

LP17 多肽对小鼠肠缺血再灌注损伤影响

孙学童 季涛 张宗兵 孔令尚 刘牧林 何先弟

【摘要】 目的 探讨 LP17 多肽对小鼠肠缺血再灌注(IIR)损伤影响。方法 将 36 只小鼠按数字表法随机分为假手术组(S 组)、IIR 组(I/R 组)、IIR + LP17 对照肽治疗组(C1 组)、IIR + LP17 治疗组(C2 组),每组 9 只。肠系膜上动脉夹闭 20 min 制作小鼠 IIR 模型,于再灌注前 5 min 将药物注入小鼠腹腔,24 h 后处死小鼠,检测血清中可溶性髓样细胞触发受体-1(sTREM-1)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的浓度,观察肠黏膜损伤程度,免疫组化法检测肝脏细胞的核因子- κ B(NF- κ B)的表达情况。**结果** 血清 sTREM-1、血清 TNF- α 和肝脏细胞 NF- κ B 在 I/R 组和 C1 组升高,分别为(1 686.34 \pm 55.98) pg/ml、(121.81 \pm 8.01) pg/ml、(3.36 \pm 0.62) 表达和(1 643.73 \pm 65.45) pg/ml、(119.88 \pm 8.05) pg/ml、(3.21 \pm 0.94)分;在 C2 组降低,分别为(944.58 \pm 39.75) pg/ml、(65.92 \pm 4.91) pg/ml 和(0.92 \pm 0.55)分,与 I/R 组和 C1 组比较,差异均有统计学意义(P 值均 $<$ 0.01)。光镜下 S 组小鼠小肠黏膜基本正常;I/R 组和 C1 组绒毛破坏较重,绒毛坏死明显,黏膜下水肿,炎性细胞浸润更加明显,肠壁各层均变薄;C2 组肠绒毛损伤明显减轻,其肠黏膜损伤评分与其他各组比较,差异均有统计学意义(P 值均 $<$ 0.01)。**结论** LP17 多肽通过调节 TREM-1 的信号转导通路,减轻 NF- κ B 和 TNF- α 过度激活所致炎症反应,减轻 IIR 引起的肠黏膜及远隔脏器的损伤。

【关键词】 髓样细胞触发受体; LP17; 肠缺血再灌注损伤; 肠黏膜屏障

Effect of LP17 on intestinal ischemia-reperfusion injury of mice Sun Xuotong*, Ji Tao, Zhang Zongbing, Kong Lingshang, Liu Mulin, He Xiandi. * Master of Gastrointestinal Surgery, Bengbu Medical College, Anhui 233030, China

Corresponding author: Liu Mulin, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Anhui 233004, China, Email: liumulin66@aliyun.com

【Abstract】 **Objective** To investigate effect on intestinal ischemia-reperfusion injury of mice injected with LP17. **Methods** 36 mice were divided into three groups randomly ($n = 9$ in each group): Sham operation group (S group), intestinal ischemia-reperfusion group (I/R group), intestinal ischemia-reperfusion + LP17 control peptide group (C1 group), intestinal ischemia-reperfusion + LP17 treatment group (C2 group). Twenty min superior mesenteric artery occlusion in mice produced intestinal ischemia-reperfusion model, 5 min before reperfusion mice by intraperitoneal injection of the drug, 24 h after the mice were sacrificed and serum concentrations of triggering receptor expressed on myeloid cells (sTREM-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were observed mucosal the extent of damage, immune staining of liver cell expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B). **Results** The concentration of serum sTREM-1, the concentration of serum TNF- α and staining integral of the NF- κ B shown on liver cell in I/R group (1 686.34 \pm 55.98) pg/ml, (121.81 \pm 8.01) pg/ml and (3.36 \pm 0.62) and C1 group (1 643.73 \pm 65.45) pg/m, (119.88 \pm 8.05) pg/m, and 3.21 \pm 0.94 were the highest and significantly reduced in the C2 group (944.58 \pm 39.75) pg/ml, (65.92 \pm 4.91) pg/ml, and 0.92 \pm 0.55, compared with I/R group and C1 group, it was statistically significant (all P values $<$ 0.01). The small intestine mucosa of the mice in S group was normal under light microscope. The villi in I/R group and C1 group were damaged seriously, villus necrosis significantly; those in C2 group received less damage and the difference had statically significance (all P values $<$ 0.01). **Conclusions** LP17 can reduce inflammatory response caused by over activation of TNF- α and NF- κ B, and reduce the damage of the intestinal mucosa and the distant organ caused by intestinal ischemia-reperfusion injury through regulating the signaling pathway of TREM-1.

