

猪门静脉回流阻断模型内毒素的移位

陈宇, 黄文起, 黑子清, 江楠, 郭隽英, 苏松德
(中山大学附属第一医院麻醉科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】拟在猪的肠血管阻断模型中探讨门静脉回流阻断肠淤血可能造成的内毒素移位和肿瘤坏死因子释放。【方法】采用种群相近体质量 22~25 kg 雌性小猪 8 只, 无感染症状。分离门静脉和肝后下腔静脉分别阻断, 然后开放各 60 min, 观察血压、心率, 阻断前和开放 60 min 各取回肠末端小肠全层行光镜、电镜检查, 测定门、颈静脉血内毒素及肿瘤坏死因子(TNF- α)含量。【结果】门静脉和肝后下腔静脉阻断后, 肠淤血、水肿, 并随时间延长而加重, 光镜检查表明实验后肠粘膜和腺体明显损伤, 电镜检查表明细胞超微结构轻微异常。阻断前后的血内毒素、TNF- α 含量无显著性差异。【结论】①肠静脉回流阻断 60 min 引起的肠道淤血可导致肠粘膜屏障损伤。②在 60 min 内肠淤血性的损伤不会引起肠腔内内毒素的大量移位及 TNF- α 的释放。

关键词: 小肠; 淤血; 细菌移位; 内毒素; 门静脉

中图分类号: R614

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)06-0635-04

Endotoxin Translocation Induced by Intestinal Venous Congestion in Pigs

CHEN Yu, HUANG Wen-qi, HEI Zi-qing, JIANG Nan, GUO Jun-ying, SU Song-de

(Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital, SUN Yet-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate enteric endotoxin translocation and tumour necrosis factor (TNF- α) release induced by intestinal venous congestion caused by portal vein clamping. 【Methods】 22~25 kg of 8 young female pigs without infectious symptoms were selected. Followed laparotomy, portal vein and retrohepatic vena cava were cross-clamped for 60 min and then released for another 60 min. Mean arterial pressure and heart rate were monitored during the surgery. A small segment of distal ileum was removed before cross-clamping and 60 min after reperfusion for determination of histopathology damage using light microscopy and transient electron microscopy. The plasma endotoxin and tumour necrosis factor (TNF- α) level of portal and systematic circulation were determined in blood samples taken from portal vein and jugular vein. 【Results】 With progressive time of portal vein clamping, appearance of the gut was turned to progressive dark blue with edema formation. Light microscopic examination showed significant injury of intestinal villi and glands after reperfusion. Electron microscopic examination showed mild ultrastructural changes, which not occurred uniformly. There were no significant difference in changes of blood endotoxin and TNF- α levels before and after clamping. 【Conclusions】①The intestinal congestion followed by vein clamping can cause gut barrier damage after 60 min. ②The degree of gut barrier damage caused by intestinal congestion within 60 min is not severe enough to cause endotoxin translocation and tumour necrosis factor alpha released.

Key words: intestine, small; congestion; bacterial translocation; endotoxin; portal vein

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26(6):635-638]

肝移植手术的无肝期, 必须阻断门静脉 50 min 左右, 门静脉压力病理性增高或人为阻断均可导致肠道血液回流的障碍而引起肠淤血。研究报告, 与肠缺血相比, 肠淤血更容易引起肠组织的损

伤, 其程度随淤血时间的增长而加重^[1]。人肠道中含有潜在性致病菌达 1×10^9 个, 肠源性的细菌及其产生的内毒素移位是引起术后严重的炎症反应和心、肺、肾等多器官功能衰竭的重要原因^[2]。目前肝移

收稿日期: 2005-05-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070733); 广东省卫生厅科研基金资助项目(A2000156)

作者简介: 陈宇(1971-), 女, 广东南海人, 主治医师; 黄文起, 教授, 通讯作者。E-mail: azureyak@21cn.com

植手术是否使用门静脉转流仍存在争议。门静脉转流可减轻肠淤血,但增加了手术操作的复杂性和创伤。门静脉阻断对内毒素移位的影响目前尚无定论。无肝期的肠淤血引起的损伤是否足以引起肠道内的内毒素移位,激发机体的炎症级联反应,本研究将就此进行探讨。

1 材料方法

1.1 实验动物

中山大学附属第一医院动物实验中心(为国家级实验中心)提供。选年龄约 6 个月,体质量 22~25 kg,雌性、种群相近的小猪 8 只,无皮肤感染灶,无感染症状。实验前 12 h 禁食、禁饮。

