

HIF-1 α 激动剂或拮抗剂对脓毒症大鼠肠道黏膜通透性的影响

王玉龙^{1,2}, 滕文彬¹, 单跃², 姚刘旭², 何锐², 李玉红^{3*}, 祝胜美^{1*}

(1. 浙江大学医学院附属第一医院 麻醉科, 浙江 杭州 310000; 2. 绍兴市人民医院 麻醉科, 浙江 绍兴 312000;
3. 树人大学树兰国际医学院附属树兰(杭州)医院 麻醉科, 浙江 杭州 310004)

摘要:目的 探讨脓毒症(sepsis)和HIF-1 α 激动或拮抗剂对肠道黏膜屏障(IMB)功能的影响。方法 将SD大鼠随机分假手术组(sham)、sepsis组[sepsis,用盲肠结扎穿孔(CLP)建立sepsis模型]、(sepsis+HIF-1 α 激动剂)/(sepsis + DMOG)组[CLP术前连续7 d腹腔注射HIF-1 α 激动剂DMOG(40 mg/kg)]、(sepsis+HIF-1 α 拮抗剂)/(sepsis + BAY 87-2243)组, [CLP术前连续3 d口服灌胃HIF-1 α 抑制剂BAY87-2243(9 mg/kg)],各6只。ELISA检测大鼠血浆肠黏膜通透性标志物二胺氧化酶(DAO)、肠型脂肪酸结合蛋白2(FABP2)、D-乳酸和荧光素标记的右旋糖苷(FD4);HE染色检测大鼠肠黏膜形态学改变;Western blot检测大鼠肠黏膜缺氧诱导因子-1(HIF-1 α)以及紧密连接(TJs)蛋白表达。结果 Sepsis致大鼠肠黏膜病理形态学破坏、通透性增加($P<0.05$)、HIF-1 α 表达上调、TJs表达下调($P<0.05$);加入DMOG能减轻肠黏膜病理损伤、降低肠黏膜通透性($P<0.05$);而大鼠经过BAY87-2243处理得出相反的结果。结论 HIF-1 α 激动剂能明显降低sepsis大鼠肠道黏膜通透性,其抑制剂作用相反。表明脓毒性肠黏膜损伤,HIF-1 α 上调可能对肠黏膜具有保护作用。

关键词: 脓毒症;肠道黏膜通透性;低氧诱导因子 1 α ;DMOG;BAY87-2243

中图分类号:R363 文献标志码:A

Effects of HIF-1 α agonist or inhibitor on intestinal mucosal permeability in rats with sepsis

WANG Yu-long^{1,2}, TENG Wen-bin¹, SHAN Yue², YAO Liu-xu², HE Rui²,
LI Yu-hong^{3*}, ZHU Sheng-mei^{1*}

(1. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310000;
2. Department of Anesthesiology, Shaoxing People's Hospital, Shaoxing 312000; 3. Department of Anesthesiology,
Shulan (Hangzhou) Hospital, Shulan International Medical College, Shuren University, Hangzhou 310004, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of sepsis and HIF-1 α agonist or inhibitor on intestinal mucosal barrier (IBM) function. **Methods** SD rats were randomly divided into four groups with 6 in each as follows: sham operation group (sham), sepsis group treated with cecal ligation and perforation (CLP), (sepsis+HIF-1 α agonist)/(sepsis+DMOG) group receiving intra-peritoneal injection of HIF-1 α agonist DMOG (40 mg/kg) for 7 consecutive days before CLP, (sepsis+HIF-1 α inhibitor)/(sepsis+BAY87-2243) group orally administered with HIF-1 α inhibitor BAY87-2243 (9 mg/kg) for 3 consecutive days before CLP. Plasma intestinal permeability markers of diamine oxidase (DAO), intestinal type fatty acid binding protein 2 (FABP2), D-lactic acid and fluorescein isothiocyanate-dextran (FD4) were detected by ELISA. Morphological changes of intestinal mucosa were detected by HE staining. HIF-1 α and TJs protein expression were detected by Western blot. **Results** Sepsis caused pathological damage, increased permeability ($P<0.05$), up-regulation of HIF-1 α and down-regulation of tight junctions (TJs) expression in intestinal mucosa of rats with sepsis ($P<0.05$); Addition of DMOG alleviated intestinal mucosal pathological damage and decreased intestinal mucosal per-

