

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.13.009
文章编号: 1005-8982 (2023) 13-0053-08

实验研究·论著

全胃肠外营养对幼鼠肠道炎症损伤作用研究*

郑瑞雪¹, 沈蕾蕾¹, 孙晓东¹, 赵庆宁², 张成欢¹, 程海燕¹, 陶敏¹, 田杨涛¹, 陈盛¹
(陆军军医大学西南医院 1. 儿科, 2. 病理科, 重庆 400038)

摘要: **目的** 探讨全胃肠外营养对幼鼠肠道炎症损伤的作用及机制。**方法** 选取18只6~8周龄雄性SD幼鼠, 随机分为正常组、对照组和观察组, 每组6只。观察组幼鼠行右颈静脉置管后给予全胃肠外营养治疗, 并禁食、水; 对照组幼鼠行右颈静脉置管后给予生理盐水治疗; 正常组不予置管。正常组和对照组幼鼠均喂食标准鼠粮和水, 14 d后处死幼鼠, 获取肠道组织。采用HE染色观察各组幼鼠肠道组织的病理变化, TUNEL染色观察各组幼鼠小肠上皮细胞凋亡情况, 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和Western blotting检测各组幼鼠肠道组织中的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和白细胞介素-10 (IL-10)、Occludin和ZO-1的mRNA和蛋白表达, 免疫组织化学检测各组幼鼠肠道组织中的Occludin、ZO-1的表达。**结果** 观察组幼鼠的肠道组织均出现不同程度的损伤; 与正常组和对照组比较, 观察组肠上皮细胞凋亡率升高($P < 0.05$), TNF- α 、IL-1 β 的mRNA和蛋白表达升高($P < 0.05$), 而IL-10、Occludin、ZO-1的mRNA和蛋白表达降低($P < 0.05$); 免疫组织化学结果显示, Occludin、ZO-1表达下降($P < 0.05$)。**结论** 持续2周的全胃肠外营养可导致幼鼠肠道功能受损, 促炎因子增加, 肠道机械屏障功能受损, 尽可能恢复肠内营养对于减少肠道并发症具有重要意义。

关键词: 全胃肠外营养; 肠道损伤; 炎症; 机械屏障

中图分类号: R722

文献标识码: A

Study on the effect of total parenteral nutrition on intestinal inflammatory injury in young rats*

Zheng Rui-xue¹, Shen Lei-lei¹, Sun Xiao-dong¹, Zhao Qing-ning², Zhang Cheng-huan¹,
Chen Hai-yan¹, Tao Min¹, Tian Yang-tao¹, Chen Sheng¹

(1. Department of Pediatric, Southwest Hospital, 2. Department of pathology, Southwest Hospital, Army Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objectives To investigate the effect and mechanism of intestinal inflammatory damage caused by total parenteral nutrition (TPN). **Methods** Eighteen male 6- to 8-week-old Sprague-Dawley young rats were randomly divided into three groups of six each: the control group, and the TPN group. The right jugular vein was catheterized to provide TPN to rats in the TPN group, who were also placed in abrosia and given water. Rats in the control group were catheterized through the right jugular vein and continuously infused with normal saline, while rats in the normal group were not catheterized. Rats in normal group and control group were fed standard rat food and water, and rats were sacrificed after 14 days to obtain intestinal tissue. The pathological changes in the intestinal tissues of rats were observed using HE staining, the apoptosis of small intestinal epithelial cells was observed using TUNEL staining, the mRNA and protein expression of TNF- α , IL-1 β , IL-10, Occludin, ZO-1 were detected in the intestinal tissues of each group using qRT-PCR and Western blotting, and the expression of Occludin and ZO-1 in the

收稿日期: 2022-12-22

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No: 82170565); 陆军军医大学科技创新能力提升专项项目(No: 2019XQY09); 陆军军医大学优秀人才库重点扶持计划项目(No: XZ-2019-505-030)

[通信作者] 陈盛, E-mail: 562437300@qq.com; Tel: 13638365620

intestinal tissues of rats in each group, and both Occludin and ZO-1 expression in the intestinal tissues of each group of young rats was detected by immunohistochemistry. **Results** Rats in the TPN group suffered varied degrees of damage to their intestinal tissues. When compared to the normal group and the control group, the TPN group's intestinal epithelial cells had a significantly higher rate of apoptosis ($P < 0.05$), higher levels of TNF- α and IL-1 β mRNA and protein expression ($P < 0.05$), and lower levels of IL-10, Occludin, and ZO-1 mRNA and protein expression ($P < 0.05$). The expression of Occludin and ZO-1 dramatically decreased, according to the immunohistochemistry findings ($P < 0.05$). **Conclusion** TPN for more than two weeks can cause rats to have compromised intestinal function, elevated pro-inflammatory factors, and compromised intestinal mechanical barrier function; therefore, it is crucial to restore enteral nutrition as much as possible to minimize intestinal problems.

