

屈金权,李佳佳,鲁洪男,等. 高原寒冷环境猪腹部肠管火器贯通伤肠道继发性通透性改变研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(9): 34-42.

Qu JQ, Li JJ, Lu HN, et al. Study on changes to intestinal permeability secondary to firearm-related penetrating wound of pig abdominal intestine in cold environment at high altitudes [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(9): 34-42.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.09.005

高原寒冷环境猪腹部肠管火器贯通伤肠道继发性通透性改变研究

屈金权¹, 李佳佳², 鲁洪男³, 杨欣悦², 孙 赳¹, 梁飞行¹, 王 岩⁴, 刘江伟^{2*}

(1.新疆军区总医院高原高寒医学保障重点实验室, 乌鲁木齐 830000; 2.新疆军区总医院新疆特殊环境医学重点实验室, 乌鲁木齐 830000; 3.新疆军区总医院临床检验中心, 乌鲁木齐 830000; 4.新疆公安厅特警总队训练基地, 乌鲁木齐 830000)

【摘要】 目的 观察高原寒冷环境猪腹部肠管火器贯通伤后未直接损伤肠道继发性通透性改变及可能机制。**方法** 55 只实验猪分为高原寒冷组(HC)及平原常温组(LN)共 2 个大组,每个大组下按照观察时间点将分为 0 h、2 h、4 h、8 h、24 h 5 个实验亚组,HC 组下每个亚组 6 只实验猪,LN 组下每个亚组 5 只实验猪。按照分组时间点安乐死实验猪,取肠道组织,以 ELISA 法检测肠道组织匀浆炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的水平以及血液中肠道通透性标志蛋白二氨氧化酶(diarrhine oxidase, DAO)、D-乳酸(D-lactate, D-LA)浓度;取 LN-0 h、LN-8 h 以及 HC-8 h 时间点实验猪肠道组织,使用 HE 染色后观察其肠道病理变化并评分,通过蛋白质印迹法(Western blot)检测肠道通透性相关的咬合蛋白(Occludin)、闭合小环蛋白 1(zonula occluden-1, ZO-1)、闭合蛋白 3(Claudin-3)与通道相关的 Toll 样受体 4(toll-like receptors 4, TLR4)、核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、肌球蛋白轻链激酶(myocin light chain kinase, MLCK)的含量。**结果** HC 组与 LN 组伤后均导致了典型的腹部肠管贯通伤,腹腔感染评分及肠管粘连在两组间无明显差异($P>0.05$)。HC 组与 LN 组实验猪血清中 DAO、D-LA 随时间逐渐增加,HC 组 DAO、D-LA 在全部时间点均显著高于 LN 组($P<0.01$ 或 $P<0.001$),HC 组的 DAO、D-LA 增加最快的时间段为 4~8 h 而 LN 组则为 8~24 h。HC 组肠道组织病理评分显著高于 LN 组实验猪($P<0.01$)。LN 组与 HC 组肠道组织炎症因子 TNF- α 和 IL-6 随时间均不断升高,HC 组炎症因子增加最明显的时间点为 4~8 h, LN 组为 8~24 h。HC 组实验猪肠道组织中的 IL-6、TNF- α 在全部时间中均高于 LN 组($P<0.05$ 、 $P<0.01$ 或 $P<0.001$)。HC-8 h 组 Occludin 与 ZO-1 较 LN-8 h 时间点均下降,差异具有统计学意义($P<0.05$),而 Claudin-3 对比 LN-8 h 显著下降($P<0.001$)。HC-8 h 组 TLR4、NF- κ B 与 MLCK 均高于 LN-8 h 组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 高原寒冷环境会导致腹部肠管火器贯通伤后继发性肠道通透性增加,其机制可能与 TLR4/NF- κ B/MLCK 通路的激活相关。

【关键词】 高原寒冷环境;腹部火器伤;肠道通透性;紧密连接

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 09-0034-09

Study on changes to intestinal permeability secondary to firearm-related penetrating wound of pig abdominal intestine in cold environment at high altitudes

【基金项目】 实验动物专项课题(SYDW[2017]11 号)。

【作者简介】 屈金权(1995—),男,硕士研究生,研究方向:普外基础与临床。E-mail:scdzjq@163.com

【通信作者】 刘江伟(1970—),男,博士后,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:普外基础与临床及特殊环境医学研究。

E-mail:ljw273273@163.com

QU Jinquan¹, LI Jiajia², LU Hongnan³, YANG Xinyue², SUN Jiu¹, LIANG Feixing¹, WANG Yan⁴, LIU Jiangwei^{2*}
(1. Key Laboratory of High Altitude and Frigid Zone Medical Support, General Hospital of Xinjiang Military Command, Urumqi 830000, China. 2. Key Laboratory of Special Environmental Medicine, General Hospital of Xinjiang Military Command, Urumqi 830000. 3. Clinical Examination and Diagnostic Center, General Hospital of Xinjiang Military Command, Urumqi 830000. 4. General Special Police Force Training Base of Xinjiang Public Security Department, Urumqi 830000)

