

JNK 信号通路在小鼠术后肠麻痹发病机制中的作用

张瑞琴^{1,2}, 林思思¹, 陈春球³, 李 琨¹, 李永渝¹

(1. 同济大学医学院病理生理学教研室—同济大学消化系统疾病研究所, 上海 200092; 2. 山西医科大学第二医院西院病理科, 太原 030053; 3. 同济大学附属第十人民医院外科, 上海 200072)

【摘要】目的 探讨 JNK 信号通路在小鼠术后肠麻痹(POI)发病机制中的作用。方法 将野生型 C57/BL6 小鼠(WT)及同品系的 JNK^{-/-}小鼠均随机分成假手术组(Sham 组, $n=6$)和肠麻痹组(POI 组, $n=6$)。采用经典小肠操作方法诱导 POI 模型, 术后 24 h 给小鼠碳末灌胃, 20 min 后麻醉小鼠, 开腹取小肠评估肠动力, 取回肠评估组织学改变, 检测髓过氧化物酶(MPO)、IL-1 β 、IL-6 水平及 Claudin-2 蛋白表达。结果 与 Sham 组小鼠相比, 无论 WT 或 JNK^{-/-}小鼠其 POI 组的小肠排推率(分别为 21%与 33%)均明显降低($P=0.034$ 及 $P=0.045$, 均 $P<0.05$), 小肠组织 MPO 活性水平(分别为 0.608 U/g 与 0.433 U/g)明显升高(均 $P<0.05$); 与 WT 小鼠 POI 组比较, JNK^{-/-}小鼠 POI 组的小肠运动功能及其组织病理变化有所改善, 炎症介质如 MPO、IL-1 β 及 IL-6 水平均有明显降低(均 $P<0.05$), 小肠 Claudin-2 蛋白表达也降低($P<0.01$)。结论 JNK 基因敲除减轻小鼠肠道炎症反应、改善 POI, 表明 JNK 信号通路参与 POI 的发病过程。

【关键词】 术后肠麻痹; 小鼠; 炎症介质; JNK 信号通路

【中图分类号】 R574 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1008-0392(2019)01-0034-05

Roles of JNK signaling pathway in murine postoperative ileus

ZHANG Rui-qin^{1,2}, LIN Si-si¹, CHEN Chun-qiu³, LI Kun¹, LI Yong-yu¹

(1. Dept. of Pathophysiology-Institute of Digestive Disease, Medical College, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Dept. of Pathology, West Branch of The Second Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan 030053, Shanxi Province, China; 3. Dept. of Surgery, Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China)

【Abstract】Objective To explore the roles of JNK signaling pathway in the murine postoperative ileus(POI). **Methods** The wild-type (WT) C57/BL6 mice and JNK knockout(JNK^{-/-}) mice of the same strain were randomly divided into sham operation group(Sham group, $n=6$) and POI group($n=6$). The POI model was induced by the classical small bowel manipulation. Mice were treated with a charcoal marking mixture by oral gavage after 24 h and then sacrificed with anesthesia 20 min later. The whole small intestines were harvested. The intestinal motility and the histological changes of the ileum were evaluated, the levels of myeloperoxidase(MPO), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 in ileum were measured, the expression of Claudin-2 protein was determined. **Results** Compared with the sham group, the gastrointestinal transit was significantly decreased($P<0.05$), and the MPO activity level of the small intestine was significantly increased($P<0.05$) both in the WT mice and JNK^{-/-} mice POI groups. Compared with WT POI mice, the gastrointestinal transit and the intestinal pathological changes

收稿日期: 2018-10-18

基金项目: 国家自然科学基金(31571181); 上海市卫计委科研课题(201540382)

作者简介: 张瑞琴(1985—), 女, 硕士.E-mail: 2014zrq@tongji.edu.cn

通信作者: 李永渝.E-mail: liyongyu@tongji.edu.cn

were improved, and the levels of MPO, IL-1 β and IL-6, and the expression of Claudin-2 protein in the intestinal tissue were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) in JNK^{-/-} POI mice. **Conclusion** The knockout of JNK gene alleviates intestinal inflammation in mice and improves POI, indicating that JNK signaling pathway may be involved in the pathogenesis of POI.

