

NOD 样受体通路在急性腹腔感染早期对大鼠肠屏障的作用机制初探

肖元廷 李国逊 王西墨

【摘要】 目的 初步探讨在急性腹腔感染早期肠上皮细胞 NOD 样受体(NLRs)的表达规律及其对肠屏障的作用。方法 将 SD 大鼠按随机数字表法分为对照组($n=6$)和实验组($n=24$),采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备急性腹腔感染模型。于术后 2、6、12 和 24 h 各取 6 只大鼠,采用实时荧光半定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测末端回肠黏膜上 NOD2、NOD 样受体 3(NLRP3)的 mRNA 表达;蛋白质免疫印迹试验检测天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1(caspase-1)及紧密连接蛋白的表达;凝胶电泳迁移率(EMSA)实验检测核转录因子 κ B(NF- κ B)活性;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平;原位末端缺刻标记试验(TUNEL)观察肠上皮细胞死亡情况,并用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的葡聚糖溶液检测肠道的通透性。结果 NOD2 mRNA 表达在术后 2 h 迅速升高达峰值,且明显高于对照组(75.50 ± 13.03 比 1.00 ± 0.00 , $P < 0.01$),术后 6 h 迅速回落,此后缓慢下降;NLRP3 mRNA 表达于术后 2 h 降低,随后逐渐升高至 12 h 达峰值,且明显高于对照组(4.03 ± 0.71 比 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$);caspase-1 蛋白表达在术后 2 h 即明显高于对照组(3.56 ± 0.14 比 2.10 ± 0.11 , $P < 0.01$),然后呈逐渐增高的趋势;紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 和 Claudin-4 的表达分别在术后 2~6 h 即明显低于对照组(2 h Occludin: 7.24 ± 1.13 比 12.72 ± 1.34 , 6 h ZO-1: 0.47 ± 0.09 比 1.57 ± 0.17 , 2 h Claudin-4: 1.63 ± 0.28 比 3.40 ± 0.34 , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),随后均逐渐下降;NF- κ B 活性在术后 2 h 即明显高于对照组(24.85 ± 0.57 比 12.42 ± 0.73 , $P < 0.01$),随后在一个高表达状态下呈缓慢下降趋势;IL-6 在术后 6 h 急剧增高达峰值(与对照组比较 3088.07 ± 330.03 比 26.19 ± 7.58 , $P < 0.01$),随后缓慢回落;TNF- α 于术后 2 h 即明显高于对照组(110.75 ± 19.18 比 7.86 ± 3.58 , $P < 0.01$),最后呈逐渐增高的趋势;随着 CLP 后时间的延续,肠上皮细胞死亡率在术后 2 h 即明显高于对照组[(0.12 ± 0.02)%比 (0.03 ± 0.01)%, $P < 0.05$],并呈逐渐上升的趋势;肠道通透性随着腹腔感染时间的延长而逐渐增大,与对照组相比从 2 h 开始其差异就有统计学意义[葡聚糖通透率:(35.75 ± 4.66)%比 (2.84 ± 0.35)%, $P < 0.01$]。相关性分析显示,NLRP3 与肠通透性和 caspase-1 蛋白表达量的相关性较其他指标略高;caspase-1 与死亡细胞量、TNF- α 和肠通透性显示出较强的相关性;而肠通透性与 caspase-1 蛋白表达量相关性最高。结论 在腹腔感染早期,NOD2 和 NLRP3 都可能起了一定的作用,NOD2 的巨幅波动提示其可能受到机体精确的反馈机制调节,以控制其表达不至于过强或过弱;NLRP3、caspase-1 和肠上皮细胞死亡量间的强关联可能暗示了这其中存在某种联系,而肠上皮细胞的死亡对于肠通透性以至维持肠屏障功能等可能与紧密连接蛋白一样有着重要意义。

【关键词】 NOD 样受体; 急性腹腔感染; 肠屏障; 信号通路

Effect mechanism of NOD like receptor signaling pathway on intestinal mucosal barrier of rat during early phase of acute intra-abdominal infection XIAO Yuan-ting*, LI Guo-xun, WANG Xi-mo. *Department of General Surgery, Tianjin Tianhe Hospital, Tianjin 300050, China

Corresponding author: WANG Xi-mo, Department of General Surgery, Tianjin Union Medical Center, Colorectal and Anal Disease Institute, Tianjin 300121, China, Email: wangximo@126.com

