

缺血-再灌注时卡巴胆碱对大鼠肠上皮细胞的保护作用

邹晓防, 林凯, 吕艺, 黎君友, 陆江阳, 胡森, 盛志勇

邹晓防, 林凯, 吕艺, 黎君友, 陆江阳, 胡森, 盛志勇, 中国人民解放军总医院第一附属医院烧伤研究所 北京市 100037
林凯, 空军总医院临床检验中心 北京市 100037
军队十五医药卫生专项课题项目, No. 06z055
通讯作者: 胡森, 100037, 北京市, 中国人民解放军总医院第一附属医院烧伤研究所. hs82080@yahoo.com.cn
电话: 010-66867397 传真: 010-68989139
收稿日期: 2006-11-17 接受日期: 2006-12-27

Protective effects of carbachol on intestinal epithelial cells in rats with gut ischemia-reperfusion

Xiao-Fang Zou, Kai Lin, Yi Lv, Jun-You Li, Jiang-Yang Lu, Sen Hu, Zhi-Yong Sheng

Xiao-Fang Zou, Kai Lin, Yi Lv, Jun-You Li, Jiang-Yang Lu, Sen Hu, Zhi-Yong Sheng, Burn Research Institute, the First Affiliated Hospital of General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China
Kai Lin, Center of Clinical Laboratory, General Hospital of Chinese PLA Air Force, Beijing 100037, China
Supported by the Special Foundation of the 11th Five-Year Plan for Military Medical Project, No. 06z055
Correspondence to: Sen Hu, Burn Research Institute, the First Affiliated Hospital of General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China. hs82080@yahoo.com.cn
Received: 2006-11-17 Accepted: 2006-12-27

Abstract

AIM: To investigate the protective effects of carbachol on intestinal epithelial cells in rats with gut ischemia and reperfusion (I/R).

METHODS: Blood flow of superior mesenteric artery was blocked to establish I/R model in Wistar rats, and then the rats were treated with carbachol for 30, 60, 120 and 240 minutes, respectively. The content (nkat/g pro) of diamine oxidase (DAO) in gut tissue was determined by biochemical method, and the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in intestinal epithelial cells was examined by immunohistochemistry. The injuries of gut epithelial cells were assessed using Chiu's scores.

RESULTS: The pathological changes were obviously relieved in rats treated with carbachol. The

content of DAO was markedly higher in carbachol-treated rats than that in the saline controls (0 min: 42.01 ± 7.17 vs 18.50 ± 7.83 ; 30 min: 44.51 ± 8.00 vs 20.00 ± 5.83 ; 60 min: 35.67 ± 7.00 vs 16.34 ± 8.17 ; 120 min: 39.00 ± 7.33 vs 21.84 ± 6.67 ; 240 min: 53.34 ± 8.17 vs 45.68 ± 6.00 ; all $P < 0.01$), while the number of TNF- α -positive cells was significantly lower (0 min: 204.4 ± 12 vs 246.4 ± 15.6 ; 30 min: 198.4 ± 11.2 vs 230.4 ± 14.4 ; 60 min: 234.4 ± 12.1 vs 270.4 ± 17.1 ; 120 min: 225.4 ± 10.2 vs 260.4 ± 18.5 ; 240 min: 196.4 ± 10.8 vs 220.4 ± 18.2 ; all $P < 0.01$).

CONCLUSION: Enteral administration of carbachol can protect intestinal epithelial cells from ischemia-reperfusion injury by decreasing the production of TNF- α .

Key Words: Ischemia/reperfusion; Carbachol; Intestinal epithelial cell; Rat

Zou XF, Lin K, Lv Y, Li JY, Lu JY, Hu S, Sheng ZY. Protective effects of carbachol on intestinal epithelial cells in rats with gut ischemia-reperfusion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(6):625-628

摘要

目的: 研究缺血/再灌注(I/R)时卡巴胆碱(Ca)对肠上皮细胞的保护作用及可能机制。

方法: 阻断Wistar大鼠SMA血量建立I/R模型, 并以肠袋内注射卡巴胆碱进行处理。采用病理学方法观察不同时间肠上皮细胞损伤指数, 免疫组化法检测肠上皮细胞TNF- α 表达的变化; 生化法检测肠组织中DAO含量(nkat/g pro)的变化。

