

· 基础研究 ·

体外循环导致大鼠小肠微循环损伤的机制研究

吴海卫, 许 飏, 景 华, 王常田, 钱建军, 董国华

[摘要]:目的 定量分析研究体外循环(CPB)对小肠微循环功能的影响,并初步探讨其可能的微观病理生理机制。方法 建立大鼠常温 CPB 模型,20 只大鼠均分为对照组和 CPB 组,以异硫氰酸荧光素标记牛白蛋白及吖啶橙作为示踪剂,分别标记血浆及白细胞,并采用活体荧光显微镜技术,在 CPB 前、CPB 30 min、CPB 60 min、CPB 后 60 min、CPB 后 120 min,定量分析小肠壁小动脉直径、收集静脉红细胞流速、功能毛细血管密度、毛细血管通透性、白细胞附壁情况。**结果** CPB 可以使肠壁小动脉直径减小,收集静脉血流速度减慢,黏膜及肌层功能毛细血管密度减低,血管壁通透性增加及大量白细胞附壁,转流停止后 120 min,各项改变达到峰值。**结论** 常温 CPB 可以导致大鼠明显而持续的小肠微循环损伤,血流重新分配和炎性细胞浸润可能是最主要的致伤因素。

[关键词]: 体外循环;小肠;微循环;活体显微镜检查

[中图分类号]:R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:**1672-1403(2012)01-0057-05

The experimental study of intestinal microcirculation dysfunction induced by cardiopulmonary bypass in the rat

Wu Hai-wei, Xu Biao, Jing Hua, Wang Chang-tian, Qian Jian-jun, Dong Guo-hua

Department of Cardiothoracic Surgery, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Jiangsu Nanjing 210002, China

Corresponding author: Dong Guo-hua, Email: dr.dongguohua@gmail.com

[Abstract]: Objective The present study aims to quantitatively evaluate the microvascular injury of the small bowel in the rat with respect to cardiopulmonary bypass (CPB) and to investigate the possible micro-pathophysiological mechanisms. **Methods** The normothermic CPB was model established in 20 male SD rats. 10 rats underwent the full proctol and another 10 sham-operated rats served as controls. The serum and white blood cell was stained with fluorescein isothiocyanate conjugated bovine serum albumin (FITC-BSA) and acridine orange respectively. The microcirculation was observed by the technology of intravital microscopy. The small bowel microcirculatory network including arterioles, capillaries, collecting venules in all layers were observed prior to CPB, CPB 30 min, CPB 60 min, and 60 min and 120 min after weaning off the bypass. The capillary perfusion, microvascular permeability and leucocyte adherence were quantitatively measured. **Results** In CPB animals, significant arteriolar vasoconstriction, blood velocity reduction and functional capillary density diminution were found. As concomitances, exaggerated albumin extravasation and increased leucocyte accumulation were also demonstrated. These changes were even further and there were no signs of restitution at the end of the observation period. **Conclusion** The normothermic CPB could induce a significant microcirculatory injury of the small bowel in rats. The major underlying mechanisms seem to be blood flow redistribution and inflammatory cells infiltration associated with CPB.

[Key words]: Cardiopulmonary bypass; Small intestine; Microcirculation; Intravital microscopy

体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)过程中非生理性血流可引起全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),造成各种器官功能损伤。小肠在 SIRS 发生发展中即是“靶”又是“源”,CPB 后肠黏膜屏障功能的损害可以造成内毒素入血、肠道菌群易位,从而触发瀑布效应,甚至

引起多脏器功能障碍,影响临床治疗效果^[1-2]。CPB 引起肠道损伤的机制尚不清楚,本研究采用大鼠 CPB 模型,用荧光活体显微镜技术对小肠微循环变化进行直接观察,定量分析肠壁血流灌注、血管通透性及白细胞附壁情况,探讨 CPB 后肠道损伤的发生机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组 采用 450 ~ 550 g 成年雄性

