

• 论著 •

丙酮酸乙酯对烫伤延迟复苏大鼠细胞免疫功能的影响

董月青 姚咏明 魏鹏 刘辉 董宁 于燕 盛志勇

【摘要】目的 观察丙酮酸乙酯(EP)对烫伤延迟复苏大鼠细胞免疫功能的影响,并探讨其作用机制。**方法** 采用大鼠 30% 总体表面积Ⅲ度烫伤模型,103 只大鼠随机分为正常对照组($n=7$)、假烫伤组($n=32$)、烫伤组($n=32$,伤后 6 h 腹腔内注入 40 ml/kg 生理盐水)和 EP(3.23 mg/ml)干预组($n=32$,伤后 6 h 腹腔内注入 40 ml/kg EP 液),分别于伤后 1、3、5 和 7 d 活杀,检测脾淋巴细胞增殖能力、白细胞介素-2(IL-2)生成及白细胞介素-2 受体(IL-2R)表达。**结果** 烫伤延迟复苏后 1~7 d,脾淋巴细胞丝裂原刺激的增殖反应明显受抑制(P 均 <0.05)。烫伤后 1~5 d IL-2 生成明显减少(P 均 <0.05),且烫伤后 1 和 3 d IL-2R 的表达显著降低(P 均 <0.05)。EP 干预能够明显恢复烫伤后 1~7 d 脾淋巴细胞的增殖能力(P 均 <0.05),伤后 1、3 和 5 d,IL-2 的生成显著增加,但对 IL-2R 的表达无影响(P 均 >0.05)。**结论** EP 能显著增加脾淋巴细胞的增殖能力和 IL-2 的产生,从而有效改善烫伤延迟复苏后细胞免疫功能障碍。

【关键词】 烧伤; 白细胞介素-2; 白细胞介素-2 受体; T 淋巴细胞; 丙酮酸乙酯

Effects of ethyl pyruvate on cell-mediated immune function in rats with delayed resuscitation after burn injury DONG Yue-qing, YAO Yong-ming, WEI Peng, LIU Hui, DONG Ning, YU Yan, SHENG Zhi-yong. Burns Institute, 304th Clinical Department of General Hospital of PLA, Beijing 100037, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of ethyl pyruvate (EP) on cell-mediated immune function in rats with delayed resuscitation after burn injury, and its potential regulatory mechanism. **Methods**

Wistar rats were subjected to 30% full-thickness scald injury with delayed resuscitation. One hundred and three male rats were randomly divided into normal controls ($n=7$), sham scald group ($n=32$), scald group ($n=32$) in which 40 ml/kg normal saline was infused peritoneally 6 hours after scald, and EP treatment group ($n=32$) in which 40 mg/kg EP was injected peritoneally 6 hours after scald. Animals were sacrificed on postburn day 1, 3, 5, and 7, and spleen was collected to determine splenocyte proliferation, IL-2 production and cell-surface IL-2 receptor (IL-2R) expression. **Results** Splenic lymphocyte proliferation responses to T cell mitogen, concanavalin A (Con A), were depressed from 1 to 7 days after scald injury (all $P<0.05$). Meanwhile, in comparison with sham scald group, burn injury resulted in a significant decrease in splenic production of IL-2 on postburn day 1, 3, as well as 5, and a marked suppression of IL-2R expression on days 1 and 3 postburn (all $P<0.05$). Treatment with EP after burn injury showed a dramatic restoration of lymphocyte proliferation rate and increased production of IL-2 at various time points (all $P<0.05$). However, treatment with EP did not affect IL-2R expression compared with scalded rats (all $P>0.05$). **Conclusion** Treatment with EP could markedly elevate splenic T lymphocyte proliferation response and increase production of IL-2 following burn injury, thereby improving cell-mediated immunity in thermally injured rats with delayed resuscitation.