Keywords: parenteral nutrition, total; intestinal injury; inflammation; mechanical barriers

胃肠外营养已广泛应用于临床,但坏死性小肠结肠炎、短肠综合征、胃肠道手术后等患儿则需要全胃肠外营养^[1]。新生儿尽早开始经口或经鼻胃管喂养能促进胃肠道功能的成熟,但部分早产儿或低体重儿往往因为喂养不耐受,经胃肠摄入的营养物质不能满足生长发育的需求,还需要一部分肠外静脉营养;对超早产、极低体重儿或胃肠道发育异常的新生儿,所有的营养可能都需要全胃肠外营养提供;因此,全胃肠外营养对这部分新生儿的短期生存和长期健康都是必要的^[2-4]。然而,全胃肠外营养可导致包括肝损伤、血栓形成、感染和代谢紊乱等多种并发症^[5]。近年来,全胃肠外营养相关性肠道损伤日益受到临床重视^[6]。有研究发现全胃肠外营养可导致肠道黏膜萎缩、肠道菌群失调及门静脉内毒素水平增加^[7],这表明新生儿后期发生的多种并发症可能与全胃肠外营养导致的肠道损伤有关。HLA-DR 是人类 II 类主要组织相容性复合物抗原。本课题组前期研究发现,2 周的全胃肠外营养可导致幼鼠静脉血淋巴细胞数量减少、外周血 Treg 细胞比例增加,脾脏细胞 HLA-DR 表达降低,内毒素诱导单核细胞活化肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 及淋巴细胞经植物血凝素 (Phytohemagglutinin, PHA) 刺激后产生 γ 干扰素 (Interferon- γ , IFN- γ) 的能力均减弱,淋巴细胞 (CD4⁺、CD8⁺T) 晚期凋亡增多,外周血炎症因子升高,但其机制尚不清楚,推测可能与全胃肠外营养导致的肠道炎症损伤及通透性增加有关^[8]。因此,本研究拟复制全胃肠外营养幼鼠模型,探讨 2 周全胃肠外营养对肠道炎症损伤的作用及机制,为临床防治全胃肠外营养相关性肠道并发症提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)、TNF- α 抗体、白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 抗体和白细胞介素-10 (Interleukin-10, IL-10) 抗体(成都正能生物技术有限公司)、Occludin 抗体和 ZO-1 抗体(美国 Proteintech 公司)、RNA 提取液和 RNA 溶解液、SweScript RT I First Strand cDNA Synthesis Kit、2 \times SYBR Green qPCR Master Mix (武汉赛维尔生物科技有限公司)。低温离心机(德国 Sigma 公司)、酶标仪(美国 Thermofisher 公司)、NanoDrop 2000 超微量分光光度计、CFX Connet 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-rad 公司)、凝胶成像系统(法国 Evolution-Capt Ede 公司)、自动染色机(德国 Leica 公司)、激光共聚焦系统(德国 Carl Zeiss 公司)、1.9F PICC 管(美国 Medi Beacon 公司)、单双通道微量动物输液泵(东莞恒丰医疗科技有限公司)。

1.2 全胃肠外营养营养液的配制

全胃肠外营养营养液参照 HODIN 等^[9]的方法配制。观察组输入全胃肠外营养液[205 kcal/(kg·d)] 14 d,全胃肠外营养溶液每升中包含 360 mL 50% 葡萄糖(中国大冢制药有限公司)、450 mL 复方氨基酸(华润双鹤药业股份有限公司)、140 mL 脂肪乳(费森尤斯卡比华瑞制药有限公司),同时添加维生素、微量元素和电解质。

1.3 动物模型复制

选择 18 只清洁级雄性 SD 幼鼠,6~8 周龄,体重 220~240 g,购自陆军军医大学实验动物中心,动物实验生产许可证号:SCXK(渝)20170002,动物实验使用许可证号:SYXK(渝)20170011。幼鼠随机分为

正常组、对照组和观察组, 每组 6 只。3 组幼鼠的周龄及体重比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。正常组: 不予静脉置管, 喂食水和标准鼠粮, 持续 14 d; 对照组: 行右颈静脉置管, 在输液泵控制下经中心静脉导管以 1.5 mL/h 的速率输入生理盐水, 同时喂食水和标准鼠粮, 持续 14 d; 观察组: 行右颈静脉置管, 置入 1.9F PICC 管后术后 24 h 内在输液泵控制下以 1.5 mL/h 的速率输注全胃肠外营养液, 24 h 后改为 2 mL/h, 同时禁食、禁水, 持续 14 d。3 组幼鼠均于代谢笼里适宜环境喂养, 维持 12:12 h 昼夜循环, 温度维持 22 °C, 相对湿度 40% ~ 60%。3 组幼鼠均在模型复制第 14 天被处死, 并获取肠道组织。本研究中涉及的动物伦理已通过陆军军医大学动物伦理委员会批准 (AMUWEC20201551)。

