

# 肠黏膜屏障功能评估方法概述

王裴 王凤君

肠黏膜上皮屏障是体内重要的生物防御屏障,在抵御肠腔内细菌和(或)内毒素移位过程中起着极其重要的作用。广义的肠黏膜屏障包括主要由肠上皮细胞及细胞间连接组成的机械屏障,主要由肠腔内常驻微生物群组成的生物屏障,主要由免疫活性细胞及肠道相关淋巴样组织等组成的免疫屏障,以及主要由消化液、消化酶、分泌性蛋白等组成的化学屏障;其中机械屏障最为重要,亦即通常所称的肠上皮屏障。严重烧(创)伤、休克、外科大手术、炎症性肠道疾病、肿瘤的放射性(化学)治疗后,肠道黏膜上皮组织受到不同程度的损害,即肠黏膜上皮屏障功能障碍、通透性增加、肠腔内细菌和(或)内毒素移位、引发全身性炎症反应,严重时甚至发生肠源性感染、多器官功能障碍甚至 MOF。在肠道黏膜形态学出现明显变化之前,肠黏膜通透性已经增高。最近的研究表明,单纯肠黏膜上皮屏障功能障碍可影响肠细胞的吸收及肠黏膜免疫等<sup>[1-2]</sup>。可见,尽早明确是否存在肠道屏障功能障碍具有重要意义。

本文就目前检测肠道屏障功能尤其是机械屏障功能的方法作一介绍,可根据自身条件或不同需求,选用适当方法评估肠黏膜上皮屏障功能障碍。

## 1 糖分子探针

常用的糖分子探针主要是乳果糖、甘露醇、鼠李糖、纤维二糖等,尤以乳果糖及甘露醇同时使用最多,以尿液中乳果糖/甘露醇比值来评估肠道屏障功能。该法是利用不易被机体代谢的糖类测定肠黏膜通透性并评估其完整性,是一种无创诊断方法,已广泛应用于临床试验及动物实验研究<sup>[3-5]</sup>。

口服的乳果糖和甘露醇在肠道内的吸收途径不同,进入血液后不易在体内代谢,主要经尿液直接排出体外。因此,临床应用时患者需在试验前夜禁食,

试验当日清晨排空尿液后空腹口服乳果糖及甘露醇混合液,常用剂量为乳果糖 10 g、甘露醇 5 g,一次性口服;也有少数用乳果糖 2 g、甘露醇 1 g,小剂量一次性口服。口服后即留取一定时间内的尿液,采用适宜的方法定量检测乳果糖和甘露醇含量,并计算其比值。乳果糖/甘露醇比值增加,则反映肠道通透性增加,肠黏膜屏障功能受损。该方法具有操作简单、敏感性高、对机体无创伤、患者容易接受等优点,但不适用于禁食的患者,且膀胱排空及肾功能异常对结果有影响。

目前用于检测乳果糖和甘露醇含量的方法,主要有比色法、气相色谱法和高效液相色谱法等。比色法简单,但干扰因素较多,结果不稳定;气相色谱法灵敏度高、结果准确,但其样品处理过程耗时,用于临床不易达到快速诊断之目的;高效液相色谱法灵敏度高、结果准确,样品处理相对简单,推荐用于临床。彭曦等<sup>[3]</sup>曾利用高效液相色谱法检测烧伤患者尿液中乳果糖/甘露醇比值。该值可反映烧伤后肠道通透性的变化,与其他反映肠道损害指标之间有较好的相关性;不足之处是需要特殊仪器,基层医疗单位难以采用。

## 2 二胺氧化酶(DAO)

DAO 存在于哺乳动物肠道黏膜上皮细胞中,以空肠、回肠活性最高,肠道外的其他组织和细胞中几乎不存在,因此它是肠黏膜上皮细胞的标志酶之一。生理状况下血液中 DAO 活性很低,当肠黏膜屏障受损时,肠黏膜上皮细胞释放大量 DAO 入血,血液中 DAO 活性大幅度升高。因此,血液 DAO 活性可反映肠黏膜屏障的完整状态<sup>[3,6-8]</sup>。目前,检测 DAO 的方法主要有放射法、分光光度法及 ELISA 法,前 2 种方法用于测定 DAO 活性,后 1 种方法用于测定 DAO 蛋白含量。3 种方法都可用于临床检测,但放射法需要核素标记的二胺底物,且存在核素污染等不足。推荐使用分光光度法,本课题组曾在烧伤患者及动物实验中利用该方法进行检测<sup>[3,6]</sup>,具有简单、快捷、结果稳定等特点,但遇严重溶血时对结果有一定影响。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2010.05.007

