DOI:10.16016/j.2097-0927.202309077

复合因素急性应激诱导肠道屏障功能障碍及其作用机制研究

林启运,侯鹏飞,郎和东,张 钧,陈 卡,易 龙,糜漫天 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系军队营养与食品安全研究中心,重庆市医学营养研究中心,重庆市营养与健康重点实验室

[摘要] **目的** 研究复合因素急性应激对肠道屏障功能的影响,并探索相关作用机制。**方法** 20只7~8周龄的雄性C57BL/6小鼠(体质量20~22 g),用随机数表法分为对照(CON)组和模型(MOD)组,$n=10$。MOD组小鼠于24 h内先后给予4 h休息、15 h的睡眠剥夺、3 h的噪音(120 dB)/闪光(2 000±500 lx)和2 h的强迫游泳运动(水温26±1 ℃、水深45 cm),建立复合因素急性应激模型;CON组小鼠置于恒温恒湿、正常昼夜节律的无噪音环境中不做任何处理。MOD组小鼠强迫游泳运动结束后,将小鼠麻醉采血,颈椎脱臼处死并取材。通过免疫酶联吸附实验试剂盒检测血清肠损伤标志物,HE染色法检测结肠组织形态变化,PAS染色检测肠道杯状细胞数目,免疫荧光、免疫组化和RT-qPCR法检测结肠组织屏障功能和炎症因子相关蛋白及基因表达,16S rRNA技术分析小鼠肠道菌群变化。**结果** 与CON组比较,MOD组小鼠血清肠道损伤标志物脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS)、肠脂肪酸结合蛋白(Intestinal fatty acid binding protein,I-FABP)、连蛋白(Zonulin)明显升高($P<0.05$);HE染色显示MOD组小鼠肠道组织损伤明显;免疫荧光染色和RT-qPCR结果显示机械屏障相关分子紧密连接蛋白-1(Zona occludens 1,ZO-1)、闭合蛋白(Occludin)表达显著降低($P<0.05$),免疫组化和PAS染色提示化学屏障相关杯状细胞数目及黏蛋白2(mucin2,Muc-2)、抗菌肽再生胰岛衍生蛋白3γ(regenerating islet derived-3γ,Reg3γ)、再生胰岛衍生蛋白3β(regenerating islet derived-3β,Reg3β)显著降低($P<0.05$);肠道菌群β多样性显著改变,有害菌拟杆菌门、脱硫弧菌门显著增加,有益菌瘤胃球菌科、丹毒丝菌(*norank_f_Erysipelotrichaceae*)属、孪生球菌(*Gemella*)属、丹毒丝菌(*Erysipelotrichaceae*)属显著减少($P<0.05$);炎症相关肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor,TNF-α)、白细胞介素6(interleukin-6,IL-6)以及活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平均显著增加($P<0.05$)。**结论** 复合因素急性应激显著诱导小鼠肠道损伤和肠屏障功能障碍。

[关键词] 复合因素;急性应激;肠道屏障;机械屏障;化学屏障;微生物屏障
[中图法分类号] R339.5;R363;R574 [文献标志码] A

Effect and mechanism of acute stress induced by composite factors on intestinal barrier dysfunction

LIN Qiyun, HOU Pengfei, LANG Hedong, ZHANG Jun, CHEN Ka, YI Long, MI Mantian Research Center for Nutrition and Food Safety, Chongqing Key Laboratory of Nutrition and Health, Institute of Military Preventive Medicine, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To identify the effect of acute stress induced by composite factors on intestinal barrier dysfunction and explore the relevant mechanism. **Methods** Twenty male C57BL/6 mice (7-8 weeks old, body mass 20-22 g) were randomly divided into control group (CON group, $n=10$) and model group (MOD group, $n=10$). To establish an acute stress model of complex factors, the mice of the MOD group were given rest of 4 h, sleep deprivation of 15 h, and then followed by 3 h of noise (120 dB)/flash (2 000±500 lx) and 2 h of forced swimming (water temperature 26±1 ℃, water depth 45 cm) within 24 h. While the

[通信作者] 糜漫天,E-mail:mantian_mi@tmmu.edu.cn
易 龙,E-mail:amu_yilong@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

mice in the CON group were placed in a noiseless environment with constant temperature and humidity and normal circadian rhythm but been given no any treatment. At the end of forced swimming, the mice from the MOD group were anesthetized for blood samples and then euthanized. Serum markers of intestinal injury were detected by immunoenzyme-linked adsorption assay kit, morphological changes in colonic tissues were observed by HE staining, protein and mRNA levels of colonic tissue barrier function related molecules and inflammatory factors were detected by immunofluorescence, immunohistochemistry and RT-qPCR, and intestinal flora changes were analyzed by 16S rRNA technique. **Results** Compared with the CON group, the serum markers of intestinal damage, lipopolysaccharide (LPS), intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) and Zonulin were significantly increased in the MOD group ($P<0.05$). HE staining showed that intestinal tissue damage was obvious in the MOD group. The results of immunofluorescence staining and RT-qPCR showed that the levels of mechanical barrier related molecules Zona occludens 1 (ZO-1) and Occludin were obviously decreased ($P<0.05$). Immunohistochemistry and PAS staining indicated the number of chemical barriers associated goblet cells, and expression of mucin2 (Muc-2), antimicrobial peptide regenerating islet derived-3γ (Reg3γ) and regenerating islet derived-3β (Reg3β) were notably reduced ($P<0.05$). Intestinal flora β diversity significantly changed, with harmful bacteria *Bacteroidetes* and *Desulfovibrio* significantly increased, while beneficial bacteria *Rumenococcus* family, *norank_f_Erysipelotrichaceae*, *Gemella genus* and *Erysipelotrichaceae genus* declined ($P<0.05$). The levels of TNF-α, IL-6 and ROS were significantly enhanced ($P<0.05$). **Conclusion** Acute stress of complex factors significantly induces intestinal injury and barrier dysfunction.

[**Key words**] composite factors; acute stress; intestinal barrier dysfunction; mechanical barrier; chemical barrier; microbial barrier

Corresponding author: MI Mantian, E-mail: mantian_mi@tmmu.edu.cn; YI Long, E-mail: amu_yilong@tmmu.edu.cn

随着科学技术的发展,未来战争中的战场环境日趋复杂[1]。高性能、高毁伤性武器装备广泛使用、连续多昼夜行军训练与作战、长途奔袭等训练和作战样式可能作为复杂的应激源对官兵健康和战斗力产生巨大影响。军事应激是军人应对恶劣军事环境时的紧张状态,是一种突然或逐渐发生在战斗人员身上的生理及心理反应[2]。军事应激被认为是影响军队战斗力的重要因素,其主要特征包括应激源强度大、应激人群规模大、应激反应形式多样以及应激损伤处理原则特殊等[3]。研究表明,军事应激致机体心理、生理及病理性损伤所导致的战场认知错误、武器操控失能以及战斗精神疾病等是造成部队非战斗减员和潜在战斗力降低的主要原因之一[4]。

