

· 基础研究 ·

一氧化碳释放分子 2 调控 T 淋巴细胞分化介导抗炎保护失血性休克大鼠肠屏障

牛庆晟¹ 张瑞² 陈磊¹ 王晓红³

¹宁夏医科大学临床医学院, 银川 750004; ²宁夏颅脑疾病重点实验室, 银川

750004; ³宁夏医科大学总医院重症医学科, 银川 750004

通信作者: 王晓红, Email: wxhhelen2005@sina.com

【摘要】目的 探讨一氧化碳释放分子 2 (carbon monoxide-releasing molecule-2, CORM-2) 调控 T 淋巴细胞的分化介导抗炎保护失血性休克大鼠肠屏障。**方法** 56 只健康雄性 SD 大鼠按照随机数字表法分为假手术组、休克组、二甲基亚砜组 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、灭活型一氧化碳释放分子 2 组 (inactive carbon monoxide-releasing molecule-2, iCORM-2)、CORM-2 2 mg/kg 组、CORM-2 4 mg/kg 组及 CORM-2 6 mg/kg 共 7 组, 每组 8 只。采用 Wiggers 改良法制备失血性休克大鼠模型, CORM-2 各剂量组和 iCORM-2 组于制备休克模型前即刻腹腔注射不同剂量 CORM-2 和 6 mg/kg iCORM-2, DMSO 组腹腔注射与 iCORM-2 等量的 2%DMSO, 休克组和假手术组不给予药物干预。各组大鼠记录置管后或休克后不同时相平均动脉压变化。各组大鼠造模成功后 23 h 采用荧光素异硫氰酸酯 (fluorescein isothiocyanate, FITC) - 葡聚糖作为渗透性标记物测试肠壁通透性, 并留取回肠组织观察肠道病理形态。免疫组化观察大鼠肠黏膜淋巴细胞转录因子 T-bet、Foxp3 的表达, Western Blot 检测大鼠肠黏膜组织干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、白介素 10 (interleukin-10, IL-10) 和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 的表达。正态分布计量资料多组间均数比较采用单因素方差分析, 非正态分布数据采用 Kruskal Wallis 秩和检验。**结果** 与假手术组相比, 休克组、DMSO 组和 iCORM-2 组血清中 FITC- 葡聚糖浓度明显增加 (均 $P < 0.05$); 与休克其余各组比较, CORM-2 各剂量组血清中 FITC- 葡聚糖浓度均减低 (均 $P < 0.05$)。病理学改变显示休克组、DMSO 组和 iCORM-2 组大鼠回肠组织损伤明显; CORM-2 干预可减轻休克大鼠回肠黏膜损伤, 且 CORM-2 4 mg/kg 组和 CORM-2 6 mg/kg 组回肠结构更完整。休克组和 DMSO 组肠黏膜淋巴细胞 T-bet 抗原表达较假手术组升高 (均 $P < 0.05$); CORM-2 各剂量组 T-bet 抗原表达较休克组降低 (均 $P < 0.05$)。CORM-2 2 mg/kg 组、CORM-2 4 mg/kg 组及 iCORM-2 组 Foxp3 抗原表达较休克组和 DMSO 组均减低 (均 $P < 0.05$), 但 CORM-2 6 mg/kg 组与休克组或 DMSO 组比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。与假手术组相比, 休克组 IFN- γ 表达升高 ($P < 0.05$), IL-10 和 TGF- β 表达未见差异 (均 $P > 0.05$); 与休克组相比, CORM-2 各剂量组 IL-10 蛋白表达升高 (均 $P < 0.05$), 其中 CORM-2 4 mg/kg 组和 CORM-2 6 mg/kg 组 TGF- β 表达上调 (均 $P < 0.05$), 但仅 CORM-2 6 mg/kg 组较休克组 IFN- γ 表达下调 ($P < 0.05$)。**结论** CORM-2 可抑制 1 型辅助性 T 细胞的活化, 降低炎症因子, 增加抗炎因子, 减轻休克缺血肠壁炎症, 保护肠屏障。

【关键词】 一氧化碳释放分子 2; 休克; 肠; 淋巴细胞; 炎症

基金项目: 国家自然科学基金 (81960348); 宁夏回族自治区自然科学基金 (2021AAC03393)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2022.05.012

Carbon monoxide releasing molecule 2 exhibits anti-inflammatory effects by regulating T lymphocyte differentiation to protect intestinal barrier in rats with hemorrhagic shock

Niu Qingsheng¹, Zhang Rui², Chen Lei¹, Wang Xiaohong³

¹ School of Clinical Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; ² Ningxia Key Laboratory of Craniocerebral Diseases, Yinchuan 750004, China; ³ Department of Intensive Care Unit, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

