

[文章编号] 1000-4718(2006)07-1306-05

迷走神经电刺激对大鼠肠缺血再灌注后肠损伤的影响

柳垂亮¹, 李玉娟², 李向宇¹, 刘克玄³, 黄文起³

(¹ 广东省中医院麻醉科, ² 中山大学附属第二医院麻醉科, 广东 广州 510120;

³ 中山大学附属第一医院麻醉科, 广东 广州 510080)

[摘要] 目的: 观察迷走神经电刺激对大鼠肠缺血再灌注(I/R)后肠损伤的影响。方法: 30只雄性Wistar大鼠, 双侧颈迷走神经切断后, 随机分为3组($n=10$): (1) 肠缺血再灌注(I/R)组: 暴露腹腔后夹闭肠系膜上动脉(SMA)1 h, 开放再灌注2 h; (2) 迷走神经刺激(VNS)组: 在夹闭前及再灌注开始均以5 V、2 ms和1 Hz强度的电能持续刺激左颈部迷走神经远端20 min; (3) 假手术对照(SC)组: 仅暴露腹腔, 不行SMA夹闭及电刺激。颈动脉插管监测平均动脉压(MAP)。所有动物在再灌注2 h后处死, 取小肠组织行光学、电子显微镜观察肠粘膜损伤程度并行改良的Chiu's评分; 检测血浆丙二醛(MDA)、肿瘤坏死因子(TNF α)含量。结果: 各组大鼠MAP在缺血期基本保持平稳。而在再灌注期, I/R组的MAP随时间延长明显低于SC组($P<0.05$), 而VNS组能明显拮抗MAP下降($P<0.05$)。光学、电子显微镜观察显示I/R后肠组织出现不同程度的损伤, I/R组最为严重, 而VNS组相对较轻; 但两组的改良Chiu's评分值显著高于SC组($P<0.01$), VNS组的评分值明显低于I/R组($P<0.01$)。I/R组血浆MDA、TNF α 含量明显高于SC组和VNS组($P<0.05, P<0.01$); VNS组血浆MDA含量高于SC组($P<0.05$), VNS组血浆TNF α 与SC组无显著差异($P>0.05$)。结论: 电刺激迷走神经能显著减轻I/R肠粘膜结构的病理改变并使再灌注期的循环血压得到一定改善, 其保护效应可能与减少脂质过氧化、下调TNF α 生成有关。

[关键词] 迷走神经; 肠; 再灌注损伤

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of electrical stimulation of vagus nerve on gut injury following intestinal ischemia - reperfusion in rats

LIU Chui-liang¹, LI Yu-juan², LI Xiang-yu¹, LIU Ke-xuan³, HUANG Wen-qi³

(¹ Department of Anesthesiology, TCM Hospital of Guangdong Province, ² Department of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; ³ Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

[ABSTRACT] AIM: To investigate the effects of electrical stimulation of vagus nerve on gut injury following intestinal ischemia - reperfusion in rats. METHODS: 30 adult male Wistar rats subjected to bilateral cervical vagotomy were randomly divided into three groups ($n=10$ per group): (1) Intestinal ischemia - reperfusion group (group I/R): laparotomy and I/R induced by clamping arteria mesenterica superior for 1 h followed by reperfusion for 2 h. (2) Vagus nerve stimulation group (group VNS): laparotomy, I/R and electric stimulation with pulse train of constant amplitude 5V, pulse width 2 ms and frequency 1 Hz at the left caudal vagus ends for 20 minutes before and after occlusion. (3) Sham control group (group SC): sham operation and sham stimulation. Carotid artery was cannulated for mean arterial pressure (MAP) monitoring. A strip of small intestine was taken from distal end of ileum for light microscopic (LM) and transient electron microscopic (TEM) examination at the time of 2 h after reperfusion. Improved Chiu's scale was used to quantitatively assay the damage degree. The levels of malondialdehyde (MDA) and TNF- α in plasma were detected. RESULTS: MAP in every group kept steady during ischemia, but decreased gradually with the prolongation in the time of reperfusion. MAP decreased more dramatically in group I/R than that in group VNS ($P<0.05$). Histological changes by LM and TEM were more significant in group I/R than those in group VNS and SC. The improved Chiu's scale in group VNS was obviously slighter than that in group I/R ($P<0.05$). In group I/R, the levels of MDA and TNF- α in plasma were significantly increased compared with group VNS and SC ($P<0.01, P<0.05$). MDA level in group VNS was significantly higher than that in group SC, but there was no significant difference in TNF- α between the two groups. CONCLUSION: Electrical stimulation of vagus

[收稿日期] 2005-07-11

[修回日期] 2005-11-22

nerves can lessen pathological changes of intestinal mucosa induced by I/R and improve BP during reperfusion, which may be related to reducing lipid peroxidation, and down-regulating TNF- α synthesis.

