

本文引用:欧阳荣键,路延之,周其全.参芪花粉片对低氧暴露下大鼠胃肠黏膜屏障损伤的保护作用观察[J].湖南中医药大学学报,2018,38(2):154-159.

参芪花粉片对低氧暴露下大鼠胃肠黏膜屏障损伤的保护作用观察

欧阳荣键^{1,2},路延之³,周其全^{4*}

(1.中国人民解放军第三十七医院,四川 雅安 625000;2.陆军军医大学新桥医院,重庆 400037;
3.空军军医大学基础部微生物教研室,陕西 西安 710032;4.陆军军医大学高原军事医学系,重庆 400038)

[摘要] **目的** 探讨低氧暴露下胃肠黏膜屏障损伤的机制及参芪花粉片对其产生的保护作用,为胃肠黏膜的应激损伤防治提供科学依据。**方法** 60只SD大鼠随机分为平原对照组(PCT)、单纯低氧暴露组(SHE)和低氧暴露+参芪花粉片保护组(GAP),在模拟海拔7 000 m的低压舱内暴露72 h,观察各组大鼠小肠黏膜厚度改变、肠上皮细胞凋亡、肠道细菌移位情况,检测血清和小肠的TNF- α 和IL-6水平,以及TLR4 mRNA表达水平。**结果** 低氧暴露组大鼠肠黏膜损伤严重,紧密连接间隙增宽,硝酸铜颗粒进入上皮细胞紧密连接间隙内以及周围组织间隙或细胞内,肠系膜淋巴结和脾脏有细菌移位;低氧暴露+参芪花粉片保护组肠黏膜损伤减轻,黏膜厚度增加,硝酸铜颗粒很少进入组织间隙和细胞内,移位细菌明显减少。与平原对照组比较,低氧暴露组血清内毒素、TNF- α 和IL-6水平显著增高,参芪花粉片保护组血清内毒素、TNF- α 和IL-6水平显著降低;低氧暴露后空肠组织TLR4 mRNA表达量显著增加,给予参芪花粉片后TLR4表达量明显下降,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 低氧暴露能引起严重的肠黏膜屏障功能损伤,给予参芪花粉片后可以降低肠黏膜通透性,对肠黏膜损伤具有一定的保护作用。

[关键词] 低氧暴露;肠黏膜;屏障损伤;细菌移位;参芪花粉片

[中图分类号]R285.5;R57

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.02.009

Protective Effect of Shenqi Huafen Tablet on Gastrointestinal Mucosal Barrier Injury Under Hypoxic Exposure

OUYANG Rongjian^{1,2}, LU Yanzhi³, ZHOU Qiquan^{4*}

(1. The 37th Hospital of PLA, Yaan, Sichuan 625000, China; 2. Xinqiao Hospital, Army Military Medical University, Chongqing 400037, China; 3. Department of Microbiology, Basic Medical College, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China; 4. High Altitude Military Medicine College, Army Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of oral Shenqi Huafen tablet on gastrointestinal mucosal barrier injury induced by hypoxia and provide scientific evidence for the prevention and treatment of various gastrointestinal mucosa stress injury. **Methods** Sixty Sprague dawley rats were randomly divided into plain control group (PCT), simple hypoxia exposure group (SHE) and hypoxia with Shenqi Huafen tablet protection group (HAP). The hypoxia treated rats were placed in a simulated altitude of 7 000 m in a hypobaric chamber for 72 hours, and the thickness changes of rat small intestine, intestinal epithelial cell apoptosis, bacterial translocation, level of TNF alpha and IL-6 levels in serum, level of TNF alpha and IL-6 levels in intestinal, as well the TLR4 mRNA expression in intestinal were observed. **Results** Rats in SHE group

[收稿日期]2017-04-12

[作者简介]欧阳荣键,男,在读硕士研究生,医师,研究方向:高原医学研究。

[通讯作者]*周其全,男,教授,硕士研究生导师,E-mail:15922532922@163.com。

showed severe intestinal mucosal injury, the tight junction gap widened and lanthanum nitrates particles entered into the epithelial tight junctions and the surrounding interstitial space or within the cell. Mesenteric lymph nodes and spleen showed bacterial translocation. Compared with the PCT group, serum endotoxin and TNF- α and IL-6 levels increased significantly in SHE group, serum endotoxin and TNF- α and IL-6 significantly reduced in HGP group. The TLR4 mRNA expression rate increased significantly in Jejunum tissues in SHE group, while after giving with Shenqi Huafen tablet, the expression of TLR4 in intestine significantly decreased, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Hypoxia exposure could cause severe intestinal barrier dysfunction, promote bacterial and enterotoxin translocation. Shenqi Huafen tablet can decrease intestinal permeability, and shows a protective effect on intestinal mucosal injury.

