

## 卡巴胆碱对肠缺血-再灌注大鼠外周血白细胞凋亡及细胞因子表达的影响

吕艺 姜小国 王海滨 孙丹 胡森 盛志勇

**【摘要】** 目的 观察拟胆碱药卡巴胆碱对肠缺血-再灌注大鼠外周血淋巴细胞和中性粒细胞凋亡及细胞因子 mRNA 表达的影响,探讨拟胆碱药的抗炎作用机制。方法 36 只大鼠随机分为手术对照组、肠缺血 1 h 组、肠缺血 1 h 后再灌注 1 h 和 2 h 组、卡巴胆碱+肠缺血 1 h 组及卡巴胆碱+肠缺血 1 h 后再灌注 2 h 组。复制大鼠肠缺血-再灌注模型;肠缺血前 10 min 经肠袋给予卡巴胆碱。检测不同时间点大鼠外周血白细胞计数及分类、淋巴细胞和中性粒细胞凋亡率及白细胞中细胞因子 mRNA 表达水平。结果 肠缺血 1 h,大鼠外周血白细胞计数减少,淋巴细胞比例增加,中性粒细胞比例减少,再灌注后上述指标均呈反向变化;卡巴胆碱可抑制肠缺血引起的外周血淋巴细胞凋亡率的增加,但增加中性粒细胞的凋亡率。外周血白细胞中致炎细胞因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和抗炎细胞因子白细胞介素-10(IL-10)表达在肠缺血 1 h 时均增加,但再灌注后 2 h,IL-10、IL-4 和  $\gamma$  干扰素(IFN- $\gamma$ )表达则明显减少,与 TNF- $\alpha$  表达明显增加的趋势相反;卡巴胆碱可改善这一变化。结论 卡巴胆碱能减少肠缺血时淋巴细胞的凋亡,调节肠缺血-再灌注时外周血白细胞中致炎和抗炎细胞因子表达失衡,在防治失控炎症反应、脓毒症和多器官功能障碍综合征中具有潜在临床应用价值。

**【关键词】** 缺血-再灌注损伤;肠;卡巴胆碱;白细胞;细胞凋亡;细胞因子

**Effects of carbachol on apoptosis of peripheral white blood cells and expression of cytokines in rats suffering from gut ischemia/reperfusion injury** LÜ Yi, JIANG Xiao-guo, WANG Hai-bin, SUN Dan, HU Sen, SHENG Zhi-yong. Research Department of Burn Institute, 304th Clinical Department of General Hospital of PLA, Beijing 100037, China

**【Abstract】** **Objective** To evaluate the effect of cholinergic drug carbachol on apoptosis and expression of certain cytokines of peripheral blood lymphocytes and neutrophils in rats subjected to ischemia/reperfusion injury of the intestine. **Methods** Thirty-six Wistar male rats were randomly divided into groups as follows: sham operation, 1 and 2 hour-gut ischemia, 1 hour-gut ischemia followed by reperfusion for 1 hour and 2 hours, carbachol+1 hour-gut ischemia, and carbachol+1 hour-gut ischemia followed by reperfusion for 2 hours. Then the gut was subjected to ischemia/reperfusion. At different time points after the said injury, the total number and differential count of leukocytes, apoptosis rate of lymphocytes and neutrophils, and the mRNA expression levels of certain cytokines in peripheral blood leukocytes, were determined. **Results** At 1 hour after gut ischemia, the total number of leukocytes decreased (the ratio of lymphocytes increased and that of neutrophils decreased), but it increased after gut reperfusion. Carbachol could reduce the apoptosis rate of lymphocytes, but enhance that of neutrophils after gut ischemia. In leukocytes, mRNAs expression of inflammatory (TNF- $\alpha$ ) and antiinflammatory (IL-10) cytokines were upregulated at 1 hour after gut ischemia, while that of IL-10, IL-4 and interferon- $\gamma$  were down-regulated distinctly at 2 hours following reperfusion. All of these phenomena were ameliorated by giving carbachol. **Conclusion** Carbachol could reduce the peripheral lymphocytes apoptosis subsequent to gut ischemia, and regulate the balance between inflammatory and antiinflammatory cytokines expression in leukocytes during gut ischemia and reperfusion. The results suggest that carbachol might be a potential therapeutic agent in preventing uncontrolled inflammatory response as a result of ischemia/reperfusion injury of the intestine.