肠道是军事应激损伤的敏感靶器官之一。研究表明,多种应激反应均会加剧肠道损伤的发生[5]。流行病学调查结果显示:我军一线官兵的消化系统疾病发病率处于高位,空军、海军、陆军的消化系统疾病发病率分别高达34.08%,26.62%和45.60%[6-8]。肠道功能异常,尤其是屏障功能障碍与各种疾病发生密切相关,如炎症性肠病[9]、糖尿病[10]等自身免疫性疾病以及自闭症[11]、阿尔茨海默病[12]等神经系统疾病。其次,“肠-脑”[13]“肠-肌”[14]轴对肠道屏障功能的维持在脑功能和运动耐力等军事作业能力调节中至关重要[15]。肠道屏障主要由机械屏障、化学屏障、微生物屏障和免疫屏障构成。机械屏障主要由上皮细胞及细胞间连接组成,化学屏障主要由消化液、消化酶、分泌性蛋白等组成,免疫屏障主要由免疫活性细胞及肠道相关淋巴样组织等组成,微生物屏障主要由肠腔内常驻的微生物群组成。越来越多的证据支持肠道屏障功能障碍与多种疾病之间的病因学联系,成为疾病加重、加速发展的直接因素。目前,靶向肠道屏障功能稳态维持已成为诊断和治疗多种疾病的热门理论之一,因此研究军事应激对肠道屏障功能的影响可为我军一线军事作业人员的健康维护以及综合保障方案的制定提供理论依据。

本研究结合睡眠剥夺、大强度游泳运动、噪声/闪光等常见应激因素,建立复合因素急性应激模型,研究其对机体肠道屏障功能的损伤作用及机制,为进一步制定复杂军事应激条件下军事训练综合保障方案提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

7~8周龄SPF级雄性C57BL/6小鼠20只,体质量为20~22 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许

可证号 SCXK(湘)2019-0004]。所有动物研究方案经过大学动物福利伦理审查委员会批准。按随机数字表法随机分为对照(CON)组和模型(MOD)组,每组 10 只。

复合因素急性应激动物模型构建:将 20∶00 定义为 ZT0(授时时间,Zeitgeber time)。CON 组小鼠置于恒温恒湿、正常昼夜节律的无噪音环境中不做处理。MOD 组小鼠 ZT0-ZT4 时置于与 CON 组同等环境中不做处理。ZT4-ZT19 时将 MOD 组置于大小鼠睡眠剥夺仪中进行睡眠剥夺干预,ZT19-ZT22 时将实验小鼠置于光触媒模拟箱中进行 3 h 噪声/闪光干扰,ZT22-ZT24 时将 MOD 组置于水中进行无负重强迫游泳运动 2 h[16]。

睡眠剥夺应激因素设置条件根据定义设置为 24 h 内睡眠时间少于 4 h[17];噪声/闪光应激源的应激强度设置为噪声强度 120 dB[18]、闪光强度为(2 000±500)lx[19];大强度游泳运动强度根据本研究团队前期研究基础和相关实验条件设置(水温 26±1 ℃、水深 45 cm)[20-21]。实验开始和结束时测量体质量和摄食量。实验结束时将小鼠麻醉后行眼球采血,颈椎脱臼处死,取适当长度结肠组织置于 4%多聚甲醛固定,将盲肠内容物、剩余结肠组织液氮淬灭后置于-80 ℃环境保存。实验设计如图 1 所示。

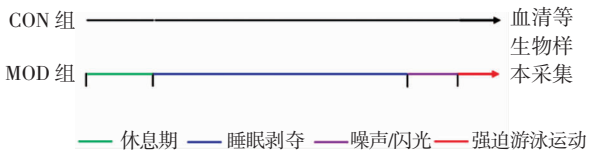


图 1 实验设计流程图

1.2 实验试剂和仪器

大小鼠睡眠剥夺仪(型号:SA108)购自江苏赛昂斯生物科技有限公司;光触媒模拟箱系本教研室自主研发设备(ZL 2011202104789、ZL 2011202110703);肠脂肪酸结合蛋白(intestinal fatty acid binding protein,IFABP)ELISA 试剂盒(货号:ml037857)、脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)ELISA 试剂盒(货号:ml002005)、连蛋白(Zonulin)ELISA 试剂盒(货号:ml225277)均购自上海酶联公司;PrimeScript™ RT Master Mix(货号:RR036A)、TB Green® Premix *Ex Taq*™ Ⅱ试剂(货号:RR820A)购自日本 TaKaRa 公司;HE 染液套装(货号:G1003)、紧密连接蛋白-1(Zona occludens 1,ZO-1)(1∶1 000)、闭合蛋白(Occludin)(1∶200)免疫荧光一抗(货号:GB111981、GB111401)、黏蛋白 2(Mucin2、Muc-2)免疫组化一抗(1∶1 000,货号:GB11344)、HRP 山羊抗兔二抗(1∶200,货号:G1213-100UL)均购自武汉赛维尔科技公司。ROS 染液(货号:D7008)购自美国 Sigma Aldrich 公司。

1.3 血清肠道损伤标志物检测

采血后将其置于室温下 2 h,4 ℃、825×*g* 离心 15 min,分离血清,按照试剂盒说明检测 LPS、IFABP 和 Zonulin 的血清浓度,进行统计学分析。

1.4 组织形态学检测

小鼠眼眶取血后,颈椎脱臼处死,取结肠近端组织 2 cm,4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μm 切片。分别进行 HE 染色、PAS 染色、免疫组化和免疫荧光染色。

1.5 RT-qPCR 实验法检测基因表达水平

采用 TRIzol 法提取总 RNA,利用 Nanodrop2000 超微量分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司)检测各组样本核酸浓度。用 TaKaRa 反转录酶试剂盒,反转录合成 cDNA。按照 TB Green Master Mix 说明书配制反应溶液,PCR 反应体系为 20 μL,采用 PCR 仪(QuantStudio 3 Real-time PCR System, Thermo Fisher Scientific 公司)完成反应,测定基因 mRNA 的表达水平。以 GAPDH 作为内参基因,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析基因的相对表达量。相关引物序列见表 1,其中包括抗菌肽再生胰岛衍生蛋白 3γ(regenerating islet derived-3γ,Reg3γ)、再生胰岛衍生蛋白 3β(regenerating islet derived-3β,Reg3β)。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5′→3′)
GAPDH	正义:GGTTGTCTCCTGCGACTTCA 反义:TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC
ZO-1	正义:AACCCGAAACTGATGCTGTGGATAG 反义:CGCCCTTGGAATGTATGTGGAGAG
Occludin	正义:TTGGCTACGGAGGTGGCTATGG 反义:CCTTTGGCTGCTCTTGGGTCTG
Reg3g	正义:AACAGAGGTGGATGGGAGTGGAG 反义:TGCCTGAGGAAGAGGAAGGATTCG
Reg3b	正义:TGGAGGTGGATGGGAATGGAGTAAC 反义:CAGAAAGCACGGTCTAAGGCAGTAG
IL-6	正义:CTTCTTGGGACTGATGCTGGTGAC 反义:GTATCTCTCTGAAGGACTCTGGCTTTG
IL-10	正义:ACATACTGCTAACCGACTCCTTAATGC 反义:AAATCACTCTTCACCTGCTCCACTG
TNF-α	正义: AGCCGATGGGTTGTACCT 反义:TGAGTTGGTCCCCCTTCT

1.6 肠道菌群 16S rRNA 基因高通量测序

根据 PF Mag-Bind Stool DNA Kit(Omega Bio-tek,Georgia,U.S.)说明书对盲肠内容物进行微生物群落总基因组 DNA 抽提,使用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组 DNA 的完整性,使用 NanoDrop2000 测定 DNA 浓度和纯度。