【Abstract】 Objective To initially investigate the expressing regularity and effect of enterocyte NOD like receptors on gut mucosal barrier during early phase of acute intra-abdominal infection. **Methods** Sprague-Dawley (SD) rats were randomly allocated into control group ($n=6$) and experimental group ($n=24$). Acute intra-abdominal infection model was induced by cecal ligation and puncture (CLP). The level of NOD2 and NOD like receptor 3 (NLRP3) mRNA expression in gut mucosa was determined using fluorescent polymerase chain reaction (PCR); the expression of caspase-1 and tight junction protein was determined by Western blotting; the activity of nuclear factor- κ B (NF- κ B) was determined by electrophoretic mobility shift assay (EMSA); the level of serum interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The dead cell percentage of enterocyte was observed by terminaldeoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, and the gut mucosal permeability using an in situ loop preparation of gut with fluorescence isothiocyanate-conjugated dextran was

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.09.005

基金项目:国家自然科学基金(30901420)

作者单位:300050 天津医院普外科(肖元廷);300121 天津市人民医院普外科,天津市大肠肛门病研究所(李国逊、王西墨)

通信作者:王西墨,Email:wangximo@126.com

determined. **Results** NOD2 mRNA expression was quickly increased to a very high apex at 2 hours after operation, compared with the control group, the difference was statistically significant (75.50 ± 13.03 vs. 1.00 ± 0.00 , $P < 0.01$), and quickly descended at 6 hours, and then slowly descended. The expression of NLRP3 mRNA was decreased at 2 hours after the operation, then increased gradually, and peaked at 12 hours, which was significantly higher than that in control group (4.03 ± 0.71 vs. 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$). The level of caspase-1 was significantly higher than that in control group at 2 hours (3.56 ± 0.14 vs. 2.10 ± 0.11 , $P < 0.01$) and then gradually increased. The levels of Occludin, ZO-1 and Claudin-4 were obviously lowered than that in control group at 2-6 hours (2 hours Occludin: 7.24 ± 1.13 vs. 12.72 ± 1.34 , 6 hours ZO-1: 0.47 ± 0.09 vs. 1.57 ± 0.17 , 2 hours Claudin-4: 1.63 ± 0.28 vs. 3.40 ± 0.34 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$), and then all slowly decreased. The activity of NF- κ B was quickly increased at 2 hours, obviously higher than that in control group (24.85 ± 0.57 vs. 12.42 ± 0.73 , $P < 0.01$), and then slowly decreased at a state of high expression. The expression of IL-6 in experimental group had a peak at 6 hours (compared with the control group, 3088.07 ± 330.03 vs. 26.19 ± 7.58 , $P < 0.01$), and then slowly decreased. The level of TNF- α was significantly higher than that in control group at 2 hours (110.75 ± 19.18 vs. 7.86 ± 3.58 , $P < 0.01$), and then gradually increased. The percentage of dead enterocyte was higher than that in control group with infection progress (0.12 ± 0.02 vs. 0.03 ± 0.01 , $P < 0.05$), and then gradually increased, so mucosal permeability was gradually increased too. Compared with the control group, the difference was statistically significant through 2 hours [glucosans: (35.75 ± 4.66)% vs. (2.84 ± 0.35)%, $P < 0.01$]. The relevance analysis showed that NLRP3 have a little higher correlation with mucosal permeability and caspase-1 protein expression than other targets. Caspase-1 had a strong correlation with the percentage of dead cell, TNF- α and gut mucosal permeability. Gut mucosal permeability had highest correlation with the expression of caspase-1 protein. **Conclusions** The data of our study suggested that NOD2 and NLRP3 take role in early phase of intra-abdominal infection, the huge wave of the expression level of NOD2 hinted that it was feed backed by some accurate mechanism in case of its express was too strong or too weak. The correlation of NLRP3, caspase-1, and percentage of dead cell imply they maybe have some extent of causation, and the percentage of dead cell in gut mucosa was as important as tight junction protein in maintaining the function of intestinal mucosal barrier.

