·论著·营养与康复·

**本文亮点：**

(1) 揭示烧伤引发的氧化应激可促进烧伤小鼠结肠组织中前梯度蛋白2(AGR2)蛋白S-亚硝基化。

(2) 表明还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)是维持人结直肠腺癌细胞株HT-29中硫氧还蛋白1(Trx1)氧化还原稳态的核心分子，6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(6PGD)为NADPH合成的限速酶。

(3) 证实TP53诱导的糖酵解与凋亡调节因子可通过6PGD调控Trx1还原酶功能，从而抑制AGR2蛋白S-亚硝基化，维护烧伤小鼠肠黏液屏障完整性。



**Highlights:**

(1) It revealed that burn-induced oxidative stress could promote S-nitrosylation of anterior gradient protein 2 (AGR2) in colonic tissue of burned mice.

(2) It demonstrated that reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) was a core molecule for maintaining the redox homeostasis of thioredoxin 1 (Trx1) in human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells with 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) being the rate-limiting enzyme for NADPH synthesis.

(3) TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) was demonstrated to regulate the reductase function of Trx1 via 6PGD, thereby inhibiting the S-nitrosylation of AGR2 and preserving the intestinal mucus barrier integrity in burned mice.

# TIGAR对烧伤小鼠肠黏液屏障的影响及其机制

魏燕[1]　吴丹[1]　苏森[1]　张攀扬[1]　查绪乐[1]　彭曦[2]

[1]陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院临床医学研究中心，重庆 400038；[2]陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院临床医学研究中心，创伤与化学中毒全国重点实验室，重庆 400038

通信作者：彭曦，Email：pxlrmm@tmmu.edu.cn

**【摘要】　目的**　探讨TP53诱导的糖酵解与凋亡调节因子(TIGAR)对烧伤小鼠肠黏液屏障的影响及其机制。　**方法**　该研究为成组设计、析因设计实验研究。取36只6~8周龄雄性BALB/c小鼠，按照随机数字表法分为行假伤处理的假伤组和行烧伤处理的烧伤组，每组18只。伤后3、5 d，2组各取6只小鼠，处死后取结肠组织，采用蛋白质印迹法检测TIGAR的蛋白表达。伤后5 d，2组分别另取6只小鼠，处死后取结肠组织，采用分光光度法测定还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸($NADP^+$)比值、谷胱甘肽/谷胱甘肽二硫化物(GSH/GSSG)比值及一氧化氮浓度，采用蛋白质印迹法检测葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)及黏蛋白2的蛋白表达，采用生物素转化法检测S-亚硝基化前梯度蛋白2蛋白(SNO-AGR2)和S-亚硝

**DOI**：10.3760/cma.j.cn501225-20260805-00284

**收稿日期**　2026-08-05

**引用本文**：魏燕, 吴丹, 苏森, 等. TIGAR对烧伤小鼠肠黏液屏障的影响及其机制[J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2026, 42(11): 1048-1059. DOI: 10.3760/cma.j.cn501225-20260805-00284.

Wei Y, Wu D, Su S, et al. Effects and mechanisms of TIGAR on the intestinal mucus barrier in burned mice[J]. Chin J Burns Wounds, 2026, 42(11): 1048-1059. DOI: 10.3760/cma. j. cn501225-20260805-00284.

基化硫氧还蛋白 1 蛋白（SNO-Trx1）的蛋白表达。将人结直肠腺癌细胞株 HT-29（以下简称细胞）分为感染空载慢病毒的空载体组、感染靶向 *TIGAR* 的单向导 RNA（sgRNA）慢病毒的 *TIGAR* 敲除组、行常规培养的正常对照组（后续同组名细胞处理相同），培养 24 h 后（后续各实验检测时间点均同此），采用蛋白质印迹法检测 GRP78、CHOP 及黏蛋白 2 的蛋白表达，样本数为 6。取细胞分为正常对照组、空载体组及感染靶向 *Trx1* 的短发夹 RNA（shRNA）慢病毒的 *Trx1* 敲低组，同前检测 SNO-AGR2 的蛋白表达，样本数为 3。另取细胞分为空载体组、*TIGAR* 敲除组、感染靶向 *TIGAR* 的 sgRNA 慢病毒后另加入 NADPH 的 *TIGAR* 敲除+NADPH 组，同前检测 SNO-Trx1 和 SNO-AGR2 的蛋白表达，样本数为 5。取细胞分为空载体组和 *TIGAR* 敲除组，采用分光光度法测定 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6PGD）酶活性，样本数为 5。取细胞分为空载体组、正常对照组及感染靶向 *6PGD* 的 shRNA 慢病毒的 *6PGD* 敲低组，采用分光光度法测定 Trx1 酶活性（样本数为 4），同前检测 SNO-AGR2 和 SNO-Trx1 的蛋白表达（样本数为 5）。取 *TIGAR* 敲除细胞分为感染空载慢病毒的空载回补对照组、感染携带 *TIGAR* 编码序列过表达慢病毒的 *TIGAR* 回补组，另取细胞设为空载体组，同前检测 SNO-AGR2 和 SNO-Trx1 的蛋白表达，样本数为 5。 **结果** 伤后 3、5 d，烧伤组小鼠结肠组织中 TIGAR 的蛋白表达均明显低于假伤组（$t$ 值分别为 14.72、29.54，$P$<0.05）。伤后 5 d，烧伤组小鼠结肠组织中 GSH/GSSG 和 NADPH/$NADP^+$ 比值均明显低于假伤组（$t$ 值分别为 21.21、19.24，$P$<0.05），一氧化氮浓度明显高于假伤组（$t$=−41.72，$P$<0.05）；烧伤组小鼠结肠组织中 GRP78、CHOP 及非成熟黏蛋白 2 的蛋白表达均明显高于假伤组（$t$ 值分别为−12.34、−32.94、−13.28，$P$<0.05），成熟黏蛋白 2 的蛋白表达明显低于假伤组（$t$=43.57，$P$<0.05）；烧伤组小鼠结肠组织中 SNO-AGR2 和 SNO-Trx1 的蛋白表达均明显高于假伤组（$t$ 值分别为−24.79、8.94，$P$<0.05）。培养 24 h 后，与空载体组比较，*TIGAR* 敲除组细胞中 GRP78、CHOP 及非成熟黏蛋白 2 的蛋白表达均明显上调（$P$<0.05），成熟黏蛋白 2 的蛋白表达下调（$P$<0.05）。培养 24 h 后，*Trx1* 敲低组细胞中 SNO-AGR2 的蛋白表达明显高于空载体组（$P$<0.05）。培养 24 h 后，*TIGAR* 敲除组细胞中 SNO-AGR2 和 SNO-Trx1 的蛋白表达均明显高于空载体组（$P$<0.05），*TIGAR* 敲除+NADPH 组细胞中 SNO-AGR2 和 SNO-Trx1 的蛋白表达均明显低于 *TIGAR* 敲除组（$P$<0.05）。培养 24 h 后，*TIGAR* 敲除组细胞中 6PGD 酶活性为（7.1±1.2）U/mg prot，明显低于空载体组的（18.8±1.1）U/mg prot（$t$=16.13，$P$<0.05）；*6PGD* 敲低组细胞中 Trx1 酶活性明显低于空载体组（$t$=10.83，$P$<0.05）。培养 24 h 后，*6PGD* 敲低组细胞中 SNO-AGR2 和 SNO-Trx1 的蛋白表达均明显高于空载体组（$P$<0.05）。培养 24 h 后，空载回补对照组细胞中 SNO-AGR2 和 SNO-Trx1 的蛋白表达均明显高于空载体组（$P$<0.05），*TIGAR* 回补组细胞中 SNO-AGR2 和 SNO-Trx1 的蛋白表达明显低于空载回补对照组（$P$<0.05）。 **结论** TIGAR 通过维持 6PGD 酶活性、促进 NADPH 生成，稳定 Trx1 还原酶功能并抑制前梯度蛋白 2 过度 S-亚硝基化，最终促进黏蛋白 2 成熟，维护烧伤小鼠肠黏液屏障完整性。

**【关键词】** 烧伤；胃肠道；营养不良；氧化性应激；内质网；黏液屏障；TP53 诱导的糖酵解与凋亡调节因子

**基金项目：**国家自然科学基金面上项目（82472549）；创伤与化学中毒全国重点实验室重点攻关计划（2024K003）；重庆市自然科学基金面上项目（CSTB2024NSCQ-MSX0031）

## Effects and mechanisms of TIGAR on the intestinal mucus barrier in burned mice

*Wei Yan[1], Wu Dan[1], Su Sen[1], Zhang Panyang[1], Zha Xule[1], Peng Xi[2]*

*[1]Clinical Medical Research Center, the First Affiliated Hospital of Army Medical University (the Third Military Medical University), Chongqing 400038, China; [2]Clinical Medical Research Center, State Key Laboratory of Trauma and Chemical Poisoning, the First Affiliated Hospital of Army Medical University (the Third Military Medical University), Chongqing 400038, China*

