

迷走神经切断及烟碱预处理对大鼠全身炎症 反应综合征的影响

凌丽, 李建国^{*}, 喻安永, 谢智慧, 章涛
(遵义医学院附属医院急诊科, 贵州 遵义 563003)

[摘要] 目的: 通过复制“两次打击”全身炎症反应综合征(SIRS)大鼠模型, 探讨迷走神经切断及烟碱预处理对大鼠 SIRS 的作用, 为临床治疗 SIRS 提供新思路。方法: 选择雄性健康 SD 大鼠 40 只, 随机分为 4 组, 每组 10 只。A: 对照组未予处理; B: 单侧迷走神经切断组; C: 行右侧颈部迷走神经切断; 烟碱预处理组: 每天 ip 烟碱液 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 连续 7 d; D: 联合迷走神经切断 + 烟碱预处理组。7 d 后造模(急性放血 + Lps ip); 造模后 12 h 取血检测大鼠外周血白细胞计数与分类、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸磷酸激酶(CPK)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)以及胆汁酸(TBA)的变化。结果: 迷走神经切断后能提高炎症反应; 烟碱预处理后能降低炎症反应; 联合二者处理后炎症反应介于两者之间。结论: 烟碱在次要的胆碱能抗炎通路中的作用不依赖于迷走神经的完整性, 可独立发挥作用。

[关键词] 两次打击; 迷走神经切断; 烟碱预处理; 全身炎症反应综合征

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0168-04

Preliminary Research on Effect of Pretreatment by Vagotomy and Nicotine on Systemic Inflammatory Reaction Syndrome in Rat

LING Li, LI Jian-guo^{*}, YU An-yong, XIE Zhi-hui, ZHANG Tao

(Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of pretreatment by vagotomy and nicotine on systemic inflammatory reaction syndrome (SIRS) in a rat model of “two-hit”, and to provide new ideas for the clinical treatment of SIRS. **Method:** Forty male SD rats were randomly divided into four groups, i. e. group A (control) without treatment, group B (unilateral vagotomy), group C (nicotine intervention), group D (unilateral vagotomy + nicotine intervention). The above interventions lasted 7 days. Afterwards, group B, group C and group D were treated by hemorrhagic shock and ip LPS for inducing SIRS. Twelve hours later, blood was with drawn to test the blood cell count, TNF- α , IL-6, LDH, CPK, BUN, Cr, ALT, AST and TBA. **Result:** Vagotomy could promote inflammation, and nicotine pretreatment could inhibit inflammation. Joint pretreatment of vagotomy + nicotine could produce an inflammatory state in between. **Conclusion:** Nicotine in the secondary cholinergic anti-inflammatory pathways appears to be independent to the integrity of vagus nerve. It may function independently.

[Key words] two-hit; vagotomy; nicotine pretreatment; systemic inflammatory reaction syndrome

全身炎症反应综合征(SIRS)是机体遭遇伤害性刺激时宿主防御反应不断扩大, 超出机体正常代

偿能力而引起的广泛组织细胞损伤的病理生理过程, 是各种原因导致的机体多器官功能障碍综合征

[收稿日期] 2010-09-02

[基金项目] 遵义市科技局项目[遵市科合社字(2009)10号]

[第一作者] 凌丽, 急诊专业研究生, 主治医师, 研究方向: 急重病, Tel: 13648525646, E-mail: 1046458383@qq.com

[通讯作者] ^{*} 李建国, 硕士生导师, 主任医师, 研究方向: 危重病, Tel: 13809433744, E-mail: 416431281@qq.com

的共同通路。自 20 世纪 90 年代提出了 SIRS 的概念和诊断标准,至今关于 SIRS 的认识仍处于初级阶段,其相应的临床干预对策缺乏有效性和特异性,本研究主要通过建立 SIRS 动物模型,探讨迷走神经切断及烟碱预处理对 SIRS 的作用,为 SIRS 的预防和治疗提供一条新的思路或更有效的治疗途径。

1 材料与方 法

1.1 动物及分组 雄性健康 SD 大鼠,体重 200 ~ 300 g,由重庆医科大学试验动物中心提供,动物许可证号 SC xR(渝)2007-0001,随机将 40 只试验动物分为 A, B, C, D 4 组,每组 10 只。A 组为对照组,未予处理;B 组单侧迷走神经切断组;C 组烟碱预处理组,每天给予烟碱液 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 连续 7d;D 组为联合迷走神经切断 + 烟碱预处理组。试验观察期内死亡的大鼠不纳入本研究。

