

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.03.003

❖ 基础研究 ❖

# 马钱苷对严重烧伤大鼠肠道屏障的保护作用机制研究

温海玲<sup>1</sup>, 杨景哲<sup>1</sup>, 孟祥熙<sup>1</sup>, 张祥云<sup>2</sup>

(1. 承德医学院附属医院南院区烧伤整形科; 2. 河北省军区承德离休干部休养所门诊部, 河北承德 067000)

**【摘要】目的:** 探讨马钱苷对严重烧伤大鼠肠道屏障的保护作用及分子机制。**方法:** 将 30 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组、烧伤组与马钱苷组, 每组各 10 只。将烧伤组及马钱苷组大鼠背部造成 30% TBSA III 度烧伤, 将对照组大鼠模拟致假烧伤。马钱苷组大鼠予以 5 mg 马钱苷灌胃, 对照组、烧伤组均予以等量生理盐水灌胃, 1 次/d, 持续 7 d。给药结束后, 采集大鼠门静脉血, 采用异硫氰酸荧光素 (FITC)-葡萄糖荧光探踪法检测肠道通透性; 采用蛋白印迹法检测大鼠肠黏膜组织白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、IL-6 蛋白表达水平, 并检测大鼠回肠组织沉默调节蛋白 1 (SIRT1)、核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 蛋白表达水平。**结果:** 与对照组比较, 烧伤组、马钱苷组肠道通透性均增高 ( $P < 0.05$ ), 但马钱苷组低于烧伤组 ( $P < 0.05$ ); 烧伤组、马钱苷组肠黏膜 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平增高 ( $P < 0.05$ ), 但马钱苷组肠低于烧伤组 ( $P < 0.05$ )。与对照组比较, 烧伤组和马钱苷组回肠组织 SIRT1 表达水平下降 ( $P < 0.05$ ), NF- $\kappa$ B p65 表达水平增高 ( $P < 0.05$ ), 但与烧伤组比较, 马钱苷组回肠组织 SIRT1 表达水平增高 ( $P < 0.05$ ), NF- $\kappa$ B p65 表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 马钱苷对严重烧伤大鼠肠道屏障具有保护作用, 其机制可能与介导 SIRT1/NF- $\kappa$ B 信号通路、抑制炎症反应有关。

**【关键词】** 烧伤; 肠道屏障; 肠道通透性; 马钱苷; 炎症

**【中图分类号】** R644 **【文献标志码】** A

## Protective effect and mechanism of loganin on intestinal barrier in severely burned rats

WEN Hai-ling<sup>1</sup>, YANG Jing-zhe<sup>1</sup>, MENG Xiang-xi<sup>1</sup>, ZHANG Xiang-yun<sup>2</sup>

(1. Department of Burn and Plastic Surgery, South District Hospital, Affiliated Hospital of Chengde Medical University; 2. Department of Outpatient, Hebei Military Region Chengde Retired Cadres Rest Center, Chengde 067000, Hebei, China)

**【Abstract】Objective:** To investigate the protective effect of loganin on intestinal barrier in severely burned rats and explore the possible molecular mechanism. **Methods:** 30 male SD rats were randomly divided into control group, burn group and loganin group, with 10 rats in each group. The rats in the burn group and loganin group were subjected to 30% TBSA III degree burn on the back, and the rats in the control group were subjected to sham burn. The rats in the loganin group were intragastrically administered with 5 mg loganin by gavage, the other two groups were given the same amount of normal saline by gavage, once daily for 7 days. After administration, the portal vein blood of mice was collected, and the intestinal permeability was detected by fluorescein isothiocyanate (FITC)-glucose fluorescence diagnostic tracer method. Western blotting was used to detect the expression of interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6 in rat intestinal mucosa, and the expression of silent information regulator1 (SIRT1) and nuclear transcription factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 in rat ileum tissue. **Results:** Compared with the control group, the intestinal permeability of burn group and loganin group increased ( $P < 0.05$ ), the intestinal permeability of the loganin group was lower than that of the burn group ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 in intestinal mucosa of the burn group and loganin group increased ( $P < 0.05$ ), and the loganin group was lower than the burn group ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the expression of SIRT1 in ileal tissues of burn group and loganin group decreased ( $P < 0.05$ ), and the expression of NF- $\kappa$ B p65 increased ( $P < 0.05$ ). Compared with burn group, the expression of SIRT1 in ileal tissue of loganin group increased ( $P < 0.05$ ), and the expression of NF- $\kappa$ B p65 decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Loganin has protective effect on intestinal barrier in severely burned rats, and its mechanism may be related to mediating SIRT1/NF- $\kappa$ B signaling pathway and inhibiting inflammatory response.

