

卡巴胆碱减轻大鼠烫伤休克期肠内补液时肠组织氧自由基的损伤

车晋伟, 胡森, 耿世佳, 吴静, 王磊, 杜颖, 田易军, 盛志勇

■背景资料

通过消化道途径进行休克液体复苏简单易行, 在战争和自然灾害时对大批创、烧伤休克人员的抗休克治疗较传统静脉途径更有优势, 对于减少消化道补液时的肠道并发症、提高复苏效率, 对于提高创烧伤急救水平、降低死亡率具有积极意义。

车晋伟, 胡森, 耿世佳, 吴静, 王磊, 杜颖, 田易军, 盛志勇, 中国人民解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所休克与多器官功能障碍实验室 北京市 100037

军队十一五专项课题基金资助项目, No. 06Z055

作者贡献分布: 此课题由胡森, 车晋伟设计; 研究过程由车晋伟, 陈玲, 耿世佳, 吴静, 王磊及杜颖及田易军操作完成; 研究所用试剂及分析工具由胡森提供; 数据分析由车晋伟完成; 本论文写作由车晋伟, 胡森及盛志勇完成。

通讯作者: 胡森, 100037, 北京市阜成路51号, 中国人民解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所休克与多器官功能障碍实验室. hs82080@yahoo.com.cn

电话: 010-66867397 传真: 010-68989391

收稿日期: 2007-11-16 修回日期: 2008-01-26

Carbachol alleviates oxygen free radical injury in gut during enteral resuscitation of burn shock in rats

Jin-Wei Che, Sen Hu, Shi-Jia Geng, Jing Wu, Lei Wang, Ying Du, Yi-Jun Tian, Zhi-Yong Sheng

Jin-Wei Che, Sen Hu, Shi-Jia Geng, Jing Wu, Lei Wang, Ying Du, Yi-Jun Tian, Zhi-Yong Sheng, Laboratory of Shock and Multiple Organ Dysfunction, Burns Institute, the First Hospital Affiliated to General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China

Supported by: the Special Foundation of Military Medical Project during the 11th Five-Year Plan Period, No. 06Z055

Correspondence to: Sen Hu, Laboratory of Shock and Multiple Organ Dysfunction, Burns Institute, the First Hospital Affiliated to General Hospital of Chinese PLA, 51 Fucheng Road, Beijing 100037, China. hs82080@yahoo.com.cn

Received: 2007-11-16 Revised: 2008-01-26

Abstract

AIM: To investigate the effects of carbachol on oxygen free radical injury in gut during enteral resuscitation of burn shock in rats.

METHODS: A 35% TBSA full thickness scald injury was induced in 38 Wistar rats. The rats were divided randomly into four groups: scald with no therapy (scald alone, $n = 8$), scald with enteral infusing either a glucose electrolyte solution (GES, $n = 10$) or GES containing carbachol (60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, GES/CAR, $n = 10$), and scald with enteral infusing only carbachol (CAR, $n = 10$). GES was infused into intestine through a duo-

denal stomy according to Parkland formula (4 mL·1%TBSA/kg) 30 min after scald and carbachol was administered simultaneously through the same path. Four hours after injury, the initial jejunum was collected for evaluation of xanthine oxidase (XOD), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO) and assessment of the pathologic damages.

RESULTS: The activity of XOD and MPO, and the MDA level were 13.2%, 21.3% and 21.1% higher in the GES containing carbachol treatment groups than in the scald alone group ($P < 0.05$). Resuscitation with GES/CAR resulted in significantly lower levels of XOD (1.36 ± 0.37 vs 2.51 ± 0.56 , $P < 0.01$), MDA (3.97 ± 1.57 vs 6.59 ± 1.50 , $P < 0.01$) and MPO (0.47 ± 0.14 vs 0.83 ± 0.21 , $P < 0.01$) than resuscitation with GES. The parameters in the CAR group were the lowest. The gut lesions were mild in the CAR and GES/CAR groups, severe in the CAR alone group, and most severe in the GES group.

CONCLUSION: Carbachol can alleviate gut oxygen free radical injury during enteral resuscitation of burn shock, which might be associated with its anti-inflammation effects, inhibition of XOD activity and generation of oxygen free radicals in gut tissue.

