

高渗溶液复苏大鼠创伤失血性休克对肠道粘膜形态学和屏障功能的影响

张良成¹, 王宏梗², 周琳瑛³, 袁世英⁴, 郭永正¹, 曾邦雄⁴ (1. 福建医科大学附属协和医院, 福建 福州 350001; 2. 福建医科大学附属第二医院, 福建 泉州 362000; 3. 福建医科大学电镜室, 福建 福州 350004; 4. 华中科技大学附属协和医院, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 观察小容量高张溶液和大容量晶体联合小量胶体溶液分别复苏创伤失血性休克大鼠后肠道屏障功能的变化。方法 SD大鼠 24 只按随机原则分成假创伤休克对照(Sham)组、创伤失血性休克高张溶液(HTH)组和大容量晶体(LRH)组,应用光镜、常规电镜和电镜化学技术观察小肠黏膜形态学变化,采用细菌培养技术观察肠源性细菌肠道外组织移位发生率,以判定肠道屏障功能状况。结果 假创伤失血性休克组大鼠肠道黏膜层上皮细胞结构完整,固有层有少量淋巴细胞;电镜下上皮细胞膜肠腔侧微绒毛排列紧密、整齐,细胞膜完整;电镜化学技术仅偶见“暗细胞”;无细菌移位现象。LRH组光镜下见黏膜上皮细胞水肿,部分细胞甚至坏死脱落形成糜烂,固有层水肿疏松,并见较多淋巴细胞及多少不等的中性粒细胞浸润;电镜下小肠黏膜上皮细胞表面微绒毛脱落,部分上皮细胞膜破损,胞浆基质外溢,有的细胞胞浆内线粒体肿胀,上皮细胞间和固有层内可见较多淋巴细胞及中性粒细胞浸润;电镜化学技术单宁酸染色可见小肠黏膜上皮“暗细胞”明显增多;细菌移位发生率 87.5%。HTH组光、电镜下形态学损伤性改变明显减轻;单宁酸染色仅见少量“暗细胞”;细菌移位率仅 12.5%,明显低于 LRH组。结论 大鼠创伤失血性休克大容量晶体复苏后肠道黏膜形态结构有明确的损伤性改变,肠道上皮层细胞膜通透性增高,导致肠道屏障功能不全、细菌移位;小容量高张溶液复苏可明显减轻肠道黏膜的损伤,改善肠道屏障功能。

关键词:创伤失血性休克;复苏;肠道屏障;形态学;细菌移位

中图分类号:R541.64 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2004)06-0438-05

Alterations of intestinal morphology and barrier function after two projects resuscitation for traumatic/hemorrhagic shock

ZHANG Liang-cheng (Department of Anesthesiology, the Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To investigate changes of morphological and barrier function in intestinal mucosa after two projects-large volume crystalloid combined with small volume colloid (lactic acid Ringer's solution / 6% hydroethylstarch) or small volume resuscitation for traumatic hemorrhagic shock. **METHOD** The morphological alterations were examined under light microscope, electron microscope and cellular chemical technique. Blood and homogenates of mesenteric lymph nodes, livers and spleens were cultured for gut-original bacteria to evaluate gut barrier function. **RESULTS** 24 h after large volume crystalloid resuscitation, the histologic evidence of intestinal injury can be detected under electron microscope and cellular chemical technique as well as under light microscope. But the histologic injuries in intestinal mucosa are slighter in rats in HTH treated group. Compared the frequencies of bacterial translocation in two groups, the rate in LRH group, with the happening of 87.5%, was more higher than that in HTH group, which was 12.5%. ($P < 0.001$). **CONCLUSION** The treatment for THS with small volume HTH can attenuated the intestinal mucosa barrier damage, associated with reducing frequency of bacterial translocation.

