

卡巴胆碱对烫伤大鼠口服补液时小肠TNF- α 及水通道蛋白-1的影响

包呈梅, 胡森, 耿世佳, 吴静, 车晋伟, 田易军, 陆江阳, 武彦, 盛志勇

包呈梅, 胡森, 耿世佳, 吴静, 车晋伟, 田易军, 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
陆江阳, 中国人民解放军总医院第一附属医院病理科北京市100037

武彦, 内蒙古医学院第一附属医院病理科 内蒙古自治区呼和浩特市010059

军队十一五专项课题资助项目, No. 06Z055

作者贡献分布: 此课题由胡森, 车晋伟, 耿世佳及吴静设计; 研究过程由车晋伟, 耿世佳, 吴静, 包呈梅及田易军操作完成; 研究所用试剂及分析工具由胡森提供; 免疫组化由武彦及陆江阳提供技术支持; 数据分析由包呈梅完成; 本论文写作由包呈梅, 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烧伤研究所休克与多器官功能障碍实验室. hs304@yahoo.com.cn

电话: 010-66867397 传真: 010-68989391

收稿日期: 2008-03-07 修回日期: 2008-04-16

接受日期: 2008-04-21 在线出版日期: 2008-07-08

Effect of carbachol on expression of TNF- α and aquaporin-1 in small intestine during enteral resuscitation of scald injury in rats

Cheng-Mei Bao, Sen Hu, Shi-Jia Geng, Jing Wu, Jin-Wei Che, Yi-Jun Tian, Jiang-Yang Lu, Yan Wu, Zhi-Yong Sheng

Cheng-Mei Bao, Sen Hu, Shi-Jia Geng, Jing Wu, Jin-Wei Che, Yi-Jun Tian, Zhi-Yong Sheng, Burns Institute, the First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100037, China

Jiang-Yang Lu, Department of Pathology, the First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100037, China

Yan Wu, Department of Pathology, the First Hospital Affiliated to the Inner Mongolia Medical College, Hohhot 010059, Inner Mongolia Autonomous Region, China

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

Correspondence to: Sen Hu, Laboratory of Shock and Multiple Organ Dysfunction, Burns Institute, the First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, 51 Fucheng Road, Beijing 100037, China. hs304@yahoo.com.cn

Received: 2008-03-07 Revised: 2008-04-16

Accepted: 2008-04-21 Published online: 2008-07-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of carbachol (a cholinergic agent) on expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and aquaporin-1 (AQP-1) water channels in small intestine of

scalded rats.

METHODS: Wistar rats were randomly assigned to five groups: shame scald (N), scald without fluid resuscitation (S), scald resuscitated with enteral GES alone (GES), scald resuscitated with enteral carbachol alone (CAR) and scald resuscitated with enteral carbachol plus GES (GES/CAR) ($n = 10$). About 35% TBSA of scald injury was formed with boiling water on back of rats in all groups except the shame scald group. N, GES and GES/CAR groups were enterally administered 30 min after scald injury. The specimens of jejunum of all groups were harvested and analyzed. AQP-1 expression in intestines was evaluated using immunohistochemical method, TNF- α was measured using ELISA and the liquid absorption rate was determined using phenol red.

RESULTS: Compared with the shame scald group, AQP-1 expression in small intestine was significantly decreased in scalded animals (90.3 ± 18.4 vs 4851.6 ± 654.5 , $P < 0.01$), but significantly increased in CAR, GES and GES/CAR groups (1806.1 ± 110.1 , 2272.3 ± 113.8 , 3322.0 ± 595.9 vs 90.3 ± 18.4 , all $P < 0.01$). TNF- α level in intestinal tissues of GES/CAR and CAR groups were markedly suppressed compared with those in S and GES groups (0.9 ± 0.3 , 1.0 ± 0.47 vs 1.8 ± 0.3 , 1.9 ± 0.2 , $P < 0.05$). TNF- α expression level was negatively correlated with AQP-1 of small intestine in GES/CAR, CAR and S groups ($r = -0.9030$, -0.9602 , -0.9866 , all $P < 0.05$). Liquid absorption rate of small intestine in GES/CAR group was significantly increased compared with GES group ($21.0\% \pm 0.1\%$ vs $12.7\% \pm 0.1\%$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Carbachol have significant effects on improving the liquid absorption by inhibiting TNF- α and up-regulating AQP-1 expression in small intestine.