[KEY WORDS] Vagus nerve; Intestines; Reperfusion injury

肠缺血再灌注(intestinal ischemia-reperfusion, I/R)损伤是外科临床中常见的器官损伤之一, I/R不仅可引起消化道局部组织的结构和功能的损害,而且因肠粘膜屏障功能的损害可引发肠道菌群移位和内毒素血症,产生全身炎症反应综合征,还可能对其它脏器造成继发性损伤,甚至多器官功能衰竭,导致并发症和死亡率增加^[1]。然而,在临床上对 I/R 损伤目前仍无有效的防治手段,因而进一步展开对其机制及防治的研究无疑是具有临床意义。近年来实验研究表明,通过传出迷走神经电刺激而释放乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)并特异性结合于组织巨噬细胞表面的 $\alpha 7$ 亚基烟碱受体,抑制致炎性细胞因子释放,具有保护脏器功能,维持内环境稳定作用^[2]。但迷走神经电刺激对 I/R 后肠粘膜损伤是否也有影响未见研究报道。本实验拟对此进行验证。

材 料 和 方 法

1 试剂与仪器

乌拉坦(上海化学试剂公司),肝素钠注射液(上海生物化学制药厂),2.5%戊二醛+2%多聚甲醛混合电镜固定液(中山大学电镜室提供),多聚甲醛(天津市化学试剂研究所),丙二醛(malon dialdehyde, MDA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF α)放免检测试剂盒(北京东亚免疫技术研究所);Biolap 98 智能型生物信号显示处理系统(成都泰盟电子制造),透射电镜(HITACH-H600,日本),离心机(LDZ5-2,北京医用离心机厂),-20℃低温冰箱(日本SANYO),普通光学显微镜(OLYMPUS CH30,日本),多管放射免疫计数器(DFM-96型,从成机电技术公司),可见分光光度计(VIS-723G型,北京瑞利分析仪器公司)。

2 动物模型的建立

清洁级健康 Wistar 雄性大鼠 30 只,体重 280-300 g,手术前禁食 12 h,自由饮水。腹腔注射 20% 乌拉坦(6 mL/kg)麻醉后,行气管切开插管以保持自主呼吸通畅。钝性分离双侧颈总动脉和迷走神经,用丝线靠头端结扎左侧迷走神经并在近端剪断,远端与双铂电极连接;右侧颈总动脉置管,连接压力传感器。双铂电极导线、压力传感器导线连接于 Biolap 98 智能型生物信号显示处理系统,连续监测平均动

脉压并提供持续电刺激迷走神经。以肝素 10 g·L⁻¹·kg⁻¹ 抗凝,尽量按无菌操作开腹,分离暴露肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA),自腹主动脉分出的根部用无损伤小动脉夹夹闭之,避免钳夹肠系膜上静脉。还纳肠管,缝合切口。缺血 1h 后重新打开腹腔,去除动脉夹再灌注 2 h。

3 动物分组

上述大鼠随机分为 3 组($n=10$): I/R 组:夹闭 SMA 1 h 后松夹再灌注 2 h,不刺激迷走神经;迷走神经刺激(vagus nerve stimulation, VNS)组:在夹闭前及再灌注开始均以 5 V、2 ms 和 1 Hz 强度的电能持续刺激左侧迷走神经远端 20 min;假手术对照(sham control, SC)组:仅暴露腹腔,不行 SMA 夹闭及电刺激。

4 动脉血压监测

记录时点:①迷走神经刺激前(基础值 T0)、②夹闭 0 min (T1)、③夹闭 30 min (T2)、④再灌注 0 min (T3)、⑤再灌注 30 min (T4)、⑥再灌注 60 min (T5)、⑦再灌注 90 min (T6)、⑧再灌注 120 min (T7)。每次记录监测波形持续 30 s,取其平均值作为该时点的测量值。动脉血压以平均动脉压(MAP)表示。

