

· 论著 ·

肠淋巴液引流改善失血性休克大鼠
液体复苏后的红细胞代谢

韩瑞 社会博 鲁蓓 司永华 张立民 张玉平 赵自刚 牛春雨

【摘要】 目的 观察肠淋巴液引流对失血性休克大鼠液体复苏后红细胞代谢的作用。方法 18 只雄性 Wistar 大鼠,按随机数字表法均分为假手术组、休克组、休克 + 引流组。复制失血性休克模型,维持低血压 1.5 h 后,行液体复苏(全血量 + 等量林格液)30 min,复苏结束后继续观察 3 h。休克 + 引流组维持低血压 1 h 后引流肠淋巴液。在复苏后 3 h 或相应时间点经腹主动脉取血,制备红细胞悬液,检测红细胞膜泵活性以及三磷酸腺苷(ATP)、乳酸(LA)水平;制备红细胞内液,检测 2,3-二磷酸甘油酸(2,3-DPG)、 Na^+ 、 K^+ 浓度;制备血浆,检测 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 、总 Ca 浓度。结果 与假手术组比较,休克组红细胞 ATP($\mu\text{mol/g}$)、 Na^+ - K^+ -ATP 酶($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)、 Ca^{2+} -ATP 酶($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)、血浆总 Ca(mmol/L)显著降低(ATP: 6.698 ± 0.938 比 10.670 ± 1.466 , Na^+ - K^+ -ATP 酶: 0.042 ± 0.010 比 0.066 ± 0.019 , Ca^{2+} -ATP 酶: 0.054 ± 0.015 比 0.081 ± 0.017 , 总 Ca: 2.27 ± 0.18 比 2.66 ± 0.21 , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),红细胞 LA(mmol/g)和血浆 K^+ (mmol/L)、 Cl^- (mmol/L)均显著升高(LA: 3.472 ± 0.853 比 1.743 ± 0.395 , K^+ : 5.83 ± 0.34 比 5.23 ± 0.37 , Cl^- : 113.37 ± 3.63 比 106.35 ± 4.99 , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),2,3-DPG (mmol/L)无显著差异(2.196 ± 0.609 比 2.590 ± 0.574 , $P > 0.05$)。与休克组比较,休克 + 引流组红细胞 2,3-DPG (4.459 ± 0.900)、ATP(8.859 ± 1.189)、 Na^+ - K^+ -ATP 酶(0.089 ± 0.022)、 Ca^{2+} -ATP 酶(0.082 ± 0.020)均显著升高,LA(2.060 ± 0.810)显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其他指标组间比较差异无统计学意义。结论 休克肠淋巴液引流可改善失血性休克大鼠液体复苏后红细胞的代谢状况,保护红细胞结构与功能。

【关键词】 肠淋巴液; 引流术; 失血性休克; 液体复苏; 红细胞; 代谢

Role of mesenteric lymph drainage improving the metabolism of red blood cell in hemorrhagic shock rats following fluid resuscitation HAN Rui, DU Hui-bo, LU Bei, SI Yong-hua, ZHANG Li-min, ZHANG Yu-ping, ZHAO Zi-gang, NIU Chun-yu. Institute of Microcirculation, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei, China

