

·综述·

中暑时肠黏膜机械屏障功能的变化

肖桂珍 苏磊

【关键词】 中暑； 热； 运动； 肠黏膜屏障； 机械屏障

中暑是由于外在的高温环境或活动引起内在代谢产热作用于机体，导致机体不能去除这些因素以保持核心体温恒定，继而核心体温升高引起的潜在致命性机体紊乱^[1]，其特点是核心体温 $>40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，伴有中枢神经系统异常，如谵妄、抽搐或昏迷。按照致病因素，中暑分为经典型中暑（高热环境导致）和劳力性中暑（高强度的体力活动导致），其高热和（或）体力活动都可影响肠道，造成屏障功能障碍^[2]。肠黏膜屏障可抵制外来物质进入内环境，如食物抗原、胆汁、水解酶和内毒素等，是机体抵御肠腔内有害环境的第一道屏障，对维持机体内环境的稳定具有重要作用^[3]。

1 肠黏膜屏障的组成与结构

肠道屏障包括机械屏障、化学屏障、微生物屏障和免疫屏障，其中机械屏障由肠上皮细胞膜、相邻肠上皮细胞之间的连接、分泌的黏液和免疫因子（如组织巨噬细胞）构成。上皮细胞间连接包括紧密连接（TJ）、缝隙连接（GJ）、黏附连接（AJ）以及桥粒等，其中紧密连接呈一条窄的带状，位于上皮细胞膜外侧顶部，由脂质和蛋白构成，蛋白主要包括结构蛋白和调节蛋白，是调节肠上皮细胞物质流量的限速屏障。跨膜蛋白 occludin 和 claudin 组成原纤维，连接细胞内的肌动蛋白链，穿过细胞膜和邻近细胞的蛋白相互作用，从而调节离子和大分子跨细胞旁路的被动转运。occludin 蛋白是紧密连接中最重要的结构蛋白，不仅能通过外环以拉链式结合进而产生严密的细胞旁封闭，还能与不同的分子结合，参与紧密连接形成的信号调节^[4]。

DOI:10.3760/ema. j. issn.1003-0603. 2012. 09.022

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81071529）

作者单位：510010 广东，广州军区广州总医院营养科（肖桂珍），急救医学部（苏磊）

通信作者：苏磊，Email: slei_jicu@163.com

肠上皮通透性包括跨上皮通路和细胞旁通路（紧密连接）。在跨上皮通路中，肠黏膜上皮细胞允许营养物质从肠腔吸收收入血，同时限制对人体有害的物质（如内毒素和炎症因子）通过^[5]。细胞旁通路主要由上皮细胞之间的紧密连接控制，对大分子物质（如内毒素和细菌的其他产物）是否通过起到关键性调控作用^[6]，在维持肠壁通透性中作用最大。

2 应激引起肠黏膜机械屏障功能障碍

研究发现，许多应激因素可引起肠屏障功能障碍，包括高热、药物、心理应激、长时间紧张锻炼等均可导致肠通透性增加，使正常情况下不能从肠腔进入血液的大分子物质入血。正常机体的肠黏膜一直存在较低水平的通透性，但功能正常的免疫系统通常能清除病原因子以避免机体损伤。如果肠黏膜通透性增加，则会导致有害的局部性和系统性的炎症反应，即肠渗漏综合征。

2.1 热应激：热应激导致器官功能不全时，胃肠道首先受影响^[7]。体外实验发现， $41\text{ }^{\circ}\text{C}$ 刺激肠上皮 Caco-2 单层细胞超过 24 h，随着热打击时间延长 occludin 表达上升，而紧密连接相关蛋白跨膜蛋白-1（ZO-1）下降，细胞旁通透性大增，上皮抵抗性下降。推测 occludin 上升是细胞的保护性反应，其表达受热休克蛋白（HSP）调节，如果阻断 HSP 则导致 occludin 表达下调、连接部位断裂，从而使细胞间通透性增加更明显^[8]。使用 $37\sim 43\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高温刺激肠上皮 T84 细胞 1 h，细胞单层的跨膜电阻（TER）和对辣根过氧化物酶（HRP）的通透性下降，其机制为上调蛋白激酶 C（PKC）和肌球蛋白轻链激酶（MLCK），从而增加肌球蛋白轻链（MLC）表达，后者与肌动蛋白相连，引起细胞运动和收缩，细胞旁途径开放^[9]。

