

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.35.003

丙酮酸盐替代乳酸盐腹膜透析液腹腔复苏对失血性 休克家兔肠黏膜屏障的影响^{*}

罗兴均¹,钟和英¹,冉 然¹,田 刚¹,简道林^{2△},卢 啸¹

(1. 湖北医药学院附属人民医院麻醉科,湖北十堰 442000;2. 三峡大学仁和医院麻醉科,湖北宜昌 443001)

[摘要] **目的** 观察丙酮酸盐替代乳酸盐腹膜透析液行腹腔复苏对失血性休克家兔肠黏膜屏障的影响。**方法** 雄性健康家兔 48 只以 Wiggers 改良方法制备失血性休克模型,将其分为常规静脉复苏组(A 组)、常规静脉复苏+腹腔注射乳酸盐腹膜透析液组(B 组)、常规静脉复苏+腹腔注射丙酮酸盐腹膜透析液组(C 组)和静脉丙酮酸盐液复苏+腹腔注射丙酮酸盐腹膜透析液组(D 组)。检测休克前、休克后 60 min 及复苏后 60、180 min 静脉血二胺氧化酶(DAO)和脂多糖(LPS)水平。于观察终点取距回盲部 5 cm 的一段回肠,测定组织干/湿质量比、丙二醛(MDA)水平及超氧化物歧化酶(SOD)活性,并观察其病理形态学改变。**结果** 4 组休克前血浆 DAO、LPS 水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$);休克后 60 min 均较休克前升高,但组间比较差异均无统计学意义($P>0.05$);复苏后 60、180 min,A、B、C、D 组血浆 DAO、LPS 水平依次降低($P<0.05$)。复苏后 180 min,A、B、C、D 组回肠组织 MDA 水平依次降低($P<0.05$),SOD 活力水平、组织干/湿质量比依次升高($P<0.05$),且组织损伤程度也依次减轻。**结论** 丙酮酸盐替代乳酸盐腹膜透析液腹腔复苏可更有效地保护失血性休克家兔肠组织细胞和减轻肠黏膜损伤。

[关键词] 休克,出血性;丙酮酸盐;腹腔复苏;肠黏膜
[中图法分类号] R459.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)35-4904-03

Effect of pyruvate replacing lactate dialysis solution peritoneal resuscitation on intestinal mucosal barrier of rabbit with hemorrhagic shock^{*}

Luo Xingjun¹,Zhong Heying¹,Ran Ran¹,Tian Gang¹,Jian Daolin^{2△},Lu Xiao¹

(1. Department of Anesthesiology, People's Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China;
2. Department of Anesthesiology, Renhe Hospital of Three Gorges University, Yichang, Hubei 443001, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of peritoneal resuscitation by pyruvate replacing lactate peritoneal dialysis solution on the intestinal mucosal barrier in rabbits with hemorrhagic shock. **Methods** The hemorrhagic shock model was prepared in 48 healthy male rabbits by adopting the improved Wiggers method. Then the rabbits were randomly divided into the conventional intravenous resuscitation group (group A),conventional intravenous resuscitation plus intraperitoneal injection of lactate peritoneal dialysis solution group (group B),conventional intravenous resuscitation plus intraperitoneal injection of pyruvate peritoneal dialysis solution group (group C) and intravenous pyruvate peritoneal dialysis solution resuscitation plus intraperitoneal injection of pyruvate peritoneal dialysis solution group (group D). The levels of diamine oxidase (DAO) and lipopolysaccharide (LPS) were measured before shock,at 60 min after shock,at 60,180 min after resuscitation. At the end of observation,the ileum tissues were taken from the 5 cm away from the ileocecal region for measuring the dry/wet ratio,malondialdehyde (MDA) level and superoxide dismutase (SOD) activity and their morphological changes was observed. **Results** There was no statistical difference in the plasma levels of DAO and LPS before shock among the four groups ($P>0.05$);which at 50 min after shock were increased,but the comparison among the groups had no statistical difference ($P>0.05$);the plasmas levels of DAO and LPS at 60,180 min after resuscitation in the group A,B,C and D were decreased in turn ($P<0.05$). The MDA levels of ileum tissues after 180 min of resuscitation in the group A,B,C and D were decreased in turn ($P<0.05$),but the SOD activities and tissue dry/wet mass ratios were increased in turn ($P<0.05$),moreover the tissue injury degrees were also relieved in turn. **Conclusion** The peritoneal resuscitation by pyruvate replacing lactate peritoneal dialysis solution can more effectively protect the intestinal tissue cells and reduce intestinal mucosal damage in hemorrhagic shock rabbits.

