

## 大鼠肠淋巴液引流方法的建立及肠道缺血再灌注损伤时活性物质的改变

陈雪峰<sup>1</sup>, 何桂珍<sup>1</sup>, 董良广<sup>1</sup>, 舒红<sup>1</sup>, 王秀荣<sup>1</sup>, 高峰燕<sup>2</sup>

<sup>1</sup>中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院肠外肠内营养科, 北京 100730

<sup>2</sup>中国疾病预防控制中心慢病社区处, 北京 100050

通信作者: 何桂珍 电话: 010-65294096, 电子邮件: hgzpumc@163.com

**摘要:** **目的** 建立大鼠肠淋巴液引流方法并探讨可能参与肠道缺血再灌注损伤的活性物质。**方法** 建立并熟练掌握大鼠肠淋巴液引流的方法。选用 SPF 级 SD 大鼠, 随机分为肠道缺血再灌注加淋巴液引流组 (I/R + 引流组) 和单纯肠淋巴液引流组 (引流组), 其中 I/R + 引流组大鼠行肠系膜上动脉夹闭, 缺血 60 min, 再灌注 120 min。收集大鼠淋巴液和血清, 比较两组内毒素、高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 及细胞因子, 包括肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白细胞介素 6 (IL-6) 和可溶性细胞黏附分子 (sICAM-1) 的水平。**结果** 大鼠肠淋巴液引流的成功率较高 (84.2%)。I/R + 引流组的淋巴液和血清中内毒素、HMGB1 以及炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 sICAM-1 均显著高于单纯引流组 ( $P < 0.05$ )。**结论** 建立起比较简便、易行的肠淋巴液引流方法。内毒素、HMGB1 和部分炎症因子可能参与了肠道缺血再灌注损伤。

**关键词:** 肠道缺血再灌注损伤; 肠淋巴液引流; 高迁移率族蛋白 1

**中图分类号:** R649.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-503X(2009)03-0322-04

**DOI:** 10.3881/j.issn.1000-503X.2009.03.017

### Method for Drainage of Lymph Fluid and Determining the Change of Active Materials in Lymph Fluid after Rat Ischemia-reperfusion Injury

CHEN Xue-feng<sup>1</sup>, HE Gui-zhen<sup>1</sup>, DONG Liang-guang<sup>1</sup>, SHU Hong<sup>1</sup>, WANG Xiu-rong<sup>1</sup>, GAO Feng-yan<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Enteral and Parenteral Nutrition, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

<sup>2</sup>Division of NCD Control and Community Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China

Corresponding author: HE Gui-zhen Tel: 010-65294096, E-mail: hgzpumc@163.com

**ABSTRACT: Objective** To set up a method for the drainage of lymph fluid and explore the change of active materials in lymph fluid and serum after rat ischemia-reperfusion injury. **Methods** The method of the drainage of lymph fluid was well established. Sixteen healthy male rats of SPF grade were selected and randomly divided into 2 groups: intestinal ischemia-reperfusion + drainage group (I/R + drainage group) and drainage group. All the rats were subjected to superior mesenteric artery occlusion for 60 minutes, followed by 120 minutes of reperfusion. We compared the change of high mobility group box-1 (HMGB1) protein, endotoxin, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL) -1 $\beta$ , IL-6, and soluble vascular cell adhesion molecular-1 (sICAM-1) by draining lymph fluid and collecting serum in 2 groups. **Results** The drainage of lymph fluid was successfully performed. The HMGB1, endotoxin, and cytokines in serum and lymph fluid were significantly

higher in ischemia-reperfusion group than in drainage group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The method for drainage of lymph fluid is simple and feasible. Endotoxin, HMGB1, and some cytokines in serum and lymph fluid may mediate the ischemia-reperfusion injury.

**Key words:** intestine ischemia reperfusion injury; drainage of intestine lymph fluid; high mobility group box 1

*Acta Acad Med Sin*, 2009, 31(3): 322-325

越来越多的研究证实, 肠道是应激的中心器官。肠道缺血再灌注损伤对严重创伤、大面积烧伤、休克、大手术等的发展与预后起重要作用, 甚至会导致全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) 和多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) 的发生。但肠道缺血再灌注引起 MODS 的机制仍未明确。最近研究认为, 肠道缺血再灌注损伤导致的系统炎症反应和远隔组织损伤的关键机制可能是肠源性因子经“肠-淋巴途径”到达系统循环<sup>[1-2]</sup>。虽然围绕“肠-淋巴途径”中参与损伤的活性物质已进行过大量研究, 但由于淋巴液的获取技术较难, 在很大程度上阻碍了“肠-淋巴途径”的研究。笔者在参考国内外获取淋巴液方法的基础上<sup>[3-4]</sup>, 加以优化改进, 建立起一个简便可行的淋巴液引流方法; 并研究大鼠肠道缺血再灌注损伤时淋巴液和循环中内毒素、高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box 1, HMGB1) 和炎症因子的变化, 探讨肠道淋巴在缺血再灌注损伤中的可能作用。

