

大鼠门静脉高压对血清内毒素及肠黏膜的影响分析

李晓娟^{1#}, 张巧云^{2#}, 冯帆¹, 姜棋予¹, 柴燕涛¹, 李润¹, 侯俊^{1*}, 李瑞生^{1*}

(1. 解放军第 302 医院临床研究管理中心, 北京 100039; 2. 山东省蓬莱市中医医院检验科, 山东 蓬莱 265600)

【摘要】 目的 研究大鼠单纯门脉高压对血清内毒素以及肠黏膜的影响。**方法** 选取 16 只大鼠, 分为空白对照组(4 只)和模型组(3 d 组、7 d 组、10 d 组, 每组 4 只), 模型组构建门脉部分结扎模型, 分别在 3 d、7 d、10 d 采集血液及大鼠的空肠、回肠和结肠, 采用 ELISA 法检测血清内毒素含量观察内毒素的变化情况, 采集各组不同部位肠组织进行 HE 染色, 进行病理组织学观察分析。**结果** 模型组大鼠均成功构建了门静脉部分结扎模型。三个不同时间点血清内毒素的结果与正常对照组之间差异无显著性。成模 3 d 后各肠段还未发生很大的损伤; 成模 7 d 后各肠段较 3 d 粘膜层的局部肠绒毛出现了部分破坏和肿胀, 上皮细胞与固有层间连结出现了松散的状况; 成模 10 d 较 3 d 和 7 d 的肠粘膜层、固有层均出现了明显的损伤。**结论** 在肝功能正常的情况下, 门脉高压短时间内可以造成肠黏膜的损伤, 但肠道产生的内毒素不会超出肝脏的处理能力而出现血清内毒素的升高现象。

【关键词】 门脉高压; 内毒素; 肠黏膜; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 01-0076-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.01.013

Effects of portal hypertension on endotoxin levels in serum and intestinal mucosa in rats

LI Xiaojuan^{1#}, ZHANG Qiaoyun^{2#}, FENG Fan¹, JIANG Qiyu¹,
CHAI Yantao¹, LI Run¹, HOU Jun^{1*}, LI Ruisheng^{1*}

(1. Research and Management Center of Clinical Medicine, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China;

2. Department of Clinical Laboratory, Penglai Traditional Chinese Medicine Hospital of Shandong Province, Penglai 265600)

【Abstract】 Objective To study the effects of simple portal hypertension on the endotoxin levels in serum and intestinal mucosa of rats. **Methods** A total of 16 rats were divided into the blank control group (4 rats) and the model groups (3-day group, 7-day group and 10-day group, 4 rats in each group). The rat model of partial portal vein ligation was established in the model groups, and samples of blood and jejunum, ileum and colon of the rats were taken on the 3rd, 7th and 10th days, respectively. Changes in the serum endotoxin levels were detected by ELISA. Histopathological changes of the intestinal tissues were examined by HE staining. **Results** The rat model of partial portal vein ligation was successfully established in all the model groups. The serum levels of endotoxin on the 3rd, 7th and 10th days in the model groups were not significantly different from that in the normal control group. Damages of different intestinal segments were not serious on the 3rd day after modeling. However, on the 7th day after modeling, there were some swollen and damaged intestinal villi in the intestinal mucosa of each intestinal segment, and the connection between the epithelial cells and the lamina propria was broken, compared with that at 3 days after modeling. In addition, there were obvious damages in the

[作者简介] 李晓娟(1980 —), 女, 硕士, E-mail: sxllily55@163.com;

张巧云(1972 —), 女, 主管检验技师, E-mail: 391211553@qq.com。* 共同第一作者

[通信作者] 李瑞生(1969 —), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 人类疾病动物模型, E-mail: lrsheng@sohu.com; 侯俊(1973 —), 女, 博士, 副主任技师, E-mail: houjun5757@sina.com。* 共同通信作者

intestinal mucosa and lamina propria on the 10th day, compared with that at 3 d and 7 d after modeling. **Conclusions** In the case of normal liver function, portal hypertension can cause intestinal mucosal damages within a short period of time, but the amount of endotoxin produced by intestine does not exceed the processing capacity of the liver and thus does not cause an increase in the serum endotoxin level.

