

DEX对脓毒症大鼠肠黏膜上皮连接蛋白 Occludin 和闭合小环蛋白 ZO-1 表达的影响

张亚阳 朱 健 (通讯作者)

山西医科大学第一医院手术麻醉科, 山西 太原 030001

摘要: 目的 旨在探究盐酸右美托咪啶 (DEX) 对脓毒症大鼠小肠黏膜上皮连接蛋白 Occludin、闭合小环蛋白 ZO-1 表达的调控作用及其肠黏膜保护机制。方法 实验将 60 只称重 240~270g, 7 周龄, SPF 级 Wistar 大鼠 (雄性), 利用随机数字表法抽样将其分为 3 组 (n=20): 1. 假手术 (Sham) 组、2. 脓毒症 (SEPSIS) 组、3. 盐酸右美托咪啶干预 (DEX 干预组) 组。SEPSIS 组、DEX 干预组采用盲肠 3 号丝线穿线结扎、针头反复 3 次穿孔的方法建立病理模型, 而 SHam 组仅开腹暴露找到盲肠, 1/2 处仅穿线不结扎, 随后缝合关腹。经大鼠颈外静脉导管泵注盐酸右美托咪啶 (DEX), 负荷剂量 5ug/kg, 10min 输注完毕, 后微量泵泵注小剂量 0.5ug/kg/h 维持。SHam 组、SEPSIS 组则泵注等剂量的生理盐水, 三组均于关腹缝合前停止泵注。次日晨经颈外静脉取血检测各组大鼠血清白细胞介素-6 (IL-6) 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 浓度; 取血后处死全部大鼠并取空回肠组织, 苏木精-伊红染色法 (HE staining) 观察各组大鼠空回肠组织病理及通透性改变, 计算出肠道损伤病理学评分 (Chiu 氏评分); 同时进行细菌移位率测定; 蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 测定小肠紧密连接蛋白 (Occludin)、闭合小环蛋白 (Zonula occludens1, ZO-1) 的表达水平。结果 与 SHam 组比较, SEPSIS 组血清 TNF- α 、IL-6 浓度升高, 小肠黏膜 Chiu 氏评分、大鼠细菌移位率升高 ($P<0.05$), Occludin、ZO-1 表达水平降低 ($P<0.05$); 与 SEPSIS 组比较, DEX 干预组血清 TNF- α 、IL-6 浓度降低, Chiu 氏评分、细菌移位率降低 ($P<0.05$), Occludin、ZO-1 表达水平升高 ($P<0.05$)。结论 DEX 可减轻脓毒症致大鼠肠黏膜上皮细胞的损伤, 与上调小肠黏膜 Occludin、ZO-1 表达水平有关。

关键词: 脓毒症; 盐酸右美托咪啶; 肠黏膜

肠道黏膜上皮机械屏障的完整性遭到破坏与脓毒症的发生、变化、进展息息相关。现有研究认为肠黏膜机械屏障能够抵御外界病原侵袭机体、维持肠道稳态, 在脓毒症的发生、进展过程处于第一道防御门户的地位^[1]。临床上肠梗阻如若未及时有效治疗, 可发展为胃肠道黏膜水肿、坏死, 直接导致胃肠道通透性增加, 肠道内有害菌群内毒素吸收加速。同时有害菌群可能移位到血流, 使得大量有害的细胞炎症介质透过肠道进入全身系统循环, 导致机体对感染产生抗炎免疫应答反应, 激活炎性细胞和因子, 驱动产生炎症级联反应。疾病迁延产生复杂的促炎激活, 复杂的炎症紊乱会加重肠道的损伤坏死。导致患者病情急转直下及恶化, 部分可发展脓毒性休克 (sepsis shock), 甚至多器官功能衰竭以及死亡。

盐酸右美托咪啶 (dexmedetomidine, DEX) 在临床麻醉中最初的辅助药品, 其药理学特性包括抑制腺体分泌、抗焦虑、镇痛、抑制交感兴奋、抗炎等多重作用, 常作为

