论著

文章编号:1000-5404(2008)15-1434-04

严重烧伤后肠黏膜肌球蛋白轻链磷酸化表达改变及其意义

陈传莉[1],刘依凌[1],王 裴[1],孙 玮[2],王凤君[1] (第三军医大学:西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,[2]基础医学部中心实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨肌球蛋白轻链(myosin light chain,MLC)磷酸化在严重烧伤早期对肠黏膜屏障功能及细胞紧密连接相关蛋白变化的作用。方法 健康成年 SD 大鼠 48 只,采用随机数字表法分为正常对照组及烧伤后 1、2、6、12、24 h 组,用异硫氰酸荧光素-葡聚糖(FITC-Dextran)检测大鼠肠黏膜通透性,免疫荧光法检测肠黏膜细胞紧密连接相关蛋白 ZO-1、F-肌动蛋白(F-actin)及磷酸化型 MLC(phosphorylated MLC,p-MLC)的变化。结果 烧伤后大鼠肠黏膜通透性明显增加,伤后 6 h 达高峰,为对照组的 3 倍($P<0.01$) 烧伤后肠上皮通透性的增加伴随有紧密连接相关蛋白 ZO-1 的明显重分布、细胞紧密连接损害以及肠上皮细胞 p-MLC 表达的增加。结论 MLC 磷酸化可能在严重烧伤后肠黏膜屏障功能紊乱及通透性增加的发生机制中起着重要的调控作用。

关键词:烧伤;肠黏膜;通透性;肌球蛋白轻链磷酸化;ZO-1
中图法分类号:R322.45;R329.25;R644.02 文献标识码:A

Role of MLC phosphorylation in intestinal epithelial barrier dysfunction induced by severe burn injury

CHEN Chuan-li[1], LI Yi-ling[1], WANG Pei[1], SUN Wei[2], WANG Feng-jun[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, [2]Central Laboratory, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To determine the role of myosin light chain (MLC) phosphorylation in intestinal epithelial barrier dysfunction induced by severe burn injury. Methods Forty-eight healthy adult Sprague Dawley rats were randomly divided into control group, 1, 2, 6, 12 and 24 h postburn groups. The intestinal permeability of all rats was measured by fluorescein-isothiocyanate-dextran (FITC-D). The changes of tight junction associated protein ZO-1, F-actin and phosphorylated MLC (PMLC) in intestinal epithelia of the rats were analyzed by immunofluorescence. Results The intestinal permeability of the rats increased significantly after burn injury, and peaked at 6 h 3 times higher than the control rats. The increased intestinal permeability was accompanied by the striking reorganization of the tight junction associated protein ZO-1, the damage of the tight junction and the significant increase of PMLC in rats with burned intestinal epithelia. Conclusion MLC phosphorylation might play a very important role in the regulation of intestinal epithelial barrier dysfunction after severe burn injury.

Key words: burn; intestinal mucosa; permeability; MLC phosphorylation; ZO-1

严重烧伤后肠道组织明显受损,屏障功能紊乱,通透性增加,从而引发或加重一系列病理生理变化。黏膜通透性的改变与细胞骨架重组,紧密连接结构变化有着密切关系,但迄今为止,对烧伤后肠黏膜屏障功能紊乱及通透性增加的发生机制仍未完全明了。最近有研究表明[1-3],上皮细胞收缩性改变是不同原因引起其通透性增加的共同通路,主要受骨架蛋白中肌球蛋白和肌动蛋白的影响,并依赖于肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC)的磷酸化。MLC 磷酸化引起的细胞紧密连接相关蛋白 ZO-1 改变在炎症介质或内毒素所致的肠上皮屏障功能紊乱中起着重要作用。因此,我们推测烧伤后肠黏膜屏障功能紊乱可能也与肠上皮细胞 MLC 磷酸化有关。本课题旨在研究严重烧伤早期肠黏膜屏障功能及细胞紧密连接相关蛋白 ZO-1 的变化,并探讨 MLC 磷酸化在其中的作用,以进一步阐明烧伤后肠黏膜屏障功能紊乱的发生机制。

基金项目:国家自然科学基金(30571923);重庆市自然科学基金(2005BB5045)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30571923) and the Natural Science Foundation of Chongqing(2005BB5045)
作者简介:陈传莉,女,广西省南宁市人,硕士研究生,主治医师,主要从事严重烧伤后肠上皮屏障功能紊乱机制方面的研究。电话:(023)68754148-8062
通信作者:王凤君,电话:(023)68754176,E-mail:wangfj@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2007-09-07;修回日期:2008-01-30