## 材料和方法

### 大鼠肠淋巴液引流方法的建立

术前准备: 所有手术器械、用于引流的硅胶导管、收集淋巴液的 Nunc 冻存管 (丹麦 Nunc 公司)、移液枪头等均预先灭菌、去热原处理。Nunc 管的管盖预先钻 1 个小孔, 将硅胶导管一端插入 Nunc 管内, 导管另一端剪 1 个 45 度斜面, 长约 3 mm。同时, 在无茵操作包内准备 1 个无孔的管盖。熟练辨别大鼠肠系膜淋巴管所在位置和走向。

肠淋巴液引流: 大鼠麻醉、消毒后, 行腹部正中切口, 长约 4 cm。将全肠道及网膜组织向大鼠左侧掀起, 暴露肠系膜上动脉及肠淋巴干, 在近腹主动脉处剪开浆膜, 钝性分离肠系膜上动脉及肠淋巴干。轻提大鼠肠淋巴干, 用眼科剪轻剪一小口, 待少量淋巴液流出的同时, 用眼科镊夹住硅胶导管, 将 45 度斜面置于开口处, 然后顺着淋巴管走向缓慢

往里送, 待导管进入淋巴管管腔 4~6 mm 有淋巴液流出时, 用少量医用胶 (广州白云医用胶厂) 涂抹于右肾旁浆膜处, 固定导管, 以防脱出。淋巴液收集完成后, 拔除导管, 将带孔的管盖换成无茵无孔的管盖旋紧。

### 大鼠肠道缺血再灌注模型及淋巴液引流

实验动物及分组: SPF 级 SD 健康雄性大鼠 16 只, 体重 (300 ± 20) g (北京维通利华实验动物技术有限公司), 随机分为肠道缺血再灌注加淋巴液引流组 (I/R + 引流组) 和单纯淋巴液引流组 (引流组) 两组, 每组 8 只。

肠道缺血再灌注及淋巴液收集: 所有大鼠在适应性饲养 5 d 后, 实验前禁食 12 h, 可自由饮水。1% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 行淋巴管插管。I/R + 引流组大鼠在淋巴管插管固定后, 用无创血管夹夹闭肠系膜上动脉 60 min, 再松夹复灌 120 min。在此期间, 间断向腹腔中注射少量生理盐水, 以预防松开动脉夹后出现一过性低血容量反应。引流组只引流淋巴液而不进行缺血再灌注。每只大鼠收集 180 min 淋巴液。

**标本采集** 实验结束后, 将收集淋巴液的 Nunc 管, 于 4℃、10 000 × g 离心 10 min, 取上清于 -80℃ 冻存。下腔静脉取血, 于 4℃、1 000 × g 离心 10 min, 分离血清, 分装至灭菌去热原的 Eppendorf 管, 冻存于 -80℃。

**观察指标及检测方法** (1) 内毒素: 淋巴液和血清中内毒素用改良偶氮显色鲎试剂盒 (上海伊华医学科技有限公司) 定量检测。(2) HMGB1: 用双抗体夹心 ELISA 法检测淋巴液和血清中 HMGB1 水平。(3) 细胞因子: 用双抗体夹心 ELISA 法检测淋巴液和血清中肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α, TNF-α)、白细胞介素 (Interleukin, IL) -1β、IL-6 和可溶性细胞黏附分子 (soluble intercellular adhesion molecule-1, sICAM-1) 水平。

**统计学处理** 采用 Excel 2003 及 SPSS13.0 统计软件, 若方差齐, 作 *t* 检验分析; 若方差不齐, 作 *t'* 检验分析。计量资料采用均数 ± 标准差表示, 以  $P <$

0.05 表示差异具有统计学意义。

## 结 果

**淋巴液引流的成功率** 淋巴液引流方法熟练掌握后,成功率较高(84.2%, 16/19)。180 min 内 L/R + 引流组大鼠引流的淋巴液量约为 0.6 ml, 而引流组约为 0.8 ml。

**血和淋巴液中内毒素、HMGB1 和炎症因子水平** L/R + 引流组大鼠血清和淋巴液中的内毒素、HMGB1 以及炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 sICAM-1 水平均显著高于单纯引流组 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

