

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.32.003

CRISPR/Cas9 介导的 IL-6 基因敲除对结肠癌 SW1116 细胞化疗敏感性的影响^{*}

马 燕^{1,2}, 叶子瑜^{1,2}, 梁艳芳³, 王 斌², 陈莎莎^{1,2},
颜慧敏², 林碧华^{1,2}, 周克元^{1,2}, 梁 统², 曾今诚^{1,2△}

(1. 广东医科大学/广东省医学分子诊断重点实验室, 广东东莞 523808; 2. 广东医科大学/东莞市医学活性分子开发与转化重点实验室, 广东东莞 523808; 3. 广东省东莞市第五人民医院病理科 523900)

[摘要] **目的** 采用成簇的、规律间隔的短回文重复序列/核酸内切酶 9 (CRISPR/Cas9) 基因组编辑技术构建白细胞介素 6 (IL-6) 基因敲除结肠癌 SW1116 细胞系, 探讨其对化疗药物顺铂 (CDDP) 的敏感性。**方法** 采用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术, 构建 IL-6 基因敲除的 SW1116 细胞系; CCK-8 法检测细胞增殖能力; 流式细胞术检测细胞周期及细胞凋亡; Western blot 法检测细胞 IL-6、cyclin E、Bax、Bcl-2、p-STAT3 和 STAT3 表达。**结果** 成功构建了 IL-6^{-/+} SW1116 和 IL-6^{-/-} SW1116 细胞系; IL-6^{-/+} SW1116 和 IL-6^{-/-} SW1116 细胞与野生型 SW1116 细胞相比, 其生长状态、细胞增殖能力、细胞周期及细胞凋亡率均无明显差异 ($P>0.05$); 5 mmol/mL CDDP 干预后, IL-6^{-/-} SW1116 细胞凋亡率明显增加、细胞增殖受到明显抑制、细胞内 Bax 表达明显增高, Bcl-2、p-STAT3 和 STAT3 表达明显降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。**结论** 成功构建了对 CDDP 敏感, 且生长增殖周期稳定的 IL-6^{-/-} SW1116 细胞系, 可为 IL-6 介导的结肠癌化疗耐药机制研究提供实验基础。

[关键词] 结肠肿瘤; 白细胞介素 6; 基因敲除; 化疗敏感性

[中图法分类号] R735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)32-4093-05

Effect of CRISPR/Cas9-mediated IL-6 knockout on chemo-sensitivity in human colorectal cancer SW1116 cell line^{*}

MA Yan^{1,2}, YE Ziyu^{1,2}, LIANG Yanfang³, WANG Bin², CHEN Shasha^{1,2},
YAN Huimin², LIN Bihua^{1,2}, ZHOU Keyuan^{1,2}, LIANG Tong², ZENG Jincheng^{1,2△}

(1. Guangdong Medical University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Diagnostics, Dongguan, Guangdong 523808, China; 2. Guangdong Medical University/Dongguan Key Laboratory of Medical Bioactive Molecular Developmental and Translational Research, Dongguan, Guangdong 523808, China; 3. Department of Pathology, the Fifth People's Hospital of Dongguan, Dongguan, Guangdong 523900, China)

[Abstract] **Objective** IL-6 knockout colorectal cancer SW1116 cell line was constructed using CRISPR/Cas9 genomic editing techniques and the effect on chemo-sensitivity to cisplatin (CDDP) was explored. **Methods** The CRISPR/Cas9 genome editing technique was used to construct the IL-6 knockout SW1116 cell line. The cell proliferation was detected by CCK-8 assay. The cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. The expressions of IL-6, cyclin E, Bax, Bcl-2, p-STAT3 and STAT3 were detected by Western blot. **Results** IL-6^{-/+} SW1116 and IL-6^{-/-} SW1116 cell lines were successfully constructed. Compared with the wild type SW1116 cells, the cell growth status, proliferation, cell cycle and apoptosis rate of IL-6^{-/+} SW1116 and IL-6^{-/-} SW1116 cells showed no significant difference ($P>0.05$). After treated with 5 mmol/mL CDDP, the apoptosis rate of IL-6^{-/-} SW1116 cells increased, the proliferation inhibited, the expressions of Bcl-2, p-STAT3 and STAT3 reduced, but Bax increased, there was statistical significantly difference ($P<0.05$). **Conclusion** IL-6^{-/-} SW1116 cell line that is sensitive to CDDP and stable in growth, is successfully constructed, which provided an experimental basis for the study of drug resistance mechanism of chemotherapy mediated by IL-6.

