

肥大细胞在深低温停循环肠损伤作用机制中的研究进展



柏利婷, 张燕搏, 李桐, 国胜文

北京协和医学院中国医学科学院阜外医院 第二住院 ICU 国家心血管病中心 心血管疾病国家重点实验室 (北京 100037)

【摘要】 深低温停循环 (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) 是外科复杂心脏手术的一种重要辅助技术, 是术中脑保护的措施之一, 并为外科手术提供便利的操作条件。然而这项技术所导致的并发症也不容忽视, 其中肠损伤的发生虽较为隐匿, 但是给患者带来巨大的痛苦并明显降低术后生活质量。研究表明, DHCA 导致肠道发生缺血再灌注损伤, 引起肥大细胞活化释放炎性介质, 破坏肠黏膜上皮屏障, 最终导致肠损伤。

【关键词】 深低温停循环; 肠损伤; 肥大细胞

Current status of mast cells in the mechanism of intestinal injury caused by deep hypothermic circulatory arrest

BAI Liting, ZHANG Yanbo, LI Tong, GUO Shengwen

Department of SICU, Fuwai Hospital, Peking Union Medical College, State Key of Laboratory of Cardiovascular Disease, National Center of Cardiovascular Disease Beijing, 100037, P.R.China

Corresponding author: ZHANG Yanbo, Email: yanbozhang@126.com

【Abstract】 Deep hypothermic circulatory arrest is an important assistant technique for complex cardiac surgery, which creates convenient operating conditions for surgery, it is also one of the measures to protect the brain during operation. However, the complications caused by this technique cannot be ignored, it should be noticed that the occurrence of intestinal injury is relatively insidious, but it brings great pain to patients and significantly reduces the quality of life after operation. Studies have shown that intestinal ischemia reperfusion injury was induced by DHCA, It causes mast cells to activate and release many inflammatory mediators that destroy the intestinal mucosal epithelium barrier, and eventually lead to intestinal injury.

【Key words】 Deep hypothermic circulatory arrest; intestinal injury; mast cell

深低温停循环 (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) 是治疗复杂心脑血管疾病的一种重要辅助技术, 如用于主动脉弓修复术以及神经外科修复巨大脑动脉瘤的手术。它是指利用体外循环技术, 将体温降至 18℃ ~ 20℃, 并阻断循环血流, 以便于进行手术操作^[1]。但是由于这项技术所引起的肠损伤, 其发生率虽仅有 1.1%, 导致术后脓毒症 (postoperative sepsis) 和多器官功能不全综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 成为接受 DHCA 患者术后恢复和重症治疗中的重要

问题^[2]。由于全身循环停止使所有器官系统和相关血管都处于缺血再灌注 (ischemia reperfusion, I/R) 状态, 导致血管内皮功能障碍、器官功能障碍和死亡的病理生理变化可能发生在多系统水平, 即 MODS^[3]。由于肠道发生 I/R, 肥大细胞作为一种特异性免疫细胞活化, 在细胞应激反应中分泌多种活性介质, 从而引起一系列局部或全身炎症反应^[4]。虽然目前临床多用中低温停循环 (将体温降至 20℃ 以上) 代替 DHCA 技术, 并且辅助使用选择性逆行脑灌注来进行脑保护, 以缩短体外循环降温和复温时间, 然而尽管避免了体温过低引起的凝血障碍和炎症, 但内脏器官缺血性损伤的风险并未降低^[5]。西奈山的一项动物实验建立中低温停循环模型并在 28℃ 时行选择性脑灌注, 研究发现 60% 的动物

DOI: 10.7507/1007-4848.201803051

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81400305)

通信作者: 张燕搏, Email: yanbozhang@126.com

在 24 h 内死于 MODS^[6]。

1 肥大细胞的生物学特性

1.1 肥大细胞概述

肥大细胞来源于骨髓造血干细胞，由骨髓生成，在外周组织发育成熟为持久的、具有高度特异性的粒细胞。肥大细胞是机体内最重要的免疫细胞之一，当机体受到外界刺激时，便迁移到相应部位发挥作用^[7]。肥大细胞主要位于与宿主防御环境有关的重要部位，如黏膜表面。胃肠道黏膜屏障主要由肠上皮细胞、粘液层和上皮免疫细胞组成，该屏障控制抗原和病原微生物从肠腔进入固有层。在健康人肠道黏膜固有层的细胞中，肥大细胞仅占 2% ~ 3%，但其作用至关重要，参与组成抵抗病原菌的第一道防线^[8]。

