗细胞 3 次, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min 后测量 TEER 值, 待 TEER 值稳定后记录数据。此外, 在 Transwell 小室顶端腔内加入 100 μL 的 HBSS 液(含有终浓度为 1 mg/mL 的 FD-40), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 收集侧腔内溶液, 使用 FLUOstar OPTIMA 荧光酶标仪测定荧光强度(激发波长 480 nm, 发射波长 530 nm)。

1.8 qRT-PCR 法测定细胞中 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 、occludin、claudin-1、ZO-1 和 MLCK 的 mRNA 表达

Trizol 试剂盒法提取细胞内总 RNA, 紫外分光检测提纯后的 RNA 浓度用于后续实验。取总 RNA(2 μg)加入 dNTPs(1 μL)、OligodT₁₈ 引物(1 μL)、MMLV 逆转录酶(1 μL)、RNases 抑制剂(1 μL)及 5×Buffer (10 μL)逆转录成 cDNA。取适量 cDNA (2 μL)用 qRT-PCR 法检测 occludin、claudin-1、ZO-1 和 MLCK 的表达量。在总反应体系中(20 μL)加入上游和下游引物(10

$\mu\text{mol/L}$)各 1 μL 、2×SYBR Premix Ex Taq II (10 μL)、50×ROX reference Dye (0.4 μL)和灭菌双蒸水(5.6 μL), 充分混匀后置于 Quant Studio TM 6 Flex PCR 仪中进行反应。扩增反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 25 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 共 40 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。每个基因 cDNA 样本平行扩增 3 次, 取 Ct 值均数, 依公式计算目的基因表达量 $[F=2^{-(\text{检测样品中基因的 Cr 值}-\text{检测样品中持家基因的 Cr 值})/2^{-(\text{空白样品中基因的 Cr 值}-\text{空白样品中持家基因的 Cr 值})}]$ 。

各引物序列如下: IL-1 β (上游: 5'-GAATGACGCCCTCAATCAAAGT-3', 下游: 5'-TCATCTTGGGCAGTCACATACA-3'), IL-8(上游: 5'-CCTGAACCTTCCAAAGATGGC-3', 下游: 5'-TTCACCAGGCAAGTCTCCTCA-3'), TNF- α (上游: 5'-GAGGCCAAGCCCTGGTATG-3', 下游: 5'-CGGGCCGATTGATCTCAGC-3'), Occludin(上游: 5'-CTTCCAATGGCAAAGTGAATGAATGA-3', 下游: 5'-TACCACCGCTGCTGTAACGAG-3'), claudin-1(上游: 5'-CCAGGTACGAATTTGGTCAGG-3', 下游: 5'-TGGTGTGGGTAAGAGGTTGT-3'), ZO-1(上游: 5'-GAGCCTAATCTGACCTATGAACC-3', 下游: 5'-TGAGGACTCGTATCTGTATGTGG-3'), MLCK(上游: 5'-CAACAGGGTCACCAACCAGC-3', 下游: 5'-GCCTTGCAGGTGTACTTGGC-3'), GAPDH(上游: 5'-CCATTTGATGTTAGCGGGATCTC-3', 下游: 5'-TGGTCTACATGTTCCAGTATGACT-3')。

1.9 数据处理与统计分析

本研究中, 所有实验均重复 3 次, 结果以均值(means) \pm 标准偏差(SD)表示。所有实验数据运用 SPSS 20.0 统计软件进行单因素方差分析与统计处理, $p<0.05$ 为具有统计差异。

2 结果与讨论

2.1 柚叶总多酚提取物对 LPS 所致 Caco-2 细胞生存率和细胞 LDH 释放水平的影响

如表 1 示, Caco-2 细胞在经 LPS(2 $\mu\text{g/mL}$)处理后细胞的生存率较正常组细胞相比下降至 43.44%。给予不同浓度的柚叶总多酚提取物处理后, 受损细胞的生存率显著升高。

随着柚叶总多酚提取物作用浓度的增加, 受损细胞的生存率逐渐升高并呈显著的剂量效应关系($p<0.05$)。特别是在经加高浓度(100 $\mu\text{g/mL}$ 和 150 $\mu\text{g/mL}$)的柚叶总多酚提取物处理后, 模式细胞的生存

