

肠道黏液屏障受损在高脂血症急性胰腺炎重症化中的机制研究

杜佳亮¹ 钱雅君² 许雅丽² 陈显成² 许莹² 虞竹溪²

¹南京鼓楼医院重症医学科,南京 210008; ²南京大学医学院附属鼓楼医院重症医学科,南京 210008

通信作者:虞竹溪, Email: pancoast@163.com

【摘要】目的 探讨高脂血症急性胰腺炎(HTG-AP)大鼠肠道杯状细胞及黏液屏障的结构与功能改变,并评估其在 HTG-AP 重症化过程中的作用机制。**方法** 采用随机数字表法将 24 只 SPF 级雄性 SD 大鼠分为对照组、胆源性急性胰腺炎(BAP)组、高甘油三酯血症(HTG)组和 HTG-AP 组,每组 6 只。BAP 组经胰胆管逆行注入 3.5% 牛磺胆酸钠(0.3 mL/min)2 mL/kg 建立 BAP 模型;HTG 组腹腔注射聚乙二醇-聚丙烯二醇嵌段共聚物 0.50 g/kg,每日 1 次,连续 7 d 建立 HTG 模型;HTG-AP 组在 HTG 模型基础上,于第 8 天腹腔注射雨蛙素 50 μg/kg,每隔 1 h 注射 1 次,连续 7 d 诱导 HTG-AP 模型;对照组注射等体积生理盐水(2 mL/kg)。各组于制模后 24 h 取材,采用苏木素-伊红(HE)染色观察胰腺、回肠和结肠组织病理学改变,并计算病理评分。采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测肠道 CD4、CD8、紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 表达;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肠黏膜分泌型免疫球蛋白 A(sIgA)含量。采用阿利新蓝/过碘酸-雪夫(AB/PAS)染色,观察肠道黏液层结构,并检测肠道黏液层厚度、杯状细胞数量。采用免疫荧光双染检测 NOD 样受体蛋白 6(NLRP6)与抗黏蛋白 2(MUC2)的表达及其共定位情况。**结果** ① 与对照组相比, BAP 组、HTG 组和 HTG-AP 组有不同程度的肠道炎症改变。HTG-AP 组肠道炎症改变最重,伴大面积腺泡坏死、出血及明显水肿,胰腺组织病理学评分较 BAP 组进一步升高(分:12.95±1.31 比 7.30±1.59, $P<0.05$);回肠和结肠炎症细胞浸润深达全层,隐窝杯状细胞大面积丢失。② BAP 组、HTG 组和 HTG-AP 组肠道免疫功能和屏障功能均有所下降,其中 HTG-AP 组改变最为严重。与 BAP 组比较, HTG-AP 组回肠组织 CD4、CD8 表达进一步升高(CD4/ β -actin: 6.664±0.034 比 3.524±0.042, CD8/ β -actin: 3.135±0.034 比 1.118±0.028, 均 $P<0.05$),回肠黏膜上清液 sIgA 水平进一步降低(ng/L: 150.00±44.72 比 410.00±54.89, $P<0.05$),结肠组织 ZO-1、Occludin 表达下降(ZO-1/ β -actin: 0.46±0.13 比 0.59±0.20, Occludin/ β -actin: 0.33±0.12 比 0.60±0.07, 均 $P<0.05$)。③ AB/PAS 染色显示, BAP 组、HTG 组和 HTG-AP 组结肠黏膜上皮黏液层均出现改变, HTG-AP 组黏液层严重受损,肠道杯状细胞黏液耗竭更明显。与 BAP 组相比, HTG-AP 组结肠黏膜上皮黏液层更薄(μ m: 10.20±4.69 比 16.80±4.38, $P<0.05$),含黏液杯状细胞数量更少(个/隐窝: 4.30±1.34 比 7.52±1.93, $P<0.05$)。④ 免疫荧光双染显示,与对照组相比, BAP 组、HTG 组和 HTG-AP 组结肠 NLRP6、MUC2 的表达及二者共定位信号均下降,尤其 HTG-AP 组下降最为明显。**结论** 黏液屏障破坏可能是 HTG-AP 重症化的重要机制之一,提示 NLRP6/MUC2 轴有望成为潜在治疗靶点。

【关键词】 高脂血症急性胰腺炎;肠道杯状细胞;肠道黏液屏障;NOD 样受体蛋白 6;抗黏蛋白 2

基金项目:南京市卫生科技发展专项资金重点课题(ZKX21024)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240719-00349

The investigation of the mechanism underlying the impairment of the intestinal mucous barrier in severe hypertriglyceridemia acute pancreatitis

Du Jialiang¹, Qian Yajun², Xu Yali², Chen Xiancheng², Xu Ying², Yu Zhuxi²

¹Department of Critical Care Medicine, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing 210008, China; ²Department of Critical Care Medicine, Drum Tower Hospital Affiliated to Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China

Corresponding author: Yu Zhuxi, Email: pancoast@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the structural and functional alterations of intestinal goblet cells and the mucus barrier in rats with hypertriglyceridemia acute pancreatitis (HTG-AP), and to evaluate the potential mechanism involved in the progression to severe HTG-AP. **Methods** Twenty-four specific pathogen-free male *Sprague-Dawley* rats were divided into control group, biliary acute pancreatitis (BAP) group, hypertriglyceridemia (HTG) group, and HTG-AP group using a random number table method, with six rats in each group. In the BAP group, the BAP model was established by retrograde injection of 3.5% sodium taurocholate (0.3 mL/min) at 2 mL/kg through the pancreaticobiliary duct. In the HTG group, a polyethylene glycol-polypropylene glycol block copolymer was administered intraperitoneally at 0.50 g/kg once daily for 7 days to establish the HTG model. In the HTG-AP group, after the HTG model had been established, caerulein was administered intraperitoneally at 50 μg/kg once every one hour on day eight, and injections