*Corresponding author: Peng Xi, Email: pxlrmm@tmmu.edu.cn*

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effects and mechanisms of TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) on the intestinal mucus barrier in burned mice. **Methods** This study was an experimental research involving grouping design and factorial design. Thirty-six male BALB/c mice aged 6−8 weeks were assigned using a random number table to sham injury group treated with sham injury and burn group treated with burn injury, with 18 mice in each group. At post-injury day (PID) 3 and 5, 6 mice in each group were sacrificed to collect the colonic tissue, then the protein expression levels of TIGAR were determined by Western blotting. At PID 5, an additional 6 mice from each group were sacrificed to collect the colonic tissue. The ratios of

reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) to nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ($NADP^+$) and glutathione to glutathione disulfide (GSH/GSSG), as well as the nitric oxide (NO) concentration were determined by spectrophotometry. The protein expression levels of glucose-regulated protein 78 (GRP78), CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP), and mucin 2 were determined by Western blotting. The protein expression levels of S-nitrosylation of anterior gradient protein 2 (SNO-AGR2) and S-nitrosylation of thioredoxin 1 (SNO-Trx1) were detected by biotin switch assay. The human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells (hereinafter referred to as cells) were divided into empty vector group infected with the empty lentivirus, *TIGAR*-knockout group infected with the lentivirus encoding *TIGAR*-targeting single guide RNA (sgRNA), and normal control group routinely cultured (groups with identical names received the same treatment in the subsequent experiments). After 24 h of culture (the same detection time point applied to all subsequent experiments), the protein expression levels of GRP78, CHOP, and mucin 2 were determined by Western blotting ($n$=6). Another batch of cells was divided into normal control group, empty vector group, and *Trx1*-knockdown group infected with the lentivirus encoding Trx1-targeting short hairpin RNA (shRNA). The protein expression level of SNO-AGR2 was detected as described above ($n$=3). Another batch of cells was divided into empty vector group, *TIGAR*-knockout group, and *TIGAR*-knockout+NADPH group. Cells in the *TIGAR*-knockout+NADPH group were treated with exogenous NADPH after infection with the lentivirus encoding *TIGAR*-targeting sgRNA. The protein expression levels of SNO-Trx1 and SNO-AGR2 were measured as described above ($n$=5). Another batch of cells was divided into empty vector group and *TIGAR*-knockout group, and the enzymatic activity of 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) was determined by spectrophotometry ($n$=5). Another batch of cells was divided into empty vector group, normal control group, and *6PGD*-knockdown group infected with the lentivirus encoding 6PGD-targeting shRNA. The enzymatic activity of Trx1 was determined by spectrophotometry ($n$=4), and the protein expression levels of SNO-AGR2 and SNO-Trx1 were detected as described above ($n$=5). The *TIGAR*-knockout cells were divided into empty vector rescue control group infected with the empty lentivirus and *TIGAR*-rescue group infected with the lentivirus overexpressing the *TIGAR* coding sequence. Another batch of cells was set as empty vector group. The protein expression levels of SNO-AGR2 and SNO-Trx1 were measured as described above ($n$=5). **Results** At PID 3 and 5, the protein expression levels of *TIGAR* in colonic tissue of mice in burn group were significantly lower than those in sham injury group (with $t$ values of 14.72 and 29.54, respectively, $P$<0.05). At PID 5, the ratios of GSH/GSSG and $NADPH/NADP^+$ in colonic tissue of mice in burn group were significantly lower than those in sham injury group (with $t$ values of 21.21 and 19.24, respectively, $P$<0.05), while the NO concentration was significantly higher than that in sham injury group ($t$=−41.72, $P$<0.05). The protein expression levels of GRP78, CHOP, and immature mucin 2 in colonic tissue of mice in burn group were significantly higher than those in sham injury group (with $t$ values of −12.34, −32.94, and −13.28, respectively, $P$<0.05), while the protein expression level of mature mucin 2 was significantly lower than that in sham injury group ($t$=43.57, $P$<0.05). The protein expression levels of SNO-AGR2 and SNO-Trx1 in colonic tissue of mice in burn group were significantly higher than those in sham injury group (with $t$ values of −24.79 and 8.94, respectively, $P$<0.05). After 24 h of culture, compared with those in empty vector group, the protein expression levels of GRP78, CHOP, and immature mucin 2 were significantly upregulated ($P$<0.05), while the protein expression level of mature mucin 2 was downregulated in cells of *TIGAR*-knockout group ($P$<0.05). After 24 h of culture, the protein expression level of SNO-AGR2 of cells in *Trx1*-knockdown group was significantly higher than that in empty vector group ($P$<0.05). After 24 h of culture, the protein expression levels of SNO-AGR2 and SNO-Trx1 of cells in *TIGAR*-knockout group were significantly higher than those in empty vector group ($P$<0.05), and the protein expression levels of SNO-AGR2 and SNO-Trx1 of cells in *TIGAR*-knockout+NADPH group were significantly lower than those in *TIGAR*-knockout group ($P$<0.05). After 24 h of culture, the enzymatic activity of 6PGD of cells in *TIGAR*-knockout group was (7.1±1.2) U/mg prot, which was significantly lower than (18.8±1.1) U/mg prot in empty vector group ($t$=16.13, $P$<0.05); the enzymatic activity of Trx1 of cells in *6PGD*-knockdown group was significantly lower than that in empty vector group ($t$=10.83, $P$<0.05). After 24 h of culture, the protein expression levels of SNO-AGR2 and SNO-Trx1 of cells in *6PGD*-knockdown group were significantly higher than those in empty vector group ($P$<0.05). After 24 h of culture, the protein expression levels of SNO-AGR2 and SNO-Trx1 of cells in empty vector rescue control group were significantly higher than those in empty vector group ($P$<0.05), while

those in *TIGAR*-rescue group were significantly lower than those in empty vector rescue control group ($P$<0.05). **Conclusions** By maintaining 6PGD enzymatic activity and promoting NADPH production, thereby stabilizing Trx1 reductase function and inhibiting excessive S-nitrosylation of anterior gradient protein 2, TIGAR ultimately facilitates the maturation of mucin 2 and preserves intestinal mucus barrier integrity in burned mice.

**【Key words】** Burns; Gastrointestinal tract; Malnutrition; Oxidative stress; Endoplasmic reticulum; Mucus barrier; TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator

**Fund program:** General Program of National Natural Science Foundation of China (82472549); Key Research Project of State Key Laboratory of Trauma and Chemical Poisoning (2024K003); General Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2024NSCQ-MSX0031)

烧伤后应激与血流重分布易造成肠道损伤，引发消化吸收障碍、营养不良，甚至肠源性感染及MODS[1-2]。杯状细胞分泌的黏液是肠道第一道屏障[3]，黏蛋白2的内质网折叠与二聚化是肠道黏液生物合成的关键起始步骤[4]，烧伤可抑制黏液合成分泌，但黏蛋白2成熟修饰的变化机制尚不明确，这是本研究关注的核心问题。

内质网中的前梯度蛋白2（anterior gradient 2，AGR2）是介导黏蛋白2成熟的关键修饰酶，其表达或功能异常均会破坏黏蛋白合成，从而损伤肠黏液屏障[5]。AGR2活性依赖氧化还原稳态，推测烧伤氧化应激可改变AGR2活性、阻碍黏蛋白2成熟。硫氧还蛋白1（thioredoxin 1，Trx1）是还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，NADPH）依赖的氧化还原调控蛋白，还原态Trx1介导蛋白去S-亚硝基化[6]。Trx1可调控内质网分子伴侣修饰[7]，但在烧伤后肠道中，Trx1是否通过调控AGR2蛋白S-亚硝基化修饰进而影响AGR2的功能，目前尚不明确。

TP53诱导的糖酵解与凋亡调节因子（TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator，TIGAR）促使葡萄糖代谢流转向磷酸戊糖通路（pentose phosphate pathway，PPP），通过该通路生成NADPH[8]，PPP限速酶6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（6-phosphogluconate dehydrogenase，6PGD）决定NADPH产量[9-10]，烧伤状态下TIGAR对6PGD的调控作用有待阐明。本研究拟观察TIGAR对烧伤后肠黏液屏障的作用，并探讨其潜在分子机制，旨在揭示烧伤后糖代谢重编程与氧化还原平衡的关键调控靶点，为烧伤患者代谢营养干预提供理论基础。

## 1　材料与方法

本成组设计、析因设计实验研究由陆军军医大学实验动物伦理委员会批准（批号：AMUWEC 20252170），遵循陆军军医大学和国家有关实验动物管理和使用的相关规定。

### 1.1　动物和细胞及主要试剂与仪器来源

36只健康无特殊病原体级6~8周龄、体重22~25 g的雄性BALB/c小鼠购自陆军军医大学实验动物中心，实验动物生产许可证号：SCXK（渝）2017-0002、使用许可证号：SYXK（渝）2022-0009。小鼠饲养于无特殊病原体级动物房，环境温度维持在21~24 ℃，采用12 h光暗循环，环境相对湿度（55±5）%。人结直肠腺癌细胞株HT-29（以下简称人HT-29细胞）购自美国典型培养物保藏中心。