【Key words】 NOD-like receptor; Acute intra-abdominal infection; Intestine barrier function; Signaling pathway

急性腹腔感染在临床上较常见,但其确切的病理机制仍不十分清楚。最近研究显示,NOD样受体(NLRs)中的NOD2基因产物对肠道免疫起关键作用,其中NOD2基因多态性与克罗恩病之间的关系最引人注目,目前认为这种肠道炎症性疾病是由肠道共生菌所引发,NOD2作为天然免疫的非特异性胞内微生物感受器,在克罗恩病的病理进程中起了重要作用,而NOD2不仅在巨噬细胞和树突细胞中有表达,还在包括潘氏细胞在内的某些肠上皮细胞中也有表达^[1-2]。本研究将初步探讨NLRs通路在急性腹腔感染状态下对大鼠肠屏障的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组: 清洁级雄性SD大鼠,体质量200~230g,购自南京军区南京总医院实验动物中心,动物合格证号:00085497。将大鼠按随机数字表法分为对照组($n=6$)和实验组($n=24$),实验组又按手术后时间分为2、6、12和24h亚组,每组6只。

本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 腹腔感染模型制备及标本的获取: 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备大鼠腹腔感染模型^[3]。于术后相应时间点麻醉大鼠,下腔静脉取血4ml,离心10min后取血清置-80℃待测;取10cm回肠纵向切开肠管,清除粪便后刮取肠黏膜置-80℃待测。

1.3 NOD2、NOD样受体3(NLRP3)mRNA表达测定: 采用实时荧光半定量聚合酶链反应(RT-PCR)检测^[4]。抽提样品RNA,用紫外吸收测定法检测样品RNA质量后合成cDNA,用于RT-PCR。用样品的目的基因和管家基因分别进行RT-PCR反应,根据扩增曲线得到每个样品目的基因和管家基因的CT值。运用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对不同样品间目的基因的表达差异进行分析;以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内对照。使用的引物序列见表1。

表1 NOD2、NLRP3引物序列

基因	双向引物序列	退火温度 产物长度	
		(℃)	(bp)
NOD2	正义链:5'-gcgatgctcggagtggaaac-3'	60	77
	反义链:5'-ggagatgttattctcgaagt-3'		
NLRP3	正义链:5'-gctgtgtgaggaactccag-3'	60	85
	反义链:5'-gaaacagcattgatgggtca-3'		
GAPDH	正义链:5'-aacgacccttcattgacctc-3'	57	81
	反义链:5'-ccttgactgtgccgttgaact-3'		

注:NLRP3:NOD样受体3,GAPDH:三磷酸甘油醛脱氢酶

1.4 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶1(caspase-1)及紧密连接蛋白Occludin、ZO-1、Claudin-4的蛋白测定: 采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测。提取肠黏膜组织总蛋白并测定蛋白浓度,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),

转膜后进行一抗和二抗免疫反应,化学发光、显影、定影,用 UVP-GDS8000 成像分析系统进行扫描、摄像,并进行图像灰度分析。

1.5 核转录因子 κ B(NF- κ B)活性的测定:采用凝胶电泳迁移率(EMSA)实验,在参考文献[5]的基础上略加改进。制备肠黏膜上皮细胞的核蛋白^[6];由上海生工生物工程有限公司合成具有 NF- κ B 特异性 DNA 结合序列,引物序列:5' -AGTTGAGGGGACT TTC CAGGC- 3', 随后用 T4 多核苷酸激酶(美国 Promega 公司)方法将 γ -³²P-ATP(北京亚辉公司)结合在此 NF- κ B 特异性 DNA 序列上进行末端放射性标记示踪;用凝胶成像分析系统扫描成像并测量 NF- κ B 条带的表达强度。

1.6 血清白细胞介素 -6(IL-6)和肿瘤坏死因子 - α (TNF- α)的测定:于相应时间点取血,离心 10 min 后取血清,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定,按试剂盒(美国 R&D Systems 公司)说明书操作。

1.7 肠上皮细胞死亡量的检测:取大鼠末端回肠新鲜冰冻切片,按原位末端缺刻标记试验(TUNEL)细胞死亡检测试剂盒(美国 Roche 公司)说明书略加改良后进行检测。阳性死亡细胞定义为:①细胞质和染色质凝缩(死亡细胞);②细胞质中出现凋亡小体(细胞质碎片);③染色质出现碎片。结果以阳性细胞占所用细胞的百分比表达,所计数的细胞(死亡细胞和非死亡细胞的总和)不少于 1000 个。

