

颈脊髓切断对内毒素血症大鼠急性肺损伤的影响

林英 朱曦 和宇 汪宗昱 曹旭光

【摘要】 目的 研究颈脊髓切断对内毒素血症大鼠急性肺损伤的影响及可能机制。方法 72 只 SD 大鼠随机分为 3 组: 正常对照组 (NC 组, 8 只), 内毒素血症组 (ET 组, 32 只) 及内毒素血症+颈脊髓切断组 (TCSC 组, 32 只), 后两组按不同时间点 (3、6、12 和 48 h) 又分为 4 个亚组, 每个亚组 8 只。静脉注射脂多糖 (LPS) 10 mg/kg 制备内毒素血症模型。TCSC 组注射 LPS 前切断大鼠颈 7 脊髓。在不同时间点采血, 并留取肺组织。采用高效液相色谱仪-电化学检测法和酶联免疫吸附法 (ELISA) 分别测定血浆去甲肾上腺素 (NE) 和白细胞介素-6 (IL-6) 的浓度; 用血气分析仪检测动脉血氧分压 (PaO_2); 观察各组大鼠肺组织病理学改变及肺湿/干重 (W/D) 比值。结果 TCSC 组 6、12 和 48 h 血浆 NE 浓度、肺 W/D 比值较 ET 组均显著降低, PaO_2 较 ET 组显著升高, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05); TCSC 组肺损伤程度减轻, 3、6、12 和 48 h 血浆 IL-6 均明显低于 ET 组 (P 均 < 0.05)。相关性分析显示, 血浆 NE 与 IL-6 浓度呈显著正相关 ($r=0.458, P<0.05$), 与 PaO_2 呈显著负相关 ($r=-0.528, P<0.05$)。结论 切断大鼠颈脊髓后造成去交感神经支配可能通过抑制肾上腺素能受体的过度激活而减轻内毒素血症大鼠急性肺损伤的程度, 继而改善肺的氧合。

【关键词】 去甲肾上腺素; 内毒素血症; 白细胞介素-6; 肺损伤, 急性; 肺水肿

Effects of transection of cervical spinal cord on lipopolysaccharide induced acute lung injury in rat LIN Ying, ZHU Xi, HE Yu, WANG Zong-yu, CAO Xu-guang. Surgical Intensive Care Unit, Beijing University, Third Hospital, Beijing 100083, China
Corresponding author: ZHU Xi (Email: xizhuccm@163.com)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of transection of cervical spinal cord (TCSC) on acute lung injury (ALI) and its potential mechanism in rat. **Methods** Seventy-two rats were randomly divided into three groups: normal control group (NC, $n=8$), endotoxemia group (ET, $n=32$) and endotoxemia with TCSC group (TCSC, $n=32$), and the latter two groups were divided into four subgroups respectively according to different time intervals ($n=8$). Endotoxemia model was established by injecting lipopolysaccharide (LPS, 10 mg/kg) intravenously, and the spinal cord at 7th cervical spine of rats was transected in TCSC group. Samples of blood and lung were collected at different time intervals. The plasma levels of norepinephrine (NE) and interleukin-6 (IL-6) were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) respectively, and arterial blood oxygen pressure (PaO_2) was determined by blood-gas analyser. The changes in histopathology and lung wet/dry weight (W/D) ratio were also observed in every group. **Results** The changes in the levels of NE and lung W/D ratio of the TCSC group was significantly decreased than those of ET group, but PaO_2 of TCSC group was increased obviously than that of ET group (all $P<0.05$), and the degree of lung injury was less intensive in the TCSC group. At all the time points, the level of IL-6 of TCSC group was lower compared with ET group (all $P<0.05$). The results of correlation analysis suggested that there was a positive correlation between plasma NE and IL-6 concentration ($r=0.458, P<0.05$), a negative correlation between NE and PaO_2 ($r=-0.528, P<0.05$). **Conclusion** Sympathectomy as a result of TCSC at 7th cervical spine may palliate the degree of ALI and improve oxygenation in rats with endotoxemia by inhibiting excessive activation of adrenoceptor.

