

文章编号:1005-6947(2006)08-0590-05

· 基础研究 ·

硫酸软骨素对 ANP 大鼠胰腺细胞氧化应激损伤及细胞间连接的影响

何忠野¹, 郭仁宣¹, 谢成耀², 刘楠²

(中国医科大学 1. 第一临床学院 普通外科 2. 基础学院 病理教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 探讨硫酸软骨素(CS)预处理对大鼠急性坏死性胰腺炎(ANP)及其组织氧化应激损伤的影响。方法 雄性 Wistar 大鼠 90 只随机分 3 组: A 组为 ANP 组; B 组为 CS 组; C 组为假手术组。3 组动物于术后 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h 分批处死。检测血清淀粉酶(SAM)、计算胰腺系数、胰腺组织中 MDA、GSH、SOD 和 ATP 含量。透射电镜观察细胞间连接的变化。在激光共聚焦显微镜下观察 E-cadherin 在细胞内分布、定位的变化。Western-blot 进行 E-cadherin 蛋白半定量检测。结果 A、B 组 SAM 水平升高, 但 B 组明显低于 A 组。A 组胰腺组织中 GSH, SOD, ATP 明显下降 ($P < 0.01$), MDA 明显升高 ($P < 0.01$)。B 组 GSH, SOD, ATP 下降幅度较小, MDA 升高幅度小, 与 A 组差异均有显著性 (均 $P < 0.05$)。A 组胰腺系数迅速升高并持续增长 ($P < 0.01$); 细胞间连接损伤; E-cadherin 弥漫分布于胞浆内, 其蛋白含量持续下降 ($P < 0.05$), 与 B、C 组比较, 均有显著性差异。结论 在实验性 ANP 早期, 胰腺组织中内源性抗氧化物质显著下降, 脂质过氧化增加, 能量耗竭, 使细胞间连接复合体损伤从而引起胰腺水肿。CS 可明显减轻 ANP 大鼠胰腺细胞氧化应激损伤及能量耗竭, 缓解 E-cadherin 的降解, 稳定细胞连接从而减轻胰腺水肿。

关键词: 胰腺炎/病理学; 硫酸软骨素; 粘着连接

中图分类号: Q539.7; R576

文献标识码: A

The effects of chondroitin-sulfate on cellular oxidation stress injury and on adhesion junction during experimental acute necrotizing pancreatitis

HE Zhong-ye¹, GUO Ren-xuan¹, XIE Cheng-yao², LIU Nan²

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shen Yang 110001, China; 2. Department of Pathology, College of Basic Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective To explore the effects of administration of chondroitin-sulfate (CS) on acute necrotizing pancreatitis (ANP) and its associated tissue oxidation stress injury. **Methods** Male Wistar rats ($n = 90$) were divided randomly into three groups: group A, ANP group; group B, ANP rats received chondroitin-sulfate therapy; group C, control group. Rats in three groups were killed at 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, and 12 h after operation, respectively. The levels of pancreatic indexes (pancreatic wet/body weight), malonyl dialdehyde (MAD), total superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), ATP and serum amylase (SAM) were measured. Changes of adhesion junctions were examined by using an electron microscopy. The cellular distribution and changes of localization of E-cadherin was observed by confocal fluorescence microscopy; an adhesion junction protein expression was studied by western-blot method. **Results** Compared with group B, Levels of GSH, SOD and ATP in group A decreased markedly ($P < 0.01$), however MDA increased significantly ($P < 0.01$). In group A, compared with B and C group, it demonstrated a rapid and sustained increase in levels of pancreatic indexes ($P < 0.01$); damages of adhesion junctions E-cadherin was localized at the cytoplasm, the level of E-cadherin protein was markedly decreased ($P < 0.01$). **Conclusions** In the early stage of experimental ANP, in pancreat tissue, the CSH, SOD and ATP decreased

收稿日期:2006-03-10; 修订日期:2006-06-13。

作者简介:何忠野,男,辽宁沈阳人,中国医科大学第一临床学院副主任医师,主要从事胆、胰外科方面的研究。

通讯作者:郭仁宣 电话:024-83253336。

significantly, resulting in severe damage of adhesion junction, which was responsible for the formation of pancreatic edema. Treatment with CS can protect adhesion junction by increasing E-cadherin protein concentration, and thus relieve pancreatic edema.