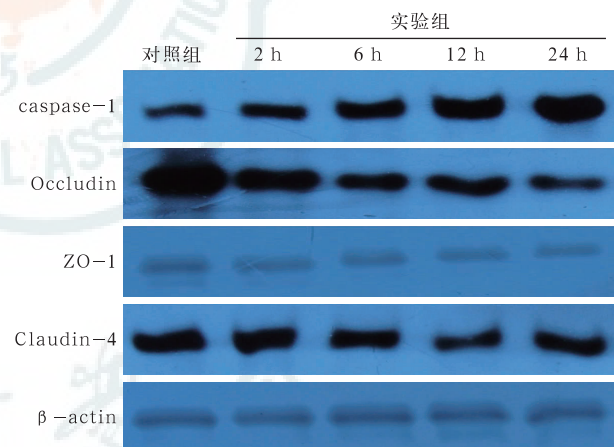
1.8 肠道通透性的测定:麻醉大鼠后,取 20 cm 回肠用 4-0 丝线两端结扎而不影响该肠段血供,由该肠段远端造口置入剪去针头的头皮针并缓慢向此肠段内注入浓度为 25 mg/ml、相对分子质量为 4000 的异硫氰酸荧光素(FITC)标记的葡聚糖溶液(美国 Sigma 公司)1 ml,60 min 后取 4 ml 血浆,离心 7 min,用荧光光度计分析 FITC 标记的葡聚糖浓度,标准曲线用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释的 FITC 标记的葡聚糖获得,以葡聚糖通过率反映肠道通透性。

1.9 统计学方法:实验数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异比较用方差分析,用距离分析检验各指标间的相关性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NOD2、NLRP3 的 mRNA 表达检测结果(表 2):NOD2 mRNA 表达于术后 2 h 迅速升高达峰值,明显高于对照组($P < 0.01$);术后 6 h 迅速回落,此后缓慢下降,与对照组相比差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。而 NLRP3 mRNA 表达没有这样明显的规律,术后 2 h NLRP3 mRNA 表达先呈下降趋势,然后缓慢上升,于术后 12 h 时达峰值(与对照组相比 $P < 0.05$),随后再次缓慢下降。

2.2 caspase-1、Occludin、ZO-1、Claudin-4 的蛋白表达检测结果(表 2;图 1):caspase-1 蛋白表达在术后 2 h 即明显高于对照组($P < 0.01$),随后呈逐渐增高的趋势;紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 和 Claudin-4 的蛋白表达趋势相似,分别于术后 2 h、6 h、2 h 起明显低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),随后呈逐渐下降趋势。



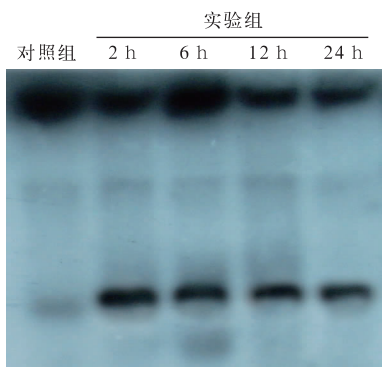
caspase-1: 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1, β -actin: β -肌动蛋白
图 1 蛋白质免疫印迹试验检测急性腹腔感染早期大鼠肠黏膜 caspase-1 及紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1、Claudin-4 的蛋白表达

表 2 急性腹腔感染早期大鼠肠黏膜 NOD2 mRNA、NLRP3 mRNA 和 caspase-1、紧密连接蛋白、NF- κ B 活性及血清细胞因子的变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	NOD2 mRNA	NLRP3 mRNA	caspase-1 蛋白	Occludin 蛋白	ZO-1 蛋白	Claudin-4 蛋白	NF- κ B	血 IL-6 (μ g/L)	血 TNF- α (μ g/L)
对照组	6	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00	2.10 \pm 0.11	12.72 \pm 1.34	1.57 \pm 0.17	3.40 \pm 0.34	12.42 \pm 0.73	26.19 \pm 7.58	7.86 \pm 3.58
实验 2 h 组	6	75.50 \pm 13.03 ^a	0.18 \pm 0.06	3.56 \pm 0.14 ^a	7.24 \pm 1.13 ^b	0.87 \pm 0.15	1.63 \pm 0.28 ^a	24.85 \pm 0.57 ^a	605.44 \pm 133.10	110.75 \pm 19.18 ^a
实验 6 h 组	6	4.27 \pm 0.76	3.35 \pm 0.33	4.11 \pm 0.25 ^a	5.12 \pm 0.55 ^a	0.47 \pm 0.09 ^a	1.04 \pm 0.28 ^a	23.76 \pm 0.54 ^a	3088.07 \pm 330.03 ^a	163.26 \pm 20.78 ^a
实验 12 h 组	6	3.88 \pm 0.56	4.03 \pm 0.71 ^b	5.04 \pm 0.13 ^a	4.89 \pm 0.78 ^a	0.26 \pm 0.08 ^a	0.79 \pm 0.04 ^a	22.36 \pm 0.51 ^a	2300.85 \pm 293.69 ^a	189.00 \pm 26.32 ^a
实验 24 h 组	6	2.01 \pm 0.38	2.46 \pm 0.52	6.36 \pm 0.17 ^a	3.06 \pm 0.34 ^a	0.25 \pm 0.04 ^a	0.73 \pm 0.06 ^a	20.60 \pm 0.78 ^a	1669.46 \pm 191.52 ^a	195.28 \pm 24.69 ^a

