

• 论著 •

不同液体复苏对未控制失血性休克大鼠肺损伤及肺水通道蛋白表达的影响

招伟贤 高巨 石永勇 徐少群

【摘要】 目的 观察不同液体复苏对未控制失血性休克大鼠肺损伤和肺水通道蛋白 1(AQP1)和 AQP5 表达的影响。方法 SD 大鼠被随机分为假手术组(C 组)、无液体复苏组(NF 组)、乳酸林格液组(LRS 组)、高渗盐水组(HS 组)和羟乙基淀粉组(HES 组)5 组,每组 12 只。建立未控制失血性休克大鼠模型,模拟临床分为 4 期;动态观察各期的平均动脉压(MAP)变化。①失血性休克期(时间为 60 min):在 15 min 内将 MAP 降至 40 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)并维持 60 min;然后向气管内注射内毒素 2 mg/kg,并用断尾法造成大鼠未控制失血性休克。②液体复苏期(时间为 30 min):LRS、HS、HES 组分别用 3 倍放血量的 LRS、4 ml/kg 的 7.5%NaCl 和 1 倍放血量的 6%HES 130/0.4 进行复苏,C 组和 NF 组不处理。③综合复苏期(时间为 1 h):在 1 h 内回输全部失血及 1:1 失血量的生理盐水。④复苏后观察期:输血、输液结束后继续观察 3.5 h。实验结束后测定肺组织湿/干重(W/D)比值;用免疫组化测定肺组织 AQP1 和 AQP5 表达;用苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺损伤程度。结果 在 C 组和 HES 组,肺血管内皮细胞 AQP1 和肺泡上皮 AQP5 均呈阳性表达;HS 组仅 AQP1 呈阳性表达,AQP5 则呈微弱表达;NF 组和 LRS 组 AQP1、AQP5 均呈微弱表达。各组 MAP、肺 W/D 比值和肺组织损伤程度比较显示,HS 组和 HES 组显著优于 NF 组和 LRS 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 遭受“二次打击”失血性休克大鼠并发肺损伤时,肺 AQP1 和 AQP5 表达下调;采用 6% HES 130/0.4 进行休克复苏可有效抑制 AQP1 和 AQP5 下调,并使肺损伤明显减轻;采用 7.5%NaCl 复苏仅能抑制 AQP1 表达下调和在一定程度上减轻肺水肿;而采用 LRS 复苏既不能保持 AQP1、AQP5 的表达,也不能有效防止肺损伤的发生。

【关键词】 失血性休克; 液体复苏; 水通道蛋白; 大鼠

Effects of different fluid resuscitation regimes on lung injury and expression of pulmonary aquaporin 1 and aquaporin 5 in uncontrolled hemorrhagic shock in rats ZHAO Wei-xian, GAO Ju, SHI Yong-yong, XU Shao-qun. Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, Guangdong, China
Corresponding author: GAO Ju, Email: gaoju_003@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of different fluid resuscitation regimes on lung injury and expression of pulmonary aquaporin 1 (AQP1) and AQP5 in rats with uncontrolled hemorrhagic shock. Methods Sixty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned to the following five groups: control group (C group), no fluid resuscitation group (NF group), lactated Ringer's solution group (LRS group), 7.5%NaCl group (HS group) and hydroxyethyl starch group (hydroxyethyl starch 130/0.4, HES group). A four-phased uncontrolled hemorrhagic shock model was reproduced. Uncontrolled hemorrhagic shock phase began with blood withdrawal extended over 15 minutes, in which animals were subjected to massive hemorrhage [mean arterial pressure (MAP)=40 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa)] for 60 minutes and followed by intratracheal lipopolysaccharide 2 mg/kg and continuous bleeding with amputation of the tail. Then, animals were partially resuscitated with LRS of 3 times the volume of shed blood (LRS group), followed by a bolus dose of 4 ml/kg body weight of 7.5%NaCl (HS), or hydroxyethyl starch (a volume equal to that of the shed blood), respectively, during different fluid resuscitation regimes. After that, comprehensive resuscitation phase of 60 minutes began with hemostasis, and transfusion of all the shed blood plus same amount of normal saline. Observation phase was continued for 3.5 hours. At the end the experiment, the lung tissue was sampled to measure wet-to-dry lung weight ratio (W/D), and the expression of AQP1 and AQP5 were determined with immunohistochemistry. The paraffin-embedded lungs were stained with hematoxylin and eosin for pathological analysis. Results When compared with NF and LRS groups, the lung W/D ratio was significantly decreased, and the shock induced decreased expression of AQP1 and AQP5 in lung tissue were attenuated in HES group, but these beneficial effects were blunted in the HS group. Conclusion Uncontrolled hemorrhagic shock may induce lung injury and pulmonary edema as well as down regulation of the expression of AQP1 and AQP5 in rats. Resuscitation with hypertonic fluids, especially with HES, can reduce lung damage and pulmonary edema in this kind of shock. The cause may be due in part to maintenance of the expression of AQP1 and/or AQP5 in the lung. Pulmonary AQP1 and AQP5 play an important role in fluid transportation.