1.4 HE 染色观察各组幼鼠肠道组织病理学变化

将幼鼠肠道组织新鲜样本剪成 5 mm × 5 mm 小块, 用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 经不同浓度乙醇脱水、石蜡包埋、切片 (厚度 3 μm), 切片放入自动染色机中染色、封片, 在光学显微镜下观察幼鼠肠道组织的病理学变化。

1.5 TUNEL 法检测各组幼鼠肠道组织的细胞凋亡情况

切片脱蜡后采用 TUNEL 法检测各组幼鼠肠道组织的细胞凋亡情况, 严格按照 TUNEL 试剂盒说明书步骤操作, 在 100 倍光镜下随机观察 5 个视野, 计算每个视野的细胞凋亡率。细胞凋亡率 = 阳性细胞数 / 总细胞数 × 100%。

1.6 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测各组幼鼠肠道组织中的 TNF-α、IL-1β、IL-10、Occludin 和 ZO-1 mRNA 的表达

肠组织称量后, 提取 RNA, 检测 RNA 浓度后, 使用 SweScript RT I First Strand cDNA Synthesis Kit (Servicebio G3330) 将 mRNA 逆转录成 cDNA, 反应条件: 25 °C、5 min, 42 °C、30 min, 85 °C、5 s。采用 2 × SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒, 行 qRT-PCR, 加样体系为 2 × Mix 7.5 μL, Primer 1.5 μL, cDNA 2.0 μL, Water Nuclease-Free 4.0 μL, 反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火延伸 30 s, 共 40 个循环, 65 °C 延伸 30 s, 逐渐升温至 95 °C 溶解曲线分析。β-actin 为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 TNF-α、IL-1β、IL-10、Occludin 和 ZO-1 mRNA 相对

表达量。引物序列: TNF-α, 正向 5'-GACCCTCACA CTCAGATCATCTT-3', 反向 5'-CCTTGAAGAGAACC TGGGAGTAG-3', 引物长度为 131 bp; IL-1β, 正向 5'-CAACTGTCCCTGAACTCAACTGT-3', 反向 5'-GAG ATGCTGCTGTGAGATTTGAA-3', 引物长度为 146 bp; IL-10, 正向 5'-CTGCTATGTTGCCTGCTCTTACT-3', 反向 5'-GGCAACCCAAGTAAACCCTTAAAG-3', 引物长度为 161 bp; Occludin, 正向 5'-ACAGACCCAGACC ACTATGAAAC-3', 反向 5'-CTCTTCGCTCTCCTCTCTG TAGT-3', 引物长度为 201 bp; ZO-1, 正向 5'-GCTTCT TCTTCCTGCTCCTACAA-3', 反向 5'-TGACGGTGGAA GTTGATGTTCTT-3', 引物长度为 419 bp; β-actin, 正向 5'-AGATCAAGATCATTGCTCCTCCT-3', 反向 5'-ACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3', 引物长度为 375 bp。

1.7 Western blotting 检测各组幼鼠肠道组织的 TNF-α、IL-1β、IL-10、Occludin 和 ZO-1 蛋白表达

称取等质量肠组织提取总蛋白, 蛋白变性后行电泳、转膜、孵育抗体, 滴加一抗 (抗 Syndecan-1 抗体, 稀释度为 1:400, 抗 GAPDH 抗体稀释度为 1:1000) 置于 4 °C 冰箱摇床孵育过夜, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔二抗 (抗体稀释度为 1:5000) 室温震荡孵育 1 h, ECL 化学发光显影。TNF-α、IL-1β、IL-10、Occludin 和 ZO-1 的稀释比例为 1:500。采用 Image J 软件分析条带的灰度值, 计算 TNF-α、IL-1β、IL-10、Occludin 和 ZO-1 蛋白相对表达量。

1.8 免疫组织化学法检测各组幼鼠肠道组织中的 Occludin、ZO-1 表达

石蜡切片, 常规脱蜡、水化、抗原修复后, PBS 液漂洗 3 次, 5 min/次; 胎牛血清室温下封闭 30 min, PBS 液漂洗 3 次, 5 min/次; 滴加小鼠抗幼鼠 Syndecan-1 单克隆抗体 (抗体稀释度为 1:100) 置于 4 °C 冰箱孵育过夜, 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 漂洗; 滴加生物素化的山羊抗小鼠 IG 抗体室温孵育 60 min, PBS 液冲洗; DAB 显色 5 ~ 8 min, 苏木精复染、透明、干燥后中性树脂胶封片镜下观察。采用阳性着色细胞计数法, 随机多个视野下计数阳性着色细胞。Occludin 的稀释比例为 1:100, ZO-1 的稀释比例为 1:200。

