

# 脂多糖促进小肠缺血再灌注损伤的机制探讨

沈晓菲 赵阳 陈辉 赵勇 杜峻峰 管文贤

**【摘要】** 目的 观察脂多糖(LPS)处理对于小肠缺血再灌注损伤(IRI)的影响及其机制的初步探讨。方法 实验分为3组:LPS组(腹腔注射LPS 100  $\mu\text{g}/\text{只}$ )、缺血再灌注(I/R)组(肠系膜上动脉夹闭30 min后恢复血供)以及LPS+I/R组(肠系膜上动脉夹闭30 min后恢复血供,并立即给予腹腔注射LPS 100  $\mu\text{g}/\text{只}$ )于再灌注后各时间点,获取全小肠,留取病理组织,并分离黏膜固有层细胞,提取总RNA,通过实时荧光定量RT-PCR检测各炎症细胞因子mRNA的表达水平。结果 与I/R组、LPS组比较,I/R+LPS组小鼠小肠黏膜固有层各主要细胞炎症因子呈现提前上调表达趋势,病理结果证实再灌注后48 h,I/R+LPS组较之I/R组和LPS组小肠损伤显著加重。再灌注后48 h结果显示,与I/R组比较,LPS组IL-17A mRNA水平无显著变化[(6.20 $\pm$ 0.32)与(5.79 $\pm$ 0.30)  $t=3.117$ ,  $P>0.05$ ];而LPS+I/R组与其余两组相比,IL-17A mRNA表达水平均明显上调[(14.22 $\pm$ 0.5)与(6.20 $\pm$ 0.32)  $t=59.047$ ,  $P<0.05$ ],[(14.22 $\pm$ 0.5)与(5.79 $\pm$ 0.30)  $t=134.754$ ,  $P<0.05$ ]其差异有统计学意义。结论 小肠缺血后外源性LPS可加速并加重再灌注损伤,这可能与IL-17A表达上调,促进相关免疫细胞浸润有关。

**【关键词】** 脂多糖类; 小肠; 再灌注损伤; 白细胞介素17; 动物实验

**Intestinal ischemia reperfusion injury induced by lipopolysaccharide** SHEN Xiao-fei\*, ZHAO Yang, CHEN Hui, ZHAO Yong, DU Jun-feng, GUAN Wen-xian. \* Department of General Surgery, Drum Tower Clinical Medical College of Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China

Corresponding author: GUAN Wen-xian, Email: guan-wx@163.com; DU Jun-feng, Email: dujf66@126.com

**【Abstract】** **Objectives** To investigate the effects of lipopolysaccharide (LPS) treatment on intestinal ischemia reperfusion injury and its mechanisms. **Methods** Mice were assigned randomly into an LPS treatment group (100  $\mu\text{g}$  LPS per mouse, i. p.); an ischemia reperfusion group (occlusion of the superior mesenteric artery for 30 minutes, followed by reperfusion); and an LPS + I/R group (occlusion of the superior mesenteric artery for 30 minutes, followed by reperfusion and 100  $\mu\text{g}$  LPS per mouse i. p.). The whole small intestine of the mice was harvested at individual time point after reperfusion, and pathological examination was performed. Total RNA of isolated lymphocytes from the intestinal lamina propria was extracted, and mRNA expression of each proinflammatory cytokine was detected by real-time RT-PCR.

**Results** Compared to the LPS treatment group and the ischemia reperfusion group, mRNA expression of proinflammatory cytokines exhibited an accelerated trend in the LPS + I/R group. These results were further confirmed by pathological results showing that the intestinal injury in the LPS + I/R group was severer 48 hours post-reperfusion. There was no significant difference in the mRNA level of IL-17A between the LPS treatment group and the I/R group at the time point of 48 hours [(6.20 $\pm$ 0.32) vs. (5.79 $\pm$ 0.30),  $t=3.117$ ,  $P>0.05$ ]; whereas compared to the other two groups, the mRNA level of IL-17A was significantly increased in the LPS + I/R group [(14.22 $\pm$ 0.5) vs. (6.20 $\pm$ 0.32),  $t=59.047$ ,  $P<0.05$ ], [(14.22 $\pm$ 0.5) vs. (5.79 $\pm$ 0.30),  $t=134.754$ ,  $P<0.05$ ]. **Conclusion** Intestinal ischemia reperfusion injury could be accelerated by exogenous LPS treatment, which might be mediated by IL-17A-producing infiltrated immunocytes.