收稿日期:2020-10-09 修回日期:2020-12-31

基金项目:浙江省科学技术厅公益项目(LY21H150001、LGF19H030011);浙江省医药卫生科技计划项目(2020KY329,2019306157)

*通信作者(corresponding author):Yuh_li@zju.edu.cn; smzhu20088@zju.edu.cn

meability ($P < 0.05$); While rats treated with BAY87-2243 showed the opposite result. **Conclusions** HIF-1 α agonist can significantly reduce intestinal mucosal permeability in sepsis, and this effect is significantly counteracted by its inhibitor. It is suggested that HIF-1 α upregulation may protect intestinal mucosa against sepsis.

Key words: sepsis; intestinal mucosal permeability; hypoxia inducible factor 1 α ; DMOG; BAY87-2243

脓毒症(sepsis)是机体对感染反应失调导致的危及生命的器官功能障碍^[1],是一个公认的全球健康问题,严重威胁人类生命安全。2017年全球统计数据 displays^[2],sepsis 年发病例 4 890 万例,死亡病例约 110 万例,死亡率为 19.7%;拯救 sepsis 运动指南为临床管理 sepsis 患者提供一些循证医学建议,在 sepsis 发病机制方面仍然存在很多认识空白^[3]。低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)是人体对适应低氧环境的关键转录因子,在急性低氧反应中发挥关键作用^[4]。近年来,肠功能障碍对 sepsis 结局的影响受到研究者重点关注。Sepsis 早期肠上皮细胞低氧能量障碍是肠功能障碍重要诱因,机体可能通过上调 HIF-1 α ,促进能量代谢,改善脓毒性肠道黏膜屏障(intestinal mucosal barrier, IMB)损伤,二甲基乙二酰基甘氨酸(dimethyloxallyl glycine, DMOG)是脯氨酰羟化酶的抑制剂,可以抑制脯氨酰羟化酶从而上调 HIF-1 α 表达;而拮抗剂 BAY87-2243 作用相反,下调 HIF-1 α 表达。本研究旨在探索 HIF-1 α 激动剂 DMOG 或拮抗剂 BAY87-2243 对脓毒症大鼠肠道黏膜通透性作用。为 sepsis 肠道黏膜屏障功能损伤救治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:选择 SPF 级 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 24 只,200~250 g [浙江省医学科学院实验动物中心,许可证号:SCXK (浙)2-14-0001]。研究方案经过绍兴市人民医院动物伦理委员会会议讨论通过(伦理审批文号:2020-009)。

1.1.2 主要试剂和设备:二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)和肠型脂肪酸结合蛋白 2 (intestinal type fatty acid binding protein 2, I-FABP/FABP2)试剂盒(Cloud-Clone 公司);D-乳酸(D-lactic)试剂盒(Abebio 公司);荧光素标记的右旋糖苷(fluorescein isothiocyanate-dextran, FD4)和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) (Sigma-Aldrich 公司); HIF-1 α 、ZO-1

(zonula occludens-1)、occludin、claudin-1 和 GAPDH 一抗(Abcam 公司);二甲基乙二酰基甘氨酸(dimethyloxalylglycine, DMOG)和 BAY87-2243 (MedChemExpress 公司);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG (Jackson 公司)。Spectra-Max Plus 全波长酶标仪(上海美谷分子仪器有限公司);ChemiDoc XRS 凝胶成像系统和 Quantity one 4.6 图像处理与分析系统(Bio-Rad 公司);R510IP 小动物麻醉机(深圳瑞沃德公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物的分组及处理:将大鼠随机数字法分为 sham 组($n=6$)、sepsis 组($n=6$) [用盲肠结扎穿孔(ligation and perforation, CLP)]、(sepsis + DMOG) 组($n=6$) [CLP 术前连续 7 d 腹腔注射 DMOG (40 mg/kg)]、(sepsis+BAY87-2243)组($n=6$) [CLP 术前连续 3 d 灌胃 BAY87-2243 (9 mg/kg)]。