率分别升高至 80.6%和 86.1%，生存率分别较未经处理的模型细胞生存率增高 1.86 倍和 1.98 倍。

LDH 是一种在正常生理情况下稳定存在于细胞内部的功能酶。当细胞遭受外界强烈的应激刺激导致细胞膜损伤后, LDH 能够直接从细胞内部溢出。因此, LDH 被常用于作为一种有效的生物指标来评估细胞损伤发生程度^[10]。与正常组细胞相比, LPS 模型组细

胞中 LDH 的溢出量为正常组细胞的 4.27 倍。经柚叶总多酚提取物处理模型细胞后, 细胞 LDH 的外溢水平显著降低, 且抑制效果存在显著的剂量效应关系 ($p<0.05$)。较高浓度的柚叶总多酚提取物(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理后的细胞中 LDH 溢出水平分别较未经处理的模型细胞 LDH 溢出水平降低 39.2%和 42.9%。

表 1 柚叶总多酚提取物对 LPS 所致 Caco-2 细胞生存率和细胞 LDH 释放水平的影响

Table 1 Effects of PLTPE on cell viability and LDH levels in LPS treated intestinal Caco-2 cells

组别	柚叶总多酚提取物浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$	细胞生存率/%	LDH 溢出水平/ $(\text{U}/\text{mg protein})$
正常组		100.00 \pm 0.00 ^a	11.64 \pm 1.07 ^k
柚叶总多酚提取物处理组	0	43.44 \pm 2.53 ^f	49.75 \pm 3.17 ^h
	10	49.98 \pm 2.78 ^e	47.38 \pm 5.01 ^h
	50	73.53 \pm 3.10 ^d	38.71 \pm 1.90 ⁱ
	100	80.60 \pm 3.48 ^c	30.07 \pm 2.90 ^j
	150	86.12 \pm 2.82 ^b	28.42 \pm 1.43 ^j

注: a~f, h~k: 字母不同表示组间差异显著($p<0.05$)。

2.2 柚叶总多酚提取物对 LPS 处理 Caco-2 细

胞中 IL-1 β 、IL-8、TNF- α 分泌水平的影响

LPS(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)刺激可显著增加 Caco-2 细胞中 IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α 的分泌(图 1)。不同浓度的柚叶总多酚提取物干预模式细胞后, 细胞内 IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α 的分泌水平均得到显著抑制。

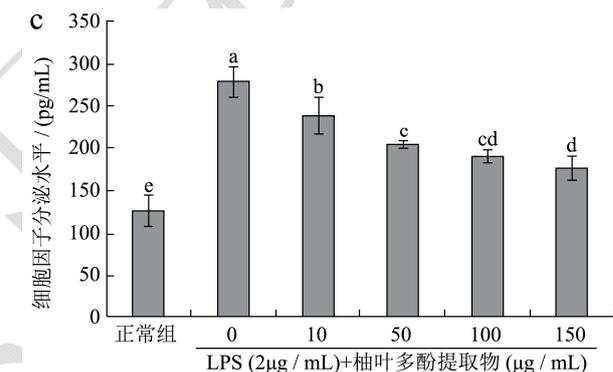
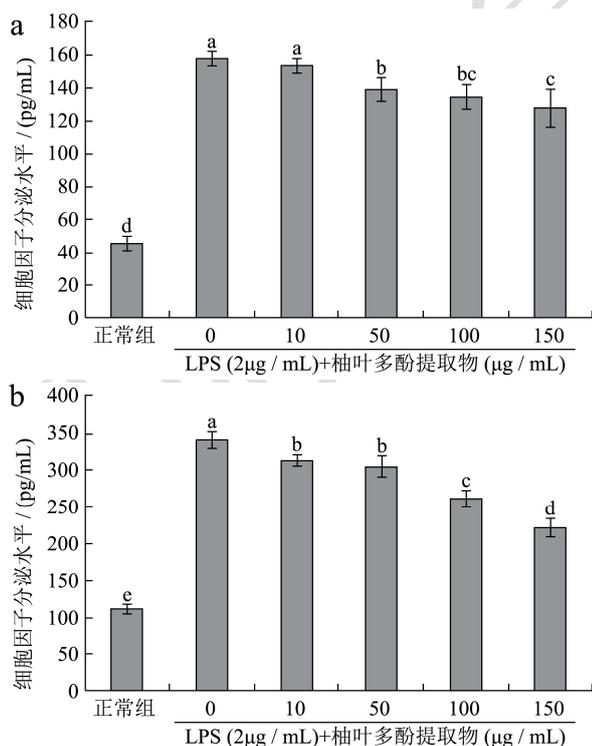