1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 27.0 统计学软件。计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析,

两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组幼鼠小肠组织的病理学变化

光学显微镜观察显示:正常组和对照组幼鼠肠组织结构清晰正常,上皮完整连续,腺体排列规则,绒毛排列整齐,黏膜层、黏膜下层、固有层无明显充血水肿。观察组幼鼠肠组织绒毛参差不齐,可见变

性水肿,部分绒毛坏死,脱落消失,腺体排列紊乱,固有层与黏膜下层重度水肿,可见中性粒细胞浸润。见图 1。

2.2 各组幼鼠肠道组织的细胞凋亡率比较

正常组、对照组与观察组幼鼠肠上皮细胞凋亡率分别为 $(2.41 \pm 1.14)\%$ 、 $(4.78 \pm 1.45)\%$ 、 $(16.86 \pm 2.89)\%$,经方差分析,差异有统计学意义 ($F = 61.298, P = 0.000$);与正常组和对照组相比,观察组肠上皮细胞凋亡率明显升高 ($P < 0.05$)。各组幼鼠肠上皮细胞凋亡情况见图 2。

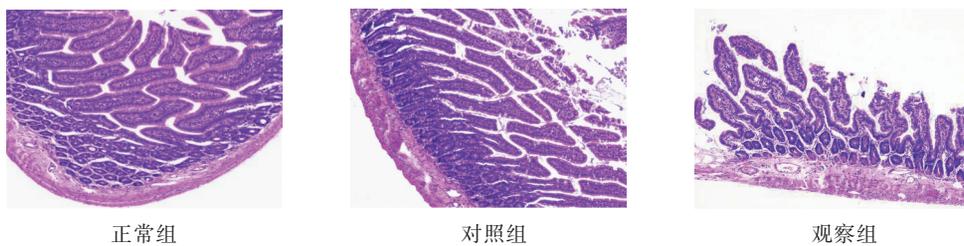
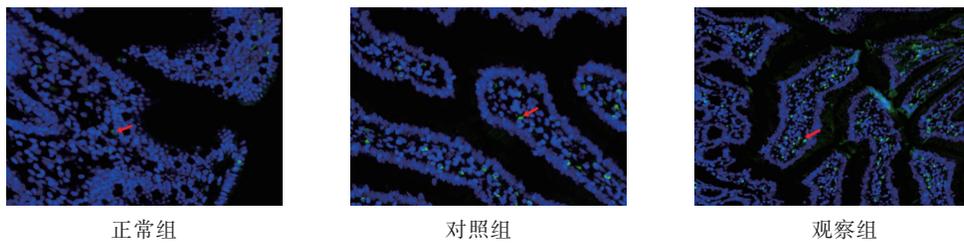


图 1 各组幼鼠肠组织病理改变 (HE 染色 $\times 100$)



红色箭头代表肠上皮凋亡细胞

图 2 各组幼鼠肠上皮细胞凋亡情况 (TUNEL 染色 $\times 400$)

2.3 各组幼鼠肠道组织的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、Occludin 和 ZO-1 mRNA 相对表达量比较

正常组、对照组与观察组幼鼠肠道组织的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、Occludin 和 ZO-1 mRNA 相对

表达量比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),与正常组和对照组比较,观察组 TNF- α 、IL-1 β mRNA 相对表达量升高,IL-10、Occludin、ZO-1 mRNA 相对表达量降低。见表 1。

表 1 各组幼鼠肠道组织的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、Occludin 和 ZO-1 mRNA 的相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α mRNA	IL-1 β mRNA	IL-10 mRNA	Occludin mRNA	ZO-1 mRNA
正常组	1.07 \pm 0.25	1.44 \pm 0.10	1.64 \pm 0.12	1.76 \pm 0.14	1.52 \pm 0.15
对照组	1.20 \pm 0.23	1.11 \pm 0.11	1.40 \pm 0.17	1.54 \pm 0.20	1.33 \pm 0.91
观察组	8.81 \pm 0.77	7.19 \pm 0.24	1.05 \pm 0.11	0.92 \pm 0.10	0.93 \pm 0.72
F 值	247.899	1325.270	14.676	24.531	23.041
P 值	0.001	0.000	0.005	0.001	0.002

