



## 腺苷抑制GSK-3 $\beta$ 活性对大鼠急危重症胰腺炎肠屏障功能障碍的影响

李旻昊, 袁梅, 夏加增, 巢琳

引用本文:

李昊,袁梅,夏加增,巢琳. 腺苷抑制GSK-3 $\beta$ 活性对大鼠急危重症胰腺炎肠屏障功能障碍的影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2022, 47(10): 1352-1355.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.10.005>

### 您可能感兴趣的其他文章

#### Articles you may be interested in

##### 线粒体细胞色素c释放抑制剂对大鼠全脑缺血再灌注损伤炎症反应的作用

Effect of mitochondrial cytochrome c release inhibitor on the inflammatory response of rats with global cerebral ischemia reperfusion injury

蚌埠医学院学报. 2022, 47(1): 7-12 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.01.002>

##### 强制性运动康复训练对脑梗死大鼠神经功能及巢蛋白表达的影响

Effects of rehabilitation with constraint-induced movement therapy on neural function and nestin expression in rat cerebral infarction model

蚌埠医学院学报. 2015, 40(5): 575-577,581 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.05.005>

##### 姜黄素对肾脏缺血再灌注损伤大鼠模型保护作用的研究

The protective effect of curcumin on the ischemia-reperfusion injury in rats

蚌埠医学院学报. 2016, 41(1): 16-19 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.01.004>

##### 血必净联合早期腹腔穿刺引流应用于重症急性胰腺炎病人的临床价值

Clinical application value of Xuebijing combined with early abdominal puncture and drainage in patients with severe acute pancreatitis

蚌埠医学院学报. 2022, 47(9): 1176-1179,1184 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.09.005>

##### 硫化氢对糖尿病大鼠空间学习记忆和海马组织氧化应激的影响

Effects of hydrogen sulfide on spatial learning and memory and oxidative stress in hippocampus tissue of diabetic rat

蚌埠医学院学报. 2020, 45(4): 447-451 <https://doi.org/10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.04.007>

# 腺苷抑制 GSK-3 $\beta$ 活性对大鼠 急危重症胰腺炎肠屏障功能障碍的影响

李旻昊<sup>1</sup>, 袁 梅<sup>2</sup>, 夏加增<sup>1</sup>, 巢 琳<sup>1</sup>

**[摘要]** **目的:** 研究腺苷对大鼠急危重症胰腺炎(SAP)肠屏障功能障碍(IBD)的保护途径。**方法:** 将 64 只健康雄性 SD 大鼠随机分为假手术组 8 只、SAP 组 40 只(分为 0、3、6、12、24 h 不同时间点处理组, 每组 8 只)、腺苷处理组(Ade-IV 组)8 只、线粒体膜通透性转移孔(mPTP)抑制剂环孢素 A(CsA)组 8 只。大鼠 SAP 造模完成后, 血清胰淀粉酶升高及镜下胰腺组织病理学改变提示造模成功, HE 染色观察大鼠小肠组织损伤情况, Western blotting 法检测大鼠小肠组织 P-GSK-3 $\beta$  表达水平, 应用电镜观察小肠线粒体超微结构的变化, 采用差速离心法分离线粒体, 并在 Ca<sup>2+</sup> 诱导下完成线粒体肿胀实验。**结果:** 大鼠 SAP 造模成功后, SAP 组 40 只大鼠血清胰淀粉酶水平随着 0~12 h 时间点的延长逐渐升高, 且 12 h 达到高峰, 24 h 下降至最低点, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ); 切片染色观察, SAP 组小肠黏膜充血、水肿, 并伴有柱状上皮细胞坏死, 甚至出现部分绒毛的断裂、缺损, 而 Ade-IV 组肠黏膜上皮及绒毛形态基本完整, 绒毛排列基本整齐; P-GSK-3 $\beta$  的表达, Ade-IV 组较 SAP 组显著增加( $P < 0.01$ ); 小肠线粒体超微结构在 SAP 组肿胀明显, 还出现了空泡变性, 而 Ade-IV 组肿胀程度减轻, 空泡变性减少; 线粒体肿胀实验发现 520 nm 处线粒体吸光度值 CsA 组 < Ade-IV 组 < SAP 组, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论:** 腺苷对 SAP 并发的 IBD 有保护作用, 其机制可能与抑制 GSK-3 $\beta$  活性, 进而阻止 mPTP 的开放有关。