以上述提取的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,每个

样本3个重复。回收PCR产物,并进行产物纯化,并用Quantus™ Fluorometer(Promega,USA)对回收产物进行检测定量。

使用NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit(Bioo Scientific,Austin,Texas,USA)对纯化后的PCR产物进行建库。利用Illumina公司的PE300/PE250平台进行测序(上海美吉生物医药科技有限公司)。基于Sliva 16s rRNA基因数据库(v138),使用Qiime2中的Naive bayes(或Vsearch、或Blast)分类器对ASVs进行物种分类学分析。

1.7 统计学分析

本研究检测小鼠的体质量、摄食量、血清肠道屏障损伤标志物含量、相关蛋白的平均荧光强度和平均光密度以及肠上皮杯状细胞数目等计量资料,实验数据以$\bar{x}\pm s$表示。数据采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计作图和分析,免疫荧光强度采用Image J软件进行统计分析,免疫组化平均光密度采用image-pro-plus软件进行统计分析和计算。数据符合正态分布时两组间比较采用独立样本t检验(student's t test),数据不符合正态分布时两组间比较采用非参数检验(non-parametric test),肠道内容物16S rRNA测序的稀释曲线、α-多样性指数、β-多样性指数、组间物种差异性比较结果系上海美吉生物医药科技有限公司云平台计算,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 复合因素急性应激对小鼠体质量和摄食量无显著影响

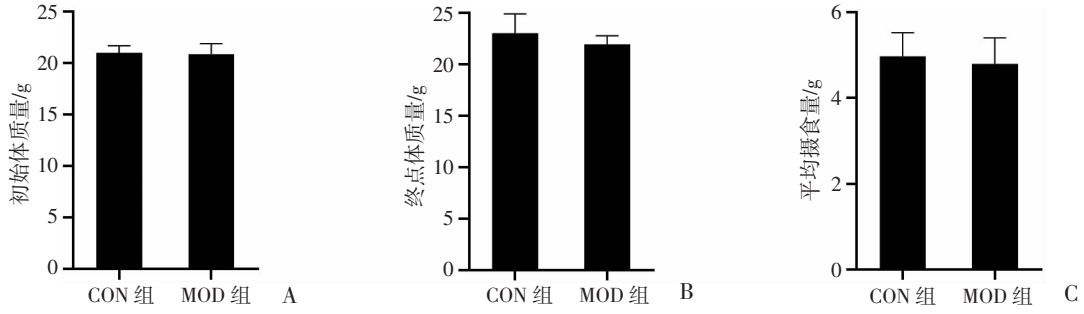
复合因素急性应激干预后,2组小鼠的初始体质量、终点体质量以及平均摄食量变化差异均无统计学意义($P>0.05$,图2),表明复合因素急性应激对小鼠的体质量和摄食量没有显著影响。

2.2 复合因素急性应激增加血清中肠屏障功能障碍标志物含量

ELISA实验检测各组小鼠血清中肠道屏障功能损伤标志物水平,结果显示:与CON组比较,MOD组小鼠血清中LPS、IFABP和zonulin血清含量均显著升高($P<0.01$,图3),表明复合因素急性应激可导致小鼠肠道损伤。

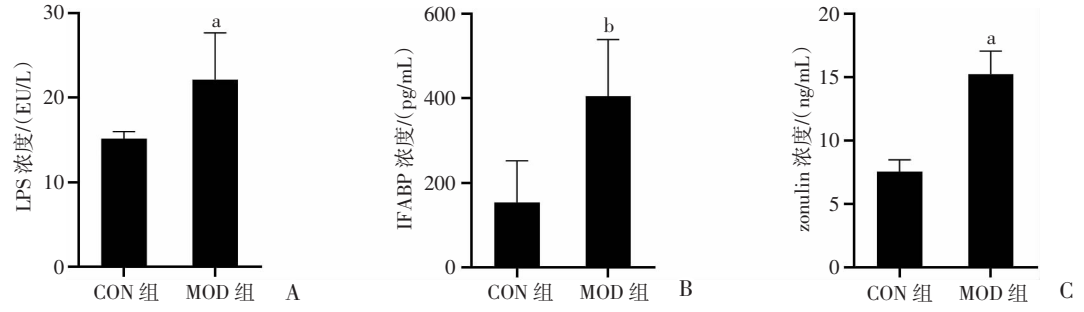
2.3 复合因素急性应激诱导结肠组织结构损伤

HE染色结果显示(图4):较之CON组,MOD组小鼠结肠组织形态改变明显,绒毛上皮与固有层出现增宽的Gruenhagen's间隙,固有层毛细血管扩张、充血明显。高倍镜下可见MOD组肠道组织炎性细胞浸润,结果提示,复合因素急性应激可致小鼠结肠组织发生明显的形态学改变,肠道损伤显著。



A:初始体质量;B:终点体质量;C:平均摄食量

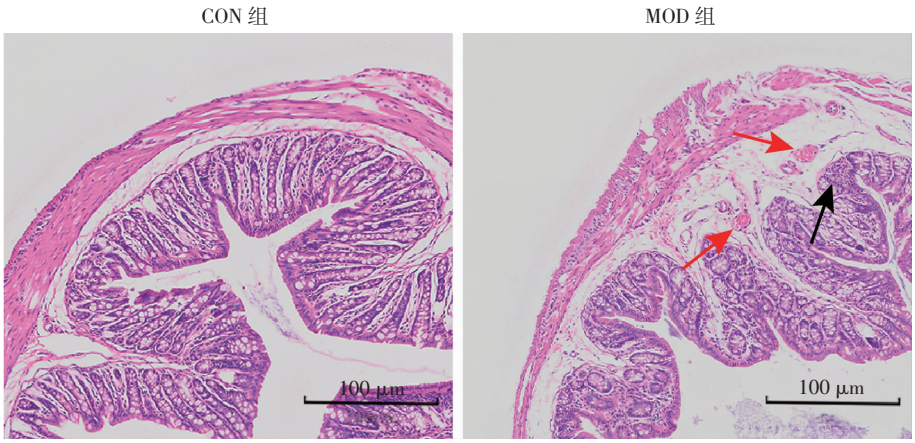
图2 复合因素急性应激对小鼠体质量和平均摄食量的影响($n=10,\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.01$,与CON组比较;b:$P<0.001$,与CON组比较

A:小鼠血清肠损伤标志物LPS浓度; B:小鼠血清肠损伤标志物IFABP浓度;C:小鼠血清肠损伤标志物zonulin浓度

图3 复合因素急性应激对小鼠肠屏障损伤标志物的影响($n=10,\bar{x}\pm s$)