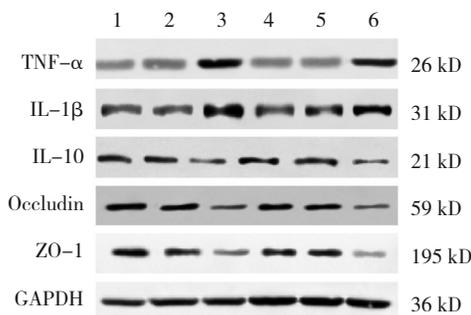
2.4 各组幼鼠肠道组织的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、Occludin 和 ZO-1 蛋白相对表达量比较

正常组、对照组与观察组幼鼠肠道组织的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、Occludin 和 ZO-1 蛋白相对

表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与正常组和对照组比较, 观察组 TNF- α 、IL-1 β 蛋白相对表达量升高, IL-10、Occludin、ZO-1 蛋白相对表达量降低。见表 2 和图 3。

表 2 各组幼鼠肠道组织的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、Occludin 和 ZO-1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α 蛋白	IL-1 β 蛋白	IL-10 蛋白	Occludin 蛋白	ZO-1 蛋白
正常组	0.45 \pm 0.09	0.48 \pm 0.12	0.91 \pm 0.21	1.07 \pm 0.48	1.02 \pm 0.44
对照组	0.48 \pm 0.11	0.47 \pm 0.10	0.73 \pm 0.02	0.85 \pm 0.18	0.86 \pm 0.27
观察组	1.01 \pm 0.27	0.82 \pm 0.19	0.39 \pm 0.07	0.23 \pm 0.12	0.24 \pm 0.14
F 值	9.861	5.926	12.675	6.321	5.315
P 值	0.013	0.038	0.007	0.033	0.047

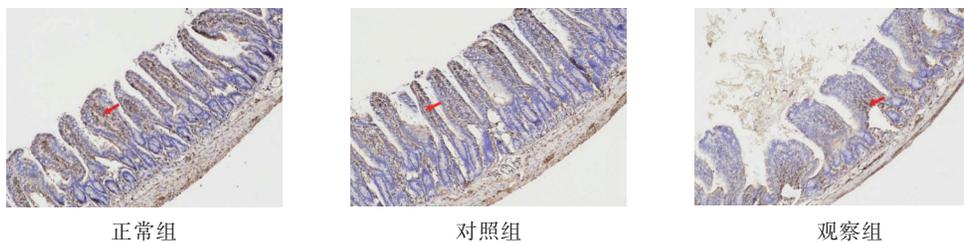


1: 正常组; 2: 对照组; 3: 观察组; 4: 正常组; 5: 对照组; 6: 观察组。

图 3 各组幼鼠肠道组织的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、Occludin 和 ZO-1 蛋白表达

2.5 各组幼鼠肠道组织的 Occludin 和 ZO-1 表达

正常组和对照组幼鼠肠道组织的绒毛上皮细胞膜呈深棕色, 而观察组幼鼠肠道组织的绒毛上皮细胞膜棕色染色明显减弱。正常组、对照组、观察组的 Occludin 阳性着色细胞分别为 (0.07 \pm 0.01)、(0.06 \pm 0.01)、(0.03 \pm 0.01) 个, 3 组比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 14.233, P = 0.005$); 正常组、对照组、观察组的 ZO-1 阳性着色细胞分别为 (0.03 \pm 0.011)、(0.02 \pm 0.003)、(0.01 \pm 0.003) 个, 3 组比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 8.846, P = 0.016$); 与正常组和对照组比较, 观察组的 Occludin、ZO-1 阳性着色细胞数降低。见图 4、5。



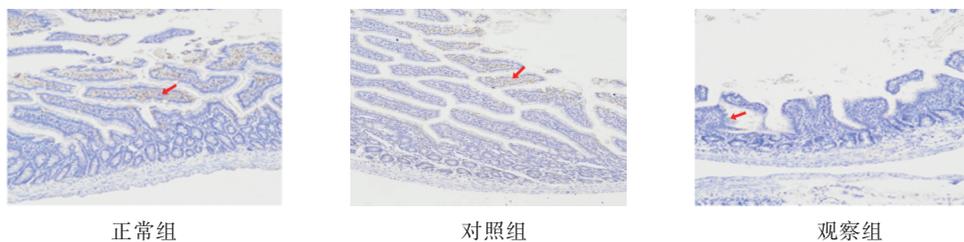
正常组

对照组

观察组

红色箭头代表 Occludin 阳性表达细胞

图 4 各组幼鼠肠道组织中 Occludin 蛋白表达 (免疫组织化学 $\times 100$)



正常组

对照组

观察组

红色箭头代表 ZO-1 阳性表达细胞

图 5 各组幼鼠肠道组织中 ZO-1 蛋白表达 (免疫组织化学 $\times 100$)