注: NLRP3: NOD 样受体 3, caspase-1: 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1, NF- κ B: 核转录因子 κ B, IL-6: 白细胞介素 -6, TNF- α : 肿瘤坏死因子 - α ; 与对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$

2.3 NF-κB 活性检测结果(表 2; 图 2): NF-κB 活性在术后 2 h 迅速上升, 随后在一个高表达状态下呈缓慢下降趋势, 但术后各时间点 NF-κB 活性均显著高于对照组(均 $P < 0.01$)。



EMSA:凝胶电泳迁移率, NF-κB:核转录因子-κB

图 2 EMAS 实验检测急性腹腔感染早期大鼠肠黏膜 NF-κB 的活性

2.4 血清 IL-6 和 TNF-α 水平检测结果(表 2): 术后 6 h IL-6 急剧增高达峰值, 显著高于对照组($P < 0.01$); 随后开始缓慢回落, 至 24 h 仍显著高于对照组($P < 0.01$)。TNF-α 于术后 2 h 即明显高于对照组($P < 0.01$), 随后呈现逐渐增高的趋势。

2.5 肠上皮细胞死亡量的检测结果(表 3; 图 3): 随着 CLP 后时间的延长, 肠上皮细胞死亡率呈逐渐上升的趋势, 且各时间点与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



图 3 镜下观察急性腹腔感染早期大鼠肠上皮细胞死亡情况 死亡细胞核呈绿褐色; 对照组(a)大鼠上皮细胞死亡量较少; 随着腹腔感染时间的延长, 实验 2~24 h(b~e)大鼠肠上皮细胞死亡量不断增加 TUNEL 中倍放大

表 3 急性腹腔感染早期大鼠肠上皮细胞死亡率和肠通透性变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	细胞死亡率(%)	肠通透性(%)
对照组	6	0.03 ± 0.01	2.84 ± 0.35
实验 2 h 组	6	0.12 ± 0.02 ^a	35.75 ± 4.66 ^b
实验 6 h 组	6	0.26 ± 0.02 ^b	43.34 ± 4.24 ^b
实验 12 h 组	6	0.56 ± 0.04 ^b	51.67 ± 7.26 ^b
实验 24 h 组	6	0.84 ± 0.02 ^b	60.17 ± 7.72 ^b

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

2.6 肠道通透性的测定结果(表 3): 肠道通透性随着腹腔感染时间的延长而逐渐增大, 各时间点与对照组相比差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

2.7 距离分析检验各指标的相关性(表 4): NOD2 与其他各项指标的相关性似乎都不高; NLRP3 与肠通透性和 caspase-1 蛋白表达的相关性较其他指标略高, 但从相关系数来看似乎未显示出强相关关系; caspase-1 蛋白表达与死亡细胞量、TNF-α 和肠通透性的相关性较强; 紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1、Claudin-4 之间有较高的相关性, 但与其他各指标间的相关性似乎并不高; NF-κB 与 TNF-α 的相关性最高, 其次是与 IL-6 和肠通透性; IL-6 与 TNF-α 的相关性较高, 其次是与 NF-κB 的相关性; TNF-α 与 caspase-1 蛋白表达量相关性较高, 其次是与死亡细胞量和肠通透性; 肠上皮细胞死亡量与 caspase-1 蛋白表达量呈强相关关系; 肠通透性与