5 血浆 MDA、TNF α 水平检测

每组动物均在肠缺血再灌注 2 h 时,立即开腹,迅速抽取肝下腔静脉血,经离心后取出上清液,分半量放入两 1.5 mL EP 管,-20℃冰箱保存。按照试剂盒说明书操作,用放免法测 TNF α 含量,并用硫代巴比妥酸(TBA)法测 MDA 含量。

6 小肠组织光学、电子显微镜观测

每组动物均在肠缺血再灌注 2 h 时,立即开腹,取小肠回盲部 10 cm 以上的肠管,剪取两小块肠组织经冰水漂净,滤纸吸干,分别放入 4% 多聚甲醛液、2.5% 戊二醛+2% 多聚甲醛混合电镜液固定,备光学、电子显微镜观测。小肠组织常规 HE 染色后,依据改良的 Chiu 等^[3]报道的方法在 400 倍显微镜下任选 5 个非重叠视野观察小肠组织损伤程度并评分,取其平均值用于统计。评分标准如下:

0 分:正常绒毛和腺体;1 分:部分绒毛顶部改变,上皮下 Gruenhagen's 腔开始形成;2 分:上皮 Gruenhagen's 腔开始形成,腺体轻度受损;3 分:上皮间隙过大,毛细血管充血;4 分:上皮与固有层中度

分离,腺体受损;5分:部分顶部绒毛脱落;6分:绒毛脱落明显,毛细血管扩张;7分:固有层绒毛脱落,腺体受损明显;8分:固有层开始消化、分解;9分:出血、溃疡。

7 统计学处理

计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 11.0 for Windows 统计软件包行统计学处理。多组均数比较使用单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较采用 LSD - *t* 检验。

结 果

1 一般情况

各组大鼠体重及实验室温度均无显著差异 ($P > 0.05$)。术中均存活,麻醉效果满意。

2 MAP 的变化

各组大鼠 MAP 在缺血期基本保持平稳。而在再灌注期 (T3 - T7), I/R 组的 MAP 随时间延长而明显下降,与 SC 组同时点相比有显著差异 ($P < 0.05$); VNS 组能明显改善 MAP, 与 I/R 组相比有显著差异 ($P < 0.05$), 但与 SC 组比较仍呈降低趋势, 表明 VNS 能一定程度地升高 MAP, 见表 1。

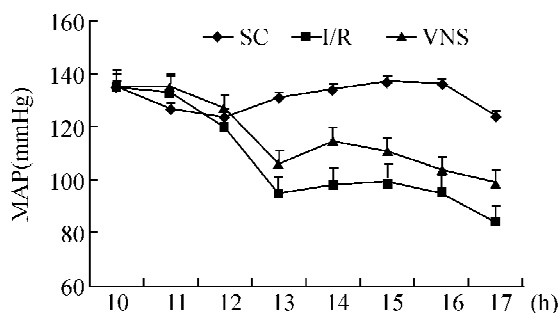


Fig 1 Changes of MAP in groups during I/R.

图 1 各组大鼠 I/R 期的 MAP 变化

表 1 各组大鼠 I/R 不同时期 MAP 的变化

Tab 1 Changes of MAP in different groups during I/R (mmHg. $\bar{x} \pm s$. $n=10$)

| Group | T0 | T1 | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 |
|-------|--------------|--------------|--------------|---------------|----------------|----------------|---------------|--------------|
| SC | 135.1 ± 7.4 | 126.9 ± 11.7 | 123.5 ± 8.3 | 130.9 ± 14.0 | 134.1 ± 10.6 | 137.0 ± 7.6 | 136.1 ± 6.2 | 123.8 ± 11.3 |
| I/R | 134.8 ± 18.3 | 132.5 ± 8.5 | 119.9 ± 15.5 | 94.2 ± 5.9* | 97.7 ± 4.2* | 98.8 ± 9.4* | 94.7 ± 8.7* | 83.4 ± 12.8* |
| VNS | 135.1 ± 14.1 | 134.8 ± 9.1 | 126.8 ± 6.0 | 105.9 ± 10.2* | 114.5 ± 18.5** | 110.9 ± 12.2** | 103.7 ± 4.8** | 98.8 ± 5.9** |

* $P < 0.05$ vs SC group; ** $P < 0.05$ vs I/R group.

