· 论著 ·

颈脊髓切断对内毒素休克大鼠全身炎症反应及预后的影响

朱曦　林英　和宇　阴赖宏　汪宗昱　赵华　聂智品

【摘要】 **目的**　研究颈脊髓切断对内毒素休克大鼠全身炎症反应及预后的影响。**方法**　92 只 SD 大鼠被随机分为正常对照组($n=8$)、内毒素休克模型组($n=42$)及内毒素休克+颈脊髓切断组($n=42$),后两组各取 10 只大鼠于制模后观察 48 h 存活率,其余大鼠再按制模后 3、6、12 和 48 h 分为 4 个亚组,每亚组 8 只动物。切断大鼠 C7 脊髓制备颈脊髓切断动物模型;腹腔注射内毒素脂多糖(LPS)10 mg/kg 造成动物内毒素休克。处死动物开胸取血,采用高效液相色谱法(HPLC)测定血浆中去甲肾上腺素(NE)含量,用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆中白细胞介素-10(IL-10)及 IL-6 的含量。**结果**　模型组血浆 NE 含量逐渐升高,而切断组逐渐下降,但均较对照组显著升高(P 均<0.05);自 6 h 起切断组显著低于模型组(P 均<0.05)。模型组血浆 IL-10 含量于 3 h 和 6 h 时显著低于对照组(P 均<0.05),之后逐渐升高(P 均>0.05);切断组于各时间点显著高于模型组,且于 12 h 和 48 h 显著高于对照组(P 均<0.05)。模型组各时间点血浆 IL-6 含量均高于对照组(P 均<0.05);切断组 3、6 和 12 h 显著低于模型组(P 均<0.05),且与对照组差异无统计学意义,而在 48 h 时较对照组显著升高($P<0.05$)。切断组大鼠 48 h 存活率高于模型组(70%比 20%)。**结论**　颈脊髓切断可增加内毒素休克大鼠血浆中 IL-10 的含量,抑制 IL-6 生成,并能提高 48 h 存活率,对内毒素休克大鼠的全身炎症反应及预后具有改善的作用。

【关键词】 去甲肾上腺素;　细胞免疫;　白细胞介素;　全身炎症反应;　内毒素休克

Effects of cervical chordotomy on systemic inflammatory response and the outcome in rats with endotoxic shock induced by lipopolysaccharide

ZHU Xi, LIN Ying, HE Yu, YIN Cheng-hong, WANG Zong-Yu, ZHAO Hua, NIE Zhi-pin. *Department of Surgical Intensive Care Unit, Beijing University, Third Hospital, Beijing 100083, China*

【**Abstract**】 **Objective**　To investigate the effects of cervical chordotomy on systemic inflammatory response and the outcome in rats with endotoxemia induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods**　Ninety-two Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: normal control group (group Ⅰ, $n=8$), endotoxemia group (group Ⅱ, $n=42$) and endotoxemia with cervical chordotomy (group Ⅲ, $n=42$). Endotoxemia was induced by intra-peritoneal injection of LPS 10 mg/kg. In group Ⅲ, "cervical chordotomy" was attained by transection of spinal cord at C7 immediately before intra-peritoneal LPS administration. Ten rats of group Ⅱ and Ⅲ each were observed for 48-hour survival. The other rats were further divided into four subgroups of 8 animals each, according to the time when the animals were sacrificed. The animals were sacrificed at 3, 6, 12, and 48 hours after intra-peritoneal LPS injection. Heart blood samples were obtained for determination of plasma concentration of norepinephrine [NE, by high performance liquid chromatography (HPLC)] and plasma concentration of interleukin-10 (IL-10) and IL-6 [by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)]. **Results**　Plasma NE concentration were significantly increased after intra-peritoneal LPS injection in group Ⅱ and Ⅲ as compared with group Ⅰ and were significantly lower in group Ⅲ than in group Ⅱ starting from 6 hours after LPS (all $P<0.05$). Plasma IL-10 concentration was significantly lower at 3 hours and 6 hours while plasma IL-6 concentration was significantly higher after LPS challenge in group Ⅲ than in group Ⅰ at all time points (all $P<0.05$). High transection of spinal cord significantly elevated plasma IL-10 level at 12 hours and 48 hours, lowered IL-6 release at 3, 6, and 12 hours (all $P<0.05$), and improved 48-hour survival (20% vs. 70%) in group Ⅲ as compared with group Ⅱ. **Conclusion**　Transection of spinal cord at C7 level can ameliorate the systemic inflammatory response induced by endotoxemia thus improving the outcome through elevation in IL-10 level, decreases in IL-6 release, and improves 48-hour survival. This might be attributable to loss of sympathetic nerve function.