1.2 肥大细胞的作用机制

肥大细胞脱颗粒释放多种炎症介质作用于不同的器官，从而导致不同疾病的发展(图 1)。经典的肥大细胞脱颗粒机制是抗原进入机体后，可选择诱导特异性 B 细胞产生 IgE 抗体。肥大细胞膜表面存在许多高亲和力 IgE 受体，IgE 通过 Fc 段与肥大细胞表面相应的 FcεRI 结合，使机体处于对该抗原的致敏状态，当相应抗原再次进入机体时，通过与致敏肥大细胞表面两个或两个以上相邻 IgE 抗体特异性结合。使膜表面 FcεRI 交联活化，活化的受体

通过其 γ 链 C 端 ITAM 的磷酸化作用，使 Syk 和 Fyn 蛋白酪氨酸激酶 (protein tyrosine kinase, PTK) 活化，形成肥大细胞活化脱颗粒的起始信号^[9-10]。随着对肥大细胞活化机制的研究，越来越多非 IgE 机制被发现，如 IgG，补体成分，TLR 配体，神经肽，细胞因子，趋化因子和其他炎症产物，这些刺激物直接触发肥大细胞脱颗粒，引起选择性释放介质，刺激增殖、分化或迁移^[11]。当肥大细胞受体活化后，通过分泌颗粒样物质，包括血管活性胺、炎症因子、趋化因子以及多种蛋白酶，主要是胰蛋白酶和糜蛋白酶，参与局部或全身炎症反应^[12]。

2 肥大细胞与 DHCA 肠损伤

2.1 DHCA 肠损伤特点

Jörn Karhausen 等建立大鼠 DHCA 大鼠实验模型，发现与对照组相比，DHCA 组动物肠损伤明显，通过染色发现损伤部位主要位于回肠末端，系肠系膜上下动脉供血分界区，显微镜下可见回肠绒毛末端变钝，黏膜破坏明显，并有广泛出血坏死和炎症细胞浸润。血清中内毒素，脂质过氧化产物，组胺等水平明显增高，此外血清中肠型脂肪酸结合蛋白含量显著增加，肠型脂肪酸结合蛋白是一种小的细胞质蛋白，容易从由缺血造成损伤的细胞中漏出。组织灌注不当引起的后果是组织缺氧和氧化应激，前者表现为基因水平 TNF-α 及 CD73, MDR1