3 讨论

由于肠道黏膜中存在着人体最大的免疫细胞群体,是炎症的启动器官、中心器官及动力器官,与包括支气管肺发育不良、早产儿视网膜病变、脑室周围白质软化等在内的多种疾病的发生发展密切相关,因此研究全胃肠外营养对肠道功能作用及机制对新生儿疾病的防治具有重要的临床意义。

国内对全胃肠外营养相关性肠损伤的研究多以成年鼠为实验动物。新生鼠全胃肠外营养模型复制困难,本研究采用的是6~8周龄的幼鼠,能更好地模拟新生儿期的发病情况。本研究结果发现,14 d的全胃肠外营养能使幼鼠肠组织出现变性、坏死、脱落,腺体排列紊乱,固有层与黏膜下层重度水肿及炎症细胞浸润,凋亡细胞明显增加,这表明长时间的全胃肠外营养可导致肠组织损伤,并且改变胃肠道的结构,如绒毛高度和宽度、隐窝深度。NOGUCHI等^[10]给予6~7周龄雄性小鼠5 d的全胃肠外营养后发现,小鼠的小肠绒毛高度和隐窝深度变浅;GANESSUNKER等^[11]采用新生猪复制全胃肠外营养动物模型,14 d后发现肠组织绒毛明显萎缩,肠绒毛高度和隐窝深度明显变浅。因此,肠道损伤可因全胃肠外营养使用时间的延长而逐渐加重,同时全胃肠外营养营养液成分对肠道损伤起重要作用。全胃肠外营养致肠道损伤的机制尚不清楚,本课题组前期研究发现全胃肠外营养可导致心肌细胞损伤,与细胞内丙二醛和过氧化氢含量升高、髓过氧化物酶表达上调有关^[12],结合文献推测氧化应激可能是全胃肠外营养炎症损伤的机制之一^[13]。全胃肠外营养液含有大豆源性脂肪乳和抗氧化作用的维生素,在光作用下容易氧化,进而导致机体氧化-抗氧化系统失衡,诱导脂质过氧化而损伤肠组织细胞^[13];其次,肠内营养物质能激活肠黏膜免疫系统,通过细胞免疫和体液免疫维持肠道免疫平衡,并且为肠黏膜上皮细胞提供70%的营养;由于肠道内长期缺乏营养物质,如全胃肠外营养时,黏膜上皮更新修复能力下降、肠黏膜免疫系统的细胞增生、分化、激活发生异常,还可增加热休克蛋白的表达,使肠黏膜上皮细胞抗活性氧能力降低易引起肠道组织损伤;同时,由于缺乏肠道营养的刺激,肠

道蠕动减少,肠道菌群的组成和功能均发生改变。有研究发现全胃肠外营养可导致肠道厚壁菌门丰度降低,拟杆菌门和变形菌门丰度升高,同时全胃肠外营养也促进大肠杆菌、沙门氏菌、耶尔森氏菌、螺旋杆菌和弧菌等机会病原体的生长,抑制脆弱拟杆菌等共生微生物的生长^[14]。同样,临床研究也获得了类似的结果:DAHLGREN等^[15]纳入47例婴儿进行前瞻性临床研究,其中25例接受全胃肠外营养治疗,研究发现婴儿粪便菌群的 α 多样性在第4周时显著降低(Shannon指数1.0 vs 1.5, $P=0.03$),拟杆菌数量显著减少,而疣微菌门丰度显著增加,并且随着时间的推移,这些差异更加显著。菌群的变化通过“肠肝轴”“肠脑轴”及与肠道免疫系统交互作用,又进一步加重肠道功能损伤,继而导致多种合并症的发生。全胃肠外营养可导致肠道损伤或肠道菌群改变,可能是新生儿坏死性小肠结肠炎、新生儿脓毒症等疾病发生的重要机制,值得临床医生警惕。

本研究结果还发现,观察组肠组织的TNF- α 、IL-1 β 的mRNA及蛋白表达升高,IL-10、Occludin和ZO-1的mRNA及蛋白表达降低,推测全胃肠外营养导致肠道TNF- α 、IL-1 β 促炎因子升高可能与全胃肠外营养液中含脂肪乳有关。研究发现长链脂肪酸能影响肠道细胞膜脂肪酸的组成,改变膜的流动性,通过膜受体改变增强促炎基因的表达^[16]。另一方面长时间的全胃肠外营养破坏了肠内营养激活的多种信号通路,促炎反应被激活^[17]。IL-10主要由肠道巨噬细胞产生,肠道上皮内淋巴细胞(IEL)也是IL-10的重要来源^[18],在CD4⁺和CD8⁺IEL中均检测到IL-10。本课题组前期研究发现全胃肠外营养能使幼鼠淋巴细胞(CD4⁺、CD8⁺T)凋亡增多,Treg(CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T)细胞呈高表达^[7],Treg细胞可以通过抑制T细胞的增殖和干扰IL-10的产生,可能是IL-10下降的重要因素。IL-10可以抑制包括TNF- α 、IL-1、IL-6和IL-8在内的炎症因子的释放,还可减少全胃肠外营养幼鼠的细菌易位,在维持肠道屏障功能中发挥重要作用。在IL-10敲除幼鼠中的全胃肠外营养动物模型中表现出屏障功能的破坏,以及异常Claudin-1和ZO-1表达和分布,而外源性的IL-10则能逆转结肠和小肠屏障功能^[19]。肠道屏障包括机械屏障、化学屏