**[关键词]** 胰腺炎; 腺苷; 线粒体; 肠屏障功能障碍; 肠缺血再灌注损伤; 大鼠

**[中图分类号]** R 657.51 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2022.10.005

## Effect of adenosine inhibition of GSK-3 $\beta$ activity on intestinal barrier dysfunction in rats with severe acute pancreatitis

LI Min-hao<sup>1</sup>, YUAN Mei<sup>2</sup>, XIA Jia-zeng<sup>1</sup>, CHAO Lin<sup>1</sup>

(1. Department of General Surgery, The Second People's Hospital of Wuxi, Wuxi Jiangsu 214001;

2. Department of Function, The Fifth People's Hospital of Wuxi, Wuxi Jiangsu 214007, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the protection pathway of adenosine against intestinal barrier dysfunction (IBD) in rats with severe acute pancreatitis (SAP). **Methods:** A total of 64 male SD rats were randomly divided into 4 groups: sham group, adenosine treatment group (adenosine), SAP group and mPTP inhibitor cyclosporin A group. Serum amylase level and pancreatic pathology were tested to confirm the success of SAP model; the damage of small intestine tissue was observed by HE staining; the expression of P-GSK-3 $\beta$  in the small intestine of rats was detected by Western blotting; electron microscope was used to observe the changes of mitochondrial ultrastructure; differential centrifugation method was used to separate mitochondria, then, mitochondrial swelling experiments were conducted under Ca<sup>2+</sup> induction. **Results:** With the success of SAP model, the serum pancreatic amylase level was gradually increased with the extension of the time point from 0 to 12 h, which reached the peak at 12 h and decreased to the lowest at 24 h. The difference was statistically significant ( $P < 0.01$ ). Staining of sections showed that SAP group had hyperemia and edema of intestinal mucosa, accompanied by necrosis of columnar epithelial cells, and even fracture and defect of some villi, while the intestinal mucosal epithelium and fluffy form of the Ade-IV group were basically complete, and the velvet arrangement was basically neat. Compared to the SAP group, the P-GSK-3 $\beta$  expression of the Ade-IV group increased significantly ( $P < 0.01$ ). In SAP group, intestinal mitochondrial ultra-micro structure was significantly swollen, even empty bubble degeneration appeared, while in Ade-IV group, this significantly reduced. Mitochondrial swelling experiment showed that the mitochondrial absorbance value at 520 nm was the highest in SAP group, secondary was Ade-IV group and CSA group was the lowest, and the differences were statistically significant ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** Adenosine prevents SAP intestinal barrier injury presumably by targeting the mPTP through inactivation of GSK-3 $\beta$ .

**[Key words]** pancreatitis; adenosine; mitochondria; intestinal barrier dysfunction; intestinal ische mia-reperfusion injury; rat

**[收稿日期]** 2020-03-21 **[修回日期]** 2022-05-23

**[作者单位]** 1. 江苏省无锡市第二人民医院 普通外科, 214001; 2. 江苏省无锡市第五人民医院 功能科, 214007

**[作者简介]** 李旻昊(1989-), 男, 主治医师。

**[通信作者]** 夏加增, 博士研究生导师, 教授。E-mail: 284389841@qq.com

急危重症胰腺炎(SAP)是临床常见的急腹症, 其病情发展迅猛, 病死率极高, 且 SAP 常常会并发

肠屏障功能受损,引起肠道菌群或内毒素移位,造成胰腺外感染,启动全身炎症反应,引起机体多器官功能障碍<sup>[1-2]</sup>。有学者<sup>[3]</sup>认为,SAP 的最重要的治疗干预措施就是预防其并发症的发生,尤其是并发的肠功能障碍。腺苷作为遍布人体细胞的内源性核苷,对全身多个系统都具有调节作用,腺苷及其类似物能够扩张肠道血管,增加肠血流量,腺苷可通过受体介导参与肠道血管的扩张<sup>[4]</sup>。SAP 并发肠屏障功能障碍主要与肠道缺血再灌注损伤有关,SAP 发生时,会引起肠道血管强烈收缩,导致肠道血流量减少,从而导致肠黏膜的缺血-再灌注损伤(IRI)<sup>[5]</sup>。本研究观察大鼠 SAP 肠屏障损伤时小肠组织的形态学变化,并给予腺苷干预以研究其对大鼠 SAP 肠屏障损伤的保护作用,进一步探讨其相关的线粒体保护机制。现作报道。