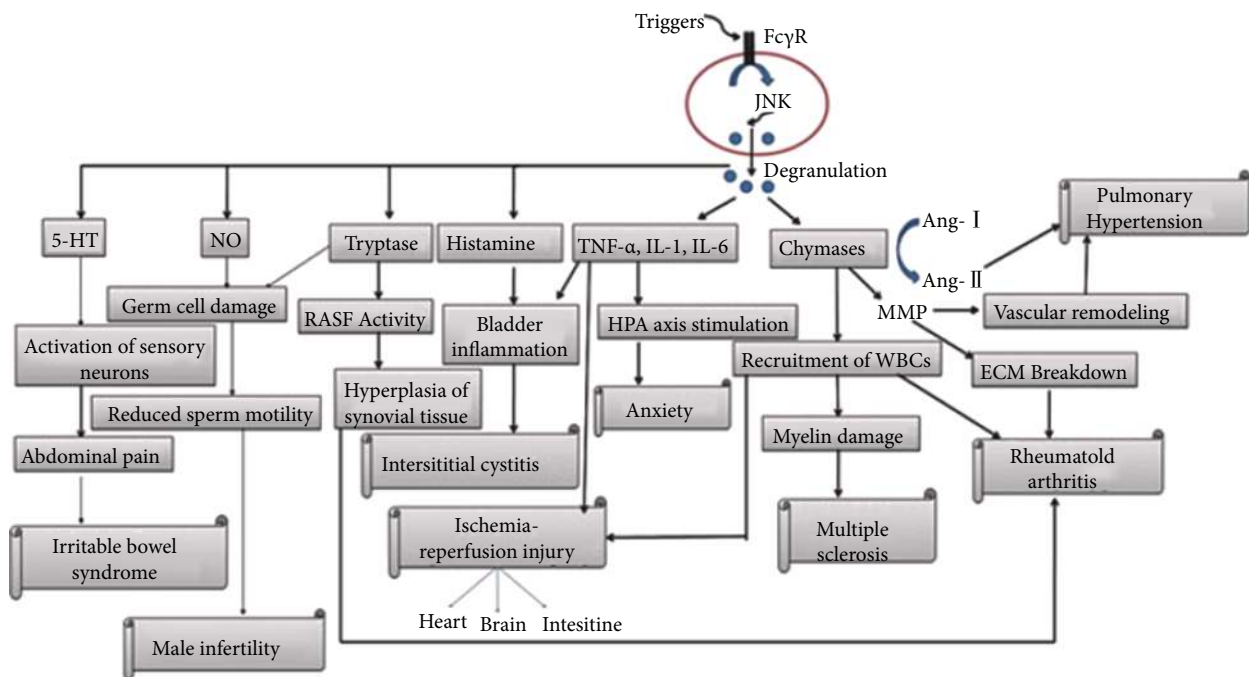


图 1 肥大细胞脱颗粒^[13]

FcεR: IgE 受体; Triggers: 诱因; JNK: c-Jun 氨基末端激酶; Degranulation: 脱颗粒; Tryptase: 类胰蛋白酶; TNF-α: 肿瘤坏死因子-α; Histamine: 组胺; Ischemia reperfusion injury: 缺血再灌注损伤; intestine: 肠

等缺氧相关基因表达增强,后者表现为脂质过氧化产物 MDA 明显增多。以上表现证明 DHCA 肠损伤是典型的 I/R 损伤^[14]。因此 DHCA 肠损伤主要有以下特点。

肠黏膜上皮氧供不足,上皮屏障受损。研究表明,在体外循环期间,微血管灌注和肠道氧代谢需求会发生变化^[15-16]。在 DHCA 技术应用过程中,随着温度不断降低,外周血管阻力增加,血流重新分布保护重要器官心脑血管的血供,肠道的血供减少,复温后心脏血流量恢复正常,肠道血流量依旧较低,因此导致肠道缺血缺氧时间较长^[17]。由于肠腔是厌氧环境而肠黏膜下组织是常氧环境,从厌氧到常氧的氧阶梯变化依赖于肠黏膜上皮完成,肠黏膜上皮介于厌氧和常氧之间,对于氧供的变化敏感易受到影响,所以即使血流发生相对较小的变化,便导致血液供应的显著中断,特别是在绒毛顶端区域^[2,18-19]。

肠黏膜上皮屏障破坏,触发炎症反应,炎症进而加重肠损伤。肠黏膜上皮屏障被破坏是 DHCA 肠损伤的特征性表现。在肠腔中,存在大量可以产生内毒素的微生物菌群,完整黏膜上皮屏障将微生物菌群与黏膜下组织分隔开,发挥保护作用。当肠黏膜屏障受损,肠腔的细菌及其产物在血液中与脂多糖结合蛋白结合,随着循环发生易位,产生细胞因子等炎性产物,诱发炎症反应,导致术后脓毒症和 MODS。DHCA 手术时,低温会引起黏膜缺血缺氧,位于肠道的细菌释放内毒素增加,并且在低温期间,免疫系统和酶活性会受到抑制,因此 Kupffer 细胞对内毒素的清除能力降低^[20],另外体外循环本身也会导致细胞免疫减弱,感染的易感性增加^[21]。临床研究发现肠道屏障功能的丧失所致菌群易位与 MODS 的发生有关,但该机制并不足以解释 ICU 患者 MODS 的发展,如一项对创伤患者的研究,在严重创伤的患者和 MODS 组患者门静脉血液中均未发现细菌或内毒素^[22]。目前认为,肠缺血损伤时,肠壁内出现大量的肥大细胞^[23],通过释放生物活性介质,导致肠道黏膜上皮屏障发生从可逆的通透性变化到不可逆的结构性损伤的改变^[23],并且这些生物活性因子可进入肠系膜淋巴管到达全身循环^[24],引起局部或全身炎症反应。

