

• 论著 •

持续高流量血液滤过对重症急性胰腺炎猪炎症反应的影响

燕晓雯 李维勤 王浩 张震环 黎介寿 李宁

【摘要】 目的 探讨高流量持续血液滤过对重症急性胰腺炎(SAP)时炎症反应的影响。方法 采用胰管内高压注射牛磺胆酸钠和胰蛋白酶的方法诱导猪 SAP 模型。将 SAP 模型动物随机分为 3 组,每组 8 只;对照组只行常规支持治疗;低流量持续性静-静脉血液滤过(CVVH)组除常规支持治疗外,模型诱导成功后立即行低流量($20 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) CVVH;高流量 CVVH 组模型诱导成功后立即行高流量($100 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) CVVH 以及常规支持治疗。于 SAP 诱导前和诱导成功后 6、12、24 和 36 h 间断测定血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)和 IL-10 含量,于 SAP 诱导后 6、12 和 24 h 测定外周血中单核细胞核转录因子- κ B(NF- κ B)活性。结果 对照组平均生存时间为 41 h,低流量 CVVH 组平均生存时间为 50 h,高流量 CVVH 组平均生存时间为 65 h。早期行 CVVH 治疗动物生存时间均显著高于对照组($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$),高流量 CVVH 组的生存时间明显高于低流量 CVVH 组($P < 0.05$)。CVVH 治疗后 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 均较对照组显著降低,高流量 CVVH 组的 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 含量均显著低于低流量 CVVH 组。两个 CVVH 组动物的外周血单核细胞 NF- κ B 活性在 6、12 和 24 h 均显著低于对照组,高流量 CVVH 组更低。结论 早期 CVVH 能改善 SAP 猪过度的炎症反应,明显延长生存时间,改善预后,而且高流量 CVVH 的效果明显优于低流量 CVVH。

【关键词】 持续高流量血液滤过; 胰腺炎,急性,重症; 细胞因子; 核转录因子- κ B; 猪

Effects of high - volume continuous hemofiltration on inflammatory reaction in experimental porcine pancreatitis in pig YAN Xiao - wen, LI Wei - qin, WANG Hao, ZHANG Zhen - huan, LI Jie - shou, LI Ning. Surgical Intensive Care Unit, Research Institute of General Surgery, Jinling Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210002, Jiangsu, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of high - volume continuous hemofiltration on the inflammatory reaction in experimental severe acute pancreatitis (SAP). **Methods** SAP was reproduced in pigs by intraductal injection of sodium taurocholate and trypsin, and they were randomly divided into three groups. Control group consisted of animals with SAP running its spontaneous course. Low - volume continuous venovenous hemofiltration (CVVH) group animals received a low volume ($20 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) CVVH, and high - volume CVVH group animals received a high volume ($100 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) CVVH both started at the onset of SAP. Vital signs were monitored. The serum concentrations of tumor necrosis factor - α (TNF - α), interleukin - 6 (IL - 6), IL - 10, and activated nuclear factor - κ B (NF - κ B) levels of peripheral blood mononuclear cell were determined at 0, 6, 12, 24, and 36 hours after the onset of SAP. **Results** The median survival time of control, low - volume and high - volume CVVH groups was respectively 41 hours, 50 hours and 65 hours. Survival time of the latter two groups was significantly higher than that in control group ($P < 0.05$ and $P < 0.01$), and the survival time of animals in high - volume CVVH group was significantly higher than low - volume CVVH ($P < 0.05$). In the high - volume CVVH group, plasma contents of TNF - α , IL - 6 and IL - 10 were lower significantly than in the low - volume CVVH and control groups from the beginning to the end of the experiment. In high - volume CVVH group, the expressions of NF - κ B activation at 6, 12 and 24 hours were lower than those in the control and low - volume CVVH groups respectively. **Conclusion** Early CVVH can blunt the excessive inflammatory reaction in experiment porcine pancreatitis in pigs, obviously prolong survival time, and improve prognosis. High - volume CVVH is significantly efficacious compared with low - volume CVVH in these respects.

