

丙酮酸乙酯对烫伤延迟复苏大鼠脾淋巴细胞增殖及凋亡影响

董宁 姚咏明 董月青 刘辉 魏鹏 于燕 盛志勇

【摘要】目的 观察丙酮酸乙酯对烫伤延迟复苏大鼠脾淋巴细胞增殖及凋亡的影响,并对其机制进行初步探讨。**方法** 72 只 Wistar 大鼠随机分为假烫伤组($n=24$)、烫伤组($n=24$)和丙酮酸乙酯(3.23 mg/ml)治疗组($n=24$),分别于伤后 1、3 和 5 d 活杀大鼠,检测脾淋巴细胞增殖能力及凋亡情况。**结果** 烫伤延迟复苏后 1~5 d,脾淋巴细胞对丝裂原刺激的增殖反应明显受抑制(P 均 <0.05);在烫伤后第 1 d,脾 $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ T 细胞凋亡显著增加($P<0.05$)。应用丙酮酸乙酯治疗能够明显恢复烫伤后 1~5 d 脾淋巴细胞的增殖反应($P<0.05$),同时烫伤后第 1 d 的凋亡明显下降($P<0.05$)。**结论** 丙酮酸乙酯能够有效恢复烫伤延迟复苏后脾淋巴细胞的增殖能力,并减轻脾淋巴细胞凋亡。

【关键词】 烧伤; 丙酮酸乙酯; T 细胞; 增殖; 凋亡

Effects of ethyl pyruvate on splenocyte proliferation and apoptosis in burn rats with delayed resuscitation

DONG Ning, YAO Yong-ming, DONG Yue-qing, LIU Hui, WEI Peng, YU Yan, SHENG Zhu-yong, Burns Institute, 304 th Hospital Affiliated to General Hospital of PLA, Beijing 100037, China

Corresponding author: YAO Yong-ming (Email: c_ff@sina.com)

【Abstract】Objective To investigate the effects of ethyl pyruvate (EP) on splenocyte proliferation and apoptosis in burn rats with delayed resuscitation, and its potential underlying mechanism. **Methods** Seventy-two male Wistar rats were randomly divided into sham-scalded control group ($n=24$), scald group ($n=24$), and scald with EP treatment group ($n=24$). Animals were sacrificed on days 1, 3, and 5 postburn, and spleen samples were collected to determine splenocyte proliferation and apoptosis. **Results** Splenic lymphocyte proliferation response to T cell mitogen, concanavalin A (Con A), was significantly depressed from 1 to 5 days after burn injury (all $P<0.05$). Meanwhile, burn injury resulted in a marked increase in splenic $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ T lymphocyte apoptosis in comparison with that in sham-scalded controls on day 1 postburn ($P<0.05$). Treatment with EP after burns resulted in a dramatic restoration of lymphocyte proliferation response and reduction of splenic $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ T lymphocyte apoptosis compared with scald group ($P<0.05$). **Conclusion** Administration of EP can markedly improve the splenocyte proliferation response and inhibit splenic $\text{CD3}^+ \text{CD4}^+$ T lymphocyte apoptosis in thermally injured rats.

【Key words】 burn; ethyl pyruvate; T lymphocyte; proliferation; apoptosis

业已明确,严重烧伤后存在细胞免疫功能紊乱,淋巴细胞的增殖受抑和早期凋亡增加在其发病机制中起着重要作用,因此针对性进行干预成为预防烧伤后感染及脓毒症发生的重要措施^[1]。近期研究发现,丙酮酸乙酯(ethyl pyruvate, EP)能够抑制晚期炎症介质——高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)的释放,进而改善内毒素血症及脓毒症动物的存活率^[2],但其调节作用机制尚有待澄清。本实验拟采用大鼠烫伤延迟复苏模型,观察 EP 治疗对脾淋巴细胞增殖及凋亡情况的影响。

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(G1999054203);国家杰出青年基金项目(30125020);首都医学发展科研基金重点项目(2003-2023)

