

• 论著 •

两种液体复苏对失血性休克大鼠细菌移位及肠道炎症反应的影响

高新跃 周强 吴长毅 庞庆丰 曹君利 曾因明

【摘要】 目的 探讨复方氯化钠溶液(林格液,RS)和质量分数为6%的中分子羟乙基淀粉溶液(HES)对失血性休克大鼠细菌移位及肠道炎症反应的影响。**方法** 50只健康雄性SD大鼠按随机数字表法分为假手术组(SHA组, $n=10$)、RS组($n=20$)、HES组($n=20$)。RS组和HES组制备可控性失血性休克模型。分别于液体复苏后1h和24h处死大鼠,检测和比较各组大鼠细菌移位、肠组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及髓过氧化物酶(MPO)活性的变化,并进行病理学检查。**结果** HES组和RS组在死亡率、放血量、病理学检查方面没有明显差别。与SHA组比较,HES组和RS组在菌落计数和TNF- α 方面明显升高,其中HES 1h组比RS 1h组明显升高,HES 24h组比RS 24h组明显下降。与SHA组比较,HES 1h组和RS 1h组的MPO活性明显升高,HES 24h组和RS 24h组MPO活性没有明显差别。**结论** RS能明显改善复苏后1h的肠道功能,HES能明显改善复苏后24h的肠道功能。

【关键词】 休克,失血性; 液体复苏; 细菌移位; 炎症反应; 肠黏膜屏障

Comparison of effects of two kinds of fluid for resuscitation on bacterial translocation and inflammation of small intestine in rats with hemorrhagic shock GAO Xin-yue, ZHOU Qiang, WU Chang-yi, PANG Qing-feng, CAO Jun-li, ZENG Yin-ming. The Key Lab of Anesthesiology of Jiangsu Province, The Anesthesiology Institute of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, Jiangsu, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of Ringer's solution (RS) or 6% hydroxyethyl saline (HES) on bacterial translocation and inflammation of the small intestine in rats with hemorrhagic shock. **Methods** Fifty healthy male SD rats were randomly divided into the sham group (SHA group, $n=10$), the Ringer's solution group (RS group, $n=20$) and 6% hydroxyethyl saline group (HES group, $n=20$). Controlled hemorrhagic shock model was reproduced in RS and HES groups. Bacterial translocation to the liver, the content of tumor necrosis factor - α (TNF - α) in intestinal tissue, and the myeloperoxidase (MPO) activity in the intestinal tissue were determined and compared among the groups, and the pathologic changes in the small intestine were observed. **Results** The mortality rate, bleeding volume and Chiu's scores were same in HES and RS groups (all $P>0.05$). Compared to SHA group, bacterial count and TNF - α level were increased significantly in HES and RS groups, and they were higher at 1 hour and lower at 24 hours in HES group than those in RS group. Compared to the SHA group, MPO activity increased at 1 hour in RS and HES groups, but no significant difference between the groups was found at 24 hours. **Conclusion** RS prevents compromise of the intestinal barrier function better than the HES at 1 hour after fluid resuscitation. However, HES seems to be better in protecting the intestinal barrier function compared with RS at 24 hours after fluid resuscitation.

【Key words】 hemorrhagic shock; fluid resuscitation; bacterial translocation; inflammation; intestinal mucosa barrier

失血性休克是临床上常见的急危重症,其并发症和病死率很高^[1]。以往的研究多注意失血性休克后发生心、肺、脑和肾等重要脏器功能的变化,而忽略了肠道功能的改变^[2]。实际上在休克早期,肠道功能首先受到损害^[3];出现细菌移位和各种炎症介质释放等功能改变,对全身炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能障碍综合征(MODS)的发生起到关键和