[Key words] colonic neoplasms; interleukin 6; gene knockout; chemosensitivity

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81500007); 广东省科技计划项目 (2014A020212298); 广东省医学科研基金项目 (A2015206, A2016278, A2016395); 广东省中医药局科研项目 (20151256)。 作者简介: 马燕 (1991—), 在读硕士研究生, 主要从事临床检验诊断学研究。
[△] 通信作者, E-mail: zengjc@gdmu.edu.cn。

结肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,近年来其发病率和病死率均呈上升趋势。虽然早期发现和手术治疗可使很多患者得到根治,但 25% 的病例在初诊时已发生转移,且约 50% 的患者最终发展成为不能切除的转移病例^[1]。对于晚期或复发转移的结肠癌患者,化疗是其主要的治疗手段。然而,化疗后中位肿瘤进展时间(TTP)仍旧很短(6~8 个月),提示结肠癌存在着内在耐药性或获得性耐药^[2]。结肠癌耐药是影响化疗效果和患者预后的重要原因之一,因此,研究结肠癌耐药的发生及其机制是化疗增敏或逆转耐药的基础。白细胞介素 6(IL-6)是一种多细胞来源并具有复杂生物学功能的单链糖蛋白细胞因子,相对分子质量为 26×10^3 ^[3]。IL-6 可参与炎症反应和急性时相反应,调节多种细胞增殖分化,促进造血,并在机体的免疫应答中发挥重要作用^[4]。IL-6 及其受体的异常表达与多种肿瘤的发生、发展及转归关系密切,包括乳腺癌^[5]、膀胱癌^[6]、头颈癌^[7]、肝癌^[8]等。有研究报道,IL-6 与结肠癌的发生、发展有着密切的联系,血浆高水平的 IL-6 往往提示预后不良^[9]。有研究发现,IL-6 可能介导了乳腺癌的顺铂(CDDP)耐药^[5],靶向调节 IL-6 极有可能成为逆转某些肿瘤耐药的新靶点。目前,有关 IL-6 介导结肠癌耐药的机制研究报道不多。本研究采用短回文重复序列/核酸内切酶 9(CRISPR/Cas9)技术构建 IL-6 基因敲除的结肠癌 SW1116 细胞系并评价其生物学活性及探讨其对化疗药物 CDDP 的敏感性,为 IL-6 介导的结肠癌化疗耐药机制研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与细胞株 phU6-sgRNA 骨架质粒购自上海吉凯基因化学技术有限公司,E. coli DH5a 感受态购自天根生化科技有限公司,SW1116 细胞株由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 Oligo 引物购自上海捷瑞生物工程有限公司;Prestained Protein Ladder、限制性内切酶 BsaB I 购自 Thermo 公司;jetPRIME® 试剂购自 Polyolus 公司;T4 DNA Ligase 购自 Fermentas 公司;Tryptone、Yeast Extract 和 Agar Powder 购自 OX-oid 公司;2×Taq Plus Master Mix 购自 Vazyme 公司;Agarose 购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、无内毒素质粒大提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;碘化丙啶(PI)、BCA 蛋白定量试剂盒和 CCK-8 检测试剂盒购自碧云天生物技术研究;APC Annexin V 凋亡检测试剂盒(APC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI)购自 BioLegend 公司;IL-6、Cyclin E、Bax、Bcl-2、p-STAT3、STAT3 和 GAPDH 抗体购自 CST 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与 Lenti-Cas9-sgRNA-EGFP 表达质粒构建 利用 CRISPR 网络工具(<http://crispr.mit.edu>)在人 IL-6 基因的合适位点选择 sgRNA 的靶向序列,设计 3 个不同的 sgRNA,即 IL-6 sgRNA1-3。寡核苷酸序列如下,sgRNA1 上游引物:5'-ACC GCA CTA CTC TCA AAT CTG TTC-3',下游引物:5'-AAA CGA ACA GAT TTG AGA GTA GTG-3';sgRNA2 上游引物:5'-ACC GTT TGT CAA TTC GTT CTG AAG-3',下游引物:5'-AAA CCT TCA GAA CGA ATT GAC AAA-3',sgRNA3 上游引物:5'-ACC GGA ACA GAT TTG AGA GTA GTG-3',下游引物:5'-AAA CCA CTA CTC TCA AAT CTG TTC-3'。在每条 sgRNA 序列正义链的 5' 端添加 ACCG,反义链的 5' 端添加 AAAC,与经 Bsa I 酶切后的 phU6-sgRNA backbone 表达质粒载体形成的黏性末端互补,构建 Lenti-Cas9-sgRNA-EGFP 表达质粒。

1.2.2 细胞转染 转染前将 SW1116 细胞接种至 6 孔板中进行培养,待细胞密度为 70%~80%时,使用转染试剂 jet PRIME® 进行细胞转染(质粒终浓度为 1 μg/mL),以等量空白载体为阴性对照。