**【Key words】** gut ischemia/reperfusion; carbachol; leukocyte; apoptosis; cytokines

严重创、烧伤后发生的肠缺血-再灌注损伤将导致肠源性炎症介质产生和肠功能障碍<sup>[1,2]</sup>,循环血白细胞激活、释放炎性细胞因子而产生失控性炎症反应,这些均是诱发脓毒症及多器官功能障碍综合征

基金项目:全军“十五”计划指令性课题(01L081)

作者单位:100037 北京,解放军总医院三〇四临床部全军烧伤研究所基础部

作者简介:吕艺(1958-),女(汉族),山东省荣城人,医学博士,副研究员。

(MODS)的重要机制<sup>[3,4]</sup>。因此,如何减轻肠缺血-再灌注后肠道局部及全身炎症反应、改善肠动力障碍、调节循环血白细胞功能状态是严重创、烧伤临床治疗中亟待解决的问题。我们在以往的研究中观察到,刺激内毒素血症大鼠迷走神经及给予肠缺血-再灌注大鼠拟胆碱药物可以降低全血和组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )浓度<sup>[5,6]</sup>。根据“胆碱能抗炎”理论<sup>[7]</sup>及 N 样受体兴奋的肠效应,我们设想拟胆碱药

具有一定的抗炎作用。本研究中通过观察肠道给予拟胆碱药物卡巴胆碱对肠缺血-再灌注大鼠外周血白细胞总数及分类、淋巴细胞和中性粒细胞凋亡率及细胞因子表达水平的影响,研究卡巴胆碱对全血白细胞炎症特性的调控作用,为进一步研究拟胆碱药的抗炎机制及其临床应用价值奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 动物及分组:**清洁级雄性 Wistar 大鼠 36 只,体重 180~220 g,中国医学科学院动物中心提供。实验前适应性饲养 1 周。术前 12 h 禁食,自由饮水。随机分为手术对照组、肠缺血 1 h 组(I1)、肠缺血 1 h 再灌注 1 h 组(IR1)、肠缺血 1 h 再灌注 2 h 组(IR2)、卡巴胆碱+肠缺血 1 h 组(CI1)和卡巴胆碱+肠缺血 1 h 再灌注 2 h 组(CR2),每组 6 只大鼠。

**1.2 动物模型制备:**大鼠以质量分数为 2% 的戊巴比妥钠(0.1 ml/100 g)腹腔注射麻醉。在距离回盲部 15 cm 处起始,向空肠端作一长约 10 cm 的肠袋(只结扎两端,保留血液供应)。卡巴胆碱处理组大鼠肠袋内注入 1 ml 卡巴胆碱(Sigma, 0.01 mg/100 g);手术对照组、肠缺血组及肠缺血-再灌注组注入等量生理盐水。10 min 后,用无损伤动脉夹夹闭肠系膜上动脉起始部,阻断肠系膜上动脉血流 1 h,作为肠缺血 1 h 组;缺血 1 h 后松夹恢复肠系膜血流,作为肠缺血-再灌注组。分别于缺血 1 h、再灌注 1 和 2 h 取腹主动脉血,检测各项指标。

### 1.3 检测指标及方法

**1.3.1 白细胞计数和分类:**肝素抗凝全血 0.5 ml,常规计数、分类。

**1.3.2 淋巴细胞和中性粒细胞凋亡率:**肝素抗凝全血 3 ml,室温静置 30 min 后取上层液,4 °C 下 1 000 r/min 离心 10 min(以下离心条件与此相同),弃上清;细胞沉淀溶血后离心、弃上清,用冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次后重悬于 200  $\mu$ l 结合缓冲液中;先加入 10  $\mu$ l 钙结合蛋白 V-异硫氰酸荧光素(annexin V-FITC),室温避光反应 15 min,上机前 5 min 加入 5  $\mu$ l 碘化丙啶(PI)混匀,再加入 300  $\mu$ l 结合缓冲液,上机检测。