表 4 急性腹腔感染早期大鼠各指标相关性分析

指标	NOD2	NLRP3	caspase-1	Occludin	ZO-1	Claudin-4	NF-κB	IL-6	TNF-α	死亡细胞	肠通透性
NOD2	1.000	-0.223	-0.097	0.290	0.199	0.153	0.264	-0.196	-0.151	-0.254	0.127
NLRP3	-0.223	1.000	0.391 ^a	-0.533	-0.491	-0.420	0.116	0.370	0.347 ^a	0.315 ^a	0.421 ^a
caspase-1	-0.097	0.391 ^a	1.000	-0.898	-0.859	-0.924	0.461	0.468	0.807 ^a	0.908 ^a	0.785 ^a
Occludin	0.290	-0.533	-0.898	1.000	0.886 ^a	0.893 ^a	-0.415	-0.687	-0.810	-0.873	-0.752
ZO-1	0.199	-0.491	-0.859	0.886 ^a	1.000	0.870 ^a	-0.431	-0.602	-0.668	-0.765	-0.763
claudin-4	0.153	-0.420	-0.924	0.893 ^a	0.870 ^a	1.000	-0.414	-0.512	-0.764	-0.907	-0.753
NF-κB	0.264	0.116	0.461	-0.415	-0.431	-0.414	1.000	0.537 ^a	0.655 ^a	0.233	0.527 ^a
IL-6	-0.196	0.370	0.468	-0.687	-0.602	-0.512	0.537 ^a	1.000	0.731 ^a	0.438	0.519
TNF-α	-0.151	0.347 ^a	0.807 ^a	-0.810	-0.668	-0.764	0.655 ^a	0.731 ^a	1.000	0.778 ^a	0.725 ^a
死亡细胞	-0.254	0.315 ^a	0.908 ^a	-0.873	-0.765	-0.907	0.233	0.438	0.778 ^a	1.000	0.714 ^a
肠通透性	0.127	0.421 ^a	0.785 ^a	-0.752	-0.763	-0.753	0.527 ^a	0.519	0.725 ^a	0.714 ^a	1.000

注: NLRP3: NOD 样受体 3, caspase-1: 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1, NF-κB: 核转录因子-κB, IL-6: 白细胞介素-6, TNF-α: 肿瘤坏死因子-α; ^a $P < 0.05$

caspase-1 蛋白表达量相关性最高,其次是与 TNF- α 和肠上皮细胞死亡量。

3 讨论

严重腹腔感染会造成肠屏障受损,肠内细菌移位,进而引发全身炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能衰竭(MOF),虽然这一病理过程已经被多数临床和科研人员所认可,但其中的具体机制仍然不是非常清楚。在腹腔感染时,肠道的先天免疫作为一种非特异性免疫系统无疑是肠屏障中的第一道防线,先天免疫中 Toll 样受体(TLRs)^[3]和 NLRs 家族同样参与了这一病理过程^[7]。早先的研究认为,NLRs 最主要的功能是监控和捕获进入细胞内的微生物的细胞壁成分,最近研究表明其对细胞外信号也有监控和捕获的能力,所以 NLRs 对于维持机体内环境稳态、防止外源微生物入侵有着重要作用^[8]。目前研究认为,NLRs 中 NODs 亚家族的 NOD2 对于肠道共生菌群的调节^[9]、慢性炎症肠病尤其是克罗恩病的发生发展^[10]、甚至小肠移植中的免疫应答^[11]等都起了重要作用。正是因为考虑到 NOD2 在各种炎症免疫应答中的突出作用,本研究假设其在腹腔感染早期肠上皮细胞中也可能会有重要作用,并对此进行初步观察。

先前的研究表明,NOD2 被相应配体激活后可以通过 NF- κ B 通路和 / 或丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)通路激活下游炎症反应,包括先天免疫和获得性免疫^[12-13];同时,NOD2 还可以通过趋化因子 CCL2 的募集作用促进肠道病原菌的清除^[14],所以 NOD2 恰当而正确的表达对于机体对自身炎症的精确控制非常重要。实际上 NOD2 在机体中处于一个复杂的信号调控网中,其中 NOD2 与 TLRs 两者相互耐受和相互抑制对于维持机体稳态起到了重要的作用^[15-16]。本研究中,NOD2 在炎症的早期(2 h)有一个非常高的峰值,随后迅速下降至正常水平附近,这种变化规律是否是其自身调节的结果还有待进一步研究;在相关性分析中未发现 NOD2 与 NF- κ B 等表现出较强关联,可能是因为 NF- κ B 的上游影响因子众多,NOD2 并非最主要的影响因素,或是其表达被迅速反馈抑制,这种对肠屏障暂时性的调节作用与文献^[17]研究结果一致。