were continued for 7 days to induce HTG-AP. The control group received an equal volume of normal saline (2 mL/kg). All rats were sacrificed at 24 hours after modeling. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to assess histopathological changes in the pancreas, ileum, and colon, and pathological scores were calculated. Western blotting was performed to determine the expressions of CD4, CD8, ZO-1, and Occludin. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to measure secretory immunoglobulin A (sIgA) level in intestinal mucosa. Alcian blue/periodic acid-Schiff (AB/PAS) staining was performed to evaluate mucus layer structure and to measure mucus layer thickness and goblet cell number. Double immunofluorescence staining was performed to detect NOD-like receptor protein 6 (NLRP6) and mucin 2 (MUC2) expression and their colocalization. **Results** 1) Compared with the control group, the BAP, HTG, and HTG-AP groups showed intestinal inflammatory changes of varying degrees. The HTG-AP group exhibited the most severe intestinal inflammation, accompanied by extensive acinar necrosis, hemorrhage, and marked edema; the pancreatic histopathological score was higher in the HTG-AP group than that in the BAP group (12.95 ± 1.31 vs. 7.30 ± 1.59 , $P < 0.05$). In addition, inflammatory cell infiltration in the ileum and colon extended through the full thickness of the intestinal wall, with massive loss of crypt goblet cells. 2) Intestinal immune function and barrier function were impaired in the BAP, HTG, and HTG-AP groups, and the impairment was most pronounced in the HTG-AP group. Compared with the BAP group, the HTG-AP group showed higher CD4 and CD8 expressions in the ileum (CD4/ β -actin: 6.664 ± 0.034 vs. 3.524 ± 0.042 , CD8/ β -actin: 3.135 ± 0.034 vs. 1.118 ± 0.028 , both $P < 0.05$), a lower sIgA level in ileal mucosal supernatant (ng/L: 150.00 ± 44.72 vs. 410.00 ± 54.89 , $P < 0.05$), and decreased ZO-1 and Occludin expressions in the colon (ZO-1/ β -actin: 0.46 ± 0.13 vs. 0.59 ± 0.20 , Occludin/ β -actin: 0.33 ± 0.12 vs. 0.60 ± 0.07 , both $P < 0.05$). 3) AB/PAS staining showed that the mucus layer of the colonic mucosal epithelium was altered in the BAP, HTG, and HTG-AP groups; the HTG-AP group exhibited severe mucus layer injury with more evident mucus depletion in goblet cells. Compared with the BAP group, the HTG-AP group had a thinner colonic mucus layer (μm : 10.20 ± 4.69 vs. 16.80 ± 4.38 , $P < 0.05$) and fewer mucus-containing goblet cells (cells/crypt: 4.30 ± 1.34 vs. 7.52 ± 1.93 , $P < 0.05$). 4) Double immunofluorescence staining showed that, compared with the control group, colonic NLRP6 and MUC2 expression and their colocalization signals were decreased in the BAP, HTG, and HTG-AP groups, and the decrease was most evident in the HTG-AP group. **Conclusion** Disruption of the intestinal mucus barrier may be an important mechanism contributing to the progression to severe HTG-AP, and the NLRP6/MUC2 axis may serve as a potential therapeutic target.

【Key words】 Hypertriglyceridemia acute pancreatitis; Intestinal goblet cell; Intestinal mucus barrier; NOD-like receptor protein 6; Mucin 2

Fund program: Key Project of Nanjing Municipal Special Fund for Health Science and Technology Development (ZKX21024)

DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20240719-00349

高甘油三酯血症 (hypertriglyceridemia, HTG) 是重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 的重要病因之一, 近年来其发病率呈持续上升趋势^[1-2]。与其他原因导致的 SAP 相比, 高脂血症急性胰腺炎 (hypertriglyceridemia acute pancreatitis, HTG-AP) 的病情更严重, 并发症更多, 病死率更高^[2]。目前关于 HTG-AP 重症化机制的研究多集中于游离脂肪酸对胰腺及其他器官的直接毒性损伤, 尚不足以全面解释其疾病早期即出现的强烈全身炎症反应以及后续持续、迁延的多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS)。因此, 深入阐明 HTG-AP 的重症化机制, 并探索针对性的干预策略, 已成为当前临床亟需解决的关键问题。肠道被认为是全身炎症反应和多器官功能障碍的“启动器”和“推动器”^[3], 一旦肠道屏障完整性被破坏, 外源有害物质及肠道细菌可侵犯宿主肠道组织, 造成严重的炎症和组织损伤。已有研究证实, 肠道黏液屏障在胰腺炎早期炎症反应及后期持续的 MODS 中的重要作用^[4], 但有关 HTG-AP 导致肠道黏液屏障受损是否有别于其他胰腺炎的机制研究仍十分匮乏,

肠道黏液屏障受损能否导致 HTG-AP 病情加剧及病死率升高尚未阐明, 只有明确其根本原因, 才能从根源上控制 HTG-AP 重症化的发展。本研究旨在评估肠道黏液层在 HTG-AP 早期全身炎症反应及后期 MODS 发生发展中的作用, 明确疾病的靶细胞及其作用的分子机制, 以期揭示 HTG-AP 重症化的机制和寻找有效干预靶点提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及伦理: SPF 级雄性 SD 大鼠 24 只, 体质量为 (200 ± 20) g, 购自南京大学模式动物所, 动物生产许可证号: SCXK (苏) 2022-0006。实验前大鼠饲养在 12 h 光照 / 暗周期下, 实验过程遵守南京鼓楼医院动物实验中心动物保护和规定, 并经动物伦理委员会批准 (审批号: 2024AE02029)。

1.2 动物分组及处理: 采用随机数字表法将大鼠分为对照组、胆源性急性胰腺炎 (biliary acute pancreatitis, BAP) 组、HTG 组和 HTG-AP 组, 每组 6 只。① 对照组: 腹腔注射等体积生理盐水 (2 mL/kg)。② BAP 组: 动物麻醉后正中开腹, 将 3.5% 牛磺胆酸钠溶液 (sodium tauro cholate, STC; 美国 Sigma 公

司)以 0.3 mL/min 的速度经胰胆管十二指肠开口端逆行注入 2 mL/kg。③ HTG 组:腹腔注射聚乙二醇-聚丙二醇嵌段共聚物(poloxamer 407, P-407;美国 Sigma 公司)0.50 g/kg,每日 1 次,连续 7 d,建立 HTG 模型。④ HTG-AP 组:在 HTG 模型基础上,于末次注射 P-407 后 24 h 腹腔注射雨蛙素(美国 Sigma 公司)50 μ g/kg,每隔 1 h 注射 1 次,连续 7 次,于末次注射后 24 h 形成 HTG-AP 模型。

1.3 检测指标及方法:各组大鼠于制模后 24 h 经腹主动脉取血,并处死取胰腺、回肠、结肠备检。

1.3.1 胰腺组织病理学检查:取胰腺组织,固定于 4% 多聚甲醛溶液中 72 h,经常规石蜡包埋、切片后行苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色。依据 VanLaethem 标准^[5],以盲法的形式由 2 位研究人员独立对水肿、炎症细胞浸润和腺泡坏死 3 项病理特征进行评估并计分。

1.3.2 血生化指标检测:取腹主动脉血,置于促凝管中,3 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 10 min,分离血清。采用全自动生化分析仪测定血清甘油三酯(triacylglycerol, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、血淀粉酶(serum amylase, AMY)、游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)及低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)水平。

