

单纯卡巴胆碱或联合膳食纤维治疗 对弥漫性脑损伤后肠屏障的影响

王印华 王宝华 唐明贵 浦践一 柴海霞

(河北联合大学附属医院 重症医学科, 河北 唐山 063000)

【摘要】 目的 观察单纯卡巴胆碱或卡巴胆碱联合膳食纤维对弥漫性脑损伤后肠屏障的影响,探讨其对肠屏障的保护作用。**方法** 采用重力打击法复制成年雄性 Wistar 大鼠弥漫性脑损伤模型,致伤并复苏存活的大鼠按处理方法不同分为模型组($n=40$)、单纯卡巴胆碱组($n=40$)、卡巴胆碱联合膳食纤维组(联合组, $n=32$)。另设头皮切开对照组($n=5$)。各实验组从复苏后 2 h 开始灌胃,间隔 6 h 1 次,保证每 6 h 灌胃液体量为 15 mL/kg,不足者加生理盐水。模型组给予生理盐水 90 mL/kg;单纯卡巴胆碱组给予卡巴胆碱 300 $\mu\text{g/kg}$;联合组给予卡巴胆碱 300 $\mu\text{g/kg}$ + 膳食纤维 60 mL/kg。分别于复苏后 3(联合组除外)、6、12、24、48 h 麻醉大鼠后取材,检测各组不同时间点血浆 D-乳酸含量和二胺氧化酶(DAO)活性,光镜下观察小肠组织绒毛高度的改变。**结果** 各实验组各时间点血浆 D-乳酸含量、DAO 活性均较对照组明显升高,且差异有统计学意义(均 $P<0.01$)。随时间延长,单纯卡巴胆碱组和联合组 D-乳酸含量和 DAO 活性均较模型组逐渐降低,于伤后 48 h 达谷值[D-乳酸(ng/L): 6.32 ± 0.79 、 7.46 ± 1.67 比 17.65 ± 1.53 , DAO 活性(kU/L): 0.76 ± 0.01 、 0.86 ± 0.01 比 2.23 ± 0.15]。光镜下可见:与对照组比较,各实验组小肠组织绒毛高度呈现为逐渐下降,至 12 h 达最低,然后又逐渐升高至伤后 48 h 达最高值,单纯卡巴胆碱组和联合组均明显高于模型组(μm : 265.36 ± 10.20 、 261.54 ± 10.38 比 247.51 ± 9.39 , 均 $P<0.05$)。**结论** 弥漫性脑损伤后早期肠内给予卡巴胆碱从伤后 6 h 起即显示出肠黏膜屏障保护作用,表现为能降低血浆中 D-乳酸含量和 DAO 活性,减轻肠黏膜损伤,保护肠黏膜屏障。卡巴胆碱联合膳食纤维降低血浆 D-乳酸和 DAO 水平及减轻肠黏膜损伤的效果与单纯卡巴胆碱相当。

【关键词】 卡巴胆碱; 膳食纤维; 弥漫性脑损伤; 肠屏障

Effect of pure carbachol or combined with dietary fiber on intestinal mucosal barrier of rats after diffuse brain injury Wang Yinhua, Wang Baohua, Tang Minggui, Pu Jianyi, Chai Haixia. Department of Critical Care Medicine, Hebei United University Affiliated Hospital, Tangshan 063000, Hebei, China
Corresponding author: Tang Minggui, Email: 601066749@qq.com