结果: I/R+Ca组再灌注各时间点肠上皮细胞病理变化较I/R+NS组轻($P < 0.01$); I/R+Ca组再灌注各时间点肠袋组织DAO含量较I/R+NS组显著增加(0 min: 42.01 ± 7.17 vs 18.50 ± 7.83 ; 30 min: 44.51 ± 8.00 vs 20.00 ± 5.83 ; 60 min: 35.67 ± 7.00 vs 16.34 ± 8.17 ; 120 min: 39.00 ± 7.33 vs 21.84 ± 6.67 ; 240 min: 53.34 ± 8.17 vs 45.68 ± 6.00 ; 均 $P < 0.01$), 而I/R+Ca组再灌注各时间点肠上皮细胞中呈TNF- α 阳性细胞数较

■背景资料

缺血-再灌注后肠屏障功能的改变会引起内毒素的移位, 从而触发脓毒症和MODS。因此, 维持缺血-再灌注后肠屏障功能, 减少细菌和内毒素移位一直是临床防治脓毒症和MODS亟待研究的重要课题。肠上皮细胞是肠屏障功能的重要组成部分, 减轻肠上皮细胞损害是临床上防治脓毒症和MODS重要措施之一。采用炎症介质拮抗剂治疗脓毒症和MODS, 但效果均不理想。因此, 保护肠道屏障功能、抑制炎症介质的释放是治疗脓毒症和MODS的关键。

■应用要点

本文结果显示应用卡巴胆碱的抗炎作用,能减轻肠上皮细胞的损害,维持肠黏膜的屏障功能,为临床治疗脓毒症和MODS提供有效的途径。

I/R+NS组明显减少(0 min: 204.4 ± 12 vs 246.4 ± 15.6 ; 30 min: 198.4 ± 11.2 vs 230.4 ± 14.4 ; 60 min: 234.4 ± 12.1 vs 270.4 ± 17.1 ; 120 min: 225.4 ± 10.2 vs 260.4 ± 18.5 ; 240 min: 196.4 ± 10.8 vs 220.4 ± 18.2 ; 均 $P < 0.01$)。

结论:卡巴胆碱能抑制缺血-再灌注时肠上皮细胞中TNF- α 表达,减轻病理损害,对肠上皮细胞具有保护作用。

关键词:缺血/再灌注;卡巴胆碱;肠上皮细胞;大鼠

邹晓防,林凯,吕艺,黎君友,陆江阳,胡森,盛志勇.缺血-再灌注时卡巴胆碱对大鼠肠上皮细胞的保护作用.世界华人消化杂志. 2007;15(6):625-628

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/625.asp>

0 引言

缺血-再灌注是烧(创)伤后常见的病理生理过程,持续缺血-再灌注造成肠上皮细胞损害,引起肠黏膜通透性的改变,减少细菌和内毒素移位,后者与脓毒症和MODS的发生有密切关系^[1-4]。如何在细胞水平减轻损伤因子的损伤作用,减少细菌和内毒素移位一直是临床防治脓毒症和MODS亟待研究的重要课题。

胆碱能抗炎通路是近年来发现治疗脓毒症和MODS潜在的新途径^[5]。研究表明,拟胆碱药-卡巴胆碱不但能增加肠黏膜血流,促进胃肠运动,而且还具有强大的抗炎作用,可以通过多途径减轻肠道缺血-再灌注损伤^[6]。本文探讨肠道缺血-再灌注时卡巴胆碱对肠上皮细胞的作用,初步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠96只,由军事医学科学院实验动物中心提供,体质量230-250 g。实验前适应性饲养1 wk,术前12 h禁食,自由饮水。30 g/L戊巴比妥钠腹腔麻醉(30 mg/kg),麻醉成功后,仰卧固定于手术台上,常规备皮消毒铺无菌洞巾。取腹部正中切口长约3-4 cm,将肠管外置并覆盖温盐水纱布,外用烤灯加温,保持肠管的湿润和温度。在距离十二指肠悬韧带后10 cm和18 cm处,分别用两根一号丝线结扎肠管,造成长约8 cm肠袋。无损伤动脉夹夹闭肠系膜上动脉起始部,阻断SMA血流45 min后,松夹恢复肠系膜血流,制成肠缺血-再灌注模型。