【Key words】 portal hypertension; endotoxin; intestinal mucosa; rats

门脉高压和内毒素血症是肝硬化晚期最常见的并发症^[1]。内毒素(endotoxin, ET)是革兰氏阴性菌细胞壁上的脂多糖,可通过多种途径介导机体损伤^[2]。当肝硬化形成时,肝内组织结构发生改变导致肝脏枯否细胞对内毒素的清除下降。同时门脉高压形成后致侧枝循环开放,也使内毒素在肝内的清除下降,上述这两种原因均导致内毒素可以绕过肝脏直接进入体循环^[3]。目前研究表明肠道除了具有消化吸收功能之外,还具有内分泌、免疫和屏障功能,而肝功能正常与否与肠源性内毒素血症的发生密切相关^[4],尤其肠肝相互作用轴已成为目前研究的热点,假设肠粘膜屏障功能障碍,会加重肠道微生态平衡的破坏及机体免疫功能的损害^[5-6]。因此本实验利用SD大鼠构建肝功能正常基础上的单纯性门脉高压模型,分别取不同时间点检测血清内毒素的变化以及肠道病理的变化,旨在分析在单纯性门脉高压的情况下,内毒素和肠道通透性的变化情况,以期为肝硬化肠肝互作研究提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

动物选择军事医学科学院实验动物中心 SPF 级 SD 大鼠 16 只,雄性,单鼠体质量 190 ~ 200 g [SCXK (军) 2012 - 004]。饲养室温度 22℃ ~ 23℃,环境湿度 50%,自由进食和饮水 [SYXK (军) 2012 - 010]。

1.2 主要试剂与仪器

大鼠内毒素 ELISA 试剂盒(科晶生物, KJ-1908);水合氯醛(国药集团化学试剂有限公司, 20151023)。显微外科手术器械;K10CD 型干浴恒温箱(杭州奥盛仪器有限公司);TD 型电子天平(余姚市金诺天平有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制备

实验分别取 4 只大鼠作为空白对照组,12 只大鼠作为门脉部分结扎模型组。模型构建:在无菌条件下,使用水合氯醛(浓度为 10%)进行麻醉,注射剂量为每只 0.7 mL,待大鼠进入深麻醉状态,作剑突下正中切口 2.0 ~ 3.0 cm,将肝脏轻轻向上翻起,

将胃肠轻轻向右拨开,放置于生理盐水湿润的纱布上可以清晰的看到门静脉的位置。钝性分离门静脉,在门静脉外缘平行放置 2 根外径为 0.8 mm 的平头空心管,用 4/0 丝线结扎门静脉主干和与之并行的钝性针头,结扎完后,轻轻拔出平头空心管,关腹。对照组作假手术仅游离门静脉,脏器复位后分层关腹。实验过程中均遵循 3R 原则,对动物实施人道主义关怀。

1.3.2 内毒素测定

首先通过大鼠眶后静脉丛采集空白对照组大鼠血液,随后分别在 3 d、7 d、10 d 采集模型组大鼠血液,室温静置 30 min,离心取血清,用 ELISA 法检测血清中内毒素的结果,每个样本均进行 3 个复孔检测。所有实验器材均采用去热原处理。

1.3.3 肠道病理检查

空白对照组在首次采集完血液后,模型组分别在 3 d、7 d、10 d 采集血液后,处死大鼠,分别采集空肠、回肠、结肠。用 4% 甲醛溶液固定,常规脱水、石蜡包埋、切片和 HE 染色,光学显微镜下行病理组织形态学观察^[7],根据病理切片结果对不同部位肠黏膜的变化过程进行分析。

1.4 统计学方法

实验数据均采用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,对四组大鼠不同时间点内毒素的检测结果进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