Corresponding author: NIU Chun-yu, Email: ncyxf@126.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of mesenteric lymph drainage on the metabolism of red blood cell (RBC) in hemorrhagic shock (HS) rats following fluid resuscitation. **Methods** Eighteen male Wistar rats were randomly divided into sham group ($n=6$), HS group ($n=6$), HS + drainage group ($n=6$). After 1.5 hours of HS model prepared, the animals were given fluid resuscitation by lost blood plus equal volume of Ringer solution within 30 minutes in HS and HS + drainage groups, and mesenteric lymph drainage was performed after 1 hour of hypotension in HS + drainage group. At 3 hours after resuscitation or corresponding time, blood samples were obtained from abdominal aorta. Membrane suspensions of RBC prepared from part of whole blood samples were used to measure the activities of adenosine triphosphate ase (ATPase) and contents of ATP and lactic acid (LA), the intracellular fluid of RBC prepared from part of whole blood samples was used to determine the concentration of 2,3-diphosphoglyceric acid (2,3-DPG), Na^+ and K^+ , plasma samples isolated from blood by centrifugation were used to determine the concentration of Na^+ , K^+ , Cl^- and total Ca. **Results** Compared with sham group, the content of ATP ($\mu\text{mol/g}$), activity of Na^+ - K^+ -ATPase ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) and Ca^{2+} -ATPase ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) in RBC membrane and total Ca (mmol/L) in plasma were decreased markedly (ATP: 6.698 ± 0.938 vs. 10.670 ± 1.466 , Na^+ - K^+ -ATPase: 0.042 ± 0.010 vs. 0.066 ± 0.019 , Ca^{2+} -ATPase: 0.054 ± 0.015 vs. 0.081 ± 0.017 , total Ca: 2.27 ± 0.18 vs. 2.66 ± 0.21 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$) in HS group, and the content of LA (mmol/g) in RBC and K^+ (mmol/L), Cl^- (mmol/L) in plasma were increased observably in HS group (LA: 3.472 ± 0.853 vs. 1.743 ± 0.395 , K^+ : 5.83 ± 0.34 vs. 5.23 ± 0.37 , Cl^- : 113.37 ± 3.63 vs. 106.35 ± 4.99 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$), there was no significant difference in term of the contents of 2,3-DPG (mmol/L : 2.196 ± 0.609 vs. 2.590 ± 0.574 , $P > 0.05$). Compared with HS group, the contents of 2,3-DPG (4.459 ± 0.900) and ATP (8.859 ± 1.189), the activities of Na^+ - K^+ -ATPase (0.089 ± 0.022), Ca^{2+} -ATPase (0.082 ± 0.020) of RBC were increased in HS + drainage group, and the level of LA (2.060 ± 0.810) was decreased observably ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), there were no significant differences in the other indices. **Conclusion** The results indicate that shock mesenteric lymph drainage plays an important role in improving the metabolism of RBC in HS rats following fluid resuscitation, subsequently, may preserve the structure and function of RBC.

【Key words】 Mesenteric lymph; Drainage; Hemorrhagic shock; Fluid resuscitation; Red blood cell; Metabolism

有研究表明,红细胞损伤引起的血液流变性异常^[1],是加重失血性休克后微循环障碍、组织细胞缺血缺氧、酸中毒、血管内皮细胞损伤的重要因素^[2-3],也是血管通透性增高、血浆外渗引起全身血流动力学异常以及毛细血管渗漏综合征的重要原因^[4-5]。因此,改善血液流变性已成为休克临床救治的关键靶点^[6]。近年来研究发现,肠淋巴液回流引起的肠源性感染及其导致的全身炎症反应失控是重症休克后多器官损伤的重要发病学机制^[7-8],肠淋巴液回流与血液流变性异常这一加重器官损伤的关键环节间的关系如何值得研究。针对失血性休克后血液流变性异常这一研究靶点,鉴于红细胞代谢是影响红细胞结构与功能的重要因素,且液体复苏是干预失血性休克的有力措施之一,为此,本研究中以红细胞三磷酸腺苷(ATP)、乳酸(LA)、2,3-二磷酸甘油酸(2,3-DPG)、膜泵活性以及红细胞内外离子作为观测指标,探讨肠淋巴液引流对失血性休克液体复苏后红细胞代谢的影响。

1 材料与方 法

1.1 主要实验材料:ATP、LA 试剂盒(南京建成生物工程研究所);2,3-DPG 试剂盒(美国,江苏希望生物科技有限公司分装);Na⁺、K⁺、Cl⁻ 试剂盒(北京百龙腾科技发展有限公司);总 Ca 试剂盒(上海华氏亚太生物制药有限公司);戊巴比妥钠(德国,上海泰瑞尔分装);肝素钠(江苏万邦生化医药股份有限公司)。

1.2 动物分组及实验方法:18 只雄性 Wistar 大鼠(SPF 级)购自军事医学科学院实验动物中心,动物许可证号:SCXK(军)2007-004,体重 230~270 g;适应性饲养 1 周后,禁食 12 h(期间自由饮水)后用于本实验。按随机数字表法将大鼠均分为假手术组、休克组、休克+引流组。腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉大鼠,休克组、休克+引流组经左股动脉缓慢匀速放血,维持平均动脉压(MAP)在(40±2) mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)复制失血性休克模型^[9]。维持低血压 1.5 h 后,将放出全血加等量林格液通过微量输液泵经股静脉行液体复苏,输液 30 min 后继续观察 3 h。休克+引流组大鼠在维