[Key words] shock,hemorrhagic;pyruvate;peritoneal resuscitation;intestinal mucosa

腹腔复苏作为一种新的休克辅助治疗方式^[1],已被证明可以改善失血性休克/复苏后肠道微循环,最终防止器官衰竭并降低病死率^[2-3],但目前所使用的乳酸盐腹膜透析液对宿主防御细胞存在明显的毒性作用,且有加剧乳酸性酸中毒的可能,在抗休克的同时仍具有巨大的潜在风险^[4-5]。与乳酸盐比较,丙酮酸盐几乎没有乳酸盐的不良反 应,且能直接纠正乳酸性酸

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81201460)。 作者简介:罗兴均(1977—),副主任医师,硕士,主要从事围术期脏器保护方面研究。 △ 通信作者,E-mail:jiandaolin@163.com。

中毒并保护血管内皮细胞^[6]。因此,本研究以丙酮酸盐替代乳酸盐腹膜透析液对失血性休克家兔进行腹腔复苏,探讨其对失血性休克家兔肠黏膜屏障功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 健康雄性家兔 48 只(湖北医药学院动物房提供),体质量(2.1±0.3)kg。按设计要求分为常规静脉复苏组(A 组)、常规静脉复苏+腹腔注射乳酸盐腹膜透析液组(B 组)、常规静脉复苏+腹腔注射丙酮酸盐腹膜透析液组(C 组)、静脉丙酮酸盐复苏+腹腔注射丙酮酸盐腹膜透析液组(D 组)。各组家兔体质量、术中条件(室温)、术中干预(麻醉药量、肝素液量)相近。

1.2 方法

1.2.1 复制失血性休克模型 家兔自由饮水,禁食过夜,仰卧位固定于手术台。3%戊巴比妥钠耳缘静脉注射(1 mL/kg)行静脉麻醉,麻醉平稳后仰卧固定于操作台上。脱毛后行气管插管,保持动物自主呼吸。耳缘静脉注射低分子肝素钠液 500 U/kg,使之全身肝素化,然后行右侧颈动脉插管,利用三通管放血和采血,并连接 BL-420E 型多参数监测仪(成都泰盟科技公司)连续监测平均动脉压(MAP)。另行同侧颈外静脉插管供回输血液和补液。待动物血压稳定 30 min 后,按 Wiggers 改良方法制备控制性失血性休克模型。10 min 内从动脉均匀放血使 MAP 降至 40 mm Hg,通过输血或放血维持 MAP 在 40 mm Hg 左右。60 min 后,根据复苏方式和复苏药物的不同,分别给予休克复苏。A 组:20 min 内静脉回输放出的血液和两倍于放血量的乳酸钠林格液进行液体复苏;B 组:静脉液体复苏的同时腹腔内注射 2.5%临床用乳酸盐腹膜透析液(广州百特公司)120 mL;C 组:静脉液体复苏的同时腹腔内注射丙酮酸盐腹膜透析液 120 mL[丙酮酸盐腹膜透析液浓度(mmol/L):钠 132 mmol,钙 1.75 mmol,镁 0.25 mmol,氯化物 96 mmol,丙酮酸盐 40 mmol,用冰点降低法测渗透浓度为 384 mmol/L,pH 5.4];D 组:20 min 内静脉回输放出的血液和两倍于放血量的丙酮酸盐溶液,同时腹腔内注射丙酮酸盐腹膜透析液 120 mL。