**1.3.3 细胞因子 mRNA 表达:**取肝素抗凝全血 1 ml,低渗溶血后采用离心法提取大鼠全血细胞总 RNA。取 2  $\mu$ g 总 RNA,按鸟类成髓细胞性白血病病毒(AMV)逆转录试剂盒说明书加入反应体系成分,合成 cDNA。每一种细胞因子均取 2  $\mu$ l 逆转录产物,加入各自的引物(表 1)进行聚合酶链反应(PCR)扩增。PCR 扩增反应条件:94 °C 变性 3 min 后,94 °C

变性 1 min、60 °C 退火 1 min、72 °C 延伸 1 min,30~40 个循环(不同细胞因子按扩增结果调整循环数),最后 72 °C 延伸 10 min。各种细胞因子的 PCR 扩增产物在质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳后,用凝胶图像分析系统(UVP-GDS800,英国)扫描成像。

表 1 检测细胞因子的引物序列

Table 1 Primer sequences of detected cytokines

| 名称            | 引物序列                                  | 片段(bp) |
|---------------|---------------------------------------|--------|
| TNF- $\alpha$ | 5'-GTA GCC CAC GTC GTA GCA AA-3'      | 346    |
|               | 5'-CCC TTC TCC AGC TGG AAG AC-3'      |        |
| HMGB1         | 5'-ATGGGCAAAGGAGATCCT-3'              | 648    |
|               | 5'-ATTCATCATCATCATCTTCT-3'            |        |
| IFN- $\gamma$ | 5'-AGC TCT GAG ACA ATG AGT G-3'       | 489    |
|               | 5'-CCA GAA TCA GCA CCG ACT C-3'       |        |
| IL-10         | 5'-CAC TGC TAT GTT GCC TGC TC-3'      | 463    |
|               | 5'-TTC ATG GCC TTG TAG ACA CC-3'      |        |
| IL-4          | 5'-AAC ACC ACG GAG AAC GAG CTC ATC-3' | 152    |
|               | 5'-AGT GAG TTC AGA CCG CTG ACA CCT-3' |        |
| CD14          | 5'-GTGCTCCTGCCAGTGAAAGAT-3'           | 268    |
|               | 5'-GATCTGTCTGACAACCCTGAGT-3'          |        |
| 18sRNA        | 5'-CGAAGTTGGTGGAGTTTGTC-3'            | 397    |
|               | 5'-GGCCTCACTAAACCATCCAA-3'            |        |

注:HMGB1 为高迁移率族蛋白 B1;IFN- $\gamma$  为  $\gamma$  干扰素;IL-10 为白细胞介素-10

**1.4 统计学处理:**数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,用 SPSS 11.0 软件进行 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 肠缺血-再灌注大鼠全血白细胞计数及分类(图 1,图 2):**与对照组比较,肠缺血-再灌注 1 h 大鼠外周血白细胞计数减少,再灌注 2 h 时增多,肠缺血 1 h 大鼠淋巴细胞比例增加,中性粒细胞比例减少;再灌注后两者均呈反向变化趋势,淋巴细胞比例略降,中性粒细胞比例略升。卡巴胆碱组大鼠的全血白细胞计数及分类的变化趋势与肠缺血及缺血-再灌注组相同。

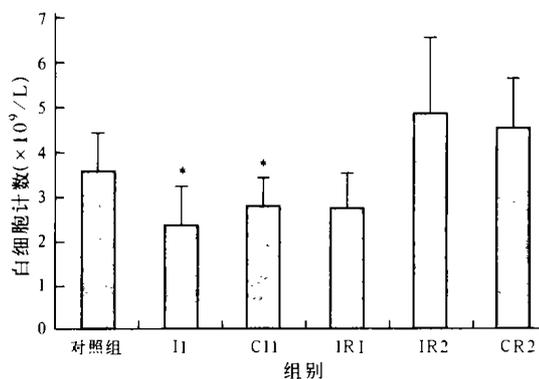


图 1 各组大鼠外周血白细胞计数的变化

Figure 1 Change of white blood cells counts in peripheral blood of each group

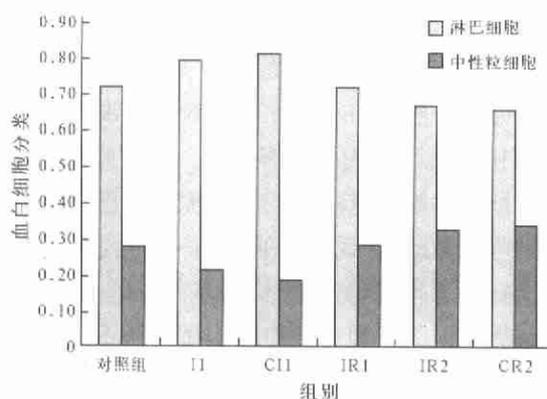


图 2 各组大鼠外周血白细胞分类的变化

Figure 2 Change of the classification of white blood cells in peripheral blood of each group