1.3.3 肠道功能测定

1.3.3.1 肠道组织病理学检查:取末端回肠(距回盲部约 5 cm)及结肠中段组织,固定于 4% 甲醛溶液(pH 7.0)中不超过 24 h,常规脱水、石蜡包埋,切取 4 μ m 厚切片,行 HE 染色,在光镜下观察肠黏膜结构改变。

1.3.3.2 肠道免疫功能及肠道屏障功能测定

1.3.3.2.1 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测蛋白表达:取末端回肠组织,液氮速冻并置于 -80 $^{\circ}$ C 保存。组织匀浆后提取总蛋白,采用二喹啉甲酸法测定蛋白浓度;取等量蛋白样品行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodiumdodecyl sulfate-polyacryl amide gel electrophoresis, SDS-PAGE),并转移至硝酸纤维素膜上;用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后,分别与 CD4(1:1 000)、CD8(1:1 000)、Occludin(1:1 000)、ZO-1(1:500)及 β -肌动蛋白(β -actin, 1:1 000)一抗于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;用含吐温 20 的 Tris 缓冲盐水(Tris-buffered saline with Tween-20, TBST)洗膜后,与辣根过氧

化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗室温孵育 1 h。采用增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)法显影,使用 Image J 软件对各条带灰度值进行分析,并以 β -actin 为内参进行相对定量。

1.3.3.2.2 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测分泌型免疫球蛋白 A(secretory immunoglobulin A, sIgA)含量:取末端回肠组织,剪成约 1 cm 小段,加入预冷磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)匀浆,于 4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 15 min,收集上清液。采用 ELISA 试剂盒(武汉博斯特生物科技有限公司)测定肠道 sIgA 含量。

1.3.3.3 肠道黏液层厚度及杯状细胞数量测定:取结肠中段组织,置于 Carnoy 固定液中固定 24 h,常规石蜡包埋,切取 4 μ m 厚切片,行阿利新蓝/过碘酸-雪夫(Alcian blue/periodic acid-Schiff, AB/PAS)染色。在光镜下观察肠道黏液层结构及杯状细胞染色情况,使用 Image J 软件进行定量分析。① 肠道黏液层厚度:每张切片随机选取 5 个视野,每个视野选取 15 个测量点,计算黏液层厚度平均值。② 肠道杯状细胞数量:每张切片随机选取 5 个视野,在纵切面上选择距表面上皮约 100 μ m 处的隐窝,计数每个隐窝中 AB/PAS 染色阳性的杯状细胞数,取平均值。

1.3.4 免疫荧光双染观察肠道 NOD 样受体蛋白 6(NOD-like receptor protein 6, NLRP6)和抗黏蛋白 2(mucin 2, MUC2)共定位:取结肠中段组织,常规石蜡包埋、切片、脱蜡、再水化后,用 1% PBST 洗涤,2% 过氧化氢处理以封闭内源性过氧化物酶,随后于 3% 山羊血清中封闭;切片与 MUC2 抗体及含 NACHT 结构域和富亮氨酸重复序列/结构域的 NLRP6 多克隆抗体(1:100)于室温下孵育,随后进行荧光二抗孵育,并用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)复染细胞核 2 min,经抗淬灭封片后,在共聚焦显微镜下观察并分析 NLRP6 与 MUC2 的共定位情况。

1.4 统计学分析:所有统计分析在 SPSS 21.0 软件中完成。连续型数据先进行 Shapiro-Wilk 正态检验,计量资料均符合正态分布,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),若差异具有统计学意义,进行 Bonferroni 事后检验。检验水准均为双侧, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 胰腺组织病理学改变: 对照组大鼠胰腺组织结构正常,边界清晰,小叶完整,无水肿、坏死(腺泡、脂肪)及出血;胰腺组织病理学评分为(0.50±0.18)分。HTG 组偶见轻微小叶间水肿和少量炎症细胞浸润;胰腺组织病理学评分为(6.93±0.94)分。BAP 组主要表现为小叶间隔及腺泡水肿和炎症细胞浸润,偶有出血或胰腺坏死;胰腺组织病理学评分为(7.30±1.59)分。HTG-AP 组病变最为显著,可见胰腺小叶和腺泡间隙明显扩张、严重水肿、大面积腺泡坏死以及较多间质出血;胰腺组织病理学评分为(12.95±1.31)分。各组大鼠胰腺组织病理学改变见图 1。

2.2 血生化指标检测: 制模后 24 h,对照组大鼠血清呈清亮淡黄色, BAP 组呈轻微浑浊样, HTG 组和 HTG-AP 组血清呈浑浊乳糜样。表 1 结果显示,与对照组相比, HTG 组和 HTG-AP 组 TG、TC、LDL-C、HDL-C 及 FFA 水平均升高(均 $P<0.05$),提示 HTG 模型建立成功;且 HTG 组和 HTG-AP 组 TG、TC、LDL-C、HDL-C 及 FFA 水平均高于 BAP 组(均 $P<0.05$)。BAP 组和 HTG-AP 组 AMY 水平高于对照组和 HTG 组(均 $P<0.05$),提示胰腺炎相关酶学改变明显。此外, HTG-AP 组 LDL-C 水平高于 HTG 组($P<0.05$)。

2.3 肠道功能受损

2.3.1 肠道炎症改变: BAP 组、HTG 组、HTG-AP 组大鼠回肠组织均可见炎症细胞浸润,其中 HTG-AP 组浸润深达肠壁全层,同时出现肠道黏膜及黏膜下层水肿、肠道上皮变形。结肠组织病理改变与回肠组织相一致, BAP 组、HTG 组、HTG-AP 组大鼠结肠组织可见大范围炎症细胞浸润,浸润深达黏膜肌层并伴有黏膜及黏膜下层的重度水肿,同时结肠杯状细胞和隐窝细胞也出现大面积丢失。各组大鼠结肠组织和回肠组织病理学改变见图 2。

2.3.2 肠道免疫功能改变: 各模型组出现免疫功能紊乱,其中 HTG-AP 组改变更为显著。表 2 和图 3 显示,与对照组相比, HTG 组、HTG-AP 组回肠 CD4、CD8 表达水平升高差异有统计学意义(均 $P<0.05$), BAP 组亦有升高趋势($P<0.05$),且 HTG-AP 组回肠 CD4、CD8 表达水平均高于 HTG 组(均 $P<0.05$)。HTG 组、HTG-AP 组回肠黏膜 sIgA 含量较对照组和 BAP 组降低(均 $P<0.05$;表 2)。