【**Key words**】 norepinephrine;　cellular immunity;　interleukin;　systemic inflammatory response;　endotoxic shock

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7032017);北京市教育委员会科技发展计划面上项目(KM200610025021)

作者单位:100083 北京大学第三医院 SICU(朱曦,林英,和宇,汪宗昱);首都医科大学附属北京友谊医院感染暨急救医学科(阴赖宏);北京大学人民医院(赵华);北京延庆县医院(聂智品)

作者简介:朱曦(1962-),男(汉族),湖北省人,主任医师,Email:xizhuccm@163.com。

万方数据

感染性休克及其导致的多器官功能障碍综合征(MODS)一直是危重病研究的热点,尽管不同的学说试图解释其发病过程并尝试干预其进程,但并没有收到预期的临床效果。近年来,大量研究显示,由内毒素休克引起的全身应激反应可导致免疫功能改变,并最终影响疾病的预后,其主要介导通路为下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(HPA 轴)和交感神经系统(SNS)[1]。研究证明,SNS 激活后从交感神经末梢释放的神经递质去甲肾上腺素(NE)对免疫功能具有调节作用[2]。本实验拟在大鼠内毒素休克模型基础上行颈脊髓切断,探求 NE 对全身炎症反应及预后的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组:健康 SD 雄性大鼠 92 只,体重 300～350 g,购于北京大学医学部实验动物中心。按随机数字表法将大鼠分为正常对照组($n=8$)、内毒素休克模型组($n=42$)及内毒素休克+颈脊髓切断组($n=42$),后两组每组取 10 只大鼠用于观察制模后 48 h 存活率,其余 32 只大鼠再分为 3、6、12 和 48 h 4 个亚组,每个亚组 8 只。

1.2 颈脊髓切断动物模型制备:用体积分数为 10%的水合氯醛 3 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,在显微镜下操作,移除 C7～T1 的椎板,显露脊髓中间位置,横向剪开硬脊膜和蛛网膜,暴露从脊髓背静脉和两侧脊髓背动脉之间分别横向切开软膜和脊髓实质,将脊髓完全横断,以无菌纱布压迫止血,逐层缝合肌肉及皮肤。皮肤表面外敷青霉素 200 kU。术后大鼠自由饮水,每 2 h 帮助其排尿 1 次,定时翻身,每日更换垫料 1 次,保持干燥。

1.3 内毒素休克动物模型建立:除对照组外,其余两组大鼠均予脂多糖(LPS, E. coli O111:B4,购自美国 Sigma 公司)10 mg/kg 腹腔注射。制模成功后予林格液或生理盐水 40 ml/kg 腹腔注射抗休克治疗。分别于制模后 3、6、12 及 48 h 麻醉各组大鼠,开胸从心脏采血 5～10 ml 备检。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 血浆 NE 含量测定:以电化学检测法,采用高效液相色谱法(HPLC)测定,用外标法计算每份样本的 NE 含量,即 NE=标准品进样量/样品进样量×样品峰面积/NE 或 E 的峰面积×样品工作液总面积/样品血浆量。

1.4.2 血浆白细胞介素-10(IL-10)及 IL-6 含量测定:采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)测定,试剂盒由美国 BioSource 公司提供,具体操作参照试剂盒说明书进行。将一抗(单克隆抗体)包被于酶标板上,目标分子与单抗结合,加入生物素化的二抗与结合在单抗上的目标分子结合,形成免疫复合物,未结合的被洗去;将辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与二抗的生物素结合,多余的物质被洗去;加入四甲基联苯胺(TMB)显色。目标分子的浓度与波长 450 nm 处的吸光度(A)值呈正比。

1.5 统计学处理:使用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析,数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,用 Kaplan-Meier 生存曲线计算 48 h 存活率,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血浆 NE 含量变化(表 1):模型组及切断组各时间点血浆 NE 含量均明显高于对照组(P 均<0.05);模型组呈逐渐增加的趋势,而切断组则逐渐降低。在术后 6、12 和 48 h 时间点,切断组血浆 NE 含量显著低于模型组(P 均<0.05)。