1.2 SIRS 模型的制备 大鼠不同处理 7 d 后造模。造模前晚禁食,不禁水,术日采用戊巴比妥钠 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 麻醉,造模时左颈总动脉穿刺置管用于监测平均动脉压,放血和采集血样;右颈总动脉置管用于休克复苏的输血补液。20 min 内从左颈总动脉放血至 50 ~ 60 mmHg,维持 30 min 后,血液保存于肝素化的试管内,术后于 120 min 内回输全部血液及等量乳酸林格氏液,拔管,缝合伤口,同时 ip LPS $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (E. coli O55: B5, Sigma 公司)。

1.3 烟碱液的制备 0.1 g 烟碱加入 50 mL 纯净水混匀搅拌制成 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 烟碱溶液。

1.4 指标检测

1.4.1 TNF- α , IL-6 含量测定 血清于 - 20 冻存,用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定 (ELISA Kit-DIA-CLONE, 法国),操作照试剂盒说明。

1.4.2 外周血白细胞计数与分类 取抗凝血在全自动细胞分析仪 (XE 2100, 日本希森美康公司) 行血细胞分析。

1.4.3 生化指标测定 在造模成功后 12 h,应用生化分析仪 (奥林巴斯 AU5400, 日本) 检测大鼠血细胞、血生化和炎症趋化因子 [肿瘤坏死因子- (TNF- α , 白介素-6 (IL-6)] 含量,血清乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸磷酸激酶 (CPK)、尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 以及胆汁酸 (TBA) 含量。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计学软件,计量资料应用单因素方差分析,率的比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组大鼠 TNF- α 含量 B 组高于 A 组 ($P < 0.05$), C 组低于 A 组 ($P < 0.05$), D 组低于 A 组 ($P < 0.05$), (图 1)。

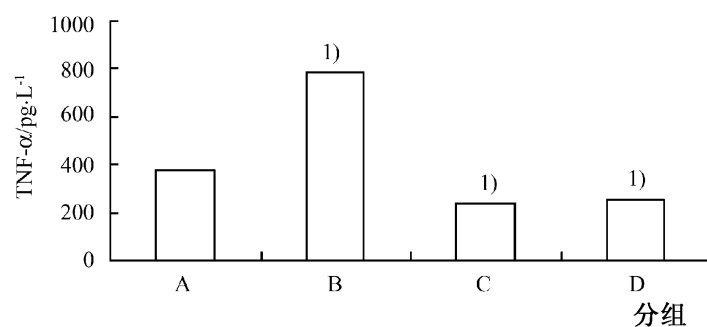


图 1 各组大鼠 TNF- α 含量

与 A 组比较¹⁾ $P < 0.01$ (图 2 ~ 4, 表 1 均同)

2.2 各组大鼠 IL-6 含量 B 组高于 A 组 ($P < 0.05$), C 组低于 A 组 ($P < 0.05$), D 组低于 A 组 ($P < 0.05$), (图 2)。

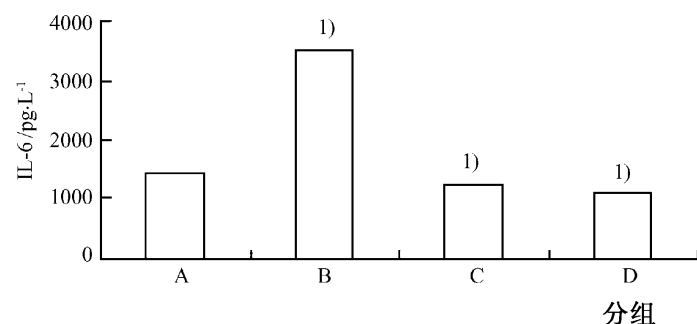


图 2 各组大鼠 IL-6 含量

2.3 各组大鼠外周血白细胞计数 A 组为 $13.0 \times 10^9 / \text{L}$, B 组 $15.1 \times 10^9 / \text{L}$, C 组 $6.5 \times 10^9 / \text{L}$, D 组 $7.3 \times 10^9 / \text{L}$, B 组高于 A 组 ($P < 0.05$), C 组低于 A 组 ($P < 0.05$), D 组低于 A 组 ($P < 0.05$), (图 3)。

