

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003343

MFG-E8 减轻梗阻性黄疸大鼠肠道细胞凋亡和黏膜通透性损害

郭 勇¹, 唐永梁¹, 杨俊涛²

(1. 陆军军医大学大坪医院肝胆胰外科, 重庆 400042; 2. 重庆两江新区人民医院肝胆胰外科, 重庆 401122)

【摘要】目的:观察梗阻性黄疸大鼠血浆乳脂球上表皮生长因子-8(milk fat globule-EGF factor VIII, MFG-E8)水平, 小肠组织 MFG-E8 蛋白表达情况;明确补充 MFG-E8 能否减轻梗阻性黄疸大鼠肠道细胞凋亡和肠黏膜通透性损害。**方法:**大鼠梗阻性黄疸模型通过手术结扎胆总管(common bile duct ligation, BDL)建立, 32 只雄性成年 SD 大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、梗阻性黄疸组(BDL 组)、MFG-E8 治疗组(MFG-E8 组)、治疗对照组(Vehicle 组)。MFG-E8 组和 Vehicle 组于 BDL 后第 1、3、5 天腹腔内注射 rmMFG-E8(20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)或等体积的生理盐水;建模后第 7 天收集血及组织标本, Western blot 检测血浆 MFG-E8 水平和肠道 MFG-E8 蛋白表达;原位末端转移酶标记(TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling, TUNEL)法染色观察肠道细胞凋亡情况, Western blot 检测肠道 Cleaved Caspase-3 水平;异硫氰酸荧光素标记葡聚糖(fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-D)法评估肠黏膜通透性, ELISA 检测血浆肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平。**结果:**与 Sham 组(5.675 ± 0.638 , 1.24 ± 0.157)比较, BDL 组血浆 MFG-E8 水平(3.087 ± 0.272)明显降低($P=0.001$), 小肠 MFG-E8 蛋白表达水平(0.484 ± 0.090)明显减少($P=0.000$);与 Vehicle 组(22.333 ± 5.085 , 0.887 ± 0.132)比较, MFG-E8 组小肠细胞凋亡比例(14.467 ± 3.722)以及 Cleaved Caspase-3 蛋白表达(0.582 ± 0.145)明显下降($P=0.048$, $P=0.024$);Vehicle 组 FITC-D 水平(4.515 ± 0.601)以及血浆 TNF- α 水平(233.84 ± 21.21)较 Sham 组(1.519 ± 0.346 , 78.24 ± 13.75)均明显升高($P=0.000$, $P=0.000$), MFG-E8 组 FITC-D 水平(2.826 ± 0.588)较 Vehicle 组明显降低($P=0.000$), 同时, 血浆 TNF- α 水平(109.90 ± 24.06)较 Vehicle 组下降了 53%($P=0.000$)。**结论:**补充 MFG-E8 明显减轻了梗阻性黄疸大鼠小肠细胞凋亡和肠黏膜通透性损害, 以及全身炎症反应。

【关键词】乳脂球上表皮生长因子-8;梗阻性黄疸;细胞凋亡;肠黏膜通透性

【中图分类号】R442.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2023-01-16

Milk fat globule-EGF factor VIII attenuates apoptosis and permeability damage of the intestinal mucosa in rats with obstructive jaundice

Guo Yong¹, Tang Yongliang¹, Yang Juntao²

(1. Department of Hepatobiliary Pancreatic Surgery, Daping Hospital, Army Medical University;

2. Department of Hepatobiliary Pancreatic Surgery, People's Hospital of Chongqing Liang Jiang New Area)

【Abstract】Objective: To investigate the level of milk fat globule-EGF factor VIII (MFG-E8) in plasma and the expression of MFG-E8 protein in the small intestine in rats with obstructive jaundice, and to determine whether supplementation of MFG-E8 can reduce apoptosis and permeability damage of the intestinal mucosa in rats with obstructive jaundice. **Methods:** The rat model of obstructive jaundice was established by common bile duct ligation (BDL). Thirty-two male adult SD rats were randomly divided into sham operation group (sham group), obstructive jaundice group (BDL group), MFG-E8 treatment group (MFG-E8 group), and treatment control group (vehicle group). The MFG-E8 group and vehicle group were intraperitoneally injected with MFG-E8 (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) or an equal volume of normal saline on the 1st, 3rd, and 5th days after BDL. Blood and tissue samples were collected on the 7th day after modeling. Western blot was used to determine plasma MFG-E8 levels, intestinal MFG-E8 protein expression, and intestinal cleaved caspase-3 levels. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling assay was used to observe the apoptosis of intestinal cells.

Fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-D) was used to assess intestinal mucosal permeability. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine plasma tumor necrosis factor alpha (TNF- α) levels. **Results:** Compared with the sham group, the BDL group had significantly decreased plasma MFG-E8 level and MFG-E8 protein expression level in the small intestine (5.675 ± 0.638 vs. 3.087 ± 0.272 , $P=0.001$; 1.24 ± 0.157 vs. 0.484 ± 0.090 , $P=0.000$). Com-

作者介绍: 郭 勇, Email: 21617675@qq.com,

研究方向: 肝胆胰外科。现为重庆市长寿区人民医院肝胆外科副主任医师。

通信作者: 杨俊涛, Email: yangjuntao2023@163.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(编号: CSTC, 2008BB0017)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20231008.0842.004>

(2023-10-10)

pared with the vehicle group, the MFG-E8 group had significantly decreased apoptosis ratio of small intestinal cells and expression of cleaved caspase-3 protein (22.333 ± 5.085 vs. 14.467 ± 3.722 , $P=0.048$; 0.887 ± 0.132 vs. 0.582 ± 0.145 , $P=0.024$). The FITC-D and plasma TNF- α levels in the vehicle group were significantly higher than those in the sham group (4.515 ± 0.601 vs. 1.519 ± 0.346 , $P=0.000$; 233.84 ± 21.21 vs. 78.24 ± 13.75 , $P=0.000$). The FITC-D level in the MFG-E8 group (2.826 ± 0.588) was significantly lower than that in the vehicle group ($P=0.000$). Compared with the vehicle group, the plasma level of TNF- α (109.90 ± 24.06) in the MFG-E8 group was significantly decreased by 53% ($P=0.000$). **Conclusion:** MFG-E8 supplementation significantly attenuates apoptosis and permeability damage of the intestinal mucosa, as well as systemic inflammatory responses in rats with obstructive jaundice.

[Key words] milk fat globule-EGF factor VIII; obstructive jaundice; apoptosis; intestinal mucosal permeability

梗阻性黄疸是肝胆胰外科常见的病理状态,其中肠屏障功能损害、肠黏膜通透性增加和肠道细菌移位是梗阻性黄疸患者容易发生脓毒血症和器官损害的主要发病机制,而肠道黏膜凋亡指数的显著升高,可能是梗阻性黄疸肠屏障功能损害的一个重要的因素^[1-2]。

乳脂球上皮生长因子-8(milk fat globule-EGF factor VIII, MFG-E8)是一种细胞分泌的糖蛋白,具有多种生物学作用,其重要的功能之一是介导对凋亡细胞的清除。MFG-E8在吞噬细胞和凋亡细胞间作为桥梁^[3],促进对凋亡细胞的吞噬,维持机体免疫平衡。研究发现,MFG-E8可通过调节对凋亡细胞吞噬,减少炎症因子的释放^[4],因此在抗炎的过程中发挥重要的作用。

脓毒症、缺血再灌注损伤的动物实验显示^[5-6], MFG-E8在组织中的表达下降,势必削弱对凋亡细胞的清除,补充MFG-E8明显减轻了组织损伤和全身炎症反应。然而,在梗阻性黄疸状态下,血浆MFG-E8水平、组织中MFG-E8表达情况,以及对梗阻性黄疸病理生理发生发展的作用,目前尚不清楚。本实验旨在研究梗阻性黄疸大鼠MFG-E8的表达,以及补充MFG-E8能否减轻梗阻性黄疸大鼠肠道组织细胞凋亡、肠黏膜通透性损害和全身炎症反应。

1 材料与方法

1.1 动物

健康成年雄性SD大鼠,体质量(180 ± 20) g,由陆军军医大学野战外科研究所动物室提供,于实验前1周饲养在灯光控制12 h白昼变换、温度22℃、湿度75%的房间以适应环境,自由饮水和进标准食物。

1.2 主要仪器与试剂

仪器:分光光度计(美国Beckman公司),电泳仪及电泳槽(美国BioRad公司),可见光/紫外凝胶扫描分析系统(美国

UVP公司),激光共聚焦显微镜(德国蔡司公司);试剂:仓鼠抗鼠MFG-E8一抗(日本MBL公司),小鼠抗 β -actin一抗(美国Novus Biologicals公司),辣根过氧化物酶标记的羊抗仓鼠二抗(美国Santa Cruz公司),Alexa Fluor 546标记的羊抗仓鼠二抗(美国Molecular Probes公司),羊抗小鼠二抗(美国sigma公司),DAPI(中国碧云天公司),重组大鼠MFG-E8(rmMFG-E8)(20 μ g/kg BW, R&D, USA)。