Key Words: Carbachol; Burn; Enteral Resuscitation; Gut

Che JW, Hu S, Geng SJ, Wu J, Wang L, Du Y, Tian YJ, Sheng ZY. Carbachol alleviates oxygen free radical injury in gut during enteral resuscitation of burn shock in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(8): 900-903

摘要

目的: 研究拟胆碱药卡巴胆碱(carbachol, CAR)对大鼠烫伤休克期肠内补液时肠组织氧自由基损伤的影响。

方法: 38只♂Wistar大鼠, 采用沸水法(100°C, 10 s)造成35%TBSA III度烫伤。随机分为不

■同行评议者

刘绍能, 主任医师, 中国中医科学院广安门医院消化科

复苏组(单烫组, $n = 8$)、葡萄糖-电解质溶液(glucose electrolyte solution)复苏组(GES组, $n = 10$)、单纯卡巴胆碱治疗组(CAR组, $n = 10$)和GES+CAR复苏组(GES/CAR组, $n = 10$)。两液体复苏组在伤后30 min将GES经十二指肠造口匀速泵入, 按Parkland公式设定补液速率, CAR组和GES/CAR组在伤后30 min将CAR以60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 溶于0.5 mL生理盐水中一次注入十二指肠。所有大鼠在伤后4 h处死, 取空肠组织测定脂质过氧化物丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性, 并观察肠组织病理学变化。

结果: 烫伤后GES组肠组织XOD、MPO活性和MDA含量分别高于单烫组13.2%、21.3%和21.1%, 并有统计学意义($P < 0.05$); GES/CAR组XOD, MPO和MDA均较GES组明显下降(1.36 ± 0.37 vs 2.51 ± 0.56 ; 0.47 ± 0.14 vs 0.83 ± 0.21 ; 3.97 ± 1.57 vs 6.59 ± 1.50 , $P < 0.01$); CAR组各指标数值最低。肠组织病理损伤也表现为CAR组和GES/CAR组最轻, 单烫组次之, GES组损伤最重。

结论: 卡巴胆碱能有效减轻烫伤休克大鼠肠内复苏时的肠道氧自由基损伤, 机制可能与其抗炎作用和抑制黄嘌呤氧化酶活性、减少氧自由基生成有关。

关键词: 卡巴胆碱; 烧伤; 口服复苏; 肠

车晋伟, 胡森, 耿世佳, 吴静, 王磊, 杜颖, 田易军, 盛志勇. 卡巴胆碱减轻大鼠烫伤休克期肠内补液时肠组织氧自由基的损伤. 世界华人消化杂志 2008; 16(8): 900-903
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/900.asp>

0 引言

口服液体复苏是主要针对战争、自然灾害和突发事件等特殊环境下由于烧伤休克伤员液体供应受限, 难以实施早期静脉复苏时进行的救治措施^[1]。但烧伤休克时肠道处于严重缺血缺氧状态, 导致肠组织过氧化损伤, 使得肠吸收功能受到抑制, 影响口服补液的复苏效果。我们以往的研究证明拟胆碱药物卡巴胆碱能有效抑制肠缺血再灌注时的促炎因子释放, 减轻缺血缺氧状态下的肠组织炎症反应^[2]。本研究在口服葡萄糖-电解质溶液(GES)中加入卡巴胆碱, 旨在观察卡巴胆碱能否抑制大鼠烫伤休克早期经口服途径补液时氧自由基生成, 减轻肠组织的过氧化损伤, 为提高烧伤休克早期口服补液的疗效、降低胃肠并发症提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar δ 大鼠38只(200-230 g), 购自中国医学科学院动物中心。GES配方: 每1 L水中溶解3.5 g NaCl、2.5 g NaHCO_3 、1.5 g KCl和20 g葡萄糖, 使用前置于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱预热。卡巴胆碱购于美国Sigma公司产品, ZNB-XB型输液泵购于北京科力丰科技发展有限公司产品, 黄嘌呤氧化酶(XOD)、髓过氧化物酶(MPO)和脂质过氧化物丙二醛(MDA)检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所产品。