【Key words】 hemorrhage shock; fluid resuscitation; aquaporin; rat

肺水通道蛋白(AQPs)是肺泡、肺间质及肺血管间的水转运通道,近年发现其与肺水肿发生有关^[1-2]。但目前尚未完全清楚失血性休克肺损伤与肺AQPs的关系,也未清楚不同液体复苏对肺损伤和AQPs表达的影响。因此,本研究中通过复制未控制失血性休克大鼠模型,观察不同液体复苏对肺损伤和AQP1、AQP5表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:成年SD大鼠60只(广州中医药大学实验动物中心提供),体重250~280 g。水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,分离右颈总动脉和静脉,分别插管用监测动脉压及供输液、放血、采集血标本。稳定15 min测定基础值后,按照随机数字表法将大鼠分为5组,即假手术组(C组)、无液体复苏组(NF组)、乳酸林格液组(LRS组)、高渗盐水组(7.5%NaCl液,HS组)及6%羟乙基淀粉130/0.4组(HES组),每组12只。

1.2 未控制失血性休克模型制备:参照文献[3]方法略有改良制备未控制失血性休克-内毒素二次打击大鼠模型,并模拟临床分为4期:①失血性休克期(时间为60 min):通过颈总动脉放血,15 min内将平均动脉压(MAP)降至40 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa)维持60 min,放出的血液保存于肝素抗凝试管中,记录容积。若MAP超过40 mm Hg,则放出部分血液;若MAP低于35 mm Hg则回输部分失血。二次打击:失血性休克60 min后,明视气管内注射内毒素(Sigma公司,美国)2 mg/kg,同时在鼠尾远端1/3处用碘伏消毒后断尾,造成未控制失血性休克,并用无菌干燥抗凝试管收集出血。②液体复苏期(时间为30 min):除C组和NF组外,其余各组在断尾后立即进行液体复苏。LRS、HS和HES组分别用3倍放血量的LRS、4 ml/kg的7.5% NaCl和1倍放血量的6% HES 130/0.4(费森尤斯卡比)进