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　动物来源　　健康成年 SD 大鼠 48 只，雌雄不拘，体质量（180 ± 20）g，由本校大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.1.2　主要试剂及仪器　　异硫氰酸荧光素-葡聚糖（FITC-Dextran，相对分子质量为 4.4×10^3）及 DAPI 购自 Sigma 公司，兔抗 ZO-1 抗体为 Zymed Laboratories 公司产品，兔抗磷酸化型肌球蛋白轻链（phosphorylated MLC，p-MLC）抗体由芝加哥大学 Turner 教授惠赠，Alexa Fluor 594 Phalloidin、Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG 及 Slow Fade Antifade 试剂盒购自 Molecular Probes 公司；F-3010 型荧光分光光度计为 Hitachi 公司产品，TCS SPS 型激光共聚焦显微镜为 Leica 公司产品。

1.2　方法

1.2.1　动物分组与烧伤模型建立　　实验前大鼠禁食 12 h，自由饮水。采用随机数字表法，将 48 只大鼠分为正常对照组（伤前）及伤后 1、2、6、12、24 h 组，每组 8 只。按 30 mg/kg 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠麻醉大鼠后，背部剪毛，并用 8% 硫化钠脱毛。除对照组外，其余大鼠背部均被涂以 3% 凝固汽油，燃烧 20 s，造成 30% Ⅲ度体表烧伤。

1.2.2　肠黏膜通透性的检测　　参照文献[4,5]方法并略加改进，实验结束活杀大鼠前，开腹将距回盲瓣 5 cm 的末段回肠两端 10 cm 结扎，向该段肠腔注入 FITC-Dextran 溶液（用 0.1 mmol/L PBS、pH 7.2 配制成 20 mg/ml）0.5 ml。操作过程中需注意勿损伤肠系膜血管，并防止 FITC-Dextran 液体泄漏。30 min 后立即取门静脉血 1 ml，3 000 × g 离心 10 min，分离血浆。取血浆 100 μl，加入 0.9 ml PBS，荧光分光光度计测定其荧光强度，激发光波长为 480 nm，发射光波长为 520 nm。以门静脉血 FITC-Dextran 的荧光强度表示肠黏膜通透性。

1.2.3　免疫荧光法检测肠黏膜组织 ZO-1、F-肌动蛋白（F-actin）及 p-MLC 表达　　取大鼠回肠段并制作冰冻组织切片，1% 多聚甲醛固定 30 min，PBS 漂洗 5 min × 3 次后，1% Triton-X 100 室温孵育 5 min，PBS 漂洗 5 min × 3 次，用 5% 正常羊血清封闭 30 min，与一抗（p-MLC 抗体为 1∶200，ZO-1 抗体为 1∶200）于 4 ℃ 孵育过夜。PBS 漂洗 5 min × 3 次，滴加二抗（Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔 IgG 为 1∶100），同时用 Alexa Fluor 594 Phalloidin（1∶40）标记 F-actin，DAPI（1∶1 000）标记细胞核，室温避光孵育 1 h，PBS 漂洗 5 min × 3 次。在切片上滴加适量的 Slow Fade 液，封片，激光共聚焦显微镜下观察照相。

1.3　统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，利用 SPSS 13.0 统计软件对严重烧伤早期肠黏膜通透性动态变化行单因素方差分析。

2　结果

2.1　严重烧伤早期肠黏膜通透性动态变化

采用荧光标记探针 FITC-Dextran 检测 30% Ⅲ度体表烧伤大鼠伤后肠黏膜通透性的动态变化，结果显示，与对照组比较，伤后 1 h 大鼠肠黏膜通透性即开始明显增加[分别为（15.37 ± 10.98）、（27.28 ± 20.82），$P < 0.05$]，并于伤后 6 h 达高峰（51.12 ± 23.10），约为伤前值的 3 倍（$P < 0.01$）。随后虽有所下降，但直到伤后 24 h（33.41 ± 15.04）仍显著高于伤前（$P < 0.05$）。这一结果提示，严重烧伤早期肠黏膜通透性明显增加。

