

· 论著 ·

胆碱能抗炎通路对失血性休克大鼠保护作用的研究

李建国 胡正芳 杜朝晖 周青 贾宝辉 彭周荃 叶小丰 李蓓

【摘要】目的 探讨胆碱能抗炎通路的抗休克作用及其可能的机制。**方法** 采用改良 Wiggers 法复制失血性休克动物模型。30 只成年雄性 SD 大鼠随机分为假失血组(假 Hem 组)、失血性休克组(Hem 组)、迷走神经切断组(VGX 组)、迷走神经电刺激组(STM 组)、胆碱酯酶抑制组(THA 组)和 N 受体拮抗组(α -BGT 组)。将左迷走神经远端连接刺激电极,于制模成功后即刻行电刺激(5 V、2 ms、1 Hz)12 min。颈总动脉置管连续监测平均动脉压(MAP),模型稳定后 45 min 测定各组动物血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和肝组织核因子- κ B(NF- κ B)含量。**结果** 失血性休克动物的 MAP 持续处于低水平状态。与假 Hem 组比较,Hem 组血浆 TNF- α 含量明显升高($P < 0.01$),肝组织 NF- κ B 表达明显增强。迷走神经电刺激组动物 MAP 迅速升高,血浆 TNF- α 含量较 Hem 组显著降低(P 均 < 0.01),肝组织 NF- κ B 表达减弱。迷走神经离断后静脉注射胆碱酯酶抑制剂四氢氨基吡啶(THA)可产生与电刺激迷走神经类似的作用,但电刺激前静脉注射 N 胆碱能受体 $\alpha 7$ 亚单位阻断剂(α -BGT),则可消除电刺激迷走神经的抗休克效应。**结论** 胆碱能抗炎通路具有潜在的抗失血性休克作用,其机制可能是通过抑制休克病程中过度的全身性炎症反应而实现的。

【关键词】 休克,失血性; 迷走神经; 电刺激; 乙酰胆碱; 肿瘤坏死因子- α ; 核因子- κ B

Protective effect of the cholinergic anti-inflammatory pathway against hemorrhagic shock in rats LI Jian-guo, HU Zheng-fang, DU Zhao-hui, ZHOU Qing, JIA Bao-hui, PENG Zhou-quan, YE Xiao-feng, LI Bei. Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of the cholinergic anti-inflammatory pathway on hemodynamics in hemorrhaged rats. **Methods** Hemorrhagic shock was induced by modified Wiggers method until mean arterial pressure (MAP) was stabilized within the range of 35 to 40 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa). Thirty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into six groups; sham group, hemorrhagic shock (Hem) group, vagotomy (VGX) group, vagus stimulation (STM) group, cholinergic inhibitor (THA) group and N receptor inhibitor (α -BGT) group. The distal end of the left vagus nerve trunk was placed on bipolar platinum electrode connected to a stimulation module and controlled by an acquisition system. Stimuli with constant voltage (5 V, 2 ms, 1 Hz) were applied to nerve for 12 minutes, starting 5 minutes after MAP stabilized at a level of 35 to 40 mm Hg. Before stimulation a blood pressure transducer was implanted in the common carotid artery for continuous registration of MAP. Blood samples and liver samples were collected from animals of all groups after stimulation. Serum levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and liver nuclear factor kappa-B (NF- κ B) were determined. **Results** MAP was markedly lowered at the end of bleeding, and the levels of serum TNF- α and liver NF- κ B markedly increased 45 minutes after the bleeding was discontinued. Bilateral cervical vagotomy did not significantly modify the changes in serum TNF- α , but slightly increased liver NF- κ B activation. Application of constant electric current to the distal end of the vagus trunk significantly reduced serum TNF- α and blunted liver NF- κ B activation. Tetrahydroamino-acridine (THA, 1.5 mg/kg, intravenous drip administration after bilateral cervical vagotomy reversed hypotension and attenuated serum TNF- α and liver NF- κ B amounts, but α -bungarotoxin (1.0 μ g/kg intravenous drip) pretreatment reverted the inhibitory effects of vagal stimulation. **Conclusion** The results suggest that direct electrical stimulation of the vagus nerve and its transmitter can significantly attenuate peak serum TNF- α amounts, inhibit the expression of liver NF- κ B, and prevent the development of hypotension, thus it might produce a potential protective effect on hemorrhaged rats through acetylcholine (ACh) binds N Ach receptor $\alpha 7$ subunit which exists in the macrophage.

