

## 综述

## 烧伤延迟复苏后氧化应激反应与肠道细胞凋亡

马明(综述) 张诚(审校)

【关键词】 烧伤; 延迟复苏; 氧化应激反应; 凋亡

众所周知,烧伤延迟复苏由于组织器官低灌注持续时间长、机体休克程度重,是烧伤早期并发多器官功能不全的重要原因之一,若不能及时给予液体复苏治疗,患者可由于休克所致的重要脏器缺血、缺氧和功能衰竭而死亡。肠道为全身炎症反应综合征(SIRS)向多器官功能障碍综合征(MODS)和多器官功能衰竭(MOF)转化的启动器官。氧化物在正常细胞的生物反应中起重要作用,也参与许多人类疾病的病理过程。一旦氧化与抗氧化平衡状态破坏,即产生氧化应激,氧负荷增加,抗氧化物防御能力下降,导致氧化物修饰靶分子的结构和功能发生改变,从而导致细胞损伤。

## 1 氧化应激与细胞凋亡的关系

1.1 内源性活性氧(ROS)增多可导致细胞凋亡:肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )刺激 TNF 受体,可使细胞内 ROS 水平迅速升高诱导细胞凋亡,并且这种细胞凋亡能被硫氧蛋白或 N-乙酰半胱氨酸(NAC)抑制。Murakawa 等<sup>[1]</sup>从鲑鱼体内提取并纯化一种凋亡诱导蛋白(AIP)作用于哺乳类动物细胞后,发现细胞内过氧化氢( $H_2O_2$ )水平显著升高并诱导细胞快速凋亡。Woo 等<sup>[2]</sup>发现,在细胞凋亡早期 ROS(主要是  $H_2O_2$ )浓度升高和线粒体膜电位下降,随后出现天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)的激活和 DNA 断裂,同时发现 NAC 能完全抑制细胞凋亡。Latha 等<sup>[3]</sup>研究证实,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)作为体内重要的生理性还原物质,应用后脂质过氧化物的形成和氧自由基释放均减少,减轻了对组织的损害。表明内源性 ROS 生成增多可导致细胞凋亡。

## 1.2 外源性 ROS 对细胞凋亡的诱导:

作者单位:730050 甘肃兰州,兰州军区兰州总医院烧伤整形科

通讯作者:张诚,医学博士,硕士生导师,副教授,副主任医师

作者简介:马明(1980-),男(汉族),河北省人,硕士研究生,医师,Email: xmgmt2288212@sina.com.

Lennon 等<sup>[4]</sup>发现细胞死亡率随  $H_2O_2$  浓度增加而增加,两者间存在正相关。随后 Ishisaka 等<sup>[5]</sup>在  $H_2O_2$ (10~50  $\mu\text{mol/L}$ )诱导 HL-60 细胞凋亡的过程中观察到 DNA 断裂,激活线粒体释放 caspase-3 和 CytC,当  $H_2O_2$  浓度达 50  $\mu\text{mol/L}$  时,溶酶体明显不稳定,因此 Ishisaka 提出  $H_2O_2$  是一种细胞凋亡介质。此外氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)亦能诱导淋巴细胞发生凋亡。

## 1.3 氧化应激诱导细胞凋亡分子机制

1.3.1 ROS 活化核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)并诱导 NF- $\kappa$ B 表达: NF- $\kappa$ B 在正常细胞中与其抑制蛋白(I $\kappa$ B)结合而处于失活状态,许多刺激因素如干扰素(IFN)、脂多糖(LPS)、白细胞介素-1(IL-1)、紫外线、病毒等都可诱导 I $\kappa$ B 磷酸化而使 NF- $\kappa$ B 活化。NF- $\kappa$ B 的激活通常是由氧化应激引起的,因为 ROS 可促进蛋白激酶 C(PKC)的激活,活化的 PKC 磷酸化 I $\kappa$ B,导致后者与 NF- $\kappa$ B 分离而使 NF- $\kappa$ B 活化。Angkeow 等<sup>[6]</sup>认为,细胞外的氧化刺激可激活细胞膜上 Rac1 调控的还原型辅酶 I / II 氧化酶,后者促使细胞质中的 ROS 水平增高<sup>[7]</sup>,ROS 可直接激活 NF- $\kappa$ B,也可以通过氧化还原因子-1(Ref-1)或其他途径间接使 NF- $\kappa$ B 活化,如通过调节 I $\kappa$ B 激酶的活性及影响 NF- $\kappa$ B 与 I $\kappa$ B 亲和力的方式来调节 NF- $\kappa$ B 的活性。