图 1 柚叶总多酚提取物对 LPS 处理 Caco-2 细胞中 IL-1 β (a)、IL-8 (b)、TNF- α (c) 分泌水平的影响

Fig.1 Effects of PLTPE on IL-1 β (a), IL-8(b) and TNF- α (c) levels in LPS treated intestinal Caco-2 cells

注: a~e: 字母不同表示组间差异显著($p<0.05$)

高浓度的柚叶总多酚提取物(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)能够使细胞中的 IL-1 β 水平分别较 LPS 模型细胞中 IL-1 β 水平降低 15.15%和 19.3%, IL-8 分泌水平降低 23.0%和 34.8%。而在 TNF- α 分泌水平方面, 柚叶总多酚提取物(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)能够使 TNF- α 水平分别较 LPS 模型细胞中 TNF- α 水平降低 31.9%和 36.9%。临床方面的研究提示, 异常表达的 IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 TNF- α 等炎细胞因子是导致肠组织细胞间紧密连接丢失以及细胞上皮屏障损伤的主要原因, 同时也在溃疡性结肠(ulcerative colitis)和克罗恩病(Crohn's disease)的发病过程中起着重要的作用^[11-15]。而本研究结果提示, 柚叶总多酚对 LPS 所诱发

的 Caco-2 肠上皮细胞炎症模型具有较好的抗炎效果。

2.3 柚叶总多酚提取物对 LPS 处理 Caco-2 细胞中 IL-1 β 、IL-8 与 TNF- α 的 mRNA 转录水平的影响

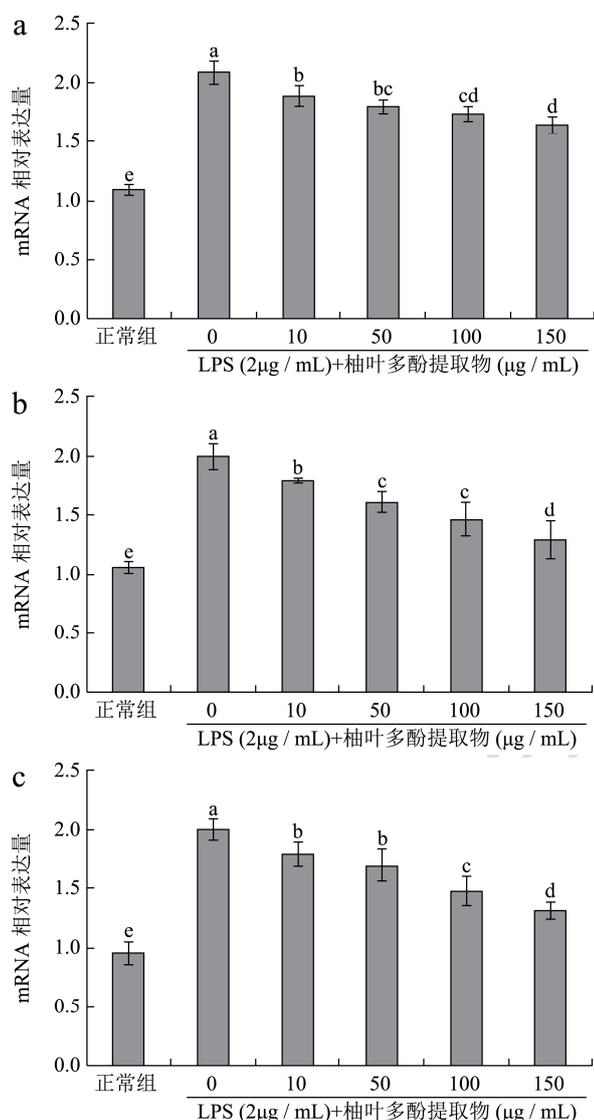


图2 柚叶总多酚提取物对 LPS 处理 Caco-2 细胞中 IL-1 β (a)、IL-8 (b)、TNF- α (c) 的 mRNA 转录水平影响

Fig.2 Effects of PLTPE on IL-1 β (a), IL-8(b) and TNF- α (c) mRNA expression in LPS treated intestinal Caco-2 cells