2.2 肥大细胞在 DHCA 肠损伤的作用机制

DHCA 技术引起的肠损伤,是缺氧造成的 I/R 损伤和全身性炎症反应共同作用而成,其中肥大细胞活化在 DHCA 诱导的肠黏膜上皮屏障破坏中发挥重要作用。对 DHCA 大鼠模型的肠道进行免疫荧光和甲苯胺蓝染色,显示肠内肥大细胞总数目增

多,并且位于肠黏膜顶端区域的肥大细胞不仅数量明显增加,其活化脱颗粒比例也增加,实验组与对照组肥大细胞脱颗粒所占比例为 $77\% \pm 14\%$ vs. $15\% \pm 1\%$ 。使用肥大细胞稳定剂克罗莫林钠预处理,则能有效地阻断肥大细胞脱颗粒,使 DHCA 后肠形态和屏障功能得以保存^[14]。肠组织肥大细胞脱颗粒有两种途径(图 2)^[4],分别是 G 蛋白偶联受体(GPCR)介导的细胞外途径和肥大细胞自身产生的物质(如活性氧 ROS)触发的细胞内途径^[25-26]。I/R 时,肠道血管内皮细胞释放内皮素-1(ET-1),腺嘌呤核苷酸从受损细胞中断裂释放出腺苷,内皮素-1,补体激活产物 C3a、C5a 以及腺苷分别与肥大细胞膜上相应受体结合,以上受体均为 G 蛋白偶联受体。另外肥大细胞自身可合成活性氧(ROS),无需通过与膜受体结合便可触发脱颗粒。以上来自胞外胞内的信号共同作用于肥大细胞内的磷脂酶-C(PLC),使其分解为甘油二酯(DAG)和三磷酸肌醇(IP3),分别激活蛋白激酶 C 和利用胞内贮存的 Ca^{2+} ,触发肥大细胞活化脱颗粒^[27-30]。

肥大细胞活化脱颗粒释放的 TNF- α 、蛋白酶如类胰蛋白酶,改变肠道黏膜上皮紧密连接的通透性^[31-32]。正常的肠黏膜上皮屏障由一层柱状上皮细胞和上皮细胞间紧密连接组成,位于细胞旁间隙的顶端。在完整的上皮细胞紧密连接上有两条跨膜通路,以便跨层细胞离子和溶质的定向运输,分别称为“孔”和“漏”通路。孔通道是指一种高容量、具有大小和电荷选择性的途径,能使大量不带电荷的小分子通过,由紧密连接蛋白(claudins)组成,其通透性依赖于 claudins 的表达^[33]。漏途径是一种低容量途径,不具有电荷选择性,可使少量大分子通过,与分子电荷性质无关,其通透性受周蛋白蛋白-1(ZO-1)、闭合蛋白(occludin)和肌球蛋白轻链激酶(MLCK)的调节^[34-35]。TNF- α 通过诱导 MLCK 的表达,或通过活化核转录因子(NF- κ B)及下调 ZO-1 蛋白的表达,改变“漏”途径的结构,导致无电荷大分子量物质通过,破坏紧密连接,使其通透性增加^[36]。另外, TNF- α 还可诱导 claudins 蛋白分布异常,改变“孔”通道的正常结构,使其不能定位在紧密连接上发挥作用,从而引起紧密连接断裂^[37]。类胰蛋白酶则是在 β -阻抑蛋白-2 参与下,通过活化蛋白酶激活受体-2(PAR-2),使紧密连接周围的纤维性肌动蛋白重组,使 ZO-1 蛋白和 occludin 蛋白重新分布,改变“漏”途径的结构,导致紧密连接破坏^[38]。当肠黏膜上皮的紧密连接的结构被破坏,会导致肠黏膜上皮的间隙扩大,通透性也就会