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-3946.2013.03.059

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81000189)

作者单位: 210008 南京, 南京医科大学附属鼓楼临床医学院普通外科(沈晓菲, 管文贤); 中国科学院动物研究所生物膜与膜生物国家重点实验室(赵阳, 陈辉, 赵勇); 北京军区总医院普通外科(杜峻峰)

通讯作者: 管文贤, 电子邮箱: guan-wx@163.com; 杜峻峰, 电子邮箱: dujf66@126.com

**【Key words】** Lipopolysaccharides; Intestine, small; Animal experimentation

Reperfusioninjury; Interleukin-17;

缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, IRI) 是指组织或器官因缺血导致缺氧, 后又因血供恢复导致“氧爆发”造成的靶器官损伤。在器官移植的过程中不可避免的存在移植物缺血-再灌注的病理过程, 因此尽可能控制或减轻 IRI, 对于延长移植物的存活、改善预后具有重要临床意义<sup>[1]</sup>。最新的研究表明, 免疫细胞在调节 IRI 中起关键作用<sup>[2]</sup>, 小肠作为全身最大的免疫场所, 不仅包含大量免疫细胞, 也存在着丰富的革兰氏阴性菌。众所周知, 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分, 可以通过与 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 相作用, 促进炎症细胞分泌多种细胞因子引起强烈的免疫反应<sup>[3]</sup>。本研究旨在探讨 LPS 对于小肠缺血再灌注损伤的影响。

### 材料和方法

#### 一、材料

SPF 级雄性 6~8 周 C57BL/6 小鼠购自北京维通利华实验动物中心。LPS 购自美国 sigma 公司。IL-17A、IL-23、IL-1β、TNF-α、IL-6、TLR-4 等上下游引物购自北京赛百盛基因技术有限公司。

#### 二、方法

实验分为 3 组: LPS 组 (腹腔注射 LPS 100 μg/只); 缺血再灌注 (I/R) 组 (肠系膜上动脉夹闭 30 min 后恢复血供); LPS + I/R 组 (肠系膜上动脉夹闭 30 min 后恢复血供, 并立即给予腹腔注射 LPS 100 μg/只)。单独 I/R 处理方法: 纵行打开腹腔, 分离肠系膜上动脉, 无损动脉夹夹闭 30 min 根据相应时间点设置, 打开动脉夹再灌注处理对应时间; 单独 LPS 处理方法: 腹腔注射 100 μg LPS 后, 根据时间点设置取材小肠组织; LPS + I/R 联合处理方法: 动脉夹夹闭 30 min 后, 立即腹腔注射 100 μg LPS, 再按照时间点设置取材小肠; 除上述 3 组外, 设立打开小鼠腹腔后立即关闭腹腔组作为阴性对照。

#### 三、小肠黏膜固有层细胞提取

分离小鼠肠道, 去除集合淋巴结, 纵向剪开肠道后, 用无菌磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffered Saline, PBS) + 5% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 漂洗两遍, PBS + 5% FBS + 5 mM EDTA, 37° 150 转/分钟 (rpm) 震荡 30 min, 去上清, 再次加入 PBS + 5% FBS + 5 mM EDTA, 37° 150 rpm 震荡 30 min; 切碎组织, 加入含 0.25 mg/ml 胶原酶 II 的 RPMI1640 中, 37° 60 rpm 震荡 30 min, 300 目尼龙网过滤,

2000 rpm 离心 15 min, 用 40/70 percoll 分离液进行梯度离心 20 min, PBS + 5% FBS 漂洗 2 遍, 300g 离心 8 min, 即获取小肠黏膜固有层免疫细胞。

#### 四、实时荧光定量 RT-PCR 检测小肠黏膜固有层细胞细胞因子 mRNA 表达

Trizol 法提取各组细胞总 RNA, 取 2 μg 总 RNA 逆转录合成 cDNA。PCR 扩增反应体系为 20 μl, PCR 反应条件为 94°C 30s, 65°C 30s, 72°C 2min, 40 个循环, 以次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HPRT) mRNA 为内参对照。