1.2.2 标本的采集与处置:大鼠采用七氟烷麻醉后,分离出 4 cm 小肠,用手术缝线分别结扎肠管两端,将 50 μ g 的 FD4,药物配制浓度为 100 mg/mL,注入肠管内,1 h 后取门静脉 0.5 mL,用于测定 FD4 血浆浓度。之后取腹主动脉血 2 mL,低温离心后分装置于 -80 $^{\circ}$ C 保存,用于检测 DAO、FABP2、D-lactic 血浆浓度。距离盲肠部 2 cm 处取 1 cm 回肠组织数段,部分制成蜡块用于形态学研究;部分分装置于 -80 $^{\circ}$ C 存储,用于检测肠黏膜紧密连接(tight junctions, TJs)和 HIF-1 α 蛋白的表达。随后颈椎脱臼法处死大鼠。

1.2.3 HE 染色检测大鼠肠黏膜形态学变化:常规 HE 染色光镜下观察小肠黏膜形态学改变,采用 Chiu's 评分定量判定小肠组织损伤程度。

1.2.4 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 DAO、FABP2 和 D-lactic 血浆浓度:按照 ELISA 试剂盒说明书检测各标本 DAO、FABP2 和 D-lactic 血浆表达水平。每个样本和标准品均设 3 个复孔,获得酶标仪 450 nm 处吸光值(A),根据吸光值绘制标准曲线,计算各样本 DAO、FABP2 和 D-lactic 的含量,取平均值。

1.2.5 FD4 浓度的测定:解冻后血浆作 1:8 倍稀释,转移到 96 孔板,每个标本做个复孔,每个孔 100 μ L。用荧光酶标仪测定 FD4 血浆浓度。激发波长和发射波长分别设定为 490 nm 和 520 nm。

1.2.6 Western blot 测定小肠黏膜 TJs 和 HIF-1 α 蛋白的表达:具体操作步骤按常规方法进行。

1.3 统计学分析

所有实验数据统计描述采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用单因素方差 (One-way Anova) 分析;组间比较差异有显著性,方差齐性数据使用 LSD 进行两两比较;方差不齐性数据采用 Dunnett T3 检验。数据分析使用 GraphPad Prism (7.0 版本) 统计学软件。

2 结果

2.1 HIF-1 α 激动剂或拮抗剂对 sepsis 大鼠肠黏膜病理形态的影响

Sham 组大鼠肠黏膜完整,绒毛整齐 (图 1A); Sepsis 组膜黏膜完整性破坏,肠绒毛萎缩脱落; (sepsis+DMOG) 组大鼠肠绒毛损伤程度介于 sham 组和 sepsis 组之间;而 (sepsis+BAY87-2243) 组绒毛损

