

· 实验研究 ·

复方苹果酸钠对失血性休克大鼠小肠黏膜细胞凋亡的影响

戴中亮 朱毅 王琳琳 李福菁 张雪萍 姚尚龙 张中军

【摘要】 目的 观察复方苹果酸钠对失血性休克大鼠小肠黏膜细胞凋亡的影响。**方法** 雄性 SD 大鼠 48 只, 体重 280~320 g, 随机分为假手术组(SS 组)、生理盐水组(NS 组)、复方乳酸钠组(RL 组)和复方苹果酸钠组(RM 组), 每组 12 只。SS 组为空白对照组, 其余三组制作失血性休克模型, 放血至 MAP 降为 (40 ± 5) mm Hg, 休克 60 min 后进行对应液体复苏, 复苏后 3 h 处死大鼠。检测小肠黏膜中 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)表达量和 Bcl-2 相关蛋白(Bax)含量, 采用 TUNEL 法检测黏膜细胞凋亡情况, 计算凋亡指数。检测小肠组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)浓度。取小肠黏膜做病理切片, 观察病理改变。**结果** NS、RL、RM 组 Bcl-2 表达量明显低于 SS 组, Bax 含量及凋亡指数明显高于 SS 组 ($P < 0.05$); RM 组 Bcl-2 表达量明显高于 NS 组和 RL 组, Bax 含量及凋亡指数明显低于 NS 组和 RL 组 ($P < 0.05$)。NS、RL、RM 组 SOD 活性明显低于 SS 组, MDA 浓度明显高于 SS 组 ($P < 0.05$); RM 组 SOD 活性明显高于 NS 组和 RL 组, MDA 浓度明显低于 NS 组和 RL 组 ($P < 0.05$)。病理组织切片显示 RM 组小肠黏膜损伤轻于 NS 组和 RL 组。**结论** 复方苹果酸钠对于失血性休克大鼠小肠黏膜具有良好的抗凋亡作用, 为临床晶体液的应用带来新的选择。

【关键词】 复方苹果酸钠; 液体复苏; 失血性休克; 小肠; 凋亡

Ringer's malate solution protects against the intestine's apoptosis caused by hemorrhagic shock in rats

DAI Zhongliang, ZHU Yi, WANG Linlin, LI Fujing, ZHANG Xueping, YAO Shanglong, ZHANG Zhongjun. Department of Anesthesiology, Shenzhen Anesthesiology Engineering Center, Shenzhen People's Hospital, The Second Medical College of Jinan University, Shenzhen 518020, China

Corresponding author: ZHANG Zhongjun, Email: dai10@sina.com

【Abstract】 Objective To test the protective effect of a new Ringer's malate solution on intestine's apoptosis caused by hemorrhagic shock in rats. **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley male rats, weighing 280-320 g, were randomly assigned into four groups: sham shock group (group SS), normal saline group (group NS), Ringer's lactate group (group RL) and Ringer's malate (group RM), $n=12$ each. The group SS was served as control group, the other groups were subjected to 60 min of hemorrhagic shock [MAP (40 ± 5) mm Hg] followed by crystalloid resuscitation. Those rats were sacrificed 3 h after resuscitation. Intestinal tissue was harvested to detect Bcl-2/Bax protein level, the bioactivity of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) level. The level of intestinal cell apoptosis was measured using TUNEL method and apoptosis index was calculated. The intestinal histopathology was examined. **Results** Compared with group SS, the expression of Bcl-2 and the bioactivity of SOD were lower, the level of Bax protein, MDA and apoptotic index were higher in groups NS, RL and RM ($P < 0.05$). Compared with groups NS and RL, the expression of Bcl-2 and the bioactivity of SOD was higher, the level of Bax protein, MDA and apoptotic index were lower in group RM ($P < 0.05$). Histopathological examination showed that group RM was better than group NS and group RL. **Conclusion** Ringer's malate alleviated intestinal apoptosis caused by hemorrhagic shock in rats. The study suggests that Ringer's malate solution could be a potential new therapeutic agent for fluid resuscitation.

