· 论著 ·

脓毒症大鼠小肠功能变化的研究

黎君友 孙丹 吕艺 晋梓 姜小国 胡森 盛志勇

【摘要】 目的 探讨脓毒症大鼠小肠屏障、吸收、通透及其蠕动功能的变化。**方法** 以 Wistar 大鼠缺血-再灌注复合内毒素血症制备动物模型。将动物随机分为正常对照(N)、肠系膜上动脉夹闭 1 h 后再灌注 1 h (I/R 1)、2 h (I/R 2) 和 4 h (I/R 4) 以及再灌注 2 h 后复合内毒素 2 h (I/RL) 共 5 个组。分别测定各组动物血或小肠组织二胺氧化酶(DAO)、D-乳酸、D-木糖水平及肠蠕动, 同时进行小肠普通光镜检查。**结果** I/R 1、I/R 4 和 I/RL 组血浆 DAO 活性均显著升高(P 均 < 0.05), 小肠组织 DAO 在 I/R 2 和 I/RL 组均显著降低(P 均 < 0.05), 从 N、I/R 1、I/R 2、I/R 4 到 I/RL, 各组血浆 DAO 和小肠 DAO 的相关分析可见呈高度负相关($r = -0.909, P < 0.001$); I/R 1、I/R 2 和 I/RL 组血浆 D-乳酸均显著升高(P 均 < 0.05); 与 N 组比较各组肠传输速度显著加快(P 均 < 0.05); I/R 1 和 I/RL 组血中 D-木糖浓度较 N 组高, 3 h 后仍高于 N 组; 血 DAO 浓度与血 D-乳酸浓度变化相关($r = 0.559, P < 0.05$)。**结论** 缺血-再灌注后小肠的屏障、吸收、通透和蠕动功能均有不同程度的改变; 缺血-再灌注复合内毒素血症时再次加速或加重了小肠屏障、吸收、通透和传输功能的变化。

【关键词】 大鼠; 缺血-再灌注; 肠; 内毒素; 脓毒症; 小肠功能

中图分类号: R631; R363 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-0603(2004)06-0352-03

Change in intestinal function in sepsis in rat LI Jun-you*, SUN Dan, LÜ Yi, JIN Hua, JIANG Xiao-guo, HU Sen, SHENG Zhi-yong. * Research Department of Burn Institute, 304 th Hospital of PLA, Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To study the barrier function, absorption, permeability and peristalsis of intestine in sepsis in rats. **Methods** A Wistar rat model of sepsis was reproduced by ischemia/reperfusion (I/R) of the intestine combined with endotoxin challenge. Animal were randomly divided into normal, I/R 1 hours (I/R 1), I/R 2 hours (I/R 2), I/R 4 hours (I/R 4) and I/RL groups. The following parameters were measured in the experiments: ①diamin oxidase activity (DAO), D-lactate and D-xylose levels in blood using spectrophotometry; ②transit function of small intestine; ③pathological examination of small intestine by light microscope. **Results** The results showed that plasma DAO activity was increased in I/R 1, I/R 4 and I/RL (all $P < 0.05$), and small intestinal tissue DAO was decreased in I/R 2 and I/RL (both $P < 0.05$). Negative correlations were found between plasma and intestinal DAO ($r = -0.909, P < 0.001$). Plasma D-lactate was elevated significantly in I/R 1, I/R 2, and I/RL (all $P < 0.05$). D-xylose content was increased at I/R1 and I/RL groups (both $P < 0.05$), and it was significantly higher than controls at 3 hours. Similarly, a positive correlation was found between plasma DAO activity and plasma D-lactate level ($r = 0.559, P < 0.05$). **Conclusion** The intestinal barrier function, absorption function, permeability, and transit are impaired after gut ischemia/reperfusion combined with endotoxin challenge.

【Key words】 rat; intestinal ischemia/reperfusion; lipopolysaccharide; sepsis; intestinal functions

CLC number: R631; R363 **Document code:** A **Article ID:** 1003-0603(2004)06-0352-03

大量的研究表明, 肠道在疾病的发生发展中起着极其重要的作用^[1-3]。创伤后的肠屏障功能改变, 通透性增加, 肠道细菌和内毒素移位, 导致大量炎性介质和细胞因子释放, 从而可加剧屏障功能的改变和影响各器官功能, 最终导致多器官功能障碍综合征(MODS)。本研究的目的拟在创伤脓毒症大鼠模