**【Key words】** Burn; Intestinal barrier; Intestinal permeability; Loganin; Inflammation

肠道作为人体重要的组织器官, 其屏障功能完整性对于机体环境稳态尤为关键。严重烧伤后的肠

基金项目: 河北省承德市科学技术研究与发展计划项目 (202006A165)

作者简介: 温海玲 (1978 - ), 女, 主治医师。E-mail: wenhailingdoc@163.com

通讯作者: 杨景哲。E-mail: 13653247707@163.com

黏膜炎症反应及缺血缺氧损伤,可致使肠道屏障功能损伤,肠道通透性增加,引起肠腔内细菌和内毒素发生移位,进而导致脓毒症甚至多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)<sup>[1-2]</sup>。因此,肠道是严重烧伤后继发性应激损伤的关键部位。对于严重烧伤的干预,肠黏膜损伤及屏障功能的恢复至关重要。马钱苷是从山茶萜分离获得的一种环烯醚萜类糖苷,具有抗炎、抗氧化、免疫调节等多重作用<sup>[3]</sup>,且其对于脑缺血再灌注损伤具有保护作用,能够减少神经元凋亡<sup>[4]</sup>,减轻肾损伤<sup>[5]</sup>。但马钱苷在严重烧伤中的应用报道较少,其对肠道屏障功能是否能够发挥保护作用仍未清晰。本研究拟构建严重烧伤大鼠模型,探讨马钱苷对烧伤后肠道损伤的保护作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物、试剂及仪器

马钱苷购于上海源叶生物科技有限公司(批号 18524-94-2);组织细胞裂解液购于美国 Sigma 公司;异硫氰酸荧光素(FITC)-葡萄糖购于美国 Sigma 公司;白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )兔源性单克隆抗体购于 Cell Signaling 公司;兔源性 IL-6 多克隆抗体购于美国 Abcam 公司;兔抗鼠沉默调节蛋白 1(SIRT1)及兔抗鼠 NF- $\kappa$ B p65 购于北京百奥莱博科技有限公司;苏木素-伊红染色试剂盒购于上海碧云天生物科技有限公司;光学显微镜购于日本 Nikon 公司;冷冻离心机(型号为 X-22R)购于美国 Beckman 公司;高速离心机(型号为 CR21F)购于日本 Hitachi 公司;多功能读板仪购于美国 Thermo Fisher 公司。

### 1.2 动物分组及处理

本实验获得医院动物伦理委员会审批。健康雄性 BALB/c 大鼠(清洁级)30 只(购于北京维通利华公司),6~8 周龄,体重 200~220 g,经过 1 周的适应性饲养后,随机分为对照组、烧伤组与马钱苷组,每组各 10 只。参照陈琦等<sup>[6]</sup>建模方法构建严重烧伤大鼠模型,3 组大鼠在对左侧下腹部予以皮肤消毒后,均采用 10 g/L 戊巴比妥钠以 30 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉,背部 30% 体表面积(TBSA)剃毛。将烧伤组和马钱苷组大鼠裸露的皮肤沉浸于 100℃ 热水中 10 s,致使大鼠背部 30% TBSA III 度烧伤;将对照组大鼠背部放置到 37℃ 温水中 10 s 模拟假烧伤。于伤口即刻,3 组大鼠均予以乳酸林格液 1.5 mL/kg TBSA 腹腔注射以进行复苏。待大鼠苏醒后,马钱苷组大鼠予以马钱苷(5 mg 马钱苷溶于 1 mL 生理盐水中)50 mg/kg 灌胃,1 次/d,持续 7 d;其余两组予以等量生理盐水灌胃,1 次/d,持续 7 d。

