

肠系膜淋巴管结扎对失血性休克大鼠肺组织一氧化氮及其表达的影响

牛春雨 李继承 赵自刚 陈瑞华 张静 刘艳凯 张玉平 姜华

【摘要】 目的 观察结扎肠系膜淋巴管对不同时期重症失血性休克大鼠肺组织一氧化氮(NO)及其表达的影响,探讨肠淋巴途径在休克大鼠急性肺损伤(ALI)中的作用。方法 雄性 Wistar 大鼠 78 只,按随机数字表法分为假手术组($n=6$)、休克组($n=42$)和结扎组($n=30$)。休克组与结扎组复制重症失血性休克模型,结扎组于休克复苏后行肠系膜淋巴管结扎术;休克组于休克后 90 min、输液复苏后 0 h,休克组及结扎组于输液复苏后 1、3、6、12 和 24 h 各时间点处死大鼠,制备肺组织匀浆,检测 NO 及其合酶的变化;用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定各组大鼠肺组织诱导型一氧化氮合酶(iNOS) mRNA 表达。结果 休克组大鼠复苏后 3 h 肺组织 NO 含量、NOS 活性及 iNOS mRNA 表达开始升高,复苏后 6~12 h 持续在较高水平,均显著高于假手术组、休克后 90 min 及复苏后 0 h ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);结扎组仅于 3 h 和 6 h 增高,且结扎组复苏后 6、12 和 24 h 肺组织 NO 含量、NOS 活性以及 iNOS mRNA 表达均显著低于休克组相同时间点 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 肠系膜淋巴管结扎可降低重症失血性休克大鼠肺组织 NO 生成及 iNOS mRNA 表达,从而减轻肺损伤。

【关键词】 休克,失血性; 肺损伤; 肠系膜淋巴管; 结扎; 一氧化氮

Effect of mesenteric lymph duct ligation on nitric oxide content and its expression in lung in rats with hemorrhagic shock NIU Chun-yu*, LI Ji-cheng, ZHAO Zi-gang, CHEN Rui-hua, ZHANG Jing, LIU Yan-kai, ZHANG Yu-ping, JIANG Hua. * Department of Pathophysiology, Hebei North University, Zhangjiakou 075029, Hebei, China

Corresponding author: LI Ji-cheng (Email:lijc@mail.hz.zj.cn)

【Abstract】 Objective To observe the effect of mesenteric lymph duct ligation on nitric oxide (NO) and its expression in lung in rats with serious hemorrhagic shock at different periods, and explore the role of intestinal lymphatic pathway in acute lung injury (ALI). **Methods** Seventy-eight male Wistar rats were randomly divided into the sham operation group ($n=6$), shock group ($n=42$), and ligation group ($n=30$). The model of serious hemorrhagic shock was reproduced in shock group and ligation group. Mesenteric lymph was diverted by ligating mesenteric lymph duct in ligation group after resuscitation. All rats were executed and their lungs were harvested. NO and nitric oxide synthase (NOS) were determined in lung homogenate 90 minutes after shock, and 0, 1, 3, 6, 12 and 24 hours after resuscitation. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA was detected by reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR). **Results** The content of NO, activity of NOS and expression of iNOS mRNA in lung tissue in shock group were increased 3 hours after transfusion and resuscitation, and they became higher 6 - 12 hours after resuscitation. The values were significantly higher than those in sham operation group, 90 minutes after shock and 0 hour after transfusion and resuscitation ($P<0.05$ or $P<0.01$). The values were only increased 3 hours and 6 hours after transfusion and resuscitation, and all the values on 6, 12 and 24 hours after resuscitation were significantly lower in the ligation group compared with those in shock group at the same time points ($P<0.01$ or $P<0.05$). **Conclusion** The results demonstrate that the ligation of mesenteric lymph duct could reduce the NO and expression of iNOS mRNA in the lung tissue, thus ameliorate ALI in rats with serious hemorrhagic shock. Mesenteric lymph might play an important role in the pathogenesis of ALI.