作者单位:100037 北京,解放军总医院第三、四临床部烧伤研究所基础部

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:董宁(1975-),女(汉族),陕西省西安市人,硕士研究生。

1 材料与方法

1.1 动物与模型制备:雄性清洁级 Wistar 大鼠,购自中国医学科学院实验动物研究所,体重 230~250 g,给大鼠称重、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,背部及侧胸去毛,浸于(99.0±0.5)℃沸水中 12 s,造成 30%总体表面积 III 度烫伤,涂以体积分数为 2%的碘酒抗感染(每日 2 次),伤后 6 h(延迟)腹腔注射生理盐水(40 ml/kg)或 EP 液(40 ml/kg)抗休克,麻醉苏醒后单笼饲养。

1.2 实验分组:72 只动物随机分为:(①)假烫伤组($n=24$);(②)烫伤组($n=24$),烫伤后 6 h 给予林格液(40 ml/kg)抗休克治疗,此外,在烫伤后 12、24、36 和 48 h 每次给予 3 ml 的林格液腹腔内注射;(③)EP(3.23 mg/ml)治疗组($n=24$),烫伤后 6 h 用 EP 液(40 ml/kg)抗休克治疗,此外在烫伤后 12、24、36 和 48 h 每次给予 3 ml 的 EP 液腹腔内注射。以上各实

验组动物分别在烫伤后 1、3 和 5 d 活杀。

1.3 脾淋巴细胞的分离: 无菌取动物脾脏, 置于盛有不含胎牛血清(FCS)的 RPMI-1640(5 ml)不完全培养液平皿中, 于 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经配好的无菌、无热原聚蔗糖-泛影葡胺液面上, 18~20 °C、2 500 r/min 离心 20 min, 吸取第二层云雾状的低密度细胞, 离心洗涤后去红细胞。应用单核细胞和多形核细胞黏附塑料及毛玻璃的特性, 进一步分离和纯化淋巴细胞。苔盼蓝检测分离细胞的活性大于 97%, 计数细胞, 调整细胞浓度为 5×10^6 /ml。

1.4 噻唑蓝(MTT)比色法检测脾淋巴细胞增殖反应: 用含体积分数为 20% FCS 的 RPMI-1640 培养液调整细胞浓度至 5×10^6 /ml, 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。用含有 20% FCS 的 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, 再向各孔加入 10 μ l MTT(5 mg/ml), 轻微振荡, 继续培养 4 h。加 100 μ l 曲通-异丙醇(Triton-ISOP)溶液, 37 °C 温箱过夜, 测定波长为 540 nm 处的吸光度值(A 值)。

1.5 流式细胞仪检测脾 CD3⁺CD4⁺T 细胞的凋亡: 分离脾淋巴细胞, 调节细胞浓度至 5×10^5 /ml, 用 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)0.5 ml 洗涤、离心 2 次, 弃上清, 再用 0.1 ml 的 1 \times 结合缓冲液(binding buffer)悬浮。

加入 CD3-异硫氰酸荧光素(FITC)0.2 μ l、膜联蛋白 V(Annexin-V)5 μ l、CD4-别藻蓝素(APC)0.5 μ l 和 7-氨基放射菌素 D(7-AAD)5 μ l 避光孵育 15 min, 再加入 0.4 ml 的 1 \times binding buffer。流式细胞仪检测, 所有荧光标记抗体和凋亡试剂盒均购自美国 BD Pharmingen 公司。