1.2.2 观察指标 检测休克前、休克后 60 min 及复苏后 60、180 min 静脉血二胺氧化酶(DAO)和脂多糖(LPS)水平。于观察终点,取距回盲部 5 cm 的一段回肠,测定组织干/湿质量比、丙二醛(MDA)水平、超氧化物歧化酶(SOD)活力,并行苏木精-伊红(HE)染色于光学显微镜下观察其形态学改变。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 LDS-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 丙酮酸腹膜透析液腹腔复苏对失血性休克家兔血浆 DAO 的影响 失血性休克前,4 组 DAO 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);休克后 60 min,4 组 DAO 水平均较休克前明显升高,组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);复苏后 60、180 min,DAO 水平 A 组>B 组>C 组>D 组,组间比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.2 丙酮酸腹膜透析液腹腔复苏对失血性休克家兔血浆 LPS 的影响 失血性休克前,4 组 LPS 水平比较,差异无统计学意

义($P > 0.05$);休克后 60 min,LPS 水平均较休克前明显升高,组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);复苏后 60、180 min,LPS 水平 A 组>B 组>C 组>D 组,组间比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

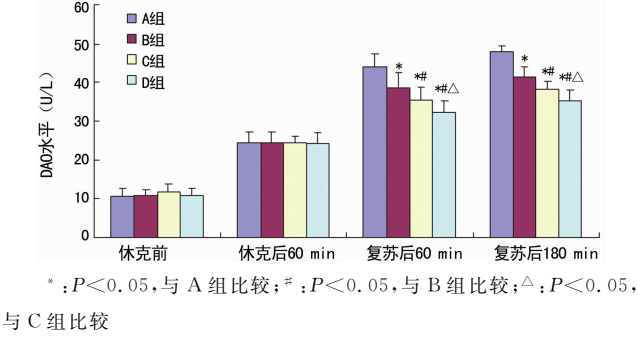


图 1 4 组家兔血浆 DAO 水平变化

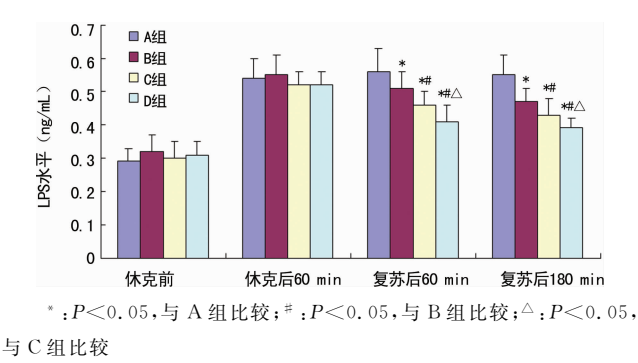


图 2 4 组家兔血浆 LPS 水平变化

2.3 丙酮酸腹膜透析液腹腔复苏对失血性休克家兔组织干/湿质量比的影响 4 组复苏后 180 min 回肠组织干/湿质量比分别为 A 组(28±4)%、B 组(40±4)%、C 组(44±8)%、D 组(58±8)%,A、B、C、D 组依次升高,组间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

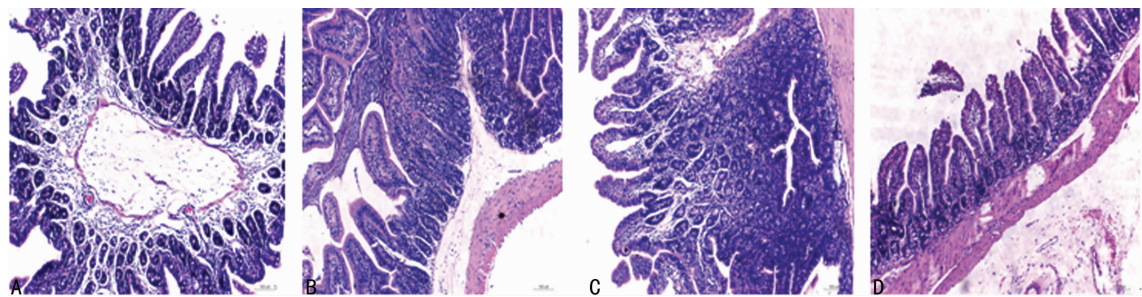
2.4 丙酮酸腹膜透析液腹腔复苏对失血性休克家兔回肠组织 MDA 水平和 SOD 活力的影响 复苏后 180 min,4 组动物回肠组织分别匀浆后检测 MDA 水平,呈现 A、B、C、D 组依次降低,而 SOD 活力则与之相反,A、B、C、D 组依次升高,组间比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 4 组回肠组织中 MDA 水平与 SOD 活力比较(n=12, $\bar{x} \pm s$)