【Key words】 Triggering receptor on myeloid cells; LP17; Intestinal ischemia-reperfusion injury; Intestinal mucosal barrier

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-7041.2014.04.015

基金项目:安徽省教育厅科研资助项目(2006kj103c)

作者单位:233030 安徽省,蚌埠医学院胃肠外科硕士研究生[孙学童(现在安徽省凤阳县人民医院)、季涛(现在江苏省泰兴市人民医院)、孔令尚(现为苏州大学博士研究生)],蚌埠医学院第一附属医院胃肠外科(张宗兵、刘牧林),重症医学科(何先弟)

通信作者:刘牧林,Email: liumulin66@aliyun.com

肠缺血再灌注 (intestinal ischemia-reperfusion, IIR) 损伤是外科常见的组织器官损伤,是严重创伤、休克、感染等发生以及治疗过程中重要的病理生理过程。髓样细胞触发受体-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells, TREM-1) 参与急性炎症反应,是炎症信号通路中的一个关键性的放大器^[1]。LP17 多肽是 TREM-1 的拮抗肽^[2-3]。本实验应用 LP17 多肽研究其能否调节 TREM-1 的炎症信号通路,减轻肠黏膜屏障的损伤,为治疗 IIR 损伤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与设备

1.1.1 实验动物 健康清洁级雄性昆明小鼠(蚌埠医学院动物实验中心提供) 36 只,体质量 18 ~ 22 g。

1.1.2 主要仪器试剂 戊巴比妥钠(武汉金诺化工有限公司),LP17 多肽及 LP17 对照肽(上海生工生物工程有限公司),鼠抗人单克隆核因子- κ B (NF- κ B) 抗体(Sant Cruz 公司, USA),即用型非生物素免疫组化 ElivisionTM plus 免疫组化试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司,产品编号 KIT-9901),DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司,产品编号 DAB-0031),多功能酶标仪(美国 BioTek 公司)。

1.2 动物分组和模型制备

将 36 只健康清洁级昆明雄性小鼠按数字表法随机分为假手术组(S 组)、IIR 组(I/R 组)、IIR + LP17 对照肽治疗组(C1 组)和 IIR + LP17 治疗组(C2 组),每组 9 只。参照文献^[4]制备肠缺血再灌注模型:向小鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥(1 ml/kg)麻醉,仰卧固定操作台上,腹部正中脱毛,碘伏消毒后铺巾,上腹部正中切口进腹(切口长 2 ~ 3 cm)。右上腹找到并分离肠系膜上动脉,其中 S 组仅分离肠系膜上动脉,I/R 组、C1 组和 C2 组用无损伤血管夹于距肠系膜上动脉根部约 0.5 cm 处夹闭,若见肠系膜血管搏动消失且小肠颜色变苍白,提示肠缺血。在夹闭肠系膜上动脉期间,向小鼠腹腔间断注入生理盐水 15 ~ 20 ml/kg,以防止或减轻松开血管夹后出现的一过性低血容量反应。20 min 后将无损伤血管夹松开,若见肠系膜血管搏动恢复,肠管变红,表示 IIR 模型成功,然后关腹。其中 C1 组和 C2 组参照文献^[5]于再灌注前 5 min 分别向腹腔注入 LP17 多肽(3.5 mg/kg, 1 mg 溶于 0.1 ml 生理盐水)、LP17 对照多肽(3.5 mg/kg, 1 mg 溶于 0.1 ml 生理盐水)。各组分别于制模后 24 h 取血后处死动