替代药物应用于各种手术的麻醉过程中, 大量的研究发现已证实 DEX 对脑、肾、肝、肺等多器官组织具有明确或潜在保护作用^[2-4]。紧密连接做为上皮细胞顶端最重要的连接方式, 构成了肠黏膜上皮机械屏障最天然的基础, 具有调控溶液、离子扩散转运出入细胞的屏障作用。其中构成紧密连接分子结构基础主要由 3 种细胞旁膜蛋白组成, 分别为 Occludin、Claudin、连接黏附分子, 以及由胞浆闭合小环蛋白 ZO-1 等所构成^[5]。本实验拟探讨 DEX 对脓毒症大鼠小肠黏膜上皮细胞损伤及膜蛋白 (Occludin)、闭合小环蛋白 (Zonula occludens1, ZO-1) 表达水平的影响, 为右美托咪啶是否支持胃肠道稳态保护寻找更多有利证据。

1 材料与方法

从山西医科大学生理学教学研究系实验动物繁殖中心获得 60 只 SPF Whister 雄鼠 (240~270 克体重, 7 周龄)。笼内温度保持在 23~26°C, 湿度控制在 50~60%, 需要自

由获得指定的水和食物。使用随机抽样表法分为三组 ($n=20$): 1. 假手术 (SHam) 组、2. 模型组 (SEPSIS) 组、3. 右美托咪啶干预组 (DEX 干预) 组。

除 SHam 组之外, 余均采用盲肠穿线结扎穿孔法造模, 手术在同一组人员中连续两个上午完成。大鼠禁食 12 小时, 并在手术前一晚禁水 4 小时。选择 1% 戊巴比妥钠麻醉药物 (45mg/kg), 部位选择腹腔注射, 麻醉后沿鼠腹正中线做 1.5cm 切口, 探查定位盲肠, 并在其根部 1/2 处丝线穿线结扎, 用 20 号注射器针头反复穿透 3 次, 轻挤压出少量肠内容物, 放置合适皮瓣防止针孔闭合, 后还纳盲肠于腹腔原位, 丝线连续缝合腹膜、筋膜和腹壁皮肤, 术毕经颈外静脉导管补充生理盐水 (30ml/kg) 进行补液。SHam 组仅分离盲肠远端 1/2 处丝线, 不结扎、穿孔。DEX 干预组经颈外静脉导管微量泵静注 5ug/kg 盐酸右美托咪啶 (批号: 22061823, 江苏, 扬子江集团有限公司), 药物泵注在 10min 完毕。后继之以小剂量 0.5ug/kg/h 泵注维持。SHam 组、SEPSIS 组则如上方式静注等剂量的 0.9% 氯化钠溶液, 各组都在缝皮前停止输注。

第二天早上, 我们收集了所有大鼠的颈静脉血。EP 通过试管离心后, 收集上清血并冷冻至 -20°C , 以备使用。收集所有样品后, 血清 IL-6 和 TNF 浓度为 ELISA。使用试剂盒测量, 并根据试剂盒说明完成步骤。

取血后颈脱臼法处死全部大鼠, 取距回肠部 10cm 处肠段 1cm 置于 10% 多聚甲醛固定 12h, 石蜡包埋切片, HE 染色, 用显微镜观察切片肠壁绒毛长度、黏膜层厚度, 并进行 Chiu 氏评分, 判定小肠组织损伤程度。Chiu 氏六级评分: 正常结构计 0 分; 1 分: 轻度肠道损伤, 小肠黏膜绒毛顶端上皮间空隙增大, 毛细血管轻微充血, 无坏死现象; 2 分: 中度肠道损伤, 绒毛上皮可见溃疡、出血和坏死, 但未穿透黏膜层; 3 分: 重度肠道损伤, 组织学上, 溃疡、出血和坏死, 已经达到浆膜层; 4 分: 绒毛破损, 毛细血管暴露, 固有层结构裸露; 5 分: 肠绒毛顶端及固有层均有破坏、出血和溃疡。

取肠系膜淋巴结、肝、肾、脾组织, 称重 0.5g, 加无

菌 0.9% 氯化钠溶液研磨制备为匀浆液, 后蘸取 0.1mL 匀浆液均匀涂抹在细菌培养基上, 放入培养箱内 37°C 培养 24h, 取出观察, 细菌群落直径测量 >0.1 毫米界定为阳性, 计算统计淋巴结、器官细菌移位率。