【Key words】 Ringer's malate solution; Fluid resuscitation; Hemorrhagic shock; Intestine; Apoptosis

基金项目: 深圳市科创委基金(JCYJ20130402092657766); 深圳市卫生科研基金(201401004)

作者单位: 518020 暨南大学第二临床学院 深圳市麻醉医学工程研究中心(戴中亮、朱毅、王琳琳、李福菁、张雪萍、张中军); 华中科技大学同济医学院附属协和医院麻醉科(姚尚龙)

通信作者: 张中军, Email: dai10@sina.com

失血性休克是临床围手术期最常见的急重症之一,主要治疗方法是液体复苏^[1]。液体复苏最主要的方式是输入晶体溶液,晶体溶液的发展经历了复方氯化钠、复方乳酸钠、复方醋酸钠等阶段^[2]。但是以上液体主要输入相应的离子成份,不能增加休克期间脏器的能量供应。苹果酸是三羧酸循环中的有机弱酸,通过苹果酸-天冬氨酸穿梭系统能够将胞浆中的 NADH 转运至线粒体氧化供能,对于休克期间的能量供应具有重要作用。本课题组在前期研究中,发明合成一种新的晶体溶液-复方苹果酸钠^[3]。该溶液 pH 7.4, Na^+ 140 mmol/L, K^+ 4 mmol/L, Cl^- 117 mmol/L, Ca^{2+} 2 mmol/L, 苹果酸根离子 15.4 mmol/L, 渗透压为 296 mOsm/kg(国家发明专利授权 201110149525.8)。本实验拟探讨复方苹果酸钠对失血性大鼠小肠黏膜细胞凋亡的影响,为临床失血性休克的液体复苏提供相关依据。

材料与方法

动物选择及分组 本实验通过华中科技大学同济医学院动物伦理委员会批准(SCXK2010-0004)。选择 SPF 级 SD 雄性大鼠 48 只,体重 280~320 g,7~9 周龄,按照随机数字表分为假手术组(SS 组)、生理盐水组(NS 组)、复方乳酸钠组(RL 组)和复方苹果酸钠组(RM 组),每组 12 只。

模型制备及取材 NS 组、RL 组和 RM 组参考文献[4, 5]的方法制备失血性休克模型,腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg,麻醉后大鼠仰卧位固定,无菌剥离颈内动脉和颈内静脉进行插管,通过监护仪连续记录 MAP。模型稳定 10 min 后,放血至 MAP 降为(40±5)mm Hg(约 2.5 ml/kg 血液,放血时间约 10 min),继续放血或回输部分血液维持此血压。60 min 后每组输入失血量两倍体积的对应液体,输液时间为 30 min。输液完成后观察记录 1 h 内 MAP 变化,缝合伤口。SS 组只行颈内动脉置管监测血压,无放血和液体复苏过程。3 h 后各组采用颈内动脉快速抽血的方法处死大鼠。在距离盲肠 10 cm 处取小肠待测。

小肠黏膜中 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)、Bcl-2 相关蛋白(Bax)检测 采用免疫组化法测定 Bcl-2 表达量和 Bax 含量。光镜下观察,如小肠黏膜细胞浆中出现棕黄色颗粒状物或呈匀质状,即标记为免疫反应阳性细胞,如细胞胞质或胞膜不着色则为阴性细胞。根据阳性细胞和阴性细胞不同的灰度

值计算 Bcl-2 表达量和 Bax 含量。采用 HPIAS-100 型医学彩色图像分析系统测量光密度值(OD 值)。每组 12 只大鼠各取 1 张切片,每张切片取 2 个视野分别测量,计算所测量 OD 值的均值作为此组的代表值。

