

引用本文:杨宇,易庆军,李军,等.类固醇受体辅活化子-3对严重烧伤小鼠肠黏膜屏障功能损伤的影响[J].安徽医药, 2024, 28(2): 235-240. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2024.02.006.

◇ 药学研究 ◇



类固醇受体辅活化子-3对严重烧伤小鼠肠黏膜屏障功能损伤的影响

杨宇^a, 易庆军^b, 李军^a, 张永洪^a, 文婷婷^a

作者单位:电子科技大学医学院附属绵阳医院、绵阳市中心医院,^a麻醉科,^b儿科,四川 绵阳 621000

通信作者:易庆军,女,副主任医师,研究方向为儿科学, Email:cgj10@163.com

基金项目:创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室开放基金资助(SKLKF202014)

摘要 **目的** 探究类固醇受体辅活化子-3(SRC-3)对严重烧伤小鼠肠黏膜屏障功能损伤的影响。**方法** 2022年1—4月将SPF级雌性SRC-3基因敲除(SRC-3^{-/-})小鼠作为对实验组($n=36$),并以野生型(SRC-3^{+/+})小鼠作为对照组($n=36$),两组小鼠均诱导建立背部30%体表总面积(TBSA)Ⅲ度烧伤模型。在烧伤后第1、3、5天时,荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖(FITC-dextran)灌胃检测肠道通透性,酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测血清白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平和血浆二胺氧化酶(DAO)活性以及内毒素(ET)水平,苏木精-伊红(HE)和阿尔新蓝-过碘酸-希夫(AB-PAS)染色评估肠黏膜损伤和杯状细胞黏液分泌情况,免疫组织化学(IHC)染色检测黏蛋白2(Muc2)的表达,蛋白质印迹法检测肠黏膜中Muc2、IL-6和TNF- α 蛋白表达。**结果** 在烧伤后第1、3、5天时,与对照组(SRC-3^{+/+}小鼠)相比,实验组SRC-3^{-/-}小鼠血清FITC-dextran浓度[(1 156.21 $\pm$ 107.65) μ g/L比(685.14 $\pm$ 79.36) μ g/L、(1 425.81 $\pm$ 115.36) μ g/L比(743.72 $\pm$ 82.29) μ g/L、(1 613.27 $\pm$ 120.94) μ g/L比(824.35 $\pm$ 85.44) μ g/L]、血浆DAO活性和ET水平、肠黏膜损伤评分、PAS⁺杯状细胞数量、血清和肠黏膜中IL-6、TNF- α 水平显著升高,AB⁺杯状细胞数量、肠黏膜中Muc2表达水平显著降低($P<0.05$)。**结论** SRC-3缺失可以在严重烧伤后损害杯状细胞的分化成熟,减少肠黏液的合成与分泌,加重肠黏膜屏障功能障碍。

关键词 烧伤; 类固醇受体辅活化子-3; 肠黏膜屏障功能; 杯状细胞; 小鼠

Impact of steroid receptor coactivator-3 on intestinal mucosal barrier function damage in severely burned mice

YANG Yu^a, YI Qingjun^b, LI Jun^a, ZHANG Yonghong^a, WEN Tingting^a

Author Affiliation:^aDepartment of Anesthesiology, ^bDepartment of Pediatrics, Mianyang Central Hospital, The Affiliated Mianyang Hospital, School of Medicine of UESTC, Mianyang, Sichuan 621000, China