核心作用^[4]。因此,研究肠道功能的改变,对于减少失血性休克患者并发症和提高存活率有重要意义。

治疗失血性休克的主要措施是及时止血和有效的液体复苏^[5,6]。动物实验表明,止血后再加晶体液充分复苏能明显减少出血量和输液量,提高存活率^[7]。但目前临床上常用的复苏液体均不能有效改善失血性休克引起的炎症反应^[8]。有关晶体液和胶体液使用优点的比较,临床上一一直都在研究^[9,10],但同时比较液体复苏对细菌移位及肠道炎症反应随时间变化的研究相对不多。本实验拟选用临床上常用的两种液体,观察和比较其对失血性休克大鼠细菌

基金项目:江苏省教育厅课题基金资助项目(KJS04002)

作者单位:221002 徐州医学院江苏省麻醉学重点实验室,江苏省麻醉学研究所

作者简介:高新跃(1975-),男(汉族),江苏宿迁人,硕士研究生,医师(Email:gaodays@163.com)。

移位及肠道炎症反应的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料:复方氯化钠溶液(林格液,RS)由江苏省徐州远恒药业有限公司生产,批号 050307;质量分数为 6% 的中分子羟乙基淀粉(HES)由北京费森尤斯卡比医药有限公司生产,批号 040910;肿瘤坏死因子- α (TNF- α)免疫组化试剂盒由湖北省武汉博士德生物试剂有限公司生产;髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)试剂盒由江苏省南京建成生物工程研究所生产。实验动物为健康、清洁级标准雄性 SD 大鼠 50 只,体重 280~320 g,由江苏省徐州医学院实验动物中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组:将 50 只大鼠按随机数字表法分为假手术组(SHA 组,只进行股动脉穿刺和结扎,而未放血复制失血性休克模型)、RS 组和 HES 组;按复苏后时间又分为 RS 1 h 组、RS 24 h 组、HES 1 h 组、HES 24 h 组,共 5 组,每组 10 只。所有动物均在实验前适应性饲养 7 d,实验前禁食(12 h 以上)但不禁水,实验后自由饮食,单独饲养。饲养环境和实验室温度保持在 22~25 °C。

1.2.2 失血性休克模型制备:应用体积分数为 10% 的水合氯醛(300~350 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,仰卧固定,剪去腹股沟及大腿内侧被毛,安尔碘消毒,无菌条件下分离股动脉,用 22 G 套管针行股动脉穿刺,成功后经三通阀门与血压换能器连接(所有管道内预充 7.5 kU/L 的肝素溶液),并连接 Patient 401(Biomedical Systems Inc.)多功能监护仪,连续记录股动脉血压和心率。待血压稳定后,在 5 min 内间断放血(血液保存在预先加入 2 ml 肝素的无菌注射器中),使大鼠平均动脉压(MAP)降至 40 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)以下开始计时,然后通过间断放血或回输血液维持 MAP 在 35~40 mm Hg,休克时间为 60 min,再进行液体复苏,复苏时间为 30 min,最后在无菌操作下拔除套管针,结扎股动脉和缝合切口。整个实验过程中保持大鼠自主呼吸,同时监测肛温,采用灯光照明的方法保持大鼠体温稳定在 37.0~37.5 °C。

1.2.3 液体复苏方案:在休克期结束后,用回抽的血液及 2 倍于放血量的液体进行复苏,所有液体经三通阀门从股动脉缓慢逆行输入,30 min 内输完。以血压恢复到放血前的 90% 或以上为复苏成功。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 组织标本收集:将存活动物于复苏后 1 h 和

24 h 用过量水合氯醛麻醉,无菌打开腹腔取肝脏,用无菌铝箔纸包裹。同时距回肠末端取下 4~5 cm 的一段小肠,其中 1 cm 用体积分数为 10% 的甲醛溶液浸泡,其余立即保存在 -80 °C 冰箱内。