小肠黏膜细胞凋亡情况检测 采用 TUNEL 法观察细胞凋亡情况,采用光学显微镜观察凋亡细胞并拍照。高倍镜下胞核呈棕褐色的细胞即为凋亡细胞。每张切片均在高倍镜下随机取 2 个视野,用 HPIAS-100 型医学彩色图像分析系统计数凋亡细胞数和总细胞数。凋亡指数=凋亡细胞数/总细胞数×100%。取每组所有视野均值代表此组的凋亡指数。

小肠组织中超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)浓度检测 低温保存的小肠组织,加入 1 mol/L 的 HCl,碾磨制成组织匀浆后于 4℃ 下 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,按试剂盒说明采用黄嘌呤氧化法测定 SOD 活性,硫代巴比妥酸比色法测定 MDA 浓度。

组织病理学观察 小肠组织经生理盐水冲洗 3 遍后用 4% 中性多聚甲醛固定,常规脱水后石蜡包埋、切片,HE 染色后普通光学显微镜下观察小肠形态学改变。

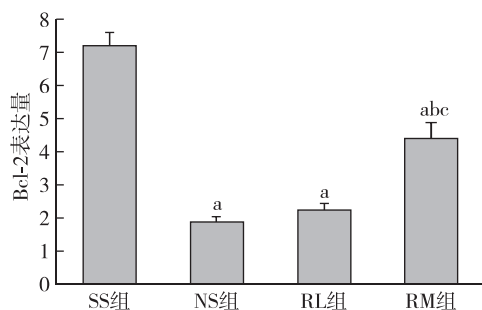
统计分析 采用 SPSS 11.0 软件进行分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK 检验。组内不同时点的比较采用重复测量数据方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

小肠黏膜中 Bcl-2 表达量和 Bax 含量 NS、RL、RM 组 Bcl-2 表达量明显低于 SS 组, Bax 含量明显高于 SS 组($P < 0.05$)。RL 组 Bax 含量明显低于 NS 组($P < 0.05$)。RM 组 Bcl-2 表达量明显高于 NS 组和 RL 组, Bax 含量明显低于 NS 组和 RL 组($P < 0.05$)(图 1, 2)。

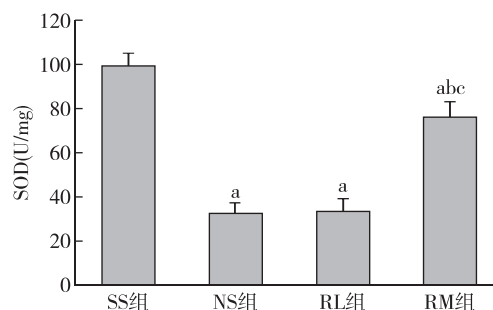
小肠黏膜细胞凋亡情况 NS、RL、RM 组凋亡指数明显低于 SS 组和 RL 组,明显高于 SS 组($P < 0.05$)。RM 组凋亡指数明显低于 NS 组和 RL 组($P < 0.05$)。

小肠组织中 SOD 活性及 MDA 浓度 NS、RL、RM 组 SOD 活性明显低于 SS 组, MDA 浓度明显高于 SS 组($P < 0.05$)。RL 组 MDA 浓度明显低于 NS 组($P < 0.05$)。RM 组 SOD 活性明显高于 NS



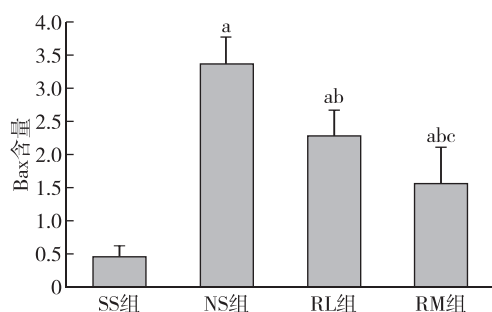
注:与 SS 组比较,^a $P < 0.05$;与 NS 组比较,^b $P < 0.05$;与 RL 组比较,^c $P < 0.05$