1.2.3 基因组 DNA 提取 细胞转染 48 h 后,使用细胞基因组提取试剂盒对各组 SW1116 细胞按照说明书操作步骤提取细胞基因组。

1.2.4 错配酶法(Surveyor)筛选高活性 sgRNA 使用 QI Aquick PCR purification Kit 试剂盒进行 PCR 产物纯化,将回收的产物稀释至 20 mg/L,按照 Surveyor 分析试剂盒说明书步骤进行检测,2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.2.5 IL-6 基因敲除 SW1116 细胞株筛选 为了进一步获得稳定敲除 IL-6 的 SW1116 细胞株,将 Lenti-Cas9-sgRNA-EGFP 质粒转染 SW1116 细胞株 48 h 后,采用有限稀释法将细胞接种至 96 孔板(保证单细胞接种)。待细胞扩增至 6 孔板时,取部分细胞进行传代及保种,剩余细胞提取蛋白质,Western blot 检测 IL-6 表达。

1.2.6 Western blot 法检测蛋白质表达 RIPA 裂解液和 1% 的蛋白酶抑制剂混合液提取细胞总蛋白质,采用 BCA 法测定蛋白质浓度后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),蛋白质上样质量为 50 μg,电泳完成后,依次进行 PVDF 膜转膜、50 g/L 牛奶封闭、洗膜(1×TBST,5 min,3 次)、孵育一抗(4℃过夜)、洗膜、孵育二抗(室温 1 h)、洗膜(1×TBST,5 min,3 次),化学发光法检测蛋白质印记条带。

1.2.7 CCK-8 法检测细胞增殖 消化处理对数期 SW1116、IL-6^{-/+} SW1116、IL-6^{-/-} SW1116 细胞,约 3 000 个/孔接种至 96 孔板,分别于 24、48、72 h 更换新鲜培养基,吸取 10 μL CCK-8 溶液于待测孔,置于

培养箱中培养 2 h,设置酶标仪参数为 450 nm,检测各孔光密度值(OD_{450})。

1.2.8 PI 染色检测细胞周期 培养 SW1116、IL-6^{-/+} SW1116、IL-6^{-/-} SW1116 细胞 48 h,胰酶消化后离心,PBS 清洗 2 次,1 mL 4 ℃ 75%乙醇重悬,固定 12 h。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,200 μ L PBS 重悬细胞,加入 150 μ L Rnase,37 ℃ 孵育 40 min 后加入 200 μ L PI 溶液,4 ℃ 孵育 2 h,流式细胞术(FCM)检测细胞周期。

1.2.9 APC Annexin V-PI 检测细胞凋亡 培养 SW1116、IL-6^{-/+} SW1116、IL-6^{-/-} SW1116 细胞 48 h,胰酶消化细胞后离心,PBS 清洗 2 次,加入 195 μ L Binding buffer 重悬细胞。加入 5 μ L APC Annexin V 混匀,再加入 10 μ L PI 溶液,轻轻混匀。室温避光孵育 15 min,FCM 检测细胞凋亡。

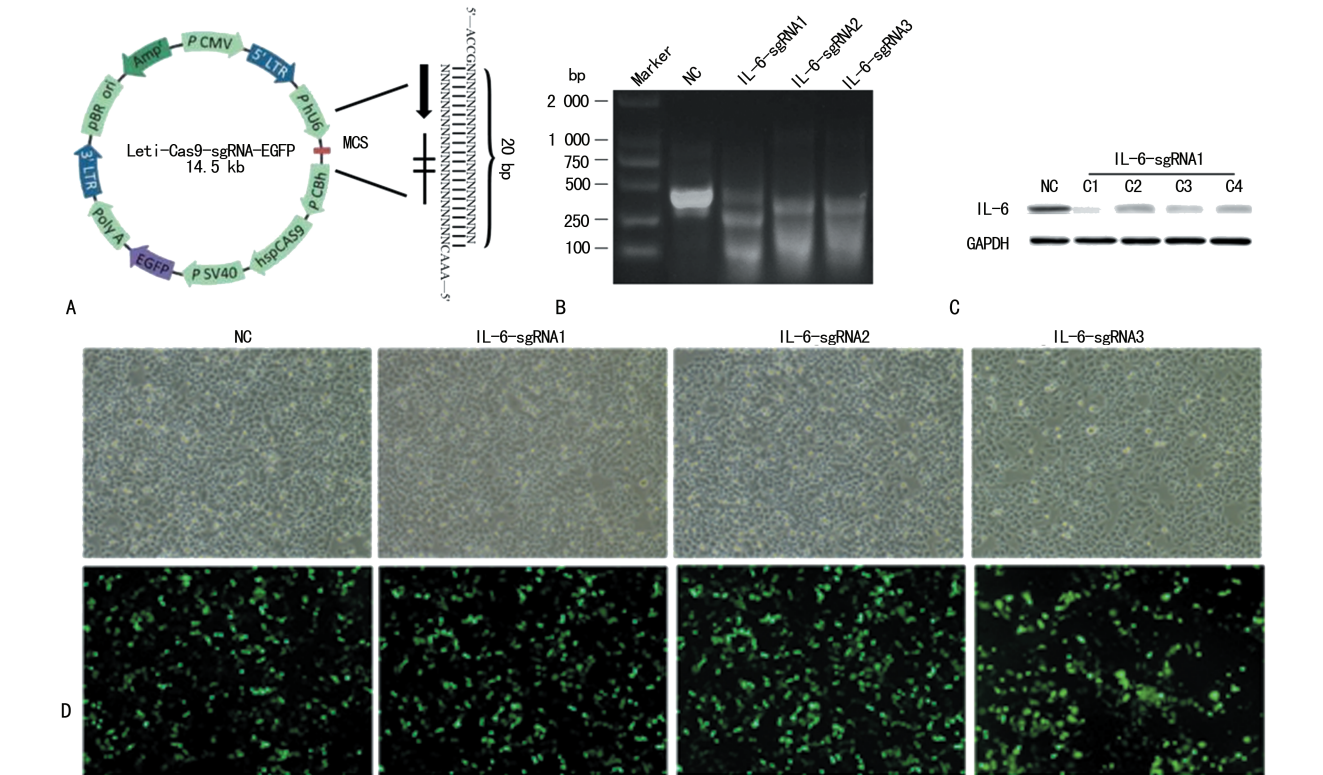
1.2.10 药物敏感性试验 消化处理对数期 SW1116、IL-6^{-/+} SW1116、IL-6^{-/-} SW1116 细胞,将 1×10^4 个/孔细胞接种至 96 孔板,待细胞贴壁后,更换培养基,加入终浓度为 5 mmol/mL 的 CDDP,置于恒温培养箱中继续培养。分别于 24、48、72 h 更换新鲜培养基,吸取 10 μ L CCK-8 溶液于待测孔,置于培养箱中培养 2 h,检测各孔 OD_{450} 。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;