2.3.3 肠道屏障功能改变: 表 2 和图 4 显示,对照组大鼠结肠 ZO-1、Occludin 的表达量正常。与对照组比较, BAP 组、HTG 组、HTG-AP 组大鼠结肠 ZO-1、Occludin 表达均有不同程度降低(均 $P<0.05$)。HTG-AP 组 Occludin 表达较 BAP 组进一步降低(均 $P<0.05$)。

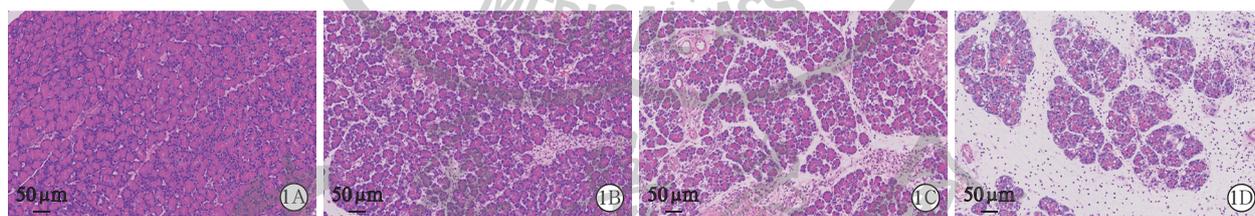


图 1 光镜下观察各组大鼠胰腺组织病理学改变: 对照组(A)胰腺小叶轮廓清晰,腺泡排列紧密,间质无水肿、无炎症细胞浸润,无出血及坏死;胆源性急性胰腺炎(BAP)组(B)小叶间隔增宽,局灶性腺泡水肿,间质内可见散在中性粒细胞浸润,偶见微小出血点,未见明显坏死灶;高甘油三酯血症(HTG)组(C)小叶间质轻度疏松,少量淋巴细胞及单核细胞浸润,腺泡结构基本完整,未见出血及坏死;高脂血症急性胰腺炎组(HTG-AP)组(D)大量腺泡细胞胞质空泡变,小叶结构破坏,间质明显分离呈网状,弥漫性水肿伴大片腺泡坏死,坏死区周边可见大量中性粒细胞、淋巴细胞浸润,并伴灶性出血,部分区域可见核碎屑及红细胞外渗 苏木素-伊红(HE)染色 高倍放大

表 1 各组大鼠血生化指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	AMY (U/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	FFA (μ mol/L)
对照组	6	1.65±0.80	3.05±0.52	475.83±184.08	0.75±0.20	0.82±0.29	25.00±5.92
BAP 组	6	1.54±0.79	2.95±0.24	3 804.33±467.94 ^a	0.86±0.35	1.20±0.60	19.83±4.26
HTG 组	6	19.70±7.08 ^{ab}	6.84±1.40 ^{ab}	1 171.00±266.92 ^b	3.91±0.87 ^{ab}	2.91±0.77 ^{ab}	39.33±2.88 ^{ab}
HTG-AP 组	6	29.78±10.52 ^{ab}	8.22±1.01 ^{ab}	3 885.17±371.53 ^{ac}	7.76±2.18 ^{abc}	3.54±0.96 ^{ab}	42.50±7.04 ^{ab}
F 值		46.834	45.317	165.858	66.717	25.292	37.128
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: BAP 为胆源性急性胰腺炎, HTG 为高甘油三酯血症, HTG-AP 为高脂血症急性胰腺炎, TG 为甘油三酯, TC 为总胆固醇, AMY 为淀粉酶, LDL-C 为低密度脂蛋白胆固醇, HDL-C 为高密度脂蛋白胆固醇, FFA 为游离脂肪酸;与对照组比较, ^a $P<0.05$;与 BAP 组比较, ^b $P<0.05$;与 HTG 组比较, ^c $P<0.05$

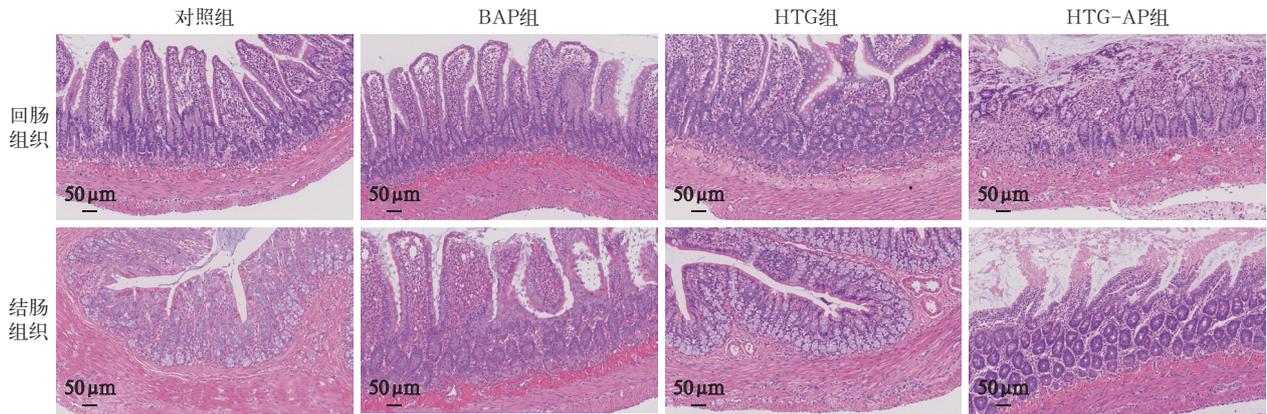
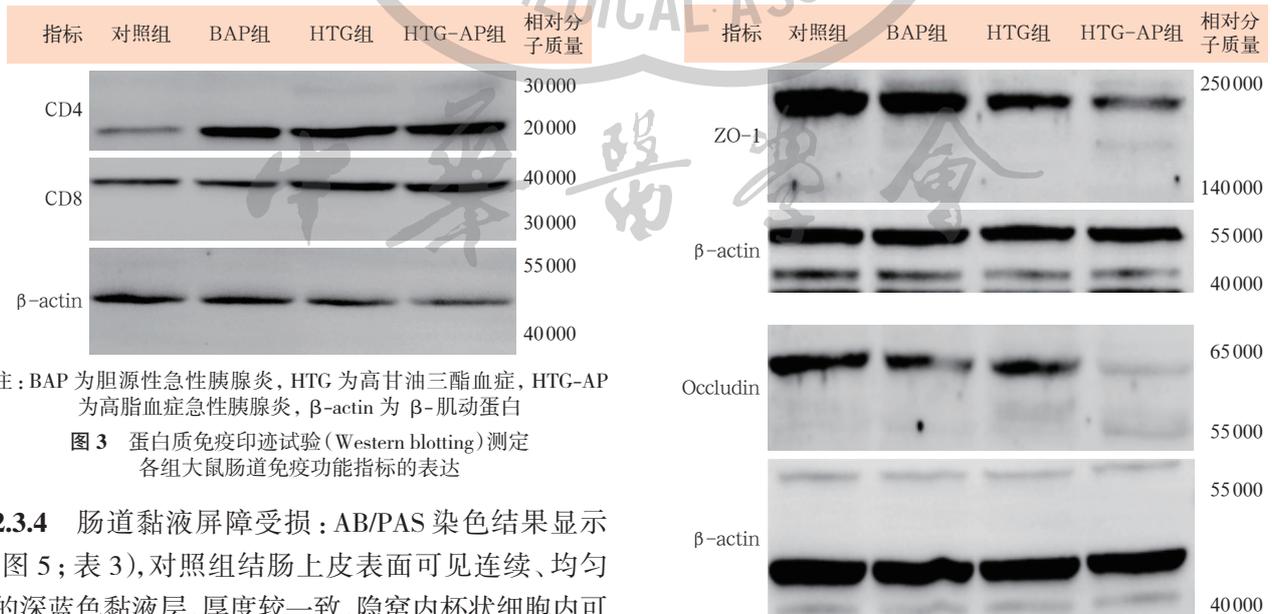


