

肠黏膜 TLR4 信号参与心肺复苏过程细菌移位

常瑞明, 姜 骏, 符 岳, 李 莉, 温立强, 常建星*

(中山大学 孙逸仙纪念医院急诊科, 广东 广州 510120)

摘 要:【目的】探讨心肺复苏(CPR)过程中肠黏膜 TLR4 信号表达是否参与肠内细菌移位,介导复苏后脓毒症产生的可能机制。【方法】通过建立大鼠心脏骤停及复苏模型,设定 CPR 自主循环建立后 6h(CPR-6h)及 48 h(CPR-48h)为早期和后期阶段,western blot 方法测定两阶段肠黏膜 TLR4 表达及其细胞内信号 MAPKs 的磷酸化蛋白表达(包括 pERK、pJNK、pp38MARK)、肠系膜淋巴结及肝脏组织细菌培养检测肠外器官的细菌移位以及扫描电镜观测肠黏膜细胞间连接增宽或开放比例。【结果】CPR-6h 组,TLR4、pERK、pJNK 和 pp38MAPK 蛋白均表达增加($P < 0.05$,与 sham 比较),2.01%肠黏膜细胞间连接增宽,肠系膜淋巴结和肝组织细菌培养分别为($3\ 700 \pm 109$)cfu/g 和(800 ± 85)cfu/g;然而 CPR-48h 组,除 pERK 外,肠黏膜 TLR4、pJNK 和 pp38MAPK 蛋白表达下降($P < 0.05$,与 CPR-6 h 比较),8.4%细胞间连接增宽,肠系膜淋巴结和肝组织细菌培养分别为($14\ 300 \pm 2\ 750$)cfu/g 和($4\ 400 \pm 623$)cfu/g,细菌移位程度及细胞间连接增宽或开放比例明显增高($P < 0.001$,与 CPR-6 h 比较)。【结论】CPR 后期阶段 TLR4 表达降低提示其识别细菌能力下降,可能与后期细菌移位有关。

关键词: 肠黏膜;Toll 样受体 4;细菌移位;心肺复苏

中图分类号:R739

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2012)01-0034-05

Intestinal Mucosal TLR4 Signal Involves in Bacterial Translocation in a Rat Model of Cardiopulmonary Resuscitation

CHANG Rui-ming¹, JIANG Jun¹, FU Yue¹, LI Li¹, WEN Li-qiang¹, CHANG Jian-xing^{1*}

(1.Department of Emergency Medicine, Sun Yat-sen Memorial Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To investigate whether intestinal expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling was involved in bacterial translocation and mediated sepsis generation in a rat model of cardiopulmonary resuscitation (CPR).【Methods】Through the establishment of rat model of CPR, the experimental animals were set CPR-6 hour group (CPR-6h) and CPR-48 hour group (CPR-48h) as the early and late stages after the establishment of spontaneous circulation, then observed two-stage intestinal TLR4 expression and MAPKs(pERK, pJNK, and pp38MAPK) expression of intracellular signaling proteins by using Western blot, detected bacterial translocation by bacterial culture of mesenteric lymph nodes (MLNs) and liver tissue, determined intestinal epithelial damage by observing cell junction widening or opening ratio.【Results】In the CPR-6h group,TLR4,pERK,pJNK,and pp38MAPK protein expression were significantly increased ($P < 0.05$, compared with sham control), and a low percentage of cell junction widening or opening ratio (2.01%) and a small quantity of colonies of colony-forming unit per gram(cfu/g) were observed in the mesenteric lymph nodes (MLNs) and liver tissue. However, in the CPR-48h group, except for pERK, TLR4, pJNK, and pp38MAPK protein were decreased, which were compared with those in the CPR-6h group ($P < 0.05$). However, the percentage of cell junction widening or opening ratio was much higher than that in the CPR-6h and sham groups (8.4%, $P < 0.001$). Moreover, the bacterial colonies of mesenteric lymph nodes and liver tissue were ($14\ 300 \pm 2\ 750$)cfu/g and ($4\ 400 \pm 623$)cfu/g, which were remarkably increased when compared to CPR-6h groups [($3\ 700 \pm 1\ 090$)cfu/g and ($9\ 800 \pm 850$)cfu/g, $P < 0.001$].【Conclusion】The lower expression of intestinal mucosal TLR4 signal was observed during the late stage of CPR, which suggested that intestinal mucosal cells may reduce its ability to sense and identify bacteria, which resulted in bacterial translocation.