兔源TIGAR多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司，兔源CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白（CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein，CHOP）多克隆抗体、兔源葡萄糖调节蛋白78（glucose-regulated protein 78，GRP78）多克隆抗体、兔源6PGD多克隆抗体、兔源Trx1多克隆抗体、兔源AGR2多克隆抗体、兔源黏蛋白2多克隆抗体、兔源GAPDH多克隆抗体、兔源微管蛋白单克隆抗体购自美国Abcam公司，小鼠源黏蛋白2单克隆抗体购自美国CST公司，辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG多克隆抗体购自美国Sigma公司，辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG多克隆抗体购自武汉三鹰生物技术公司，Alexa Fluor 594标记的山羊抗兔IgG多克隆抗体、Alexa Fluor 488标记的山羊抗小鼠IgG多克隆抗体、免疫沉淀试剂盒购自美国Invitrogen公司。NADPH/烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（nicotinamide adenine dinucleotide phosphate，$NADP^+$）检测试剂盒、谷胱甘肽/谷胱甘肽二硫化物（glutathione/glutathione disulfide，GSH/GSSG）检测试剂盒、一氧化氮检测试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司，McCoy′s5A培养基、胎牛血清、青霉素、链霉素购自美国Gibco公司。靶向*TIGAR*的单向导RNA（single guide RNA，sgRNA）慢病毒、靶向*AGR2*的sgRNA慢病毒、靶向*6PGD*的短发夹RNA（short

hairpin RNA，shRNA）慢病毒、靶向 *Trx1* 的 shRNA 慢病毒、携带 *TIGAR* 编码序列的过表达慢病毒、空载慢病毒，以及慢病毒转染试剂盒购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司，Trx1 酶活性检测试剂盒、6PGD 酶活性检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

VARIOSKAN 型多功能酶标仪购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司，通用型蛋白电泳仪、ChemiDoc XRS 型凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司，LSM880 型激光扫描共聚焦显微镜购自德国 ZEISS 公司。

**1.2** 动物实验

**1.2.1** 动物分组与处理及标本采集 将 36 只小鼠按随机数字表法分为假伤组和烧伤组，每组 18 只。将 2 组小鼠按 40 mg/kg 腹腔注射 10 g/L 戊巴比妥钠溶液麻醉（麻醉方法下同）后，背部剃毛。将烧伤组小鼠背部置于 90 ℃热水中 10 s，造成 30%TBSA Ⅲ度烫伤（经病理切片证实，以下称烧伤）；将假伤组小鼠背部置于 37 ℃温水中 10 s 致假伤。2 组小鼠伤后立即腹腔注射乳酸钠林格液 1.5 mL·kg$^{-1}$·%TBSA$^{-1}$ 进行液体复苏，并注射 100 μL 丁丙诺啡（0.3 mg/mL）镇痛。伤后 3、5 d，2 组各取 6 只小鼠，颈椎脱臼法处死（处死方法下同）后迅速切取结肠组织用于 **1.2.2** 和 **1.2.3** 检测。伤后 5 d，2 组分别另取 6 只小鼠处死后迅速切取结肠组织于 −196 ℃液氮中保存，用于 **1.2.4**、**1.2.5** 及 **1.2.6** 检测。因组织用于多项检测，部分样本取材不足，统计各指标实际有效样本数。

**1.2.2** 结肠组织病理变化与黏蛋白形态分析 取结肠组织样本，置于含有 5 mL 甲醇-卡诺氏固定液的离心管中，于室温下至少固定 3 h，随后常规行石蜡包埋，制备厚 5 μm 的组织切片。行 HE 染色后，于光学显微镜 200 倍放大倍数下观察结肠黏膜炎症细胞浸润、上皮细胞变化及结构变化。行阿尔辛蓝-过碘酸希夫染色后，于光学显微镜 200 倍放大倍数下观察杯状细胞染色变化，浅蓝色染色的杯状细胞判定为阿尔辛蓝阳性，以分泌酸性黏蛋白为主；洋红或紫红色染色的杯状细胞判定为过碘酸希夫阳性，以分泌中性黏蛋白为主；同时具备两种染色特征的杯状细胞记为阿尔辛蓝和过碘酸希夫双阳性，以分泌混合型黏蛋白为主。

**1.2.3** 结肠组织中 TIGAR 的蛋白表达检测 取结肠组织，提取总蛋白，采用蛋白质印迹法检测 TIGAR 的蛋白表达。一抗为兔源 TIGAR 多克隆抗体（稀释比为 1∶1 000）和兔源微管蛋白单克隆抗体（稀释比为 1∶5 000），二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体（稀释比为 1∶5 000）。使用 Quantity One 4.6.2 软件（美国 Bio-Rad 公司）分析灰度值，以微管蛋白为内参照，计算目的蛋白的相对表达量。本实验样本数为 6。

**1.2.4** 结肠组织中氧化应激指标检测 取冻存结肠组织，加入 1 mL 裂解缓冲液进行冰浴匀浆，以离心半径 4.8 cm、12 000 r/min 离心 10 min 后收集上清液。采用分光光度法，使用 NADPH/NADP$^+$ 检测试剂盒、GSH/GSSG 检测试剂盒及一氧化氮检测试剂盒，依次测定组织样本中 NADPH/NADP$^+$ 比值、GSH/GSSG 比值及一氧化氮浓度。本实验样本数为 4。

**1.2.5** 结肠组织中 GRP78 和 CHOP 及黏蛋白 2 的蛋白表达检测 取结肠组织，同 **1.2.3** 采用蛋白质印迹法检测 GRP78 和 CHOP 及黏蛋白 2 的蛋白表达。一抗为兔源 CHOP、GRP78、黏蛋白 2 多克隆抗体（稀释比均为 1∶1 000），小鼠源黏蛋白 2 单克隆抗体（稀释比为 1∶1 000）及兔源微管蛋白单克隆抗体（稀释比为 1∶5 000）；二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、抗小鼠 IgG 多克隆抗体（稀释比均为 1∶5 000）。本实验样本数为 6。

**1.2.6** 结肠组织中 AGR2 和 Trx1 蛋白 S-亚硝基化检测 采用生物素转化法检测 AGR2 和 Trx1 蛋白 S-亚硝基化。将结肠组织用 S-亚硝基化蛋白提取液裂解，取 2 mg 蛋白样品，加入甲基硫代甲磺酸酯，50 ℃孵育 20 min，封闭游离半胱氨酸巯基。蛋白经丙酮沉淀后，以离心半径 4.8 cm、14 000 r/min 离心 10 min，缓慢吸弃上清液并收集蛋白沉淀，加入体积分数 70% 丙酮洗涤沉淀以去除残留的过量甲基硫代甲磺酸酯。用 S-亚硝基化检测裂解缓冲液重新悬浮蛋白沉淀，加入 N-[6-（生物素酰氨基）己基]-3′-（2′-吡啶二硫代）丙酰胺与抗坏血酸钠，避光孵育 1 h。再次采用丙酮沉淀并洗涤后，将样品调至中性，加入链霉亲和素，4 ℃下孵育 12~18 h。以离心半径 4.8 cm、2 000 r/min 离心 10 min 后收集上清液，采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测分析 AGR2 和 Trx1 蛋白 S-亚硝基化。一抗为兔源 AGR2、Trx1 多克隆抗体（稀释比均为 1∶1 000），二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体（稀释比为 1∶5 000）。使用 Quantity One 4.6.2 软件

分析灰度值，以AGR2和Trx1总蛋白为内参照，计算S-亚硝基化AGR2蛋白（S-nitrosylation of AGR2，SNO-AGR2）与S-亚硝基化Trx1蛋白（S-nitrosylation of Trx1，SNO-Trx1）的相对表达量。本实验样本数为4。

**1.3** 细胞实验

**1.3.1** 人HT-29细胞培养　取人HT-29细胞，加入含体积分数10%胎牛血清、100 μmol/L青霉素、100 μmol/L链霉素的McCoy′s5A培养基（以下简称完全培养基），置于37 ℃、含体积分数5%二氧化碳、饱和湿度的培养箱中培养（即常规培养）。培养4~5 d待细胞融合率达90%后，以细胞浓度$5\times10^5$个/mL进行传代，选择折光性好的第2代细胞进行后续实验。

**1.3.2** TIGAR对细胞中GRP78和CHOP及黏蛋白2的蛋白表达的影响　取细胞按$1\times10^6$个/mL的浓度接种于6孔板，每孔1 mL。将细胞分为感染空载慢病毒的空载体组、感染靶向*TIGAR*的sgRNA慢病毒的*TIGAR*敲除组、行常规培养的正常对照组（后续同组名细胞处理相同）。于常规培养24 h后（后续各实验检测时间点均同此），同**1.2.5**采用蛋白质印迹法检测GRP78、CHOP及黏蛋白2的蛋白表达。本实验样本数为6。