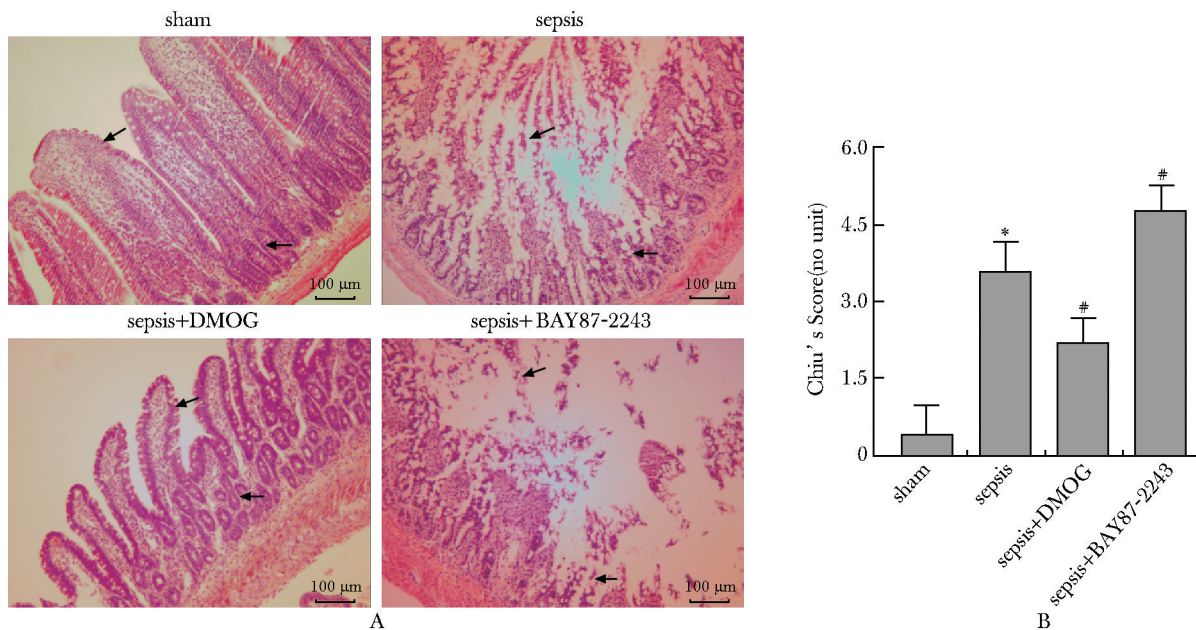
伤比 sepsis 组更严重,甚至出现溃疡。Chiu's 评分与黏膜损伤程度成正比,具体见图 1A, B。

2.2 各组大鼠 DAO、FABP2、D-lactic 和 FD4 血浆浓度的比较

与 sham 组相比,sepsis 组大鼠 DAO、FABP2、D-lactic 和 FD4 血浆浓度均增高 ($P < 0.05$) (图 2A ~ D)。与 sepsis 相比, (sepsis + DMOG) 组 DAO、FABP2、D-lactic 和 FD4 血浆浓度均明显降低 ($P < 0.05$) (图 2A ~ D); (sepsis+BAY87-2243) 组大鼠 DAO、FABP2、D-lactic 和 FD-4 血浆浓度均显著升高 ($P < 0.05$) (图 2A, D)。

