

基于肠干细胞治疗脓毒症肠屏障功能障碍的研究进展

梁 群 贾 璇 潘郭海容 田 圆 王瀚黎

〔作者简介〕 梁群,黑龙江中医药大学附属第一医院急诊、重症医学科主任,急诊教研室主任。中华人民共和国教育部 2019 年度“长江学者奖励计划”特岗学者,二级教授,主任医师,博士、博士后导师。2016 年被黑龙江省卫生和生育计划委员会(现黑龙江省卫生健康委员会)、黑龙江省人力资源和社会保障厅、黑龙江省中医药管理局评为黑龙江省第五批名中医。2018 年经黑龙江省卫生和计划生育委员会、中共黑龙江省委宣传部、黑龙江省精神文明建设办公室、黑龙江省总工会授予“龙江名医”称号。主要从事中西医结合治疗急危重症研究。发表核心期刊论文近百篇,出版著作 17 部,主持科研项目 22 项,获得科技奖项共 13 项。

摘 要 脓毒症是急危重症领域的常见病和多发病,肠屏障功能障碍(intestine barrier functional disturbance,IBFD)是脓毒症患者最常见且严重的并发症,脓毒症相关 IBFD 主要是由肠上皮细胞损伤及肠道缺血、血流灌注不足引起的。肠干细胞(intestinal stem cell,ISCs)是一种未分化的细胞,是体内平衡损伤后新上皮细胞的来源,因其具有增殖、再生、转化为分化细胞和修复受损组织的能力,对于治疗 IBFD 具有重要意义。本文聚焦于在治疗脓毒症相关 IBFD 中扮演重要角色的 ISCs,旨在挖掘基于 ISCs 治疗脓毒症相关 IBFD 的方法及机制,探究现阶段治疗措施,希望对未来脓毒症患者的研究和治疗提供新思路。

关键词 肠干细胞 脓毒症 肠屏障功能损伤

中图分类号 R278 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.10.003

脓毒症是由于感染引起宿主免疫失调反应而导致脏器功能衰竭的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome,SIRS),亦是引发多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome,MODS)的主要原因。每年罹患脓毒症的患者为(1900~4890)万,发生率和病死率持续上涨,约占全球死亡人数的 20%,是全球性的健康危机^[1]。长期以来,肠道一直被认为是脓毒症 MODS 的发动机,肠道受损后,内毒素从肠内转移到循环中,加重脓毒症^[2,3]。因此,探究脓毒症相关肠功能损伤机制及基于肠干细胞(intestinal stem cell,ISCs)治疗脓毒症肠屏障功能障碍(intestine barrier functional disturbance,IBFD)的方法,对提高脓毒症患者治愈率及改善预后生存质量具有现实意义。

正常肠黏膜屏障由机械屏障、化学屏障、免疫屏障、生物屏障构成,对维持机体正常运转起重要作用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81974557,81774276);黑龙江中医药大学校级科技创新研究平台项目(2018pt06);黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”科研项目(2018RCL16)

作者单位:150040 哈尔滨,黑龙江中医药大学

通信作者:贾璇,电子信箱:m17603601279@163.com

脓毒症导致肠黏膜屏障结构发生一系列病理生理变化:肠内稳态破坏,分泌产生肠道蛋白水解酶,肠微生物群组成改变,上皮通透性增加,黏膜机械、化学屏障功能受损,肠内毒素穿过肠屏障到达其他无菌器官定植、过度生长,生物屏障结构改变,引发感染,破坏免疫屏障,出现 SIRS、MODS,危及患者生命。