物留取标本。

1.3 ELISA 检测小鼠血清可溶性 TREM-1 (sTREM-1) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的浓度

以 sTREM-1 为例:sTREM-1 标准溶液配成不同浓度系列,在 450 nm 波长处读取吸光度(OD)值,以 sTREM-1 标准溶液不同浓度值为 X,相对应 OD 值为 Y,求得回归方程 $Y = kX + b$,其中 k 为斜率,b 为 y 坐标轴截距。采取摘眼球方法,采血 2 ~ 3 ml,离心(2 000 r/min, 10 min,离心半径 13.5 cm,)后保存备测。小鼠外周血血清 sTREM-1 测定采用上双抗体夹心 ELISA 法:样品和生物素标记抗体先后加入酶标板孔反应后,PBS 洗涤。随后加入过氧化物酶标记的亲合素反应;经过 PBS 的彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色,在 450 nm 波长处测得 OD 值,小鼠 sTREM-1 与 OD 值呈正比,根据标准曲线求出标本中 sTREM 浓度。

1.4 小肠组织病理学观察

于再灌注 24 h 剖腹取距回盲部约 5 cm 处的小肠组织 5 cm,并将其纵形剖开,生理盐水冲洗后置于 10% 甲醛中固定,石蜡包埋,光镜下观察肠组织的损伤严重程度,进行肠损伤程度评分:0 分,正常,绒毛上皮完整,组织结构正常;1 分,绒毛轻度水肿,上皮脱落仅限于绒毛顶部;2 分,绒毛轻度坏死;3 分,绒毛中度坏死,肠隐窝清晰可见;4 分,绒毛全部坏死,上皮结构完全消失。

1.5 免疫组化检测 NF- κ B

取小鼠肝组织,用 10% 中性甲醛固定液固定,石蜡包埋,连续切片 2 张,厚度为 4 μ m,Elivision 免疫组化步骤:烤片,脱蜡,封闭,抗原修复,加一抗兔抗鼠单克隆 NF- κ B 抗体(1:100 稀释),加增强剂,加二抗酶标羊抗鼠/兔 IgG 复合物,加 DAB 显色剂,复染,脱水,封片。标本染色后以积分法半定量描述,由同一组病理科医生采用双盲法光镜下读片。

阳性结果判定标准为:NF- κ B 以胞质和/或胞核出现棕黄色染色为阳性细胞,按染色强度分为 5 级:0 级阴性染色;1 级弱阳性染色(淡黄色);2 级阳性染色(黄色);3 级中度阳性染色(深黄色);4 级强阳性染色(棕褐色)。每个切片随机取 10 个高倍视野,每个视野观察 100 个细胞,根据 100 个细胞阳性细胞数的不同分等级。按阳性细胞数占总细胞数的比例分为 5 级:0 级阴性;1 级阳性细胞 1% ~ 25%;2 级阳性细胞 26% ~ 50%;3 级阳性细胞 51% ~ 75%;4 级阳性细胞 76% ~ 100%。染色积分 = 染色强度 \times 阳性细胞数占总细胞数的比例。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计学软件包进行数据分析。正态分布计数资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验;病理组织学检验采用秩和检验,双侧检测。以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清 sTREM-1 和 TNF- α 浓度比较

L/R 组和 C1 组的血清 sTREM-1 浓度和血清 TNF- α 浓度均高于 S 组和 C2 组,C2 组亦高于 S 组,差异均有统计学意义(P 值均 < 0.01);而 C1 组略低于 L/R 组,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 4 组小鼠血清髓样细胞触发受体-1 浓度和肿瘤坏死因子- α 浓度比较($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	样本	sTREM-1	TNF- α
S 组	9	135.49 \pm 26.38	5.86 \pm 1.47
L/R 组	9	1 686.34 \pm 55.98 ^{ab}	121.81 \pm 8.01 ^{ab}
C1 组	9	1 643.73 \pm 65.45 ^{ab}	119.88 \pm 8.05 ^{ab}
C2 组	9	944.58 \pm 39.75 ^{ab}	65.92 \pm 4.91 ^{ab}
F 值	—	1 315.262	464.939
P 值	—	0.000	0.000