2.2　严重烧伤早期肠黏膜上皮细胞紧密连接相关蛋白 ZO-1 分布的变化

采用免疫荧光技术研究严重烧伤后大鼠肠黏膜上皮细胞紧密连接相关蛋白 ZO-1 的变化。对照组 ZO-1 主要分布在细胞与细胞之间的连接处，在细胞质中有少量表达。然而，烧伤后 6 h 大鼠肠黏膜上皮细胞与细胞之间的 ZO-1 明显减少，甚至消失，而细胞质中 ZO-1 分布则明显增加。该结果提示：严重烧伤早期肠黏膜通透性增加伴随有肠上皮细胞紧密连接相关蛋白 ZO-1 重分布现象的发生（图 1）。

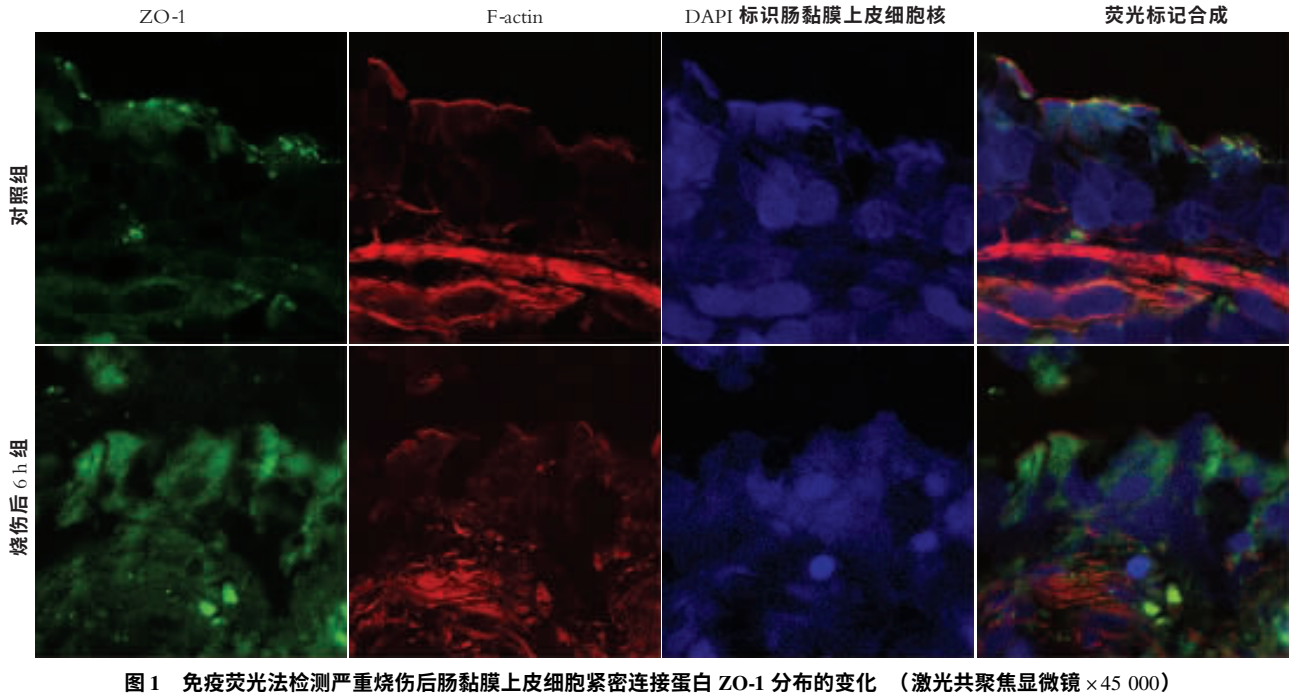


图 1　免疫荧光法检测严重烧伤后肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白 ZO-1 分布的变化　（激光共聚焦显微镜 ×45 000）