【Key words】 high - volume continuous hemofiltration; severe acute pancreatitis; cytokine; nuclear factor - κ B; pig

基金项目:江苏省社会发展基金资助项目(BS2000051)

作者单位:210002 南京大学医学院临床医院(南京军区南京总医院)普通外科研究所 ICU

作者简介:燕晓雯(1978-),女(汉族),山东青岛人,博士研究生,医师,主要从事外科危重病的研究(E-mail:yan_xiaowen@yahoo.com.cn)。

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)发病急,病情进展迅速,病死率高达 30%^[1]。全身炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能障碍综合征(MODS)以及胰腺坏死引起的感染是 SAP 患者的主要死因。炎性介质释放被认为是引起 SAP 病程中 SIRS 相关肺、心血管和肾功能障碍的主要发

病机制。研究显示,血液滤过能清除多种血液中游离的促炎和抗炎细胞因子^[2]。但严重感染患者外周循环血中有大量的游离炎性介质,低强度血液滤过(如滤液置换速度为 1 000 ml/h 的标准血液滤过)不能满足临床需要。因此,越来越多的研究者认为应该加大感染患者的血液净化治疗强度,但对其疗效、临床可行性和安全性尚不清楚。本研究中对 SAP 模型猪早期行持续性高流量血液滤过,探讨其对 SAP 猪炎症反应的影响。

1 材料和方法

1.1 动物模型制备:24 只家猪由本院动物实验中心提供,体重 21~30 kg。术前禁食 12 h,肌肉注射氯胺酮 10 mg/kg 和阿托品 0.06 mg/kg 诱导麻醉,硫贲妥钠 6 mg·kg⁻¹·h⁻¹ 持续静脉泵入维持麻醉。麻醉诱导成功后气管插管,呼吸机辅助呼吸。调整呼吸机各项参数以保证动脉血气指标在正常范围内。动物取仰卧位,待麻醉和机械通气指标平稳后,右颈内动脉切开置管用于采集血样和持续监测血压,膀胱穿刺置入 14F 硅胶管用于检测尿量;腹部正中切口,游离十二指肠,在十二指肠乳头处找到主胰管,插入 5 Ch 静脉导管,腹腔放置乳胶引流管,在 100 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa) 压力控制下向胰管内注射质量分数为 4% 的牛磺胆酸钠 1 ml/kg (Sigma Chemical, Germany) 和胰蛋白酶 2 U/kg (Difco Chemical, USA) 诱导 SAP 后逐层缝合关腹。

1.2 血液滤过治疗方法:采用持续性静-静脉血液滤过(CVVH)方法,由两腔导管(Arrow Company, USA)插入左侧颈内静脉建立血管通路,机器为连续运转性血泵(Baxter BM25, Germany),滤器为聚丙烯腈膜(1.2 m², AN69, Hospal, France),置换液为改良 Port 配方^[3],以前稀释法输入,液体平衡为机器零平衡,血流量为 80 ml/min,根据需要调整置换液速度。治疗开始时一次性静脉注射 100 U/kg 低分子肝素以防止滤器凝血,然后在体外循环管路动脉端以 8 U·kg⁻¹·h⁻¹ 的速度持续加用肝素。24 h 更换 1 次滤器。

1.3 动物分组:SAP 模型诱导成功后将实验动物按随机数字表法分为 3 组:对照组、低流量 CVVH 组和高流量 CVVH 组,每组 8 只。对照组除液体复苏、机械通气、腹腔引流等基本支持治疗外,不给任何特殊治疗。低流量和高流量 CVVH 组在 SAP 诱导成功后立即行低流量(20 ml·kg⁻¹·h⁻¹)或高流量(100 ml·kg⁻¹·h⁻¹)CVVH 治疗。实验过程中,所有动物以 5 ml·kg⁻¹·h⁻¹ 的速度同时静脉滴注

