

· 论著 ·

丙酮酸乙酯对脓毒症小鼠器官损伤的影响

邓子辉 迹冬冬 薛辉 林季 王录焱 颜光涛

【摘要】 目的 探讨丙酮酸乙酯(EP)与碱性磷酸酶(ALP)在脓毒症损伤过程中的作用机制。方法 建立小鼠盲肠结扎穿孔致脓毒症模型。90 只雄性昆明小鼠随机分为假手术组、模型组、EP 干预组;制模后 1 h EP 组腹腔给予 EP 75 mg/kg,模型组给予等量乳酸林格液;两组分别于术后 15 min 和 1、3、6 h 各取 10 只小鼠摘除眼球并取血后活杀。用全自动生化分析仪检测血清中 ALP、尿酸(UA)及肺组织匀浆中乳酸/丙酮酸比值,采用苏木素-伊红(HE)染色观察小肠组织病理学变化并进行小肠病理损伤评分。结果 与假手术组比较,模型组和 EP 组血清 ALP 均呈显著下降趋势($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),EP 组术后 6 h 显著低于模型组($P < 0.05$)。模型组血清 UA 水平 1 h 时显著升高,3 h 达峰值(P 均 < 0.05),随后下降;而 EP 组呈相反的变化趋势,于 1 h、3 h 显著低于模型组(P 均 < 0.05)。EP 组肺组织匀浆乳酸/丙酮酸比值于各时间点均显著低于模型组(P 均 < 0.05)。病理学观察发现,与模型组比较,EP 组肠道结构损伤随时间延长明显减轻,3 h、6 h 时小肠病理损伤评分明显低于模型组(P 均 < 0.05)。结论 EP 能促进血清 ALP 的利用,降低血清 UA 水平,改善机体酸中毒以及肠道损伤,对脓毒症所致损伤的脏器发挥保护作用。

【关键词】 脓毒症; 丙酮酸乙酯; 碱性磷酸酶; 尿酸; 小肠

Effects of ethyl pyruvate on injuries of sepsis in mice DENG Zi-hui, TI Dong-dong, XUE Hui, LIN Ji, WANG Lu-huan, YAN Guang-tao. Research Laboratory of Biochemistry, Institute of Basic Medicine, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

Corresponding author: YAN Guang-tao, Email: yan301@263.net

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of ethyl pyruvate (EP) and alkaline phosphatase (ALP) on injuries of sepsis and the mechanism involved. **Methods** A murine sepsis model of cecal ligation and puncture was reproduced, and 90 male Kunming mice were divided randomly into sham-operation, model and EP-intervention groups. 75 mg/kg EP was intraperitoneally injected in EP groups 1 hour after establishment of model, and the mice in model group were given a same volume of Ringer's solution. The eyeballs were removed in the latter two groups, and mice were sacrificed at 15 minutes and 1, 3 and 6 hours in subgroups of 10 mice each. ALP, uric acid (UA) and ratio of lactic acid and pyruvic acid were determined in serum and homogenized lung tissue by autonomous biochemical analyzer, and pathological changes in intestine were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results** Compared with sham-operation group, serum ALP in model groups and EP groups decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and ALP level of EP group was significantly lower than model group at 6 hours after injury ($P < 0.05$). Compared with sham-operation group, serum UA in model group increased significantly at 1 hour, and reached the highest level at 3 hours (both $P < 0.05$) but decreased significantly later. UA in EP group was significantly lower than that in model group at 1 hour and 3 hours (both $P < 0.05$). Lactic acid/pyruvic acid ratio in lung homogenate of EP group was significantly lower than that of the model group at all the time points (all $P < 0.05$). Intestinal structural damages were distinctly improved in EP group compared with model group at 3 hours and 6 hours (both $P < 0.05$). **Conclusion** EP promotes the utilization of serum ALP, decreases serum UA, ameliorates acidosis and intestinal damages, thus exerting a protective effect on sepsis-induced organ injuries.