高温引起肠道血流下降，以及肠黏膜损害、紧密连接的完整性丧失，造成大分子物质入血，表现为内毒素血症。动物

模型中，热应激时门静脉和动脉血中脂多糖（LPS）浓度明显上升，核心体温到达 $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时增加最为明显。如 Hall 等^[10]研究表明，核心体温达 $41.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的麻醉大鼠，门脉 LPS 浓度显著上升。Lambert 等^[11]观察到，核心体温达 $42.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的麻醉大鼠，肠道（包括十二指肠、空肠、回肠和结肠）对异硫氰酸荧光素（FITC）- 葡聚糖的通透性增加，小肠病理改变较结肠明显，透射电镜下可见肠上皮细胞破坏，微绒毛丧失，紧密连接开放，线粒体肿胀、空泡化。临床死亡的中暑病例主要症状常常包括胃肠道出血、内毒素血症，说明其肠屏障功能也同样受到破坏。

后来一系列的实验室研究也发现，热打击与肠道衍生 LPS 有关，而去除 LPS 或治疗内毒素血症后，则对中暑预后有利。一项实验显示，预先注射抗 LPS 的免疫血浆，中暑的猴子血 LPS 水平基本没有升高，并且全部存活，存活时间明显延长；而对照组血 LPS 水平则明显升高，只有 1 只存活（ $P<0.025$ ），证实 LPS 在中暑的病理进程中起重要作用^[12]。Bynum 等^[13]的研究显示，犬在诱导中暑前预先使用抗菌药物、泻药导泻并进行灌肠，可以使 18 h 生存率从 20.0% 提高到 70.6%，提示肠道细菌通过内毒素血症参与了中暑的病理过程。

2.2 高强度的体力活动：长时间的紧张运动会致肠道屏障功能障碍。研究发现，因体力衰竭需要进行治疗的马拉松运动员，81% 的血中内毒素水平显著上升，并与运动时间呈正相关^[14]。Lambert 等^[15]也在进行长时间耐力运动的人身上发现了进一步的证据，运动员参加全能三项赛后，包括 2.4 km 游泳、112 km 自行车和 26.2 km 长跑，立即摄入含乳糖和鼠李糖的溶液后测定小肠通透性。结果显示，与静息的对照个体相比，运动员的肠道通透性明显增加。

更多的研究发现，某些环境下，即使

较小的运动量也可造成肠道屏障功能障碍。Pals 等^[16]发现,与仅需 40%~60% 的最大氧耗(VO_2max)的慢跑相比,60 min 的慢跑(80% VO_2max)显著增加了小肠通透性,其程度和直肠温度呈正相关,但未引起胃肠道症状。如果同时限制液体摄入,赛跑 60 min 达到 70%的 VO_2max 时,代表胃、十二指肠通透性的尿蔗糖以及代表小肠通透性的乳果糖/鼠李糖都较休息时明显升高^[17]。运动前 24 h 使用治疗剂量的阿司匹林或布洛芬,可导致胃和小肠通透性显著增加,以阿司匹林的增加更明显^[18]。

3 肠屏障破坏的原因

运动和(或)热应激时肠道血流减少,为增加散热大量血液从内脏器官转向肌肉和皮肤。肠道缺血、缺氧,从而导致 ATP 耗竭、酸中毒和离子泵活性改变,使细胞活性下降、细胞间通透性升高。高热具有直接的细胞毒性,还造成细胞代谢需求增加,诱导细胞产生氧自由基^[19],同时内脏血流下降也会造成氧化和硝化应激,导致肠上皮和肝细胞缺氧,产生活性氧和氮类物质,加速黏膜损伤,两者协同作用,造成细胞膜破坏和紧密连接开放,肠道通透性升高。而使用保护和修复缺血及氧化损伤的药物,可预防和治疗中暑^[19]。