1.3 主要方法

1.3.1 实验分组及模型的建立 动物随机分为假手术组(Sham组)、梗阻性黄疸组(BDL组)、MFG-E8治疗组(MFG-E8组)、治疗对照组(Vehicle组),每组8只。梗阻性黄疸通过结扎胆总管完成。在实验之前,雄性SD大鼠被禁食整晚,仅给自由饮水;操作步骤:腹腔注射麻醉(3%戊巴比妥,0.2 mL/100 g),上腹正中线切口长约2 cm入腹,显露胆总管,2-0丝线双重结扎,并于两结扎线之间切断,连续缝合腹膜,分层关腹,并按3 mL/100 g体质量皮下注射生理盐水,动物苏醒后放回笼中自由进食饮水;假手术动物除了不结扎切断胆总管外,需完成其余相同的手术步骤。建模后第7天,收集血及肠道组织标本。

1.3.2 Western blot检测血浆MFG-E8蛋白水平 抽取血液样品后加入Aprotinin(1:10 000, Amresco)抑制蛋白降解,离心取血浆待检测。取10 μ L蛋白样品用11% SDS-PAGE凝胶电泳70伏分离3~4 h,再将胶中分离的蛋白区带电泳转移到硝酸纤维素膜上,然后将硝酸纤维素膜用含6%脱脂奶粉的PBS封闭1 h,取出封闭后的硝酸纤维素膜置于含仓鼠抗小鼠MFG-E8 IgG(1:250, MBL Inc.)的胎牛血清封闭液中,4℃摇床孵育过夜, pH7.2的PBS缓冲液洗膜3次,每次10 min;再将硝酸纤维素膜置于含辣根过氧化物酶标记的羊抗仓鼠IgG(1:1 000, Santa Cruz Biotechnology Inc.)中室温摇床孵育1 h,洗膜3次,将已用二抗标记了的膜与ECL化学发光试剂反应,曝光后显影。用Labworks™ Analysis Software软件测条带灰度值,计算目的蛋白相对比值。

1.3.3 Western blot检测组织MFG-E8蛋白表达 取小肠组织各0.2 g加入蛋白裂解液(Tris-HCL 50 mmol/L, Triton X-100 0.1%, EDTA 1 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, NaF 10 mmol/L, Na_3VO_4 2 mmol/L, β -巯基乙醇 10 mmol/L)提取组织总蛋白,用考马斯亮蓝法进行蛋白定量。取10 μ L蛋白样品用11% SDS-PAGE凝胶电泳70伏分离3~4 h,再将胶中分离的

蛋白区带电泳转移到硝酸纤维素膜上,然后将硝酸纤维素膜用含 6% 脱脂奶粉的 PBS 封闭 1 h,取出封闭后的硝酸纤维素膜置于含鼠抗大鼠 MFG-E8 IgG (1:1 000; MBL Inc.) 的胎牛血清封闭液中,4 °C 摇床孵育过夜, pH 7.2 的 PBS 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min;再将硝酸纤维素膜置于含辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (1:2 500, Santa Cruz Biotechnology Inc.) 中室温摇床孵育 1 h,洗膜 3 次,将已用二抗标记了的膜与 ECL 化学发光试剂反应,曝光后显影。用 Labworks™ Analysis Software 软件测条带灰度值,计算目的基因与 β -actin 的灰度比值。

1.3.4 MFG-E8 施药方法 分别于 BDL 后第 1、3、5 天经腹腔注入 0.2 mL rmMFG-E8 (20 μ g/kg BW, R&D, USA) (MFG-E8 组) 或相同剂量的生理盐水 (Vehicle 组)^[7],于 BDL 后第 7 天收集血液及组织标本用于各种检测。

1.3.5 原位末端转移酶标记 (TUNEL) 法观察组织细胞凋亡情况 组织切片分别放入二甲苯 I 7 min、二甲苯 II 5 min、无水乙醇 8 min、95% 乙醇 3 min、90% 乙醇 3 min、85% 乙醇 3 min。用吸水纸将组织周围水擦干,并将组织上的水甩干,用蛋白酶 K (20 μ g/mL 溶于 Tris/HCl 中, pH 7.4~8.0) 将其充分覆盖。室温孵育 20 min 后甩干液体, PBS 振荡洗片 3 次,滴加 TUNEL 反应液 (Roche Inc. USA) 于组织上,将其完全覆盖。室温孵育 1 h,用 PBS 振荡洗片 3 次,3 min/次,吸水纸将组织周围的水擦干,甘油封片,4 °C 湿盒避光保存,激光共聚焦显微镜观察。在激光共聚焦显微镜下, TUNEL 阳性细胞发绿色荧光,随机选取 5 个高倍镜视野 ($\times 400$) 计数阳性细胞。

