

· 海外发表论文选读 ·

肠三叶因子减轻烧伤后内质网应激促进肠上皮细胞 谷氨酰胺转运的机制研究

胡建红 石岩 王超 万晗星 吴丹 王宏宇 彭曦

陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤

国家重点实验室,重庆 400038

通信作者:彭曦,Email:pxlrm@163.com

原文 DOI:10.1038/s41598-018-21282-4

本文 DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2019.05.016

1 材料与与方法

120 只成年雄性 SD 大鼠来源于陆军军医大学实验动物中心,将大鼠分为正常组、烧伤组、烧伤 + 肠三叶因子(ITF)组,每组 40 只。所有大鼠均给予剔除躯干毛发,苯巴比妥钠麻醉,2 个烧伤组大鼠造成 30% TBSA III 度烧伤。钙离子螯合法提取肠上皮细胞(IECs),镁离子梯度离心法制备 IECs 刷状缘囊泡(BBMVs)。采用透射电镜观察 BBMVs 结构变化,核素液相闪烁仪检测 IECs 及 BBMVs 对谷氨酰胺的转运能力。采用蛋白质印迹法检测 IECs 中 ASCT2 和 B0AT1 及其相关调控蛋白磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(p-AMPK)、CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)、葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、p-62、LC3-II、二硫键异构酶(PDI)蛋白水平的变化。采用荧光定量 PCR 技术观察 IECs 中 ASCT2、B0AT1、CHOP、GRP78、PDI mRNA 水平的变化。采用 PDI 亚硝基化实验和胰岛素聚集实验检测 PDI 的活性变化。体外实验培养 IEC-6 细胞株,分为正常血清组、烧伤血清组、烧伤给药组、烧伤给药后抑制 AMPK 组、烧伤给药后抑制自噬组、烧伤给药后抑制 PDI 组,正常血清组细胞加入体积分数 10% 正常大鼠血清培养,5 个烧伤组细胞均加入体积分数 10% 烧伤大鼠血清培养,后 4 组细胞还分别加入 ITF(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,质量浓度下同)培养、ITF + 复合物 C 培养、ITF + 3-MA 培养、ITF + 16F16 培养。检测前述蛋白表达。采用双向方差分析统计数据, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

透射电镜结果显示,烧伤组大鼠 BBMVs 结构受损,烧伤 + ITF 组大鼠 BBMVs 受损程度较烧伤组明显减轻。与正常组比较,烧伤组大鼠 BBMVs 及 IECs 对谷氨酰胺的转运能力明显降低($P < 0.05$);与烧伤组比较,烧伤 + ITF 组大鼠 BBMVs 及 IECs 对谷氨酰胺的转运能力明显增强($P < 0.05$)。

与正常组比较,烧伤组大鼠 IECs 中 ASCT2、B0AT1、PDI 及 p-AMPK 蛋白水平降低($P < 0.05$);与烧伤组比较,烧伤 + ITF 组大鼠该 4 项指标水平显著升高($P < 0.05$)。3 组大鼠 IECs 中 ASCT2、B0AT1 mRNA 水平无明显差异,PDI mRNA 水平差异同蛋白水平。与正常组比较,烧伤组大鼠 IECs 中 CHOP、GRP78 蛋白水平及 mRNA 水平明显升高($P < 0.05$);与烧伤组比较,烧伤 + ITF 组这些指标水平明显降低($P <$

0.05)。与正常组比较,烧伤组大鼠 IECs 中 p-62、LC3-II 蛋白水平分别降低、升高($P < 0.05$);与烧伤组比较,烧伤 + ITF 组大鼠 IECs 中 p-62 降低更明显($P < 0.05$)、LC3-II 蛋白水平升高更明显($P < 0.05$)。

PDI 亚硝基化实验和胰岛素聚集实验结果显示,烧伤组大鼠 PDI 活性明显低于正常组($P < 0.05$);与烧伤组比较,烧伤 + ITF 组大鼠 PDI 活性明显增强($P < 0.05$)。

体外培养 IEC-6 细胞实验结果显示,与正常血清组比较,烧伤血清组 ASCT2、B0AT1、PDI 及 p-AMPK、p-62 蛋白水平降低($P < 0.05$),CHOP、GRP78、LC3-II 蛋白水平明显升高($P < 0.05$)。与烧伤血清组比较,烧伤给药组 ASCT2、B0AT1、PDI 及 p-AMPK 蛋白水平明显提高($P < 0.05$),CHOP、GRP78 蛋白水平降低($P < 0.05$),p-62 蛋白水平降低更明显($P < 0.05$),LC3-II 蛋白水平升高更明显($P < 0.05$)。与烧伤给药组比较,烧伤给药后抑制 AMPK 组、烧伤给药后抑制自噬组、烧伤给药后抑制 PDI 组均能显著降低 ITF 对 IEC-6 细胞的生物学效应($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究观察到 ITF 能明显增强烧伤大鼠肠道对谷氨酰胺的转运,其机制为 ITF 能激活 AMPK,增强烧伤后 IECs 自噬水平,降低细胞内异常蛋白聚集对内质网的刺激,将烧伤后 IECs 的内质网应激控制在合理水平,减轻烧伤导致的 PDI、ASCT2 和 B0AT1 蛋白合成障碍,最终促进烧伤后肠道对谷氨酰胺的转运。此外,ITF 对 IECs 和 BBMVs 具有直接的保护作用,减轻了烧伤导致的细胞损伤。因此 ITF 从维护细胞正常的组织结构和促进谷氨酰胺转运载体合成两方面作用于肠道,减轻了烧伤导致的肠道谷氨酰胺转运障碍。

[本文已以英文发表,全文见“Hu J, Shi Y, Wang C, et al. Role of intestinal trefoil factor in protecting intestinal epithelial cells from burn-induced injury. Sci Rep, 2018, 8(1): 3201.”]

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

(收稿日期:2019-03-30)

本文引用格式

胡建红,石岩,王超,等. 肠三叶因子减轻烧伤后内质网应激促进肠上皮细胞谷氨酰胺转运的机制研究[J]. 中华烧伤杂志,2019,35(5):400. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2019.05.016.