行复苏,在30 min内复苏完毕。③综合复苏期(时间为1 h):即液体复苏结束后开始1 h的综合复苏,各组大鼠尾部断端结扎止血,1 h内回输全部失血及1:1失血量的生理盐水。④复苏后观察期:输血结束后继续观察3.5 h,记录血压、心率和呼吸频率。实验结束时检测动脉血气,处死大鼠后开胸结扎左主支气管,取左中肺组织用多聚甲醛水溶液固定后进行组织病理学观察和AQPs免疫组化检测。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 动态观察各组大鼠不同时间点MAP变化。
1.3.2 肺组织湿/干重(W/D)比值测定:实验结束后取左下肺称湿重,80℃烤20 h至恒重后称干重,计算W/D比值。
1.3.3 肺组织病理学观察:将固定好的肺组织标本用石蜡包埋,切片后常规苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺损伤的程度。
1.3.4 AQP1、AQP5免疫组化测定:滴加1:200兔抗鼠AQP1和AQP5多克隆抗体(Santa Cruz biotechnology,美国),4℃过夜,二抗为生物素化的抗鼠IgG。按照链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)试剂盒(北京中山生物技术公司)说明书进行检测,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色。图像采用HPISA-2000高清晰度彩色病理图像免疫组化测量系统进行分析,测定AQP1和AQP5的表达和平均吸光度(A)值。

1.4 统计学处理:各组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析及LSD检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MAP变化(表1):各组MAP基础值比较差异无统计学意义。在液体复苏20 min和30 min时,3个复苏组MAP回升,显著高于未复苏的NF组(P 均 < 0.01)。在综合复苏1 h和复苏后观察1 h,

表1 各组大鼠休克复苏不同时间点MAP的变化比较($\bar{x} \pm s, n=12$) mm Hg

组别	基础值	休克60 min	液体复苏20 min	液体复苏30 min	综合复苏1 h	复苏后观察1 h	复苏后观察2 h	复苏后观察3.5 h
C组	118.3±8.7	115.0±8.5	113.6±9.0	113.8±6.2	111.1±4.5	111.8±6.6	110.2±5.2	108.0±5.1
NF组	115.8±9.5	37.6±5.2 ^b	41.7±7.4 ^b	43.9±5.8 ^b	76.6±17.6 ^b	78.7±23.4 ^b	76.4±27.1 ^b	72.7±25.1 ^b
LRS组	116.6±13.3	36.0±5.1 ^b	53.7±9.4 ^{bd}	69.4±12.3 ^{bd}	82.6±13.8 ^b	83.2±15.7 ^b	84.3±12.4 ^b	81.3±19.2 ^b
HS组	115.4±12.4	35.9±4.4 ^b	61.9±13.9 ^{bde}	73.6±15.2 ^{bd}	93.5±16.0 ^d	92.7±15.1 ^{bc}	89.2±16.9 ^b	82.9±7.6 ^b
HES组	117.5±11.6	37.9±3.3 ^b	62.9±10.1 ^{bde}	76.8±14.2 ^{bd}	97.8±12.7 ^{df}	96.2±13.9 ^{ade}	95.9±13.2 ^{ade}	92.5±12.3 ^{ade}

注:与C组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与NF组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;与LRS组比较,^e $P < 0.05$,^f $P < 0.01$

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.05.009
基金项目:广东省自然科学基金项目(07300272);广东省医学科研基金项目(A2005259)
作者单位:510120 广州中医药大学第二附属医院(广东省中医院)麻醉科 通信作者:高巨,Email:gaoju_003@163.com

HS 组和 HES 组 MAP 显著高于 NF 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 但复苏后观察 2 h 和 3.5 h 时只有 HES 组的 MAP 仍高于 NF 组 (P 均 < 0.01)。

2.2 肺组织 W/D 比值 (表 2): NF 组和 LRS 组 W/D 比值高于 C 组, 但两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。HS 组和 HES 组 W/D 比值明显低于 NF 组和 LRS 组 (P 均 < 0.01), 且 HES 组明显低于 HS 组 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠肺组织 W/D 比值及 AQP1、AQP5 蛋白含量比较 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	W/D 比值	AQP1(A 值)	AQP5(A 值)
C 组	4.085 ± 0.090	0.783 ± 0.073	0.904 ± 0.049
NF 组	4.752 ± 0.119 ^b	0.253 ± 0.036 ^b	0.257 ± 0.043 ^b
LRS 组	4.668 ± 0.107 ^b	0.269 ± 0.035 ^b	0.305 ± 0.055 ^b
HS 组	4.408 ± 0.092 ^{bdf}	0.516 ± 0.053 ^{bdf}	0.311 ± 0.072 ^b
HES 组	4.292 ± 0.095 ^{bdfg}	0.556 ± 0.054 ^{bdf}	0.759 ± 0.067 ^{bdfg}