**2.2 肠缺血-再灌注大鼠外周血淋巴细胞和中性粒细胞凋亡率的变化:** 尽管同一组不同个体大鼠的外周血淋巴细胞凋亡率有一定差异;但在不同因素作用下各组变化有一定的规律:正常大鼠为 28%~30%,肠缺血大鼠上升至 43%~50%,而预先给予卡巴胆碱的肠缺血大鼠淋巴细胞凋亡率为 33%~40%。对照组和肠缺血组间中性粒细胞的凋亡率(50%~70%)差异无显著性,但预先给予卡巴胆碱的肠缺血大鼠中性粒细胞凋亡率有所增加(80%)。再灌注组和给予卡巴胆碱的再灌注组大鼠淋巴细胞凋亡率分别为 22%和 25%,两组中性粒细胞的凋亡率均为 80%,与对照组相比差异均无统计学意义。

**2.3 肠缺血-再灌注大鼠外周血细胞因子 mRNA 表达变化(图 3):** ①炎症细胞因子表达的变化:肠缺血及再灌注组全血白细胞 TNF- $\alpha$  mRNA 表达均增加,再灌注 2 h 表达量最多;给予卡巴胆碱的大鼠再灌注 2 h 时 TNF- $\alpha$  mRNA 表达量明显少于未给予卡巴胆碱的大鼠。全血白细胞 HMGB1 mRNA 的表达各时间点差异均无显著性;②抗炎介质表达的变化:大鼠肠缺血 1 h 和再灌注 1 h 全血 IL-10 mRNA 表达增加,再灌注 2 h 减少;给予卡巴胆碱大鼠肠缺血-再灌注 2 h 时全血 IL-10 mRNA 表达多于未给予卡巴胆碱的大鼠。再灌注 2 h 时,IL-4 mRNA 表达变化规律与 IL-10 mRNA 相似;③其他:CD14 mRNA 的表达在肠缺血和再灌注后各时间点差异均无显著性。IFN- $\gamma$  mRNA 表达在肠缺血 1 h 时增多,再灌注后减少,但给予卡巴胆碱的大鼠再灌注 2 h 时全血 IFN- $\gamma$  mRNA 表达高于同时时间点未给予卡巴胆碱的大鼠。

### 3 讨论

促炎细胞因子的大量释放是诱发全身炎症反应失控和 MODS 的重要因素<sup>[4]</sup>,然而根据这一理论采

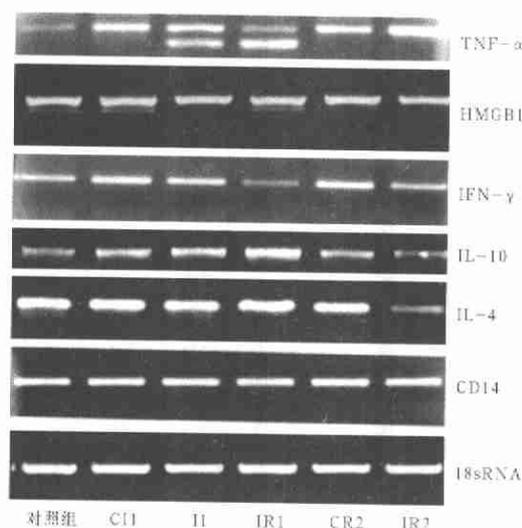


图 3 大鼠外周血不同细胞因子 mRNA 表达的检测结果

Figure 3 mRNA levels of different cytokines expressed in peripheral blood of rats

用的抗细胞因子的多中心临床观察结果并不尽人意<sup>[8]</sup>。近年的研究表明,副交感神经系统的胆碱能递质参与调节炎症反应,并将这种神经-免疫相互作用称为“胆碱能抗炎通路”<sup>[7]</sup>。已证实胆碱能递质的抗炎效应主要通过 N 样受体抑制 TNF- $\alpha$  转录后蛋白质的合成实现<sup>[9]</sup>。胆碱能抗炎作用的提出,不仅提供了神经-免疫网络调控炎症反应的证据,更为探索防治脓毒症和 MODS 的手段开辟了新途径。