[**Keywords**] hypoxia exposure; intestinal mucosa; barrier injury; bacteria translocation; Shenqi Huafen tablet

胃肠道是人体消化的重要器官,也是细菌及其他有害物质进入人体内的主要途径,正常胃肠黏膜的屏障功能是胃肠道有效阻挡肠腔内各种有害物质入侵机体的关键。暴露在高原环境下的人体处于严重应激状态,胃肠黏膜极易受到损伤,不仅造成胃肠消化吸收功能降低,也容易导致肠内细菌及毒素易位引起全身炎症反应综合征或急性高原适应不全综合征^[1-2],即急性高原病,严重时危及生命。因此保护高原低氧暴露下的胃肠黏膜屏障功能具有重要意义。本文用参芪花粉片对低氧暴露大鼠进行干预,观察其对低氧暴露下胃肠黏膜屏障功能障碍是否具有保护作用。现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物、药品、试剂及仪器

成年雄性 SD 大鼠 60 只,体质量(210±25) g,购自四川华西医学中心实验动物所(证书号:川实动管第 99168 号)。参芪花粉片(河南凤凰制药有限公司,批准文号:B20020762)。鲎试剂(上海伊华临床医学科技公司),乌拉坦(国药集团化学试剂有限公司),辣根过氧化酶(上海甄准生物科技有限公司),邻联二回香胺(Sigma),二盐酸尸胺(Sigma),PBS(武汉博士德生物工程有限公司),硝酸镧(重庆博艺化学试剂有限公司),二甲砷酸钠(上海捷倍思基因技术有限公司分装)。低压氧舱(贵航集团风雷军械厂),细菌内毒素动态测定仪(湛江安度斯生物有限公司),透射电子显微镜(荷兰飞利浦),微量紫外分光光度计(普析 TU-19001),高速离心机(Eppendorf)。

1.2 分组及处理方法

实验动物随机分为 3 组,分别为平原对照组(简称 PCT)、单纯低氧暴露组(简称 SHE)和低氧暴

露+参芪花粉保护组(简称 GAP),每组 20 只,雌雄各半。将实验组(SHE、GAP)动物置于低压舱内,模拟海拔 7 000 m 高度的低氧环境暴露 72 h,平原对照组(PCT)置于正常气压条件,其余饲养条件相同。SHE 组给予基础喂养,每天称质量;GAP 基础喂养的同时,给予参芪花粉片,按大鼠体质量每 100 g 给予 0.5 g/d,用温水稀释(1:4)后灌胃,连续给药 3 d。

1.3 观察指标与检测方法

各实验组在各自条件下生活 72 h 后,PCT 组在平原环境下取材,剩余两组(SHE、GAP)在于模拟海拔 4 500 m 环境下取材,均使用 10% 乌拉糖(1 g/kg)腹腔麻醉。各组动物心脏取血后处死动物,将血液 5 mL 置于经去热原处理的试管,4 ℃,2 000 r/min 离心后分离血清,分别置于-20 ℃冰箱保存待测。无菌条件下取脾、肺、肝、肠系膜淋巴结,称质量并保存,待细菌培养。距回盲部 5 cm 处取一段约 5 cm 回肠组织分别作组织学和超微结构检查,另取 4 cm 小肠加入 3 倍体积的 PBS(0.1mol/L,pH 7.2)匀浆,离心(1 000 r/min)30 min,取上清液待测。

1.3.1 一般情况及腹腔内大体改变 观察大鼠精神状态及活动度,腹腔内肠管是否扩张、充血、水肿。

1.3.2 小肠黏膜厚度检测 在离回盲瓣 5 cm 处取 2 cm 回肠肠管,纵行剖开,生理盐水洗净,切成 4 mm 厚的组织块,10% 中性甲醛 4 ℃固定 24 h 以上,PBS 冲洗后常规石蜡包埋,连续切片(4 μ m),HE 染色,每张切片随机检测 18 个肠绒毛高度和绒毛表面积(肠绒毛表面积=2 π rh,r 为绒毛半径,h 为绒毛高度),取其平均值,计算肠黏膜上皮黏膜的厚度。