注: 与 C 组比较, ^b $P < 0.01$; 与 NF 组比较, ^d $P < 0.01$; 与 LRS 组比较, ^f $P < 0.01$; 与 HS 组比较, ^g $P < 0.05$

2.3 肺组织 AQP1 和 AQP5 的表达与定位 (表 2): C 组 AQP1 和 AQP5 均呈棕黄色强阳性表达, 其中 AQP1 主要表达在肺血管内皮, AQP5 在肺泡上皮。HES 组也呈阳性表达, 但稍弱于 C 组, 而 NF 组和 LRS 组均为微弱表达。HS 组 AQP1 呈阳性表达, AQP5 呈微弱表达。C 组 AQP1 和 AQP5 的 A 值最高, HES 组次之, NF 组和 LRS 组最低。HES 组 AQP1 及 AQP5 的 A 值明显高于 NF 组和 LRS 组, HS 组仅 AQP1 的 A 值明显高于 NF 组和 LRS 组 (P 均 < 0.01)。

2.4 肺组织病理学改变: 光镜下观察 C 组肺组织结构完整, 肺间质无水肿和炎症; NF 组肺间质呈弥漫性炎症和水肿改变, 肺泡内大量炎性细胞浸润和渗出液; LRS 组肺间质水肿明显, 肺泡壁结构破坏和大量炎性细胞浸润; HES 组肺间质轻度水肿, 间质和肺泡少量炎性细胞浸润; HS 组肺组织病理学改变介于 HES 组与 LRS 组之间。

3 讨论

近期的实验结果证实, 在出血得到有效控制前对休克者实施积极的液体复苏, 不但不能增加休克复苏的成功率, 反而导致死亡率增加^[4]; 这也为近年提出的限制性液体复苏策略 (即以 7.5% NaCl 4~6 ml/kg 进行的小容量复苏)^[5] 提供了依据。既往研究还发现, 失血性休克发生后即使无感染, 急性肺损伤 (ALI) 的发生率也可高达 40%^[6-7]。但临床上失血性休克患者常合并感染, 失血性休克合并内毒素作

用时肺损伤程度可能更加剧烈^[3-4]。因此, 本研究中采用了失血性休克复合内毒素攻击二次打击模型。肺损伤还可导致氧合功能降低, 使休克加重和死亡率增加。因此, 有效的休克复苏应该不仅是循环功能的改善和全身炎症反应的抑制, 还应该是器官功能的改善和死亡率的降低。综观当前的高渗盐水复苏结果, 可以认为, 虽然高渗盐水可在一定程度上改善血流动力学和全身炎症反应, 但对失血性休克预后的改善却不甚理想^[8-9]。近年来研究发现, 新一代羟乙基淀粉 (HES 130/0.4) 对脓毒症肺毛细血管渗漏和炎症反应具有抑制效应^[10], 显示其在休克治疗中潜在的肺保护前景。

本研究中发现, 失血性休克复苏治疗中肺组织 AQP1 和 AQP5 表达变化与肺含水量和肺损伤程度具有明显的一致性, 即失血性休克后不复活的 NF 组大鼠肺组织 AQP1 和 AQP5 表达明显下降, 肺 W/D 比值最大, 肺组织含水量显著增加, 肺组织病理损伤亦最严重; 采用 HES 130/0.4 复苏的 HES 组不仅有效地改善了循环功能, 而且显著保持了 AQP1、AQP5 的表达, 肺 W/D 比值最小, 肺组织病理损伤程度最轻, 提示能有效抑制肺水转运障碍。采用 LRS 复苏的 LRS 组 AQP1、AQP5 表达均较低, W/D 比值与 NF 组比较无明显改善, 肺组织病理损伤亦较重; 采用高渗盐水复苏的 HS 组仅见 AQP1 表达得到保持, AQP5 表达明显减少, W/D 比值略高于 HES 组, 但明显低于 LRS 组, 肺组织损伤程度也介于 HES 组与 LRS 组之间。提示: AQP1 和 AQP5 似乎参与了失血性休克的肺损伤过程, 当其正常表达得到维持时肺水肿较轻, 若表达减少则肺水肿加剧; 采用 HES 复苏有助于保持 AQP1 和 AQP5 的正常表达和减轻肺水肿。

