

· 论著 ·

淋浆对内毒素休克大鼠肾肝血流灌注量变化的干预作用

张利利 张静 赵自刚 张玉平 牛春雨

【摘要】 目的 观察正常淋浆对内毒素休克(ES)大鼠肾、肝微区血流灌注量变化的干预作用。方法 将 30 只 Wistar 大鼠按随机数字表法均分为对照组、模型组、淋浆组。采用静脉注射脂多糖(LPS, 15 mg/kg)复制 ES 模型;对照组给予等量生理盐水。制模 15 min 后,淋浆组自颈静脉输入仅占全血量 1/15 的淋浆;模型组和对照组以生理盐水代替。连续观察注射 LPS 后 6 h 内的颈动脉血压,用激光多普勒血流灌注仪连续记录肾、肝微区血流灌注量;并观察大鼠存活时间。结果 注射 LPS 后,模型组及淋浆组血压迅速下降,回升波后模型组呈缓慢进行性下降,而淋浆组在休克早期及后期血压虽低于对照组,但显著高于模型组。模型组和淋浆组注射 LPS 后肾、肝微区血流灌注量(PU)显著低于对照组(肾:559.90±111.87、577.50±91.49 比 672.60±50.81;肝:160.50±54.17、163.56±34.04 比 232.30±34.23,均 $P<0.05$)。两组肾微区血流灌注量于 30 min 时回升并显著高于对照组,且淋浆组高水平维持至 75 min,其后维持在对照组水平;而模型组 120 min 时显著降低,且于 210 min 起显著低于对照组。淋浆组肾微区血流灌注量(PU)于 LPS 后 270~360 min 显著高于模型组,以 330 min 后增高最为明显(330 min:615.44±98.71 比 364.40±146.76, 360 min:584.56±104.72 比 307.11±143.11,均 $P<0.05$)。两组肝微区血流灌注量于 30 min 时恢复正常,模型组于 LPS 后 270 min 起呈进行性下降;淋浆组 300 min 后肝微区血流灌注量(PU)显著高于模型组,以 330 min 后增高最为明显(330 min:224.67±20.65 比 172.90±46.74, 360 min:218.56±20.40 比 158.52±44.71,均 $P<0.05$)。模型组肾微区血流灌注量出现持续性低灌注的时间(min)显著早于肝脏(123.00±68.85 比 282.00±96.90, $P<0.01$)。淋浆组动物存活时间(h)明显长于模型组(11.80±2.67 比 7.21±1.33, $P<0.01$)。结论 正常淋浆对 ES 时肾、肝组织低灌注具有良好的干预作用,并可改善低血压,延长存活时间。

【关键词】 内毒素休克; 淋浆; 血流灌注量; 肾脏; 肝脏; 激光多普勒血流灌注仪

Intervention role of lymph plasma on renal and hepatic blood perfusion in rats with endotoxic shock
ZHANG Li-li, ZHANG Jing, ZHAO Zi-gang, ZHANG Yu-ping, NIU Chun-yu. Department of Pathophysiology, Hebei North University, Zhangjiakou 075029, Hebei, China
Corresponding author: ZHANG Jing, Email: zhangjing55155@yahoo.com.cn

【Abstract】 **Objective** To observe the intervention role of normal lymph plasma on renal and hepatic micro-regional blood perfusion in rats with endotoxic shock. **Methods** Thirty male Wistar rats were equally divided into control group, model group and lymph plasma group by random digits table. The latter two groups were injected intravenously with lipopolysaccharide (LPS, 15 mg/kg) to duplicate endotoxic shock model, and equal amount of normal saline was given in the control group instead of LPS. Fifteen minutes after the reproduction of model, normal lymph plasma in an amount of 1/15 of blood volume was infused in lymph plasma group. In control and model groups, normal saline was given instead of lymph plasma. Blood pressure was monitored continuously for 6 hours after LPS injection (or normal saline) in all groups, and the micro-regional blood perfusion of the kidney and liver was also observed at the same time with laser Doppler flowmetry. The survival time among groups was compared. **Results** After injecting LPS, the blood pressure of both model and lymph plasma groups declined quickly, and in model group, it gradually descended after a brief elevation. The blood pressure of lymph plasma group although was lower than that of control group at early and later stage, but it was still higher than that of model group. After LPS injection, the micro-regional blood perfusion (PU) of kidney and liver in model group and lymph plasma group were also decreased significantly compared with the control group (kidney: 559.90±111.87, 577.50±91.49 vs. 672.60±50.81; liver: 160.50±54.17, 163.56±34.04 vs. 232.30±34.23, all $P<0.05$). The blood perfusion of kidney in two groups was increased markedly after 30 minutes compared with control group, and the high level was maintained in the lymph plasma group up to 75 minutes, then it maintained at the level of control group. However, in model group, the blood perfusion was significantly reduced at 120 minutes, and it was significantly lower than control group after 210 minutes. The renal micro-regional blood perfusion (PU) in lymph plasma group was significantly higher than that of model group at 270 - 360 minutes, especially after 330 minutes (330 minutes: 615.44±98.71 vs. 364.40±146.76, 360 minutes: 584.56±104.72 vs. 307.11±143.11, both $P<0.05$). The liver blood perfusion in both groups became normal at 30 minutes, and in model group it declined progressively at 270 minutes. In lymph plasma group the liver blood perfusion (PU) was markedly increased compared with model group, especially after 330 minutes