1.2 动物麻醉及监护

肌肉注射氯胺酮 300 mg + 东莨菪碱 0.3 mg 麻醉小猪后,连接多功能生理参数监护仪(美国惠普 M3 型)连续监测心电图(ECG)变化。以 10 g/L 普鲁卡因局麻下行气管切开,插入管径 6.0~6.5 号气管导管,连接呼吸机(美国鸟牌 6400 型)机控呼吸;分离右颈外静脉,插入 14 gauge 无菌静脉导管监测中心静脉压(CVP)输液、采外周血标本;分离右颈动脉,插入 16 gauge 无菌静脉导管,经压力传感器接监护仪测平均动脉血压(ABP)。

麻醉维持:静脉滴注氯胺酮,间断推注芬太尼、咪唑安定、维库溴铵。术中管理:监测血气,调节呼吸机参数,维持动脉血氧饱和度 98%~100%,动脉血二氧化碳分压 30~50 mmHg。补液根据 ABP、CVP 等参数,使用乳酸钠林格氏液、琥珀酰明胶和羟乙基淀粉静脉滴注。门静脉、下腔静脉开放前常规静脉滴注 50 g/L 碳酸氢钠。严格止血,出血量不超过 200 mL。

1.3 动物手术

在严格消毒无菌下进行。肋下八字切口,逐层分离,打开腹腔。寻找回肠末端,缝 4 号丝线做标记。仔细分离门静脉及肝后下腔静脉,门静脉穿刺插入 16 gauge 静脉留置针,固定,以备门静脉采血。然后分别阻断 60 min,松开阻断钳,继续观察 60 min,结束实验。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 血液动力学 麻醉后连续监测平均动脉血压(ABP, p_a /mmHg)以及心率(HR, r_h/min^{-1})。

1.4.2 光学显微镜检查 阻断前、开放后 60 min

分别取回肠末端 1~2 cm 小肠全层,即以多聚甲醛液固定,经石蜡包埋、切片,HE 染色,行改良 Chill's 评分。Chill's 评分标准:按肠粘膜的损伤按绒毛的变化分成 0~5 分,腺体的变化分成 0~4 分,二者相加为积分值。0 分:正常绒毛和腺体;1 分:部分绒毛顶部上皮 Gruenhagen's 腔开始形成;2 分:上皮 Gruenhagen's 腔形成,腺体轻度受损;3 分:上皮间隙扩大,毛细血管充血;4 分:上皮与固有层中度分离,腺体受损;5 分:部分顶部绒毛脱落;6 分:绒毛脱落明显,毛细血管扩张;7 分:固有层绒毛脱落,腺体受损明显;8 分:固有层开始消化、分解;9 分:出血、溃疡。

1.4.3 电子显微镜检查 阻断前、开放后 60 min 取回肠末端全层肠段,在电子透射显微镜(日本,日立 H600)下观察细胞超微结构的变化。

1.4.4 血浆内毒素(Et)含量 阻断前、阻断后 30 min、阻断后 60 min、开放 15 min、开放 60 min 分别抽取门静脉、颈静脉血各 3 mL,用鲎试剂盒(上海依华临床医学科技公司)按试剂盒说明操作,以偶氮基质法定量检测内毒素含量。实验用品均严格去热源处理。

1.4.5 血浆肿瘤坏死因子(TNF- α)含量 阻断前、阻断 30 min、阻断 60 min、开放 15 min、开放 60 min 分别取门静脉、颈静脉血用肿瘤坏死因子放免试剂盒(北京东亚免疫技术研究所)按试剂盒说明操作,以放免法测肿瘤坏死因子(TNF- α)含量。

1.5 统计学分析

所有数据输入电脑,采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理。阻断及开放后各时间点的血压、心率的变化比较采用单因素方差分析(one way ANOVA),与术前值的比较采用最小有意义差异 t 检验(least significant difference- t ,LSD- t);肠粘膜 Chill's 评分采用两个相关样本的秩和检验(nonparametric 2 related samples test);内毒素及肿瘤坏死因子(TNF- α)浓度比较采用连续型重复测量资料的方差分析方法(repeated measurement ANOVA)。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

8 只小猪质量 22~25 kg,均为雌性,无感染征象。术中均存活,麻醉满意。术中出血 100~200 mL。

动脉血气分析术中无缺氧,二氧化碳蓄积,酸、碱平衡和电解质基本正常。阻断前血压、心率基本正常;阻断后血压低、心率快,与术前相比差异显著;开放

后血压、心率回复,与手术前比较差异无统计学意义(表-1)。

2.2 光镜检查

表1 8只猪肠静脉阻断平均动脉压和心率变化 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Changes of mean arterial pressure and heart rate in intestinal venous congestion in 8 pigs

	PO	PC	T _{15 a,c}	T _{30 a,c}	T _{60 a,c}	T _{15 a,r}	T _{30 a,r}	T _{60 a,r}
p_a' (mmHg)	116±14	117±16	62±10 ¹⁾	58±21 ¹⁾	56±20 ¹⁾	83±35 ²⁾	95±34	104±52
<i>P</i>		0.896	0.000	0.000	0.000	0.026	0.143	0.427
r_h' (min ⁻¹)	118±10	108±13	145±38	172±33 ¹⁾	165±39 ²⁾	142±32	136±28	145±31
<i>P</i>		0.547	0.084	0.001	0.011	0.188	0.266	0.166