4 免疫反应

严重的运动和(或)高热应激,加上可能伴发的其他应激因素,均导致肠上皮细胞膜和细胞间连接的破坏。正常情况下,少量内毒素可被肝脏迅速解毒和灭活,但在严重热应激时,由于门静脉血流和肝细胞功能下降,对内毒素的解毒功能也下降,造成大量内毒素通过肠黏膜入血^[20];引起炎症因子的产生和释放增加,活化内皮细胞,刺激内皮活化因子的释放,引起局部或系统的炎症反应,加重和引起免疫失衡,造成高热和循环衰竭的恶性循环^[21],即出现了休克综合征,其症状包括低血压、心动过速和器官灌注不足^[22]。

肠腔内的细菌、抗原等物质渗漏到内环境激活免疫反应,刺激细胞(如单核细胞和巨噬细胞)释放促炎细胞因子,引起对肠道上皮和组织的炎症损害。对中暑患者的研究证实,热应激反应期间存在促炎细胞因子的释放,白细胞介素

(IL-6、IL-1 α 、IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和 γ -干扰素(IFN- γ)浓度增高,并可能和血 LPS 浓度升高有关,与疾病的严重程度呈正相关^[23]。虽然 IL-6 与发病时的核心体温无相关性,但在超过 6 h 后 IL-6 显著升高,并随体温下降而下降,与临床结局相关,并与病死率呈正相关^[24]。核心温度 42.5 $^{\circ}C$ 的麻醉大鼠血中 TNF- α 升高,肠道对 FITC-葡聚糖的通透性增加。TNF- α 不仅能直接影响上皮细胞紧密连接蛋白表达及分布,并能与 IFN- γ 起协同作用,诱导 MLCK 等紧密连接调节蛋白的表达,使通透性明显增加^[25]。IFN- γ 影响 claudin-2 和 occludin 的表达,破坏了肠上皮屏障,使紧密连接蛋白表达下降,加重黏膜异常免疫反应^[26]。

内毒素血症恶化了循环衰竭和体温调节能力衰竭,同时又刺激了炎症因子的产生,诱导低血压、循环衰竭和核心体温增加。这一免疫反应的结果可能是系统炎症反应,造成中暑特征性的多器官功能衰竭和中枢功能不全^[27]。

5 肠道通透性的测定方法

高热和(或)运动造成肠屏障功能改变,肠道通透性增加,其常用的测定方法从原理上分为直接法和间接法。

5.1 直接评价法:通过口服不代谢、正常不能通过肠黏膜的大分子试剂,测定尿中浓度,可直接代表肠上皮细胞旁通路的渗漏情况。各种糖类探针最常用,但由于受胃排空、肠蠕动、肠黏膜表面积、肾排出量和尿液收集的误差等影响,多采用两种糖(一种单糖和一种双糖)探针同时测定通透性。

5.1.1 乳果糖和甘露醇比值:乳果糖和甘露醇比值为临床上最常用的指标,乳果糖分子质量较大,正常情况下在小肠内不消化,只能在大肠内被细菌降解。细胞旁通路(紧密连接)或上皮受损时进入循环,这也是细菌及其毒素通过肠黏膜的途径。甘露醇主要通过小肠上皮细胞膜上的水溶性微孔吸收。肠黏膜屏障损伤导致上皮细胞间的结构破坏,乳果糖吸收增加,而从细胞膜途径吸收的甘露醇吸收量不受影响,因此,尿中乳果糖和甘露醇比值升高。也有实验使用鼠李糖代替甘露醇。

5.1.2 其他糖类探针:单糖类的鼠李糖

和 D-木糖,以及双糖类的蔗糖和乳糖等也是常用指标。蔗糖常用于评价胃的通透性。因为胃里没有蔗糖酶,尿中出现蔗糖表明器官屏障的丧失。蔗糖是检测胃、十二指肠通透性的有效指标,在十二指肠远端蔗糖迅速被蔗糖-异麦芽糖酶降解,因此只能用来检测胃、十二指肠通透性^[28]。三氯蔗糖在胃肠道不被消化,口服后几小时内可通过消化系统到达结肠,并停留 24 h,用于评价结肠通透性^[29]。而三氯蔗糖与乳果糖比值则可反映结肠相对于小肠通透性的程度。