#### 引物序列:

IL-17A	正向引物	CTCAGACTACCTCAACCGTTCC
	反向引物	ATGTGGTGGTCCAGCTTTCC
IL-23	正向引物	CTGAGAAGCAGGAACAAGATG
	反向引物	GAAGATGTCAGACTCAAGCAGGTG
IL-1β	正向引物	TGGGAAACAACAGTGGTCAGG
	反向引物	CCATCAGAGGCAAGGAGGAA
TNF-α	正向引物	GAGTGACAAGCCTGTAGCC
	反向引物	CTCCTGGTATGAGATAGCAAA
IL-6	正向引物	GCAATGGCAATTCTGATTGTATG
	反向引物	AAGGACTCTGGCTTTGCTTTTCT
TLR4	正向引物	CCTGATGACATTCTTCT
	反向引物	AGCCACCAGATTCTCTAA

#### 五、小鼠小肠组织病理学评分

在各组相应时间点, 分别取相同节段的小肠, 10% 中性甲醛溶液固定, 石蜡切片, HE 染色, 光镜下观测小肠组织形态, 双盲下根据下述标准进行小肠黏膜损伤评分: “0”正常绒毛; “1”绒毛尖部紊乱; “2”绒毛缺乏杯状细胞, 存在 Guggenheims’ 间隙; “3”绒毛内出现上皮细胞片状中断; “4”绒毛暴露, 上皮细胞脱落但黏膜固有层完整; “5”黏膜固有层出现渗出; “6”绒毛有出血剥脱。

#### 六、数据统计分析

采用 SPSS 12.0 软件分析, 各组小鼠数据采用均数 ± 标准差表示, 组之间比较用 t 检验比较, P < 0.05 认为差异有统计学意义。

### 结果

1. 各组小鼠小肠黏膜固有层细胞炎症因子表达情况: 图 1 所示: 单独 I/R 处理组、单独 LPS 处理组、I/R + LPS 联合处理组各时间点主要炎症因子表达

情况: 单独 I/R 处理组各炎症因子主要在 72 h 和 120 h 呈现高峰, 见图 1; 而单独 LPS 处理组各炎症因子表达相对平稳, 在 144 h 呈现高峰, 见图 2; LPS + I/R 联合处理组, 各炎症因子主要在 48 h 和 96 h 呈现高峰, 见图 3。

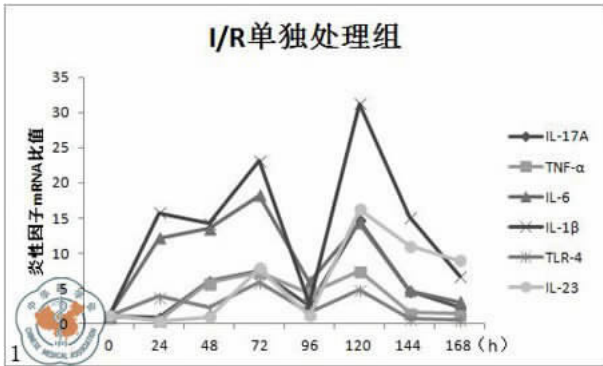


图 1 单独 I/R 处理组各时间点小鼠小肠黏膜固有层细胞炎症因子表达情况

(纵坐标表示将 0h 各炎症因子表达水平设为 1, 其余时间点炎症因子与 0h 之比): 炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-17A、IL-1 $\beta$ 、IL-23、IL-6 以及 TLR-4 mRNA 水平都呈现随灌注时间的延长, 表达水平逐渐上升, 在 72 h 达到高峰, 而后逐渐下降, 在 96 h 达到低谷, 遂又逐渐上升, 在 120 h 再次达到高值。

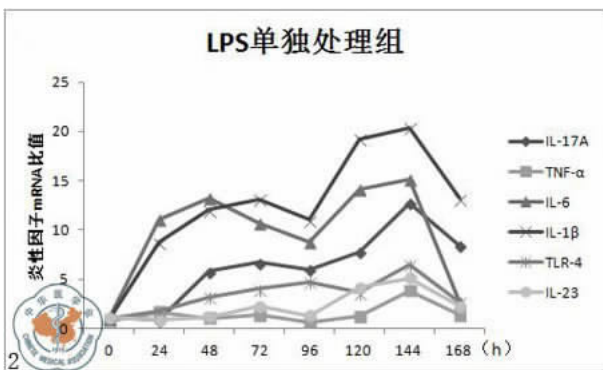


图 2 单独 LPS 处理组各时间点小鼠小肠黏膜固有层细胞炎症因子表达情况

(纵坐标表示将 0h 各炎症因子表达水平设为 1, 其余时间点炎症因子与 0h 之比): 炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-17A、IL-1 $\beta$ 、IL-23 以及 TLR-4 mRNA 水平都呈现随灌注时间的延长, 表达水平逐渐上升, 在 48 h 达到高峰, 而后逐渐平稳, 在 144 h 再次达到高值。