作者单位: 210002 江苏南京,南京军区南京总医院心胸外科

通讯作者: 董国华, Email: dr.dongguohua@gmail.com

SD 大鼠,建立常温 CPB 模型^[3-4]。简要步骤如下,大鼠麻醉后气管切开接小动物呼吸机辅助通气,吸入氧浓度 100%。左股静脉置 22G 套管针,接微量输液泵,维持静脉通道;右侧颈动脉置 24G 套管针,连接动脉泵管,用于 CPB 动脉血泵入。右颈静脉置入带网状侧孔的 16G 穿刺导管,深入至右心房水平,引流静脉血入贮血槽。全身肝素化(500 IU/kg)后开始转流。静脉血由右房经颈静脉管依靠重力和虹吸引出,引流到位于心脏平面下方 30 cm 的开放贮血槽,经微型膜肺(广东科威医疗器械有限公司,气血交换面积 0.05 m²,预充量 4 ml)氧合,氧合血由小型蠕动泵(保定兰格恒流泵有限公司, BT00-300M 型)泵入右颈动脉。预充液由 8 ml 贺斯和 8 ml 供体血液构成。在贮血槽和膜肺上方,用 100W 白炽灯照明加热,以维持肛温在 36.5~38.3℃。逐渐增加流量,稳定于 100~150 ml/(kg·min),维持平均动脉压在 60~80 mm Hg。转流 60 min 后,逐步降低灌注流量并停机,依次拔除各管道。缓慢输入贮血槽中的余血,维持循环稳定。继续辅助呼吸 120 min 并进行微循环观察。20 只大鼠随机分为 CPB 组及对照组,每组各 10 只。两组动物手术操作相同,CPB 组连接 CPB 装置并转流 60 min,对照组同样连接装置并肝素化但不转流。

1.2 活体观察方法 在观察开始前,经股静脉分别注入异硫氰酸荧光素标记牛白蛋白(fluorescein isothiocyanate-bovine serum albumin, FITC-BSA)(5%, 0.2 ml/100 g)和吖啶橙(0.2%, 0.1 ml/100 g),其中 FITC-BSA 可以使血浆着色,以显示肠壁毛细血管结构,吖啶橙可以标记体内白细胞,使其细胞核在镜下呈现为发光亮点。做腹部正中切口,将末段回肠连同肠系膜轻轻拉出腹外,逆肠系膜方向纵形切开肠管约 1 cm,以 6-0 单丝线缝于四周,舒展、固定于载玻片,置于观察台,连续用 37~38℃ 生理盐水表面灌流给肠壁保温、保湿。黏膜及黏膜下层由通过切口由内向外,浆膜层及肌层则直接从肠管外由外向内进行观察。采用荧光显微镜(上海 2XC4TV 型)进行活体观察,用 100W 汞灯分别通过 I2/3(绿色,波长 530~560 nm)和 N2(兰色,波长 450~490 nm)滤色板顶部照明。分别于 CPB 前(T1)、CPB 30 min(T2)、CPB 60 min(T3)、CPB 后 60 min(T4)、CPB 后 120 min(T5)对小肠微循环状态进行显微观察,选定有代表性的 4 个不交叉区域经行各项指标检测,通过摄影、摄片记录有关图像资料,用 Image J 图像分析系统做评估。

1.3 指标检测

1.3.1 微循环血流动力学指标 选择无分枝、长度 100 μm、直径 30 μm 左右的小动脉,测量其直径变化;用逐帧回放分析技术,测量黏膜下层收集静脉中的红细胞流速;测量观察区域内荧光灌注毛细血管长度,分别计算肌层、黏膜层单位面积 FITC-BSA 灌注毛细血管的长度,即功能毛细血管密度(functional capillary density, FCD),FCD 值以单位面积 FITC-BSA 灌注毛细血管的长度表示(/cm)。