注:S:假手术;L/R:肠缺血再灌注;C1:肠缺血再灌注 + LP17 对照肽治疗;C2:肠缺血再灌注 + LP17 治疗;与 S 组比较,^a $P < 0.01$;与 C2 组比较,^b $P < 0.01$

2.2 各组小鼠肠组织病理学观察及评分

各组小鼠肠黏膜损伤程度在 HE 染色显微镜下观察比较:S 组小鼠小肠黏膜基本正常;L/R 组和 C1 组绒毛破坏较重,出现明显的绒毛坏死,黏膜下水肿、炎性细胞浸润更加明显,肠壁各层均变薄;C2 组

损伤较轻,可见肠黏膜绒毛顶部上皮脱落,黏膜下水肿,毛细血管扩张、淤血,炎性细胞浸润等。L/R 组肠黏膜损伤程度比 S 组严重,C2 组比 L/R 组及 C1 组减轻,差异均有统计学意义(P 值均 < 0.05);C1 组与 L/R 组比较无明显变化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2 及图 1。

表 2 4 组小鼠肠黏膜损伤评分比较

组别	样本	0 分	1 分	2 分	3 分	4 分
S 组	9	6	3	0	0	0
L/R 组	9	0	0	0	3	6
C1 组	9	0	0	1	2	6
C2 组	9	0	3	3	3	0

注:S:假手术;L/R:肠缺血再灌注;C1:肠缺血再灌注 + LP17 对照肽治疗;C2:肠缺血再灌注 + LP17 治疗;S 组与 L/R 组比较, $H_c = 45.0, P < 0.01$;C1 组与 S 组比较, $H_c = 45.0, P < 0.01$;C2 组与 S 组比较, $H_c = 49.5, P < 0.01$;C1 组与 L/R 组比较, $H_c = 84.0, P = 0.873$;C2 组与 L/R 组比较, $H_c = 49.5, P < 0.01$;C2 组与 C1 组比较, $H_c = 55.5, P < 0.05$

2.3 各组小鼠肝组织 NF- κ B 免疫组化及染色积分

S 组小鼠肝细胞 NF- κ B 表达呈阴性或弱阳性,且弱阳性表达的细胞数占总细胞的比例低;L/R 组及 C1 组小鼠肝细胞 NF- κ B 表达呈中度阳性或强阳性,且阳性细胞质和细胞核都含有棕黄色颗粒,部分以细胞核为主;C2 组小鼠肝细胞 NF- κ B 表达的强度和阳性细胞数降低,L/R 组和 C1 组的小鼠肝脏组织 NF- κ B 免疫组化染色积分均高于 S 组和 C2 组,C2 组亦高于 S 组,差异均有统计学意义(P 值均 < 0.01);C1 组与 L/R 组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3 及图 2。