(330 minutes: 224.67 ± 20.65 vs. 172.90 ± 46.74 , 360 minutes: 218.56 ± 20.40 vs. 158.52 ± 44.71 , both $P < 0.05$). In model group, the onset of decrease in perfusion (minutes) in the kidney was significantly earlier than that of liver (123.00 ± 68.85 vs. 282.00 ± 96.90 , $P < 0.01$). Survival time (hours) was markedly prolonged in lymph plasma group than that of model group (11.80 ± 2.67 vs. 7.21 ± 1.33 , $P < 0.01$). **Conclusion** Normal lymph plasma may play a beneficial intervention role in kidney and liver tissue hypoperfusion, and it ameliorates hypotension and prolongs survival time in endotoxic shock.

【Key words】 Endotoxic shock; Lymph plasma; Blood perfusion; Kidney; Liver; Laser Doppler flowmetry

休克是以组织低灌注为主要标志并继发多器官功能障碍综合征或多器官功能衰竭(MODS/MOF)连续过程的序贯性事件^[1],因此,探讨有效的干预措施,对降低其病死率有重要意义。本室前期的研究表明,小量正常淋浆对失血性休克及内毒素休克(ES)均有一定的干预作用^[2-3]。本研究中通过观察淋浆对内毒素脂多糖(LPS)导致大鼠ES时肾、肝微区血流灌注量变化的影响,进一步探讨淋浆对ES时组织低灌注的干预作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组:清洁级雄性Wistar大鼠30只,体重220~300g,由中国医学科学院实验动物繁殖中心提供,动物合格证号:SCXK(京)2006-0003。按随机数字表法将大鼠分为对照组、模型组和淋浆组,每组10只。

1.2 ES模型复制及干预:肌肉注射戊巴比妥全身麻醉,肝素全身抗凝,分离右颈总动脉并插管,生物信号采集系统连续记录血压;分离左颈静脉,插管备输液用。血压稳定30min后,模型组、淋浆组自颈静脉注入LPS(E. coli, O111:B4, 美国Sigma公司, 10 mg/ml)15 mg/kg, 2 min注完,加注0.2 ml生理盐水,保证LPS全部进入血液循环,复制ES模型;对照组以等量生理盐水代替LPS。淋浆组在注射LPS 15 min后以0.5 ml/min的速度自颈静脉输入淋浆(占全血量1/15,全血量按体重的7.4%计算);模型组和对照组以生理盐水代替淋浆。实验过程中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 正常淋浆的制备与干预:健康成年杂种犬3只,犬龄2~3年,购自北京芳缘养殖场,动物合格证号:SCXK(京)2009-0014。用戊巴比妥静脉麻醉犬,开腹分离肠淋巴管,用自制的金属淋巴插管行肠淋巴管插管术,在1%肝素(350 U/kg)全身抗凝下引流肠淋巴液3h,离心10min,除去细胞成分,

取上清液即为淋浆,于-72℃冷冻备用。

1.4 肾、肝微区血流灌注量的测定:用激光多普勒血流灌注仪(LDF, Per-Flux5000, 瑞典PERIMED公司)407型光导纤维探头(光纤间距0.25 mm)分别以医用生物胶测定肾、肝微区血流灌注量,稳定30min后记录基础血流灌注值,注射LPS后或相应时间连续观察6h,以灌注单位(PU)记录数据。

1.5 持续性肾、肝低灌注时间的判断:模型组大鼠给予LPS后血流灌注量出现回升波且维持在给予LPS前水平后,以其ES发展过程中,肾、肝微区血流灌注量下降开始差异具有统计学意义的灌注量较给予LPS前降低的百分比作为判断标准,分别找出模型组肾、肝微区血流灌注量开始显著降低的时间点进行统计。