5.1.3 其他大分子物质:在动物模型中,通常用荧光探测剂检测小肠通透性,将在体小肠两端结扎,注入 FITC-右旋糖酐一定时间后检测其在血浆中的浓度,可直接反映这段小肠的通透性改变。也可将离体的一段小肠用同样方法处理,浸入缓冲液中,并测定其中浓度。其他常用的探针使用方法相似,如铬标记的乙二胺四乙酸(Cr-EDTA)和辣根过氧化物酶^[30],这些物质的分子质量从几百到几百万,不但是小肠通透性的指标,还能表明小肠上皮开放性程度。

5.2 间接评价方法:肠道屏障功能受损后,原本为肠内容物的物质进入血液中,检测这些物质可以间接反映肠道屏障功能的改变,其检测方法较简便,更多用于临床和人体研究。

5.2.1 内毒素:内毒素是革兰阴性(G-)细菌外膜的 LPS 成分,具有高致病性,在肠道中浓度很高。如在血液循环中内毒素浓度上升,表明有重度肠道屏障功能障碍,肠通透性升高,其水平超过了肝脏从血中清除的能力^[10]。检测原理为:LPS 能够诱导鲎鱼血液凝集,以此定量反映其血浆水平。由于对设备与技术要求高,临床应用受限制。

5.2.2 二胺氧化酶(DAO):DAO 是肠黏膜上皮细胞内具有高度活性的细胞内酶,肠黏膜上皮细胞受到损伤,DAO 被释放出来,血浆浓度升高,其活性程度与黏膜损伤程度一致,可作为肠黏膜上皮细胞完整性的血浆标志物,比较准确且敏感^[31]。

5.2.3 D-乳酸:D-乳酸是肠道内多种细菌发酵的代谢产物,正常情况下很少被吸收,在人体内的清除率很低,肠道损伤时血中水平升高^[32]。

6 展 望

高热直接损伤肠黏膜细胞,与高强度的运动协同,可降低胃肠道血流,导致组织缺氧、ATP 耗竭、酸中毒和氧化应激,使紧密连接开放,诱发肠屏障功能不全,增加对原本不能透过的分子的通透性,引起炎症反应。中暑中有关紧密连接的完整分子结构及其调节机制目前尚不清楚,是否存在其他重要的调节途径对紧密连接的研究有着重要的意义。通过改善肠黏膜屏障功能,减少肠道通透性,是防治中暑的目标之一。