【Key words】 burns; interleukin-2; interleukin-2 receptor; T lymphocyte; ethyl pyruvate

业已明确,严重烧伤后存在细胞免疫功能的紊乱^[1]。因此,进行针对性干预已成为预防烧伤后感染及脓毒症发生的重要措施。我们的研究显示,晚期炎症介质高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)能明显影响小鼠脾淋巴细胞增殖反应,并对淋巴细胞白细胞介素-2(IL-2)诱生活活性及 T 辅助淋巴细胞极化具有显著作用(待发表)。近期发现,丙酮酸乙酯(ethyl

pyruvate, EP)能抑制 HMGB1 的释放,但其对严重损伤后体内细胞免疫功能的影响尚不清楚。本实验拟采用大鼠烫伤延迟复苏模型,观察 EP 干预对脾淋巴细胞增殖、IL-2 产生及白细胞介素-2 受体(IL-2R)表达的影响,旨在探索改善烧伤后免疫功能障碍的新途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物与模型制备: 雄性清洁级 Wistar 大鼠,体重 230~250 g,购自中国医学科学院实验动物研究所。大鼠称重、编号,禁食 12 h,盐酸氯胺酮注射液与速眠新 2:1 混合液 0.1 ml 肌肉注射麻醉,刮除背部及侧胸部毛,浸于(99.0±0.5)℃沸水中 12 s,造成 30% 总体表面积Ⅲ度烫伤,背部创面每日

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(G1999054203-1);
国家杰出青年科学基金资助项目(30125020)

作者单位:100037 北京,解放军总医院三〇四临床部全军烧伤研究所

通讯作者:姚咏明,教授,博士研究生导师 (Email: c_ff@sina.com)

作者简介:董月青(1972-),男(汉族),河北省保定市人,医学硕士,主治医师,主要从事创、烧伤脓毒症发病机制及防治方法的研究。

2 次涂以质量分数为 2% 的碘酒抗感染, 伤后 6 h 补液抗休克, 麻醉苏醒后单笼饲养。假烫伤动物浸于 37 °C 温水中 12 s, 余处理同上。

1.2 动物分组: 103 只动物随机分为 4 组: ①正常对照组 ($n=7$): 麻醉后活杀; ②假烫伤组 ($n=32$); ③烫伤组 ($n=32$): 烫伤后 6 h 腹腔内注入林格液 40 ml/kg 抗休克, 于 12、24、36 和 48 h 再分别给予 3 ml; ④EP 干预组 ($n=32$): 烫伤后 6 h 腹腔内注入 EP 液 (3.23 mg/ml) 40 ml/kg 抗休克, 12、24、36 和 48 h 再分别给予 3 ml。假烫伤组、烫伤组和 EP 干预组于伤后 1、3、5 和 7 d 活杀, 每个时间点 8 只动物。

1.3 脾 T 淋巴细胞的分离: 无菌取动物脾脏, 置于 5 ml 不含小牛血清的 RPMI-1640 不完全培养液中, 100 目金属网上用注射器针芯碾压, 收集网下的细胞悬液, 注入无菌离心管中。将脾细胞悬液缓慢置于已配好的无菌无热原蔗糖-泛影葡胺液面上。在 18~20 °C 下, 2 500 r/min 离心 20 min, 吸取第二层云雾状低密度细胞, 离心、洗涤后去红细胞, 纯化、分离单个核细胞后, 利用单核细胞和多型核细胞黏附塑料及毛玻璃的特性分离 T 淋巴细胞。苔盼蓝检测分离细胞的活性大于 97%。细胞计数, 调整细胞浓度为 $5 \times 10^9/L$ 。

1.4 检测指标和方法

1.4.1 噻唑蓝 (MTT) 比色法检测脾 T 淋巴细胞增殖反应: 含体积分数为 20% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度至 $5 \times 10^9/L$, 取 0.1 ml 接种于 96 孔培养板, 另加 100 μ l 刀豆素 (Con A, 5 μ g/ml) 进行刺激。体积分数为 20% 的完全 RPMI-1640 培养液与 5 μ g/ml Con A 各 100 μ l 混合作为调零孔。37 °C、体积分数为 5% 的 CO₂ 孵箱孵育 68 h, 轻轻吸弃 100 μ l 上清, 向各孔加入 10 μ l MTT (5 mg/ml), 轻微震荡, 继续培养 4 h。再加 100 μ l Triton-100 (体积分数为 10% 的 TritonX-100 + 体积分数为 5% 的异丙醇 + 0.01 mol/L HCl) 溶液, 37 °C 温箱过夜, 测 540 nm 处吸光度 (A_{540} 值)。

1.4.2 细胞培养上清中 IL-2 活性的检测: 应用大鼠 IL-2 酶联免疫吸附 (ELISA) 检测试剂盒 (R&D Systems 公司, 美国), 严格按照说明书操作, 分别计算出标准曲线和回归方程, 将样品吸光度值代入标准曲线乘以相应的稀释倍数, 计算出样品中细胞因子蛋白浓度。标准曲线回归方程为: $y=0.0012x-0.0304$, $r=0.9974$ 。

