维普资讯 http://www.cqvip.com

· 论著 ·

肠缺血/再灌注时卡巴胆碱对肠上皮细胞凋亡的影响

胡森 邹晓防 吕艺 陆江阳 盛志勇

【摘要】 **目的** 研究肠缺血/再灌注(I/R)时卡巴胆碱对肠上皮细胞凋亡的影响及可能机制。**方法** 雄性 Wistar 大鼠，戊巴比妥钠腹腔麻醉，结扎肠管造成长约 8 cm 肠袋，采用夹闭肠系膜上动脉(SMA)阻断血流 45 min 后恢复血流的方法，制备肠 I/R 损伤模型。将动物按随机数字表法分为假手术组($n=40$)、I/R 模型组($n=40$)和卡巴胆碱组($n=40$)。卡巴胆碱组在阻断血流的同时向肠袋内注射卡巴胆碱(0.1 mg/kg)，I/R 模型组给予等量生理盐水。分别在再灌注 0、30、60、120 和 240 min 时，采用病理学方法按 Chiu's 评分观察肠上皮细胞损伤；原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测肠上皮细胞凋亡指数的变化；免疫组化法检测肠上皮细胞凋亡相关半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase-3)和 Bcl-2 蛋白表达的变化。**结果** 与 I/R 模型组比较，卡巴胆碱组肠上皮细胞病理学变化较轻，凋亡指数明显降低，caspase-3 阳性肠上皮细胞数明显减少，而 Bcl-2阳性肠上皮细胞数明显增加(P 均<0.01)。**结论** 卡巴胆碱能抑制 I/R 时肠上皮细胞 caspase-3 表达，增加 Bcl-2 表达，减少肠上皮细胞的凋亡。

【关键词】 缺血/再灌注损伤，肠； 卡巴胆碱； 肠上皮细胞； 凋亡

Effects of carbachol on apoptosis of intestinal epithelial cells after gut ischemia/reperfusion in rat *HU Sen, ZOU Xiao-fang, LÜ Yi, LU Jiang-yang, SHENG Zhi-yong. Burn Research Institute, First Affiliated Hospital of General Hospital of PLA, Beijing 100037, China*

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the effects of carbachol on apoptosis of intestinal epithelial cells in rats after gut ischemia/reperfusion (I/R). **Methods** A jejunal sac was formed in Wistar rats. The superior mesenteric artery (SMA) was occluded for 45 minutes followed by 240 minutes of reperfusion. Immediately after occlusion of SAM blood flow, either 0.1 mg/kg of carbachol or same amount of 0.9% normal saline was injected into the jejunal sac. Animals were randomized into three groups (each $n=40$): sham operation, I/R+normal saline injection (I/R model) and I/R+carbachol injection (0.1 mg/kg, Ca). The pathological changes in gut epithelial cells were assessed by Chiu's scores. The apoptosis index of intestinal epithelial cell was determined with terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) staining. Expressions of caspase-3 and Bcl-2 in intestinal epithelial cells were assayed by immunohistochemistry method. All measurements were done at 0, 30, 60, 120 and 240 minutes after reperfusion. **Results** The pathological injuries were less severe in Ca group than those in I/R model group. Apoptosis index of intestinal epithelial cell and expressions of caspase-3 were significantly decreased, while the expressions of Bcl-2 increased dramatically (all $P<0.01$) after I/R in Ca group compared with those in I/R model group, especially at 120 minutes after reperfusion. **Conclusion** Enteral administration of carbachol can inhibit apoptosis of intestinal epithelial cells in rats after gut I/R injury.

【**Key words**】 intestinal ischemia/reperfusion; carbachol; intestinal epithelial cell; apoptosis

肠缺血/再灌注(I/R)是烧(创)伤后常见的病理生理过程，也是引起脓毒症和多器官功能障碍综合征(MODS)的重要因素。近来研究表明，肠 I/R 损伤引起的细胞凋亡也是肠上皮细胞死亡的一种重要形式[1]。