Western-blot 法检测肠道组织的紧密连接蛋白 Occludin 和闭合小环蛋白 (Zonula occludens1, ZO-1) 的表达水平 将小肠组织称重并剪成细小碎片, 裂解后 4°C 制备匀浆, 加入 Buffer 变性后, SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离目的蛋白, 然后将蛋白转移至 PVDF 转印膜上, 5% 的脱脂奶粉封闭 1h, TBST 洗涤清洗分别加入相应的一抗 (兔抗 1:1000, 自博士德生物公司购得, 武汉) 4°C 孵育过夜, TBST 洗涤清洗转印洗膜 3 次, 每次 5-10min, 室温孵育二抗 (兔抗 1:2000 自博士德生物公司购得, 武汉) 2h, TBST 洗涤缓冲液清洗后 ECL 显色, 以 GAPDH 为内参, 在凝胶成像仪中观察蛋白的表达情况, 利用 ImageJ 软件测量蛋白质灰度值, 步骤严格按照实验条件进行。

所用数据均通过在 SPSS Statistics 29 软件中录入后进行统计分析, 计量资料数据最后均以均数 $\pm$ 标准差的形式 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 所有数据用 Levene 法进行方差齐性检验, 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠回肠黏膜损伤的形态学改变及 Chiu 氏评分比较

SHam 组大鼠回肠黏膜完整, 结构正常, 无出血及炎症现象; SEPSIS 组可见绒毛破损, 排列杂乱, 毛细血管暴露, 固有层破坏, 部分可见出血、溃疡、炎症细胞浸润; DEX 干预组可见绒毛组织少量剥离, 固有层分离, 损伤明显轻于 SEPSIS 组 (图 1)。SHam 组、SEPSIS 组和 DEX 干预组 Chiu 氏六级评分分别为 0.37 ± 0.15 、 4.69 ± 0.11 和 2.21 ± 0.18 。统计学分析结果显示: SEPSIS 组评分高于 SHam 组, DEX 干预组低于 SEPSIS 组但高于 SHam 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。



图 1 大鼠回肠黏膜损伤的形态学改变 (HE 染色, 光镜下 400x): 从左往右依次为 SHam 组、SEPSIS 组、DEX 干预组

表 1 三组大鼠回肠黏膜形态及 Chiu 氏评分比较

(n=20, $\bar{x} \pm s$)

组别	绒毛长度(μ m)	黏膜厚度(μ m)	Chiu 氏评分(分)
SHam 组	160.21 $\pm$ 15.31	260.15 $\pm$ 13.08	0.37 $\pm$ 0.15
SEPSIS 组	91.23 $\pm$ 12.29 ^a	171.59 $\pm$ 12.50 ^a	4.69 $\pm$ 0.11 ^a
DEX 干预组	113.15 $\pm$ 15.46 ^{ab}	210.25 $\pm$ 16.73 ^{ab}	2.21 $\pm$ 0.18 ^{ab}

注:与 SHam 组比较, ^a $P < 0.05$ 与 SEPSIS 组比较, ^b $P < 0.05$

2.2 三组大鼠淋巴结器官细菌移位率的比较

与 SHam 组比较, SEPSIS 组大鼠器官细菌移位率升高 ($P < 0.05$); 与 SEPSIS 组比较, DEX 干预组大鼠器官细菌移位率降低 ($P < 0.05$);

表 2 三组大鼠器官、淋巴结中细菌移位率之间的比较

[n(%)]

组别	肝	肾	脾	淋巴结	总移位率
SHam 组	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (10)	3.34
SEPSIS 组	5 (25)	2 (10)	2 (10)	9 (45)	30.00 ^a
DEX 干预组	3 (15)	2 (10)	1 (5)	4 (20)	16.67 ^{ab}

注:同 SHam 组比较, ^a $P < 0.05$ 与 SEPSIS 组相较, ^b $P < 0.05$ 2.3 三组大鼠血清标本中 IL-6、TNF- α 浓度的比较

