

# 完整迷走神经刺激对大鼠全身炎性反应的影响

黄健 张年春 周健 杨志焕

**【摘要】** 目的 了解完整迷走神经刺激(IVNS)对大鼠全身炎性反应的影响。方法 以内毒素血症为全身炎性反应模型。将 100 只 SD 大鼠随机分为 A 组[静脉注射内毒素/脂多糖(LPS)]、B 组(切断迷走神经、注射 LPS 后对其远端行电刺激)、C 组(注射 LPS 后行迷走神经干电刺激)、D 组(除注射等量等渗盐水外,同 C 组处理)、E 组(仅注射等量等渗盐水)。于注射前及注射后 2、4、6 h,观察血清肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 10(IL-10)水平变化。每组取 5 只大鼠测定平均动脉压(MAP)。结果 注射后 10 min,前 3 组大鼠 MAP 值显著升高( $P < 0.05$ ),以 A 组最明显[(134.4  $\pm$  7.3) mm Hg, 1 mm Hg = 0.133 kPa,  $P < 0.05$ ];注射后 30 min,前 3 组 MAP 值明显下降( $P < 0.05$ );注射后 10 min ~ 6 h, A 组 MAP 值均明显低于 B、C 组( $P < 0.05$ )。注射后 2、4、6 h, B、C 组血清 TNF- $\alpha$  水平均明显低于 A 组( $P < 0.05$ )。注射后 4、6 h, C 组大鼠 IL-10 水平显著高于 A、B 组( $P < 0.05$ )。结论 IVNS 能稳定全身炎性反应时的血流动力学指征,并具有抗炎效应。

**【关键词】** 内毒素血症; 完整迷走神经刺激; 全身炎性反应

Effects of stimulation of intact vagus nerve on systemic inflammatory response in rats HUANG Jian, ZHANG Nian-chun, ZHOU Jian, YANG Zhi-huan. Intensive Care Unit, Daping Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400042, P. R. China

**【Abstract】** Objective To observe the effects of stimulation of intact vagus nerve (IVNS) on systemic inflammatory response in rats. Methods The model of systemic inflammatory response was reproduced by lipopolysaccharide(LPS). One hundred Sprague Dawley rats were randomly divided into A group (with intravenous injection of LPS), B group (with stimulation of efferent nerve trunk of vagus nerve after intravenous injection of lipopolysaccharide and vagotomy), C group (with stimulation of intact vagus nerve after intravenous injection of LPS), D group (with vagus nerve stimulation after injection of equivalent isotonic saline), E group (with intravenous injection of equivalent isotonic saline), with 20 rats in each group. Five rats of each group were used to determine mean aortic pressure(MAP) before injection and 10 min, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h and 6 h after injection. The serum levels of tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$  and interleukin (IL) 10 were determined with enzyme linked immunosorbent assay before injection and 2, 4 and 6 hour after injection. Results The level of MAP rose in A, B, C groups at 10 min after injection, especially in A group (134.40  $\pm$  7.3 mm Hg, 1 mm Hg = 0.033 kPa,  $P < 0.05$ ), but it dropped in above groups at 30 min after injection. The level of MAP in A group was obviously lower than that in B, C groups during 10 min ~ 6 h after injection. The serum level of TNF- $\alpha$  in A group was significantly higher than that in B, C groups at 2, 4, 6 hours after injection ( $P < 0.05$ ). Compared with that in C group, the serum level of IL-10 in A, B groups lowered markedly at 4, 6 hours after injection ( $P < 0.05$ ). Conclusion IVNS can stabilize hemodynamics and exert have anti-inflammatory effects at early stage of systemic inflammatory response.

**【Key words】** Endotoxiemia; Intact vagus nerve stimulation; Systemic inflammatory response

“胆碱能抗炎途径”的发现<sup>[1]</sup>,为刺激迷走神经来调控全身炎性反应提供了理论基础。但迷走神经干中不仅包含有传出纤维,还含有大量的传入纤维,因而刺激迷走神经干还可能对中枢产生未知的复杂效应。笔者以内毒素血症为全身炎性反应模型,观

察了完整迷走神经刺激(IVNS)对大鼠全身炎性反应的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及模型制作

清洁级 SD 大鼠 100 只,雌雄不拘,体质量 280 ~ 320 g,由大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。实验前 3 d, 8:00 ~ 20:00 开灯,其余时间熄灯。实验前 12 h 大鼠禁食、可自由饮水。实验时大鼠以 250 g/L 乌拉坦(800 mg/kg)腹腔注射,麻醉后固定