胆碱能抗炎通路是近年来发现的治疗脓毒症和 MODS 潜在的新途径[2]。研究表明，拟胆碱药卡巴胆碱不仅能增加肠黏膜血流量，促进胃肠运动，而且还有强大的抗炎作用，可通过多种途径减轻肠 I/R 损伤[3]。但卡巴胆碱是否对肠上皮细胞凋亡具有影响尚无研究。本研究通过观察卡巴胆碱对肠I/R时肠上皮细胞凋亡指数、凋亡相关基因半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase-3)、Bcl-2 蛋白的表达变化，探讨卡巴胆碱对肠上皮细胞凋亡的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型制备与分组：雄性 Wistar 大鼠 120 只，由军事医学科学院实验动物中心提供，体重 230～250 g。实验前适应性饲养 1 周，术前12 h禁食，自由饮水。用质量分数为 3%的戊巴比妥钠 30 mg/kg腹腔注射麻醉后，仰卧位固定于手术台

基金项目：军队医药卫生"十一五"专项课题(06Z055)

作者单位：100037 北京，解放军总医院第一附属医院烧伤研究所

作者简介：胡森(1959-)，男(汉族)，山东省人，医学博士，教授，研究员，主要从事休克和多器官功能障碍综合征的研究(Email: hs82080@yahoo.com.cn)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

上，常规备皮、消毒、铺无菌洞巾。沿腹正中线作一长约 3～4 cm 切口，将肠管外置并覆盖温盐水纱布，外用烤灯加温，保持肠管的湿润和温度。在距十二指肠悬韧带后 10 cm 和 18 cm 处分别用两根 1－0 丝线结扎肠管，造成长约 8 cm 肠袋。用无损伤动脉夹夹闭肠系膜上动脉(SMA)起始部，阻断血流 45 min 后，松夹恢复肠系膜血流，制成肠 I/R 损伤模型。将动物按随机数字表法分为假手术组(n=40)、I/R 模型组(n=40)和卡巴胆碱组(n=40)。卡巴胆碱组在阻断 SMA 血流的同时向肠袋内注射 0.1 mg/kg 卡巴胆碱；模型组注射等量生理盐水；假手术组行上述操作，未夹闭 SMA。分别在再灌注 0、30、60、120 和 240 min(每个时间点 8 只)后处死动物，取肠袋组织，冲洗后用体积分数为 10%的甲醛溶液固定 48 h，脱水、常规石蜡包埋、切片。

1.2 肠组织病理学变化和肠上皮细胞损伤的测定：石蜡切片常规脱蜡至水后，行苏木素-伊红(HE)染色，用于光镜下观察肠组织病理学变化和肠上皮细胞损伤的测定。每份切片在光镜下随机选择10 个视野(×400)，由病理医生观察变化，根据 Chiu's[4]评分方法进行肠上皮细胞损伤测定。

1.3 肠上皮细胞凋亡检测：应用原位末端缺刻标记法(TUNEL)进行细胞凋亡检测，TUNEL 试剂盒为德国宝灵曼公司提供。在末端脱氧核苷酸转移酶介导下，使生物素标记的脱氧尿苷三磷酸(dUTP)掺合在凋亡细胞 DNA 片段的 3′-OH 末端，利用标记过氧化物酶的链酶抗生物素蛋白与生物素的特异结合，加入底物，用 3,3′-二氨基联苯胺(DAB)染色，显微镜下凋亡细胞核呈棕黄色。随机取 10 个视野，计数每一高倍镜视野下(×200)凋亡肠上皮细胞数目及总肠上皮细胞数目，计算凋亡指数。凋亡指数＝凋亡肠上皮细胞数目/总肠上皮细胞数目。取所有视野均值为每只动物的凋亡指数。

1.4 Caspase－3 和 Bcl－2 在肠上皮细胞中表达的检测：采用 Power Vision™两步法进行免疫组化检测，试剂盒购自北京天来生物医学科技公司，操作按说明书进行。石蜡切片常规脱蜡至水，经过氧化氢(H_2O_2)处理后，进行酶修复，然后用 1∶100 稀释的抗体，4 ℃孵育过夜，DAB 显色，苏木素复染，常规脱水，透明，封片，显微镜下观察。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。在相同放大倍数下观察，细胞染棕色者为阳性，每个时间点各随机取 10 个视野(×100)进行计数，计算阳性细胞数。取所有视野均值为每只动物的阳性细胞数。