【Abstract】 Objective To observe the changes to, and possible mechanism of, intestinal permeability in pigs without direct injury after an abdominal- and intestinal-penetrating injury from firearms in cold environment at high altitudes. **Methods** Fifty-five experimental pigs were divided into two groups: high-altitude cold group (HC) and low-altitude normal temperature group (LN). According to the observation time, each group was divided into five experimental subgroups: 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, and 24 h. There were six pigs in each HC subgroup and five pigs in each LN subgroup. After euthanasia, intestinal tissues were taken, and the levels of the inflammatory factors TNF- α , and IL-6 in intestinal homogenate and the concentrations of intestinal permeability-related proteins DAO and D-lactate acid in blood were detected by ELISA method. The intestinal tissues of experimental pigs were taken at 0 h and 8 h for LN and 8 h for HC, and intestinal pathological changes were observed and scored after HE staining. The concentrations of Occludin, ZO-1, Claudin-3, TLR4, NF- κ B, and MLCK (proteins related to intestinal permeability) were detected by Western blot to explore the effect of a cold environment at high altitude on secondary intestinal permeability changes after injury and the possible mechanisms. **Results** Both the HC group and LN group experienced typical abdominal intestinal penetrating injuries, and there were no significant differences in their abdominal infection scores or intestinal adhesion ($P>0.05$). The levels of DAO and D-LA in the serum of experimental pigs in the HC and LN groups gradually increased over time. The levels of DAO and D-LA in the HC group were significantly higher than those in the LN group at all time points ($P<0.01$ or $P<0.001$). The fastest increase in DAO and D-LA in the HC group was 4 h to 8 h, while in the LN group, it was 8 h to 24 h. The pathological score of intestinal tissue in the HC group was significantly higher than that in the LN group of experimental pigs ($P<0.01$). The inflammatory factors TNF- α and IL-6 both increased over time in the intestinal tissue of LN and HC groups. The most significant time point for a increase of inflammatory factors in the HC group was 4 h to 8 h, while in the LN group, it was 8 h to 24 h. The intestinal tissue IL-6 and TNF- α levels of experimental pigs in the HC group were higher than those in the LN group the entire time ($P<0.05$, $P<0.01$, or $P<0.001$). The levels of occludin and ZO-1 in the HC group at 8 h decreased significantly compared to those of the LN group at the 8 h time point ($P<0.05$), while claudin-3 showed a significant decrease in LN ($P<0.001$). In the HC group, TLR4, NF- κ B, and MLCK were both higher than those in the LN group at 8 h, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusions** A high-altitude cold environment can lead to a secondary increase in intestinal permeability after abdominal-penetrating firearm injury, and its mechanism may be related to the TLR4/NF- κ B/MLCK pathway.

【Keywords】 cold environment at high altitudes; abdominal firearm injury; intestinal permeability; tight junction

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

腹部在火器伤受伤部位中占有很大比例^[1],且死亡率高^[2],肠道在腹腔中分布范围广,在火器伤中受到损伤的可能性最大^[3]。高原环境恶劣的气候条件,落后的医疗及基础设施建设,都制约着火器伤的救治。在腹部肠管火器贯通伤后期确定性的手术救治过程中,腹部探查以及肠管切除再吻合是其治疗的主要方法,直接损伤的肠道因为部分组织已经坏死,一部分肠管将会被切除,其余未直接

损伤的肠道将重建消化道,此时肠道的继发性损伤将是影响吻合部位以及机体恢复的重要因素^[4]。然而高原低压缺氧环境对机体的影响是持续作用的,并不会因为机体脱离高原环境而快速停止。因此高原寒冷环境腹部火器伤后送至平原环境后继发性肠道的损伤情况,高原环境对火器伤后肠道屏障功能和通透性的影响及可能的机制研究则在后期的救治中至关重要。本研究在高原寒冷环境猪

肠管火器贯通伤模型建立的基础上通过检测血液中肠道通透性标志性蛋白、组织中炎症因子、肠道组织紧密连接(tight junction, TJ)蛋白以及损伤相关的通道蛋白,研究肠道通透性改变及可能的机制,为后期进一步救治提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通清洁级长白猪 55 头,2~3 月龄,均系公猪,体重 30~35 kg,检疫合格证明(NO. 9001068323),购于新疆泰昆农牧科技有限责任公司(动物生产许可证号:新兵 B030101)。实验猪送达后于新疆军区总医院特殊环境医学重点实验室大型动物饲养间[SYXK(军)2017-0049]预饲养 4~7 d,将实验猪单笼饲养,按照自然光照条件,未进行饲养环境光暗处理,环境温度(26.3 ± 3.6) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(46 ± 18)%。所有实验猪在适应性饲养期间不限食水,本实验方案获得新疆军区总医院动物伦理委员会批准(DWLL20190314),并符合动物福利 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

硫酸阿托品(天津金耀);盐酸氯胺酮注射液(江苏恒瑞);猪 TNF- α ELISA 检测试剂盒(武汉菲恩);猪 IL-6 ELISA 检测试剂盒(武汉菲恩);猪 D-LA ELISA 试剂盒(上海科兴);猪 DAO ELISA 试剂盒(武汉菲恩);NF- κB p65 抗体(CST);MLCK 抗体(博奥森);TLR4 抗体(NOVUS);ZO-1 抗体(博奥森);Claudin-3 抗体(博奥森);Occludin 抗体(Abcam)。西北特殊环境人工实验舱(新疆军区总医院);显微图像分析采集系统(Leica);酶标仪(Bio-Rad);Western blot 电泳/转膜设备(Bio-Rad)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型建立

按照随机数法将 55 头实验猪分为高原寒冷组(HC)及平原常温组(LN)共 2 个大组,每个大组下按照观察时间点将分为 0 h、2 h、4 h、8 h、24 h 5 个实验亚组,HC 组下每个亚组 6 头实验猪,LN 组下每个亚组 5 头实验猪。待实验猪预适应结束后,将 HC 组实验猪放置于西北特殊环境人工实验舱内,调节高度为 6000 m(大气压 47.33 kPa,空气氧分压为 9.87 kPa,温度 10 $^{\circ}\text{C}$),待实验舱达到相应高度后停留 48 h,出舱前 12 h 禁食,6 h 禁水,余下时间自由食水。高原暴露结束后将实验猪置于靶场,使用硫酸阿托品注射液+盐酸氯胺酮注射液对猪注射麻醉

后,将其呈四肢体下垂悬吊于靶场,专业射手调教手枪后,距离实验猪约 2 m 的距离瞄准右侧腹部髂前上棘前方 3 cm,腹中线靠背侧 3 cm 交界处标记点射击完成造模。平原常温组除将实验猪放置于海拔 800 m(大气压 89.87 kPa,空气氧分压为 18.8 kPa,温度 25 $^{\circ}\text{C}$)48 h 外,按上述相同方法建模。