检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

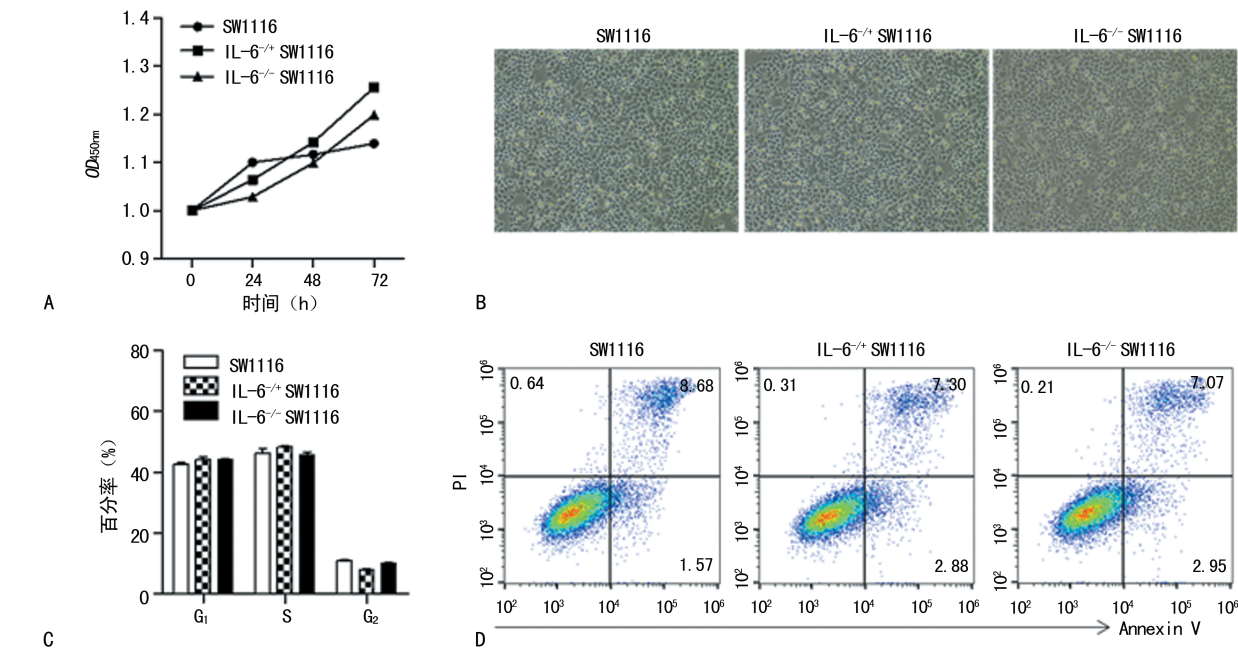
2 结 果

2.1 IL-6 基因敲除 SW1116 细胞株的建立与鉴定 根据 IL-6 基因序列,合成 3 个 sgRNA 寡核苷酸序列 (sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3),将合成的序列分别与 Lenti-Cas9-sgRNA-EGFP 质粒(图 1A)进行重组,分别得到 Lenti-Cas9- IL-6-sgRNA-1-EGFP 质粒、Lenti-Cas9-IL-6-sgRNA-2-EGFP 质粒和 Lenti-Cas9- IL-6-sgRNA-3-EGFP 质粒。采用 QI Aquick PCR purification Kit 试剂盒进行 PCR 产物纯化,将回收产物通过 T7E1 酶切后 2 %琼脂糖凝胶电泳结果显示针对 IL-6-sgRNA-1 有较好的打靶效率(图 1B)。采用有限稀释法将 Lenti-Cas9-IL-6-sgRNA-1-EGFP 质粒转染 SW1116 细胞经过克隆化培养,筛选得到 4 株单克隆细胞株,分别命名 C1、C2、C3、C4,提取细胞蛋白进行 Western blot 检测单克隆细胞 IL-6 表达量(图 1C),结果显示与对照组(NC)相比,C2~4 细胞株表达少量 IL-6,命名为 IL-6^{-/+} SW1116 细胞株,C1 细胞株完全不表达 IL-6,将其命名为 IL-6^{-/-} SW1116 细胞株。质粒转染 SW1116 细胞 48 h 后,荧光显微镜下发现与对照组(NC)相比,转染了 Lenti-Cas9-sgRNA-EGFP 质粒的 SW1116 细胞多表达绿色荧光,表明质粒转染 SW1116 细胞株成功(图 1D)。



