

## 电刺激迷走神经对脓毒症大鼠急性肺损伤的影响

王丽 李建国 贾宝辉 吴远波 周青 杜朝晖

**【摘要】目的** 探讨电刺激迷走神经激活胆碱能抗炎通路对脓毒症大鼠急性肺损伤的影响。**方法** 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)复制脓毒症大鼠模型。40 只雄性 SD 大鼠被随机分为假手术(SHAM)组、CLP 组、迷走神经切断(VGX)组和迷走神经刺激(STM)组,每组 10 只。CLP 组行 CLP;VGX 组行 CLP 后离断双侧颈部迷走神经干;STM 组在 VGX 组处理的基础上行左侧迷走神经干远端电刺激。所有动物于制模成功后 18 h 经颈动脉放血处死,检测血浆肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )浓度、动脉血乳酸及血气分析;计算肺湿/干重比值;观察肺组织病理学改变及超微结构改变。**结果** 与 SHAM 组比较,CLP 组和 VGX 组血浆 TNF- $\alpha$  浓度、动脉血乳酸值、动脉血二氧化碳分压(PaCO<sub>2</sub>)、肺湿/干重比值均升高,pH、动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)以及剩余碱(BE)值均降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与 CLP 组比较,STM 组血浆 TNF- $\alpha$  浓度、动脉血乳酸值、PaCO<sub>2</sub>、肺湿/干重比值均降低,pH、PaO<sub>2</sub> 以及 BE 值升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。肺组织病理学和电镜下超微结构改变均显示:CLP 组肺损伤较 SHAM 组明显加重,而 STM 组肺损伤较 CLP 组、VGX 组明显减轻。**结论** 通过电刺激迷走神经激活胆碱能抗炎通路,可起到保护脓毒症大鼠急性肺损伤的作用。

**【关键词】** 脓毒症; 迷走神经; 肺脏; 胆碱能抗炎通路

**Protective effects of electric stimulation of vagus nerve on acute lung injury in rat with sepsis** WANG Li, LI Jian-guo, JIA Bao-hui, WU Yuan-bo, ZHOU Qing, DU Zhao-hui. Intensive Care Unit, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China  
Corresponding author: LI Jian-guo (Email: drljg181@yahoo.com.cn)

**【Abstract】Objective** To investigate the protective effect of stimulation of vagus nerve on acute lung injury in rat with sepsis. **Methods** Sepsis was reproduced by cecal ligation and puncture (CLP). Forty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 4 groups (each  $n = 10$ ): SHAM group received performed sham surgery. In CLP group, CLP was performed. In vagotomy (VGX) group, rats were subjected to bilateral cervical VGX following CLP. In vagus stimulation (STM) group, rats were subjected to bilateral cervical VGX after CLP and the efferent end of the left vagus nerve was stimulated with electric current. The animals were sacrificed at 18 hours after production. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) level in blood was detected, arterial blood lactic acid concentration, pH, partial pressure of oxygen in arterial blood (PaO<sub>2</sub>), partial pressure of carbon dioxide in arterial blood (PaCO<sub>2</sub>), base excess (BE) and lung wet/drying (W/D) ratio were determined. The histopathology and ultra-microstructure of the lung were observed. **Results** The TNF- $\alpha$  and lactic acid concentrations, PaCO<sub>2</sub> and W/D ratio were all increased, and pH, PaO<sub>2</sub>, BE all lowered in CLP group and VGX group compared with those of SHAM group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with CLP group, TNF- $\alpha$ , lactic acid concentration, PaCO<sub>2</sub>, W/D ratio in STM group were decreased obviously, and pH, PaO<sub>2</sub> and BE were all increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The lung tissue pathology and ultra-microstructure changes indicated that lung injury was severe in CLP group than in SHAM group and was ameliorated in STM group compared with that of CLP group and VGX group. **Conclusion** The results suggest that direct electrical stimulation of the efferent end of vagus nerve can protect lung against injury induced by sepsis in rat.