1.5 统计学方法：采用 SPSS11.5 统计学软件处理数据。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，用 t 检验；计数资料采用 χ^2 检验；$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 光镜下病理学改变：假手术组肠上皮细胞呈柱状，刷状缘清晰，排列整齐，连接紧密。I/R 模型组从再灌注开始时肠上皮细胞略有肿胀，随再灌注时间延长，肠上皮细胞肿胀逐渐加重，并出现坏死，脱落；黏膜层炎性细胞浸润，固有层红细胞增多，以再灌注 120 min 时最明显。卡巴胆碱组损伤变化趋势同 I/R 模型组，但病变程度明显减轻，Chiu's 评分显著降低(P 均<0.01，表 1)。

2.2 TUNEL 染色结果(表 2，彩色插页图 1)：TUNEL 标记阳性染色为棕褐色，主要位于胞核。再灌注各时间点 I/R 模型组凋亡指数明显高于假手术组(P 均<0.01)；卡巴胆碱组凋亡指数明显低于 I/R 模型组，但比假手术组高(P 均<0.01)。

表 1 I/R 期间 Chiu's 评分变化($\bar{x}\pm s$, n=8)

Table 1 Change of Chiu's scores during gut I/R($\bar{x}\pm s$, n=8) 分

组别	再灌注 0 min	再灌注 30 min	再灌注 60 min	再灌注 120 min	再灌注 240 min
假手术组	0.40±0.12	0.43±0.13	0.41±0.12	0.49±0.10	0.31±0.17
I/R 模型组	2.64±2.34*	2.54±2.25*	2.40±2.10*	2.91±2.11*	2.90±2.13*
卡巴胆碱组	1.59±1.34*△	1.14±1.23*△	1.04±1.31*△	1.75±1.11*△	1.62±1.42*△

注：与假手术组比较：*P<0.01；与 I/R 模型组比较：△P<0.01

表 2 I/R 期间肠上皮细胞凋亡指数的变化($\bar{x}\pm s$, n=8)

Table 2 Change of apoptosis index of intestinal epithelial cells during gut I/R($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	再灌注 0 min	再灌注 30 min	再灌注 60 min	再灌注 120 min	再灌注 240 min
假手术组	4.13±1.23	4.24±1.31	3.93±1.41	4.41±1.34	4.32±1.52
I/R 模型组	26.54±6.89*	22.53±5.54*	20.71±4.97*	29.71±7.97*	25.52±7.52*
卡巴胆碱组	24.42±3.87*△	12.68±3.98*△	8.73±4.57*△	15.63±4.65*△	11.49±4.78*△

注：与假手术组比较：*P<0.01；与 I/R 模型组比较：△P<0.01

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 3 I/R 期间肠上皮细胞中 caspase - 3 和 Bcl - 2 阳性细胞数的变化($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 3 Change of number of caspase - 3 and Bcl - 2 postive cells of intestinal epithelial cells during gut I/R($\bar{x}\pm s$, $n=8$) 个

指标	组别	再灌注 0 min	再灌注 30 min	再灌注 60 min	再灌注 120 min	再灌注 240 min
caspase - 3	假手术组	4.13±1.23	4.24±1.31	3.93±1.41	4.41±1.34	4.32±1.52
	I/R 模型组	26.54±6.89*	22.53±5.54*	20.71±4.97*	29.71±7.97*	25.52±7.52*
	卡巴胆碱组	16.42±3.87*△	12.68±3.98*△	8.73±4.57*△	15.63±4.65*△	11.49±4.78*△
Bcl - 2	假手术组	18.51±7.73	19.92±8.01	18.74±7.39	20.15±6.85	18.27±7.29
	I/R 模型组	6.72±2.59*	8.24±3.13*	9.63±2.89*	5.96±1.93*	6.87±2.43*
	卡巴胆碱组	13.34±4.12*△	14.96±4.85*△	15.29±5.28*△	10.39±3.61*△	11.08±4.83*△