基金项目:国家重点基础研究发展规划(2005CB522600)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院重症监护室(黄健、周健),野战外科研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室研究四室(张年春、杨志焕)

于手术板上,颈部剪毛、消毒,于颈部中央切开皮肤,逐层分离肌肉组织,沿气管右侧暴露颈动脉鞘,在手术显微镜下用玻璃分针游离周围组织,分离出左侧迷走神经干,用 4-0 丝线轻轻提起神经并固定,伤口周围组织覆盖石蜡膜,并将迷走神经浸泡于温热石蜡油中防止干燥。将双极铂金钩状电极(极间距为 2 mm)置于神经干中段,电极连接至神经刺激仪(STW-3201 型,日本光电公司)。药物注射后即刻开始电刺激,参数为:5 mV、2 ms、1 Hz,持续 5 min、间隔 30 min。大鼠经右股静脉插管以注射药物;右股动脉插管,经传感器连接至 Powerlab 多通道生理记录仪(澳大利亚 AD 公司),用于监测和记录血压;同时用心电图 II 导联监测心率。

### 1.2 动物分组

将大鼠按随机数字表法分为 A 组:静脉注射内毒素/脂多糖(LPS, 5 mg/kg, *E. coli* O<sub>26</sub>: B<sub>6</sub>, 美国 Sigma 公司);B 组:切断迷走神经,静脉注射 LPS 后对其远端实施电刺激;C 组:静脉注射 LPS 后,给予颈迷走神经干电刺激;D 组:除注射等量等渗盐水外,同 C 组处理;E 组:注射等量等渗盐水。每组 20 只大鼠。

### 1.3 检测方法

**1.3.1 平均动脉压(MAP)的测定** 每组取 5 只大鼠,分别于注射前及注射后 10、30 min 以及 1、2、4、6 h 测定 MAP。

**1.3.2 肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、白细胞介素 10(IL-10)水平的测定** 于注射前及注射后 2、4、6 h 采集各组大鼠心脏血,自然凝固后,于 4 °C 4000 × g 离心 4 min,分离血清, -70 °C 下保存,参照酶联免疫吸附测定试剂盒说明书,测定 TNF-α、IL-10 水平,每相点 5 只大鼠。

### 1.4 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 10.0 统计软件包进行单因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 内毒素血症时 IVNS 对 MAP 的影响

组间 MAP 的正常值相似 ( $P > 0.05$ ),见表 1。

### 2.2 内毒素血症时 IVNS 对 TNF-α 的影响

组间 TNF-α 正常值相似 ( $P > 0.05$ ),见表 2。

表 2 迷走神经刺激对内毒素血症大鼠血清肿瘤坏死因子 α 的影响 (pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	正常值	注射后 2 h	注射后 4 h	注射后 6 h
A 组	53 ± 5	1079 ± 143 <sup>ad</sup>	1830 ± 130 <sup>adf</sup>	1422 ± 79 <sup>adef</sup>
B 组	54 ± 6	597 ± 53 <sup>abd</sup>	1022 ± 119 <sup>abdf</sup>	986 ± 105 <sup>abdef</sup>
C 组	53 ± 7	532 ± 50 <sup>abd</sup>	945 ± 56 <sup>abdf</sup>	684 ± 117 <sup>abdef</sup>
D 组	52 ± 7	60 ± 8	59 ± 6	55 ± 4
E 组	54 ± 9	75 ± 9	63 ± 10	61 ± 9

注:每组各相点 5 只大鼠;A 组静脉注射内毒素/脂多糖(LPS);B 组切断迷走神经、静脉注射 LPS 后远端实施电刺激;C 组静脉注射 LPS 后,给予颈迷走神经干电刺激;D 组除注射等量等渗盐水外,同 C 组处理;E 组注射等量等渗盐水;与 D、E 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 A 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 C 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与正常值比较,<sup>d</sup> $P < 0.01$ ;与注射后 4 h 比较,<sup>e</sup> $P < 0.01$ ;与注射后 2 h 比较,<sup>f</sup> $P < 0.01$

### 2.3 内毒素血症时 IVNS 对 IL-10 的影响

组间 IL-10 正常值相似 ( $P > 0.05$ ),见表 3。

表 3 迷走神经刺激对内毒素血症大鼠血清白细胞介素 10 水平的影响 (pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	正常值	注射后 2 h	注射后 4 h	注射后 6 h
A 组	133 ± 22	1659 ± 224 <sup>ac</sup>	1882 ± 264 <sup>ac</sup>	1841 ± 228 <sup>ac</sup>
B 组	130 ± 16	1619 ± 215 <sup>ac</sup>	1725 ± 199 <sup>ac</sup>	1700 ± 216 <sup>ac</sup>
C 组	110 ± 16	1745 ± 261 <sup>ac</sup>	2328 ± 211 <sup>abcd</sup>	2255 ± 206 <sup>abcd</sup>
D 组	119 ± 12	137 ± 24	141 ± 17	147 ± 15
E 组	125 ± 13	217 ± 77	169 ± 38	156 ± 18