一、肠干细胞概述

肠干细胞(intestinal stem cell,ISCs)是一种未分化且具有高核质比的隐窝底部柱状细胞(crypt base columnar cells,CBC),因其具有增殖、再生、转化为分化细胞和产生组织的能力一直备受关注。干细胞区域的组成包括:位于隐窝底部 +1~+3 位置、+4 位置的 CBC 以及潘氏(Paneth)细胞^[4]。+4 位置的细胞长时间呈现类静止状态,作为功能性干细胞贮备库,在组织损伤或 CBC 缺失情况下激活其“干性”,再次进入分裂状态;Paneth 细胞通过维持 ISCs 生态位影响其增殖、分化^[5]。Paneth 细胞和 +4 位置 CBC 共同维持 ISCs 动态平衡。

根据特性可将 ISCs 分为两大群体:活跃增殖的 aISC(actively proliferating intestinal stem cell)和缓慢增殖的储备 rISC(reserve or more quiescent intestinal stem cell)^[6]。有实验表明,肠道周转率很大程度上

取决于 ISCs 的自我更新,即细胞在活跃循环和静止表型之间的转换,aISC 介导正常情况下的肠上皮更新,rISC 在组织损伤时完成特定再生任务^[7]。

ISCs 具有两个显著特点,一是产生多谱系分化的子代细胞,二是长期保持自我更新。ISCs 产生一个高度增殖的转扩细胞池,细胞向上迁移到绒毛,并分化为两个主要的细胞谱系,用于吸收食物的吸收系细胞和用于分泌激素的分泌系细胞^[8]。正常情况下,肠上皮细胞通过 ISCs 分化的子代细胞,每 3~5 天更新一次;当肠道受损时,即使 ISCs 数量减少,若 Paneth 细胞和 +4 位置 CBC 受损相对较轻,依然能够恢复肠道功能,维持肠道内稳态。在修复肠上皮的过程中,Paneth 细胞通过 Wnt 配体与 Frizzled 受体及其共受体复合物低密度脂蛋白受体相关蛋白 5/6 结合,与 T 淋巴细胞因子相互作用,识别下游的靶基因,激活 rISC,使其“休眠”状态转为活跃状态,加速修复肠上皮黏膜,通过恢复上皮细胞更新,完成 ISCs 生态位重建^[9]。与此同时,Notch 信号对肠道祖细胞的增殖和分化有调节功能,通过作用于 *olfactomedin4* 基因,抑制转录因子 *Atoh1* 表达,引导祖细胞分化,增加其数量,达到满足 ISCs 增殖的目的^[10]。

在 ISCs 增殖、分化和凋亡的过程中,受到肠道多重信号的影响,依赖于不同信号途径的相互作用,以维持 ISCs 的稳态,各通路交织成为信号通路网,调控 ISCs 的增殖和分化,使肠道内各细胞群处于稳定状态。

二、脓毒症相关肠屏障功能障碍

脓毒症对相关肠屏障功能障碍(intestine barrier functional disturbance,IBFD)的影响主要包括两个方面,其一是脓毒症引起细胞凋亡、坏死,最终导致肠缺血,诱发坏死性 IBDF;其二是感染造成的炎症反应损伤黏膜上皮,增加肠黏膜通透性,造成持续进行性 IBDF。

1. 坏死性 IBDF:脓毒症对肠屏障功能损伤分 3 个阶段推进。第 1 阶段损伤是内脏灌注不足或缺血;第 2 阶段损伤是复苏期间肠血流的恢复,导致缺血-再灌注损伤;第 3 阶段损伤是肠屏障功能的丧失,出现肠系膜微循环障碍,造成坏死性损伤。脓毒症主要病理机制是“招募”炎症细胞,产生过度促炎反应^[11]。脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)、肽聚糖以及损伤相关分子模式(damage associated molecular patterns,DAMPs),包括线粒体 DNA、高流动性组蛋白 B1 和血清淀粉样蛋白 A 等,导致肠内皮黏附因子水平随中

性粒细胞和巨噬细胞增加而上调,这些一线防御细胞在肠道中产生大量促炎性细胞因子,引发炎症反应,引起细胞大量凋亡和坏死,导致肠道血液灌注不足及回流障碍,引起肠缺血性损伤^[12]。肠道局部缺血早期始于表层,后向肠壁深部发展,肠系膜血流量突然减少或中断,破坏肠内动态平衡,近端循环中内脏血流量的减少导致深度缺血,甚至诱发肠局部坏死,形成不可逆的缺血性 IBDF。