【Abstract】 Objective To study the protective effect of pure carbachol or combined with dietary fiber on intestinal mucosal barrier of rats after diffuse brain injury (DBI). **Methods** An adult male Wistar rat model of DBI was reproduced by gravitational shock method. The rats injured and survived after resuscitation were divided into three groups: model group ($n=40$), carbachol group ($n=40$) and carbachol combined with dietary fiber group (combined group, $n=32$). In addition, a control group was established by simply an incision performed on the scalp, and the rats could drink freely ($n=5$). In the experimental groups, 2 hours after resuscitation the rats began to receive gavage, 6 hours once, the liquid amount 15 mL/kg should be assured in every 6 hours, and if insufficient, normal saline was supplemented. In model group, normal saline 90 mL/kg was given, in carbachol group, carbachol 300 $\mu\text{g/kg}$ was administered and in combined group, carbachol 300 $\mu\text{g/kg}$ combined with dietary fiber 60 mL/kg was supplied. At 3 (combined group being excluded), 6, 12, 24 and 48 hours after resuscitation, the rats were anesthetized to collect samples and detect the plasma levels of D-lactate and activity of diamine oxidase (DAO) respectively, and the changes of villus height of small intestine were examined by a light microscope. **Results** The plasma D-lactate levels and the activities of DAO at any time point in the experimental groups were significant higher than those in control group (all $P<0.01$). Along with the prolongation of time, the levels of plasma D-lactate and DAO activities in carbachol and carbachol plus dietary fiber groups were gradually lower than those of the model group, and at 48 hours after injury they reached their valley values [D-lactate (ng/L): 6.32 ± 0.79 , 7.46 ± 1.67 vs. 17.65 ± 1.53 , DAO activity (kU/L): 0.76 ± 0.01 , 0.86 ± 0.01 vs. 2.23 ± 0.15]. Under light microscopy, compared with control group, the villus height of small intestinal mucosa at any time point in any experimental group was gradually lowered, and reached the valley values at 12 hours, then gradually increased, and peaked at 48 hours, the villus height in carbachol group and combined group was higher than that in model group (μm : 265.36 ± 10.20 , 261.54 ± 10.38 vs. 247.51 ± 9.39 , both $P<0.05$). **Conclusion** When only carbachol is administered into the rat intestine early after diffuse brain injury in rats, beginning from 6 hours after injury, the protective effect of intestinal mucosal barrier is shown, representing decrease of plasma D-lactate level and DAO

activity, amelioration of intestinal mucosal damage and protection of intestinal mucosal barrier; under the same above situation, the carbachol combined with dietary fiber was applied, showing the similar above carbachol protective effects.

【Key words】 Carbachol; Dietary fiber; Diffuse brain injury; Intestinal mucosal barrier

肠屏障功能是防止肠道内细菌、细菌产物等逸至肠道外进入机体所特有的屏障。早在 1988 年, Wilmore 就提出了“肠道为应激的中心器官”这一具有开创性的观点。目前肠屏障功能已被公认为是判断严重创伤患者预后的重要条件之一, 当各种致伤因素如创伤、烧伤、感染、休克等作用于机体, 肠道局部微循环障碍、缺血/再灌注(I/R)损伤、肠动力障碍和肠黏膜屏障破坏等情况共同为应激下肠道细菌和内毒素移位提供了条件。肠内细菌和毒素的移位将导致脓毒症, 甚至多器官功能障碍综合征(MODS), 危重病的胃肠道功能状态决定其转归^[1]。可见保护肠屏障结构和功能的完整对防止 MODS 的发生具有重要意义。

本研究通过复制弥漫性脑损伤大鼠模型^[2], 伤后早期肠内给予单纯卡巴胆碱或卡巴胆碱联合膳食纤维, 观察二者对大鼠血浆 D-乳酸和二胺氧化酶(DAO)含量及肠绒毛病理变化的影响, 探讨早期肠内单纯给予卡巴胆碱或卡巴胆碱联合膳食纤维对肠黏膜屏障功能的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组: 选择清洁级健康成年雄性 Wistar 大鼠 170 只, 体质量 (350 ± 20) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物合格证号: SCXK(京)2002~0003。在河北联合大学附属医院骨科研究生实验中心动物房饲养 1 周后进行实验。实验前 12 h 禁食、不禁水。致伤并复苏存活的大鼠按照干预措施不同分为模型组、单纯卡巴胆碱组、联合组, 每组 8 只大鼠; 另设头皮切开对照组 5 只大鼠(只切开头皮而不致伤)。