1.4.3 细胞 IL-2R 的表达: 向平底 96 孔细胞培养板孔内加入含体积分数为 20% FBS 的 Con A 液

(5 μ g/ml) 0.1 ml, 相应孔中加细胞悬液 ($5 \times 10^9/L$) 0.1 ml。37 °C、5% CO₂ 中孵育 18 h 后收集上清, -20 °C 保存, 用于 IL-2 活性检测。刺激 18 h 后的脾 T 淋巴细胞离心, 用 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 0.5 ml 悬浮, 细胞计数 $5 \times 10^8/L$ 。用 1 μ l 抗体 Fc 片段阻断剂 4 °C 孵育 5 min, 加入异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的抗大鼠 CD3 抗体 1 μ l 和藻红蛋白 (PE) 标记的抗大鼠 CD25 抗体 2.5 μ l, 避光孵育 20~30 min, 采用流式细胞仪进行分析。所有荧光标记抗体均购自美国 BD Pharmingen 公司。

1.5 统计学处理: 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 Stata 7.0 统计软件包进行 t 检验、方差分析及相关分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EP 干预对脾 T 淋巴细胞增殖的影响 (表 1): 与假烫伤组及正常对照组比较, 烫伤组动物伤后 1~7 d 脾 T 淋巴细胞对丝裂原刺激的增殖反应显著降低 (P 均 < 0.05); 而应用 EP 干预能够明显减轻脾 T 淋巴细胞增殖的抑制 (P 均 < 0.05)。

表 1 EP 干预对烫伤延迟复苏大鼠脾 T 淋巴细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of EP treatment on splenocyte proliferation in rats with postburn delayed resuscitation ($\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 | A_{540} | | | |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | 伤后 1 d | 伤后 3 d | 伤后 5 d | 伤后 7 d |
| 假烫伤组 | 0.250 \pm 0.011 | 0.261 \pm 0.013 | 0.348 \pm 0.015 | 0.357 \pm 0.011 |
| 烫伤组 | 0.151 \pm 0.009* Δ | 0.239 \pm 0.010* Δ | 0.265 \pm 0.026* Δ | 0.302 \pm 0.019* Δ |
| EP 干预组 | 0.285 \pm 0.008 $\#$ | 0.293 \pm 0.021 $\#$ | 0.355 \pm 0.014 $\#$ | 0.360 \pm 0.011 $\#$ |

注: 与正常对照组 (0.358 \pm 0.017) 比较: $\Delta P < 0.05$; 与假烫伤组比较: * $P < 0.05$; 与烫伤组比较: $\# P < 0.05$

2.2 EP 干预对脾 T 淋巴细胞 IL-2 生成的影响 (表 2): 与正常对照组或假烫伤组比较, 烫伤组伤后 1~7 d 的 IL-2 生成明显减少, 伤后 1、3 和 5 d 时 IL-2 活性明显下降 (P 均 < 0.05)。与烫伤组比较, EP 干预后 IL-2 活性明显增强, 伤后 1、3 和 5 d 分别增加了 3.4、1.6 和 1.4 倍 (P 均 < 0.05)。

2.3 EP 干预对脾 T 淋巴细胞 IL-2R 表达的影响 (表 3, 图 1): 烫伤延迟复苏后 1 d 和 3 d, 与假烫伤组或正常对照组比较, IL-2R 的表达均明显降低 (P 均 < 0.05), 以后则逐渐上升。但烫伤后第 5 d IL-2R 表达仍低, 至第 7 d 表达已恢复至伤前水平 ($P > 0.05$)。应用 EP 干预对烫伤动物脾 T 淋巴细胞表达 IL-2R 的能力无明显影响 (P 均 > 0.05)。

2.4 脾淋巴细胞增殖与 IL-2 生成量间的相关性分析: 烫伤延迟复苏后 1~7 d, 脾淋巴细胞增殖抑

制与 IL-2 生成量减少呈明显正相关($r=0.9922$, $P<0.05$)。

表 2 EP 干预对烫伤延迟复苏大鼠脾 T 淋巴细胞 IL-2 生成的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of EP treatment on splenic T lymphocyte production of IL-2 in rats with postburn delayed resuscitation($\bar{x}\pm s, n=8$) ng/L

| 组别 | 伤后 1 d | 伤后 3 d | 伤后 5 d | 伤后 7 d |
|--------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------|
| 假烫伤组 | 1 323.7±137.8 | 2 102.0±607.8 | 2 574.5±151.2 | 2 447.0±165.3 |
| 烫伤组 | 412.8±299.5 [△] * | 1 292.8±463.6 [△] * | 1 701.2±166.3 [△] * | 2 270.3±345.3 |
| EP 干预组 | 1 412.8±413.7 [#] | 2 062.0±268.7 [#] | 2 365.3±109.5 [#] | 2 568.7±128.6 |