**【Key words】** septic shock; vagus nerve; lung; cholinergic anti-inflammatory pathway

胆碱能抗炎通路(cholinergic anti-inflammatory pathway)是存在于中枢神经系统和免疫系统之间、由迷走神经及其递质乙酰胆碱构成的抗炎通路<sup>[1]</sup>。胆碱能抗炎通路通过迷走神经末梢释放乙酰

胆碱,作用于全身各器官系统的单核/巨噬细胞表面含  $\alpha 7$  亚基的 N 型胆碱能受体,抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1(IL-1)等炎症介质的释放<sup>[2-3]</sup>,从而拮抗全身性炎症反应,减轻器官损伤<sup>[4]</sup>。在脓毒症导致的多器官损伤中,肺脏往往是受累最早也是最易受累的器官<sup>[5]</sup>。胆碱能抗炎通路对脓毒症所致急性肺损伤(ALI)的保护作用及其机制目前了解较少。本研究采用盲肠结扎穿孔术(CLP)复制脓毒症动物模型,通过电刺激迷走神经激活胆碱能抗炎通路<sup>[6]</sup>,观察其对脓毒症大鼠 ALI 的影响

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672727);湖北省自然科学基金项目(2004ABA161);湖北省卫生厅科研基金资助项目(JX2B27)

作者单位:430071 湖北武汉,武汉大学中南医院

通讯作者:李建国(Email:drljg181@yahoo.com.cn)

作者简介:王丽(1981-),女(汉族),湖北省人,医师。

及其可能机制,为 ALI 的治疗提供帮助。

## 1 材料与方 法

**1.1 主要试剂及仪器:** TNF- $\alpha$  试剂盒(R&D 公司,美国),生物机能实验系统(泰盟科技 BL-4201,中国成都),血气分析仪(i-STAT,美国),UV-754 分光光度仪(SANYO,日本),450 nm 酶标仪(Bio-Rad 公司,美国),20 000 $\times$ g 台式高速低温离心机(Heraeus,德国),超低温冰箱(SANYO,日本)。

**1.2 实验动物及分组:** 40 只雄性 SD 大鼠(武汉大学医学院实验动物中心提供),体重(200 $\pm$ 20)g。按随机数字表法分为 4 组,每组 10 只。①假手术组(SHAM 组):除不结扎和穿孔盲肠外,其余步骤同 CLP 组;同时行双颈部迷走神经干分离术;②CLP 组:CLP+双颈部迷走神经干分离术;③迷走神经切断组(VGX 组):CLP+双颈部迷走神经干离断术;④迷走神经刺激组(STM 组):CLP+双颈部迷走神经干离断术+左侧迷走神经干远端电刺激。

**1.3 CLP 模型制备<sup>[7]</sup>:**用质量分数 200 g/kg 乌拉坦 1 g/kg 腹腔注射麻醉后,分离颈总动脉及迷走神经。于前腹正中作长约 2~3 cm 切口,游离肠系膜和盲肠,以 3-0 丝线环形结扎盲肠根部,用 9 号针头于盲端部位穿刺 2 处,两针孔相距约 3 cm,还纳肠管,逐层缝合关腹。术毕皮下注射生理盐水 30 ml 补充体液丢失,碘伏消毒小腹并包扎伤口。

**1.4 迷走神经分离、离断术和电刺激:**动物麻醉后,仰卧位固定备皮,在喉头与胸骨之间找到颈动脉鞘(内有颈动脉及颈部神经),持蚊式止血钳顺着血管走向钝性分离颈总动脉和迷走神经约 3~4 cm,用 4-0 丝线结扎迷走神经然后剪断,远端与双铂电极连接。CLP 后即刻,以 5 V、2 ms 和 1 Hz 强度的电能持续刺激迷走神经 20 min。