【Key words】 postoperative ileus; mice; inflammatory factors; JNK signaling pathway

术后肠麻痹(postoperative ileus, POI)是指腹部或非腹部手术引起的胃肠运动功能紊乱,以腹痛、腹胀、恶心、呕吐及排气排便延迟为主要症状^[1]。POI的发生增加了患者术后并发症的发生率,导致部分患者住院时间延长和医疗费用增加^[2]。迄今为止,POI的发病机制仍未完全阐明,因此,对POI发病机制的研究可望为其有效防治提供理论和实验依据。

研究揭示,炎症反应是参与POI发生发展的主要机制之一。核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)等炎症相关信号通路的激活,导致大量炎症介质的释放,包括肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6、单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)等^[3-5]。这些炎症介质以及炎细胞的浸润引起肠道组织尤其是肠道肌层受损,进而干扰肠道运动功能;此外,持续的炎症反应还可引起肠屏障损伤,进一步引起局部炎症反应的蔓延,加重肠道病变,严重时甚至引起全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)及多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),从而危及生命^[6]。p38MAPK和c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路是MAPK信号通路中两个主要的分支。研究^[4-5]发现,p38MAPK参与了POI的炎症反应,JNK信号通路在多种炎症性疾病中的作用已有报道^[7-8],然而其在POI发病中的作用仍不清楚。

本实验通过采用经典的小肠干扰术(intestinal manipulation, IM),在C57/BL6野生型(wide type, WT)和同品系的JNK基因敲除(JNK^{-/-})小鼠诱导肠麻痹模型,通过检测小肠排推率、组织病理学改变、炎症介质水平以及连接蛋白Claudin-2表达水平,初步探讨JNK信号通路在POI发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年C57/BL6 WT小鼠及其相同背景的JNK^{-/-}小鼠各12只,体质量18~23 g,雌雄各半,由上海海军军医大学病理生理教研室章卫平教授提供。动物饲养于同济大学动物实验中心无特定病原体级(SPF级)动物房,室温(25 \pm 3) $^{\circ}$ C、湿度55% \pm 5%,保持12 h光照,给予标准实验饮食、自由饮水。

1.2 主要试剂和仪器

MPO、IL-1 β 和IL-6的酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒均购自深圳达科为生物技术公司;Western印迹法产品购自碧云天生物技术公司;Claudin-2抗体购自美国Santa Cruz CST公司; β -actin抗体购自美国CMCTAG公司;抗小鼠抗体购自上海Abmart公司;抗兔抗体购自CWRIO公司;酶标仪购自美国Thermo Scientific公司;ImageQuant LAS 4000化学发光成像分析仪购自美国GE Healthcare公司。

1.3 方法

1.3.1 小鼠分组及POI模型构建 实验前小鼠禁食12 h禁水4 h,参照文献^[4]的方法诱导POI模型。WT和JNK^{-/-}小鼠随机各分为2组,每组6只:(1) POI组,用恩氟烷麻醉小鼠后仰卧置于手术台上,沿腹中线进行剖腹手术,轻柔提出小肠放到已浸泡过生理盐水的湿纱布上,用两根微湿的棉花棒头端对小肠从屈氏韧带到回肠末端来回触摸3次,每次来回约5 min,干扰共15 min后将小肠回纳入腹腔,双层缝合腹壁;(2) 假手术组(Sham组),开腹后仅轻柔地将小肠从腹腔取出并置于湿润的棉布,不对其进行触摸刺激。

1.3.2 肠道运动功能检测 小鼠腹部手术后24 h,参照文献^[9]方法分别给小鼠按每10 g体质量灌胃0.1 mL碳末-阿拉伯胶混悬液(10%碳末悬液:10%阿拉伯胶悬液),20 min后麻醉处死小鼠,立即开腹