2.3 各组大鼠肠黏膜组织 TJs 和 HIF-1 α 表达的比较

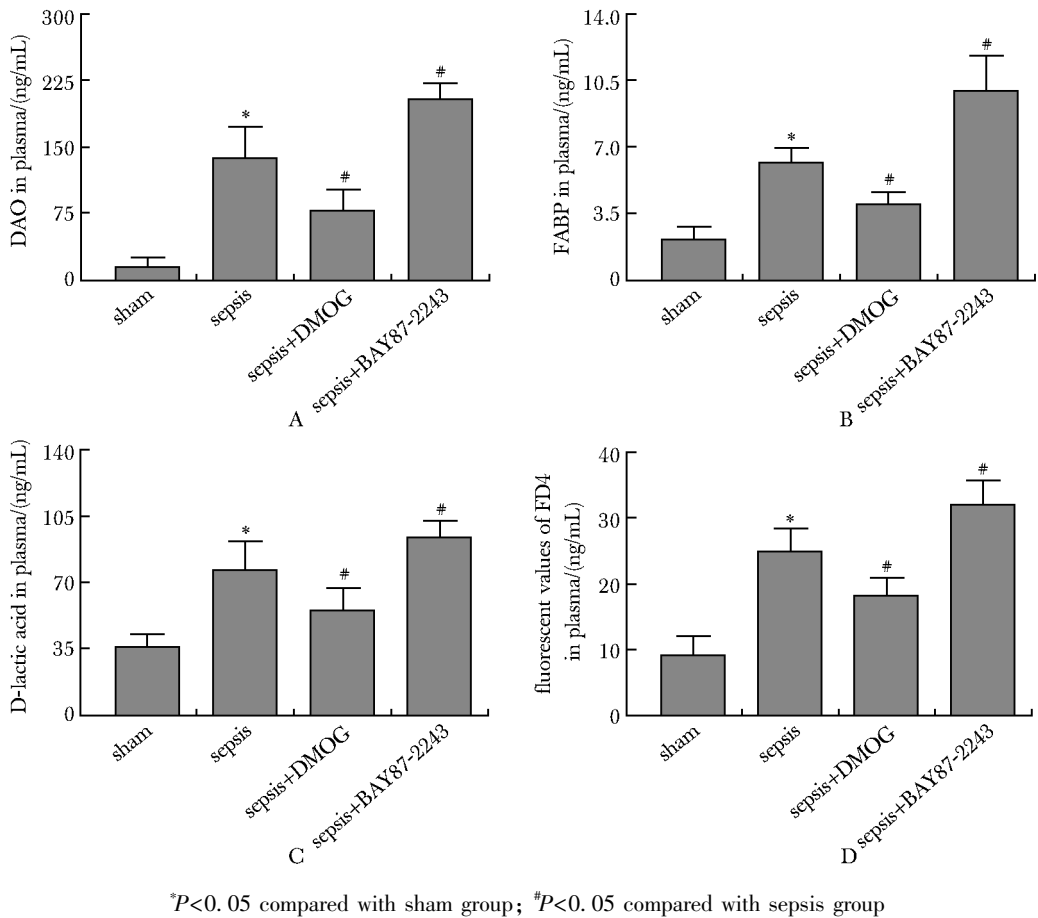
与 sham 组相比,sepsis 组大鼠肠黏膜组织中 HIF-1 α 的表达水平上调 ($P < 0.05$) (图 3A, B), 而 TJs 蛋白 (ZO-1, occludin 和 claudin-1 蛋白) 的表达水平明显下调 ($P < 0.05$) (图 3A, C ~ E)。与 sepsis 相比 (sepsis + DMOG) 组肠黏膜组织中 HIF-1 α 、ZO-1、occludin 和 claudin-1 蛋白的表达均显著上调 ($P < 0.05$); 而 (sepsis+BAY87-2243) 组相反,肠黏膜组织中上述蛋白表达水平均下调 ($P < 0.05$) (图 3, 表 1)。



A. images of intestinal morphology, the pathological status of intestinal mucosal barrier villi and lamina propria in the treated animals was shown at the arrow (HE staining, $\times 200$); B. intestinal mucosa injury was quantitative assessed by Chiu's Score; * $P < 0.05$ compared with sham group; # $P < 0.05$ compared with sepsis group

图 1 HIF-1 α 激动剂或拮抗剂对 sepsis 大鼠肠黏膜病理形态的影响

Fig 1 Effects of HIF-1 α agonist or inhibitor on pathological morphology of intestinal mucosa in septic rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)



* $P < 0.05$ compared with sham group; # $P < 0.05$ compared with sepsis group

图2 HIF-1 α 激动剂或抑制剂对大鼠血浆 DAO (A)、FABP2 (B)、D-lactic (C) 和 FD4 (D) 的影响

Fig 2 Effects of HIF-1 α agonist or inhibitor on the levels of DAO (A), FABP2 (B), D-lactic (C) and fluorescent values of FD-4 (D) in plasma of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3 讨论