## 1 材料与方法

1.1 材料 实验用成年健康雄性 SD 大鼠 64 只(250~280 g),购于北京大学动物实验中心,饲养于华北理工大学动物实验中心屏障实验室。腺苷(南京春秋生物工程有限公司),环孢素 A(CsA)注射液(美国诺华公司),牛磺胆酸钠(美国 Sigma 公司),糖原合成酶激酶 3 $\beta$ (GSK-3 $\beta$ )(Ser9)抗体、Total-GSK-3 $\beta$  抗体(美国 cell signaling 公司),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、ECL 发光检测试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所有)。电泳仪(Invitrogen 公司);生物图像采集系统(美国 UVP 公司);电镜(日本日立公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 实验分组及动物模型制备 64 只健康雄性 Wistar 大鼠,随机分为假手术组 8 只、SAP 组 40 只(分为 0、3、6、12、24 h 不同时间点处理组,每组 8 只)、腺苷处理组(Ade-IV 组)8 只、线粒体膜通透性转移孔(mPTP)抑制剂 CsA 组 8 只。

所有大鼠术前 12 h 禁食,饮水不受限。SAP 组模型制备:采用腹腔内注射戊巴比妥溶液麻醉、固定,选择上腹正中切口入腹,找到十二指肠,轻柔地提起,用小号动脉夹分别夹在十二指肠段和肝门部胰胆管部,用一次性静脉留置针经十二指肠大乳头处逆行穿刺胰胆管,穿刺成功后接注射器,缓慢注射牛磺胆酸钠 0.5 g/100 g,持续约 1 min,后停留 5 min,然后拔出留置针,去除动脉夹,可以观察到,大鼠胰腺组织充血、水肿,然后将肠组织放回腹腔,分层缝合腹壁并消毒,整个手术过程要做到迅速且轻柔,然后将大鼠放入笼中,自由进食、饮水。Ade-

IV 组于造模成功后 5 min 将 10 g/L 腺苷溶液(20 mg/kg)通过阴茎背静脉给药,CsA 组于术前经腹腔注射 CsA 注射液(3 mg/kg)(我们既往研究<sup>[6]</sup>发现,大鼠 SAP 在 12 h 时间点损伤最为严重,下文实验结果中也会有提及,所以 Ade-IV 及 CsA 组只针对 12 h 时间点,在这里稍加说明,以便于理解)。假手术组仅打开腹腔,翻动胰腺组织后关腹。SAP 组所有大鼠在术后相应时间点打开腹腔,找到下腔静脉,真空负压抽取血液并离心取血清送检胰淀粉酶。

1.2.2 标本的病理学观察 取胰腺及回肠末端组织,多聚甲醛溶液固定,然后作 HE 染色及电镜下观察肠道组织的病理改变。

1.2.3 线粒体分离及 Ca<sup>2+</sup> 诱导的肿胀实验 本实验利用 Ca<sup>2+</sup> 诱导的线粒体肿胀试验测定各组 mPTP 的开放程度,CsA 作为 mPTP 的抑制剂,只出现在了线粒体肿胀实验中,进行此项实验包含 SAP、Ade-IV 及 CsA 三个组。首先分离大鼠肠组织细胞,用差速离心法提取肠组织细胞线粒体,采用 BCA 蛋白定量试剂盒分析线粒体浓度,纯净的线粒体悬浮于肿胀缓冲液中(KCl 120 mmol/L,Tris-HCl 10 mmol/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mmol/L,MOPS 20 mmol/L,4 ℃)使线粒体终浓度达到 0.3 mg/mL,并接种于 96 孔板中,加入 200  $\mu$ mol/L CaCl<sub>2</sub> 诱导 mPTP 的开放,线粒体的肿胀程度的判定采用分光光度法测量 520 nm 吸光度降低的百分率来评价。

1.2.4 Western blotting 检测磷酸化-GSK-3 $\beta$  蛋白表达 采用液氮研磨大鼠小肠组织,并经过一系列匀浆、离心、裂解等步骤提取肠组织蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白浓度测定,电泳并转膜,脱脂牛奶封闭,并加一抗(磷酸化-GSK-3 $\beta$ )4 ℃ 孵育过夜,然后二抗室温孵育 1 h 后进行 ECL 荧光显色。用总蛋白(Total-GSK-3 $\beta$ )进行内参检测。所有胶片用扫描仪采集图像,保存好后用 Image J 分析灰度值。