Key words: Pancreatitis/pathol; Chondroitin-Sulfate; Adherens Junctions

CLC number: Q539.7; R576

Document code: A

在急性坏死性胰腺炎 (acute necrotizing pancreatitis, ANP) 发生的早期阶段, 细胞间隙扩大, 使腺泡腔内富含蛋白及消化酶的液体通过细胞间隙进入间质, 这一现象被定义为胰腺水肿^[1]。细胞间隙扩大的机制是细胞连接结构的破坏^[2]。在胰腺上皮中广泛存在的 E-cadherin 是一种以嗜同型方式介导同型细胞-细胞间黏附的细胞黏附分子, 可以促进上皮细胞间的相互黏附, 维持组织结构的完整^[3]。其表达和分布对连接复合体的形成至关重要, 因其影响细胞间的连接。有研究发现^[4], 氧自由基损伤引起细胞能量耗竭导致细胞间连接蛋白降解, 细胞连接破坏。外源性硫酸软骨素 (chondritin-sulfate, CS) 系氨基葡聚糖家族 (GAGs) 主要成员之一, 可通过抗氧化作用维持细胞内 ATP 含量, 从而减轻 ANP 大鼠胰腺细胞损伤及胰腺水肿。基于此, 笔者通过研究 CS 对 ANP 大鼠胰腺细胞间连接及连接蛋白 E-cadherin 表达和分布的影响, 以期进一步揭示这一保护作用的机制, 为 ANP 的治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

注射用 CS (软灵芝) 购自西安博森生物制药有限公司; 牛磺胆酸钠购自 Sigma 公司; 10% 水合氯醛注射液系中国医科大学一院制剂室制备; 透射电镜、SXP-1B 手术显微镜购自上海光学仪器厂; TCS SP2 激光共聚焦显微镜购自 Leica 公司。Rabbit Anti-E-cadherin (BA0475) 购自武汉博士德公司; 荧光标记剂 (FITC) 为 Sigma 产品, 胰腺组织中丙二醛 (MDA)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和 ATP 测试盒购自南京建成生物工程研究所。雄性 Wistar 大鼠 90 只, 体重 200 ~ 250 g, 由中国医科大学实验动物中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 建立 ANP 模型和实验设计 动物于实验前 12h 禁食, 不禁水。随机分为 3 组, 每组 30 只, A 组为 ANP 组; B 组为 ANP CS 预处理组; C 组为假手

术对照组。动物模型采用 Aho 等^[5]的方法。腹腔注射 10% 水合氯醛以 0.3 mL/100 g 麻醉动物后剖腹。在手术显微镜下通过胆胰管逆行注射 5% 牛磺胆酸钠 0.1 mL/100 g, 注射速度 0.1 mL/min。B 组在 ANP 诱导前 30 min 腹腔注射 CS 30 mg/kg, A 组以等量生理盐水代替。C 组仅翻动胰腺。

各组动物分别在 30 min, 1, 3, 6, 12 h 分批处死, 每时点宰杀 6 只。剖腹后, 迅速切取胰腺去除脂肪、淋巴结, 称湿重。切取 1 mm × 1 mm × 1 mm 小块固定于 2% 戊二醛固定液中送电镜检查, 其余组织部分做冷冻切片进行免疫荧光染色; 另一部分存于 -70℃ 冰箱内。

1.2.2 指标测定 测定 3 组动物各时点的血清淀粉酶 (SAM) 值。以 TAB 比色法测定 MDA; 以亚硝酸盐形成法测定 SOD; 以 Beutler 改良法测定 GSH; 用色谱法测定 ATP 含量。

1.2.3 计算胰腺系数和透射电子显微镜观察 按公式计算。胰腺系数 = 胰腺湿重 (g) / 大鼠体重 (g) × 100%。拟进行电镜观察的标本, 以 2% 戊二醛固定, 环氧树脂 618 包埋剂包埋, 800 A 超薄切片, 透射电镜观察。

1.2.4 免疫荧光染色检测 5% 的封闭血清在 37℃ 封闭 20 min, 加一抗 (1:150) 孵育 4℃ 过夜; 磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 5 min × 3 次, 避光条件下滴加 FITC 标记的二抗 (1:40), 37℃ 孵育 35 min, PBS 冲洗 5 min × 3 次; 中性甘油封片, 在激光共聚焦显微镜下观察并进行图象采集。