表 1 各组大鼠制模后不同时间点血浆 NE 含量变化比较($\bar{x}\pm s$, $n=8$) nmol/L

组别	术后 3 h	术后 6 h	术后 12 h	术后 48 h
对照组	1.24±0.46			
模型组	9.44±3.11[a]	10.79±4.25[a]	13.93±7.51[a]	17.94±6.52[a]
切断组	7.60±2.27[a]	5.17±2.14[ab]	2.93±1.67[ab]	2.76±0.76[ab]

注:与对照组比较,[a]$P<0.05$;与模型组同期比较,[b]$P<0.05$;空白为无此项

2.2 血浆 IL-10 含量变化(表 2):术后 3 h 和 6 h 时,模型组血浆 IL-10 含量均较对照组明显降低(P 均<0.05),而切断组无明显改变。12 h 和48 h 时,模型组血浆 IL-10 含量与对照组比较差异无统计学意义,而切断组 IL-10 含量明显高于对照组和模型组(P 均<0.05)。

表 2 各组大鼠制模后不同时间点血浆 IL-10 含量变化比较($\bar{x}\pm s$, $n=8$) μg/L

组别	术后 3 h	术后 6 h	术后 12 h	术后 48 h
对照组	0.189±0.058			
模型组	0.054±0.010[a]	0.048±0.018[a]	0.112±0.017	0.252±0.018
切断组	0.152±0.033[b]	0.278±0.076[b]	0.752±0.034[ab]	1.236±0.247[ab]

注:与对照组比较,[a]$P<0.05$;与模型组同期比较,[b]$P<0.05$;空白为无此项

2.3 血浆 IL-6 含量变化(表 3):模型组大鼠在各时间点血浆 IL-6 含量均较对照组显著增加(P 均<0.05),随时间延长呈逐渐升高趋势。在 3、6 和 12 h 时间点,切断组血浆 IL-6 含量与对照组比较差异无

万方数据

统计学意义，但较模型组有所降低（P 均 <0.05）；48 h 时，切断组血浆 IL-6 含量与模型组比较无明显差异，但较对照组明显升高（$P<0.05$）。

表 3　各组大鼠制模后不同时间点血浆 IL-6 含量变化比较（$\bar{x}\pm s, n=8$）　μg/L

组别	术后 3 h	术后 6 h	术后 12 h	术后 48 h
对照组	0.163±0.032			
模型组	0.341±0.041[a]	0.297±0.074[a]	0.342±0.063[a]	0.431±0.199[a]
切断组	0.228±0.063[b]	0.203±0.063[b]	0.183±0.071[b]	0.276±0.010[a]

注：与对照组比较，[a]$P<0.05$；与模型组同期比较，[b]$P<0.05$；空白为无此项

2.4　大鼠 48 h 存活率：模型组死亡 8 只，存活 2 只，存活率为 20%；平均存活时间 17.88 h，标准误为 4.77 h，95%可信区间（CI）为 8.52～27.23。切断组死亡 3 只，存活 7 只，存活率为 70%；平均存活时间 37.19 h，标准误为 5.23 h，95%CI 为 26.95～47.43。Kaplan-Meier 生存曲线（图 1）显示，模型组从 8 h 开始存活率有所下降，至 12 h 存活率维持在 20%；而切断组的存活率约在 11 h 开始下降，至 13.5 h 存活率维持在 70%。