1.3 统计学方法 采用 *t* 检验、方差分析和 *q* 检验。

## 2 结果

### 2.1 腺苷对大鼠 SAP 肠屏障的影响

2.1.1 血清胰淀粉酶在不同时间点的水平变化 SAP 组造模成功后,抽血送检血清胰淀粉酶,发现 0~12 h 随时间延长,SAP 组 40 只大鼠胰淀粉酶逐渐升高,且 12 h 达到高峰,24 h 下降至最低,差异均



有统计学意义( $P < 0.01$ ) (见表1)。

表1 血清胰淀粉酶在不同时间点的水平变化( $\bar{x} \pm s$ )		
时间点	<i>n</i>	血清胰淀粉酶/(U/L)
0 h	8	100 ± 1.36
3 h	8	242 ± 2.27 **
6 h	8	264 ± 2.7 ** △△
12 h	8	496 ± 4.99 ** △△##
24 h	8	151 ± 1.54 ** △△##◇◇
<i>F</i>	—	22 860.40
<i>P</i>	—	< 0.01
<i>MS</i> <sub>组内</sub>	—	8.142

*q* 检验:与0 h比较 \*\*  $P < 0.01$ ;与3 h比较 △△  $P < 0.01$ ;与6 h比较 ##  $P < 0.01$ ;与12 h比较 ◇◇  $P < 0.01$

2.1.2 胰腺和小肠组织的病理学改变 肉眼观察:假手术组胰腺组织无明显变化,SAP组胰腺可见片状坏死,胰周及网膜出现点状、块状皂化斑,并伴有

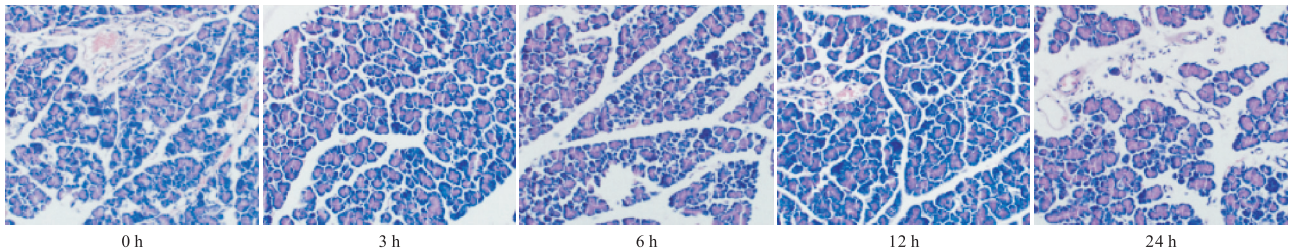


图1 SAP组不同时间点大鼠胰腺组织的形态学变化

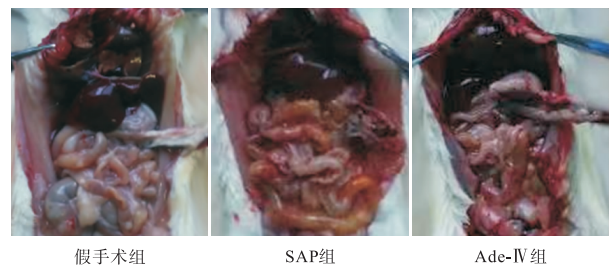


图2 肉眼下3组大鼠胰腺及小肠组织的病理学改变

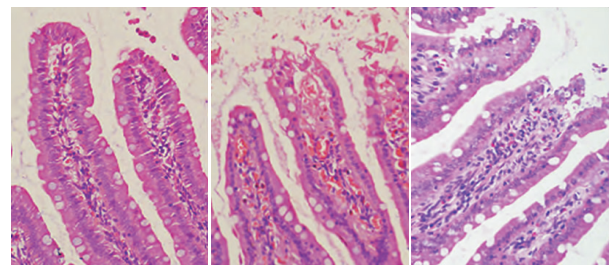


图3 3组大鼠小肠组织的形态学改变

2.1.3 腺苷对小肠组织超微结构的影响 大鼠SAP造成了小肠组织的线粒体损伤,主要为线粒体肿胀,部分出现空泡变性,而腺苷组可见线粒体肿胀减轻,空泡变性减少,线粒体损伤较前者明显减轻