取出胃幽门至盲肠端小肠,测量碳末移行距离和小肠总长度,小肠的排推率(%)=碳末移行距离/小肠总长度×100。

1.3.3 肠道病理组织学的观察 剪取约 1 cm 小鼠回肠肠段,固定于 4.2%~4.6% 甲醛溶液中,进行常规脱水、石蜡包埋、组织切片及苏木精-伊红(H-E)染色。光学显微镜下观察肠组织形态及局部炎症情况。

1.3.4 小肠炎症介质水平检测 取适量的小鼠回肠组织,并按照 MPO、IL-1 β 及 IL-6 的 ELISA 试剂盒产品说明书加入磷酸盐缓冲液(PBS)进行匀浆,2 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,取上清液并按试剂盒说明书进行加样和检测。

1.3.5 Western blotting 法检测小肠组织 Claudin-2 蛋白表达 取适量的小鼠回肠组织并加入蛋白裂解液,进行匀浆并使之充分裂解后,2 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,取上清液。使用蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,加入含十二烷基硫酸钠(SDS)的上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C 变性 10 min。参照文献[5]方法上样本量 25 μ g,完成 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及转聚偏氟乙烯(PVDF)膜操作,之后用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, TBST 洗涤后 PVDF 膜与一抗 Claudin-2 抗体(1:100 稀释)及 β -actin 抗体(1:5 000 稀释)在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。TBST 洗涤后 PVDF 膜在室温下与辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:5 000 稀释)孵育 1 h。化学发光法(ECL)显色后,使用 ImageQuant LAS 4000 化学发光成像分析仪曝光、采集图像,用 Image J 软件对 Western 印迹法结果进行灰度值半定量分析。

1.4 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。WT 或 JNK $^{-/-}$ 小鼠两组间分别进行两独立样本 *t* 检验,两种小鼠 POI 组之间采用双因素分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肠道运动功能的变化

两种小鼠 Sham 组之间的小肠排推率差异无统计学意义($P>0.05$);与各自的 Sham 组相比,两种小鼠造模后小肠排推率均明显下降($P<0.05$);然而,对于 POI 小鼠,JNK $^{-/-}$ 小鼠的小肠运动功能明显

好于 WT 小鼠的($P<0.05$),说明 JNK 基因敲除后可以改善小肠运动功能,见图 1。

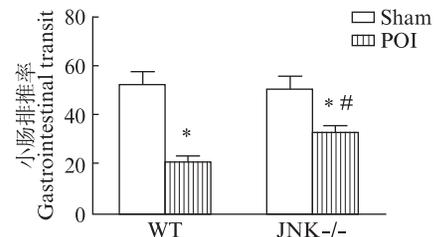


图 1 WT 和 JNK $^{-/-}$ 小鼠小肠排推率的变化
Fig.1 Alterations of gastrointestinal transit in WT and JNK $^{-/-}$ mice

与 Sham 组相比,* $P<0.05$;与 WT 的 POI 组相比,# $P<0.05$

2.2 小肠组织病理学的改变

WT 和 JNK $^{-/-}$ 小鼠的 Sham 组回肠黏膜绒毛及隐窝结构正常,黏膜内少量淋巴细胞及浆细胞浸润;POI 造模后,两种小鼠的回肠黏膜内存在大量淋巴细胞及浆细胞,黏膜下间质水肿。与 JNK $^{-/-}$ 小鼠 POI 组比较,WT 小鼠 POI 组病理改变更为严重,同时还有回肠黏膜绒毛结构紊乱,杯状细胞数量减少的情况,见图 2。