1.3.2 死亡率、放血量及 MAP:本实验中单独比较大鼠在液体复苏后 1 h 和 24 h 的死亡率,并比较动物放血量及复苏期 MAP 变化。

1.3.3 细菌移位:0.1 g 肝组织在 1 ml 磷酸盐缓冲液(PBS)中匀浆,5 000×g 离心 5 min。取 0.1 ml 组织匀浆上清接种于血培养皿上,37 °C 恒温箱内培养 48 h,计算菌落数并鉴定,但不做厌氧菌培养。

1.3.4 肠组织 TNF- α :用免疫组化方法测量肠组织 TNF- α ,以高倍光镜(400 倍)下 10 个视野内的阳性表达作为统计数字。

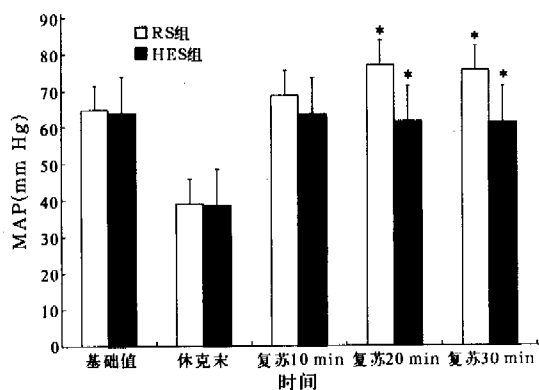
1.3.5 肠组织 MPO 活性:采用比色法,具体操作按说明书进行。

1.3.6 组织学检查:光镜(100 倍)下观察肠黏膜形态,采用 Chiu 氏 6 级评分法评价其损伤程度:0 分为正常;1 分为绒毛顶端上皮间质增大;2 分为上皮层和固有层中度分离;3 分为绒毛两侧大量分离,部分绒毛顶端破损;4 分为绒毛破损,固有层毛细血管大量暴露;5 分为固有层破坏、出血和溃疡。

1.4 统计学处理:数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内比较采用 *t* 检验,组间比较采用 *F* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 放血量和 MAP:在模型制备过程中,RS 组放血量(4.2 ± 1.1)ml 与 HES 组放血量(4.1 ± 0.9)ml 间差异无显著性,RS 组复苏 20 min 和 30 min 时 MAP 比 HES 组高,差异有显著性(图 1)。SHA 组动物没有监测血压变化。



注:与复苏后同时间 RS 组比较,* $P < 0.05$

图 1 HES 和 RS 复苏对 MAP 的影响

Figure 1 Changes of MAP during RS and HES fluid resuscitation

2.2 死亡率:1 h 时 RS 组和 HES 组动物全部存活,24 h 两组死亡率分别为 30%(3/10 只)和 40%(4/10 只),两组间差异无显著性。

2.3 细菌移位:SHA 组无细菌移位发生;HES 24 h 组有 2 只未培养出细菌,阳性率为 66.7%(4/6 只);其余各实验组细菌阳性率均为 100.0%。HES 1 h 组菌落计数较 RS 组明显增多,但随时间延长,HES 24 h 组菌落计数下降,而 RS 组则明显升高,两者比较差异有显著性(表 1)。常见菌依次为大肠杆菌、阴沟肠杆菌、沃式葡萄球菌和类白喉棒状杆菌等,两组发生率无明显区别,与文献报道一致^[10]。

2.4 组织学检查(表 1,彩色插页图 2):与 SHA 组比较,HES 1 h 组和 RS 1 h 组损伤指数较高,光镜下可见肠黏膜水肿和绒毛断裂,但 HES 组和 RS 组间比较差异无显著性。24 h HES 组和 RS 组损伤恢复,光镜下与 SHA 组比较无明显差别。

表 1 各组小肠黏膜损伤指数和菌落计数的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of small intestinal mucosa damage index and the number of bacterial colony among the groups($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	损伤指数	细菌菌落	
			计数(CFU/g)	阳性率(%)
RS 1 h 组	10	2.7 $\pm$ 0.4 Δ	166.6 $\pm$ 69.0 Δ *	100.0 Δ *
RS 24 h 组	7	0	583.3 $\pm$ 397.9 Δ *	100.0 Δ
HES 1 h 组	10	2.5 $\pm$ 1.1 Δ	2 716.6 $\pm$ 543.5 Δ	100.0 Δ
HES 24 h 组	6	0	125.0 $\pm$ 43.3 Δ	66.7 Δ Δ
SHA 组	10	0	0	0

