

• 基础研究 •

电刺激迷走神经对感染性休克大鼠血浆肿瘤坏死因子 α 、一氧化氮合酶及一氧化氮的影响

谢守嫔¹, 李海龙², 梁永林², 王清峰³, 李永盛⁴, 明海霞²

[摘要] 目的 研究电刺激迷走神经对感染性休克大鼠血浆肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、一氧化氮合酶(NOS)及一氧化氮(NO)水平的影响。方法 成年雄性 SD 大鼠 40 只,采用盲肠结扎穿孔法(CLP)复制感染性休克模型,随机分为 5 组:假 CLP 组、CLP 组、迷切组、电刺激左侧迷走神经组、电刺激右侧迷走神经组。各组动物均行颈总动脉置管连续监测平均动脉压,ELISA 法检测血浆 TNF- α ,生化法检测血浆中 NOS 活性和 NO 水平。结果 CLP 组术后平均动脉血压进行性下降,2 h 时血浆 TNF- α 、NOS 及 NO 水平显著升高;与 CLP 组比较,电刺激组动物平均动脉压下降幅度减轻,血浆 TNF- α 、NOS 及 NO 水平显著降低。结论 电刺激左、右迷走神经均可能缓解 CLP 致感染性休克大鼠的进行性血压下降,降低血浆 TNF- α 、NOS 及 NO 水平,有助于抗休克。

[关键词] 感染性休克;迷走神经;电刺激;肿瘤坏死因子 α (TNF- α);一氧化氮合酶(NOS);一氧化氮(NO);盲肠结扎穿孔法(CLP);大鼠

Effects of Electrical Stimulation of Vagus Nerve on Plasma Tumor Necrosis Factor α , Nitric Oxide Synthases and Nitric Oxide in Septic Shock Rats XIE Shou-pin, LI Hai-long, LIANG Yong-lin, et al. 1st Hospital of Lanzhou, Lanzhou 730050, Gansu, China

Abstract: **Objective** To study the effect of electrical stimulation of vagus nerve on inflammatory response in septic shock rats. **Methods** SD rats were randomly divided into 5 groups: Group I was the sham group, group II with the cecal ligation and puncture (CLP) and the vagus nerve were isolated but not transected, group III with bilateral cervical vagotomy following CLP, group IV with bilateral cervical vagotomy after CLP and the left vagus nerve trunks were stimulated with bipolar electrodes, group V with bilateral cervical vagotomy after CLP and the right vagus nerve trunks were stimulated. The common carotid artery pressure was monitored, and the plasma tumor necrosis factor α (TNF- α), nitric oxide synthases (NOS) and nitric oxide (NO) were measured 2 h after stimulation. **Results** The mean arterial blood pressure (MAP) gradually decreased and the concentration of plasma TNF- α , NOS and NO significantly increased after CLP. Electrical stimulation of the left and right vagus nerve significantly increased the MAP and decreased the plasma TNF- α , NOS and NO levels. **Conclusion** Direct electrical stimulation of the left and right vagus nerve can significantly improve the blood pressure and reduced plasma TNF- α , NOS and NO levels during septic shock, which may play a role in anti-shock in rats.

Key words: septic shock; vagus nerve; electrical stimulation; tumor necrosis factor α (TNF- α); nitric oxide synthases (NOS); nitric oxide (NO); cecal ligation and puncture (CLP); rats

[中图分类号] R541.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2009)03-0225-03

[本文著录格式] 谢守嫔,李海龙,梁永林,等.电刺激迷走神经对感染性休克大鼠血浆肿瘤坏死因子 α 、一氧化氮合酶及一氧化氮的影响[J].中国康复理论与实践,2009,15(3):225—227.