1.2.5 免疫印记 (Western-blot) 分析 200 mg 胰腺组织研磨粉碎后, 加入 1 000 μL 新鲜配制的冷蛋白裂解液 (50 mmol/L Tris-HCL, pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EDTA, 1% SDS), 经 4℃, 14 000 r/min 离心 10 min, 去上清液并测定蛋白浓度。取 40 μg 蛋白与上样缓冲液混合, 煮沸 5 min, 置于 SDS 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳; 电转移到 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉液封闭过夜; 用 1:200 Rabbit Anti-E-cadherin 抗体孵育后加入二抗孵育 60 min 显色。采

用凝胶成像分析系统(GDS-8000)测定条带的面积和灰度值,得出积分灰度值,以此代表蛋白的表达量。

1.3 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。统计采用 SPSS 软件包单因方差分析, Tukey-t 检验方法。

2 结果

2.1 胰腺系数变化

制模 1h 后, A 组胰腺含水量开始增加, 胰腺系数持续升高, 与 C 组比较有明显差异性 ($P < 0.01$); B 组各时点示明显低于 A 组 ($P < 0.01$) (表 1)。

表 1 胰腺系数变化(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	时点				
		30min	1h	3h	6h	12h
A	6	2.86 ± 0.14	3.25 ± 0.28 ¹⁾	3.60 ± 0.26 ¹⁾	4.47 ± 0.23 ¹⁾	4.92 ± 0.49 ¹⁾
B	6	2.83 ± 0.13	2.93 ± 0.12)	3.28 ± 0.12 ^{1),2)}	3.42 ± 0.14 ^{1),2)}	3.85 ± 0.15 ^{1),2)}
C	6	2.81 ± 0.15	2.70 ± 0.13	2.91 ± 0.15	2.83 ± 0.16	2.83 ± 0.13

注:1)与 C 组比较 $P < 0.01$; 2)与 A 组比较 $P < 0.05$

2.2 SAM 值的变化(U/L)

A 组各时点 SAM 明显升高, 与 C 组差异有显著性 ($P < 0.05$); B 组各时点示明显低于 A 组 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

2.3 胰腺组织中 MDA 的变化

B 组各时点胰腺组织 MDA (nmol/mg) 水平均显

著低于 A 组 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

2.4 胰腺组织中内源性抗氧化剂和 ATP 含量的变化

B 组各时点胰腺组织中内源性抗氧化剂 SOD (nmol/mg)、GSH ($\mu\text{g}/100\text{mg}$)、ATP ($\mu\text{mol}/\text{g}$ 湿重) 均显著高于 A 组 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

表 2 SAM 等的检测结果($\bar{x} \pm s$)

检测指标	组别	n	时点				
			30min	1h	3h	6h	12h
SAM (U/L)	A	6	1769 ± 100 ¹⁾	2671 ± 251 ¹⁾	3589 ± 232 ¹⁾	6023 ± 531 ¹⁾	12207 ± 593 ¹⁾
	B	6	956 ± 98 ²⁾	1654 ± 153 ^{1),2)}	1918 ± 195 ^{1),2)}	2690 ± 521 ^{1),2)}	5653 ± 444 ^{1),2)}
	C	6	691 ± 89	783 ± 165	725 ± 223	706 ± 116	750 ± 124
SOD (nmol/mg)	A	6	20.4 ± 1.2 ¹⁾	14.1 ± 4.1 ¹⁾	9.7 ± 1.6 ¹⁾	9 ± 2.2 ¹⁾	6.4 ± 1.9 ¹⁾
	B	6	28.4 ± 1.8 ²⁾	20.8 ± 1.8 ^{1),2)}	16.1 ± 1.1 ^{1),2)}	13.3 ± 1.7 ^{1),2)}	9.5 ± 2 ^{1),2)}
	C	6	31.5 ± 2.2	29.7 ± 2.3	31.3 ± 2.3	32.6 ± 1.6	29.9 ± 1.7
GSH ($\mu\text{g}/100\text{mg}$)	A	6	13.1 ± 0.8 ¹⁾	12.7 ± 0.5 ¹⁾	11.89 ± 1.34 ¹⁾	9.07 ± 1.45 ¹⁾	7 ± 0.6 ¹⁾
	B	6	15 ± 1 ²⁾	14.6 ± 0.5 ^{1),2)}	13.6 ± 1.1 ^{1),2)}	12.3 ± 0.9 ^{1),2)}	10.6 ± 1.4 ^{1),2)}
	C	6	16.9 ± 0.9	17.2 ± 2.3	16.3 ± 0.8	16.6 ± 1.2	14.6 ± 0.5
MDA (nmol/mg)	A	6	9.6 ± 0.8 ¹⁾	12.5 ± 1.7 ¹⁾	16.1 ± 1.3 ¹⁾	27.1 ± 0.8 ¹⁾	34.8 ± 2.8 ¹⁾
	B	6	7.8 ± 0.7 ²⁾	8.1 ± 0.7 ²⁾	9.6 ± 1.1 ^{1),2)}	12 ± 0.9 ^{1),2)}	12.2 ± 1.6 ^{1),2)}
	C	6	7.96 ± 1.78	8.2 ± 0.88	8.06 ± 2.04	6.8 ± 1.3	8 ± 1.8
ATP ($\mu\text{mol}/\text{g}$)	A	6	7.7 ± 0.6 ¹⁾	6.7 ± 0.4 ¹⁾	5.5 ± 0.4 ¹⁾	4.2 ± 0.3 ¹⁾	2.1 ± 0.5 ¹⁾
	B	6	10.9 ± 0.2 ^{1),2)}	10.3 ± 0.5 ^{1),2)}	9.3 ± 0.8 ^{1),2)}	7.8 ± 0.5 ^{1),2)}	5.6 ± 0.4 ^{1),2)}
	C	6	12.7 ± 0.5	12.7 ± 0.5	12.5 ± 0.5	12.6 ± 0.6	12.3 ± 0.7