组别	MDA(nmol/mg prot)	SOD(U/mg prot)
A 组	5.12±0.40	335±44
B 组	4.54±0.41 *	415±64 *
C 组	4.11±0.43 * #	488±64 * #
D 组	3.68±0.72 * # △	586±39 * # △

* : $P < 0.05$,与 A 组比较;#: $P < 0.05$,与 B 组比较;△: $P < 0.05$,与 C 组比较

2.5 丙酮酸腹膜透析液腹腔复苏对失血性休克家兔回肠组织形态学的影响 A 组:黏膜固有层及黏膜下层血管扩张,间质疏松水肿,大量炎性细胞浸润;B 组:黏膜固有层内较多炎性细胞浸润,黏膜下间质疏松水肿,黏膜表面较多炎性渗出物;C 组:黏膜下层轻度疏松水肿,固有层炎性细胞浸润;D 组:黏膜下层轻度疏松水肿,未见明显炎性细胞浸润,上皮细胞基本完整,见图 3。



A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组

图 3 光学显微镜下回肠组织病理图片 (HE,×40)

3 讨 论

高糖乳酸盐腹膜透析液对宿主间皮细胞、吞噬细胞等防御细胞有明显毒性作用,是损伤腹膜结构和功能,导致其功能下降甚至丧失的因素之一,其机制可能是乳酸与葡萄糖协同作用,抑制了细胞呼吸,同时透析液中所含的非生理性乳酸对细胞也有毒性作用^[4-5]。因此,乳酸盐腹膜透析液在腹腔复苏中并不是理想的选择,其不利因素可能只是在一定条件下被高渗的保护作用所掩盖。

丙酮酸盐能直接纠正乳酸性酸中毒^[7-10],消除或减轻葡萄糖与乳酸的细胞毒作用^[6],具有保护血管内皮细胞和红细胞/携氧的功能^[11-14],几乎没有乳酸盐的不良反应。本研究采用丙酮酸盐替代乳酸盐腹膜透析液对失血性休克家兔进行腹腔复苏治疗,以克服乳酸盐腹膜透析液腹腔复苏的细胞毒作用和潜在风险,观察其对复苏关键脏器肠道黏膜屏障相关指标的影响。DAO 存在于哺乳动物小肠黏膜绒毛上皮细胞中,是具有高度活性的细胞内酶,为肠屏障功能受损的较好指标,能可靠地反映小肠黏膜结构和功能情况。正常机体肠腔内虽含有大量细菌和内毒素,但健全的肠道屏障功能可阻隔和限制其致病作用。如病理状态导致肠道屏障功能受损,肠腔内的细菌和内毒素可突破肠黏膜屏障并刺激特定细胞生成大量炎性介质,导致全身性炎性反应甚至多器官功能障碍。有文献证明,创伤性休克患者肠道屏障功能受损时,外周血中 DAO 和 LPS 水平升高^[15]。本实验结果表明,休克后,各组家兔血浆 DAO 和 LPS 水平都明显升高,而复苏后各观察时点,A、B、C、D 组血浆 DAO 和 LPS 水平均依次降低,D 组水平最低。腹腔复苏可通过保存和恢复内皮细胞的正常功能,改善休克复苏后肠黏膜循环的低灌注状态^[16],而本实验中丙酮酸盐腹膜透析液可能由于其本身的细胞保护特性使得此作用显著加强。SOD、MDA 是反映组织氧化损伤程度的良好指标。大量的实验证明,休克/复苏再灌注后脂质氧化反应参与和促进肠黏膜的病理损伤,表现为血和组织中 SOD 活性降低,MDA 水平升高。本实验显示,复苏后 180 min,A、B、C、D 组回肠组织 MDA 水平依次降低,而 SOD 活力则与之相反,表明丙酮酸盐腹膜透析液可增强腹腔复苏的抗组织氧化损伤作用。组织干/湿质量比反映组织水肿程度,失血性休克后水分在不同组织腔隙之间转移,水隔离在细胞内和组织间隙,表现为临床性组织水肿。本实验中回肠组织干/湿质量比表现为 A、B、C、D 组依次增高,而组织病理结果也显示 A、B、C、D 组损伤依次减轻。这说明丙酮酸盐腹膜透析液腹腔复苏在发挥腹腔复苏效果的同时可通过多