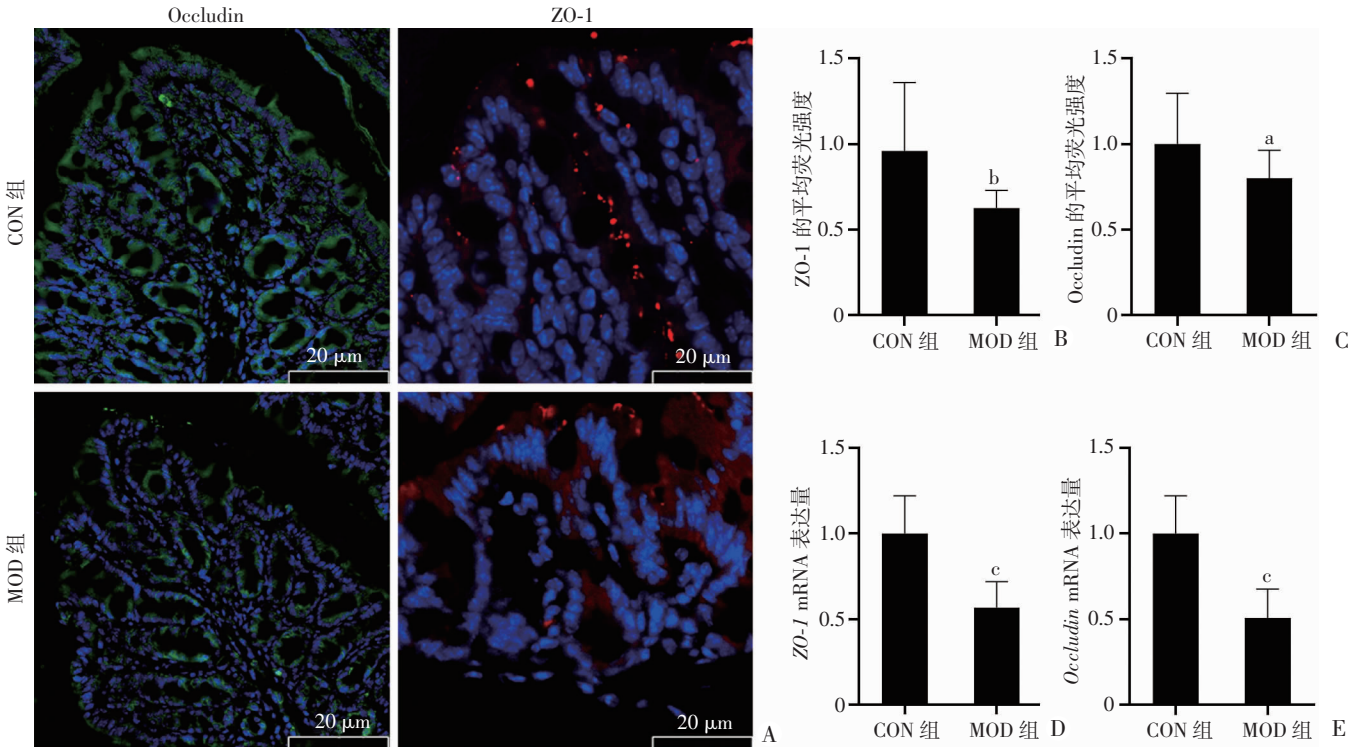


红色箭头:示固有层内毛细血管充血扩张;黑色箭头:示炎性细胞浸润

图 4 HE 染色观察复合因素急性应激对小鼠结肠组织结构的影响

2.4 复合因素急性应激降低肠道机械屏障相关紧密连接蛋白 mRNA 和蛋白表达

组织免疫荧光化学染色检测 ZO-1、Occludin 的蛋白表达水平结果显示:较之 CON 组,MOD 组小鼠结肠组织的 ZO-1 和 Occludin 的相对平均荧光强度明显降低(图 5A ~ C,$P<0.05$)。RT-qPCR 实验结果显示 MOD 组小鼠相较于 CON 组肠上皮紧密连接蛋白 *ZO-1*、*Occludin* 的 mRNA 相对表达量明显减少($P<0.001$,图 5D、E)。表明复合因素急性应激降低肠道上皮紧密连接蛋白的表达,损伤小鼠肠道机械屏障功能。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,c:$P<0.001$,与 CON 组比较

A:结肠组织免疫荧光染色 蓝色为 DAPI,绿色为 Occludin,红色为 ZO-1;B:ZO-1 蛋白相对平均荧光强度;C:Occludin 蛋白相对平均荧光强度;D:结肠组织 *ZO-1* mRNA 相对表达量;E:结肠组织 *Occludin* mRNA 相对表达量

图 5 复合因素急性应激对小鼠肠道紧密连接蛋白表达的影响($n=10$,$\bar{x}\pm s$)