1.3.2 检测指标

记录实验猪体重、伤情及解剖情况,腹腔感染情况采用腹腔感染评分系统进行评分^[5],使用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒测定两组实验猪各时间点血清标本中 DAO、D-LA 含量以及肠道组织中 IL-6 与 TNF- α 的含量。使用回肠组织 HE 染色切片,两位专业病理医生分别观察切片并按肠道 Chiu's 六级评分标准打分,取均值,分值相差 2 分及以上者引入第 3 位病理医生观察并评分^[6]。Western blot 法检测肠道组织 ZO-1、Claudin-3、Occludin 蛋白以及 TLR4、NF- κB 和 MLCK 蛋白的表达。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 25 统计软件进行数据处理,使用 Image J 进行 Western blot 图像分析,使用 Graph Pad Prism 8 进行绘图,符合正态分布的计量指标用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不符合正态分布的指标采用中位数 $\pm$ 四分位间距表示 $M(QL, QU)$ 。组间比较用独立因素 T 检验,组内比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),多重比较方差齐用 LSD- T 检验,方差不齐采用 Dunnett's $T3$ 检验,非正态分布资料采用非参数检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

HC 组暴露后体重为(28.344 ± 1.712)kg,较进舱前(32.570 ± 1.416)kg 显著降低($P < 0.001$)。创伤后 HC 组与 LN 组实验猪在各时间点取材前均存活,解剖时均观察到有肠管贯通伤。两组腹腔感染情况均随时间增加而加重,表现为损伤部位肠管肿胀,腹腔内纤维膜覆盖,肠管表面出现白色米粒样结节,但两组各时间点间对比均无差异性($P > 0.05$)。两组肠管均在 4 h 时间点开始出现肠管粘连,并随时间增加表现更加严重,表现为肠管与腹壁、肠系膜、肠管间粘连加重,两组各时间点间对比也均无差异性($P > 0.05$)。详见表 1。

2.2 血清 DAO、D-LA 检测结果

如图 1 所示两组实验猪肠道 DAO、D-LA 总体趋势均随时间而逐渐增加。HC 组实验猪血清中的 DAO、D-LA 在 2 h、4 h、8 h、24 h 时间点均显著高于 LN 组($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。HC 组的 DAO、D-LA 增加最快的时间段为 4~8 h,而 LN 组则为 8~24 h。

2.3 肠道炎症因子检测结果

如图 2 所示两组实验猪肠道炎症因子 IL-6、TNF- α 总体趋势均随时间而逐渐增加。在随时间点的变化趋势中,HC 组 IL-6、TNF- α 含量急剧升高,最早出现在 4~8 h 之间,而 LN 组出现这一现象的时间段为 8~24 h 之间。HC 组实验猪肠道组织中的 IL-6 在 0 h、2 h、4 h、8 h、24 h 时间点均显著高于 LN 组($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。HC 组实验猪肠道组织中的 TNF- α 在 0 h、2 h、8 h、24 h 时间点对比 LN 组

显著增高($P<0.01$ 或 $P<0.001$);在剩下的 4 h 时间点也高于 LN 组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 肠道病理学评分

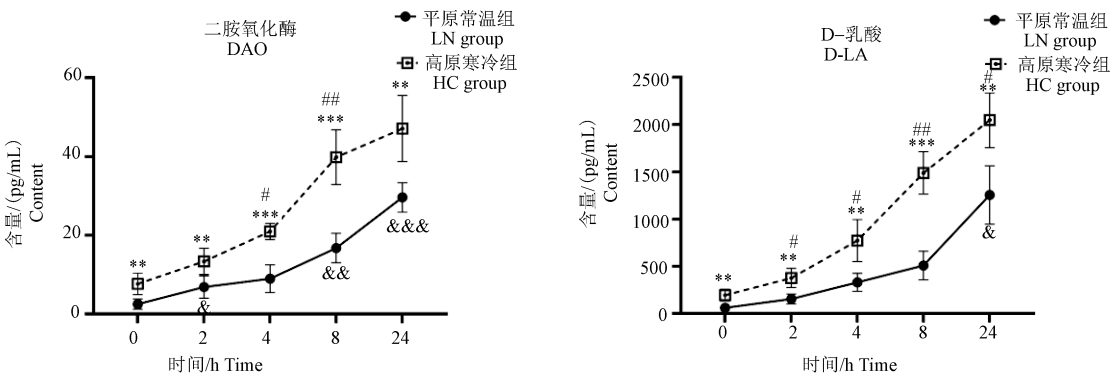
选择 LN 组 0 h 时间点(LN-0 h)、LN 组 8 h 时间点(LN-8 h)与 HC 组 8 h 时间点(HC-8 h)距子弹直接损伤部位 10 cm 肠道组织包埋切片后 HE 染色,进行观察评分。如图 3 所示,HC-8 h 平均病理评分为 3.83(3.55~3.90)对比 LN-0 h 平均病理评分的分值 0.00(0.02~0.24)与 LN-8 h 平均病理评分的分值 1.67(1.51~1.69)均显著增高($P<0.01$)。

2.5 肠道通透性相关蛋白表达结果

如图 4 所示,肠道紧密连接蛋白 Occludin、ZO-1 与 Claudin-3 均表现出在 LN-0 h 组含量最高,LN-8 h 组次之,而 HC-8 h 组含量最少。HC-8 h 时间点实验猪的肠道通透性蛋白 Occludin 与 ZO-1 的相对表达

表 1 HC 与 LN 组实验猪伤后不同时间点腹腔感染及腹腔粘连情况
($\bar{x}\pm s$ 或 $M(QL,QU)$, LN=5 只/时间点,HC=6 只/时间点)