Abstract **Objective** To investigate the impact of steroid receptor coactivator-3 (SRC-3) on the damage of intestinal mucosal barrier function in severely burned mice. **Methods** From January to April 2022, the SPF female SRC-3 knockout (SRC-3^{-/-}) mice were regarded as the experimental group ($n=36$), and the wild-type (SRC-3^{+/+}) mice were regarded as the control group ($n=36$), both groups of mice were induced to establish a 30% total body surface area (TBSA) third-degree burn model on the back. On the 1st, 3rd, and 5th days after burn, fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-dextran) was administered by gavage to detect intestinal permeability, the levels of serum interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), plasma diamine oxidase (DAO) activity, and the level of endotoxin (ET) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), hematoxylin-eosin (HE) and alcian blue-periodic acid-Schiff (AB-PAS) staining were used to evaluate intestinal mucosal injury and goblet cell mucus secretion, the expression of mucin 2 (Muc2) was detected by immunohistochemical (IHC) staining, Western blotting was used to detect the protein expressions of Muc2, IL-6 and TNF- α in intestinal mucosa. **Results** On the 1st, 3rd, and 5th days after burn, compared with the control group (SRC-3^{+/+} mice), the serum FITC-dextran concentration [(1 156.21 $\pm$ 107.65) μ g/L vs. (685.14 $\pm$ 79.36) μ g/L, (1 425.81 $\pm$ 115.36) μ g/L vs. (743.72 $\pm$ 82.29) μ g/L, (1 613.27 $\pm$ 120.94) μ g/L vs. (824.35 $\pm$ 85.44) μ g/L], plasma DAO activity, level of ET, intestinal mucosal injury score, the number of PAS⁺ goblet cells, the levels of IL-6 and TNF- α in serum and intestinal mucosa of SRC-3^{-/-} mice in the experimental group were obviously increased, the number of AB⁺ goblet cells and the expression level of Muc2 in intestinal mucosa were obviously decreased ($P<0.05$). **Conclusion** SRC-3 deletion can impair the differentiation and maturation of goblet cells after severe burn, reduce the synthesis and secretion of intestinal mucus, and aggravate the dysfunction of intestinal mucosal barrier.

Keywords Burns; Steroid receptor coactivator-3; Intestinal mucosal barrier function; Goblet cells; Mice

重度烧伤不仅会对皮肤和皮下软组织造成大面积损伤,还会因缺血、缺氧、炎症等多个器官造成损害,而肠道是烧伤后最易受到损伤的器官之一^[1]。严重烧伤后,全身血液灌注重新分布,肠道缺血缺氧,肠黏膜上皮屏障破坏,肠道细菌易位,内毒素进入血液,可导致肠道内毒素血症,甚至败血症和多器官功能障碍^[2-3]。因此,保护肠黏膜屏障功能可能是提高严重烧伤后存活率的有效方法。

类固醇受体辅活化子-3(steroid receptor coactivator-3, SRC-3)是一种转录共激活因子, SRC-3在肠道稳态中具有重要作用。据报道, SRC-3可通过募集中性粒细胞来增强宿主对肠道细菌的防御^[4];并且 SRC-3可能与严重烧伤后 T 淋巴细胞免疫功能抑制有关^[5]。此外, SRC-3 可以通过抑制炎症和促进结肠杯状细胞分化和成熟,改善溃疡性结肠炎^[6]。然而, SRC-3 在严重烧伤后肠黏膜屏障功能损伤中的生物学作用仍未可知。黏液分泌不足和黏液成分变化引起的肠道黏液层损伤是引起肠道损伤的始发因素之一^[7]。黏液由杯状细胞分泌,可起到阻滞剂的作用,防止细菌、毒素与肠上皮接触^[8]。因此,本研究 2022 年 1—4 月从肠道黏液合成和分泌的角度探讨 SRC-3 在严重烧伤后肠黏膜屏障功能损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级雌性 SRC-3 基因敲除(SRC-3^{-/-})小鼠和野生型(SRC-3^{+/+})小鼠各 36 只, 10~12 周龄, 体重质量范围为 18~23 g, 由美国贝勒医学院分子和细胞生物学实验室提供。在实验开始前将动物在温度 22~25 °C、湿度 60%~65%、12 h 光/暗循环的无病原体环境中适应 1 周。所有的实验方案均符合动物护理和一般动物实验伦理学原则。

1.2 主要试剂及仪器 荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖(FITC-dextran)(60842-46-8)购自美国 MedChemExpress 公司;小鼠内毒素(endotoxin, ET)(ml002005)、二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)(ml002199)、白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6)(ml063159)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)(ml002095)ELISA 检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(G1120)、阿尔新蓝-过碘酸-希夫(Alcian Blue Periodic acid Schiff, AB-PAS)染色试剂盒(G1285)购自北京 Solarbio 公司;兔抗小鼠黏蛋白 2(mucin2, Muc2)抗体(ab272692)、IL-6 抗体(ab208113)、TNF- α 抗体(ab183218)购自英国 Abcam 公司;SRC-3(#2126)购自美国 Cell Signaling Technology 公司。iMark680 多功能酶标仪(美国 Bio-