图 1 四组大鼠肠黏膜细胞中 Bcl-2 表达量的比较



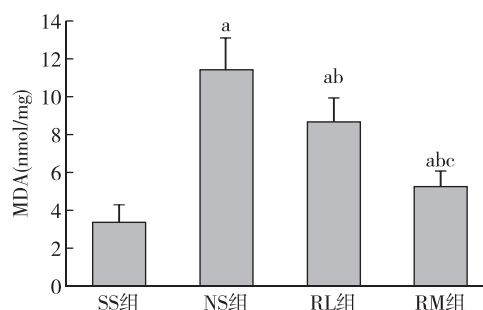
注:与 SS 组比较,^a $P < 0.05$;与 NS 组比较,^b $P < 0.05$;与 RL 组比较,^c $P < 0.05$

图 3 四组大鼠小肠组织中 SOD 活性的比较



注:与 SS 组比较,^a $P < 0.05$;与 NS 组比较,^b $P < 0.05$;与 RL 组比较,^c $P < 0.05$

图 2 四组大鼠肠黏膜细胞中 Bax 含量的比较



注:与 SS 组比较,^a $P < 0.05$;与 NS 组比较,^b $P < 0.05$;与 RL 组比较,^c $P < 0.05$

图 4 四组大鼠小肠组织中 MDA 浓度的比较

组和 RL 组,MDA 浓度明显低于 NS 组和 RL 组($P < 0.05$)(图 3,4)。

小肠病理学改变 NS 组小肠绒毛顶端上皮下游隙明显扩大,绒毛尖端上皮抬高与固有膜剥离,绒毛尖端坏死;RL 组中绒毛顶端上皮下游隙增宽,绒毛尖端上皮与固有膜剥离,见部分绒毛上皮成块脱落;RM 组绒毛顶端上皮轻度变宽,绒毛上皮仅见少量坏死脱落;SS 组结构正常(图 5)。

讨 论

在临床工作中,出血导致血容量不足的失血性休克非常普遍。该类休克患者最主要的病理生理改变是有效循环血量减少导致的机体缺氧,进而引起机体的能量代谢障碍和过氧化还原反应^[6]。能量不足和大量氧自由基的产生严重损害机体各脏器的功能,导致多器官功能障碍,对小肠功能的损伤尤为明显^[7]。既往液体治疗强调输入细胞外液相应的离子成分,从最早的生理盐水到后来的复方乳酸钠。由于上述晶体液只强调补充相应的离子成分,在血管内停留时间短,因此对休克导致的全身脏器

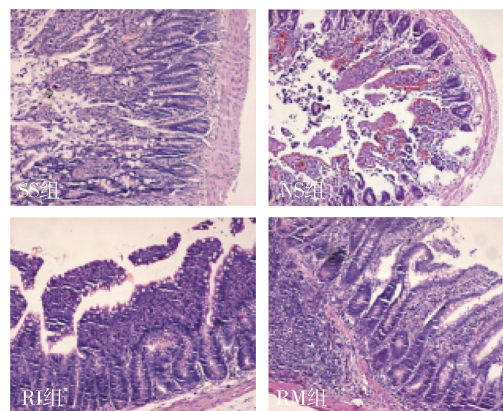


图 5 四组大鼠小肠组织病理学改变(HE, ×100)

功能损伤不能提供保护作用^[8]。

苹果酸是一种二元有机弱酸^[9],是苹果酸-天冬氨酸穿梭的重要组成部分,对还原当量的 NADH 转移到线粒体供能起重要的作用,在机体内具有重要的能量代谢意义^[10, 11]。本研究结果显示,复方苹果酸钠对失血性休克大鼠具有良好的抗凋亡作用,可能与其能迅速补充机体能量、提高线粒体能量代