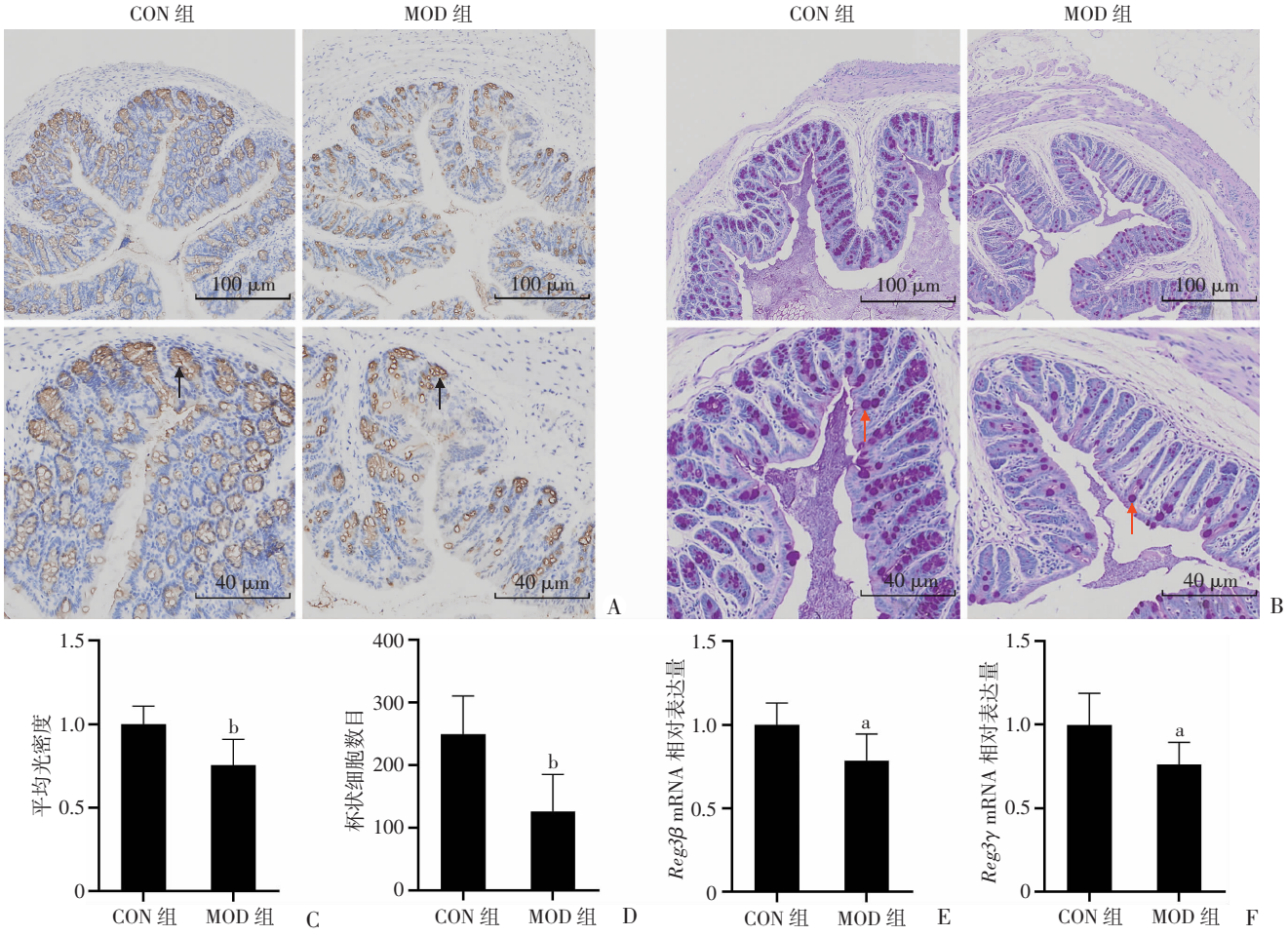
2.5 复合因素急性应激减少肠道化学屏障功能分子表达及杯状细胞数目

免疫组化染色结果显示:较之 CON 组,MOD 组小鼠结肠组织黏蛋白 Muc2 表达明显降低,差异具有统计学意义($P<0.01$,图 6A、C)。利用 PAS 染色检测各组小鼠结肠组织中杯状细胞数目,发现 MOD 组小鼠结肠上皮 PAS 染色阳性的杯状细胞数量明显少于 CON 组($P<0.01$,图 6B、D)。MOD 组抗菌肽 *Reg3β* 和 *Reg3γ* 的 mRNA 表达明显降低($P<0.05$,图 6E、F)。提示复合因素急性应激可诱导小鼠肠道化学屏障功能损伤。

2.6 复合因素急性应激诱导肠道菌群紊乱

本研究采用 16S rRNA 菌群多样性分析技术探究复合因素急性应激对小鼠肠道生物屏障功能的影响,结果显示:稀释曲线(rarefaction curve)达到平台期,测序深度覆盖多数微生物。ACE、Chao1、Sobs、Shannon 等 α-多样性指数无显著变化,但 β-多样性指数分析中 PCoA(principal co-ordinates analysis)分析发现两组样本明显分离,说明两组样本间的肠道微生物 β 多样性具有显著差异($R=0.47$,$P<0.01$,图 7A~F)。

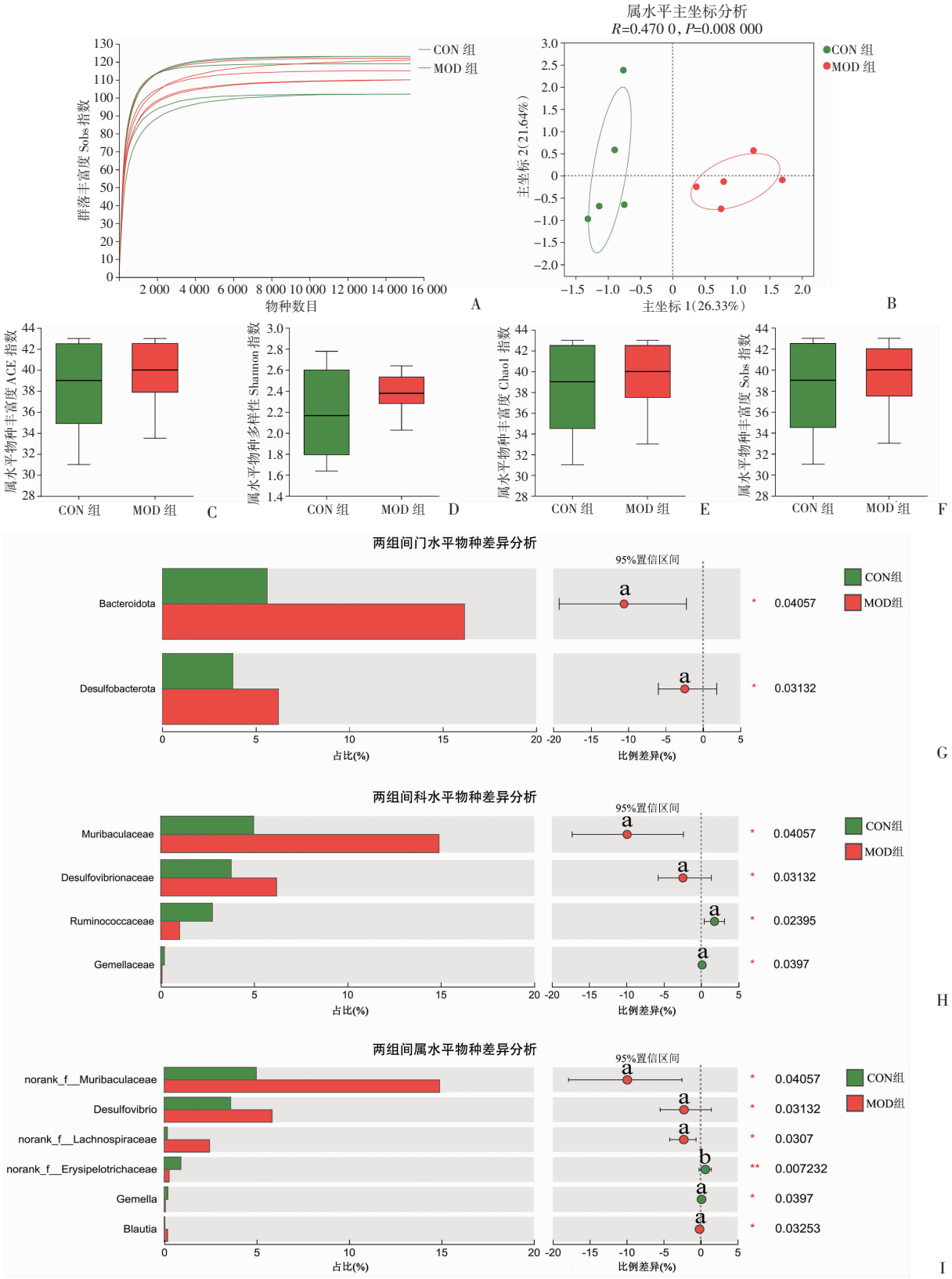
进一步分析各组间肠道菌群组成的差异性,发现在门水平上,MOD 组小鼠的脱硫杆菌门(*Desulfobacterota*)和拟杆菌门(*Bacteroidota*)较 CON 组小鼠显著升高,有统计学意义($P<0.05$)。在科水平上,MOD 组小鼠 *Muribaculaceae* 菌科、脱硫弧菌科(*Desulfovibrionaceae*)都较 CON 组小鼠明显升高,瘤胃球菌科(*Ruminococcaceae*)和孪生球菌科(*Gemellaceae*)较 CON 组小鼠的明显降低($P<0.05$)。在属水平上,MOD 组小鼠的 *norank_f_Muribaculaceae* 菌属、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、*norank_f_Lachnospiraceae* 菌属、经黏液真杆菌属(*Blautia*)较 CON 组小鼠明显升高,而丹毒丝菌属(*norank_f_Erysipelotrichaceae*)和孪生球菌属(*Gemella*)则明显减低($P<0.05$,图 7G~I)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 CON 组比较;黑色箭头示 Muc2 阳性表达,红色箭头示杯状细胞

A:结肠组织免疫组化染色;B:结肠组织 PAS 染色;C:Muc2 阳性区域光密度;D:杯状细胞数目;E:*Reg3β* mRNA 相对表达量;F:*Reg3γ* mRNA 相对表达量

图 6 复合因素急性应激对小鼠肠道组织 Muc2 蛋白表达和杯状细胞数目的影响($n=10$,$\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.05$; b:$P<0.01$