A:质粒 Lenti-Cas9-IL-6-sgRNA-EGFP 结构示意图;B:Surveyor 法检测 sgRNA 活性;C:Western blot 检测 IL-6 表达;D:质粒转染 SW1116 细胞(荧光下视野,×10)

图 1 IL-6 基因敲除 SW1116 细胞株的建立与鉴定



A: CCK-8 检测细胞增殖; B: 显微镜下观察细胞状态(×200); C: PI 染色检测细胞周期; D: FCM 检测细胞凋亡

图 2 3 组细胞增殖、周期和凋亡结果

2.2 IL-6^{-/+} SW1116、IL-6^{-/-} SW1116 细胞增殖、周期和凋亡检测结果 与对照组 SW1116 细胞比较, IL-6^{-/+} SW1116、IL-6^{-/-} SW1116 细胞增殖无明显差别(图 2A); 镜下观察三种细胞状态基本一致, 生长良好(图 2B)。细胞周期检测结果显示, SW1116 细胞、IL-6^{-/-} SW1116 和 IL-6^{+/+} SW1116 细胞各期(G₁、S、G₂ 期)细胞数量均无明显差异(图 2C); 细胞凋亡结果显示 IL-6 基因敲除后, SW1116、IL-6^{-/+} SW1116、IL-6^{-/-} SW1116 细胞的凋亡率均无明显差

异(图 2D)。Western blot 结果显示细胞周期蛋白质 Cyclin E 在 SW1116、IL-6^{-/+} SW1116、IL-6^{-/-} SW1116 三种细胞中的表达量比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), 见图 3。

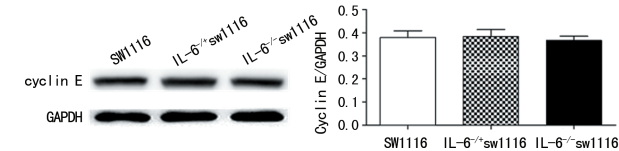
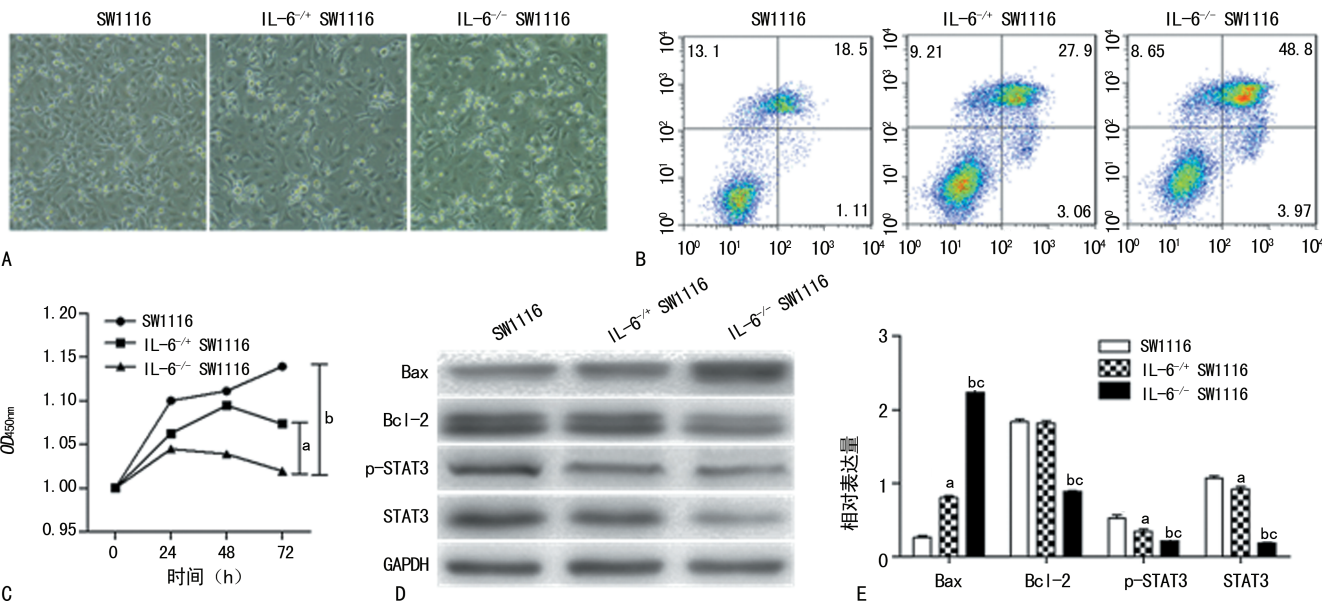


