

·综述·

新生儿坏死性小肠结肠炎发病机制的研究进展

芦惠 综述, 薛辛东 审校

(中国医科大学附属第二医院儿科, 辽宁 沈阳 110004)

[中图分类号] R722 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2004)03-0239-03

新生儿坏死性小肠结肠炎(necrotizing enterocolitis, NEC)是新生儿期最常见和最严重的疾病之一。早产、肠道喂养和感染^[1]等诸多因素可导致此病。虽然由于肺表面活性物质的应用及医疗水平的提高,许多小早产儿得以存活,但过去30年NEC的发病率并未下降。原因是NEC的发病机制尚不十分清楚。20世纪80年代以来,随着分子生物学的迅速发展,对NEC的发病机制有了更深的认识。现将有关研究及进展情况综述如下。

1 损伤机制

1.1 血小板活化因子

血小板活化因子(platelet-activating factor, PAF)是一种具有广泛生物活性的内源性磷脂介质,其合成受磷脂酶A₂(PLA₂)调控。PAF来源于炎性细胞(巨噬细胞、肥大细胞、中性粒细胞、上皮细胞)、内皮细胞、血小板等,在NEC的发病机制中起关键作用。

实验表明,注射大剂量PAF,大鼠可迅速发生肠坏死。坏死一般呈局灶性,可累及空肠、回肠(尤其是远端回肠)和/或盲肠,超大剂量时整个小肠受累;坏死从绒毛顶部开始,渐至绒毛大部,有时侵及粘膜下层甚至浆膜层^[1]。而PAF拮抗剂可预防因内毒素、缺氧或肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)引起的肠损伤。有人在新生鼠NEC模型中预先应用PAF-R拮抗剂WEB 2170和WEB 2086,结果发现适量WEB 2170能明显降低新生鼠NEC发生率和死亡率;而过高剂量WEB 2170对PAF受体(PAF-R)有兴奋作用,反而不能减少NEC的发生^[2]。进一步研究表明,新生鼠经肠道摄入人重组PAF乙酰水解酶(rPAF-AH, 80 U)后,肠道

PAF-AH活性明显增加,NEC发生率(6/26)较对照组(19/26)显著减少^[3]。临床研究也显示NEC患儿血浆PAF水平 13.6 ± 6.9 ng/ml较对照组 2.03 ± 1.96 ng/ml明显增高^[4]。上述研究结果提示,内源性PAF可能是NEC发生的关键介质之一。

1.2 脂多糖和TNF

PAF能改变肠上皮细胞骨架结构,引起E-钙粘连素(粘连带上皮细胞膜结构)酪氨酸磷酸化,导致肠粘膜通透性增加,促进细菌产物如脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)从肠腔进入组织,引起炎性介质失控性释放,促进NEC的发生^[5]。有研究证实,肠道内毒素在PAF引起的休克和肠坏死中起主要作用^[1]:①抗内毒素小鼠可抵御PAF引起的肠损伤;②无菌大鼠能防止PAF产生的休克和肠损伤,用内源性LPS预处理后其防御机能丧失;③用结合抗体减少肠道细菌,在很大程度上使大鼠免于PAF引起的损伤。实验表明,只有大剂量LPS(>5 mg/kg)才可导致低血压和肠坏死;而LPS是PAF的有效促进剂,小剂量LPS(0.5 mg/kg)与小剂量PAF协同作用,即能引起肠损伤。可见此效应由内源性PAF介导^[1]。

TNF有多种促炎功能:激活多形核白细胞(PMN)和内皮细胞;诱导产生内皮细胞和白细胞粘附分子;促进中性粒细胞向内皮细胞迁移;产生前列腺素、血栓素、白三烯和PAF等细胞因子和磷脂介质。TNF与LPS协同作用,加重肠损伤。给大鼠静脉注射TNF(1 mg/kg)可引起低血压和轻度肠损伤;而联合应用TNF(0.5 mg/kg)和LPS(200 mg/kg),则导致严重休克和肠坏死^[1]。给予TNF/LPS后可检测到PAF,而预先注射PAF-R拮抗剂能预防TNF/LPS引起的休克、肠损伤和死亡,提示PAF可能是TNF/LPS的内源性介质。