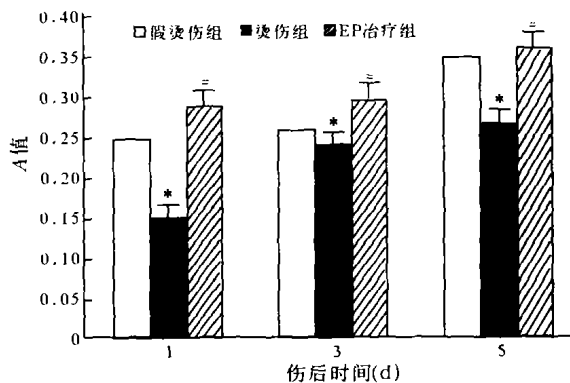
1.6 统计学处理: 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 Stata 7.0 统计软件包对数据进行 *t* 检验和方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EP 对烫伤延迟复苏大鼠脾淋巴细胞增殖的影响(图 1): 与假烫伤组比较, 烫伤组烫伤延迟复苏后 1、3、5 d 脾淋巴细胞对丝裂原刺激增殖反应显著受抑(P 均 < 0.05)。而用 EP 治疗能明显减轻烫伤后 1、3、5 d 脾淋巴细胞增殖的抑制状态(P 均 < 0.05)。

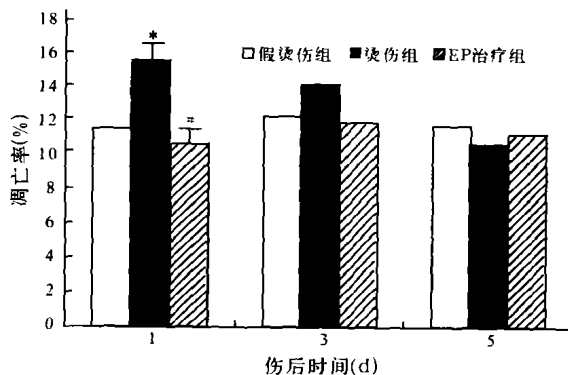
2.2 EP 对烫伤延迟复苏大鼠脾淋巴细胞凋亡的影

响(图 2, 图 3): 与假烫伤组比较, 烫伤组在烫伤延迟复苏后的第 1 d, 脾 CD3⁺CD4⁺T 细胞凋亡显著增加($P < 0.05$), 而第 3 和 5 d 差异不明显。与烫伤组比较, EP 干预能够明显减少烫伤后第 1 d 脾 CD3⁺CD4⁺T 细胞凋亡($P < 0.05$), 而伤后第 3 和 5 d 则差异无显著性。



注: 与假烫伤组比较: * $P < 0.05$; 与烫伤组比较: # $P < 0.05$

图 1 EP 对烫伤延迟复苏大鼠脾淋巴细胞增殖的影响
Figure 1 Effects of EP on splenocyte proliferation in rats with delayed resuscitation after burn injury