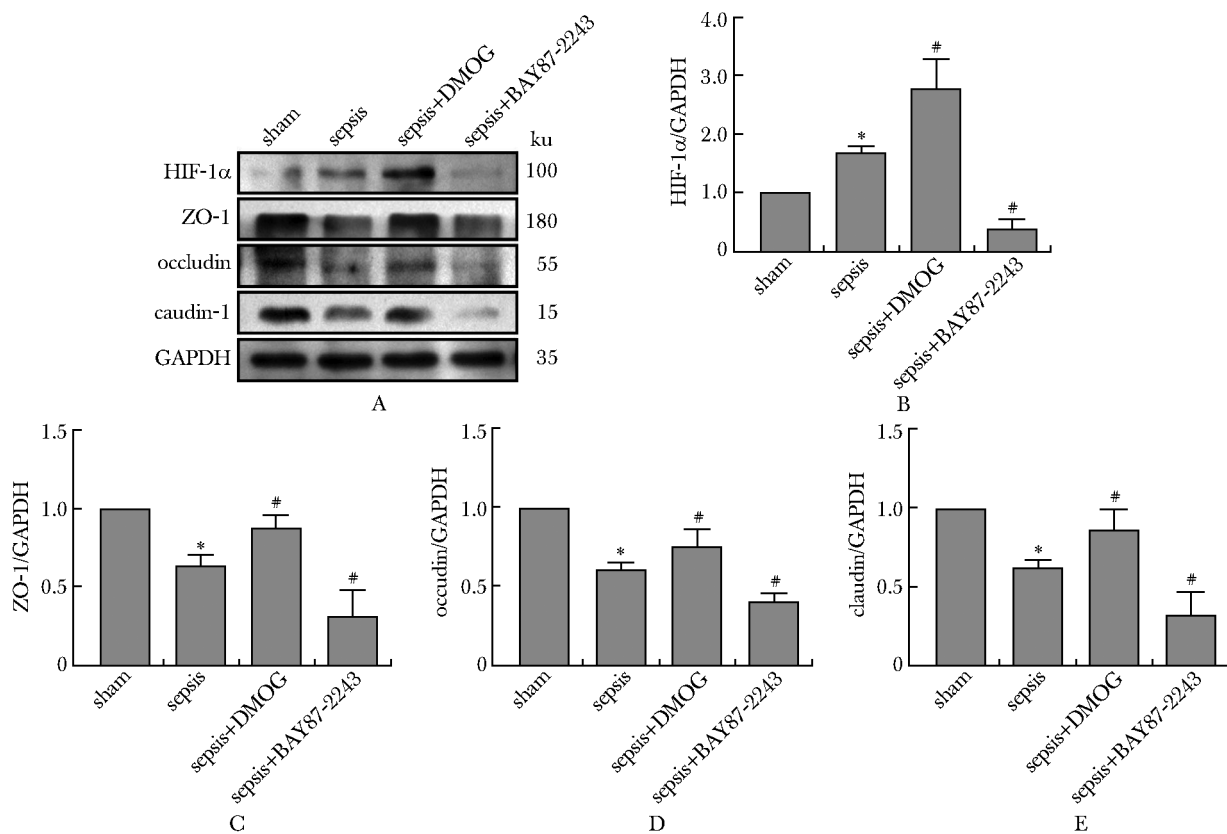
Sepsis 是一种危及生命的临床综合征,可导致自身组织和器官损伤,引起多个器官功能障碍^[1]。危重患者肠道致病菌过度繁殖,肠黏膜受损,细菌毒素进入血液循环,进而发展为全身性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)或多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),因此,肠道是 sepsis 的“启动器官”。Sepsis 中,肠黏膜微循环障碍,肠道黏膜屏障受损;通过肠道-淋巴通路使肠功能衰竭进一步恶化,肠道又是 sepsis 的“中心器官”^[5]。

DAO 和 FABP2 在肠黏膜细胞中表达,肠黏膜损伤细胞脱落时,快速释放进入血液循环,可以作为肠黏膜损伤的特异性标志物^[6]。D-lactic 是肠道细菌的代谢产物,肠黏膜损伤致通透性增加时,D-lactic