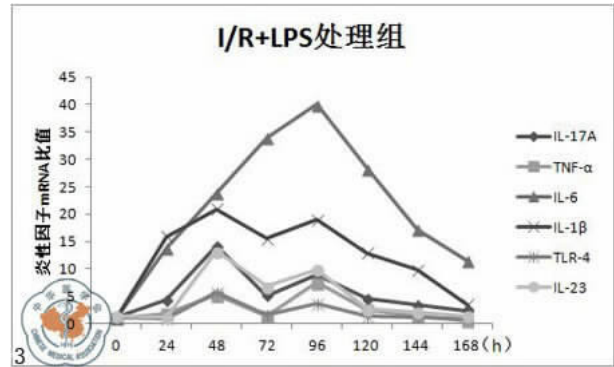


图 3 I/R + LPS 联合处理组各时间点小鼠小肠黏膜固有层细胞炎症因子表达情况

(纵坐标表示将 0h 各炎症因子表达水平设为 1, 其余时间点炎症因子与 0h 之比): 炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-17A、IL-1 $\beta$ 、IL-23 以及 TLR-4 mRNA 水平都呈现随灌注时间的延长, 表达水平逐渐上升, 在 48 h 以及 96 h 达到高峰; 与其他炎症细胞因子相比, IL-6 mRNA 水平则呈现单峰状态, 在 96 h 达到高峰。

2. 各组小鼠小肠黏膜固有层细胞同一时间点 (取 48 h) 细胞因子 IL-17A mRNA 水平对比: 与 I/R 单独处理组相比, LPS 单独处理组 IL-17A mRNA 水平差异没有统计学意义 [(6.20  $\pm$  0.32) 与 (5.79  $\pm$  0.30)  $t = 3.117, P > 0.05$ ]; 而 LPS + I/R 联合处理组与上述两者相比, IL-17A mRNA 表达水平明显上调 [(14.22  $\pm$  0.5) 与 (6.20  $\pm$  0.32),  $t = 59.047, P < 0.05$ ]; [(14.22  $\pm$  0.5) 与 (5.79  $\pm$  0.30),  $t = 134.754, P < 0.05$ ], 差异有统计学意义 (图 4)。

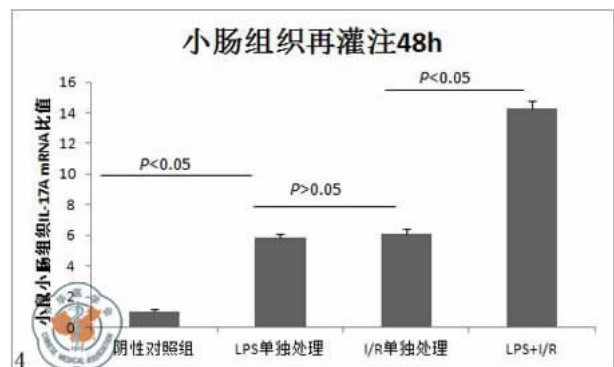


图 4 再灌注 48 h 小鼠小肠黏膜固有层细胞 IL-17A mRNA 水平表达情况

(纵坐标表示将阴性对照组 IL-17A mRNA 水平设为 1, 其余 3 组与阴性对照组之比)

3. 各组小鼠小肠组织病理切片 (HE 染色) 20 倍光镜下炎症细胞浸润及损伤情况: 对再灌注 48 h 后的小肠进行病理切片: 单独 LPS 处理组和单独的

I/R处理组可见绒毛轻度变形,杯状细胞存在,中等量炎性细胞浸润,见图5A和图5B; LPS + I/R 联合处理组可见绒毛暴露,绒毛内间隙增宽,绒毛内部结构紊乱,广泛的炎性细胞浸润,见图5C。单独LPS处理组和单独的I/R处理组相比较,小肠组织病理学评分差异没有统计学意义 [(1.1 ± 0.32) 与 (1.2 ± 0.42)  $t = 0.659, P > 0.05$ ]; 但是LPS + I/R联合处理组病理学评分要明显高于另外两组 [(2.7 ± 0.48) 与 (1.1 ± 0.32)  $t = 19.348, P < 0.05$ ]; [(2.7 ± 0.48) 与 (1.2 ± 0.42)  $t = 6.949, P < 0.05$ ], 见图6。