**1.3.3** 细胞中AGR2和黏蛋白2荧光共定位观测　取细胞，以每孔$1\times10^4$个/mL的浓度接种于铺有圆形盖玻片的培养孔内，每孔500 μL。常规培养24 h后进行免疫荧光染色。一抗为小鼠源黏蛋白2单克隆抗体（稀释比为1∶1 000）和兔源AGR2多克隆抗体（稀释比为1∶250），二抗为Alexa Fluor 594标记的山羊抗兔IgG多克隆抗体和Alexa Fluor 488标记的山羊抗小鼠IgG多克隆抗体（稀释比均为1∶1 000）。经4′，6-二脒基-2-苯基吲哚复染细胞核后，于激光扫描共聚焦显微镜400倍放大倍数下观察并评估荧光共定位情况，其中AGR2阳性染色呈红色，黏蛋白2阳性染色呈绿色，二者共定位区域显示为黄色。

**1.3.4** AGR2对细胞中黏蛋白2的蛋白表达的影响　取细胞同**1.3.2**接种后分为空载体组、正常对照组及感染靶向*AGR2*的sgRNA慢病毒的*AGR2*敲除组。同**1.2.5**采用蛋白质印迹法检测黏蛋白2的蛋白表达。黏蛋白2抗体及稀释比同前，有变动的一抗为兔源GAPDH多克隆抗体（稀释比为1∶5 000），二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG多克隆抗体（稀释比为1∶5 000），以GAPDH为内参照，计算目的蛋白的相对表达量。本实验样本数为4。

**1.3.5** 细胞中AGR2与Trx1的相互作用检测　取细胞同**1.3.2**接种后，参照免疫沉淀试剂盒说明书中的蛋白富集方法，使用5 μg兔源Trx1多克隆抗体富集蛋白，对所得蛋白样品行蛋白质印迹法检测AGR2的蛋白表达。一抗为兔源AGR2多克隆抗体（稀释比为1∶1 000），二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG多克隆抗体（稀释比为1∶5 000）。若在沉淀复合物中检测到AGR2蛋白条带，提示AGR2与Trx1存在相互作用。

**1.3.6** *Trx1*敲低对细胞中AGR2蛋白S-亚硝基化及*TIGAR*敲除对细胞中AGR2和Trx1蛋白S-亚硝基化的影响　取细胞同**1.3.2**接种后分为空载体组、正常对照组及感染靶向*Trx1*的shRNA慢病毒的*Trx1*敲低组，同**1.2.6**采用生物素转化法检测SNO-AGR2和AGR2的蛋白表达，本实验样本数为3。另取细胞同**1.3.2**接种后分为空载体组、*TIGAR*敲除组、*TIGAR*敲除+NADPH组，其中*TIGAR*敲除+NADPH组细胞感染靶向*TIGAR*的sgRNA慢病毒后另加入终物质的量浓度为10 mmol/L的NADPH，同**1.2.6**采用生物素转化法检测SNO-Trx1和SNO-AGR2的蛋白表达，本实验样本数为5。

**1.3.7** TIGAR对细胞中6PGD酶活性的影响　取细胞同**1.3.2**接种后分为空载体组和*TIGAR*敲除组。参照6PGD酶活性检测试剂盒说明书，采用分光光度法，使用多功能酶标仪于波长340 nm处测定6PGD酶活性。本实验样本数为5。

**1.3.8** 6PGD对细胞中NADPH/$NADP^+$比值和一氧化氮浓度及Trx1酶活性的影响　取细胞同**1.3.2**接种后分为空载体组、正常对照组及感染靶向*6PGD*的shRNA慢病毒的*6PGD*敲低组。采用分光光度法同**1.2.4**检测NADPH/$NADP^+$比值和一氧化氮浓度，同**1.3.7**使用Trx1酶活性检测试剂盒检测Trx1酶活性，2个实验样本数均为4。

**1.3.9** *6PGD*敲低和*TIGAR*回补对细胞中AGR2和Trx1蛋白S-亚硝基化的影响　取细胞同**1.3.8**分组和处理后，同**1.2.6**采用生物素转化法检测SNO-AGR2和SNO-Trx1的蛋白表达。取细胞同**1.3.2**接种后分为空载体组、空载回补对照组、*TIGAR*回补组，其中空载回补对照组、*TIGAR*回补组细胞先感染靶向*TIGAR*的sgRNA慢病毒，再分别感染空载慢病毒、携带*TIGAR*编码序列过表达慢病毒的*TIGAR*，同法检测上述蛋白表达。2个实验样本数

均为5。

### 1.4　统计学处理

采用SPSS 23.0统计软件进行数据处理。计量资料数据均符合正态分布，以$\bar{x} \pm s$表示。多组间总体比较行单因素方差分析，组间两两比较行LSD-$t$检验、SNK检验；两组间单一时间点比较行独立样本$t$检验，多时间点比较行析因设计方差分析。所有假设检验为双侧检验，$P$<0.05为差异有统计学意义。

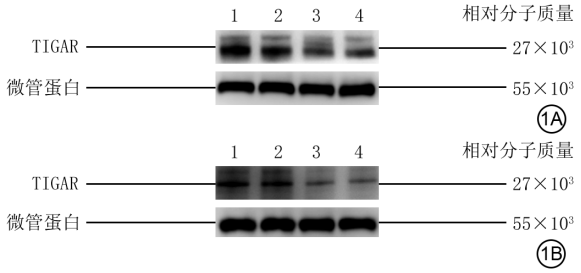
## 2　结果

### 2.1　结肠组织病理变化与黏蛋白形态分析

伤后3、5 d，HE染色显示假伤组小鼠结肠黏膜结构基本正常，未见明显病理性损伤；烧伤组小鼠结肠黏膜结构均出现明显病理改变，其中伤后5 d，结肠黏膜杯状细胞数量显著减少、隐窝高度显著降低且隐窝间隙显著增宽，结肠黏膜上皮屏障破坏明显，炎症细胞浸润加剧。伤后3、5 d，阿尔辛蓝-过碘酸希夫染色显示假伤组小鼠结肠杯状细胞以分泌酸性黏蛋白为主，伴少量中性黏蛋白；烧伤组小鼠结肠杯状细胞中性、酸性黏蛋白分泌均减少，其中伤后5 d更显著。

### 2.2　结肠组织中TIGAR的蛋白表达

伤后3、5 d，烧伤组小鼠结肠组织中TIGAR的蛋白表达均明显低于假伤组（$P$<0.05），见图1、表1。




注：TIGAR为TP53诱导的糖酵解与凋亡调节因子；条带上方1、2指示小鼠背部浸入37 ℃温水造成假伤的假伤组2个样本，3、4指示小鼠背部浸入90 ℃热水造成烧伤的烧伤组2个样本

**图1**　蛋白质印迹法检测的2组小鼠伤后各时间点结肠组织中TIGAR的蛋白表达。1A.伤后3 d；1B.伤后5 d

**Figure 1**　The protein expression levels of TIGAR in colonic tissue of two groups of mice at various time points post injury detected by Western blotting

### 2.3　结肠组织中氧化应激指标

伤后5 d，烧伤组小鼠结肠组织中GSH/GSSG和NADPH/$NADP^+$比值分别为8.2±0.5、0.26±0.03，均明显低于假伤组的30.1±2.0、1.77±0.15（$t$值分别为21.21、19.24，$P$<0.001）；一氧化氮浓度为（29.4±0.9）μmol/mg prot，明显高于假伤组的（8.4±0.7）μmol/mg prot（$t$=−41.72，$P$<0.001）。

**表1**　2组小鼠伤后各时间点结肠组织中TIGAR的蛋白表达比较（$\bar{x} \pm s$）

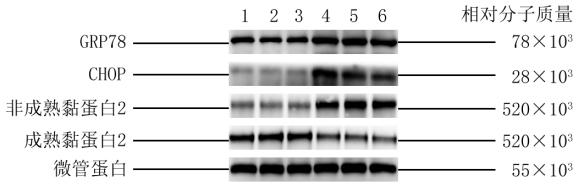
**Table 1**　Comparison of the protein expression levels of TIGAR in colonic tissue of two groups of mice at various time points post injury

| 组别 | 鼠数（只） | 3 d | 5 d |
|---|---|---|---|
| 假伤组 | 6 | 1.00±0.07 | 1.00±0.05 |
| 烧伤组 | 6 | 0.47±0.05 | 0.27±0.03 |
| $t$值 | | 14.72 | 29.54 |
| $P$值 | | <0.001 | <0.001 |

注：TIGAR为TP53诱导的糖酵解与凋亡调节因子；假伤组、烧伤组小鼠背部分别浸入37 ℃温水、90 ℃热水造成假伤、烧伤；处理因素主效应，$F$=831.07，$P$<0.001；时间因素主效应，$F$=20.52，$P$<0.001；两者交互作用，$F$=20.49，$P$<0.001