Rad 公司);BX53 光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 模型的建立 将 SRC-3^{-/-}小鼠($n=36$)作为实验组, SRC-3^{+/+}小鼠($n=36$)作为对照组。所有小鼠均采用 40 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,然后使用电动推剪去除背毛。对照组和实验组小鼠剃毛并固定相当于体表总面积(total body surface area, TBSA)30% 的面积后,将其置于 100 °C 水中 8 s 诱导建立 30% TBSA Ⅲ度烧伤模型^[9]。烧伤后,立即腹腔注射林格氏液(50 mL/kg)进行复苏,皮下注射丁丙诺啡(1 mg/kg)镇痛。

1.4 指标检测

1.4.1 FITC-dextran 灌胃检测肠道通透性 在烧伤后第 1、3、5 天时,每组采用随机数字表法选择 6 只小鼠,以 440 mg/kg 的剂量灌胃 FITC-dextran。4 h 后,取血,静置 30 min 后离心分离血清。通过荧光分光光度法(激发:480 nm,发射:520 nm)测量血清中的荧光强度。然后根据标准曲线计算血清 FITC-dextran 浓度,评估肠道通透性。

1.4.2 ELISA 法检测血清 TNF- α 、IL-6 水平和血浆 DAO 活性以及 ET 水平 在烧伤后的不同时间点,每组采用随机数字表法选择 6 只小鼠,取血并分离血清,通过 ELISA 测量血清 TNF- α 和 IL-6 水平;取部分血样放入普通的肝素抗凝管中,静置后离心,分离血浆,检测血浆中 DAO 活性;另取部分血样放入无热原的 ET 测定专用管中,静置后离心,分离血浆,检测血浆中 ET 水平。

1.4.3 HE 和 AB-PAS 染色评估肠黏膜损伤和杯状细胞黏液分泌情况 取血后,从小鼠身上采集回肠组织样本(长 5 cm)并固定在中性福尔马林溶液(pH 7.4)中。然后石蜡包埋、制备连续切片(5 μ m 厚)。然后将切片脱蜡并用 HE 或 AB-PAS 染色试剂盒染色。在光学显微镜下观察并拍照。HE 染色观察肠黏膜损伤,评分标准如下^[7]:绒毛正常,0 分;绒毛顶部存在囊性空间,毛细血管充血,1 分;绒毛顶端上皮间质增大,中度内皮水肿,2 分;固有层明显水肿,上皮细胞变性坏死,绒毛尖端脱落,3 分;上皮细胞层变性、坏死、脱落、部分绒毛脱落、裸固有层、毛细血管扩张、充血,4 分;绒毛脱落、固有层崩解、出血、溃烂,5 分。AB-PAS 染色评估杯状细胞黏液分泌情况(可反映杯状细胞分化成熟情况),计数染成蓝色和紫红色阳性杯状细胞(AB⁺/PAS⁺细胞)。AB 将酸性黏多糖染成蓝色, PAS 将中性黏多糖染成紫红色。

1.4.4 免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)染色检测 Muc2 的表达 取肠组织石蜡切片,经过脱蜡、水化、抗原修复后,与 3% 过氧化氢(H₂O₂)—

起孵育以灭活内源性过氧化物酶活性。切片在室温下用3%牛血清白蛋白(BSA)封闭1 h,在4℃下与一抗Muc2(1:100)孵育过夜。随后,将切片用PBS洗涤,并在室温下与二抗(山羊抗兔,1:100)孵育1 h。DAB显色,苏木精复染细胞核,光学显微镜下观察肠组织Muc2阳性表达,每张切片采用随机数字表法选择3个视野,用Image Pro Plus 6.0计算平均光密度(mean optical density, MOD)。