大量血性腹水。

光镜下观察:SAP组3、6 h可见胰腺间质扩张充血,伴有少量的炎细胞浸润,12 h胰腺小叶、胰管大面积出血坏死,分叶结构模糊,伴有大量的炎细胞浸润及纤维素渗出。24 h胰腺出血坏死区明显减少,小叶纤维组织及小胰管增生明显,表现出明显的修复作用,且血清胰淀粉酶在12 h升高最为显著,这些也都间接提示12 h损伤最为严重,所以我们选取12 h组给药后进行后续观察。与SAP组比较,Ade-IV组肉眼可见血性腹水明显减少,胰腺充血、水肿等较SAP组减轻,有少量血性腹水,未发现钙化斑。小肠蠕动良好。光镜下观察SAP组可见小肠黏膜固有层充血、水肿,柱状上皮细胞坏死脱落,绒毛增粗水肿,排列紊乱,部分绒毛出现断裂、缺损;与SAP组比较,Ade-IV组光镜下肠黏膜上皮及绒毛形态基本完整,绒毛排列基本整齐(见图1~3)。

(见图4)。

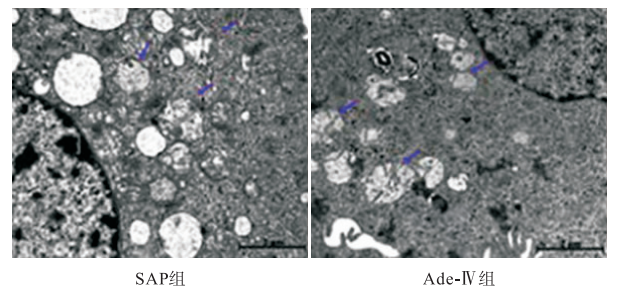


图4 2组大鼠小肠组织线粒体超微结构的改变

2.2 腺苷对mPTP开放的影响 线粒体520 nm处的吸光度为CsA组 < Ade-IV组 < SAP组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ) (见表2)。

2.3 腺苷对GSK-3 $\beta$ 磷酸化的影响 与SAP组( $4637.75 \pm 193.42$ )比较,Ade-IV组P-GSK-3 $\beta$ ( $10\,128.88 \pm 591.82$ )的表达明显增加( $t = 24.95, P < 0.01$ )。

### 3 讨论

肠屏障指的是肠道上皮具有分隔肠腔内物质,防止致病性物质,如细菌和毒素等侵入的功能。研

究<sup>[7]</sup>发现,在大鼠肠道缺血早期,肠黏膜缺血、缺氧会引起大量酸性代谢产物堆积,导致细胞代谢障碍。SAP 常常会导致肠屏障功能受损,从而启动全身炎症反应,诱发多器官功能障碍综合征的发生。

表 2 腺苷对 mPTP 开放的影响( $\bar{x} \pm s$ )		
分组	<i>n</i>	线粒体吸光度值减少的百分比
SAP 组	8	37.15 ± 2.18
CsA 组	8	10.00 ± 1.31 **
Ade-Ⅳ组	8	19.63 ± 1.41 **△△
<i>F</i>	—	537.71
<i>P</i>	—	<0.01
<i>MS</i> 组内	—	2.819

*q* 检验:与 SAP 组比较 \*\* *P* < 0.01;与 CsA 组比较△△*P* < 0.01

一些中药制剂等能够明显减轻 SAP 并发的肠黏膜损伤<sup>[8-10]</sup>,不仅如此,腺苷作为人体细胞普遍存在的内源性核苷,可通过扩张肠黏膜血管从而发挥肠道保护作用<sup>[11]</sup>。但是这些药物发挥肠道保护作用的具体细胞信号转导机制仍不是很清楚,尤其是关于线粒体保护途径的研究更是甚少。本研究发现,在给予腺苷预处理后,肉眼观察,大鼠血性腹水减少,小肠组织充血水肿明显减轻,肠蠕动良好,光镜下,小肠黏膜上皮及绒毛形态相对完整,排列基本整齐,与假手术组比较有明显差别,说明腺苷能够改善肠屏障功能,减轻 SAP 并发的肠损伤。

在正常生理条件下,mPTP 呈关闭状态,但是当机体处于应激条件下(如缺血缺氧、钙超载、氧化应激损伤等),mPTP 会开放,这时某些离子和代谢产物就会进入线粒体内,从而破坏线粒体的结构而引起线粒体的坏死或凋亡,最终导致细胞的功能障碍。本研究电镜结果显示,腺苷能够减轻肠黏膜线粒体的肿胀、空泡化,证实腺苷的肠黏膜保护作用与线粒体有关。不仅如此,腺苷还能够模拟 mPTP 抑制剂 CsA,显著抑制 Ca<sup>2+</sup>诱导的线粒体肿胀,进一步说明腺苷可通过抑制 mPTP 开放,从而发挥肠屏障的保护作用。