1.3.3 肠道细菌移位情况观察 在无菌条件下打开胸腹腔,采集心脏血 1 mL,精确称量肝、脾、肠系膜淋巴结各 100 mg,加入 900 μ L 无菌生理盐水后充分匀浆,取全血 0.5 mL 和组织器官匀浆各 0.5 mL,

涂于麦康凯固体培养基,37℃培养24h后,进行细菌菌落计数及初步生化鉴定。另取腹腔拭子于LB液体培养基中37℃孵育24h,同法接种于麦康凯培养基,作阴性对照。细菌移位率=同一组细菌培养的阳性脏器数/培养脏器总数×%。

1.3.4 血清内毒素水平的测定 利用动态浊度法对血清内毒素水平进行测定。各组相应的动物心尖采血3mL,置于灭活热原的促凝管,4℃,3000r/min×10min分离收集血清500μL待测。精确吸取100μL血清样本加入900μL KTA 鲎试剂并混匀,65℃条件放置20min,吸取200μL血清混合液加至酶反应主试剂中,置于EDS-99细菌内毒素动态测定仪3600s后,软件自动检测出样品内毒素含量。

1.3.5 小肠黏膜通透性超微结构观察 动物经10%乌拉坦(1g/kg)麻醉后,分离左颈外静脉,插管后缓慢注入2%硝酸镧生理盐水0.5mL,循环10min后,随即开胸经左心室插管至主动脉,用37℃0.9%NaCl生理盐水快速灌洗(压力维持在100mmHg,约200mL),剪开右心耳,直至流出液体基本清亮为止。然后换用镧醛固定液(2%多聚甲醛-2.5%戊二醛-2%硝酸镧-0.1mol/L二甲胍酸钠)恒压继续灌注固定30min。迅速在距幽门10cm处取2cm长空肠,纵行剖开修成1mm×1mm×1mm标本,浸于4℃镧醛固定液继续后固定24h,4℃0.1mol/L二甲胍酸钠缓冲液(pH7.4)漂洗30min×3次。1%锇酸固定后,经同法漂洗,丙酮梯度脱水,环氧树脂618包埋、修块、半薄切片定位和制备超薄切片,铅铀双染,采用TECNAI10型透射电子显微镜观察肠道超微结构和硝酸镧颗粒分布。

1.3.6 血清和小肠组织匀浆二胺氧化酶(DAO)、纤维二糖酶测定 各组大鼠取血清0.5mL,向血清中分别依次加入0.2mol/L PBS(pH7.2)3mL,辣根过氧化物酶溶液0.1mL(4μg),邻联二回香胺0.1mL(500μg)以及尸胺(戊二胺)0.1mL(175μg),放于37℃浴水中孵育30min,空白对照管用磷酸缓冲液替代,在波长436nm处测定OD值,从以DAO为标准制作的曲线上查出DAO的量^[5]。取0.5mL小肠组织匀浆上清液,用相同方法测定小肠匀浆DAO的量。分别取血清0.1mL按试剂盒说明进行操作,利用硫代巴比妥酸法测定丙二醛(MDA)的含量,采

用纤维二糖酶ELISA法测定试剂盒测定纤维二糖酶的OD值,并采用考马斯亮兰法测定小肠匀浆总蛋白含量,计算出小肠纤维二糖酶含量(试剂盒由上海铭博生物科技有限公司提供)。

1.3.7 炎症介质TNF-α、IL-6含量的检测 同上采集大鼠血清。采用ELISA法检测血清TNF-α和IL-6的含量,实验步骤严格按照说明书操作,在Synergy HT型酶标仪450nm处测读取OD值,然后根据标准曲线换算出待测样本的浓度。