Corresponding author: Wang Xiaohong, Email: wxhhelen2005@sina.com

【 Abstract 】 Objective To investigate the protective effect of carbon monoxide releasing molecule 2 (CORM-2) on intestinal barrier by regulating the differentiation of T lymphocytes in rats with hemorrhagic shock. **Methods** Healthy male Sprague-Dawley rats ($n=56$) were randomly (random number) divided into the sham operation group, shock group, dimethyl sulfoxide (DMSO) control group, inactivated carbon monoxide release molecule-2 (iCORM-2) pretreatment group and three pretreatment CORM-2 with the doses of 2, 4 and 6 mg/kg separately. The hemorrhagic shock was induced with the use of a modified Wiggers model. Rats in the CORM-2 group and iCORM-2 group were intraperitoneally injected with CORM-2 with the doses of 2, 4 and 6 mg/kg and 6 mg/kg iCORM-2 instantly before shock induction. Rats in the DMSO group received intraperitoneal administration of 2% DMSO with the same volume of iCORM-2. Rats in the shock group and sham operation group were not pretreated before inducing shock. Mean arterial pressure of each rat was recorded at different phases after catheterization or shock. Twenty-three hours after shock induction, the permeability of intestinal barrier was measured by FITC-dextran flux, and then ileum tissues were harvested to observe histopathologic changes. Immunohistochemistry was used to detect the expression of transcription factors T-bet and Foxp3 of intestinal mucosa in rats, and the expression of interferon- γ (IFN- γ), interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor- β (TGF- β) in intestinal mucosa was measured by Western blot. One-way analysis of variance or Kruskal Wallis rank sum test was used to compare the difference among groups for normal or non-normal distributed data. **Results** Compared with the sham operation group, serum concentrations of FITC-dextran were significantly increased in the shock group, DMSO group and iCORM-2 group (all $P<0.05$). The concentrations of FITC-dextran in serum of three CORM-2 pretreatment groups pretreatment were significantly decreased compared with other groups undergoing shock (all $P<0.05$). Rats in the shock group, DMSO group and iCORM-2 group showed severe ileum injury. CORM-2 intervention resulted in alleviation of intestinal mucosal injury in rats with shock, and rats in groups pretreatment CORM-2 at the doses of 4 and 6 mg/kg exhibited integrity of anatomic ileac structure. Compared with the sham operation group, T-bet levels of intestinal intraepithelial lymphocytes were increased in shock group and DMSO group (all $P<0.05$). Compared with the shock group, levels of T-bet were decreased in intestinal epithelium of three groups pretreatment with CORM-2 at the doses of 2, 4 and 6 mg/kg (all $P<0.05$). Foxp3 levels in intestinal intraepithelial lymphocytes of the iCORM-2 group and two groups pretreatment with CORM-2 at the doses of 4 and 6 mg/kg were increased compared with the shock group and DMSO group (all $P<0.05$), but there was no significant difference among the shock group, DMSO group and group pretreatment with CORM-2 at 6 mg/kg (all $P>0.05$). The shock group showed increased expression of IFN- γ (all $P<0.05$), but unchangeable expression of IL-10 and TGF- β (all $P>0.05$) compared with the sham operation group. Compared with the shock group, the expression levels of IL-10 in three groups pretreatment with CORM-2 at the doses of 2, 4 and 6 mg/kg were significantly increased (all $P<0.05$), and the expression levels of TGF- β were increased in two groups pretreatment with CORM-2 at the doses of 4 and 6 mg/kg (all $P<0.05$). The expression of IFN- γ in group pretreatment with CORM-2 at 6 mg/kg was significantly decreased compared with the shock group ($P<0.05$). **Conclusions** CORM-2 inhibited the activation of type 1 helper T cells to decrease the expression of proinflammatory factors and upregulated the expression of anti-inflammatory factors. Thus, CORM-2 reduced gut inflammation and protected the intestinal barrier.

【 Keywords 】 Carbon monoxide releasing molecule-2; Shock; Intestine; Lymphocyte; Inflammation

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81960348); Natural Science Foundation of Ningxia of China (2021AAC03393)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2022.05.012

肠道被认为是休克患者并发肠源性感染及多脏器功能障碍的“发动机”^[1]。肠道是人体最大的免疫器官,包括人体 70% 的免疫细胞,尤其是肠上皮和固有层内具有丰富淋巴细胞^[2-3]。近年研究证实肠道缺血-再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)中不仅中性粒细胞等固有免疫细胞参与,淋巴细胞也发挥重要作用,尤其适应性免疫的主要细胞 T 细胞参与不同疾病模型下多种器官的 IRI^[4-5]。因此研究肠道 IRI 中淋巴细胞亚群变化及其调节,对于保护 IRI 肠屏障,减少全身炎症反应,保护远隔器官,改善休克预后具有重要意义。目前针对肠道 IRI 缺乏有效的保护手段。外源性一氧化碳释放分子-2(carbon monoxide-releasing molecule-2, CORM-2)是一种携带一氧化碳(carbon monoxide, CO)的新型金属羰基化合物,CO 具有抗炎、抗凋亡、免疫调节等多重效应^[6]。本团队前期研究证实 CORM-2 可减轻休克大鼠肠黏膜机械屏障损伤^[7]。本研究拟建立失血性休克大鼠模型, CORM-2 预处理大鼠,观察大鼠肠黏膜上皮 1 型辅助性 T(T helper 1, Th1)细胞与调节性 T(regulatory T, Treg)细胞及相关炎症因子的表达,探讨 CO 对失血性休克大鼠肠黏膜屏障的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与试剂

本研究使用鼠恒温实验台(成都泰盟公司,中国)、生物机能实验系统(成都泰盟公司,中国)和高速冷冻离心机(Thermo,美国)。实验试剂包括 CORM-2(Sigma,美国)、荧光素异硫氰酸酯(fluorescein isothiocyanate, FITC)-葡聚糖(Sigma,美国)、T-bet 兔抗鼠多克隆抗体(Abcam,英国)、Foxp3 兔抗鼠多克隆抗体(Abcam,英国)重组抗体、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)抗体(Abcam,英国)、白介素 10(interleukin, IL-10)多克隆抗体(Thermo,美国)、重组抗转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)抗体(Abcam,英国)。