A:稀释曲线　随着测序数量增加 Sobs 指数不再增加,表明测序涵盖大多数微生物;B:两组间 PCoA 分析;C:两组间 ACE 指数比较;D:两组间 Shannon 指数比较;E:两组间 Chao1 指数比较;F:两组间 Sobs 指数比较;G:两组间门水平物种差异分析;H:两组间科水平物种差异分析;I:两组间属水平物种差异分析

图 7　复合因素急性应激对小鼠肠道微生物菌群的影响($n=5$,$\bar{x}\pm s$)

2.7 复合因素急性应激增加肠道组织的 ROS 水平和炎症因子的表达

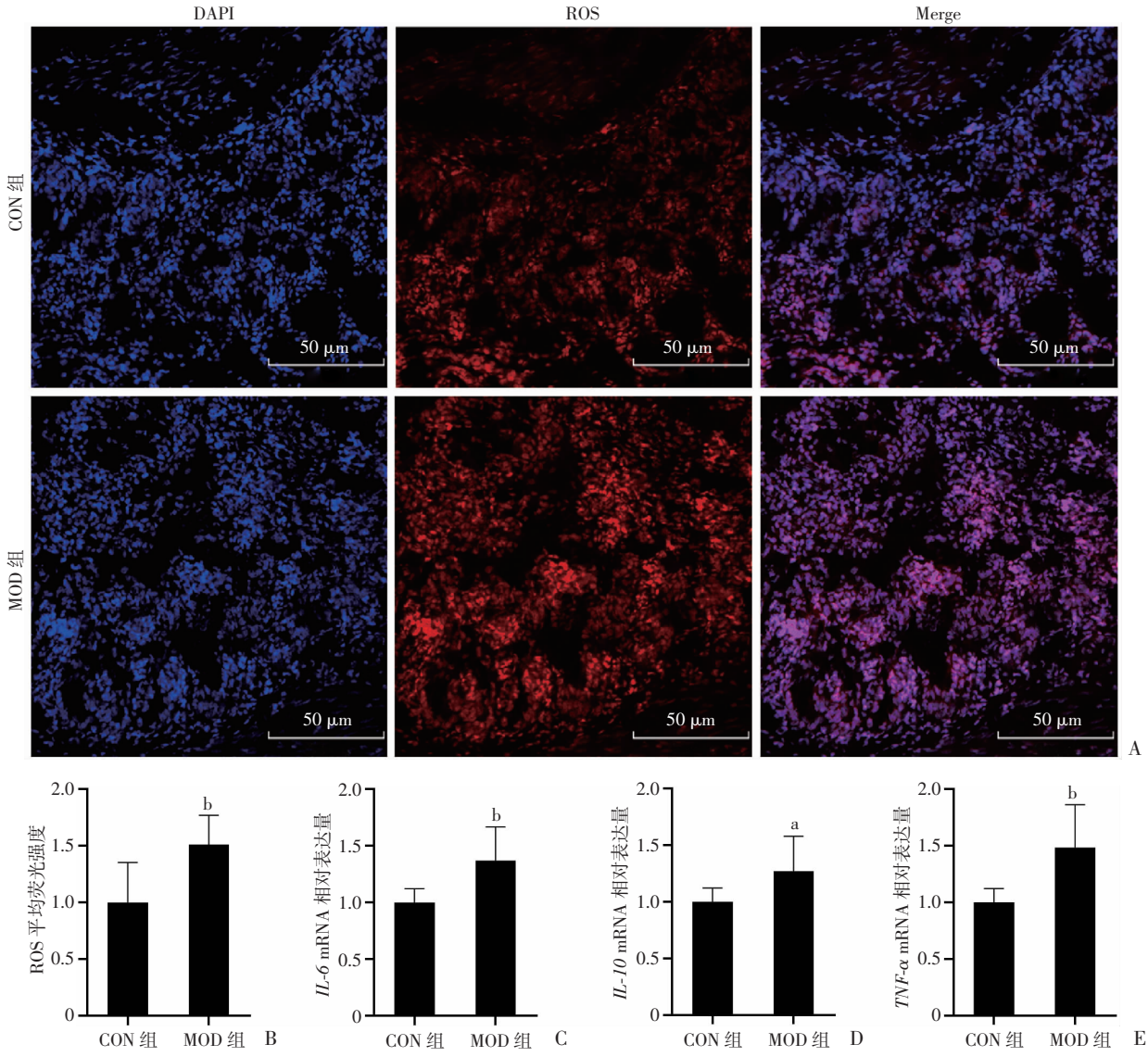
免疫荧光染色实验和 RT-qPCR 结果提示:MOD 组小鼠肠道组织的 ROS 染色实验中平均荧光强度较 CON 组明显升高($P<0.01$,图 8A、B)。MOD 组小鼠肠道组织中促炎因子 *TNF-α*、*IL-6* 和抗炎因子 *IL-10* 的 mRNA 水平显著升高($P<0.05$,图 8C~E)。表明复合因素急性应激诱导的肠道氧化应激和过度的炎症反应可能是其致肠屏障功能损伤的重要机制。

3 讨论

随着当代科学技术的迅猛发展,战争形态加速向信息化智能化转变,作战样式、战场环境、武器装备发生显著改变,军事作业人员身处复杂应激环境执行任务已成为常态,然而多种复杂军事应激源对军事作业人员的健康和作战效能产生显著影响[22-23]。而肠道功能的稳态维持与人体健康、代谢调节、营养物质吸收等功能密切相关,因此本研究明确了复合因素急性应激对机体肠道这一敏感而重要的靶器官的损伤效应,旨在模拟战场环境对机体的影响,为下一步卫勤保障方案的制定提供理论依据和实验基础。

3.1 复合因素急性应激影响肠道的机械屏障和化学屏障功能可能增加肠道通透性并降低抗感染能力

本研究通过睡眠剥夺、噪音/闪光、大强度游泳运



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 CON 组比较

A:ROS 免疫荧光染色;B:ROS 平均荧光强度;C:*IL-6* 的 mRNA 相对表达量;D:*IL-10* 的 mRNA 相对表达量;E:*TNF-α* 的 mRNA 相对表达量

图 8 复合因素急性应激对小鼠肠道组织氧化应激和炎症因子表达的影响($n=10$,$\bar{x}\pm s$)

动模拟战场军事复合应激因素,构建复合因素急性应激动物模型,研究复合因素急性应激对肠道屏障功能的作用。对比肠道缺血再灌注损伤和 LPS 感染小鼠等多种生理应激或病理模型中的肠道组织损伤[24-25],我们发现,本模型组小鼠结肠组织结构改变明显,血清损伤标志物水平显著升高,损伤效应显著。肠道是人体重要的消化器官,同时参与机体"神经-内分泌-免疫"调节网络,因此对应激源十分敏感。紧密连接广泛存在于肠上皮细胞间连接的最顶端,主要由 Occludin、claudin、ZO 蛋白等组成。而肿瘤坏死因子可以降低肠道上皮的紧密连接蛋白表达[26],进而影响肠道的机械屏障功能[27]。复合因素急性应激可以诱导紧密连接蛋白表达降低,同时增加血清 LPS 的水平,提示复合因素急性应激可以损伤肠道的机械屏障功能,增加肠道通透性和机体内毒素血症的可能。化学屏障主要由消化液、消化酶、分泌性蛋白等组成,包括 Muc2 黏蛋白、抗菌肽等 30 种核心蛋白,杯状细胞则是主要的黏液分泌细胞[28]。有研究表明 Muc2 缺陷型小鼠会自发性产生结肠炎[29]。我们的实验结果:复合因素急性应激减少小鼠肠道的 Muc2 分泌、肠道杯状细胞数目以及抗菌肽的 mRNA 表达,提示复合因素急性应激对化学屏障功能有显著影响。根据大量研究发现,肠道机械屏障和化学屏障异常与多种疾病之间的病因学联系,会导致机体抗病能力下降、对病原微生物的易感性增强,成为疾病加重、加速发展的直接因素[30]。因此目前靶向肠道屏障功能稳态维持已成为诊断和治疗多种疾病和机体多器官稳态的热门理论。