注: a~e 字母不同表示组间差异显著($p < 0.05$)。

如图 2 所示, LPS(2 μ g/mL)处理能够显著刺激 Caco-2 细胞中 IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α 的 mRNA 转录。不同浓度的柚叶总多酚提取物处理细胞后, 细胞内 IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α 的 mRNA 转录水平均得到显著抑制。较未经过柚叶总多酚提取物处理的 LPS 模型组细胞而言, 高浓度的柚叶总多酚提取物(100 μ g/mL 和

150 μ g/mL)能够分别有效降低 LPS 模型细胞中 IL-1 β 的转录水平至 16.8%和 21.1%, IL-8 转录水平至 27.0%和 35.6%。同时, 柚叶总多酚提取物还能显著抑制 LPS 模型细胞中 TNF- α 的转录水平至 26.5%和 34.8%。抑制 IL-1 β 、IL-8 和 TNF- α 等炎症细胞因子的过度表达, 不仅能够降低肠道组织的炎症水平, 还能减缓高炎症环境所导致肠上皮细胞间细胞紧密连接丢失的发生 [1,12,13]。

2.4 柚叶总多酚提取物对 LPS 处理 Caco-2 细胞的膜通透性影响

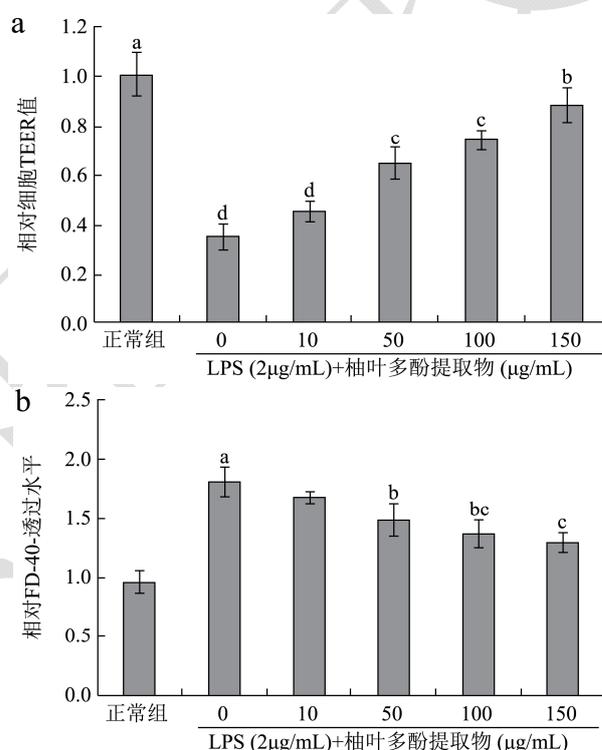


图3 柚叶总多酚提取物对 LPS 处理 Caco-2 细胞 TEER (a) 与 FD-40 (b) 透过水平的影响

Fig.3 Effects of PLTPE on TEER(a) and FD-40(b) flux levels in LPS treated intestinal Caco-2 cells

注: a~e 字母不同表示组间差异显著($p < 0.05$)。

细胞膜通透性的改变程度能够反映细胞间紧密连接和细胞单层屏障功能。如图 3a 所示, LPS 处理显著造成 Caco-2 细胞中跨上皮细胞电阻(TEER)值的降低。而 TEER 值是用于检测肠上皮细胞单层屏障功能变化的经典生物指标之一 [16], 其主要反映肠上皮屏障模型的离子通透性改变情况 [17]。给予不同浓度柚叶总多酚处理后, 模型细胞的 TEER 值均显著回升($p < 0.05$)。其中, 柚叶总多酚(10 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL 和 150 μ g/mL)处理组细胞分别较 LPS 组细胞的 TEER 值升高 1.27 倍、1.84 倍、2.10 倍和 2.50 倍。另一方面,