1.6 动物存活时间的观察:各组大鼠在观察结束后结扎颈总动脉和颈静脉,逐层缝合伤口,记录自注入LPS到死亡的时间,存活24h以上为长期存活。

1.7 统计学处理:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用SPSS 16.0统计分析软件处理,进行单因素方差分析、组间和自身t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物血压的变化(图1):注射LPS前,各组血压均无明显差异(均 $P > 0.05$)。在观察期间,对照组血压稳定。注射LPS后,模型组及淋浆组血压均下降,尽管中间有一度回升,但模型组各时间点均显著低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而淋浆组在注射淋浆后接近对照组水平,仅在75~105 min及255~315 min时血压显著低于对照组,且在多个时间点显著高于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠肾微区血流灌注量的动态变化比较(图2):3组大鼠注射LPS前肾微区血流灌注量无明显差异。在观察期间,对照组肾脏微区血流灌注量稳定。模型组、淋浆组注射LPS后15 min,血流灌注量(PU)均较对照组显著下降(559.90 ± 111.87 、 577.50 ± 91.49 比 672.60 ± 50.81 ,均 $P < 0.05$),30 min时回升并高于对照组,淋浆组维持高水平至

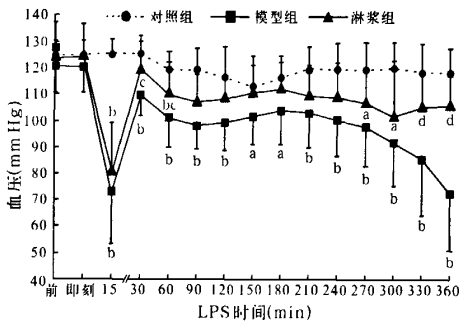
DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.12.012

基金项目:河北省教育厅科研计划项目(2007407)

作者单位:075029 张家口,河北北方学院病理生理教研室

通信作者:张静,Email:zhangjing55155@yahoo.com.cn

75 min; 模型组短暂升高后于 45~105 min 肾微区血流灌注量接近对照组, 自 120 min 起显著降低, 其后中间略有波动, 于 210~360 min 呈持续进行性下降。淋浆组从 90 min 起至观察结束, 除较对照组偶有增高外, 余时间点均无差异。尽管淋浆组及模型组自 195 min 起肾微区血流灌注量均低于注射 LPS 前, 但自 270 min 开始至观察结束, 淋浆组血流灌注量(PU)显著高于模型组, 以 330 min 后增高最为明显(330 min: 615.44 ± 98.71 比 364.40 ± 146.76, 360 min: 584.56 ± 104.72 比 307.11 ± 143.11, 均 $P < 0.05$)。

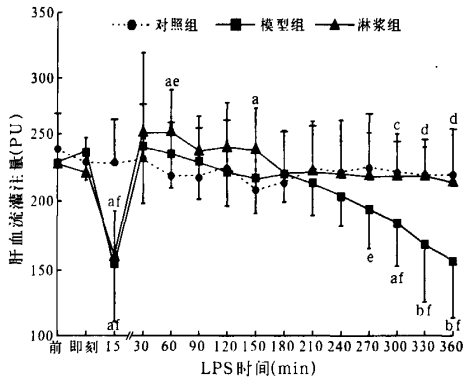
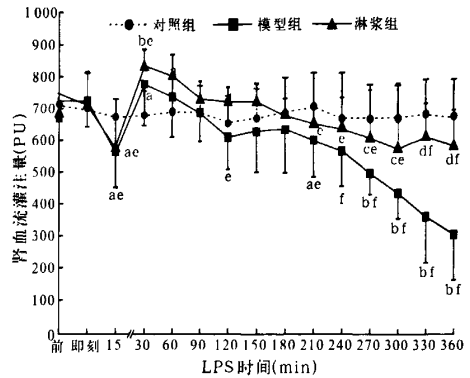


注: LPS: 脂多糖; 与对照组比较, $^a P < 0.05$, $^b P < 0.01$; 与模型组比较, $^c P < 0.05$, $^d P < 0.01$; 1 mm Hg = 0.133 kPa

图 1 淋浆对内毒素休克大鼠血压变化的影响

2.3 各组大鼠肝微区血流灌注量的动态变化比较 (图 2): 3 组大鼠注射 LPS 前肝微区血流灌注量无明显差异。在观察期间, 对照组肝微区血流灌注量恒定。模型组、淋浆组注射 LPS 后肝微区血流灌注量(PU)显著低于对照组(160.50 ± 54.17、163.56 ± 34.04 比 232.30 ± 34.23, 均 $P < 0.05$), 30 min 时恢复正常。模型组除偶低于对照组外, 多接近对照组水平, 但自 270 min 开始血流灌注量呈进行性下降, 285~360 min 明显低于对照组。淋浆组自 30 min 后肝微区血流灌注量除偶有短暂升高外, 多处于接近对照组恒定水平; 自 300 min 血流灌注量(PU)均显著高于模型组, 以 330 min 后增高最明显(330 min: 224.67 ± 20.65 比 172.90 ± 46.74, 360 min: 218.56 ± 20.40 比 158.52 ± 44.71, 均 $P < 0.05$)。