1.3.6 Western blot 检测组织 Cleaved Caspase-3 水平 取小肠各 0.2 g 加入蛋白裂解液 (Tris-HCl 50 mmol/L, Triton X-100 0.1%, EDTA 1 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, NaF 10 mmol/L, Na_3VO_4 2 mmol/L, β -巯基乙醇 10 mmol/L) 提取组织总蛋白,用考马斯亮蓝法进行蛋白定量。取 10 μ L 蛋白样品用 11% SDS-PAGE 凝胶电泳 70 伏分离 3~4 h,再将胶中分离的蛋白区带电泳转移到硝酸纤维素膜上,然后将硝酸纤维素膜用含 6% 脱脂奶粉的 PBS 封闭 1 h,取出封闭后的硝酸纤维素膜置于含兔抗 Cleaved Caspase-3 (1:1 000, Cell signaling Inc.) 的胎牛血清封闭液中,4 °C 摇床孵育过夜, pH 7.2 的 PBS 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min;再将硝酸纤维素膜置于辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (1:2 500, Sigma-Aldrich Inc.) 中室温摇床孵育 1 h,洗膜 3 次,将已用二抗标记了的膜与 ECL 化学发光试剂反应,曝光后显影。用 Labworks™ Analysis Software 软件测条带灰度值,计算目的基因与 β -actin 的灰度比值。

1.3.7 异硫氰酸荧光素标记葡聚糖 (fluorescein isothiocyanate-dextran, FITC-D) 法评估肠黏膜通透性 采用 FITC-D 法检测大鼠肠黏膜通透性^[7]。实验动物麻醉后,近回盲瓣 5 cm 的末端回肠两端约 10 cm 进行结扎,再向结扎段肠腔内注入 0.5 mL FITC-D 溶液 (20 mg/mL, 用 0.1 mmol/L PBS 液配制, pH 7.2),操作过程中注意勿损伤肠系膜血管,并防止

FITC-D 液体泄漏,30 min 后立即取门静脉血 1 mL,4 °C 下 3 000 r/min 离心 10 min 分离血浆,取血浆 200 μ L 用荧光分光光度计测定其荧光强度,其中激发波长 480 nm,发射波长为 520 nm,根据标准曲线换算成 FITC-D 的血浆浓度,以门静脉血 FITC-D 的荧光强度表示肠黏膜通透性。

1.3.8 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血浆 TNF- α 水平 按试剂盒说明书 (NEOBIO SCIENCE Inc, CHINA),将密封袋平衡至室温,取出实验用的板条。空白孔加通用稀释液,其余孔加样本与预设好的不同浓度标准品 (100 μ L/孔),封住各反应孔,置 36 °C 孵育箱 90 min。准备生物素化的抗体工作液。用配置好的 1 \times 洗涤液洗涤 5 次。按说明书依次加入生物素化抗体工作液、酶结合物工作液、显示底物 TMB、终止液,混匀后立即测 OD_{450 nm} 值。

1.4 统计学方法

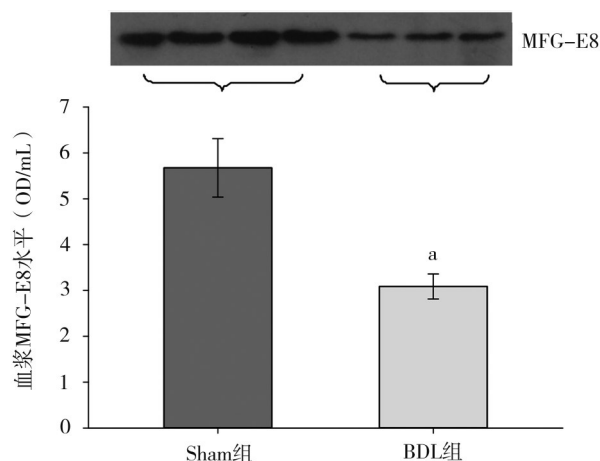
采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。计量资料服从正态分布用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。2 组比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 梗阻性黄疸后 MFG-E8 表达的变化

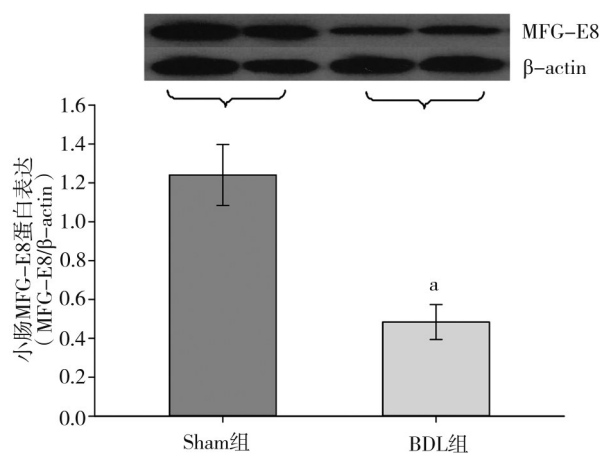
采用 Western blotting 检测, Sham 组血浆 MFG-E8 蛋白水平为 (5.68 ± 0.64) OD/mL, BDL 组为 (3.09 ± 0.27) OD/mL。BDL 组血浆 MFG-E8 蛋白水平较 Sham 组明显降低 ($t=6.478$, $P=0.001$) (图 1),降幅为 45.60%。