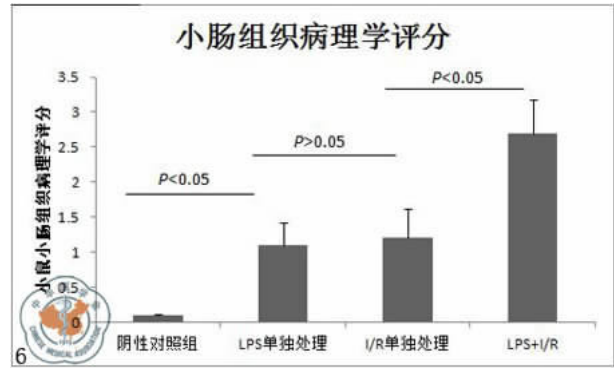


图6 各组小鼠小肠组织病理学评分

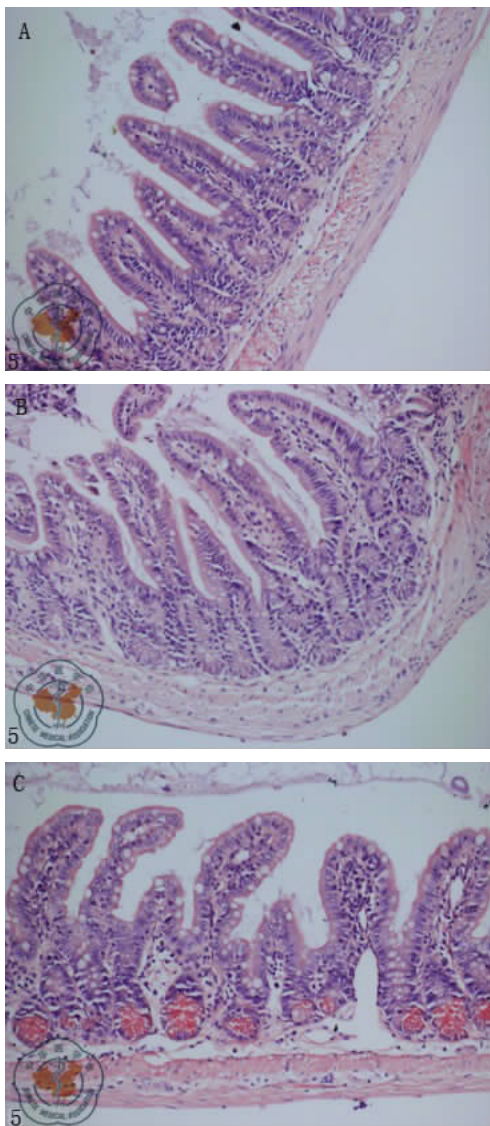


图5 再灌注48h后,各组小肠病理切片炎细胞浸润及小肠损伤情况(HE染色20倍光镜)

A: 单独LPS处理; B: 单独I/R处理; C: LPS + I/R联合处理

### 讨论

缺血再灌注损伤不仅包括缺血对组织的损伤,再灌注后释放的大量氧自由基以及一系列炎症因子信号通路的激活<sup>[4]</sup>,也会进一步加重损伤。与机体其他脏器相比,小肠缺血再灌注损伤并不是一个单纯的无菌性损伤<sup>[5]</sup>,由于缺血再灌注损伤会激活病原体识别相关受体(pathogen-recognition receptors, PRRs),例如TLR,寄生菌及肠道内的病原微生物可以通过表达的病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)与TLR结合,活化转录因子NF-κB,引起大量炎症因子的转录与释放<sup>[6]</sup>,因而寄生菌与病原微生物也会进一步加重小肠缺血再灌注损伤。LPS通过与TLR相作用,可以产生与肠道内寄生菌和病原微生物类似的作用<sup>[5]</sup>,因此我们运用腹腔注射LPS,来模拟小肠缺血再灌注损伤后寄生菌与病原微生物对损伤的作用,通过比较炎症因子mRNA水平表达情况,来探讨相应的内在联系。由于缺血再灌注损伤既主要由固有免疫应答介导,同时也包括后续可能产生的适应性免疫应答。我们所检测的TNF-α、IL-1β、IL-6及IL-23 mRNA水平可以很好地衡量固有免疫应答效应;IL-17A作为一个炎症因子,可以趋化中性粒细胞等其他免疫细胞迁移至缺血再灌注组织,进一步加重固有免疫应答所造成的损伤<sup>[6]</sup>,而T细胞来源的IL-17A(即Th17和/或γδT细胞)也是反应适应性免疫应答严重程度的重要指标<sup>[7]</sup>,因而上述炎症因子均从一定程度上很好地反应了缺血再灌注损伤的严重程度。我们发现无论是单独I/R处理组还是单独的LPS处理组,抑或是I/R + LPS联合处理组,炎症因子转录水平在各时间点都呈现类似的上升趋势,但是缺血后注射LPS,会加速炎症因子的释放,病理切片评分也进一步证实了此结果。这提示我们TLR受体的激活,会进一步加速缺血再灌注损伤,因