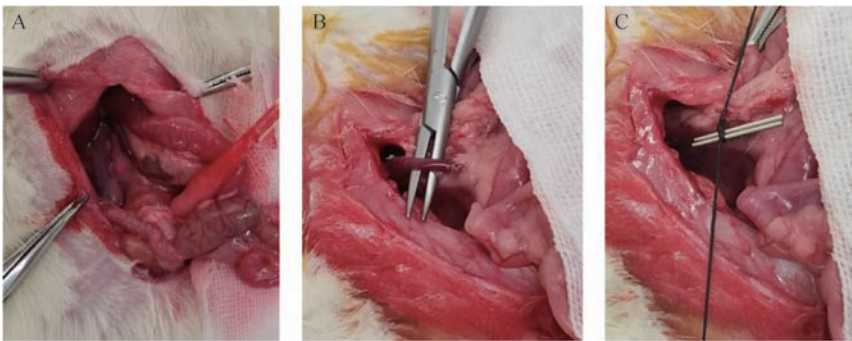
2 结果

2.1 大鼠门脉部分结扎模型构建及一般状态

12 只模型组大鼠均成功分离出门静脉,并进行门静脉部分结扎手术(见图 1)。术后大鼠一般状况均良好,饮食正常,随着时间的推移也未出现各种不适以及精神萎靡的状况。

2.2 不同时间点大鼠内毒素的变化

空白对照组和模型组(3 d、7 d、10 d)每只大鼠的样本均进行 3 孔重复,得出每个样本的内毒素均值。然后各组相互之间进行统计学分析,结果显示,各模型组血清内毒素的结果与正常对照组之间差异无显著性(见表 1)。



注:A:麻醉剖腹探查门静脉;B:钝性分离门静脉;C:部分结扎门静脉。

图 1 大鼠门脉部分结扎模型

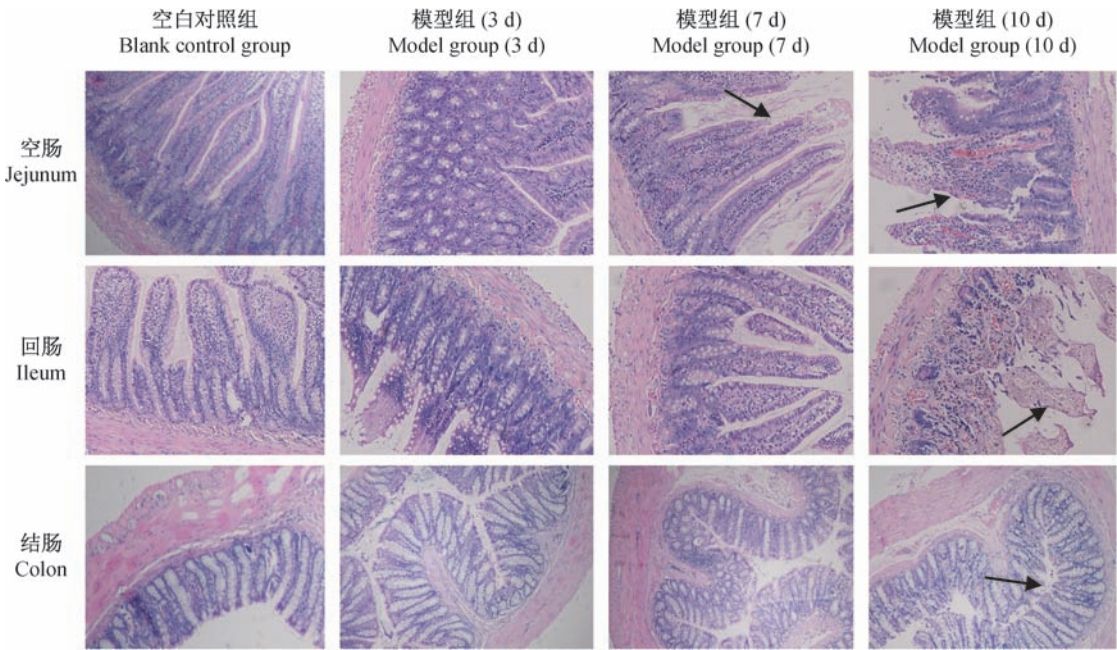
Note. A: Exploration of the portal vein by laparotomy after anesthesia. B: Blunt separation of the portal vein. C: Partial ligation of the portal vein.