注:与 SHA 组比较; $\Delta P < 0.05$;与 HES 组同时时间点比较;

* $P < 0.05$;HES 24 h 组与其他各组比较; $\Delta P < 0.05$

2.5 肠组织 TNF- α 水平(表 2,彩色插页图 3):SHA 组肠组织中没有检测到 TNF- α ,其余各组均检测到 TNF- α 。HES 1 h 组较 RS 1 h 组 TNF- α 明显增多;两组随时间延长,均出现下降趋势,且 HES 24 h 组 TNF- α 水平明显低于 RS 24 h 组。各组间差异有显著性。

表 2 各组肠组织 TNF- α 和 MPO 水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of content of TNF- α and activity of MPO in small intestine among the groups($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	TNF- α 水平(个)	MPO 活性(U/g)
RS 1 h 组	10	100.5 $\pm$ 64.7 Δ *	0.9 $\pm$ 0.4 Δ *
RS 24 h 组	7	73.0 $\pm$ 16.7 Δ *	0.7 $\pm$ 0.2
HES 1 h 组	10	211.0 $\pm$ 85.5 Δ	1.2 $\pm$ 0.6 Δ
HES 24 h 组	6	41.5 $\pm$ 15.4 Δ	0.7 $\pm$ 0.1
SHA 组	10	0	0.6 $\pm$ 0.1

注:与 SHA 组比较; $\Delta P < 0.05$;与 HES 组同时时间点比较;

* $P < 0.05$

2.6 肠组织 MPO 活性(表 2):与 SHA 组比较,HES 组较 RS 组 MPO 活性明显增强,HES 1 h 组较

RS 1 h 组 MPO 活性明显增强,差异有显著性;与 SHA 组比较,HES 24 h 组和 RS 24 h 组的 MPO 活性变化差异无显著性。

3 讨论

3.1 失血性休克期肠道功能的变化:在失血性休克早期,由于腹腔内血液灌注减少和血流再分布的原因,使肠道内的血液灌注量明显减少,肠黏膜缺血、缺氧,发生黏膜水肿和绒毛断裂等病理变化,引起肠黏膜屏障功能不全。肠黏膜水肿,被认为与肠道功能减退后营养物质的吸收减少有关,并且与细菌移位和 MODS 的发生有关^[9]。发生细菌移位常见的肠道外组织器官有肠系膜淋巴结、肝、脾、肾、腹腔和血液等^[11]。引起肠黏膜屏障功能受损的因素越重,则它导致细菌移位的发生越重,移位的细菌或内毒素越多^[12],对 SIRS 的发生起到关键作用^[3]。

实验证明,肠道在失血性休克期可释放各种炎症介质,如 TNF- α ^[11,13]。TNF- α 主要由中性粒细胞、巨噬细胞和肠黏膜上皮细胞分泌,其中中性粒细胞在激发炎症因子的释放及随之导致的 MODS 病理变化中有重要作用^[4]。TNF- α 既是机体在炎症刺激(主要是内毒素)下产生免疫防御的产物,又是免疫反应发生与加重多器官功能损害的始动和加剧因素,能加重器官损害和功能不全,是诱导 SIRS 和 MODS 发生的中心介质和早期介质,对 MODS 的发生、发展起核心作用^[4,14]。失血性休克发生后,机体出现一系列应激反应,其中活化的中性粒细胞发挥重要的免疫防御作用,但过多的中性粒细胞可以对组织器官造成损害,不利于休克的治疗。MPO 主要存在于中性粒细胞中,而在单核细胞和巨噬细胞中分布较少。MPO 活性大小与中性粒细胞的数量相关,可以反映组织内中性粒细胞的数量^[15]。