以 β -actin 为内参,定量分析 Sham 组和 BDL 组小肠组织 MFG-E8 的蛋白表达分别为 1.24 ± 0.16 、 0.48 ± 0.09 。与 Sham 组比较, BDL 组小肠组织 MFG-E8 蛋白表达下降了 61.29% ($t=7.432$, $P=0.000$) (图 2)。



注: a, 与 Sham 组比较, $P<0.05$

图 1 梗阻性黄疸大鼠血浆 MFG-E8 蛋白水平变化 ($\bar{x} \pm s$, Sham 组 $n=4$, BDL 组 $n=3$)

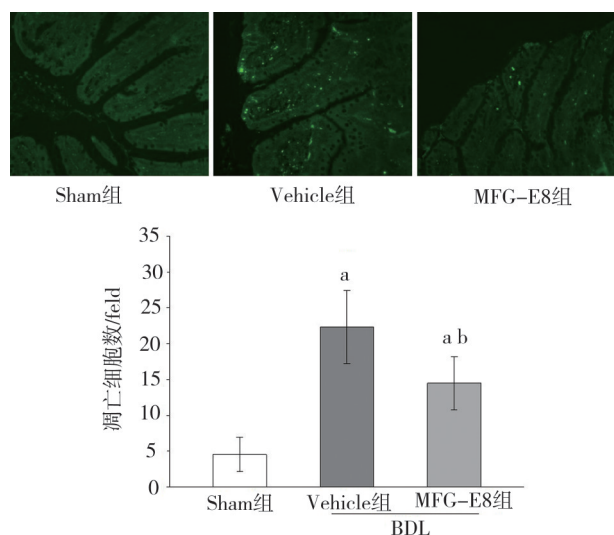


注:a,与Sham组比较, $P<0.05$

图2 梗阻性黄疸大鼠小肠组织MFG-E8蛋白表达
($\bar{x} \pm s$, Sham组 $n=4$, BDL组 $n=3$)

2.2 补充rmMFG-E8减轻了梗阻性黄疸后肠道组织细胞凋亡

采用TUNEL法观察组织细胞凋亡情况,Sham组、Vehicle组和MFG-E8组小肠组织中凋亡细胞的数量分别为 4.53 ± 2.40 、 22.33 ± 5.09 、 14.47 ± 3.72 ,方差分析3组凋亡细胞数量的差异具有统计学意义($F=15.745$, $P=0.004$)。与Sham组比较,Vehicle组小肠组织凋亡细胞明显增多($P=0.003$);与Vehicle组比较,MFG-E8组小肠组织凋亡细胞明显减少($P=0.048$)(图3)。

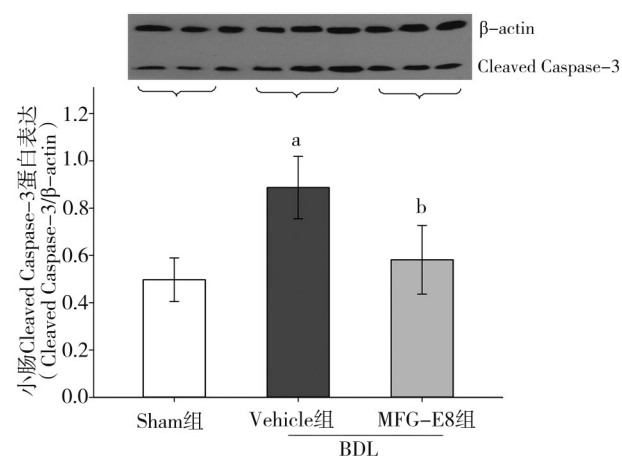


注:a,与Sham组比较, $P<0.05$;b,与Vehicle组比较, $P<0.05$

图3 梗阻性黄疸大鼠小肠组织中凋亡细胞的变化,绿色荧光细胞为凋亡细胞($\bar{x} \pm s$, $n=3$, $200 \times$)

