

用 HB-H-7 树脂吸附血浆内毒素和炎症细胞因子的体外实验研究

田爽 李涛 骆力群 杜智

【摘要】 目的 通过体外实验探讨使用 HB-H-7 树脂吸附血浆内毒素及炎症细胞因子的有效性和安全性。方法 静态吸附实验:树脂与内毒素阳性患者血浆按 1:10 比例混合,置 37℃ 恒温水浴振荡 2 h。动态吸附实验:将内毒素阳性患者血浆经过装有树脂的自制灌流器中灌流 2 h。测定灌流前后血浆内毒素、炎症细胞因子、蛋白质和电解质浓度,计算吸附率。比较静态与动态不同吸附方式以及不同温度血浆灌流前后(30、60、120 min)血浆内毒素浓度的变化,并计算吸附率。结果 静态吸附实验中,用 HB-H-7 树脂吸附后,血浆内毒素和炎症细胞因子含量均显著降低(P 均 <0.05),内毒素、肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-1、6、8 的吸附率分别为 99.2%、55.0%、57.0%、75.0%、42.0%;而对蛋白质影响较小(P 均 <0.05);对电解质无明显影响(P 均 >0.05)。动态与静态血浆内毒素吸附率比较差异无统计学意义(99.8%比 99.1%, $P>0.05$),37℃ 与 25℃ 下血浆内毒素吸附率比较差异亦无统计学意义(99.8%比 99.9%, $P>0.05$)。结论 HB-H-7 树脂对内毒素及炎症细胞因子有明显吸附效果,对蛋白质影响较小,对电解质无明显影响。

【关键词】 内毒素; 炎症细胞因子; 内毒素血症; 血浆灌流; 吸附

Study on the adsorption of endotoxin and proinflammatory cytokines with HB-H-7 resin in vitro TIAN Shuang, LI Tao, LUO Li-qun, DU Zhi. Third Central Clinical Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300170, China

Corresponding author: LI Tao, Email: Litao0387@sohu.com

【Abstract】 **Objective** To study the efficacy and safety of adsorption of endotoxin and proinflammatory cytokines with HB-H-7 resin in vitro. **Methods** Static adsorption experiment: HB-H-7 resin was added into plasma of endotoxin-positive patients according to the ratio of 1:10. Then, they were put in a constant temperature water bath oscillator, and oscillated for 2 hours. Before and after the experiment, plasma endotoxin, proinflammatory cytokines, protein and electrolytes were detected, and the rate of 2-hour adsorption was calculated. The experiment was repeated 10 times. Dynamic adsorption experiment: 5 ml resin was put into a self-made perfusion unit. Endotoxin-positive patients plasma (50 ml) was perfused for 2 hours. The flow rate of plasma was controlled at 4 ml/min with the infusion pump, and the plasma endotoxin was determined at 0, 30, 60 and 120 minutes after plasma hemoperfusion, and the adsorption rates were calculated. The results were compared with static adsorption. The influence of temperature during adsorption was determined as follows. Perfusion method was similar with dynamic adsorption experiment. The perfusion units were either placed in a 37℃ water bath or 25℃ (room temperature). Then, the plasma endotoxin was measured 2 hours after plasma perfusion, and the adsorption rates were calculated. **Results** In static adsorption experiment, the plasma endotoxin and proinflammatory cytokines were significantly lower after adsorption with HB-H-7 resin adsorption (all $P<0.05$). The adsorption rates of endotoxin, tumor necrosis factor- α and interleukin-1, 6, 8 were 99.2%, 55.0%, 57.0%, 75.0%, 42.0%, respectively. Changes in protein were small (all $P<0.05$), and there was no significant change in plasma electrolytes (all $P>0.05$). Dynamic adsorption rate was higher than that of static, but the differences were not significant (99.8% vs. 99.1%, $P>0.05$). There was no statistically significant difference between difference in temperature (37℃ vs. 25℃, 99.8% vs. 99.9%, $P>0.05$). **Conclusion** HB-H-7 resin effectively adsorbs endotoxin and proinflammatory cytokines in vitro. Its adsorption rate for protein is lower, and it has no obvious effects on electrolytes.