注：与假手术组比较：*$P<0.01$；与 I/R 模型组比较：△$P<0.01$

2.3 免疫组化结果（表 3）：caspase - 3 和 Bcl - 2 阳性染色为胞浆黄染。caspase - 3 的表达在 I/R 模型组远高于假手术组（P 均<0.01），卡巴胆碱组的表达明显低于 I/R 模型组（P 均<0.01，彩色插页图 2）。Bcl - 2 在 I/R 模型组的表达较假手术组低（P 均<0.01），卡巴胆碱组的表达远高于 I/R 模型组，但低于假手术组（P 均<0.01，彩色插页图 3）。

3 讨 论

肠 I/R 是烧（创）伤后常见的病理生理过程，也是诱发 MODS 的始动因素[5]。肠上皮细胞是肠黏膜屏障的重要组成部分，对缺血、缺氧十分敏感。研究表明，I/R 损伤时，肠上皮细胞有坏死和凋亡两种死亡形式，而且凋亡是细胞死亡的主要方式，占死亡细胞总数的 80%[6]。而肠上皮细胞的过度凋亡会引起肠黏膜通透性增加及细菌/内毒素移位，同时启动肠道炎症和免疫反应，这一过程在烧（创）伤后全身炎症反应和 MODS 过程中起重要作用。寻找抑制肠上皮细胞过度凋亡的方法对临床治疗全身炎症反应和 MODS 有重要的意义。

胆碱能抗炎通路是最近提出的一条新的神经-内分泌抗炎途径，是近年来发现的治疗脓毒症和 MODS 潜在的新途径，刺激迷走神经传出支可抑制大鼠内毒素血症时的全身炎症反应[2]。副交感神经主要递质乙酰胆碱在体外能有效地抑制脂多糖（LPS）刺激外周巨噬细胞释放致炎介质肿瘤坏死因子-α（TNF - α）[7]。卡巴胆碱是一种胆碱能激动剂，有研究表明，卡巴胆碱可降低肠 I/R 损伤动物血浆致炎因子的水平，减轻肠道局部和全身炎症反应，保护肝、肾和心功能[3,8,9]。本研究设想肠 I/R 时卡巴胆碱对肠上皮细胞的凋亡具有一定的影响。

目前，肠 I/R 损伤时细胞凋亡的具体发生机制尚未完全阐明。I/R 损伤引起肠上皮细胞凋亡的发生机制可能包括：①氧自由基直接损伤 DNA 或攻击蛋白质，使许多具有酶活性的蛋白质功能丧失而诱导细胞凋亡；②I/R 期间多种因素造成细胞内钙离子超载而导致细胞凋亡；③受损的小肠上皮细胞及内皮细胞释放细胞因子和炎症介质，加重炎症反应和细胞凋亡；④I/R 期间线粒体功能改变而诱导细胞凋亡的发生。进一步研究证实，细胞凋亡的发生主要受凋亡相关基因和酶的调控，这些基因和酶包括起诱导凋亡作用的，如 caspase 家族的酶类、p53 等，也有起抑制凋亡作用的，如 Bcl - 2 等，这些促凋亡因素和抑制凋亡因素间相互作用，决定了凋亡的启动和抑制。其中caspase - 3作为 caspase 家族成员，被认为是各种凋亡刺激因子激活的 caspase 家族中的关键酶，活化的 caspase - 3 可作用于一些其他 caspase 成员而产生“瀑布样”级联反应，引起细胞形态上的改变，使凋亡最终得以完成[10]；同时，caspase - 3 直接酶解Bcl - 2片段从而使其功能发生根本转变，使后者从抑制凋亡转为触发凋亡。本实验观察到大鼠 I/R 模型组肠 I/R 期间肠上皮细胞 caspase - 3 表达明显升高，而在卡巴胆碱组其表达显著降低，caspase - 3 阳性表达与 TUNEL 染色结果基本一致；且卡巴胆碱组肠上皮细胞病理损伤明显减轻，提示 I/R 时肠黏膜上皮细胞凋亡发生与促凋亡因素增强有关系。卡巴胆碱能通过抑制促凋亡基因 caspase - 3 蛋白表达，从而抑制 I/R 期间肠上皮细胞凋亡的发生，防治 I/R 期间肠黏膜的损伤。