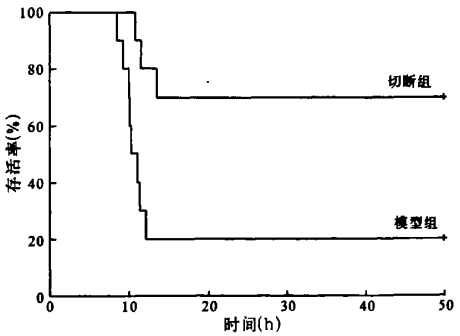

图 1　Kaplan-Meier 生存曲线计算两组大鼠 48 h 存活率

3　讨　论

近 30 多年来的研究已证实，机体的神经系统与内分泌、免疫系统之间构成相互作用的网络关系，NE 作为交感神经系统分泌的神经递质，对免疫系统具有调节作用。早期的研究认为，NE 可引起普遍的免疫抑制[3]；但最新的研究却显示，NE 仅抑制机体的细胞免疫，而对体液免疫却有促进作用[4]。在创伤、休克及严重感染等应激情况下，分布在脊髓侧角的肾上腺素能神经元下行纤维及其神经末稍释放出 NE，从而对交感神经张力及肾上腺髓质中儿茶酚胺的分泌起调控作用。本实验发现，给予 LPS 后 3 h，制模大鼠血浆中 NE 含量明显高于对照组，自 6 h 起模型组 NE 含量仍呈持续升高趋势，而切断组却逐渐下降，说明在 LPS 攻击下，机体交感-肾上腺髓质系统被激活。当脊髓切断后，由于神经递质从变性的轴突中丢失以及神经末梢失去重新摄取 NE 的功能，致使 NE 含量暂时性增高，出现短时性的拟交感作用[5]。随着血浆中 NE 被不断代谢分解，而切断的颈脊髓又不能释放出 NE，从而使血浆中 NE 的含量随时间而逐渐降低。

已知脓毒症时肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、IL-1 及 IL-6 等炎症细胞因子过度表达，而作为抗炎细胞因子的 IL-10 通过抑制核转录因子-κB（NF-κB）抑制蛋白-α（IκB-α）的降解以阻断单核/巨噬细胞中 NF-κB 的活化，抑制炎症细胞因子及趋化因子的生成，从而重建体内炎症介质和抗炎介质的平衡[6]。动物实验也显示，IL-10 对脓毒症动物具有抗炎症反应的保护作用[7-10]。本实验显示，在 LPS 攻击后 3 h 和 6 h，模型组大鼠血浆 IL-10 含量明显下降，而切断组无明显改变；在 12 h 和 48 h 时模型组血浆 IL-10含量恢复正常，而切断组则呈升高趋势。放射性配基结合及免疫荧光染色检查方法结果显示，产生 IL-10 的 Th2 细胞表面没有 β_2 肾上腺素能受体的结合位点[11]，说明 NE 对 IL-10 的这一影响可能是间接作用的结果。Swanson 等[12]通过研究发现，NE 或 β_2 受体激动剂能促进鼠幼稚 $CD4^+$ 分化为 Th1，从而促进 γ-干扰素（IFN-γ）的生成。由于 Th1 产生的致炎细胞因子 IFN-γ 对 Th2 生成 IL-10 具有一定的抑制作用，因此这可能是本实验中 IL-10 浓度随 NE 而改变的原因。Torres 等[13]的实验更进一步证实了 NE 在体外能促进炎症细胞因子 IFN-γ、TNF-α 和 IL-6 的合成，但同时也促进抗炎细胞因子 IL-10 的合成，这一点与本实验结果不相符，其原因可能为：研究对象的物种差异、制模方式不同、淋巴细胞培养环境（体内及体外实验）不同、NE 的含量及观察时限不同等。

本实验结果还显示，模型组各时间点血浆 IL-6 含量均较对照组有所增加，并呈逐渐升高趋势；在 3、6 和 12 h，切断组血浆 IL-6 含量与对照组比较差异无统计学意义，但较模型组有所降低。IL-6 作为一种兼有促炎和抗炎特性的细胞因子[14]，不仅在感染性休克早期显著升高，而且在整个病程中维持高水平。研究表明，血清 IL-6 含量与脓毒症、感染性休克及多器官功能障碍综合征（MODS）患者疾病的预后密切相关[15-16]，并已作为临床上研究感染性休克的一项纳入指标。Gornikiewicz 等[17]通过实验发现，NE 能促进由 LPS 诱导的人微血管内皮细胞生成

万方数据

IL-6；更进一步的研究结果显示，NE 的这一促进作用发生在 IL-6 的转译水平，并由 β_1 和 β_2 肾上腺素能受体介导。但在本实验中难以解释的是，在 48 h 时间点，切断组与模型组比较血浆 IL-6 含量无明显差异，但均较对照组明显升高，这可能是由于机体内产生 IL-6 的细胞种类多样，在本动物模型中所受的影响也各不相同所致。

由于 IL-10 和 IL-6 对内毒素休克动物的死亡率具有高度相关性，因此这可能是本实验中切断组大鼠 48 h 存活率明显高于模型组的原因。本实验结果还显示，血浆 NE 含量的改变与 IL-10、IL-6 含量的变化具有一定的相关性，因此我们推测，NE 对由感染性休克触发的"瀑布式"炎症反应具有抑制作用，从而减轻对多脏器功能的损害，降低死亡率。

参考文献

[1] Yang EV, Glaser R. Stress-induced immunomodulation and the implications for health [J]. Int Immunopharmacol, 2002, 2 (2-3): 315-324.

[2] Madden KS, Sanders VM, Felten DL. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1995, 35: 417-448.