图 3 Western blot 检测 Cyclin E 表达及定量分析



A: 显微镜下观察细胞状态(×200); B: FCM 检测细胞凋亡; C: CCK-8 法检测细胞增殖; D: Western blot 检测 Bax 及 Bcl-2 等表达; E: Bax 及 Bcl-2 等表达定量分析; a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与 SW1116 比较; c: $P<0.01$, 与 IL-6^{-/-} SW1116 比较

图 4 CDDP 干预对 IL-6^{-/-} SW1116 细胞增殖及细胞内 Bax 等表达的影响

2.3 CDDP 干预对 IL-6^{-/-} SW1116 细胞增殖及细胞内 Bax 等表达的影响 与 SW1116 细胞相比, 终浓

度为 5 mmol/mL CDDP 作用 IL-6^{-/+} SW1116 和 IL-6^{-/-} SW1116 细胞 72 h 后,IL-6^{-/-} SW1116 细胞生长状态明显变差(图 4A),细胞凋亡率增加(图 4B),细胞增殖受到明显抑制(图 4C)。Western blot 结果显示 IL-6^{-/-} SW1116 细胞胞内 Bax 表达显著增高,Bcl-2、p-STAT3 和 STAT3 表达显著降低,见图 4D、E。

3 讨 论

CRISPR/Cas9 系统是新近发展起来的、广泛应用于细菌、酵母、动物和植物中的基因组定点编辑技术,具有精确的靶向功能。本研究采用 Lenti-Cas9-sgRNA-EGFP 骨架质粒构建得到 Lenti-Cas9-IL-6-sgRNA-1-EGFP、Lenti-Cas9-IL-6-sgRNA-2-EGFP 和 Lenti-Cas9-IL-6-sgRNA-3-EGFP 重组质粒,并通过转染结肠癌 SW1116 细胞,经筛选鉴定得到一株 IL-6 基因全敲除和 IL-6 基因部分敲除的结肠癌细胞系:IL-6^{-/+} SW1116 和 IL-6^{-/-} SW1116 细胞。该两种细胞除 IL-6 表达受到影响外,其细胞生长状况、细胞增殖能力及细胞周期变化均于野生型 SW1116 无明显差异($P>0.05$),提示 IL-6 基因敲除可能并不影响结肠癌细胞生长增殖。值得注意的是,当采用终浓度为 5 mmol/mL CDDP 分别干预野生型 SW1116、IL-6^{-/+} SW1116 和 IL-6^{-/-} SW1116 细胞 72 h 后,IL-6^{-/-} SW1116 细胞生长状态明显变差,细胞增殖能力受到明显抑制,提示 IL-6^{-/-} SW1116 细胞对 CDDP 敏感性增加。Western blot 检测显示 CDDP 干预后,IL-6^{-/-} SW1116 细胞凋亡相关蛋白 Bax 表达增加,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达减低。