本实验结果表明，Bcl - 2 的表达在 I/R 模型组降低，在卡巴胆碱组较 I/R 模型组显著增高，且卡巴胆碱组肠黏膜病理损伤明显减轻，提示 I/R 时肠黏膜上皮细胞凋亡发生与促凋亡因素增强和抑凋亡因素减弱均有关，卡巴胆碱可能通过抑制促凋亡基因 caspase - 3 基因表达、增加抑凋亡基因 Bcl - 2 表达，从而抑制 I/R 期间肠黏膜上皮细胞凋亡发生，减轻 I/R 期间肠黏膜上皮细胞损伤。此外，Bcl - 2 表达与 caspase - 3 表达的反向趋势变化现象，可能与一定量的 Bcl - 2 蛋白被 caspase - 3 酶解有关。

维普资讯 http://www.cqvip.com

本研究结果表明，肠 I/R 损伤期间，caspase－3 高水平表达和 Bcl－2 降低可能是肠黏膜上皮细胞发生异常凋亡的重要机制；而卡巴胆碱通过下调 caspase－3 和上调 Bcl－2 表达，从而抑制肠 I/R 时肠黏膜上皮细胞的异常凋亡，减轻肠 I/R 损伤，但具体调控机制尚有待进一步研究。

参考文献：

1 Shima Y, Tajiri T, Taguchi T, et al. Increased expression of c－fos and c－jun in the rat small intestinal epithelium after ischemia－reperfusion injury: a possible correlation with the proliferation or apoptosis of intestinal epithelial cells [J]. J Pediatr Surg, 2006, 41(4): 830－836.

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

3 胡森，姜小国，石德光，等. 卡巴胆碱对缺血/再灌注损伤时肠道局部炎症反应的影响[J]. 中国危重病急救医学，2003，15(12)：748－750.

4 Chiu C J, McArdle A H, Broun R, et al. Intestinal mucosal lesion in low－flow states 1: a morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal[J]. Arch Surg, 1970, 101(4): 478－483.

5 Deitch E A, Xu D, Kaise V L. Role of the gut in the development of injury－and shock induced SIRS and MODS: the gut－lymph hypothesis, a review[J]. Front Biosci, 2006, 11: 520－528.

6 Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, et al. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium[J]. Gut, 1998, 42(4): 530－537.

7 姜小国，石德光，胡森，等. 迷走神经及其递质乙酰胆碱的抗炎作用的研究进展[J]. 中国危重病急救医学，2003，15(1)：59－61.

8 姜小国，胡森，石德光，等. 肠内注射卡巴胆碱对缺血/再灌注大鼠血浆炎症介质的影响[J]. 中国危重病急救医学，2004，16(2)：90－92.

9 胡森，曹卫红，孙丹，等. 卡巴胆碱对部分缺血/再灌注损伤所致全身炎症反应和多器官功能障碍的影响[J]. 中国危重病急救医学，2005，17(1)：49－52.

10 Wang J X, Zheng S. Caspase－3 and survivin expression in pediatric neuroblastoma and their roles in apoptosis [J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(12): 1821－1824.

（收稿日期：2006－12－27 修回日期：2007－04－20）
（本文编辑：李银平）

· 经验交流 ·

静脉留置套管针穿刺留置失败原因分析

程美萍 周敏杰 王红 张娜 张琪

【关键词】 静脉留置套管针； 穿刺； 失败原因

我院急诊科自 1997 年引进静脉留置套管针穿刺技术以来，各种类型套管针先后运用于患者，既解决了患者反复穿刺的痛苦，又减轻了护士的工作量，特别是对急性中毒、休克、昏迷及各种心脑血管疾病患者，可同时建立两条液体通路，便于及时给药，提高抢救成功率，现总结如下。

1 临床资料

于 2003—2006 年抢救危重患者时，我院对 870 例患者采用密闭式静脉留置针（Y 型、22AG）穿刺术建立液体通路，其中男 410 例，女 460 例，年龄 6～82 岁，平均（48.5±10.5）岁；患者以急性中毒、休克、昏迷较多。结果：采用这种方法为抢救患者的生命争取了时间，抢救成功率达 85%，但是穿刺过程中尚有部分患者不能一次留置成功，原因如下。