NLRs 的一个突出特征就是它能通过 pyrin 区间 PYD-PYD 的相互作用进而与凋亡相关的斑点样蛋白(ASC)起作用。ASC 和 NLRs 的相互作用可以激活 NLRP1、NLRP2 和 NLRP3,随后 ASC 的 CARD 开始募集 procaspase-1 的 CARD 并将其激活,激活的

caspase-1 随后再激活多种炎症反应^[18-19]。与 NODs 不同的是,NLRP3 并不能激活 NF- κ B,而能激活 caspase-1^[8,20],caspase-1 被激活后与 NLRP3、ASC 等蛋白组成炎性体(inflammasome),一方面可促进 IL-1 β 和 IL-18 的成熟与释放,另一方面还可以促进 caspase-1 相关的细胞死亡^[21-22]。但有关 caspase-1 促进细胞死亡的研究还不多,其机制尚不清楚,由于 NLRP3 所感受的配体不只有外源性的,还包括内源性的,如热休克蛋白、坏死细胞碎片等^[23],所以不能排除 caspase-1 所诱导的细胞死亡是机体在炎症中的一种自我保护方式。

本研究显示,NLRP3 表达先下降,随后升高至 12 h 达峰值,然后再次下降,这可能暗示 NLRP3 表达受机体的精确调控,存在反馈抑制机制以防止其表达过弱或过强。在变量相关性研究中,NLRP3 与肠通透性关联度最高,其次是与 caspase-1 表达;caspase-1 作为一个中游的接头蛋白,其表达量与肠上皮细胞死亡量呈强相关关系,与 TNF- α 和肠通透性也显示了较强的关联;作为效应指标的肠通透性与 caspase-1 表达关联度最高,其次是与 TNF- α 和肠上皮细胞死亡量。从这些数据来看,“NLRP3 升高—caspase-1 升高—肠上皮细胞死亡增多—肠通透性增高”这一推论似乎得到一个间接的验证,而且 TNF- α 在这一过程中可能也起到了重要作用,当然这只是一个初步观察,确切的结论还有待进一步实验验证。

紧密连接蛋白是肠上皮细胞间细胞与细胞的连接蛋白,被认为是维持肠屏障功能的重要蛋白之一。有研究表明,在腹腔感染时紧密连接蛋白的量和表达部位都发生了变化,表达量减少,表达部位由细胞的侧壁移位到细胞的底部或顶部,造成肠上皮细胞连接松散,肠通透性增高^[24-25]。还有研究表明,TLR2 的变化能干扰肠上皮细胞紧密连接蛋白的表达^[26],但尚不清楚 NLRs 中是否有相关信号转导通路对紧密连接蛋白有影响。本研究所检测的 3 个紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 和 Claudin-4 都呈逐渐下降的趋势,并且在 6 h 后与对照组相比差异都有统计学意义,这与文献报道是一致的。由于紧密连接蛋白的变化趋势与其他各项指标的变化趋势明显不同,所以相关性矩阵中仅表现为这 3 个蛋白间有较强的关联,与其他指标间呈负关联,有关其间的变化规律还有待进一步的实验研究。

总之,本研究显示,在腹腔感染的早期 NOD2 和 NLRP3 都可能起到了一定的作用,NOD2 的巨幅波

动提示其可能受到机体精确的反馈机制调节,以控制其表达不至于过强或过弱;NLRP3、caspase-1 和肠上皮细胞死亡量间的强关联可能暗示了这其中存在某种联系,而肠上皮细胞的死亡对于肠通透性以至维持肠屏障功能等可能与紧密连接蛋白一样有着重要意义。