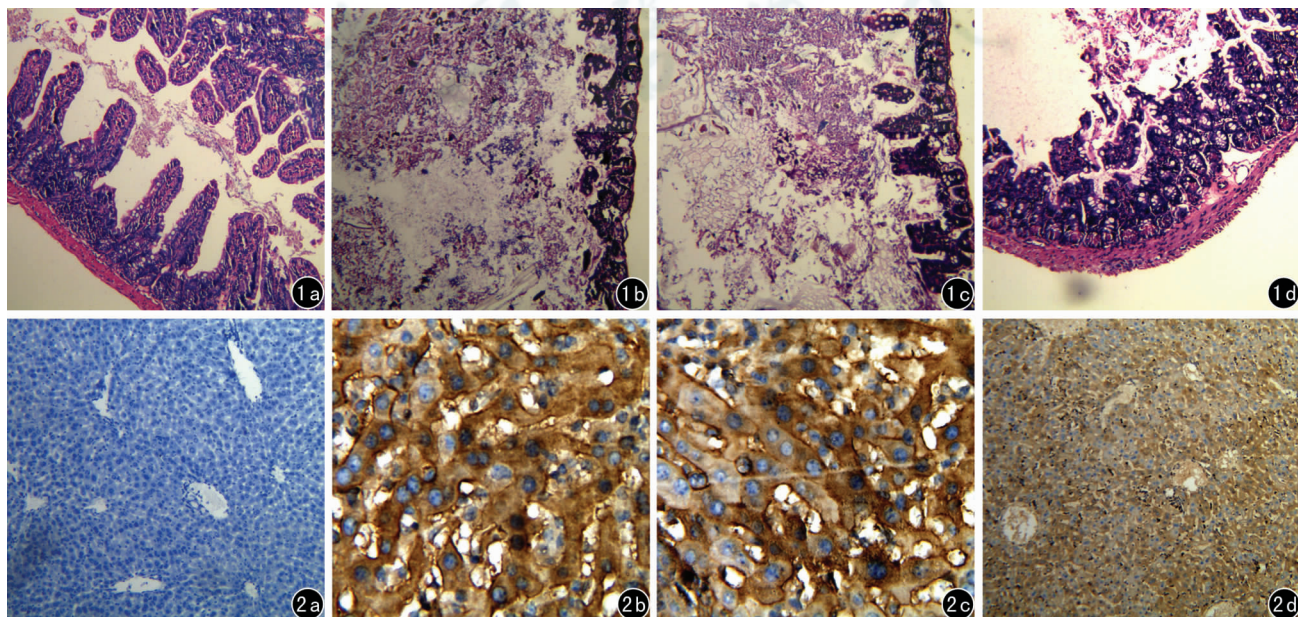


图 1 各组小鼠肠组织镜下结构病理变化(HE $\times 100$) 图 2 各组小鼠肝组织核因子- κ B 的表达(免疫组化 $\times 400$) 2a 假手术组 2b 肠缺血再灌注组 2c 肠缺血再灌注 + LP17 对照肽治疗组 2d 肠缺血再灌注治疗组

表 3 4 组小鼠肝脏组织核因子- κ B 免疫组化染色积分比较($\bar{x} \pm s$, 分)

组别	例数	染色积分	F 值	P 值
S 组	9	0.05 \pm 0.08		
I/R 组	9	3.36 \pm 0.62 ^{ab}		
C1 组	9	3.21 \pm 0.94 ^{ab}	62.63	<0.01
C2 组	9	0.92 \pm 0.55 ^a		

注:S:假手术;I/R:肠缺血再灌注;C1:I/R + LP17 对照肽治疗;C2:I/R + LP17 治疗;与 S 组比较,^a $P < 0.01$;与 C2 组比较,^b $P < 0.01$

3 讨论

TREM 是一种表达于髓样细胞的与 DAP12 相关性的免疫球蛋白超家族跨膜受体^[6]。TREM-1 通过其跨膜区的带正电荷的赖氨酸残基与接头蛋白 DAP12 跨膜区的带负电荷的天冬氨酸相偶联,并且通过 DAP12 胞浆区的免疫受体酪氨酸活化基序来传递活化信号^[6-7]。TREM-1 和 Toll 类受体(Toll-like receptors, TLRs)信号通路有协同促进炎症反应的作用,TREM-1 的激活可增强、放大 TLRs(主要是 TLR2、4)介导的炎症反应,可以导致 NF- κ B 转录复合物的激活,引起致炎基因转录^[8-9],引起 TNF- α 、IL-1 β 、GM-CSF 分泌增加,同时抑制 IL-10 的分泌^[10-11]。上述炎症信号通路的激活最终可以引起炎症反应的增强放大,从而导致过度炎症反应。