图 2 光镜下观察各组大鼠肠道组织病理学改变 回肠组织病理改变显示,对照组绒毛高度一致,隐窝结构规整,黏膜上皮连续完整,固有膜内偶见单个核细胞,无水肿;胆源性急性胰腺炎(BAP)组绒毛顶端轻度变钝,固有膜及黏膜下层散在中性粒细胞、淋巴细胞浸润,局灶性间质轻度水肿,肌层结构完整;高甘油三酯血症(HTG)组绒毛高度略降低,上皮局灶性脱落,固有膜内见灶性淋巴细胞聚集,黏膜下层轻度水肿,未见明显出血及坏死;高脂血症急性胰腺炎(HTG-AP)组绒毛广泛倒伏、缩短,上皮连续性中断并见糜烂,炎症细胞密集浸润至黏膜肌层甚至外肌层,黏膜及黏膜下层显著水肿、疏松,毛细血管扩张充血,偶见少量红细胞外渗。结肠组织病理改变显示,对照组黏膜表面平整,隐窝排列整齐,杯状细胞丰富,固有膜内炎症细胞稀少,黏膜下层无水肿;BAP组隐窝结构尚存,杯状细胞轻度减少,固有膜及黏膜下层可见散在淋巴细胞、浆细胞浸润,伴轻度间质水肿;HTG组隐窝局部扭曲,杯状细胞数量中度下降,炎症细胞浸润达黏膜肌层,黏膜下层水肿较明显,未见出血;HTG-AP组大片隐窝结构消失,杯状细胞几乎完全丢失,残留隐窝呈囊性扩张,炎症细胞密集浸润至黏膜肌层及更深,黏膜及黏膜下层高度水肿、分离,毛细血管充血,偶见灶性出血,肠壁各层厚度增加,肌层间质疏松 苏木素-伊红(HE)染色 高倍放大

表 2 各组大鼠肠道免疫功能和屏障功能比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	回肠 CD4 (CD4/ β -actin)	回肠 CD8 (CD8/ β -actin)	回肠 sIgA (ng/L)	结肠 ZO-1 (ZO-1/ β -actin)	结肠 Occludin (Occludin/ β -actin)
对照组	6	1.000 \pm 0.000	1.000 \pm 0.000	450.00 \pm 58.31	0.93 \pm 0.04	0.69 \pm 0.06
BAP 组	6	3.524 \pm 0.042 ^a	1.118 \pm 0.028 ^a	410.00 \pm 54.89	0.59 \pm 0.20 ^a	0.60 \pm 0.07
HTG 组	6	5.239 \pm 0.047 ^{ab}	2.551 \pm 0.046 ^{ab}	210.00 \pm 58.31 ^{ab}	0.50 \pm 0.09 ^a	0.45 \pm 0.13 ^a
HTG-AP 组	6	6.664 \pm 0.034 ^{abc}	3.135 \pm 0.034 ^{abc}	150.00 \pm 44.72 ^{ab}	0.46 \pm 0.13 ^a	0.33 \pm 0.12 ^{ab}
F 值		2 230.500	1 730.200	44.090	16.450	15.320
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: BAP 为胆源性急性胰腺炎, HTG 为高甘油三酯血症, HTG-AP 为高脂血症急性胰腺炎, β -actin 为 β -肌动蛋白, sIgA 为分泌型免疫球蛋白 A; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 BAP 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 HTG 组比较, ^c $P < 0.05$



注: BAP 为胆源性急性胰腺炎, HTG 为高甘油三酯血症, HTG-AP 为高脂血症急性胰腺炎, β -actin 为 β -肌动蛋白

图 3 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)测定各组大鼠肠道免疫功能指标的表达

2.3.4 肠道黏液屏障受损: AB/PAS 染色结果显示(图 5; 表 3), 对照组结肠上皮表面可见连续、均匀的深蓝色黏液层, 厚度较一致, 隐窝内杯状细胞内可见大量饱满的蓝色酸性黏液颗粒, 主要分布于隐窝中上部。与对照组相比, BAP 组结肠黏膜上皮黏液层出现局灶性缺失, 黏液层厚度及含黏液杯状细胞

注: BAP 为胆源性急性胰腺炎, HTG 为高甘油三酯血症, HTG-AP 为高脂血症急性胰腺炎, β -actin 为 β -肌动蛋白

图 4 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)测定各组大鼠肠道屏障功能指标的表达

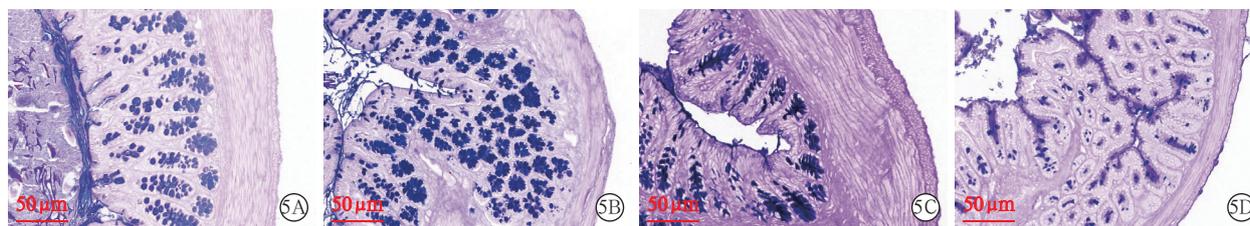


图5 光镜下观察各组大鼠结肠黏液层厚度和杯状细胞数量 对照组(A)结肠上皮表面可见连续、均匀的深蓝色黏液层,隐窝内杯状细胞内酸性黏液颗粒丰富;胆源性急性胰腺炎(BAP)组(B)黏液层局灶性缺失或变薄,连续性受损,隐窝内含黏液杯状细胞减少;高甘油三酯血症(HTG)组(C)黏液层明显变薄且不均匀,局部不连续,杯状细胞内黏液减少;高脂血症急性胰腺炎(HTG-AP)组(D)黏液层显著变薄且完整性破坏最明显,杯状细胞内黏液显著减少 阿利新蓝/过碘酸-雪夫(AB/PAS)染色 中倍放大