1.3.8 荧光定量PCR对肠道TLR4 mRNA表达量变化的检测 (1)组织总RNA的提取和残留基因组DNA的灭活 精确称量60mg空肠组织,通过RNAiso Plus提供的步骤提取总RNA,采用NanoDrop超微量紫外分光光度计测浓度和纯度,以A260/A280在1.9~2.1之间,浓度大于100ng/μL作为提取成功标准。各组分别取500ng总RNA,按RQ1 RNase-Free DNase提供的步骤行基因组残留DNA灭活。最终各组总RNA浓度约为150ng/μL。(2)逆转录为cDNA 采用PrimeScrip® RT Master Mix Perfect Real Time试剂盒,总反应体系10μL,包括:5×PrimeScrip® RT Master Mix 2μL,Total RNA 1μL,RNase Free dH₂O 7μL。反应条件为37℃15min,85℃5s。(3)荧光定量PCR 引物由Invitrogen公司合成,经NCBI BLAST检索无同源序列。TLR4引物:上游5'-ATCTCAGCAAAATCCCTCAT-3',下游5'-AATCCAGCCACTGAAGTTGT-3',产物长度123bp。内参基因β-actin引物:上游5'-GTGGGCCGCCCTAGGCACCA-3',下游5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGAGGG-3',产物长度250bp。采用SYBR Premix Ex Taq™ II试剂盒,反应体系20μL,包括:SYBR Premix Ex Taq™ II 10μL,上下游引物1.6μL(各0.8),cDNA模板1.6μL,dH₂O 6.8μL。利用MT opticon实时荧光定量系统进行PCR反应,相关参数为:预变性95℃30s,95℃5s,54℃30s,72℃15s,共40个循环,72℃5min,记录扩增和熔解曲线。根据系统自动采集的目的基因及内参基因Ct值,选用2^{-ΔΔCt}法计算各组的TLR4基因相对表达量。

1.3.9 Western blot检测NF-κB p65蛋白表达 各组取空肠组织80mg,加入800μLRIPA裂解液和

8 μL PMSF, 超声匀浆后按步骤提取组织总蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度并统一用蒸馏水稀释到 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 加入 5 \times SDS 上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸 5 min 使蛋白变性。按每 35 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 点样, 用 5% 积层胶和 10% 分离胶, 80V 电泳 90 min, 然后将蛋白带 100 V 湿转 1 h 至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别加入 NF- κB P65 (1:500) 一抗和 β -actin (1:1 000) 一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST 漂洗, 10 min \times 3 次。加入 HRP 标记的二抗 (1:3 000), 室温 1 h。TBST 漂洗, 10 min \times 3 次。加入 ECL 试剂化学发光显影。在 Bio-Rad 公司 Gel EQ 凝胶成像仪上采集图像, 用内置软件分析条带灰度值, 并以同一样本目的条带灰度值/ β -actin 灰度值作为样本的相对表达量。每组样本重复 3 次以上。

1.4 统计学处理

用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 计量资料采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示, 计数资料采用百分比表示, 用 t 检验比较各组样本均值, χ^2 检验用于比较各组细菌易位的发生率, 组间比较用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

PCT 组大鼠活泼, 精神亢奋; 实验组 (SHE、GAP) 大鼠活动减少, 精神萎靡不振。

2.2 小肠黏膜厚度观察

PCT 组小肠黏膜上皮细胞的结构完整, 绒毛排列整齐, 杯状细胞分布均匀, 肠黏膜厚度、绒毛高度及表面积均较高; SHE 组小肠黏膜厚度变薄, 绒毛数量变少, 高度下降, 形态不规则, 排列紊乱, 小肠上皮细胞绒毛顶端及根部均有凋亡细胞, 与 PCT 组比较, SHE 组肠绒毛高度、黏膜厚度降低, 肠绒毛的表面积减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); GAP 组小肠绒毛基本完整, 绒毛排列整齐, 黏膜萎缩减轻, 杯状细胞增多, 绒毛顶端及根部仅见少量的凋亡细胞, 与 SHE 组比较, GAP 组肠绒毛高度、黏膜厚度及肠绒毛表面积均有所增加, 但仍低于 PCT 组, 组间比较有显著性差异 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 见表 1。

2.3 肠黏膜超微结构观察

PCT 组小肠黏膜微绒毛排列整齐, 紧密连接完整, 镧颗粒仅见附着于小肠微绒毛表面、毛细血管腔

表 1 各组大鼠肠黏膜形态学的比较 ($\bar{x}\pm s, n=20$)