基金项目:创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室自主研究课题(SKLZZ200818)

作者单位:400038 重庆,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

通信作者:王凤君,Email:wangfj@mail.tmmu.com.cn,电话:023-68754176

### 3 D-乳酸

D-乳酸是肠道固有细菌代谢产物之一。哺乳动物不能产生 D-乳酸,也缺乏 D-乳酸脱氢酶,故不能代谢或仅能缓慢代谢 D-乳酸。肠黏膜上皮细胞损伤时紧密连接被破坏,肠上皮屏障功能障碍,肠腔内 D-乳酸入血,因此血液中 D-乳酸含量可反映肠黏膜屏障功能的受损状况<sup>[9-12]</sup>。有文献报道,血浆 D-乳酸含量与烫伤后肠黏膜损伤评分呈显著正相关<sup>[9]</sup>。D-乳酸的检测方法主要是酶法,利用酶促反应原理检测反应产物含量,该值可代表 D-乳酸含量。有学者也曾用该法检测血浆 D-乳酸含量,以了解烧伤后肠道屏障功能的损害状况<sup>[6,10]</sup>,用于临床试验及动物实验具有一定预警价值。需要指出的是,多种细菌均可产生 D-乳酸,因此样品采集及处理过程中应避免细菌污染;对于严重全身性感染且血液中出现细菌者,血浆 D-乳酸是否仍可用于评价肠道屏障功能,值得进一步商榷。

### 4 内毒素

肠道是体内最大的细菌及内毒素储存库,正常机体肠腔即含有大量细菌和内毒素,但由于肠道屏障功能完整,肠腔内细菌和内毒素难以进入血循环。当严重烧(创)伤、休克、大手术应激后发生肠道屏障功能障碍时,肠腔内细菌和内毒素可穿过肠黏膜屏障,经过门脉系统和(或)淋巴系统进入血循环。内毒素分子比细菌小,较细菌更容易穿过受损的肠黏膜屏障,因此检测血液中内毒素含量,是评估肠道屏障功能的另一重要手段<sup>[4,7]</sup>。笔者单位的临床及实验研究表明,严重烧伤后很快发生内毒素移位及血液中内毒素水平升高,最早发生于伤后 15 min,并与其他反映肠道屏障功能障碍的指标变化趋势一致<sup>[3,6,13]</sup>。迄今为止,鲎试验法是检测内毒素最好的方法,简单、快速、灵敏、准确,已被欧美药典及我国药典定为法定内毒素检测法。需要注意的是,样品采集及操作过程中应避免细菌及内毒素污染,所有相关器材均应进行去热原处理。现已有专门的内毒素测定仪,但其基本原理仍是基于鲎试验法。

### 5 肠型脂肪酸结合蛋白(I-FABP)

脂肪酸结合蛋白(FABP)是一类运输长链脂肪酸的低相对分子质量胞质蛋白,其含量在参与摄取和利用脂肪酸的组织中较高,目前已发现 9 种亚型,分别根据其所在组织命名,具有组织器官表达特异性。I-FABP 表达于肠道黏膜上皮细胞,是肠黏膜上

皮细胞的特异性标志蛋白之一,约占全部胞质蛋白的 2%~3%,绒毛上皮细胞 I-FABP 的含量高于隐窝上皮细胞。正常情况下血液中 I-FABP 含量极微;当肠黏膜受损时,屏障功能发生障碍,I-FABP 很快通过肠道屏障入血,血液中浓度急剧升高。动物实验资料显示,肠道缺血性损伤 30 min 后,血浆 I-FABP 水平平均约为缺血前的 14 倍,且与肠上皮组织学结构损伤及屏障功能的损害程度相一致<sup>[14]</sup>。大宗临床病例研究表明,严重创伤患者血浆 I-FABP 水平平均为对照组的数倍,并与休克指数及创伤严重程度评分密切相关<sup>[15]</sup>。目前检测 I-FABP 水平的常用方法主要有 ELISA 法及放射免疫分析法。有资料表明,尿液中 I-FABP 含量的变化也可用于评价肠道屏障功能损害<sup>[16]</sup>。