数量减少。HTG 组和 HTG-AP 组黏液层变薄更为明显并伴连续性受损,其中 HTG-AP 组改变最重,杯状细胞内黏液明显减少。

表3 各组大鼠结肠黏液层厚度和杯状细胞数量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	结肠黏液层厚度(μm)	杯状细胞数量(个/隐窝)
对照组	6	25.50 ± 2.12	9.60 ± 3.82
BAP 组	6	16.80 ± 4.38 ^a	7.52 ± 1.93
HTG 组	6	15.50 ± 2.94 ^a	6.60 ± 2.31
HTG-AP 组	6	10.20 ± 4.69 ^a	4.30 ± 1.34 ^{ab}
F 值		18.340	4.550
P 值		<0.001	0.013

注: BAP 为胆源性急性胰腺炎, HTG 为高甘油三酯血症, HTG-AP 为高脂血症急性胰腺炎;与对照组比较, ^a $P < 0.05$;与 BAP 组比较, ^b $P < 0.05$

2.4 NLRP6 和 MUC2 在肠道中的表达: 相较于对照组, BAP 组、HTG 组、HTG-AP 组肠道 NLRP6 和 MUC2 表达均减少,且两者共定位明显减少,其中 HTG-AP 组减少更明显(图 6)。

3 讨论

HTG 于 1952 年被公认为 SAP 的重要病因^[6]。近年来, HTG-AP 在 SAP 中的病因构成比呈不断上升趋势^[7],具有明显的重症化、年轻化、易复发及合并症多、预后差等特点^[8]。与其他原因胰腺炎相比, HTG-AP 的全身炎症反应更严重,更易发生急性胰周液体积聚等局部并发症和严重感染等全身并发症,器官衰竭程度更高,最终导致重症化的发展^[9]。

HTG-AP 最主要的重症化机制并不在于早期 TG 分解后的高水平 FFA 对胰腺腺泡细胞的直接损伤^[10],可能存在胰腺之外的其他路径诱发的严重炎症反应。胰腺本身的直接损伤与胰腺之外的病理生理改变相互推动,协同放大,导致 HTG-AP 病情迅速发展。临床和动物研究均显示,肠道为 SAP 最早受累的器官,表现为肠道通透性增加,肠屏障功能受损,其程度与机体的炎症反应、脓毒症形成以及

预后息息相关^[3,11];同时,在 MODS 的综合治疗中,肠道通常又是最后一个恢复的器官。肠道在 SAP 的重症化中发挥了重要作用^[12]。肠道屏障受损可加速胰腺炎病情的发展;SAP 出现肠道损伤的同时也会通过肠道免疫炎症反应继发感染,进一步加重病情^[13]。

在肠道各种屏障中,肠道黏液屏障是十分重要的屏障。肠道黏液层主要由肠道杯状细胞分泌的 MUC2 组成^[14],其合成与分泌发生改变会导致黏液层受损,黏液屏障通透性增加,促进细菌等病原微生物侵袭黏附肠道,引起肠屏障功能障碍,导致 MODS 的发生^[15]。因此,黏液屏障损伤可能是导致 HTG-AP 病情加重的重要事件之一,采取相应措施改善肠道黏液层,有助于改善肠道的屏障功能和免疫功能,减轻肠道菌群移位,防止 HTG-AP 病情进一步发展^[15]。

既往研究证明,高脂饮食可影响肠道黏液层的特性,同时可影响肠道杯状细胞的功能,导致肠道黏液层的产生、分泌出现异常,影响肠道屏障的完整性^[16]。研究者通过基因敲除建立 HTG 肥胖小鼠模型,观察到模型小鼠肠道 MUC2 分泌异常,肠道屏障功能下降^[17],与本研究结果类似。本研究中采用 P-407 诱导 HTG,并联合雨蛙素诱导急性胰腺炎建立 HTG-AP 大鼠模型,是因二者在动物体内可稳定且可重复地模拟临床 HTG 伴胰腺炎的病理过程,避免单纯高脂饮食或胆汁酸方式制模时间长及成功率低的缺点。本研究结果显示,与 BAP 大鼠相比,HTG-AP 大鼠肠道杯状细胞黏液耗竭更加明显, MUC2 含量降低,黏液屏障严重受损;同时,HTG-AP 大鼠肠道免疫功能、屏障功能均明显受损,肠道炎症反应更重,进一步证实了 HTG-AP 存在肠道黏液层严重受损,导致肠道功能受损,肠道细菌移行入血。