1.2 动物模型制备及处理: 采用重力打击法制备大鼠弥漫性脑损伤模型。动物致伤并复苏成功后 2 h 开始灌胃, 间隔 6 h 1 次, 保证每 6 h 灌胃液体量为 15 mL/kg, 不足者加生理盐水。模型组致伤并复苏后给予生理盐水 90 mL/kg; 单纯卡巴胆碱组致伤并复苏后给予卡巴胆碱 300 μ g/kg; 联合组致伤并复苏后给予卡巴胆碱 300 μ g/kg+ 膳食纤维 60 mL/kg。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 观察指标及方法: 于伤后 3(联合组除外)、6、12、24、48 h 进行下列指标检测。

1.3.1 弥漫性轴索损伤的判断: 动物表现为呼吸抑

制、四肢抽搐、昏迷等; 颅脑组织大体解剖改变: 蛛网膜下腔出血、脑室出血、点片状脑实质出血; 颅脑组织的镜下改变: 神经元水肿、细胞间隙扩大、空泡变性, 小胶质细胞增多甚至出现神经细胞卫星现象。

1.3.2 血浆 D-乳酸含量和 DAO 活性的测定: 将大鼠深度麻醉状态下常规消毒腹部皮肤, 打开腹腔, 用一次性无菌注射器穿刺心尖部入左心室, 用加有肝素的试管取血 4~5 mL, 4℃离心 12 min, 吸取上清液 1 mL, -70℃保存检测。采用改良的酶学分光光度法测定血浆中 D-乳酸含量; 采用分光光度法测定血浆 DAO 活性。

1.3.3 肠黏膜绒毛高度测定: 取血后在距回盲部 5 cm 处向头部取 2 cm 长小肠组织观察黏膜损伤情况, 然后清洗、固定、包埋后, 每个时间点、每只动物标本均取不连续切片 5 张, 切片厚度为 4 μ m, 行苏木素-伊红(HE)染色。采用 HPIAS-1000 彩色病理图像分析系统在光镜下进行观察, 每张切片顺次取奇数视野, 测定 20 个小肠绒毛的高度。

1.4 统计学处理: 使用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较用 *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 一般状况(表 1): 致伤大鼠中 103 只存活, 各组大鼠死亡分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。对照组 5 只动物均无死亡。各组大鼠体质量分布差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 各组血浆 D-乳酸含量、DAO 活性比较(表 2): 与对照组比较, 伤后各组各时间点血浆 D-乳酸含量、DAO 活性均明显升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$); 与模型组比较, 随时间延长, 单纯卡巴胆碱组和联合组各时间点 D-乳酸含量和 DAO 活性均逐渐降低, 于伤后 48 h 达谷值; 伤后 6 h 单纯卡巴胆碱组 D-乳酸含量较联合组降低且差异有统计学意义($P < 0.05$), 其余各时间点比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.3 肠黏膜损伤情况

2.3.1 大体标本检查(表 3): 致伤动物符合弥漫性轴索损伤者占 92.5%, 小肠黏膜镜检有损伤改变者占 87.2%, 各组间弥漫性轴索损伤、小肠黏膜损伤分

表 1 各组不同时间点动物一般情况比较

组别	时间	动物数 (只)	存活情况(只)		体质量 (g, $\bar{x} \pm s$)
			死亡	存活	
对照组		5	0	5	348.80 ± 23.74
模型组	伤后 3 h	8	1	7	346.86 ± 24.22
	伤后 6 h	8	1	7	354.71 ± 21.74
	伤后 12 h	8	1	7	348.88 ± 24.79
	伤后 24 h	8	0	8	349.29 ± 18.96
	伤后 48 h	8	0	8	346.71 ± 22.67
单纯卡巴胆碱组	伤后 3 h	8	1	7	346.75 ± 20.04
	伤后 6 h	8	0	8	348.43 ± 19.92
	伤后 12 h	8	1	7	349.17 ± 21.64
	伤后 24 h	8	1	7	344.36 ± 23.19
	伤后 48 h	8	1	7	350.14 ± 20.26
联合组	伤后 6 h	8	1	7	349.25 ± 20.54
	伤后 12 h	8	0	8	347.43 ± 21.35
	伤后 24 h	8	1	7	345.25 ± 20.19
	伤后 48 h	8	0	8	348.00 ± 23.18