1.2 药物制备

CORM-2 溶液的制备:1 mg CORM-2 粉剂溶于 20 μ L 的 DMSO,振荡均匀,加入 980 μ L 的 0.9% 的生理盐水,振荡均匀,使得 DMSO 的终体积分数为 2%,药物现用现配。iCORM-2 溶液配制:将配制好的 CORM-2 溶液放置 37 $^{\circ}$ C 恒温箱 72 h,打

开容器盖,避光保存 48 h,待药物释放完全后使用。

1.3 失血性休克大鼠模型的建立

SPF 级雄性 SD 大鼠,9~10 周龄,体重 280~350 g,购自宁夏医科大学动物实验中心,许可证号:SCXK(宁)2020-000-1。大鼠实验前 24 h 禁食,自由饮水。实验严格遵循宁夏医科大学总医院动物伦理委员会的各项规定(伦理编号 2020-841)。本实验采用 Wiggers 改良法制备失血性休克大鼠模型。1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠。分别经右颈动脉放置 23 号 PE-50 聚乙烯管用于监测平均动脉血压(mean arterial pressure, MAP),经动脉导管三通处放血,经左颈静脉置管用于复苏补液准备。导管均充满肝素生理盐水,并通过压力传感器与数据采集卡连接实时记录数据电脑存盘,记录基础血流动力学数据。动静脉穿刺手术完成后,待大鼠生理参数稳定开始诱导休克。用无菌注射器从右颈动脉导管三通处以 0.5 mL/min 的速度开始放血,在 10 min 内将 MAP 降到 40 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。通过动脉放血或静脉回输(当 MAP >40 mmHg 时放血,MAP <35 mmHg 时回输)以维持实验大鼠 MAP 在 35~40 mmHg 间的休克状态 2 h,休克模型即建立成功。休克维持 2 h 后行液体复苏,经静脉导管输注复苏液,复苏液为回输所失的血量并加上 1.5 倍失血量的林格液,30 min 内将 MAP 升到血压稳定后停止复苏,观察血流动力学稳定 30 min。实验结束后,拔除导管观察 24 h,记录生存情况。

1.4 实验分组及预处理

56 只 SPF 级雄性 SD 大鼠采用随机数字表法分为 7 组,即假手术组、休克组、DMSO 组、iCORM-2 组、CORM-2 2 mg/kg 组、CORM-2 4 mg/kg 组和 CORM-2 6 mg/kg 组,每组 8 只。假手术组大鼠仅置入相关导管,不进行失血性休克相关建模操作。不同浓度 CORM-2 组于制作休克模型前即刻腹腔注射 2 mg/kg、4 mg/kg 及 6 mg/kg CORM-2 药物。iCORM-2 组干预药物浓度为 6 mg/kg,于制作休克模型前即刻腹腔注射;DMSO 组于制作休克模型前即刻腹腔注射与 iCORM-2 组等量的 2% DMSO 溶液。休克组和假手术组不予其他预处理。

1.5 大鼠血流动力学监测

假手术组分别于大鼠颈动脉置管后即刻(即 0 h)、1.5 h、2.5 h 和 3 h 记录 MAP 变化。其余 6 组

大鼠于置管后即刻(或休克前)、置管后 1.5 h(或休克后 1 h)、置管后 2.5 h(或休克后 2 h)、置管后 3 h(或复苏后)记录 MAP 的动态变化。

1.6 大鼠肠道通透性的测定

各组术后 23 h 使用 FITC-葡聚糖作为渗透性标记物测试大鼠同一部位肠壁通透性。1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,固定于鼠恒温实验台。寻找回盲部,分离结肠与回肠,结扎约 4 cm 末端回肠的两端,并将 400 μ L FITC-葡聚糖(25 mg/mL)注射到肠腔中。1 h 后留取大鼠血液标本 5 mL,离心(12 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C, 10 min),将血清(500 μ L)与 500 μ L PBS 混合,并通过荧光分光光度计检测大鼠血清内 FITC-葡聚糖的荧光强度(激发光波长:488 nm,发射光波长:525 nm),根据标准曲线计算 FITC-葡聚糖浓度,进行肠道通透性检测。

1.7 大鼠肠黏膜病理形态学观察

各组术后 24 h 留取大鼠同一部位回肠组织,4%多聚甲醛溶液固定后,经乙醇脱水、石蜡包埋、切片,苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察肠黏膜形态,并用 Chiu 6 级评分法对肠黏膜损伤程度进行评价^[8]。

1.8 免疫组化检测大鼠回肠组织淋巴细胞 T-bet 和 Foxp3 转录因子的表达

各组术后 24 h 留取大鼠同一部位回肠组织,4%多聚甲醛固定。将组织脱蜡并用 dd-H₂O 冲洗。洗涤后,加入 1 500~3 000 mL 柠檬酸盐缓冲液,在封闭缓冲液中孵育 30 min。样品用稀释的一抗缓冲液在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,抗 T-bet 抗体、抗 Foxp3 抗体稀释比分别为 1:250 和 1:150。在洗涤一抗后,加入适量的 HRP 标记兔抗山羊二级抗体(40 min,室温)。然后用 DAB(ZSGB-BIO,中国北京)显色液显示背景。免疫组化结果判定以细胞核中出现棕黄色为阳性,每只大鼠选取 3 张切片,每张切片随机选取 5 个视野,显微镜下观察载玻片染色情况。利用 ImageProPlus 图像分析技术分析靶蛋白的平均吸光度值。