持低血压 1 h 后按本室方法引流肠淋巴液^[10]至实验终点。假手术组仅麻醉与手术,不放血。

1.3 标本留取与指标检测:休克组、休克+引流组在液体复苏结束后 3 h、假手术组在相应时间点,经腹主动脉取血,制备红细胞膜悬液、红细胞内液,并留取压积红细胞;以磷钼酸比色法(肌酸激酶催化肌酸与标本中 ATP 反应产生磷酸肌酸)、脱氢法(LA 经乳酸脱氢酶催化生成丙酮酸)、定磷法(ATP 酶分解 ATP 产生无机磷)分别检测红细胞悬液 ATP、LA 含量与红细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶活性;用文齐法检测血红蛋白(Hb)浓度,用于 ATP、LA、ATP 酶标准化。用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测红细胞内液 2,3-DPG 含量。压积红细胞经乙酸裂解后,离子电极法检测红细胞内液 Na⁺、K⁺ 浓度;文齐法检测上清液中 Hb 浓度,用于 Na⁺、K⁺ 浓度标准化。生化分析仪检测血浆 Na⁺、K⁺、Cl⁻、总 Ca 浓度。

1.4 统计学方法:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 16.0 统计软件进行处理,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用两样本均数 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 红细胞内液 2,3-DPG 含量(表 1):休克+引流组大鼠红细胞内液 2,3-DPG 含量显著高于假手术组、休克组(均 $P < 0.01$);休克组与假手术组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 红细胞悬液 ATP 含量(表 1):休克组与休克+引流组大鼠红细胞 ATP 含量均显著低于假手术组($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$);但休克+引流组明显高于休克组($P < 0.01$)。

2.3 红细胞悬液 LA 含量(表 1):休克组大鼠红细胞 LA 含量显著高于假手术组($P < 0.01$);休克+引流组显著低于休克组($P < 0.05$),且与假手术组无统计学差异($P > 0.05$)。

2.4 红细胞膜泵活性(表 1):休克组大鼠红细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活性均显著低于假手术组(均 $P < 0.05$);休克+引流组 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶活性均显著高于休克组($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),且 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性高于假手术组($P < 0.05$)。

2.5 红细胞内外离子浓度(表 2):与假手术组比较,休克组大鼠血浆 K⁺、Cl⁻ 显著升高、总 Ca 显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);休克组大鼠血浆 Na⁺ 与假手术组比较,休克+引流组血浆 Na⁺、K⁺、Cl⁻、总 Ca 浓度和休克组比较,以及 3 组间红细胞内液 Na⁺、K⁺

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.08.008

基金项目:国家自然科学基金(30370561);河北省自然科学基金(C2010001433);河北省科技研究与发展计划项目(11276103D-84);河北省张家口市科技研究与发展计划项目(0911021D-1, 0911021D-2);河北省高校百名优秀创新人才支持计划(CPRC047)

作者单位:075000 张家口,河北北方学院微循环研究所

通信作者:牛春雨,Email:ncylxf@126.com

表 1 肠淋巴液引流对失血性休克大鼠红细胞 2,3-DPG、ATP、LA 含量及膜泵活性的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	2,3-DPG(mmol/L)	ATP($\mu\text{mol/g}$)	LA(mmol/g)	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	Ca ²⁺ -ATP 酶($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
假手术组	6	2.590 ± 0.574	10.670 ± 1.466	1.743 ± 0.395	0.066 ± 0.019	0.081 ± 0.017
休克组	6	2.196 ± 0.609	6.698 ± 0.938 ^a	3.472 ± 0.853 ^a	0.042 ± 0.010 ^b	0.054 ± 0.015 ^b
休克 + 引流组	6	4.459 ± 0.900 ^{ad}	8.859 ± 1.189 ^{bd}	2.060 ± 0.810 ^c	0.089 ± 0.022 ^{bd}	0.082 ± 0.020 ^c

注:2,3-DPG:2,3-二磷酸甘油酸,ATP:三磷酸腺苷,LA:乳酸;与假手术组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与休克组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

表 2 肠淋巴液引流对失血性休克大鼠血浆离子、总 Ca 浓度及红细胞内液离子浓度的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	血浆离子浓度			血浆总 Ca 浓度	红细胞内液离子浓度	
		Na ⁺ (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)	Cl ⁻ (mmol/L)	(mmol/L)	Na ⁺ (mmol/g)	K ⁺ (mmol/g)
假手术组	6	138.25 ± 1.60	5.23 ± 0.37	106.35 ± 4.99	2.66 ± 0.21	45.69 ± 10.94	663.96 ± 109.09
休克组	6	138.93 ± 2.65	5.83 ± 0.34 ^a	113.37 ± 3.63 ^b	2.27 ± 0.18 ^a	43.03 ± 14.20	698.08 ± 104.67
休克 + 引流组	6	140.10 ± 1.84	5.49 ± 0.43	110.25 ± 2.64	2.58 ± 0.37	37.86 ± 11.54	616.77 ± 188.17