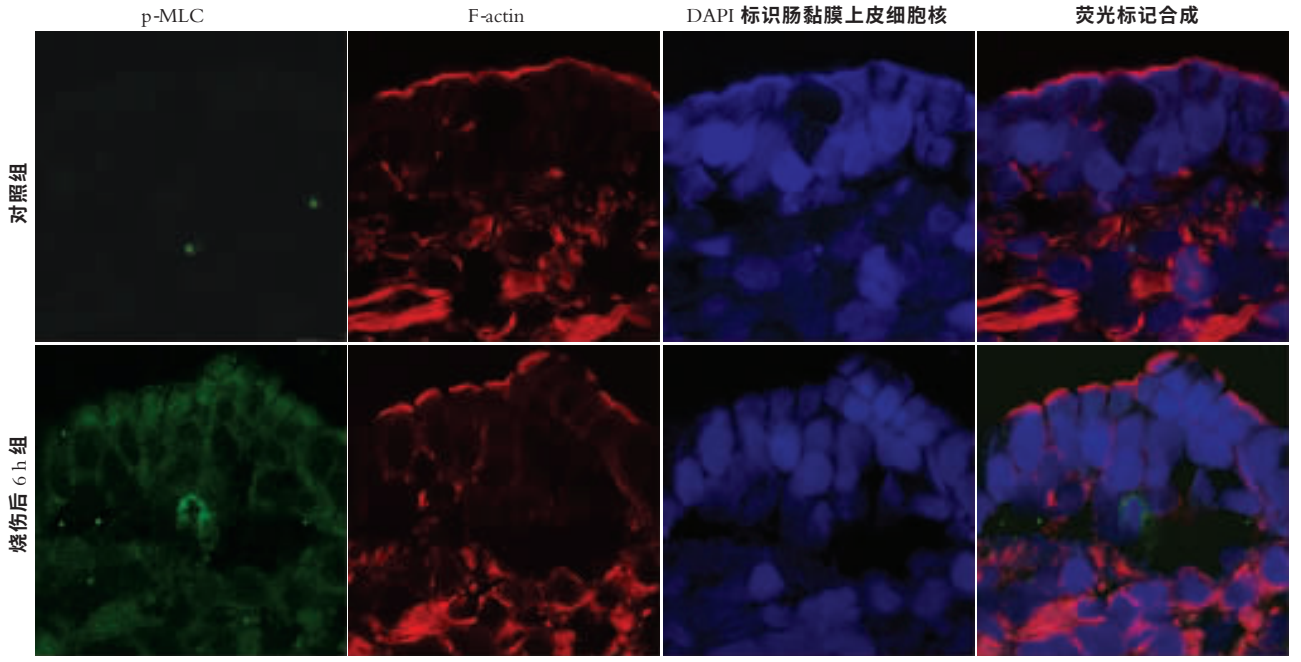


图2 免疫荧光法检测严重烧伤后肠黏膜上皮细胞 p-MLC 增加 （激光共聚焦显微镜 ×45 000）

2.3 严重烧伤早期肠黏膜上皮细胞 F-actin 的表达变化

采用特异性的 Phalloidin 对 F-actin 进行荧光标记，并用激光共聚焦显微镜检测了严重烧伤大鼠肠黏膜上皮细胞 F-actin 的变化。对照组 F-actin 主要沿细胞膜分布，并在细胞与细胞之间互相连接形成束状，在细胞质中偶有分布。烧伤 6 h 后，F-actin仍主要沿细胞膜分布，但细胞与细胞连接处出现断裂，且在细胞质中分布增加（图 1，2）。提示严重烧伤后肠黏膜上皮细胞紧密连接受到损害。

2.4 严重烧伤早期肠黏膜上皮细胞 p-MLC 的表达变化

采用免疫荧光技术检测了严重烧伤大鼠肠黏膜上皮细胞 p-MLC 的表达变化情况。对照组大鼠肠黏膜上皮细胞几乎不能检测到 p-MLC 表达，烧伤后 6 h 大鼠肠黏膜上皮细胞 p-MLC 表达明显增加，主要分布在细胞质（图 2）。提示严重烧伤后肠黏膜上皮细胞 MLC 磷酸化程度增加。

3 讨论

肠道是外科应激的中心器官之一，在严重烧伤、创伤、休克等病理状态下，由于严重的缺血缺氧性损害，肠道黏膜受损，黏膜通透性增加，屏障功能降低，肠腔内细菌和/或毒素等移位至其他器官，引发肠源性感染或全身失控性炎症反应综合征，甚至发生多器官功能衰竭。肠黏膜通透性是反映肠黏膜屏障功能的重要指标，指相对分子质量大于 150 的大分子物质渗透肠黏膜的能力，正常情况下这些大分子物质不能通过或者只有极少量可以通过肠黏膜屏障进入血液循环。本研究所用的荧光标记物 FITC-Dextran 的相对分子质量为 4.4×10^3，检测血中 FITC-Dextran 含量可反映肠黏膜通透性的改变情况[4,5]。我们的结果显示，30% Ⅲ度烧伤大鼠伤后各时相点门静脉血 FITC-Dextran 含量均明显高于伤前，并约于伤后 6 h 达最高峰。这表明严重烧伤后肠黏膜屏障功能受到损害，通透性增加，且以伤后 6 h 为最重。