型中寻找特异、敏感、实用的标志或标志组合, 能替代现有昂贵的侵入性诊断方法, 为开展肠道损伤和保护的研究提供诊断方法。

1 材料与方法

1.1 实验试剂: 二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO), 邻联(二)茴香胺(O-dianisidine), 1,5-戊二胺二氯化物(cadaverine dihydrochloride), D-乳酸脱氢酶(D-lactic dehydrogenase), D(+)-木糖(xylose), D(-)-乳酸(lactic acid)和辅酶 I(NAD) 购自 Sigma 公司; 葡聚糖蓝(blue dextra) 购自瑞士 Pharmacia 公司; 其余均为国产分析纯以上试剂。

基金项目: 全军“十五”指令性课题基金资助项目(01L081)

作者单位: 100037 北京, 解放军第三〇四医院全军烧伤研究所基础部

作者简介: 黎君友(1950-), 男(汉族), 广东省浮云市人, 副研究员, 主要从事创伤生化及代谢的研究。

1.2 动物模型制备及分组:健康雄性 Wistar 大鼠, 购自军事医学科学院动物中心, 经过适应性饲养 1 周后, 将动物随机分为正常对照组(N 组), 肠系膜上动脉(SMA)夹闭 1 h 后再灌注 1 h(I/R 1 组)、2 h(I/R 2 组)、4 h(I/R 4 组)以及动脉夹闭 1 h、再灌注 1 h 后静脉给予脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, O55:B5, 5 mg/kg, I/RL 组)5 组, 每组 7~10 只动物。动物禁食过夜, 自由饮水。给大鼠腹腔注射质量分数为 3%的戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉后, 常规消毒取腹正中切口, 游离 SMA, 以无损伤动脉夹夹闭 SMA 起始部, 1 h 后松开恢复 SMA 血流, 再静脉给予 LPS, 即为脓毒症模型。正常对照组大鼠行同样步骤, 但不夹闭 SMA。整个实验过程在恒温、恒湿及控制每日黑天、白天各 12 h 的条件下进行。全部大鼠按不同时间点活杀取血和组织制作样品。

1.3 指标检测及方法:

1.3.1 血浆和小肠 DAO 活性测定:采用黎君友等报告的方法, 并以微量考马斯亮蓝法测定小肠组织蛋白含量, 使小肠组织 DAO 活性以每克蛋白中的量来表示^[4]。

1.3.2 血浆 D-乳酸含量测定:以 Brandt 等方法^[5]在离心速度上作适当调整后测血浆 D-乳酸含量。

1.3.3 血浆 D-木糖测定:N、I/R 组及 I/RL 组于第 1、3 h 取血 0.1 ml 以 Eberts 等方法^[6,7]测血浆 D-木糖浓度。

1.3.4 小肠蠕动速度测定:向大鼠胃内注射葡聚糖蓝(0.5 kg/L, 0.5 g/ml)后到观察时间结束时活杀动物, 取全肠以 5 g 天平砝码垂挂测量其长度, 再测量葡聚糖蓝染色长度, 计算动物小肠传输百分率。

1.3.5 组织形态学检查:光镜下观察小肠组织形态学变化。

1.4 统计学处理:数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 *t* 检验、 χ^2 检验和相关分析进行数据处理。

2 结果

从 I/R 1 起到 I/RL 血浆 DAO 活性较 N 组升高, 其中 I/R 1、I/R 4 和 I/RL 时升高显著, 以 I/RL 时最为明显; 小肠组织 DAO 活性较 N 组不同程度地降低, I/R 2 和 I/RL 时降低显著; 血浆 D-乳酸含量各组也不同程度的升高, I/R 1、I/R 2 和 I/RL 时升高显著; 小肠的蠕动功能在缺血-再灌注各时间点以及缺血-再灌注后均显著加快(*P* 均 < 0.05, 表 1)。I/R 和 I/RL 在 1 h 后血 D-木糖浓度高于 N 组, I/R 1 时显著高于 N 组, I/R 和 I/RL 在 3 h 时仍高于 N 组, 但无统计学差异(表 2)。从 N 组到 I/R 各时间

组, 直至 I/RL 组, 血浆 DAO 活性与小肠组织 DAO 活性的变化呈高度负相关($r = -0.909, P < 0.001$); 血浆 DAO 与 D-乳酸呈正相关变化($r = 0.559, P < 0.05$, 表 3)。小肠组织染色光镜下见小肠绒毛有较多嗜酸性白细胞, 有少量淋巴细胞浸润, 小肠绒毛出血; 给予 LPS 后, 小肠绒毛增粗、出血, 大量嗜酸性白细胞、淋巴细胞浸润。