表 2 各组动物血浆 D-乳酸含量和 DAO 活性的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	动物数 (只)	D-乳酸 (ng/L)	DAO 活性 (kU/L)
对照组		5	2.15 ± 0.76	0.25 ± 0.05
模型组	伤后 3 h	7	33.41 ± 1.61 ^a	1.44 ± 0.16 ^a
	伤后 6 h	7	35.48 ± 1.50 ^a	1.60 ± 0.06 ^a
	伤后 12 h	7	34.40 ± 1.51 ^a	1.34 ± 0.15 ^a
	伤后 24 h	8	14.54 ± 1.52 ^a	1.45 ± 0.02 ^a
	伤后 48 h	8	17.65 ± 1.53 ^a	2.23 ± 0.15 ^a
单纯卡巴胆碱组	伤后 3 h	7	31.96 ± 0.73 ^{ab}	1.18 ± 0.09 ^{ab}
	伤后 6 h	8	31.52 ± 1.57 ^{ab}	1.48 ± 0.01 ^{ab}
	伤后 12 h	7	30.61 ± 1.74 ^{ab}	0.96 ± 0.02 ^{ab}
	伤后 24 h	7	10.62 ± 1.56 ^{ab}	0.86 ± 0.02 ^{ab}
	伤后 48 h	7	6.32 ± 0.79 ^{ab}	0.76 ± 0.01 ^{ab}
联合组	伤后 6 h	7	33.66 ± 1.47 ^{abc}	1.52 ± 0.03 ^{ab}
	伤后 12 h	8	31.52 ± 1.51 ^{ab}	0.99 ± 0.03 ^{ab}
	伤后 24 h	7	11.33 ± 1.44 ^{ab}	0.96 ± 0.18 ^{ab}
	伤后 48 h	8	7.46 ± 1.67 ^{ab}	0.86 ± 0.02 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组同期比较,^b $P < 0.05$;与单纯卡巴胆碱组同期比较,^c $P < 0.05$

布差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.3.2 光镜下观察各组大鼠小肠组织绒毛高度的变化(表 3):与对照组比较,各组伤后各时间点小肠组织绒毛高度均降低,随时间延长,单纯卡巴胆碱组和联合组肠绒毛高度均较模型组升高,于伤后 48 h 达峰值($P < 0.05$)。单纯卡巴胆碱组和联合组各时间点比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

表 3 各组动物肠道黏膜镜检及肠绒毛高度比较

组别	时间	动物数 (只)	弥漫性轴索 损伤(只)	小肠黏膜 损伤(只)	绒毛高度 (μm , $\bar{x} \pm s$)
对照组		5	0	0	270.10 ± 14.31
模型组	伤后 3 h	8	8	7	233.48 ± 12.63 ^a
	伤后 6 h	8	7	7	222.39 ± 12.50 ^a
	伤后 12 h	8	8	7	206.91 ± 12.40 ^a
	伤后 24 h	8	7	6	225.81 ± 10.00 ^a
	伤后 48 h	8	7	7	247.51 ± 9.39 ^a
单纯卡巴胆碱组	伤后 3 h	8	8	8	240.96 ± 11.36 ^{ab}
	伤后 6 h	8	7	6	232.33 ± 10.55 ^{ab}
	伤后 12 h	8	7	7	219.61 ± 9.14 ^{ab}
	伤后 24 h	8	7	6	240.08 ± 13.91 ^{ab}
	伤后 48 h	8	8	8	265.36 ± 10.20 ^{ab}
联合组	伤后 6 h	8	7	7	231.03 ± 11.32 ^{ab}
	伤后 12 h	8	8	7	210.96 ± 8.97 ^a
	伤后 24 h	8	7	7	238.30 ± 10.85 ^{ab}
	伤后 48 h	8	8	8	261.54 ± 10.38 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组同期比较,^b $P < 0.05$