1.3.2 毛细血管通透性 FITC-BSA 分子量大,正常情况下不能通透血管壁而位于血管腔内,当毛细血管通透性增加时,FITC-BSA 可穿过血管壁进入组织间隙,使血管周围出现散在的不规则斑片状荧光。利用计算机图像处理技术,将其转为 255 灰阶图时,可以表现为灰度值增加,其增加幅度与 FITC-BSA 的漏出程度呈正相关。通过测定微血管周围的灰度值变化,可以定量了解血管壁的通透性情况,灰度值越高,则表示组织间的大分子物质越多,血管通透性就越大。

1.3.3 白细胞浸润情况 于高倍视野下找到黏膜下层清晰的毛细血管后微静脉,通过摄像系统记录白细胞的流动状态。将静止于血管内皮 >30 s 和游走于血管外但仍在小血管旁的白细胞认定为附壁状态,对其计数,并计算 100 μm 长度血管的附壁白细胞数。

1.4 统计分析 所有数据用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 SPSS 13.0 统计软件分析处理,组内比较采用 *t* 检验,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异显著。

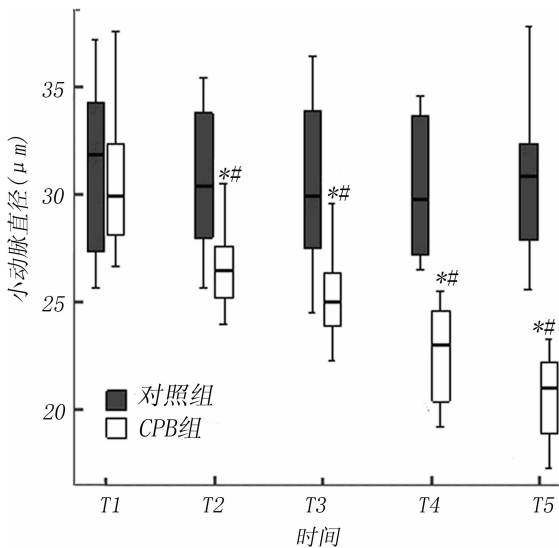
2 结果

2.1 小动脉直径 小动脉直径自 CPB 开始后开始逐步下降,到观察结束时最为明显,从(30.8±3.6) μm 降至(20.6±3.7) μm,差异显著($P < 0.001$),这种血管收缩与小血管的自律运动无关,见图 1。

2.2 小静脉血流速度 CPB 开始后小静脉内血流速度减慢,随着 CPB 时间的延长,血流速度进一步降低。在 T4 和 T5 时小静脉血流速度仍持续降低,从 T1 时的(1.38±0.08) mm/s 降为至 T5 时的(0.44±0.06) mm/s,见图 2。

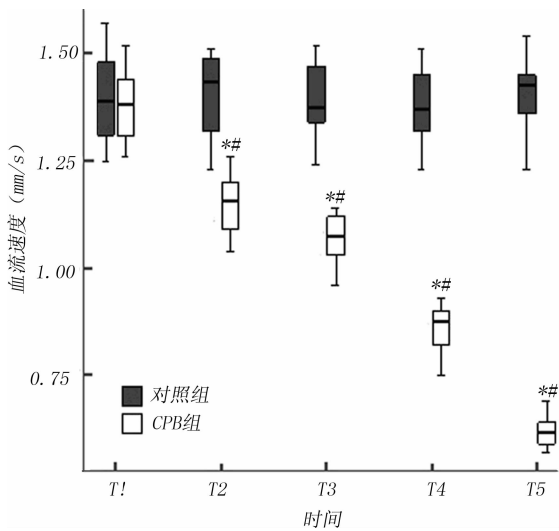
2.3 功能毛细血管密度 对照组黏膜层毛细血管网丰富,绒毛内小血管细而迂曲,结构清晰;肌层毛细血管网在正常情况下呈规则矩形,毛细血管网丰富,显影清晰,见图 3A。CPB 状态下可见到明显的血管充盈减少,并有血管边缘模糊表现;转流后 120 min FITC-BSA 灌注血管影明显减少,并有相互之间的交通中断现象,见图 3B。对照组肌层和黏膜层