生理盐水和质量分数为 5% 的葡萄糖。

1.4 指标检测

1.4.1 观察各组动物 72 h 内的生存时间。

1.4.2 血浆细胞因子测定:于 SAP 诱导前及诱导成功后 6、12、24 和 36 h 采集静脉血,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝,离心半径为 20 cm,以 1 500 r/min 离心 10 min;血浆置-70℃冰箱保存。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)和 IL-10 含量采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定,猪细胞因子试剂盒由美国 R&D 公司提供。

1.4.3 单核细胞核转录因子- κ B(NF- κ B)活性测定:于 SAP 诱导成功后 6、12 和 24 h 经中心静脉取血,采用 EDTA 抗凝。将全血置于淋巴细胞分离液上,以 1 500 r/min 离心 30 min,离心半径为 20 cm;收集中间层的单核细胞,使用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,以 1 500 r/min 离心 15 min,离心半径为 20 cm。使用凝胶电泳迁移率法(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)测定 NF- κ B 活性,单克隆抗体购自 Promega Madison WI。

1.5 统计学分析:平均生存时间以中位数表示,其余计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,使用 SPSS10.0 软件。生存时间曲线采用 Kaplan-Meier 分析,组间比较用 log-rank 检验,诱导后参数值与基础值比较用重复计量资料单因素方差分析,两组间比较用 *t* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高流量 CVVH 对生存时间的影响:对照组动物平均生存时间为 41 h,低流量 CVVH 组为 50 h,高流量 CVVH 组为 65 h。log-rank 检验结果显示,早期行 CVVH 治疗,无论是低流量还是高流量 CVVH,动物生存时间均显著高于对照组(*P*<0.05 和 *P*<0.01),而高流量 CVVH 组的生存时间明显高于低流量 CVVH 组(*P*<0.05)。

2.2 高流量 CVVH 对血浆细胞因子含量的影响(表 1):SAP 诱导前,各组间血浆细胞因子含量差异均无显著性(*P*均>0.05)。SAP 诱导成功后,3 组动物血浆 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 含量在早期(6 h)即显著增高。CVVH 治疗后 12 h, TNF- α 、IL-6 和 IL-10 含量均较对照组显著降低。高流量 CVVH 组 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 含量从开始至终末期均显著低于低流量 CVVH 组。

2.3 高流量 CVVH 对外周血单核细胞 NF- κ B 活性的影响(图 1):对照组外周血单核细胞 NF- κ B 活性在 SAP 诱导后 6 h 即开始升高,于 12 h 达峰值,

表 1 各组血浆 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 含量的变化($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Changes of plasma TNF- α , IL-6 and IL-10 concentrations in each group($\bar{x} \pm s, n=8$) ng/L