而控制好肠道微环境,避免病原微生物的存在对于缺血再灌注损伤能起到一定程度的减缓作用。所以肠道手术,尤其是小肠移植,术前肠道准备极为重要。

本研究中,我们并没有对哪类细胞因子在缺血再灌注损伤中起到更为至关重要的作用进行评价。Lee等<sup>[8]</sup>的研究表明,小肠上皮内潘氏细胞来源的IL-17A可能是介导小鼠小肠缺血再灌注损伤的重要因素,但是他们并未对黏膜固有层内的细胞,尤其是T细胞来源的IL-17A进行评价<sup>[9]</sup>,这主要是由于他们所用的小鼠周龄尚小,而Th17主要存在于大龄小鼠<sup>[10]</sup>,需要寄生虫与病原微生物的刺激产生<sup>[11]</sup>,但是在人类肠道,常规存在着Th17细胞<sup>[12]</sup>。此外在小肠移植中,缺血再灌注损伤在所难免,而控制好排斥反应即T细胞反应又是器官移植成功与否的关键<sup>[13]</sup>,所以Th17对于缺血再灌注损伤中固有免疫应答及其本身参与的适应性免疫应答的作用<sup>[14]</sup>,可能是控制缺血再灌注损伤、促进器官移植成功的重点<sup>[15]</sup>。我们发现,当在I/R基础上联合运用LPS时,损伤最重的48h这一时间点上,黏膜固有层内IL-17A mRNA水平大幅度提升,这与Lee对于肠上皮来源的IL-17A的研究结果是不同的,这提示我们Th17可能在小肠内通过分泌IL-17A也介导了小肠缺血再灌注损伤。下一步研究,我们会对小肠黏膜固有层内的细胞进行更为细致的分析,探索固有免疫应答与适应性免疫应答间的内在联系,从而为缺血再灌注损伤以及小肠移植研究打下基础。

#### 参 考 文 献

- [1] Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* 2011, 364(7): 656-665.
- [2] Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med* 2011, 17(11): 1391-1401.
- [3] Rossol M, Heine H, Meusch U, et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol*, 2011, 31(5): 379-446.
- [4] Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, et al. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J* 2012, 31(11): 2448-2460.
- [5] Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010, 10(12): 826-837.
- [6] 沈晓菲, 杜峻峰, 管文贤. 浆细胞样树突状细胞与调节性T细胞在移植免疫研究中的新进展. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(3): 308-311.
- [7] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008, 42(2): 145-151.
- [8] Lee HT, Kim M, Kim JY, et al. Critical role of interleukin-17A in murine intestinal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013, 304(1): G12-G25.
- [9] Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, et al. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemia stroke. *Blood* 2012, 120(18): 3793-3802.
- [10] Esplugues E, Huber S, Gagliani N, et al. Control of Th17 cells occurs in the small intestine. *Nature* 2011, 475(7357): 514-518.
- [11] Ivanov II, Atarashi K, Manel N, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 2009, 139(3): 485-498.
- [12] Esplugues E, Huber S, Gagliani N, et al. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature* 2011, 475(7357): 514-518.
- [13] Weaver CT, Elson CO, Fouser LA, et al. The Th17 pathway and inflammatory diseases of the intestines, lungs, and skin. *Annu Rev Pathol* 2013, 8: 477-512.
- [14] Morrison PJ, Ballantyne SJ, Kullberg MC. Interleukin-23 and T helper 17-type responses in intestinal inflammation: from cytokines to T-cell plasticity. *Immunology* 2011, 133(4): 397-408.
- [15] Yang JJ, Feng F, Hong L, et al. Interleukin-17 plays a critical role in the acute rejection of intestinal transplantation. *World J Gastroenterol* 2013, 19(5): 682-691.

(收稿日期: 2013-05-13)

沈晓菲, 赵阳, 陈辉, 等. 脂多糖促进小肠缺血再灌注损伤的机制探讨[J/CD]. *中华普外科手术学杂志: 电子版*, 2013, 7(3): 219-223.