

• 论著 •

脓毒症早期大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴
超微结构变化与功能的关系

张玉想 李宏山 马朋林

【摘要】 目的 观察脓毒症早期下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴结构及功能的变化,并探讨其相互关系。**方法** 雄性 SD 大鼠 30 只,按随机数字表法均分为正常对照组、假手术组和脓毒症组。采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制作脓毒症大鼠模型,术后 6 h 取血并处死动物,检测血浆促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质酮(CORT)以及下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)水平;透射电镜下观察 HPA 轴的超微结构改变。结果 脓毒症组血浆 ACTH、CORT 和下丘脑 CRH 水平均明显高于正常对照组和假手术组[ACTH(pmol/L): 5.78 ± 0.36 比 1.94 ± 0.31 、 2.51 ± 0.10 ; CORT(nmol/L): 88.48 ± 4.47 比 22.02 ± 1.62 、 34.20 ± 2.51 ; CRH($\mu\text{g/L}$): 101.92 ± 6.61 比 61.65 ± 6.05 、 66.65 ± 4.03 , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$]。透射电镜下观察:脓毒症组大鼠下丘脑粗面内质网囊状扩张,脱颗粒,高尔基体肿胀,垂体 ACTH 细胞分泌颗粒增多,肾上腺组织脂滴减少。**结论** 脓毒症早期大鼠 HPA 轴处于过度激活状态,血浆 ACTH、CORT 和下丘脑 CRH 水平明显升高;HPA 轴的超微结构明显改变,且与功能变化有密切联系。

【关键词】 脓毒症; 盲肠结扎穿孔术; 下丘脑-垂体-肾上腺轴; 透射电镜

The relationship of ultrastructure and function of hypothalamus-pituitary-adrenal axis in early stage of sepsis in rats ZHANG Yu-xiang*, LI Hong-shan, MA Peng-lin. * Department of Intensive Care Unit, 309 Hospital of PLA, Beijing 100091, China

Corresponding author: ZHANG Yu-xiang, Email: zhyux88@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To observe the changes in ultrastructure and function of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPAA), and to approach the relationship between them in early stage of sepsis in rats. **Methods** Thirty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal control group, sham group, sepsis group. The sepsis model was reproduced by cecal ligation and puncture (CLP). The rats were sacrificed after collection of blood at 6 hours after CLP, and the levels of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone (CORT) in the plasma, and the corticotropin release hormone (CRH) in the tissue of hypothalamus were detected. The histopathological changes in HPAA were observed with transmission electron microscopy. **Results** The levels of ACTH and CORT in plasma, and the CRH in hypothalamus tissue of sepsis group were increased in the early stage of sepsis compared with the normal control group or sham group [ACTH (pmol/L): 5.78 ± 0.36 vs. 1.94 ± 0.31 , 2.51 ± 0.10 ; CORT (nmol/L): 88.48 ± 4.47 vs. 22.02 ± 1.62 , 34.20 ± 2.51 ; CRH ($\mu\text{g/L}$): 101.92 ± 6.61 vs. 61.65 ± 6.05 , 66.65 ± 4.03 , $P < 0.05$ or $P < 0.01$]. The changes in ultrastructure of the hypothalamus, pituitary and adrenal were also found. In sepsis group, the ultrastructure of hypothalamus was as follows. Rough endoplasmic reticulum expansion and degranulation of rough endoplasmic reticulum, and swelling of Golgi complex were found. A large number of endocrine granules could be seen in ATCH cells in the pituitary with depletion of adrenal lipid droplets. **Conclusion** In septic rats, the HPAA was excessively activated, and ACTH and CORT in plasma, and CRH in hypothalamus were significantly increased in early stage of sepsis. The changes in ultrastructure of HPAA were obvious, and the change in function was closely related to the ultrastructural changes.