注:与正常对照组($2 469.6\pm 146.7$)ng/L 比较:[△] $P<0.05$;
与假烫伤组比较:^{*} $P<0.05$;与烫伤组比较:[#] $P<0.05$

表 3 EP 干预对烫伤延迟复苏大鼠脾 T 淋巴细胞 IL-2R 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of EP treatment on splenic T lymphocyte IL-2R expression in rats with postburn delayed resuscitation($\bar{x}\pm s, n=8$) %

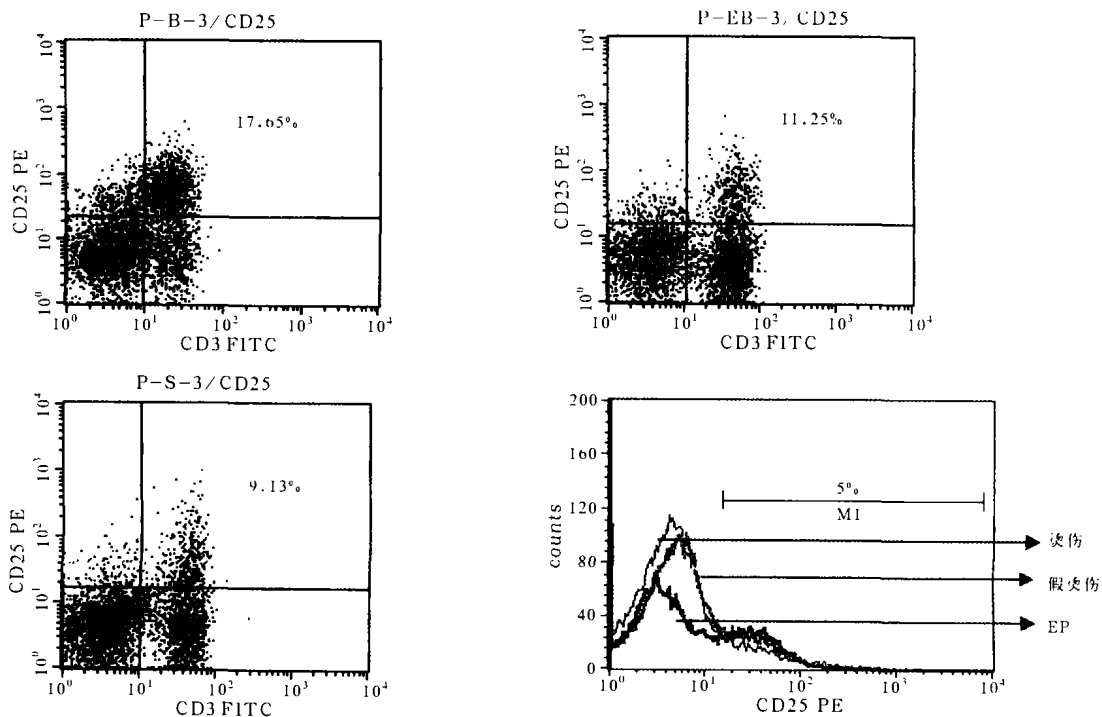
| 组别 | 伤后 1 d | 伤后 3 d | 伤后 5 d | 伤后 7 d |
|--------|--------------------------|--------------------------|------------|------------|
| 假烫伤组 | 17.38±8.46 | 16.81±6.79 | 17.92±8.39 | 16.87±7.47 |
| 烫伤组 | 9.31±4.60 [△] * | 9.13±4.25 [△] * | 13.43±6.79 | 19.36±8.05 |
| EP 干预组 | 9.62±4.57 | 10.21±3.56 | 13.76±5.24 | 17.26±7.43 |