分组 Groups		0 h	2 h	4 h	8 h	24 h
腹腔感染(评分) Abdominal infection (score)	LN	0.00(0.000~0.000)	1.00(1.000~2.000)	2.00(1.500~2.000)	3.00(2.500~3.000)	4.00(4.000~4.500)
	HC	0.00(0.000~0.000)	1.50(1.000~2.000)	2.00(1.750~2.000)	3.00(3.000~3.250)	4.00(4.000~4.250)
	Z	0.000	-0.316	-0.136	-1.354	-0.136
	P	1.000	0.752	0.892	0.176	0.892
腹腔粘连(n) Abdominal adhesions	LN	0.00(0.000~0.000)	0.00(0.000~0.500)	5.400 $\pm$ 1.817	5.600 $\pm$ 1.673	9.400 $\pm$ 2.510
	HC	0.00(0.000~0.000)	0.00(0.000~1.000)	5.500 $\pm$ 1.643	5.667 $\pm$ 1.751	10.500 $\pm$ 2.345
	Z/F	0.000	-0.471	-0.096	-0.064	-0.751
	P	1.000	0.637	0.926	0.950	0.472



注:HC 组与同组前一时间点相比, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$;LN 组与同组前一时间点相比, $^{\&}P<0.05$, $^{\&\&}P<0.01$, $^{\&\&\&}P<0.001$;与相同时间 LN 组相比, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ 。

图 1 LN 组与 HC 组肠道通透性相关指标 DAO、D-LA 检测结果

Note. HC group compared with the previous time point in the same group, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$. LN group compared with the same group at the previous time point, $^{\&}P<0.05$, $^{\&\&}P<0.01$, $^{\&\&\&}P<0.001$. Compared with the LN group at the same time, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$.

Figure 1 Detection results of DAO and D-LA indicators related to intestinal permeability in LN group and HC group

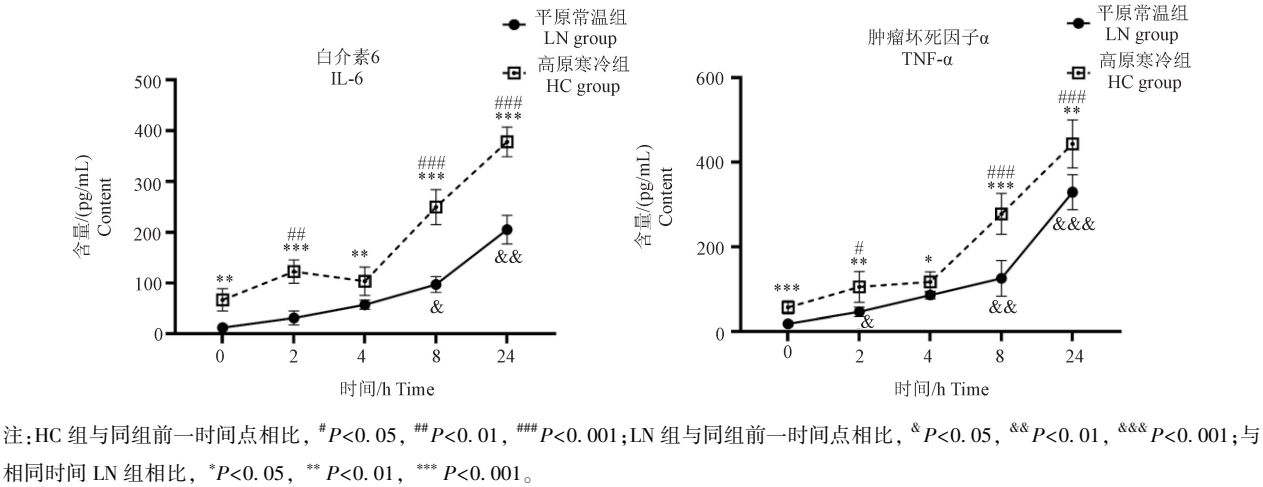


图 2 LN 组与 HC 组伤后不同时间肠道组织炎症因子变化

Note. HC group compared with the previous time point in the same group, $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$, $^{###}P<0.001$. LN group compared with the same group at the previous time point, $^{\&}P<0.05$, $^{\&\&}P<0.01$, $^{\&\&\&}P<0.001$. Compared with the LN group at the same time, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$.