1.9 大鼠回肠组织 IFN- γ 、IL-10、TGF- β 炎症因子水平的表达

各组术后 24 h 留取大鼠同一部位回肠组织。Western blot 检测回肠组织 IFN- γ 、IL-10、TGF- β 蛋白水平。裂解回肠组织提取总蛋白,用 BCA 法定量后,进行 SDS-PAGE 电泳并转移至 PVDF 膜。脱脂奶粉封闭 1.5 h,分别加入 IFN- γ 、IL-10、

TGF- β 抗体(均 1:1 000 稀释),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,加入 HRP 标记山羊抗兔(1:3 000 稀释),室温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,加入 ECL 显影,用 ImageJ 分析软件测定各蛋白条带灰度值;实验重复 3 次。

1.10 统计学方法

应用 SPSS 22.0 软件进行统计分析和数据处理。对计量资料数据进行正态性检验及方差齐性检验,服从正态分布的以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和 Student-Newman-Keuls 检验;非正态分布的计量资料以中位数(四分位数)[$M(Q_1, Q_3)$]表示,采用 Kruskal Wallis 秩和检验。组内结果随时间变化采用重复测量的多因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时相 MAP 的变化

休克各组大鼠麻醉后 MAP 为(101 \pm 3) mmHg。大鼠失血(6.5 \pm 0.3) mL 后 MAP 降低至(37.0 \pm 0.9) mmHg。休克持续 2 h 后复苏补液,补液后大鼠 MAP 维持(84 \pm 5) mmHg。诱导休克后,休克各组不同时间点血压均低于假手术组(均 $P < 0.05$),且各组休克后不同时相 MAP 均低于休克前血压(均 $P < 0.05$)。除假手术组之外,其余各组之间置管后 3 h(或复苏后)血压差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。见图 1、表 1。

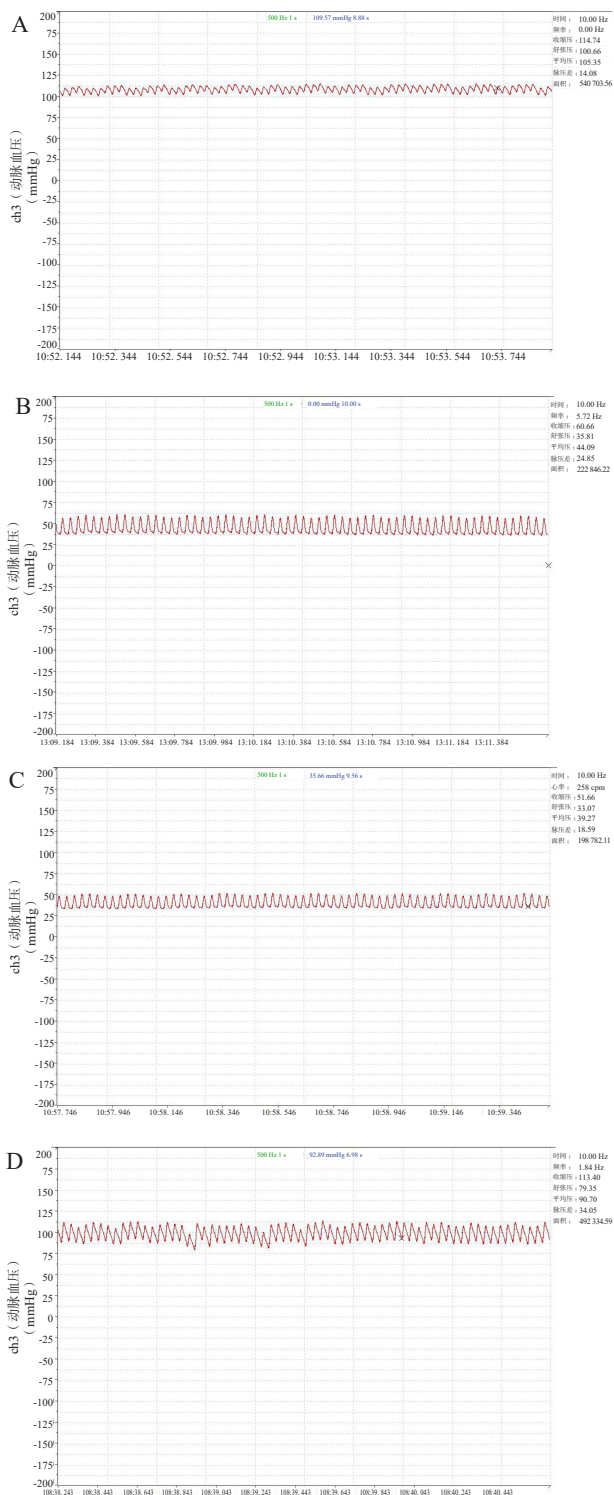
表 1 各组大鼠不同时相 MAP ($n=8$ /组, mmHg, $\bar{x} \pm s$)
Table 1 Mean arterial pressure of rats in each group at different time points ($n=8$ per group, mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组别	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	F 值	P 值
假手术组	101 \pm 8	101 \pm 8	102 \pm 8	103 \pm 9	0.118	0.949
休克组	99 \pm 15	37 \pm 2 ^{ab}	37 \pm 4 ^{ab}	84 \pm 12 ^{ab}	81.681	<0.001
DMSO 组	102 \pm 15	36 \pm 2 ^{ab}	37 \pm 3 ^{ab}	83 \pm 9 ^{ab}	114.247	<0.001
iCORM-2 组	98 \pm 12	37 \pm 3 ^{ab}	37 \pm 3 ^{ab}	83 \pm 9 ^{ab}	137.611	<0.001
CORM-2 2 mg/kg 组	100 \pm 11	37 \pm 2 ^{ab}	38 \pm 3 ^{ab}	85 \pm 11 ^{ab}	127.514	<0.001
CORM-2 4 mg/kg 组	94 \pm 10	36 \pm 2 ^{ab}	38 \pm 4 ^{ab}	78 \pm 9 ^{ab}	133.004	<0.001
CORM-2 6 mg/kg 组	96 \pm 10	38 \pm 3 ^{ab}	37 \pm 4 ^{ab}	82 \pm 10 ^{ab}	129.433	<0.001
F 值	0.457	339.190	244.197	5.271		
P 值	0.836	<0.001	<0.001	<0.001		