【Key words】 Sepsis; Cecal ligation and puncture; Hypothalamic-pituitary-adrenal axis; Trans-mission electron microscopy

严重感染患者存在神经-内分泌-免疫功能的早期损伤,导致脓毒症时是造成危重患者的主要死亡

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.05.010

基金项目,国家自然科学基金资助项目(81071592);天津研究基金项目(01200913)

作者单位,100091 北京,解放军第三〇九医院 ICU(张玉想、马朋林),唐山市人民医院 ICU(李宏山)

通信作者:张玉想,Email:zhyux88@yahoo.com.cn

原因^[1-2],深入研究神经-内分泌-免疫网络调节机制可能为脓毒症的干预提供有效措施^[3]。脓毒症时神经-内分泌-免疫网络的活化调节作用具有双重性,而下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴是神经-内分泌-免疫网络的枢纽。HPA 轴的适度活化对机体抵御外来打击是有利的,而一旦反应过度则结果可能全然相反。本研究中采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备大鼠

脓毒症模型,观察脓毒症大鼠 HPA 轴的内分泌变化,结合超微结构改变,探讨其结构与功能的关系。

1 材料与方法

1.1 动物分组及脓毒症模型制备:雄性 SD 大鼠 30 只,体重 250~300 g,由河北医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:807145。按随机数字表法分为正常对照组、假手术组、脓毒症组,每组 10 只。按照 Hubbard 等^[4]报道的方法进行 CLP,复制严重腹腔感染致脓毒症大鼠模型,术毕皮下注射生理盐水 30 ml/kg 抗休克治疗;假手术组只开腹翻动肠管后关腹,不结扎和穿孔盲肠;正常对照组动物不予任何处理。实验过程中动物处置方法均符合动物伦理学标准。

1.2 检测指标及方法:各组均于 CLP 术后 6 h 采血并处死动物备检。

1.2.1 一般情况:观察术后大鼠的活动情况,处死大鼠检查腹水及腹腔肠管外观形态学改变。

1.2.2 血浆促肾上腺皮质激素 (ACTH) 和皮质酮 (CORT) 检测:采血 3 ml,离心取血浆-20℃保存。采用放射免疫法测定血浆 ACTH、CORT 水平,按试剂盒(购自北京北方生物技术研究所)说明书步骤进行操作。

1.2.3 组织超微结构观察:采血后处死动物,取下丘脑、垂体和肾上腺组织,用戊二醛溶液固定、切片,透射电镜下观察组织病理学改变。

1.2.4 下丘脑促肾上腺皮质激素释放激素 (CRH) 含量测定:取部分下丘脑组织液氮中保存,检测前将组织进行匀浆,离心取上清。采用放射免疫法测定 CRH 含量,严格按试剂盒(购自北京华英生物技术研究所)说明书步骤进行操作。

1.3 统计学处理:采用 SPSS 11.5 统计软件分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CLP 术后一般情况:CLP 术后大鼠苏醒延迟,逐渐出现精神萎靡、竖毛、寒颤、呼吸急促、活动迟缓或减少,濒死前有呼吸困难、寒颤、四肢僵硬;剖腹可见浑浊血性腹水,恶臭;肠管水肿;肝肾充血、水肿。

2.2 各组血浆 ACTH、CORT 及下丘脑 CRH 水平比较(表 1):正常对照组和假手术组血浆 ACTH、CORT 及下丘脑 CRH 水平比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。脓毒症组血浆 ACTH、CORT 及下丘脑 CRH 水平均明显高于正常对照组和假手术组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠血浆 ACTH、CORT 及下丘脑 CRH 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	血浆 ACTH (pmol/L)	血浆 CORT (nmol/L)	下丘脑 CRH (μg/L)
正常对照组	10	1.94±0.31	22.02±1.62	61.65±6.05
假手术组	10	2.51±0.10	34.20±2.51	66.65±4.03
脓毒症组	10	5.78±0.36 ^{ad}	88.48±4.47 ^{ad}	101.92±6.61 ^{bc}