注:1)与 C 组比较 $P < 0.01$; 2)与 A 组比较 $P < 0.05$

2.5 透射电镜观察结果

A 组在 1 h 后出现细胞间连接破坏,细胞间隙增宽;此时 B 组细胞间连接仍保持完整,3 h 后才发生变化(图 1)。

2.6 E-cadherin 在细胞内的定位变化

激光共聚焦显微镜观察,E-cadherin 定位如下:C 组在正常胰腺腺泡细胞中,E-cadherin 定位于细胞膜及附近的胞浆中;A 组 1 h 后,E-cadherin 分布紊乱,散布于细胞浆中。B 组分布较 A 组规则(图 2)。

A:正常连接

B:造膜后 1h 细胞间连接破坏

C:硫酸软骨素处理后 1h 细胞间连接复合体结构完好

图 1 电镜显示细胞间连接的变化($\times 20\ 000$)箭头所指为细胞键连接复合体

A:正常腺泡 E-cadherin 表达于细胞膜周胞浆中

B:造膜后 1h E-cadherin 由细胞周解聚紊乱分布于胞浆中(呈点状分布)

C:造膜 1h 后 E-cadherin 分布较规则

图 2 激光共聚焦显微镜下观察 E-cadherin 在细胞内的分布($\times 1\ 000$)

2.7 E-cadherin 蛋白表达的变化

对照组各时点及 A, B 组 30 min 时点,蛋白条带清晰,密度较高。1 h 后 A, B 两组蛋白条带密度均

逐渐减弱,A 组至术后 12 h, E-cadherin 蛋白条带几乎消失;B 组蛋白条带密度减弱程度明显低于 A 组($P < 0.01$)(表 3,图 3)。

表 3 E-cadherin 蛋白 Western-blot 分析($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时点				
		30min	1h	3h	6h	12h
A	6	39.3 \pm 2.4 ¹⁾	19.3 \pm 2.41)	10.7 \pm 2 ¹⁾	7.97 \pm 1.9 ¹⁾	5.83 \pm 2.1 ¹⁾
B	6	43.7 \pm 3 ²⁾	38.5 \pm 0.13 ^{1),2)}	30 \pm 2.3 ^{1),2)}	20.8 \pm 2.3 ^{1),2)}	12.1 \pm 1.6 ^{1),2)}
C	6	47 \pm 1.1	47.3 \pm 2.5	47.4 \pm 1.9	48.8 \pm 1.9	49.1 \pm 1.3

注:1)与 C 组比较 $P < 0.01$; 2)与 A 组比较 $P < 0.05$

3 讨论

许多上皮细胞之间细胞连接的主要结构是细胞黏附分子复合体^[6],其主要分子是 E-cadherin,它是一种糖蛋白,是上皮组织发展限制机制,具有一个跨膜部,5 个重复的细胞外区,有两个高度保守的 Ca^{2+} 结合机动力子,负责相邻细胞间的同性相互作用