注: T₀ 为置管后即刻(或休克前), T₁ 为置管后 1.5 h(或休克 1 h), T₂ 为置管后 2.5 h(或休克 2 h), T₃ 为置管后 3 h(或复苏后);^a 为组间不同时间点,与假手术组相比 $P < 0.05$; ^b 为组内不同时相点,与 T₀ 比较 $P < 0.05$

2.2 各组大鼠回肠组织通透性测定

如表 2 所示,与假手术组相比,休克组、DMSO 组、iCORM-2 组血清中 FITC-葡聚糖浓度增高(均 $P < 0.05$),而 CORM-2 各组,仅 2 mg/



A: 休克前; B: 诱导休克后 1 h; C: 诱导休克后 2 h; D: 复苏后
图 1 休克大鼠不同时相 MAP 的变化
Fig 1 Changes of MAP at different time points in rats with shock

kg 组血清的 FITC- 葡聚糖浓度增高 ($P < 0.05$), CORM-2 其余各组与假手术组比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。与休克组、iCORM-2 组和 DMSO 组相比, CORM-2 各剂量组血清 FITC- 葡

聚糖浓度均降低 (均 $P < 0.05$)。CORM-2 不同剂量组之间比较, 血清 FITC- 葡聚糖浓度差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 但 CORM-2 6 mg/kg 血清中 FITC- 葡聚糖有降低趋势。

2.3 各组大鼠回肠组织病理形态学观察

假手术组大鼠回肠黏膜上皮完整, 腺体结构清晰, 绒毛排列整齐; 休克组大鼠回肠绒毛结构消失, 绒毛表面游离, 肠上皮细胞出现大量坏死, 结构不连续, 破坏明显, 有大量炎症细胞聚集; CORM-2 4 mg/kg 组和 6 mg/kg 组大鼠回肠上皮细胞少量坏死, 绒毛部分节段结构不连续, 未见明显水肿, 较其他休克组明显改善; 见图 2。由表 2 可见, 与假手术组比, 休克各组肠黏膜组织病理 Chiu 评分均升高 (均 $P < 0.05$); 与休克组、iCORM-2 组和 DMSO 组相比较, CORM-2 不同剂量组 Chiu 评分均降低 (均 $P < 0.05$); 但 CORM-2 各剂量组之间比较, 肠黏膜组织病理 Chiu 评分无差异 (均 $P > 0.05$)。

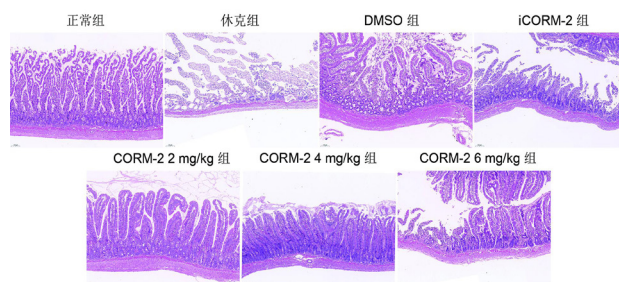


图 2 各组大鼠回肠组织病理改变的比较 (HE 染色, $\times 100$)
Fig 2 Comparison of histopathological changes of ileum of rats in each group (HE staining, original magnification $\times 100$)

2.4 各组大鼠肠黏膜上皮 T-bet、Foxp3 表达

各组大鼠肠黏膜上皮 T-bet、Foxp3 表达情况见图 3。

与假手术组相比, 诱导休克后仅休克组和 DMSO 组肠黏膜淋巴细胞 T-bet 抗原表达升高 (均 $P < 0.05$); iCORM-2 组和 CORM-2 各剂量组 T-bet 抗原与假手术组比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), 均低于休克组 (均 $P < 0.05$); CORM-2 各剂量组 T-bet 抗原表达与 iCORM-2 组比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。见图 4。

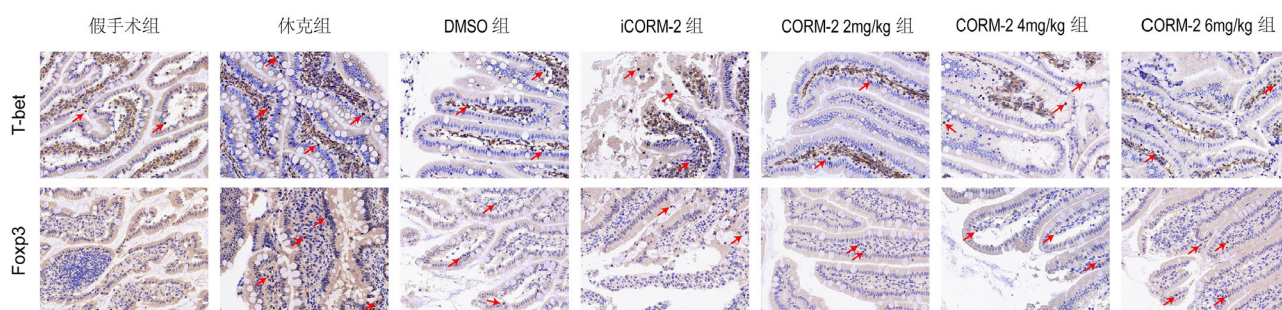
与假手术组比较, 休克组、DMSO 组和 CORM-2 6 mg/kg 组肠黏膜淋巴细胞 Foxp3 抗原表达升高 (均 $P < 0.05$); CORM-2 2 mg/kg 组、CORM-2 4 mg/kg 组及 iCORM-2 组 Foxp3 抗原表达较休克组和 DMSO 组均减低 (均 $P < 0.05$), 但