注:与正常对照组(17.94 ± 8.27)比较:[△] $P<0.05$;与假烫伤组比较:^{*} $P<0.05$

3 讨论

脓毒症是由感染诱发的严重并发症,其发生与

严重创、烧伤后细胞免疫功能紊乱密切相关^[2]。在细胞免疫中 T 淋巴细胞增殖需要 IL-2 等细胞因子与相关高亲和力受体结合。IL-2R 主要由 75 ku 的 β 链、64 ku 的 γ 链及 55 ku 的 α 链组成。 β 、 γ 链在静息淋巴细胞上表达,主要与受体亲和力有关; α 链只在活化 T 淋巴细胞上表达,且与 β 、 γ 链结合形成高亲和力、高活性受体。本试验中检测了 T 淋巴细胞上高亲和力受体的表达,结果证实,烫伤延迟复苏后 1~7 d,脾 T 淋巴细胞对丝裂原刺激的增殖反应受到明显抑制;伤后 1~7 d 脾 T 淋巴细胞产生 IL-2 的能力明显下降,与国外学者研究结果基本一致。目前,对于创伤后脾 T 淋巴细胞表达 IL-2R 的情况存在争议。本实验中发现,烫伤延迟复苏早期(伤后 1 和 3 d),脾 T 淋巴细胞表达 IL-2R 明显下调,但随着时间的推移,动物从创伤应激中逐渐恢复,IL-2R 表达逐渐回升至正常范围。产生这些差异的原因尚不清楚,推测与采用不同的动物模型及创伤严重程度有关。业已明确,严重创伤后淋巴细胞的增殖受抑制,除与早期应激性介质肾上腺糖皮质激素等升高有关外,IL-10、前列腺素 E₂ 及一氧化氮等抑制因子同样起重要作用^[3,4]。目前普遍认为,创伤后 IL-2 的生成减少也在其中起着至关重要的作用。本组资料中,脾 T 淋巴细胞增殖反应受抑制主要与 IL-2 的诱生减少密切相关($r=0.9922$),IL-2R



注:P-B-3/CD25 为烫伤组;P-EI'-3/CD25 为 EP 干预组;P-S-3/CD25 为假烫伤组

图 1 烫伤延迟复苏后 3 d 脾 T 淋巴细胞 CD25 (IL-2R) 表达的细胞流式结果

Figure 1 Results of CD25 (IL-2R) expression on the splenic T lymphocyte by flow cytometry

表达降低可能只是早期影响增殖反应的一个因素,对 T 淋巴细胞的增殖反应并不起关键作用。

新近发现, HMGB1 作为一种晚期炎症介质可能介导了内毒素血症的致死效应^[5]。研究显示, HMGB1 在循环及不同组织中, 显示出延迟、高表达效应, 并且明显影响了肝、肺及小肠等重要器官的功能^[6,7]。此外, HMGB1 还能诱导其他细胞因子如 IL-1、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等产生。研究显示, HMGB1 能引起促炎/抑炎细胞因子比例的失调, 可能参与了烧伤后免疫功能紊乱的发病机制^[8,9]。HMGB1 还能显著影响脾 T 淋巴细胞增殖功能和 IL-2 诱生能力(待发表), 初步提示它不仅参与脓毒症时炎症反应过程, 还与机体免疫功能障碍有关。

EP 能够抑制内毒素刺激动物巨噬细胞释放 HMGB1, 明显降低脓毒症大鼠血浆中 HMGB1 水平, 与改善脓毒症大鼠的生存率有关^[10]。此外, EP 能够降低失血性休克、缺血-再灌注动物模型的死亡率, 并可减轻急性坏死性胰腺炎所致重要器官的损害^[11,12]。但其具体作用机制目前并不十分明确。据报道, EP 通过降解谷胱甘肽成为谷胱甘肽的二硫化物, 使得细胞内氧化-还原状态发生改变^[13], 进而抑制核因子- κ B(NF- κ B) 的活性, 最终抑制了促炎介质的产生。业已明确, TNF- α 和 HMGB1 是炎症反应中重要的两种重要细胞因子, 对于细胞因子网络起着关键的调控作用。应用 EP 可能有助于调节炎症反应的平衡, 防止过度炎症反应的发展。另据表明, 有效拮抗 NF- κ B 活化能够下调 TNF- α 等促炎性细胞因子的合成与分泌, 同时维持机体的抗炎调节机制^[14]。但这并不是 EP 作用的惟一方面。我们研究发现, EP 还能明显改善烧伤延迟复苏动物的免疫功能, 表现为明显改善烧伤延迟复苏动物脾 T 淋巴细胞对丝裂原刺激的增殖能力; 显著增加烧伤后脾 T 淋巴细胞产生 IL-2 的能力; 但其对烧伤后 IL-2R 的表达并未产生明显影响。此外 EP 还可降低 HMGB1 水平及其对细胞免疫的不利影响, 因此增加 IL-2 的产生可能是 EP 恢复烧伤延迟复苏大鼠 T 淋巴细胞增殖能力的作用机制之一。