【Key words】 sepsis; ethyl pyruvate; alkaline phosphatase; uric acid; intestine

流行病学调查显示,脓毒症主要病原菌为革兰阴性(G^-)菌,致病菌进入体内后释放内毒素是脓毒症的主要致病因素,如何控制体内的内毒素水平已成为临床上治疗脓毒症的关键。碱性磷酸酶(ALP)是一种胞外酶,且多存在于解毒、屏障以及防御细胞

中,表明其可能是一种防御因子^[1-3]。以往临床上比较关注 ALP 活性升高的意义,近年来研究发现,ALP 在脓毒症患者发病机制和治疗方面有新的意义,其脱磷酸作用可以使内毒素转变成无毒形式从而达到抑制内毒素的作用^[4],提示 ALP 活性降低在脓毒症损伤过程中同样具有重要的临床意义。丙酮酸乙酯(EP)的抗氧化作用在感染和非感染性炎症中发挥的脏器保护作用越来越受到重视^[5-7]。我们推测外源性应用 EP 可能对脓毒症所致损伤的脏器发挥保护作用,并对血清中 ALP 产生一定的影响。故

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.08.005

基金项目:国家自然科学基金项目(30670821)

作者单位:100853 北京,解放军总医院基础医学研究所生化研究室

通信作者:颜光涛,Email:yan301@263.net

本研究中以盲肠结扎穿孔术(CLP)复制脓毒症模型,观察外源性给予 EP 对小鼠脏器的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备及分组:90 只雄性昆明小鼠,体重 25 g,由本院实验动物中心提供。按随机数字表法将动物分为假手术组、模型组、EP 组,后两组再分为术后 15 min 和 1、3、6 h 组,每组 10 只。采用 CLP 复制脓毒症模型;假手术组仅分离盲肠,不做任何处理。EP 组制模 1 h 后腹腔给予 EP 75 mg/kg(购自美国 Sigma 公司);模型组给予等量乳酸林格液。各组小鼠按相应时间点摘除眼球取血后处死,并取小肠组织备检。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 血清 ALP、尿酸(UA)及肺组织匀浆乳酸/丙酮酸比值测定:采用全自动生化分析仪测定。

1.2.2 组织病理学观察:取小肠回盲部 10 cm 以上肠管,用中性甲醛水溶液固定,石蜡包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色后进行组织病理学观察,并按照 Chiu's 小肠病理损伤评价标准^[8]评为 0~5 分。

1.3 统计学处理:采用 Stata 软件进行统计分析,计量资料均以均数±标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示,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 血清 ALP 水平(表 1):随脓毒症时间延长,模型组和 EP 组 ALP 水平呈下降趋势。与假手术组比较,模型组 3 h 起显著降低,EP 组从 15 min 时就显著降低,且 6 h 时显著低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠血清 ALP、UA 及肺组织匀浆乳酸/丙酮酸比值比较($\bar{x} \pm s_x, n = 10$)

组别	血清 ALP(U/L)			
	术后 15 min	术后 1 h	术后 3 h	术后 6 h
模型组	256.5±46.9	271.7±46.3	241.3±43.5 ^a	215.7±39.6 ^b
EP 组	246.8±42.4 ^a	239.5±40.6 ^a	236.2±36.6 ^b	176.9±40.9 ^{b,c}
组别	血清 UA(μmol/L)			
	术后 15 min	术后 1 h	术后 3 h	术后 6 h
模型组	134.6±91.4	184.6±78.1 ^a	217.1±80.0 ^a	129.0±31.6
EP 组	95.3±45.5	87.6±47.8 ^a	137.7±23.1 ^a	180.0±66.7 ^a
组别	肺乳酸/丙酮酸比值			
	术后 15 min	术后 1 h	术后 3 h	术后 6 h
模型组	21.9±8.7	20.7±5.0	23.8±9.6	25.0±13.0
EP 组	14.0±3.8 ^a	13.8±2.4 ^a	16.8±4.4 ^a	15.5±5.8 ^a

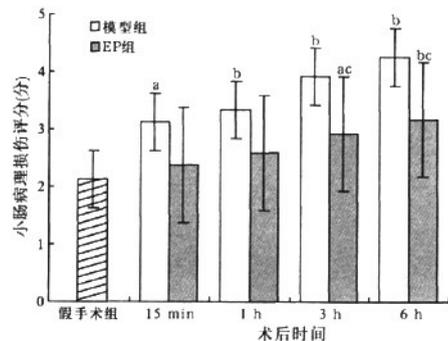
注:假手术组 ALP 为(301.0±51.5)U/L,UA 为(120.8±33.5)μmol/L,乳酸/丙酮酸比值为 19.9±7.8;与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P < 0.05$