注:ACTH,促肾上腺皮质激素;CORT,皮质酮;CRH,促肾上腺皮质激素释放激素;与正常对照组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与假手术组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

2.3 组织超微结构改变

2.3.1 下丘脑(图 1):正常对照组下丘脑室旁核胞质较丰富,核近似椭圆形;胞质内粗面内质网排列于细胞周边,数量较少,高尔基体位于核周;线粒体散在于胞质中。脓毒症组神经元活动较活跃,表现为粗面内质网扩张,有脱颗粒现象;线粒体大部分嵴和膜融合消失,突触前后膜模糊不清,突触间隙模糊,部分融合消失。

2.3.2 垂体(图 2):正常对照组垂体 ACTH 细胞核大而圆,胞质透亮,细胞器相对较少,高尔基体发达,粗面内质网较少,呈细长管状,有大小不等分泌颗粒。脓毒症组垂体 ACTH 细胞可见较大的细胞核,细胞内可见大量较小的内分泌颗粒,大颗粒明显减少,可见椭圆形的致密芯,致密芯和膜之间有电子密度低的环形空晕;粗面内质网有扩张、脱颗粒现象,核糖体模糊不清;线粒体大部分嵴和膜融合、消失,有水肿、空化现象。

2.3.3 肾上腺(图 3):正常对照组肾上腺皮质束状带细胞呈多边形,细胞内充满大小不一的脂滴,胞质中线粒体多,呈球形,体积较大。脓毒症组肾上腺皮质束状带细胞膜、核膜有融合现象,胞质水肿;滑面内质网减少,呈空泡状;线粒体水肿,局部空化,大部分管状嵴融合消失、排列紊乱;脂滴减少;粗面内质网管腔膨胀,脱颗粒现象明显。

3 讨论

HPA 轴是神经-内分泌-免疫网络的枢纽,在应激反应中起关键性作用。感染发生时,HPA 轴被激活,产生以肾上腺分泌皮质醇增多为主的应激反应,这种应激反应并不只是由生理应激引起,也可由炎症时免疫细胞释放的细胞因子引发^[5]。在许多细菌和病毒感染中,HPA 轴可被活化,致使循环中糖皮质激素水平增高^[6],一方面,这种活化可以维持内环境稳定,提高机体抵抗力;另一方面,HPA 轴的过度活化可增加机体对感染的易感性。有研究表明,打断