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

3 讨论

ATP 是各种组织细胞所需能量的直接来源;LA 为无氧酵解代谢产物,是引起代谢性酸中毒、加重细胞损伤的重要因素之一^[11];2,3-DPG 是红细胞糖酵解途径的重要中间产物,调节组织供氧^[12]。故本研究中选择了 ATP、LA、2,3-DPG 作为红细胞代谢的指标,以 ATP 反映红细胞的能量情况,以 LA 含量探讨红细胞的损伤机制,以 2,3-DPG 了解红细胞的供氧能力。有研究发现,大鼠维持低血压 1.5 h 行液体复苏后,红细胞 ATP 含量显著降低,LA 含量显著升高,而 2,3-DPG 含量未出现显著变化,说明存在红细胞能量代谢障碍,这成为休克红细胞损伤的发病学基础^[13]。休克肠淋巴液引流则提高了 ATP 含量、降低了 LA 含量,这对于保护红细胞是有利的;同时,也提高红细胞内液 2,3-DPG 含量,有利于氧的代偿^[14],从而发挥较好的干预作用。

ATP 酶为膜结合蛋白酶,其功能依赖 ATP,对建立跨膜离子梯度、维持细胞膜电位、细胞内外液的容量与代谢以及营养转运等具有重要的调节作用^[15];细胞内外离子浓度是稳定细胞结构、维持水和电解质代谢稳态的重要指标。为此,本研究中观察了休克肠淋巴液引流对红细胞膜泵活性与细胞内外离子浓度的影响。结果发现,休克组大鼠复苏后红细胞膜的 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶活性均明显降低,提示红细胞膜泵活性降低是引起红细胞流变性乃至微循环障碍的重要因素;同时,休克组大鼠出现血浆 K⁺、Cl⁻ 增高(尽管增高程度不是太高),其原因与 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性降低、LA 增多有关,血浆总 Ca 浓度为游离 Ca²⁺ 与结合 Ca 的总和,在血浆蛋白无明显变化的情况下反映游离 Ca²⁺ 的

浓度,其降低可能与 Ca²⁺-ATP 酶活性降低、输液等因素有关。进一步研究发现,引流休克肠淋巴液后,红细胞膜泵活性显著升高,红细胞内外离子浓度未出现显著变化,这说明休克肠淋巴液引流对于保护红细胞的完整性是有利的。

综上,本研究中以红细胞这一机体能量代谢障碍后损伤的首要靶细胞为靶点,证实引流肠淋巴液减少其回流,既可改善失血性休克大鼠液体复苏后红细胞的代谢状况,有利于维持红细胞结构的完整,又可调节红细胞的供氧能力,有利于机体组织器官的供氧,其机制除与减少休克后肠淋巴液中的毒性物质回流有关外,还可能与调节红细胞代谢的酶、激素等有关,但这还需要进一步证实。休克肠淋巴液引流对红细胞代谢状况的改善作用可能是减少休克肠淋巴液回流、改善机体整体和器官功能的重要机制,研究结果为完善休克后器官损伤的肠淋巴机制提供了新的实验资料。

参考文献

- [1] Machiedo GW, Zaets SB, Berezina TL, et al. Trauma-hemorrhagic shock-induced red blood cell damage leads to decreased microcirculatory blood flow. Crit Care Med, 2009, 37: 1000-1010.
- [2] Salazar Vázquez BY, Martini J, Chávez Negrete A, et al. Microvascular benefits of increasing plasma viscosity and maintaining blood viscosity: counterintuitive experimental findings. Biorheology, 2009, 46: 167-179.
- [3] 赵莲, 王波, 尤国兴, 等. 难逆性失血性休克早期血液流变学变化的研究. 中国危重病急救医学, 2008, 20: 159-162.
- [4] 杨万杰, 任朝来, 张如梅. 创伤后毛细血管渗漏综合征的血流动力学变化规律及意义. 中国危重病急救医学, 2009, 21: 55-57.
- [5] 景炳文, 林兆奋. 关于毛细血管渗漏综合征救治中有关问题的讨论. 中国危重病急救医学, 2009, 21: 705.
- [6] Zhao KS. Hemorheologic events in severe shock. Biorheology, 2005, 42: 463-477.