Western blot结果显示,Sham组、Vehicle组和MFG-E8组小肠组织Cleaved Caspase-3蛋白相对表达水平分别为 0.50 ± 0.09 、 0.89 ± 0.13 、 0.58 ± 0.15 ,方差分析3组Cleaved Caspase-3蛋白表达的差异具有统计学意义($F=8.073$, $P=$

0.020)。与Sham组比较,Vehicle组Cleaved Caspase-3蛋白表达明显升高($P=0.021$);与Vehicle组比较,MFG-E8组小肠Cleaved Caspase-3蛋白表达明显降低($P=0.024$)(图4)。

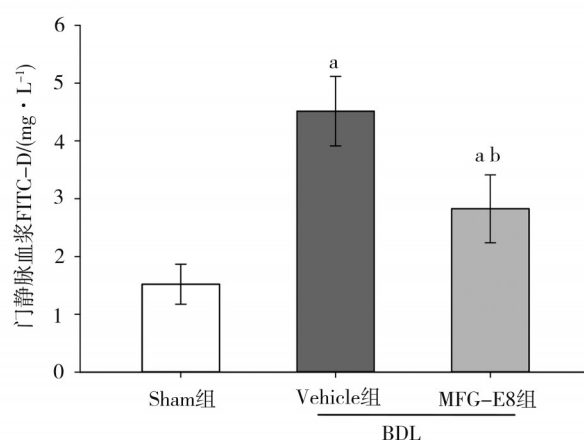


注:a,与Sham组比较, $P<0.05$;b,与Vehicle组比较, $P<0.05$

图4 梗阻性黄疸大鼠小肠组织Cleaved Caspase-3蛋白表达
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.3 补充rmMFG-E8减轻了梗阻性黄疸后肠黏膜屏障损害

通过检测大鼠门静脉血浆FITC-D水平评估肠黏膜通透性,Sham组、Vehicle组和MFG-E8组FITC-D水平分别为 (1.52 ± 0.35) mg/L、 (4.52 ± 0.60) mg/L、 (2.83 ± 0.59) mg/L,方差分析3组差异有统计学意义($F=65.473$, $P=0.000$)。与Sham组比较,Vehicle组FITC-D水平明显升高($P=0.000$);补充rmMFG-E8后,MFG-E8组FITC-D水平较Vehicle组降低了37.39%($P=0.000$)(图5),提示大鼠肠黏膜通透性明显改善。



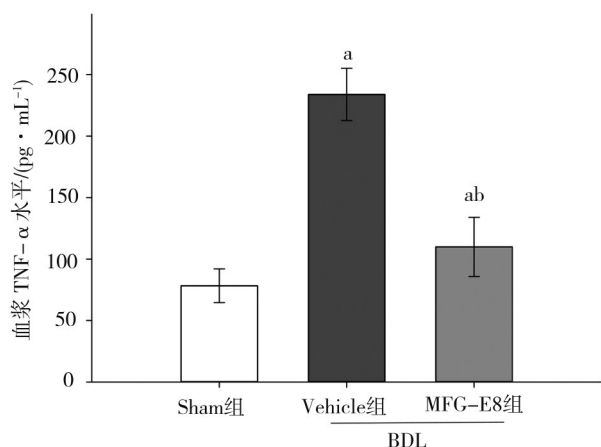
注:a,与Sham组比较, $P<0.05$;b,与Vehicle组比较, $P<0.05$

图5 梗阻性黄疸大鼠门静脉血浆FITC-D水平变化($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

2.4 补充rmMFG-E8下调了梗阻性黄疸后血浆TNF-α水平

Sham组、Vehicle组、MFG-E8组的TNF-α水平分别为 (78.24 ± 13.75) pg/mL、 (233.84 ± 21.21) pg/mL、 (109.90 ± 24.06) pg/mL,方差分析3组差异有统计学意义($F=133.305$,

$P=0.000$)。与 Sham 组比较,梗阻性黄疸第 7 天 Vehicle 组血浆 TNF- α 水平明显升高($P=0.000$);与 Vehicle 组比较,MFG-E8 组血浆 TNF- α 水平明显降低达 53%($P=0.000$)(图 6)。



注:a,与 Sham 组比较, $P<0.05$;b,与 Vehicle 组比较, $P<0.05$

图 6 梗阻性黄疸大鼠血浆中 TNF- α 水平的变化($\bar{x} \pm s, n=8$)

3 讨论

凋亡细胞异常增多是梗阻性黄疸后体内组织器官出现的重要病理变化之一。Zhang XP^[8]等在梗阻性黄疸大鼠中观察到小肠黏膜凋亡指数增高,可能是肠屏障功能损害的一个重要的环节。另有报道在大鼠胆总管结扎术后,脾脏和胸腺细胞凋亡指数明显升高,而免疫细胞凋亡增多,势必影响机体的免疫功能^[9]。梗阻性黄疸后凋亡细胞异常增加的病理生理机制较为复杂,目前尚不完全清楚,其原因可能与凋亡细胞产生增加和清除受到抑制均有关系。