**1.5 指标检测:**制模成功后 18 h 用颈动脉放血法处死大鼠。采集颈动脉血,用血气分析仪检测乳酸浓度并进行血气分析;另取 2 ml 颈动脉血离心,取血浆,用酶联免疫吸附法(ELISA)测定 TNF- $\alpha$  浓度。取右上肺测湿/干重(W/D)比值。取右中肺组织,行

苏木素-伊红(HE)染色,制备切片,在光镜及电镜下观察肺组织病理学改变。

**1.6 统计学处理:**采用 SPSS11.5 统计软件进行分析,数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 乳酸值和动脉血气分析(表 1):**与 SHAM 组比较,CLP 组和 VGX 组动脉血乳酸值和动脉血二氧化碳分压(PaCO<sub>2</sub>)均升高,pH、动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)和剩余碱(BE)均降低,差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.01$ )。与 CLP 组比较,STM 组动脉血乳酸值和 PaCO<sub>2</sub> 均降低,pH、PaO<sub>2</sub> 和 BE 均升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。

**2.2 血浆 TNF- $\alpha$  浓度(表 1):**与 SHAM 组比较,CLP 组和 VGX 组血浆 TNF- $\alpha$  浓度均统计学意义高,差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.01$ )。与 CLP 组比较,STM 组血浆 TNF- $\alpha$  浓度显著降低,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

**2.3 肺 W/D 比值(表 1):**与 SHAM 组比较,CLP 组和 VGX 组肺 W/D 比值均显著升高,差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.05$ )。与 CLP 组比较,STM 组肺 W/D 比值显著降低( $P<0.05$ )。

**2.4 光镜下肺组织改变(彩色插页图 1):**SHAM 组肺组织未见明显改变。CLP 组肺组织明显水肿、淤血,呈浸润性炎症改变;肺泡壁部分崩解,结构欠完整,肺泡腔内有大量渗液;肺间质水肿、增生和变厚,伴大量炎性细胞浸润。与 CLP 组比较,STM 组肺组织病理变化明显减轻,肺泡壁结构完整,仅部分肺泡腔和间质内可见轻度炎性细胞浸润。

**2.5 电镜下肺组织改变(彩色插页图 2):**SHAM 组肺组织未见明显改变。CLP 组肺泡 II 型上皮细胞微绒毛稀疏,线粒体结构破坏,板层小体排空现象明显,形成大空泡;毛细血管内皮细胞肿胀,微绒毛脱落、融合,内皮细胞之间连续性损伤,细胞间隙增宽。STM 组肺泡 II 型上皮细胞微绒毛排列整齐,线粒体结构正常,板层小体数目结构基本正常;血管内皮细

表 1 各组大鼠乳酸浓度和动脉血气的比较( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 1 Comparison of lactic acid concentration, pH, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, BE, TNF- $\alpha$  and W/D ratio of lung tissue of rats in each group( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	乳酸(mmol/L)	pH	PaO <sub>2</sub> (mm Hg)	PaCO <sub>2</sub> (mm Hg)	BE(mmol/L)	TNF- $\alpha$ (mmol/L)	肺 W/D 比值
SHAM 组	1.116 $\pm$ 0.360	7.450 $\pm$ 0.047	123.00 $\pm$ 10.98	37.51 $\pm$ 5.29	-3.33 $\pm$ 1.33	28.81 $\pm$ 7.24	4.09 $\pm$ 0.47
CLP 组	2.448 $\pm$ 0.665**	7.300 $\pm$ 0.091**	96.17 $\pm$ 10.32**	50.92 $\pm$ 4.21**	-10.00 $\pm$ 2.45**	70.40 $\pm$ 16.37**	5.07 $\pm$ 0.69*
VGX 组	2.860 $\pm$ 1.269**	7.310 $\pm$ 0.084**	94.50 $\pm$ 13.98**	47.97 $\pm$ 7.98**	-10.33 $\pm$ 2.05**	73.14 $\pm$ 13.56**	5.10 $\pm$ 0.81*
STM 组	1.035 $\pm$ 0.169**	7.410 $\pm$ 0.044#	112.00 $\pm$ 11.69#	42.15 $\pm$ 6.76#	-4.50 $\pm$ 1.24#	39.05 $\pm$ 12.32##	4.14 $\pm$ 0.48#