肠上皮屏障完整性得以维持的结构基础是细胞间的紧密连接及其相关蛋白[6,7]。紧密连接由特异的连接蛋白使两个相邻细胞之间的间歇完全闭锁，与紧密连接密切相关的蛋白包括 ZO-1、occludin、claudin 等，其中 ZO-1 又与细胞内细胞骨架肌动蛋白相连，使细胞内细胞骨架与胞外连接蛋白实现信号沟通。在相关信号刺激下，由于骨架蛋白活动和细胞回缩，引起连接蛋白结构和功能失调，细胞间隙形成。为了进一步探索严重烧伤后肠上皮屏障功能紊乱及通透性增加的发生机制，我们采用免疫荧光技术研究了严重烧伤大鼠肠上皮细胞紧密连接相关蛋白 ZO-1 的变化。结果表明，与正常对照大鼠相比较，烧伤大鼠肠上皮细胞与细胞之间的紧密连接蛋白 ZO-1 明显减少，甚至消失，而细胞质分布则明显增加。说明严重烧伤后肠上皮细胞紧密连接相关蛋白 ZO-1 发生了明显重分布。此外，我们的结果还表明，烧伤大鼠肠上皮细胞 F-actin 虽仍主要沿细胞膜分布，但在细胞与细胞连接处出现断裂，且细胞质分布增加，提示严重烧伤后肠上皮细胞紧密连接受到损害。综合这些结果，我们认为肠上皮细胞紧密连接蛋白 ZO-1 的重分布及细胞紧密连接的损害可能是严重烧伤后肠上皮通透性增加的重要原因。

MLC 的磷酸化与屏障功能的调控密切相关[1,2,8-11]，当 MLC 的第 18 位苏氨酸和 19 位丝氨酸残基发生磷酸化后，可活化肌球蛋白重链头部的 ATP 酶，所产生的能量使细胞骨架肌动蛋白微丝滑动，细胞发生收缩，通透性发生改变。MLC 磷酸化在肠上皮屏

障功能紊乱及细胞紧密连接相关蛋白的调控中起着重要作用。为了探讨 MLC 磷酸化在严重烧伤后肠上皮屏障功能及通透性增加发生机制中的作用，我们采用免疫荧光方法研究了烧伤大鼠肠上皮细胞磷酸化型 MLC 蛋白表达的变化。结果显示，严重烧伤大鼠肠上皮细胞磷酸化型 MLC 的表达明显高于正常对照大鼠。由此表明，严重烧伤后肠上皮细胞 MLC 磷酸化水平增加，进而通过调控 F-actin 及细胞紧密连接蛋白 ZO-1，在烧伤后肠上皮屏障功能紊乱及通透性增加的发生机制中可能扮演重要角色。

参考文献：

[1] Zolotarevsky Y, Hecht G, Koutsouris A, *et al*. A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in *in vitro* models of intestinal disease [J]. Gastroenterology, 2002, 123(1): 163 – 172.

[2] Wang F, Graham W V, Wang Y, *et al*. Interferon(-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression [J]. Am J Pathol, 2005, 66(2): 409 – 419.

[3] Moriez R, Salvador-Cartier C, Theodorou V, *et al*. Myosin light chain kinase is involved in lipopolysaccharide-induced disruption of colonic epithelial barrier and bacterial translocation in rats [J]. Am J Pathol, 2005, 167(4): 1071 – 1079.

[4] Iiboshi Y, Nezu R, Khan J, *et al*. Developmental changes in distribution of the mucosal gel layer and intestinal permeability in rat small intestine [J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1996, 20(6): 406 – 411.

[5] Fujiyoshi N, Feketeova E, Lu Q, *et al*. Amiloride moderates increased gut permeability and diminishes mesenteric lymph-mediated priming of neutrophils in trauma/hemorrhagic shock [J]. Surgery, 2006, 140(5): 810 – 817.

[6] Harhaj N S, Antonetti D A. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(7): 1206 – 1237.