失血性休克后液体复苏等治疗使机体组织灌注压恢复正常,肠黏膜毛细血管恢复血液灌注,这种休克期缺血和复苏后再灌注过程(即缺血/再灌注)使肠黏膜屏障功能进一步恶化^[16],被认为是释放炎症介质的重要机制^[17],可进一步损害肠屏障功能。

3.2 液体复苏对肠道功能的影响及可能机制:理想的液体复苏不仅能缩短休克发生时间,还应能减少各种不良炎症反应的发生,对预防脓毒症和 MODS 的发生极为重要^[18]。最近人们将这种液体复苏引起的炎症反应作为评价失血性休克治疗的一个潜在指标^[18]。这也是人们研究液体复苏的意义所在。

本实验中选用的 RS 属于等渗晶体液一种,它的分子质量小,很容易通过外周静脉进入心血管系

统,并且对血管内外的渗透压变化没有影响^[19]。本实验中,与 HES 比较,RS 复苏 20 min 能维持相对较高的 MAP 水平,说明 RS 在增加组织灌注方面要优于 HES,这有利于增加重要脏器的血液灌注量,但这种增加作用能维持多久,本实验中未能证明。

HES 属于大分子质量胶体液,与晶体液相比,它在血管内存留时间相对较长,且小剂量 HES 可有效维持循环容量^[19]。一般认为,HES 能产生较高的胶体渗透压,可吸引血管外液体进入血管内,临床研究已证明,胶体液在减轻组织水肿和术后患者恢复方面优于晶体液^[9]。但 Gan 等^[20]认为,人工胶体液可降低微血管渗透压和毛细血管渗透性,不利于维持微循环血量稳定,因此并不能促进微循环血流增加。我们的实验也观察到这种现象,依据是在液体复苏后 1 h,RS 组和 HES 组肠黏膜损伤指数无明显区别,说明两者在增加肠组织微循环血量、减轻肠黏膜水肿方面无明显差别。虽然复苏后 24 h 两组肠黏膜损伤指数均恢复正常,但本实验证明,HES 在改善肠黏膜水肿方面要早于 RS,这可从它在休克后 24 h 改善肠道功能较好来推测。

与 HES 组相比,RS 1 h 组细菌移位、MPO 和 TNF- α 均明显减少,这可能与 RS 能维持 MAP 稳定、增加组织灌注方面优于 HES,从而较好维持肠道功能稳定有关。HES 24 h 组细菌移位和 TNF- α 较 RS 组明显降低,MPO 恢复至 SHA 组水平,这可能与它较早改善肠道功能有关,意味着 HES 可较早地减轻肠组织水肿,从而减轻肠道功能受损导致的细菌移位和炎症反应的发生。

实验证明,复苏时选择的液体种类不是休克时发生细菌移位的主要因素,细菌移位主要与复苏的效果有关^[21],本实验也证明了这种现象。虽然 RS 组和 HES 组的死亡率没有明显区别,但对肠道细菌移位和炎症反应的影响在不同时间是不一样的,因此它们对肠道功能的影响在不同时间也不同。

4 结 论

在本实验条件下得出以下结论:①RS 和 HES 在治疗失血性休克的过程中,均能发生细菌移位和炎症介质的释放,但在不同的时间释放量不同。②液体复苏后 1 h,RS 在改善肠道功能方面要优于 HES,而在液体复苏后 24 h,HES 在改善肠道功能方面要优于 RS。

参考文献:

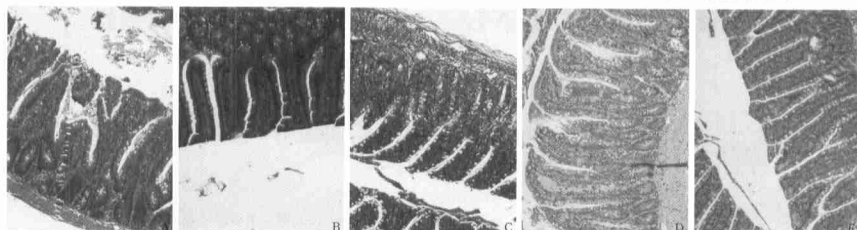
- Wheeler A, Bernard G. Treating patients with severe sepsis [J]. N Engl J Med, 1999, 340: 207 - 214.
- Kirton O C, Windsor J, Wedderburn R, et al. Failure of splanchnic resuscitation in acutely injured trauma patient correlates with multiple organ system failure and length of stay in the ICU [J]. Chest, 1998, 113: 1064 - 1069.
- 常建星, 陈双, 符玉茹, 等. 大鼠失血性休克复苏早期肠黏膜损伤与修复的形态学观察 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 477 - 480.
- Alok S H, Naoyuki H, Yu C H, et al. Osmotic regulation of cell function and possible clinical applications [J]. Shock, 2004, 21: 391 - 400.
- Carrico C J, Holcomb J B, Chaudry I H. Scientific priorities and strategic planning for resuscitation research and life saving therapy following traumatic injury: report of the pulse trauma work group [J]. Shock, 2002, 17: 165 - 168.
- 朱志宏, 沈洪. 失血性休克与早期液体复苏 [J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 319 - 封三.
- 王钦存, 肖南, 刁有芳, 等. 未控制出血性休克早期液体复苏的实验研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 746 - 749.
- Krausz M M, Bashenko Y, Hirsh M. Crystalloid and colloid resuscitation of uncontrolled hemorrhagic shock following massive splenic injury [J]. Shock, 2001, 16: 383 - 388.
- Michael P W, Michael G, Mythen K, et al. Perioperative fluid management and clinical outcomes in adults [J]. Anesth Analg, 2005, 100: 1093 - 1096.
- Koylucog L, Bakici S, Elagöz M, et al. The effects of pentoxifylline treatment on bacterial translocation after hemorrhagic shock in rats [J]. Clin Exp Med, 2001, 1: 61 - 66.
- Tohru T, Mitsuhiro F, Kazuyoshi H, et al. Bacterial translocation and tumor necrosis factor - α gene expression in experimental hemorrhagic shock [J]. Crit Care Med, 2000, 28: 3705 - 3709.
- Misha D, Luyer P, Jan A, et al. Enteral administration of high - fat nutrition before and directly after hemorrhagic shock reduces endotoxemia and bacterial translocation [J]. Ann Surg, 2004, 239: 257 - 264.
- Sobhian B, Jafarmadar M, Redl H, et al. Hemorrhage - and resuscitation - related alterations in gastrointestinal circulation: effects of a low dose of L - Nmma [J]. Shock, 2005, 23: 243 - 247.
- Savoye G, Tamion D, Richard V, et al. Hemorrhagic shock resuscitation affects early and selective mesenteric artery endothelial function through a free radical - dependent mechanism [J]. Shock, 2005, 23: 411 - 416.
- Masahiko S, Shinichi U, Kenji K, et al. A potential role of hyperbaric oxygen exposure through intestinal nuclear factor - κ B [J]. Crit Care Med, 2004, 32: 1722 - 1729.
- Attuwaybi B, Kozar R A, Gates K S, et al. Hypertonic saline prevents inflammation, injury, and impaired intestinal transit after Gut ischemia/reperfusion by inducing heme oxygenase - 1 enzyme [J]. J Trauma Injury Infect Crit Care, 2004, 56: 749 - 759.
- Tamion F, Richard V, Lacoume Y, et al. Intestinal preconditioning prevents systemic inflammatory response in hemorrhagic shock: role of HO - 1 [J]. Am J Physiol, 2002, 283: 408 - 414.
- Bilkovskia R N, Rivers E P, Horst H M. Targeted resuscitation strategies after injury [J]. Current Opinion Crit Care, 2004, 10: 529 - 538.
- Kelley D M. Hypovolemic shock [J]. Crit Care Nurs Q, 2005, 28: 2 - 19.
- Gan T J, Soppitt A, Maroof M, et al. Goal - directed intraoperative fluid administration reduces length of hospital stay after major surgery [J]. Anesthesiology, 2002, 97: 820 - 826.
- Hollenberg S M, Ahrens T S, Annane D, et al. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update [J]. Crit Care Med, 2004, 32: 1928 - 1948.