组别	绒毛高度/ μm	肠黏膜厚度/ μm	肠绒毛表面积/ μm^2
PCT	324 \pm 19	398 \pm 41	16 344 \pm 997
SHE	246 \pm 23**	256 \pm 37**	12 345 \pm 917*
GAP	275 \pm 23 \blacktriangle	368 \pm 18 $\blacktriangle\blacktriangle$	13 986 \pm 978 \blacktriangle

注: 与 PCT 组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 SHE 组比较, \blacktriangle $P<0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle$ $P<0.01$ 。

面。肠黏膜上皮和毛细血管内皮连接复合体、基底膜、血管外间质均未见镧颗粒沉积。SHE 组微绒毛有萎缩及脱落, 紧密连接间隙增宽, 内质网及线粒体轻度扩张, 在肠黏膜上皮和血管内皮紧密连接、基底膜处均可见镧颗粒呈线状分布, 且局部可见镧颗粒通过血管内皮紧密连接进入周围组织的间隙, 呈弥漫性分布于肠上皮及毛细血管内皮、基底膜、周围组织间隙。GAP 组可见上皮微绒毛轻度变形及少量脱落, 镧颗粒分布于肠腔和毛细血管腔面, 周围组织间隙和细胞浆中未见镧颗粒分布。

2.4 肠道细菌易位观察

PCT 组大鼠各器官细菌培养均为阴性; SHE 组脾脏及肠系膜淋巴结有细菌移位, 与 PCT 组比较, $P<0.05$; GAP 组器官易位细菌和细菌易位发生率减少, 与 SHE 组比较, $P<0.05$, 见表 2。

表 2 各组大鼠细菌易位率的变化 ($\bar{x}\pm s, n=20$, 个 \cdot 100 mg^{-1})

组别	肝脏	脾脏	肺脏	淋巴结	血液/个 \cdot mL^{-1}	易位细菌率/%
PCT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
SHE	0.00	1.6 \pm 0.75	0.00	1.5 \pm 0.75	0.00	0.69 \pm 0.63**
GAP	0.00	0.8 \pm 0.58	0.00	0.7 \pm 0.62	0.00	0.33 \pm 0.47 \blacktriangle

注: 与 PCT 组比较, * $P<0.01$; 与 SHE 组比较, \blacktriangle $P<0.05$ 。

2.5 血液及肠黏膜 DAO 活性与纤维二糖酶浓度变化
较 PCT 组, SHE 组血清 DAO 水平显著增高, 而二糖酶水平降低, 小肠黏膜 DAO、二糖酶水平均显著降低。相比 SHE 组, GAP 组血清 DAO 水平明显降低, 且血清二糖酶水平增高; 肠 DAO 水平及小肠黏膜二糖酶均显著增高, 组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 3。

2.6 血清内毒素及炎症介质 TNF- α 、IL-6 含量的变化

SHE 组血清内毒素、IL-6 浓度较 PCT 组明显升高, TNF- α 降低, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。给予参芪花粉片治疗后血清内毒素、IL-6 浓度均显著降

低, TNF- α 增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表

表 3 各组大鼠血和小肠黏膜组织匀浆 DAO、二糖酶

组别	含量的比较 ($\bar{x} \pm s, n=20$)			
	血(DAO) /kU·L ⁻¹	肠(DAO) /kU·L ⁻¹	血(二糖酶) /mmol·L ⁻¹	肠(二糖酶) /mmol·gprot ⁻¹
PCT	0.861±0.359	0.516±0.062	3.083±0.186	0.573±0.032
SHE	3.533±0.584**	0.325±0.053**	1.472±0.079**	0.377±0.010**
GAP	1.810±0.450**▲	0.431±0.049**▲	1.951±0.070**▲	0.448±0.021**▲

注:与 PCT 组比较, ** $P < 0.01$; 与 SHE 组比较, ▲ $P < 0.05$ 。

表 4 各组动物血清内毒素、TNF- α 、IL-6 的浓度变化

组别	浓度的比较 ($\bar{x} \pm s, n=20$)		
	内毒素/EU·mL ⁻¹	TNF- α /pg·mL ⁻¹	IL-6/pg·mL ⁻¹
PCT	0.058±0.014	10.300±3.512	0.000±9.695
SHE	0.786±0.106**	6.514±9.869**	154.000±37.372**
GAP	0.488±0.072**▲	18.014±4.443**▲	71.714±28.253**▲