2. 进行性 IBDF:病原相关分子入血后,启动病原相关分子模式,脂多糖结合蛋白识别 LPS,并与 Toll 样受体 4(TLR4)结合,活化 NF- κ B、MAPK 信号通路,引起级联反应,释放大量的炎症介质,发生炎症反应^[13]。重症患者机体防御系统本就脆弱,在这种情况下,机体防御系统“重新编程”,既无法消除原发感染,也无法防止继发感染^[14]。凋亡和坏死机制损害黏膜上皮,导致 DAMPs 进一步释放,这种恶性循环延续到后续的炎症反应中,导致溃疡和出血增加,使黏膜稳态失衡加剧^[15]。黏膜稳态失衡,异常激活肠道免疫细胞,改变控制细胞间紧密连接的调节因子^[16]。脓毒症大鼠模型中,可以观察到紧密连接蛋白和封闭蛋白 claudin-1、3、4、5 和 8 重新排布,肠上皮内紧密连接蛋白和内皮屏障功能调节因子 zonulin-1 超微结构中断,肠道通透性增加,肠内相关致病因子大量易位,由此产生促炎性细胞因子,发生局部肠道炎症反应^[17]。微循环再灌注恢复后,肠道内 DAMPs 首先被吸收到肠系膜淋巴系统,经由肠系膜淋巴管排入乳糜池,在左锁骨下静脉进入体循环^[18]。肺动脉是 DAMPs 经由肠系膜淋巴管到达的第一个血管,因此,肺也是脓症患者最常见的受累器官;DAMPs 进入体循环后,全身细胞-趋化因子反应的过度释放,造成急性肾损伤;线粒体功能障碍及内质网应激导致肝衰竭^[19]。由此,脓毒症造成持续进行性 IBDF 的同时,也伴随各器官的急性损伤,造成 MODS 甚至多器官功能衰竭,反向加速脓毒症进展^[20,21]。

三、脓毒症对 ISCs、IBFD 影响及相关治疗

脓毒症对 ISCs 及 IBFD 影响主要涵盖两个基础点:炎症细胞因子通过信号通路影响 ISCs 活性,降低其修复黏膜损伤速度;灌注不足造成肠缺血性损伤影响 ISCs 数量,加重黏膜损伤程度。因此,可以基于以上两点探究脓毒症相关 IBFD 的 ISCs 靶向治疗模式。

1. 炎症细胞因子影响 ISCs 活性:炎症细胞因子通过信号通路影响 ISCs 活性。 PI_3K/Akt 通路是一个

信号转导酶家族,可调节细胞增殖和存活率,在炎症反应中发挥着负性调节作用;Hippo 通路对于调控组织器官的大小和生长至关重要,YAP 蛋白作为 Hippo 通路中的核心因子,控制生物器官发育和调控细胞生长^[22,23]。

脓毒症期间,肠道中内毒素刺激 PI₃K/Akt 通路,诱导产生三磷酸磷脂酰肌醇,Hippo/YAP 信号通路活性被其抑制,当 Hippo 信号失活时,LATS1/2 激酶失活,YAP 蛋白不能被磷酸化,YAP 蛋白转移进入细胞核,结合调控转录靶基因的表达,降低 ISCs 增殖分化速度,导致黏膜修复速度减缓,加重肠道受损程度、加剧脓毒症病情发展^[24]。

同时,炎症细胞因子通过改变 ISCs 对称分裂模式影响其活性^[25]。ISCs 在争夺生态位空间、加速增殖分化时主要发生对称分裂,脓毒症期间,肠黏膜上皮细胞被破坏,大量炎症细胞因子诱导 ISCs 发生不对称分裂,导致分裂模式紊乱,生成分化潜能低、甚至无分化能力的无效子细胞,具有“干性”的 ISCs 数量减少,延缓上皮黏膜修复速度,加速病情恶化。