细胞因子	组别	诱导前	诱导后 6 h	诱导后 12 h	诱导后 24 h	诱导后 36 h
TNF- α	对照组	11.5 \pm 4.6	932.6 \pm 203.2 ^d	807.8 \pm 147.7 ^d	242.0 \pm 140.4 ^d	102.3 \pm 31.1 ^c
	低流量 CVVH 组	10.9 \pm 4.0	616.7 \pm 152.5 ^{ad}	448.3 \pm 115.7 ^{ad}	389.9 \pm 96.9 ^d	268.7 \pm 80.7 ^{ad}
	高流量 CVVH 组	11.0 \pm 3.3	227.5 \pm 110.8 ^{abd}	147.9 \pm 48.5 ^{abd}	133.9 \pm 83.0 ^{bd}	115.0 \pm 59.6 ^{bd}
IL-6	对照组	61.8 \pm 27.1	436.8 \pm 82.0 ^d	476.4 \pm 109.7 ^d	333.9 \pm 90.8 ^d	50.1 \pm 29.5 ^c
	低流量 CVVH 组	56.4 \pm 36.5	252.2 \pm 91.6 ^{ad}	244.5 \pm 94.1 ^{ad}	244.5 \pm 94.1 ^d	213.6 \pm 55.6 ^{ad}
	高流量 CVVH 组	58.2 \pm 35.9	147.1 \pm 46.3 ^{abd}	142.9 \pm 37.3 ^{abd}	132.5 \pm 47.3 ^{abd}	129.8 \pm 46.7 ^{abd}
IL-10	对照组	19.0 \pm 7.7	158.0 \pm 39.3 ^d	160.9 \pm 31.9 ^d	146.1 \pm 25.5 ^d	123.1 \pm 23.4 ^d
	低流量 CVVH 组	19.9 \pm 6.9	146.8 \pm 35.6 ^{ad}	150.4 \pm 35.0 ^{ad}	131.1 \pm 25.1 ^d	98.4 \pm 12.7 ^{ad}
	高流量 CVVH 组	18.9 \pm 10.8	114.8 \pm 14.4 ^{abd}	124.6 \pm 34.0 ^{abd}	95.2 \pm 10.2 ^{abd}	53.0 \pm 21.2 ^{abd}

注:与对照组同时时间点比较,^a $P < 0.05$;与低流量 CVVH 组比较,^b $P < 0.05$;与诱导前比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

24 h 开始明显减弱。CVVH 治疗后 NF- κ B 活性在 6、12 和 24 h 都显著低于对照组,尤其是高流量 CVVH 治疗后 NF- κ B 活性更低。

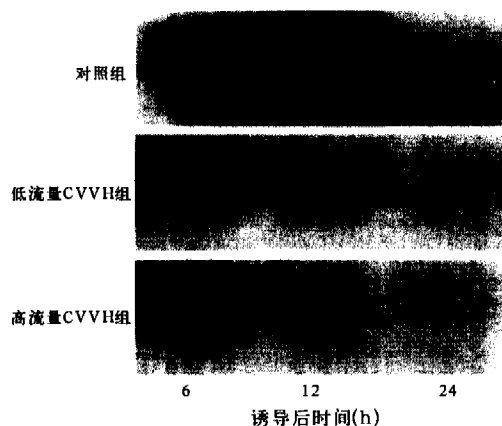


图 1 外周血中单核细胞 NF- κ B 活性变化

Figure 1 Changes of NF- κ B activity in peripheral blood mononuclear cell

3 讨论

许多促炎或抗炎介质(包括 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 和 IL-10)在 SAP 发生、发展过程中起重要的作用,其中 TNF- α 和 IL-1 更被认为是 SAP 时炎性介质级联反应中的核心因子^[4,5]。SAP 早期,大量释放的促炎因子和激活的中性粒细胞会使 SIRS 进一步发展成为 MODS,同时炎性细胞因子的“瀑布式反应”和其后续作用又增加了系统炎症的局部反应,因此,炎性介质就成为症状开始到发展为远端器官损害这段时间的治疗靶点。阻止细胞因子的网络式反应可改善 SAP 预后,降低病死率。

血液净化(如血浆置换、红细胞吸附、血液滤过)能非选择性地去除炎性细胞因子,使临床上有效的抗炎治疗成为可能。其中,血液滤过作为一项人工支持手段已证明对 SAP 诱发的组织器官损害具有保护作用^[6]。用于持续性血液滤过的聚丙烯腈膜孔径

为 30~50 ku,可去除许多分子质量小于 50 ku 的炎症介质,例如 TNF、IL-1、IL-6、可溶性 IL-2 受体(sIL-2R)、IL-8、IL-2 和 IL-10 等越来越多地用于治疗 SAP 引起的 SIRS 和 MODS。本实验结果显示,两个 CVVH 治疗组动物 SAP 诱导后 6 h 血浆 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 含量虽较诱导前有所增加,但明显低于同期未行 CVVH 的对照组,其作用机制可能主要是“峰浓度假说”(the peak concentration hypothesis),即血液滤过的对流和滤膜吸附作用抑制了炎性细胞介质的峰浓度。另外, CVVH (包括高流量 CVVH)治疗过程中动物生命体征等指标都比较稳定,说明早期应用高流量 CVVH 治疗 SAP 安全而且有效。