### 6 肠黏膜内 pH 值

肠黏膜对缺血缺氧极为敏感,在严重烧(创)伤、休克等低灌注状态下,肠黏膜因缺血易受到损伤,乏氧代谢增强,产生大量酸性物质。因此,Fiddian-Green<sup>[17]</sup>首先提出用张力计测定胃肠黏膜 pH 值,既可直接反映胃肠道血液灌流和组织氧合情况,也可间接反映全身组织灌注情况。近年来肠黏膜 pH 值作为反映缺血缺氧的敏感指标,已越来越多地被用于烧伤等临床复苏的监控,作为复苏成功与否的监测以及预后判断的指标之一<sup>[18-19]</sup>。由于肠道的缺血缺氧多引起肠道屏障功能障碍,肠黏膜 pH 值也被用于评价缺血缺氧时肠道屏障功能的指标。有资料表明,肠黏膜 pH 值随着全身血压下降而降低,并与黏膜破坏程度相一致;严重创伤及失血性休克后,肠黏膜 pH 值与反映肠道屏障功能的其他指标如内毒素、DAO、乳果糖/甘露醇比值变化趋势一致,并显著相关<sup>[20-21]</sup>。我们认为,肠黏膜 pH 值作为评价缺血缺氧时肠道屏障功能的指标固然有一定意义,但只能间接推测,不是所有的个体都会因缺血缺氧发生肠道屏障功能障碍;此外,pH 值是否适用于评价非缺血缺氧因素所引起的肠道屏障功能障碍,目前还难以定论,也值得进一步研究。

### 7 其他方法

#### 7.1 荧光标记分子探针

通常采用异硫氰酸荧光素(FITC)标记的葡聚糖(dextran)、白蛋白(albumin)等,尤其是 FITC-葡聚糖,有不同相对分子质量的探针可供选择。患者经口服、动物经灌喂或开腹直接注入肠腔,采集血标



肠黏膜屏障功能的影响. 世界华人消化杂志, 2002, 11 (7): 796-799.

[7] 单信芝, 韩磊, 马爱国, 等.  $\beta$ -胡萝卜素对急性放射损伤大鼠小肠黏膜结构和屏障功能的影响. 肠外与肠内营养, 2009, 16 (6): 346-350.

[8] 马晓菁, 马兵, 谢东珊, 等. 谷氨酰胺对严重烧伤后肠黏膜和机体免疫功能保护作用的临床观察. 西安交通大学学报(医学版), 2009, 30(3): 359-361, 386.

[9] Zhang C, Sheng ZY, Hu S, et al. The influence of apoptosis of mucosal epithelial cells on intestinal barrier integrity after scald in rats. Burns, 2002, 28(8): 731-737.

[10] 张家平, 黄跃生, 杨宗城. 烧伤延迟复苏加重肠黏膜屏障功能损害的机制研究. 世界华人消化杂志, 2004, 12(6): 1329-1332.

[11] 张敏, 胡毓华, 张伟. 胰高血糖素样肽-2 对幼鼠肠缺血-再灌注损伤的保护作用. 江苏医药, 2009, 35(12): 1473-1475.

[12] 刘丽平, 石斌, 李斌, 等. 环氧合酶-2 在小肠缺血再灌注损伤中的作用研究. 解放军医学杂志, 2009, 34(8): 945-948.

[13] 肖光夏. 肠源性感染的研究. 中华烧伤杂志, 2008, 24(5): 331-333, 364.

[14] Derikx JP, Matthijsen RA, de Bruijne AP, et al. Rapid reversal of human intestinal ischemia-reperfusion induced damage by shedding of injured enterocytes and reepithelialisation. PLoS One, 2008, 3(10): e3428.

[15] de Haan JJ, Lubbers T, Derikx JP, et al. Rapid development of intestinal cell damage following severe trauma: a prospective observational cohort study. Crit Care, 2009, 13(3): R86.

[16] Derikx JP, Evennett NJ, Degrauwe PL, et al. Urine based detection of intestinal mucosal cell damage in neonates with suspected necrotising enterocolitis. Gut, 2007, 56(10): 1473-1475.