异硫氰酸荧光素(FITC)-右旋糖酐(FD40)透过度也属于评估肠上皮细胞单层屏障功能变化的常用生物指标^[16],其主要反映肠屏障细胞模型透过大分子物质的能力,FD-40数值越高则意味着肠上皮屏障模型细胞通透性越高^[18]。如图3b所示,LPS处理显著造成Caco-2细胞的通透性增高。经柚叶总多酚处理后,模型细胞的FD-40透过水平均呈显著下降趋势($p<0.05$)。柚叶总多酚(10 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 和150 $\mu\text{g/mL}$)处理组细胞分别较LPS组细胞的FD-40透过水平降低8.06%、18.22%、24.86%和28.91%。以上结果提示,柚叶总多酚提取物可以显著改善LPS所导致的Caco-2细胞高通透性情况的发生。

2.5 柚叶总多酚提取物对LPS处理Caco-2细胞中Occludin、claudin-1、ZO-1和MLCK的mRNA转录水平影响

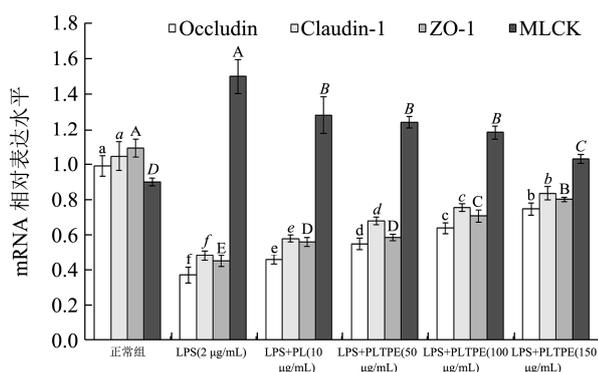


图4 柚叶总多酚提取物对LPS处理Caco-2细胞中细胞间紧密连接相关因子的mRNA转录水平的影响

Fig.4 Effects of PLTPE on tight junction related factors mRNA expression in LPS treated intestinal Caco-2 cells

注: a-e、a~e、A~E、A~E: 字母不同表示组间差异显著($p<0.05$)。

肠上皮屏障是由相邻肠上皮细胞间紧密连接所形成的环带状蛋白复合体,其主要的生理功能在于调控物质从细胞旁途径跨上皮运输,细胞间的构造稳定及细胞间的通讯等功能^[19]。经qRT-PCR分析发现,LPS处理造成Caco-2细胞中Occludin、claudin-1和ZO-1的mRNA转录水平显著下降(图4)。Occludin、claudin-1与ZO-1蛋白都是构成紧密连接(tight junction, TJs)的重要结构蛋白^[20]。

与正常组相比,LPS组细胞中Occludin、claudin-1和ZO-1的mRNA转录水平分别下降62.56%、53.63%和58.62%。相反,给予柚叶总多酚处理后,模型细胞中Occludin、claudin-1和ZO-1的mRNA转录水平均

显著回升。高浓度柚叶总多酚提取物(100 $\mu\text{g/mL}$ 和150 $\mu\text{g/mL}$)能够较LPS模型分别提升Occludin(1.57倍与1.78倍)、claudin-1(1.56倍与1.73倍)和ZO-1(1.73倍与2.02倍)的mRNA转录水平。

肌球蛋白轻链激酶(MLCK)属一类钙调素激酶,自身被激活后能够通过促肌球蛋白轻链(MLC)磷酸化使其参与肌动蛋白收缩,引发细胞骨架重排,破坏细胞TJ结构,最终造成细胞间隙的开放,使得细胞间通透性增高^[21]。如图4示,LPS处理较正常组而言能显著造成Caco-2细胞中MLCK的转录水平升高($p<0.05$)。柚叶总多酚处理后,模型细胞中MLCK的转录水平得到抑制。与LPS组相比,最高浓度(150 $\mu\text{g/mL}$)的柚叶总多酚可显著抑制MLCK的mRNA转录水平(抑制率为31.30%)。抑制肠上皮细胞中MLCK的过度活化,对于维持肠上皮细胞屏障和细胞间紧密连接的重要作用^[22]。

