

• 论著 •

卡巴胆碱对脓毒症大鼠内脏组织缺血引起脂质过氧化损伤的作用研究

胡森 张立俭 白慧颖 包呈梅

【摘要】 目的 探讨卡巴胆碱(CAR)对脓毒症大鼠脏器组织灌流和脂质过氧化损伤的影响。方法 雄性SD大鼠64只,采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备大鼠脓毒症模型。随机分为CAR处理组和CLP组,每组32只,术后即刻两组分别静脉注射CAR 10 μg/kg或等量生理盐水。每组16只用于观察12h和24h死亡率;其余16只于CLP后18h测定平均动脉压(MAP)和肝、肾、空肠组织血流量;取血测定血浆丙氨酸转氨酶(ALT)和肌酐(Cr)水平;后处死动物,测定空肠组织二胺氧化酶(DAO)活性及肝、肾、空肠组织黄嘌呤氧化酶(XOD)活性、丙二醛(MDA)含量和组织含水量。结果 CAR组12h和24h死亡率分别为25.0%(4/16)和50.0%(8/16),显著低于CLP组[37.5%(6/16),75.0%(12/16),*P*均<0.05]。CLP后18h,两组MAP差异无统计学意义(*P*>0.05);CAR组肝、肾、空肠组织血流量均明显大于CLP组(*P*均<0.05),肾和空肠组织XOD活性、MDA含量及组织含水量显著低于CLP组(*P*均<0.05);脏器功能指标[ALT:(64.3±8.3)U/L, Cr:(96.4±7.0)μmol/L, DAO:(0.20±0.04)U/L]的改善程度也均显著优于CLP组[ALT:(81.5±7.9)U/L, Cr:(117.1±6.7)μmol/L, DAO:(0.12±0.03)U/L, *P*均<0.05]。结论 CAR能改善脓毒症大鼠内脏灌流、抑制氧自由基生成,减轻组织水肿和脏器功能损害。

【关键词】 卡巴胆碱; 脓毒症; 多器官功能障碍; 氧自由基

The protective effects of carbachol on visceral ischemia-induced lipid peroxidation injury in rats with sepsis
 HU Sen, ZHANG Li-jian, BAI Hui-ying, BAO Cheng-mei. Laboratory of Shock and Organ Dysfunction, Burns Institute, First Affiliated Hospital of PLA General Hospital, Beijing 100048, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of carbachol (CAR) on visceral perfusion and lipid oxidation injury in rats with sepsis. **Methods** Sixty-four Sprague-Dawley (SD) rats received cecal ligation and puncture (CLP) surgery, and they were divided randomly into two groups; septic model group (CLP group, *n*=32) and septic model with CAR-treatment group (CAR group, *n*=32). CAR (10 μg/kg, CAR group) or normal saline (CLP group) was immediately injected into penial vein. Sixteen animals in each group were used to observe the mortality rates 12 hours and 24 hours after CLP, and the remaining rats for measurement of variables of blood and tissue. At the 18 hours after CLP, the mean arterial pressure (MAP), the blood flow (BF) of liver, kidney and jejunum, the plasma levels of alanine aminotransferase (ALT) and creatinine (Cr) were measured. Animals were sacrificed after the aforementioned determinations, and specimens of liver, kidney and jejunum were harvested for evaluation of malondialdehyde (MDA), xanthine oxidase (XOD), and assessment of tissue water content (ratio of dry to wet weight) of those organs. The activity of diamine oxidase (DAO) in jejunal tissue was detected. **Results** The mortality rates of 12 hours and 24 hours of CAR group were 25.0% (4/16) and 50.0% (8/16) respectively, all significantly lower than those of CLP group [37.5% (6/16) and 75% (12/16), both *P*<0.05]. CAR treatment did not result in significant statistical difference in the levels of MAP compared with CLP group at 18 hours after CLP (*P*>0.05), but led to significant increases in BF of CAR group in liver, kidney and jejunum compared with those of CLP group (all *P*<0.05). The levels of XOD and MDA, as well as the tissue water content were significantly lower in CAR group than CLP group in kidney and jejunum (all *P*<0.05). The parameters of organ function were significantly different in CAR group compared with CLP group [ALT: (64.3 ± 8.3) U/L vs. (81.5 ± 7.9) U/L, Cr: (96.4 ± 7.0) μmol/L vs. (117.1 ± 6.7) μmol/L, DAO: (0.20 ± 0.04) U/L vs. (0.12 ± 0.03) U/L, all *P*<0.05]. **Conclusion** The results indicate that CAR promotes visceral perfusion, inhibits lipid peroxidation production and alleviates visceral edema and dysfunction in rats with sepsis.