[17] Fiddian-Green RG. Gastric intramucosal pH, tissue oxygenation and acid-base balance. Br J Anaesth, 1995, 74(5): 591-606.

[18] 闫汝蕴, 孙永华, 陈忠. 重症烧伤病人休克期监测胃黏膜 pH 值与预后关系的临床研究. 北京医学, 2002, 24(5): 315-317.

[19] 苏青和, 虞俊杰, 杨敏杰, 等. 持续监测 pH<sub>i</sub> 对于评价严重烧伤休克患者预后的意义. 中国微循环, 2002, 6(5): 295-296.

[20] 杨兴东, 黎洁良, 陆连荣, 等. 火器多发伤时肠屏障功能损害实验. 中国医学科学院学报, 2000, 22(5): 428-431.

[21] 黎君友, 吕艺, 胡森, 等. 小肠屏障功能监测的实验研究. 创伤外科杂志, 2001, 3(2): 109-112.

[22] 陈传莉, 刘依凌, 王裴, 等. 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. 第三军医大学学报, 2008, 30(15): 1434-1437.

[23] Wang F, Graham WV, 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. Am J Pathol, 2005, 166(2): 409-419.

[24] Wang F, Schwarz BT, Graham WV, et al. IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction. Gastroenterology, 2006, 131(4): 1153-1163.

[25] 王裴, 陈传莉, 李牧, 等. 肌球蛋白轻链激酶介导的缺氧后肠上皮屏障功能紊乱. 中华烧伤杂志, 2009, 25(1): 57-60.

[26] Yang H, Finaly R, Teitelbaum DH. Alteration in epithelial permeability and ion transport in a mouse model of total parenteral nutrition. Crit Care Med, 2003, 31(4): 1118-1125.

[27] Smith F, Clark JE, Overman BL, et al. Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 298(3): G352-363.

[28] Hoda MR, Scharl M, Keely SJ, et al. Apical leptin induces chloride secretion by intestinal epithelial cells and in a rat model of acute chemotherapy-induced colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 298(5): G714-721.

[29] Kaltoft N, Tilotta MC, Witte AB, et al. Prostaglandin E2-induced colonic secretion in patients with and without colorectal neoplasia. BMC Gastroenterol, 2010, 10: 9.

[30] Costantini TW, Eliceiri BP, Peterson CY, et al. Quantitative assessment of intestinal injury using a novel in vivo, near-infrared imaging technique. Mol Imaging, 2010, 9(1): 30-39.

(收稿日期: 2010-04-27)

(本文编辑: 莫恩)

### 读者 · 作者 · 编者

### 本刊可直接使用英文缩写的常用词汇

本刊对大家较熟悉的以下常用词汇, 允许直接使用英文缩写(按英文首字母排序), 即在文中首次出现时可不标注中文。

- |                    |                                |                               |
|--------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 脱细胞真皮基质(ADM)       | 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPD)              | 一氧化氮(NO)                      |
| 丙氨酸转氨酶(ALT)        | 血红蛋白(Hb)                       | 一氧化氮合酶(NOS)                   |
| 天冬氨酸转氨酶(AST)       | 重症监护病房(ICU)                    | 动脉血二氧化碳分压(PaCO <sub>2</sub> ) |
| 腺苷三磷酸(ATP)         | 白细胞介素(IL)                      | 动脉血氧分压(PaO <sub>2</sub> )     |
| 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)  | 角质形成细胞(KC)                     | 磷酸盐缓冲液(PBS)                   |
| 集落形成单位(CFU)        | 半数致死烧伤面积(LA50)                 | 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)            |
| 每分钟放射性荧光闪烁计数值(cpm) | 内毒素/脂多糖(LPS)                   | 超氧化物歧化酶(SOD)                  |
| 细胞外基质(ECM)         | 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)                | 血氧饱和度(SO <sub>2</sub> )       |
| 表皮生长因子(EGF)        | 最低抑菌浓度(MIC)                    | 转化生长因子(TGF)                   |
| 酶联免疫吸附测定(ELISA)    | 多器官功能障碍综合征(MODS)               | 辅助性 T 淋巴细胞(Th)                |
| 成纤维细胞(Fb)          | 多器官功能衰竭(MOF)                   | 肿瘤坏死因子(TNF)                   |
| 胎牛血清(FBS)          | 核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) | 负压封闭引流(VSD)                   |

本刊编辑部