【Key words】 hemorrhagic shock; lung injury; mesenteric lymph duct; ligation; nitric oxide

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370561);河北省自然科学基金资助项目(C2004000649)

作者单位:075029 张家口,河北北方学院病理生理教研室(牛春雨,赵自刚,陈瑞华,张静,刘艳凯,张玉平,姜华);310003 杭州,浙江大学细胞生物学研究所(李继承)

通讯作者:李继承,教授,博士研究生导师(Email:lijc@mail.hz.zj.cn)

作者简介:牛春雨(1967-),男(汉族),河北张家口人,教授,硕士研究生导师,博士研究生,河北省有突出贡献的中青年专家,河北省新世纪“三三三人才工程”二层次人选,张家口市拔尖人才,获河北省科技进步一等奖 1 项、三等奖 2 项,厅市级科技进步奖 2 项;发表学术论文 80 余篇(Email:ncylxf@sohu.com)。

失血性休克是临床常见急症,其导致的急性肺损伤(ALI)是患者死亡的主要原因,也是导致多器官功能障碍综合征(MODS)时常见的器官损伤^[1-3]。我们前期的研究发现,淋巴微循环与休克的发生、发展及转归关系密切^[4];结扎肠系膜淋巴管可减轻MODS大鼠肺功能障碍和组织损伤^[5]。为进一步阐明肠淋巴途径在休克肺损伤发病中的意义,本研究中进一步探讨肠系膜淋巴管结扎对重症失血性休克大鼠肺组织一氧化氮(NO)生成及其表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物与分组:78只健康清洁级Wistar雄性大鼠,体重220~300g,购自中国医学科学院动物繁殖中心。按随机数字表法分为假手术组(6只)、休克组(复制失血性休克模型,又分为休克90min及输液复苏后0、1、3、6、12和24h亚组,每组6只)、结扎组(复制失血性休克模型,输液进行复苏后结扎肠系膜淋巴管,又分为复苏后1、3、6、12和24h亚组,每个亚组6只)。实验前大鼠禁食12h,自由饮水。

1.2 失血性休克模型的复制:给大鼠肌肉注射(肌注)质量分数为2%的戊巴比妥钠(50mg/kg)全身麻醉,无菌手术,行右侧颈总动脉和左侧颈静脉插管,以备放血及输液用。舌静脉注射(静注)质量分数为0.5%的肝素(1ml/kg,700kU/L)全身抗凝。稳定10min,经ZCZ-50型自动抽注机自颈总动脉缓慢放血(失血量以全血量的1/5计算,全血量以体重的1/13计算),3min内完成,保留备回输液用。以无菌林格液瓶作为Lamson瓶,连接无菌输液器,将液面调整至固定高度,维持低血压(40mmHg,1mmHg=0.133kPa)90min,复制大鼠重症失血性休克模型。休克组、结扎组以自动推注机自左侧颈静脉缓慢回输放出的血液及林格液(量为全血量),时间 ≥ 20 min。复苏后行腹部手术,结扎组行肠系膜淋巴管结扎术;休克组仅在肠系膜淋巴管下穿线,不结扎。假手术组仅麻醉及行颈部、腹部手术,不放血、复苏。

1.3 标本留取:休克组和结扎组于休克及输液复苏后各时间点、假手术组于完成假手术后分别处死动物,取肺固定。取其中0.8~1.0g肺组织加9倍4℃无菌生理盐水,低温下制备体积分数为10%的组织匀浆,高速低温离心机以2500r/min(离心半径8cm)离心10min,取上清液置于冰箱内-26℃冷冻备测。另取固定肺组织0.5g左右,液氮保存,备测肺组织诱生型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA的表达。

1.4 肺组织匀浆NO及其合酶测定:以硝酸还原酶法、化学显色法分别检测肺组织匀浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量及NOS活性(试剂盒购自南京建成生物工程研究所),按试剂盒说明书操作。肺组织匀浆蛋白定量采用考马斯亮蓝法。

1.5 肺组织iNOS mRNA表达:0.2g肺组织低温匀浆,用Trizol一步法提取RNA,在波长260nm和280nm处测吸光度 A_{260}/A_{280} 比值为1.8~2.0。逆转录:反应体积为40 μl ,包括标本RNA2 μg ,随机引物100ng,5 \times 逆转录缓冲液8 μl ,10nmol/L dNTP(MBI公司)1.25 μl ,核糖核酸酶抑制剂(RNasin)25U,逆转录酶200U(Promega公司)。70℃5min;37℃60min,95℃5min,将逆转录出的cDNA-20℃保存备用。用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测肺组织细胞iNOS mRNA表达,用 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参照。iNOS引物序列:5'-TCC CGA AAC GCT ACA CTT-3'(正义链);5'-GGT CTG GCG AAG AAC AAT C-3'(反义链),预计扩增产物为315bp。 β -actin引物序列:5'-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AGG-3'(正义链);5'-TTG TAA CCA ACT GGG ACG ATA TGG-3'(反义链),扩增产物为764bp,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR条件:94℃预变性5min,然后94℃30s,56℃30s,72℃45s,共35个循环,终末72℃延伸7min。PCR产物经质量分数为1.5%的琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下拍照后进行密度扫描,以iNOS/ β -actin吸光度值($A_{\text{iNOS}}/A_{\beta\text{-actin}}$)计算待测基因的相对表达量。