【Key words】 endotoxin; proinflammatory cytokine; endotoxemia; hemoperfusion; adsorption

用血液灌流(HP)治疗内毒素血症可通过直接

吸附血液中的内毒素和炎症细胞因子,降低其血中浓度,既减弱了内毒素和炎症细胞因子的活性,又抑制了其他有害因子的释放,从而改善感染症状。本实验中通过观察体外 HP 过程血浆内毒素、炎症细胞因子、蛋白质及电解质的变化,检验 HB-H-7 树脂吸附内毒素、炎症细胞因子的有效性、安全性。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.03.015

基金项目:天津市医药卫生科研基金项目(03KY05)

作者单位:300170 天津医科大学三中心医院临床学院 天津市第三中心医院 天津市人工细胞重点实验室

通信作者:李涛,Email:Litao0387@sohu.com

1 材料与方法

1.1 吸附剂预处理:取 HB-H-7 吸附树脂(由天津紫波公司提供)5 ml,用 1 mol/L NaOH 浸泡 24 h,三蒸水洗涤;用 1 mol/L HCl 浸泡 24 h,三蒸水洗涤。用无水乙醇浸泡 24 h,4~6 h 更换 1 次,三蒸水洗涤;用三蒸水煮沸 1 h,洗涤,直至无溶出物。

1.2 灌流器制备:用一次性输血器、输液器及透析器管路制成微型灌流器,7.5 ml 吸附罐内装入吸附剂 5.0 ml,两端以 100 目滤网封装,加压确认无泄漏,使用前用紫外线照射灭菌及肝素钠盐水冲管。

1.3 静态吸附实验:取 HB-H-7 吸附树脂 1 ml,按 1:10 比例加入内毒素阳性患者血浆,置于 37 °C 恒温水浴振荡器中以 140 r/min 的速度振荡 2 h,测定振荡前后血浆中内毒素、炎症细胞因子、蛋白质和电解质浓度,计算 2 h 吸附率,实验重复 10 次。

吸附率 = (C₀ - C) / C₀ × 100%

式中,C₀为吸附前内毒素、蛋白质、电解质的浓度,C为吸附后内毒素、蛋白质、电解质的浓度。

1.4 动态吸附实验:取 HB-H-7 吸附树脂 5 ml 置于自制灌流器中,将内毒素阳性患者血浆 50 ml 置于瓶中,如图 1 所示连接管路,以输液泵控制血浆流速为 4 ml/min 灌流 2 h,于灌流前及灌流 30、60 和 120 min 测定血浆内毒素浓度,计算吸附率。

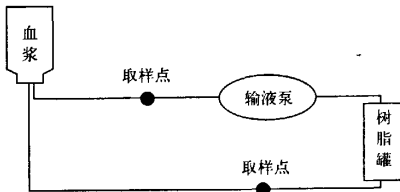


图 1 用 HB-H-7 吸附树脂动态吸附血浆内毒素的体外循环示意图

1.5 温度对 HP 影响的实验:灌流方法同动态吸附实验,但将灌流器分别置于 37 °C 水箱及 25 °C 室温中进行灌流,于灌流前和灌流 30、60、120 min 取样,测定血浆内毒素浓度,计算吸附率。

1.6 统计学处理:采用 SPSSv 13.0 软件,数据经正态检验,以均数±标准差(x±s)表示,用方差分析对数据进行方差齐性检验,方差齐者采用 t 检验,方差不齐者采用 t' 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HB-H-7 吸附剂对血浆内毒素和炎症细胞因子的影响(表 1):吸附后血浆内毒素和炎症细胞因子均较吸附前明显下降(P 均<0.05),其中,内毒素吸附率达 99.9%。

表 1 HB-H-7 吸附剂对血浆内毒素及炎症细胞因子吸附率的影响(x±s)

Table with 5 columns: 指标, 次数, 吸附前值, 吸附后值, 吸附率(%). Rows include 内毒素, TNF-α, IL-1, IL-6, and IL-8.

注:与吸附前值比较,*P<0.05

2.2 HB-H-7 吸附剂对血浆蛋白质吸附率的影响(表 2):吸附后血浆中 3 种蛋白质含量均有所下降(P 均<0.05),其中白蛋白和球蛋白的吸附率均达 14.0%。

表 2 HB-H-7 吸附剂对血浆蛋白质吸附率的影响(x±s)

Table with 5 columns: 指标, 次数, 吸附前值, 吸附后值, 吸附率(%). Rows include 总蛋白, 白蛋白, and 球蛋白.

注:与吸附前值比较,*P<0.05

2.3 HB-H-7 吸附剂对血浆电解质吸附率的影响(表 3):HB-H-7 吸附剂对血浆电解质钾、钠、氯、钙、镁和磷均无明显影响(P 均>0.05)。

表 3 HB-H-7 吸附剂对血浆电解质的影响(x±s)

Table with 5 columns: 电解质, 次数, 吸附前值, 吸附后值. Rows include 钾, 钠, 氯, 钙, 镁, and 磷.