FCD 值随时间的延长无明显变化,而 CPB 后则逐渐减少,至 CPB 后 120 min 时分别由从 CPB 前(511 ± 17)/cm 和 (221 ± 13)/cm 降为 (150 ± 17)/cm 和 (64 ± 7)/cm,差异显著 ($P < 0.001$),见图 4。



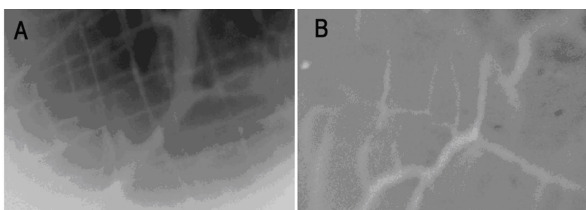
注:与 T1 相比 * $P < 0.01$;与对照组相比 # $P < 0.01$

图 1 小动脉直径



注:与 T1 相比 * $P < 0.01$;与对照组相比 # $P < 0.01$

图 2 小静脉内血流速度



注:A:对照组术后 120 min;B:CPB 术后 120 min

图 3 肌层毛细血管网

2.4 毛细血管通透性 对照组术后 120min 毛细血管轮廓清晰,FITC - BSA 局限于血管内,血管周围背影黑暗,见图 5A。CPB 转流开始后,随时间延长可以见到逐步增多的血管外透亮区,在小肠黏膜层绒毛微血管和黏膜下层毛细血管后微静脉中尤为明显,至观察结束时,个别小血管结构变得模糊不清,边界难以确认,见图 5B。定量分析则表现为小血管周围灰度值的逐步增加,由开始时的(142 ± 7)升至实验结束时的(220 ± 13),有显著统计学差异 ($P < 0.001$),表明 CPB 后小血管通透性增加。见图 6。

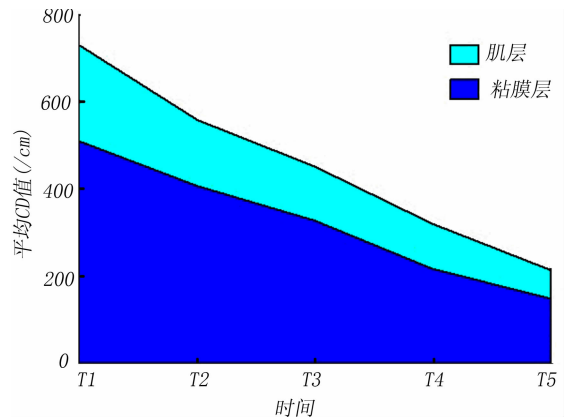
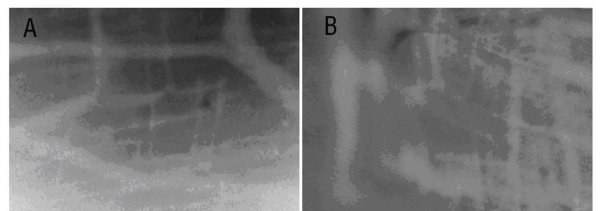
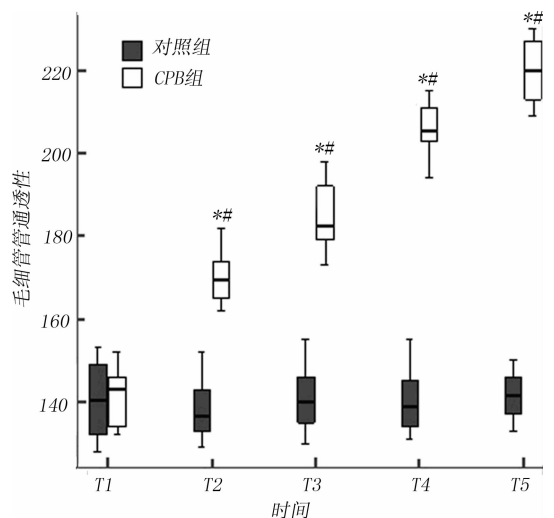