细菌内毒素及其诱导的炎性细胞因子如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)刺激一氧化氮(NO)的大量生成是感染性休克时持续低血压的重要原因之一。近年对胆碱能抗炎通路的研究表明,由迷走神经及其释放的递质乙酰胆碱为主构成的抗炎通路具有快速而直接对抗促炎

细胞因子、减轻生物毒素致死效应及调节或对抗全身炎症反应等特点,可能对预防和拮抗感染性休克发病进程中过度的全身性炎症反应有重要作用^[1-3]。本研究采用盲肠结扎穿孔法(cecal ligation and puncture, CLP)制做大鼠感染性休克模型,观察电刺激迷走神经时感染性休克大鼠血压、血浆 TNF- α 和及血浆中一氧化氮合酶(NOS)活性和 NO 含量的变化,探讨双侧迷走神经兴奋在抗感染性休克中的作用与相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 40 只 SPF 级健康雄性 SD 大鼠(甘肃中医学院动物实验中心提供),体重 250~300

基金项目:甘肃省教育厅科研项目(0505B-08)。

作者单位:1. 兰州市第一人民医院,甘肃兰州市 730050;2. 甘肃中医学院,甘肃兰州市 730000;3. 江苏泰州职业技术学院,江苏泰州市 225300;4. 甘肃省定西市第二人民医院,甘肃定西市 743000。作者简介:谢守嫔(1973-),女,甘肃兰州市人,主治医师,主要研究方向:内科急重症的基础及临床研究。

g,动物合格证号:医动字 FCXK(甘)2004-2006。随机分为 5 组,每组 8 只:①假 CLP 组:行假 CLP 术+双颈部迷走神经干分离术;②CLP 组:行 CLP 术+双颈部迷走神经干分离术;③迷切组:行 CLP 术+双颈部迷走神经干离断术;④左侧刺激组:行 CLP 术+双颈部迷走神经干离断术+左侧迷走神经干远端电刺激;⑤右侧刺激组:行 CLP 术+双颈部迷走神经干离断术+右侧迷走神经干远端电刺激。

1.2 CLP 模型制作 乌拉坦 1 g/kg 腹腔注射麻醉后,分离颈总动脉及迷走神经;行颈总动脉置管,连接压力传导系统和监护仪连续监测动脉压。于前腹正中作长约 2~3 cm 切口,游离肠系膜和盲肠,以 3.0 丝线环行结扎盲肠根部,用 9 号针头于盲端部位穿刺 2 处,两针孔相距约 3 mm,还纳肠管,逐层缝合关腹。术毕皮下注射生理盐水 30 ml/kg,碘伏消毒并包扎伤口。假 CLP 组除不结扎和穿刺盲肠外,其余步骤相同。

1.3 迷走神经离断术和电刺激 麻醉后,动物仰卧位固定备皮,在喉头与胸骨之间沿颈腹正中中线做长约 2.5~4 cm 切口,用止血钳将胸骨舌骨肌与胸骨甲状肌分开,即可找到颈动脉鞘(内有颈动脉及颈部神经)。钝性分离颈总动脉和迷走神经约 3~4 cm,4.0 丝线结扎迷走神经然后剪断,远端与双铂电极连接。刺激组于 CLP 术后即刻以 5 V、2 ms 和 1 Hz 强度持续刺激迷走神经远端 20 min。

1.4 主要试剂及仪器 大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒:武汉博士德生物工程研究所,批号:EK0526;NOS、NO 检测试剂盒:南京建成生物工程研究所,批号:20070918 和 20070919;UV-2300 紫外分光光度计:上海天美;GZ-16 湘仪台式高速低温离心机和超低温冰箱:日本 SANYO;生物信号采集分析 BL-420 系统:成都泰盟。

1.5 观察指标及样本采集

1.5.1 一般情况及血流动力学监测 CLP 术后观察动物有无萎靡、寒颤、竖毛、腹泻、脓尿及眼角分泌物增加等表现。右颈总动脉插管,经三通管与压力变换器连接,输入台式电脑,由 BL-420 生理仪分析软件记录血压波形变化和数值。

1.5.2 血浆 TNF- α 、NOS 及 NO 含量测定 分别于电刺激后 2 h,从颈总动脉采血 0.8 ml 置于含 EDTA 抗凝剂无菌 EP 管中,4℃、3000 r/min 离心 15 min,取血浆保存于-70℃。按照试剂盒说明书检测血浆 TNF- α 、NOS、NO 水平。

1.6 统计学方法 数据以($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 11.5 软件,采用单因素 ANOVA 分析,独立样本间采用 LSD-*t* 检验,显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 平均动脉压 CLP 组术后平均动脉血压较假 CLP 组进行性下降($P<0.01$),电刺激组动物平均动脉压下降幅度较 CLP 组减轻($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠平均动脉压的变化(mmHg)