较 SHam 组对较, SEPSIS 组大鼠炎症反应重, 血清中炎症因子 IL-6、TNF- α 的浓度升高 ($P < 0.05$)。相较之 SEPSIS 组, DEX 干预组大鼠血清炎症因子 IL-6、TNF- α 浓度降低 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义;

表 3 三组大鼠血清 IL-6、TNF- α 浓度比较(n=20, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-6 (ng/L)	TNF- α (ng/L)
SHam 组	36.10 $\pm$ 10.03	168.23 $\pm$ 12.32
SEPSIS 组	63.61 $\pm$ 12.53 ^a	245.61 $\pm$ 11.29 ^a
DEX 干预组	52.05 $\pm$ 12.70 ^{ab}	205.15 $\pm$ 10.47 ^{ab}

注:与 SHam 组比较, ^a $P < 0.05$ 与 SEPSIS 组比较, ^b $P < 0.05$

2.4 各组大鼠小肠组织紧密连接蛋白及胞浆蛋白表达水平的比较

同 SHam 组相对比, SEPSIS 组大鼠小肠组织紧密连接蛋白 Occludin、闭合小环蛋白 ZO-1 表达水平降低明显 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义; 同 SEPSIS 组对比, DEX 干预组大鼠小肠组织紧密连接蛋白 Occludin、闭合小环蛋白 ZO-1 蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 4 三组大鼠小肠组织 Occludin、ZO-1 表达水

平比较(n=20, $\bar{x} \pm s$)

组别	Occludin	ZO-1
SHam 组	1.034 $\pm$ 0.137	1.087 $\pm$ 0.140
SEPSIS 组	0.076 $\pm$ 0.012 ^a	0.183 $\pm$ 0.023 ^a
DEX 干预组	0.408 $\pm$ 0.062 ^{ab}	0.463 $\pm$ 0.067 ^{ab}

注:与 SHam 组比较, ^a $P < 0.05$ 与 SEPSIS 组比较 ^b $P < 0.05$

3 讨论

本实验参照李锦灵等^[6]实验方法制备脓毒症大鼠肠损伤模型, 腹腔探查找到盲肠后, 在盲肠远端用 3 号穿线结扎, 引起局部组织变性坏死及炎症反应。后用 20 号针头反复穿透 3 次, 轻挤出少量粪便内容物, 漏入腹膜引起腹膜炎。后把盲肠推回于腹腔逐层连续缝合关腹。HE 染色可见绒毛破损, 毛细血管暴露, 固有层破破坏, 部分可见出血、溃疡; SEPSIS 组 Chiu 氏六级评分 (4.69 ± 0.11) 高于 SHam 组评分 (0.37 ± 0.15), 细菌器官移位率升高, 术后 24h 血清 IL-6、TNF- α 等炎症介质浓度升高, 证实模型制备成功。

本实验按张瑛等^[7]的给药剂量方式作为本 DEX 给药干预剂量参考, 最后的结果表明, 给予 5ug/kg 盐酸右美托咪啶负荷及维持干预后的脓毒症大鼠, 回肠黏膜病理学损伤减轻, Chiu 氏评分降低, 细菌器官移位率降低, 血清 TNF- α 、IL-6 浓度降低。验证了盐酸右美托咪啶可缓解脓毒症大鼠的肠黏膜上皮损伤坏死程度及炎症反应。

肠黏膜上皮细胞之间的膜连接形成天然机械壁。紧密接触主要存在于上皮细胞的上端, 并形成紧密接触的跨膜蛋白在细胞膜上紧密排列形成脊线, 相邻两细胞的脊线对应接合, 形成类似“拉链样”结构, 具有调控溶液、离子从细胞一侧扩散转运进入细胞的作用。构成紧密连接的分子基础是 3 种细胞旁膜蛋白, 分别为 Occludin、Claudin 和连接黏附分子 (cell adhesion molecules) 以及细胞浆内闭合小环蛋白 (ZO-1、ZO-2、ZO-3 和 cingulin、sympleskin 等) 构成^[5,8], 异常表达可导致上皮细胞和内皮细胞的骨架结构破坏和信号转导传递功能受损。其中 occludin、ZO-1 是紧密连接的主要蛋白, 对细胞骨架系统的关联中发挥重要作用, 直接影响紧密连接的正常防御屏障功能。文献报道中马春燕^[9]证实, 谷氨酰胺进行干预后, 可以上调肠缺血再灌注损伤后大鼠肠黏膜闭合小环蛋白 ZO-1 的表达, 对肠缺血再灌注损伤导致肠黏膜屏障损伤破坏起到修复的作用。本研究结果表明, 脓毒症大鼠小肠黏膜 Occludin、