1.3.2 ROS 损伤 DNA,激活 P53 诱导细胞凋亡:有研究认为<sup>[6,8]</sup>:ROS 可直接损伤 DNA,因为 ROS 的中间产物自由基可直接作用于核酸,引起碱基的修饰和 DNA 链断裂,导致聚 ADP 核酸转移酶的活化以及 P53 的积累,从而导致细胞凋亡。DNA 断裂损伤可以激活 DNA 依赖性的蛋白激酶(DNA-PK)和突变后患运动失调性毛细血管扩张症的基因表达蛋白分子(是一种丝氨酸、苏氨酸蛋白激酶),两种酶皆催化 c-Abl(一种酪氨酸蛋白激酶)S465 磷酸化激活,后者再结合 P53 加强其稳定。许多凋亡因子基

因启动子都存在 P53 反应元件(P53 responsive element,PRE),结合 P53 后被激活转录表达,如促使 Fas、FasL、凋亡激活因子-1(Apaf-1)、DR5 和 Bax 等表达增高,而对 bcl-2 基因则抑制其表达;同时 P53 还促进内质网释放 TNF- $\alpha$  和 Fas,也能与 DNA 复制蛋白 A(RPA)结合,阻止 DNA 复制,上述效应最终激活 caspase-3,6,7,从而促进细胞凋亡。

1.3.3 ROS 激活应激活化的蛋白激酶(SAPK)通路,介导细胞凋亡:丝裂原活化的蛋白激酶(MAPKs)信号通路包括 3 个主要的蛋白磷酸化级联,即细胞外信号转导蛋白激酶(ERKs)、C-Jun N-末端激酶(JNKs)和 P38-MAPKs,后者可被多种应激原激活,故也称 SAPKs。在静止细胞中,JNK 与 P38 定位于细胞质与细胞核,一旦被激活,细胞质中的 JNK 与 P38 转位到细胞核,磷酸化修饰转录因子 ATF-2 和 E1K-1,促进相关基因转录、表达,同时 JNK 与 P38 还磷酸化激活 MAPK 激活蛋白激酶 2 与 3(MAPKAPK2,3),进而对低分子质量的热休克蛋白(HSP)磷酸化,HSP 能易化激活 caspase,导致细胞凋亡。

1.3.4 线粒体介导细胞凋亡:研究表明,ROS 的增加可直接或间接损伤线粒体膜,造成膜电位下降,而线粒体膜电位下降可导致膜通透性增高,使线粒体膜间腔的 CytC 释放入胞质,与 Apaf-1 及 caspase-9 前体形成凋亡小体(apoptosome),在 ATP 参与下,凋亡小体内的 caspase-9 前体可自身激活,形成有活性的 caspase-9,进一步激活 caspase-3,6,7 等<sup>[9-10]</sup>。活化的 caspase 可进一步导致线粒体膜破裂,致使线粒体进一步释放其他一些 caspases 及激活因子。Caspase-3,6,7 被激活后,可催化靶底物分裂,如分裂 DNA 片段化因子 45(DFF45)释放出具有活性的 DFF40,后者进入核内使 DNA 有序片段化;分裂聚 ADP 核糖聚合酶(PARP)和复制因子 C 大亚基(RFC140)引起 DNA 修复和复制障碍,

导致细胞凋亡。

## 2 烧伤与氧化应激

有证据表明,体表烧伤后早期,肺、肝、肾等组织中有中性粒细胞(PMN)大量积聚,脂质过氧化作用增加。这种远隔器官的损伤与血管内补体被激活,刺激PMN产生ROS代谢产物有关<sup>[11]</sup>。

烧伤所致氧化应激的原因有:①热力所致的细胞直接损伤;细胞破裂死亡后催化过渡金属离子如 $Fe^{2+}$ 释放,同时激活环氧合酶和脂氧合酶,使周围组织的脂质过氧化作用增加,使膜的液态性和流动性减弱,通透性增强,细胞外 $Ca^{2+}$ 内流增加导致细胞死亡。由于脂质过氧化物的终产物丙二醛(MDA)具有易检测和高敏感性,已成为研究氧化应激最常用的标志物。②烧伤后的低血流状态可以激活白细胞,血管内皮黏附分子增加,通过黄嘌呤氧化酶产生的ROS使血管通透性增加、毛细血管漏,进而导致全身炎症反应的发生,引发全身组织氧化应激。③羟自由基产生并释放的次氯酸(HOCl)、一氧化氮(NO)能与 $O_2^-$ 作用形成强活性的羟基(OH $^-$ )<sup>[12]</sup>。尤其是羟自由基可导致细胞内游离钙增加,后者使微粒体上的脂加酶及环加酶被激活,通过花生四烯酸代谢形成具有高度生物活性的物质,如前列腺素、血栓素、白细胞三烯等。伤后应用大剂量维生素C能减轻脂质过氧化作用,降低血管通透性和组织水肿,由此减少严重烧伤患者的复苏补液量<sup>[13]</sup>。