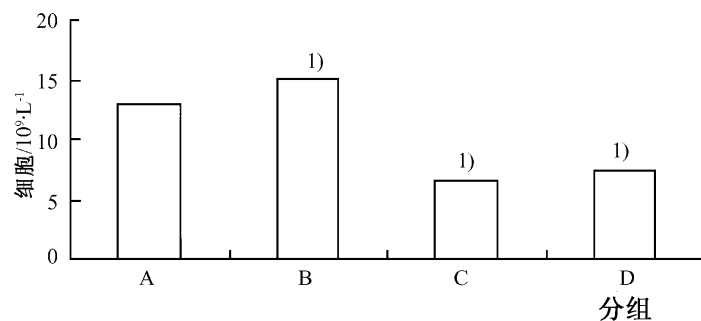


图 3 各组大鼠外周血白细胞计数

2.4 各组大鼠外周血中性粒细胞比率 A, B, C, D 组分别为 43.2%, 58.5%, 12.1%, 17.3%, B 组高于 A 组 ($P < 0.05$), C 组低于 A 组 ($P < 0.05$), D 组低于 A 组 ($P < 0.05$), (图 4)。

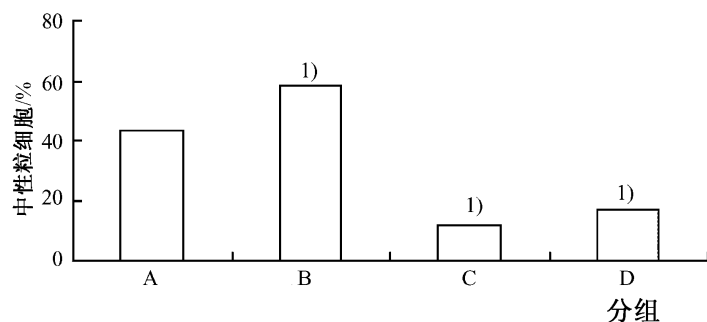


图 4 各组大鼠外周血中性粒细胞比率

2.5 各组大鼠血生化指标 B 组高于 A 组 ($P < 0.05$), C 组低于 A 组 ($P < 0.05$), D 组低于 A 组 ($P < 0.05$), (图 3, 表 1)。

表 1 各组大鼠血生化指标($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	LDH/ $U \cdot L^{-1}$	CPK/ $U \cdot L$	BUN/ $mmol \cdot L^{-1}$	Cr/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	TBA/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	ALT/ $U \cdot L^{-1}$	AST/ $U \cdot L^{-1}$
A	17.4 \pm 1.2	1681.9 \pm 292.5	20.1 \pm 3.3	28.4 \pm 5.6	28.3 \pm 4.9	741.3 \pm 159.5	1 412.8 \pm 59.2
B	24.5 \pm 3.6 ¹⁾	2 634.6 \pm 124.9 ¹⁾	28.4 \pm 5.6 ¹⁾	45.6 \pm 6.8 ¹⁾	44.5 \pm 5.9 ¹⁾	1 494.1 \pm 81.6 ¹⁾	2 426.9 \pm 190.6 ¹⁾
C	13.7 \pm 1.0 ¹⁾	1 343.9 \pm 150.3 ¹⁾	11.0 \pm 3.1 ¹⁾	13.5 \pm 2.7 ¹⁾	20.5 \pm 6.6 ¹⁾	532.6 \pm 168.1 ¹⁾	1 079.9 \pm 96.9 ¹⁾
D	15.8 \pm 0.5 ¹⁾	1 477.9 \pm 40.1 ¹⁾	13.5 \pm 2.7 ¹⁾	22.2 \pm 6.6 ¹⁾	21.6 \pm 6.1 ¹⁾	550.6 \pm 165.9 ¹⁾	1 245.1 \pm 50.9 ¹⁾