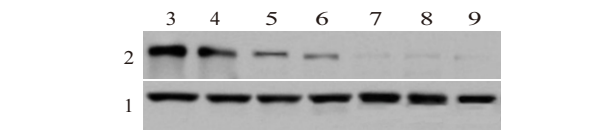
1.4.5 蛋白质印迹法检测肠黏膜中SRC-3、Muc2、IL-6和TNF-α蛋白表达 用含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解缓冲液从肠黏膜中提取总蛋白。通过SDS-PAGE凝胶分离等量的蛋白质提取物,并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。将膜用5%脱脂牛奶封闭后,在4℃下与一抗SRC-3(1:1 000)、Muc2(1:1 000)、IL-6(1:1 000)、TNF-α(1:1 000)和GAPDH(1:5 000)孵育过夜。然后,与相应的二抗(1:5 000)一起孵育1 h。增强化学发光底物(ECL)显色,用Image J软件分析条带灰度值,并以GAPDH为内参蛋白,计算目的蛋白的相对表达。

1.5 统计学方法 采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据比较采用独立样本 t 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SRC-3在烧伤小鼠中的表达变化 与未烧伤SRC-3^{+/+}小鼠相比,在烧伤后第1、3、5天,从SRC-3^{+/+}小鼠肠黏膜组织裂解物中检测到SRC-3蛋白表达呈降低趋势;在SRC-3^{-/-}小鼠的肠黏膜中未检测到SRC-3蛋白。见图1。

2.2 SRC-3缺失对烧伤小鼠肠道通透性的影响 在烧伤后第1、3、5天时,与对照组(SRC-3^{+/+}小鼠)相



注:1—GAPDH;2—SRC-3;3—SRC-3^{+/+}小鼠第0天;4—SRC-3^{+/+}小鼠第1天;5—SRC-3^{+/+}小鼠第3天;6—SRC-3^{+/+}小鼠第5天;7—SRC-3^{-/-}小鼠第1天;8—SRC-3^{-/-}小鼠第3天;9—SRC-3^{-/-}小鼠第5天。

图1 烧伤小鼠肠黏膜中SRC-3蛋白表达

比,实验组SRC-3^{-/-}小鼠血清FITC-dextran浓度显著升高($P<0.05$)。见表1。

表1 两组小鼠血清荧光素异硫氰酸酯-葡聚糖(FITC-dextran)浓度比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	FITC-dextran(μg/L)		
		第1天	第3天	第5天
对照组	6	685.14±79.36	743.72±82.29	824.35±85.44
实验组	6	1 156.21±107.65	1 425.81±115.36	1 613.27±120.94
t 值		8.63	11.79	13.05
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

2.3 SRC-3缺失对烧伤小鼠血浆DAO活性和ET水平的影响 在烧伤后第1、3、5天时,与对照组(SRC-3^{+/+}小鼠)相比,实验组SRC-3^{-/-}小鼠血浆DAO活性和ET水平显著升高($P<0.05$)。见表2。

2.4 SRC-3缺失对烧伤小鼠肠黏膜形态学的影响 HE染色结果显示,对照组SRC-3^{+/+}小鼠在烧伤后第3、5天肠黏膜出现明显损伤,主要表现为绒毛肿胀、黏膜充血水肿、毛细血管充血、炎症细胞浸润。与对照组相比,实验组SRC-3^{-/-}小鼠在烧伤后第1、3、5天肠黏膜病理损伤程度加重,烧伤后第1天肠黏膜水肿、毛细血管充血、绒毛缩短,烧伤后第3、5天绒毛破裂、坏死、脱落、炎症细胞浸润、黏膜下充血、水肿、固有层剥落、绒毛紊乱萎缩,甚至形成浅表溃疡,肠黏膜损伤评分显著升高($P<0.05$)。见图2,表3。

表3 两组小鼠肠黏膜损伤评分比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	肠黏膜损伤评分/分		
		第1天	第3天	第5天
对照组	6	1.38±0.20	2.01±0.24	2.49±0.28
实验组	6	1.95±0.23	2.52±0.29	3.17±0.35
t 值		4.58	3.32	3.72
P 值		0.001	0.008	0.004

2.5 SRC-3缺失对烧伤小鼠肠杯状细胞分化成熟的影响 AB-PAS染色结果显示,在烧伤后第1、3、5天,与对照组(SRC-3^{+/+}小鼠)相比,实验组SRC-3^{-/-}小鼠肠组织中AB⁺杯状细胞的丰度明显降低,PAS⁺杯状细胞数量显著增加($P<0.05$)。见图3,表4。