丙酮酸作为葡萄糖有氧及厌氧代谢的重要中间产物, 也起着降解有害氧化物的作用, 主要表现为直接中和过氧化物及过氧亚硝酸盐。乙酯形式的丙酮酸在林格液中更能保持相对的稳定性。研究证实, 严重烧伤延迟复苏过程中产生的氧自由基能明显抑制脾 T 淋巴细胞增殖反应^[15]。EP 也可能通过中和氧自由基, 而使 T 淋巴细胞的增殖抑制得以缓解。

综上所述, 本研究通过体内实验首先证实了 EP 对严重烧伤延迟复苏动物细胞免疫功能障碍具有明显改善作用。EP 可能通过抑制 HMGB1 的释放、增加 IL-2 的产生及拮抗氧自由基等多方面效应减轻淋巴细胞的功能异常。林格 EP 液作为一种高效、安全的复苏液, 对多种急危重症动物模型具有保护作用, 其确切临床应用效果仍有待进一步探讨。

参考文献:

- 1 Wolfe J H, Wu A V, O'Connor N E, et al. Anergy, immunosuppressive serum, and impaired lymphocyte blastogenesis in burn patients[J]. Arch Surg, 1982, 117: 1266-1271.
- 2 董月青, 姚咏明. 脓毒症中细胞免疫紊乱的机制[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 636-638.
- 3 Choudhry M A, Mao H, Haque F, et al. Role of NFAT and AP-1 in PGE₂-mediated T cell suppression in burn injury[J]. Shock, 2002, 18: 212-216.
- 4 Masson I, Mathieu J, Nolland X B, et al. Role of nitric oxide in depressed lymphoproliferative responses and altered cytokine production following thermal injury in rats[J]. Cell Immunol, 1998, 186: 121-132.
- 5 Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice[J]. Science, 1999, 285: 248-251.
- 6 张立天, 姚咏明, 陆家齐, 等. 高迁移率族蛋白-1 在脓毒症所致多器官功能损害中的作用[J]. 中华外科杂志, 2003, 41: 320-323.
- 7 Fang W H, Yao Y M, Shi Z G, et al. The significance of changes in high mobility group-1 protein mRNA expression in rats after thermal injury[J]. Shock, 2002, 17: 329-333.
- 8 王忠堂, 姚咏明, 盛志勇, 等. 休克期切痂对烫伤大鼠肝、肺组织高迁移率族蛋白 B1 表达及促炎/抗炎平衡的影响[J]. 中华外科杂志, 2004, 42: 839-844.
- 9 姚咏明, 鄢小建, 董宁, 等. 脓毒症大鼠高迁移率族蛋白-1 对组织 Toll 样受体 2 基因表达的影响[J]. 中华创伤杂志, 2003, 19: 13-16.
- 10 Ulloa L, Ochani M, Yang H, et al. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 12351-12356.
- 11 Sims C A, Wattanasirichaigoon S, Menconi M J, et al. Ringer's ethyl pyruvate solution ameliorates ischemia/reperfusion-induced intestinal mucosal injury in rats[J]. Crit Care Med, 2001, 29: 1513-1518.
- 12 Yang R, Uchiyama T, Alber S M, et al. Ethyl pyruvate ameliorates distant organ injury in a murine model of acute necrotizing pancreatitis[J]. Crit Care Med, 2004, 32: 1453-1459.
- 13 Rahman I, MacNee W. Regulation of redox glutathione levels and gene transcription in lung inflammation: therapeutic approaches[J]. Free Radic Biol Med, 2000, 28: 1405-1420.
- 14 姚咏明, 姚胜, 陈劲松, 等. NF- κ B 抑制剂对烫伤脓毒症大鼠致炎/抗炎细胞因子表达的影响[J]. 解放军医学杂志, 2004, 29: 33-35.
- 15 Valenti L, Mathieu J, Chancerelle Y, et al. Nitric oxide inhibits spleen cell proliferative response after burn injury by inducing cytoapoptosis, apoptosis, and necrosis of activated T lymphocytes: role of the guanylate cyclase[J]. Cell Immunol, 2003, 221: 50-63.

(收稿日期: 2004-10-25 修回日期: 2004-12-20)

(本文编辑: 郭方)