参考文献

- [1] Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*, 2006, 442: 39-44.
- [2] Strober W, Murray PJ, Kitani A, et al. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6: 9-20.
- [3] 李国逊, 钮凌颖, 杨荣, 等. 急性腹腔感染早期大鼠肠黏膜屏障中 Toll 样受体信号通路的变化及意义. *肠外与肠内营养*, 2011, 18: 31-34, 38.
- [4] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [5] Yu M, Shao D, Yang J, et al. Ketamine suppresses intestinal TLR4 expression and NF- κ B activity in lipopolysaccharide-treated rats. *Croat Med J*, 2006, 47: 825-831.
- [6] Liu Z, Yu Y, Jiang Y, et al. Growth hormone increases lung NF- κ B activation and lung microvascular injury induced by lipopolysaccharide in rats. *Ann Clin Lab Sci*, 2002, 32: 164-170.
- [7] 傅强, 崔乃强, 喻文立. 严重腹腔感染患者免疫失衡与肠屏障功能障碍的关系. *中国危重病急救医学*, 2009, 21: 429-433.
- [8] Sirard JC, Vignat C, Dessein R, et al. Nod-like receptors: cytosolic watchdogs for immunity against pathogens. *PLoS Pathog*, 2007, 3: e152.
- [9] Petnicki-Ocwieja T, Hrcir T, Liu YJ, et al. Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 15813-15818.
- [10] Rogler G. The importance of gut microbiota in mediating the effect of NOD2 defects in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2010, 59: 153-154.
- [11] Landfried K, Bataille F, Rogler G, et al. Recipient NOD2/CARD15 status affects cellular infiltrates in human intestinal graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol*, 2010, 159: 87-92.
- [12] Franchi L, Warner N, Viani K, et al. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev*, 2009, 227: 106-128.
- [13] Shaw MH, Reimer T, Kim YG, et al. NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors. *Curr Opin Immunol*, 2008, 20: 377-382.
- [14] Kim YG, Kamada N, Shaw MH, et al. The Nod2 sensor promotes intestinal pathogen eradication via the chemokine CCL2-dependent recruitment of inflammatory monocytes. *Immunity*, 2011, 34: 769-780.
- [15] Hedl M, Li J, Cho JH, et al. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 19440-19445.
- [16] Strober W, Kitani A, Fuss I, et al. The molecular basis of NOD2 susceptibility mutations in Crohn's disease. *Mucosal Immunol*, 2008, 1 Suppl 1: S5-9.
- [17] Rehman A, Sina C, Gavrilova O, et al. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut*, 2011, 60: 1354-1362.
- [18] Srinivasula SM, Poyet JL, Razmara M, et al. The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. *J Biol Chem*, 2002, 277: 21119-21122.
- [19] Martinon F, Hofmann K, Tschopp J. The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation. *Curr Biol*, 2001, 11: R118-120.
- [20] Marina-García N, Franchi L, Kim YG, et al. Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2. *J Immunol*, 2008, 180: 4050-4057.
- [21] Warren SE, Mao DP, Rodriguez AE, et al. Multiple Nod-like receptors activate caspase 1 during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*, 2008, 180: 7558-7564.
- [22] Suzuki T, Núñez G. A role for Nod-like receptors in autophagy induced by *Shigella* infection. *Autophagy*, 2008, 4: 73-75.
- [23] Yamasaki K, Muto J, Taylor KR, et al. NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1 β (IL-1 β) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury. *J Biol Chem*, 2009, 284: 12762-12771.
- [24] Costantini TW, Loomis WH, Putnam JG, et al. Burn-induced gut barrier injury is attenuated by phosphodiesterase inhibition: effects on tight junction structural proteins. *Shock*, 2009, 31: 416-422.
- [25] Costantini TW, Deree J, Loomis W, et al. Phosphodiesterase inhibition attenuates alterations to the tight junction proteins occludin and ZO-1 in immunostimulated Caco-2 intestinal monolayers. *Life Sci*, 2009, 84: 18-22.
- [26] Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology*, 2007, 132: 1359-1374.

(收稿日期: 2013-06-09)

(本文编辑: 李银平)

· 科研新闻速递 ·

对潮式呼吸进行治疗能降低慢性心力衰竭患者心律失常的发生率

慢性心力衰竭(心衰)患者的心律失常一般采用植入式心脏复律除颤器来治疗,但有研究显示,对潮式呼吸进行治疗有助于减小慢性心衰患者心律失常发生的风险和概率。波鸿鲁尔大学的研究人员通过队列研究及进行相关参考文献统计分析,旨在探讨对潮式呼吸的适当治疗是否能降低慢性心衰患者发生心律失常的风险。研究人员对 403 例植入心脏复律除颤器的患者(左室射血分数 ≥ 0.45 、心功能 2 级以上)进行跟踪随访,有 96 例患者接受正压通气治疗。结果发现,与无潮式呼吸患者以及潮式呼吸治疗患者相比,未进行潮式呼吸治疗的患者无事件生存期明显缩短,这表明对潮式呼吸的治疗有助于改善心脏功能和呼吸功能。未对潮式呼吸进行治疗是一个独立的危险因素[心脏复律除颤器治疗的风险比为 1.99, 95%可信区间(95%CI)为 1.46 ~ 2.72;室性心律失常监测的风险比为 2.19, 95%CI 为 1.42 ~ 3.37]。因此研究人员认为,慢性心衰和植入心脏复律除颤器的患者,通过正压通气治疗潮式呼吸可减少除颤器的使用。

孟祥熙, 胡森, 编译自《J Cardiovasc Electrophysiol》, 2013-06-05(电子版)