目前对 AQPs 在 ALI 中的作用存在诸多观点。有人认为 AQPs 的作用有利也有弊, 因为 AQPs 对水的转运是双向性的 (bi-direction), 例如在容量负荷增加的情况下增加 AQP1 表达, 可使肺间质水分增加和使气道黏膜增厚 44%, 显示血管内水转向血管外; 但在缺氧或酸吸入导致肺水肿时, 若增加 AQP1 表达可使肺水清除加快, 显示血管外水转入血管内^[11]。近年研究表明, AQPs 在肺水清除中起重要作用, 例如病理状态下发生肺水肿时 AQP1 的表达往往是下调的, 当肺水肿得到控制时 AQP1 的表达是上调的, 提示肺 AQPs 的正常表达应有助于肺水的清除和减轻肺水肿^[11-13]。

本研究免疫组化定位检测结果与文献报道的结

果相似,即 AQP1 主要定位于肺血管内皮,可清除血管周围组织的水分;而 AQP5 主要位于 I 型肺泡上皮,可清除肺泡腔内水分。故可解释本研究中采用 7.5%NaCl 复苏的 HS 组因为仅 AQP1 表达增加,可能仅有助于清除肺间质过多水分,但对肺泡腔内水分的清除能力较弱。

综上所述,遭受“二次打击”大鼠出现肺损伤和肺水肿时肺组织 AQP1 和 AQP5 表达显著下调;给予 HES 进行休克复苏能有效抑制 AQP1 和 AQP5 的表达下调,有助于肺泡和肺间质水分的吸收,从而减轻失血性休克造成的 ALI。

参考文献

- [1] Jiao G, Li E, Yu R. Decreased expression of AQP1 and AQP5 in acute injured lungs in rats. Chin Med J (Engl), 2002, 115 (7): 963-967.
- [2] 谭利平, 许峰, 匡凤梧. 水通道蛋白 5 在高氧肺损伤中的表达及调节机制. 中国危重病急救医学, 2006, 18(8): 462-465.
- [3] Capone AC, Safar P, Stezoski W, et al. Improved outcome with fluid restriction in treatment of uncontrolled hemorrhagic shock. J Am Coll Surg, 1995, 180(1): 49-56.
- [4] Kiraly LN, Differding JA, Enomoto TM, et al. Resuscitation with normal saline (NS) vs. lactated ringers (LR) modulates hypercoagulability and leads to increased blood loss in an uncontrolled hemorrhagic shock swine model. J Trauma, 2006, 61(1): 57-64.
- [5] 王钦存, 肖南, 刁有芳, 等. 出血未控制性休克限制性液体复苏机制的探讨. 中国危重病急救医学, 2004, 16(8): 473-476.
- [6] Maeshima K, Takahashi T, Uehara K, et al. Prevention of hemorrhagic shock-induced lung injury by heme arginate treatment in rats. Biochem Pharmacol, 2005, 69(11): 1667-1680.
- [7] 石永勇, 高巨, 徐少群, 等. 失血性休克和内毒素二次打击肺损伤时转化生长因子- β 1/sm α 2 信号通路的变化. 中国危重病急救医学, 2008, 20(7): 401-404.
- [8] Mauritz W, Schimetta W, Oberreither S, et al. Are hypertonic hyperoncotic solutions safe for prehospital small-volume resuscitation? Results of a prospective observational study. Eur J Emerg Med, 2002, 9(4): 315-319.
- [9] Bahrami S, Zimmermann K, Szelényi Z, et al. Small-volume fluid resuscitation with hypertonic saline prevents inflammation but not mortality in a rat model of hemorrhagic shock. Shock, 2006, 25(3): 283-289.
- [10] Tian J, Lin X, Guan R, et al. The effects of hydroxyethyl starch on lung capillary permeability in endotoxic rats and possible mechanisms. Anesth Analg, 2004, 98(3): 768-774.
- [11] Verkman AS. Role of aquaporins in lung liquid physiology. Respir Physiol Neurobiol, 2007, 159(3): 324-330.
- [12] 谢艳萍, 陈才平, 王建春, 等. 急性肺损伤大鼠肺水通道蛋白 1 和 5 的表达及功能的实验研究. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28 (6): 385-389.
- [13] Su X, Song Y, Jiang J, et al. The role of aquaporin-1 (AQP1) expression in a murine model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. Respir Physiol Neurobiol, 2004, 142(1): 1-11.