图 4 CPB 组肌层和黏膜层 FCD 变化



注:A:对照组术后 120 min;B:CPB 术后 120 min

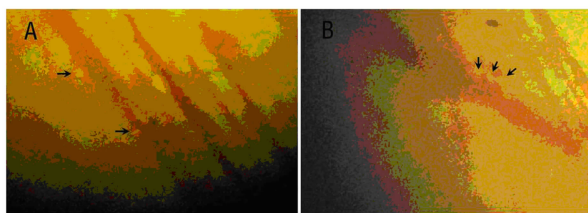
图 5 微循环大分子漏出情况对比



注:与 T1 相比 * $P < 0.01$;与对照组相比 # $P < 0.01$

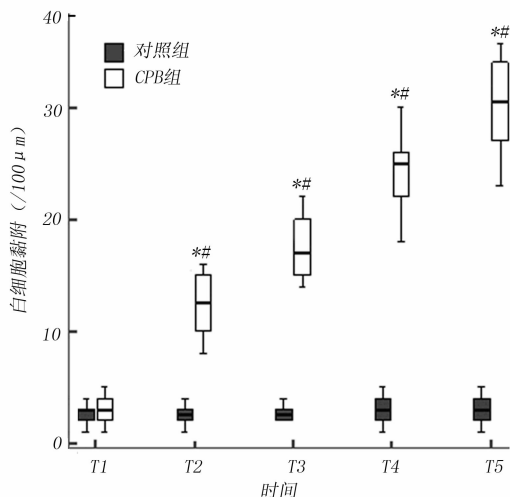
图 6 小肠微循环血管周围组织灰度

2.5 白细胞浸润情况 对照组毛细血管内很少见到附壁白细胞,毛细血管内偶见被吖啶橙染亮的白细胞颗粒,见图 7A,箭头所示为停留于血管边缘的白细胞,在吖啶橙染色下呈现桔红色颗粒;而 CPB 组大鼠在转流 120 min 后,附壁的血细胞数目明显增加,以黏膜下层小静脉内最为突出,可见到许多的白细胞亮点聚集于小血管内及血管周边,见图 7B。定量分析显示白细胞附壁数由 CPB 前(2.8 ± 1.3)个/ $100 \mu\text{m}$ 升至(30.3 ± 1.3)个/ $100 \mu\text{m}$,差异显著($P < 0.001$),见图 8。



注: A:对照组术后 120 min;B:CPB 术后 120 min

图 7 毛细血管白细胞附壁情况



注: 与 T1 相比 * $P < 0.01$;与对照组相比[#] $P < 0.01$

图 8 毛细血管白细胞壁定量比较

3 讨论

限于伦理道德方面的制约,对 CPB 所致胃肠道损伤及其在术后全身炎症反应中作用的研究,在人体上难以深入,大多限于临床经验总结或间接测定,如:对术后消化系统并发症的分析、Doppler 超声腹内血管血流测定、动脉-胃黏膜 pH_i 测定等,从而推断胃肠道缺血及黏膜损伤程度,无法做到直接、定量分析,进一步的研究必须依赖适当的动物模型^[4-5]。本实验建立大鼠 CPB 模型,采用活体荧光显微镜技

术,对小肠微血管形态、管壁结构完整性及血管内的细胞运动状态进行直接、定量观察和分析研究。过去的研究常采用肠系膜作为微循环观测对象,然而,肠系膜与肠壁内的微血管在结构分布和血流状态上存在很大差别,且肠壁各层之间也有明显不同^[6-7],因此,必须对肠壁各层(包括绒毛层、黏膜层、黏膜下层及肌层等)微循环直接观测,才是判断其损伤程度最直观、有效的方法。