参考文献

- [1] Bouchama A, Knochel JP. Heat stroke. *N Engl J Med*, 2002, 346: 1978-1988.
- [2] Rosendal L, Langberg H, Skov-Jensen A, et al. Incidence of injury and physical performance adaptations during military training. *Clin J Sport Med*, 2003, 13: 157-163.
- [3] Madara JL. Warner-Lambert / Parke-Davis Award lecture: pathobiology of the intestinal epithelial barrier. *Am J Pathol*, 1990, 137: 1273-1281.
- [4] Chen YH, Lu Q, Goodenough DA, et al. Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 2002, 13: 1227-1237.
- [5] Barrett KE. New ways of thinking about (and teaching about) intestinal epithelial function. *Adv Physiol Educ*, 2008, 32: 25-34.
- [6] Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol*, 2006, 169: 1901-1909.
- [7] Liu F, Yin J, Du M, et al. Heat-stress-induced damage to porcine small intestinal epithelium associated with downregulation of epithelial growth factor signaling. *J Anim Sci*, 2009, 87: 1941-1949.
- [8] Dokladny K, Moseley PL, Ma TY. Physiologically relevant increase in temperature causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290: G204-212.
- [9] Yang PC, He SH, Zheng PY. Investigation into the signal transduction pathway via which heat stress impairs intestinal epithelial barrier function. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22: 1823-1831.
- [10] Hall DM, Buettner GR, Oberley LW, et al. Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280: H509-521.
- [11] Lambert GP, Gisolfi CV, Berg DJ, et al. Selected contribution: hyperthermia-induced intestinal permeability and the role of oxidative and nitrosative stress. *J Appl Physiol*, 2002, 92: 1750-1761, 1749.
- [12] Gathiram P, Wells MT, Brock-Utne JG, et al. Antilipopolysaccharide improves survival in primates subjected to heat stroke. *Circ Shock*, 1987, 23: 157-164.
- [13] Bynum G, Brown J, Dubose D, et al. Increased survival in experimental dog heatstroke after reduction of gut flora. *Aviat Space Environ Med*, 1979, 50: 816-819.
- [14] Brock-Utne JG, Gaffin SL, Wells MT, et al. Endotoxaemia in exhausted runners after a long-distance race. *S Afr Med J*, 1988, 73: 533-536.
- [15] Lambert GP, Murray D, Eddy W, et al. Intestinal permeability following the 1998: Irman triathlon. *Med Sci Sports Exerc*, 1999, 31: S318.
- [16] Pals KL, Chang RT, Ryan AJ, et al. Effect of running intensity on intestinal permeability. *J Appl Physiol*, 1997, 82: 571-576.
- [17] Lambert GP, Lang J, Bull A, et al. Fluid restriction during running increases GI permeability. *Int J Sports Med*, 2008, 29: 194-198.
- [18] Lambert GP, Boylan M, Laventure JP, et al. Effect of aspirin and ibuprofen on GI permeability during exercise. *Int J Sports Med*, 2007, 28: 722-726.
- [19] Chang CK, Chang CP, Liu SY, et al. Oxidative stress and ischemic injuries in heat stroke. *Prog Brain Res*, 2007, 162: 525-546.
- [20] Leon LR. Heat stroke and cytokines. *Prog Brain Res*, 2007, 162: 481-524.
- [21] Yan YE, Zhao YQ, Wang H, et al. Pathophysiological factors underlying heatstroke. *Med Hypotheses*, 2006, 67: 609-617.
- [22] Lambert GP. Role of gastrointestinal permeability in exertional heatstroke. *Exerc Sport Sci Rev*, 2004, 32: 185-190.
- [23] Bouchama A, al-Sedairy S, Siddiqui S, et al. Elevated pyrogenic cytokines in heatstroke. *Chest*, 1993, 104: 1498-1502.
- [24] Leon LR. The thermoregulatory consequences of heat stroke: are cytokines involved?. *J Thermal Biol*, 2006, 31: 67-81.
- [25] Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, et al. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol*, 2003, 171: 6164-6172.
- [26] Utech M, Ivanov AI, Samarin SN, et al. Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 5040-5052.
- [27] Epstein Y, Roberts WO. The pathophysiology of heat stroke: an integrative view of the final common pathway. *Scand J Med Sci Sports*, 2011, 21: 742-748.
- [28] Farhadi A, Keshavarzian A, Kwasny MJ, et al. Effects of aspirin on gastroduodenal permeability in alcoholics and controls. *Alcohol*, 2010, 44: 447-456.
- [29] Haas V, Büning C, Buhner S, et al. Clinical relevance of measuring colonic permeability. *Eur J Clin Invest*, 2009, 39: 139-144.
- [30] Cameron HL, Perdue MH. Stress impairs murine intestinal barrier function: improvement by glucagon-like peptide-2. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 314: 214-220.
- [31] Honzawa Y, Nakase H, Matsuura M, et al. Clinical significance of serum diamine oxidase activity in inflammatory bowel disease: importance of evaluation of small intestinal permeability. *Inflamm Bowel Dis*, 2011, 17: E23-25.
- [32] Szalay L, Umar F, Khadem A, et al. Increased plasma D-lactate is associated with the severity of hemorrhagic/traumatic shock in rats. *Shock*, 2003, 20: 245-250.

(收稿日期: 2012-07-27)

(本文编辑: 李银平)