NF- κ B 是调节细胞因子、黏附分子及其他炎性介质的转录表达,在感染、急性呼吸窘迫综合征(ARDS)和 MODS 时起重要作用的转录因子^[7],并可能调控 SAP 的启动,触发炎症介质的瀑布样级联反应^[8,9]。Gukovsky 等^[8]研究发现,胰腺炎动物模型建立后 30 min, NF- κ B 即有强烈表达。Ethridge 等^[10]研究发现,急性胰腺炎 3~6 h NF- κ B 表达出现第 2 个高峰,指出 NF- κ B 的早期高表达在诱发急性胰腺炎的炎症反应中至关重要,它使得胰腺炎易于从局部病变发展成为 SIRS、ARDS 和 MODS。因此,抑制 NF- κ B 的激活可能是阻止 SAP 发展的重要环节^[11,12]。本研究结果表明, NF- κ B 的激活与血浆 TNF- α 等细胞因子水平的变化一致,进一步证实了 NF- κ B 活化引起炎性介质的释放,导致 SIRS 和 MODS 的发生。CVVH 组 NF- κ B 活性较对照组明显减弱,尤其在诱导后 12 h,这可能是因为 CVVH 能维持内环境稳定,保持良好的水、电解质平衡,降低体温和代谢率,从而抑制 NF- κ B 的激活,减轻 SIRS 的程度,有利于 MODS 的防治。

Rogiers 等^[13]的研究结果显示,在置换液速度

为 3 000 ml/h(相当于临床上置换液速度为 7 000~8 000 ml/h)的情况下,内毒素感染狗才能达到临床上较稳定和满意的血流动力学。Lonnemann 等^[14]证实,高流量血液滤过可通过改善和恢复巨噬细胞活性,分泌 TNF 对内毒素产生应答反应,第 1 次证实了高流量 CVVH 能改善机体细胞功能。本实验结果显示,高流量 CVVH 在清除炎性介质和改善预后等方面明显优于低流量 CVVH,与其他实验研究结果相符^[15]。在 SAP 的保守治疗中,机体免疫功能和抗生素合理应用是防止胰腺感染的两个重要因素。SAP 早期给予高流量 CVVH 可清除过度释放的炎性介质,使感染机会大大降低,而感染发生时间延迟,则提示机体免疫功能上调。此外,高流量 CVVH 还能改善肺间质水肿,改善微循环、内脏灌注和组织氧代谢,改善器官功能,如肺功能^[16]和胃肠道屏障功能^[17],在维持水、电解质、酸碱平衡以及内稳态方面起重要作用,特别是当机体肾功能受损时。

采用高流量 CVVH 治疗 SAP 还应注意:①通过持续性血液滤过,细胞因子的“瀑布效应”被早期阻断,阻止了次级趋化因子和细胞因子释放的恶性循环,因此强调早期行 CVVH。CVVH 开始得越早,患者预后越好。②SAP 合并 MODS 时,不断释放的细胞因子相互作用,产生“瀑布效应”。在 CVVH 治疗过程中,使用新滤器时细胞因子清除效果好;CVVH 后期,当滤器的吸附作用饱和时清除能力下降,因此,频繁更换滤器可增加细胞因子的清除^[18]。所以我们采用 24 h 常规更换 1 次新滤器。尽管如此,由于目前临床上采用血液滤过治疗 SAP 时间不长,其治疗机制十分复杂且尚未完全阐明,因此还不能代替其他的治疗手段。

参考文献:

- 1 崔乃强,吴威中.重症急性胰腺炎治疗的现状和展望[J].中国危重病急救医学,2004,16:705-707.
- 2 Bellomo R. Continuous hemofiltration as blood purification in sepsis[J]. New Horiz,1995,3:732-737.
- 3 季大玺,谢红浪,刘芸,等.连续性肾脏替代治疗在重症急性肾功能衰竭及多器官功能障碍综合征救治中的应用[J].中国危重病急救医学,1999,11:550-553.
- 4 王自法,潘承恩,刘绍浩.炎性介质在重症急性胰腺炎发病机制中的作用[J].中国危重病急救医学,1999,11:312-313.
- 5 邓群,黎沾良,姚咏明,等.急性坏死性胰腺炎早期血清细胞因子的变化及免疫干预的影响[J].中国危重病急救医学,1999,11:358-360.
- 6 杨朝晖,杨军,汪勇俊.连续性血液滤过对重症急性胰腺炎诱导组织器官损害的保护作用[J].中国危重病急救医学,2004,16:232-234.
- 7 Abraham E. NF- κ B activation[J]. Crit Care Med,2000,28(Suppl):N100-N104.
- 8 Gukovsky I, Gukovskaya A S, Blinman T A, et al. Early NF kappaB activation is associated with hormone-induced pancreatitis[J]. Am J Physiol,1998,275:1402-1414.
- 9 刘牧林,刘瑞林,马良龙.核转录因子- κ B 在大鼠急性胰腺炎发病机制中的作用研究[J].中国危重病急救医学,2005,17:434-435.
- 10 Ethridge R T, Hashimoto K, Dai H, et al. Selective inhibition of NF- κ B attenuates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis[J]. J Am Coll Surg,2002,195:497-505.
- 11 Dunn J A, Li C, Ha T, et al. Therapeutic modification of nuclear factor kappa B binding activity and tumor necrosis factor alpha gene expression during acute biliary pancreatitis[J]. Am Surg,1997,63:1036-1043.
- 12 Satoh A, Shimosegawa T, Fujita M, et al. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation improves the survival of rats with taurocholate pancreatitis[J]. Gut,1999,44:253-258.
- 13 Rogiers P, Zhang H, Smail N, et al. Continuous venovenous hemofiltration improves cardiac performance by mechanisms other than tumor necrosis factor-alpha attenuation during endotoxic shock[J]. Crit Care Med,1999,27:1848-1855.
- 14 Lonnemann G, Bechstein M, Linnenweber S, et al. Tumor necrosis factor-alpha during continuous high-flux hemodialysis in sepsis with acute renal failure[J]. Kidney Int Suppl,1999,72:S84-S87.
- 15 张军,陶立坚,宁建平,等.高容量血液滤过对多器官功能障碍综合征患者肿瘤坏死因子及其受体的影响[J].中国危重病急救医学,2004,16:81-84.
- 16 Ullrich R, Roeder G, Lorber C, et al. Continuous venovenous hemofiltration improves arterial oxygenation in endotoxin-induced lung injury in pigs [J]. Anesthesiology, 2001, 95: 428-436.
- 17 Yekebas E F, Strate T, Zolmajd S, et al. Impact of different modalities of continuous venovenous hemofiltration on sepsis-induced alterations in experimental pancreatitis[J]. Kidney Int, 2002, 62: 1806-1818.
- 18 Yekebas E F, Treede H, Knoefel W T, et al. Influence of zero-balanced hemofiltration on the course of severe experimental pancreatitis in pigs[J]. Ann Surg,1999,229:514-522.

(收稿日期:2005-12-09 修回日期:2006-01-25)

(本文编辑:郭方)

欢迎订阅《中国危重病急救医学》杂志

中华医学会和天津市天和医院主办,全国各地邮局订阅,邮发代号:6-58

刊社地址:天津市和平区睦南道 122 号天和医院内 邮编:300050