1.2 方法

1.2.1 模型制备与分组: 大鼠用200 g/L乌拉坦肌注麻醉后, 背部脱毛, 用沸水(100 $^{\circ}\text{C}$, 10 s)造成30% TBSA III度烫伤。伤后立即于腹正中线切开腹壁, 暴露十二指肠上端, 于幽门远端1 cm处行十二指肠造口并插入一段无菌胶管, 外接ZNB-XB型输液泵。随机分为不复苏组(单烫组, $n = 8$)、葡萄糖-电解质溶液(glucose electrolyte solution)复苏组(GES组, $n = 10$)、单纯卡巴胆碱治疗组(CAR组, $n = 10$)和GES+CAR复苏组(GES/CAR组, $n = 10$)。单烫组烫伤后无处理; GES组和GES/CAR组在烫伤后30 min开启输液泵进行肠内补液, 补液速度按Parkland公式设定, 即伤后第一个24 h输注液体量为每公斤体质量每1%烧伤面积4 mL, 前8 h输注一半, 前4 h输注1/4; CAR组和GES/CAR组在烫伤后30 min将卡巴胆碱以60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 溶于0.5 mL生理盐水中一次注入十二指肠。

1.2.2 指标检测: 所有大鼠在烫伤后4 h处死, 取空肠起始段10 cm测肠组织中黄嘌呤氧化酶(XOD)、髓过氧化物酶(MPO)和脂质过氧化物丙二醛(MDA)含量。各指标均使用检测试剂盒测定, 严格按说明书操作。

1.2.3 组织病理观察: 肠组织标本用体积分数为40 g/L的中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋切片, 苏木精-伊红(HE)染色, 光镜下观察。

统计学处理 实验数据采用SPSS11.0统计软件处理, 结果以mean \pm SD表示, 进行组间方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

光镜下单烫组小肠绒毛结构完整, 黏膜上皮及腺上皮杯状细胞增多, 伴炎细胞浸润; GES组小肠绒毛排列紊乱, 部分黏膜上皮脱落, 大量淋巴细胞和单核细胞浸润, 伴有轻度腺体增生和炎细胞嗜腺体现象; GES/CAR组小肠绒毛结构较

■ 研发前沿

通过增加胃肠道排空、吸收功能提高补液效率; 通过减轻胃肠道组织缺血再灌注损伤、保护胃肠道屏障功能等手段减少并发症等问题都需要进一步研究和解决。

■ 创新盘点

国内外对于烧创伤休克的消化道途径补液问题较为关注, 但相关研究成果不多。本研究通过胆碱能抗炎药的作用减轻烧伤休克肠内补液时的肠组织损伤具有创新性。

应用要点

本研究为烧伤休克口服补液时减轻肠道并发症,提高复苏效果提供了新的有效途径和实验依据。

表 1 卡巴胆碱对大鼠烫伤休克早期肠内补液时XOD、MPO活性和MDA含量的影响(mean ± SD)

指标	分组			
	单烫组	GES组	CAR组	GES/CAR组
XOD (U/gprot)	2.22 ± 0.54	2.51 ± 0.56	1.02 ± 0.28 ^{bd}	1.36 ± 0.37 ^{bc}
MPO (U/gprot)	0.69 ± 0.11	0.83 ± 0.21 ^a	0.43 ± 0.11 ^{bc}	0.47 ± 0.14 ^{bc}
MDA (μmol/gprot)	5.49 ± 1.07	6.59 ± 1.50 ^a	3.24 ± 0.86 ^{bd}	3.97 ± 1.57 ^{bd}

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 单烫组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs GES组。