sTREM-1 是 Gibot 等^[11]于脓毒症大鼠的外周血中发现的,它很可能与 TREM-1 基因转录有关。Gibot 等^[3,5]合成了一种多肽 LP17,它是 TREM-1 的拮抗肽,与 TREM-1 的胞外区结构相似,可以竞争 TREM-1 未知的天然配体;LP17 可以减少 LPS 刺激下体外培养的单核细胞分泌的 TNF- α 、IL-1 β 量,并且具有剂量依赖性。本实验显示:(1) LP17 治疗小鼠 IIR 损伤后,小鼠肝组织免疫组化显示 NF- κ B 的表达强度较 I/R 组明显减弱,且 NF- κ B 阳性表达的肝细胞数亦明显减少($P < 0.05$),表明 LP17 治疗后,NF- κ B 的强度及活性下降,降低炎性因子的表达,减轻肠道和肝组织的炎性反应。(2) LP17 治疗后小鼠血清中的 TNF- α 和 sTREM-1 的浓度较缺血再灌注组小鼠相比显示明显减轻($P < 0.05$)。表明 LP17 可能与 TREM-1 的胞外区结合,抑制 TREM-1 与 TLRs 信号通路的协同促进炎症反应的作用,减轻、削弱了 TLRs 介导的炎症反应,抑制 TNF- α 的分泌,减弱炎症信号的转导。(3) LP17 治疗后,镜下显示小鼠小肠组织的损伤程度较 I/R 组明显减轻。可

能是 LP17 通过对 TREM-1 的旁路调节,减轻了肠缺血再灌注所致肠黏膜损害。LP17 通过调节 TREM-1 的信号转导通路,减轻 NF- κ B 和 TNF- α 过度激活所致炎症反应,减轻 IIR 引起的肠黏膜及远处脏器的损伤。因此,调控 TREM-1 可能成为治疗 IIR 损伤的一个潜在靶点。

参 考 文 献

- [1] Oku R, Oda S, Nakada TA, et al. Differential pattern of cell-surface and soluble TREM-1 between sepsis and SIRS [J]. Cytokine, 2013, 61(1): 112-117.
- [2] Horst SA, Linnér A, Beineke A, et al. Prognostic value and therapeutic potential of TREM-1 in *Streptococcus pyogenes*-induced sepsis [J]. Innate Immun, 2013, 5(6): 581-590.
- [3] Molloy EJ. Triggering receptor expressed on myeloid cells (TREM) family and application of its antagonists [J]. Recent Pat Antiinfect Drug Discov, 2009, 4(1): 51-56.
- [4] Shen ZY, Zhang J, Song HL, et al. Bone-marrow mesenchymal stem cells reduce rat intestinal ischemia-reperfusion injury, ZO-1 downregulation and tight junction disruption via a TNF- α -regulated mechanism [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(23): 3583-3595.
- [5] Gibot S, Massin F, Alauzet C, et al. Effect of the TREM-1 pathway modulation during mesenteric-ischemia-reperfusion in rat [J]. Crit Care Med, 2008, 36(2): 504-510.
- [6] Tian XF, Yao JH, Zhang XS, et al. Protective effect of carnosol on lung injury induced by intestinal ischemia reperfusion [J]. Surg Today, 2010, 40(9): 858-865.
- [7] Arts RJ, Joosten LA, van der Meer JW, et al. TREM-1: intracellular signaling pathways and interaction with pattern recognition receptors [J]. J Leukoc Biol, 2013, 93(2): 209-215.
- [8] Hosoda H, Tamura H, Kida S, et al. Transcriptional regulation of mouse TREM-1 gene in RAW264.7 macrophage-like cells [J]. Life Sci, 2011, 89(3-4): 115-122.
- [9] Zeng H, Ornatowska M, Joo MS, et al. TREM-1 expression in macrophages is regulated at transcriptional level by NF- κ B and PU.1 [J]. Eur J Immunol, 2007, 37(8): 2300-2308.
- [10] Arts RJ, Joosten LA, Dinarello CA, et al. TREM-1 interaction with the LPS/TLR4 receptor complex [J]. Eur Cytokine Netw, 2011, 22(1): 11-14.
- [11] Gibot S, Cravoisy A, Kolopp-Sarda MN, et al. Time-course of sTREM (soluble triggering receptor expressed on myeloid cells)-1, procalcitonin, and C-reactive protein plasma concentrations during sepsis [J]. Crit Care Med, 2005, 33(4): 792-796.

(收稿日期:2013-12-05)

(本文编辑:张萍)