文章编号:1000-5404(2005)13-1367-03

论著

全身和局部降温对创伤失血性休克后小肠早期炎症反应影响的研究

王韶亮,甯交琳,葛衡江,陈力勇,刘怀琼 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所麻醉科,重庆 400042)

提 要:目的 观察全身降温和局部降温状态下,肠组织促炎症细胞因子和抗炎症细胞因子含量的变化,探讨是否可以抑制肠组织炎症反应。**方法** 30只新西兰大白兔,随机分为正常对照组和创伤失血性休克组,创伤失血性休克组又根据不同的体温干预措施分为常温组、浅低体温组、中低体温组和局部降温组,采用ELISA法测定肠组织匀浆上清液TNF-α、IL-6、IL-8和IL-10含量。**结果** 创伤失血性休克后肠组织TNF-α、IL-6、IL-8和IL-10含量均显著升高;浅低体温组、中低体温组和局部降温组肠组织TNF-α、IL-6和IL-8含量低于常温组,中低体温组和局部降温组肠组织IL-10含量高于常温组。**结论** 低体温和局部降温可抑制创伤失血性休克后肠组织炎症反应。

关键词:创伤失血性休克;低温;炎症反应;肠
中图法分类号:R322.45; R454.5; R605.971 **文献标识码**:A

Effects of systemic and regional hypothermia on inflammatory reaction in gut after traumatic hemorrhagic shock

WANG Shao-liang, NING Jiao-lin, GE Heng-jiang, CHEN Li-yong, LIU Huai-qiong (Department of Anesthesiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the changes of the levels of inflammatory cytokines and anti-inflammatory cytokine of gut homogenate in order to investigate effects of systemic and regional hypothermia on inflammatory reaction in gut. **Methods** Thirty rabbits were randomly divided into normal control group and traumatic hemorrhagic shock group that was randomized into normal temperature group, mild hypothermia group, moderate hypothermia group and regional hypothermia group. TNF-α, IL-6, IL-8 and IL-10 levels in gut homogenate were measured with ELISA. **Results** TNF-α, IL-6, IL-8 and IL-10 levels of gut homogenate increased significantly in traumatic hemorrhagic shock group, while the levels of TNF-α, IL-6, IL-8 were lower and IL-10 levels of gut homogenate were higher in mild hypothermia group, moderate hypothermia group and regional hypothermia group than that of the normal temperature group. **Conclusion** Systemic and regional hypothermia can inhibit inflammatory reaction in gut.

Key words: traumatic hemorrhagic shock; hypothermia; inflammatory reaction; gut

正常情况下,肠道依靠肠粘膜上皮、肠道免疫系统、肠道内正常菌群、肠道内分泌及蠕动组成的肠道屏障,可有效阻断肠道内寄生菌及其内毒素向肠腔外组织和器官移位。在严重感染、创伤、休克等应激状况下,肠道屏障功能受损、肠道细菌移位,从而影响患者的预后。细胞因子在肠道屏障功能障碍的病理生理过程中发挥重要作用[1],因此本实验作为低体温对全身炎症反应后肠道粘膜屏障功能影响系列研究的一部分,在制作创伤失血性休克动物模型上,观察低体温对肠组织TNF-α、IL-6、IL-8和IL-10含量的影响,初步探讨低体温和局部降温是否能通过减少促炎症细胞因子和增加抗炎症细胞因子的产生,从而抑制肠组织的炎症反应。为低体温能否减轻创伤失血性休克对肠道屏障功能的损害提供肠道免疫系统方面的理论支持。

1 材料和方法

1.1 动物模型

健康新西兰大白兔30只,本院实验动物中心提供。体质量(3.51±0.28)kg,雌雄不限。实验前自由进食、饮水。实验所用手术器械、穿刺导管、肝素、注射器、输液器、复方林格氏液均无菌,穿刺导管全部用6 U/ml肝素盐水冲洗。

1.1.1 创伤失血性休克动物模型 耳缘静脉注射3%戊巴比妥钠10 mg/kg麻醉后,无菌条件下行右侧颈动脉插管,动脉导管外接三通,连接动脉测压导管和动脉测压电缆,与多道生理监测仪连接,监测外周动脉血压和心率;颈外静脉插管,静脉