2.4 ES 大鼠肾、肝微区血流量开始持续低灌注时间的比较: 模型组大鼠制模后肝微区血流灌注量即持续显著下降, 肾血流灌注量较注射 LPS 前降低 15.56%, 肝降低 15.85%, 以此为标准统计, 模型组肾血流灌注量出现持续下降时间(min)明显早于肝脏(123.00 ± 68.85 比 282.00 ± 96.90, $P < 0.01$)。



注: LPS: 脂多糖; 与对照组比较, $^a P < 0.05$, $^b P < 0.01$; 与模型组比较, $^c P < 0.05$, $^d P < 0.01$; 与本组注射 LPS 前

比较, $^e P < 0.05$, $^f P < 0.01$

图 2 淋浆对内毒素休克大鼠肾、肝微区血流灌注量变化的影响

2.5 各组大鼠存活时间的比较: 对照组大鼠长期存活。淋浆组大鼠存活时间(h)显著长于模型组(11.80 ± 2.67 比 7.21 ± 1.33, $P < 0.01$)。

3 讨论

本研究发现, 注射 LPS 后大鼠血压在急剧下降的同时, 肾、肝微区血流灌注量也相应下降, 这是由于应激反应、交感-肾上腺髓质系统兴奋及儿茶酚胺分泌, 通过神经-体液调节, 使肾、肝等内脏及皮肤血管收缩所致; 也正是通过血液重新分布维持心、脑重要器官的血液供应, 从而促进血压回升接近正常水平及维持组织的血液灌注。值得注意的是, 模型组大鼠在注射 LPS 后 30 min 时肾微区血流灌注量出现短暂升高, 且明显高于对照组, 这难以用 LPS 的拟交感作用来解释, 也可能与肾脏的自我调节有关。实验证明, 肾灌注压在一定范围内可进行肾血流的自身调节, 其机制可能有肌源性调节、管-球反应和代谢性调节^[4]。当肾血管灌注压突然降低时, 跨壁压降低, 血管平滑肌受到的牵张刺激减弱, 毛细血管前阻

力降低,得以维持肾血流灌注量,且这种肌源性自身调节在肾血管表现特别明显^[5];同时,肾血流灌注量减少,使流经致密斑的小管液流量减少,通过管-球反馈使肾血流灌注量增加;以及氧分压降低,局部代谢产物[CO₂、H⁺、一氧化氮(NO)和缓激肽等]均可引起肾血管扩张,肾血流灌注量增加。近年来研究表明,ES 时增加 NO 量可维持小血管内血流^[6],给脓毒症大鼠注射一氧化氮合酶(NOS)抑制剂反而会增加白细胞黏附^[7],推测 ES 早期肾微区血流灌注量的短暂升高可能与 NO 合成增加有关。有报道,大鼠注射 LPS 30 min 后血浆中的 NO 明显升高^[8]。

本实验中还发现,ES 时不同器官出现微区血流灌注量持续下降的早晚不同,肾微区血流灌注量的下降明显早于肝脏,其原因可能与 LPS 的拟交感作用及 ES 时的应激反应有关,两者均使儿茶酚胺大量分泌。肾、皮肤和胃肠血管平滑肌上 α 受体的数量占优势,而肝和骨骼肌血管上 β 受体占优势,所以肾血管收缩明显,血流灌注量减少。休克时肾脏局部的肾素-血管紧张素系统(RAS)活跃及血容量减少时血管升压素释放增多,均促使肾血管平滑肌收缩,导致肾血流灌注量减少。因此,ES 时肾脏是最早受累的器官,积极采取措施改善肾脏血流灌注和保护肾脏,对防止休克恶化及器官功能衰竭具有重要意义。