### 2.4　结肠组织中GRP78和CHOP及黏蛋白2的蛋白表达

伤后5 d，烧伤组小鼠结肠组织中GRP78、CHOP及非成熟黏蛋白2的蛋白表达分别为1.651±0.021、2.071±0.072、3.67±0.49，均明显高于假伤组的1.000±0.012、1.000±0.023、1.00±0.03（$t$值分别为−12.34、−32.94、−13.28，$P$<0.001）；成熟黏蛋白2的蛋白表达为0.511±0.022，明显低于假伤组的1.000±0.021（$t$=43.57，$P$<0.001）。见图2。




注：GRP78为葡萄糖调节蛋白78，CHOP为CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白；条带上方1~3、4~6分别指示小鼠背部浸入37 ℃温水造成假伤的假伤组3个样本、小鼠背部浸入90 ℃热水造成烧伤的烧伤组3个样本

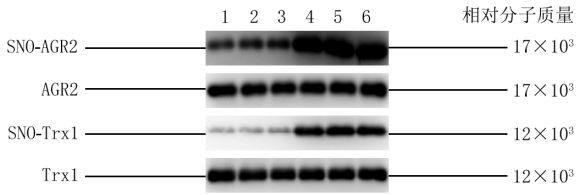
**图2**　蛋白质印迹法检测的2组小鼠伤后5 d结肠组织中GRP78和CHOP及黏蛋白2的蛋白表达

**Figure 2**　The protein expression levels of GRP78, CHOP, and mucin 2 in colonic tissue of two groups of mice at post-injury day 5 detected by Western blotting

### 2.5　结肠组织中AGR2和Trx1蛋白S-亚硝基化情况

伤后5 d，烧伤组小鼠结肠组织中SNO-AGR2和SNO-Trx1的蛋白表达分别为3.441±0.151、2.21±

0.26，均明显高于假伤组的 1.000±0.112、1.00±0.09（$t$ 值分别为-24.79、8.94，$P$<0.001）。见图 3。




注：SNO-AGR2 为 S-亚硝基化前梯度蛋白 2 蛋白，AGR2 为前梯度蛋白 2，SNO-Trx1 为 S-亚硝基化硫氧还蛋白 1 蛋白，Trx1 为硫氧还蛋白 1；条带上方 1~3、4~6 分别指示小鼠背部浸入 37 ℃温水造成假伤的假伤组 3 个样本、小鼠背部浸入 90 ℃热水造成烧伤的烧伤组 3 个样本

**图 3**　生物素转化法检测的 2 组小鼠伤后 5 d 结肠组织中 AGR2 和 Trx1 蛋白 S-亚硝基化情况

**Figure 3**　The S-nitrosylation of AGR2 and Trx1 in colonic tissue of two groups of mice at post-injury day 5 detected by biotin switch assay

**2.6**　TIGAR 对细胞中 GRP78 和 CHOP 及黏蛋白 2 的蛋白表达的影响

培养 24 h 后，与空载体组比较，*TIGAR* 敲除组细胞中 GRP78、CHOP 及非成熟黏蛋白 2 的蛋白表达均明显上调（$P$<0.05），成熟黏蛋白 2 的蛋白表达明显下调（$P$<0.05）。见图 4、表 2。

**2.7**　细胞中 AGR2 和黏蛋白 2 荧光共定位

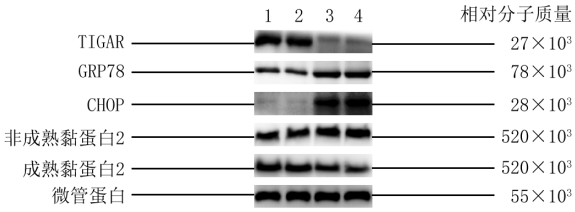
培养 24 h 后，免疫荧光结果显示细胞中可见 AGR2 与黏蛋白 2 存在共定位，见图 5。

**2.8**　AGR2 对细胞中黏蛋白 2 的蛋白表达的影响

培养 24 h 后，*AGR2* 敲除组细胞中非成熟黏蛋白 2 的蛋白表达明显高于空载体组（$P$<0.05），成熟黏蛋白 2 的蛋白表达明显低于空载体组（$P$<0.05）。见表 3。

**2.9**　TIGAR 对细胞中 Trx1 和 AGR2 蛋白 S-亚硝基化的影响

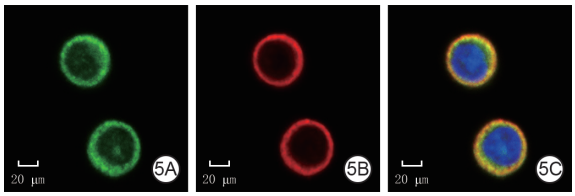
培养 24 h 后，细胞中 Trx1 与 AGR2 存在相互作用。培养 24 h 后，*Trx1* 敲低组细胞中 SNO-AGR2 的蛋白表达明显高于空载体组（$P$<0.05）。培养 24 h 后，*TIGAR* 敲除组细胞中 SNO-AGR2 和 SNO-Trx1 的蛋白表达均明显高于空载体组（$P$<0.05），*TIGAR* 敲除+NADPH 组细胞中 SNO-AGR2 和 SNO-Trx1 的蛋




注：TIGAR 为 TP53 诱导的糖酵解与凋亡调节因子，GRP78 为葡萄糖调节蛋白 78，CHOP 为 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白；条带上方 1 指示正常对照组，2 指示空载体组，3 和 4 指示 *TIGAR* 敲除组 2 个样本；正常对照组细胞行常规培养，空载体组细胞感染空载慢病毒，*TIGAR* 敲除组细胞感染靶向 *TIGAR* 的单向导 RNA 慢病毒

**图 4**　蛋白质印迹法检测的 3 组人结直肠腺癌细胞株 HT-29 培养 24 h 后 GRP78 和 CHOP 及黏蛋白 2 的蛋白表达

**Figure 4**　The protein expression levels of GRP78, CHOP, and mucin 2 in three groups of human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells after 24 h of culture detected by Western blotting




注：AGR2 为前梯度蛋白 2；黏蛋白 2 阳性染色为绿色，AGR2 阳性染色为红色，细胞核阳性染色为蓝色

**图 5**　人结直肠腺癌细胞株 HT-29 培养 24 h 后 AGR2 与黏蛋白 2 的免疫荧光共定位　Alexa Fluor 488-Alexa Fluor 594-4′,6-二脒基-2-苯基吲哚　×400。5A. 可见黏蛋白 2 阳性表达；5B. 可见 AGR2 阳性表达；5C. 可见 AGR2 和黏蛋白 2 共定位

**Figure 5**　The immunofluorescence colocalization of AGR2 and mucin 2 in human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells after 24 h of culture

**表 2**　3 组人结直肠腺癌细胞株 HT-29 培养 24 h 后 GRP78 和 CHOP 及黏蛋白 2 的蛋白表达比较（$\bar{x} \pm s$）

**Table 2**　Comparison of the protein expression levels of GRP78, CHOP, and mucin 2 in three groups of human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells after 24 h of culture

| 组别 | 样本数 | GRP78 | CHOP | 非成熟黏蛋白 2 | 成熟黏蛋白 2 |
|---|---|---|---|---|---|
| 正常对照组 | 6 | 1.000±0.021 | 1.000±0.041 | 1.00±0.03 | 1.000±0.051 |
| 空载体组 | 6 | 1.161±0.211 | 1.022±0.032 | 1.32±0.48 | 1.071±0.053 |
| *TIGAR* 敲除组 | 6 | 1.813±0.081[a] | 3.641±0.411[a] | 1.75±0.14[a] | 0.410±0.022[a] |
| $F$ 值 | | 66.54 | 239.89 | 10.07 | 434.91 |
| $P$ 值 | | <0.001 | <0.001 | 0.006 | <0.001 |

注：GRP78 为葡萄糖调节蛋白 78，CHOP 为 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白，TIGAR 为 TP53 诱导的糖酵解与凋亡调节因子；正常对照组细胞行常规培养，空载体组细胞感染空载慢病毒，*TIGAR* 敲除组细胞感染靶向 *TIGAR* 的单向导 RNA 慢病毒；与空载体组比较，[a]$P$<0.05

**表 3**　3 组人结直肠腺癌细胞株 HT-29 培养 24 h 后黏蛋白 2 的蛋白表达比较（$\bar{x} \pm s$）

**Table 3**　Comparison of the protein expression levels of mucin 2 in three groups of human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells after 24 h of culture

| 组别 | 样本数 | 非成熟黏蛋白 2 | 成熟黏蛋白 2 |
|---|---|---|---|
| 正常对照组 | 4 | 1.00±0.05 | 1.000±0.082 |
| 空载体组 | 4 | 1.08±0.05 | 1.141±0.032 |
| *AGR2* 敲除组 | 4 | 2.54±0.16[a] | 0.383±0.041[a] |
| *F* 值 | | 288.87 | 171.27 |
| *P* 值 | | <0.001 | <0.001 |