表2 两组小鼠血浆二胺氧化酶(DAO)活性和内毒素(ET)水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	DAO/(U/mL)			ET/(EU/mL)		
		第1天	第3天	第5天	第1天	第3天	第5天
对照组	6	1.85±0.22	2.09±0.25	2.20±0.27	0.94±0.12	1.30±0.15	1.82±0.23
实验组	6	2.69±0.31	3.12±0.36	3.70±0.39	1.28±0.16	1.79±0.21	2.43±0.28
t 值		5.41	5.76	7.75	4.16	4.65	4.12
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	0.002

表4 两组小鼠肠杯状细胞数量比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	AB ⁺ 杯状细胞数/肠隐窝			PAS ⁺ 杯状细胞数/肠隐窝		
		第1天	第3天	第5天	第1天	第3天	第5天
对照组	6	21.42±2.53	15.80±1.91	10.35±1.74	8.72±1.10	10.45±1.28	13.50±1.46
实验组	6	15.36±1.84	9.24±1.35	4.70±0.62	13.60±1.85	17.08±2.16	22.94±2.51
<i>t</i> 值		4.74	3.87	7.49	5.55	6.47	7.96
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.6 SRC-3 缺失对烧伤小鼠肠黏膜中 Muc2 表达的影响

IHC 染色结果显示,在烧伤后第 1、3、5 天,与对照组(SRC-3^{+/+}小鼠)相比,实验组 SRC-3^{-/-}小鼠肠黏膜中 Muc2 表达水平显著降低($P<0.05$)。见图 4,表 5。

表5 两组小鼠肠黏膜中黏蛋白2(Muc2)表达水平比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	Muc2		
		第1天	第3天	第5天
对照组	6	0.041±0.005	0.030±0.003	0.022±0.003
实验组	6	0.029±0.004	0.018±0.002	0.010±0.001
<i>t</i> 值		4.59	8.15	9.30
<i>P</i> 值		0.001	<0.001	<0.001

2.7 SRC-3 缺失对烧伤小鼠血清 IL-6 和 TNF- α 水平的影响

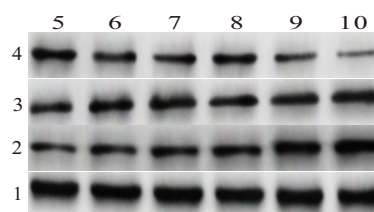
在烧伤后第 1、3、5 天,与对照组(SRC-3^{+/+}小鼠)相比,实验组 SRC-3^{-/-}小鼠血清 IL-6、TNF- α 水平显著升高($P<0.05$)。见表 6。

2.8 SRC-3 缺失对烧伤小鼠肠黏膜中 Muc2、IL-6 和 TNF- α 蛋白表达的影响

在烧伤后第 1、3、5 天, 与对照组 (SRC-3^{+/+} 小鼠) 相比, 实验组 SRC-3^{-/-} 小鼠肠黏膜中 Muc2 蛋白水平显著降低, IL-6、TNF- α 蛋白水平显著升高 ($P < 0.05$)。见图 5、表 7。

3 讨论

肠道对缺血、缺氧和炎症非常敏感,严重烧伤会降低肠道血液灌注,导致肠黏膜结构和功能受



注:1—GAPDH;2—TNF- α ;3—IL-6;4—Muc2;5—对照组第1天;6—对照组第2天;7—对照组第5天;8—实验组第1天;9—实验组第3天;10—实验组第5天。

图5 两组小鼠肠黏膜中Muc2、IL-6和TNF- α 蛋白表达

损,使肠道屏障功能减弱,进而引发严重的全身炎症反应,从而导致多器官损伤^[1]。肠道屏障包括黏液层的化学屏障、上皮细胞层的机械屏障和固有层的免疫屏障^[10]。肠黏膜是负责食物消化吸收的主要部位,其屏障功能也是维持机体环境稳态的核心要素。肠黏膜的完整性是反映肠屏障功能的重要指标^[11]。SRC-3是一种多功能蛋白,在调节细菌脂多糖诱导的炎症^[12]和肠道稳态^[4,6]中起重要作用。已有研究证实,敲除SRC-3基因可能在严重烧伤后增加机体对病原微生物的易感性^[4]。在本研究中,为了确定SRC-3在烧伤中的功能,检查了不同烧伤阶段小鼠肠黏膜中SRC-3的表达。笔者发现与未烧伤SRC-3^{+/+}小鼠相比,在烧伤后第1、3、5天,SRC-3^{+/+}小鼠肠黏膜中SRC-3蛋白表达逐渐降低;而在SRC-3^{-/-}小鼠的肠黏膜中未检测到SRC-3蛋白。此外,与SRC-3^{+/+}小鼠相比,SRC-3^{-/-}小鼠在烧伤后观察到更严