Key Words: Burns; Carbachol; Aquaporin-1; Tumor necrosis factor- α

背景资料

AQP-1在消化系统分布广泛,是介导胃肠道水分子跨膜转运的重要物质.烧伤休克时肠缺血缺氧、肠动力下降、肠道对水吸收障碍,影响口服补液的复苏效果.因此在烧伤休克口服补液时减少炎症反应抑制炎症因子,改善AQP-1的表达,增加肠道水吸收,将有助于提高口服补液效果.卡巴胆碱是一种胆碱能受体激动剂,可促进胃肠动力、扩张血管、减轻炎症,对减轻烧伤休克时炎症反应抑制炎症因子,改善AQP-1的表达,增加肠道水吸收有重要意义,是值得关注的能提高烧伤休克口服补液疗效的一种药物.

同行评议者

吴志勇,教授,上海交通大学医学院附属仁济医院普外科

■ 研发前沿

水通道蛋白是跨膜水转运的重要通道,是近几年的研究热点.

Bao CM, Hu S, Geng SJ, Wu J, Che JW, Tian YJ, Lu JY, Wu Y, Sheng ZY. Effect of carbachol on expression of TNF- α and aquaporin-1 in small intestine during enteral resuscitation of scald injury in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(19): 2171-2174

摘要

目的: 研究拟胆碱药卡巴胆碱对烫伤大鼠口服补液时小肠TNF- α 及水通道蛋白-1(AQP-1)表达的影响.

方法: δ Wistar大鼠50只,随机分为假烫(N)、单纯烫伤(S)、肠内葡萄糖-电解质液(GES)、肠内卡巴胆碱组(CAR)和肠内葡萄糖-电解质液+卡巴胆碱组(GES/CAR)5组($n = 10$).大鼠背部用沸水造成35% TBSA烫伤. N, GES和GES/CAR组于伤后30 min开始补液.免疫组化法测定肠组织AQP-1的表达, ELISA法检测肠组织TNF- α 含量,酚红法测定大鼠小肠对水的吸收率.

结果: S组大鼠小肠AQP-1与N组比明显降低(90.3 ± 18.4 vs 4851.6 ± 654.5 , $P < 0.01$); CAR, GES和GES/CAR组AQP-1与S组相比均显著增加(1806.1 ± 110.1 , 2272.3 ± 113.8 , 3322.0 ± 595.9 vs 90.3 ± 18.4 , 均 $P < 0.01$).给予卡巴胆碱组(CAR, GES/CAR)与未给予卡巴胆碱组(S, GES)相比肠组织TNF- α 含量明显下降(0.9 ± 0.3 , 1.0 ± 0.47 vs 1.8 ± 0.3 , 1.9 ± 0.2 , $P < 0.05$).GES/CAR, CAR及S组AQP-1表达量与TNF- α 含量成负相关($r = -0.9030$, -0.9602 , -0.9866 , 均 $P < 0.05$).GES/CAR组水吸收率较GES组明显升高($21.0\% \pm 0.1\%$ vs $12.7\% \pm 0.1\%$, $P < 0.05$).

结论: 卡巴胆碱可抑制促炎因子TNF- α 的释放,上调小肠AQP-1表达,改善大鼠烫伤早期肠道对水的吸收.

关键词: 烫伤; 卡巴胆碱; 水通道蛋白-1; 肿瘤坏死因子- α

包呈梅, 胡森, 耿世佳, 吴静, 车晋伟, 田易军, 陆江阳, 武彦, 盛志勇. 卡巴胆碱对烫伤大鼠口服补液时小肠TNF- α 及水通道蛋白-1的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16(19): 2171-2174
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2171.asp>

0 引言

水通道蛋白对水有高度选择性,是跨膜水转运的重要通道,其中水通道蛋白-1(AQP-1)在消化系分布广泛,是介导胃肠道水分子跨膜转运的重要物质^[1-2].烧伤休克时肠道处于严重缺血缺氧及炎症状态、肠动力下降、肠道水吸收障碍,