表 2 各组大鼠血清中 FITC- 葡聚糖浓度及肠黏膜组织 Chiu 评分的比较 (n=8/ 组, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of FITC-dextran concentration in serum and Chiu score in intestinal mucosa of rats in each group (n=8 per group, $\bar{x} \pm s$)

指标	假手术组	休克组	DMSO 组	iCORM 组	CORM-2 2 mg/kg 组	CORM-2 4 mg/kg 组	CORM-2 6 mg/kg 组	H 值	P 值
FITC- 葡聚糖 (μg/mL)	0.020 ± 0.016	5.699 ± 0.438 ^a	4.517 ± 1.571 ^a	5.117 ± 1.519 ^a	0.729 ± 0.396 ^{abcd}	0.454 ± 0.261 ^{bcd}	0.220 ± 0.214 ^{bcd}	27.345	<0.001
Chiu 评分 (分)	0.89 ± 0.66	4.43 ± 0.51 ^{ad}	3.64 ± 1.03 ^a	3.58 ± 0.99 ^a	3.00 ± 1.68 ^{ab}	2.88 ± 0.92 ^{ab}	2.58 ± 1.02 ^{ab}	47.214	<0.001

注：与假手术组相比，^aP<0.05；与休克组相比，^bP<0.05；与 iCORM-2 组相比，^cP<0.05；与 DMSO 组相比，^dP<0.05



箭头所指为细胞核中出现棕黄色，视为阳性细胞

图 3 各组大鼠肠黏膜 T-bet、Foxp3 表达 (免疫组化, 放大倍数 × 400)

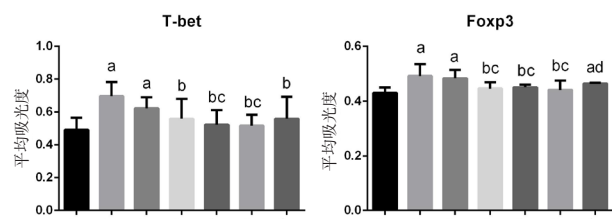
Fig 3 Expression of T-bet and Foxp3 in intestinal mucosa of rats in each group (immunohistochemistry, original magnification × 400)

CORM-2 6 mg/kg 组与休克组或 DMSO 组比较差异无统计学意义 (均 P>0.05); 休克组和 DMSO 组之间 Foxp3 抗原表达差异无统计学意义 (P>0.05)。见图 4。

2.5 各组大鼠回肠组织 IFN-γ、TGF-β、IL-10 蛋白表达水平比较

与假手术组相比，休克组、DMSO 组、iCORM-2 组和 CORM-2 2 mg/kg 组 IFN-γ 表达升高 (均 P<0.05); CORM-2 各剂量组中，仅 CORM-2 6 mg/kg 组较休克组、iCORM-2 组和 DMSO 相比 IFN-γ 表达明显降低 (均 P<0.05)。见图 5。

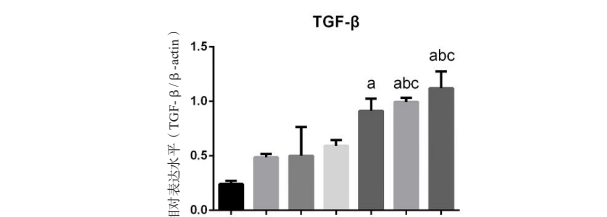
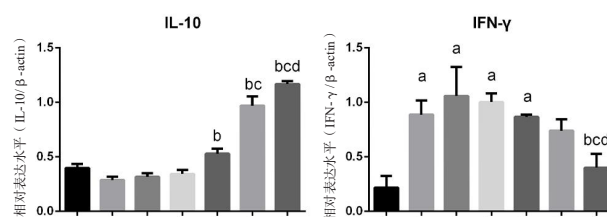
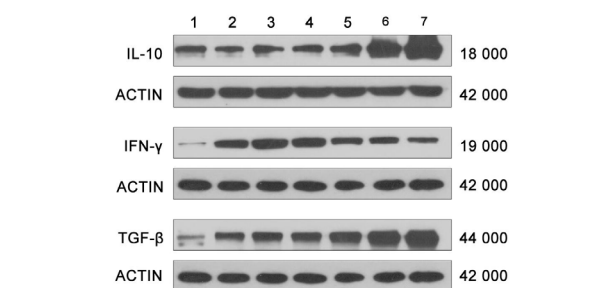
与假手术组比较，仅 CORM-2 各剂量组 TGF-β 蛋白表达升高 (均 P<0.05)，其余各组



1~7 依次为假手术组、休克组、DMSO 组、iCORM-2 组、CORM-2 2 mg/kg 组、CORM-2 4 mg/kg 组、CORM-2 6 mg/kg 组；与假手术组相比，^aP<0.05；与休克组相比，^bP<0.05；与 DMSO 组相比，^cP<0.05；与 iCORM-2 组相比，^dP<0.05