障、免疫屏障和微生物屏障, 紧密连接蛋白是机械屏障的基础结构, 可维持正常的细胞旁通透性, 防止大分子有毒物质和肠腔内容物的渗透, 组成包括跨膜蛋白(闭合蛋白 Claudins、闭锁蛋白 Occludin、连接黏附分子 JAM)和细胞质蛋白(闭合小环蛋白 ZO)等。促炎细胞因子诱导紧密连接蛋白的改变, 致使细胞凋亡和增强细菌易位, TNF- α 通过激活 ERK1/2 和 SRC 信号转导调控 Claudin-1 的表达和定位^[20], IL-6 也已被证明可通过 MEK/ERK、PI3K 信号通路和转录因子 CDX2 的表达诱导 Claudin-2 的表达^[21]。紧密连接的完整性受到紧密连接蛋白的严格调控, 而肌球蛋白轻链激酶是一个重要的调控元件, 其磷酸化可导致 F-肌动蛋白重组, 从而导致紧密连接蛋白从肠细胞顶端区域重新分布到细胞内^[22], 此外, TNF- α 和 IL-1 β 通过 NF- κ B 刺激肌球蛋白轻链激酶基因表达, 导致紧密连接通透性增强^[23]。因此, 抑制 TNF- α 诱导的肌球蛋白轻链激酶表达可以恢复紧密连接屏障的功能。本研究结果显示, ZO-1 和 Occludin 的 mRNA 及蛋白表达均降低, 表明全胃肠外营养可导致肠道屏障功能受损。ZO-1 和 Occludin 除受到 IL-10 调控外, 还受到 TLR4、NF- κ B、IL-1 β 等炎症因子的调节。肠道菌群对维持肠道机械屏障功能也起到至关重要的作用, 肠道微生物代谢产物如乙酸、丙酸、丁酸、戊酸等短链脂肪酸能有效维持肠道屏障功能^[24], 提高 ZO-1 和 Occludin 的表达, 降低肠道的通透性^[25]。有研究发现早期给予肠内营养有助于改善 ZO-1、Occludin 水平^[26]。长期全胃肠外营养是院内感染的独立危险因素, 尤其在免疫功能低下的早产儿, 早期母乳喂养对减少肠道屏障功能损伤继而减少细菌、内毒素移位具有重要的意义。

综上所述, 2 周的全胃肠外营养可致幼鼠肠道绒毛坏死, 导致幼鼠肠道损伤, 肠道促炎因子增加, 抗炎因子减弱, 肠道屏障受损, 尽可能减少全胃肠外营养使用时间, 及早恢复肠内营养, 具有重要的临床意义。然而全胃肠外营养导致肠道损伤的具体分子机制仍不清楚, 尚待深入研究。

参 考 文 献 :