表6 两组小鼠血清白细胞介素6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)比较/(ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-6			TNF- α		
		第1天	第3天	第5天	第1天	第3天	第5天
对照组	6	20.38 $\pm$ 2.76	27.25 $\pm$ 4.31	40.74 $\pm$ 5.20	26.45 $\pm$ 3.51	32.26 $\pm$ 4.73	41.18 $\pm$ 5.06
实验组	6	45.36 $\pm$ 5.42	89.40 $\pm$ 10.68	126.30 $\pm$ 14.19	39.12 $\pm$ 4.82	50.75 $\pm$ 5.64	72.23 $\pm$ 7.40
<i>t</i> 值		10.06	13.22	13.87	5.20	6.15	8.48
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表7 两组小鼠肠黏膜中黏蛋白2(Muc2)、白细胞介素6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)蛋白水平比较/ $\bar{x} \pm s$

[illegible]

重的肠黏膜屏障功能障碍,并产生更多的促炎细胞因子(IL-6、TNF- α)。因此, SRC-3对烧伤诱导的肠黏膜屏障功能可能具有重要保护作用。

烧伤后肠道屏障功能受损可促使细菌和毒素易位,这种易位可引发肠道感染和高肠道代谢,导致预后不良^[13]。ET、DAO是肠道损伤的敏感指标,肠道损伤后血浆ET水平、DAO活性显著升高^[14]。在本研究中,在烧伤后第1天至第5天, SRC-3^{-/-}小鼠的肠道通透性明显高于SRC-3^{+/+}小鼠,同时血浆ET水平、DAO活性均明显升高。用HE染色测定肠黏膜损伤进一步证实了此结果,烧伤后SRC-3^{-/-}小鼠肠黏膜充血水肿,黏膜剥脱、溃烂程度较SRC-3^{+/+}小鼠加重。表明严重烧伤后SRC-3的缺失使肠组织结构受到明显影响,加重了肠道屏障功能损伤。

肠黏液屏障是肠道屏障系统的重要组成部分,由肠黏液组成。肠黏液由杯状细胞分泌,在维持肠黏膜结构和功能中的作用越来越受到重视^[15]。未成熟的杯状细胞主要分泌中性黏液,随着不断分化,唾液酸含量不断增加,酸性黏液含量是杯状细胞成熟的重要指标^[7]。本研究发现,烧伤后SRC-3^{-/-}小鼠酸性黏液的分泌较SRC-3^{+/+}小鼠显著减少,中性黏液的分泌增加。Muc2免疫组化染色和蛋白免疫印迹结果显示,肠道黏液的核心成分黏蛋白Muc2在SRC-3^{-/-}小鼠中的表达水平显著低于SRC-3^{+/+}小鼠。肠黏液层由大约30种核心蛋白组成,包括黏蛋白、抗菌肽和分泌的免疫球蛋白A。其中,由肠杯状细胞在上皮细胞层合成的Muc2是最重要的成分^[16]。Muc2的表达和分泌不足,则Muc2黏液屏障的内层会逐渐变薄并变得可穿透。这时,肠道细菌可以侵入黏液层,与肠上皮细胞层接触,诱发肠道炎症甚至癌变^[17-18]。IL-6、TNF- α 作为促炎递质,在烧伤中广泛释放,已被报道与烧伤患者肠道屏障功能损伤有关^[19]。Chen等^[6]的研究显示,在溃疡性结肠炎小鼠中, SRC-3的缺失减少了Muc2阳性结肠杯状细胞数量,同时促炎细胞因子的产生增加。在本研究中可观察到烧伤后SRC-3^{-/-}小鼠血清和肠黏膜中IL-6、TNF- α 水平较SRC-3^{+/+}小鼠显著升高,与以往的研究结果一致。表明SRC-3的缺失严重损害了杯状细胞的分化和成熟,可能是烧伤诱发肠黏膜屏障功能障碍的病因之一。提示, SRC-3可以减少烧伤对杯状细胞的损伤,促进杯状细胞的分化和成熟。