3.2 复合因素急性应激影响肠道微生物屏障功能可能进而介导机体多种生物学功能异常

生物屏障主要由定植在肠道组织表面的多种微生物组成,其稳态维持对于机体健康的维系尤为重要。本研究发现,复合因素急性应激模型小鼠相较于正常小鼠有益菌减少,而有害菌增加,说明复合因素急性应激损害小鼠的肠道生物屏障功能。在门水平上,拟杆菌门(*Bacteroidota*)和脱硫菌门(*Desulfobacterota*)较正常小鼠明显增加。在科水平上,瘤胃球菌科(*Ruminococcaceae*)和孪生球菌科(*Gemellaceae*)较正常小鼠的明显降低,脱硫弧菌科(*Desulfovibrionaceae*)则明显升高。在属水平上,模型小鼠的脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、*norank_f_Muribaculaceae* 菌属、经黏液真杆菌属(*Blautia*)较正常小鼠明显升高,而丹毒丝菌属(*norank_f_Erysipelotrichaceae*)和孪生球菌属(*Gemella*)则明显减低。脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)作为一种潜在的机会致病菌可能是促进人体内毒素血症发生的关键菌[31],严重损伤状态下机会致病菌可跨过肠道上皮屏障进入血液引起明显的菌血症,这与之前的血清肠道损伤标志物 LPS 升高趋势保持一致。丹毒丝菌(*norank_f_Erysipelotrichaceae*)作为一种益生菌可以显著缓解 DSS 诱导的小鼠结肠炎[32],而在最新人群研究中孪生球菌属(*Gemella*)、丹毒丝菌属(*Erysipelotrichaceae*)可通过代谢膳食纤维产生丁酸盐等短链脂肪酸[33],对机体健康维护、代谢调节、损伤防护发挥关键作用。研究报道 *Muribaculaceae* 菌属和人体焦虑及抑郁样行为呈正相关性[34],本研究中复合因素急性应激显著增加 *Muribaculaceae* 菌属,其可能是军事应激诱导焦虑和抑郁样表现的关键物质基础。

本研究通过复合多种因素模拟军事作业环境中的应激源,构建复合因素急性应激小鼠动物模型。利用分子生物学、16s rRNA 测序等实验方法研究发现,复合因素急性应激可致小鼠肠道机械、化学、生物屏障功能降低,其机制可能与过度炎症反应和氧化应激水平增加密切相关,为进一步研究军事作业人员在复杂地域、环境下的综合保障方案制定提供了动物模型。

参考文献:

[1] 孙波, 韩玮, 李明贤, 等. 战时卫勤保障单兵急救包的研制[J]. 实用医药杂志, 2017, 34(11): 1054-1055. DOI: 10.14172/j.issn1671-4008.2017.11.037.
SUN B, HAN W, LI M X, *et al*. Development of individual soldier first aid kit for wartime medical service support [J]. Pract J Med Pharm, 2017, 34(11): 1054-1055. DOI:10.14172/j.issn1671-4008.2017.11.037.

[2] 夏锋, 冯正直. 军事应激研究进展与类战争心身应激模型建立的思考[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(24): 2335-2340. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201710096.
XIA F, FENG Z Z. Progress of military stress and thinking on establishment of a model of combat-like psychosomatic stress [J]. J Third Mil Med Univ, 2017, 39(24): 2335-2340. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201710096.

[3] 钱令嘉. 关于应激与认知的思考[J]. 军事医学, 2011, 35(9)658-662. DOI: 10.3969/j.issn.1674-9960.2011.09.006.
QIAN L J. Reflections on stress and cognition[J]. Mil Med Sci, 2011, 35(9)658-662. DOI: 10.3969/j.issn.1674-9960.2011.09.006.

[4] GIBBONS S W, HICKLING E J, WATTS D D. Combat stressors and post-traumatic stress in deployed military healthcare professionals: an integrative review[J]. J Adv Nurs, 2012, 68(1): 3-21. DOI: 10.1111/j.1365-2648.2011.05708.x.

[5] 王静怡, 杨婧仪, 付波, 等. 2022 年度美军军事作业医学研究进展[J]. 军事医学, 2023, 47(2): 81-86. DOI: 10.7644/j.issn.1674-9960.2023.02.001.
WANG J Y, YANG J Y, FU B, *et al*. Research progress in military operational medicine in U. S. Armed Forces in 2022 [J]. Mil Med Sci, 2023, 47(2): 81-86. DOI: 10.7644/j.issn.1674-9960.2023.02.001.

[6] 王子恺, 崔立红, 彭丽华, 等. 海军某部官兵功能性胃肠病各部位重叠的流行病学研究[J]. 解放军医学杂志, 2013, 38(6)450-452.
WANG Z K, CUI L H, PENG L H, *et al*. Epidemiological study of overlapping of involved organs in functional gastrointestinal disorders in the Chinese naval servicemen[J]. Med J Chin People's Liberation Army, 2013, 38(6)450-452.

[7] 姚欣, 王倩, 孙蓉, 等. 陆军某部官兵功能性胃肠病患病情况及其与心理因素的关系[J]. 解放军医药杂志, 2016, 28(12): 24-28. DOI: 10.3969/j.issn.2095-140X.2016.12.006.
YAO X, WANG Q, SUN R, *et al*. Prevalence of functional gastrointestinal disorders and its relationship with psychological factors in officers and soldiers in one troop of PLA army[J]. Med Pharm J Chin PLA ,2016, 28(12): 24-28. DOI: 10.3969/j.issn.2095-140X.2016.12.006.

[8] 谢莎丽, 季一鑫, 王剑, 等. 2009—2013 年空军官兵疾病特征分析[J]. 军事医学, 2017, 41(5): 385-389. DOI: 10.7644/j.issn.1674-9960.2017.05.013.
XIE S L, JI Y X, WANG J, *et al*. Disease characteristics of a group of military men in Chinese PLA Air Force between 2009 and 2013[J]. Mil Med Sci, 2017, 41(5): 385-389.. DOI: 10.7644/j.issn.1674-9960.2017.05.013.

[9] MEHANDRU S, COLOMBEL J F. The intestinal barrier, an arbitrator turned provocateur in IBD [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(2): 83-84. DOI: 10.1038/s41575-020-00399-w.

[10] RIEDEL S, PHEIFFER C, JOHNSON R, *et al*. Intestinal barrier function and immune homeostasis are missing links in obesity and type 2 diabetes development [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12: 833544. DOI: 10.3389/fendo.2021.833544. DOI: 10.3389/fendo.2021.833544.