## 讨 论

肠道作为 MODS 发动机的概念已被普遍接受,在休克、烧伤和 ICU 重症患者中肠屏障功能的损害是引起 SIRS 和 MODS 的重要原因,但其具体机制仍存在各种推测和争议。“肠-淋巴”引发 MODS 这一概念的提出是基于将休克动物淋巴液输入到正常动物体内可以复制休克引起的各种病理损伤<sup>[5-6]</sup>,而在失血性休克前进行淋巴管引流可以预防休克引起的器官功能障碍,包括肺通透性、肺泡细胞凋亡和肺部中性粒细胞聚集的增加<sup>[7]</sup>。另外,Deitch 等<sup>[8]</sup>和 Damle 等<sup>[9]</sup>的研究结果都表明,休克后肠淋巴液是创伤失血性休克和 MODS 之间的关键环节。本实验室曾应用大鼠肠道缺血再灌注损伤模型研究淋巴管结扎对肠源性 MODS 的影响,结果表明在肠道缺血再灌注前进行肠淋巴管结扎,可有效减少肠道缺血再灌注损伤引发的肠屏障损伤、急性肺损伤,降低体循环中炎症细胞因子和内毒素水平等;说明肠源

性物质可能经“肠-淋巴途径”进入循环,引发炎症反应,结扎淋巴管可以有效阻断这一途径<sup>[10]</sup>。

大鼠淋巴液的获取技术较难,因大鼠淋巴管管壁薄,由少量上皮细胞组成,操作中极易受损;另外肠淋巴干及肠系膜上动脉周围缠绕少量毛细血管,如操作不慎,即会引起失血。本研究在参考国内外获取淋巴液方法<sup>[3-4]</sup>的基础上,主要作了以下改进:(1) 将以往结扎固定改为涂抹医用胶固定,起到良好固定作用;将顾葆春等<sup>[4]</sup>的涂抹位置由下腔静脉处改为涂在大鼠右肾旁的浆膜处,减少了由于在下腔静脉处使用胶而可能造成的肠黏连;(2) 预先将硅胶导管插入 Nunc 管,减少了术中污染;手术完毕后,换上 1 个无菌无孔的 Nunc 管盖子旋紧,利于无菌保存;(3) 淋巴管先剪 1 个小孔,再将硅胶导管的 45 度斜面置于开口处,能准确定位引流淋巴液的位置,而不是直接将硅胶管插入淋巴管,因为硅胶管较软,不一定能准确刺入所需位置,反复插入还会造成对淋巴管的损伤。

大量研究表明,细胞因子在缺血再灌注损伤中发挥重要作用。细胞因子之间的相互拮抗、相互协同,构成复杂的细胞因子级联反应,导致炎症因子释放增加、内毒素移位,进而引起肠屏障功能障碍和远隔组织器官损伤,最终发展成 SIRS 和 MODS<sup>[1,5]</sup>。已知微生物及其产物(主要是内毒素)通过 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR4) 激发生物体发生失控的炎症反应和脓毒症。但在某些创伤和手术等引起的 SIRS 和远隔组织器官损伤中,并未检测到内毒素;而应用 *TLR4* 基因突变小鼠或者 TLR4 阻断剂可以明显减轻炎症反应和组织损伤。最新研究认为可能是 TLR4 及其内源性配体相互激活并引发炎症反应;在肾脏、肝脏、肺、脑等多种器官

表 1 两组大鼠淋巴液和血清中内毒素、HMGB1 和炎症因子水平

Table 1 Levels of endotoxin, HMGB1, and several cytokines in lymph fluid and serum in rats of both groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