注:与 PCT 组比较, ** $P < 0.01$; 与 SHE 组比较, **▲ $P < 0.05$ 。

4。

2.7 TLR4 mRNA 实时荧光定量 PCR 检测结果

SHE 组空肠组织 TLR4 mRNA 表达量增加, 与 PCT 组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。GAP 组 TLR4 表达量较 SHE 组显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 5。

2.8 Western 免疫印迹结果表明

空肠组织 NF- κ B P65 蛋白表达条带灰度值 SHE 组较 PCT 组增加; 干预后, GAP 组较 SHE 组下调, 组间比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P <$

表 5 各组大鼠空肠组织 TLR4mRNA 及 NF- κ B P65 蛋白

组别	表达 ($\bar{x} \pm s, n=20$)		
	$\Delta \Delta Ct$	$2^{-\Delta \Delta Ct}$	NF- κ B P65 条带灰度值
PCT	0.000±0.117	1.003±0.081	0.156±0.080
SHE	-0.764±0.082	1.700±0.097**	0.366±0.092**
GAP	-0.272±0.149	1.213±0.119▲	0.187±0.097**▲

注:与 PCT 组比较, ** $P < 0.01$; 与 SHE 组比较, ▲ $P < 0.05$ 。

0.05)。见表 5。

3 讨论

低氧是高海拔地区突出的环境特征, 其对快速进入高海拔地区的人体正常生理功能具有危害作用。文献报道在高原移居人群中, 胃肠道疾病的发病率很高^[3]。这严重干扰进入高原地区人员的正常生活、工作和学习, 严重损害急进高海拔部队指战员的

军事作业能力, 不利于高原地区的经济发展和国防现代化建设。另外, 随着高原地区的旅游业发展, 急进高原地区的人越来越多, 低氧带来胃肠危害也越来越明显。因此, 探索研究有效安全的干预物来减轻急进高海拔地区人员胃肠黏膜的损伤具有重要意义。参芪花粉片主要成分为党参、黄芪、蒲黄、油菜花粉、玉米花粉、向日葵花粉等^[4], 为补益类药物, 以补气为主。动物与人体研究表明参芪花粉片能提高体内超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性; 减轻氧自由基的损伤, 改善脑功能和睡眠, 增加食欲, 增强体力, 并能明显保护高原多脏器应激损伤^[5], 改善脑膜微循环, 调节心率血压等生理机能, 是一种较好的致适应剂。

在高原低氧条件下, 不但可引起肠道微生态环境破坏, 菌群失调, 有害菌(革兰阴性菌)大量繁殖, 有益菌显著减少, 还可使有害物质在肠道内聚集, 引起肠道内环境平衡破坏, 导致优势菌突破黏膜发生细菌转移, 引起肠源性感染。因此, 肠屏障对防止致病性抗原入侵起着十分重要的作用, 一旦肠道细菌及内毒素进入淋巴系统及门静脉, 可移位至身体相关器官和组织^[6], 导致各种炎症因子的“瀑布样”级联效应和全身炎症性反应综合征(SIRS), 更甚者产生多器官功能障碍综合征(MODS)^[7], 从而损伤肠道的屏障功能。选择适当的检测指标, 对及时判断有无肠黏膜损伤及是否存在“细菌和毒素的移位”是非常关键的。目前组织学、细菌移位、内毒素、分子探针等是肠黏膜功能检测的主要常用指标。肠黏膜的组织形态学观察是肠屏障功能评价最直接的依据, 利用显微镜观察肠黏膜, 能较准确地分析肠黏膜上皮形态结构的变化情况。本文结果表明了急性低氧暴露下肠道菌群存在移位, 这和既往文献的缺氧引起细菌移位^[8]结果相同。低氧暴露条件下可引起大鼠肠道黏膜屏障功能显著的损伤在上述实验结果中都得到了证实。

Toll 样受体 4 (TLR4) 作为肠道的天然免疫受体, 在健康肠黏膜上皮细胞中少量甚至不表达, 这样即使有细菌及相关的内毒素存在也可不激活。肠黏膜与细菌间的炎性反应由肠上皮细胞 TLR4 调节, 一方面为维持肠道菌群平衡而产生适度的炎症反应; 另一方面避免免疫系统过度反应导致肠屏障损伤。在革兰氏阴性菌引起的败血症中, 革兰氏阴性菌外膜