严重影响着补液的复苏效果^[3].我们假设如果在烧伤肠内补液中加入能减少炎症反应抑制炎症因子,改善AQP-1的表达,增加水吸收的药物,将有助于提高补液效果.卡巴胆碱是一种胆碱能受体激动剂,有促进胃肠动力、扩张血管、减轻炎症等作用^[4].本研究的目的是观察在烫伤休克早期肠内补液时卡巴胆碱对小肠TNF- α 及水通道蛋白-1表达的影响,为提高烫伤休克早期肠内补液疗效提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 δ Wistar大鼠50只(230 ± 20 g)60-70日龄,购自中国医学科学院动物中心. GES配方:每1L水中溶解3.5 g NaCl、2.5 g NaHCO₃、1.5 g KCl和20 g葡萄糖,使用前置于37℃恒温水浴箱预热.酚红溶液:100 mL含2 mg酚红.卡巴胆碱:美国Sigma公司产品.兔抗鼠AQP-1多克隆抗(1:100):购自美国Santa Cruz公司.非生物素二步法免疫组化检测试剂盒(内含内源性过氧化物酶阻断剂、二抗HRP-多聚体)北京中杉金桥生物技术有限公司产品.大鼠TNF- α 检测试剂盒:美国Doclone公司产品. ZNB-XB型输液泵:北京科力丰科技发展有限公司产品.

1.2 方法

1.2.1 动物模型: δ Wistar大鼠在万级动物室适应性饲养1 wk,术前18-20 h禁食,4 h禁水.烫伤组大鼠用乌拉坦im麻醉,背部脱毛,沸水(100℃, 15 s)造成35% TBSA III度烫伤.取腹正中切口,自十二指肠起始段幽门下5 cm和盲肠上5 cm各剪开一个小口,向十二指肠远端向下和回肠近端向上各插入直径为0.5 cm的无菌硅胶管,扎紧固定,用37℃生理盐水将小肠内容物冲洗干净.循环液置于37℃恒温水浴箱预热30 min,将两硅胶管游离端置于循环液中形成闭合环路.用输液泵控制十二指肠游离端液体流速,输液泵速度按4 mL 1% TBSA/kg设定.

1.2.2 分组处理: 动物随机分为假烫(N, $n = 10$)、单纯烫伤(S, $n = 10$)、肠内卡巴胆碱组(CAR, $n = 10$)、肠内葡萄糖-电解质液(GES, $n = 10$)和肠内葡萄糖-电解质液+卡巴胆碱组(GES /CAR, $n = 10$)等5组. N、GES和GES/CAR组于伤后30 min开始补液, CAR组给予卡巴胆碱.各组烫伤后四和经腹主动脉抽血处死,取空肠标本,甲醛固定.

1.2.3 检测及方法: (1)AQP-1免疫组化.将石蜡切片脱蜡水化,一抗为兔抗鼠AQP-1多克隆抗(1:100).非生物素二步法免疫组化检测试剂

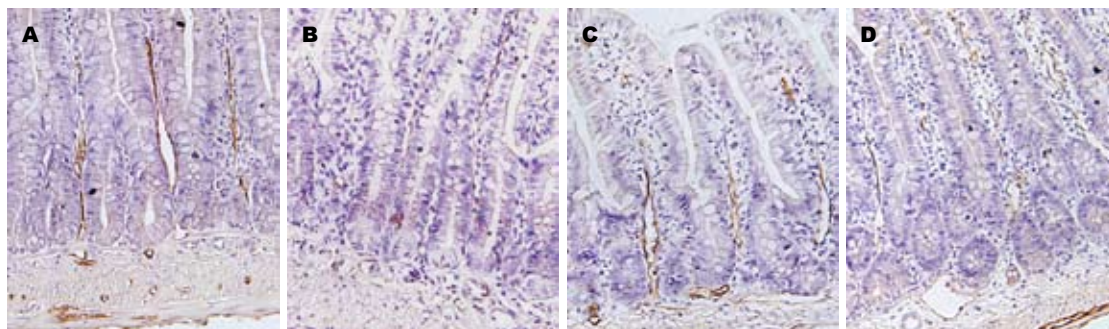


图 1 AQP-1的表达(SABC $\times 200$). A: 假烫组; B: 单烫组; C: GES/CAR组; D: GES组.

■应用要点

卡巴胆碱可增加小肠水吸收率, 对维持机体内平衡, 增加机体对烫伤休克的耐受能力有重要作用, 对于提高口服液体复苏效果具有潜在的应用价值.