注：AGR2 为前梯度蛋白 2；正常对照组细胞行常规培养，空载体组细胞感染空载慢病毒，*AGR2* 敲除组细胞感染靶向 AGR2 的单向导 RNA 慢病毒；与空载体组比较，[a]*P*<0.05

白表达均明显低于 *TIGAR* 敲除组（*P*<0. 05）。见图 6、表 4、表 5。

**2. 10**　TIGAR 对细胞中 6PGD 酶活性的影响

培养 24 h 后，*TIGAR* 敲除组细胞中 6PGD 酶活性为（7. 1±1. 2）U/mg prot，明显低于空载体组的（18. 8±1. 1）U/mg prot（*t*=16. 13，*P*<0. 001）。

**2. 11**　6PGD 对细胞中 NADPH/NADP$^+$ 比值和一氧化氮浓度及 Trx1 酶活性的影响

培养 24 h 后，*6PGD* 敲低组细胞中 NADPH/NADP$^+$ 比值和 Trx1 酶活性分别为 0. 55±0. 08、（13. 8±1. 7）U/mg prot，均明显低于空载体组的 1. 21±0. 21、（30. 2±2. 9）U/mg prot（*t* 值分别为 6. 55、10. 83，*P*<0. 001）；*6PGD* 敲低组细胞中一氧化氮浓度为（16. 4±1. 4）μmol/mg prot，明显高于空载体组的（7. 7±1. 1）μmol/mg prot（*t*=−10. 71，*P*<0. 001）。

**表 4**　3 组人结直肠腺癌细胞株 HT-29 培养 24 h 后 AGR2 蛋白 S-亚硝基化比较（$\bar{x} \pm s$）

**Table 4**　Comparison of the S-nitrosylation of AGR2 in three groups of human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells after 24 h of culture

| 组别 | 样本数 | SNO-AGR2 | AGR2 |
|---|---|---|---|
| 正常对照组 | 3 | 1.000±0.021 | 1.00±0.06 |
| 空载体组 | 3 | 1.131±0.112 | 1.11±0.06 |
| *Trx1* 敲低组 | 3 | 2.442±0.251[a] | 1.21±0.16 |
| *F* 值 | | 71.34 | 2.66 |
| *P* 值 | | <0.001 | 0.124 |

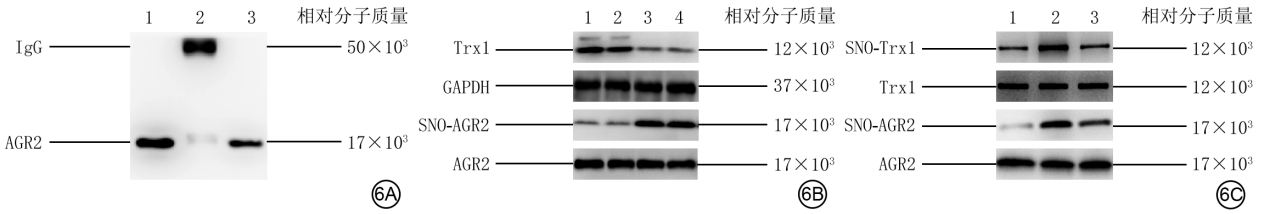
注：AGR2 为前梯度蛋白 2，Trx1 为硫氧还蛋白 1，SNO-AGR2 为 S-亚硝基化 AGR2 蛋白；正常对照组细胞行常规培养，空载体组细胞感染空载慢病毒，*Trx1* 敲低组细胞感染靶向 *Trx1* 的短发夹 RNA 慢病毒；与空载体组比较，[a]*P*<0.05

**2. 12**　*6PGD* 敲低和 *TIGAR* 回补对细胞中 AGR2 和 Trx1 蛋白 S-亚硝基化的影响

培养 24 h 后，*6PGD* 敲低组细胞中 SNO-AGR2 和 SNO-Trx1 的蛋白表达均明显高于空载体组（*P*<0. 05）。培养 24 h 后，空载回补对照组细胞中 SNO-AGR2 和 SNO-Trx1 蛋白表达均明显高于空载体组（*P*<0. 05），*TIGAR* 回补组细胞中 SNO-AGR2 和 SNO-Trx1 蛋白表达均明显低于空载回补对照组（*P*<0. 05）。见图 7、表 6、表 7。

## 3　讨论

肠黏液屏障是肠道稳态与损伤防御的第一道防线[11]，黏蛋白是黏液核心组分，其内质网内的折叠成熟过程决定黏液屏障完整性[12]。内质网中的 AGR2 属于蛋白二硫键异构酶家族，兼具氧化还原




注：AGR2 为前梯度蛋白 2，Trx1 为硫氧还蛋白 1，GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶，SNO-Trx1 为 S-亚硝基化 Trx1 蛋白，SNO-AGR2 为 S-亚硝基化 AGR2 蛋白；图 6A 条带上方 1 指示免疫沉淀前的细胞总蛋白，2 指示 IgG 重链，3 指示 Trx1 抗体免疫沉淀复合物；图 6B 条带上方 1 指示正常对照组，2 指示空载体组，3 和 4 指示 *Trx1* 敲低组 2 个样本；图 6C 条带上方 1 指示空载体组，2 指示 *TIGAR* 敲除组，3 指示 *TIGAR* 敲除+还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（NADPH）组；正常对照组细胞行常规培养，空载体组细胞感染空载慢病毒，*Trx1* 敲低组细胞感染靶向 *Trx1* 的短发夹 RNA 慢病毒，*TIGAR* 敲除组细胞仅感染靶向 *TIGAR* 的单向导 RNA 慢病毒，*TIGAR* 敲除+NADPH 组细胞感染靶向 *TIGAR* 的单向导 RNA 慢病毒后另加入 NADPH

**图 6**　免疫共沉淀联合生物素转化法检测的 6 组人结直肠腺癌细胞株 HT-29 培养 24 h 后 TIGAR 对 Trx1 和 AGR2 蛋白 S-亚硝基化的影响。6A. 免疫共沉淀法检测的 AGR2 与 Trx1 的相互作用；6B. 生物素转化法检测的 *Trx1* 敲低对细胞中 AGR2 蛋白 S-亚硝基化的影响；6C. 生物素转化法检测的 *TIGAR* 敲除对细胞中 AGR2 和 Trx1 蛋白 S-亚硝基化的影响

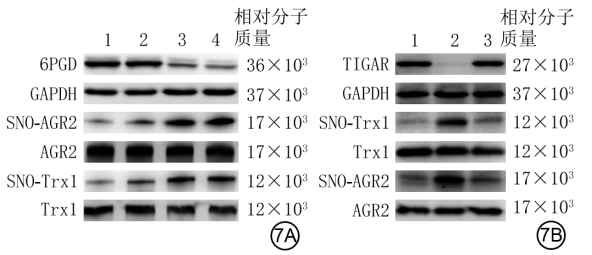
**Figure 6**　The effects of TIGAR on S-nitrosylation of Trx1 and AGR2 in 6 groups of human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells after 24 h of culture assessed by co-immunoprecipitation combined with biotin switch assay

**表 5**　3 组人结直肠腺癌细胞株 HT-29 培养 24 h 后 AGR2 和 Trx1 蛋白 S-亚硝基化比较（$\bar{x} \pm s$）

**Table 5**　Comparison of the S-nitrosylation of AGR2 and Trx1 in three groups of human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells after 24 h of culture

| 组别 | 样本数 | SNO-Trx1 | SNO-AGR2 |
|---|---|---|---|
| 空载体组 | 5 | 1.00±0.09 | 1.000±0.063 |
| *TIGAR* 敲除组 | 5 | 2.29±0.24[a] | 2.882±0.191[a] |
| *TIGAR* 敲除+NADPH 组 | 5 | 1.16±0.05[b] | 1.374±0.084[b] |
| *F* 值 | | 104.57 | 303.23 |
| *P* 值 | | <0.001 | <0.001 |

注：AGR2 为前梯度蛋白 2，Trx1 为硫氧还蛋白 1，TIGAR 为 TP53 诱导的糖酵解与凋亡调节因子，NADPH 为还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸，SNO-Trx1 为 S-亚硝基化 Trx1 蛋白，SNO-AGR2 为 S-亚硝基化 AGR2 蛋白；空载体组细胞感染空载慢病毒，*TIGAR* 敲除组细胞感染靶向 *TIGAR* 的单向导 RNA 慢病毒，*TIGAR* 敲除+NADPH 组细胞感染靶向 *TIGAR* 的 sgRNA 慢病毒后另加入 NADPH；与空载体组比较，[a]*P*<0.05；与 *TIGAR* 敲除组比较，[b]*P*<0.05