2 失败原因分析

2.1 高龄慢性病患者：由于疾病代谢产物和药物的毒性对血管长期损伤，血管弹性差、脆性大；术者右手持套管针向静脉内穿刺时用力过猛，导致静脉血管被穿通，很容易造成穿刺失败。

2.2 失血性休克患者：由于失血导致血管内有效循环血容量不足，血管不充盈，穿刺后见不到回血，使术者判断失误，退针后再穿刺，很容易穿刺失败。

2.3 血液黏稠度高的患者：术者穿刺时虽然成功，但安上输液器后，溶液不滴，经检查血液形成小血栓堵塞套管，大多由于一人操作动作较慢造成。

2.4 技术上的差异：由于术者的手法不同（如静脉上方进针或静脉侧壁进针），静脉上方进针易刺通血管，容易造成穿刺失败。

2.5 外周血管不具备留置针条件的患者：如遇到急性心力衰竭伴肥胖患者，术者如盲目进行套管针留置，容易造成穿刺失败。

2.6 急性 CO 中毒、急性有机磷农药中毒患者：由于患者常出现抽搐、烦躁症状，术者穿刺时见回血后就左手进针管、右手退针芯，导致套管未进血管内或套管在血管内长度很短，易使血往皮下渗或套管脱出血管形成皮下血肿，容易造成穿刺失败。

3 改进措施

在抢救危重病患者建立液体通路时，要先选择走向直、富有弹性、粗大且远离关节和静脉瓣的血管建立留置套管针。对外周血管不具备留置套管针的患者不能一概都用套管针，要先选普通输液器建立液体通路，维持抢救用药，待血管弹性或压力有所恢复后再建立留置针。由于一人操作过慢导致套管针阻塞，可先将输液器连接在“Y”型套管针上并排出气体，再行穿刺。直型针则改为两人协助操作，一人穿刺成功后，松开止血带，去除针芯，另一人立即安上输液器并及时打开输液开关。加强穿刺技术训练，掌握操作程序，熟能生巧，才能达到稳、准、轻一次穿刺成功，从而保证了用药及时，提高了工作效率。