卡巴胆碱是一种强力拟胆碱药,具有迷走神经递质乙酰胆碱的作用,但 N 样作用比乙酰胆碱强。我们以往的研究显示,肠缺血-再灌注大鼠肌肉或肠内注射卡巴胆碱,血浆中 TNF- $\alpha$  含量均显著降低,提示卡巴胆碱在体给药可抑制促炎因子 TNF- $\alpha$  释放<sup>[10]</sup>。离体研究中也观察到卡巴胆碱和乙酰胆碱对内毒素(LPS)刺激全血释放 TNF- $\alpha$  和 IL-10 有抑制作用,并呈现一定的剂量依赖关系<sup>[11]</sup>。这些均提示卡巴胆碱具有明确的抗炎作用。

迄今对胆碱能抗炎作用的体外研究结果主要来自外周血单核细胞。由于血液中有多种白细胞存在,实际应用时药物与多种细胞作用后可能产生细胞间的相互作用,造成单一细胞和多种细胞混合作用效应的差异。因此,分析全血中各种细胞的变化更能反应药物作用的综合效应,有助于判断药物作用的整体效果。本研究中,我们分析了肠缺血-再灌注大鼠外周血白细胞中多种与失控性炎症反应相关的细胞因子 mRNA 表达变化,发现:①肠缺血大鼠外周血白细胞中不论是致炎介质(如 TNF- $\alpha$ )还是抗炎介质(如 IL-10, IL-4),其 mRNA 表达量均增加;

②再灌注后 2 h, TNF- $\alpha$  mRNA 表达明显增加, 而此时 IL-10 和 IL-4 mRNA 表达明显减少, 致炎和抗炎因子表达反向变化, 呈现过度炎症反应的特征; ③肠缺血前给予卡巴胆碱的大鼠在肠缺血-再灌注后 2 h, TNF- $\alpha$  mRNA 表达下调, IL-10 和 IL-4 mRNA 表达上调, 与未给卡巴胆碱大鼠差异有显著性; ④能够与炎症因子协同作用并与免疫调节相关的 IFN- $\gamma$  与 IL-10 mRNA 表达规律基本一致; ⑤脓毒症晚期介质 HMGB1 mRNA 的表达和与 LPS 信号转导相关的 CD14 mRNA 表达量各组差异无显著性。

TNF- $\alpha$  mRNA 于再灌注 2 h 时表达增加, 而 HMGB1 mRNA 在各时间点中表达均未上调, 这与以往的研究结果基本一致<sup>[12]</sup>。抗炎介质的表达在再灌注后 2 h 下调, 与致炎介质表达反向调节, 这一变化可能是炎症反应失控继而形成全身炎症反应综合征的基础。而给予卡巴胆碱对再灌注后 2 h 外周血 TNF- $\alpha$ 、IL-10、IL-4 以及 IFN- $\gamma$  mRNA 表达的影响与以往体外实验中观察到的乙酰胆碱能抑制 LPS 刺激的巨噬细胞释放 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等致炎介质, 但是不影响抗炎细胞因子 IL-10 释放<sup>[7]</sup> 有别; 与 LPS 体外刺激全血释放 IL-10 的检测结果也不一致<sup>[11]</sup>。表明胆碱能抗炎效应在不同的细胞类型及作用体系有差别。同时提示我们, 仅从离体实验结果推断整体效应有很大的局限性。卡巴胆碱下调 TNF- $\alpha$  mRNA 表达、上调 IL-10 和 IL-4 mRNA 表达的作用对于削弱失控炎症反应网络效应及调节致炎/抗炎反应平衡有重要意义; 而卡巴胆碱上调 IFN- $\gamma$  mRNA 表达则有益于抗原呈递细胞功能的发挥。由此推论, 卡巴胆碱的作用不仅限于抗炎, 而且还有调节炎症/抗炎反应的平衡及免疫功能。