- [1] BETTAG J, PO L, CUNNINGHAM C, et al. Novel therapeutic approaches for mitigating complications in short bowel syndrome[J]. *Nutrients*, 2022, 14(21): 4660.
- [2] RIZZO V, CAPOZZA M, PANZA R, et al. Macronutrients and micronutrients in parenteral nutrition for preterm newborns: a narrative review[J]. *Nutrients*, 2022, 14(7): 1530.
- [3] PATEL P, BHATIA J. Total parenteral nutrition for the very low birth weight infant[J]. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2017, 22(1): 2-7.
- [4] HARDING J E, CORMACK B E, ALEXANDER T, et al. Advances in nutrition of the newborn infant[J]. *Lancet*, 2017, 389(10079): 1660-1668.
- [5] LUCCHINETTI E, LOU P H, WAWRZYNIAK P, et al. Novel strategies to prevent total parenteral nutrition-induced gut and liver inflammation, and adverse metabolic outcomes[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2021, 65(5): e1901270.
- [6] CERDÓ T, GARCÍA-SANTOS J A, RODRÍGUEZ-PÖHNLEIN A, et al. Impact of total parenteral nutrition on gut microbiota in pediatric population suffering intestinal disorders[J]. *Nutrients*, 2022, 14(21): 4691.
- [7] DICKERSON R N, KARWOSKI C B. Endotoxin-mediated hepatic lipid accumulation during parenteral nutrition in rats[J]. *J Am Coll Nutr*, 2002, 21(4): 351-356.
- [8] 沈蕾蕾, 孙晓东, 郑瑞雪, 等. 全胃肠外营养对幼鼠免疫功能和炎症反应的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2021, 43(21): 2358-2365.
- [9] HODIN C M, VISSCHERS R G J, RENSEN S S, et al. Total parenteral nutrition induces a shift in the Firmicutes to Bacteroidetes ratio in association with Paneth cell activation in rats[J]. *J Nutr*, 2012, 142(12): 2141-2147.
- [10] NOGUCHI M, MORIYA T, MURAKOSHI S, et al. Lipid compositions of total parenteral nutrition affect gut Peyer's patches and morphology in mice[J]. *J Surg Res*, 2022, 280: 355-362.
- [11] GANESSUNKER D, GASKINS H R, ZUCKERMANN F A, et al. Total parenteral nutrition alters molecular and cellular indices of intestinal inflammation in neonatal piglets[J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1999, 23(6): 337-344.
- [12] 孙晓东, 沈蕾蕾, 郑瑞雪, 等. 全胃肠外营养对幼鼠心肌的损伤作用及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(12): 1181-1187.
- [13] KARTHIGESU K, BERTOLO R F, BROWN R J. Parenteral nutrition and oxidant load in neonates[J]. *Nutrients*, 2021, 13(8): 2631.
- [14] HENEGHAN A F, PIERRE J F, TANDEE K, et al. Parenteral nutrition decreases Paneth cell function and intestinal bactericidal activity while increasing susceptibility to bacterial enteroinvasion[J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2014, 38(7): 817-824.
- [15] DAHLGREN AF, PAN A, LAM V, et al. Longitudinal changes in the gut microbiome of infants on total parenteral nutrition[J]. *Pediatr Res*, 2019, 86(1): 107-114.
- [16] WU W C, WANG S S, LIU Q, et al. AMPK facilitates intestinal long-chain fatty acid uptake by manipulating CD36 expression and translocation[J]. *FASEB J*, 2020, 34(4): 4852-4869.

- [17] CALDER P C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man[J]. *Biochem Soc Trans*, 2017, 45(5): 1105-1115.
- [18] KOLKOWSKI E C, FERNÁNDEZ M A, PUJOL-BORRELL R, et al. Human intestinal alphabeta IEL clones in celiac disease show reduced IL-10 synthesis and enhanced IL-2 production[J]. *Cell Immunol*, 2006, 244(1): 1-9.
- [19] SUN X Y, YANG H, NOSE K, et al. Decline in intestinal mucosal IL-10 expression and decreased intestinal barrier function in a mouse model of total parenteral nutrition[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 294(1): G139-G147.
- [20] BHAT A A, AHMAD R, UPPADA S P B, et al. Claudin-1 promotes TNF- α -induced epithelial-mesenchymal transition and migration in colorectal adenocarcinoma cells[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 349(1): 119-127.
- [21] SUZUKI T, YOSHINAGA N, TANABE S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(36): 31263-31271.
- [22] SHEN L, BLACK E D, WITKOWSKI E D, et al. Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure[J]. *J Cell Sci*, 2006, 119(Pt 10): 2095-2106.
- [23] YE D M, MA T Y. Cellular and molecular mechanisms that mediate basal and tumour necrosis factor- α -induced regulation of myosin light chain kinase gene activity[J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(4): 1331-1346.
- [24] PARADA VENEGAS D, de la FUENTE M K, LANDSKRON G, et al. Short chain fatty acids (SCFAs)-Mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 277.
- [25] TIAN M, LI L L, TIAN Z Z, et al. Glycerol butyrate attenuates enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced intestinal inflammation in piglets by inhibiting the NF- κ B/MAPK pathways and modulating the gut microbiota[J]. *Food Funct*, 2022, 13(11): 6282-6292.
- [26] CHEN X S, KONG Q H, ZHAO X X, et al. Sodium acetate/sodium butyrate alleviates lipopolysaccharide-induced diarrhea in mice via regulating the gut microbiota, inflammatory cytokines, antioxidant levels, and NLRP3/Caspase-1 signaling[J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 1036042.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 郑瑞雪, 沈蕾蕾, 孙晓东, 等. 全胃肠外营养对幼鼠肠道炎症损伤作用研究[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(13): 53-60.

Cite this article as: ZHENG R X, SHEN L L, SUN X D, et al. Study on the effect of total parenteral nutrition on intestinal inflammatory injury in young rats[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(13): 53-60.