2.2 血清 UA 水平(表 1):与假手术组比较,模型

组血清 UA 水平呈先升后降的趋势,1 h 时升高显著,3 h 达高峰($P < 0.05$),6 h 降至假手术组水平($P > 0.05$);EP 组 15 min 时 UA 水平有所降低,1 h 时降至最低,3 h 后开始升高,6 h 时显著升高($P < 0.05$)。EP 组 UA 水平于 1 h、3 h 时显著低于模型组($P < 0.05$)。

2.3 肺组织乳酸/丙酮酸比值(表 1):与假手术组比较,模型组乳酸/丙酮酸比值呈升高趋势,EP 组呈降低趋势,但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。EP 组各时间点均显著低于模型组($P < 0.05$)。

2.4 小肠组织病理学观察(彩色插页图 1,图 2):模型组小鼠肠壁明显肿大,随时间延长组织出现明显损伤,大量炎性细胞浸润,杯状细胞明显肿大,肠绒毛破损、脱落,并伴有固有层出血。与假手术组比较,模型组小肠病理损伤评分显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。EP 组小鼠肠壁损伤明显改善;术后 3 h 和 6 h 时小肠病理损伤评分明显高于假手术组,但明显低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P < 0.05$

图 2 各组小鼠小肠病理损伤评分比较

3 讨论

内毒素是脓毒症的主要致病因素,不同 G⁻菌感染机体后释放内毒素的毒性作用机制大致相同,脂多糖(LPS)和 LPS 结合蛋白复合物与 CD14 膜受体结合,通过信号转导通路激活巨噬细胞、内皮细胞、单核细胞、中性粒细胞、淋巴细胞和血小板等靶细胞,释放白细胞介素(IL-1、IL-6、IL-8)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等细胞因子,刺激机体发生全身炎症反应,最终导致多器官功能衰竭^[9-11]。本研究结果提示,外源性应用 EP 治疗后,脓毒症小鼠的损伤得到明显改善,尽管 EP 不能完全避免肠道的损伤,但能够对其起到一定的保护作用;其次,模型组血清 UA 水平显著升高,但 EP 组血清 UA 水平低于模

型组,说明 EP 能控制机体出现高尿酸血症。高尿酸血症是急、慢性肾炎或肾功能衰竭等肾脏疾病的明确指标,与肾脏疾病的发生具有相互促进效应^[12],说明 EP 可通过控制体内 UA 水平保护肾脏功能。同时血清 UA 水平还可反映全身炎症反应综合征(SIRS)患者体内炎症介质对器官功能的损伤程度,与多器官功能障碍综合征(MODS)的进展呈正相关^[13]。肾脏作为分泌 ALP 的主要器官之一,其分泌的 ALP 水平在 UA 降低时应该有所增加。而本研究结果却显示,模型组和 EP 组 ALP 水平显著降低,且 EP 组低于模型组,说明外源性应用 EP 在使肾脏功能得到改善的同时降低了血清中 ALP 活性。另有研究显示,外源性给予内毒素后,可在早期使血清 ALP 水平迅速降至基础值的 50%^[14],提示 ALP 活性降低的主要原因可能是由于其被消耗所致,这是因为 ALP 能非特异性水解磷酸单酯键,而细菌裂解释放的内毒素化学构成包括脂质 A、核心多糖和特异多糖,脂质 A 的两个磷酸盐基团是 LPS 诱导机体炎症反应的主要成分^[15],那么 ALP 就能够通过水解内毒素脂质 A 的磷酸基团破坏内毒素的结构成分,使其不能与特异性的膜受体结合,从而使 EP 发挥抗内毒素作用。同时机体在脓毒症时的高代谢状态导致无氧呼吸增加,乳酸大量堆积,机体出现酸中毒。正常情况下机体乳酸/丙酮酸比值保持一定的稳定,而本研究结果显示,损伤后乳酸/丙酮酸比值呈升高趋势,外源性应用 EP 后则呈相反的变化趋势,并且各时间点均显著低于模型组,提示 EP 能够降低脓毒症后肺脏乳酸水平,控制肺脏酸中毒,改善器官损伤。

综上所述,本研究提示,EP 的抗炎机制或许与其能促进 ALP 中和内毒素的毒性作用及改善机体酸中毒有关,为临床上应用 EP 提供了理论依据。

参考文献

[1] Koyama I, Matsunaga T, Harada T, et al. Alkaline phosphatases reduce toxicity of lipopolysaccharides in vivo and

in vitro through dephosphorylation. Clin Biochem, 2002, 35 (6):455-461.