2.4 HB-H-7 动态和静态吸附对血浆内毒素的影响(表 4):灌流后血浆内毒素浓度明显下降,60 min 后下降速度减慢。灌流结束时,动态吸附法内毒素吸附率为 99.8%(P<0.05);静态吸附法内毒素吸附率为 99.1%(P<0.05)。两种方法间比较差异无统计学意义。

表 4 HB-H-7 动态和静态吸附对血浆内毒素浓度的影响(x±s,n=10)

Table with 5 columns: 吸附状态, 灌流前, 灌流 30 min, 灌流 60 min, 灌流 120 min. Rows include 动态吸附 and 静态吸附.

注:与本吸附状态灌流前比较,*P<0.05

2.5 不同温度下吸附对血浆内毒素浓度的影响(表5):不同温度下灌流后血浆内毒素浓度均明显下降,60 min 后下降速度减慢。灌流结束时,37 ℃ 下内毒素吸附率为 99.8%,25 ℃ 下内毒素吸附率为 99.9%,与灌流前比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);不同温度间吸附率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表5 HB-H-7 在不同温度下吸附对血浆内毒素浓度的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

吸附温度	内毒素(ng/L)			
	灌流前	灌流 30 min	灌流 60 min	灌流 120 min
25 ℃ 室温	12 688±1 056	3 556±186 ^a	426±21 ^a	24±8 ^a
37 ℃ 水浴	12 688±1 056	2 786±156 ^a	335±19 ^a	13±4 ^a

注:与灌流前比较,^a $P < 0.05$

3 讨论

内毒素是存在于革兰阴性菌细胞壁外膜的脂多糖(LPS)成分,可引起机体一系列的病理生理改变,如发热、血压降低、代谢改变、局部过敏反应等^[1]。内毒素入血后,其活性成分LPS首先与脂多糖结合蛋白(LBP)形成复合物,进而与细胞表面脂多糖受体CD14分子结合,启动细胞内信号转导系统,并通过胞内信号分子传递,引起核转录因子- κ B(NF- κ B)磷酸化,NF- κ B随之由胞质移至胞核内,结合于多种炎症细胞因子基因启动区域,激活相关基因转录,翻译出有生物活性的炎症细胞因子,如TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8等^[2]。研究表明,内毒素主要是通过激活机体单核/巨噬细胞系统过度释放炎症细胞因子而发挥作用,这些炎症细胞因子对组织细胞的损害远远超过内毒素本身对机体的直接影响^[3-4]。目前,内毒素血症的药物治疗效果不理想。

HP通过直接吸附血液中内毒素和TNF- α 等致病因子,可使其浓度迅速降低^[5],既减弱了其本身的活性,又抑制了其他有害因子的释放^[6-9],而且对人体无不利影响。HP吸附材料要直接与人体血液接触,因此,理想的内毒素吸附剂不仅对内毒素的清除率高,而且应具有良好的安全性,必须符合对人体无毒、无过敏反应、化学性能稳定、机械强度高、不易破碎、不脱落颗粒、几何尺寸稳定、血液相容性良好、疗效明显及可靠的要求^[10]。

日本研究人员将多黏菌素B(PMB)涂附在血滤器中空纤维的内壁上,结果表明,PMB血液纤维吸附柱(PMX-F)可有效清除血浆内毒素,改善血流动力学,抑制IL-6及C-反应蛋白(CRP)^[11-12]。但是

PMB价格昂贵,且具有肾毒性,如果从载体上脱落则有毒副作用,不适合在国内推广^[13]。

树脂是一种球形形成交联共聚物,具有多孔、高比表面积等特征,有较好的机械强度,不脱落颗粒,在制备过程中可以人为控制其理化结构,使它对某些物质具有选择性吸附,因此在HP的应用中有极大优势。树脂分为两种,离子交换树脂具有良好的清除效果,但对电解质平衡有一定影响;大孔吸附树脂也称中性树脂,对电解质平衡无影响,但对内毒素吸附效果不佳。HB-H-7树脂是大孔高分子聚合物,属于离子交换树脂,本实验显示,至静态吸附结束,HB-H-7对血浆内毒素吸附率达99.2%,对TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8的吸附率分别达55.0%、57.0%、75.0%、42.0%,动、静态吸附间及不同温度间吸附内毒素吸附率差异均无统计学意义,表明HB-H-7树脂对内毒素及炎症细胞因子均有较好的吸附作用。HB-H-7静态吸附后,血浆蛋白质下降明显减少,至吸附结束,总蛋白、白蛋白、球蛋白分别下降了11.0%、14.0%、14.0%。而灌流对血浆电解质钾、钠、氯、钙、镁和磷均无明显影响。