种不同途径增强对失血性休克家兔肠道的保护作用。丙酮酸盐替代乳酸盐腹膜透析液腹腔复苏增强失血性休克家兔的肠黏膜屏障保护作用的具体机制尚不清楚,初步推测可能机制为:(1)腹腔复苏通过扩血管作用改善内脏组织的灌注,纠正肠道持续缺血状态,从而减轻肠道细胞损伤;(2)可能与丙酮酸盐本身可以消除或减轻葡萄糖与乳酸的细胞毒性作用,以及抗氧化/抗硝基化应急、抗炎作用有关^[17-20]。

总之,丙酮酸盐替代乳酸盐腹膜透析液腹腔复苏对失血性休克家兔的综合影响和作用机制均值得进一步研究和探讨,以期临床休克复苏和脏器保护提供更加安全、简单和有效的治疗方法。

参考文献

[1] Zakaria ER,Hurt RT,Matheson PJ,et al. A novel method of peritoneal resuscitation improves organ perfusion after hemorrhagic shock[J]. Am J Surg, 2003, 186 (5): 443-448.

[2] Garrison RN,Zakaria ER. Peritoneal resuscitation[J]. Am J Surg, 2005, 190(2): 181-185.

[3] Garrison RN,Conn AA,Harris PD,et al. Direct peritoneal resuscitation as adjunct to conventional resuscitation from hemorrhagic shock: a better outcome[J]. Surgery, 2004, 136(4): 900-908.

[4] Zhou FQ. Pyruvate in the correction of intracellular acidosis: a metabolic basis as a novel superior buffer[J]. Am J Nephrol, 2005, 25(1): 55-63.

[5] Chaimovitz C. Peritoneal dialysis[J]. Kidney International, 1994, 45(4): 1226-1240.

[6] 王世相,李学旺. 丙酮酸盐腹膜透析液对酸碱平衡、电解质代谢、腹腔巨噬细胞功能及腹膜间皮的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2001, 17(6): 365-368.

[7] Mongan PD, Karaian J, van Der Schuur BM, et al. Pyruvate prevents poly-ADP ribose polymerase (PARP) activation, oxidative damage, and pyruvate dehydrogenase deactivation during hemorrhagic shock in swine[J]. J Surg Res, 2003, 112(2): 180-188.

[8] Mongan PD, Capacchione J, West S, et al. Pyruvate improves redox status and decreases indicators of hepatic apoptosis during hemorrhagic shock in swine[J]. Am J

- Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(4): H1634-1644.
- [9] Olivencia-Yurvati AH, Blair JL, Baig M, et al. Pyruvate-enhanced cardioprotection during surgery with cardiopulmonary bypass[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2003, 17(6): 715-720.
- [10] Hu S, Bai XD, Liu XQ, et al. Pyruvate Ringer's solution corrects lactic acidosis and prolongs survival during hemorrhagic shock in rats[J]. J Emerg Med, 2013, 45(6): 885-893.
- [11] Kristo G, Yoshimura Y, Niu J, et al. The intermediary metabolite pyruvate attenuates stunning and reduces infarct size in in vivo porcine myocardium[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(2): H517-524.
- [12] Zhou FQ. Advantages of pyruvate over lactate in peritoneal dialysis solutions[J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22(5): 385-392.
- [13] Wu YT, Wu ZL, Jiang XF, et al. Pyruvate preserves neutrophilic superoxide production in acidic, high glucose-enriched peritoneal dialysis solutions[J]. Artif Organs, 2003, 27(3): 276-281.
- [14] Gurji HA, White DW, Hoxha B, et al. Pyruvate-fortified resuscitation stabilizes cardiac electrical activity and energy metabolism during hypovolemia[J]. World J Crit Care Med, 2013, 2(4): 56-64.
- [15] 吴锦鸿, 许国根, 陈雯. 外周血监测失血性休克患者肠道黏膜屏障功能的研究[J]. 中国急救医学, 2006, 26(12): 893-895.
- [16] Lewis RE, Cruse JM, Sanders CM, et al. The immunophenotype of pre-TALL/LBL revisited[J]. Exp Mol Pathol, 2006, 81(2): 162-165.
- [17] Lee YJ, Kang IJ, Bünger R, et al. Enhanced survival effect of pyruvate correlates MAPK and NF-kappaB activation in hydrogen peroxide-treated human endothelial cells[J]. J Appl Physiol, 2004, 96(2): 793-801.
- [18] Koustova E, Rhee P, Hancock T, et al. Ketone and pyruvate Ringer's solutions decrease pulmonary apoptosis in a rat model of severe hemorrhagic shock and resuscitation[J]. Surgery, 2003, 134(2): 267-274.
- [19] Guarda IF, Correia CJ, Breithaupt-Faloppa AC, et al. Effects of ethyl pyruvate on leukocyte-endothelial interactions in the mesenteric microcirculation during early sepsis treatment[J]. Clinics (Sao Paulo), 2015, 70(7): 508-514.
- [20] Dong W, Zhang G, Qu F. Effects of Ringer's sodium pyruvate solution on serum tumor necrosis factor- α and interleukin-6 upon septic shock[J]. Pak J Med Sci, 2015, 31(3): 672-677.