【Key words】 norepinephrine; endotoxemia; interleukin-6; acute lung injury; pulmonary edema

急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征 (ALI/ARDS) 的病理损害除炎性细胞聚集、活化及炎症介质释放外, 还与交感神经的过度兴奋有关。最新的资

料显示, “脓毒症时交感神经兴奋毒性”启动了全身促炎反应的发生和失控^[1]。我们在临床中也观察到, 颈脊髓损伤合并交感神经受抑制的患者在并发感染后, 全身炎症反应的程度较其他患者明显减轻, 且 ARDS 的发生率也较低, 继而推测颈脊髓损伤所致的交感神经功能受抑可能阻止了 ALI 的进一步发生发展。由此, 我们通过切断大鼠颈 7 (C7) 脊髓的方法制备去交感神经支配动物模型, 观察颈脊髓切断对脂多糖 (LPS) 诱导 ALI 的作用, 探讨去交感神经

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

通讯作者: 朱曦, Email: xizhuccm@163.com

作者简介: 林英 (1974-), 女 (汉族), 四川省人, 医学硕士, 主治医师, Email: aly740709@hotmail.com.

支配对内毒素血症大鼠 ALI 的影响及可能机制, 报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备: 雄性 SD 大鼠 72 只, 体重 300~350 g, 由北京大学医学部实验动物中心提供。按随机数字表法将动物分为 3 组: 正常对照组 (NC 组, 8 只), 内毒素血症组 (ET 组, 32 只) 及内毒素血症+颈脊髓切断组 (TCSC 组, 32 只), 后两组按不同时间点 (3、6、12 及 48 h) 又分为 4 个亚组, 每个亚组 8 只大鼠。

1.1.1 颈脊髓切断去交感神经动物模型的制备: 参照文献[2]的方法制备脊髓全横断动物模型。腹腔注射体积分数为 10% 的水合氯醛 (3 mg/kg) 麻醉大鼠, 俯卧位固定, 以 C7 椎骨棘突为标志, 暴露 C7-胸 1 (T1) 棘突及椎板, 咬除 C7-T1 的棘突, 移去椎板, 剪开硬脊膜和蛛网膜, 横向切断软膜和脊髓实质, 压迫止血, 随后缝合肌肉和皮肤, 表皮用青霉素 200 kU 外敷, 术后自然照明, 定时翻身, 每隔 2 h 帮助排尿 1 次。

1.1.2 内毒素血症动物模型建立^[3]: 除 NC 组外, 其余两组大鼠静脉注射 LPS 10 mg/kg, 然后再给予林格液 40 ml/kg 腹腔注射补液治疗。制模后 3、6、12 和 48 h 分别麻醉各组大鼠, 开腹暴露腹主动脉, 抽取动脉血 1 ml, 开胸从心脏采血 5~10 ml, 留取右侧肺组织备检。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 血浆去甲肾上腺素 (NE) 含量的测定: 参照裴兆辉等^[4]的方法, 采用高效液相色谱仪 (HPLC)-电化学检测法测定血浆 NE 含量。配制流动相、标准品、样品工作液和 0.1 mol/L HClO₄ 溶液。取 4 ml 肝素抗凝血, 高速低温离心 10 min, 分离血浆并于 -20 °C 冰箱中保存。色谱条件: 流速 0.6 ml/min, 电压 0.6 V, 图谱优化范围 (RANGE) 32, 运行次数 (RUN) 2 次, 纸速 1 mm/s, 进样量 10 μl。用外标法计算样本 NE 含量。NE (ng/L) = 标准品进样量/样品进样量 × 样品峰面积/NE 的峰面积 × 样品工作液总面积/样品血浆量。

1.2.2 血浆白细胞介素-6 (IL-6) 含量的测定: 用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定血浆 IL-6 的含量, 操作按照试剂盒说明书进行。