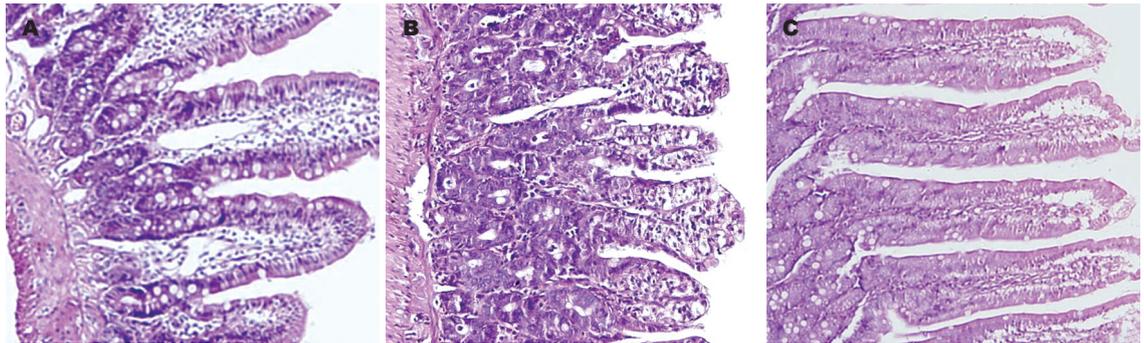


图 1 肠组织病理改变(HE × 40). A: 单烫组; B: GES组; C: GES/CAR组。

完整,排列整齐,有少量黏膜上皮脱落,炎细胞浸润不明显,CAR组与GES/CAR组差别不明显(图1)。烫伤后4 h给予GES, GES复苏组XOD、MPO活性和MDA含量均高于单烫组(分别高出13.2%、21.3%和21.1%),而CAR组和GES/CAR组各指标均明显较GES组减少,并有统计学意义(表1)。

3 讨论

通过消化道途径进行休克液体复苏具有操作简单、携带方便、使用要求低等特点,在战争和自然灾害时对大批创、烧伤休克人员的抗休克治疗较传统静脉途径更有优势,已经越来越受到国内外学者的重视^[3]。但至今仍无一个公认的可行性好、治疗效果理想的口服复苏方案问世,主要原因在于烧伤休克时的胃肠功能显著减退,使得消化道途径补液效率低下,难以达到静脉复苏的疗效。

肠内液体进入血循环的关键步骤是肠道吸收,烧伤休克时机体为满足重要生命脏器的血液供应,将胃肠道血液重新分布至心、肺、脑等脏器,肠组织处于严重缺血缺氧状态,此时肠内给予大量液体,首先加重了肠道的“工作负担”,导致组织缺氧状况加剧;其次补液一定程度上恢复缺血肠组织灌流,这样形成肠道局部范围内的缺血-再灌注效应,会进一步加重组织

损伤。氧自由基大量生成是缺血-再灌注时组织氧化损伤的重要环节,而黄嘌呤氧化酶途径是氧自由基生成的主要途径之一,在复苏过程中缺血组织重新获得氧供给,此时缺血肠组织中堆积的ATP代谢产物次黄嘌呤在黄嘌呤氧化酶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,氧自由基几乎能与任何细胞成分发生反应,造成细胞结构、代谢和功能的全面紊乱,甚至死亡^[4-6]。因此,减轻缺血-再灌注时氧自由基损伤对改善口服复苏时肠组织损伤、提高肠吸收功能乃至复苏效果都非常重要。

卡巴胆碱是拟胆碱药,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],近年我们对卡巴胆碱兴奋N样受体的作用作了深入研究,证明卡巴胆碱能结合细胞膜上的胆碱能受体 $\alpha 7$ 亚单位,发挥有效的抗炎作用,从而保护失血性休克和缺血再灌注时的器官功能^[8-10],体外细胞实验还证明卡巴胆碱对肠上皮细胞过氧化损伤具有明显保护作用^[11],因此本研究在烧伤休克口服补液时应用卡巴胆碱,观察其对肠组织的氧自由基生成和组织过氧化损伤有抑制和保护作用。

XOD是氧自由基生成的黄嘌呤氧化酶途

名词解释

胆碱能抗炎通路:中枢神经系统可通过胆碱能副交感神经传出纤维及其递质调节全身性炎症反应,通过传出迷走神经刺激而释放乙酰胆碱并特异性结合于炎症细胞表面的胆碱能N受体的 $\alpha 7$ 亚基,抑制致炎细胞因子释放;具有快速、直接、局限、整合地调节炎症反应的特点,受到医学界广泛重视,有相当重要的临床和研究价值。