讨 论

本研究通过阻断 SMA 1 h 再灌注 2 h 复制了 I/R 肠损伤模型, 通过光学、电子显微镜观测肠组织形态学变化, 发现 I/R 组肠粘膜结构受损最严重, 对肠粘膜病理损伤程度的改良 Chiu's 评分的定量分析结

3 光学显微镜观测小肠组织损伤程度

光镜下可见 SC 组小肠粘膜基本正常, 仅少数部位出现绒毛上皮轻度受损 (见图 2A)。I/R 组的小肠绒毛水肿明显, 大量上皮细胞脱落, 腺体明显受损, 有出血; 上皮间隙明显增大, 上皮与固有层分离; 固有层水肿、充血、出血, 血管、淋巴管高度扩张 (图 2B)。VNS 组的小肠绒毛水肿, 偶有脱落, 腺体轻度受损, 可见少量出血; 上皮间隙扩大不明显, 可见局部分离; 固有层水肿, 血管和淋巴管轻度扩张 (图 2C)。

其它两组改良的 Chiu's 评分值显著高于 SC 组 ($P < 0.01$), 而 VNS 组的评分值显著低于 I/R 组 ($P < 0.01$), 见表 2。

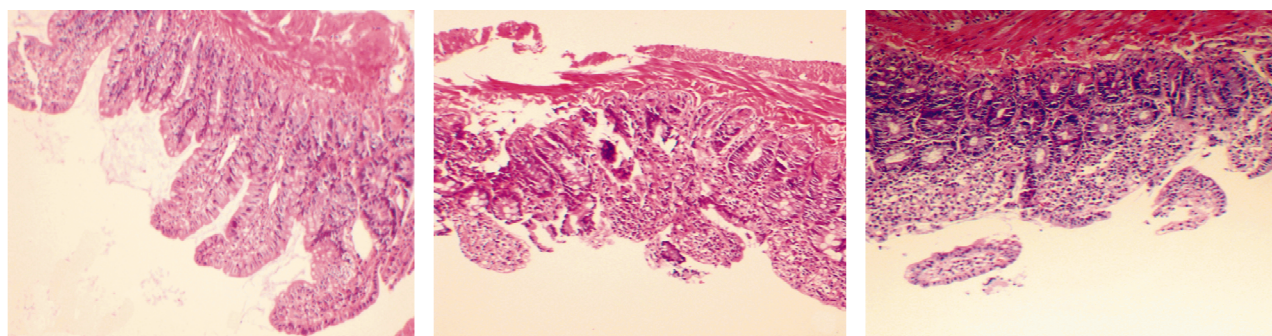
4 电子显微镜观测小肠粘膜损伤程度

SC 组: 上皮细胞柱状排列紧密, 核椭圆形, 排列整齐; 微绒毛丰富、细长, 排列整齐; 线粒体丰富, 无肿胀; 可见大量的糖原和内质网 (图 3A、B)。I/R 组: 微绒毛肿胀, 短而粗, 部分甚至全部脱落; 线粒体重度肿胀, 嵴断裂, 内质网显著扩张; 细胞排列不整, 连接减少, 细胞间隙增宽, 核固缩, 核膜不整, 可见凋亡细胞 (图 3C、D)。VNS 组: 微绒毛短而粗, 轻度水肿, 少部分脱落; 线粒体轻度肿胀, 嵴清, 内质网扩张不明显, 细胞间可见连接 (图 3E、F)。

5 血浆 MDA、TNF α 水平

I/R 组血浆 MDA、TNF α 含量明显高于 SC 组 ($P < 0.01$), 而 VNS 组能降低两者含量, 与 I/R 组相比具有显著差异 ($P < 0.05$, 或 $P < 0.01$); VNS 组血浆 MDA 仍高于 SC 组 ($P < 0.05$), 而 VNS 组血浆 TNF α 与 SC 组无显著差异 ($P > 0.05$), 提示 VNS 可能显著抑制 TNF α 生成并一定程度上减少 MDA 的生成。见表 2。

果也同样表明, I/R 组的病变程度最重, 显著高于其它两组 ($P < 0.01$)。而 VNS 组可减轻病理形态学变化并显著降低 Chiu's 评分值, 但仍高于 SC 组, 提示迷走神经电刺激预处理能在一定程度上减轻 I/R 后肠组织病理形态学变化、明显改善肠粘膜细胞超微结构。同时本实验也表明, 与 I/R 组相比, VNS 能明