表 1 肠缺血-再灌注复合内毒素大鼠

肠功能指标的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes of intestinal function parameter after gut ischemia/reperfusion combined with endotoxin

in rats($\bar{x} \pm s$)

组别	血 DAO(kU/L)	小肠 DAO(U/g)	血 D-乳酸(mg/L)	小肠蠕动(%)
N 组	0.94±0.30	3.59±1.18	2.31±0.89	17.3±4.3
I/R 1 组	1.60±0.53 ^a	2.94±1.23	4.63±1.13 ^a	25.4±5.4 ^a
I/R 2 组	1.47±0.74	2.52±0.49 ^a	3.58±0.57 ^a	33.1±6.3 ^a
I/R 4 组	1.58±0.63 ^a	2.71±0.60	2.56±0.66	27.9±6.9 ^a
I/RL 组	1.99±0.59 ^a	2.25±0.38 ^a	3.45±1.07 ^a	28.8±3.5 ^a

注: 与 N 组比较: ^a*P* < 0.05

表 2 肠缺血-再灌注复合内毒素大鼠

小肠 D-木糖吸收变化($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Changes of D-xylose absorption after gut ischemia/reperfusion combined with endotoxin

in rats($\bar{x} \pm s$)

mg/L

组别	I/R 1 h	I/R 3 h
N 组	30.4±9.5	40.7±13.0
I/R 组	50.1±23.0 ^a	47.7±17.6
I/RL 组	50.4±5.7 ^a	53.3±12.9

注: 与 C 组比较: ^a*P* < 0.05

表 3 肠缺血-再灌注复合内毒素大鼠

各指标的相关分析

Table 3 Correlation analysis between DAO and D-lactate after gut ischemia/reperfusion combined with endotoxin in rats

X 项	Y 项	r 值	P 值
血 DAO	小肠 DAO	-0.909	<0.001
血 DAO	D-乳酸	0.559	<0.05
小肠 DAO	D-乳酸	-0.422	>0.05

3 讨论

3.1 肠缺血-再灌注复合内毒素血症时小肠黏膜屏障功能的改变:在以往对动物模型及临床患者的研究中, 我们曾对创伤后血浆或小肠组织 DAO 活性的变化进行过报道^[3,8]。DAO 存在于哺乳动物的黏膜或绒毛上层, 其中大部分存在于小肠黏膜绒毛, 仅极小部分存在于子宫内绒毛中。它是具有高度活性的细胞内酶, 是反映小肠黏膜结构和功能较为理想的指标。在本研究中, 血中 DAO 含量于再灌注各

时间点均升高,并且给予 LPS 后 DAO 浓度增加。从 N 组到各时间点间血浆和小肠组织的 DAO 结果看,可反映出肠缺血-再灌注损伤及 LPS 攻击后肠黏膜通透性增加,肠上皮细胞被激活,释放的 DAO 进入肠细胞间隙淋巴管和血液,使血浆中 DAO 含量升高。肠缺血-再灌注及缺血-再灌注复合 LPS 后,小肠组织 DAO 活性降低,可能是坏死肠黏膜细胞脱落进入肠腔,使小肠组织 DAO 含量降低。进一步分析还可见血浆 DAO 变化与小肠 DAO 变化在各个时间点均呈高度相关性。上述结果均提示小肠黏膜屏障功能损伤。

3.2 肠缺血-再灌注复合内毒素血症时肠黏膜通透性的变化:在严重创伤、创伤并发脓毒症的发生和发展过程中,由于小肠的屏障功能的改变^[9,10],并同时伴有肠黏膜通透性的增加,表现为肠道细菌和内毒素移位,导致大量炎性介质和细胞因子释放,从而加剧肠道屏障功能的改变。通过测定尿乳果糖、甘露醇及其比值的变化,以及血或组织内毒素含量等,可直接或间接反映肠黏膜通透性的变化^[11]。利用 D-乳酸是胃肠道固有细菌的代谢终产物,哺乳类动物体内不具备将其快速分解代谢的酶系统,进入机体后不参与代谢反应这一特点,可以测定血中 D-乳酸含量来作为判断肠黏膜通透性变化。结果发现肠缺血-再灌注后 1 h 和 2 h 血浆 D-乳酸浓度显著性升高,再灌注 4 h 有所降低,但给予 LPS 后又有显著升高,这种双峰现象提示内毒素能延迟小肠黏膜通透性的升高;相关分析发现,血浆 D-乳酸与血浆 DAO 呈相关关系,进一步提示小肠屏障功能损伤会使其通透性升高。