3 讨论

严重创伤、感染等因素能激活机体的神经内分泌系统,动员全身的免疫系统参与应激反应。如果忽视神经内分泌系统及免疫系统之间的相互关系,单一针对机体的某一方面调控,则可能出现医源性的新的紊乱。所以,宿主的炎症反应强度必须受到有效的调节,使机体处于一个相对平衡的炎症反应状态。本试验通过复制“两次打击”SIRS 动物模型,予单侧迷走神经切断及烟碱预处理,行炎症介质,白细胞计数及血生化等指标检测,希望能对 SIRS 的发病机制及如何防治 SIRS 有进一步的认识。

SIRS 的发病机制非常复杂,目前与其相关的学说大概分为两类,其一为与细胞因子有关的学说:细胞因子风暴学说和促炎/抗炎失衡学说。机体在严重感染或创伤打击时,一旦机体调节失衡,细胞因子释放失控,血液内出现长时间较高水平促炎因子而引起 SIRS,称为细胞因子风暴(Cytokine Storm)。机制可能是早期巨噬细胞产生 TNF- α , IL-6 等多种细胞因子,这些因子促进并放大炎症发展过程,同时还诱导免疫系统产生继发性细胞因子,它们又可进一步诱导炎症细胞分泌出大量炎症介质,如此循环反馈,最终导致组织器官损伤^[11]。促炎/抗炎失衡学说认为, SIRS 的发生可能是因为促炎增强,而抗炎减弱,机体自稳机制打破导致炎症反应过度^[2]。其二为与机体细胞的反应性有关的学说。SIRS 的发生还可能与机体细胞(如单核巨噬细胞和淋巴细胞)的反应性异常相关。TNF- α 是介导 SIRS 的主要细胞因子,除了具有直接毒性作用之外,其还能与其他多种细胞及分子相关联产生广泛的作用^[3]。白介素是感染时介导急性时相反应的一类多肽,免疫活性强,能参与多种炎症反应,对炎症发展起重要作用。张银中等^[4]通过试验认为 IL-6 可能是通过抑制中性粒细胞凋亡,增加中性粒细胞坏死而促进炎症反应。我们通过所制大鼠模型研究后发现“两次打

击”造模,检测的 TNF- α 及 IL-6 值升高明显,可能正是这些因子在大鼠体内升高促进并放大了炎症反应过程,最终导致组织器官损伤及免疫功能下降,导致了 SIRS。国内外研究证实迷走神经系统能显著地快速抑制细胞因子和炎症趋化因子的释放,从而减轻 SIRS,该生理机制被称为胆碱能抗炎通路—(CAP)^[5]。通过激活 CAP 能够有效的调节宿主炎症反应^[6],是宿主对严重细菌感染固有的免疫应答^[7]。通过缺血再灌注损伤动物模型刺激迷走神经能降低血浆中 TNF- α 的水平^[8]。Bemik 等^[9]研究表明,两侧迷走神经的抗炎作用没有显著性差异,迷走神经保护作用不存在偏侧性,故我们试验仅选择一侧迷走神经切断。结果显示单侧迷走神经切断组(B 组) TNF- α , IL-6, 白细胞计数及中性粒细胞比率较对照组(A 组)明显升高($P < 0.05$)。我们选用 CPK 和 LDH 反映心功能, ALT, AST 及 TBA 反映肝功能, BUN 和 Cr 反映肾功能,上述指标能反应各组织器官炎症反应程度。结果显示, B 组上述各项生化值较 A 组明显升高($P < 0.05$)。提示单侧迷走神经切断加重了大鼠全身炎症反应程度。其可能机制是胆碱能抗炎通路效应约 50% 被阻断,细胞因子和炎症趋化因子不能得到有效抑制而导致释放失控,血液内出现长时间较高水平促炎因子而加重 SIRS。乙酰胆碱(Ach)能抑制炎症反应时促炎症介质(TNF- α , IL-6 等)释放。体外试验证明 Ach 主要作用于蛋白水平而有效抑制巨噬细胞释放 TNF- α ^[10]。烟碱激动剂能抑制脓毒症晚期介质高迁移率族蛋白 B-1(HGMB-1)的释放,而 HGMB-1 可能是介导脓毒症炎症反应的重要调节因子^[11]。烟碱预处理能明显降低中性白细胞聚集、促炎细胞水平以及肝脏的损伤^[7]。所以通过研究我们认为,迷走神经切断后,大鼠体内促炎细胞因子的释放增加,大量白细胞聚集,炎症反应加强,对心、肝、肾等重要脏器的损伤加重。而烟碱预处理的大鼠,明显降低促炎细胞因子