组别	n	即刻	1 h	2 h
假 CLP 组	8	109.20 \pm 13.81	105.90 \pm 11.78	95.80 \pm 8.43
CLP 组	8	110.39 \pm 14.79	88.13 \pm 13.07 ^a	74.00 \pm 7.26 ^a
迷切组	8	108.20 \pm 13.10	90.90 \pm 11.32 ^b	71.80 \pm 6.14 ^a
左侧刺激组	8	111.66 \pm 13.07	101.13 \pm 12.45 ^{c,e}	90.13 \pm 9.73 ^{d,f}
右侧刺激组	8	109.29 \pm 10.58	104.13 \pm 9.82 ^{c,e}	91.13 \pm 10.07 ^{d,f}

注:1 mmHg=0.133 kPa。与假 CLP 组比较,a: $P<0.01$,b: $P<0.05$;与 CLP 组比较,c: $P<0.05$,d: $P<0.01$;与迷切组比较,e: $P<0.05$,f: $P<0.01$ 。

2.2 血浆 TNF、NOS 及 NO 水平 术后 2 h,CLP 组术后血浆 TNF、NOS 及 NO 水平较假 CLP 组明显升高($P<0.01$),电刺激组动物血浆 TNF、NOS 及 NO 水平上升幅度较 CLP 组明显减轻($P<0.01$)。见表 2。

表 2 各组大鼠血浆 TNF、NOS 及 NO 水平

组别	n	TNF(pg/ml)	NO(μ mol/L)	NOS(U/ml)
假 CLP 组	8	40.71 \pm 5.03	25.21 \pm 3.05	29.45 \pm 2.79
CLP 组	8	69.80 \pm 6.56 ^a	55.77 \pm 7.42 ^a	45.33 \pm 3.24 ^a
迷切组	8	77.07 \pm 8.96 ^a	52.21 \pm 9.05 ^a	43.45 \pm 5.15 ^a
左侧刺激组	8	45.64 \pm 5.54 ^{b,c}	28.33 \pm 5.66 ^{b,c}	33.33 \pm 3.98 ^{b,c}
右侧刺激组	8	43.35 \pm 6.52 ^{b,c}	27.33 \pm 6.74 ^{b,c}	31.33 \pm 4.46 ^{b,c}

注:a:与假 CLP 组比较, $P<0.01$;b:与 CLP 组比较, $P<0.01$;c:与迷切组比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

NO 是 L-精氨酸在 NOS 作用下生成的。NOS 主要有两种异构体:结构型 NOS(cNOS)和诱导型 NOS(iNOS);由前者催化生成的 NO 量较少,主要在生理状态下释放并调节细胞间的信息传递;后者在内毒素、某些细胞因子如 TNF- α 等激活下产生大量 NO,NO 通过 cGMP 依赖性和非依赖性两条通路作用于血管平滑肌,导致血管舒缩机能障碍。iNOS 作为 NO 生成的限速酶,是影响感染性休克发病过程的重要关键性中介物质^[4]。Petros 和 Kilbourn 等用 NO 或 iNOS 抑制剂治疗感染性休克,起到了提高血压、降低败血症病死率和抗休克作用。TNF- α 是一类由单核-巨噬细胞产生的内源性细胞因子,是感染性休克病理生理改变的基础^[5]。在持续内毒素血症存在的情况下,TNF- α 可促进肝细胞合成 NO,TNF- α 可通过在贮脂细胞及巨噬细胞上的表达而增加 NO 的合成。

本研究发现,CLP 组大鼠平均动脉压进行性下降,2 h 时血浆 TNF- α 、NOS 及 NO 水平明显高于假 CLP 组,说明 TNF- α 、NOS 及 NO 的产生与腹腔感染

有明显关系。严重腹腔感染时,机体内毒素血症可导致机体巨噬细胞、T 淋巴细胞产生免疫应答,释放一些中介物质如 $\text{TNF-}\alpha$ 等,同时内毒素和这些细胞因子作用于巨噬细胞、中性粒细胞等细胞内的 iNOS,生成大量 NO;过多的 NO 可激活鸟苷酸环化酶,产生大量环鸟苷酸,减少胞内游离钙离子,从而引起全身血管异常扩张,并降低血管对缩血管物质的反应性。这是严重感染时出现的低血压的重要原因^[6]。