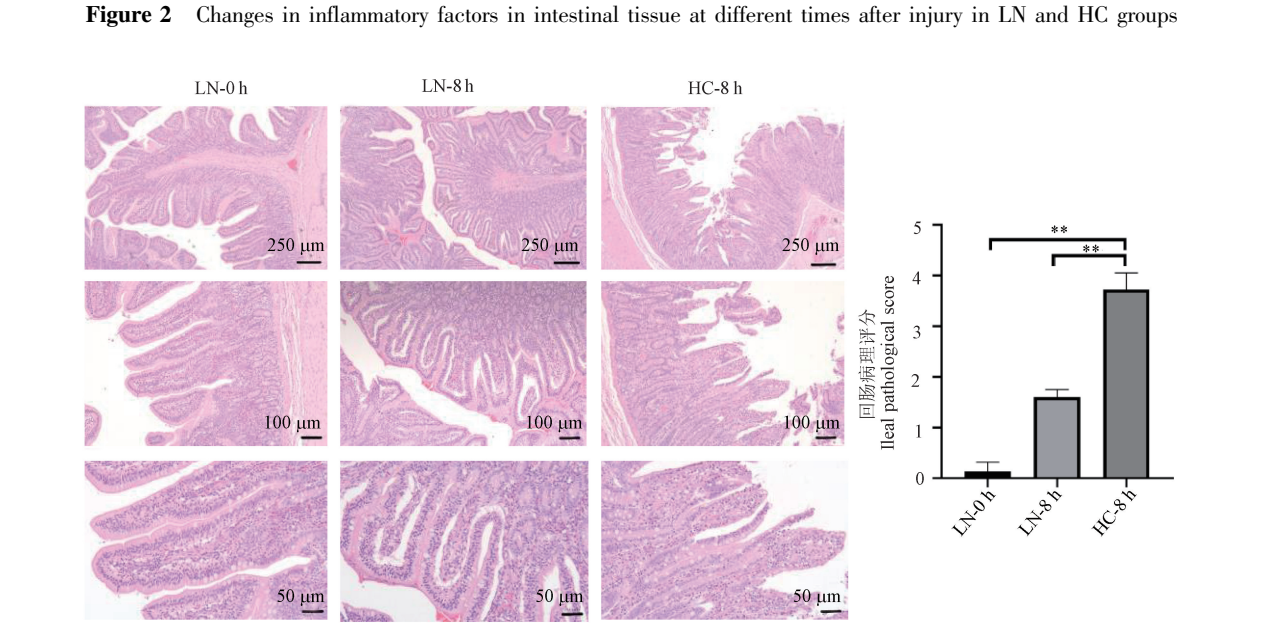


图 3 LN 组与 HC 组回肠 HE 染色切片病理评分

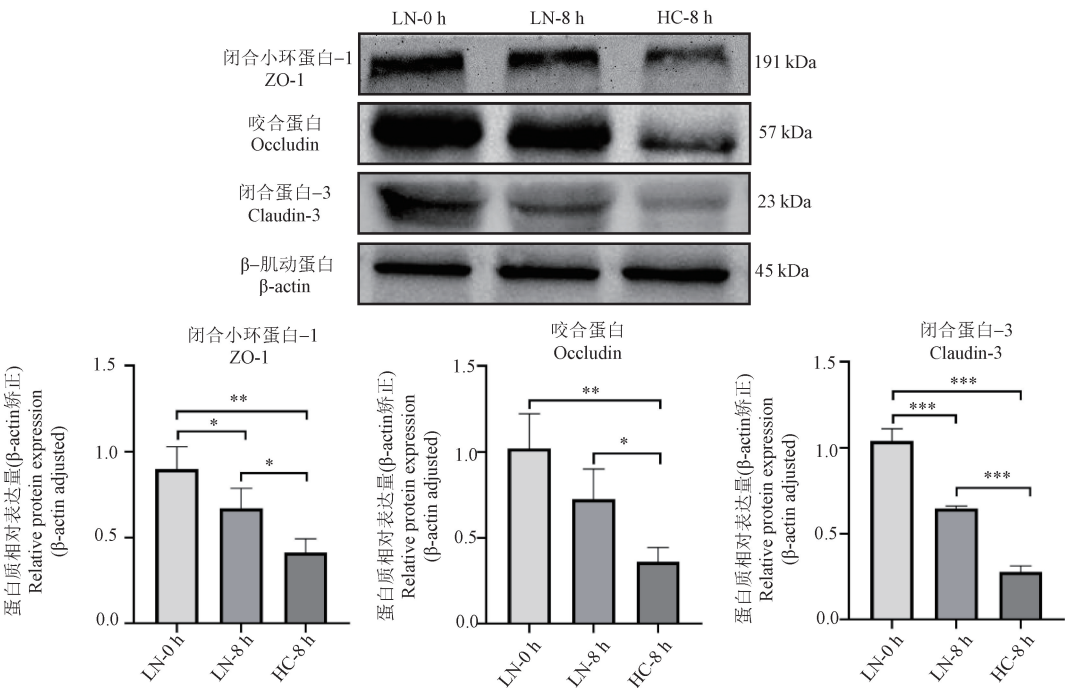
Note. Compared with the HC-8 h group, $^{**}P<0.01$.

Figure 3 Pathological scores of HE stained sections of ileum in LN group and HC group

量较 LN-8 h 时间点均下降,差异具有统计学意义($P<0.05$),而 Claudin-3 蛋白的相对表达量对比 LN-8 h 则是显著下降($P<0.001$)。HC-8 h 组对比 LN-0 h 组 Occludin、ZO-1 与 Claudin-3 的含量明显减少($P<0.01$)。LN-8 h 组相较于 LN-0 h 组, Occludin 含量降低但无统计学意义($P>0.05$), ZO-1 的差异具有统计学意义($P<0.05$),而 Claudin-3 则是显著降低($P<0.001$)。

2.6 TLR4/NF-κB/MLCK 通道蛋白表达结果

如图 5 所示,TLR4/NF-κB/MLCK 通路蛋白在 HC-8 h 组表达量最高, LN-8 h 组次之, LN-0 h 表达量最低。HC-8 h 组实验猪的 TLR4、NF-κB 与 MLCK 的相对表达量均高于 LN-8 h 组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。HC-8 h 组对比 LN-0 h 组 TLR4、NF-κB 与 MLCK 的含量显著增加($P<0.01$)。LN-8 h 组相较于 LN-0 h 组, TLR4、NF-κB 与 MLCK 的含量有