[3] Cook-Mills JM, Cohen RL, Perlman RL, et al. Inhibition of lymphocyte activation by catecholamines: evidence for a non-classical mechanism of catecholamine action[J]. Immunology, 1995, 85(4): 544-549.

[4] Podojil JR, Sanders VM. CD86 and Beta2-adrenergic receptor stimulation regulate B-cell activity cooperatively [J]. Trends Immunol, 2005, 26(4): 180-185.

[5] 李英杰，王振金. 交感神经切断对内分泌和免疫功能影响的研究现状[J]. 北京军区医药，2001，13(6)：395-396.

[6] de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, et al. Interleukin 10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes[J]. J Exp Med, 1991, 174(5): 1209-1220.

[7] Howard M, Muchamuel T, Andrade S, et al. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia[J]. J Exp Med, 1993, 177(4): 1205-1208.

[8] van der Poll T, Marchant A, Buurman WA, et al. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis[J]. J Immunol, 1995, 155(11): 5397-5401.

[9] Ishida H, Hastings R, Thompson-Snipes L, et al. Modified immunological status of anti-IL-10 treated mice [J]. Cell Immunol, 1993, 148(2): 371-384.

[10] Kühn R, Löhler J, Rennick D, et al. Interleukin 10 deficient mice develop chronic enterocolitis[J]. Cell, 1993, 75(2): 263-274.

[11] Ramer-Quinn DS, Baker RA, Sanders VM. Activated Th1 and Th2 cells differentially express the beta-2-adrenergic receptor: a mechanism for selective modulation of Th1 cell cytokine production[J]. J Immunol, 1997, 159(10): 4857-4867.

[12] Swanson MA, Lee WT, Sanders VM. IFN-γ production by Th1 cells generated from naive CD4+ T cells exposed to norepinephrine[J]. J Immunol, 2001, 166(1): 232-240.

[13] Torres KC, Antonelli LR, Souza AL, et al. Norepinephrine, dopamine and dexamethasone modulate discrete leukocyte subpopulations and cytokine profiles from human PBMC [J]. J Neuroimmunol, 2005, 166(1-2): 144-157.

[14] Tilg H, Dinarello CA, Mier JW. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators[J]. Immunol Today, 1997, 18(9): 428-432.

[15] 梁华平，姚咏明，王正国. 关注脓毒症及其结局的预测研究[J]. 中国危重病急救医学，2005，17(12)：709-711.

[16] 梅雪，李春盛，王烁. 全身炎症反应综合征患者血清细胞因子动态变化的研究[J]. 中国危重病急救医学，2006，18(2)：85-88.

[17] Gornikiewicz A, Sautner T, Brostjan C, et al. Catecholamines up-regulate lipopolysaccharide-induced IL-6 production in human microvascular endothelial cells[J]. FASEB J, 2000, 14 (9): 1093-1100.

（收稿日期：2008-01-11 修回日期：2008-06-25）
（本文编辑：李银平）

· 启事 ·

《机械通气临床实践》出版

由俞森洋教授编著、钟南山院士和朱元珏教授作序的《机械通气临床实践》一书近期将由人民军医出版社出版。全书分 9 篇共 94 章，所介绍的机械通气知识几乎涉及基础和临床的所有方面，重点讲述机械通气的方法和技术、患者的监护、在不同疾病和临床状态下的应用。该书密切结合临床，注重实践应用、知识新颖，紧跟现代进展，并融会了作者自己多年的经验和研究成果，对临床应用的关键点、难点和困惑予以指明和点评，适用于呼吸内科医生、ICU 医护人员阅读。需要者可到当地新华书店购买，或与作者联系，地址：北京解放军总医院南楼呼吸科，邮编：100853。

（解放军总医院南楼呼吸科）

《呼吸危重学》出版

由解放军总医院俞森洋教授主编的《呼吸危重学》近期已由中国协和医科大学出版社出版。全书分上、下两册，共 71 章 286 万字。该书系统、全面、深入地介绍了呼吸危重病学领域所涉及的各方面知识，包括呼吸危重病的诊治和监护技术，各种呼吸危重病的病因、病理、诊断标准、救治技术、方法和策略等。该书注重知识的系统性、综合性，以及技术的实用性、进展性，适用于呼吸病学和危重病学医生，尤其是从事呼吸危重病学和 ICU 工作的医生阅读。

（解放军总医院南楼呼吸科）

万方数据