【Key words】 carbachol; sepsis; multiple organ dysfunction; oxygen free radical

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.09.012

基金项目:全军“十一五”计划专项课题(06Z055)

作者单位:100048 北京,解放军总医院第一附属医院烧伤研究

所休克与多器官障碍实验室

Email:hs82080@yahoo.com.cn

缺血和炎症反应引起的内脏组织水肿及脂质过氧化损伤是脓毒症的重要病理生理变化,也是导致多器官功能障碍综合征(MODS)和患者死亡的原因之一,目前临床尚缺乏有效的治疗措施^[1]。卡巴胆碱

(CAR)是一种胆碱能受体激动剂,具有促进胃肠运动、扩张血管、减轻炎症和抗氧化等多重作用,以往研究表明,CAR 能减轻缺血/再灌注(I/R)引起的过氧化损伤^[2]。本研究中通过采用大鼠盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症模型,观察 CAR 对内脏缺血引起的氧自由基生成和组织水肿的干预作用,为脓毒症和 MODS 的防治提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 动物模型制备与分组:60~70 日龄清洁级雄性 SD 大鼠 64 只,体重 220~250 g,购自军事医学科学院动物中心,适应性喂养 1 周,实验前禁食 12 h,禁饮 4 h。按照 Chaudry 等^[3]报道的方法行 CLP,复制严重腹腔感染致脓毒症模型。术毕立即皮下注射 50 ml/kg 生理盐水抗休克,自由饮水。按随机数字表法分为 CAR 处理组和 CLP 模型组,每组 32 只,术后即刻从阴茎背静脉注射 CAR(美国 Sigma 公司产品)10 μg/kg 或等量生理盐水。每组中 16 只用于观察 CLP 后 12 h 和 24 h 动物的死亡率,其余 16 只于 CLP 后 18 h 检测各项指标。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 平均动脉压(MAP)和组织血流量:MAP 用小动物血流动力学监测仪测定。组织血流量采用激光多普勒血流仪(LDF)测定,于术后 18 h 在麻醉状态下无菌手术开腹,暴露所要测量的肝、肾表面和空肠黏膜,用 LDF 接触式光纤探头测定肝、肾和空肠组织血流量。LDF 信号经仪器转换为血流灌注量单位(BPU),采用 PSW 2.0 配套软件进行 BPU 信号和曲线的输出、记录,每次测量 30 s,取稳定的曲线 10 s 计算平均值。

1.2.2 脏器功能及氧化损伤指标:于术后 18 h 抽取腹主动脉血,用自动生化分析仪测定血浆丙氨酸转氨酶(ALT)和肌酐(Cr)水平;然后处死动物,取肝、肾和空肠组织,按试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书步骤检测脂质过氧化物丙二醛(MDA)含量、组织含水量、黄嘌呤氧化酶(XOD)活性及空肠组织二胺氧化酶(DAO)活性。

1.2.3 脏器组织含水量:取肝、肾和空肠组织称湿

重后,放入烤箱 90 ℃烤 72 h,再称干重,组织含水量(%)=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.3 统计学处理:采用 SPSS 12.0 统计分析软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 死亡率:CAR 组 12 h 和 24 h 死亡率分别为 25.0%(4/16)和 50.0%(8/16),显著低于 CLP 组 12 h[37.5%(6/16)]和 24 h[75.0%(12/16)],差异有统计学意义(P 均 <0.05)。

2.2 MAP 和脏器功能(表 1):CLP 后 18 h,两组 MAP 比较差异无统计学意义($P>0.05$)。CAR 组肝、肾和空肠功能指标 ALT、Cr 和 DAO 显著优于 CLP 组(P 均 <0.05)。

2.3 脏器组织血流量(表 1):CLP 后 18 h,CAR 组肝、肾、空肠组织血流量大于 CLP 组,差异有统计学意义(P 均 <0.05)。

2.4 脏器 XOD、MDA 和组织含水量(表 2):CLP 后 18 h,CAR 组脏器 XOD 活性、MDA 含量及组织含水量均低于 CLP 组,以肾和空肠组织差异显著(P 均 <0.05)。