作者简介:王韶亮(1975-),男,山东省诸城市人,硕士研究生,医师,主要从事创伤、休克与凝血纤溶方面的研究。电话:(023)68757347

收稿日期:2005-02-14;修回日期:2005-05-08

导管外接三通，以备输液、放血和抽取血液标本；以特制的台钳致新西兰大白兔右侧股骨中下1/3处骨折，骨折后30 min，经颈静脉放血至平均动脉压为基础水平的1/2，回输或抽血维持该血压水平1 h后，回输失血(10 U/ml肝素抗凝)，并补充等容量的复方林格氏液(复苏全过程不少于45 min)，在实验观察过程中，每小时每千克输入10～15 ml林格氏液；实验全过程监测肛温。

1.1.2 实验分组 将30只大白兔随机分为5组，每组6只。正常对照组(C组)：穿刺颈动脉、静脉后，观察8 h；正常体温组(Ⅰ组)：采用红外线烤灯、热水袋、加热静脉液体等方法，在复苏同时实施复温或保温措施，使肛温维持在正常范围内；浅低温组(Ⅱ组)：采用腹部喷洒乙醇、风扇直接吹、冰袋降温等方法，在复苏的同时进行降温，40 min内将肛温降至35～36 ℃，并维持至实验结束；中度低温组(Ⅲ组)：采用Ⅱ组相同的方法，在复苏同时进行降温，40 min内将肛温降至32～33 ℃，维持至实验结束；创伤局部降温组(Ⅳ组)：右后肢骨折制作完毕后，立刻用24层盐水冰冻纱布包裹骨折处，15 min后解开，10 min后再次包裹15 min；若肛温下降，在复苏同时将体温升至正常范围内，并在实验观察过程中维持体温于正常范围内至实验结束。

1.2 实验时相点

致伤失血液体复苏后6 h。

1.3 小肠标本的采集

取近回盲部小肠15 cm左右，采用无菌生理盐水洗净肠管后置于液氮中保存。

1.4 小肠组织匀浆的制作

1.4.1 配制苯甲基氟磺酸(PMSF)储存液(10 mmol/L) PSMF 87 mg，异丙醇50 mg，－20 ℃保存。

1.4.2 配制匀浆缓冲液 0.01 mmol/L PBS缓冲液(pH 7.4) 94.25 ml，10 mmol/L PSMF 5.75 ml，TWEEN20 50 μl。

1.4.3 组织匀浆及蛋白含量测定 300～400 mg组织，于小烧杯中剪成碎末后加入5 ml匀浆缓冲液，充分混匀，倒入玻璃匀浆器中，在冰浴条件下，对组织彻底匀浆后，4 000×g离心10 min，取上清液，－20 ℃保存。在冰上解冻后，4 ℃，4 000×g离心10 min，采用考马斯亮兰法检测组织匀浆中蛋白质含量。

1.5 测定指标

小肠组织匀浆上清液TNF-α、IL-6、IL-8和IL-10含量，测定采用ELISA法，按ELISA试剂盒操作步骤进行，每样品测6个平行孔，取平均值。

1.6 数据处理

所得数据以$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS统计软件对组内参数进行重复测量的方差分析法。

2 结果

2.1 小肠组织TNF-α含量

液体复苏后6 h小肠组织TNF-α含量明显升高，并显著高于正常对照组($P<0.01$)。Ⅱ组、Ⅲ组和Ⅳ组小肠组织TNF-α含量均低于Ⅰ组小肠组织TNF-α含量，其中Ⅱ组小肠组织TNF-α含量显著低于Ⅰ组小肠组织TNF-α含量($P<0.01$)。Ⅳ组小肠组织TNF-α含量显著低于Ⅰ组和Ⅲ组小肠组织TNF-α含量($P<0.05$)(表1)。

表1 小肠组织炎症细胞因子含量变化($n=6$, $\bar{x} \pm s$, pg/ml)

Tab 1 Changes of the levels of cytokines in gut homogenate ($n=6$, $\bar{x} \pm s$, pg/ml)

Group	TNF-α	IL-6	IL-8	IL-10
C	213.12±34.21	206.10±35.64	315.12±42.00	159.59±34.94
Ⅰ	4 084.44±613.60**	5 586.28±396.94**	6 293.36±1 087.37**	2 608.08±217.00**
Ⅱ	3 246.34±371.66**△△	2 462.22±227.51**△△	4 083.38±412.09**△	2 606.28±102.81**
Ⅲ	3 999.36±569.59**	3 174.34±542.99**△△	4 323.60±1 392.00**	3 035.60±558.74**
Ⅳ	2 545.92±925.78**△#	3 461.20±1 117.17**△	4 078.28±294.32**	4 145.10±860.02**△+