[7] Blikslager A T, Moeser A J, Gookin J L, *et al*. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa [J]. Physiol Rev, 2007, 87(2): 545 – 564.

[8] Turner J R. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application [J]. Am J Pathol, 2006, 169(6): 1901 – 1909.

[9] Wang F, Schwarz B T, Graham W V, *et al*. IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction [J]. Gastroenterology, 2006, 131(4): 1153 – 1163.

[10] Schwarz B T, Wang F, Shen L, *et al*. LIGHT signals directly to intestinal epithelia to cause barrier dysfunction *via* cytoskeletal and endocytic mechanisms [J]. Gastroenterology, 2007, 132(7): 2383 – 2394.

[11] 刘依凌，王凤君，陈传莉，等. Rho 激酶在大鼠严重烧伤后肠黏膜通透性改变中的作用及机制研究 [J]. 第三军医大学学报，2008，30(9)：817 – 819.

（编辑　张　维）

（上接 1433 页）

3　讨论

3.1　早期诊断

对于颈部大血管损伤，早期诊断是提高患者的生存率和生存质量的前提。表现有颈部大出血的血管损伤诊断并不困难，但是，在血管小的破裂、非全层裂伤等情况下，早期大多缺乏明显的症状和体征，往往在血栓形成导致远端血供障碍时才出现明显表现。本组病例中，神经系统症状最早出现在伤后 2 h，50% 的病例症状出现在伤后 6 h 内，50% 的病例症状出现在伤后24 h。因此，对于有颈部外伤史的病例应高度注意血管是否损伤，进行反复详细的体检和动态的观察，并配合特殊的血管检查，以早期发现，并尽可能对颈动脉损伤的病例在术前进行大脑侧支循环及缺血耐受性的评估，以指导治疗。

3.2　紧急止血

不同于其他部位的止血，在颈总动脉和颈内动脉的紧急止血中，动脉阻断时间与大脑侧支循环的好坏与治疗后果息息相关，当大脑侧支循环不良时，如动脉阻断时间过长，会导致大脑缺血缺氧性损害甚至死亡。当情况不允许在术前进行大脑侧支循环及缺血耐受性的评估时，术中通过颈内动脉残端压的测定来判断侧支循环情况显得尤为重要。一般认为，颈内动脉残端压超过平均动脉压的 50% 以上，说明脑血流代偿良好[2]，阻断颈内动脉暂时不会引起严重后果；否则说明脑血流代偿不良，须行转流术来保障脑血供，结扎颈内动脉很可能导致死亡。我们在 4 例颈动脉修复重建术中将完全阻断时间控制在15 min 以内，均未发生不良后果。

3.3　血管重建

在无法原位重建颈内动脉的情况下，行颅内 – 外动脉旁路术对提高脑血供有一定的帮助，本组 2 例应用该方法后效果良好。对于已经出现昏迷等神经系统缺失症状的颈动脉损伤的处理，在治疗上目前还存在争议[3]。大多数学者认为积极的手术重建相比血管结扎来说死亡率降低[4]。但由于已经存在的严重脑部问题，患者的手术耐受性低；而且脑血流缓慢，脑内微血管的栓塞可能已经存在，手术不能解决这方面的问题；并且，血管栓塞的范围往往较为广泛，手术难度大、风险极高。所以，是否行血管重建手术还需要结合实际情况来决定。

颈部血管损伤是一种凶险的损伤，需要我们提高警惕性和应急能力，早期发现，及早治疗，避免不可逆的脑缺血缺氧性损害是抢救成功的关键。

关键词：颈部；血管损伤；脑血供；修复重建
中图法分类号：R653　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 段志泉，张　强. 实用血管外科学 [M]. 沈阳：辽宁科学技术出版社，1999：221 – 227.

[2] 陈建超，陈　飞，李　彬，等. 血管结扎术治疗颈部血管破裂 [J]. 中国耳鼻喉头颈外科，2006，13(9)：622 – 624.

[3] Azuaje R E, Jacobson L E, Glover J, *et al*. Reliability of physical examination as a predictor of vascular injury after penetrating neck trauma [J]. Am Surg, 2003, 69(9): 804 – 807.

[4] Yao J S, Pearce W H. Practical vascular surgery [M]. 北京：科学出版社，2000：391 – 400

（编辑　汪勤俭）