作者单位：071000 河北省保定市第一中心医院急诊科

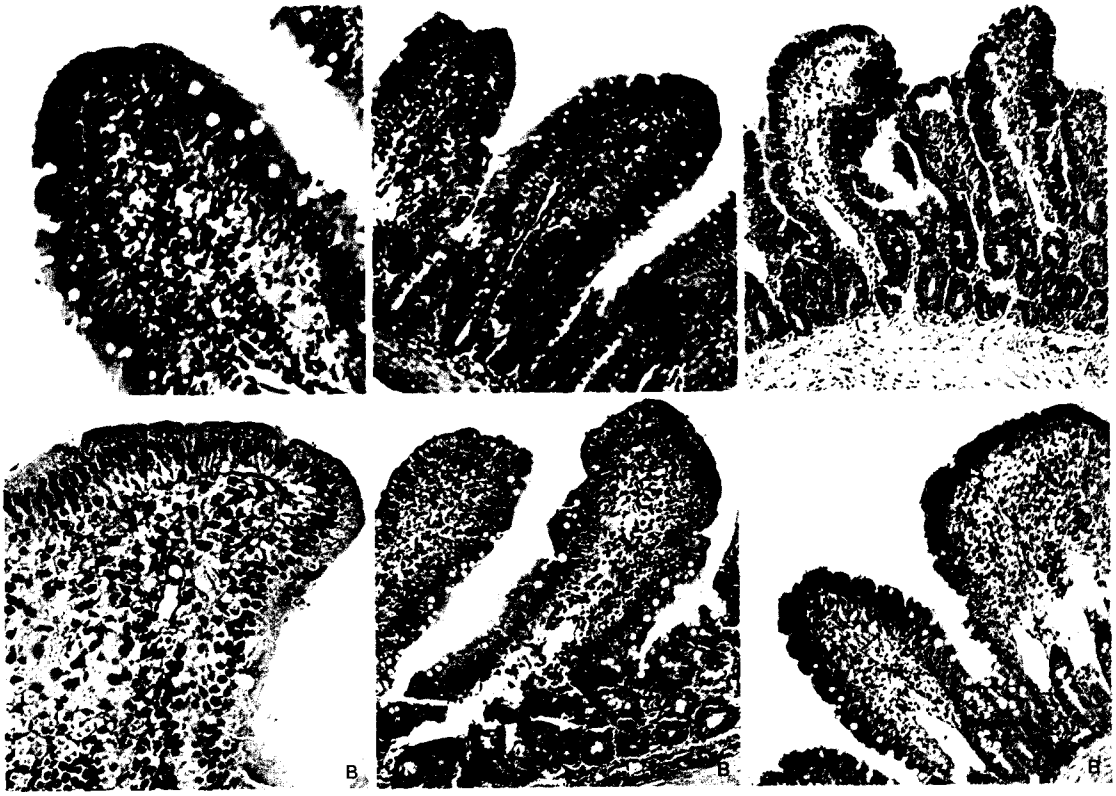
作者简介：程美萍（1964－），女（汉族），安徽省人，主管护师。

（收稿日期：2007－05－09
修回日期：2007－06－26）
（本文编辑：李银平）

维普资讯 http://www.cqvip.com

肠缺血/再灌注时卡巴胆碱对肠上皮细胞凋亡的影响

（正文见463页）



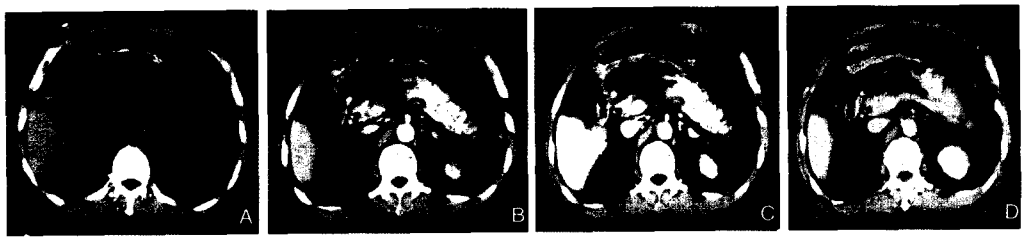
注：A：I/R模型组；B：卡巴胆碱组
图1 两组肠上皮细胞凋亡检测（TUNEL，×200）
Figure 1 Detectation of apoptosis of intestinal epithelial cells in two groups (TUNEL, ×200)

注：A：I/R模型组；B：卡巴胆碱组
图2 两组肠上皮细胞中caspase-3阳性表达（免疫组化，×100）
Figure 2 Positive expression of caspase-3 in intestinal epithelial cells in two groups (immunohistochemistry, ×100)

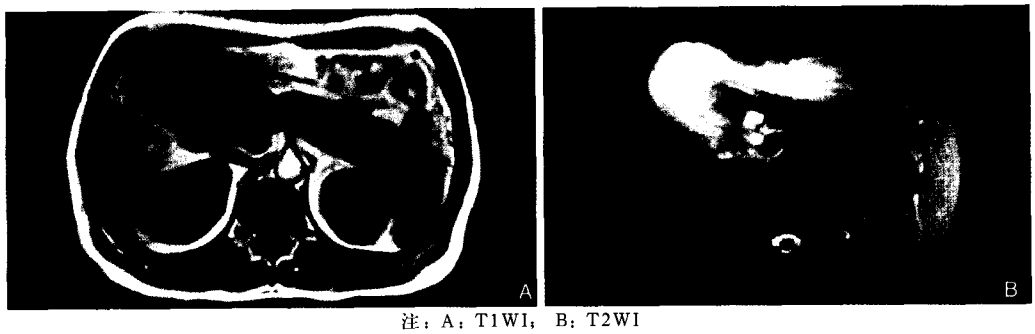
注：A：I/R模型组；B：卡巴胆碱组
图3 两组肠上皮细胞中Bcl-2阳性表达（免疫组化，×100）
Figure 3 Positive expression of Bcl-2 in intestinal epithelial cells in two groups (immunohistochemistry, ×100)

急性胰腺炎影像学检查的临床价值

（正文见497页）



注：A：CT平扫；B～D：增强扫描
图1 AP的CT扫描影像结果
Figure 1 CT findings of acute pancreatitis



注：A：T1WI；B：T2WI
图2 AP的MRI扫描影像结果
Figure 2 MRI findings of acute pancreatitis

Gp8:21