【Key words】 hemorrhagic shock; vagus nerve; electrical stimulation; acetylcholine; tumor necrosis factor- α ; nuclear factor- κ B

基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2004ABA161)

作者单位:430071 武汉大学中南医院 ICU

作者简介:李建国(1952-),男(汉族),河北省隆尧县人,教授,硕士研究生导师,主任医师,主要研究方向为感染性休克和多器官功能障碍综合征发病机制及治疗。

失血性休克是临床常见的危重症之一,许多因素参与了其病理过程。过度的全身性炎症是失血性休克由可逆向不可逆转化的重要原因之一,与休克的预后有明显关系。因此,在失血性休克的早期,除进行积极的液体复苏外,采取抗炎治疗措施,阻断或

减少炎性介质的生成和释放,对于阻止失血性休克的病程发展有重要意义。新近研究发现,在中枢神经系统(CNS)与免疫系统之间存在一条具有拮抗全身性炎性反应作用的通路,该通路由迷走神经及其递质乙酰胆碱所构成,故命名为胆碱能抗炎通路(cholinergic anti-inflammatory pathway)^[1-3]。本实验中通过电刺激迷走神经以及静脉注射胆碱酯酶抑制剂和 N 型胆碱能受体拮抗剂等手段,观察迷走神经兴奋及乙酰胆碱释放对失血性休克大鼠血流动力学参数、血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量及肝组织核因子- κ B(NF- κ B)表达的影响,探讨胆碱能抗炎通路对失血性休克的治疗作用及其可能机制,为将这一方法应用于临床提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器:主要试剂有四氢氨基吡啶(tetrahydroaminoacridine, THA, 他克林, 美国 Cayman 公司), α -银环蛇毒素(α -bungarotoxin, α -BGT, 美国 Sigma 公司), 大鼠 TNF- α 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(美国 R&D 公司), 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(HRP-IgG, 美国 KPL 公司), 兔抗大鼠 NF- κ B p65 多克隆抗体(美国 Neomarkers 公司), 增强化学发光(ECL)试剂盒(LumiGLO Chemiluminescent Substrate Kit, 美国 KPL 公司), 硝酸纤维素膜(美国 Promega 公司); 主要仪器有 UV-1601 分光光度仪(日本 SANYO), 生命体征监护仪(美国 Agilent V24C), 450 nm 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)和电生理刺激仪(日本 Nihon-kohden SEN-7103)。

1.2 动物分组:30 只雄性健康 SD 大鼠(武汉大学医学院研究动物中心提供), 平均体重(250 \pm 20)g。随机分为 6 组, 每组 5 只。①假失血组(假 Hem 组):行假放血和双颈部迷走神经干分离术。②失血性休克组(Hem 组):放血制备失血性休克动物模型, 并行双侧颈部迷走神经干分离术。③迷走神经切断组(VGX 组):制备失血性休克动物模型, 并行双侧颈部迷走神经干分离和切断术。④迷走神经电刺激组(STM 组):除行与 VGX 组相同处理外, 电刺激左侧迷走神经干远端。⑤胆碱酯酶抑制组(THA 组):除进行与 VGX 组相同的处理外, 静脉注射胆碱酯酶抑制剂 THA, 模拟电刺激迷走神经的效应。⑥N 受体拮抗组(α -BGT 组):除进行与 STM 组相同的处理外, 静脉注射 N 型胆碱能受体拮抗剂 α -BGT。

1.3 失血性休克模型制备:质量分数为 200 g/L 的乌拉坦(剂量 1 g/kg), 腹腔注射麻醉后, 全身肝素

化(600 U/kg)。分离颈总动脉及迷走神经, 颈总动脉内置管与压力传导系统和监护仪相连, 用以直接监测动脉压。分离左侧股动脉并插管用放血和采集标本, 分离右侧髂静脉用以注射药物。参照改良 Wiggers 法建立大鼠失血性休克模型, 在 10 min 内以 1.8~2.0 ml/100 g 的速度放血, 至平均动脉压(MAP)35~40 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa), 稳定 5 min 不再回升即为放血终点。累计失血量约为总血量的 50.6%(按 56 ml/kg 计算)。假 Hem 组除不放血外, 其他步骤均相同。观察和记录动物血压的变化情况。