与模型组比较,淋浆组大鼠自静脉输入正常淋浆后,低血压显著改善,肾、肝微区血流灌注量相对稳定,除肾微区血流灌注量在 30~75 min、肝微区血流灌注量在 60~75 min 和 135~150 min 显著高于对照组外,均维持在对照组的灌注水平,而且存活时间也明显延长,各项指标均显著优于模型组,表明正常淋浆对以大量 LPS 攻击 2 min 所致的 ES 也有良好的干预作用。提示对于以组织低灌注为特征的 ES,正常淋浆可明显改善 ES 时肾、肝微区血流灌注量,其机制是否与干预炎症介质和改善微循环有关,有待进一步研究。模型组注入等量生理盐水未能改善器官血流灌注量的事实,说明小量淋浆改善器官低灌注的作用,难以用补充血容量解释。本室过去的研究显示,淋浆干预 ES 的发展与减少肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等释放和减轻中性粒细胞激活有关^[3,9],并发现淋浆能改善失血性休克大鼠的微循环障碍,表现在解除肠系膜微循环血管痉挛,改善微血管的血流状态,提高微淋巴管收缩性^[2];还可干预右旋糖酐 500 所致的大鼠急性血液流变性异常^[10-11]。这一切表明,淋浆改善 LPS 所致的肾、肝血流低灌

注可能与改善微循环及减轻炎症级联反应有关,其干预 ES 的具体机制有待进一步探索。当然,研究也表明,休克淋巴液中的内毒素等成分^[12],可增加休克后重要器官肝、肾以及肺微血管内皮细胞的炎症反应^[13-15],结扎肠系膜淋巴管减少休克淋巴液回流可改善急性大鼠的血液凝固性^[16],提示淋巴液在各型休克的发病学中具有双刃剑作用。

综上所述,本研究证实,少量正常淋浆对 ES 的肾、肝组织低灌注具有良好的干预作用,并可改善血压和延长存活时间。这为今后开发新的血液代用品治疗 ES、降低病死率提出了新思路。

参考文献

- [1] 李银平,沈中阳.“一边是海水 一边是火焰”——休克的早期液体复苏. 中国危重病急救医学,2009,21:257-258.
- [2] 牛春雨,张静,姚彤,等.淋巴液的抗休克作用. 中国应用生理学杂志,1999,15:72-76.
- [3] 杨亦青,樊贵,韩敏,等.淋巴液对内毒素休克大鼠的干预作用及其机制. 中国急救医学,2004,24:661-664.
- [4] 朱大年.生理学.7版.北京:人民卫生出版社,2008:124.
- [5] 马明,朱晓云,王立善,等.一氧化氮合酶对早期内毒素休克猕猴肾脏的影响. 中国危重病急救医学,2006,18:421-424.
- [6] West MB, Hill BG, Xuan YT, et al. Protein glutathiolation by nitric oxide: an intracellular mechanism regulating redox protein modification. FASEB J, 2006, 20:1715-1717.
- [7] Sundrani R, Easington CR, Mattoo A, et al. Nitric oxide synthase inhibition increases venular leukocyte rolling and adhesion in septic rats. Crit Care Med, 2000, 28:2898-2903.
- [8] 廖欣,张宜,杜少辉,等.牛珀至宝微丸对内毒素休克肝损伤 iNOS 表达的影响. 中国医药学报,2004,19:307-309.
- [9] 樊贵,赵自刚,牛春雨,等.正常淋巴液对内毒素休克大鼠肺组织髓过氧化物酶活性及膜泵的作用研究. 中国危重病急救医学,2006,18:721-723.
- [10] 侯亚利,赵自刚,牛春雨,等.外源正常淋巴液对急性微循环障碍大鼠多器官及凝血功能的影响. 中国微循环,2009,13:93-96.
- [11] 李俊杰,王伟平,牛春雨,等.正常淋巴液对大鼠血液流变性异常的干预作用. 中国微循环,2006,10:250-253.
- [12] 牛春雨,侯亚利,赵自刚,等.肠淋巴途径在失血性休克大鼠肠源性细菌/内毒素移位发病学中的作用. 中国危重病急救医学,2007,19:266-269.
- [13] 赵自刚,牛春雨,张静,等.肠淋巴途径在大鼠休克致肝脏炎症反应中的作用. 中国危重病急救医学,2008,20:385-389.
- [14] Niu CY, Zhao ZG, Ye YL, et al. Mesenteric lymph duct ligation against renal injury in rats after hemorrhagic shock. Ren Fail, 2010, 32:584-591.
- [15] 赵自刚,陈瑞华,牛春雨,等.休克淋巴液对大鼠肺微血管内皮细胞炎症介质表达的影响. 中国危重病急救医学,2009,21:266-269.
- [16] 赵自刚,刘春艳,张玉平,等.肠系膜淋巴管结扎对急性失血大鼠血液凝固性的影响. 中国危重病急救医学,2009,21:708-710.

(收稿日期:2010-07-22)

(本文编辑:李银平)