1.3 粘附分子

白细胞迁移是炎症反应、损伤的重要病理环节,这种迁移是血液细胞和血管内皮细胞相互作用的结果,而粘附分子在这一过程中发挥作用。动物实验证实,以 PMN 活化和多形核白细胞-血管内皮细胞粘附为特征的急性炎症反应是 PAF 作用后的始发机制。激活的 PMN 表面可表达选择素,增加 PMN 和内皮细胞之间的亲和力,进而形成 PMN 和内皮细胞的滚动和粘附;而牢固的粘附、聚集主要由粘附分子白细胞 β_2 整合素,特别是 CD11b/CD18 介导。预先用抗 CD11b 或抗 CD18 抗体治疗,可明显防止 PMN 粘附,减轻 PAF 造成的肠损伤^[6]。Sun 等^[7]发现 P-选择素缺乏小鼠和经岩藻素(选择素的有效抑制剂)治疗后细胞间粘附分子(ICAM-1)缺乏小鼠也可抵御 PAF 造成的损害,表明粘附分子在肠损伤中的重要作用。

1.4 活性氧

PAF 的终末作用环节很可能是通过活性氧(reactive oxygen species, ROS)完成。肠道主要 ROS 来自黄嘌呤脱氢酶/黄嘌呤氧化酶系统(XD/XO)。XD 是 XO 的前体,在回肠绒毛上皮细胞表达丰富,能催化次黄嘌呤向黄嘌呤及黄嘌呤向尿酸的转化,同时 NAD^+ 转化为 NADPH; XO 利用分子氧,产生高活性的超氧化物,在肠损伤中发挥作用。Qu 等^[8]研究证实,PAF 可通过蛋白水解作用使 XD 向 XO 转化,回肠中 XO 活性增加,这种改变在肠系膜血流恢复前即已发生。在静脉注射 PAF 前用别嘌呤醇 10mg/kg 干预,可明显防止 PAF 引起的 XO 活化和肠损伤。

1.5 NF- κ B

静息状态下, NF- κ B 结合蛋白以无活性形式存在于胞浆中(I κ B)。当细胞受到 TNF- α 刺激时,胞浆中 I κ B 发生磷酸化,继而降解成有活性的 p50/p65, p50/p50 异、同二聚体。活体内脏是 TNF 的主要来源,正常肠道潘氏细胞(Paneth cells, 富含 PLA₂-IIA, 可被 PAF 上调)TNF 表达水平非常低。在 NEC 急性期,肠壁中潘氏细胞、固有层嗜酸细胞和浸润的巨噬细胞 TNF 基因转录明显增强。静脉注射 LPS(8 mg/kg)可激活大鼠 NF- κ B 二聚体 p50/p50 和 p50/p65 的转录。PAF 拮抗剂 WEB 2170 和抗 TNF- α 抗体可部分阻断 LPS 的效应,提示 LPS 通过内源性 PAF 和 TNF- α 介导发挥作用^[9]。转录因子 NF- κ B 可上调许多促炎因子。De Plaen 等^[10]对注射了 PAF 鼠回肠上皮细胞核提纯物进行分析后发现,在尚不足以造成休克和肠坏死

的剂量(1.5 $\mu\text{g/kg}$)时, PAF 即能迅速增加 NF- κ B DNA 结合活性,激活 p50 亚单位;同时免疫组化显示 PAF 可诱导 p50 向上皮细胞核迁移。

NF- κ B 的作用尚不清楚。对穿孔性 NEC 患儿小肠切除标本和邻近正常肠组织分析显示,穿孔标本诱生型环氧合酶(COX-2)蛋白提纯物表达较正常小肠明显增加; NEC 标本中 I κ B 迅速降解,进而活化 NF- κ B 的结合活性,激活下游靶基因 COX-2。提示 COX-2/NF- κ B 在 NEC 发生机制中发挥一定作用,阻断这一途径的制剂或许能抑制 NEC 的发生^[11]。