通过上述方法,我们发现,CPB 可造成肠道缺血、血管通透性增加和炎性细胞浸润等病理现象。CPB 后小动脉管径变细,伴随着血流速度减慢,导致肠壁血供减少、灌注不足;FCD 进行性下降,到观察结束时,大约只有转流前的 30%,表明肠道存在血流重新分布,肠壁缺血的程度严重;白蛋白的外溢,显示血管壁通透性增加,屏障功能受损,而周围组织的水肿形成,可以进一步加重微循环损害;小静脉内聚集的附壁白细胞,可能是最早参与炎症反应的活化细胞,它们产生、释放各种炎性介质,破坏血管内皮完整性,加重液体外渗,并在随后的病理改变中扮演重要角色。研究还发现,毛细血管和黏膜下收集静脉的改变最早、最明显,是 CPB 损伤中最易受影响的结构单元。而转运毛细血管减少和腔内淤滞,可以导致小肠肌层毛细血管灌注和营养紊乱,肌肉活力丧失或减少,最后导致肠麻痹^[8]。

实验中为了避免药物作用的影响,未使用任何血管活性药物,然而在这种状态下,小肠微循环损伤的改变仍然非常明显。因此,可以认为,CPB 导致的小肠微循环缺血不仅仅是机体低灌注或低心排的结果,而非生理性转流过程中的血流重新分配可能是最初的致伤原因^[9]。值得注意的是,这种损伤在 CPB 结束后的 2 小时没有任何缓解的征象,反而达到了高峰。这表明,CPB 诱发的炎症反应可能是肠道损伤最主要的机制,CPB 过程尽管已经停止,但炎症反应却仍在继续。CPB 过程中血液和血细胞与体外管道人工表面接触、泵的机械损伤、缺血再灌注损伤导致白细胞活化、炎性介质释放、血浆酶、补体活化、白细胞溢出、氧自由基释放^[10-11],这些都可以直接或间接影响微循环,导致血管收缩,血液浓缩和血流淤滞,随后内皮细胞肿胀,阻塞血管,血管通透性增加,大分子渗漏。

总之,本研究利用大鼠 CPB 模型和活体荧光显微镜技术,直观地研究了 CPB 所致小肠微循环进行性损伤的现象,初步揭示了其微观病理生理机制。研究发现,在体循环状态稳定的情况下,常温 CPB 可以导致大鼠明显而持续的小肠微循环损伤,血流重新分

配和炎性细胞浸润可能是最主要的致伤因素。

参考文献:

- [1] 柴文祥, 李刚, 荣金明, 等. 体外循环心脏术后腹部并发症临床分析[J]. 实用医药杂志, 2009, 26(09): 1-4.
- [2] 董国华, 景华, 李德闽, 等. 体外循环术后消化系统功能障碍的临床分析[J]. 中国医师杂志, 2004, 6(11): 1498-1500.
- [3] Dong GH, Xu B, Wang CT, *et al.* A rat model of cardiopulmonary bypass with excellent survival[J]. J Surg Res, 2005, 123(2): 171-175.
- [4] 黄海嵘, 王常田, 申翼, 等. 体外循环后大鼠肝损伤的研究[J]. 医学研究生学报, 2009, 22(1): 5.
- [5] 李志浩, 苏肇伉, 陈冬英, 等. 小儿先天性心脏病术后肠道通透性的研究[J]. 中国体外循环杂志, 2007, 5(1): 7-10.
- [6] Rimpilainen R, Vakkala M, Rimpilainen E, *et al.* Minimized and conventional cardiopulmonary bypass damage intestinal mucosal integrity [J]. Scand Cardiovasc J, 2011, 45(4): 236-246.
- [7] 林宝泉, 王军, 王强, 等. 中低温停循环经下腔静脉逆灌对

猪肠系膜微循环的影响[J]. 中国体外循环杂志, 2011, 09(1): 36-39.