2. 灌注不足造成肠缺血性损伤影响 ISCs 数量:随着缺血时间延长,进行性上皮损伤逐渐向隐窝延伸。短暂缺血 1~2h 后,再灌注加剧上皮损伤;缺血 3h 后,隐窝组织学损伤逐渐明显,ISCs 数量有所减少,绒毛上皮完全丧失;缺血持续 4h 后,隐窝上皮近乎完全丢失,隐窝上皮细胞的数量明显减少^[26,27]。脓毒症造成肠缺血性损伤通常大于 4h,对隐窝的严重损伤已经形成,ISCs 数量锐减,无法进行有效的增殖分化。脓毒症期间,肠道组织严重缺氧,上皮细胞中的细胞外泌体微 RNA-34a 增加,加速 ISCs 不对称分裂,使具有“干性”的 ISCs 数量快速减少,ISCs 自我更新和分化能力减弱,无法及时替代凋亡的肠黏膜上皮细胞,屏障功能得不到修复,相关 IBFD 加剧。

3. 基于 ISCs 的治疗:ISCs 移植是重建 IBFD 患者上皮屏障的一种新型治疗方法。有实验表明,ISCs 可以进行体外类器官培养,与活体中的肠上皮相似,类器官同样拥有隐窝、绒毛区及由 ISCs 增殖分化的各类上皮细胞^[28,29]。为降低组织排斥风险,可以通过内镜活检从 IBFD 患者的健康肠组织中收集 ISCs,同时筛查与脓毒症相关的突变基因,降低移植后肠道恶化风险,用建立的类器官培养法进行体外扩增,培养到所需数量的细胞后,通过内镜移植到目标部位。后期通过评估证实,与患者器官样培养基比较,类器官簇状、杯状细胞表达率更高,最新的

临床评估认为,这种治疗方法值得深入研究并大规模推广^[30]。

四、展 望

肠道被认为是系统性炎症反应的来源和 MODS 的“引擎”,对肠屏障功能的病理生理学解释还在随着时间而不断更迭。肠道作为脓毒症患者最先出现相应临床症状的器官,肠黏膜上皮损伤导致 IBFD,从局部微循环障碍发展为全身炎症反应、免疫抑制,最终导致机体出现 MODS。近年来,随着对脓毒症 IBFD 的深入理解,治疗重点已从单纯的抗炎抗感染转至修复肠黏膜细胞、纠正黏膜功能障碍的多靶点治疗,人们越来越需要找到安全、可行的方式,以恢复或预防脓毒症患者出现 IBFD。

综上所述,ISCs 是参与 IBFD 应答的主要靶细胞之一,不仅是肠道炎症反应中被动的靶细胞,也是一种效应细胞;不单具有修复受损肠黏膜、改善肠道缺血、保护肠组织的作用,在严重感染反应造成的 IBFD 中,还能起到调节内皮细胞功能等保护机制。故而,靶向 ISCs 治疗将从根本上调整脓毒症患者相关 IBFD 的治疗策略,大幅度提高脓毒症患者复苏成功率,最终降低脓毒症、脓毒性休克及 MODS 的病死率,改善预后生存质量。因此,基于 ISCs 疗法的研究有望成为医学、药学和生命科学等的前沿领域。