1.2.3 动脉血气检测: 用全自动血气分析仪测定动脉血氧分压 (PaO₂)。

1.2.4 肺湿/干重 (W/D) 比值的测定: 取大鼠右下肺组织, 拭去血迹后称湿重; 将肺组织置于 60 °C 烤

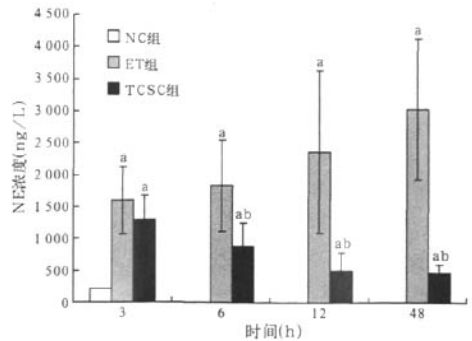
箱内 72 h, 去除水分后称干重。肺 W/D 比值反映肺水肿的程度。

1.2.5 肺组织病理学观察: 肺组织以体积分数为 10% 的甲醛水溶液固定, 石蜡包埋, 4 μm 切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色后光镜下观察 (×40)。按文献[5]标准进行肺组织病理损害分级。0 级: 肺血管、肺泡、间质及支气管均正常; 1 级: 间质少量中性粒细胞, 间质及肺泡腔出血、水肿范围 < 25%; Ⅱ级: 间质及部分肺泡腔有较多中性粒细胞, 间质增宽, 毛细血管淤血, 肺泡腔出血、水肿程度为 25%~50%; Ⅲ级: 大部分肺泡腔和间质有白细胞聚积成团, 间质明显增宽, 肺泡腔出血、水肿程度为 50%~75%。

1.3 统计学处理: 采用 SPSS 10.0 统计软件, 计量数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用单因素方差分析, 率及等级资料比较用非参数统计法的 Mann-Whitney 检验; 血浆 NE 浓度分别与 IL-6 含量和 PaO₂ 进行相关性分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆 NE 浓度的变化 (图 1): 与 NC 组比较, ET 组血浆 NE 浓度在各时间点均明显升高 (P 均 < 0.05); TCSC 组血浆 NE 浓度在 6~48 h 均显著低于 ET 组 (P 均 < 0.05)。



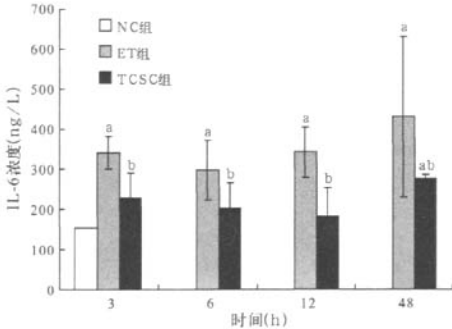
注: 与 NC 组比较, *P < 0.05; 与 ET 组同期比较, ^bP < 0.05

图 1 各组大鼠血浆 NE 浓度变化比较

2.2 血浆 IL-6 含量变化及 IL-6 与血浆 NE 浓度的相关性分析 (图 2): ET 组各时间点血浆 IL-6 浓度均较 NC 组有所增加 (P 均 < 0.05); TCSC 组各时间点血浆 IL-6 浓度均较 ET 组明显降低 (P 均 < 0.05)。相关性分析显示, 血浆 IL-6 与 NE 浓度呈显著正相关 (r = 0.458, P < 0.05)。

2.3 PaO₂ 的改变及 PaO₂ 与血浆 NE 浓度的相关性分析 (表 1): 与 NC 组比较, ET 组 6~48 h PaO₂

明显降低(P 均 <0.05),尤其在 6 h 最显著;TCSC 组 6~48 h PaO_2 均显著高于 ET 组(P 均 <0.05)。相关性分析显示, PaO_2 与 NE 浓度呈显著负相关($r=-0.528, P<0.05$)。



注:与 NC 组比较, $^aP<0.05$;与 ET 组同期比较, $^bP<0.05$

图 2 各组大鼠血浆 IL-6 浓度变化比较

表 1 各组大鼠 PaO_2 及肺组织 W/D 比值的变化比较($\bar{x}\pm s$)