KEY WORDS: shock/ traumatic hemorrhagic; resuscitation; intestinal mucosa barrier; morphology; bacterial translocation

容量复苏是救治创伤失血性休克(tramaic hemorrhagic shock, THS)的最根本措施之一,但近来发现,大容量晶体复苏后肠道屏障功能可发生损伤,导致肠源性细菌移位于肠道外组织。小容量高张盐水复苏 THS 对血流动力学的改善作用已为众多研究所证实,但有关其对肠道屏障结构形态学及屏障功能如何影响有待进一步探讨。

1 材料和方法

1.1 大鼠创伤失血性休克模型制作与分组

24 只 SD 雄性大鼠(西普尔-必凯公司 上海)体重 365 ~ 410g,实验前 12h 禁食不禁饮,实验时乙醚吸入麻醉下,向腹腔内注射无菌 2%戊巴比妥 50 mg/kg 维持麻醉,随机分为 3 个组:假创伤休克(Sham)组、创伤失血性休克乳酸林格氏液(LRH)复苏组和高渗溶液(HTH)复苏组。按照 Chaudry^[1]介绍方法略作改动制作创伤失血性休克模型,根据血压波动

通过继续放血或回输自身血液维持 MAP 于 35 ~ 40 mmHg 之间,放出的血液储存于无菌无热源瓶子中,加肝素 10u/ mL 抗凝。休克维持 60 min,LRH 组以三倍失血量乳酸林格氏液联合 6 %羟乙基淀粉(5 mL/ kg 体重)于 30 min 内输入,HTH 组以 7.5 % NaCl / 6 %羟乙基淀粉复合液(5 mL/ kg 体重)于 10 min 内输入,继续观察各大鼠血压变化 60 min,若未达到休克前水平,补充少量自身血液。假创伤休克组大鼠仅作动静脉置管测压,维持时间与休克组总时间相同,模型制作完成后,拔除置管,结扎动静脉并缝合切口,放回原饲养场所待其自然清醒和自由饮食,24h 后,各大鼠经麻醉行心脏穿刺抽血致死。实验期间以白帜灯照大鼠,维持肛温于 37 ~ 37.5 ℃。以上操作均严格遵守无菌原则。

1.2 标本处理

1.2.1 细菌培养的组织 无菌条件下打开胸腔,经升主动脉灌注 0 ℃ 无菌生理盐水,待从右心房流出液变清,打开腹腔取肠系膜淋巴结、肝和脾组织,在经紫外线消毒超净台内,称取一定量的上述组织,加入无菌生理盐水制成 10 %匀浆。

1.2.2 形态学观察的组织 在距回盲部 5cm 处环切回肠标本:①10 %中性甲醛固定,常规石蜡包埋切片,HE 染色。②3 %戊二醛-1.5 %多聚甲醛固定 4h 以上(4 ℃),PBS 漂洗后用 1 %锇酸后固定 2h(4 ℃),逐级乙醇-丙酮脱水,环氧树脂 618 浸透、包埋,超薄切片经枸橼酸铅、醋酸铀双染各 10 min。③参照 Hopwood 方法^[2],标本经 1 %单宁酸-3 %戊二醛固定 72h(4 ℃),PBS 漂洗后用 1 %锇酸固定 1h(4 ℃),逐级乙醇-丙酮脱水,环氧树脂 618 浸透、包埋,超薄切片经枸橼酸铅单染 1 min。

1.3 指标观察

1.3.1 光镜下组织形态学改变观察 HE 染色后的小肠标本,光镜下由两位资深病理医师参照 Park^[3]方法对其损伤程度进行评分。

1.3.2 电镜下组织形态学观察 按常规透射电镜观察所要

求处理的小肠标本,在 Philips EM208 透射电镜下观察黏膜上皮细胞表面微绒毛排列和柱状上皮细胞、胞浆内细胞器、固有层腺体的结构及黏膜层内炎症细胞浸润情况;按电镜化学技术观察要求处理的小肠标本,将细胞浆电子密度高,电镜下呈现黑色者,称为“暗细胞”(D),表明细胞膜对大分子物质单宁酸通透性增加;正常细胞膜因没有单宁酸渗透入胞内,电子密度低,呈白色,称为“明细胞”(L),计算暗/明细胞比值(D/L),代表细胞损伤、膜通透性增高的程度。