## 3 烧伤后延迟复苏与淋巴细胞凋亡

细胞凋亡是机体的一种生理机制,在维护机体内环境稳定方面发挥着极为重要的作用,细胞凋亡过高或过低都会对机体产生不利的影响。在烧伤研究中发现烧伤引发的细胞凋亡是机体常见现象,而且往往发生得很早,淋巴器官、淋巴组织最易发生。宋屹娜等<sup>[13]</sup>实验证实,主要在烧伤后6h和12h出现胸腺细胞、脾白髓、淋巴结的副皮质区T淋巴细胞凋亡。烧伤引发的以T淋巴细胞为主的细胞凋亡,可能是氧化应激后细胞介导免疫功能障碍的直接原因。

张诚等<sup>[14-18]</sup>认为严重烧伤后,由于应激反应、炎症细胞因子表达失衡和肠道缺血/再灌注损伤等原因引起的肠相关淋巴组织(GALT)病理性细胞凋亡,将导致肠道免疫屏障的严重损害,促进肠道内毒素和细菌移位,在MODS的发

生发展中起重要作用。大鼠烫伤后,无论立即或延迟复苏,均可导致Peyer结节萎缩,Peyer结淋巴细胞(PPL)、肠上皮间质淋巴细胞(IEL)和肠固有层淋巴细胞(LPL)大量凋亡而使肠道淋巴细胞数量显著减少,肠道内容物sIgA含量显著下降,同时伴有肠道内毒素和肠系膜淋巴结(MLN)细菌移位量的显著增高。

## 4 烧伤延迟复苏后氧化应激与肠道细胞凋亡

张诚等<sup>[19]</sup>认为烫伤后组织氧自由基增加是细胞凋亡的重要原因,抗氧化剂能够显著降低烫伤后肠黏膜上皮的凋亡率。研究结果表明肠黏膜的凋亡率与肠黏膜组织MDA、肠黏膜黄嘌呤氧化酶含量的增高呈正相关,而非蛋白巯基(NPSH)变化呈负相关,说明烫伤后肠黏膜组织氧化应激是其凋亡加重的重要原因之一。抗氧化剂NAC可有效降低肠黏膜的凋亡率,提示自由基损害与凋亡关系密切;别嘌呤醇对伤后肠黏膜损害有一定的保护作用,但未能有效降低其凋亡率。

## 5 结论与展望

伤后组织病理情况下氧负荷增加,机体抗氧化能力下降,就产生了氧化应激反应。烧伤后的氧化应激使体内氧自由基产生增多,机体抗氧化能力下降所引起的脂质过氧化、蛋白氧化、DNA损伤而造成严重的器官、组织、细胞损害,是造成大面积烧伤患者多器官功能不全甚至衰竭的机制之一,后者是导致烧伤患者死亡的首要原因。因此,烧伤后氧化应激引起细胞凋亡是当今研究的热点,但是烧伤后氧化应激对肠屏障功能的影响尤其是肠免疫屏障的影响,烧伤后氧化应激是否直接引起肠道淋巴细胞凋亡,这些方面我们还知之甚少,尚有许多问题需要进一步探讨。

## 参考文献

- [1] Murakawa M, Jung S K, Lijima K, et al. Apoptosis-inducing protein, AIP, from parasite-infected fish induces apoptosis in mammalian cells by two different molecular mechanisms[J]. Cell Death Differ, 2001, 8(3):298-307.
- [2] Woo S H, Park I C, Park M J, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis through a reactive oxygen species-dependent pathway and loss of mitochondrial membrane potential in