参考文献

- 1 Chiu C, Legrand M. Epidemiology of sepsis and septic shock [J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2021, 34(2): 71-76
- 2 Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(1): 9-21
- 3 Xie X, Liu J, Chen X, et al. Gut microbiota involved in leptospiral infections [J]. *ISME J*, 2022, 16(3): 764-773
- 4 夏青松, 徐丽君, 陈广, 等. 信号分子通路网络对肠干细胞增殖和分化的调控 [J]. *生理科学进展*, 2020, 51(4): 305-310
- 5 Gehart H, Clevers H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(1): 19-34
- 6 Saito Y, Shimizu M, Iwatsuki K, et al. Effect of short-time treatment with TNF- α on stem cell activity and barrier function in enteroids [J]. *Cytotechnology*, 2021, 73(4): 669-682
- 7 Meyer AR, Brown ME, McGrath PS, et al. Injury-induced cellular plasticity drives intestinal regeneration [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2022, 13(3): 843-856
- 8 谢吐秀, 吕菁君, 魏捷, 等. 脓毒症致肠道菌群失调机制与治疗的研究 [J]. *医学研究杂志*, 2018, 47(8): 184-187
- 9 Günther C, Ruder B, Stolzer I, et al. Interferon lambda promotes Paneth cell death via STAT1 signaling in mice and is increased in inflamed ileal tissues of patients with Crohn's disease [J]. *Gastroenter-*

- ology, 2019, 157(5): 1310 - 1322
- 10 Nigmatullina L, Norkin M, Dzama MM, *et al.* Id2 controls specification of Lgr5 + intestinal stem cell progenitors during gut development [J]. *EMBO J*, 2017, 36(7): 869 - 885
 - 11 Schnoor M, García P, Alexander, *et al.* Actin dynamics in the regulation of endothelial barrier functions and neutrophil recruitment during endotoxemia and sepsis[J]. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 2017, 74(11): 1 - 13
 - 12 Kilpatrick LE, Kiani MF. Experimental approaches to evaluate leukocyte - endothelial cell interactions in sepsis and inflammation [J]. *Shock*, 2020, 53(5): 585 - 595
 - 13 Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis - 3) [J]. *JAMA*, 2016, 315(8): 801 - 810
 - 14 Philips CA, Maiwall R, Sharma MK, *et al.* Comparison of 5% human albumin and normal saline for fluid resuscitation in sepsis induced hypotension among patients with cirrhosis (FRISC study): a randomized controlled trial[J]. *Hepato Int*, 2021, 15(4): 983 - 994
 - 15 Wu TY, Zhang HB. Glutamine has a protective role on intestinal tissues via targeting NF - κ B pathway in rats with sepsis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(3 Suppl): 184 - 191
 - 16 Longhitano Y, Zanza C, Thangathurai D, *et al.* Gut alterations in septic patients: a biochemical literature review[J]. *Rev Recent Clin Trials*, 2020, 15(4): 289 - 297
 - 17 Van GR, Kox M, Leijte G, *et al.* A randomized double - blind, placebo - controlled clinical phase IIa trial on safety, immunomodulatory effects and pharmacokinetics of EA - 230 during experimental human endotoxaemia[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2019, 85(7): 1559 - 1571
 - 18 Martínez C, Rodiño - Janeiro BK, Lobo B, *et al.* miR - 16 and miR - 125b are involved in barrier function dysregulation through the modulation of claudin - 2 and cingulin expression in the jejunum in IBS with diarrhoea [J]. *Gut*, 2017, 66(9): 1537 - 1538
 - 19 Huang Q, Yu F, Liao D, *et al.* Microbiota - immune system interactions in human neurological disorders[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2020, 19(7): 509 - 526
 - 20 Sun J, Zhang J, Wang X, *et al.* Gut - liver crosstalk in sepsis - induced liver injury[J]. *Crit Care*, 2020, 24(1): 614
 - 21 Singh M, Long B, Koyfman A. Mesenteric is chemia: a deadly miss [J]. *Emerg Med Clin North Am*, 2017, 35(4): 879 - 888
 - 22 Hu XM, Zhang Q, Zhou RX, *et al.* Programmed cell death in stem cell - based therapy: mechanisms and clinical applications [J]. *World J Stem Cells*, 2021, 13(5): 386 - 415
 - 23 Chen X, Zhang J, Xia L, *et al.* β - Arrestin - 2 attenuates hepatic ischemia - reperfusion injury by activating PI₃K/Akt signaling[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 13(2): 2251 - 2263
 - 24 Bues J, Biočanin M, Pezoldt J, *et al.* Deterministic scRNA - seq captures variation in intestinal crypt and organoid composition [J]. *Nat Methods*, 2022, 19(3): 323 - 330
 - 25 Lu H, Hao L, Yang H, *et al.* miRNA - 34a suppresses colon carcinoma proliferation and induces cell apoptosis by targeting SYTI [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(8): 2887 - 2897
 - 26 Richmond CA, Rickner H, Shah MS, *et al.* JAK/STAT - 1 signaling is required for reserve intestinal stem cell activation during intestinal regeneration following acute inflammation [J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(1): 17 - 26
 - 27 Yousefi M, Nakauka - Ddamba A, Berry CT, *et al.* Calorie restriction governs intestinal epithelial regeneration through cell - autonomous regulation of mTORC1 in reserve stem cells[J]. *Stem Cell Reports*, 2018, 10(3): 703 - 711
 - 28 Lukonin I, Serra D, Challet ML, *et al.* Phenotypic landscape of intestinal organoid regeneration [J]. *Nature*, 2020, 586(7828): 275 - 280
 - 29 Watanabe S, Kobayashi S, Ogasawara N, *et al.* Transplantation of intestinal organoids into a mouse model of colitis [J]. *Nat Protoc*, 2022, 17(3): 649 - 671
 - 30 Sugimoto S, Ohta Y, Fujii M, *et al.* Reconstruction of the human colon epithelium in vivo[J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 22(2): 171 - 176