1.3.3 细菌培养 取 1.0 mL 匀浆或血液参照普通琼脂倾注平板法^[4],将各标本接种于 Mackcoys 琼脂培养板上,在 37 ℃ 下培养 48h,4 种培养物中有一种菌落形成数 ≥100 CFU/ g 组织或每毫升血则认为细菌培养阳性,即有细菌向肠道外组织转移,形成的菌落行细菌生化鉴定。

2 结果

2.1 光镜下小肠黏膜形态学改变

Sham 组见肠黏膜上皮细胞层完整,固有层见极少量淋巴细胞浸润,无中性粒细胞浸润,腺体结构未见异常。LRH 组黏膜上皮细胞及整个上皮层水肿,表现为上皮层下间隙增宽、间质疏松,部分细胞甚至坏死脱落形成糜烂;固有层也水肿疏松,并见较多淋巴细胞及多少不等的中性粒细胞浸润。HTH 组损伤性改比 LRH 组明显较轻,见图 1,不同复苏组损伤评分见表 1。

表 1 两种方案复苏后小肠黏膜损伤评分情况($\bar{x} \pm s$)

组别	n	评分
RLH	8	3.55 ± 1.20 ¹⁾
HTH	8	1.75 ± 0.71

注:两组间相应时间点比较¹⁾ P < 0.01

Note :compared with LRH group¹⁾ P < 0.01

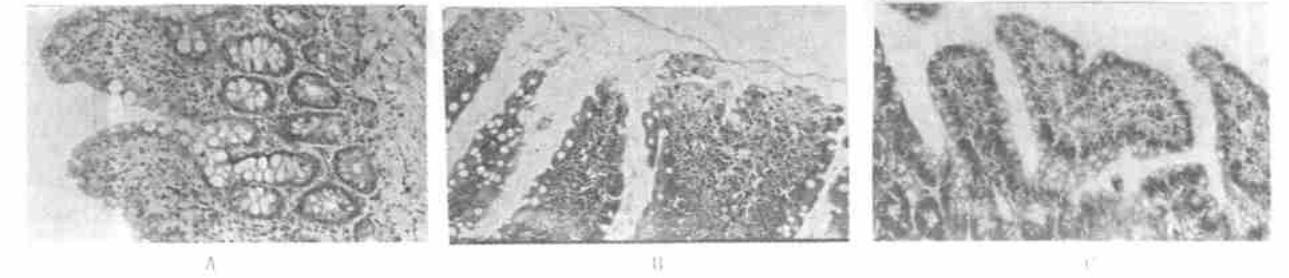


图 1 光镜下小肠黏膜形态学改变,(HE × 200)

Fig 1 The morphological alterations under light micro scope in intestinal mucosa from traumatic - hemorrhagic shock in rats (HE, original magnification × 200)

A. Sham 组,上皮层细胞排列整齐、紧密,间或有杯状细胞,固有层密集,有少量淋巴细胞浸润;B. RLH 组,上皮细胞排列紊乱,部分细胞坏死脱落形成糜烂,绒毛水肿表现为上皮层下间隙增宽,间质疏松,固有层也水肿疏松,充血明显,并见较多淋巴细胞及多少不等的中性粒细胞浸润;C. HTH 组,损伤较轻,上皮层尚完整,有轻度水肿,固有层也有炎症细胞浸润,以淋巴细胞为主

A. Normal ileum mucosa structure from Sham group rat;B. Ileum section from RHT group characterized by edema of the distal portion of the villus and necrosis of the epithelium at the villus tips as well as infiltration of neutrophils and lymphocytes in tunica propria;C. Resuscitation with HTH significantly reduced traumatic hemorrhagic shock induced gut Injury

2.2 电镜下小肠黏膜形态改变

2.2.1 常规透射电镜观察 Sham 组肠黏膜上皮细胞表面微绒毛排列整齐,柱状上皮细胞结构完整,胞浆内细胞器未见异常,固有层腺体结构正常,仅见少量淋巴细胞浸润。RLH 组黏膜上皮细胞表面微绒毛变短、排列紊乱、有的脱