谢效率、加强体内抗氧化、加速自由基的清除有关。SOD 活性及 MDA 浓度是反映脂质过氧化反应的指标,增加 SOD 活性可提高机体清除氧自由基的能力,MDA 浓度可间接反映细胞受损程度。本实验结果提示复方苹果酸钠具有良好的氧自由基清除功能。同时,病理切片也证实复方苹果酸钠能明显减轻肠黏膜损伤。

综上所述,复方苹果酸钠对失血性休克导致的小肠黏膜损伤具有良好的抗凋亡和减轻损伤作用,其研制有望为临床晶体液的应用带来新的选择,具体作用机制仍有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Bogert JN, Harvin JA, Cotton BA. Damage control resuscitation. *J Intensive Care Med*, 2016, 31(3): 177-186.
- [2] Stancil SA. Past and current trends in intravenous therapy for hemorrhagic shock. *Air Med J*, 2014, 33(4): 172-175.
- [3] Dai ZL, Wu J, Meng C, et al. Ringer's malate solution protects against the multiple organ injury and dysfunction caused by hemorrhagic shock in rats. *Shock*, 2012, 38(3): 268-274.
- [4] Nelson A, Statkevicius S, Schött U, et al. Effects of fresh frozen plasma, Ringer's acetate and albumin on plasma volume and on circulating glycocalyx components following haemorrhagic shock in rats. *Intensive Care Med Exp*, 2016, 4(1): 6.
- [5] 王棣馨,但伶,谢先丰. 盐酸戊乙奎醚对大鼠失血性休克致急性肺损伤肺组织 CD40 和 CD40L 表达的影响. *临床麻醉学杂志*, 2015, 31(1): 79-82.
- [6] Hubbard WJ, Bland KI, Chaudry IH. The error of our ways: estrogen-related receptors are about energy, not hormones, and are potential new targets for trauma and shock. *Shock*, 2015, 44(1): 3-15.
- [7] Harrois A, Baudry N, Huet O, et al. Norepinephrine decreases fluid requirements and blood loss while preserving intestinal villi microcirculation during fluid resuscitation of uncontrolled hemorrhagic shock in mice. *Anesthesiology*, 2015, 122(5): 1093-1102.
- [8] Santi M, Lava SA, Camozzi P, et al. The great fluid debate: saline or so-called "balanced" salt solutions? *Ital J Pediatr*, 2015, 41: 47.
- [9] Mondala AH. Direct fungal fermentation of lignocellulosic biomass into itaconic, fumaric, and malic acids: current and future prospects. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2015, 42(4): 487-506.
- [10] Kolosova NG, Akulov AE, Stefanova NA, et al. Effect of malate on the development of rotenone-induced brain changes in Wistar and OXYS rats: an MRI study. *Dokl Biol Sci*, 2011, 437: 72-75.
- [11] Aleshin VA, Artiukhov AV, Oppermann H, et al. Mitochondrial impairment may increase cellular NAD(P)H: resazurin oxidoreductase activity, perturbing the NAD(P)H-based viability assays. *Cells*, 2015, 4(3): 427-451.

(收稿日期:2016-09-21)

· 消息 ·

《中国科技期刊引证报告(核心版)》2016 年版发布

2016 年 10 月 12 日,中国科学技术信息研究所在北京国际会议中心发布了 2016 年版《中国科技期刊引证报告(核心版)》。共有 1985 种期刊入选本年度中国科技核心期刊。本刊核心总被引频次 3236,核心影响因子 1.364,在外科学综合类期刊中分别排在第 3 和第 2 位,在所有核心期刊中分别排在第 157 和第 107 位。会上,同时公布了 2016 年度领跑者 5000—中国精品科技期刊顶尖论文(F5000)。据统计,2011~2015 年累积被引用次数达到其所在学科领域和发表年度基准线以上的论文有近 2 万篇。其中通过定量分析方式获得精品期刊顶尖论文提名的论文共有 2 225 篇。本刊有 20 篇论文入选。