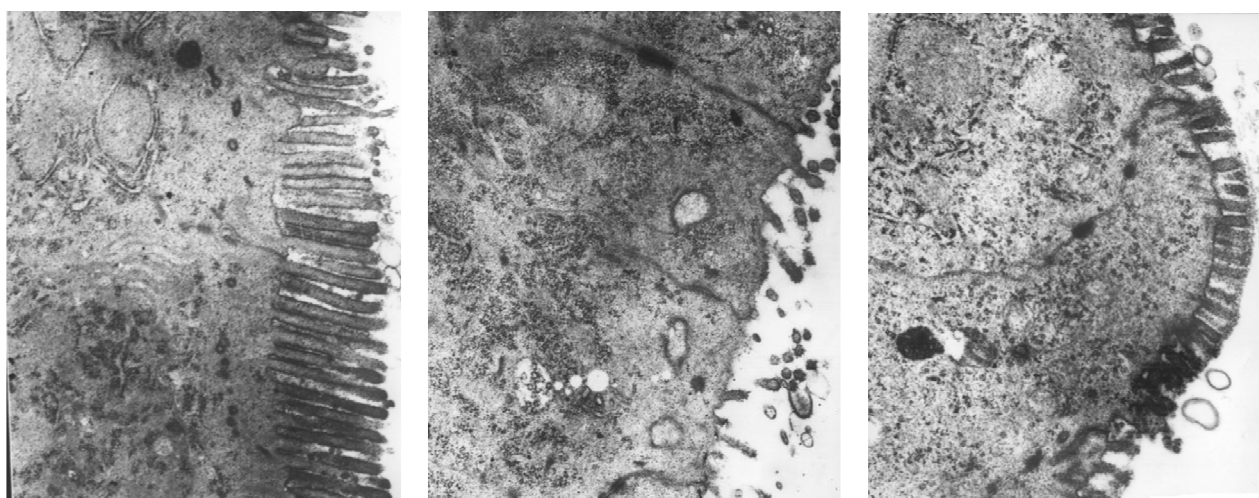
A: SC group

B: I/R group

C: VNS group

Fig 2 Pathological changes of small intestine tissue in three groups (×100).

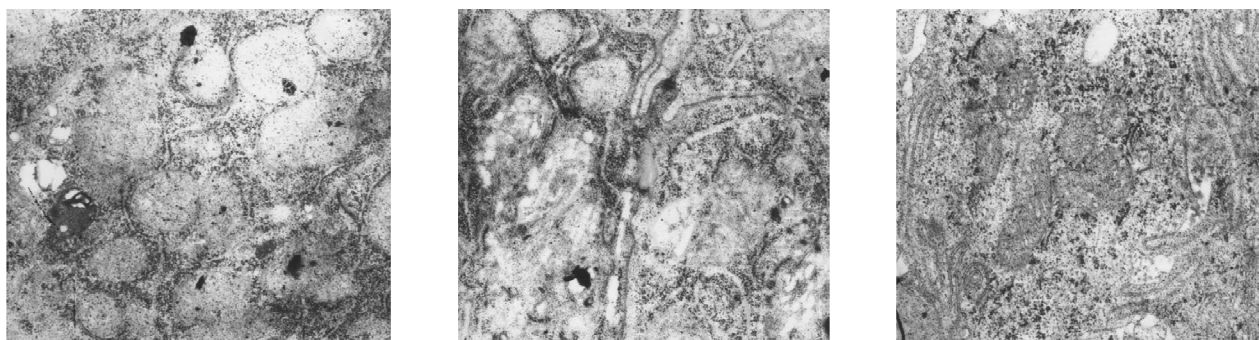
图2 光镜下3组小肠组织病理检查结果



A: SC group (×15 000)

C: I/R group (×15 000)

E: VNS group (×15 000)



B: SC group (×20 000)

D: I/R group (×20 000)

F: VNS group (×20 000)

Fig 3 Ultrastructure of small intestinal epithelial cells under electron microscope.