Key words: intestinal mucosa; toll-like receptor4; bacterial translocation; cardiopulmonary resuscitation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2012,33(1):34-38]

收稿日期:2011-11-17

基金项目:广东省自然科学基金(10151008901000135)

作者简介:常瑞明,硕士,主治医师,E-mail:rubby866@126.com;* 通信作者:常建星,副主任医师,E-mail:chang-jianxing@yahoo.com.cn

自从 40 多年前现代心肺复苏术确立以来,复苏成功率逐年提高,但多数最初恢复自主循环的患者最终还是死于复苏后综合征(post-resuscitation syndrome, PRS),也就是复苏后多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF),其原因之一与肠屏障的破坏所致肠内细菌移位及毒性物质渗透导致脓毒症有关,机制尚不清楚^[1,2]。我们前期的实验表明心肺复苏后肠黏膜 TLR4 参与介导肠屏障损伤^[3]。为进一步研究肠对心肺复苏的影响,本实验通过大鼠心肺复苏模型,观察肠黏膜 TLR4 与复苏后细菌移位的关系。

1 材料与方法

1.1 实验设计

健康清洁 SD 雄性大鼠, (350 ± 50)g, 来源于中山大学动物实验中心。实验分为复苏组及假复苏(sham)两组,前者根据复苏后时间再分为复苏后 6 h 组(CPR-6 h)和复苏后 48 h 组(CPR-48 h),每组 6 只(实验分组是根据 CPR 后动物有效血循环建立特点以及本课题预实验结果划分)。分别检测两阶段肠黏膜 TLR4 表达及其细胞内信号 MAPKs 的磷酸化蛋白表达(包括 pERK、pJNK 和 pp38MAPK)、肠系膜淋巴结及肝脏组织细菌培养检测肠外器官的细菌移位以及扫描电镜观测肠黏膜细胞间连接增宽或开放比例。

1.2 心搏骤停和复苏的程序

戊巴比妥钠(45 mg/kg)腹腔注射麻醉,颈部胸骨上窝以上一横指处 1 cm 纵向切口,钝性分离到气管,引导 14 号鞘管套针经口气管插管;左股动脉放置 23 号 PE-50 聚乙烯管到达剑突下;分离双侧颈静脉,左颈静脉置 23 号 PE-50 聚乙烯管到右心房,右颈静脉放置 4 号电极导管;肢体和体表插入针头电极连接多导生理参数仪持续监测肢体 II 导联心电图,股动脉和左侧颈静脉导管连接压力传感器与多导生理参数仪相连分别持续监测动脉压和右房压力,将多导生理参数仪模拟数据经数据采集卡采集后经模数转换引入到电脑,专用软件实时记录数据并保存。心尖部皮下插入负极针头,右侧颈静脉电极导管插入电极钢丝(正极)到右心室内膜,体表心电图确认电极放置位置。致颤前 10 min 机械通气开始(潮气量 0.65 mL/100 g,氧浓度 21%),用低于 10mA 交流电经触及

右心室内膜指引钢丝和体表负极针头形成的交流电回路持续致颤 3 min 和观察 5 min, 总共 8 min 无处理室颤。然后胸外按压和同步机械通气,频率分别为 200 次/min 和 100 次/min,复苏 6 min 后,连续给予最多 3 次的 2J 双向波除颤。自主循环恢复标准:室上性心律、MAP ≥ 60 mmHg 并且维持 5 min 以上;自主呼吸建立后连续监测 2 h 血流动力学。

1.3 标本获取

实验动物于各时间段活杀。严格无菌操作下切取肝脏和肠系膜淋巴结,放置无菌培养管,进行细菌培养;一部分取末段回肠,刮去黏膜,液氮速冻后, -80℃ 保存,另取一部分处理备电镜检测。