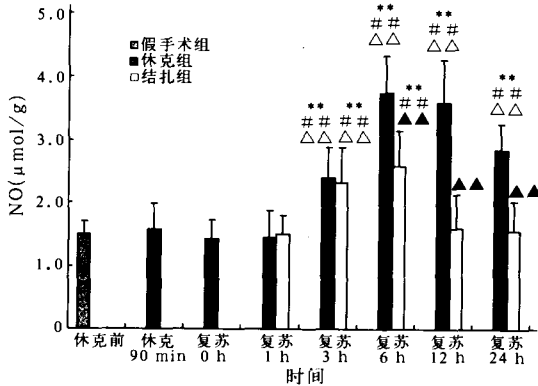
1.6 统计学处理:数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用SPSS 11.0统计软件包进行单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肺组织NO含量(图1):休克组大鼠复苏后3、6、12和24h及结扎组复苏后3h和6h肺组织NO含量均显著高于假手术组、休克后90min及复苏后0h(P 均 <0.01);结扎组复苏后6、12和24h NO含量均显著低于休克组相同时间点(P 均 <0.01),且12h和24h的NO含量与假手术组比较差异均无显著性(P 均 >0.05)。

2.2 大鼠肺组织NOS活性(图2):休克组大鼠复苏后3、6、12和24h及结扎组复苏后3h和6h肺组织NOS活性均显著高于假手术组及复苏后0h($P<0.05$ 或 $P<0.01$);休克组复苏后6h和12h

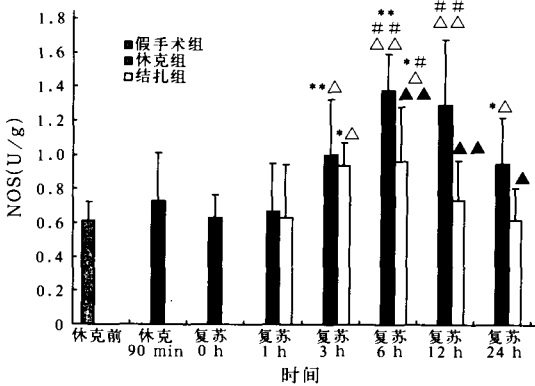
及结扎组复苏后 6 h NOS 活性均显著高于休克后 90 min ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 且结扎组复苏后 6、12 和 24 h NOS 活性均显著低于休克组相同时间点 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



注:与假手术组比较:· $P < 0.01$;与休克 90 min 比较:· $P < 0.01$;与休克复苏后 0 h 比较:△ $P < 0.01$;与休克组相应时间点比较:▲ $P < 0.01$

图 1 肠系膜淋巴管结扎对失血性休克大鼠肺组织 NO 含量的影响

Figure 1 Effect of mesenteric lymph duct ligation on content of NO in lung tissue of rats with hemorrhagic shock

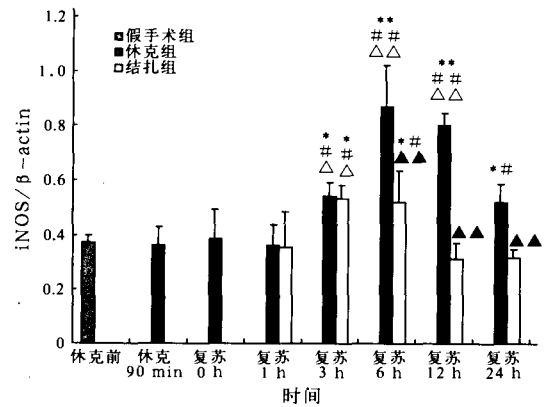


注:与假手术组比较:· $P < 0.05$, ·· $P < 0.01$;与休克 90 min 比较:· $P < 0.05$, ·· $P < 0.01$;与休克复苏后 0 h 比较:△ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$;与休克组相应时间点比较:▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