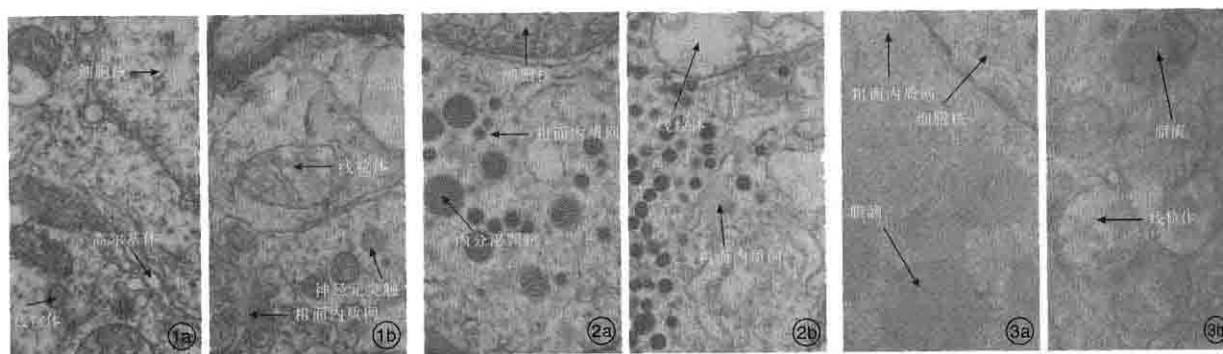


图 1 透射电镜下观察,正常对照组(a)下丘脑室旁核胞质较丰富,高尔基体位于核周,线粒体散在于胞质中;脓毒症组(b)粗面内质网扩张,有脱颗粒现象,线粒体大部分嵴和膜融合消失 醋酸铀-枸橼酸铅双染 $\times 20\ 000$ 图 2 透射电镜下观察,正常对照组(a)垂体粗面内质网较少,呈细长管状,分泌颗粒较少,大小不一;脓毒症组(b)细胞内可见大量内分泌颗粒,粗面内质网有扩张、脱颗粒现象,线粒体大部分嵴和膜融合、消失,有空化现象 醋酸铀-枸橼酸铅双染 $\times 20\ 000$ 图 3 透射电镜下观察,正常对照组(a)肾上腺皮质束状带细胞内充满大小不一的脂滴,细胞质中线粒体呈球形,管状嵴清晰可见;脓毒症组(b)肾上腺皮质束状带细胞内脂滴减少,细胞质中线粒体大部分嵴空泡化,有的融合消失 醋酸铀-枸橼酸铅双染 $\times 20\ 000$

HPA 轴(如肾上腺切除术、垂体切除术)或给予糖皮质激素受体阻断剂可以使机体感染加重,病死率增高;而在给予糖皮质激素替代治疗后可以减轻感染的严重程度,降低病死率^[6-8]。HPA 轴的活化能够促进小鼠体内牛分枝杆菌生长^[9],增加对病毒性疾病的易感性^[10]。因此推测,将神经-内分泌-免疫网络的活化程度调控在适度的范围内可能会有效干预脓毒症的发生发展过程^[3]。

感染时 HPA 轴被激活,使垂体 ACTH 分泌增加,肾上腺分泌活性增强,血浆皮质醇水平升高。多数研究结果显示,重症感染患者皮质醇分泌增加,血清浓度持续升高^[11-14]。可能的解释是皮质醇浓度与应激强度相适应,病情越重,则应激程度越强,HPA 轴激活就越显著,皮质醇浓度也越高。Rothwell 和 Lawler^[12]测定了 260 例重症监护病房(ICU)患者皮质醇水平,其中存活组 745.2 nmol/L (27 $\mu\text{g}/\text{dl}$),死亡组 1 297.2 nmol/L (47 $\mu\text{g}/\text{dl}$),提示血清皮质醇是影响预后的独立危险因素,并且与疾病严重程度有关。Sam 等^[13]将内科 100 例严重感染和感染性休克患者依据皮质醇浓度分为 ≤ 345 、345~552、552~1 242、 $\geq 1\ 242$ nmol/L 4 组,病死率分别为 54%、53%、41%和 81%,说明皮质醇浓度越高,病死率越高。Legakis 等^[14]发现术后不同程度脓症患者血 CORT、ACTH 水平随着脓毒症程度的加重而升高。李艳红等^[15]检测肺内源性急性肺损伤大鼠肾上腺皮质功能发现,模型组大鼠血浆 ACTH 和 CORT 水平升高,ACTH 于 24 h 达峰值,而 CORT 于 36 h 则明显降低。本研究中 CLP 后 6 h 血浆中 ACTH、CORT 水平明显升高,说明脓毒症早期 HPA 轴过

度激活使内环境紊乱,出现感染中毒症状。

尽管严重感染患者血清皮质醇水平普遍升高,但是相对于其感染应激的状态仍不足,即虽然肾上腺分泌皮质醇的功能是“正常”的,但是皮质醇仍处于相对缺乏的状态,称之为“食物充足的饥饿状态”,也称之为相对性肾上腺皮质功能不全(RAI)^[16-17]。本研究中把 HPA 轴的内分泌功能与下丘脑、垂体、肾上腺皮质超微结构结合在一起,能更好地理解这一概念。结果显示脓毒症大鼠早期血浆 ACTH 及下丘脑 CORT 水平即明显升高,表明在多种因素刺激下持续刺激 HPA 轴,ACTH 水平升高导致 CORT 分泌持续增加,失去了正常的昼夜规律性,动员机体以满足严重脓毒症时对皮质激素需求量的增加。为了适应机体的需要,肾上腺处于“高负荷运转状态”,合成大量的皮质醇激素,使原料耗竭,表现为脂滴减少,储备功能下降^[18-19];而 CORT 的分泌持续增加是由于受到了垂体功能活跃的影响。一般认为,功能活跃期,ACTH 细胞内大颗粒减少,小颗粒增多^[20]。本研究发现脓毒症大鼠 ACTH 细胞内小颗粒明显增多,提示垂体处于活跃状态。