1.4 实验项目检测

1.4.1 细菌移位检测 无菌生理盐水仔细漂洗干净采集的肠系膜淋巴结和肝脏,称取质量。超声粉碎机制备组织匀浆,取 0.1 mL 组织匀浆加无菌生理盐水 0.9 mL 调整浓度为 0.1 g/mL, 再各取 0.1 mL 调整后的组织匀浆接种至两个厌氧血琼脂培养板,用玻棒涂抹均匀后,置于厌氧培养箱 37℃ 培养 24 ~ 48 h, 分别用低倍放大镜计算每个平板细菌落数(colony-forming unit, cfu),取平均数。组织细菌菌量(cfu/g)=菌落数×100。

1.4.2 电镜观察细胞间紧密连接的开放程度 回肠标本(约 1×1 mm³)固定于 3% 戊二醛的缓冲液(pH = 7.4, 4℃)中,PBS 冲洗后固定于 1% 四氧化锇 1 h。固定组织逐级乙醇脱水,树脂包埋。超薄切片机切取 70 nm 切片,用 4% 醋酸双氧铀和 0.4% 柠檬酸铅固定。采用 H-600 透射电镜(日立生产)检测细胞间紧密连接的增宽或开放比例,每张切片检测 30 ~ 40 个细胞间紧密连接(以百分数表示)^[4]。

1.4.3 TLR4 及 MAPKs 激酶的表达 采用 Western blot 检测肠上皮细胞内 TLR4 分子、MAPK 信号通路分子包括 ERK、JNK、p38MAPK 总蛋白以及 pERK、pJNK、pp38MAPK 蛋白表达。简略描述为:刮取回肠黏膜,组织粉碎成匀浆后,加入预冷的 RIPA 总蛋白裂解液于冰上裂解 30 min,低温高速离心(20 000 r/min, r=86 mm)30 min,取上清,用 BCA 法测定蛋白质浓度(PIERCE BCATM 蛋白试剂盒,Thermo Fisher Scientific Inc,美国)。蛋白于 -80℃ 冰箱保存。电泳前按 3:1 体积比与上样缓冲液混合,100℃ 变性 5 min,约取 20 μg 蛋白上样于 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后转印至 NC 膜上,封闭 2 h,4℃ 孵育特异性一抗(TLR4 抗体来自

abcam, 美国; p38、pp38、ERK、pERK、JNK、pJNK 抗体购自 Cell Signaling Technology, 美国), 过夜, 一抗反应结束后与 HRP 标记的特异性二抗(US Biological, 美国) 室温孵育 1 h, ECL 试剂处理曝光。然后将 NC 膜洗脱后再次封闭, 以免抗鼠 GAPDH 抗体(Novus Biologicals)处理进行印迹反应, 最后扫描图片, 以 Adobe Photoshop 7.0 软件分析条带密度。

1.5 统计学分析

实验数据用均数 $\pm$ 标准差表示, 多组间或两组间比较分别用单因素方差分析或 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 统计分析用 SPSS 13.0 统计软件完成。

2 结 果

2.1 肠细胞间紧密连接超微结构变化

sham 组大部分表现为正常的细胞间连接, 仅有 0.93% 细胞间连接增宽, 未发现明显的开放, 细胞器和细胞核无损伤性表现; 6 h 组表现为较多细胞内线粒体肿胀及部分细胞核染色体浓缩、边移, 2.01% 细胞间连接增宽, 与 sham 组比较无统计学差异 ($P > 0.05, n = 6$), 未见有明显细胞间连接开放; 与前两组不同, 48 h 组内发现多数线粒体肿胀, 细胞间连接增宽的比例明显增高高达 8.4%, 高于 6 h 组 4 倍 ($P < 0.001, n = 6$), 并可见到明显的紧密连接的开放(图 1)。