2 防御机制

2.1 一氧化氮和神经型一氧化氮合酶

内源性一氧化氮(NO)由一氧化氮合酶(NOS)催化生成。根据 NOS 的生物学特性和编码基因,将 NOS 分为两类三型。神经型(I型)nNOS 和内皮型(III型)eNOS 属于原生型 NOS(cNOS);巨噬细胞型(II型)属于诱生型 NOS(iNOS)。小肠中 90% 以上是 nNOS;正常肠上皮滤泡细胞也存在 iNOS,但它不足 NOS 总活性的 10%,而 eNOS 在肠道中几乎测不出^[12]。

内源性 NO 是维持肠道生理功能及肠道抗损伤的关键因素。许多研究均证实了 NO 的保护作用:①用非特异性 NOS 抑制剂 N^G-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)预处理,抑制大鼠 NO 生成,能加重毛细血管渗出和中性粒细胞浸润,加重 PAF 引起的肠损伤^[13]。②预先用特异性 iNOS 抑制剂 S-异甲基硫脲、NO 供体 3-吗啉-斯得酮亚胺(3-morpholinonitrosydnonimine)治疗,肠道中 cNOS 的活性与组织损伤程度呈负相关;只有 cNOS 具备较高活性时, iNOS 抑制剂才能减轻 PAF 引起的损伤;NO 供体可明显减轻 PAF 引起的肠损伤。提示 cNOS 和 iNOS 在 PAF 引起的肠损伤中作用不同^[12]。另外,许多研究进一步证实,NO 有助于维持粘膜屏障和微血管系统的完整性,增加血流,抑制白细胞和内皮细胞的粘附^[14]。

2.2 双歧杆菌和多价不饱和脂肪酸

双歧杆菌为健康母乳喂养儿肠道中的优势菌,在抑制肠道致病菌的侵袭、调整肠道正常菌群方面有重要意义。动物实验证实^[15],每天经胃管给予新生大鼠 10^9 个幼稚双歧杆菌,其 NEC 发生率(7/24)较对照组(19/27)明显减少;治疗组新生鼠粪便和肠腔中可检测到双歧杆菌,而对照组则否;双歧杆菌可明显降低实验组血浆内毒素水平 21 ± 3 EU/ml,对照组为 191 ± 31 EU/ml;亦可明显降低实验组肠道

PLA₂-II 的基因表达 42 ± 29 mol/mg, 对照组为 785 ± 310 mol/mg。显示双歧杆菌通过改变 PAF 代谢和菌群移位来减少 NEC 的发生。

多价不饱和脂肪酸(PUFA), 尤其是 ω -3 鱼油制剂对炎症连锁反应的作用已得到广泛认可。Caplan 等^[16]用添加花生四烯酸(34 mg/100ml)和二十二碳六烯酸(23 mg/100ml)的配方乳经口胃管喂养新生鼠, 结果显示, PUFA 虽不能影响肠上皮凋亡, 但可明显减少 NEC 的发生(8/24, 对照组为 17/24); 生后 24 h 肠道 PLA₂ 基因表达降低; 48 h 血浆内毒素水平明显降低, 肠道 PAF-R 表达减少; 提示 PUFA 能够减轻新生鼠肠道炎症反应, 减少 NEC 的发生。

3 结论

引起 NEC 连锁反应的始动因素可能是围产期缺氧或轻度感染, 两者均可导致肠粘膜轻微受损。配方乳喂养后引起肠道菌群增殖, 藉不完善的粘膜屏障, 细菌到达受损的肠上皮, 诱发产生内源性 PAF(及 PAF 样磷脂)和 TNF。在粘膜功能不成熟或轻度受损的情况下, 细菌紧邻肠上皮细胞, 促使 PAF 跨细胞渗透至粘膜。如果 PAF-AH 水平低下(早产儿), PAF 在局部积聚, 肠上皮通透性增加, 引起局灶性粘膜渗漏及细菌和细菌产物侵入。而后 PAF 与 LPS 和/或 TNF 协同作用, 触发炎症连锁反应: PMN 激活后与内皮细胞粘附, 血管通透性增加, 补体活化, NF- κ B 转录, 促炎细胞因子和粘附分子产生, ROS 和炎性介质(LTC₄, 前列腺素和 PAF)释放, 引起血管收缩, 导致缺血和继发性再灌注损伤。缺血和/或蛋白酶活化后进一步激活黄嘌呤氧化酶, 产生大量 ROS。最终结果取决于损伤机制和防御机制的平衡。若前者占优势将造成粘膜屏障严重受损和细菌大量入侵, 形成恶性循环, 引起休克、败血症, 甚至死亡。