循环血白细胞激活后聚集在组织中并释放氧自由基和蛋白酶类是严重创、烧伤休克救治过程中发生组织缺血-再灌注损伤的重要机制之一<sup>[3]</sup>; 淋巴器官中淋巴细胞的大量凋亡是失控炎症反应早期重要的病理学变化, 也是脓毒症及 MODS 发生的病理学基础<sup>[13]</sup>。本研究中, 肠缺血期外周血白细胞总数的减少表明有大量白细胞在组织中扣押, 参与缺血期肠损伤过程。由于扣押在组织中的白细胞不会再进入血循环, 故再灌注后全血白细胞数的恢复可能与骨髓释放增加有关。本研究中, 淋巴细胞凋亡率在肠缺血期增加, 而给予卡巴胆碱则有所改善, 提示应用卡巴胆碱有益于维护机体的细胞免疫功能。由于在肠缺血期白细胞总数和淋巴细胞比例增加, 因此已

证明的 N 样受体兴奋可以促进淋巴细胞从胸腺释放<sup>[14]</sup> 尚不能解释卡巴胆碱的这一效应, 推测可能与凋亡调控分子的参与有关。中性粒细胞凋亡率在肠缺血期和再灌注期均无明显变化, 卡巴胆碱能增加肠缺血期中性粒细胞的凋亡率。提示卡巴胆碱可削弱白细胞的激活, 从而减轻肠缺血-再灌注后局部及远隔器官组织损伤, 其作用机制尚不清楚。从应用卡巴胆碱后淋巴细胞和中性粒细胞凋亡的不同反应推测, 卡巴胆碱对不同细胞可能通过不同的作用机制(直接或间接)产生影响。

本研究结果表明, 卡巴胆碱能调节肠缺血-再灌注早期出现的致炎和抗炎细胞因子表达失衡, 改善肠缺血时淋巴细胞凋亡的发生, 将有益于控制失控炎症发展及脓毒症/MODS 发生, 对严重创、烧伤后肠缺血-再灌注损伤的防治具有潜在临床应用价值。

#### 参考文献:

- 1 吕艺, 盛志勇, 侯晓霞, 等. 肠缺血再灌注大鼠不同组织 TNF- $\alpha$  和 IL-6 mRNA 表达的规律及意义[J]. 解放军医学杂志, 1999, 24: 94-96.
- 2 黎君友, 孙丹, 吕艺, 等. 肠缺血再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12: 464-466.
- 3 吕艺, 盛志勇, 黎君友, 等. 肠缺血-再灌注损伤对中性粒细胞和内皮细胞黏附分子表达的影响及其与脏器损伤的关系[J]. 中国危重病急救医学, 1998, 10: 592-596.
- 4 盛志勇, 胡森, 主编. 多器官功能障碍综合征[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 49-58.
- 5 Jiang Xiaoguo, Hu Sen, Shi Deguang, et al. Experiment studies of tumor necrosis factor changes in different tissues after stimulating vagus nerve[J]. Chin J Clin Rehabil, 2003, 7: 334-335.
- 6 石德光, 胡森, 姜小国, 等. 电刺激迷走神经对内毒素血症所致急性肺损伤的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 732-735.
- 7 Borovikova L V, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin [J]. Nature, 2000, 405: 458-462.
- 8 Zeni F, Freenab B, Natanson C. Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment [J]. Crit Care Med, 1997, 25: 1095-1100.
- 9 Wang H, Yu M, Ochani M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation [J]. Nature, 2003, 421: 384-388.
- 10 姜小国, 胡森, 石德光, 等. 卡巴胆碱对肠缺血-再灌注大鼠血浆肿瘤坏死因子- $\alpha$  和白介素-10 含量的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 167-169.
- 11 吕艺, 孙丹, 胡森, 等. 胆碱能递质对 LPS 刺激外周血释放细胞因子的影响[J]. 感染炎症修复, 2003, 4: 220-223.
- 12 Wang Haichao, Bloom O, Zhang Minghuang, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice [J]. Science, 1999, 285: 248-251.
- 13 陆江阳, 梁延杰, 王晓红, 等. 多器官衰竭早期免疫器官细胞凋亡的检测及意义[J]. 解放军医学杂志, 1996, 21: 414-416.
- 14 Antonica A, Magni F, Mearini L, et al. Vagal control of lymphocyte release from rat thymus [J]. Auton Nerv Syst, 1994, 48: 187-197.

(收稿日期: 2004-10-28 修回日期: 2005-01-04)

(本文编辑: 郭方, 李银平)