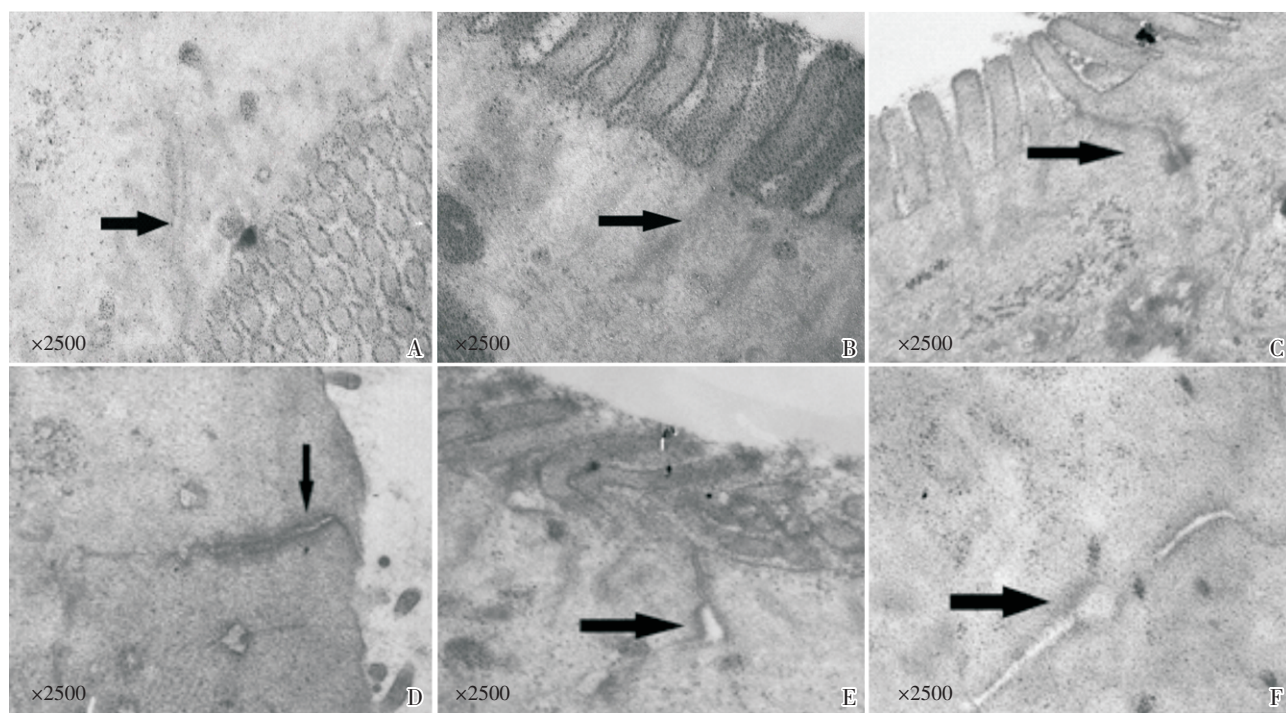


图 1 心肺复苏后肠黏膜细胞间紧密连接的超微结构

Fig.1 Representative images of ultrastructure of intestinal cell tight junction after CPR

A and B for sham showed the percentage of cell junction widening ratio (0.93%). C and D for CPR-6h showed a low percentage of cell junction widening or opening ratio (2.01%). E and F for CPR-48h showed 8.4% of cell junction widening or opening, which was much higher than in CPR-6h ($P < 0.001$). Arrows point to intestinal cell epithelial tight junction.

2.2 细菌移位

sham 组并没有在肝脏组织发现细菌, 仅在肠系膜淋巴结匀浆培养出少量细菌菌落; 6 h 组均可在肝组织和肠系膜淋巴结培养出细菌, 并在 48 h 组明显增高 ($P < 0.001$, 表 1)。

2.3 TLR4 及其 MAKPs 的表达影响

肠黏膜 TLR4 水平在 CPR-6h 组明显增高, CPR-48h 组反而下降, 接近于 sham 组; p38、pJNK 在 CPR-6h 组表达明显增高高于 sham 组及 CPR-48h 组; pERK 在 CPR-6h 及 CPR-48h 组均明

表 1. 肝、肠系膜淋巴结细菌移位分析

Table 1 The colonies of bacterial translocation to MLNs and liver tissue	(cfu/g)			
	Sham		CPR	
	6 h	48 h	6 h	48 h
Liver	0	0	800 ± 85	4400 ± 623 ¹⁾
MLNs	400 ± 128	0	3 700 ± 109	1 4300 ± 2750 ¹⁾