注：6PGD 为 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶，GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶，SNO-AGR2 为 S-亚硝基化前梯度蛋白 2 蛋白，AGR2 为前梯度蛋白 2，SNO-Trx1 为 S-亚硝基化硫氧还蛋白 1 蛋白，Trx1 为硫氧还蛋白 1，TIGAR 为 TP53 诱导的糖酵解与凋亡调节因子；图 7A 条带上方 1 指示正常对照组，2 指示空载体组，3 和 4 指示 *6PGD* 敲低组 2 个样本；图 7B 条带上方 1 指示空载体组，2 指示空载回补对照组，3 指示 *TIGAR* 回补组；正常对照组细胞行常规培养，空载体组细胞感染空载慢病毒，*6PGD* 敲低组细胞感染靶向 *6PGD* 的短发夹 RNA 慢病毒，空载回补对照组 *TIGAR* 敲除细胞感染空载慢病毒，*TIGAR* 回补组 *TIGAR* 敲除细胞感染携带 *TIGAR* 编码序列的过表达慢病毒

**图 7**　生物素转化法检测的经 *6PGD* 敲低与 *TIGAR* 回补处理的 6 组人结直肠腺癌细胞株 HT-29 培养 24 h 后 AGR2 与 Trx1 蛋白 S-亚硝基化。7A. *6PGD* 敲低对细胞中 AGR2 和 Trx1 蛋白 S-亚硝基化的影响；7B. *TIGAR* 回补对 *TIGAR* 敲除细胞中 AGR2 和 Trx1 蛋白 S-亚硝基化的影响

**Figure 7**　The S-nitrosylation of AGR2 and Trx1 in 6 groups of human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells after 24 h of culture with *6PGD* knockdown or *TIGAR* rescue assessed by biotin switch assay

酶与分子伴侣活性，介导黏蛋白 2 前体折叠成熟[13-15]。本研究证实，AGR2 功能缺失可引发黏蛋白 2 成熟障碍，加重肠道损伤，是烧伤后肠黏液屏障破坏的关键原因。

**表 6**　3 组人结直肠腺癌细胞株 HT-29 培养 24 h 后 AGR2 和 Trx1 蛋白 S-亚硝基化比较（$\bar{x} \pm s$）

**Table 6**　Comparison of the S-nitrosylation of AGR2 and Trx1 in three groups of human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells after 24 h of culture

| 组别 | 样本数 | SNO-AGR2 | SNO-Trx1 |
|---|---|---|---|
| 正常对照组 | 5 | 1.000±0.104 | 1.00±0.06 |
| 空载体组 | 5 | 1.141±0.042 | 1.11±0.08 |
| *6PGD* 敲低组 | 5 | 2.863±0.272[a] | 3.01±0.25[a] |
| *F* 值 | | 188.16 | 250.88 |
| *P* 值 | | <0.001 | <0.001 |

注：AGR2 为前梯度蛋白 2，Trx1 为硫氧还蛋白 1，6PGD 为 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶，SNO-AGR2 为 S-亚硝基化 AGR2 蛋白，SNO-Trx1 为 S-亚硝基化 Trx1 蛋白；正常对照组细胞行常规培养，空载体组细胞感染空载慢病毒，*6PGD* 敲低组细胞感染靶向 *6PGD* 的短发夹 RNA 慢病毒；与空载体组比较，[a]*P*<0.05

**表 7**　3 组人结直肠腺癌细胞株 HT-29 培养 24 h 后 AGR2 和 Trx1 蛋白 S-亚硝基化比较（$\bar{x} \pm s$）

**Table 7**　Comparison of the S-nitrosylation of AGR2 and Trx1 in three groups of human colorectal adenocarcinoma HT-29 cells after 24 h of culture

| 组别 | 样本数 | SNO-AGR2 | SNO-Trx1 |
|---|---|---|---|
| 空载体组 | 5 | 1.000±0.102 | 1.00±0.09 |
| 空载回补对照组 | 5 | 3.632±0.351[a] | 4.25±0.59[a] |
| *TIGAR* 回补组 | 5 | 1.142±0.143[b] | 1.14±0.11[b] |
| *F* 值 | | 164.79 | 136.94 |
| *P* 值 | | <0.001 | <0.001 |

注：AGR2 为前梯度蛋白 2，Trx1 为硫氧还蛋白 1，TIGAR 为 TP53 诱导的糖酵解与凋亡调节因子，SNO-AGR2 为 S-亚硝基化 AGR2 蛋白，SNO-Trx1 为 S-亚硝基化 Trx1 蛋白；空载体组细胞感染空载慢病毒，空载回补对照组 *TIGAR* 敲除细胞感染空载慢病毒，*TIGAR* 回补组 *TIGAR* 敲除细胞感染携带 *TIGAR* 编码序列的过表达慢病毒；与空载体组比较，[a]*P*<0.05；与空载回补对照组比较，[b]*P*<0.05

严重烧伤可引起机体发生强烈的氧化应激与炎症反应，导致肠组织中一氧化氮大量生成，进而触发蛋白质异常翻译后修饰[16]。本研究首次在烧伤小鼠模型中证实，过量一氧化氮可诱导 AGR2 蛋白 S-亚硝基化。序列分析提示，AGR2 仅含有 1 个半胱氨酸残基（Cys81），因此 AGR2 蛋白 S-亚硝基化只能发生于该保守功能位点，提示过量一氧化氮可靶向修饰 AGR2 的 Cys81 位点。AGR2 的 Cys81 是介导 AGR2 与黏蛋白 2 前体相互作用，进而调控黏蛋白 2 前体折叠与成熟的核心位点[17]，该位点发生亚硝基化后会直接破坏 AGR2 与黏蛋白 2 前体的相互作用，导致未成熟黏蛋白在杯状细胞中大量蓄积，持续激活内质网应激反应，进一步阻滞黏蛋白 2 成熟，

最终造成肠道黏液层变薄、完整性受损，加重烧伤后肠道受损程度。该结果拓展了烧伤应激环境下一氧化氮介导蛋白翻译后修饰的调控谱系，为解析烧伤后杯状细胞功能异常提供了新的分子解释。

TIGAR 是调控糖代谢与氧化还原稳态的核心分子，可通过调控 PPP 通量、抑制乳酸蓄积，稳定细胞抗氧化体系[18-19]。本研究初步阐明了 TIGAR 保护烧伤后肠黏液屏障的关键机制，即 TIGAR 可通过调控 PPP 促进 NADPH 合成，抑制氧化应激，进而维持肠黏液屏障稳态。烧伤可明显下调肠道 TIGAR 表达，而 TIGAR 低表达会直接降低 PPP 关键限速酶 6PGD 的酶活性，干扰细胞 NADPH 生成。NADPH 作为体内核心抗氧化辅酶，可充当关键递氢体，对维持 Trx1 还原酶活性具有重要作用[20-21]。TIGAR 缺失介导的 NADPH 耗竭，会打破胞内氧化还原平衡，使 Trx1 由去亚硝基化的还原酶转变为促亚硝基化的氧化酶，导致被修饰的蛋白发生氧化反应。此时，Trx1 可介导 AGR2 蛋白 S-亚硝基化，损害 AGR2 的分子伴侣功能，进而抑制黏蛋白 2 前体折叠成熟。至此，本研究证实，烧伤后 TIGAR 表达下降，导致 6PGD 活性受抑和 NADPH 合成减少，进而导致 Trx1 介导的 AGR2 蛋白 S-亚硝基化，最终导致黏蛋白 2 成熟障碍和肠黏液屏障受损。相较于既往大多聚焦 TIGAR 抗肿瘤、缺血损伤、神经系统领域的报道[22-24]，本研究将 TIGAR 功能延伸至烧伤肠道黏膜损伤，揭示其通过糖代谢-氧化还原轴调控杯状细胞黏蛋白成熟的全新通路。

尽管体内有多条 NADPH 合成通路，如苹果酸酶 1 和异柠檬酸脱氢酶 1 通路等，但 PPP 是其合成的主要通路，占合成总量的 60% 以上[25-27]。在 NADPH 合成过程中有 2 个关键限速酶葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（glucose-6-phosphate dehydrogenase，G6PD）与 6PGD，二者共同决定 PPP 中的碳流量及 NADPH 生成效率，对维持细胞氧化还原平衡、减轻氧化应激具有重要作用[28-30]。既往关于 TIGAR 调控 PPP 代谢及氧化应激的研究多聚焦于上游限速酶 G6PD[31-32]，忽视了其下游限速酶 6PGD。本研究显示，烧伤后 TIGAR 表达下降可明显抑制 6PGD 酶活性，阻碍 NADPH 合成，导致杯状细胞发生氧化应激，提示 6PGD 同样是 TIGAR 发挥氧化还原调控不可或缺的效应分子。该结果拓展了对 TIGAR 调控 PPP 机制的认知，提示 TIGAR 对 PPP 的调控并非仅作用于 G6PD，6PGD 也参与该过程，丰富了糖代谢介导肠道氧化应激的认知，为调控细胞氧化还原平衡提供了新的干预靶点。

本研究存在如下局限性：机制证据主要来自烧伤小鼠组织与分子检测，缺少 TIGAR 或 6PGD 体内拯救实验，通路因果关系有待验证；仅采用动物模型，缺乏临床样本，与临床转化存在距离。后续将开展体内拯救实验，确认该通路在烧伤结肠黏液屏障损伤中的因果效应，评估靶点转化潜力。

综上，本研究围绕 PPP 限速酶 6PGD 及黏蛋白成熟关键调控分子 AGR2 展开机制探究，初步阐明了 TIGAR 的细胞保护效应：TIGAR 通过维持 6PGD 催化活性，促进 NADPH 合成，稳定 Trx1 还原酶活性，抑制 AGR2 蛋白 S-亚硝基化，进而促进黏蛋白 2 成熟，维护肠黏液屏障。该研究揭示了 6PGD 在烧伤后肠黏液屏障损伤中的全新生物学功能，深化了对烧伤后肠道损伤病理生理机制的认识，为建立烧伤后肠道损伤靶向防治策略提供了新思路。

**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 魏燕：实施研究、采集数据、统计分析与论文撰写；吴丹：实施研究、采集数据、起草文章、修改文章及图片制作；苏森、张攀扬、查绪乐：采集数据、统计分析；彭曦：酝酿与设计研究、修改文章、获取研究经费

**参考文献**

[1] 彭曦,苏森.重视烧伤康复期的营养治疗[J].中华烧伤与创面修复杂志,2025,41(12):1139-1145.DOI:10.3760/cma.j.cn501225-20251105-00459.