【参 考 文 献】

[1] Hsueh W, Caplan MS, Qu XW, Tan XD, De Plaen IG, Gonzalez-Crussi F. Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts [J]. *Pediatr Dev Pathol*, 2003, 6(1): 6-23.
[2] Caplan MS, Hedlund E, Adler L, Lickerman M, Hsueh W. The platelet-activating factor receptor antagonists WEB2170 prevents neonatal necrotizing enterocolitis [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1997, 24(3): 296-301.

[3] Caplan MS, Lickerman M, Adler L, Dietsch GN, Yu A. The role of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis [J]. *Pediatr Res*, 1997, 42(6): 779-783.
[4] Rabinowitz SS, Dzakpasu P, Piccub S, Leblanc P, Valencia G, Komecki K. Platelet-activating factor in infants at risk for necrotizing enterocolitis [J]. *J Pediatr*, 2001, 138(1): 81-86.
[5] Tan XD, Chang H, Qu XW, Caplan MS, Gonzalez-Crussi F, Hsueh W. PAF increases mucosal permeability in rat intestine via tyrosine phosphorylation of E-cadherin [J]. *Br J Pharmacol*, 2000, 129(7): 1522-1529.
[6] Sun XM, Qu XW, Huang W, Granger DIV, Bree M, Hsueh W. Role of leukocyte beta 2-integrin in PAF-induced shock and intestinal injury [J]. *Am J Physiol*, 1996, 270(1 Pt 1): G184-G190.
[7] Sun XM, Rozenfeld RA, Qu XW, Huang W, Gonzalez-Crussi F, Hsueh W. P-selectin-deficient mice are protected from PAF-induced shock, intestinal injury, and lethality [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(1 Pt 1): G56-G61.
[8] Qu XW, Rozenfeld RA, Huang W, Bulkey GB, Hsueh W. Roles of xanthine oxidase in platelet activating factor induced intestinal injury in the rat [J]. *Gut*, 1999, 44(2): 203-211.
[9] De Plaen IG, Tan XD, Chang H, Wang L, Kernik DG, Hsueh W. Lipopolysaccharide activates nuclear factor κ B in rat intestine: role of endogenous platelet-activating factor and tumour necrosis factor [J]. *Br J Pharmacol*, 2000, 129(2): 307-314.
[10] De Plaen IG, Tan XD, Chang H, Qu XW, Lin QP, Hsueh W. Intestinal NF- κ B is activated mainly as p50 homodimers, by platelet-activating factor [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1392(2-3): 185-192.
[11] Chung DH, Ethridge RT, Kim S, Owens-Stovall S, Hernandez A, Kelly PR, et al. Molecular mechanisms contributing to necrotizing enterocolitis [J]. *Ann Surg*, 2001, 233(6): 835-842.
[12] Qu XW, Rozenfeld RA, Huang W, Sun Min, Tan XD, Hsueh W. Roles of nitric oxide synthases in platelet-activating factor-induced intestinal necrosis in rats [J]. *Crit Care Med*, 1999, 27(2): 356-364.
[13] MacKendrick W, Caplan MS, Hsueh W. Endogenous nitric oxide protects against platelet-activating factor-induced bowel injury in the rat [J]. *Pediatr Res*, 1993, 34(2): 222-228.
[14] Kubes P, McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation [J]. *Am J Med*, 2000, 109(2): 150-158.
[15] Caplan MS, Miller-Catchpole R, Kaup S, Russell T, Lickerman M, Amer M, et al. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model [J]. *Gastroenterol*, 1999, 117(3): 577-583.
[16] Caplan MS, Russell T, Xiao Y, Amer M, Kaup S, Jilling T. Effect of polyunsaturated fatty acid (PUFA) supplementation on intestinal inflammation and necrotizing enterocolitis (NEC) in a neonatal rat model [J]. *Pediatr Res*, 2001, 49(5): 647-652.

(本文编辑: 吉耕中)