### 1.3 标本采集及指标检测

#### 1.3.1 FITC-葡萄糖荧光探针检测大鼠肠道通透性

干预完成后,对各组大鼠予以戊巴比妥钠 10 g/L 腹腔注射麻醉,切开腹腔。在与回盲部 2 cm 处对回肠实施结扎处理,然后对近端回肠实施结扎操作,通过回肠结扎段予以 20 mg/mL 的 FITC-葡萄糖(采用 pH=7.2,0.1 mmol/L 的 PBS 液配置而成)注射。30 min 后,抽取门静脉血 0.1~0.3 mL,将血标本置于含有肝素的抗凝管中,离心(3 000 r/min,半径 6 cm)10 min。各组大鼠均留取血浆 10  $\mu$ L,并加入 90  $\mu$ L PBS 进行充分混匀,选择 100  $\mu$ L PBS 作为对照,采用 FITC-葡萄糖荧光探诊示踪法进行测定<sup>[7]</sup>:测定血浆荧光强度,采用多功能读板仪进行,用来反映大鼠的肠道通透性。

#### 1.3.2 小肠组织病理形态学观察

取小肠组织,经 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋和切片等处理后,利用苏木素-伊红进行染色,光学显微镜下观察小肠组织病理。

#### 1.3.3 蛋白印迹法检测大鼠肠黏膜组织炎症因子蛋白和回肠组织 SIRT1、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平

采集大鼠 3~5 cm 清洁肠段,采用 PBS 冲净内容物,然后剖开,分别采集肠内的绒毛组织和回肠组织 0.5 g,置入研钵中,予以预冷裂解液添加(按质量比 1:10),再予以冰浴或研磨,提取总蛋白,进行定量。实施凝胶电泳以后,将蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜(湿转法)。室温下,予以脱脂奶粉溶液(50 g/L)予以 45 min 的封闭处理,依次予以兔源性 IL-6、IL-1 $\beta$ 、NF- $\kappa$ B p65、人兔抗鼠 SIRT1 及内参  $\beta$ -Actin 一抗(均为 1:1 000),然后 4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜,进行 4 次处理后,予以山羊抗兔 IgG 二抗(1:1 000),室温孵育 60 min。TBST 洗膜后,显色,使用 Quantity One 4.6.2 软件进行定量分析,以目的蛋白与  $\beta$ -Actin 灰度值之比来表示,结果取 3 次测定结果的平均值。

### 1.4 统计学分析

应用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。肠道通透性、IL-1 $\beta$  蛋白、IL-6 蛋白等均符合正态分布的计量资料描述为( $\bar{x} \pm s$ ),用单因素方差分析进行多组间差异的分析,用 LSD-*t* 检验进一步进行两两之间差异的分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 马钱苷对严重烧伤大鼠肠道通透性的影响

对照组、烧伤组、马钱苷组大鼠肠道通透性分别为(0.91  $\pm$  0.21)、(2.49  $\pm$  0.46)、(1.26  $\pm$  0.23),各组组间比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与对

对照组比较,烧伤组、马钱苷组肠道通透性增高( $P < 0.05$ ),但马钱苷组低于烧伤组( $P < 0.05$ )。

## 2.2 马钱苷对严重烧伤大鼠小肠黏膜病理变化的影响

对照组大鼠小肠黏膜组织未见充血、水肿等变

化,上皮结构完整。烧伤组小肠黏膜受损明显,可见区域充血、水肿,肠绒毛萎缩,伴有明显炎性细胞浸润。马钱苷组也存在水肿、充血等表现,但相比烧伤组较轻,炎症细胞浸润减少,组织结构相对完整。见图1。



图1 马钱苷对严重烧伤大鼠小肠黏膜组织病理变化的影响(HE×200)

A. 对照组;B. 烧伤组;C. 马钱苷组。

## 2.3 马钱苷对各组大鼠肠组织相关蛋白表达水平的影响

与对照组比较,烧伤组、马钱苷组肠黏膜 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平均增高( $P < 0.05$ ),SIRT1 表达水平下降( $P < 0.05$ );与烧伤组比较,马钱苷组肠黏膜 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白降低( $P < 0.05$ ),SIRT1 表达增高( $P < 0.05$ )。见表1及图2。

表1 各组大鼠肠黏膜 IL-1 $\beta$  和 IL-6、肠组织 SIRT1 和 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-1 $\beta$	IL-6	SIRT1	NF- $\kappa$ B p65
对照组(n=10)	0.39 $\pm$ 0.12	0.51 $\pm$ 0.12	1.02 $\pm$ 0.14	0.19 $\pm$ 0.05
烧伤组(n=10)	1.08 $\pm$ 0.14*	1.17 $\pm$ 0.15*	0.18 $\pm$ 0.05*	1.03 $\pm$ 0.16*
马钱苷组(n=10)	0.76 $\pm$ 0.11**	0.90 $\pm$ 0.08**	0.41 $\pm$ 0.09**	0.64 $\pm$ 0.10**
F值	34.152	46.874	29.587	39.781
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