图 2 肠系膜淋巴管结扎对失血性休克大鼠肺组织 NOS 活性的影响

Figure 2 Effect of mesenteric lymph duct ligation on activity of NOS in lung tissue of rats with hemorrhagic shock

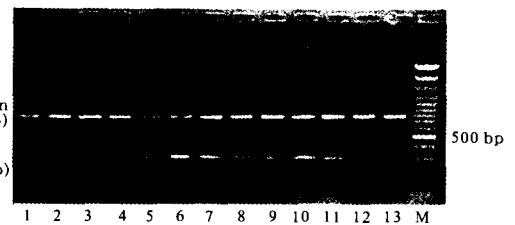
2.3 肺组织 iNOS mRNA 表达(图 3,图 4):休克组复苏后 3、6、12 和 24 h 及结扎组复苏后 3 h 和 6 h iNOS mRNA 表达均显著高于假手术组及休克后 90 min;休克组复苏后 3、6 和 12 h 及结扎组复苏后 3 h iNOS mRNA 活性均显著高于休克复苏后 0 h ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而且结扎组复苏后 6、12 和 24 h 的 iNOS mRNA 活性均显著低于休克组相同时间点 (P 均 < 0.01)。



注:与假手术组比较:· $P < 0.05$, ·· $P < 0.01$;与休克 90 min 比较:· $P < 0.05$, ·· $P < 0.01$;与休克复苏后 0 h 比较:△ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$;与休克组相应时间点比较:▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$

图 3 肠系膜淋巴管结扎对失血性休克大鼠肺组织 iNOS mRNA 表达的影响

Figure 3 Effect of mesenteric lymph duct ligation on expression of iNOS mRNA in lung tissue of rats with hemorrhagic shock



1 为假手术组;2 为休克后 90 min;3~8 分别为休克组复苏后 0、1、3、6、12 和 24 h;9~13 分别为结扎组复苏后 1、3、6、12 和 24 h;M 为 Marker

图 4 RT-PCR 检测肠系膜淋巴管结扎对失血性休克大鼠肺组织 iNOS mRNA 表达的影响

Figure 4 Effect of mesenteric lymph duct ligation on expression of iNOS mRNA in lung tissue of rats with hemorrhagic shock determined by RT-PCR

3 讨论

在失血性休克发展过程中,引起肠道屏障功能障碍和肠道内细菌/内毒素移位(BET)所致的肠源性感染,是无明确感染灶重症患者发生脓毒症的重要因素^[6],而 BET 引起的 ALI 是导致患者病情恶化,甚至死亡的主要因素之一^[7]。

近年研究表明,NO 在休克的病理生理过程中发挥了重要作用,与血管反应性下降、器官功能衰竭及病死率等密切相关^[8]。杨红梅等^[9]报告,失血性休克再灌注过程中心肌 NOS 活性、血浆 NO 浓度、心肌 NO 含量均升高,提示 NO 在失血性休克再灌注心肌损伤中起重要作用;而灵芝多糖可通过抑制 NOS 活性、降低 NO 浓度而对失血性休克再灌注心肌损伤起保护作用。同时有研究表明,牛珀至宝微丸

对内毒素休克大鼠心脏及脑损伤具有保护作用,其机制与下调 iNOS 在相关组织的表达相关^[10,11],可见 NO 及 iNOS mRNA 表达在休克发病学中具有重要作用。本研究结果显示,休克组大鼠复苏后 3 h 起肺组织 iNOS mRNA 表达开始增强,6~12 h 仍维持在较高水平,24 h 虽有所下降,但仍高于假手术组;同时,肺组织匀浆 NOS 活性及 NO 含量也显著增高,且增高程度和时间与 iNOS mRNA 表达增强趋势相似。提示:大鼠经失血、再灌注等一系列损伤,可导致肠道黏膜通透性增高,屏障功能下降,从而引起 BET,刺激肺组织 iNOS 表达增强,NOS 活性增高,诱导内皮细胞、巨噬细胞、中性粒细胞形成大量的 NO,从而引起 NO 释放增多;大量的 NO 发挥其损伤作用,加重炎症反应,通过刺激中性粒细胞产生呼吸爆发及脱颗粒,释放氧自由基和蛋白水解酶,作用于血管内皮细胞,进一步导致肺血管内皮细胞损伤、血管反应性下降、呼吸膜通透性增强,又可破坏其完整性,进而造成组织器官的损伤^[12],促使 ALI 发生。