PO: pre-operation; PC: pre-clamping; T_{15 a,c}: 15 min after clamping; T_{30 a,c}: 30 min after clamping; T_{60 a,c}: 60 min after clamping; T_{15 a,r}: 15 min after reperfusion; T_{30 a,r}: 30 min after reperfusion; T_{60 a,r}: 60 min after reperfusion. p_a' (mmHg): Mean arterial pressure (ABP); r_h' (min⁻¹): heart rate (HR). $F_{ABP} = 6.139, P_{ABP} = 0.000; F_{HR} = 3.338, P_{HR} = 0.035$. 1) Compared with pre-operation. $P < 0.01$; 2) Compared with pre-operation, $P < 0.05$

血管阻断前 Chill's 评分最高 2 分; 血管开放后最高为 9 分, 表现为粘膜出血, 其次为 4 分, 为固有层与上皮层的中度分离; 其他例损害主要表现为绒毛和腺体的中至轻度损伤, 评 3 分。阻断前、开放后对比, 差异有统计学意义(表 2, 其中一只数据缺失), 实验后肠黏膜与实验前相比出现损害。

2.2 电镜检查

阻断前小肠上皮游离面的微绒毛排列整齐, 长度大致相等。吸收细胞、分泌细胞形态大小正常。细胞间排列紧密, 可见桥粒、紧密连接等细胞间连接复合体。线粒体、内质网、细胞核形态正常。偶见凋亡细胞。阻断后两只见部分微绒毛缺损、倒伏; 一只见细胞间隙增宽; 两只见细胞间隙明显增宽, 细胞间连接复合体消失; 两只见部分细胞肿胀; 线粒体肿胀, 嵴变短, 模糊, 粗面内质网扩张; 1 只出现大量细胞凋亡。

2.4 内毒素含量

各时间点差别及门静脉、体静脉差异均无统计学意义(表 3)。

2.4 肿瘤坏死因子(TNF-α)含量

各时间点差别以及门体静脉血之间差别, 差异均无统计学意义(P 均 > 0.05 , 表 3)。

表2 Chill's 评分 ($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 2 Results of the Chill's grading system (1 lost)

Number of the animal	1	2	3	4	5	6	7
Before experiment	2	0	0	2	0	0	1
After experiment	3	4	9	3	3	2	3

Significant difference of Chill's grading system was found before cross-clamping and after reperfusion, $Z = -2.375, P = 0.018$

表3 8只猪肠静脉阻断血内毒素、血肿瘤坏死因子-α含量 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Concentration of plasma endotoxin and TNF-α in portal and external jugular vein before and after clamping in 8 pigs

	PC		T _{30 a,c}		T _{30 a,r}		T _{15 a,r}		T _{60 a,r}	
	Portal vein	Jugular vein	Portal vein	Jugular vein	Portal vein	Jugular vein	Portal vein	Jugular vein	Portal vein	Jugular vein
Endotoxin / (EU/mL)	0.28±0.08	0.27±0.07	0.27±0.18	0.19±0.06	0.31±0.04	0.27±0.18	0.28±0.10	0.23±0.09	0.22±0.14	0.21±0.18
$\rho_{TNF-\alpha}$ / (ng/mL)	0.96±0.11	1.07±0.13	0.97±0.10	0.72±0.11	0.90±0.12	0.83±0.07	0.92±0.10	1.04±0.13	1.11±0.25	1.02±0.10

Repeated measurement ANOVA. Endotoxin: Compared within time point $F=1.614, P=0.185>0.05$; Portal vein levels compared with Jugular vein levels $F=1.002, P=0.335>0.05$. TNF-α: Compared within time point $F=1.373, P=0.257>0.05$; Portal vein levels compared with Jugular vein levels, $F=0.102, P=0.755>0.05$

3 讨论

肠道中的潜在致病菌多为 G 杆菌, 通过释放其细胞壁中的脂多糖成分-内毒素而致病。正常情况下, 肠道的屏障功能使细菌和其产生的内毒素局

限在肠腔内^[3], 细菌、内毒素移位受肠道的正常菌群比例、肠屏障解剖与功能的完整性、机体的免疫系统、肝 Kupffer 细胞的清除能力以及机体所受创伤大小等因素影响, 其中肠粘膜上皮层功能的完整性起最主要的作用。在其他因素基本正常的条件下, 肠粘膜上皮层通透性的改变为细菌、内毒素移