\* $P < 0.05$ ,与对照组比较;# $P < 0.05$ ,与烧伤组比较。

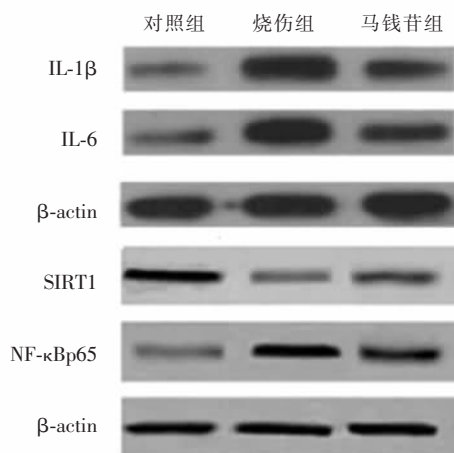


图2 蛋白印迹法检测肠组织相关蛋白表达水平

## 3 讨论

肠黏膜损伤及屏障功能恢复对于严重烧伤并发感染的防治和预后的改善至关重要<sup>[8]</sup>。从山茱萸中分离得到马钱苷属环烯醚萜类糖苷,生物功能多样,包括抗炎、调节血糖、调节免疫、抗肿瘤、促进 IL-2 生成等作用<sup>[9]</sup>。马钱苷对于氧化应激所介导的细胞凋亡有抑制作用,进而发挥良好的抗氧化和抑制炎症反应的能力<sup>[10]</sup>。炎症介质的释放是烧伤后机体全身炎症反应综合征(SIRS)的始动因素,也是烧伤后肠道损伤及其并发症发生发展的核心环节<sup>[11]</sup>。

肠道通透性是屏障功能密切相关的指标,可反映肠黏膜屏障功能<sup>[12]</sup>。本研究显示,烧伤组、马钱苷组肠道通透性均高于对照组,且马钱苷组肠道通透性低于烧伤组,提示严重烧伤大鼠存在肠道通透性的增强,而马钱苷能够抑制这种增强,对烧伤后肠道屏障功能有保护作用,可减轻肠黏膜损伤。

肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、IL-6 等多种促炎因子的释放量增多,可损害肠上皮屏障功能<sup>[13-14]</sup>,影响肠上皮细胞紧密连接蛋白的表达并干扰其分布,进而引起肠上皮屏障功能损害,使肠通透性增强<sup>[15-16]</sup>。马钱苷为山茱萸提取物有效成分之一,能够抑制脓毒症大鼠炎症反应,从而发挥肝损伤保护作用<sup>[17]</sup>。马钱苷能够减轻糖基化终末产物所致肾小球足细胞损伤,抑制炎症细胞因子分泌是其作用机制<sup>[18]</sup>。本研究表明,严重烧伤大鼠肠黏膜 IL-1 $\beta$ 、IL-6 蛋白表达量显著增高,而马钱苷能够抑制烧伤大鼠 IL-1 $\beta$ 、IL-6 蛋白表达量,提示马钱苷可能通过抑制肠黏膜炎症反应对肠道屏障功能发挥保护作用。

SIRT1/NF- $\kappa$ B 信号通路与多种炎症反应相关,

SIRT1 活化可抑制 NF- $\kappa$ B p65 炎症信号通路,使得 IL-1 $\beta$ 、IL-6 等表达水平下调,从而缓解炎症反应,保护烧伤大鼠肾功能<sup>[19]</sup>。NF- $\kappa$ B p65 参与了烧伤大鼠早期肠损伤过程,抑制 NF- $\kappa$ B p65 表达有助于减轻炎症反应,缓解烧伤大鼠肠损伤症状<sup>[20]</sup>。本研究表明,经过马钱苷干预后,烧伤大鼠 SIRT1 蛋白表达增高,而 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达降低,提示马钱苷干预可活化 SIRT1,可能是通过该信号通路发挥抗炎作用的。

综上,马钱苷可能通过介导 SIRT1/NF- $\kappa$ B 信号通路,抑制炎症反应,从而缓解严重烧伤大鼠肠黏膜损伤,发挥肠道屏障功能保护作用。

### 参考文献

[1] He W, Wang Y, Wang P, *et al.* Intestinal barrier dysfunction in severe burn injury[J]. *Burns & Trauma*, 2019, 7(1): 11 - 24.