3.3 肠缺血-再灌注复合内毒素血症时小肠蠕动功能变化:肠道给予葡聚糖蓝染色后再测定肠蠕动速度的结果表明,从小肠缺血-再灌注到复合内毒素的各个时间点,小肠的染色百分长度显著增加,提示肠缺血-再灌注、肠缺血-再灌注后复合内毒素血症时小肠的蠕动增加,表明小肠的炎症反应使体液渗出增加,进而刺激肠蠕动增强。

3.4 肠缺血-再灌注复合内毒素血症时小肠吸收功能的变化:木糖是一种主要由小肠上段吸收的游离戊糖,是通过与葡萄糖竞争性抑制吸收,而不是通过与半乳糖或果糖竞争。木糖的吸收既不受横过肠黏膜电化学变化的影响,也不受葡萄糖吸收率的影响,因此,其吸收机制有别于其他单糖。木糖在十二指肠和空肠被吸收后,不参加体内代谢,经肾脏排出。本研究结果显示:肠缺血-再灌注和缺血-再灌注复合

内毒素血症后 1 h,两组血 D-木糖浓度均高于正常对照组;我们在前期研究发现,单纯缺血-再灌注给 D-木糖后 3 h 时血木糖已下降,而正常动物到给木糖后 3 h 才达到接近于 I/R 和 I/RL 1 h 的浓度。给木糖后 3 h, N、I/R 和 I/RL 之间血木糖浓度无显著性差异。提示 I/R 和 I/RL 后很快 D-木糖吸收入血,血中浓度增加^[12]。有研究认为,给木糖 1 h 后血糖的浓度足以评价小肠黏膜吸收功能情况^[7]。综上所述,我们认为肠缺血-再灌注或肠缺血-再灌注复合内毒素血症时,仅测给木糖后 1 h 血木糖浓度能反应小肠的吸收情况。

参考文献:

- 1 Moore F A. The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure[J]. *Am J Surg*, 1999, 178: 449-453.
- 2 Heithan T H, Kone B C, Mercer D W, et al. Postinjury multiple organ failure: the role of the gut[J]. *Shock*, 2001, 15: 1-10.
- 3 黎君友, 吕艺, 付小兵, 等. 二胺氧化酶在创伤后肠道损伤中变化及意义[J]. *中国危重病急救医学*, 2000, 12(8): 482-484.
- 4 黎君友, 于燕, 郝军, 等. 分光光度法测定血和小肠组织二胺氧化酶活性[J]. *氨基酸和生物资源*, 1996, 18: 28-30.
- 5 Brandt R B, Siegel S A, Waters M G, et al. Spectrophotometric assay for D-(-)-lactate in plasma[J]. *Anal Biochem*, 1980, 102: 39-46.
- 6 Eberts T J, Sample H R, Gliok M R, et al. A simplified colorimetric micromethod for xylose in serum or urine, with phloroglucinol[J]. *Chin Chemistry*, 1979, 25: 1440-1443.
- 7 Li J Y, Sun D. Experimental study of gut absorptive capacity after trauma detected by D-xylose content test with micromethod[J]. *Chin J Clin Rehabil*, 2003, 7: 2810-2811.
- 8 Li J Y, Lu Y, Hu S, et al. Preventive effect of glutamine on intestinal barrier dysfunction induced by severe trauma [J]. *World Gastroenterol*, 2002, 8: 168-171.
- 9 黎君友, 胡森, 孙晓庆, 等. 创伤脓毒症早期病理生理过程的探讨[J]. *中国危重病急救医学*, 2001, 13: 291-294.
- 10 邢峰, 郭宝琛, 黎君友, 等. 表皮生长因子对大鼠肠缺血-再灌注所致肠黏膜通透性改变的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2002, 14(10): 650-655.
- 11 Cullen J J, Dory R C, Ephgrave K S, et al. Changes in intestinal transit and absorption during endotoxemia are dose dependent [J]. *J Surg Res*, 1999, 81(1): 81-86.
- 12 黎君友, 孙丹, 吕艺, 等. 肠缺血-再灌注对小肠屏障、吸收、通透和传输功能的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2004, 12(2): 464-466.

(收稿日期: 2004-03-24 修回日期: 2004-04-10)

(本文编辑: 李银平)

• 广告目次 •

- ①深圳迈瑞 (封二, 插页)
- ②成都地奥: 迈普新 (插页)
- ③成都地奥: 替波定 (插页)
- ④北京极远: 紧急心肺复苏机 (插页)
- ⑤伟康医疗(中国)有限公司 (封三)
- ⑥北京四环医药: 苏诺 (封底)