入血,哺乳动物不能代谢 D-lactic,因此,血 D-lactic 浓度增加间接反映肠道通透性增加^[6]。FD4 是肠道通透性和肠道屏障改变的标志物^[7]。本研究中,sepsis 大鼠上述血浆标志物均升高,提示 sepsis 导致大鼠肠黏膜损伤,通透性增加。

TJs 是维系细胞间链接与细胞屏障的重要组成部分。Occludin 维持肠道物理特性,具有黏附功能;claudin-1 形成细胞旁离子的选择性通道,影响着细胞间物质渗透率^[8];ZO-1 与多种细胞骨架蛋白绑定,对 TJs 起到支撑骨架作用^[9]。本研究中,sepsis 大鼠肠黏膜组织中 TJs 相关蛋白 ZO-1、occludin、claudin-1 的表达水平下降,病理形态破坏,提示 sepsis 导致大鼠肠黏膜形态结构破坏。

生理状态下,肠上皮细胞暴露于“生理性低氧”环境中,低氧环境是肠道共生菌生存的物质基础,并促进肠道物质运输^[10];炎症反应时,氧耗增加、血管



A. expression bands; B-E. protein expression of HIF-1 α , ZO-1, occludin, and claudin-1; * P <0.05 compared with sham; # P <0.05 compared with sepsis

图3 HIF-1 α 激动剂和拮抗剂对大鼠肠黏膜 HIF-1 α 和 TJ 蛋白表达的影响

Fig 3 Effects of HIF-1 α agonists and inhibitors on the protein expression of HIF-1 α (B) and TJ proteins (C-E) in intestinal mucosa of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

表1 HIF-1 α 激动剂或拮抗剂对大鼠肠黏膜 HIF-1 α 和 TJ 蛋白表达的影响

Table 1 Effects of HIF-1 α agonist or inhibitors on the protein expression of HIF-1 α and TJ proteins in intestinal mucosa of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

protein expression	sham	sepsis	sepsis + DMOG	sepsis + BAY87-2243
Hif-1 α /GAPDH	1.00 \pm 0.00	1.26 \pm 0.04 *	1.64 \pm 0.09#	0.88 \pm 0.17#
ZO-1/GAPDH	1.00 \pm 0.00	0.52 \pm 0.05 *	0.82 \pm 0.05#	0.36 \pm 0.10#
occludin/GAPDH	1.00 \pm 0.00	0.53 \pm 0.06 *	0.78 \pm 0.13#	0.36 \pm 0.03#
claudin/GAPDH	1.00 \pm 0.00	0.65 \pm 0.08 *	0.90 \pm 0.06#	0.46 \pm 0.12#

* P <0.05 compared with sham group; # P <0.05 compared with sepsis group.

收缩导致氧供降低,肠上皮细胞出现缺氧^[11]。本研究中,sepsis 大鼠肠黏膜中 HIF-1 α 表达明显增加,明显高于正常组,提示 sepsis 造成肠黏膜细胞缺氧,黏膜细胞通过自身代偿性 HIF-1 α 的表达上调,以提高对缺氧的耐受并促进增殖维护肠道黏膜屏障的完整。既往研究使用 HIF-1 α 激活剂明显减轻 CLP 引起小鼠肾脏损害^[12]。在结肠炎小鼠中,HIF-1 α 激

活剂 AKB-4924 能增强小鼠肠黏膜屏障功能,但是对 HIF-1 α 缺陷小鼠无肠黏膜保护作用,表明肠黏膜 HIF-1 α 是 AKB-4924 介导保护的靶点^[13]。肠道 HIF-1 α 敲除小鼠加剧肠酒精性肠道黏膜屏障的破坏^[14]。通过敲除和过表达实验发现 HIF 在基因启动子水平上对 claudin-1 的表达起着基本的调节作用,揭示 claudin-1 可能是 HIF 的一个重要靶基