本研究结果还显示,HTG-AP 大鼠肠道组织中 NLRP6 和 MUC2 的表达水平降低,提示 NLRP6 在

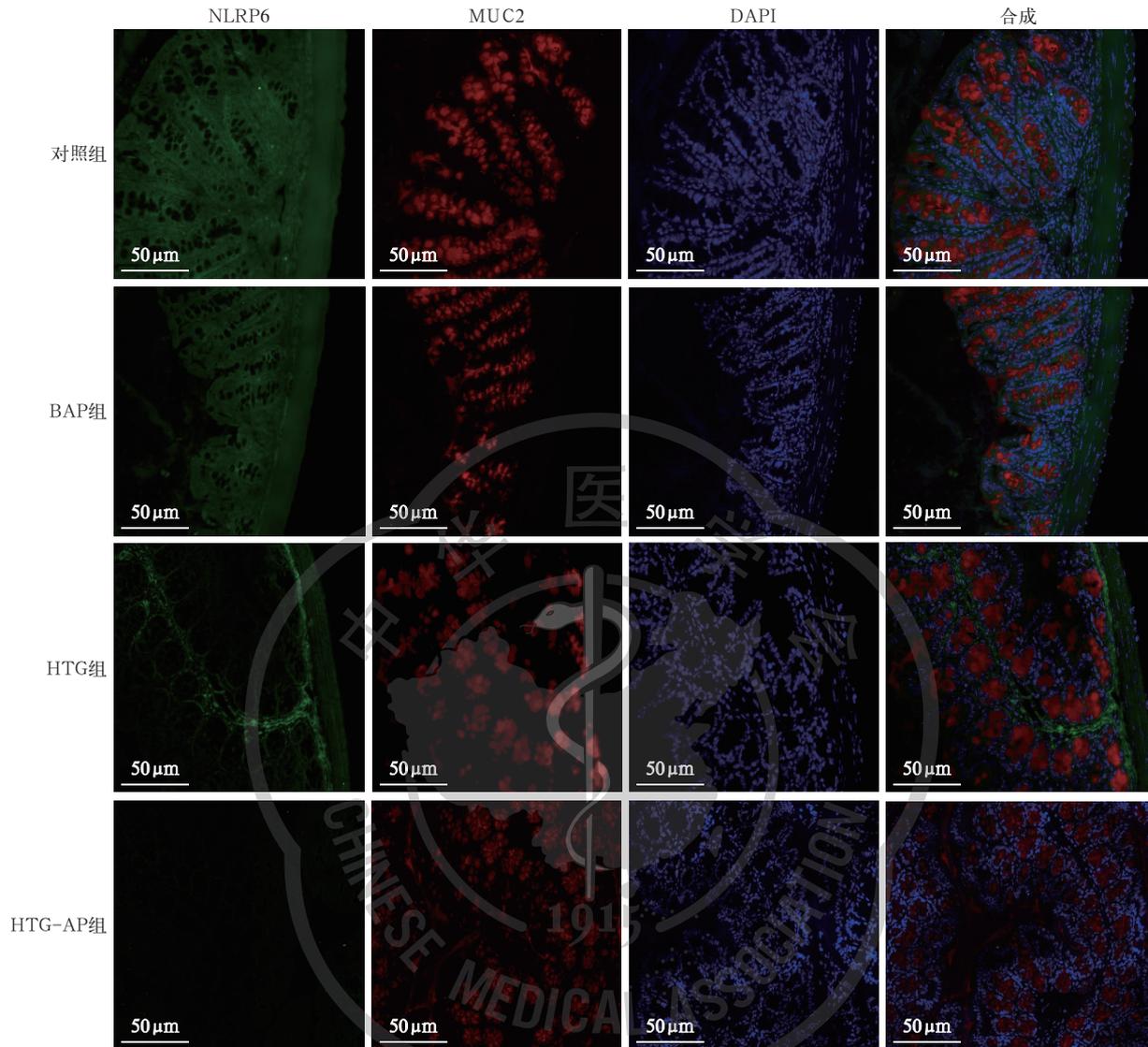


图6 共聚焦显微镜下观察各组大鼠结肠黏液层 NOD 样受体 6(NLRP6)和抗黏蛋白 2(MUC2)共定位。对照组 NLRP6(绿色)和 MUC2(红色)阳性信号在结肠上皮及隐窝杯状细胞 / 腔面黏液层区域分布较为明显, NLRP6 与 MUC2 共定位(黄色)较明显, 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI, 蓝色)标记为细胞核;胆源性急性胰腺炎(BAP)组 NLRP6 和 MUC2 荧光强度下降,黏液层相关信号连续性变差,两者共定位信号减少;高甘油三酯血症(HTG)组 NLRP6 和 MUC2 荧光强度进一步减弱且呈不均一、不连续分布,两者共定位信号明显减少;高血脂急性胰腺炎(HTG-AP)组 NLRP6 和 MUC2 荧光强度显著降低,黏液层 / 杯状细胞相关信号最弱,两者共定位信号减少最为明显。免疫荧光双染。中倍放大

肠道黏液屏障受损中可能起到一定的作用。肠道杯状细胞分泌 MUC2 是形成肠道黏液屏障的基础,已证实, NLRP6 炎症小体可调节杯状细胞分泌 MUC2 的功能^[18],该过程与黏液屏障的形成高度相关。NLRP6 是 NOD 样受体家族成员,主要功能是识别病原体,调节白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)的产生,上调肠道黏液的分泌,改善肠道黏液屏障功能^[19]。Elinav 等^[20]研究表明, NLRP6 缺乏会导致大鼠杯状细胞缺陷,从而干扰肠腔黏液的分泌,肠道损伤程度更重。NLRP6 作为肠道先天免疫调节枢纽,其表达水平直接决定杯状细胞黏液分泌能力,进而调控肠黏膜增殖 / 分化平衡。该通路的失调可破坏微生物稳态,导致屏障功能障碍^[18],这与本研究

结果一致。

与既往关于 HTG-AP 的研究主要聚焦于高水平 TG 分解后 FFA 对胰腺腺泡细胞的直接毒性损伤不同,本研究从胰腺外器官,即肠道黏液屏障的角度切入,系统比较了 HTG-AP 与 BAP 在肠道黏液屏障结构和功能改变上的差异。结果显示,相较于 BAP, HTG-AP 大鼠更早、更显著地出现杯状细胞黏液耗竭及 MUC2 含量下降,并伴随肠道屏障和局部免疫功能受损更明显,提示在 HTG-AP 重症化过程中,肠道黏液层可能并非被动受累,而是参与放大炎症反应和推动器官功能恶化的关键环节。

值得注意的是,本研究进一步发现 HTG-AP 组肠道组织 NLRP6 和 MUC2 表达同步下调,提示

“NLRP6/MUC2 轴失衡—杯状细胞分泌障碍—黏液层耗竭—屏障破坏”可能构成 HTG-AP 较 BAP 更易重症化的重要分子基础。结合既往研究, NLRP6 炎症小体通过调控 IL-18 等途径维持杯状细胞分泌功能与黏液屏障稳态; 当 NLRP6 功能下调时, 黏液分泌减少, 黏液层变薄, 通透性升高, 细菌/毒素更易黏附与穿越黏膜屏障, 从而触发更强烈的肠源性炎症与感染风险, 进一步与胰腺局部损伤形成“胰腺-肠道”相互促进的恶性循环。基于此, 我们推测 HTG-AP 中升高的 FFA 除直接作用于胰腺外, 还可能通过影响肠道先天免疫感知与 NLRP6 相关通路, 削弱黏液屏障稳态, 使其成为驱动全身炎症放大和器官功能衰竭的重要“放大器”。尽管如此, 本研究尚未直接评估菌群移位、内毒素入血或 IL-18 等关键下游因子的变化, 亦缺乏针对 NLRP6/MUC2 轴的干预验证。后续可通过检测肠道通透性、评估菌群移位/内毒素水平, 并采用 NLRP6 激动/抑制、补充 IL-18、或促进杯状细胞分泌等策略进行因果验证, 以进一步明确 NLRP6/MUC2 轴在 HTG-AP 重症化中的调控作用及其潜在干预价值。