(收稿日期: 2017-06-15 修回日期: 2017-09-15)

(上接第 4903 页)

- nanoparticles[J]. J Photochem Photobiol B, 2016, 164: 151-159.
- [2] Bao G, Mitragotri S, Tong S, et al. Multifunctional nanoparticles for drug delivery and molecular imaging[J]. Annu Rev Biomed Eng, 2013, 15: 253-282.
- [3] Zhao Z, Zhou Z, Bao J, et al. Octapod iron oxide nanoparticles as high-performance T2 contrast agents for magnetic resonance imaging[J]. Nat Commun, 2013, 4: 2266.
- [4] Manshian BB, Abdelmonem AM, Kantner K, et al. Evaluation of quantum dot cytotoxicity: Interpretation of nanoparticle concentrations versus intracellular nanoparticle numbers[J]. Nanotoxicology, 2016, 10(9): 1318-1328.
- [5] Du B, Tian L, Gu X, et al. Anionic lipid, pH-sensitive liposome-gold nanoparticle hybrids for gene delivery - quantitative research of the mechanism[J]. Small, 2015, 11(29): 2333-2340.
- [6] Huang Y, Hemmer E, Rose F, et al. Multifunctional liposome nanocarriers combining upconverting nanoparticles and anticancer drugs[J]. J Phys Chem B, 2016, 120(22): 4992-5001.
- [7] Jia HZ, Wang W, Zheng DW. Multifunctional nanotherapeutics with all-in-one nanoentrapment of drug/gene/inorganic nanoparticle[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2016, 8(11): 6784-6789.
- [8] Sharma VK, Filip J, Zboril R, et al. Natural inorganic nanoparticles--formation, fate, and toxicity in the environment[J]. Chem Soc Rev, 2015, 44(23): 8410-8423.
- [9] Lovell JF, Jin CS, Huynh E, et al. Porphysome nanovesicles generated by porphyrin bilayers for use as multimodal biophotonic contrast agents[J]. Nat Mater, 2011, 10(4): 324-332.
- [10] Wu T, Kaur S, Branda NR. Energy transfer between amphiphilic porphyrin polymer shells and upconverting nanoparticle cores in water-dispersible nano-assemblies[J]. Org Biomol Chem, 2015, 13(8): 2317-2322.
- [11] Zhang H, Chen HJ, Du X, et al. Dependence of photothermal conversion characteristics on different nanoparticle dispersions[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2015, 15(4): 3055-3060.
- [12] Mocan L, Matea CT, Bartos D, et al. Advances in cancer research using gold nanoparticles mediated photothermal ablation[J]. Clujul Med, 2016, 89(2): 199-202.
- [13] Song J, Wang F, Yang X, et al. Gold nanoparticle coated carbon nanotube ring with enhanced raman scattering and photothermal conversion property for theranostic applications[J]. J Am Chem Soc, 2016, 138(22): 7005-7015.

(收稿日期: 2017-07-12 修回日期: 2017-09-15)