1.4 迷走神经分离、切断和电刺激术:动物麻醉后仰卧位固定备皮, 在喉头与胸骨间沿颈腹正中线开一长约 2.5~4.0 cm 的切口, 用止血钳将胸骨舌骨肌与胸骨甲状肌分开, 暴露颈动脉鞘(内有颈动脉及颈部神经)。持玻璃分针顺血管走向钝性分离颈总动脉和迷走神经约 3.0~4.0 cm, 用 4-0 丝线结扎迷走神经, 然后剪断, 远端与双铂电极连接。失血性休克模型制备完毕即刻, 以 5 V、2 ms 和 1 Hz 的强度持续刺激迷走神经 12 min。

1.5 药物处理:THA 组在失血性休克模型制备成功和完成迷走神经离断术后, 经髂静脉注射 THA(1.5 mg/kg)^[4]。 α -BGT 组在失血性休克模型制备成功和迷走神经离断后, 先经髂静脉注射 α -BGT(1.0 μ g/kg)^[5], 而后电刺激迷走神经。未给药各组给予等量的生理盐水。

1.6 指标检测

1.6.1 血流动力学:颈总动脉置管连续监测 MAP。

1.6.2 血浆 TNF- α 含量:制模成功后 45 min, 从颈总动脉采血 0.8 ml, 置于含有乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝剂的无菌离心管中, 离心(3 000 \times g, 4 $^{\circ}$ C)15 min 后取上清液, -70 $^{\circ}$ C 下保存, 用 ELISA 法检测 TNF- α 含量。

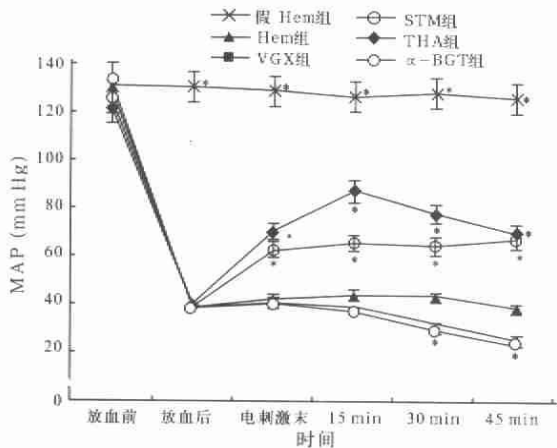
1.6.3 肝组织 NF- κ B 含量:制模成功后 45 min 处死动物, 取肝组织块 100 mg, 用免疫印迹化学发光法(ECL Western-blotting)检测肝组织 NF- κ B p65 含量。

1.7 统计学分析:用 SPSS11.5 For Windows2000 软件处理数据。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用单因素 ANOVA(analysis of variance)检验, 独立样本间比较采用 post hoc(Bonferroni *t*)检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MAP 的变化(图 1):失血性休克模型制备完

成后, MAP 仍进行性下降, 各组与假 Hem 组各相应时间点比较均有显著性差异。VGX 组血压下降更为明显, 但与 Hem 组比较, 各相应时间点均无显著性差异。STM 组及 THA 组血压下降幅度减轻, 在放血后各时间点的血压值均显著高于 Hem 组相应时间点; α -BGT 组血压显著下降, 与 VGX 组的变化相似; 与 Hem 组放血后 15 min 各相应时间点比较也均有显著性差异。

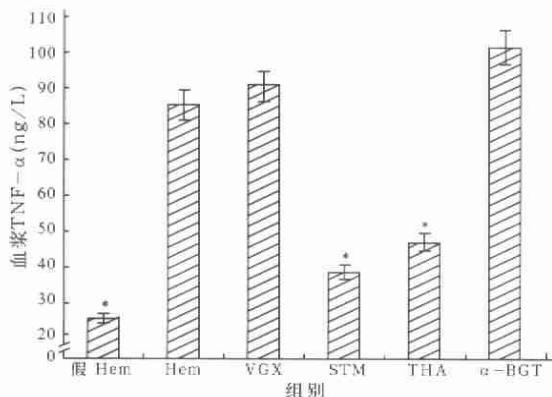


注: 与 Hem 组比较: * $P < 0.01$

图 1 不同时间点大鼠 MAP 的动态变化

Figure 1 Dynamic changes of MAP at different time - points

2.2 血浆 TNF- α 含量变化(图 2): 失血性休克发生 45 min 后, 血浆 TNF- α 含量显著升高, 与假 Hem 组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。VGX 组血浆 TNF- α 含量升高更为明显, 但与 Hem 组比较无显著性差异。STM 组和 THA 组血浆 TNF- α 含量明显降低, 显著低于 Hem 组 (P 均 < 0.01), 而与假 Hem 组的 TNF- α 含量相近; 但 α -BGT 组血浆 TNF- α 水平明显上升, 与 VGX 组的 TNF- α 含量相似; 与 Hem 组比较无显著性差异。