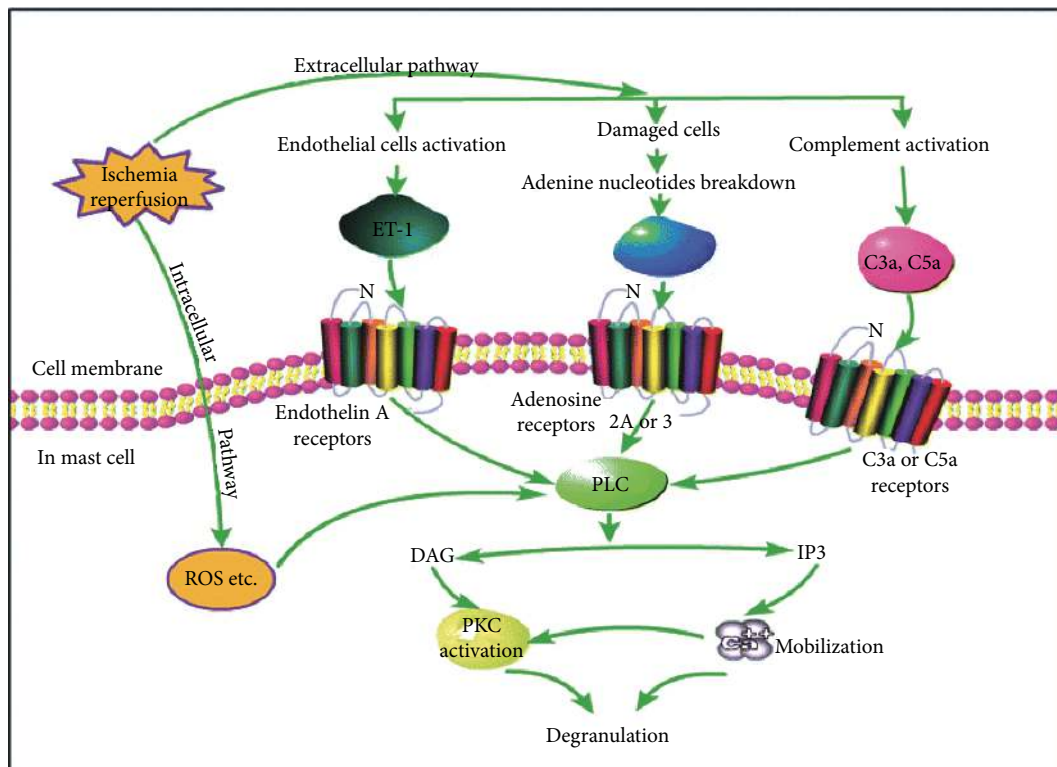


图 2 肠组织肥大细胞脱颗粒的两种途径^[4]

Ischemia reperfusion: 缺血再灌注; Extracellular pathway: 细胞外途径; Damaged cells: 损伤细胞; Endothelial cells activation: 内皮细胞活化; ET-1: 内皮素-1; Adenine nucleotides breakdown: 腺嘌呤核苷酸断裂; Adenosine: 腺苷; Complement activation: 补体激活产物; cell membrane: 细胞膜; mast cell: 肥大细胞; Intracellular pathway: 细胞内途径; Endothelin A receptors: 内皮素 A 受体; Adenosine receptor: 腺苷受体; ROS: 活性氧; PLC: 磷脂酶-C; DAG: 甘油二酯; IP3: 三磷酸肌醇; PKC: 蛋白激酶 C; Degranulation: 脱颗粒