Fig.1 Partial portal vein ligation in a rat

表 1 各组大鼠血清内毒素结果($\bar{x} \pm s$, $n = 4$, EU/mL)

Tab.1 Serum level of endotoxin in the rats

组别 Groups	正常组 Normal group	模型组(3 d) Model group (3 d)	模型组(7 d) Model group (7 d)	模型组(10 d) Model group (10 d)
内毒素含量 Endotoxin levels	51.14 ± 2.62	43.19 ± 8.05	43.64 ± 5.29	41.60 ± 7.64



注:箭头所指为黏膜脱落部位。

图 2 大鼠不同时间点空、回、结肠病理学结果(HE 染色, $\times 10$)

Note. Arrows indicate the abscission sites of epithelial cells in the intestinal mucosa.

Fig.2 Histopathological changes of the jejunum, ileum and colon at different time points in the rats of different groups. HE staining

2.3 不同时间点大鼠肠道病理组织学结果

病理组织学观察结果表明:空白对照组大鼠空肠、回肠和结肠的病理组织结构整齐,粘膜分层规则清晰,各层结构完整,上皮细胞与固有层间连结紧密无缝隙;成模 3 d 后各肠段的粘膜层次依然较

整齐清晰,上皮与固有层的连接还未出现缝隙;而成模 7 d 后各肠段较 3 d 粘膜层的局部肠绒毛出现了部分破坏和肿胀,上皮细胞与固有层间连结出现了松散的状况;成模 10 d 较 3 d 和 7 d 的肠黏膜发生了较大的损伤:肠绒毛排列凌乱,部分肿胀溶解,

粘膜上皮细胞可见萎缩脱落。黏膜下炎症细胞浸润增多,上皮细胞与固有层的间距可见明显增宽;而固有层腺体明显减少及破坏。

3 讨论

在正常情况下,肠黏膜屏障在保持机体内环境稳定方面发挥了重要作用,肠黏膜能够阻止肠道细菌、内毒素向肠外移位,保护机体免受食物抗原、微生物及其有害代谢产物的损害^[8]。而当肝硬化尤其是出现门脉高压合并腹水时,肠黏膜屏障系统也会随之发生功能改变。徐义军等^[9]发现当肠道通透性显著增加后,早期即可出现细菌移位并形成内毒素血症。施琳琳等^[10]也验证了应用中药大黄可以改善由于肝硬化导致内毒素灭活减少,肠免疫功能紊乱而导致的肠道菌群异常增生和肠源性内毒素吸收增加形成的肠源性内毒素血症。而在肝功能正常状态下形成门脉高压以观察内毒素和肠黏膜改变的研究尚未报道。

因此本实验应用 SD 大鼠构建肝脏功能正常的单纯性门脉高压模型,分别取不同时间点检测血清内毒素的变化情况以及胃肠道病理变化情况,结果显示,模型组大鼠均成功构建了门脉部分结扎模型。术后大鼠一般状况均良好,饮食正常,随着时间的推移也未出现各种不适以及精神萎靡的状况。此法与王继见等^[11]使用 Wistar 大鼠构建门脉部分结扎模型相似,此法操作简便、快速,成模时间短,且能对门静脉部分结扎后到形成门脉高压期间检测的各项指标进行动态观察。本实验对不同时间点的血清内毒素进行检测结果显示,不同时间点内毒素差异无显著性。经过分析发现,肝脏作为体内清除内毒素和解毒的主要脏器,是遭受内毒素攻击的首要器官。而在正常情况下,肝脏具有很强的内毒素灭活能力,由此看出,肝脏正常时可以将来自门静脉的内毒素完全灭活,因而不会发生内毒素血症。若肝脏受损如肝硬化时,对内毒素的灭活能力下降,则容易发生肠源性内毒素血症^[12]。因此推断在本实验的操作过程中,由于肝脏功能未受损,内毒素的升高还未超出肝脏处理内毒素的上限,因此内毒素未出现很大的波动。但是不同部位肠段的病理结果显示,成模 3 d 后各肠段也未发生很大的损伤,成模 7 d 后各肠段局部肠绒毛出现了部分破坏和肿胀,上皮细胞与固有层间连结出现了松散的状况;成模 10 d 较 3 d 和 7 d 肠段均出现了明显的损伤。肠粘膜屏障是由机械屏障、化学屏障、生物屏障以及免疫屏障共同构成。在肠粘膜机械屏障组成成分中,肠上皮细胞及其紧密连接是最重要的