3 结论

本研究利用LPS构建Caco-2肠上皮细胞高通透性细胞模型研究柚叶总多酚提取物对细胞高通透性的改善效果。结果提示,柚叶总多酚能够有效抑制LPS造成的细胞损伤后LDH外溢,提升细胞生存率。同时,柚叶总多酚可有效抑制LPS诱发的IL-1 β 、IL-8和TNF- α 炎症细胞因子分泌并抑制其mRNA转录。此外,柚叶总多酚处理还能改善模型细胞的高通透性发生情况。在分子层面,柚叶总多酚能显著上调受损细胞中TJ相关因子(Occludin、claudin-1和ZO-1)的mRNA转录,抑制导致细胞TJ丢失的MLCK的mRNA高转录。综上所述,柚叶总多酚对LPS所致Caco-2细胞发生高通透性的保护作用可能与其具有较强的抗炎作用以及对细胞TJ相关因子的mRNA转录水平的调控能力有关。在后续研究中,课题组将重点针对柚叶总多酚是否具有MLCK活化过程中的上、下游信号通路的调控作用而展开深入研究。

参考文献

- [1] 蔡文娟,章明放.上皮紧密连接与炎症肠病的研究进展[J].医学综述,2011,17(15):2274-2276
CAI Wen-juan, ZHANG Ming-fang. Research advance in epithelial tight junctions and inflammatory bowel disease [J]. Medical Recapitulate, 2011, 17(15): 2274-2276
- [2] Kaplan G G, Ng S C. Understanding and preventing the global increase of inflammatory bowel disease [J]. Gastroenterology, 2017, 152(2): 313-321
- [3] Liu T C, Stappenbeck T S. Genetics and pathogenesis of