1) $P < 0.001$, vs CPR-6 h

显高于 sham 组, 前两组间无统计学差异(图 2)。

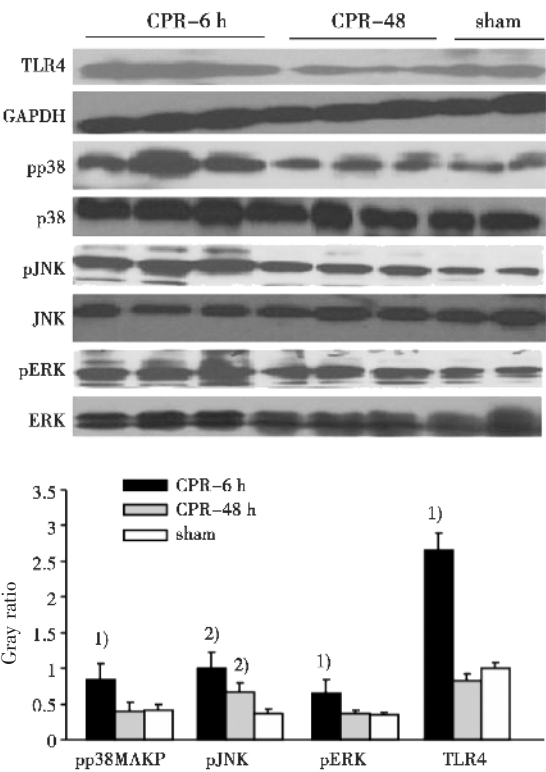


图 2 肠黏膜细胞磷酸化 MAPKs 和 TLR4 的 Western blot 分析

Fig.2 Western blot analysis of MAPKs phosphorylation and TLR4 in intestinal mucosal cells after CPR

Results were shown as fold-change compared with sham control value after optical density normalized to reference protein GAPDH. 1) $P < 0.01$ vs sham control and CPR-48h; 2) $P < 0.05$ vs sham control. $n = 3$.

3 讨 论

研究已证明, Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 通过识别和感受细菌病原相关模式和机体损伤后的内源性配体, 启动固有免疫应答和调控适应性免疫应答, 参与机体炎症反应^[5]。肠黏膜通

过表达 TLR4, 在其配体或激动剂作用下, 介导肠黏膜炎症信号和炎症级联反应^[6]。本研究通过 TLR4 及其细胞内信号表达结果提示: 心肺复苏的早期阶段 (CPR-6h), TLR4 的高信号可能参与或介导肠黏膜的炎症反应和损伤; 心肺复苏的后期阶段 (CPR-48h), 细菌移位的增加可能与 TLR4 信号降低有关。

造成心肺复苏失败的关键点之一是恢复自主循环 (restoration of spontaneous circulation, ROSC) 后的复苏后综合症。包括 2005 年复苏指南在内, 普遍认为导致复苏后综合症的重要原因是复苏后 2 ~ 3 d 由于肠道的细菌移位增加最终导致脓毒性休克及复苏后多器官功能衰竭^[1]。本实验也表明, 复苏后早期 6 h, 肠系膜淋巴结及肝组织的细菌培养数明显少于复苏后 48 h, 肠上皮细胞间连接的增宽或开放程度亦明显低于后者, 这个结果反映出肠源性因素对心肺复苏的影响是 ROSC 建立后的后期事件。

CPR 过程中肠黏膜 TLR4 的功能性表达可能影响肠屏障功能。尽管 TLRs 的调节机制尚不清楚, 但本研究结果提示 TLR4 的表达下降可能导致肠道细菌移位增加。CPR-48h 组显示细胞紧密连接开放比例及组织细菌培养菌落数增加可能反映出肠黏膜 TLR4 信号强度与识别细菌能力有关。有关 C3H/He 鼠系研究中, 尽管 C3H/HeJ 鼠 (TLR4-/-) 对全身应激反应敏感性降低, 降低肠黏膜炎症损伤^[7-8], 但是缺乏 TLR4 信号可能导致对细菌的识别力降低, 结果是细菌在体内繁殖^[8-9]。对于免疫尚未发育健全的乳鼠, 由于缺乏有效的 TLR4 信号将增加盲肠穿孔引发细菌感染后的死亡率^[10]。

丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPKs) 家族是 TLR4/ NF- κ B 细胞信号通路间重要的信号蛋白, 主要包括 ERK、JNK (N-terminal kinase) 和 p38MAPK^[11-12]。已经证实 TLR4 通过激活 JNK、ERK 和 p38 MAPK, 以 NF- κ B (nuclear factor- κ B) 依赖途径诱导炎症细胞因子和趋化因子的产生, 诱导炎症产生。本研究亦证实 CPR 早期三者表达增高, 符合文献报道 TLR4 的功能性表达, 同时 TLR4 表达高低伴随 JNK 和 p38 MAPK 信号变化可能说明 JNK 和 p38MAPK 是 TLR4 途径依赖性。但 CPR-48h 组并没有观察到 TLR4 表达下降影响到 ERK 的磷酸化, 可能为 ERK 涉及到 TLR4 的非依赖途径, 或因刺激变化

及激活的长短,ERK 可能发挥不同的生物学功能,或者可能是 p38/JNK 和 ERK 接受炎症刺激后的平衡作用。

心脏骤停及复苏后,肠经历了一系列的缺血与再灌注后损伤改变,CPR 早期肠黏膜 TLR4 的高炎症信号参与诱导黏膜的固有免疫反应,并导致肠黏膜损伤;随着 TLR4 信号减弱,至少部分由于黏膜识别细菌能力下降,导致或促进细菌移位。更详尽的研究需要证明 TLR4 失控介导复苏后肠屏障损伤以及细菌移位的机制,以便寻找 TLR4 调控手段。

参考文献

- [1] Neumar RW, Nolan JP, Adrie C, et al. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. A consensus statement from the International Liaison Committee on Resuscitation (American Heart Association, Australian and New Zealand Council on Resuscitation, European Resuscitation Council, Heart and Stroke Foundation of Canada, InterAmerican Heart Foundation, Resuscitation Council of Asia, and the Resuscitation Council of Southern Africa); the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; and the Stroke Council. *Circulation*[J]. 2008,118(23):2452-2483.
- [2] Gueugniaud PY, David JS, Chanzy E, et al. Vasopressin and epinephrine vs. epinephrine alone in cardiopulmonary resuscitation[J]. *N Engl J Med*,2008,359(1):21-30.
- [3] 常瑞明,温立强,常建星. Toll 样受体介导心肺复苏后肠黏膜损伤的研究[J]. 岭南现代临床外科,2010,10(4):552-255.
- [4] Zhang YJ, Li M, Meng M, et al. Effect of ethyl pyruvate on physical and immunological barriers of the small intestine in a rat model of sepsis[J]. *J Trauma*, 2009, 66:1355-1364.
- [5] O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling [J]. *Nat Rev Immunol*,2007,7(5): 353-364.
- [6] Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing toll-like receptors[J]. *J Immunol*,2000,164(2):966-972.
- [7] Watanabe T, Higuchi K, Kobata A, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small intestinal damage is Toll-like receptor 4 dependent[J]. *Gut*,2008,57(2): 181-187.
- [8] Fukata M, K. S, Michelsen R, Eri LS et al. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis[J]. *Am J Physiol*,2005,288(5): G1055-G1065.
- [9] Wolfe DN, Buboltz AM, Harvill ET. Inefficient Toll-like receptor-4 stimulation enables *Bordetella parapertussis* to avoid host immunity[J]. *PLoS ONE*,2009,4(1):e4280.
- [10] Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, et al. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte [J]. *Nat Immunol*,2000,1(6):496-4501.
- [11] Sharma R, Young C, Neu J. Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota [J]. *J Biomed Biotechnol*,2010,305879. Epub 2010 Jan 31.
- [12] Zhuang S, Schnellmann RG. A death-promoting role for extracellular signal-regulated kinase [J]. *J Pharmacol Exp Ther*,2006,319(3):991-997.

(编辑 孙慧兰)