ZO-1 表达水平下调;给予盐酸右美托咪啶后,小肠黏膜 Occludin、ZO-1 表达水平上调。提示右美托咪啶可上调小肠黏膜 Occludin、ZO-1 表达水平,证明调控紧密连接蛋白 Occludin、闭合小环蛋白 ZO-1 是改善脓毒症肠屏障损伤的关键靶点。

闭合小环蛋白家族除 ZO-1 外包括了 ZO-2、ZO-3、cingulin、symplesin 等细胞质蛋白,它们不仅是紧密连接的重要构成部分,同时可以在细胞核与细胞膜间规律移动,并参与细胞信号转导过程^[10]。有学者就发现,作为主要胞浆蛋白的 ZO-1 在 Ras/Raf/MAPK 信号通路的信号转导过程中也起着重要作用^[11]。

综上所述,盐酸右美托咪啶干预后可减轻脓毒症大鼠的肠黏膜上皮损伤,与上调小肠黏膜紧密连接膜蛋白 Occludin、胞浆蛋白 ZO-1 表达水平有关,具体的复杂作用机制及相互关联的信号转导通路需要在此基础上进一步探索研究,以待更多阐明。

参考文献:

- [1]王翠娟,李培杰,王晓琴,等.右美托咪啶联合亚低温对脓毒症大鼠肺组织炎症反应影响的实验研究[J].中国急救医学杂志,2016,36(9):794-798.
- [2]Mantz J, Josseland J, Hamada S. Dexmedetomidine: new insights[J]. Eur J Anaesthesiol, 2011, 28(1):3-6.
- [3]Weerink MAS, Struys MMRF, Hannivoort LN, et al. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamic of Dexmedetomidine[J]. Clin Pharmacokinet, 2017, 56(8):893

-913.

- [4]缪丽艳.右美托咪啶对脓毒症大鼠肠道损伤的保护效应[D].福建医科大学,2015.
- [5]向若兰,苏运超,吴立玲,等.紧密连接蛋白 claudin-4 的研究进展[J].生理科学进展,2012,43(4):310-313.
- [6]李锦灵,黄树武.大鼠脓毒症模型的凝血功能研究[J].中国实验动物学报,2018,26(2):224-229.
- [7]张瑛,钟文晖,王爱忠.右美托咪啶对缺血-再灌注大鼠肠黏膜屏障功能的影响[J].上海交通大学学报,2014,34(4):487-506.
- [8]李思宇,王庆松.慢性脑低灌注对大鼠回肠黏膜 Occludin 及 Claudin-2 表达的影响[J].中国组织工程研究,2020,24(32):5186-5191.
- [9]马春燕,王爱丽,王爱娜,等.谷氨酰胺对大鼠肠缺血再灌注损伤后 ZO-1 的作用及其机制研究[J].中华临床医师杂志,2015,9(9):132-136.
- [10]Otani T, Furuse M. Tight Junction Structure and Function Revisited. Trends Cell Biol, 2020, 30(10):805-817.
- [11]李秋霞,罗茂林,李茹柳,等.紧密连接蛋白 ZO-1 研究概述[J].广州中医药大学学报,2007,24(6):523-526.

作者简介: 张亚阳 (1992-), 男, 汉族, 山西太原人, 硕士, 山西医科大学第一医院, 麻醉与器官功能保护。朱健 (1987-), 男, 汉族, 山西太原人, 硕士, 山西医科大学第一医院, 麻醉与器官功能保护。