组别	时间	动物数	$\text{PaO}_2(\text{mm Hg})$	W/D 比值
NC 组		8	100.81±17.02	4.11±0.15
ET 组	3 h	8	90.20±3.85	4.32±0.34
	6 h	8	62.43±8.00 ^a	5.03±0.26
	12 h	8	72.56±6.01 ^a	5.04±0.16 ^a
	48 h	8	78.14±5.46 ^a	4.96±0.29 ^a
TCSC 组	3 h	8	94.71±4.88	4.22±0.35
	6 h	8	92.16±4.01 ^b	4.62±0.50 ^{ab}
	12 h	8	94.26±10.46 ^b	4.48±0.54 ^b
	48 h	8	96.76±13.50 ^b	4.42±0.43 ^b

注:与 NC 组比较, $^aP<0.05$,与 ET 组同期比较, $^bP<0.05$;
1 mm Hg=0.133 kPa

2.4 肺组织 W/D 比值的变化(表 1):与 NC 组比较,ET 组肺组织 W/D 比值在 6~48 h 均显著升高(P 均 <0.05);而 TCSC 组肺组织 W/D 比值较 ET 组均明显降低(P 均 <0.05)。

2.5 肺组织病理学观察(表 2;彩色插页图 3,图 4):NC 组肺泡结构完整,轮廓清晰,肺泡腔及间质无水肿渗出,未见出血及炎性细胞浸润。给予 LPS 3 h 后,ET 组大鼠出现肺间质出血、炎性细胞浸润、肺泡间隔断裂、破坏,肺泡融合,肺大泡形成;6 h 后,肺组织损害更加明显,肺泡间隔增宽,水肿明显,肺泡间隔中有较多的炎性细胞浸润,部分聚集成团,间质、肺泡腔出血明显;12 h 后,肺组织可见大量炎性细胞浸润,黏膜肌层被破坏;48 h 后,肺组织内可见大量炎性细胞浸润,累及黏膜肌层及气道上皮细胞层。6~48 h 时间段,TCSC 组肺组织病变程度较 ET 组明显减轻。

表 2 各组大鼠肺组织病理评分变化比较 只

组别	时间	动物数	0 级	1 级	2 级	3 级
NC 组		8	8	0	0	0
ET 组	3 h	8	2	5	1	0 ^a
	6 h	8	0	1	4	3 ^a
	12 h	8	1	1	4	2 ^a
	48 h	8	1	2	3	2 ^a
TCSC 组	3 h	8	4	3	1	0 ^a
	6 h	8	2	5	1	0 ^{ab}
	12 h	8	3	4	1	0 ^{ab}
	48 h	8	3	5	0	0 ^{ab}

注:与 NC 组比较, $^aP<0.05$;与 ET 组同期比较, $^bP<0.05$

3 讨论

近年来,NE 在脓毒症过程中的免疫调节功能已成为继“胆碱能抗炎途径”后神经免疫领域的一个研究新热点。早期研究认为,NE 可通过单核细胞上的 β_2 受体介导抗炎反应;但最近的研究却发现,交感神经系统和肠源性 NE 能通过激活库普弗细胞上的 α_2A 受体促进促炎细胞因子的过度释放,最终导致严重感染患者多器官功能障碍综合征的发生率及病死率增加^[1]。本实验显示,给予 LPS 后 6~48 h,ET 组大鼠不论是从血浆 NE 和 IL-6 浓度,还是从组织病理学、 PaO_2 和肺 W/D 比值上看,都呈现明显的损害改变;而 TCSC 组上述指标的改善程度都很明显。相关性分析显示,NE 浓度与 IL-6 呈显著正相关,而与 PaO_2 呈显著负相关,提示交感神经过度兴奋能加重 LPS 诱导的 ALI。

哺乳动物脊髓内广泛存在肾上腺素能神经纤维及末梢,其主要来源于脑干 A5~A7 等肾上腺素能细胞群^[6]。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神经末梢释放 NE,使血浆 NE 浓度急剧增加。脊髓切断后,由于神经递质从变性的轴突中丢失及神经末梢失去重新摄取 NE 的功能,致使 NE 浓度暂时性增高,出现短时的拟交感作用^[7]。随血浆中 NE 被不断代谢分解,而切断的交感神经纤维又不能释放出 NE,故血浆 NE 浓度也随时间而逐渐降低。