[2] Verweij WR, Bentala H, Huizinga-Van der Vlag A, et al. Protection against an Escherichia coli-induced sepsis by alkaline phosphatase in mice. Shock, 2004, 22(2):174-179.

[3] Poelstra K, Bakker WW, Klook PA, et al. A physiologic function for alkaline phosphatase: endotoxin detoxification. Lab Invest, 1997, 76(3):319-327.

[4] Bentala H, Verweij WR, Huizinga-Van der Vlag A, et al. Removal of phosphate from lipid A as a strategy to detoxify lipopolysaccharide. Shock, 2002, 18(6):561-566.

[5] Uchiyama T, Delude RL, Fink MP. Dose-dependent effects of ethyl pyruvate in mice subjected to mesenteric ischemia and reperfusion. Intensive Care Med, 2003, 29(11):2050-2058.

[6] 李琨, 吴承堂, 丘雪红. 丙酮酸乙酯对严重腹腔感染时肠黏膜过氧化损伤的防治作用. 中国危重病急救医学, 2006, 18(3):154-156.

[7] Yang H, Ochani M, Li J, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high mobility group box1. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(1):296-301.

[8] Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. Arch Surg, 1970, 101(4):478-483.

[9] 盛志勇. 努力提高脓毒症的认识水平. 中国危重病急救医学, 2003, 15(3):131.

[10] 姚咏明, 于燕, 盛志勇, 等. 创伤后内毒素血症与脏器损害关系及其防治新方法的系列研究. 中国危重病急救医学, 1998, 10(3):134-139.

[11] 章云涛, 丁国娟, 方强. 重症脓毒症患者血清脂多糖结合蛋白及其受体变化的临床研究. 中国危重病急救医学, 2006, 18(2):78-81.

[12] Kang DH, Nakagawa T, Feng L, et al. A role for uric acid in the progression of renal disease. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(12):2888-2897.

[13] 许国根, 陈颖, 陈雯, 等. 全身性炎症反应综合征病人血清尿酸水平及其临床意义. 岭南急诊医学杂志, 2001, 6(2):81-82.

[14] Su F, Brands R, Wang Z, et al. Beneficial effects of alkaline phosphatase in septic shock. Crit Care Med, 2006, 34(8):2182-2187.

[15] Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, et al. Bacterial endotoxin; molecular relationships of structure to activity and function. FASEB J, 1994, 8(2):217-225.

(收稿日期:2008-12-31 修回日期:2009-07-17)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

内毒素性急性肺损伤过程中肺部通气和血流分布的特点

最近美国研究人员采用绵羊脓毒症模型,利用 CT 影像技术,研究了急性肺损伤后肺部通气和血流分布方面的变化。研究人员给 21 只麻醉后机械通气的绵羊静脉输注大肠杆菌内毒素导致严重低氧血症,分析注射内毒素后的肺部 CT 影像及相同时间点肺尖和肺底的血流影像,得到通气肺和未通气肺的肺容积以及通气/血流变化曲线,观察损伤后肺的恢复过程。结果显示,损伤过程中通气肺容积逐渐减少,未通气肺容积逐渐增大;但肺血流则保持相对独立,损伤后通气不良部位的血流无变化或稍增。损伤后通气/血流比值失衡,重力影响减小。研究人员认为,内毒素引起的低氧血症主要影响肺组织的通气功能,使通气受限,但肺部血流并未因此发生明显减少。

杨明星,编译自《Crit Care Med》,2009-06-15(电子版);胡森,审校

严重烫伤合并铜绿假单胞菌脓毒症家兔 外周血淋巴细胞蛋白质组学的研究

(正文见455页)