肠道 BET 存在门静脉和肠淋巴途径两条途径,但在创伤性休克动物模型或患者门静脉血中却没有发现细菌或毒素^[13]。我室的研究也表明,肠淋巴途径在 MODS 的发病中具有重要作用^[14],结扎肠系膜淋巴管可抑制 MODS 大鼠的过度炎症反应和体液免疫反应^[15]。本研究结果表明,肠系膜淋巴管结扎阻断了肠淋巴回流,切断了大鼠由于手术创伤、失血、再灌注等因素使肠道屏障功能下降所导致的 BET,从而阻断了肠源性毒物经肠系膜淋巴管流向全身,降低了肺部炎症反应,有效地抑制了 iNOS mRNA 表达,降低了 NO 的释放及毒素-细胞因子的级联反应,从而对重症失血性休克所引起的肺损伤具有干预作用。

综上所述:本研究结果表明,肠系膜淋巴管结扎阻断了失血性休克复苏后肠系膜淋巴液中毒素、细胞因子等有害物质的移位,降低内毒素-细胞因子的级联反应,抑制 iNOS mRNA 表达,减少 NO 以及

NOS 形成,从而有效减轻重症失血性休克所引起的 ALI,提示肠淋巴途径在休克肺损伤发病学中具有重要作用。

参考文献:

- 吕镛烽,宋勇,施毅,等.失血性休克鼠肺组织 Toll 样受体基因的表达[J].中国危重病急救医学,2005,17:519-522.
- 王刚,陈婷婷,高长青.乌司他丁对创伤失血性休克兔肺损伤的保护作用[J].中国危重病急救医学,2005,17:36-38.
- 张君岚,刘艳梅,王殿华,等.IL-10 抗内毒素气管内滴注致急性肺损伤作用的实验研究[J].中国病理生理杂志,2000,16:324-326.
- 牛春雨,赵自刚,刘艳凯,等.高渗盐水对低血容量性休克大鼠淋巴循环的影响[J].中国危重病急救医学,1999,11:596-598.
- 赵自刚,牛春雨,张静,等.肠系膜淋巴管结扎对 MODS 大鼠的器官保护作用[J].中国病理生理杂志,2005,21:308-313.
- Nieuwenhuijzen G A, Deitch E A, Goris R J. The relationship between gut-derived bacteria and the development of the multiple organ dysfunction syndrome [J]. J Anat, 1996, 189 (Pt3): 537-548.
- Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, et al. Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats [J]. J Pediatr Surg, 1999, 34:1458-1462.
- Kirkeboen K A, Strand O A. The role of nitric oxide in sepsis an-overview [J]. Acta Anaesthesiol Scand, 1999, 43:275-288.
- 杨红梅,王黎,陈洁,等.失血性休克复苏时心肌损伤和一氧化氮的变化及灵芝多糖的干预作用[J].中国中西医结合急救杂志,2003,10:304-306.
- 黄彬,杜少辉,陈东风,等.牛珀至宝微丸对内毒素休克大鼠心脏诱导型一氧化氮合酶表达的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2004,11:95-98.
- 杜少辉,黄彬,陈东风,等.牛珀至宝微丸对内毒素休克大鼠脑诱导型一氧化氮合酶表达的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2004,11:77-79.
- Lundin S, Mang H, Smithies M, et al. Inhalation of nitric oxide in acute lung injury: results of a European multicentre study [J]. Intensive Care Med, 1999, 25:911-919.
- Xu D Z, Lu Q, Adams C A, et al. Trauma-hemorrhagic shock-induced up-regulation of endothelial cell adhesion molecules is blunted by mesenteric lymph duct ligation [J]. Crit Care Med, 2004, 32:760-765.
- 牛春雨,赵自刚,张静,等.肠淋巴途径在二次打击致大鼠 MODS 的发病学作用[J].中国病理生理杂志,2005,21:559-564.
- 赵自刚,牛春雨,侯亚利,等.肠系膜淋巴管结扎对 MODS 大鼠体液免疫功能的影响[J].中国微循环,2005,9:160-163.

(收稿日期:2006-03-08 修回日期:2006-08-07)

(本文编辑:李银平)

欢迎订阅《中国中西医结合急救杂志》

中国科协主管,中国中西医结合学会主办,全国各地邮局订阅,邮发代号:6-93

刊社地址:天津市和平区睦南道 122 号 邮编:300050