综上所述,脓毒症时神经-内分泌-免疫网络的调节作用受多种因素影响,其通路复杂^[21-22],这为调节机制的研究带来困难,还需进一步深入研究。

参考文献

- [1] 崔娜,刘大为,王郝.严重感染患者下丘脑-垂体-靶腺轴功能的早期改变.中国危重病急救医学,2007,19,332-335.
- [2] Lesur O, Roussy JF, Chagnon F, et al. Proven infection-related sepsis induces a differential stress response early after ICU admission. Crit Care, 2010, 14, R131.
- [3] Kumar V, Sharma A. Is neuroimmunomodulation a future therapeutic approach for sepsis? Int Immunopharmacol, 2010,

- 10,9-17.
- [4] Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, et al. Cecal ligation and puncture. Shock, 2005, 24 Suppl 1, S52-57.
- [5] Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. Endocr Rev, 1984, 5, 25-44.
- [6] Webster JJ, Sternberg EM. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, glucocorticoids and glucocorticoid receptors in toxic sequelae of exposure to bacterial and viral products. J Endocrinol, 2004, 181, 207-221.
- [7] Silverstein R, Johnson DC. Endogenous versus exogenous glucocorticoid responses to experimental bacterial sepsis. J Leukoc Biol, 2003, 73, 417-427.
- [8] Gómez SA, Fernández GC, Vanzulli S, et al. Endogenous glucocorticoids attenuate Shiga toxin-2-induced toxicity in a mouse model of haemolytic uraemic syndrome. Clin Exp Immunol, 2003, 131, 217-224.
- [9] Brown DH, Zwilling BS. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis differentially affects the anti-mycobacterial activity of macrophages from BCG-resistant and susceptible mice. J Neuroimmunol, 1994, 53, 181-187.
- [10] Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. Stress-associated immune modulation, relevance to viral infections and chronic fatigue syndrome. Am J Med, 1998, 105, 35S-42S.
- [11] Schein RM, Sprung CL, Marcial E, et al. Plasma cortisol levels in patients with septic shock. Crit Care Med, 1990, 18, 259-263.
- [12] Rothwell PM, Lawler PG. Prediction of outcome in intensive care patients using endocrine parameters. Crit Care Med, 1995, 23, 78-83.
- [13] Sam S, Corbridge TC, Mokhesi B, et al. Cortisol levels and mortality in severe sepsis. Clin Endocrinol (Oxf), 2004, 60, 29-35.
- [14] Legakis I, Saramantis A, Voros D, et al. Dissociation of ACTH, beta-endorphin and cortisol in graded sepsis. Horm Metab Res, 1998, 30, 570-574.
- [15] 李艳红, 宋国维, 甘小庄, 等. 肺内源性急性肺损伤大鼠肾上腺皮质功能的变化和意义. 临床儿科杂志, 2010, 28, 40-43.
- [16] Fleseriu M, Loriaux DL. "Relative" adrenal insufficiency in critical illness. Endocr Pract, 2009, 15, 632-640.
- [17] 崔娜, 刘大为. 糖皮质激素在严重感染和感染性休克中的应用. 中国危重病急救医学, 2005, 17, 241-243.
- [18] Polito A, Lorin de la Grandmaison G, Mansart A, et al. Human and experimental septic shock are characterized by depletion of lipid droplets in the adrenals. Intensive Care Med, 2010, 36, 1852-1858.
- [19] 胡振杰, 田惠玉, 王澜涛, 等. 脓毒症早期大鼠肾上腺皮质功能变化及地塞米松的干预作用. 中国危重病急救医学, 2009, 21, 40-43.
- [20] 成令忠. 组织学. 北京, 人民卫生出版社, 1994.
- [21] 姚咏明, 刘辉, 盛志勇. 提高对神经-内分泌-免疫网络与创伤脓毒症的认识. 中华创伤杂志, 2006, 22, 561-564.
- [22] Peng J, Du B. Sepsis-related stress response, known knowns, known unknowns, and unknown unknowns. Crit Care, 2010, 14, 179.