- inflammatory bowel disease [J]. Annual Review Pathology, 2016, 11(1): 127-148
- [4] Greenhill C. IBD: glucocorticoids revealed to augment intestinal epithelial barrier function [J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2014, 11(2):75. doi: 10.1038/nrgastro.2013.255
- [5] Vlantis K, Polykratis A, Welz PS, et al. Original article: TLR-independent anti-inflammatory function of intestinal epithelial TRAF6 signalling prevents DSS-induced colitis in mice [J]. Gut, 2016, 65(6): 935-943
- [6] 陈建福,林洵,陈俊尧,等.响应面法优化超声波辅助提取柚叶多酚的工艺研究[J].河南工业大学学报(自然科学版), 2016,37(3):47-54
CHEN Jian-fu, LIN Xun, CHEN Jun-rao, et al. Optimization of ultrasonic associated extraction of polyphenols from pomelo leaves using response surface methodology [J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2016, 37(3): 47-54
- [7] 郑亚美,任娇艳,史传超.蜜柚叶黄酮的提取及其抗氧化与降尿酸活性研究[J].食品工业科技,2017,38(8):262-266,271
ZHENG Ya-mei, REN Jiao-yan, SHI Chuan-chao. Extraction of flavonoids from Honey pomelo leaves and study on its antioxidant and uric acid reduction activities [J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(8): 262-266, 271
- [8] 尤新.植物多酚黄酮抗氧化剂与人体健康[J].食品与生物技术学报,2011,30(4):481-488
YOU Xin. Property of nature antioxidants-plants polyphenol and flavonoids extracts and their bioactivities on human health [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2011, 30(4): 481-488
- [9] Chen S W, Zhu J, Zuo S, et al. Protective effect of hydrogen sulfide on TNF- α and IFN- γ -induced injury of intestinal epithelial barrier function in Caco-2 monolayers [J]. Inflammation Research, 2015, 64(10): 789-797
- [10] Li B, Zani A, Martin Z, et al. Intestinal epithelial cell injury is rescued by hydrogen sulfide [J]. Journal of Pediatric Surgery, 2016, 51(5): 775-778
- [11] 孟晓弘,季明昉,方一,等.炎症性肠病患者血清巨噬细胞极化相关细胞因子水平及其意义[J].胃肠病学,2015,20(9): 538-541
MENG Xiao-hong, JI Ming-fang, FANG Yi, et al. Levels and significance of serum macrophage polarization-related cytokines in patients with inflammatory bowel disease [J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2015, 20(9): 538-541
- [12] 孙钦娟,李琴,宛东,等.细胞因子在炎症性肠病患者肠黏膜中表达的分析[J].胃肠病学,2018,23(1):13-17
SUN Qin-juan, LI Qin, WAN Dong, et al. Cytokines expression in intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease [J]. Chinese Journal of Gastroenterology, 2018, 23(1): 13-17
- [13] 唐齐林,周国华,王为.TNF- α 、IL-6 在炎症性肠病发病机制中的研究进展[J].医学综述,2014,20(7):1174-1176
TANG Qi-lin, ZHOU Guo-hua, WANG Wei. Research progress of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease [J]. Medical Recapitulate, 2014, 20(7): 1174-1176
- [14] 王艳萍,姬林松,倪猛,等.不同严重程度溃疡性结肠炎患者血清 TNF- α 、IL-6 及 IL-8 的表达及意义[J].中国老年学杂志,2015,35(14):3940-3941
WANG Yan-ping, JI Lin-song, NI Meng, et al. Expression and significance of serum TNF- α , IL-6 and IL-8 in patients with different severity of ulcerative colitis [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2015, 35(14): 3940-3941
- [15] 周勇.检测血清 IL-1 β 、IL-6、IL-8 水平对于评估溃疡性结肠炎患者病情的应用价值分析[J].中国中西医结合消化杂志,2015,23(4):286-287,290
ZHOU Yong. Application value of serum IL-1 β , IL-6, IL-8 in evaluating the condition of patients with ulcerative colitis [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Digestion, 2015, 23(4): 286-287, 290
- [16] Perinelli D R, Vllasaliu D, Bonacucina G, et al. Rhamnolipids as epithelial permeability enhancers for macromolecular therapeutics [J]. European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics, 2017, 119: 419-425
- [17] Seike S, Takehara M, Takagishi T, et al. Delta-toxin from Clostridium perfringens perturbs intestinal epithelial barrier function in Caco-2 cell monolayers [J]. Biochim Biophys Acta, 2018, 1860(2): 428-433
- [18] Chopyk D M, Kumar P, Raeman R, et al. Dysregulation of junctional adhesion molecule-A contributes to ethanol-induced barrier disruption in intestinal epithelial cell monolayers [J]. Physiological Reports, 2017, 5(23)
- [19] Xu P, Becker H, Elizalde M, et al. Intestinal organoid culture model is a valuable system to study epithelial barrier function in IBD [J]. Gut, 2017:gutjnl-2017-315685
- [20] 胡玥,吕宾.应激对肠上皮紧密连接功能的影响[J].生理科学进展,2017,48(2):113-116
HU Yue, LV Bin. Effect of stress in intestinal tight junctions [J]. Progress in Physiological Sciences, 2017, 48(2): 113-116

- [21] 马军宏,于向阳,张楠,等.紧密连接蛋白与肠黏膜屏障损伤研究进展[J].中国中西医结合外科杂志,2015,21(1):104-105
MA Jun-hong, YU Xiang-yang, ZHANG Nan, et al. Research progress on tight junction proteins and intestinal barrier damage [J]. Chinese Journal of Surgery of Integrated Traditional and Western Medicine, 2015, 21(1): 104-105
- [22] 丁少桢,丁浩,梅俏,等.同型半胱氨酸调控 MEK-ERK-MLCK 通路影响结肠炎大鼠肠黏膜通透性的实验研究[J].中国药理学通报,2016,32(4):498-502
DING Shao-zhen, DING Hao, MEI Qiao, et al. Effect of homocysteine on the intestinal permeability by regulating MEK-ERK-MLCK signal transduction in experimental colitis rats [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2016, 32(4): 498-502

现代食品科技