LPS 是导致 ALI/ARDS 的主要病因之一,其病理改变主要为肺泡上皮细胞和血管内皮细胞的弥散性损害^[8]。Rassler 等^[9-10]通过实验发现,持续输入 NE 或 α 受体激动剂后,肺组织会出现间质和肺泡水肿、大量淋巴细胞浸润及肺不张等病理改变,肺泡灌洗液中蛋白含量升高,肺组织表达 IL-1 α 、IL-1 β 和 IL-6 mRNA 及血清 IL-6 的浓度显著增加;与 NE 的 α 受体激动剂比较, β 受体激动剂所致肺损伤的程度及血清 IL-6 浓度均明显降低,而胸腔积液量

却显著增加。其作用机制可能为： α 受体激动剂通过引起血流动力学的改变(增加右室收缩压和外周血管阻力)及诱发过度炎症反应而导致ALI,激活 β 受体/阻断 α 受体后,机体通过上调肺泡I型上皮细胞上的阿米洛利敏感钠通道和 Na^+/K^+ -ATP酶的活性,从而增强对肺泡液体的清除功能^[11-12]。Molina等^[13]也发现,在给予LPS后,血清中儿茶酚胺含量的增加与肺部炎症反应密切相关,这与本实验结果相一致。研究表明,NE能诱发多种严重的肺损伤(如嗜铬细胞瘤及神经源性肺水肿),究其机制,除了增加肺毛细血管静水压外,NE还能促进IL-6的生成^[14],而细胞因子的大量激活和过度炎症反应则是肺血管通透性增加、肺水肿形成的根本原因。Dincer等^[15]的研究结果还显示,NE能诱导人/大鼠肺泡上皮细胞的凋亡。而肺泡上皮细胞的广泛凋亡正是由LPS诱导的ALI的重要特征之一^[16],其作用机制可能与肺泡及气道上皮细胞表面表达的Fas/Fas配体系统有关^[17]。总之,由感染诱发的血浆NE浓度升高能加重LPS诱导的ALI,其作用机制可能与肾上腺素能受体(主要为 α 受体)被激活后所导致的血流动力学紊乱及过度炎症反应有关;而适当抑制脓毒症早期过高的交感张力能调控机体的免疫功能,防止促炎/抗炎失衡及ARDS的发生。

参考文献

- [1] Miksa M, Wu R, Zhou M, et al. Sympathetic excitotoxicity in sepsis: pro-inflammatory priming of macrophages by norepinephrine[J]. *Front Biosci*, 2005, 10: 2217-2229.
- [2] 刘锐, 游思维, 刘惠玲, 等. 大鼠脊髓全横断损伤模型的建立[J]. *神经解剖学杂志*, 2005, 21(3): 263-268.
- [3] 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(12): 732-735.
- [4] 裴兆辉, 朱妙章, 裴建明, 等. 高效液相色谱测定大鼠血浆儿茶酚胺的含量[J]. *心脏杂志*, 2003, 15(1): 9-11.
- [5] 雷文章, 韦靖江, 沈文律, 等. 实验性坏死性胰腺炎多器官损伤与内毒素血症的关系[J]. *中华实验外科杂志*, 1995, 12(3): 131-132.