注:与 SHAM 组比较;\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与 CLP 组比较;# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ ;1 mm Hg=0.133 kPa

胞形态结构正常, 气血屏障连续, 形态结构清晰。

### 3 讨论

脓毒症及其他严重创伤导致的应激状态可使炎症系统广泛被激活, 释放大量的炎症介质, 尤其是一些促炎症细胞因子, 如  $\text{TNF} - \alpha$ 、 $\text{IL} - 1$  等均被激活和释放, 触发全身炎症反应综合征 (SIRS), 引起强烈的自我破坏性炎症反应, 间接地导致各器官系统相继损伤, 进而发展为多器官功能障碍综合征 (MODS) 甚至多器官功能衰竭 (MOF)<sup>[8]</sup>。

脓毒症过程中, 肺脏是最容易受损伤的靶器官之一, 其机制与炎症因子密切相关<sup>[9]</sup>。SIRS 可诱发激活肺内的效应细胞, 特别是肺内含量丰富的肺毛细血管内皮细胞以及活化的中性粒细胞, 它们释放大量的细胞因子和炎症介质, 如  $\text{TNF} - \alpha$ 、 $\text{IL} - 1$  等, 引起“呼吸爆发”, 出现肺不张、动静脉分流和难以纠正的低氧血症。因此, 在脓毒症早期进行有效的抗炎治疗, 抑制或减少炎症介质的产生和释放, 对改善脓毒症时 ALI 有重要意义。

研究显示, 对内毒素休克大鼠实施迷走神经电刺激术, 能够减少  $\text{TNF} - \alpha$  的合成和释放, 降低其血清  $\text{TNF} - \alpha$  水平, 显著逆转低血压<sup>[10-11]</sup>。应用胆碱能激动剂烟碱和卡巴胆碱, 能够减轻内毒素血症大鼠各脏器的炎症反应, 对休克动物有保护作用<sup>[12]</sup>。此外, 通过其他可导致严重炎症反应的急性病变模型, 如失血性休克和全身性缺血/再灌注损伤模型等, 胆碱能抗炎通路的抗休克效应和治疗作用也得到证实<sup>[13-14]</sup>。

本实验显示, 大鼠脓毒症模型制备成功后, 肺组织病理切片及电镜下肺组织超微结构改变都表现出了明显的 ALI 病理特点, 且肺 W/D 比值也较正常大鼠显著增加, 成功复制了 ALI 早期动物模型。大鼠行 CLP 后, 血清  $\text{TNF} - \alpha$  浓度、乳酸浓度  $\text{PaCO}_2$  和 BE 负值均明显升高, pH 值和  $\text{PaO}_2$  均降低, 肺功能明显下降。电刺激大鼠迷走神经传出端后, 大鼠肺组织病理损伤、超微结构改变及肺水肿明显减轻, 乳酸浓度得以恢复, pH 值和  $\text{PaO}_2$  升高,  $\text{PaCO}_2$  和 BE 减小, 肺功能明显改善。这些表明电刺激迷走神经能减少脓毒症大鼠血清中  $\text{TNF} - \alpha$  的浓度, 阻断了以