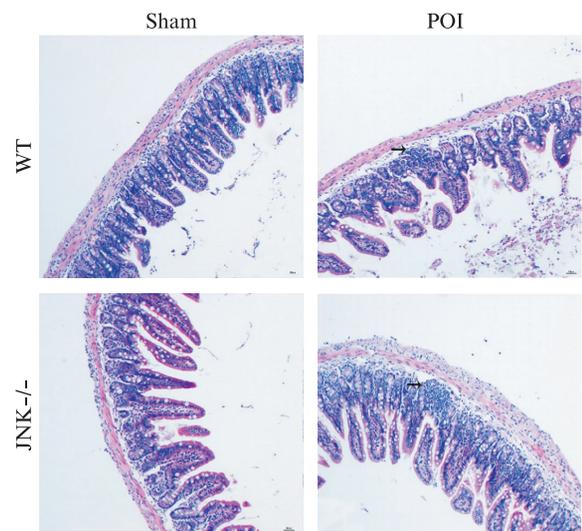


图 2 WT 和 JNK $^{-/-}$ 小鼠回肠病理学改变(H-E,×100)
Fig.2 Pathological changes in ileum of WT and JNK $^{-/-}$ mice(H-E,×100)

→所示淋巴细胞

2.3 各组小肠组织 MPO、IL-1 β 、IL-6 水平

POI 造模后,WT 小鼠回肠组织的炎症介质 MPO、IL-1 β 、IL-6 水平均明显升高($P<0.05$);JNK $^{-/-}$ 小鼠的 MPO 水平有明显增高($P<0.05$),但 IL-1 β 及 IL-6 水平升高不明显($P>0.05$);与 WT 造

模组的相比, $JNK^{-/-}$ 小鼠造模组回肠组织的 MPO、IL-1 β 、IL-6 水平均较低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3。

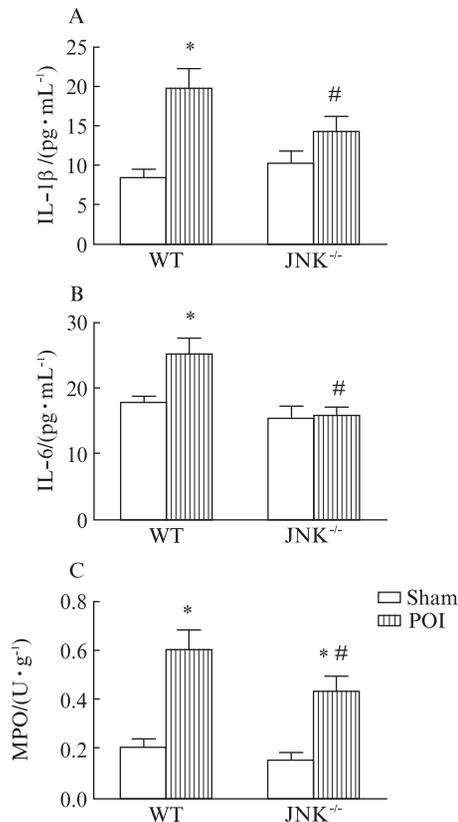


图 3 WT 和 $JNK^{-/-}$ 小鼠回肠炎症介质水平的改变

Fig.3 Levels of inflammatory mediators in ileum of WT and $JNK^{-/-}$ mice

与 Sham 对照组相比, * $P < 0.05$; 与 WT 的 POI 组相比, # $P < 0.05$

2.4 各组小肠 Claudin-2 连接蛋白的表达

与同种小鼠的 Sham 组 (WT 小鼠为 0.183 相对灰度值与 $JNK^{-/-}$ 小鼠为 0.199 相对灰度值) 相比, WT 小鼠 POI 组回肠 Claudin-2 蛋白表达 (0.337 相对灰度值) 明显增高 ($P = 0.036, P < 0.05$), 而 $JNK^{-/-}$ 小鼠 POI 组 (0.186 相对灰度值) 无此变化 ($P = 0.804, P > 0.05$)。而 WT 小鼠 POI 组回肠 Claudin-2 蛋白表达明显高于 $JNK^{-/-}$ 小鼠 POI 组 ($P = 0.004, P < 0.01$), 见图 4。