增加，肠黏膜屏障的完整性被破坏，使得一些细菌、内毒素可通过细胞间隙进入体循环，进而引起局部或全身损伤。

3 展望

DHCA 技术导致肠道发生 I/R 损伤，组织缺氧激活肠黏膜固有层肥大细胞脱颗粒活化，释放 TNF- α 、类胰蛋白酶等活性介质，破坏紧密连接的结构和功能，损伤肠黏膜上皮屏障。因此肥大细胞活化脱颗粒是 DHCA 肠损伤的重要环节，阻断肥大细胞脱颗粒或者阻断肥大细胞所释放出介质的作用，为预防 DHCA 肠损伤提供新的治疗可能。研究表明使用肥大细胞膜稳定剂进行预处理，阻断肥大细胞脱颗粒，可明显减轻 DHCA 所致 I/R 损伤^[14, 39]，色甘酸钠是最常用的肥大细胞膜稳定剂，通过抑制肥大细胞脱颗粒减少炎性介质释放，防止肠损伤。除膜稳定剂外，使用异丙酚进行预处理可通过抑制 NADPH 氧化酶介导的肥大细胞激活而保护肠 I/R 损伤^[40]。但是目前的研究仅限于动物实验模型，对于人还有待进一步研究。另外肥大细胞

释放多种介质，每种介质作用机制并未完全阐明，未来的工作应该集中在确定更多的、更有效的药物针对不同的介质稳定肥大细胞。此外，与心脏手术本身相关的炎症信号可能会增强的肥大细胞反应，触发肠黏膜下肥大细胞的炎症级联反应，将局部炎症反应通过肠系膜淋巴道放大至全身，但是这种相互作用机制仍不清楚，有待进一步阐明这种复杂炎症刺激的相互作用。

参考文献

- 1 Gutsche JT, Ghadimi K, Patel PA, *et al.* New frontiers in aortic therapy: focus on deep hypothermic circulatory arrest. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2014, 28(4): 1159-1163.
- 2 Grenz A, Eltzschig HK. Mast cells and intestinal injury: a novel link between hypoxia and inflammation. *Crit Care Med*, 2013, 41(9): 2246-2248.
- 3 Cooper WA, Duarte IG, Thourani VH, *et al.* Hypothermic circulatory arrest causes multisystem vascular endothelial dysfunction and apoptosis. *Ann Thorac Surg*, 2000, 69(3): 696-702.
- 4 Yang MQ, Ma YY, Ding J, *et al.* The role of mast cells in ischemia and reperfusion injury. *Inflamm Res*, 2014, 63(11): 899-905.
- 5 Con-debate: short circulatory arrest times in arch reconstructive surgery: is simple retrograde cerebral perfusion or hypothermic