注: 与 Hem 组比较: * $P < 0.01$

图 2 休克 45 min 时血浆 TNF- α 水平

Figure 2 Levels of serum TNF- α at 45 minutes after the bleeding

2.3 肝组织 NF- κ B p65 含量变化(图 3): ECL Western-blotting 检测发现, 与假 Hem 组比较, Hem 组在休克发生 45 min 后, 肝组织 NF- κ B p65 表达明显增强。VGX 组肝组织 NF- κ B p65 表达更强。STM 组和 THA 组 NF- κ B p65 表达较 Hem 组明显减弱; 而 α -BGT 组肝组织 NF- κ B p65 表达明显增强。

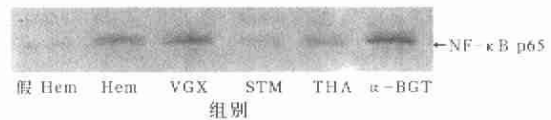


图 3 免疫印迹法检测休克 45 min 时肝脏 NF- κ B p65 含量

Figure 3 Western-blotting analysis of liver NF- κ B p65 45 minutes after the bleeding

3 讨论

失血性休克的基本病理生理学变化是失血造成的有效循环血容量减少和组织低灌注。失血性休克和严重创伤导致的应激状态可以引起炎症系统的广泛激活, 触发全身炎症反应综合征(SIRS)。在此过程中大量炎症介质, 尤其是一些促炎性细胞因子, 如 TNF- α 、白细胞介素-1(IL-1)和 IL-6 等均被激活和释放, 导致自我破坏性的全身性炎症, 进而发展为多器官功能障碍综合征(MODS)。因此, 除有效止血和血流动力学支持以外, 在失血性休克早期进行积极的抗炎治疗, 阻断或减少炎症介质的产生和释放, 可能对遏制失血性休克向不可逆方向转化具有积极意义。胆碱能抗炎通路是晚近发现的一条新的神经-免疫抗炎通路, 其抗休克作用首先是在内毒素性休克动物模型中得到证实。2000 年, Borovikova 等^[1]发现, 电刺激内毒素休克大鼠传出迷走神经, 可抑制肝脏 TNF- α 合成及降低血清 TNF- α 含量, 并显著逆转血压的持续下降, 减缓由内毒素引起的低血压性休克发生时相; 行单纯迷走神经切断术则使炎症刺激导致的 TNF- α 反应增强, 动物对内毒素的致死效应更加敏感。

Tracey 小组采用激光共聚焦显微镜(confocal)和逆转录-聚合酶链(RT-PCR)等方法研究证实, 胆碱能神经系统和天然免疫系统之间有着密切联系, 其分子基础是存在于巨噬细胞表面的 N 型胆碱能受体, 并且明确鉴定出是通过该受体的 $\alpha 7$ 亚单位发挥效应的。在体外, 将人巨噬细胞暴露于烟碱或乙酰胆碱后, TNF- α 、IL-1 和 IL-18 等促炎性细胞因子的生成受到抑制; 而应用 N 型胆碱能受体 $\alpha 7$ 亚单位拮抗剂 α -BGT 后, 则烟碱或乙酰胆碱的

此种抑制作用消除^[2,5,6]。

对于失血性休克,胆碱能抗炎通路也能发挥保护作用。Savci 等^[4]研究指出,胆碱能物质可调节血压并延长失血性休克大鼠的存活时间,在失血性休克大鼠脑室或外周注射强效胆碱酯酶抑制剂 THA,均可逆转失血性休克的血压降低,延长大鼠的存活时间。Guarini 等^[7]亦证实,电刺激失血性休克大鼠迷走神经传出纤维有明显的升压作用,能显著降低血浆中 TNF- α 水平,抑制肝脏 NF- κ B 抑制物 α (I κ B α) 的降解,阻止肝脏 TNF- α mRNA 的表达,并延长大鼠的存活时间,提高生存率。最新的动物实验还发现,在促肾上腺皮质激素 (ACTH) 和高张盐水等措施逆转失血性休克时,胆碱能抗炎通路也发挥着必不可少的重要作用^[8,9]。