- [8] Beuk RJ, Tangelder GJ, Maassen RL, *et al.* Leucocyte and platelet adhesion in different layers of the small bowel during experimental total warm ischaemia and reperfusion[J]. Br J Surg, 2008, 95(10): 1294-1304.
- [9] Dong GH, Wang CT, Li Y, *et al.* Cardiopulmonary bypass induced microcirculatory injury of the small bowel in rats[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(25): 3166-3172.
- [10] Geissler HJ, Fischer UM, Grunert S, *et al.* Incidence and outcome of gastrointestinal complications after cardiopulmonary bypass[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2006, 5(3): 239-242.
- [11] 刘小雄, 彭金华, 徐建军, 等. 谷氨酰胺对体外循环患者肠道保护作用的临床研究[J]. 中国体外循环杂志, 2007, 5(1): 11-13.

(收稿日期: 2011-09-16)

(修订日期: 2011-11-17)

(上接第 31 页)

- [2] 肖赛松, 高长青, 陈婷婷, 等. 全机器人心脏手术麻醉中体外循环对肺功能的影响[J]. 中国体外循环杂志, 2011, 9(4): 201-204.
- [3] Fukuoka N, Iida H, Akamatsu S, *et al.* The association between the initial end-tidal carbon dioxide difference and the lowest arterial oxygen tension value obtained during one-lung anesthesia with propofol or sevoflurane [J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2009, 23(6): 775-779.
- [4] Pardos PC, Garutti I, Pineiro P, *et al.* Effects of ventilatory mode during one-lung ventilation on intraoperative and postoperative arterial oxygenation in thoracic surgery [J]. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2009, 23(6): 770-774.
- [5] Sentürk M. New concepts of the management of one-lung ventilation [J]. Current Opinion in Anaesthesiology, 2006, 19(1): 1-4.

- [6] Ishikawa S, Shirasawa M, Fujisawa M, *et al.* Compressing the non-dependent lung during one-lung ventilation improves arterial oxygenation, but impairs systemic oxygen delivery by decreasing cardiac output [J]. J Anesth, 2010, 24(1): 17-23.
- [7] 王刚, 高长青, 周琪, 等. 非体外循环下机器人冠状动脉旁路移植手术的麻醉管理[J]. 中华胸心外科杂志, 2011, 27(7): 404-406.
- [8] Russell WJ. Intermittent positive airway pressure to manage hypoxia during one-lung anaesthesia [J]. Anaesth Intensive Care, 2009, 37(3): 432-434.

(收稿日期: 20012-02-13)

(修订日期: 2012-02-14)

(上接第 40 页)

- [7] Dresser LP, McKinney WM. Anatomic and pathophysiologic studies of the human internal jugular valve [J]. Am J Surg, 1987; 154(2): 220-224.
- [8] Okita Y, Minatoya K, Tagusari O, *et al.* Prospective comparative study of brain protection in total aortic arch replacement: deep hypothermic circulatory arrest with retrograde cerebral perfusion or selective antegrade cerebral perfusion [J]. Ann Thorac Surg, 2001, 72(1): 72-79.
- [9] Tanoue Y, Tominaga R, Ochiai Y, *et al.* Comparative study of retrograde and selective cerebral perfusion with transcranial Doppler [J]. Ann Thorac Surg, 1999, 67(3): 672-675.
- [10] Pacini D, Di Marco L, Di Bartolomeo R. Methods of cerebral protection in surgery of the thoracic aorta [J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2006, 4(1): 71-82.

- [11] Malvindi PC, Scarscia G, Vitale N. Is unilateral antegrade cerebral perfusion equivalent to bilateral cerebral perfusion for patients undergoing aortic arch surgery [J]? Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2008, 7(5): 891-897.
- [12] 缪娜, 侯晓彤, 刘瑞芳, 等. 应用孙式手术治疗主动脉夹层的体外循环管理策略[J]. 中国体外循环杂志, 2010, 8(2): 72-74.
- [13] Black JH, Davision JK, Cambria PR. Regional hypothermia with epidural cooling for prevention of spinal cord ischemic complications after thoracoabdominal aortic surgery [J]. Semin Thorac Cardiovasc surg, 2003, 15(4): 345-352.

(收稿日期: 2011-07-27)

(修订日期: 2011-09-05)