3 讨论

严重颅脑损伤后机体会出现复杂的适应性变化,如选择性内脏血管痉挛以保持心脑等重要器官的血液供应,但应激反应过程中存在肠黏膜血流量丰富、内含大量动静脉短路等生理特点,更容易受到应激的损害,使肠黏膜发生屏障结构及功能的改变。

肠道除具有重要的消化和排泄功能外,也可产生大量的肠源性炎性介质,是重要的神经-内分泌-免疫系统调节枢纽,决定了肠道在全身炎症反应综合征(SIRS)/MODS 中的关键作用^[3]。

目前,如何保护肠黏膜屏障以防止细菌移位成为各国学者研究的热点。胆碱能抗炎通路是一条新的神经-内分泌抗炎路径^[4],卡巴胆碱是一种人工合成的拟胆碱药物,它能同时作用于 M 样和 N 样胆碱能受体,不仅能扩张血管、促进胃肠动力、增加腺体分泌,还能减轻局部和全身炎症反应^[5-6]。动物实验研究发现,在大鼠弥漫性脑损伤后的早期,小肠黏膜中可见大量的炎性细胞浸润,绒毛上皮坏死脱落^[7-9];早期胃肠道给予具有抗炎反应的卡巴胆碱,能显著减轻模型动物肠 I/R 损伤后肠黏膜的炎症反应和病理损伤^[10]。同时研究表明,创伤早期胃肠道麻痹主要在胃和结肠^[11],而此时小肠仍有吸收功能,故创伤后早期进行肠内营养有利于改善小肠供血,保护肠黏膜屏障。研究表明,早期给予单纯膳食纤维的肠内营养能改善肠黏膜形态,降低肠黏膜通

透性^[12]。本研究观察肠内应用卡巴胆碱的同时加用膳食纤维对肠屏障的影响,以探讨早期肠内应用卡巴胆碱联合膳食纤维是否在保护肠屏障功能方面能较单纯卡巴胆碱的作用更好。

DAO 是一种具有高度活性的细胞内酶,是反映小肠黏膜结构和功能的理想指标^[13]。D-乳酸是目前较为公认的评价肠黏膜屏障功能的指标^[14-15],主要是由胃肠道细菌发酵产生,正常情况下很少被吸收,并且哺乳动物不具备将其快速降解的酶系统。当肠屏障受损时,肠道中细菌产生的大量 D-乳酸通过受损的肠黏膜经局部循环进入血液,故检测血中 D-乳酸水平可及时反映肠黏膜损害程度^[16]。同时监测 D-乳酸含量和 DAO 活性,对判断颅脑损伤后肠屏障变化意义更大^[17]。本研究结果显示,I/R 后血浆 D-乳酸含量和 DAO 活性显著升高,提示小肠黏膜通透性发生了变化。复苏成功后肠内给予卡巴胆碱或卡巴胆碱联合膳食纤维,6~48 h 血浆中 D-乳酸含量较对照组有显著降低,且单纯卡巴胆碱组在 6 h 时较联合组即显示出明显优势。3~48 h 血浆 DAO 活性较对照组有显著降低。

研究发现,创伤性脑损伤后可发生严重的肠黏膜结构性损害,形态学改变包括上皮细胞脱落、绒毛断裂和融合、局灶性溃疡、中央乳糜管扩张、黏膜萎缩、绒毛间质和固有层水肿等,这些损害在颅脑损伤后 3 h 即可发生,持续 7 d 左右^[18]。光镜下定量观察小肠绒毛高度的变化可反映肠屏障功能的变化。本实验表明,大鼠颅脑损伤后肠黏膜绒毛高度较对照组明显降低,单纯卡巴胆碱组于伤后 12~48 h、联合组于 24~48 h 肠绒毛高度较对照组有改善。

从实验结果看,虽然各种干预方式均能减轻弥漫性脑损伤后肠黏膜损伤,降低肠上皮的通透性,但膳食纤维联合卡巴胆碱较单纯的卡巴胆碱并未能显示出更好的保护弥漫性脑损伤后肠屏障的作用,推测可能与膳食纤维促进胃肠蠕动、从而干扰卡巴胆碱的作用时间有关。