动物随机分为I/R+NS组、I/R+Ca组和假手术组。I/R+Ca组阻断SMA血流45 min后肠袋内注

射卡巴胆碱(0.1 mg/kg,山东正大福瑞达制药有限公司),I/R+NS注射等体积生理盐水。假手术组行上述操作,而未夹闭SMA(每时间点8只)。

以上各组分别在再灌注后0, 30, 60, 120和240 min处死动物取肠袋组织。一部分肠袋组织迅速取出后,又去离子水冲洗3次, -80℃冰冻保存,用于组织匀浆的制备。另一部分冲洗后用40 g/L的甲醛溶液固定48 h,脱水,常规石蜡包埋,切片。

1.2 方法 石蜡切片常规脱蜡至水后,进行HE染色,用于光镜下观察病理变化和肠黏膜损伤。每份切片光镜下随机选择10视野(400×)由病理医师观察,根据Chiu's^[7]的方法进行肠黏膜损伤测定。

1.2.1 肠组织DAO含量的测定 取肠袋组织1 mg,采用黎君友 *et al*^[8]建立的分光光度法测定肠组织中DAO含量。

1.2.2 免疫组化检测肠上皮细胞内TNF- α 的表达 采用Power Vision TM两步法进行免疫组织化学检测,试剂盒购自北京天来生物医学科技公司,操作按说明书进行。石蜡切片常规脱蜡至水,经过氧化氢处理后,进行酶修复,然后用1:100稀释的抗体,4℃过夜孵育,DAB显色,苏木素复染,常规脱水,透明,封片,显微镜下观察。以PBS代替一抗作为阴性对照。在同一放大倍数下观察,细胞将棕色者为阳性,每个时相点随机取10个视野(400×)进行计数,计算阳性细胞数。

统计学处理 数据均以均数±标准差(mean±SD)表示,用SPSS11.0软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 光镜下病理改变 正常组肠上皮细胞呈柱状,刷状缘清晰,排列整齐,连接紧密。I/R+NS组从再灌注开始时肠上皮细胞略有肿胀,随再灌注时间延长,肠上皮细胞肿胀逐渐加重,并出现坏死,脱落。黏膜层炎症细胞浸润,固有层红细胞增多。I/R+Ca组损伤变化趋势同I/R+NS组,但病变程度明显减轻。

2.2 Chiu's评分变化 I/R+NS组肠黏膜组织的损伤主要发生在缺血-再灌注120 min和240 min,以再灌注120 min组最明显。I/R+Ca组的损伤的变化趋势与I/R+NS的基本相同,但损伤程指数要远低于I/R+NS组($P < 0.01$)(表1)。

2.3 肠组织DAO含量的变化 I/R+NS组肠组织DAO含量再灌注后前30 min稍有升高,后迅速

表 1 缺血再灌流期间各项指标的Chiu's评分变化(mean \pm SD, $n = 8$)

分组	再灌流时间				
	0 min	30 min	60 min	120 min	240 min
Chiu's评分					
假手术组	0.40 \pm 0.12	0.43 \pm 0.13	0.41 \pm 0.12	0.49 \pm 0.10	0.31 \pm 0.17
I/R+NS组	2.64 \pm 0.34 ^b	2.54 \pm 0.25 ^b	2.40 \pm 0.10 ^b	2.91 \pm 0.11 ^b	2.90 \pm 0.13 ^b
I/R+Ca组	1.59 \pm 0.34 ^{bd}	1.14 \pm 0.23 ^{bd}	1.04 \pm 0.31 ^{bd}	1.75 \pm 0.11 ^{bd}	1.62 \pm 0.42 ^{bd}
DAO(nkat/g)					
假手术组	59.01 \pm 16.34	58.68 \pm 14.17	59.68 \pm 16.00	59.51 \pm 14.34	59.68 \pm 14.84
I/R+NS组	18.50 \pm 7.83 ^b	20.00 \pm 5.83 ^b	16.34 \pm 8.17 ^b	21.84 \pm 6.67 ^b	45.68 \pm 6.00 ^b
I/R+Ca组	42.01 \pm 7.17 ^{bd}	44.51 \pm 8.00 ^{bd}	35.67 \pm 7.00 ^{bd}	39.00 \pm 7.33 ^{bd}	53.34 \pm 8.17 ^{bd}
TNF- α 阳性细胞					
假手术组	157.4 \pm 10.7	154.9 \pm 9.9	155.9 \pm 10.4	158.4 \pm 9.4	155.4 \pm 8.8
I/R+NS组	246.4 \pm 15.6 ^b	230.4 \pm 14.4 ^b	270.4 \pm 17.1 ^b	260.4 \pm 18.5 ^b	220.4 \pm 18.2 ^b
I/R+Ca组	204.4 \pm 12 ^{bd}	198.4 \pm 11.2 ^{bd}	234.4 \pm 12.1 ^{bd}	225.4 \pm 10.2 ^{bd}	196.4 \pm 10.8 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 假手术组, ^d $P < 0.01$ vs I/R+NS组.