组成部分^[13-14]。因此本实验单纯门脉高压可以造成肠黏膜出现损伤,如果继续发展将会使进入门静脉的内毒素不断增加,最终如果超出了肝脏的清理能力,就可能会逆流入血形成内毒素血症,这一点有待进一步实验验证。

综上所述,本实验通过单纯制造门脉高压模型检测内毒素和肠黏膜变化情况发现,在短时间内,在肝功能正常的情况下,门脉高压可以造成肠黏膜的损伤,而肠道产生的内毒素不会很快超出肝脏的处理能力而出现血清内毒素升高的现象,为今后研究肝硬化门脉高压与内毒素血症和肠黏膜损伤的发病机制提供一定的理论依据。

参考文献:

- [1] 陆苗青,余菲,许东. 内毒素在肝衰竭发生中的作用研究进展 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2015, 25(4): 252-256.
- [2] Sawhney R, Jalan R. Liver. The gut is a key target of therapy in hepatic encephalopathy [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015, 12(1): 7-8.
- [3] 马全玲,刘扬,李传保,等. 内毒素检测与临床应用现状 [J]. 国际检验医学杂志, 2003, 24(2): 64-65.
- [4] 周为,陈斌,彭杰,等. D-半乳糖胺诱导肝衰竭肠源性内毒素血症模型最佳剂量选择 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2014, 24(6): 347-349.
- [5] Dănulescu RM, Stanciu C, Trifan A. Assessing the risk of decompensation by ascites and spontaneous bacterial peritonitis in cirrhosis [J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2014, 118(2): 320-326.
- [6] Wang LK, Wang LW, Li X, et al. Ethyl pyruvate prevents inflammatory factors release and decreases intestinal permeability in rats with D-galactosamine-induced acute liver failure [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2013, 12(2): 180-188.
- [7] 王睿林,李晓娟,白云峰,等. 黄连解毒汤对小鼠酒精性脂肪肝的预防作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(2): 34-37, 87.
- [8] 黄培宁,邓有辉. 微生态制剂对慢性肝衰竭患者肠道菌群、血浆内毒素及细胞因子的影响 [J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(18): 3798-3800.
- [9] 徐义军,王超. 乳果糖对门脉高压大鼠肠粘膜屏障功能保护作用的研究 [J]. 中外医疗, 2010, 29(12): 18-20.
- [10] 施琳琳,徐虹,潘锋,等. 大黄素保护肝硬化门脉高压大鼠肠屏障的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(8): 1950-1952.
- [11] 王继见,高根五,刘长安,等. 用 Wistar 大鼠门静脉部分结扎制作门脉高压动物模型 [J]. 重庆医科大学学报, 2001, 26(3): 302-304.
- [12] 李筠. 内毒素在肝衰竭形成中的作用及中医药治疗 [J]. 传染病信息, 2010, 23(5): 260-262.
- [13] 杨洁,聂青和. 肝衰竭与肠道屏障功能障碍 [J]. 实用肝病杂志, 2010, 13(1): 66-69.
- [14] 张春雨,袁捷. 肝硬化门脉高压动物模型的研究进展 [J]. 肝胆胰外科杂志, 2012, 24(2): 176-177.

[收稿日期] 2017-08-23