$\text{TNF} - \alpha$  为主的炎症介质过度释放, 减轻了脓毒症过程中的全身性炎症反应, 从而对肺组织起到一定的保护作用。

综上所述, 通过电刺激迷走神经而激活胆碱能抗炎通路, 可抑制脓毒症大鼠的全身性炎症反应, 进而保护肺脏。

### 参考文献:

- 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.
- Murphy K, Haudek S B, Thompson M, et al. Molecular biology of septic shock [J]. *New Horiz*, 1998, 6 (2): 181 - 193.
- van der Poll T, van Deventer S J. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 1999, 13 (2): 413 - 426.
- Pavlov V A, Tracey K J. The cholinergic anti-inflammatory pathway [J]. *Brain Behav Immun*, 2005, 19 (6): 493 - 499.
- Fein A M, Calalang-Colucci M G. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock [J]. *Crit Care Clin*, 2000, 16 (2): 289 - 317.
- de Jonge W J, van der Zanden E P, The F O, et al. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the  $\text{Jak}2 - \text{STAT}3$  signaling pathway [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6 (8): 844 - 851.
- 朱义用, 景炳文, 姜永华. 肠源性感染致早期肺损伤模型的制备及其机制探讨 [J]. *中国危重病急救医学*, 2000, 12 (9): 541 - 545.
- Bone R C, Balk R A, Cerra F B, et al. Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis [J]. *Chest*, 1992, 101 (6): 1644 - 1655.
- Downey G P, Dong Q, Kruger J, et al. Regulation of neutrophil activation in acute lung injury [J]. *Chest*, 1999, 116 (1 Suppl): 46S - 54S.
- Wang H, Liao H, Ochani M, et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis [J]. *Nat Med*, 2004, 10 (11): 1216 - 1221.
- Matthay M A, Ware L B. Can nicotine treat sepsis [J]? *Nat Med*, 2004, 10 (11): 1161 - 1162.
- 姜小国, 胡森, 石德光, 等. 卡巴胆碱对肠缺血/再灌注大鼠血浆肿瘤坏死因子- $\alpha$  和白介素-10 含量的影响 [J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15 (3): 167 - 169.
- 李建国, 胡正芳, 杜朝晖, 等. 胆碱能抗炎通路对失血性休克大鼠保护作用的研究 [J]. *中国危重病急救医学*, 2005, 17 (1): 24 - 27.
- Bernik T R, Friedman S G, Ochani M, et al. Cholinergic antiinflammatory pathway inhibition of tumor necrosis factor during ischemia reperfusion [J]. *J Vasc Surg*, 2002, 36 (6): 1231 - 1236.

(收稿日期: 2007-08-30 修回日期: 2007-10-06)

(本文编辑: 李银平)