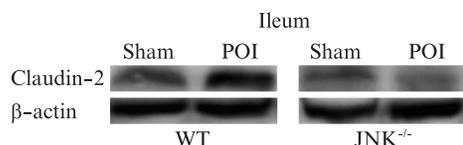


图 4 WT 和 $JNK^{-/-}$ 回肠 Claudin-2 蛋白的表达

Fig.4 Claudin-2 protein expression in ileum of WT and $JNK^{-/-}$ mice

3 讨 论

近年来, POI 发生机制的研究取得了一定的进展, 但仍未阐明。目前研究认为 POI 的发生发展主要与以下因素有关: 神经调节紊乱、炎性介质过量释放和胃肠激素分泌异常等^[10]。研究表明, 麻醉剂的使用、手术操作及疼痛等刺激引起交感神经过度兴奋, 抑制肠道平滑肌; 同时, 交感-副交感神经平衡失调, 抑制肌间神经丛兴奋和乙酰胆碱释放, 从而抑制术后肠运动, 但是神经机制的调控是个短暂的过程, 不能完全解释术后 3~5 d 的肠麻痹过程^[11-12]。20 世纪 90 年代, Kalff 等^[13] 研究发现, 肠道肥大细胞、巨噬细胞的激活及炎症反应在 POI 发生发展中具有重要作用, 并且肠道肌层的炎症反应程度是决定 POI 持续时间的关键因素之一。本课题组前期实验揭示, 持续性的炎症反应导致肠道肌层和肠屏障受损。MAPK 信号通路的激活导致大量炎症介质释放, 甚至从肠道通过血液系统扩散到全身^[5]。

肠道不仅仅是消化和吸收营养物质的主要器官, 而且具有重要的屏障功能, 在抵抗外来抗原物质对机体的侵袭、维持肠道稳态中发挥着重要作用。炎症介质及炎性细胞的浸润常是导致肠屏障受损的主要原因^[14-15]; 同时, 肠黏膜损伤、缺血、氧自由基产生、炎细胞激活, 均可引起肠黏膜通透性增加, 肠道微生物菌群失调, 进而引发或加重肠道炎症反应及免疫反应^[16]。肠屏障按功能特点分为机械、化学、生物及免疫屏障。肠黏膜上皮细胞间的紧密连接是肠上皮细胞间的主要连接方式, 属于机械屏障的重要组成部分。Claudin-2 作为一种紧密连接蛋白, 其表达水平与肠道通透性有关, 其表达水平升高提示肠道通透性升高, 一定程度上反映肠屏障功能的变化^[17]。本实验发现, Claudin-2 蛋白在 POI 小鼠的回肠组织表达明显升高, JNK 基因敲除的小鼠未见其增加, 这一结果和 Al-Sadi 等^[3] 的研究相符。这可能是由于 POI 的小肠炎症介质水平升高, 肠黏膜受损, 肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白进行重新分配, Claudin-2 蛋白表达升高, 肠道通透性增加。 JNK 敲除后减少炎症介质释放, 干扰 Claudin-2 蛋白表达。

本实验发现, POI 造模后, 小肠运动功能减弱, 回肠光镜下表现为肠黏膜轻度损伤及炎症改变, 回

肠炎症介质 MPO、IL-1 β 和 IL-6 水平的明显升高; JNK 基因敲除后,小肠运动能力有所改善,回肠病变减轻,炎症介质水平明显下降,提示 JNK 基因敲除可以减轻 POI 时肠道的病理变化,从而提示: JNK 信号通路参与 POI 炎症反应, JNK 基因敲除后该通路受到抑制,干扰了相关的炎症级联反应,使肠道组织损伤减轻,肠道运动功能得到改善。此外, JNK 信号通路对细胞凋亡有调控作用^[18],本实验发现 JNK 基因敲除小鼠在 POI 时肠黏膜损伤程度减轻,可能与其促进肠上皮细胞凋亡能力减弱也有关系。

综上所述, JNK 基因敲除能缓解或改善 POI 小肠的运动功能以及组织的炎症病理变化,提示 JNK 信号通路通过参与炎症反应,在 POI 发病机制中起着一定的作用。

【参考文献】

[1] VATHER R, BISSETT I. Management of prolonged post-operative ileus: evidence-based recommendations [J]. ANZ J Surg, 2013,83(5) : 319 - 324.