因, HIF 缺陷型肠黏膜 claudin-1 表达异常, 导致 TJs 形态异常^[15]。本研究中给予 sepsis 大鼠 DMOG, sepsis 大鼠肠道 HIF-1 α 和 TJs 相关蛋白的表达上调, 肠道黏膜损伤缓解。而给予 BAY87-2243, 出现 HIF-1 α 和 TJs 相关蛋白表达下调, 肠黏膜损伤缓解加重。

综上所述, sepsis 时大鼠肠道黏膜屏障的结构和功能受到严重破坏, 黏膜细胞通过自身调节

HIF-1 α 表达上调。给予 HIF-1 α 激动剂 DMOG 通过降低肠黏膜通透性, 调节 TJs 中 claudin-1 而发挥保护肠道黏膜屏障作用, 缓解脓毒引起的肠道黏膜屏障损伤作用; 而给予 HIF-1 α 抑制剂 BAY87-2243, 作用相反。结果提示 HIF-1 α 对 sepsis 大鼠通过降低肠黏膜的通透性, 发挥对脓毒症肠黏膜损伤具有保护作用, 具体机制有待于进一步探索。

参考文献:

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315:801-810.
- [2] Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017; analysis for the Global Burden of Disease Study [J]. *Lancet*, 2020, 395:200-211.
- [3] Coopersmith CM, De Backer D, Deutschman CS, *et al.* Surviving sepsis campaign: research priorities for sepsis and septic shock [J]. *Crit Care Med*, 2018, 46:1334-1356.
- [4] Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2 alpha in development and disease [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15: 628-634.
- [5] Arthur CM, Nalbant D, Feldman HA, *et al.* Anemia induces gut inflammation and injury in an animal model of preterm infants [J]. *Transfusion*, 2019, 59:1233-1245.
- [6] Montagnana M, Danese E, Lippi G. Biochemical markers of acute intestinal ischemia: possibilities and limitations [J]. *Ann Transl Med*, 2018, 6:341. doi:10.21037/atm.2018.07.22.
- [7] Bao J, Tan S, Yu W, *et al.* The effect of peritoneal air exposure on intestinal mucosal barrier [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2014, 2014:674875. doi:10.1155/2014/674875.
- [8] Hegyi P, Maleth J, Walters JR, *et al.* Guts and gall: bile acids in regulation of intestinal epithelial function in health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2018, 98: 1983-2023.
- [9] Pawlowska B, Sobieszczanska BM. Intestinal epithelial barrier: the target for pathogenic *Escherichia coli* [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2017, 26:1437-1445.
- [10] Muenchau S, Deutsch R, de Castro IJ, *et al.* Hypoxic environment promotes barrier formation in human intestinal epithelial cells through regulation of microRNA 320a expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2019, 39. pii: e00553-18. doi:10.1128/MCB.00553-18.
- [11] Fitzpatrick SF. Immunometabolism and sepsis: a role for HIF? [J] *Front Mol Biosci*, 2019, 6: 85. doi:10.3389/fmolb.2019.00085.
- [12] Schindler K, Bondeva T, Schindler C, *et al.* Preconditioned suppression of prolyl-hydroxylases attenuates renal injury but increases mortality in septic murine models [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2016, 31:1100-1113.
- [13] Keely S, Campbell EL, Baird AW, *et al.* Contribution of epithelial innate immunity to systemic protection afforded by prolyl hydroxylase inhibition in murine colitis [J]. *Mucosal Immunol*, 2014, 7:114-123.
- [14] Shao T, Zhao C, Li F, *et al.* Intestinal HIF-1 α deletion exacerbates alcoholic liver disease by inducing intestinal dysbiosis and barrier dysfunction [J]. *J Hepatol*, 2018, 69:886-895.
- [15] Saeedi BJ, Kao DJ, Kitzenberg DA, *et al.* HIF-dependent regulation of claudin-1 is central to intestinal epithelial tight junction integrity [J]. *Mol Biol Cell*, 2015, 26: 2252-2262.