位的主要原因,移位内毒素的量与肠粘膜损伤的严重性相关^[4]。缺血、缺氧、缺血再灌注损伤等可导致肠黏膜通透性改变^[5-7]。内毒素则主要通过通透性受损的细胞膜穿越肠粘膜上皮细胞到达固有层、粘膜下层再转至肠外,进入体循环^[8],并激活单核巨噬细胞系统。特别是 Kupffer 细胞内的一些蛋白酶磷酸化的级联反应,首先诱导产生 TNF- α 。它可与组织细胞表面的特异性受体结合,通过抑制这些细胞生长,介导细胞毒性,阻碍细胞的分化以及引起蛋白质磷酸化而发挥毒性效应^[9,10],并继而诱导产生其他的细胞因子,临床上表现为发热、低血压、DIC、肺水肿、中毒性休克、多器官功能衰竭等^[11]。

本研究选用与人类接近的大动物(猪)作为实验动物。门静脉及肝后下腔静脉阻断后,回心血量剧减,血压明显下降,心率反射性增快。肠的病理改变主要为组织间隙的水肿,而细胞膜、细胞器膜等超微结构的损伤轻微,膜的通透性改变不大,因此血内毒素的含量没有发生显著性变化。内毒素是诱导 TNF- α 释放的最强力的因素,两者存在正相关。在对每一只实验动物各项结果的综合分析中发现,电镜下见到大量凋亡细胞的 1 只动物,光镜检查实验后粘膜层出血明显,Chill's 评分分值最高,而阻断期内毒素的含量在各例中也显示最高,说明了内毒素移位程度与肠粘膜损伤程度有关。本实验表明,对于原本结构完整、功能正常的肠道,可以在一定时间内良好地耐受肠静脉回流阻断引起的肠淤血损伤,在损伤没有超出机体调节和自我修复能力的时候,内毒素不会大量进入循环;微量的内毒素可进一步被肝脏功能正常的 Kupffer 细胞清除,而不会引发炎症反应级联效应的产生。无肝期不行门静脉转流似乎是安全的。但对于外科高危病人,其肠道功能、血流动力学已经受损,或者已出现内毒素的移位,肠静脉回流阻断肠道长时间淤血带来的创伤和内毒素移位也许会非常严重,再加上其他危险因素的叠加作用,可能是致命的。

总之,肠静脉回流阻断引起的肠道淤血可导致肠粘膜屏障损伤;在 60 min 内肠淤血性的损伤尚不会引起肠腔内内毒素的大量移位及 TNF- α 的释放。

参考文献:

- [1] Yano K, Hata Y, Matsuka K, *et al.* Time limit for ischemia and congestion: an experimental study in rats [J]. *Ann Plas Surgery*, 1994, 32(3): 310-4.
- [2] Matejovic M, Rokyta R Jr, Krouzecky A, *et al.* Gastrointestinal tract dysfunction in critical illness [J]. *Cas Lek Cesk*, 2002, 141(2): 46-50.
- [3] Amoureux MC. Pathophysiological role of endotoxins, a common denominator to various diseases[J]. *Pathol Biol*. 2004, 52(7): 415-22.
- [4] Schafer C, Parlesak A, Schutt C, *et al.* Concentrations of lipopolysaccharide-binding protein, bactericidal/permeability-increasing protein, soluble CD14 and plasma lipids in relation to endotoxaemia in patients with alcoholic liver disease[J]. *Alcohol Alcohol*, 2002, 37(1): 81-6.
- [5] Moore-Olufemi SD, Xue H, Attuwaybi BO, *et al.* Resuscitation-induced gut edema and intestinal dysfunction[J]. *J Trauma*, 2005, 58(2): 264-70.
- [6] Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes [J]. *World J Surg*, 1996, 20(4): 411-7.
- [7] Sun Z, Wang X, Deng X, *et al.* Phagocytic and intestinal endothelial and epithelial barrier function during the early stage of small intestinal ischemia and reperfusion injury[J]. *Shock*, 2000, 13(3): 209-16
- [8] Hurley BP, Thorpe CM, Acheson DW. Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration[J]. *Infect Immun*, 2001, 69(10): 6148-55.
- [9] Robertshaw HJ, Brennan FM. Release of tumour necrosis factor alpha (TNFalpha) by TNF alpha cleaving enzyme (TACE) in response to septic stimuli *in vitro* [J]. *Br J Anaesth*, 2005, 94(2): 222-8.
- [10] 王永明,刘友生. 烧伤合并内毒素血症早期肠粘膜损害机制的研究[J]. *第三军医大学学报*, 2000, 22(3): 207-9.
- [11] Kennedy JA, Lewis H, Clements WD, *et al.* Kupffer cell blockade, tumour necrosis factor secretion and survival following endotoxin challenge in experimental biliary obstruction[J]. *British J Surgery*, 1999, 86(11): 1410-4.

(编辑 张敏瑞)