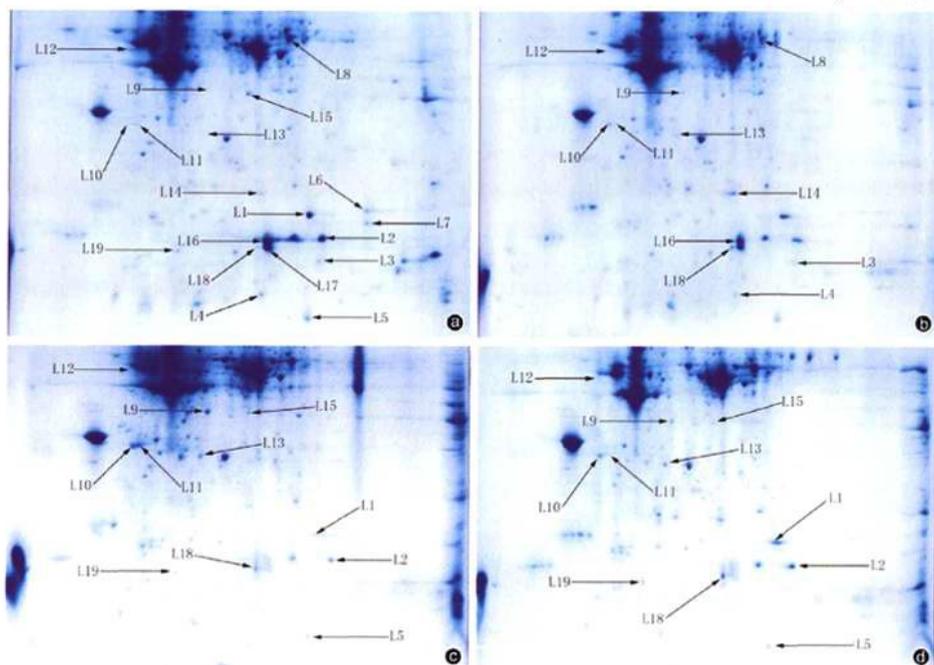


图1 各组家兔外周血淋巴细胞中蛋白质点的2-DE图谱 对照组(a)箭头指向为差异蛋白质点, 烫伤组(b)、烫伤脓毒症2h组(c)、烫伤脓毒症6h组(d)箭头指向均为与对照组比较表达有差异的蛋白质点

丙酮酸乙酯对脓毒症小鼠器官损伤的影响

(正文见460页)

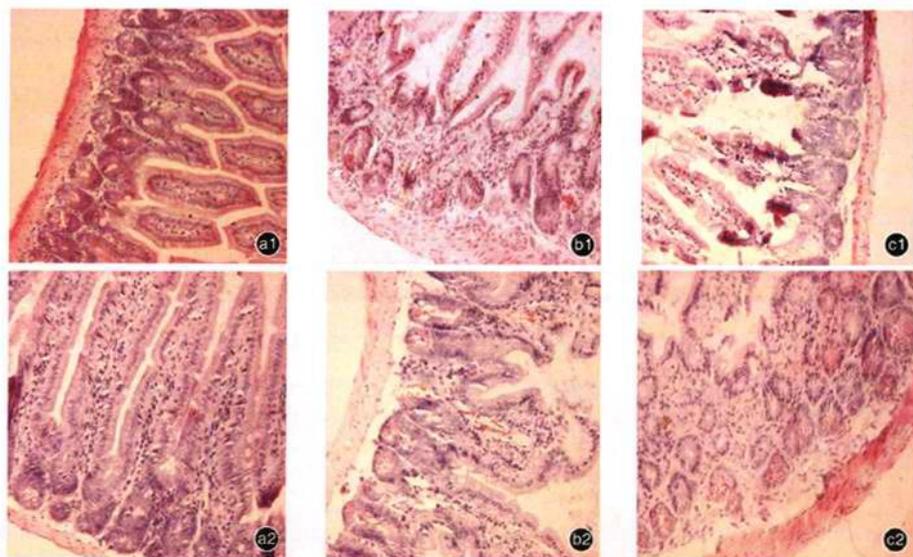


图1 光镜下观察各组小鼠小肠组织病理学改变 假手术组(a1,a2)可见正常黏膜, 无炎症变化, 无充血、出血, 模型组3h(b1)、6h(b2)可见黏膜破损严重, 大量炎性细胞浸润, 固有层破坏, EP组3h(c1)、6h(c2)可见绒毛破损减轻, 炎性细胞在固有层聚集, 固有层同上皮层的间隙增大 HE ×200