[2] DOORLY M G, SENAGORE A J. Pathogenesis and clinical and economic consequences of postoperative ileus [J]. Surg Clin North Am, 2012,92(2) : 259 - 272, viii.

[3] AL-SADI R, YE D, BOIVIN M, et al. Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of claudin-2 gene [J]. PLoS One, 2014,9(3) : e85345.

[4] LI Y Y, CAO M H, GOETZ B, et al. The dual effect of cannabinoid receptor-1 deficiency on the murine post-operative ileus [J]. PLoS One, 2013,8(7) : e67427.

[5] LIN S S, ZHANG R Q, SHEN L, et al. Alterations in the gut barrier and involvement of Toll-like receptor 4 in murine postoperative ileus [J]. Neurogastroenterol Motil, 2018,30(6) : e13286.

[6] STOFFELS B, HUPA K J, SNOEK S A, et al. Post-operative ileus involves interleukin-1 receptor signaling in enteric glia [J]. Gastroenterology, 2014,146(1) : 176 - 187.e1.

[7] HAN M S, BARRETT T, BREHM M A, et al. In-

flammation mediated by JNK in myeloid cells promotes the development of hepatitis and hepatocellular carcinoma [J]. Cell Rep, 2016,15(1) : 19 - 26.

[8] ROY P K, RASHID F, BRAGG J, et al. Role of the JNK signal transduction pathway in inflammatory bowel disease [J]. World J Gastroenterol, 2008,14(2) : 200 - 202.

[9] LI Y Y, LI Y N, NI J B, et al. Involvement of cannabinoid-1 and cannabinoid-2 receptors in septic ileus [J]. Neurogastroenterol Motil, 2010,22(3) : 350 - e88.

[10] 安丽娅,孙大力,徐鹏远.术后肠麻痹发生机制和治疗的研究进展 [J].中国全科医学,2016,19(18) : 2223-2226,2227.

[11] MUELLER M H, GLATZLE J, KAMPITOGLOU D, et al. Differential sensitization of afferent neuronal pathways during postoperative ileus in the mouse jejunum [J]. Ann Surg, 2008,247(5) : 791 - 802.

[12] SANFILIPPO F, SPOLETINI G. Perspectives on the importance of postoperative ileus [J]. Curr Med Res Opin, 2015,31(4) : 675-676.

[13] KALFF J C, CARLOS T M, SCHRAUT W H, et al. Surgically induced leukocytic infiltrates within the rat intestinal muscularis mediate postoperative ileus [J]. Gastroenterology, 1999,117(2) : 378 - 387.

[14] SHORT S S, WANG J, CASTLE S L, et al. Low doses of celecoxib attenuate gut barrier failure during experimental peritonitis [J]. Lab Invest, 2013,93(12) : 1265 - 1275.

[15] 马秀颖,汤茂春,赵严.重症急性胰腺炎对肠黏膜屏障功能损伤的研究进展 [J].同济大学学报(医学版), 2015,36(2) : 125 - 128.

[16] LUISSINT A C, PARKOS C A, NUSRAT A. Inflammation and the intestinal barrier: leukocyte-epithelial cell interactions, cell junction remodeling, and mucosal repair [J]. Gastroenterology, 2016,151(4) : 616 - 632.

[17] LUETTIG J, ROSENTHAL R, BARMAYER C, et al. Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation [J]. Tissue Barriers, 2015,3(1-2) : e977176.

[18] RAY R M, JIN S, BAVARIA M N, et al. Regulation of JNK activity in the apoptotic response of intestinal epithelial cells [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011,300(5) : G761 - 770.