**：$P<0.01$，*vs* Group C；△：$P<0.01$，*vs* Group Ⅰ；+：$P<0.01$，*vs* Group Ⅱ；#：$P<0.01$，*vs* Group Ⅲ

2.2 小肠组织IL-6含量

液体复苏后6 h小肠组织IL-6含量明显升高，并显著高于正常对照组($P<0.01$)。Ⅱ组、Ⅲ组和Ⅳ组小肠组织IL-6含量显著低于Ⅰ组小肠组织IL-6含量($P<0.01$)(表1)。

2.3 小肠组织IL-8含量

液体复苏后6 h小肠组织IL-8含量明显升高，并显著高于正常对照组($P<0.01$)。Ⅱ组、Ⅲ组和Ⅳ组小肠组织IL-8含量均低于Ⅰ组小肠组织IL-8含量($P<0.05$)，其中Ⅱ组小肠组织IL-8含量显著低于Ⅰ组小肠组织IL-8含量($P<0.01$)(表1)。

2.4 小肠组织IL-10含量

液体复苏后6 h小肠组织IL-10含量明显升高，并显著高于正常对照组($P<0.01$)。Ⅲ组小肠组织IL-10含量高于Ⅰ组小肠组织IL-10含量($P<0.05$)，Ⅳ组小肠组织IL-10含量显著高于Ⅰ组和Ⅱ组小肠组织IL-10含量($P<0.01$)(表1)。

3 讨论

机体在受到创伤、感染等刺激后可迅速产生大量的炎症介质，这些炎症介质过量产生，可随着血液循环损伤全身组织器官，其中炎症细胞因子是在此过程中发挥至关重要的作用[2]。TNF-α、IL-6、IL-8能启动炎症反应"级联效应"，被称为是前炎症细胞因子[3]。TNF-α具有很多生物学效应，最重要的作用是扩大炎症反应和引起组织器官损伤。实验研究表明TNF-α可通过改变肠细胞单层的形态和功能，还可使其表达粘附分子异常和肌动蛋白解聚而影响肠粘膜通透性。TNF-α对肠粘膜有直接损伤作用，给狗注入TNF-α后小肠血流量明显下降，肠粘膜下血管有灶性栓塞，粘膜糜烂，血培养阳性率直接增加[4]。IL-6可激活中性粒细胞，并

使中性粒细胞聚集，释放大量的蛋白酶即各种毒性氧自由基损伤肠道上皮细胞，破坏肠道屏障功能等[5]。IL-8 是一种中性粒细胞趋化因子，可通过特异性 G-蛋白耦联受体对靶细胞产生生物效应，诱导中性粒细胞粘附和聚集，引起中性粒细胞脱颗粒、呼吸爆发和溶酶体酶释放，从而导致炎症反应和炎性组织损伤[1,6]。机体促炎症细胞因子增加的同时抗炎症细胞因子的产生也明显增加，以维持炎症反应和抗炎症反应之间的平衡，其中 IL-10 是最重要的抗炎症细胞因子，能抑制 TNF-α、IL-6、IL-8 等促炎症细胞因子、粘附分子和趋化分子的产生，从而减轻促炎症细胞因子的生物学活性和对器官的损伤作用[7]。

本实验结果表明创伤失血性休克后肠组织 TNF-α、IL-6、IL-8 和 IL-10 的产生明显增加，说明创伤失血性休克后肠炎症反应被激活，与此同时肠抗炎症反应也被激活，以抑制炎症反应。本实验发现浅低体温、中低体温均能显著抑制创伤失血性休克后肠炎症反应；局部降温对创伤失血性休克后肠炎症反应也有明显的抑制作用，并且能促进肠抗炎症反应。另外本实验过程中观察到中低体温组动物在降温后呼吸道分泌物明显增加，需要吸痰才能维持呼吸道的通畅，在取肠组织标本后观察局部伤情发现骨折局部尚有不凝血液，而且中低体温对肠组织 TNF-α、IL-6 和 IL-8 产生的抑制作用也没有浅低体温明显，而浅低体温和局部降温没有出现上述现象。因此，浅低体温和局部降温对创伤患者的临床救治可能更有利。

总之，低体温对肠道炎症反应影响的研究目前尚少，但浅低体温和局部降温对肠道炎症反应影响及机制的研究，将为临床肠道屏障功能的保护提供新的思路。浅低体温和局部降温是否能通过减少肠道局部炎症介质的产生达到保护肠道屏障功能的目的，以及减少肠组织炎症介质产生的机制，都有待于进一步的研究。

参考文献：

[1] Falcone F H, Rossi A G, Sharkey R, *et al*. Ascaris suum-derived products induce human neutrophil activation via a G protein-coupled receptor that interacts with the interleukin-8 receptor pathway[J]. Infect Immun, 2001, 69(6): 4007 - 4018.