表 1 小肠AQP-1的表达 ($n = 10$, mean \pm SD, 总IA值)

分组	总IA值
N组	4851.6 \pm 654.5
S组	90.3 \pm 18.4 ^d
CAR组	1806.1 \pm 110.1 ^{ab}
GES组	2272.3 \pm 113.8 ^{ab}
GES/CAR组	3322.0 \pm 595.9 ^b

^a $P < 0.05$ vs GES/CAR组; ^b $P < 0.01$ vs S组; ^d $P < 0.01$ vs N组.

盒(内含内源性过氧化物酶阻断剂、二抗HRP-多聚体). 正常羊血清封闭液阻断非特异性染色, 胃蛋白酶抗原修复, DAB显色, 苏木素复染, 脱水、透明、干燥, 中性树胶封固, 光镜下观察. 用Image-Pro Plus 6.0图象分析系统, 进行AQP-1半定量检测; 每组3张切片每张切片随机选取7个视野, 计算各视野的整合吸光度(IA)值. (2)肠组织TNF- α 含量测定. 取空肠起始段测肠组织中TNF- α , 操作严格按大鼠TNF- α ELISA检测试剂盒说明书要求进行. (3)肠吸收功能: 由于酚红不被小肠吸收, 可用于测定肠道水吸收率. 配制的溶液每100 mL含2 mg酚红. 每组开始补液后每30 min取循环液0.5 mL, 分别加入0.2 mol/L NaOH 5 mL, 摇匀, 以0.2 mol/L NaOH调零, 在550 nm测定吸收度, 绘制标准曲线.

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 实验数据采用SPSS11.0统计软件进行 t 检验及相关性分析, $P < 0.05$ 为差别有统计学意义.

2 结果

2.1 AQP-1的表达 假烫组AQP-1免疫组化结果显示, AQP-1大量表达于肠道毛细血管、小血管及中央乳糜管内皮细胞(棕色为阳性表达); 单纯烫伤组AQP-1表达显著低与假烫组($P < 0.01$); GES组和GES/CAR组AQP-1表达量与单烫组相比均有所增加($P < 0.01$); GES/CAR组AQP-1表达增加

表 2 GES /CAR, CAR和S组AQP-1与TNF- α 相关性

	相关系数	P 值
GES/CAR组	-0.9030	0.005
CAR组	-0.9602	0.001
S组	-0.9866	0.002

较GES组明显($P < 0.05$, 表1, 图1).

2.2 肠组织TNF- α 含量 卡巴胆碱可明显抑制烫伤休克大鼠小肠促炎因子TNF- α 的表达, 给予卡巴胆碱的CAR组和GES/CAR大鼠肠组织TNF- α 含量(1.0 ± 0.5 , 0.9 ± 0.1)与单纯烫伤组及GES组(1.8 ± 0.3 , 1.9 ± 0.5)比较明显减少($P < 0.05$). GES/CAR, CAR及S组AQP-1表达量与TNF- α 含量成负相关(表2).

2.3 水吸收率 与假烫组比较烫伤休克大鼠小肠水吸收率明显下降, 假烫组 $21.5\% \pm 0.1\%$, GES组 $12.7\% \pm 0.1\%$ ($P < 0.05$); GES/CAR组肠道水吸收率为 $21.0\% \pm 0.1\%$; GES/CAR组各时间点水吸收值均明显高于GES组($P < 0.05$).

3 讨论

正常生理情况下, 水透过细胞膜分2种过程: (1)通过磷脂双层的简单扩散; (2)通道介导的跨膜转运. 后者受水通道蛋白表达水平的影响. 水通道蛋白在哺乳动物各组织器官中分布广泛^[5], 其中AQP-1在消化系统大量表达, 参与肠道对水的分泌、吸收及细胞内外水的平衡. 本实验对大鼠小肠AQP-1的免疫组化染色显示AQP-1主要表达于小肠毛细血管、小血管及中央乳糜管内皮细胞. 进一步说明了AQP-1与小肠水吸收密切相关.