(收稿日期: 2008-08-27 修回日期: 2009-01-08)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

迷迭香酸通过减少促炎因子释放及改善血流动力学减轻脓毒症

研究关注迷迭香酸(RA)对盲肠结扎穿孔术(CLP)脓毒症模型及 RAW264.7 细胞的影响和机制。结果显示: RA 能减少 RAW264.7 细胞肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)释放, 调节核转录因子- κ B(NF- κ B)的抗炎途径, 并呈剂量依赖性。单独静脉注射 RA 或联合应用亚胺培南能降低 CLP 脓毒症大鼠死亡率。注射 RA 后肝、肺、小肠血流动力学改善。研究者认为, RA 可通过减轻局部或全身炎症反应发挥对脓毒症的治疗作用, 通过 NF- κ B 抗炎途径发挥抗炎活性。

白慧颖, 编译自《Shock》, 2009 年 3 月(电子版); 胡森, 审校

甲氧西林抵抗金黄色葡萄球菌性脓毒症羊心血管晕厥与血管通透性改变

甲氧西林抵抗金黄色葡萄球菌(MRSA)感染常导致脓毒症及感染性休克。研究人员设想反应性氮氧原子与血管内皮生长因子(VEGF)可能在 MRSA 脓毒症中发挥关键作用。12 只绵羊经术前准备后随机均分为脓毒症组和对照组, 通过吸入或气管滴注 MRSA 方法制备 MRSA 脓毒症模型。结果 6 h 后脓毒症组出现休克, 伴血管通透性增加和血浆蛋白含量降低; 24 h 后脓毒症组心肌 3-硝基酪氨酸蛋白(3-NT)和 VEGF mRNA 表达增加。提示 VEGF 过表达可能是 MRSA 脓毒症血管通透性增加的原因。

白慧颖, 编译自《Shock》, 2009 年 3 月(电子版); 胡森, 审校

丁二酮 I 与利福平治疗鲍曼不动杆菌脓毒症的疗效对比分析

为了评价丁二酮 I 与利福平联用治疗鲍曼不动杆菌脓毒症的疗效, 研究者进行了前瞻性随机对照动物实验研究。采用腹腔注射鲍曼不动杆菌制备脓毒症动物模型, 制模成功后将动物随机分为两组, 分别静脉注射丁二酮 I 1 mg/kg 或利福平 10 mg/kg。结果显示, 与利福平治疗相比, 丁二酮 I 能够更好地减轻内毒素血症, 减少细胞因子释放并表现出良好的抗微生物活性。研究者认为, 丁二酮 I 能够更好地治疗鲍曼不动杆菌脓毒症。

白慧颖, 编译自《Crit Care Med》, 2009, 37(4): 1403-1407; 胡森, 审校