图 3 E-cadherin 蛋白在 3 组组织中的表达

用;并有一个细胞内区域通过一种称为 Catenins 的粘连伴随蛋白与 F-actin 连接,形成至关重要的连接结构(连接复合体)^[7-9]。这一结构不仅调控细胞间的黏附和连接,而且还影响了细胞内 actin 细胞骨架的结构^[9]和细胞内蛋白的极性分布^[11]。

本研究发现:A组在发病早期即有胰腺水肿形成,并随病程发展而加重,与之相伴随的是细胞间粘连复合体破坏,细胞间隙扩大,同时 E-cadherin 分布紊乱。蛋白半定量分析表明,ANP 时,E-cadherin 蛋白迅速降解,蛋白含量有逐渐减少的趋势。此结果与 Markus 等^[12]的报道有矛盾。他们发现在 cerulein 诱导的急性水肿性胰腺炎中 E-cadherin 仅有轻度下降,并且在病情发展过程中细胞连接可以恢复。这一矛盾在一定程度上解释了 ANP 与急性水肿性胰腺炎可能有着不同的病理生理变化。

近期研究揭示^[13],CS 不仅是细胞外基质的组成,而且调控一些细胞事件和生理过程。CS 以其羧基团及磺基团与启动 Fenton 反应的 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 等过渡金属离子反应,起到抗氧化作用。笔者认为 CS 可通过减少 Reactive oxygen species (ROS) 产生,降低氧化应激损伤,维持细胞内 ATP 含量,从而减轻 ANP 大鼠胰腺细胞损伤及胰腺水肿。

本研究发现,CS 腹腔注射预处理后,可缓解 ANP 大鼠胰腺细胞中 E-cadherin 蛋白降解及定位、分布的紊乱,维持细胞间连接的稳定,从而减轻了大鼠 ANP 早期胰腺水肿的形成。同时进一步揭示了 CS 这一抗氧化剂对 ANP 大鼠胰腺细胞保护作用的生物学机制,为 ANP 的治疗提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Lerch MM, Weiden bach H, Gress TM, *et al.* Effect of Kinin inhibition in experimental acute pancreatitis [J]. *Am J Physiol*, 1995, 269(1): G490 - 499.
- [2] Fallon MB, Gorelick FS, Anderson JM, *et al.* Effect of cerulein hyperstimulation on the paracellular barrier of the rat exocrine pancreas [J]. *Gastroenterology*, 1995, 108(10): 1863 - 1872.
- [3] Neneill H, Ozawa W, Kemler R, *et al.* Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity [J]. *Cell*, 1990, 62(5): 309 - 315.
- [4] Sugi K, Musch MW, Field M, *et al.* Inhibition of Na^+/K^+ - ATPase by interferon- γ down-regulates intestinal epithelial transport and barrier function [J]. *Gastroenterology*, 2001, 120(7): 1393 - 1403.
- [5] Aho HJ, Kosken Salo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis [J]. *Scand J Gastroenterol*, 1980, 15(4): 411 - 416.
- [6] Stock C, Launay JF, Grenier JF, *et al.* Pancreatic acinar cell changes induced by caerulein, vinblastine, cleuterium oxide, and cytochalasin B in vitro [J]. *Lab Invest*, 1978, 38(1): 157 - 164.
- [7] Takeichi M. Morphogenetic roles of classical cadherins [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1995, 7(6): 619 - 627.
- [8] Ozawa M, Ringwald M, Kemler R. Uvomorulin-cateuin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(12): 4246 - 4250.
- [9] Kemler R. From cadherins to catenins: Cytoplasmic interactions and regulation of cell adhesion [J]. *Trend Gen*, 1993, 9(3): 317 - 321.
- [10] Frixen UH, Nagamine Y. Stimulation of urokinase-type plasminogen activator expression by blockage of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(11): 3618 - 3623.
- [11] McNeill H, Ozawa M, Kemler R, *et al.* Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity [J]. *Cell*, 1990, 62(3): 309 - 326.
- [12] Markus M, Lerch Manfred P, Thomas M. Dissociation and Reassembly of adherens junctions during experimental acute pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 1997, 113(7): 1355 - 1366.
- [13] Sugahara K, Kitagawa H. Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfate glycosaminoglycans [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2000, 10(5): 518 - 527.