本实验结果显示,失血性休克模型制备成功后,MAP 急剧下降,血浆 TNF- α 和肝组织 NF- κ B 含量明显升高;电刺激迷走神经传出端可以逆转失血性休克的低血压,降低休克大鼠血浆 TNF- α 含量,这与 Guarini 等的研究结果一致,表明胆碱能抗炎通路的确具有潜在的抗休克作用。迷走神经离断后静脉注射强效胆碱酯酶抑制剂 THA,可以产生与电刺激迷走神经相类似的作用,进一步证实胆碱能抗炎通路是通过迷走神经兴奋后其末梢所释放的乙酰胆碱而起作用的。而电刺激迷走神经前静脉注射 N 型胆碱能受体 $\alpha 7$ 亚单位的特异性拮抗剂 α -BGT,则消除了电刺激所产生的休克保护效应和抗炎作用,表明胆碱能抗炎通路对失血性休克动物的保护作用也与内毒素性休克时的情形相似,主要是通过 N 型胆碱能受体 $\alpha 7$ 亚单位介导实现的。在感染、失血和创伤导致全身性炎症反应的过程中,NF- κ B 的激活起着关键作用^[10]。活化的 NF- κ B 进入细胞核,与多种促炎性细胞因子(尤其是 TNF- α) 基因启动子的 κ B 序列结合,促进这些细胞因子的转录和合成增加。正是以 TNF- α 为代表的炎性介质过度释放,构成了休克过程中的瀑布样炎症反应。本研

究中发现,电刺激迷走神经和应用胆碱酯酶抑制剂 THA 后,失血性休克动物肝组织 NF- κ B p65 的表达明显减弱。提示胆碱能抗炎通路的抗失血性休克作用可能是通过抑制 NF- κ B 的激活,从而减少促炎性细胞因子转录及合成而实现的。

综上所述,胆碱能抗炎通路对失血性休克动物具有保护作用的发现,为休克治疗提供了新的思路。至于其确切作用机制,电刺激迷走神经的时机、强度和时间的选择,以及其临床应用的可能性,尚待深入探讨。

参考文献:

- 1 Borovikova L V, Ivanova S, Zhang M, et al. Vague nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin [J]. *Nature*, 2000, 405: 458-462.
- 2 Tracey K J. The inflammatory reflex [J]. *Nature*, 2002, 420: 853-859.
- 3 姜小国, 石德光, 胡森, 等. 迷走神经及其递质乙酰胆碱的抗炎作用研究进展 [J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15: 59-61.
- 4 Savci V, Avun S, Gürün V S, et al. Reversal of haemorrhagic shock in rats by tetrahydroaminoacridine [J]. *Pharmacology*, 2001, 62: 36-44.
- 5 Wang H, Yu M, Ochani M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor 7 subunit is an essential regulator of inflammation [J]. *Nature*, 2003, 421: 384-388.
- 6 Bernik T R, Friedman S G, Ochani M, et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic anti-inflammatory pathway [J]. *J Exper Med*, 2002, 195: 781-788.
- 7 Guarini S, Altavilla D, Cainazzo M M, et al. Efferent vagal fibre stimulation blunts NF- κ B activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock [J]. *Circulation*, 2003, 107: 1189-1194.
- 8 Guarini S, Cainazzo M M, Giualahi D, et al. Adrenocorticotropin reverses hemorrhagic shock in anesthetized rats through the rapid activation of a vagal anti-inflammatory pathway [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 63: 357-365.
- 9 Velasco I T, Baena R C. The role of the vagus nerve in hypertonic resuscitation of hemorrhagic shocked dogs [J]. *Br J Med Bio Res*, 2004, 37: 419-425.
- 10 Abraham E. NF- κ B activation [J]. *Crit Care Med*, 2000, 28: 100-104.

(收稿日期: 2004-09-12 修回日期: 2004-10-22)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《中国危重病急救医学》杂志 2005 年 1~6 期重点内容

第 1 期 休克与复苏

第 2 期 创伤与修复

第 3 期 心脑血管疾病急救

第 4 期 多器官功能衰竭

第 5 期 呼吸系统疾病

第 6 期 外科疾病急救

(本刊编辑部)