的释放,白细胞聚集减少,抑制了炎症反应,对心、肝、肾等重要脏器有一定的保护作用。有趣的是,同时对于迷走神经切断联合烟碱治疗的大鼠促炎症效应被部分抵消,证实了烟碱在次要的胆碱能抗炎通路中的作用不依赖于迷走神经的完整性,可独立发挥作用,但其作用机制还有待进一步从分子或基因水平来深入研究。

[参考文献]

- [1] Moggi C, Memmini G, Turini M, et al. Severe inflammatory disease in children. Rationale for corticosteroid immunomodulating therapy: pathogenic therapy[J]. *Pediatr Med Chir*, 1996, 18(4) : 395.
- [2] Bone R C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS [J]. *Crit Care Med*, 1996, 24(7) : 1125.
- [3] Brouckaert P, Fiers W. Tumor necrosis factor and the systemic inflammatory response syndrome[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996, 216: 167.
- [4] 张银中, 叶铁虎, 赵丽云, 等. 白介素-6 和白介素-10 对体外中性粒细胞凋亡的影响[J]. *武警医学*, 2004, (9) : 647.
- [5] Tracsy K J. Physiology and immunology of the cholinergic anti-inflammatory pathway[J]. *Clin Invest*, 2007, 117(2) : 289.

- [6] Guarini S, Altavilla D, Cainazzo M M, et al. Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor- κ B activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock[J]. *Circulation*, 2003, 107(8) : 1189.
- [7] Van W D J, Giebelen I A, Florquin S, et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis [J]. *J Infect Dis*, 2005, 191(12) : 2138.
- [8] Bwmik T R, Friedman S G, Ochani M, et al. Cholinergic anti-inflammatory pathway inhibition og tumor necrosis foctor during ischemia reperfusion[J]. *J Vase Surg*, 2002, 36(6) : 1231.
- [9] Bemik T R, Friedman S G, Ochani M, et al. Phamacological stimulation of the choline anti-inflammatory pathway[J]. *J Exp Med*, 2002, 195(6) : 1.
- [10] Rorovikova L V, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin[J]. *Nature*, 2000, 405(6785) : 458.
- [11] Yao Y M, Sheng Z Y, Huang L F. The effect of a novel cytokine, high mobility group box 1 protein, on the development of traumatic sepsis[J]. *Clin J Integr Med*, 2009, 15(1) : 13.

[责任编辑 何伟]

(上接第 167 页)

与高良姜相同; CPA[18 1(11Z) / 0 0] 具有阻止癌细胞入侵和扩散的作用, 而肉桂具有抗肿瘤活性^[3]。肉桂水提物提高 CPA[18 1(11Z) / 0 0] 在尿液中浓度, 可能与肉桂抗肿瘤作用机制相关。肉桂增强基础代谢的作用机制可能与内源性抗基础代谢物质的浓度降低相关。本试验研究证明肉桂水提物能使给药组抗基础代谢物质(deoxyuridine) 的浓度显著低于空白组。而文献报道热性药物能够使机体基础代谢率显著升高^[4], 与试验过程中 deoxyuridine 浓度显著降低一致。因此, 抗基础代谢物质浓度降低可能是肉桂增强基础代谢的作用机制。

综上, 本试验以 LC-MS/MS 的代谢组学方法研究了肉桂水提物给药对大鼠尿液中内源性物质的影响, 初步研究结果表明肉桂水提物能显著影响大鼠

尿液中与细胞信号、基础代谢等作用相关物质的浓度变化。但具体的机制尚不明确, 有待进一步的分析或试验研究。

[参考文献]

- [1] 方琴. 肉桂的研究进展 [J]. *中药新药与临床药理*, 2007, 3(18) : 249.
- [2] www.umetrics.com.
- [3] Kiuchi F, Iwakami S, Shibuya M, et al. Inhibition of prostglandian and leukotriene biosythesis by gingerols and diarylheptanoids[J]. *Chem Pharm Bull Tokyo*, 1992, 40 (2) : 387.
- [4] 严守正. 虚热[J]. *福建中医药*, 1963, 8(2) : 71.

[责任编辑 何伟]