注:每组各相点 5 只大鼠;A 组静脉注射内毒素/脂多糖(LPS);B 组切断迷走神经、静脉注射 LPS 后对其远端实施电刺激;C 组静脉注射 LPS 后,给予颈迷走神经干电刺激;D 组除注射等量等渗盐水外,同 C 组处理;E 组注射等量等渗盐水;与 D、E 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 A、B 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与正常值比较,<sup>c</sup> $P < 0.01$ ;与注射后 2 h 比较,<sup>d</sup> $P < 0.01$

表 1 迷走神经刺激对大鼠内毒素血症时平均动脉压的影响 (mm Hg,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	正常值	注射后 10 min	注射后 30 min	注射后 1 h	注射后 2 h	注射后 4 h	注射后 6 h
A 组	103.2 ± 6.6	134.4 ± 7.3 <sup>abc</sup>	83.2 ± 6.7 <sup>abcd</sup>	80.0 ± 8.0 <sup>abcd</sup>	73.2 ± 7.4 <sup>abcd</sup>	67.8 ± 3.4 <sup>abcd</sup>	56.4 ± 5.1 <sup>abcd</sup>
B 组	106.5 ± 6.9	110.4 ± 7.9 <sup>ac</sup>	89.2 ± 6.6 <sup>acd</sup>	86.7 ± 5.5 <sup>ac</sup>	76.9 ± 4.2 <sup>acd</sup>	72.5 ± 7.7 <sup>ac</sup>	64.8 ± 7.5 <sup>acd</sup>
C 组	105.4 ± 7.9	117.4 ± 6.7 <sup>ac</sup>	92.4 ± 5.3 <sup>acd</sup>	89.0 ± 5.2 <sup>ac</sup>	78.6 ± 5.1 <sup>acd</sup>	76.4 ± 2.3 <sup>ac</sup>	75.8 ± 6.6 <sup>ac</sup>
D 组	102.8 ± 5.4	102.8 ± 3.8	100.0 ± 5.6	100.5 ± 5.8	101.0 ± 5.6	101.2 ± 7.0	100.0 ± 6.0
E 组	105.2 ± 6.2	108.0 ± 6.0	104.8 ± 6.2	105.2 ± 6.6	100.8 ± 6.2	102.6 ± 3.9	98.2 ± 6.2

注:每组各相点 5 只大鼠;A 组静脉注射内毒素/脂多糖(LPS);B 组切断迷走神经、静脉注射 LPS 后对其远端实施电刺激;C 组静脉注射 LPS 后,给予颈迷走神经干电刺激;D 组除注射等量等渗盐水外,同 C 组处理;E 组仅注射等量等渗盐水;与 D、E 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 B、C 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与正常值比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与前一相点比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ ;1 mm Hg = 0.133 kPa

### 3 讨论

#### 3.1 内毒素血症时 IVNS 对 MAP 的影响

Bernik 等<sup>[2]</sup>给予动物静脉注射致死剂量的 LPS (50 ~ 60 mg/kg) 后, MAP 值立即下降, 20 min 内低于伤前值的 20% ~ 30%。本研究观察到, 大鼠注射 LPS 后 10 min 内 MAP 值显著升高, 30 min 时才开始下降, 究其原因可能是 LPS 的剂量不同所致。大剂量的 LPS 可诱导心肌抑制因子的产生, 直接抑制心脏功能活动<sup>[3]</sup>。IVNS 可抑制 LPS 注射 10 min 时 MAP 的过度升高, 表明它可对抗应激早期血流动力学的剧烈变化, 在后续时相点具有提升 MAP 的作用。原因可能是迷走神经兴奋性提高后, 其递质乙酰胆碱 (ACh) 通过抑制 TNF- $\alpha$  等炎性介质的产生或对抗其致炎效应的结果。TNF- $\alpha$  等促炎介质不仅可损伤心肌细胞, 直接导致心功能下降, 还可导致外周微循环功能障碍, 毛细血管渗漏增加 (毛细血管渗漏综合征), 使循环血量不足, 引起血压下降<sup>[4]</sup>。同时, IVNS 刺激可升高血液中 ACh 水平<sup>[5]</sup>。ACh 能舒张血管并对血管内皮细胞产生保护作用<sup>[6]</sup>, 减轻对组织器官和微循环的损伤, 从而稳定循环, 改善包括心脏在内的组织器官的功能。