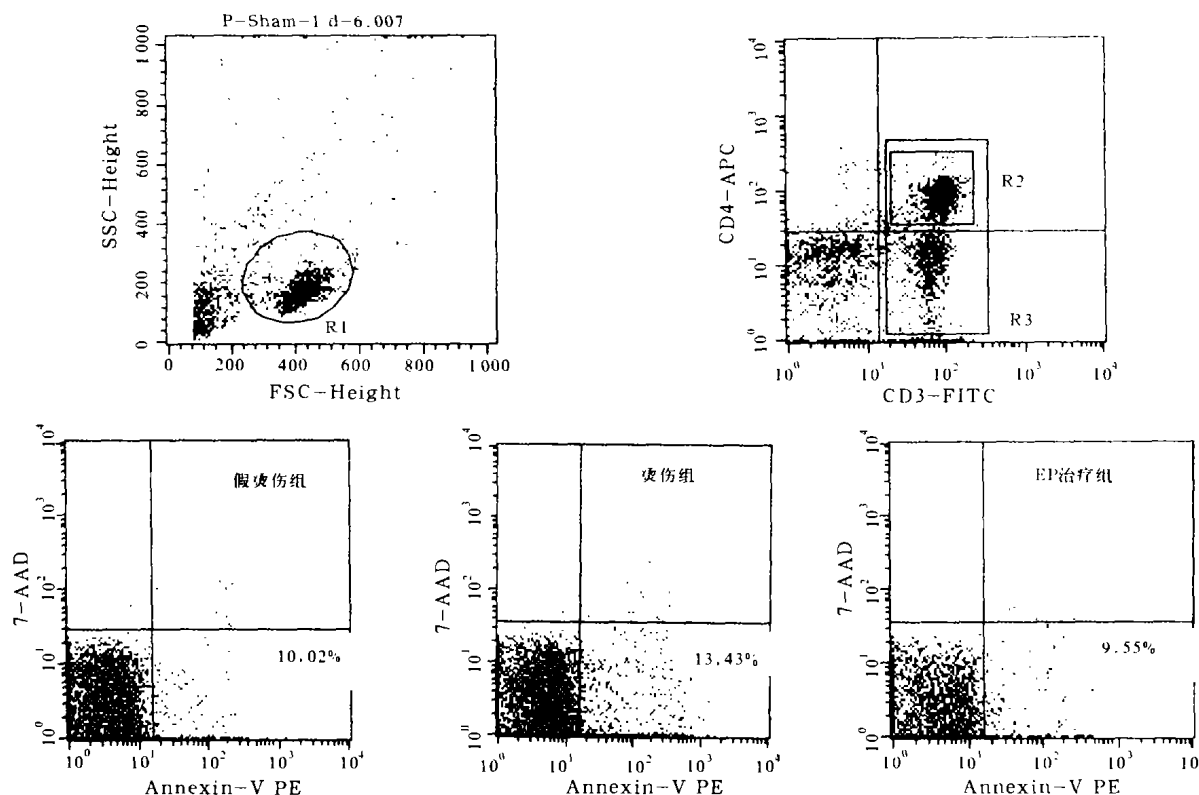


注: 与假烫伤组比较: * $P < 0.05$; 与烫伤组比较: # $P < 0.05$

图 2 EP 对烫伤延迟复苏大鼠脾 CD3⁺CD4⁺T 细胞凋亡的影响
Figure 2 Effects of EP on apoptosis of CD3⁺CD4⁺T lymphocytes in rats with delayed resuscitation after burn injury

3 讨论

脓毒症的发生与严重创、烧伤后细胞免疫功能紊乱密切相关。业已明确, T 细胞增殖受抑使免疫系统不能维持正常的免疫应答^[1,3]。在脓毒症的发展过程中, 淋巴细胞凋亡不仅表现为一种病理现象, 同时也被认为是诱导免疫抑制的重要原因^[4]。本实验采用标记有特异荧光的 4 种抗体检测脾淋巴细胞的凋亡情况, 探讨 EP 处理对烫伤大鼠免疫功能的影响。结果显示, 烫伤延迟复苏后 1~5 d, 脾淋巴细胞对丝裂原刺激的增殖反应持续受抑制, 表明机体细胞免疫功能严重障碍。与此同时, 在烫伤延迟复苏早期, 脾 CD3⁺CD4⁺T 细胞的凋亡亦明显增加。凋亡被认为是机体对严重创伤所诱发促炎状态的一种负向调



注:R1 为根据前相角和侧相角圈定的脾淋巴细胞群;R2、R3 为根据 CD3-FITC 和 CD4-APC 所圈定的 CD3⁺CD4⁺T 细胞和 CD3⁺T 细胞;不同组别的凋亡图示全部为对 R2 群细胞的分析

图 3 不同组别淋巴细胞凋亡流式图比较

Figure 3 Comparison of apoptosis of lymphocytes among different groups

节,早期过度的 T 细胞凋亡是诱发免疫功能失调的重要因素。据报道,细胞凋亡可诱导细胞免疫功能抑制,促使 T 细胞的极性分化,并且能够明显降低单核细胞的活性。新近研究证实, HMGB1 作为一种晚期炎症介质介导了脓毒症的致死效应。本课题组前期的研究分别采用不同的烧伤或脓毒症模型,观察到 HMGB1 在多种组织中均呈现延迟、高表达效应;并发现 HMGB1 与体内促炎/抑炎细胞因子比例的失调、烧伤后免疫功能紊乱有关^[5,6];同时体外预试验还发现, HMGB1 能显著影响脾淋巴细胞增殖功能。本资料证实,严重烧伤后应用 EP 液延迟复苏能明显改善动物的免疫功能,具体表现为:①显著提高烧伤延迟复苏动物脾淋巴细胞对丝裂原刺激的增殖反应能力;②明显减少烧伤延迟复苏大鼠早期脾 CD3⁺CD4⁺T 细胞的凋亡。因此可以认为,严重烧伤后在发生细菌入侵的情况下,机体能够产生足够有效的淋巴细胞克隆,这对于防止脓毒症的发生、发展具有重要意义。