- circulatory arrest as good or better than complex antegrade cerebral perfusion for open distal involvement or hemi-arch. *J Vis Surg*, 2018, 4: 46.
- 6 Etz CD, Luehr M, Kari FA, *et al*. Selective cerebral perfusion at 28 degrees C--is the spinal cord safe? *Eur J Cardiothorac Surg*, 2009, 36(6): 946-955.
- 7 Juremalm M, Olsson N, Nilsson G. Selective CCL5/RANTES-induced mast cell migration through interactions with chemokine receptors CCR1 and CCR4. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297(3): 480-485.
- 8 Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol*, 2011, 12(11): 1035-1044.
- 9 刘东方, 张春光, 吴健民. 肥大细胞脱颗粒机制研究进展. *国外医学 (临床生物化学与检验学分册)*, 2004, 25(2): 137-139.
- 10 Amin K. The role of mast cells in allergic inflammation. *Respir Med*, 2012, 106(1): 9-14.
- 11 Yu Y, Blokhuis BR, Garssen J, *et al*. Non-IgE mediated mast cell activation. *Eur J Pharmacol*, 2016, 778: 33-43.
- 12 Bischoff SC. Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. *Semin Immunopathol*, 2009, 31(2): 185-205.
- 13 Anand P, Singh B, Jaggi AS, *et al*. Mast cells: an expanding pathophysiological role from allergy to other disorders. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2012, 385(7): 657-670.
- 14 Karhausen J, Qing M, Gibson A, *et al*. Intestinal mast cells mediate gut injury and systemic inflammation in a rat model of deep hypothermic circulatory arrest. *Crit Care Med*, 2013, 41(9): e200-e210.
- 15 Tsunooka N, Maeyama K, Hamada Y, *et al*. Bacterial translocation secondary to small intestinal mucosal ischemia during cardiopulmonary bypass. Measurement by diamine oxidase and peptidoglycan. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2004, 25(2): 275-280.
- 16 Solligård E, Wahba A, Skogvoll E, *et al*. Rectal lactate levels in endoluminal microdialysate during routine coronary surgery. *Anaesthesia*, 2007, 62(3): 250-258.
- 17 Zarins CK, Skinner DB. Circulation in profound hypothermia. *J Surg Res*, 1973, 14(2): 97-104.
- 18 Jakob SM. Splanchnic blood flow in low-flow states. *Anesth Analg*, 2003, 96(4): 1129-1138.
- 19 Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC. Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med*, 2012, 367(24): 2322-2333.
- 20 Kats S, Schönberger JP, Brands R, *et al*. Endotoxin release in cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: pathophysiology and possible therapeutic strategies. An update. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2011, 39(4): 451-458.
- 21 Efthymiou CA, Weir WI. Salmonella sepsis simulating gastrointestinal ischaemia following cardiopulmonary bypass. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2011, 12(2): 334-336.
- 22 Deitch EA. Gut lymph and lymphatics: a source of factors leading to organ injury and dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1207 Suppl 1: E103-E111.
- 23 Boros M. Microcirculatory dysfunction during intestinal ischemia-reperfusion. *Acta Physiol Hung*, 2003, 90(4): 263-279.
- 24 Deitch EA. Gut-origin sepsis: evolution of a concept. *Surgeon*, 2012, 10(6): 350-356.
- 25 Kuehn HS, Gilfillan AM. G protein-coupled receptors and the modification of FcepsilonRI-mediated mast cell activation. *Immunol Lett*, 2007, 113(2): 59-69.
- 26 Suzuki Y, Yoshimaru T, Inoue T, *et al*. Role of oxidants in mast cell activation. *Chem Immunol Allergy*, 2005, 87: 32-42.
- 27 Murray DB, Gardner JD, Brower GL, *et al*. Endothelin-1 mediates cardiac mast cell degranulation, matrix metalloproteinase activation, and myocardial remodeling in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(5): H2295-H2299.
- 28 Rork TH, Wallace KL, Kennedy DP, *et al*. Adenosine A2A receptor activation reduces infarct size in the isolated, perfused mouse heart by inhibiting resident cardiac mast cell degranulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 295(5): H1825-H1833.
- 29 Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2000, 362(4-5): 299-309.
- 30 Venkatesha RT, Berla Thangam E, Zaidi AK, *et al*. Distinct regulation of C3a-induced MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 production in human mast cells by extracellular signal regulated kinase and PI3 kinase. *Mol Immunol*, 2005, 42(5): 581-587.
- 31 Lin L, Bankaitis E, Heimbach L, *et al*. Dual targets for mouse mast cell protease-4 in mediating tissue damage in experimental bullous pemphigoid. *J Biol Chem*, 2011, 286(43): 37358-37367.
- 32 Overman EL, Rivier JE, Moeser AJ. CRF induces intestinal epithelial barrier injury via the release of mast cell proteases and TNF- α . *PLoS One*, 2012, 7(6): e39935.
- 33 Anderson JM, Van Itallie CM. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(2): a002584.
- 34 Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(1): 9-21.
- 35 Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, *et al*. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev*, 2007, 87(2): 545-564.
- 36 Shen L, Weber CR, Raleigh DR, *et al*. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol*, 2011, 73: 283-309.
- 37 Marchiando AM, Shen L, Graham WV, *et al*. Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *J Cell Biol*, 2010, 189(1): 111-126.
- 38 Li S, Guan J, Ge M, *et al*. Intestinal mucosal injury induced by tryptase-activated protease-activated receptor 2 requires β -arrestin-2 in vitro. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 7181-7187.
- 39 Liu D, Gan X, Huang P, *et al*. Inhibiting tryptase after ischemia limits small intestinal ischemia-reperfusion injury through protease-activated receptor 2 in rats. *J Trauma Acute Care Surg*, 2012, 73(5): 1138-1144.
- 40 Gan X, Xing D, Su G, *et al*. Propofol Attenuates Small Intestinal Ischemia Reperfusion Injury through Inhibiting NADPH Oxidase Mediated Mast Cell Activation. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 167014.

收稿日期: 2018-03-21 修回日期: 2018-05-14

本文编辑: 董敏