MFG-E8 蛋白于 1990 年首次被发现位于小鼠乳脂球膜上^[10],是一个分子量 66 kDa 的糖蛋白。MFG-E8 的分子结构中包含 N 端 2 个 EGF 结构域,C 端 2 个 discoidin 结构域,其中 discoidin 结构域与血液中的 V、Ⅷ因子同源^[11],第 2 个 EGF 结构域包含与整合素结合的 RGD 序列,可通过与整合素 $\alpha\beta_3/\alpha v\beta_3$ 结合而促进细胞黏附,调节整合素下游的细胞转导^[12]。研究证实,MFG-E8 具有多种生理功能,其中重要的作用是参与巨噬细胞、树突细胞等免疫细胞对凋亡细胞的吞噬和清除^[13],避免细胞坏死后释放有毒的和具有免疫原性的物质,这个过程对维持机体正常免疫平衡非常重要^[14]。

在缺血再灌注、放射性肠炎、脓毒症的实验研

究中^[3,5-6,15],MFG-E8 已经显示出具有抗炎性保护治疗作用的潜力。Wu R 等^[6]在肠缺血再灌注损伤小鼠实验中发现,rmMFG-E8 能增强肠道凋亡细胞清除、减轻细菌易位、抑制中性粒细胞浸润并促进肠道缺血再灌注后的组织修复。在大鼠全身照射模型中^[15],补充 rmMFG-E8 可减少肠道细胞凋亡和炎症反应,并降低大鼠死亡率。新近的脓毒症诱发急性器官损伤的实验显示^[16-17],补充 MFG-E8 明显减轻了肺、肾等组织细胞凋亡和病理损害程度,降低了血浆 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等炎症介质的升高幅度。本课题组实验发现,梗阻性黄疸大鼠血浆 MFG-E8 蛋白水平明显下降,小肠组织 MFG-E8 蛋白表达明显降低,提示 MFG-E8 可能参与了梗阻性黄疸大鼠病理生理的发展过程;经腹腔注入 rmMFG-E8 可以明显减少梗阻性黄疸大鼠小肠组织中的细胞凋亡;同时,肠黏膜通透性得到显著改善,血浆 TNF- α 水平升幅明显降低。结果表明,补充 rmMFG-E8 可明显改善梗阻性黄疸大鼠肠屏障功能,降低全身炎症反应。

生理状态下,凋亡细胞的继发性坏死可通过组织和循环中的吞噬细胞快速清除来预防,由此避免凋亡细胞释放危险内容物(例如细胞因子、酶等)对机体的潜在危害。MFG-E8 发挥有益作用的一种可能机制,就是介导和促进吞噬细胞去除可能泄漏有毒和促炎内容物的垂死细胞^[6]。本课题组分析认为,梗阻性黄疸诱导多种细胞凋亡,同时通过下调 MFG-E8 表达,降低凋亡细胞清除率,导致凋亡细胞的积累并继发性坏死,可能是梗阻性黄疸后肠道组织受损、全身炎症反应发生发展的机制之一。补充 rmMFG-E8 增强了凋亡细胞的清除,进而减轻梗阻性黄疸后的机体促炎反应和肠黏膜通透性损害。

在小鼠脓毒症急性肾损伤实验中^[17],腹腔注射 rmMFG-E8 明显减轻肾脏病理改变的同时,还显著减弱了 NF- κ B 信号通路的激活,提示 MFG-E8 对急性肾损伤的有益作用机制可能是通过抑制 NF- κ B 信号传导实现的。Aziz M 等^[18]通过 LPS 刺激腹腔巨噬细胞观察 MFG-E8 的抗炎作用,发现 rmMFG-E8 预处理上调了 STAT3 靶基因 SOCS3 表达,降低了 LPS 诱导的 NF- κ B p65 含量,SOCS3 与 NF- κ B p65 相互作用,促进了 TLR4 信号传导对 LPS 诱导 TNF- α 产生的负调节。糖尿病小鼠相关肠损伤实验表明^[19],MFG-E8 与肠道炎症之间可能存在负调节机

制,上调 MFG-E8 导致炎症反应的减轻可部分归因于受体相互作用蛋白(receptor-interacting proteins, RIPs)通路的抑制。上述研究提示,MFG-E8 除了通过清除凋亡细胞发挥抗炎作用,很可能是一种直接的抗炎分子,通过多种途径和机制参与机体炎症反应的调节。