研究证实,EP 能抑制内毒素刺激鼠巨噬细胞释放 HMGB1,降低失血性休克、脓毒症、缺血-再灌注

动物死亡率^[2,7]。据报道,EP 通过降解谷胱甘肽成为谷胱甘肽的二硫化物,使细胞内氧化-还原状态改变,抑制核转录因子- κ B 活性,最终抑制促炎介质的产生^[8]。此外,体内氧自由基产生过多时能明显抑制脾淋巴细胞增殖,且可诱导淋巴细胞凋亡,EP 也可能通过中和氧自由基而使淋巴细胞的增殖抑制及过度凋亡得以缓解。本研究进一步证实,EP 对严重烧伤延迟复苏动物具有明显的保护作用,可能通过减少 HMGB1 释放,使 T 细胞的过度凋亡和增殖受抑状态得以明显改善。EP 作为一种高效、安全的复苏液,在多种急重症动物模型中均显示有益作用^[9],但对其确切临床应用效果仍有待进一步探讨。

参考文献:

- 1 Yao Y M, Lu L R, Yu Y, et al. Influence of selective decontamination of the digestive tract on cell-mediated immune function and bacteria/endotoxin translocation in thermally injured rats [J]. J Trauma, 1997, 42: 1073 - 1079.
- 2 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.
- 3 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.

- 4 Hotchkiss R S, Karl I E. The pathophysiology and treatment of sepsis[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348: 138 - 150.
- 5 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.
- 6 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.
- 7 Yang H, Ochani M, Li J, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high - mobility group box 1[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 296 - 301.
- 8 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.
- 9 Sama A E, D'Amore J, Ward M F, et al. Bench to bedside: HMGB1 - a novel proinflammatory cytokine and potential therapeutic target for septic patients in the emergency department[J]. *Acad Emerg Med*, 2004, 11: 867 - 873.

(收稿日期: 2005 - 04 - 07 修回日期: 2005 - 05 - 21)

(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

血液净化抢救重度急性中毒患者 36 例

孙玉汾

【关键词】 血液净化; 中毒; 抢救

用血液灌流(HP)和连续性静-静脉血液滤过(CVVH)技术抢救各种重度急性中毒患者 36 例, 总结如下。

1 临床资料

1.1 病例: 36 例患者中男 17 例, 女 19 例; 年龄 16~76 岁, 平均 36.2 岁; 有机磷农药中毒 14 例, 安眠药中毒 12 例, 毒鼠药中毒 8 例(其中毒鼠强中毒 2 例), 百草枯中毒 2 例。入院时昏迷 27 例次, 嗜睡 3 例次, 休克 18 例次, 呼吸衰竭(呼衰) 11 例次, 抽搐 6 例次。全部患者入院 24 h 内最差的情况按照急性生理学及慢性健康状况 I (APACHE I)^[1] 评分, 36 例评分 21~38 分, 平均 26.4 分。全部患者均合并 2 个以上器官功能障碍, 其中急性肾功能衰竭(ARF) 6 例; 按多器官功能障碍综合征(MODS) 评分标准^[2] 评为 9~22 分, 平均 12.3 分。

1.2 治疗方法: 常规给予彻底洗胃、催吐、导泻、利尿、补液、解毒剂, 如有休克、呼衰, 给予纠正休克、气管插管、呼吸机辅助通气。治疗中进行心电、血压和血氧监测。采用日本产 NIKKISO DKP - 22 型血泵机行 HP, 灌流器采用瑞典金宝 Adsorba 300 活性炭和珠海丽珠 HA 型吸附树脂。14 例有机磷农药中毒者中, 8 例用活性炭, 6 例用树脂; 12 例安眠药中毒者中, 10 例用活性炭, 2 例用树脂; 8 例毒鼠药中毒者中, 5 例用活性炭,