- [6] Rajaofetra N, Ridet JL, Poulat P, et al. Immunocytochemical mapping of noradrenergic projections to the rat spinal cord with an antiserum against noradrenaline[J]. *J Neurocytol*, 1992, 21(7): 481-494.
- [7] 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.
- [8] 张秋金, 李银平, 黎檀实. 肺泡上皮细胞功能特性与内毒素性急性肺损伤[J]. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(6): 382-384.
- [9] Rassler B, Reissig C, Briest W, et al. Catecholamine-induced pulmonary edema and pleural effusion in rats: α - and β -adrenergic effects[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2003, 135(1): 25-37.
- [10] Rassler B, Rohling MA, Reissig C, et al. Involvement of cytokines and inflammation in catecholamine-induced pulmonary injury in rats[J]. *Vascular Disease Prevention*, 2005, 2(1): 1-9.
- [11] Minakata Y, Suzuki S, Grygorczyk C, et al. Impact of β -adrenergic agonist on Na^+ channel and Na^+/K^+ -ATPase expression in alveolar type I cells[J]. *Am J Physiol*, 1998, 275 (2 Pt 1): L414-422.
- [12] Laffon M, Lu LN, Modelska K, et al. α -adrenergic blockade restores normal fluid transport capacity of alveolar epithelium after hemorrhagic shock [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277 (4 Pt 1): L760-768.
- [13] Molina PE, Abumrad NN. Differential effects of hemorrhage and LPS on tissue TNF- α , IL-1 and associate neuro hormonal and opioid alterations[J]. *Life Sci*, 2000, 66(5): 399-409.
- [14] Barth W, Deten A, Bauer M, et al. Differential remodeling of the left and right heart after norepinephrine treatment in rats; studies on cytokines and collagen[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32(2): 273-284.
- [15] Dincer HE, Gangopadhyay N, Wang R, et al. Norepinephrine induces alveolar epithelial apoptosis mediated by α -, β -, and angiotensin receptor activation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 281(3): L624-630.
- [16] Kitamura Y, Hashimoto S, Mizuta N, et al. Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163 (3 Pt 1): 762-769.
- [17] Matute-Bello G, Liles WC, Frevert CW, et al. Recombinant human Fas ligand induces alveolar epithelial cell apoptosis and lung injury in rabbits [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 281(2): L328-335.

(收稿日期: 2007-09-25 修回日期: 2008-03-15)

(本文编辑: 李银平)

• 启事 •

《机械通气技术临床应用与进展》和《危重病急救医学进展》学习班招生通知

上海交通大学医学院附属新华医院急救中心将分别于 2008 年 10 月 19—25 日举办《机械通气技术临床应用与进展》学习班[项目编号: 2008-03-02-024(国)], 于 2008 年 10 月 26—31 日举办《危重病急救医学进展》学习班[项目编号: 2008-03-10-147(国)], 以宋志芳教授主编的《现代呼吸机治疗学——机械通气与危重病》第 2 版和《实用危重病综合救治》第 1 版为教材, 每个学习班授予国家级 I 类继续教育学分 10 分。举办地点在上海交通大学医学院附属新华医院, 招生对象为从事急诊、急救、危重病、ICU、呼吸、麻醉等专业技术人员, 招生名额为 30~50 名, 收取费用: 学费暨资料费 800 元, 住宿费 600 元(其余费用一律不收)。联系人: 赵洁(13916733661), 于洋(13761879849), 潘曙明(021-28022655), 宋志芳(13611790423)。

(上海交通大学医学院附属新华医院)

基质金属蛋白酶-2/9及其组织抑制剂比例失衡在高氧所致急性肺损伤中的作用

(正文见597页)

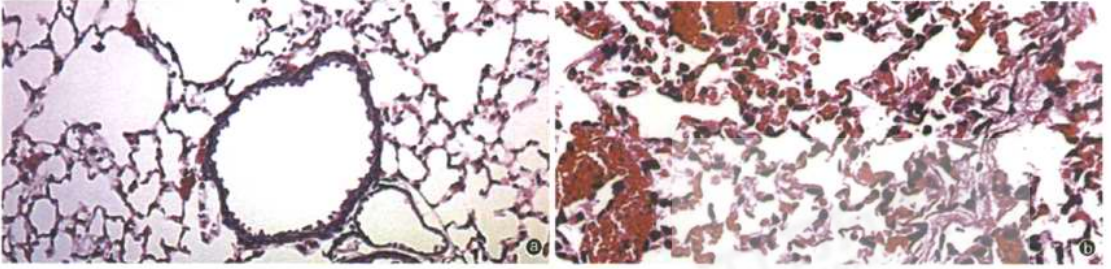
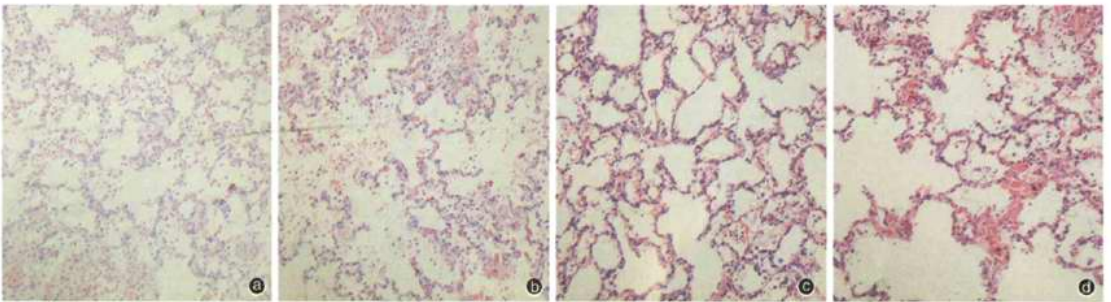