降低,再灌流后60 min后最低,后逐渐上升,到再灌流240 min,基本接近正常. I/R+Ca组肠组织DAO含量变化基本同I/R+NS组相同,但程度要较I/R+NS组低($P < 0.01$)(表1).

2.4 肠上皮细胞TNF- α 表达的变化 正常组有少量TNF- α 阳性的肠上皮细胞,主要位于绒毛的顶端.肠道缺血期开始, I/R+NS组TNF- α 阳性的肠上皮细胞数量逐渐增多,且染色逐渐加深,部位由绒毛顶端向基地部扩展. I/R+Ca组TNF- α 阳性的肠上皮细胞的变化同I/R+NS组,但阳性细胞数较I/R+NS组少(表1),更接近绒毛顶端,且染色较浅.

3 讨论

肠缺血-再灌流是烧(创)伤后常见的病理生理过程,也是诱发MODS的始动因素.肠上皮细胞是肠黏膜屏障的重要组成部分,对缺血、缺氧十分敏感.缺血、缺氧可引起肠上皮细胞结构、功能的改变,而肠上皮细胞结构、功能的改变必然引起肠黏膜通透性的改变,引起细菌和内毒素的移位,同时启动肠道炎症和免疫反应,而这一过程在烧(创)伤后全身炎症反应和MODS的过程中起重要作用^[9-11].为此,寻找减轻肠上皮细胞的损害的方法,对于临床上治疗全身炎症反应和MODS有重要的意义.胆碱能抗炎通路是最近提出的一条新的神经-内分泌抗炎途径.刺激迷走神经传出支可抑制大鼠内毒素血症时的全身炎症反应^[2].副交感神经主

要递质乙酰胆碱在体外能有效地抑制LPS刺激外周巨噬细胞释放致炎介质TNF- α ^[12].

卡巴胆碱是一种胆碱能激动剂,作用于M和N胆碱受体,在体内不易被水解.卡巴胆碱除具有促进胃肠动力、增加腺体分泌等作用外,还具有强大抗炎作用,其效应适于防治过度全身性炎症反应和改善肠功能障碍.在兔部分肠缺血-再灌流模型中观察到卡巴胆碱可保护缺血-再灌流动物肝、肾和心功能,减轻全身性炎症反应^[13].

DAO是人类和哺乳动物肠黏膜上皮细胞代谢不可缺少的酶,是肠上皮细胞的标志酶,其活性与上皮细胞的核算和蛋白合成有密切关系,因此通过测定DAO在肠组织中的变化,可以反映肠黏膜上皮细胞的损伤和修复情况^[8].本实验发现I/R+NS大鼠肠组织中DAO含量显著降低.其原因可能是缺血-再灌流时,肠上皮细胞损伤、坏死,肠上皮细胞脱落进入肠腔. I/R+Ca肠组织中DAO含量较I/R+NS显著升高,提示卡巴胆碱能减轻肠缺血-再灌流损伤,从而对肠上皮细胞起保护作用.

国内外研究表明肠缺血-再灌流时,肠组织可分泌TNF- α ,引起局部和全身的炎症,导致远隔器官的损伤,促进MODS的发生^[14-16].TNF- α 在局部可以加重肠上皮细胞的损害. Van Lanschot *et al*研究发现,给大鼠注射外源性重组TNF- α 可引起肠上皮细胞剥落、坏死,肠黏膜固有层中性粒细胞浸润.如果应用小鼠抗人

■名词解释

胆碱能抗炎通路: 神经系统通过迷走神经及其递质乙酰胆碱能够迅速、显著地抑制巨噬细胞释放TNF- α ,减轻全身炎症反应,这一生理机制称为胆碱能抗炎通路.此通路可以抑制炎症细胞因子的合成反馈监控和调节炎症反应.