[2] Olivares-Villagomez D, Van LK. Intestinal intraepithelial lymphocytes; Sentinels of the mucosal barrier[J]. *Trends in Immunology*, 2017, 39(4): 264 - 275.

[3] 胡家铭, 陈权, 肖鲁伟, 等. 马钱苷药理学作用及机制研究进展[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 26(8): 1206 - 1209.

[4] 应夏丽, 王晓玲, 陈妍月, 等. 马钱苷对小鼠脑缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[J]. *中国中医药科技*, 2021, 28(6): 888 - 893.

[5] 吕兴, 许惠琴, 吕高虹, 等. AGEs/RAGE/SphK1 信号通路介导马钱苷抗 AGEs 损伤 GMCs 的机制研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2017, 33(4): 382 - 385.

[6] 陈琦, 杨红明. 重度烧伤小鼠脾脏凝溶胶蛋白含量和 mRNA 表达及 T 淋巴细胞增殖活性的变化[J]. *中华烧伤杂志*, 2017, 33(8): 481 - 485.

[7] 张玮, 李华南, 骆雄飞, 等. 腹部推拿对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝大鼠肠道黏膜通透性的干预作用[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(4): 1740 - 1743.

[8] Carter SR, Zahs A, Palmer JL, *et al.* Intestinal barrier disruption as

a cause of mortality in combined radiation and burn injury[J]. *Shock*, 2013, 40(4): 281 - 289.

[9] 易赛妮, 张文娇, 李良远, 等. 马钱子苷对小胶质细胞活化的抑制作用[J]. *山东科学*, 2021, 34(5): 34 - 41.

[10] 张进强, 易赛妮, 申琳敏, 等. 马钱子苷对神经干细胞的增殖、存活和分化的调节作用[J]. *山东科学*, 2021, 34(5): 8 - 15.

[11] 娄家祺, 厉晔, 崔庆伟, 等. 胰岛素强化治疗联合谷氨酰胺对严重烧伤患者营养代谢和炎症反应及血流动力学影响的前瞻性随机对照研究[J]. *中华烧伤杂志*, 2021, 37(9): 821 - 830.

[12] 孔灿, 徐鹏远. 肠屏障功能受损评估指标的研究进展[J]. *医学综述*, 2017, 23(17): 3348 - 3353.

[13] Capaldo CT, Nusrat A. Cytokine regulation of tight junctions[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1788(4): 864 - 871.

[14] 樊钧豪, 孙义方, 伍国胜, 等. 基于改良全身炎症反应综合征评分建立的联合预测模型对大面积烧伤患者入院早期死亡风险的预测价值[J]. *中华烧伤杂志*, 2020, 36(1): 42 - 47.

[15] Haines RJ, Beard RS, Chen L, *et al.* Interleukin-1 $\beta$  mediates  $\beta$ -catenin-driven downregulation of claudin-3 and barrier dysfunction in Caco2 cells[J]. *Digestive Diseases*, 2016, 61(8): 2252 - 2261.

[16] Haines RJ, Beard RS, Eitner RA, *et al.* TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$  mediated intestinal epithelial barrier dysfunction is attenuated by microRNA-93 downregulation of PTK6 in mouse colonic epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0154351.

[17] 邵琰, 牟微娜, 俞莹莹. 山茱萸提取物经 COX-2/Nrf2 信号通路对脓毒症模型大鼠肝损伤的改善作用[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2021, 31(4): 308 - 313.

[18] 戴国英, 吕兴, 许惠琴, 等. 马钱苷对糖基化终末产物致肾系膜细胞内质网应激的保护作用机制[J]. *中草药*, 2016, 47(21): 3848 - 3853.

[19] 白晓智, 何亭, 刘洋, 等. 活化沉默信息调节因子 1 对大鼠严重烧伤早期肾损害的影响[J]. *中华烧伤杂志*, 2017, 33(6): 344 - 348.

[20] 王墨华, 张永, 裴敬仲. 虎杖苷对严重烧伤小鼠早期肠损伤及 SIRT1/NF- $\kappa$ B 通路的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(5): 566 - 571.

(收稿日期: 2022 - 09 - 29

修回日期: 2022 - 10 - 24)