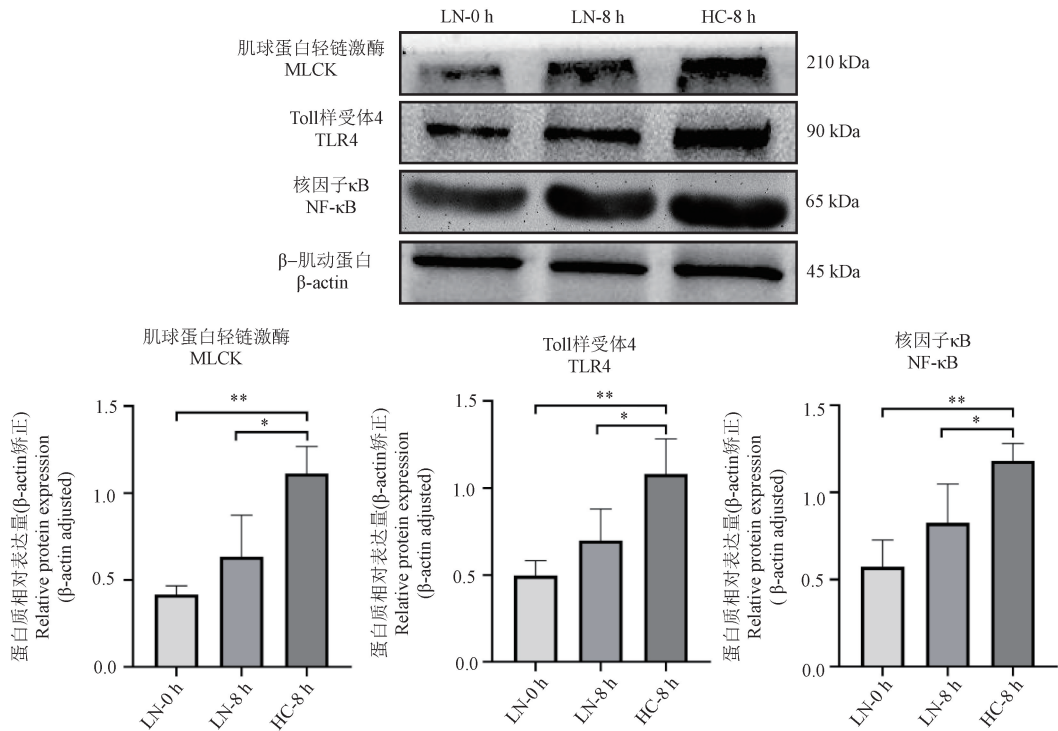


注:与 HC-8 h 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 4 LN 组与 HC 组肠道通透性相关蛋白表达结果

Note. Compared with the HC-8 h group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 4 Expression results of intestinal permeability related proteins in LN and HC groups



注:与 HC-8 h 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 5 LN 组与 HC 组肠道 TLR4/NF- κ B/MLCK 通路蛋白表达结果

Note. Compared with the HC-8 h group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 5 Expression results of TLR4/NF- κ B/MLCK pathway proteins in the intestine of LN and HC groups

所增高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

高原环境对肠道屏障功能有损伤作用^[7],其作用机制主要是高原缺氧会加重小肠微绒毛缺氧状态造成肠道上皮损伤,同时缺氧会导致产生一些缩血管物质,进一步导致肠道缺血、缺氧,加重肠道损伤,其次高原环境改变肠道内菌群结构也是导致肠道屏障功能受损的一大因素^[8],而且高原环境也会诱导肠道炎症通路相关蛋白合成增加,导致肠道炎症因子大量释放加重肠道屏障功能损伤。机体各类型的损伤会通过应激反应造成肠道屏障功能损伤,同时机体的炎症反应产生的大量炎症因子也被证实会对肠道屏障功能造成损伤^[9],同时高原缺氧环境会导致大脑部分功能抑制,两者共同作用使得实验猪在高原环境摄食减少,而且高原应激等损伤会导致机体消耗增加,使得实验猪体重显著下降。大量研究表明高原寒冷缺氧环境会导致细菌繁殖降低,感染时限延长,但我们研究发现高原环境中实验猪体温相比平原环境一直保持在高位^[10],这也许是导致本实验中 HC 组与 LN 组在腹腔感染以及肠道粘连中无差异的原因之一。

二氨氧化酶(diarrhine oxidase, DAO)主要存在于哺乳动物的绒毛顶端肠上皮细胞,主要在肠黏膜表达,通常血液中的 DAO 含量非常低^[11],但当肠道上皮细胞受损时,其中的 D-LA 会释放到机体血液中,导致血中 DAO 含量增加^[12]。大量研究表明,DAO 的含量反映了肠黏膜的完整性,以及肠道黏膜损伤和恢复情况^[13]。在机体内,D-乳酸(D-lactate, D-LA)主要由胃肠道内的细菌代谢而产生,但哺乳动物没有可以代谢 D-LA 的酶^[14],其无法通过正常的肠道上皮屏障,因此 D-LA 在正常机体血液中含量很少。但当肠道黏膜上皮细胞受损时,D-LA 会通过损伤的肠道屏障进入到循环血液中,导致血清 D-LA 水平升高^[11,15]。在本实验中,无论是 LN 组还是 HC 组实验猪,其血清中的 DAO 和 D-LA 水平均随时间而增加,而且 HC 组的 DAO、D-LA 增加最快的时间段为 4~8 h 而 LN 组则为 8~24 h。结果说明两组实验猪在伤后肠道通透性均不断增加。而 HC 组肠道通透性增最快的时间段为 4~8 h, LN 组为 8~12 h,说明高原环境暴露对机体的影响是持续的,即使脱离了缺氧环境,机体的损伤还是会更加严重,所以发生在高原环境的创伤即使脱离了高原环境仍要

警惕损伤加重,而且相较于平原更加严重,同时损伤的峰值可能会提前出现,这与高原缺氧导致的炎症反应以及应激反应可能相关^[16]。鉴于 HC 组 4~8 h 时间段肠道损伤加重最为明显,而 LN 组在 8~24 h 明显,因此我们选择了 LN-0 h、LN-8 h 以及 HC-8 h 时间点来进一步观察高原寒冷环境对火器伤后肠道的损伤与平原常温组的区别,也有利于进一步的机制研究。在对 LN-0 h、LN-8 h 以及 HC-8 h 的肠道病理观察与评分中,我们发现 HC-8 h 组的肠道病理评分要显著高于 LN-8 h 与 LN-0 h,而且在观察中发现 HC-8 h 的 6 头实验猪几乎都存在着多少不一的肠道上皮绒毛脱落,顶端基底层暴露,固有层血管扩张充血的情况。结果同样印证了高原寒冷环境会进一步加重火器伤后肠道的继发性损伤,导致血清中肠道通透性相关指标升高。