综上所述, SRC-3缺失可以在严重烧伤后损害杯状细胞的分化成熟,减少肠黏液的合成与分泌,加重肠黏膜屏障功能障碍。本研究表明SRC-3可能是肠黏膜屏障功能的主要调节因子,在保护宿主免

受细菌感染方面发挥着重要作用。因此,如何在烧伤后维持SRC-3的表达进而保护肠黏膜屏障功能,是未来研究的重点。此外, SRC-3如何调控杯状细胞的分化成熟以及SRC-3基因的缺失是否会影响创伤小鼠的自愈能力仍有待探索。

(本文图2~4见插图2-2)

参考文献

- [1] ADILIAGHDAM F, ALMPANI M, GHAREDAGHI MH, et al. Targeting bacterial quorum sensing shows promise in improving intestinal barrier function following burn-site infection [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(5):4057-4066.
- [2] LIU R, WANG SM, GUO SJ, et al. Histone deacetylase inhibitor attenuates intestinal mucosal injury in fatally scalded rats [J]. Ann Transl Med, 2022, 10(2):54-67.
- [3] 周晓倩, 胡华, 周敏, 等. 益生元对烧伤患者肠道菌群及肠黏膜通透性的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(2): 183-187.
- [4] CHEN W, LU X, CHEN Y, et al. Steroid receptor coactivator 3 contributes to host defense against enteric bacteria by recruiting neutrophils via upregulation of CXCL2 expression [J]. J Immunol, 2017, 198(4):1606-1615.
- [5] 李军, 林露, 汪海洋, 等. 类固醇受体辅活化子-3在烧伤后T淋巴细胞功能抑制中的作用[J]. 四川医学, 2014, 35(5): 545-548.
- [6] CHEN W, ZHUO M, LU X, et al. SRC-3 protects intestine from DSS-induced colitis by inhibiting inflammation and promoting goblet cell differentiation through enhancement of KLF4 expression [J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(14):2051-2064.
- [7] WANG ZE, PENG J, WU D, et al. Effects of intestinal trefoil factor on intestinal mucus barrier in burned mice [J]. Am J Transl Res, 2020, 12(11):7187-7198.
- [8] MELHEM H, REGAN-KOMITO D, NIESS JH. Mucins dynamics in physiological and pathological conditions [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(24):13642-13657.
- [9] 王翌华, 张永, 裴敬仲. 虎杖苷对严重烧伤小鼠早期肠损伤及SIRT1/NF- κ B通路的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(5): 566-570.
- [10] CAMILLERI M. What is the leaky gut? Clinical considerations in humans [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2021, 24(5): 473-482.
- [11] HAO W, CHA R, WANG M, et al. Impact of nanomaterials on the intestinal mucosal barrier and its application in treating intestinal diseases [J]. Nanoscale Horiz, 2021, 7(1):6-30.
- [12] CHEN Q, CHEN T, XU Y, et al. Steroid receptor coactivator 3 is required for clearing bacteria and repressing inflammatory response in Escherichia coli-induced septic peritonitis [J]. J Immunol, 2010, 185(9):5444-5452.
- [13] ADILIAGHDAM F, CAVALLARO P, MOHAD V, et al. Targeting the gut to prevent sepsis from a cutaneous burn [J]. JCI Insight, 2020, 5(19):137128-137142.
- [14] WANG ZE, WU D, ZHENG LW, et al. Effects of glutamine on

- intestinal mucus barrier after burn injury[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(11):3833-3846.
- [15] YANG S, YU M. Role of goblet cells in intestinal barrier and mucosal immunity[J]. J Inflamm Res, 2021, 14(1):3171-3183.
- [16] QIN T, YANG J, HUANG D, et al. DOCK4 stimulates MUC2 production through its effect on goblet cell differentiation[J]. J Cell Physiol, 2021, 236(9):6507-6519.
- [17] YAO DB, DAI WL, DONG M, et al. MUC2 and related bacterial factors: therapeutic targets for ulcerative colitis[J]. E Bio Medicine, 2021, 74(1):103751-103758.
- [18] GUNDAMARAJU R, CHONG WC. Consequence of distinctive expression of MUC2 in colorectal cancers: how much is actually bad? [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021, 1876(1):188579-188585.
- [19] ZAHS A, BIRD MD, RAMIREZ L, et al. Anti-IL-6 antibody treatment but not IL-6 knockout improves intestinal barrier function and reduces inflammation after binge ethanol exposure and burn injury[J]. Shock, 2013, 39(4):373-379.
- (收稿日期:2022-06-27,修回日期:2022-08-11)