■同行评价

临床上脓毒症和MODS的治疗一直是一个研究的热点和难点, 本实验方法较合理, 结果可靠, 表达简洁准确, 选题有一定临床意义和应用价值。

TNF- α mAb被动免疫大鼠1 h后再注射TNF- α , 则肠上皮细胞损害明显减轻, 说明TNF- α 可引起肠上皮细胞的损伤。本实验结果显示, I/R+Ca组大鼠肠组织TNF- α 阳性细胞数明显低于I/R+NS, 显示减少肠上皮细胞TNF- α 的分泌和释放是卡巴胆碱减轻肠上皮细胞损伤的一条重要途径。

本实验结果显示: I/R+Ca组与I/R+NS组相比DAO含量明显升高, 且I/R+Ca组的TNF- α 阳性细胞数明显低于I/R+NS组, 说明卡巴胆碱可通过抑制炎症介质的释放减轻肠缺血-再灌流时肠上皮细胞的损害, 从而保护肠上皮细胞。因此卡巴胆碱在防治肠缺血-再灌流引起的失控炎症反应和脓毒症中具有潜在的临床应用前景。

4 参考文献

- 1 盛新华, 石汉平. 肠道在多器官功能障碍综合征中的作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2029-2032
- 2 Mole DJ, Taylor MA, McFerran NV, Diamond T. The isolated perfused liver response to a 'second hit' of portal endotoxin during severe acute pancreatitis. *Pancreatol* 2005; 5: 475-485
- 3 Closa D, Folch-Puy E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. *IUBMB Life* 2004; 56: 185-191
- 4 张喜平, 张宇. 急性胰腺炎肠道屏障损害机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 417-421
- 5 Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to

- endotoxin. *Nature* 2000; 405: 458-462
- 6 吕艺, 姜小国, 曹卫红, 白玉梅, 孙丹, 胡森, 盛志勇. 卡巴胆碱对肠缺血-再灌流动物脏器功能的保护作用. 中华急诊医学杂志 2006; 15: 228-231
- 7 Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101: 478-483
- 8 黎君友, 吕艺, 付小兵, 晋桦, 胡森, 孙晓庆, 盛志勇. 二胺氧化酶在创伤后肠道损伤种变化及意义. 中国危重病急救医学 2000; 12: 482-484
- 9 Mitsuoka H, Schmid-Schonbein GW. Mechanisms for blockade of in vivo activator production in the ischemic intestine and multi-organ failure. *Shock* 2000; 14: 522-527
- 10 Boros M, Takaichi S, Hatanaka K. Ischemic time-dependent microvascular changes and reperfusion injury in the rat small intestine. *J Surg Res* 1995; 59: 311-320
- 11 李晓芳. 严重烧伤后胃肠道功能障碍的机制和防治. 世界华人消化杂志 2006; 14: 888-893
- 12 姜小国, 石德光, 胡森, 盛志勇. 迷走神经及其递质乙酰胆碱的抗炎作用的研究. 中国危重病急救医学 2003; 15: 59-61
- 13 胡森, 曹卫红, 孙丹, 吕艺, 白玉梅, 盛志勇. 卡巴胆碱对部分缺血-再灌流所致全身炎症和多器官功能障碍的影响. 中国危重病急救医学 2005; 17: 49-52
- 14 Wang Z, Castresana MR, Detmer K, Newman WH. An IkappaB-alpha mutant inhibits cytokine gene expression and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J Surg Res* 2002; 102: 198-206
- 15 Theuer J, Dechend R, Muller DN, Park JK, Fiebelor A, Barta P, Ganten D, Haller H, Dietz R, Luft FC. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc Disord* 2002; 2: 3
- 16 van Lanschot JJ, Mealy K, Wilmore DW. The effects of tumor necrosis factor on intestinal structure and metabolism. *Ann Surg* 1990; 212: 663-670

电编 李琪 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国科学技术信息研究所情报方法研究中心关于 2005年世界华人消化杂志指标检索报告

本刊讯 2005年度《世界华人消化杂志》的总被引频次为2079, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第51位, 内科医学类28种期刊的第4位。2005年《世界华人消化杂志》的影响因子为0.485, 位居全部1652种中国科技论文统计源期刊的第449位, 内科医学类28种期刊的第14位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.070, 他引率0.66, 地区分布数26, 基金论文比0.43, 国际论文比0.02, 学科影响指标0.46。(世界胃肠病学杂志社2007-02-28)