IL-6 是一种多功能、多效性细胞因子,主要由位于肿瘤微环境内的多种细胞类型产生,包括肿瘤浸润免疫细胞、基质细胞和肿瘤细胞本身^[10-11]。IL-6/JAK/STAT3 途径在多种实体肿瘤(如乳腺癌、结肠癌、膀胱癌和头颈癌等)中过度活化,与肿瘤的发生、发展及不良预后密切相关^[7-10]。在肿瘤微环境中,IL-6/JAK/STAT3 信号通路驱动肿瘤细胞增殖、存活、侵袭和转移,且强烈抑制抗肿瘤免疫反应^[12]。IL-6 直接作用于肿瘤细胞以诱导 STAT3 靶基因的表达,促进肿瘤增殖相关蛋白质(如 Cyclin D1、Cyclin E)、血管生成因子(如血管内皮生长因子)、侵袭转移相关蛋白(如基质金属蛋白酶)和免疫抑制因子(如 IL-10 和转化生长因子-β)表达^[12-14]。STAT3 也可促进 IL-6 基因表达,从而形成自分泌反馈环^[14]。STAT3 还促进对常规化疗和放疗及靶向治疗(如西妥昔单抗)的耐药性^[15]。有研究显示通过正反馈回路激活 STAT3 可能是药物处理的癌细胞耐药的主要机制,结果显示外周血高水平 IL-6 与结肠癌患者肿瘤大小、分期和转移相关^[14,16]。作者所在课题组亦发现结肠癌组织高表达 IL-6,且与肿瘤大小、分化程度、转移及化疗耐药等密切相关(结果待报道)。

为了进一步探讨肿瘤源性 IL-6 在结肠癌发生、发

展及耐药中的作用,本研究建立了稳定的 IL-6 基因敲除结肠癌细胞系,结果显示 IL-6 基因敲除结肠癌细胞系对化疗药物 CPPD 敏感性增加,且该过程可能与 STAT3 信号通路受到抑制有关。

综上所述,本研究成功构建了对 CDDP 敏感,且细胞生长、增殖、周期稳定的 IL-6 基因敲除结肠癌 SW1116 细胞系,可为深入探索 IL-6 介导的结肠癌化疗耐药机制提供一定实验基础。

参考文献

- [1] EARLY D S,GRAY D M. Patient attitudes and issues in colon cancer screening[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2014,12(5):673-678.
- [2] SILERI P,D'UGO S,BENAVOLI D,et al. Metachronous splenic metastasis from colonic carcinoma five years after surgery:a case report and literature review[J]. South Med J, 2009,102(7):733-735.
- [3] CHIANG K C,TSUI K H,CHUNG L C,et al. Celestrol blocks interleukin-6 gene expression via downregulation of NF-kappa B in prostate carcinoma cells[J]. PLoS One, 2014,9(3):e93151.
- [4] JORDAN S C,CHOI J,KIM I,et al. Interleukin-6,a cytokine critical to mediation of inflammation,autoimmunity and allograft rejection;therapeutic implications of IL-6 receptor blockade[J]. Transplantation,2017,101(1):32-44.
- [5] ABOU-SHOUSHA S,MOAAZ M,SHETA M,et al. An approach to breast cancer immunotherapy:the apoptotic activity of recombinant Anti-Interleukin-6 monoclonal antibodies in intact tumour microenvironment of breast carcinoma[J]. Scand J Immunol,2016,83(6):427-437.
- [6] CHEN M F,LIN P Y,WU C F,et al. Correction:IL-6 expression regulates tumorigenicity and correlates with prognosis in bladder cancer[J]. PLoS One,2016,11(5):e155774.
- [7] SHKEIR O,ATHANASSIOU M,LAPADATESCU M,et al. In vitro cytokine release profile;Predictive value for metastatic potential in head and neck squamous cell carcinomas[J]. Head Neck,2013,35(11):1542-1550.
- [8] HE G,DHAR D,NAKAGAWA H,et al. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling[J]. Cell,2013,155(2):384-396.
- [9] NAGASAKI T,HARA M,NAKANISHI H,et al. Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis;anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction[J]. Br J Cancer,2014,110(2):469-478.
- [10] GYAMFI J,EOM M,KOO J S,et al. Multifaceted roles of interleukin-6 in Adipocyte-Breast cancer cell interaction[J]. Transl Oncol,2018,11(2):275-285.
- [11] KUMARI N,DWARAKANATH B S,DAS A,et al. Role of interleukin-6 in cancer progression (下转第 4101 页)

跨膜运输及维持细胞的极性^[12]。紧密连接包括 Occludin、周膜蛋白紧密连接蛋白家族和 Claudin 跨膜蛋白家族,Occludin 表达于细胞基侧膜顶端,与其他蛋白构成紧密连接的基本结构,调控上皮细胞的跨上皮电阻和膜转运功能^[13]。ZO-1 则在连接 Occludin 中起桥梁作用,是 Occludin 与细胞内骨架系统连接的关键物质,对肠上皮起稳定作用^[14]。紧密连接表达的改变可能是胆汁淤积时肠黏膜屏障损伤的重要原因^[15]。本实验发现模型组大鼠的小肠组织中 Occludin 和 ZO-1 表达水平较对照组大鼠明显减少,Bc 干预后,大鼠小肠组织中 Occludin 和 ZO-1 表达增加。紧密连接是肠黏膜屏障完整的基础,这提示 Bc 上调大鼠肠黏膜紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 的表达可能是其改善肠黏膜通透性,进而保护肝损伤的关键因素。

综上所述,Bc 可能通过改变肠黏膜通透性、增加紧密连接蛋白表达进而通过肝肠轴对胆汁淤积大鼠肝损伤产生保护作用,然而肝肠之间相互作用复杂,Bc 保护肝损伤的具体机制还有待进一步深入研究。

参考文献

[1] VOLTA U,CAIO G,TOVOLI F,et al. Gut-liver axis;an immune Link between celiac disease and primary biliary cirrhosis[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol,2013,7(3):253-261.