[11] 王姣姣, 张瑞光, 董晓荣. 肠道菌群与大脑功能相互联系的研究进展[J]. 中华神经医学杂志, 2018, 17(12): 1281-1286. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2018.12.017.
WANG J J, ZHANG R G, DONG X R. Recent advance in interaction between intestinal flora and brain function[J]. Chin J Neuromed, 2018, 17(12): 1281-1286. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2018.12.017.

[12] KESIKA P, SUGANTHY N, SIVAMARUTHI B S, *et al*. Role of gut-brain axis, gut microbial composition, and probiotic intervention in Alzheimer's disease[J]. Life Sci, 2021, 264: 118627. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118627.

[13] RUTSCH A, KANTSJÖ J B, RONCHI F. The gut-brain axis: how microbiota and host inflammasome influence brain physiology and pathology[J]. Front Immunol, 2020, 11: 604179. DOI: 10.3389/fimmu.2020.604179.

[14] OKAMOTO T, MORINO K, UGI S, *et al*. Microbiome potentiates endurance exercise through intestinal acetate production[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2019, 316(5): E956-E966. DOI: 10.1152/ajpendo.00510.2018.

[15] 史益凡, 王新颖. 肠道菌群对骨骼肌的影响及 SCFAs 介导"肠-肌轴"的机制研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(9): 849-854. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2021.09.01.
SHI Y F, WANG X Y. Research progress in the effect of gut microbiome on skeletal muscle and mechanism of SCFAs mediated "gut-muscle axis"[J]. Med J Chin PLA, 2021, 46(9): 849-854. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2021.09.01.

[16] SUN Y, LIANG C, ZHENG L H, *et al*. Anti-fatigue effect of hypericin in a chronic forced exercise mouse model[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 284: 114767. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114767.

[17] 郑蕴鑫, 陈小异, 杜雪, 等. 睡眠剥夺对执行功能的影响及其机制[J]. 中国健康心理学杂志, 2022, 30(10): 1575-1582. DOI: 10.13342/j.cnki.cjhp.2022.10.027.
ZHENG Y X, CHEN X Y, DU X, *et al*. Effect of sleep deprivation on executive function and its mechanism[J]. China J Health Psychol, 2022, 30(10): 1575-1582. DOI: 10.13342/j.cnki.cjhp.2022.10.027.

[18] 王顶, 柳柯, 张悦, 等. 120dB 白噪声对 C57BL/6J 小鼠听力损失的观察研究[J]. 中华耳科学杂志, 2017, 15(2): 217-221. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2922.2017.02.015.
WANG D, LIU K, ZHANG Y, *et al*. Effects of high level white noise exposure on hearing function in C57BL/6J mice [J]. Chin J Otol, 2017, 15(2): 217-221. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2922.2017.02.015.

[19] 姜文静, 张丽娜, 于晓, 等. 内质网应激对光照诱导的人视网膜色素上皮细胞损伤的促进作用[J]. 中华实验眼科杂志, 2017, 35(9): 816-823. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.010.
JIANG W J, ZHANG L N, YU X, *et al*. Mediated effects of endoplasmic reticulum stress on light-induced apoptosis and inflammation of human retinal pigment epithelial cell[J].

Chin J Exp Ophthalmol, 2017, 35(9): 816-823. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.09.010.

[20] ZHENG L, HOU P F, JING J J, *et al*. Pterostilbene attenuates high-intensity swimming exercise-induced glucose absorption dysfunction associated with the inhibition of NLRP3 inflammasome-induced IECs pyroptosis [J]. Nutrients, 2023, 15(9): 2036. DOI: 10.3390/nu15092036.

[21] YANG J N, GUO X X, LI T Y, *et al*. Sulforaphane inhibits exhaustive exercise-induced liver injury and transcriptome-based mechanism analysis[J]. Nutrients, 2023, 15(14): 3220. DOI: 10.3390/nu15143220.

[22] 蒋春雷. 应激医学的发展现状与趋势[J]. 军事医学, 2023, 47(09): 641-645. DOI: 10.7644/j.issn.1674-9960.2023.09.001.
JIANG C L. Stress medicine: current situation and prospect [J]. Mil Med Sci, 2023, 47(09): 641-645. DOI: 10.7644/j.issn.1674 - 9960.2023.09.001.

[23] 胡浩磊, 邢培梅, 张鹏臻, 等. 军事噪声性听力损失研究进展[J]. 中华耳科学杂志, 2021, 19(2): 311-315. DOI: 10.3969/j.issn.1672-2922.2021.02.025.
HU H L, XING P M, ZHANG P Z, *et al*. Advances in research on military noise-induced hearing loss[J]. Chin J Otol, 2021, 19(2): 311-315.

[24] LIU Z, JIANG J, YANG Q, *et al*. MicroRNA-682-mediated downregulation of PTEN in intestinal epithelial cells ameliorates intestinal ischemia-reperfusion injury[J]. Cell Death Dis, 2016, 7(4): e2210. DOI: 10.1038/cddis.2016.84.

[25] CHEN L, ZHONG X L, CAO W Y, *et al*. JQ1 as a BRD4 inhibitor blocks inflammatory pyroptosis-related acute colon injury induced by LPS[J]. Front Immunol, 2021, 12: 609319. DOI: 10.3389/fimmu.2021.609319.

[26] MARCHIANDO A M, SHEN L, GRAHAM W V, *et al*. Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation *in vivo*[J]. J Cell Biol, 2010, 189(1): 111-126. DOI: 10.1083/jcb.200902153.

[27] MD, TORY A, MEYER, *et al*. Sepsis and endotoxemia stimulate intestinal interleukin-6 production[J]. Surgery, 1995, 118(2): 336-342. DOI: 10.1016/S0039-6060(05)80342-3.

[28] JI J, QU H, SHU D M. Crosstalk between bioactive peptide and intestinal barrier in gut homeostasis[J]. Curr Protein Pept Sci, 2015, 16(7): 604-612. DOI: 10.2174/1389203716666150630134804.

[29] VAN DER SLUIS M, DE KONING B A, DE BRUIJN A C, *et al*. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC_2 is critical for colonic protection[J]. Gastroenterology, 2006, 131(1): 117-129. DOI: 10.1053/j.gastro.2006.04.020.

[30] TURNER J R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(11): 799-809. DOI: 10.1038/nri2653.

[31] GOLDSTEIN E J, CITRON D M, PERAINO V A, *et al*. *Desulfovibrio desulfuricans* bacteremia and review of human *Desulfovibrio* infections[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(6): 2752-2754. DOI: 10.1128/JCM.41.6.2752-2754.2003.

[32] LI S J, ZHUGE A X, WANG K C, *et al*. Ketogenic diet aggravates colitis, impairs intestinal barrier and alters gut microbiota and metabolism in DSS-induced mice[J]. Food Funct, 2021, 12(20): 10210-10225. DOI: 10.1039/d1fo02288a.

[33] MAO J Z, WANG D X, LONG J Y, *et al*. Gut microbiome is associated with the clinical response to anti-PD-1 based immunotherapy in hepatobiliary cancers[J]. J Immunother Cancer, 2021, 9(12): e003334. DOI: 10.1136/jitc-2021-003334.

[34] LIU X E, TENG T, LI X M, *et al*. Impact of inosine on chronic unpredictable mild stress-induced depressive and anxiety-like behaviors with the alteration of gut microbiota [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 697640. DOI: 10.3389/fcimb.2021.697640.

(**收稿**:2023-09-19;**修回**:2023-10-21)

(编辑 栾 嘉)