大量研究表明肠道组织紧密连接蛋白的表达与细胞间紧密连接结构和肠道屏障功能有着密不可分的联系^[17]。细胞紧密连接相关蛋白主要由 Occludin、Claudin 家族以及 Jams 等跨膜蛋白构成,紧密连接相关蛋白与咬合蛋白家族和细胞骨架构成紧密连接复合体,组成紧密连接复合体的蛋白之间通过不同的调节机制共同调节肠道上皮的屏障功能^[18]。有研究表明高原环境可导致肠道通透性增加,张方信等^[19]观察到急进高原大鼠肠道中紧密连接蛋白相比平原地区表达减少,而且这种减少的趋势随着在高原停留时间的增加而加快。在本研究中,通过检测 LN-0 h、LN-8 h、HC-8 h 肠道组织中的 Occludin、Claudin-3 以及 ZO-1 蛋白的相对表达量,我们发现创伤后上述蛋白表达减少,这与 Katzenberger 等^[20]和 Corson 等^[21]所观察到的现象一致,而高原环境会进一步降低 Occludin、Claudin-3 以及 ZO-1 蛋白的表达,说明高原寒冷环境与创伤具有协同作用,两者将会进一步增加肠道的通透性。肠道中的紧密连接复合体相关蛋白的表达与分布受多种因素的影响,其中研究最多的就是炎症反应对该类蛋白的影响^[22-23]。有相关细胞实验表明组织中炎症因子 TNF- α 增加会导致 Claudin 家族与 ZO-1 表达减少与分布异常^[24]。在本次研究中通过对组织匀浆检测其中的炎症因子 TNF- α 与 IL-6,结果提示 HC 与 LN 组火器伤后 TNF- α 、IL-6 均逐渐升高,而且在上升的趋势中,HC 组同样在 4~8 h 幅度最大,而 LN 组则为 8~24 h,这与肠道通透性标志蛋白表现一致。上述结果提示高原环境进一步降低

Occludin、Claudin-3 以及 ZO-1 蛋白的表达可能与肠道组织中 TNF- α 、IL-6 含量增加相关。

MLCK 是一种蛋白激酶,它通过磷酸化调节肌球蛋白轻链 MLC-2,诱导 ATP 供能的肌动蛋白-肌球蛋白收缩^[25]。有研究发现 TNF- α 诱导的细胞骨架结构改变与 NF- κ B 蛋白的激活有密切关系,TNF- α 通过 NF- κ B 亚基引起 MLCK 转录启动子激活,诱导 MLCK 转录,最终导致 MLCK 蛋白表达增加^[26]。MLCK 将进一步激活 MLC 蛋白轻链,使 MLC 结构发生变化,同时激活肌球蛋白头部的 ATP 酶,产生能量,使细胞骨架-肌动蛋白产生滑动,导致紧密连接的前肌动球蛋白环收缩和张力增加,引起 Occludin、Claudin 家族、ZO-1 等紧密连接蛋白和周围细胞骨架蛋白的重新分布,最终导致紧密连接结构改变,细胞旁路开放,导致肠粘膜通透性增加^[27-28]。经典的炎症通路中,肠道中的 LPS 通过损伤的肠道上皮细胞以及上皮细胞旁通路进入内环境,作用于肠道组织细胞膜上的 TLR4 蛋白受体,TLR4 级联激活下游的 MYD88、NF- κ B,激活的 NF- κ B 进入细胞核进一步启动下游炎症因子 TNF- α 、IL-6 的基因转录,从而产生大量的炎症因子 TNF- α 、IL-6,而 TNF- α 进一步作用于该通路,形成炎症瀑布^[29-31]。在本研究中,我们观察到肠道组织中的 TNF- α 、IL-6 增加,同时发现火器伤后 LN-8 h 肠道组织中的 TLR4、NF- κ B 以及 MLCK 均较 LN-0 h 升高,而 HC-8 h 较 LN-8 h 又进一步升高了,而 Occludin、Claudin-3 以及 ZO-1 蛋白表达下降。因此我们推测高原寒冷环境通过 TLR4/NF- κ B/MLCK 信号通路降低腹部肠管火器贯通伤后肠道组织 Occludin、Claudin-3 以及 ZO-1 的蛋白的含量,进一步损伤肠道屏障功能。

综上所述,高原寒冷环境腹部肠管火器贯通伤可导致机体未直接损伤的肠道继发性通透性较平原腹部肠管火器贯通伤进一步增加,其机制可能与 TLR4/NF- κ B/MLCK 信号通路的激活相关。

参考文献:

[1] VLČEK M, JAGANJAC E, NIEDOBA M, et al. Current treatment procedures for civilian gunshot wounds [J]. Rozhl Chir, 2018, 97(12): 558-562.

[2] MAGHAMI S, HENDRIX C, MATECKI M, et al. Comparison of the causes of death and wounding patterns in urban firearm-related violence and civilian public mass shooting events [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2020, 88(2): 310-313.

[3] 崔鸿斌, 张小培, 王秉钧. 142 例腹部火器伤的诊疗体会

[J]. 甘肃医药, 2010, 29(3): 285-288.

CUI H B, ZHANG X P, WANG B J. Diagnosis and treatment of 142 cases of abdominal firearm injury [J]. Gansu Med J, 2010, 29(3): 285-288.

[4] BERG R J, INABA K, OKOYE O, et al. The peril of thoracoabdominal firearm trauma: 984 civilian injuries reviewed [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2014, 77(5): 684-691.

[5] 邵永胜, 张应天. 继发性腹膜炎的评分系统 [J]. 腹部外科, 2002, 15(3): 188-189.

SHAO Y S, ZHANG Y T. Scoring system of secondary peritonitis [J]. J Abdom Surg, 2002, 15(3): 188-189.

[6] CHIU C J, MCARDLE A H, BROWN R, et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal [J]. Arch Surg, 1970, 101(4): 478-483.

[7] MCKENNA Z J, BELLOVARY B N, DUCHARME J B, et al. Circulating markers of intestinal barrier injury and inflammation following exertion in hypobaric hypoxia [J]. Eur J Sport Sci, 2023, 23(10): 2002-2010.

[8] LIU D, GAO X, HUANG X, et al. Moderate altitude exposure impacts host fasting blood glucose and serum metabolome by regulation of the intestinal flora [J]. Sci Total Environ, 2023, 905: 167016.