落,部分上皮细胞膜破损,胞浆基质外溢,部分细胞浆内线粒体肿胀,上皮细胞间可见淋巴细胞及中性粒细胞浸润,固有层亦见较多的淋巴细胞及中性粒细胞浸润。HTH 组上皮细胞表面微绒毛略缩短,脱落现象不明显,细胞膜无破裂及胞浆外溢现象,见图 2。

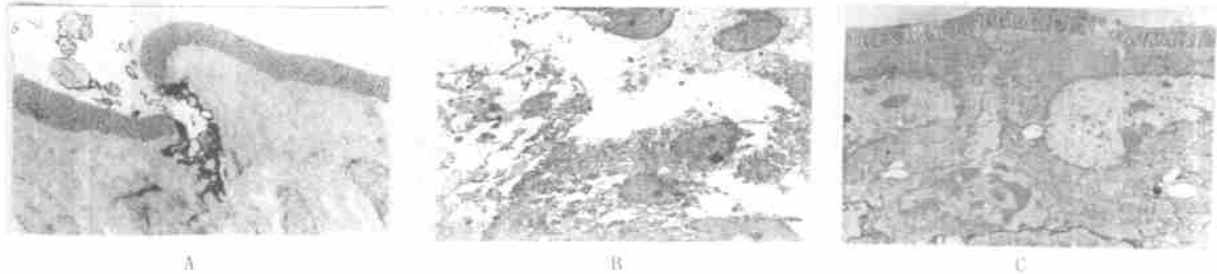


图 2 常规透射电镜下小肠黏膜形态学改变

Fig 2 The morphological alterations under electron microscope

A. Sham 组,上层细胞膜完整,细胞器结构清晰,上皮细胞肠腔面微绒毛排列整齐、紧密;TEM×6000;B. RLH 组,上皮细胞膜破裂基质外溢,胞浆内结构紊乱,有的微绒毛脱落、稀疏;TEM×2400;C. HTH 组,上皮细胞膜完整,部分细胞膜上微绒毛挛缩变短、较稀疏,胞浆内结果也较清晰,TEM×2400

A. Specimen from Sham group. The epithelial cells were intact. (original magnification×6000); B. Specimen from RLH group. The integrity of the epithelial cell membrane was damaged and organelles in the cytoplasm were disordered. Micovilli on the epithelial cell membrane shedded and became rarefaction. (original magnification×2400); C. Specimen from HTH group. The damaged of epithelial cell was more slight. (original magnification×2400)



图 3 电镜细胞化学技术观察小肠上皮细胞通透性改变

Fig 3 Changes of permeability in membrane of intestinal mucosal cell in rats with cellular chemical technique

A. Sham 组,视野内无暗细胞(杯状细胞除外),↑为杯状细胞,☆为暗细胞,TEM×4000;B. RLH 组,该视野内 4 个暗细胞,TEM×4000;C. HTH 组,该视野内 1 个暗细胞,TEM×4000

A. No dark cell can be found in ileum mucosa from Sham group specimens(except goblet cells). Goblet cell was signed with ↑, (original magnification×2400); B. Four dark cells can be found in ileum mucosa from RLH group specimen, (original magnification×4000); C. One dark cell can be found in ileum mucosa from HTH group specimen, (original magnification×4000)

2.2.2 小肠黏膜细胞膜通透性改变 Sham 组仅见个别暗细胞,RLH 组和 HTH 组暗细胞数改变,见图 3。RLH 组明显高于 HTH 组($P<0.01$),见表 2。

表 2 两种方案复苏后小肠黏膜上皮暗/明细胞比值($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Ratio of dark cells/bright cells in intestinal mucosa of rats after resuscitation with two solutions for traumatic hemorrhagic shock ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	评分
RLH	8	0.43±0.10
HTH	8	0.16±0.07 ¹⁾

注:复苏后各相应时间点间比较¹⁾ $P<0.01$

Note :compared with LRH group¹⁾ $P<0.01$

2.2.3 细菌移位情况

Sham 组各培养物均为阴性;复苏后 24h,RLH 组细菌移位发生率(BRT)达 87.5%,HTH 组移位发生率为 12.5%,两组比较有显著差异($P<0.001$),见表 3。细菌生化鉴定结果以大肠杆菌最多见,其余菌种还有肠球菌、类链球菌、白色链球菌、肺炎克雷白杆菌、类白喉杆菌、葡萄球菌等,这与已有报道基本吻合。