分组 Group	内毒素 Endotoxin (EU/ml)	HMGB1 ( $\mu\text{g/L}$ )	TNF- $\alpha$ (ng/L)	IL-1 $\beta$ (ng/L)	IL-6 (ng/L)	sICAM-1 ( $\mu\text{g/L}$ )
淋巴液 Lymph fluid						
引流组 Drainage group	0.0077 $\pm$ 0.0051	5.4395 $\pm$ 0.9731	31.623 $\pm$ 6.479	65.479 $\pm$ 7.992	20.012 $\pm$ 5.623	54.073 $\pm$ 8.082
L/R + 引流组 L/R + drainage group	0.0289 $\pm$ 0.0107*	6.6971 $\pm$ 1.0526*	53.706 $\pm$ 20.202*	148.393 $\pm$ 28.042*	30.326 $\pm$ 7.989*	116.666 $\pm$ 10.936*
血清 Serum						
引流组 Drainage group	0.0207 $\pm$ 0.0025	2.9635 $\pm$ 0.9965	12.329 $\pm$ 2.357	23.414 $\pm$ 3.574	13.554 $\pm$ 4.137	34.670 $\pm$ 8.125
L/R + 引流组 L/R + drainage group	0.0241 $\pm$ 0.0026*	4.9058 $\pm$ 0.5517*	25.381 $\pm$ 9.281*	65.829 $\pm$ 10.888*	19.204 $\pm$ 4.136*	48.401 $\pm$ 6.547*

HMGB1: 高迁移率族蛋白 1; TNF- $\alpha$ : 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ : 白细胞介素 1 $\beta$ ; IL-6: 白细胞介素 6; sICAM-1: 可溶性细胞黏附分子-1; L/R: 缺血再灌注; 与引流组比较, \*  $P < 0.05$

HMGB1: high mobility group box 1; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ ; IL-1 $\beta$ : interleukin-1 $\beta$ ; IL-6: interleukin-6; sICAM-1: soluble intercellular adhesion molecule-1; L/R: ischemia-reperfusion; \*  $P < 0.05$  compared with drainage group

的缺血再灌注损伤中, HMGB1 作为 TLR4 的内源性配体, 激活 TLR4 等受体, 活化核因子- $\kappa$ B 等多种信号通路, 促进多种炎症因子的合成释放<sup>[11]</sup>。

本研究结果显示, 肠道 I/R + 引流组的大鼠淋巴液和血清中内毒素、HMGB1 以及多种炎症因子释放均显著高于单纯淋巴液引流组的大鼠, 表明缺血再灌注损伤时, 内毒素、HMGB1 和炎症因子的表达均增加。对于内毒素和 HMGB1 在损伤中孰轻孰重、孰先孰后的问题, 仍存在争议。但不容否定的是, 上述几种物质均参与了损伤, 其具体作用机制将是进一步研究方向。

### 参 考 文 献

- [1] Clark JA, Coopersmith CM. Intestinal crosstalk: a new paradigm for understanding the gut as the "motor" of critical illness [J]. *Shock*, 2007, 28(4):384-393.
- [2] Fanous MY, Phillips AJ, Windsor JA. Mesenteric lymph: the bridge to future management of critical illness [J]. *JOP*, 2007, 8(4):374-399.
- [3] Glatzle J, Kasperek MS, Mueller MH, *et al.* Enteral immunonutrition during sepsis prevents pulmonary dysfunction in a rat model [J]. *Gastrointest Surg*, 2007, 11(6):719-724.
- [4] 顾葆春, 刘正军, 李 萍, 等. 获取大鼠肠淋巴液的技术改进 [J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27(19):1988-1989.
- [5] Niu CY, Li JC, Zhao ZG, *et al.* Effect of intestinal lymphatic circulation blockage in two-hit rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(36):5805-5812.
- [6] Senthil M, Watkins A, Barlos D, *et al.* Intravenous injection of trauma-hemorrhagic shock mesenteric lymph causes lung injury that is dependent upon activation of the inducible nitric oxide synthase pathway [J]. *Ann Surg*, 2007, 246(5):822-830.
- [7] Watkins AC, Caputo FJ, Badami C, *et al.* Mesenteric lymph duct ligation attenuates lung injury and neutrophil activation after intraperitoneal injection of endotoxin in rats [J]. *J Trauma*, 2008, 64(1):126-130.
- [8] Deitch EA, Xu D, Kaise VL. Role of the gut in the development of injury- and shock-induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review [J]. *Front Biosci*, 2006, 11:520-528.
- [9] Damle SS, Moore EE, Nydam TL, *et al.* Postshock mesenteric lymph induces endothelial NF- $\kappa$ B activation [J]. *J Surg Res*, 2007, 143(1):136-140.
- [10] He GZ, Dong LG, Cui XY, *et al.* Effect of mesenteric lymphatic duct ligation on the system inflammation during the intestinal ischemia-reperfusion [J]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, 2008, 11(5):469-471.
- [11] Wu H, Chen G, Wyburn KR, *et al.* TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(10):2847-2859.

(2008-11-24 收稿)