图 4 各组大鼠肠黏膜 T-bet、Foxp3 抗原阳性表达的平均吸光度值比较

Fig 4 Comparison of average optical density of T-bet and Foxp3 antigen-positive expression in intestinal mucosa of rats in each group



1~7 依次为假手术组、休克组、DMSO 组、iCORM-2 组、CORM-2 2 mg/kg 组、CORM-2 4 mg/kg 组、CORM-2 6 mg/kg 组；与假手术组相比，^aP<0.05；与休克组相比，^bP<0.05；与 DMSO 组相比，^cP<0.05；与 iCORM-2 组相比，^dP<0.05

图 5 各组大鼠回肠组织 IL-10、IFN-γ、TGF-β 蛋白相对表达水平比较

Fig 5 Comparison of expression levels of IL-10, IFN-γ, and TGF-β protein in ileum of rats in each group

TGF- β 蛋白表达与假手术组差异无统计学意义(均 $P>0.05$); CORM-2 各剂量组中, 4 mg/kg 组和 6 mg/kg 组 TGF- β 表达高于休克组和 DMSO 组(均 $P<0.05$)。见图 5。

CORM-2 各剂量组 IL-10 蛋白表达均高于休克组(均 $P<0.05$), 4 mg/kg 组和 6 mg/kg 组 IL-10 蛋白表达同时高于 DMSO 组(均 $P<0.05$)。CORM-2 各剂量组中仅 6 mg/kg 组 IL-10 蛋白表达较 iCORM-2 组升高($P<0.05$)。见图 5。

3 讨论

休克是由不同原因引起机体有效循环血量减少、微循环灌注不足、细胞代谢紊乱并可引起多器官功能障碍的临床综合征^[9]。小肠因其独特的肠绒毛毛细血管网的分布特点, 使之对 IRI 高度敏感, 且肠道是休克时最早损伤、最迟恢复的器官^[10]。目前尚缺乏保护肠屏障有效的方法。本研究采用 Wiggers 改良法建立大鼠失血性休克模型, 大鼠维持休克状态 120 min, 休克各组 MAP 均降低, 持续至复苏后。休克大鼠回肠黏膜出现柱状细胞与杯状细胞的缺失, 绒毛结构消失或排列紊乱, 肠上皮大量淋巴细胞浸润。使用 FITC-葡聚糖作为渗透标记物检测回肠黏膜组织通透性, 结果显示失血性休克大鼠肠黏膜组织通透性增加。以上结果提示失血性休克大鼠肠损伤模型构建成功。

内源性 CO 是一种气体信使分子, 合适剂量的 CO 具有抗炎、抗氧化、细胞保护等生理功能^[11]。CORM-2 是一种新型金属羰基化合物, 已被证实能在生理条件下能有效地将 CO 输送到组织中发挥保护作用^[6]。本研究使用不同剂量 CORM-2 干预失血性休克大鼠, 结果显示 CORM-2 干预后休克大鼠回肠黏膜病理损伤减轻, 肠黏膜的通透性较休克组降低, 证实 CORM-2 可有效地保护休克大鼠肠黏膜屏障的完整性。其中 CORM-2 6 mg/kg 对休克大鼠肠黏膜屏障保护作用最强, CORM-2 2 mg/kg 的保护作用较弱。

CO 保护肠屏障机制尚不清楚。越来越多的证据显示肠道相关淋巴组织是肠 IRI 的靶标者, 也是主动参与者^[12]。肠道具有丰富的免疫细胞, 淋巴细胞在肠道 IRI 中发挥重要作用^[4-5]。因此, 淋巴细胞亚群变化及其调节在保护 IRI 肠屏障、减少全身炎症反应保护远隔器官功能、改善休克预后中十分关键。本研究探讨 CORM-2 对休克 IRI 肠道 CD4⁺T

淋巴细胞活化类型及其分泌炎症因子的影响。初始 CD4⁺T 细胞根据分泌的细胞因子和功能不同进一步分化为 Th1、Th2、Th17 和 Treg 细胞。多个信号转导子和转录活化子信号通路分子协调 CD4⁺T 细胞诱导 T-bet 表达, 促进 Th1 细胞的分化^[13]。Th1 细胞是经典促炎因子, 是原生动物的免疫至关重要的一类免疫细胞, 可产生 IFN- γ ^[14]。Treg 细胞是 CD4⁺T 淋巴细胞的另一种辅助性 T 细胞, 表达特征转录因子 Foxp3, 分泌 IL-10、TGF- β 等抑制炎症反应^[15]。本研究结果发现休克大鼠肠黏膜淋巴细胞 T-bet 抗原表达升高, 同时肠黏膜 IFN- γ 表达增高, 提示休克肠 IRI 损伤 Th1 细胞活化, 其促炎介质释放可能参与了肠 IRI 损伤; CORM-2 可能抑制 Th1 细胞活化, 减轻了休克大鼠肠黏膜炎症因子如 IFN- γ 的释放, 减轻缺血肠壁损伤; 本研究结果与 Nikolic 等^[16]研究基本一致。