[2] WONG V W,WON G L,CHIM A M,et al. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with probiotics. A proof-of-concept study[J]. Ann Hepatol,2013,12(2):256-262.

[3] LV L X,HU X J,QIAN G R,et al. Administration of lactobacillus salivarius LI01 or pediococcus pentosaceus LI05 improves acute liver injury induced by d-galactosamine in rats[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2014,98(12):5619-5632.

[4] CULLEN J M,FAIOLA B,MELICH D H,et al. Acute Alpha-Naphthylisothiocyanate-induced liver toxicity in germfree and conventional male rats[J]. Toxicol Pathol,2016,44(7):987-997.

[5] 陈蛟,张映林,刘作金. 肝肠轴相关机制研究进展[J]. 现代医药卫生,2014,30(22):3405-3408.

[6] WIEST R,ALBILLOS A,TRAUNER M,et al. Targeting

the gut-liver axis in liver disease[J]. J Hepatol,2017,67(5):1084-1103.

[7] BELL D S. Changes seen in gut bacteria content and distribution with obesity: causation or association? [J]. Postgrad Med,2015,127(8):863-868.

[8] TIAN F W,CHI F F,WANG G,et al. Lactobacillus rhamnosus CCFM1107 treatment ameliorates alcohol-induced liver injury in a mouse model of chronic alcohol feeding[J]. J Microbiol,2015,53(12):856-863.

[9] LI H Z, QIU P, WANG J H, et al. Effects of compound Ginkgo biloba on intestinal permeability in rats with alcohol-induced liver injury[J]. Food Funct,2015,6(2):470-478.

[10] SUN T,GAO G Z,LI R F,et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates oxidative stress and restores intestinal mucosal permeability in chemically induced colitis in mice[J]. Am J Transl Res,2015,7(5):891-901.

[11] MATTY L T, RAMANDEEP S, SUZANNE E G, et al. Measurement of the intestinal permeability in chronic kidney disease[J]. World J Nephrol,2016,5(4):378-388.

[12] CHASIOTIS H, KELLY S P. Effects of elevated circulating cortisol levels on hydromineral status and gill tight junction protein abundance in the stenohaline goldfish [J]. Gen Comp Endocrinol,2012,175(2):277-283.

[13] ABDAYEM R,CALLEJON S,PORTES P,et al. Modulation of transepithelial electric resistance(TEER) in reconstructed human epidermis by excipients known to permeate intestinal tight junctions[J]. Exp Dermatol,2015,24(9):686-691.

[14] YU T,LU X J,LI J Y,et al. Overexpression of miR-429 impairs intestinal barrier function in diabetic mice by down-regulating occludin expression[J]. Cell Tissue Res,2016,366(2):341-352.

[15] YIN J,WU M M,DUAN J L,et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits NF-KappaB activation and upregulates the expression of Gpx1,Gpx4,occludin,and ZO-1 in DSS-Induced colitis[J]. Appl Biochem Biotechnol,2015,177(8):1716-1728.

(收稿日期:2018-01-24 修回日期:2018-06-18)

(上接第 4097 页)

and therapeutic resistance[J]. Tumor Biology,2016,37(9):11553-11572.

[12] WANG S W,SUN Y M. The IL-6/JAK/STAT3 pathway;Potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer(Review)[J]. Int J Oncol,2014,44(4):1032-1040.

[13] BOURNAZOU E,BROMBERG J. Targeting the tumor microenvironment: JAK-STAT3 signaling [J]. JAK-STAT,2013,2(2):e23828.

[14] CHANG Q,BOURNAZOU E,SANSONE P,et al. The

IL-6/JAK/Stat3 feed-forward loop drives tumorigenesis and metastasis[J]. Neoplasia,2013,15(7):848-862.

[15] SPITZNER M,EBNER R,WOLFF H A,et al. STAT3: A novel molecular mediator of resistance to chemoradiotherapy[J]. Cancers (Basel),2014,6(4):1986-2011.

[16] LEE H J,ZHUANG G L,CAO Y,et al. Drug resistance via feedback activation of Stat3 in oncogene-addicted cancer cells[J]. Cancer Cell,2014,26(2):207-221.

(收稿日期:2018-05-18 修回日期:2018-07-16)