(收稿日期: 2005 - 10 - 22 修回日期: 2006 - 02 - 11)

(本文编辑: 李银平)

两种液体复苏对失血性休克大鼠细菌移位及肠道炎症反应的影响

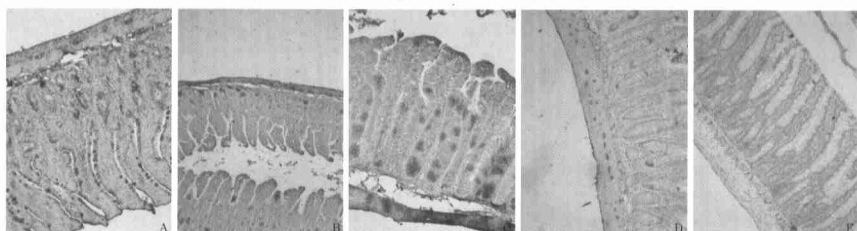
(正文见146页)



A: HES1 h组; B: HES24 h组; C: RSI h组; D: RS24 h组; E: 假手术组

图2 各组肠组织病理学变化(HE, ×100)

Figure 2 Pathological changes of intestine in each group (HE, ×100)



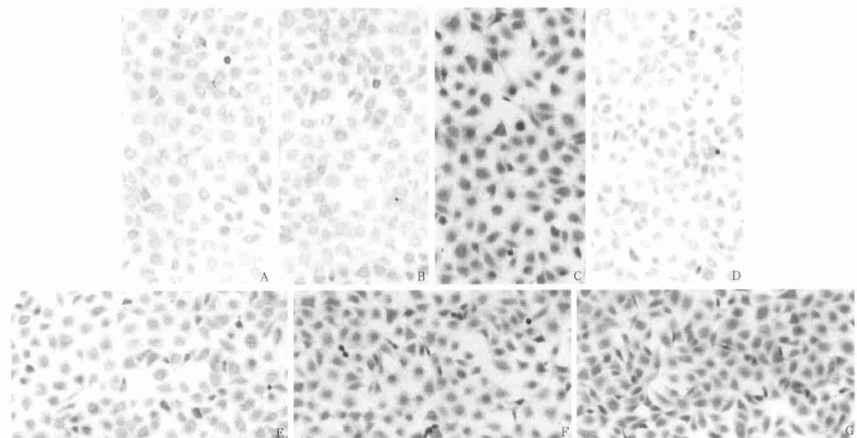
A: HES1 h组; B: HES24 h组; C: RSI h组; D: RS24 h组; E: 假手术组

图3 各组肠组织TNF-α含量变化(免疫组化, ×100)

Figure 3 Expression of TNF-α in intestine in each group (immunohistochemistry, ×100)

八肽缩胆囊素调节脂多糖诱导ECV-304细胞核转录因子-κB表达的受体机制研究

(正文见150页)



A: 溶剂对照组; B: CCK-8组; C: LPS组; D: CCK-8+LPS组; E: CR-1409+CCK-8+LPS组; F: CR-2945+CCK-8+LPS组; G: Pro+CCK-8+LPS组

图2 CCK受体拮抗剂对LPS诱导ECV-304细胞NF-κB p65蛋白表达的影响(DAB, ×100)

Figure 2 Effect of CCK receptor antagonist on LPS-induced NF-κB p65 protein expression in ECV-304 cells (DAB, ×100)

146-151