表 3 两种方法复苏后 24h 细菌移位发生率($n=8$)

Tab 3 The incidence of bacterial translocation in rats after resuscitation with two solutions for traumatic hemorrhagic shock ($n=8$)

	mIn	bld	liv	spln	BTR(%)
RLH	7/8	2/8	4/8	2/8	87.5 ¹⁾
HTH	1/8	0/8	0/8	0/8	12.5

注:肠系膜淋巴结, bld 血液, liver 肝, spln 脾。与假休克组比较,¹⁾ P

3 讨论

本研究发现, THS 大鼠 RLH 复苏后, 回肠黏膜在光镜下可见上皮细胞和间质水肿, 上皮细胞间和固有层炎症细胞浸润明显, 有的上皮细胞坏死、脱落, 形成小糜烂; 电镜下, 上皮细胞表面微绒毛变短、稀疏, 甚至有细胞膜破裂, 基质外溢; 电镜化学技术发现上皮层中“暗细胞”数量增多, 提示一些上皮细胞膜受损后对大分子物质单宁酸通透性增高。而同样程度的 THS 以 HTH 复苏后, 肠道黏膜的损伤程度明显比 RLH 复苏者轻微。光镜下, 上皮层的水肿程度减轻, 浸润的炎症细胞也较少, 无明显的坏死糜烂灶, 损伤评分明显低于 RLH 复苏组; 电镜下未见细胞膜破裂和基质外溢; 电镜化学技术所见的“暗细胞”数量也明显少于 RLH 复苏组。前述结果表明, 从对肠道机械屏障结构的影响, 同样程度的 THS 以小容量 HTH 复苏要优于大容量等张晶体。

目前认为, THS 后肠道机械屏障结构损伤是多因素作用的结果: ①肠道绒毛内存在逆流氧交换机制, 绒毛顶端的氧张力远比动脉血内为低, 休克时的低血压使黏膜绒毛组织血供减少, 产生缺氧改变; ②严重创伤失血性休克期间血容量严重不足, 致心输出量明显减少, 如本研究中平均动脉压降至 40 mmHg 时, 心输出量约降低 50~70%^[5], 机体因代偿性血流再分布使胃肠道血供严重降低而致缺血和损伤; ③休克状态复苏后, 重新得到血供的肠道黏膜组织经历了缺血/再灌注过程^[6], 触发脂质过氧化损伤, ④创伤和失血性休克使中性粒细胞、微血管内皮及一些组织细胞表面黏附分子表达增高, 以致中性粒细胞在肠黏膜微血管中大量黏附滞留, 一方面释放大蛋白水解酶和氧自由基, 产生组织细胞损伤^[7], 另一方面可堵塞微血管血流; 此外, 大容量晶体本身也可使微血管因内皮细胞肿胀^[8]、白细胞黏附力增强, 致微血管嵌塞和复苏后无再流现象。小容量 HTH 复苏可通过多种机制减轻 THS 后上述的不利作用。首先, 迅速恢复循环血量, 提高心肌收缩力和心输出量^[9], 从而提高各器官组织的血液灌流量; 其次, 血浆渗透浓度升高, 减轻或防止休克复苏后血管内皮细胞肿胀, 也不利于中性粒细胞体积膨胀和活化^[10]; 再者, 高渗环境还抑制中性粒细胞黏附分子表达^[11,12], 减轻其与微血管壁黏附及在微血管嵌塞^[13,14], 从而改善包括肠道组织的微循环血流灌注^[15]。

本研究的两种复苏方案都观察到细菌移位现象, 但 HTH 复苏组的发生率明显低于 RLH 复苏组, 这结果与已有的报道基本吻合。此结果的一种解释是 HTH 复苏改善了休克后肠道黏膜的组织结构, 减轻屏障损伤; 另外, 高张溶液对免疫功能有调节作用, 可提高淋巴细胞繁殖能力^[16], 逆转休克后免疫功能的抑制状态^[17], 这有利于提高包括肠道相关淋巴组织的免疫防御功能。此两点增强 Deith^[18]观念中肠道屏障功能, 因而可降低细菌移位的发生。