综上,体外实验表明,HB-H-7树脂对内毒素及炎症细胞因子有明显吸附效果,对蛋白质影响小,对电解质无影响,符合内毒素、炎症细胞因子吸附的安全性和有效性要求,为深入研究适用于HP的高效内毒素及炎症细胞因子吸附剂提供了依据。但仍需进行体内研究,以观察其有效性及急慢性毒性反应。

参考文献

- [1] 姚咏明,陈劲松.细菌内毒素与脓毒症//姚咏明,柴家科,林洪远.现代脓毒症理论与实践.北京:科学出版社,2005:96-128.
- [2] Camerer E, Cornelissen I, Kataoka H, et al. Roles of protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia. *Blood*, 2006, 107(10):3912-3921.
- [3] Sharma R, Tepas JJ 3rd, Hudak ML, et al. Neonatal gut barrier and multiple organ failure: role of endotoxin and proinflammatory cytokines in sepsis and necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*, 2007, 42(3):454-461.
- [4] 赵世峰,沈洪.内毒素血症早期治疗的基础研究. *世界急危重病医学杂志*, 2007, 4(3):1884-1889.
- [5] 周红卫,谢恺庆,伍民生,等.血液灌流对炎症细胞因子及甲状腺素的影响. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(10):629.
- [6] Taniguchi T, Hirai F, Takemoto Y, et al. A novel adsorbent of circulating bacterial toxins and cytokines: the effect of direct hemoperfusion with CTR column for the treatment of experimental endotoxemia. *Crit Care Med*, 2006, 34(3):800-806.
- [7] Taniguchi T, Takemoto Y, Tsuda K, et al. Effects of post-treatment with direct hemoperfusion using a CTR column on mortality and inflammatory responses to endotoxin-induced shock in rats. *Blood Purif*, 2006, 24(5-6):460-464.
- [8] Tsuchida K, Yoshimura R, Nakatani T, et al. Blood purification

for critical illness, cytokines adsorption therapy. Ther Apher Dial, 2006, 10(1): 25-31.

[9] Taniguchi T, Kurita A, Mukawa C, et al. Dose-related effects of direct hemoperfusion using a cytokine adsorbent column for the treatment of experimental endotoxemia. Intensive Care Med, 2007, 33(3): 529-533.

[10] Talmadge KW, Siebert CJ. Efficient endotoxin removal with a new sanitizable affinity column; affi-prep polymyxin. J Chromatogr, 1989, 476: 175-185.

[11] Tsushima K, Kubo K, Yoshikawa S, et al. Effects of PMX-DHP treatment for patients with directly induced acute

respiratory distress syndrome. Ther Apher Dial, 2007, 11(2): 138-145.

[12] Nakamura T, Kawagoe Y, Suzuki T, et al. Polymyxin B-immobilized fiber hemoperfusion with the PMX-05R column in elderly patients suffering from septic shock. Am J Med Sci, 2007, 334(4): 244-247.

[13] 俞玫, 王慧彦, 刘涛, 等. 血液灌流用内毒素吸附材料研究. 高等学校化学学报, 2004, 25(8): 1465-1467.

(收稿日期: 2009-01-06)

(本文编辑: 李银平)

• 病例报告 •

血液灌流成功救治淡水淹溺并溶血 1 例

高友山 徐君

【关键词】 淹溺; 溶血; 血液灌流

应用血液灌流成功救治 1 例淡水淹溺并溶血患者, 现报告如下。

1 病历简介

患者男性, 20 岁, 在游泳时发生溺水, 被救时全身发绀, 意识丧失, 呼吸、心跳停止, 救生员予以胸外按压、人工呼吸等, 约 2 min 后恢复心跳及自主呼吸, 即送入当地医院抢救。其间患者出现呼吸困难, 咯粉红色痰, 并出现洗肉水样尿, 给予气管插管呼吸机辅助通气、利尿等处理后转入本院重症监护病房(ICU)。体温 37.6℃, 脉搏 123 次/min, 血压 90/50 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa), 呼吸频率 26 次/min, 浅昏迷, 双肺呼吸音粗, 可闻及湿啰音; 心律齐; 导尿管内尿液呈浓茶色。实验室检查: 尿红细胞 4 个/HP, 白细胞 6 个/HP, 尿蛋白定量 2 600 mg; 血白细胞计数 $25 \times 10^9/L$, 中性粒细胞 0.92, 血红蛋白 153 g/L, 血细胞比容 0.42, 血小板计数 $184 \times 10^9/L$; 血钾 3.07 mmol/L, 钠 126.2 mmol/L, 氯 95.2 mmol/L; 肌酐 157 $\mu\text{mol/L}$, 尿素氮 5.6 mmol/L, 肌酸激酶 2 299 U/L, 肌酸激酶同工酶 110.6 U/L; 凝血酶原时间 37.1 s, D-二聚体 $> 10 \text{ mg/L}$, 国际标准化比值 1.33; 乳酸 6.59 mmol/L; 丙氨酸转氨酶 38 U/L, 天冬氨酸转氨酶 149 U/L, 总胆红素 74.4 $\mu\text{mol/L}$, 结