(收稿日期: 2022 - 03 - 18)

(修回日期: 2022 - 03 - 21)

(接第 83 页)

- 13 贾晓慧, 胡师东, 张丽萍. 后疫情时代某三甲儿童医院疾病谱变化与应对策略[J]. *中国医院*, 2021, 25(11): 58 - 60
- 14 张鸿文, 曹艳林, 刘立飞, 等. 北京市属医院互联网诊疗利用情况及需求调查[J]. *中国医院*, 2022, 26(1): 35 - 37
- 15 马芬, 张明奎, 高岳林. 北京市三级综合医院新型冠状病毒肺炎防控关键环节应急管理实践[J]. *中国研究型医院*, 2020, 7(2): 12 - 16
- 16 程辉, 周琼, 刘小莉, 等. 新型冠状病毒肺炎疫情下“互联网 + 医疗”的机遇及思考[J]. *中国医院管理*, 2020, 40(6): 38 - 40
- 17 王立泽, 欧阳涛, 范照青, 等. 新型冠状病毒肺炎疫情下肿瘤专科医院临床科室线上诊疗系统的应用[J]. *中国医院管理*, 2020, 40(11): 76 - 79
- 18 赵卫全, 马军. 新型冠状病毒肺炎疫情期间互联网医疗服务模式的建立与实践[J]. *医疗装备*, 2020, 33(19): 47 - 48
- 19 刘臻臻, 吴晓航, 陈晴晶, 等. 新冠疫情期间眼病患者线上问诊模式与影响因素分析[J]. *国际眼科杂志*, 2020, 20(11): 1996 - 2002
- 20 祖潇然, 赵晓雯, 郭蕊, 等. 新冠肺炎疫情防控常态化背景下北京市互联网诊疗平台服务满意度及其影响因素研究[J]. *中国医院*, 2021, 25(10): 18 - 22
- 21 张慧林, 成昌慧, 马效恩. 分级诊疗制度的现状分析及对策思考[J]. *中国医院管理*, 2015, 35(11): 8 - 9
- 22 赵明霞, 葛海霞, 张拥波, 等. 新冠肺炎疫情对神经内科门诊患者就诊情况的影响[J]. *临床和实验医学杂志*, 2020, 19(7): 691 - 693

(收稿日期: 2022 - 05 - 05)

(修回日期: 2022 - 05 - 12)