径中的关键酶, 其活性高低直接决定组织氧自由基含量多少, 有研究报告在急性胰腺炎早期黄嘌呤脱氢酶(XDH)向XOD转化增多, 是引起肠道内皮细胞损伤的重要原因^[12], 因此XOD活性可作为反映组织氧自由基生成的灵敏指标. MDA是氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸, 引起脂质过氧化作用而形成的过氧化物, 其含量可反映细胞受氧化应激时脂质过氧化程度, 从而间接反映组织细胞过氧化损伤的程度^[13]. 正常情况下MPO存在于中性粒细胞, 在机体受损时中性粒细胞聚集于损伤组织并大量释放MPO, 因此组织局部MPO活性与受损程度呈显著正相关. 我们的实验结果证明卡巴胆碱能明显降低肠组织中的XOD、MPO活性, 抑制MDA生成, 减轻组织病理损害, 从而对肠道的组织结构和功能起到保护作用. 其作用机制应当与卡巴胆碱兴奋胆碱能抗炎通路、抑制缺血再灌注时过氧化损伤引起的促炎因子释放有关.

可见卡巴胆碱用于烧伤休克早期肠内补液, 既能通过扩张血管增加肠道血流、促进吸收, 又能通过抗炎作用减轻肠组织炎症反应和氧自由基损伤、减少体液的渗出和丢失, 对于提高肠道对复苏液的吸收效率有一举两得的效果. 本研究为烧伤休克口服补液时减轻肠道并发症、提高复苏效果提供了新的有效途径和实验依据.

4 参考文献

1 Thomas SJ, Kramer GC, Herndon DN. Burns: military options and tactical solutions. *J Trauma*

- 2003; 54: S207-S218
- 2 胡森, 姜小国, 石德光, 吕艺, 黎君友, 孙丹, 盛志勇. 卡巴胆碱对缺血-再灌注损伤时肠道局部炎症反应的影响. *中国危重病急救医学* 2003; 15: 748-750
- 3 车晋伟, 胡森, 盛志勇. 烧(创)伤休克战地液体复苏研究进展. *解放军医学杂志* 2007; 32: 271-273
- 4 de Haan JB, Bladier C, Lotfi-Miri M, Taylor J, Hutchinson P, Crack PJ, Hertzog P, Kola I. Fibroblasts derived from Gpx1 knockout mice display senescent-like features and are susceptible to H2O2-mediated cell death. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 53-64
- 5 Parks DA. Oxygen radicals: mediators of gastrointestinal pathophysiology. *Gut* 1989; 30: 293-298
- 6 Zima T, Stípek S, Tesar V, Němecek K, Měchurová A. Free radicals in the pathogenesis of selected diseases. *Cas Lek Cesk* 1995; 134: 291-295
- 7 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
- 8 姜小国, 胡森, 石德光, 晋桦, 吕艺, 韩翠华, 孙丹, 盛志勇. 卡巴胆碱对肠缺血-再灌注大鼠血浆肿瘤坏死因子- α 和白介素-10含量的影响. *中国危重病急救医学* 2003; 15: 167-169
- 9 吕艺, 姜小国, 曹卫红, 白玉梅, 孙丹, 胡森, 盛志勇. 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: 228-231
- 10 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: 625-628
- 11 邹晓防, 胡森, 吕艺, 孙娜, 石新惠, 李泽峰, 盛志勇. 卡巴胆碱对肠上皮细胞氧化损伤的保护作用研究. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1273-1275
- 12 Granell S, Bulbena O, Genesca M, Sabater L, Sastre J, Gelpi E, Closa D. Mobilization of xanthine oxidase from the gastrointestinal tract in acute pancreatitis. *BMC Gastroenterol* 2004; 4: 1
- 13 Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9: 515-540

同行评价

本文有一定的科学性、创新性和可读性.

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志中文摘要要求

本刊讯 本刊中文摘要必须在350字左右, 内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的), 方法(必须包括材料或对象、应描述课题的基本设计, 双盲、单盲还是开放性, 使用什么方法, 如何进行分组和对照, 数据的精确程度. 研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则, 对照组匹配的特征. 如研究对象是患者, 应阐明其临床表现, 诊断标准. 如何筛选分组, 有多少例进行过随访, 有多少例因出现不良反应而中途停止研究), 结果(应列出主要结果, 包括主要数据, 有什么新发现, 说明其价值和局限, 叙述要真实、准确、具体, 所列数据经用何种统计学方法处理; 应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值; 概率写P, 后应写出相应显著性检验值), 结论(全文总结, 准确无误的观点及价值). (常务副总编辑: 张海宁 2008-03-18)