(收稿日期: 2011-02-01)

(本文编辑: 李银平)

• 消息 •

全国中西医结合发展战略研讨会暨中国中西医结合学会成立 30 周年纪念会征文通知

中国中西医结合学会定于 2011 年 11 月在北京召开“全国中西医结合发展战略研讨会暨中国中西医结合学会成立 30 周年纪念会”。届时将邀请我国中西医结合领域的资深专家、著名学者、研究人员和中西医结合工作者齐聚北京, 共同研讨我国中西医结合发展的战略问题和关键问题。欢迎大家踊跃投稿, 到会交流。现将征文事项通知如下。

会议主题: ①以“实行中西医结合发展传统医药学”为主题, 探讨新形势下中西医结合的地位与作用、发展思路与途径; ②总结中西医结合研究进展, 交流中西医结合学术成果; ③回顾和纪念中国中西医结合学会成立 30 周年历程。

征文内容: ①探讨中西医结合医学的地位和作用, 新形势下发展中西医结合的思路、途径与方法; ②传统医学和现代医学各自的优势与不足, 传统医药学与现代医药研究如何更好地结合; ③中西医结合工作取得的具体成绩和当前存在的主要问题, 重点总结中西医结合科研、医疗、教育工作的成绩和存在问题, 在此基础上提出进一步推动中西医结合工作的建议; ④中西医结合临床医学研究进展, 以内科系统疾病为重点, 包括心血管、呼吸、消化、神经、血液、内分泌、肿瘤、老年病、急救、灾害、肝病、风湿、变态反应、肾脏、心身、养生康复等各科疾病的中西医结合研究重点、研究思路以及临床诊疗经验总结, 中西医结合新方法、新技术介绍和探讨等; ⑤中西医结合内科的临床诊疗路径和临床共性问题的研究与探讨; ⑥中国中西医结合学会成立 30 周年历程的历史回顾和经验总结; ⑦其他中西医结合相关内容。

征文要求: ①来稿要求主题突出, 观点鲜明, 科学性、先进性、可行性强。②来稿未在公开发行的学术刊物上发表过。③来稿请注明作者工作单位、职务职称、通讯地址(含邮编)和手机号码。④论文字数在 4 000 字以内, 顺序为: 文题、单位、邮编、作者姓名、摘要、正文。⑤论文排版采用 WORD 文档格式, 标题为四号黑体字, 正文为小四号宋体字; 电子稿以电子邮件附件方式发送至 caim@caim.org.cn; 来邮必复, 如未见回复, 请再次发送; 如为打印稿, 请邮寄至: 北京市东直门内南小街 16 号(邮编 100700)中国中西医结合学会, 信封左下角注明“结合战略研讨会投稿”字样, 并随信附寄含电子版 U 盘或光盘。⑥截稿日期: 2011 年 9 月 30 日。

其他事宜: ①会议具体时间、地点请待“会议报到通知”; ②参会者可获得国家级继续教育学分 6 分; ③联系人: 孔令青、毛平, 010-64025672; 010-64014411-3023, 3026; 传真: 010-64010688; 电子邮箱: caim@caim.org.cn。

(中国中西医结合学会)