总之,本课题组实验证实,梗阻性黄疸大鼠 MFG-E8 血浆水平降低、肠道组织表达减少,补充外源性 rmMFG-E8 可以明显降低肠道细胞凋亡,改善肠屏障通透性,减轻全身炎症反应。它为梗阻性黄疸的治疗提供了一种新的策略,具有潜在的指导意义。但 MFG-E8 在梗阻性黄疸中的具体作用机制尚不明晰,这也是本课题组下一步研究的目标之一。

参 考 文 献

- [1] Zhou YK, Qin HL, Zhang M, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* on gut barrier function in experimental obstructive jaundice[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(30):3977-3991.
- [2] Pavlidis ET, Pavlidis TE. Pathophysiological consequences of obstructive jaundice and perioperative management[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2018, 17(1):17-21.
- [3] Matsuda A, Jacob A, Wu R, et al. Milk fat globule-EGF factor VIII in sepsis and ischemia-reperfusion injury[J]. *Mol Med*, 2011, 17(1-2):126-133.
- [4] Miksa M, Amin D, Wu R, et al. Maturation-induced down-regulation of MFG-E8 impairs apoptotic cell clearance and enhances endotoxin response[J]. *Int J Mol Med*, 2008, 22(6):743-748.
- [5] Hansen LW, Khader A, Yang WL, et al. Deficiency in milk fat globule-epidermal growth factor-factor 8 exacerbates organ injury and mortality in neonatal sepsis[J]. *J Pediatr Surg*, 2017, 52(9):1520-1527.
- [6] Wu R, Dong W, Wang Z, et al. Enhancing apoptotic cell clearance mitigates bacterial translocation and promotes tissue repair after gut ischemia-reperfusion injury[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(3):593-598.
- [7] Chogle A, Bu HF, Wang X, et al. Milk fat globule-EGF factor 8 is a critical protein for healing of dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice[J]. *Mol Med*, 2011, 17(5/6):502-507.
- [8] Zhang XP, Jiang J, Yu YP, et al. Effect of Danshen on apoptosis and NF- κ B protein expression of the intestinal mucosa of rats with severe acute pancreatitis or obstructive jaundice[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2010, 9(5):537-546.
- [9] Zhang XP, Li CY, Zhang J, et al. Protection of *Salvia miltiorrhizae* to the spleen and thymus of rats with severe acute pancreatitis or obstructive jaundice[J]. *Mediators Inflamm*. 2009; 2009: 186136. doi: 10.1155/2009/186136. Epub 2009 Nov 16.
- [10] Stubbs JD, Lekutis C, Singer KL, et al. cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor VIII-like sequences[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87(21):8417-8421.
- [11] Aoki N, Kishi M, Taniguchi Y, et al. Molecular cloning of glycoprotein antigens MGP57/53 recognized by monoclonal antibodies raised against bovine milk fat globule membrane[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1245(3):385-391.
- [12] Andersen MH, Graversen H, Fedosov SN, et al. Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin[J]. *Biochemistry*, 2000, 39(20):6200-6206.
- [13] Bu HF, Zuo XL, Wang X, et al. Milk fat globule-EGF factor 8/lactadherin plays a crucial role in maintenance and repair of murine intestinal epithelium[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(12):3673-3683.
- [14] Asano K, Miwa M, Miwa K, et al. Masking of phosphatidylserine inhibits apoptotic cell engulfment and induces autoantibody production in mice[J]. *J Exp Med*, 2004, 200(4):459-467.
- [15] Ajakaiye MA, Jacob A, Wu R, et al. Recombinant human MFG-E8 attenuates intestinal injury and mortality in severe whole body irradiation in rats[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10):e46540.
- [16] Hansen LW, Yang WL, Bolognese AC, et al. Treatment with milk fat globule epidermal growth factor-factor 8 (MFG-E8) reduces inflammation and lung injury in neonatal sepsis[J]. *Surgery*, 2017, 162(2):349-357.
- [17] Zhao Y, Wang Q, Zang B. Milk fat globule-epidermal growth factor 8 (MFG-E8) attenuates sepsis-induced acute kidney injury by inhibiting NF- κ B signaling pathway[J]. *Acta Cir Bras*, 2019, 34(2):e201900209.
- [18] Aziz M, Jacob A, Matsuda A, et al. Pre-treatment of recombinant mouse MFG-E8 downregulates LPS-induced TNF- α production in macrophages via STAT3-mediated SOCS3 activation[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11):e27685.
- [19] Hua X, Li B, Yu F, et al. Protective Effect of MFG-E8 on Necroptosis-Induced Intestinal Inflammation and Enteroendocrine Cell Function in Diabetes[J]. *Nutrients*, 2022, 14(3):604.

(责任编辑:冉明会)