烫伤休克早期肠内补液作为一种紧急救助措施^[6], 虽然血流动力学恢复滞后于静脉补液, 但在提高血容量和尿量、降低死亡率等方面可以达到与静脉补液相似的效果^[7-8]. 本实验结果显示, 烫伤休克大鼠小肠AQP-1表达显著降低,

■同行评价

本研究设计方法较合理,结果可信,讨论条理分明,具有潜在的临床应用价值。

使水跨膜转运减少,小肠水吸收率明显下降。葡萄糖-电解质溶液可通过糖酵解途径产生ATP供胃肠上皮细胞利用,改善受损细胞功能,促进钠和水的吸收,但其改善小肠AQP-1表达及水吸收的作用并不显著,给予葡萄糖-电解质溶液后小肠TNF- α 较单烫组有所增加,可能由于烫伤休克肠内补液所制的缺血再灌注引起的炎症因子增加。本实验结果显示卡巴胆碱可明显抑制小肠促炎因子TNF- α 的表达,在葡萄糖-电解质溶液中加入卡巴胆碱可明显增加烫伤休克大鼠小肠AQP-1表达量及水吸收率,其作用机制可能为:(1)卡巴胆碱兴奋M受体可增加肠蠕动、改善肠血流,增强AQP-1活性。文献报道也显示,乙酰胆碱通过M3受体可使水通道蛋白在细胞内囊泡与顶质膜间穿梭^[9-10],提高水的通透性;(2)卡巴胆碱有兴奋N受体抑制肠道缺血再灌注时TNF- α 等炎症因子释放,减轻缺血缺氧状态下的肠组织炎症反应的作用^[11-12]。烧伤休克时肠道处于严重缺血缺氧状态,导致肠组织过度炎症损伤。TNF- α 是烧伤休克时重要的促炎因子,可下调水通道基因表达^[13]。实验结果显示GES/CAR, CAR及S组AQP-1表达量与TNF- α 含量成负相关性。烫伤休克后随着肿瘤坏死因子的大量释放,AQP-1表达迅速减少,给予卡巴胆碱可明显抑制肠组织中TNF- α 释放^[14-15],从而改善AQP-1的表达增强肠道对水的吸收。但卡巴胆碱增加小肠AQP-1表达的具体机制尚不清楚,有待进一步研究。烫伤休克早期肠内补液时在葡萄糖-电解质溶液中加入卡巴胆碱可增加小肠水吸收率,对维持机体内平衡,增加机体对烫伤休克的耐受能力有重要作用,对提高肠内液体复苏的效果具有潜在的应用价值。

4 参考文献

- 1 Sogami M, Era S, Murakami M, Seo Y, Watari H, Uyesaka N. Application of the transition state

- theory to water transport across cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1511: 42-48
- 2 Ma T, Verkman AS. Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology. *J Physiol* 1999; 517 (Pt 2): 317-326
- 3 曹卫红, 柴家科, 胡森, 杨红明, 孙天骏, 邹晓防, 盛志勇. 卡巴胆碱对烧伤后肠道功能障碍影响的研究. *中华烧伤杂志* 2006; 22: 168-172
- 4 Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang H, Yang H, Ulloa L, Al-Abed Y, Czura CJ, Tracey KJ. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003; 421: 384-388
- 5 梁棋, 徐三荣, 严唯力, 邓丽贤, 孙大裕. 水通道蛋白-1在消化系统的研究进展. *国外医学·消化系疾病分册* 2003; 23: 245-247
- 6 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
- 7 Ramakrishna BS. Towards a better oral rehydration fluid. *Indian J Pediatr* 2001; 68: 41-43
- 8 任清华, 赵晓晏, 胡森, 郝波, 陈廷秀, 黎君友, 吕艺, 杨国兴, 王国强, 周国勇, 盛志勇. 烧伤后早期口服液体复苏与静脉液体复苏的对比研究. *华北国防医药* 2006; 18: 305-307
- 9 Ishikawa Y, Eguchi T, Skowronski MT, Ishida H. Acetylcholine acts on M3 muscarinic receptors and induces the translocation of aquaporin5 water channel via cytosolic Ca²⁺ elevation in rat parotid glands. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245: 835-840
- 10 Emeth-Cahalan KL, Kalman K, Hall JE. Molecular basis of pH and Ca²⁺ regulation of aquaporin water permeability. *J Gen Physiol* 2004; 123: 573-580
- 11 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
- 12 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
- 13 Towne JE, Krane CM, Bachurski CJ, Menon AG. Tumor necrosis factor-alpha inhibits aquaporin 5 expression in mouse lung epithelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 18657-18664
- 14 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
- 15 胡森, 周国勇, 吕艺, 宋琪, 邹晓防, 盛志勇. 卡巴胆碱对脂多糖刺激巨噬细胞释放炎症细胞因子的影响及其受体研究. *中国药理学通报* 2007; 23: 1575-1579

编辑 潘伯荣 电编 郭海丽