本研究发现,电刺激左、右侧迷走神经均可改善感染性休克大鼠的低血压状态,降低 NOS 活性和 NO 含量,并对其 $\text{TNF-}\alpha$ 的生成具有抑制作用。Borovikova 等发现,乙酰胆碱可使血中 $\text{TNF-}\alpha$ 显著减少^[7]。Tracey 等研究发现,直接电刺激内毒素休克大鼠的左侧迷走神经传出纤维,可降低肝中 $\text{TNF-}\alpha$ 的含量,使休克动物的低血压得到缓解;其离体实验表明,迷走神经释放的递质乙酰胆碱可减轻巨噬细胞对内毒素的免疫反应,抑制 $\text{TNF-}\alpha$ 合成^[8]。

迷走神经是由运动性和感觉性神经纤维所组成的一个混合性神经,其末梢分布广泛,其中肝脏接受来自腹腔神经丛的迷走神经支配。迷走神经一般被分为前丛和后丛,前丛由左右腹腔神经节和左迷走神经分支组成,包括胆囊管、胆囊和胰腺-胆总管分支,其在肝动脉周围形成鞘,并沿肝动脉进入肝脏;后丛由右腹腔神经节和右迷走神经分支组成,主要沿肝外胆管和门静脉分布,其有分支与前丛神经分支相沟通^[9]。大鼠肝的迷走神经支配则主要是通过迷走神经在贲门上数毫米处发出的肝支直接支配,而不是通过腹腔神经丛^[10]。有研究证明,电刺激致左侧迷走神经兴奋后释放大乙酰胆碱,与存在于库普弗细胞和肝内单核细胞上的乙酰胆碱受体 $\alpha 7$ 亚单位结合^[11],可减轻巨噬细胞对内毒素的免疫反应,抑制 $\text{TNF-}\alpha$ 合成,进而抑

制 NOS 的诱导,从而抑制 NO 生成和释放。尽管左右侧迷走神经解剖路径不同,但本试验的结果表明,左右两侧迷走神经兴奋后均可能经由乙酰胆碱释放后激活的胆碱能抗炎通路降低血浆 $\text{TNF-}\alpha$ 、NOS 活性和 NO 含量,并起到抗休克的作用。

[参考文献]

- [1] Pavlov VA, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway [J]. Brain Behav Immun, 2005, 19(6):493—499.
- [2] Pavlov VA, Tracey KJ. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway[J]. Biochem Soc Trans, 2006, 34(Pt6): 1037—1040.
- [3] 石德光, 胡森, 姜小国, 等. 迷走神经兴奋减轻内毒素血症引起的大鼠心脏炎症反应[J]. 中国危重病急救医学杂志, 2003, 15(1):26—28.
- [4] 谢子安, 方强. 一氧化氮与感染性休克关系的实验和临床研究进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(11):1433—1437.
- [5] Sato T, Asanuma Y, Massaki Y, et al. Changes in $\text{TNF-}\alpha$ and interleukin 1 beta production following liver surgery on cirrhotic patients[J]. Hepatogastroenterol, 1996, 43(11):1148—1153.
- [6] Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms [J]. Anna Reu physiol, 1995, 57:737—769.
- [7] Borovikova LV, Ivanova S, Naardi D, et al. Role of vagus nerve signaling in CNI214932 mediated suppression of acute inflammation [J]. Auton Neurosci, 2000, 85(1—3):141—147.
- [8] Tracey KJ. The inflammatory reflex[J]. Nature, 2002, 420(6917): 853—859.
- [9] 陈明易, 李崇辉, 黄志强. 肝脏支配神经及其对肝脏循环的调节[J]. 国外医学外科学分册, 2003, 30(5):280—282.
- [10] Shimazu T. Progress and perspective in neurohepatology[M]. // Shimazu T. Liver Innervation. London: John Libbey, 1996:57.
- [11] Wang H, Yu M, Ochant M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation [J]. Nature, 2003, 421(6921):384—388.

(收稿日期:2008-12-15)