- HeLa cells[J]. Int J Oncol, 2002, 21(1):57-63.
- [3] Latha B, Ramakrishnan M, Jayaraman V, et al. The efficacy of trypsin: chymotrypsin preparation in the reduction of oxidative damage during burn injury[J]. Burns, 1998, 24(6):532-538.
- [4] Lennon S V, Martin S J, Cotter T G. Does-dependent induction of apoptosis in human tumour or cell lines by widely diverging stimuli[J]. Cell Prolif, 1991, 24(2):203-214.
- [5] Ishisaka R, Utsumi K, Utsumi T. Involvement of lysosomal cysteine proteases in hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL-60 cells[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2002, 66(9):1865-1872.
- [6] Angkeow P, Deshpande S S, Qi B, et al. Redox factor-1, an extra-nuclear role in the regulation of endothelial oxidative stress and apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2002, 9(7):717-725.
- [7] Deshpande S S, Angkeow P, Huang J, et al. Rac1 inhibits TNF-alpha induced endothelial cell apoptosis; dual regulation by reactive oxygen species[J]. FASEB J, 2000, 14(12):1705-1714.
- [8] Trinei M, Giorgio M, Cicalese A, et al. A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis[J]. Oncogene, 2002, 21(24):3872-3878.
- [9] Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo[J]. J Exp Med, 1995, 181(5):1661-1672.
- [10] Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria[J]? Trends Cell Biol, 1998, 8(7):267-271.
- [11] Tadros T, Traber D L, Hegggers J P, et al. Angiotensin I inhibitor DuP753 attenuates burn- and endotoxin-induced gut ischemia, lipid peroxidation, mucosal permeability, and bacterial translocation[J]. Ann Surg, 2000, 231(4):566-576.
- [12] Tanaka H, Matsuda T, Miyagantani Y, et al. Reduction of resuscitation fluid volumes in severely burned patients using ascorbic acid administration: a randomized, prospective study[J]. Arch Surg, 2000, 135(3):326-331.

- [13] 宋屿娜, 林忠清, 林海, 等. 大鼠严重烫伤淋巴组织细胞凋亡的原位 TUNEL 及电镜观察[J]. 临床与实验病理学杂志, 2000, 16(4): 315-317.
- [14] 张诚, 盛志勇, 胡森, 等. 烫伤延迟复苏后肠上皮细胞凋亡诱导肠道内毒素和细菌移位[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(3): 150-153.
- [15] 张诚, 盛志勇, 胡森, 等. 烫伤延迟复苏后细胞凋亡对肠黏膜通透性的影响[J]. 西北国防医学杂志, 2004, 25(1): 10-12.
- [16] 张诚, 盛志勇, 于晨, 等. 延迟复苏对烫伤大鼠小肠上皮细胞凋亡及相关基因表达的影响[J]. 西北国防医学杂志, 2002, 23(2): 87-89.
- [17] 张诚, 盛志勇, 吕艺, 等. 烫伤延迟复苏后小肠固有层和上皮内淋巴细胞凋亡率及凋亡相关基因表达的变化[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(5): 284-287.
- [18] 张诚, 盛志勇, 吕艺, 等. 烫伤延迟复苏后小肠 PPL 凋亡率及凋亡相关基因表达的变化[J]. 西北国防医学杂志, 2003, 24(4): 241-243.
- [19] 张诚, 盛志勇, 柴家科, 等. 氧自由基对烫伤大鼠延迟复苏后肠上皮细胞凋亡的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(8): 488-491.

(收稿日期: 2007-12-19  
修回日期: 2008-02-21)  
(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

## 连续性血液灌流透析及激素冲击治疗百草枯中毒伴多器官功能衰竭

鲁新

【关键词】 中毒; 百草枯; 多器官功能衰竭; 血液灌流; 血液透析; 激素冲击治疗

百草枯一旦被人误服后将损害多脏器, 致死率很高, 目前无特殊治疗。我院 2000 年 1 月—2008 年 3 月收治百草枯中毒 112 例, 47 例发生多器官功能衰竭(MOF), 25 例给予血液滤过(HP)+血液透析(HD)及激素冲击治疗, 提高了临床治愈率, 报告如下。

### 1 临床资料

1.1 一般资料: 47 例患者均为急诊科抢救后住院患者, 有明确口服百草枯病史。男 20 例, 女 27 例; 年龄 15~56 岁; 口服量 10~180 ml, 服药 72 h 内就诊。