图3 电镜下小肠上皮细胞的超微结构

显著改善再灌注期 MAP 下降趋势,防止低血压发生。目前对 VNS 这种保护作用的机制还不是太清楚,可能与迷走神经兴奋后释放的 ACh 作用有关^[2,4-6]

小肠粘膜对缺血非常敏感,在遭受 30 min 缺血后,即可出现上皮细胞脱落现象^[7]。MDA 是脂质过氧化反应的最终代谢产物,其含量不仅可以反映缺血-再灌注损伤时氧自由基的生成,同时也与氧自由基对细胞膜损伤的严重程度呈正相关^[7]。本研究发现 I/R 组 MDA 血浆浓度显著高于其它两组,亦再

次证实了 I/R 后氧化应激的存在。迷走神经电刺激预处理能明显降低 I/R 后血浆 MDA 含量,但仍高于 SC 组,这提示迷走神经电刺激能一定程度上减少 MDA 的生成,具有抗氧化应激损伤作用,这与石德光等^[8]报道的电刺激迷走神经减少内毒素血症动物肺 MDA 生成的研究结果有相似之处。

TNF α 具有多种生物学效应,是启动和加速各种炎性连锁反应的关键因子^[9]。在 I/R 损伤中,TNF α 通过刺激使自身和其它致炎性介质合成增加,使免

表2 各组小肠粘膜的改良 Chiu's 评分、血浆 MDA 和 TNF α 含量的比较

Tab 2 Comparison of improved Chiu's scale of intestinal mucosa and levels of MDA, TNF α in plasma in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

| Item | SC group | I/R group | VNS group |
|----------------------------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| Improved Chiu's scale | 1.40 \pm 0.70 | 7.00 \pm 1.20** | 5.30 \pm 0.90**# |
| MDA ($\mu\text{mol/L}$) | 4.35 \pm 1.64 | 10.77 \pm 3.60** | 7.86 \pm 2.61** |
| TNF α ($\mu\text{g/L}$) | 1.07 \pm 0.21 | 1.56 \pm 0.48** | 1.01 \pm 0.29** |

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs SC group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs I/R group.

疫反应被放大;另外, TNF α 作为致炎细胞因子可致白细胞的趋化、聚积并释放化学物质引起组织损伤^[7]。本研究发现 I/R 组血浆 TNF α 非常显著高于 SC 组 ($P < 0.01$), 提示 TNF α 可能通过以上机制参与 I/R 的全身损伤作用。迷走神经电刺激预处理能非常显著减低 I/R 后血浆 TNF α ($P < 0.01$), 这与文献报道迷走神经电刺激能降低内毒素血症、严重低血量失血性休克、主动脉钳夹缺血再灌注大鼠血浆 TNF α 的研究结果相似^[4-6,8];但不同的是, 在这些文献报道的动物模型中迷走神经电刺激虽能降低血浆 TNF α 但仍高于假手术对照组, 而本研究结果表明 VNS 组与 SC 组的血浆 TNF α 无显著差异 ($P > 0.05$), 出现这种不同结果的原因之一, 可能是本研究观察的动物模型和检测时点不同, 且以往研究的动物模型损伤程度似乎更为严重。另外, 必须强调的是组织与血浆中的 TNF α 浓度变化并不完全一致, 血中 TNF α 浓度不能完全反映不同组织 TNF α 的含量, 而组织中的水平似乎更具有临床和生物学意义^[10]。

综上所述, 大鼠肠缺血 1 h 后再灌注 2 h 导致肠粘膜结构明显损伤, 电刺激迷走神经能显著减轻 I/R 肠粘膜结构的病理改变并使再灌注期的循环血压得到一定改善, 其保护效应可能与减少脂质过氧化、下

调 TNF α 生成有关, 其确切机制有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes [J]. World J Surg, 1996, 20(4): 411-417.

[2] Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, et al. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation [J]. Mol Med, 2003, 9(5-8): 125-134.

[3] Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal [J]. Arch Surg, 1970, 101(4): 478-483.

[4] Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin [J]. Nature, 2000, 405(6785): 458-462.

[5] Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, et al. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion [J]. J Vasc Surg, 2002, 36(6): 1231-1236.

[6] Guarini S, Altavilla D, Cainazzo MM, et al. Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor-kappaB activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock [J]. Circulation, 2003, 107(8): 1189-1194.

[7] 杨凤蕊, 林秀珍. 肠缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2002, 8(4): 319-321.

[8] 石德光, 胡森, 姜小国, 等. 迷走神经兴奋对内毒素致大鼠心脏炎症反应的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(1): 26-28.

[9] 陈宁, 叶静, 汤特, 等. 共有序列寡核苷酸竞争结合 NF- κ B 以减少 TNF 产生的实验研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(5): 619-621.

[10] 吕艺, 盛志勇, 侯晓霞, 等. 肠缺血-再灌注大鼠不同组织 TNF α 和 IL-6 mRNA 表达的规律及意义 [J]. 解放军医学杂志, 1999, 24(2): 94-96.