综上所述, 本研究结果表明, HTG-AP 大鼠中血清 FFA 水平升高, 伴随肠道 NLRP6/MUC2 轴功能下调, 导致杯状细胞黏液分泌减少及肠道黏液层耗竭, 从而造成肠道屏障及局部免疫功能受损。肠道黏液屏障损伤可能在 HTG-AP 重症化过程中发挥重要作用。本研究从肠道结构和功能改变的角度, 将肠道黏液屏障损伤与 HTG-AP 病情加重相联系, 为进一步阐明 HTG-AP 重症化机制及探索肠道屏障靶向干预策略提供了新的实验依据。与既往关于 HTG-AP 的研究多集中于血脂及 FFA 所致的直接胰腺损伤不同, 本研究系统比较了 HTG-AP 与 BAP 在肠道黏液屏障受损的结构、功能和分子机制差异, 尤其揭示了 NLRP6/MUC2 轴在 HTG-AP 重症化过程中的下调及其与杯状细胞黏液分泌障碍的相关性。但本研究尚存在不足, 本研究未直接评估肠道菌群移位及其对远隔器官功能的影响, 亦未通过干预实验明确 NLRP6 下游信号通路的因果关系。未来研究可结合肠道通透性检测、菌群移位评估及靶向调控 NLRP6/MUC2 轴的干预手段, 进一步验证其在 HTG-AP 重症化中的作用及潜在临床价值。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 杜佳亮: 酝酿和设计实验、采集数据、分析/解释数据、起草文章、统计分析; 钱雅君、许雅丽: 实施研究、分析/解释数据、起草文章; 陈显成、许莹: 采集数据、分析/解释数据、统计分析;

虞竹溪: 酝酿和设计实验, 实施研究, 对文章的知识性内容作批评性审阅, 获取研究经费, 行政、技术或材料支持

参考文献

- [1] Lankisch PG, Apte M, Banks PA. Acute pancreatitis[J]. *Lancet*, 2015, 386(9988): 85–96. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60649-8. Erratum in: *Lancet*, 2015, 386(10008): 2058.
- [2] Valdivielso P, Ramírez-Bueno A, Ewald N. Current knowledge of hypertriglyceridemic pancreatitis[J]. *Eur J Intern Med*, 2014, 25(8): 689–694. DOI: 10.1016/j.ejim.2014.08.008.
- [3] Fishman JE, Levy G, Alli V, et al. The intestinal mucus layer is a critical component of the gut barrier that is damaged during acute pancreatitis[J]. *Shock*, 2014, 42(3): 264–270. DOI: 10.1097/SHK.000000000000209.
- [4] Ge P, Luo YL, Okoye CS, et al. Intestinal barrier damage, systemic inflammatory response syndrome, and acute lung injury: a troublesome trio for acute pancreatitis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110770. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110770.
- [5] Pan YY, Li Y, Gao L, et al. Development of a novel model of hypertriglyceridemic acute pancreatitis in mice[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40799. DOI: 10.1038/srep40799.
- [6] Klatskin G, Gordon M. Relationship between relapsing pancreatitis and essential hyperlipemia[J]. *Am J Med*, 1952, 12(1): 3–23. DOI: 10.1016/0002-9343(52)90164-2.
- [7] Iannuzzi JP, King JA, Leong JH, et al. Global incidence of acute pancreatitis is increasing over time: a systematic review and Meta-analysis[J]. *Gastroenterology*, 2022, 162(1): 122–134. DOI: 10.1053/j.gastro.2021.09.043.
- [8] Li XY, Ke L, Dong J, et al. Significantly different clinical features between hypertriglyceridemia and biliary acute pancreatitis: a retrospective study of 730 patients from a tertiary center[J]. *BMC Gastroenterol*, 2018, 18(1): 89. DOI: 10.1186/s12876-018-0821-z.
- [9] Phillips AE, Wilson AS, Greer PJ, et al. Relationship of circulating levels of long-chain fatty acids to persistent organ failure in acute pancreatitis[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2023, 325(3): G279–G285. DOI: 10.1152/ajpgi.00074.2023.
- [10] 中华医学会外科学分会胰腺外科学组. 中国急性胰腺炎诊治指南(2021)[J]. *中华外科杂志*, 2021, 59(7): 578–587. DOI: 10.3760/cma.j.cn112139-20210416-00172.
- [11] Li XY, He C, Zhu Y, et al. Role of gut microbiota on intestinal barrier function in acute pancreatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(18): 2187–2193. DOI: 10.3748/wjg.v26.i18.2187.
- [12] Garg PK, Singh VP. Organ failure due to systemic injury in acute pancreatitis[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(7): 2008–2023. DOI: 10.1053/j.gastro.2018.12.041.
- [13] Liu JB, Huang L, Luo M, et al. Bacterial translocation in acute pancreatitis[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2019, 45(5–6): 539–547. DOI: 10.1080/1040841X.2019.1621795.
- [14] Gustafsson JK, Johansson MEV. The role of goblet cells and mucus in intestinal homeostasis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19(12): 785–803. DOI: 10.1038/s41575-022-00675-x.
- [15] Song JB, Zhong YL, Lu XG, et al. Enteral nutrition provided within 48 hours after admission in severe acute pancreatitis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2018, 97(34): e11871. DOI: 10.1097/MD.00000000000011871.
- [16] Paone P, Cani PD. Mucus barrier, mucins and gut microbiota: the expected slimy partners?[J]. *Gut*, 2020, 69(12): 2232–2243. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-322260. Erratum in: *Gut*, 2023, 72(12): e7. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-322260corr1.
- [17] Neyrinck AM, Sánchez CR, Rodríguez J, et al. Prebiotic effect of berberine and curcumin is associated with the improvement of obesity in mice[J]. *Nutrients*, 2021, 13(5): 1436. DOI: 10.3390/nu13051436.
- [18] Włodarska M, Thaiss CA, Nowarski R, et al. NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion[J]. *Cell*, 2014, 156(5): 1045–1059. DOI: 10.1016/j.cell.2014.01.026.
- [19] Venuprasad K, Theiss AL. NLRP6 in host defense and intestinal inflammation[J]. *Cell Rep*, 2021, 35(4): 109043. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109043.
- [20] Elinav E, Strowig T, Kau AL, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis[J]. *Cell*, 2011, 145(5): 745–757. DOI: 10.1016/j.cell.2011.04.022.

(收稿日期: 2024-07-19)

(本文编辑: 保健媛 张耘菲)