[2] He W,Wang Y,Wang P,et al.Intestinal barrier dysfunction in severe burn injury[J/OL].Burns Trauma,2019,7:24[2026-08-05].https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31372365/.DOI:10.1186/s41038-019-0162-3.

[3] Zha X,Su S,Wu D,et al.The impact of gut microbiota changes on the intestinal mucus barrier in burned mice:a study using 16S rRNA and metagenomic sequencing[J/OL].Burns Trauma,2023,11:tkad056[2026-08-05].https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38130728/.DOI:10.1093/burnst/tkad056.

[4] Yao Y,Kim G,Shafer S,et al.Mucus sialylation determines intestinal host-commensal homeostasis[J].Cell,2022,185(7):1172-1188.e28.DOI:10.1016/j.cell.2022.02.013.

[5] Al-Shaibi AA,Abdel-Motal UM,Hubrack SZ,et al.Human AGR2 deficiency causes mucus barrier dysfunction and infantile inflammatory bowel disease[J].Cell Mol Gastroenterol Hepatol,2021,12(5):1809-1830.DOI:10.1016/j.jcmgh.2021.07.001.

[6] Stomberski CT,Hess DT,Stamler JS.Protein S-nitrosylation:determinants of specificity and enzymatic regulation of S-nitrosothiol-based signaling[J].Antioxid Redox Signal,2019,30(10):1331-1351.DOI:10.1089/ars.2017.7403.

[7] Nagarajan N,Oka SI,Nah J,et al.Thioredoxin 1 promotes autophagy through transnitrosylation of Atg7 during myocardial ischemia[J].J Clin Invest,2023,133(3):e162326.DOI:10.1172/JCI162326.

[8] Tang J, Chen L, Qin ZH, et al. Structure, regulation, and biological functions of TIGAR and its role in diseases[J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(10): 1547-1555. DOI: 10.1038/s41401-020-00588-y.

[9] Guchhait K, Yoon HS, An HS, et al. Cereblon (CRBN) inhibits prostate cancer metastasis by negatively regulating 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) [J]. Oncogene, 2026,45(14):1234-1246.DOI:10.1038/s41388-026-03717-9.

[10] Wu D, Su S, Zha X, et al. Glutamine promotes O-GlcNAcylation of G6PD and inhibits AGR2 S-glutathionylation to maintain the intestinal mucus barrier in burned septic mice[J]. Redox Biol,2023,59:102581.DOI:10.1016/j.redox.2022.102581.

[11] 吴丹,苏森,魏燕,等.肠黏液屏障与烧伤后肠道损伤修复的研究进展[J].中华烧伤与创面修复杂志,2022,38(8):788-793. DOI:10.3760/cma.j.cn501225-20220701-00280.

[12] Yuan Z, Xia Z, Ling L, et al. Mucin 2 and unfolded protein response reshape the mucus barrier in inflammatory bowel disease (Review) [J]. Mol Med Rep, 2026, 33(1): 18. DOI: 10.3892/mmr.2025.13728.

[13] Li H, Zhang Z, Shi Z, et al. Disrupting AGR2/IGF1 paracrine and reciprocal signaling for pancreatic cancer therapy[J]. Cell Rep Med, 2025, 6(2): 101927. DOI: 10.1016/j.xcrm.2024.101927.

[14] Wu D, Su S, Zhang P, et al. TIGAR regulates intestinal mucus barrier integrity by inhibiting lactylation of G6PD/6PGD in ulcerative colitis[J]. Nat Commun, 2026, 17(1): 3382. DOI: 10.1038/s41467-026-70263-z.

[15] Neidhardt L, Cloots E, Friemel N, et al. The IRE1β-mediated unfolded protein response is repressed by the chaperone AGR2 in mucin producing cells[J]. EMBO J, 2024, 43(5): 719-753.DOI:10.1038/s44318-023-00014-z.

[16] Gong ZY, Yuan ZQ, Dong ZW, et al. Glutamine with probiotics attenuates intestinal inflammation and oxidative stress in a rat burn injury model through altered iNOS gene aberrant methylation[J]. Am J Transl Res,2017,9(5):2535-2547.

[17] Xhumari J, Ojeda A, Akinsuyi OS, et al. Cross-species systems analysis distinguishes inflammatory remodeling from primary mucus secretory failure in inflammatory bowel disease[J]. Front Immunol, 2026, 17: 1813019. DOI: 10.3389/fimmu.2026.1813019.

[18] Liu MY, Li HM, Wang XY, et al. TIGAR drives colorectal cancer ferroptosis resistance through ROS/AMPK/SCD1 pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2022, 182: 219-231. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.03.002.

[19] Kim J, Devalaraja-Narashimha K, Padanilam BJ. TIGAR regulates glycolysis in ischemic kidney proximal tubules[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2015, 308(4): F298-F308. DOI: 10.1152/ajprenal.00459.2014.

[20] Chen L, Zhang Z, Hoshino A, et al. NADPH production by the oxidative pentose-phosphate pathway supports folate metabolism[J].Nat Metab,2019,1:404-415.

[21] Seitz R, Tümen D, Kunst C, et al. Exploring the thioredoxin system as a therapeutic target in cancer: mechanisms and implications[J]. Antioxidants (Basel), 2024, 13(9): 1078. DOI: 10.3390/antiox13091078.

[22] Huang B, Lang X, Li X. The role of TIGAR in nervous system diseases[J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14: 1023161. DOI: 10.3389/fnagi.2022.1023161.

[23] Geng J, Yuan X, Wei M, et al. The diverse role of TIGAR in cellular homeostasis and cancer[J]. Free Radic Res, 2018, 52(11/12):1240-1249.DOI:10.1080/10715762.2018.1489133.

[24] Liu M, Zhou X, Li Y, et al. TIGAR alleviates oxidative stress in brain with extended ischemia via a pentose phosphate pathway-independent manner[J]. Redox Biol, 2022, 53: 102323.DOI:10.1016/j.redox.2022.102323.

[25] Fujiwara-Tani R, Nakashima C, Ohmori H, et al. Significance of malic enzyme 1 in cancer: a review[J]. Curr Issues Mol Biol,2025,47(2):83.DOI:10.3390/cimb47020083.

[26] Simmen FA, Alhallak I, Simmen RCM. Malic enzyme 1 (ME1) in the biology of cancer: it is not just intermediary metabolism[J]. J Mol Endocrinol, 2020, 65(4): R77-R90. DOI: 10.1530/JME-20-0176.

[27] Ni Y, Shen P, Wang X, et al. The roles of IDH1 in tumor metabolism and immunity[J]. Future Oncol, 2022, 18(35): 3941-3953.DOI:10.2217/fon-2022-0583.

[28] Yang HC, Stern A, Chiu DT. G6PD: a hub for metabolic reprogramming and redox signaling in cancer[J]. Biomed J, 2021,44(3):285-292.DOI:10.1016/j.bj.2020.08.001.

[29] Meng Q,Zhang Y,Hao S,et al.Recent findings in the regulation of G6PD and its role in diseases[J].Front Pharmacol,2022,13: 932154.DOI:10.3389/fphar.2022.932154.

[30] Hu Z, Wang Y, Wang J, et al. Neutrophil extracellular traps in diabetic wound healing: mechanisms, pathological roles, and therapeutic implications[J/OL]. Burns Trauma, 2026, 14: tkag041[2026-08-05]. https://pubmed. ncbi. nlm. nih. gov/42666792/.DOI:10.1093/burnst/tkag041.

[31] Zhou W, Yao Y, Li J, et al. TIGAR attenuates high glucose-induced neuronal apoptosis via an autophagy pathway[J]. Front Mol Neurosci, 2019, 12: 193. DOI: 10.3389/fnmol.2019.00193.

[32] Dodson M, Darley-Usmar V, Zhang J. Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 63: 207-221. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.014.