GSK-3β 是一种多功能的丝/苏氨酸类激酶,该酶参与了多条细胞信号通路,对细胞增殖、分化及凋亡,肿瘤的发生、转移等过程发挥重要作用<sup>[12-13]</sup>。与大多数蛋白激酶不同的是,GSK-3β 受两个不同位点磷酸化的调节,Tyr216 磷酸化使 GSK-3β 活性增高,相反,Ser9 磷酸化使 GSK-3β 活性降低<sup>[14]</sup>。GSK-3β Ser9 位点的磷酸化表达增加,能够阻止 mPTP 的开放,从而发挥线粒体的保护作用<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,与对照组相比,腺苷能够使 GSK-3β Ser9 的磷酸化表达明显增加,提示抑制 GSK-3β 活

性,阻止 mPTP 开放,是腺苷发挥肠道保护作用的机制之一。

[参 考 文 献]

[1] ZHANG JW,ZHANG GX,CHEN HL,*et al.* Therapeutic effect of Qingyi decoction in severe acute pancreatitis-induced intestinal barrier injury[J]. World J Gastroenterol,2015,21(12):3537.

[2] WANG H,JIANG Y,LI H,*et al.* Carbachol protects the intestinal barrier in severe acute pancreatitisby regulating Cdc42/F-actin cytoskeleton[J]. Exp Ther Med,2020,20(3):2828.

[3] ZHANG M,WU YQ,XIE L,*et al.* Isoliquiritigenin protects against pancreatic injury and intestinal dysfunction after severe acute pancreatitis via Nrf2 signaling[J]. Front Pharmacol,2018,9:936.

[4] BOWSER JL,PHAN LH,ELTZSCHIG HK. The hypoxia-adenosine link during intestinal inflammation[J]. Immunol,2018,200(3):897.

[5] 张春,林建源,吕桂芳,等. 地塞米松对重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜屏障的保护作用机制研究[J]. 中外医学研究,2020,18(34):6.

[6] 袁梅. 大鼠急危重症胰腺炎并发心脏损害的相关机制研究[D]. 唐山:河北联合大学,2013.

[7] NAKATSUTSUMI K,MORISHITA K,YAGI M,*et al.* Vagus nerve stimulation modulates arachidonic acid production in the mesenteric lymph following intestinal ischemia-reperfusion injury[J]. Trauma Acute Care Surg,2021,91(4):700.

[8] 李百强,武之洋,袁晨晨,等. 鱼油代谢物保护素 D1 对重症急性胰腺炎小鼠肠粘膜损伤保护作用的研究[J]. 肠外与肠内营养,2020,27(4):205.

[9] PAN LY,CHEN YF,LI HC,*et al.* Dachengqi decoction attenuates intestinal vascular endothelial injury in severe acute pancreatitis in vitro and in vivo[J]. Cell Physiol Biochem,2017,44(6):2395.

[10] CUI QR,LING YH,WEN SH,*et al.* Gut barrier dysfunction induced by aggressive fluid resuscitation in severe acute pancreatitis is alleviated by necroptosis inhibition in rats[J]. Shock,2019,52(5):e107.

[11] BOWSER JL, PHAN LH, ELTZSCHIG HK. The hypoxia-adenosine link during intestinal inflammation[J]. Immunol, 2018,200(3):897.

[12] POTZ BA,SCRIMGEOUR LA,SABE SA,*et al.* Glycogen synthase kinase 3β inhibition reduces mitochondrial oxidative stress in chronic myocardial ischemia[J]. Thorac Cardiovasc Surg,2018,155(6):2492.

[13] POTZ BA,SABE AA,ELMADHUN NY,*et al.* Calpain inhibition modulates glycogen synthase kinase 3β pathways in ischemic myocardium:a proteomic and mechanistic analysis[J]. Thorac Cardiovasc Surg,2017,153(2):342.

[14] ZHU H,DING Y,XU X,*et al.* Prostaglandin E1 protects coronary microvascular function via the glycogen synthase kinase 3β-mitochondrial permeability transition pore pathway in rat hearts subjected to sodium laurate-induced coronary microembolization[J]. Am J Transl Res,2017,9(5):2520.

[15] DING Y,ZHU HY,ZHANG LZ,*et al.* Shexiang Tongxin dropping pill reduces coronary microembolization in rats via regulation of mitochondrial permeability transition pore opening and AKT-GSK3β phosphorylation[J]. Chin J Integr Med,2021,27(7):527.