总之, 本研究表明, 小容量高张溶液复苏创伤失血性休

克可减轻肠道黏膜结构形态学和屏障功能的损伤, 这可能有 利于降低创伤休克复苏后全身性炎症反应综合征和多器官 功能不全的发生。

参考文献

- [1] Chaudry I H. Rat and mouse models of hypovolemic-traumatic shock[A]. In Schlag G, Redl H. Pathophysiology of shock, sepsis and organ failure[M]. Germany: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 1993, 371.
- [2] Hopwood D, Milne G, Penston J. Leakiness of gastric superficial and foveolar cells. A quantitative electron microscopic study using tannic acid[J]. J Pathol, 1991, 165:119-123.
- [3] Park PO, Haglund U, Balkley GB, et al. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion[J]. Surgery 1990, 107(5):574-80.
- [4] 李仲兴, 郑家齐, 李家宏. 临床细菌学[M]. 北京, 人民卫生出版, 1986:26-27.
- [5] Redl H, Dinges HP, Buurman WA, et al. Expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 in septic but not traumatic/hypovolemic shock in the baboon[J]. Am J Pathol, 1991, 139:461-466.
- [6] Eversole RR, Smith SL, Beuving LJ, et al. Protective effect of the 21-aminosteroid lipid peroxidation inhibitor tirilazad mesylate on hepatic endothelium experimental hemorrhagic shock[J]. Circ shock, 1993, 40:125-132.
- [7] Kalff JC, Hierholzer C, Tsakada K et al. Hemorrhagic shock results in intestinal muscularis inter-cellular adhesion molecule expression, neutrophil infiltration, and smooth muscle dysfunction [J]. Arch Orthop Trauma Surg, 1999, 11:989-993.
- [8] Menger MD, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia/reperfusion injury in striated muscle: Significance of “no reflow” [J]. Am J Physiol 1992, 263: H1892.
- [9] Maningas PA, DeGuzman LR, Tillman FJ, et al. Small volume infusion of 7.5% NaCl in 6% dextran 70 for the treatment of severe hemorrhagic shock in swine[J]. Ann Emerg Med, 1986, 15:1131-7.
- [10] Rosengren S, Hernson PM, Worthen GS. Migration associated volume changes in neutrophils facilitate the migratory process *in vitro*[J]. Am J Physiol 1994, 267: C1623-32.
- [11] 王宏梗, 张良成, 林财珠, 等. 两种复苏溶液对创伤失血性休克大鼠早期肺损伤的影响[J]. 中华急诊医学杂志, 2003, 12: 394.
- [12] Angle N, Hoyt DB, Cimbra R, et al. Hypertonic saline resuscitation diminishes lung injury by suppressing neutrophil activation after hemorrhagic shock[J]. Shock, 1998, 9:164.
- [13] Spera PA, Arfors KE, Vasthare US, et al. Effect of hypertonic saline on leukocyte activity after spinal cord injury[J]. Spine, 1998, 23:2444.
- [14] Hartl R, Schurer L, Schmid-Schonbein G, et al. Experimental antileukocyte interventions in cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab 1997, 16:1108-19.
- [15] Mazzoni MC, Borgstrom P, Intaglietta M, Arfors KE. Capillary

narrowing in hemorrhagic shock is rectified by hyperosmotic saline-dextran reinfusion[J]. Circ Shock 1990 ,31 :407 .

decreasing prostaglandin E2 and interleukin-4 production[J]. J Surg Res ,1996 ,64 :203 .

[16] Junger WG, Liu FC, Loomis WH, *et al*. Hypertonic saline enhances cellular immune function[J]. Circ Shock , 1994 ,42 :190 .

[18] Deitch EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure[J]. Arch Surg , 1990 ,30 :184 .

[17] Coimbra R, Junger WG, Hoyt DB, *et al*. Hypertonic saline resuscitation restores hemorrhage induced immunosuppression by

收稿日期 :2003-06-03