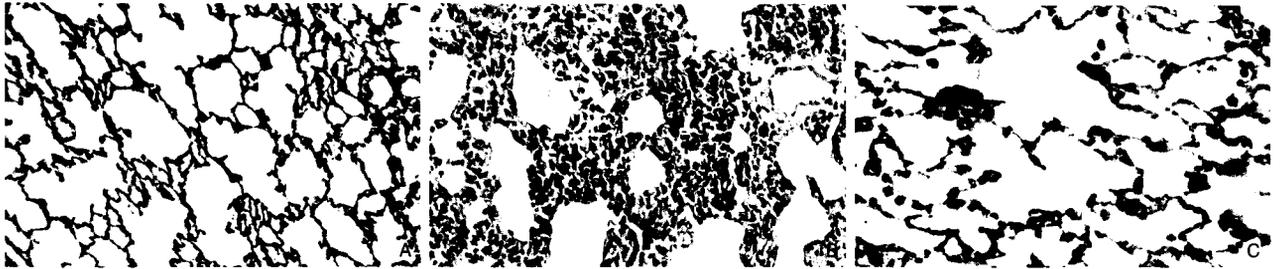
## 欢迎订阅《中国危重病急救医学》杂志

中华医学会和天津市天和医院主办, 全国各地邮局订阅, 邮发代号: 6-58

刊社地址: 天津市和平区睦南道 122 号天和医院内 邮编: 300050

## 电刺激迷走神经对脓毒症大鼠急性肺损伤的影响

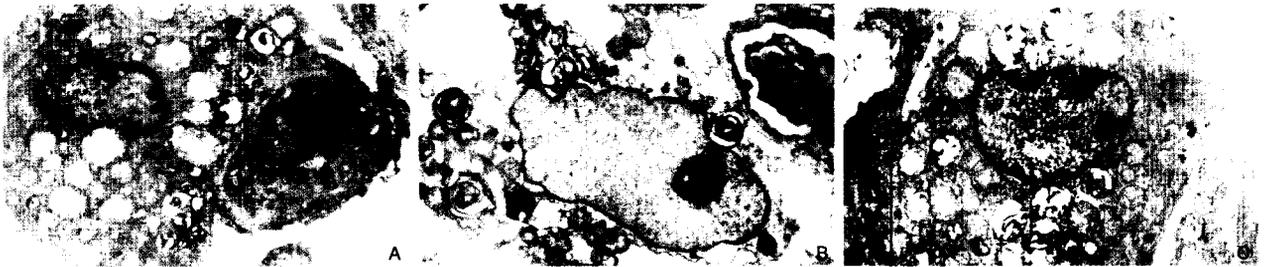
(正文见593页)



A: SHAM组; B: CLP组; C: STM组

图1 各组光镜下肺组织病理学改变 (HE, ×400)

Figure 1 Pathological change of lung tissue in each group under light microscope(HE, ×400)



A: SHAM组; B: CLP组; C: STM组

图2 各组电镜下肺组织病理学改变(醋酸铀-枸橼酸铅双染, ×5 000)

Figure 2 Pathological change of lung tissue in each group under electron microscope(uranylacetate and lead citrate double staining, ×5 000)

## 盐酸戊乙奎醚对腹腔感染脓毒症小鼠肺损伤的保护作用

(正文见623页)

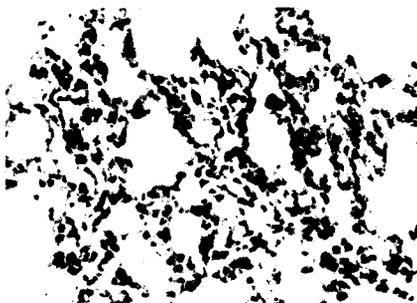


图1 光镜下CLP组肺组织病理学观察 (HE, ×400)

Figure 1 Pathological change of lung tissue in CLP group under light microscope (HE, ×400)

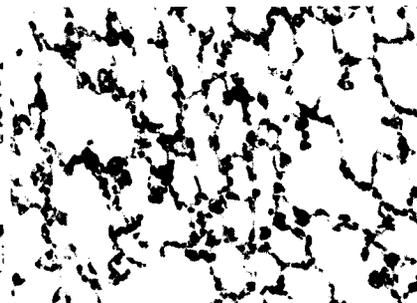


图2 光镜下PHC处理组肺组织病理学观察 (HE, ×400)

Figure 2 Pathological change of lung tissue in PHC group under light microscope (HE, ×400)



图3 电镜下CLP组肺组织病理学观察 (醋酸铀-枸橼酸铅双染, ×10 000)

Figure 3 Pathological change of lung tissue in CLP group under electron microscope (uranylacetate and lead citrate double staining, ×10 000)



图4 电镜下PHC处理组肺组织病理学观察 (醋酸铀-枸橼酸铅双染, ×10 000)

Figure 4 Pathological change of lung tissue in PHC group under electron microscope (uranylacetate and lead citrate double staining, ×10 000)



图5 CLP组肺组织iNOS mRNA阳性表达 (原位杂交, ×400)

Figure 5 Positive expression of iNOS mRNA of lung tissue in CLP group (in situ hybridization, ×400)

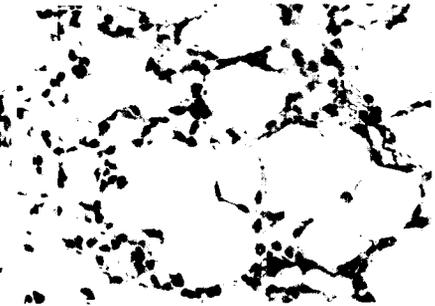


图6 PHC处理组肺组织iNOS mRNA阳性表达(原位杂交, ×400)

Figure 6 Positive expression of iNOS mRNA of lung tissue in PHC group (in situ hybridization, ×400)