图1 对照组(a)和高氧72 h组(b)小鼠肺组织病理学变化(HE, ×200)

俯卧位通气联合呼气末正压治疗急性呼吸窘迫综合征家猪的疗效研究

(正文见615页)

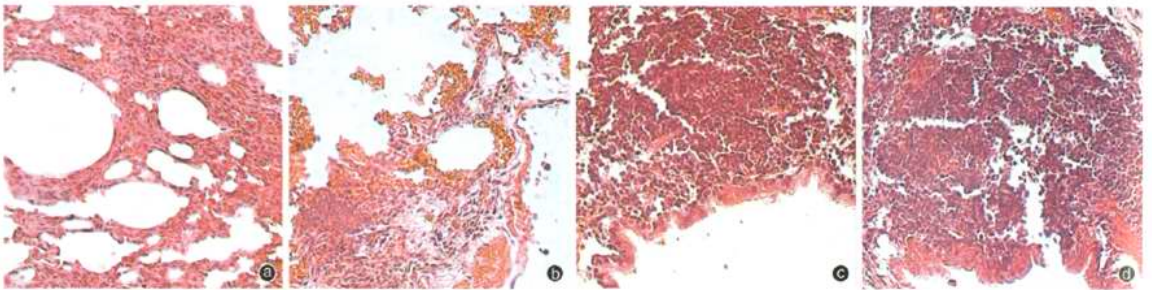


①: 仰卧位组腹侧肺组织, ②: 仰卧位组背侧肺组织, ③: 俯卧位组背侧肺组织, ④: 俯卧位组腹侧肺组织

图1 不同体位时ARDS家猪肺组织病理学改变(HE, ×400)

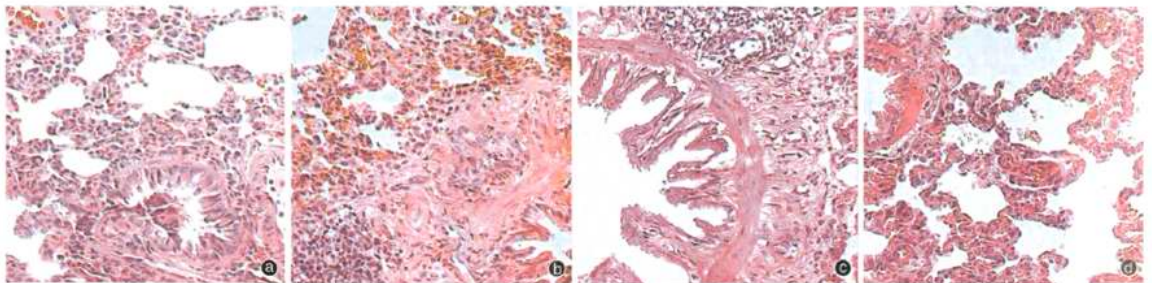
颈脊髓切断对内毒素血症大鼠急性肺损伤的影响

(正文见621页)



③: 3 h, ④: 6 h, ⑤: 12 h, ⑥: 48 h

图3 内毒素血症(ET)组大鼠制模后不同时间点肺组织病理学改变(HE, ×40)



③: 3 h, ④: 6 h, ⑤: 12 h, ⑥: 48 h

图4 内毒素血症+颈脊髓切断(TCSC)组大鼠制模后不同时间点肺组织病理学改变(HE, ×40)