[2] Fergus S. Inflammatory bowel disease; immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics[J]. Gastroenterology, 2001, 120(3): 622 - 635.

[3] 王正国. 创伤外科学[M]. 上海：上海科学技术出版社，2002. 102 - 112.

[4] Ruetten H, Thiemernmann C. Combination immunotherapy which neutralizes the effect of TNF alpha and IL-1 beta attenuates the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat[J]. J Physiol Pharmacol, 1997, 48(4): 605 - 621.

[5] Wang W, Smail N, Wang P, *et al*. Increased gut permeability after hemorrhage is associatedwith upregulation of local and systemic IL-6[J]. J Surg Res, 1998, 79(1): 39 - 46.

[6] Miller E J, Kurdowska A, Nagao S, *et al*. Asynthetic peptide which specifically inhibits heat-treated interleukin-8 binding and chemotaxis for neutrophils[J]. Agents Actions, 1993, 40(314): 200 - 208.

[7] Moore K W, de Waal Malefyt R, Coffman R L, *et al*. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor[J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19: 683 - 765.

（编辑　薛国文）

（上接 1366 页）

2　结果

148 例经临床病理诊断为 CA 患者的标本，阳性率 100%，Ct 值均小于 37.0，平均为 22.45；337 例疑 CA 患者的标本，检出阳性 308 例，阳性率 91.4%，Ct 值均小于 37.0、平均为 26.7。

3　讨论

HPV 可以引起女性生殖道临床、亚临床和潜伏性感染，而亚临床和潜伏性感染缺乏典型形态学变化，HPV-DNA 检测是目前惟一的确诊方法。HPV 有多种亚型，不同亚型可引起不同的生殖道疾病。早期的 PCR 技术由于错误扩增和产物污染导致假阳性率高，不能正确指导临床实践。在常规 PCR 基础上荧光基因探针杂交定量 PCR 方法把目的基因扩增，特异分子杂交和荧光化学融为一体，利用基因扩增的灵敏性、分子杂交的特异性和光、化学反应的精确性[2]，实时在线探测 PCR 过程中荧光信号强弱的变化，获得 DNA 模板的准确定量结果。与竞争性 PCR 等定量 PCR 相比，荧光定量 PCR 不仅进一步提高了特异性，无需 PCR 后处理和冗长的电泳，紫外线或染色检测，还具有定量范围宽，定量准确等优点，使假阳性率降低到最低限度，并且从根本上解决了 PCR 扩增产物污染的难题[3]。

我们从 337 例无明显临床症状又疑为尖锐湿疣患者中检出 308 例 HPV-6、11 阳性，阳性率达 91.4%，表明使用 FQ-PCR 技术能为可疑患者提供早期诊断，从而有利于患者的早期发现和治疗。对于 148 例经临床病理诊断为 CA 的患者，HPV-6、11 DNA 阳性检出率为 100%，与临床病理诊断也完全相符，证明用 FQ-PCR 技术检测 HPV-DNA 灵敏度高、特异性强。因此，本方法不仅可对 HPV 感染进行早期诊断、早期治疗，预防病情进一步恶化，还可为评价临床治疗效果提供可靠的依据。

关键词：荧光定量 PCR；尖锐湿疣；人乳头瘤病毒
中图法分类号：R752.530.4　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 单可人，何　燕，吕　筠，等. 用 PCR 检测尖锐湿疣患者的 6、11 型人乳头瘤病毒[J]. 贵阳医学院学报，1999，24(3)：229 - 230.

[2] Heid C A, Stevens J, Livak K J, *et al*. Real time quantitative PCR[J]. Genome Res, 1996, 6(10): 986 - 994.

[3] 赖宏芳，付晓野，董玉琳，等. 荧光探针定量 PCR 检测 HBV-DNA[J]. 上海医学检验杂志，2000，15(1)：18 - 19.

（编辑　陈聪连）