[9] 胡琼源. 中性粒细胞胞外诱捕网在脓毒症及肠屏障功能中的研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2019, 32(10): 1084-1088.

HU Q Y. Progress research of neutrophil extracellular traps in sepsis and intestinal barrier function [J]. J Med Postgrad, 2019, 32(10): 1084-1088.

[10] 屈金权, 李佳佳, 杨欣悦, 等. 高原寒冷环境猪腹部肠管火器贯通伤后弹道细菌变化及药敏分析 [J]. 创伤外科杂志, 2024, 26(4): 247-255.

QU J Q, LI J J, YANG X Y, et al. Ballistic bacteria changes and drug sensitivity analysis after abdominal intestinal firearm penetrating wound in pig models exposed in simulated cold and high altitude environments [J]. J Trauma Surg, 2024, 26(4): 247-255.

[11] ZHANG Q, GAO X, WU J, et al. The correlation between endotoxin, D-lactate, and diamine oxidase with endoscopic activity in inflammatory bowel disease [J]. Dis Markers, 2022, 2022: 9171436.

[12] LUK G D, VAUGHAN W P, BURKE P J, et al. Diamine oxidase as a plasma marker of rat intestinal mucosal injury and regeneration after administration of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine [J]. Cancer Res, 1981, 41(6): 2334-2337.

[13] D'AGOSTINO L, PIGNATA S, DANIELE B, et al. Postheparin plasma diamine oxidase values in the follow up of patients with small bowel Crohn's disease [J]. Gut, 1991, 32(8): 932-935.

[14] OUYANG J, YAN J, ZHOU X, et al. Relevance of biomarkers indicating gut damage and microbial translocation in people living

with HIV [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1173956.

[15] NIELSEN C, MORTENSEN F V, ERLANDSEN E J, et al. L- and D-lactate as biomarkers of arterial-induced intestinal ischemia; an experimental study in pigs [J]. *Int J Surg*, 2012, 10(6): 296–300.

[16] GAO Y, LONG Q, YANG H, et al. Transcriptomics and metabolomics study in mouse kidney of the molecular mechanism underlying energy metabolism response to hypoxic stress in highland areas [J]. *Exp Ther Med*, 2023, 26(5): 533.

[17] HOROWITZ A, CHANEZ-PAREDES S D, HAEST X, et al. Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(7): 417–432.

[18] OTANI T, FURUSE M. Tight junction structure and function revisited [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(10): 805–817.

[19] 张方信, 邓芝云, 李文祥, 等. 急进高原与平原大鼠肠黏膜屏障紧密连接蛋白 occludin 表达的对比研究 [J]. *西北国防医学杂志*, 2013, 34(5): 401–403.

ZHANG F X, DENG Z Y, LI W X, et al. Expression of occludin protein in intestinal mucosa barrier in model rats of radical plateau and plain [J]. *Med J Natl Defending Forces Northwest China*, 2013, 34(5): 401–403.

[20] KATZENBERGER R J, GANETZKY B, WASSARMAN D A. The gut reaction to traumatic brain injury [J]. *Fly*, 2015, 9(2): 68–74.

[21] CORSON R J, PATERSON I S, O’ DWYER S T, et al. Lower limb ischaemia and reperfusion alters gut permeability [J]. *Eur J Vasc Surg*, 1992, 6(2): 158–163.

[22] STEPHENS M, VON DER WEID P Y. Lipopolysaccharides modulate intestinal epithelial permeability and inflammation in a species-specific manner [J]. *Gut Microbes*, 2020, 11(3): 421–432.

[23] ZHANG X, ZHANG Y, HE Y, et al. β -glucan protects against necrotizing enterocolitis in mice by inhibiting intestinal inflammation, improving the gut barrier, and modulating gut microbiota [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 14.

[24] TIAN Y, SHU R, LEI Y, et al. Somatostatin attenuates intestinal epithelial barrier injury during acute intestinal ischemia-reperfusion through Tollip/Myeloiddifferentiationfactor 88/ Nuclear factor kappa-B signaling [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 5005–5020.

[25] KHAPCHAEV A Y, SHIRINSKY V P. Myosin light chain kinase MYLK1: anatomy, interactions, functions, and regulation [J]. *Biochemistry*, 2016, 81(13): 1676–1697.

[26] ZHONG J, YU R, ZHOU Q, et al. Naringenin prevents TNF- α -induced gut-vascular barrier disruption associated with inhibiting the NF- κ B-mediated MLCK/p-MLC and NLRP3 pathways [J]. *Food Funct*, 2021, 12(6): 2715–2725.

[27] HE W Q, WANG J, SHENG J Y, et al. Contributions of myosin light chain kinase to regulation of epithelial paracellular permeability and mucosal homeostasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 993.

[28] CHANEZ-PAREDES S D, ABTAHI S, ZHA J, et al. Mechanisms underlying distinct subcellular localization and regulation of epithelial long myosin light-chain kinase splice variants [J]. *J Biol Chem*, 2024, 300(2): 105643.

[29] KIM Y C, LEE S E, KIM S K, et al. Toll-like receptor mediated inflammation requires FASN-dependent MYD88 palmitoylation [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(9): 907–916.

[30] LIU Y, ZHAO C, MENG J, et al. Galectin-3 regulates microglial activation and promotes inflammation through TLR4/MyD88/NF- κ B in experimental autoimmune uveitis [J]. *Clin Immunol*, 2022, 236: 108939.

[31] 杨玲, 周素芳, 路月红, 等. 基于 LPS/TLR4 信号通路探讨酒精性肝病进展的相关机制 [J]. *医学研究生学报*, 2022, 35(1): 35–40.

YANG L, ZHOU S F, LU Y H, et al. The exploration of the mechanism of progression in alcoholic liver disease based on LPS/TLR4 signaling pathway [J]. *J Med Postgrad*, 2022, 35(1): 35–40.

[收稿日期]2024-04-10