研究表明, 自主神经系统对器官功能的调节与效应器官本身的功能状态有关, 即机体器官功能处于不同状态时, 使用同样参数刺激迷走神经将产生程度不等甚至相反的效应。例如对于交感神经切除后的大鼠, 不同时相点的迷走神经刺激对循环系统的影响可分别表现为兴奋或抑制效应<sup>[7]</sup>。本实验所观察到内毒素血症时 IVNS 对循环的稳定作用, 可能正是迷走神经这种双向调节作用的表现之一。因此, IVNS 可稳定应激早期的血流动力学指征, 保护机体免受因循环剧烈波动而造成的不良影响。

#### 3.2 IVNS 对全身炎症反应的影响

我们观察到 IVNS 对全身炎症反应时 TNF- $\alpha$  的抑制现象, 与 Borovikova 等<sup>[8]</sup>的结果相似。但本研究结果显示, IVNS 可明显提高注射后 4、6 h 血清 IL-10 水平, 可能是保持了迷走神经完整性的缘故。完整的迷走神经将电刺激信号传入中枢, 产生复杂的中枢效应, 进而影响机体其他内源性抗炎保护作用途径, 如通过神经内分泌途径产生一些神经肽 (如  $\alpha$ -促黑激素) 等使 IL-10 水平升高<sup>[9]</sup>。作为在炎症反应时起关键作用的启动因子, TNF- $\alpha$  介导了

后续细胞因子释放的“瀑布效应”, 放大全身炎症反应, 加重远隔部位的组织细胞损伤。研究还表明, TNF- $\alpha$  可诱导“晚期炎性介质”高迁移率族蛋白 1 的产生, 直接影响脓毒症的预后<sup>[10]</sup>。IL-10 通过抑制核因子  $\kappa$ B 对一些促炎细胞因子, 例如 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 等的生成起负性调控作用<sup>[11]</sup>。虽然过多的 IL-10 将会抑制免疫反应, 增加机体对感染的易感性, 但在内毒素血症早期, 相对于 TNF- $\alpha$  的增多, IL-10 适当升高将有利于促炎与抗炎反应间的平衡, 防止损伤的进一步加重<sup>[12]</sup>。综上所述, 本研究结果说明, IVNS 可以稳定全身炎症反应时血流动力学指征, 并具有抗炎效应, 对脓毒症的防治具有重要意义。但临床使用 IVNS 的参数和时机尚待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Libert C. Inflammation: a nervous connection. *Nature*, 2003, 421(23): 328-329.
- [2] Bernik TR, Friedman SG, Ochani M, et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Exp Med*, 2002, 195(6): 781-788.
- [3] 王正国. 脓毒症研究概况. *中华创伤杂志*, 2003, 19(1): 5-8.
- [4] Llewelyn M, Cohen J. New insights into the pathogenesis and therapy of sepsis and septic shock. *Curr Clin Top Infect Dis*, 2001, 21: 148-171.
- [5] 黄健, 杨志焕, 张年春, 等. 内毒素血症大鼠交感-迷走神经平衡的改变. *中华创伤杂志*, 2006, 22(10): 771-774.
- [6] Bermejo A, Zarzuelo A, Duarte J, et al. In vivo vascular effects of genistein on a rat model of septic shock induced by lipopolysaccharide. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2003, 42(3): 329-338.
- [7] 王莎莉, 陆杰, 黄仲荪. 电刺激迷走神经引起交感神经反射性反应的电生理学研究. *重庆医科大学学报*, 1994, 19(3): 187-190.
- [8] Borovikova LV, Lvanova S, Zhang M, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature*, 2000, 405(6785): 458-462.
- [9] Catania A, Delgado R, Airaghi L, et al. alpha-MSH in systemic inflammation. Central and peripheral actions. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 885: 183-187.
- [10] Czura CJ, Tracey KJ. Targeting high mobility group box 1 as a late-acting mediator of inflammation. *Crit Care Med*, 2003, 31 Suppl 1: S46-50.
- [11] Haveman JW, Muller Kobold AC, Tervaert JW, et al. The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment. *Neth J Med*, 1999, 55(3): 132-141.
- [12] Adrie C, Pinsky MR. The inflammatory balance in human sepsis. *Intensive Care Med*, 2000, 26(4): 364-375.

(收稿日期: 2007-06-26)

(本文编辑: 莫愚)