1.2 临床表现: 服药后均有消化道症状、口腔烧灼感、吞咽困难、恶心及上腹部不适。腹痛、呕吐 47 例; 黄疸 20 例, 便血 5 例; 肝功能异常、急性中毒性肝损害 47 例; 尿少 27 例, 肾区叩痛 40 例, 血尿素氮、肌酐升高 47 例; 发热 33 例, 咳嗽 37 例, 咳血 4 例, 呼吸困难、肺部干、湿啰音 36 例; 窦性心动过速、Q-T 间期延长 23 例, 心肌酶学升高 47 例; 头晕、头痛 38 例, 抽搐 4 例。按 MOF 诊断标准, 治疗组累及 4 个器官 11 例, 累及 3 个器官 12 例, 累及 2 个器官 2 例; 对照组累及 4 个器官 10 例, 累及 3 个器官 12 例。出现 MOF 时间: 对照组 1 d 9 例, 1~2 d 8 例, 3 d 5 例; 治疗组 2~3 d 2 例, 3~

5 d 16 例, 5~7 d 7 例。

### 1.3 治疗方法

1.3.1 常规治疗: 所有患者入院后常规洗胃、导泻、补液、利尿抗感染、抗氧自由基、保肝、护肾等对症治疗。

1.3.2 激素治疗: 所有患者入院后即静脉注射地塞米松 20 mg/d, 出现呼吸衰竭或 MOF 给予甲泼尼龙 0.3 g/d, 连用 3~10 d 后每 4~10 d 减 1/3 量, 逐渐过渡到口服泼尼松。激素总疗程 1.0~1.5 个月。

1.3.3 HP+HD 疗法: 应用瑞典金定 AK-200 型、AK95S 型透析机 F6 透析器、珠海丽珠生物材料有限公司的 HA 型 330 灌流器, 股静脉插管建立血管通路, 树脂罐串联于动脉端透析器前, 碳酸盐透析液, 血流量 200 ml/min, 透析液流量 500 ml/min, 肝素首剂 1.5 mg/kg, 追加 5 mg/h, 1 d 后 0.8~1.0 mg/kg。24 h 内连续灌流 10~12 h, 以后每日灌流 4~6 h, 每个树脂罐使用 2 h, MOF 患者连续灌流 4~8 d。

1.4 结果: HP+HD 及激素冲击组 25 例, 存活 16 例, 其中 4 例为 4 个脏器功能衰竭, 10 例为 3 个脏器功能衰竭, 2 例为 2 个脏器功能衰竭。存活者服药量均少于 60 ml, 就医时间在 20 h 内。对照组 22 例均死亡。

### 2 讨论

百草枯的胃肠吸收率不高, 吸收后几乎不与血浆蛋白结合, 2 h 达血浆浓度峰值, 并迅速分布到组织器官中, 15~20 h 后血浆浓度缓慢下降, 以原型从肾

脏排出。进入体内的百草枯在肺内的浓度是血液的 10~90 倍, 并在肺内产生氧自由基, 造成肺、肝、肾等全身细胞膜脂质过氧化, 破坏细胞结构, 引起 MOF, 病死率很高, 并且是引起 3 d 内早期死亡的最主要原因, 晚期肺纤维化引起呼吸衰竭而死亡<sup>[1]</sup>。百草枯吸收收入血后对组织器官产生毒性作用较晚, 如能迅速清除, 可最大限度避免组织损伤<sup>[2]</sup>。我们采用连续性血液灌流加透析, 每日应用 10 h 或更长时间, 连续 4~8 d 能有效清除已吸收收入血液及组织中的百草枯。

血液灌流还可清除分子量较大的毒素及各种炎症细胞因子, 达到尽快解除中毒症状为阻断中毒首要环节, 可提高抢救成功率<sup>[3]</sup>。HP 治疗维护患者内环境平衡, 促进肾脏功能恢复, 清除多余水分, 并能将原发病刺激产生的炎症介质排除体外, 为受损细胞的修复和再生争取时间, 二者联合应用效果显著。

### 参考文献

- [1] Koo J R, Kim J C, Yoon J W, et al. Failure of continuous venovenous hemofiltration to prevent death in paraquat poisoning [J]. Am J Kidney Dis, 2002, 39(1): 55-59.
- [2] 杜捷夫. 中毒与药物过量临床表现及救治 (Internet 网上病例讨论) [J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(7): 445-447.
- [3] 刘生. 血液灌流治疗百草枯中毒 16 例临床观察 [J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(6): 349.

(收稿日期: 2008-04-06)  
(本文编辑: 李银平)

基金项目: 吉林省吉林市科技发展计划基金资助项目(2007068)

作者单位: 132001 吉林市第二中心医院肾内科

作者简介: 鲁新(1967-), 女(满族), 吉林省人, 副主任医师。