值得注意的是, 本研究除证实 CORM-2 能够抑制促炎因子 IFN- γ 的释放外, 还可上调抗炎因子 IL-10 和 TGF- β 的表达, 提示 CORM-2 对休克缺血肠壁的炎症损伤具有抗炎效应。Magierowska 等^[17]研究证实 CO 通过上调 IL-10 和 TGF- β 发挥抗炎效应促进胃溃疡愈合, 与本研究结果一致。总之, 以上的证据提示 CO 可抑制促炎 Th1 细胞活化引起的炎症反应, 或通过促进抗炎因子的释放, 减轻失血性休克大鼠缺血肠黏膜的过度激活的炎症反应, 保护肠道。然而, 本结果提示 CORM-2 并非增加缺血肠黏膜 Treg 细胞活化, 增加抗炎因子 IL-10 和 TGF- β 表达, 发挥抑制缺血肠壁炎症反应的效应。本研究分析 CORM-2 促进 IL-10 和 TGF- β 抗炎因子的表达并不依赖于 Treg 的活化, 可能是由其他免疫细胞产生, 其具体机制尚待阐明。

综上所述, CORM-2 可有效保护失血性休克大鼠肠黏膜屏障, 抑制 Th1 促炎细胞的活化, 降低 IFN- γ 促炎因子表达。CORM-2 增加 IL-10、TGF- β 等抗炎因子表达, 减轻缺血肠壁炎症, 保护肠屏障。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 牛庆晨: 实验操作、论文撰写; 张瑞、陈磊: 数据收集及整理、统计学分析; 王晓红: 研究设计、论文修改

参 考 文 献

[1] Assimakopoulos SF, Triantos C, Thomopoulos K, et al. Gut-origin

- sepsis in the critically ill patient: Pathophysiology and treatment[J]. *Infection*, 2018, 46(6): 751-760. DOI:10.1007/s15010-018-1178-5.
- [2] Rizk FH, Abdel Ghafar MT, Soliman NA, et al. Vildagliptin recruits regulatory T cells in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention[J]. *Immunol Invest*, 2018, 47(6): 583-592. DOI: 10.1080/08820139.2018.1467927.
- [3] Zheng Y, Song T, Zhang L, et al. Immunomodulatory effects of T helper 17 cells and regulatory T cells on cerebral ischemia[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2018, 32(1): 29-35.
- [4] Yang XK, Bai H, Wang YC, et al. Deletion of regulatory T cells supports the development of intestinal ischemia-reperfusion injuries[J]. *J Surg Res*, 2013, 184(2): 832-837. DOI:10.1016/j.jss.2013.05.014.
- [5] Geha M, Tsokos MG, Bosse RE, et al. IL-17A produced by innate lymphoid cells is essential for intestinal ischemia-reperfusion injury[J]. *J Immunol*, 2017, 199(8): 2921-2929. DOI:10.4049/jimmunol.1700655.
- [6] Magierowska K, Korbut E, Hubalewska-Mazgaj M, et al. Oxidative gastric mucosal damage induced by ischemia/reperfusion and the mechanisms of its prevention by carbon monoxide-releasing tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 145: 198-208. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.032.
- [7] 王晓红, 刘芳, 张胜, 等. 一氧化碳释放分子 2 对休克大鼠肠黏膜上皮屏障的保护作用[J]. *中华急诊医学杂志*, 2019, 28(1): 50-55. DOI:10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2019.01.010.
- [8] Chiu CJ, McArdle AH, 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. DOI:10.1001/archsurg.1970.01340280030009.
- [9] Cannon JW. Hemorrhagic shock[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(19): 1852-1853. DOI:10.1056/NEJMc1802361.
- [10] Ge P, Luo YL, Okoye CS, et al. Intestinal barrier damage, systemic inflammatory response syndrome, and acute lung injury: A troublesome trio for acute pancreatitis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132: 110770. DOI:10.1016/j.biopha.2020.110770.
- [11] Adach W, Olas B. Carbon monoxide and its donors - their implications for medicine[J]. *Future Med Chem*, 2019, 11(1): 61-73. DOI:10.4155/fmc-2018-0215.
- [12] Qiu Y, Yu M, Yang Y, et al. Disturbance of intraepithelial lymphocytes in a murine model of acute intestinal ischemia/reperfusion[J]. *J Mol Histol*, 2014, 45(2): 217-227. DOI:10.1007/s10735-013-9544-1.
- [13] Fu JX, Yang TS, Wang W, et al. Effect of selenium antagonist lead-induced damage on Th1/Th2 imbalance in the peripheral blood lymphocytes of chickens[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 175: 74-82. DOI:10.1016/j.ecoenv.2019.03.036.
- [14] Krueger PD, Goldberg MF, Hong SW, et al. Two sequential activation modules control the differentiation of protective T helper-1 (Th1) cells[J]. *Immunity*, 2021, 54(4): 687-701.e4. DOI:10.1016/j.immuni.2021.03.006.
- [15] Bertolini TB, Biswas M, Terhorst C, et al. Role of orally induced regulatory T cells in immunotherapy and tolerance[J]. *Cell Immunol*, 2021, 359: 104251. DOI:10.1016/j.cellimm.2020.104251.
- [16] Nikolic I, Vujicic M, Stojanovic I, et al. Carbon monoxide-releasing molecule-A1 inhibits Th1/Th17 and stimulates Th2 differentiation in vitro[J]. *Scand J Immunol*, 2014, 80(2): 95-100. DOI:10.1111/sji.12189.
- [17] Magierowska K, Bakalarz D, Wójcik D, et al. Time-dependent course of gastric ulcer healing and molecular markers profile modulated by increased gastric mucosal content of carbon monoxide released from its pharmacological donor[J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 163: 71-83. DOI:10.1016/j.bcp.2019.02.011.

(收稿日期: 2021-07-15)

(本文编辑: 姜宇婷)