3 例用树脂; 2 例百草枯中毒者全部用活性炭。CVVH 采用瑞典金宝 Prisma 血滤机, 滤器采用金宝 M60 型血液灌流器, 置换液参考季大玺推荐的碳酸氢盐方法配制^[3]。

1.3 结果: 36 例患者共进行 41 次 HP, 其中 5 例进行 2 次, 6 例因出现 ARF 同时行 CVVH; HP 开始治疗时间为 5~30 h, 平均 15 h; 治愈组为 2~12 h; 平均 10 h; 救治成功 29 例(占 80.56%), 死亡 7 例(占 19.44%)。其中 4 例死于循环衰竭, 3 例死于呼衰; 死于有机磷农药中毒 5 例, 百草枯中毒 1 例, 毒鼠强中毒 1 例; 死亡组 HP 治疗中死亡 2 例, 灌流后 1 h 内死亡 3 例, 5 h 内死亡 2 例。治疗过程中出现低血压 16 例, 灌流器堵塞 5 例, 无一例出血。CVVH 治疗 6 例无死亡, 治疗时间 52~95 h, 平均 74 h。

2 讨论

本组患者为各种药物和毒物重度中毒, 入院时症状重, APACHE I 评分均值 > 25 分, MODS 评分均值 > 10 分。有报道, MODS 分值 9~12 分时病死率达 25%, 而两个器官衰竭时病死率高达 60%^[1,2]。本组应用 HP 或加用 CVVH 救治, 成功率达 80.56%, 证明此法疗效良好。目前临床主要用 HP 抢救药物和毒物中毒, 清除效率大于血液透析(HD)和腹膜透析^[4,5]。但 HP 对尿素清除率很差, 对电解质、酸碱平衡紊乱和水负荷亦无作用^[6]。CVVH 则可清除血中炎性介质、尿素和过多水分, 纠正电解质和酸碱平衡紊乱, HP 和 CVVH 联用可起到取

长补短的作用。有学者亦认为各种急性药物中毒选择 HP 效果优于 HD, 如伴 MODS, 选择 HP + CVVH 或 HP + HD 效果更佳^[5]。本组 8 例毒鼠药中毒者中, 3 例用树脂均有效, 用活性炭 5 例中死亡 1 例; 12 例安眠药中毒, 经联用活性炭和树脂进行 HP, 全部抢救成功。多数有机磷农药是脂溶性很强的化合物, 根据灌流器的特点, 树脂效果要比活性炭好^[6]。本组死亡 5 例全部用活性炭灌流, 应用树脂灌流的 9 例全部抢救成功。

参考文献:

- 1 Knaus W A, Draper E A, Wagner D P, et al. APACHE I: a severity of disease classification system[J]. *Crit Care Med*, 1985, 13: 818 - 829.
- 2 Marshall J C, Cook D J, Christou N V, et al. Multiple organ dysfunction score: reliable descriptor of a complex clinical outcome [J]. *Crit Care Med*, 1995, 23: 1638 - 1652.
- 3 季大玺, 谢红浪, 黎磊石, 等. 连续性肾替代疗法在重症急性肾功能衰竭治疗中的应用 [J]. *中华内科杂志*, 1999, 38: 802 - 805.
- 4 何长民. 肾脏替代治疗学 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1999. 193.
- 5 赵华, 徐文达. 连续性血液净化技术在治疗危重病中的体会 [J]. *中国危重病急救医学*, 2004, 16: 698.
- 6 武维恒, 王少卿, 谭运标, 等. 急性中毒诊疗手册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 187 - 188.

(收稿日期: 2005 - 03 - 30)

(本文编辑: 李银平)

作者单位: 529020 广东省江门市人民医院 ICU

作者简介: 孙玉汾 (1950 -), 女 (汉族), 北京市人, 副主任医师。