合胆红素 4.8 $\mu\text{mol/L}$, 非结合胆红素 66.6 $\mu\text{mol/L}$ 。X 线胸片示双肺渗出性病变。入院后给予呼吸机辅助通气, 多巴胺维持血压, 速利尿尿、碳酸氢钠碱化尿液, 激素等处理。考虑到患者有溶血以及全身炎症反应, 使用 HA330 血液灌流器行血液灌流治疗 2.5 h, 灌流结束时尿液已转为淡黄色, 48 h 内又行血液灌流 2 次。于入院后 48 h 拔除气管插管, 患者意识清晰, 转普通病房观察, 无特殊临床表现, 出院。诊断: 淡水淹溺, 心肺复苏术后, 急性肺水肿, 溶血。

2 讨论

淡水淹溺主要病理表现为肺损伤, 由于血容量过多, 血浆胶体渗透压降低, 肺泡表面活性物质减少, 继发性引起肺毛细血管缺氧性损伤, 使其通透性增加, 导致肺毛细血管渗出血浆成分, 广泛透过肺泡膜进入细支气管肺泡及间质内, 形成肺水肿。患者心肺复苏成功后及时给予呼吸机辅助通气, 对维持呼吸功能, 减轻肺损伤起到了积极的作用。此外, 因淡水大量吸收进入循环后导致低渗, 发生不同程度的溶血, 导致高钾血症和游离血红蛋白升高, 进而引起心脏停搏以及急性肾小管坏死^[1-2]。刘海峰等^[3]观察到淡水淹溺患者急性肾功能衰竭的发生率为 22%。治疗上除了给予速利尿尿、碳酸氢钠碱化尿液外, 及时给予血液灌流治疗, 可以清除血浆中的游离血红蛋白。动物实验表明, 海水浸泡组的急性肺损伤明显重于生理盐水浸泡组, 表现为严重的低氧血症和高碳酸血症、肺组织

含水量明显增加, 伤后血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 均明显升高^[4]; 另有研究证明, TNF- α 、IL- β 、IL-6、IL-8 等细胞因子的释放在溶血发病机制中起重要作用^[5-6]; 而中性大孔树脂吸附剂对 TNF- α 、IL- β 、IL-6 等大分子物质具有较好的清除能力^[7]。患者在进行血液灌流后, 在短时间内血蛋白尿消失, 可见血液灌流不失为有效治疗淹溺并溶血的一种新方式。

参考文献

[1] Bierens JJ, Knape JT, Gelissen HP. Drowning. Curr Opin Crit Care, 2002, 8(6): 578-586.

[2] Harries M. Near Drowning. BMJ, 2003, 327(7427): 1336-1338.

[3] 刘海峰, 卢中秋, 彭武建, 等. 淡水近乎淹溺 23 例救治体会. 实用医学杂志, 2007, 23(21): 3398-3399.

[4] 李辉, 鹿尔驯, 虞积耀, 等. 胸部开放伤海水浸泡致急性肺损伤的实验研究. 中国危重病急救医学, 2000, 12(10): 598-601.

[5] Davenport RD, Kunkel SL. Cytokine roles in hemolytic and nonhemolytic transfusion reactions. Transfus Med Rev, 1994, 8(3): 157-168.

[6] Muylle L. The role of cytokines in blood transfusion reactions. Blood Rev, 1995, 9(2): 77-83.

[7] 刘辉, 赵庆, 侯秀妮. 血液吸附联合血液透析治疗重度烧伤临床观察. 中国危重病急救医学, 2004, 16(9): 568-569.

(收稿日期: 2008-10-31)

(本文编辑: 李银平)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.

2009.03.016

作者单位: 510630 广东广州, 暨南大学附属第一医院 ICU