的脂多糖(LPS)可强效激动肠上皮细胞的TLR4,引起TLR4的过多表达,当LPS与TLR4作用后,通过TRIF依赖和MyD88依赖的两条途径,激活胞浆中核转录因子 κ B(NF- κ B),活化的NF- κ Bp65迁移到细胞核内,与DNA分子上的炎性调节基因结合,启动炎性细胞因子转录、翻译,最终引起多种细胞因子及炎症介质合成释放^[9-10],产生炎症介质反应,引起肠黏膜损伤。针对TLR4在肠道免疫中的作用,目前观点尚不统一,有学者^[11]发现TLR4可以促进上皮细胞增殖并抑制肠道细菌移位,但也有学者^[12]认为肠道损伤后TLR4可能在粒细胞招募与细菌移位中扮演着十分关键的角色。有实验发现^[13]吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(PDTC)可以明显减少TLR4 mRNA的表达,PDTC是一种NF- κ B活化的抑制剂,其抑制TLR4的表达可能与NF- κ B的活性被PDTC阻断有关。

综上所述,高原低氧暴露可引起胃肠道黏膜屏障功能严重损伤。早期给予参芪花粉片可以抑制TLR4/NF- κ B信号通路的活化,减轻肠黏膜屏障损伤,减少肠道细菌和毒素易位,减轻低氧暴露下的全身炎症反应,进而阻止高原疾病的发生发展,可见对于快速进驻高原的人群早期给予参芪花粉片不但有利于保护胃肠黏膜,也能有效地防治高原病的发生,起到防治兼备的作用。

参考文献:

- [1] 张世范,吴天一.全身炎症反应综合征与急性高原反应综合征的关联性研究和思考[J].西北国防医学杂志,2007,28(2):81-83
- [2] 罗晓红,张鲜英,高 炜,等.高原全身炎症反应综合征与急性高原反应综合征:一体化评分系统的初步探讨[J].西北国防医学杂志, 2007,28(2):87-93
- [3] ZHOU B,YANG D Z, ZHOU Q Q. The SEM observation of small intestina l mucosa in the rabbits under simulated high altitude hypoxia.[J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2009, 18(8): 751-753.
- [4] 石自福,周其全,向 路,等.3种中药复方制剂治疗高原脱适应症的随机安慰剂对照试验[J].中西医结合学报,2011,9(4):395-401.
- [5] 娄晓敏,张雪峰,周其全,等.参芪花粉片对高原慢性间歇性缺氧暴露期间脱习服的疗效观察[J].现代预防医学,2013,40(7):1227-1229.
- [6] DEITCH E A. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings?[J]. Surgery, 2002, 131(3): 241-244.
- [7] WANG Z T, YAO Y M, XIAO G X, et al. Risk factors of development of gut-derived bacterial translocation in thermally injured rats[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(11): 1619-1624.
- [8] ZHOU Q Q, YANG D Z, LUO Y J, et al. Over Starvation Aggravate Intestinal Mucosal Injury and Promote Bacterial Translocation Under High -Altitude Hypoxic Environment Exposure [J]. World Gastroenterology, 2011, 17(12): 1584-1593.
- [9] NOREEN M, SHAH M A, MALL S M, et al. TLR4 polymorphisms and disease susceptibility.[J]. Inflamm Res, 2012, 61 (3): 177-188.
- [10] 张尚波,石学慧,王净净,等.愈痢灵方对PTZ致病大鼠脑组织海马CA3区TLR4、NF- κ B P65、TNF- α 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2016,36(1):33-40.
- [12] FUKATA M, MICHELSEN K S, ERI R, 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 Gastrointest Liver Physiol, 2005, 288 (5): G1055-G1065.
- [13] SOARES AL, COELHO F R, GUABIRABA R, et al. Tumor necrosis factor is not associated with intestinal ischemia/reperfusion-induced lung inflammation.[J]. Shock, 2010, 34(3): 306-313.
- [12] LUO H, GUO P, ZHOU Q. Role of TLR4/NF- κ B in damage to intestinal mucosa barrier function and bacterial translocation in rats exposed to hypoxia [J]. PLoS One, 2012, 7(10):e46291.

(本文编辑 杨 瑛)