表 2 CAR 对大鼠 CLP 后 18 h 肝、肾和空肠 XOD 活性、MDA 含量及组织含水量的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	脏器	XOD(U/g)	MDA(μmol/g)	组织含水量(%)
CLP 组	8	肝	7.31±1.41	0.62±0.15	74.6±2.7
		肾	8.11±1.17	2.38±0.15	75.7±2.0
		空肠	7.66±1.34	2.90±0.34	72.0±3.4
CAR 组	8	肝	6.10±1.06	0.46±0.13	70.2±3.2
		肾	6.09±1.23*	2.01±0.17*	71.6±2.5*
		空肠	5.28±1.05*	2.08±0.22*	67.2±2.1*

注:与 CLP 组比较,* $P<0.05$

3 讨 论

CLP 是目前国内外公认的脓毒症动物模型制备方法,脓毒症模型能模拟腹腔脓肿发展到弥漫性腹膜炎、脓毒性休克和 MODS 的临床过程。在此过程中,肝、肾及小肠等脏器在缺血和过度炎症刺激下发生 I/R 和氧自由基损伤。已证明全身炎症反应失

表 1 CAR 对大鼠 CLP 后 18 h MAP、脏器功能指标及组织血流量的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	MAP (mm Hg)	血 ALT (U/L)	血 Cr (μmol/L)	空肠组织 DAO (U/L)	组织血流量(BPU)		
						肝	肾	空肠
CLP 组	8	68.5±7.5	81.5±7.9	117.1±6.7	0.12±0.03	20.16±5.19	20.74±5.98	21.14±2.98
CAR 组	8	64.3±8.0	64.3±8.3*	96.4±7.0*	0.20±0.04*	32.17±7.09*	39.12±8.27*	30.12±6.25*

注:与 CLP 组比较,* $P<0.05$;1 mm Hg=0.133 kPa

控引起的 MODS 与 I/R 产生的大量氧自由基密切相关。组织缺血和炎症引起的氧化应激反应能通过解除对关键炎症信号通路的负调控, 预激或增强炎症细胞的活性, 使炎症反应更加强烈, 以至失控造成组织损伤和 MODS^[4]。黄嘌呤氧化酶途径是组织氧自由基生成的主要途径, XOD 是黄嘌呤氧化酶途径中的关键酶, 其活性高低直接决定组织氧自由基含量, 可作为反映组织氧自由基生成的灵敏指标。在 I/R 过程中, 组织中堆积的 ATP 代谢产物次黄嘌呤在 XOD 的催化作用下大量生成黄嘌呤, 同时稳态的分子氧被转化为极不稳定的氧自由基, 造成肠组织结构、代谢和功能的损害^[5]。MDA 是氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸, 是引起脂质过氧化反应的产物, 其含量能间接反映组织细胞过氧化损伤的程度^[6]。CAR 是拟胆碱药, 能同时兴奋 M 样和 N 样受体, 兴奋 M 样受体具有促进胃肠动力、扩张血管的作用, 以往临床用于胃肠胀气和尿潴留等病症。根据“胆碱能抗炎通路”(cholinergic anti-inflammatory pathway) 理论^[7], 近年我们对 CAR 兴奋 N 样受体的作用进行了深入研究, 证明 CAR 能结合细胞膜上的胆碱能 N 受体 $\alpha 7$ 亚单位发挥有效的抗炎作用, 从而保护低血容量休克和 I/R 损伤时的器官功能, 体外细胞实验证明 CAR 对肠上皮细胞过氧化损伤具有明显的保护作用^[8-10]。