引用本文:齐雪静,曹辉,赵宇,等.维生素E聚乙二醇琥珀酸酯乳化 α -生育酚琥珀酸酯纳米乳的制备及体外抗肿瘤细胞活性评价[J].安徽医药,2024,28(2):240-245.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2024.02.007.

◇ 药学研究 ◇



维生素E聚乙二醇琥珀酸酯乳化 α -生育酚琥珀酸酯纳米乳的制备及体外抗肿瘤细胞活性评价

齐雪静¹,曹辉¹,赵宇²,张引兰¹

作者单位:¹南京市第二医院、南京中医药大学附属南京医院药学部,江苏 南京210003;

²齐齐哈尔医学院药学院,黑龙江 齐齐哈尔161003

基金项目:黑龙江省省属本科高校基本科研项目(2019-KYYWF-1226)

摘要 **目的** 探索以维生素E聚乙二醇琥珀酸酯(TPGS)做乳化剂,制备 α -生育酚琥珀酸酯纳米乳(T-NE),对纳米乳进行处方优化、制备方法以及制剂学性质考察,并且评价其体外抗肿瘤细胞活性。**方法** 自2022年1—4月,先后通过水滴定法绘制伪三元相图,根据纳米乳区域确定最优处方,再采用乳化蒸发法制备,并对其进行了理化性质评价,包括类型确定、形态学考察、粒径大小和分布、Zeta电位、载药量和稳定性,并通过细胞活力实验(MTT)进行体外抗肿瘤细胞活性评价。**结果** T-NE的最优处方为 α -生育酚琥珀酸酯(α -TOS)、维生素E、TPGS、聚乙二醇400质量比1:1:2:1;所制得T-NE为O/W型,外观呈类球形且无粘连;载药量为 (20.15 ± 1.91) g/L,粒径为 (258.8 ± 3.48) nm,多分散指数(PDI)为 0.136 ± 0.03 ,Zeta电位值为 (-27.0 ± 0.46) mV;4℃和25℃条件下放置稳定性良好,且适宜室温长期贮存;与游离的 α -TOS药物溶液相比,T-NE对人乳腺癌细胞系(MCF-7)及人卵巢癌细胞系(A2780)细胞具有更强的抑制作用,IC₅₀值分别为16.68 μ mol/L和7.50 μ mol/L,且空白纳米乳基本无毒性作用。**结论** 该实验制备的T-NE外观均一呈类球形,粒径较小且分布均匀,载药量高稳定性好,同时表现出比游离 α -TOS更为优异的抗肿瘤细胞活性作用,具有良好的开发前景。

关键词 α -生育酚; 纳米复合物; 维生素E聚乙二醇琥珀酸酯; 纳米乳; 体外抗肿瘤

Preparation of α -tocopherol succinate nanoemulsion emulsified with TPGS and evaluation of its *in vitro* anticancer effect

QI Xuejing¹, CAO Hui¹, ZHAO Yu², ZHANG Yinlan¹

Author Affiliations:¹Department of Pharmacy, the Second Hospital of Nanjing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210003, China;²School of Pharmacy of Qiqihar Medical College, Qiqihar, Heilongjiang 161003, China

Abstract **Object** To explore the preparation of α -tocopherol succinate nanoemulsion (T-NE) emulsified with tocopherol polyethylene glycol succinate (TPGS), and investigate the formulation optimization, preparation method and pharmacological properties of nanoemulsion, and evaluate its antitumor cell activity *in vitro*. **Methods** From January to April 2022, The pseudo-ternary phase diagrams were drawn with water titration method, then the optimal prescription could be determined according to nanoemulsion region. T-NE was prepared by emulsion-evaporation method. The physicochemical properties were evaluated, including type determination, morphologi-