参考文献

- [1] 孔立,郭琪钰,赵浩.脓毒症胃肠功能障碍中医证候分布规律探讨[J].中国中西医结合急救杂志,2013,20(3):134-137.
- [2] Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, et al. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics[J]. J Neurosurg, 1994, 80(2): 291-300.
- [3] 陈新河,肖奇明.多器官功能障碍综合征的肠保护治疗进展[J].中国中西医结合急救杂志,2014,21(2):155-158.
- [4] 项辉,胡波,李建国.对胆碱能抗炎通路研究的新认识[J].中华危重病急救医学,2012,24(3):185-188.
- [5] 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].中华危重病急救医学,2003,15(12):748-750.
- [6] 胡森,曹卫红,孙丹,等.卡巴胆碱对肠部分缺血/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].中华危重病急救医学,2005,17(1):49-52.
- [7] Wolf SE, Ikeda H, Matin S, et al. Cutaneous burn increases apoptosis in the gut epithelium of mice[J]. J Am Coll Surg, 1999, 188(1):10-16.
- [8] 王兴鹏,王冰娴,吴恺,等.细胞凋亡在急性坏死型胰腺炎早期肠黏膜上皮细胞死亡中的作用[J].中华消化杂志,2001,21(5):267-270.
- [9] 潘文东.肠上皮细胞凋亡与缺血/再灌注损伤[J].国外医学生理病理科学与临床分册,2000,20(3):216-218.
- [10] 胡森,曹卫红,孙丹,等.卡巴胆碱对肠部分缺血/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].中华危重病急救医学,2005,17(1):49-52.
- [11] Goodlad RA, Lenton W, Ghatei MA, et al. Effects of an elemental diet, inert bulk and different types of dietary fibre on the response of the intestinal epithelium to refeeding in the rat and relationship to plasma gastrin, enteroglucagon, and PYY concentrations[J]. Gut, 1987, 28(2):171-180.
- [12] 邱方,张宏伟,王瑞刚,等.复合膳食纤维对重型颅脑损伤大鼠肠屏障的保护作用[J].感染、炎症、修复,2004,5(4):131-135.
- [13] 袁丽珍,董红林.放射损伤后肠粘膜和血浆中二胺氧化酶活性的变化[J].中华放射医学与防护杂志,1994,14(1):32-34.
- [14] Meddings J. The significance of the gut barrier in disease[J]. Gut, 2008, 57(4):438-440.
- [15] Laine L, Takeuchi K, Tarnawski A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside[J]. Gastroenterology, 2008, 135(1):41-60.
- [16] 李鸣,詹怀义,叶建平.丙氨酰-谷氨酰胺对重型颅脑损伤后肠黏膜通透性的影响作用[J].医学研究杂志,2012,41(6):132-134.
- [17] 陈秀凯,蒲践一,邱方,等.二胺氧化酶与 D-乳酸对脑损伤大鼠肠屏障功能的监测意义[J].中国煤炭工业医学杂志,2003,6(7):669-671.
- [18] 杭春华,史继新,黎介寿,等.创伤性脑损伤后肠黏膜结构和屏障功能的变化[J].肠外与肠内营养,2005,12(2):94-98.

(收稿日期:2015-04-22)(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊对论文中实验动物描述的有关要求

在医学论文的描述中,凡涉及到实验动物应符合以下要求:①品种、品系描述清楚;②强调来源;③遗传背景;④微生物学质量;⑤明确体质量;⑥明确等级;⑦明确饲养环境和实验环境;⑧明确性别;⑨有无质量合格证明;⑩有对饲养的描述(如饲料类型、营养水平、照明方式、温度、湿度要求);⑪所有动物数量准确;⑫详细描述动物的状况;⑬对动物实验的处理方式有单独清楚的交代;⑭全部有对照,部分可采用双因素方差分析;⑮尤其是要注明本实验的动物处置过程是否符合动物伦理学要求。