本研究中采用 CLP 制备脓毒症大鼠模型, 术后立即静脉注射 CAR, 结果显示, CLP 后 18 h CAR 组肝、肾、空肠组织血流量明显大于 CLP 组; 肾和空肠组织 MDA 含量、XOD 活性及组织含水量显著低于 CLP 组。表明 CAR 能增加脏器组织灌流, 改善脏器缺血, 抑制 XOD 活性和脂质过氧化物生成, 减轻氧自由基损伤引起的脏器组织水肿。本研究结果还显示, CAR 组脏器功能指标显著优于 CLP 组; 12 h 和 24 h 死亡率均显著低于 CLP 组, 表明 CAR 能改善脓毒症大鼠脏器功能损害, 降低死亡率。

CAR 对腹腔脓毒症大鼠的保护机制: ①与胆碱能 N 受体的 $\alpha 7$ 亚单位结合, 增强胆碱能通路的抗炎作用, 抑制脓毒症引起的全身和肠道局部炎症反应^[8]; ②抑制脓毒症时脏器组织炎症和缺血导致的氧自由基增加及过氧化损伤^[11]; ③直接抑制脏器微血管通透性升高, 减少血浆渗出, 从而减轻脏器组织水肿^[12]; ④增加脏器组织灌流, 改善组织缺血引起

的细胞损伤^[13]; ⑤抑制中性粒细胞在小肠组织聚集和髓过氧化物酶(MPO)等蛋白酶释放^[14]; ⑥抑制肠上皮细胞凋亡^[15]等。CAR 的上述作用有助于改善脓毒症时的失控炎症反应和氧自由基损伤引起的脏器缺血、水肿及功能障碍, 对休克、脓毒症和 MODS 的防治具有潜在的临床运用价值。

参考文献

- [1] Kaymak C, Kadioglu E, Ozcaqli E, et al. Oxidative DNA damage and total antioxidant status in rats during experimental gram-negative sepsis. *Hum Exp Toxicol*, 2008, 27 (6): 485-491.
- [2] 胡森. 兴奋胆碱能抗炎通路干预炎症与缺血引起的器官损害、感染、炎症、修复, 2008, 9(4): 195-198.
- [3] Chaudry IH, Wichterman KA, Baue AE. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. *Surgery*, 1979, 85(2): 205-211.
- [4] Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, et al. Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*, 2003, 31(4): 1048-1052.
- [5] Granell S, Bulbena O, Genesca M, et al. Mobilization of xanthine oxidase from the gastrointestinal tract in acute pancreatitis. *BMC Gastroenterol*, 2004, 4: 1.
- [6] Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*, 1990, 9(6): 515-540.
- [7] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 2000, 405(6785): 458-462.
- [8] 胡森, 周国勇, 吕艺, 等. 卡巴胆碱对脂多糖刺激巨噬细胞释放炎症细胞因子的影响及其受体研究. *中国药理学通报*, 2007, 23(12): 1575-1579.
- [9] 胡森, 宋琪, 王磊, 等. 电针兴奋胆碱能抗炎通路减轻内毒素引起的细胞因子释放和脏器功能损害. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15(4): 205-208.
- [10] 吕艺, 姜小国, 曹卫红, 等. 卡巴胆碱对缺血-再灌注动物脏器功能的保护作用. *中华急诊医学杂志*, 2006, 15(3): 228-231.
- [11] 吴静, 胡森, 汪剑威, 等. 维生素 C 对烫伤休克大鼠肠内补液时肠组织氧自由基损伤的影响. *解放军医学杂志*, 2008, 33(6): 646-648.
- [12] 胡森, 车晋伟, 包呈梅, 等. 卡巴胆碱对犬 50% 总体表面积烧伤口服补液时肺血管通透性和肺组织含水量的影响. *中国危重病急救医学*, 2009, 21(5): 286-289.
- [13] 胡森, 车晋伟, 杜颖, 等. 卡巴胆碱对烧伤犬肠内补液时肠黏膜血流量和吸收效率的影响. *中国危重病急救医学*, 2008, 20(3): 167-171.
- [14] 吕艺, 牛梅梅, 周洁平, 等. 卡巴胆碱减轻肠缺血/再灌注大鼠中性粒细胞活化和多器官损伤. *中国药物与临床*, 2008, 8(10): 770-773.
- [15] 胡森, 邹晓防, 吕艺, 等. 肠缺血/再灌注时卡巴胆碱对肠上皮细胞凋亡的影响. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(8): 463-466.

(收稿日期: 2009-05-12 修回日期: 2009-07-16)

(本文编辑: 李银平)