

• 论著 •

丙酮酸乙酯对烫伤延迟复苏大鼠多器官功能及死亡率的影响

王文江 姚咏明 威力明 董宁 于燕

【摘要】 目的 观察丙酮酸乙酯(EP)对烫伤延迟复苏动物多器官功能及死亡率的影响,探讨其保护作用的机制。**方法** 采用雄性 Wistar 大鼠 30% 总体表面积 III 度烫伤模型。实验分为两部分进行:①死亡率观察:130 只大鼠按照随机数字表法分为假烫伤组($n=10$)、烫伤组($n=60$,伤后 6 h 腹腔注射生理盐水 40 ml/kg 进行复苏,然后按照不同时间点腹腔注射等量生理盐水)和 EP 组($n=60$,伤后 6 h 腹腔注射生理盐水 40 ml/kg 进行复苏,按不同时间点腹腔注射 EP 液 40 mg/kg,每日 2 次,间隔 12 h,给药 3 d)。除假烫伤组外,各组又分为伤前 2 h($n=20$)、伤后 2 h($n=20$)和伤后 12 h($n=20$)给药 3 个亚组。观察不同时间点各组动物 7 d 死亡率。②器官功能观察:70 只大鼠随机分为假烫伤组($n=10$)、烫伤组($n=30$)和 EP 组($n=30$,伤后 2 h 给药),并分别于伤后 12、24 和 72 h 活杀,检测器官功能指标改变。**结果** 与烫伤组相比,伤后 12 h EP 组动物死亡率显著降低(35.0%比 75.0%, $P<0.05$)。伤后 2 h EP 组血清丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、尿素氮、肌酐、肌酸激酶水平及肺组织髓过氧化物酶活性均明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** EP 能明显改善严重烫伤延迟复苏大鼠的预后,并对重要器官功能具有显著保护作用。

【关键词】 丙酮酸乙酯; 烧伤; 延迟复苏; 多器官功能障碍综合征; 死亡率

Effect of treatment with ethyl pyruvate on multiple organ dysfunction and mortality following delayed resuscitation after burn injury in rat WANG Wen - jiang, YAO Yong - ming, XIAN Li - ming, DONG Ning, YU Yan. Burns Institute, the First Affiliated Hospital of General Hospital of PLA (Formerly 304 th Hospital of PLA), Beijing 100037, China (WANG Wen - jiang works at Armed - force Police Corps of Beijing, Beijing 100027, China)

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

【Abstract】 Objective To observe the effects of ethyl pyruvate (EP) treatment on multiple organ dysfunction and mortality following delayed resuscitation after burn injury in rat, and investigate the mechanisms of its protective effect. **Methods** Male Wistar rats were subjected to 30% full - thickness scald injury followed with delayed resuscitation (6 hours postburn). ① One hundred and thirty male Wistar rats were randomly divided into sham scald group ($n=10$), scald group ($n=60$) and EP - treatment group ($n=60$). In the scald group, 40 ml/kg normal saline was injected intraperitoneally 6 hours after scald injury for resuscitation, and it was repeated periodically. Following delayed resuscitation after burn injury, EP was injected at a dose of 40 mg/kg every 12 hours in EP - treatment group for 3 days. According to the interventional time points, rats of scald and EP - treatment groups were respectively divided in three subgroups: 2 hours prior to scald ($n=20$), 2 hours after scald ($n=20$), and 12 hours after scald ($n=20$). The mortality of animals was observed with 7 days as the cut point. ② Seventy male rats were randomly divided into sham scald group ($n=10$), scald group ($n=30$), and EP - treatment group ($n=30$). In EP - treatment group, 40 mg/kg EP was injected intraperitoneally 2 hours after scald. Animals were sacrificed at 12, 24, and 72 hours postburn, and serum samples were collected to determine the organ functional parameters, and lung tissue was obtained for measurement of myeloperoxidase (MPO) activity. **Results** The 7 - day mortality in scald and EP - treatment groups (EP given 12 hours postburn) was 75.0% and 35.0% respectively ($P<0.05$). Compared with scald group, serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr) and creatine kinase (CK) levels were markedly decreased in EP - treatment group at 12 to 24 hours postburn ($P<0.05$ or $P<0.01$), and pulmonary MPO activities were also significantly declined at 12 to 72 hours following burns ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** EP can obviously improve the outcome in rats with delayed resuscitation after burn injury, and prevent the development of multiple organ dysfunction secondary to major burns.

【Key words】 ethyl pyruvate; burn; delayed resuscitation; multiple organ dysfunction syndrome; mortality

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(2005CB522602);国家杰出青年科学基金资助项目(30125020);首都医学发展科研基金重点项目(2003 - 2023)

作者单位:100037 北京,解放军总医院第一附属医院(原解放军第三〇四医院)全军烧伤研究所基础部(王文江现在武警北京总队医院普外科工作)

通讯作者:姚咏明,教授,研究员,博士研究生导师(Email:c_ff@sina.com)

作者简介:王文江(1967 -),男(汉族),天津人,医学硕士,主治医师。

脓毒症常发生于严重感染或创伤后,是导致多器官功能障碍综合征(MODS)甚至多器官功能衰竭(MOF)的关键前导过程。关于脓毒症的研究一直受到关注^[1,2],但目前对脓毒症的发病机制尚未完全明确。丙酮酸乙酯(ethyl pyruvate, EP)是一种稳定的脂溶性丙酮酸盐衍生物,是近年来发现的一种有效抗炎物质,能减轻缺血/再灌注损伤诱发的全身性炎症反应,并下调脓毒症时细胞因子表达,改善烫伤延迟复苏大鼠细胞免疫功能障碍,但其对严重烧伤后组织损害及预后的影响尚不清楚^[3-5]。本实验拟采用烫伤延迟复苏大鼠模型,观察 EP 处理对动物多器官功能及死亡率的干预效果,旨在为进一步开展临床试验奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 动物模型制备:200 只雄性清洁级 Wistar 大鼠(北京维通利华实验动物有限公司提供),体重(250±15)g。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,刮除背部及侧胸部毛,浸于(99.0±0.5)℃沸水中 12 s,造成 30%总体表面积Ⅲ度烫伤,背部创面每日 2 次涂以质量分数为 2%的碘酒抗感染,伤后 6 h 补液抗休克,麻醉苏醒后单笼饲养。

1.2 实验设计及动物分组

1.2.1 死亡率观察:130 只大鼠按随机数字表法分为 3 组:① EP 组($n=60$),伤后 6 h 腹腔注射生理盐水 40 ml/kg,按不同时间点腹腔注射 3.23 g/L EP 液 40 mg/kg,每日 2 次,间隔 12 h,共给药 3 d。② 烫伤组($n=60$),伤后 6 h 腹腔注射 40 ml/kg 生理盐水,然后按不同时间点腹腔注射等量生理盐水。③ 假烫伤组($n=10$),动物浸于 37℃温水中 12 s,不补液,不抗休克。除假烫伤组外,各组依不同时间点再分为伤前 2 h、伤后 2 h、伤后 12 h 给药 3 个亚组,每个亚组 20 只大鼠。模型制备后 7 d 内按时给药,定时观察实验动物存活情况。

1.2.2 器官功能观察:70 只动物按照随机数字表法分为 3 组:EP 组($n=30$,伤后 2 h 给药)、烫伤组($n=30$)和假烫伤组($n=10$)。除假烫伤组不补液、不抗休克,直接活杀外,EP 组和烫伤组动物分别于伤后 12、24 和 72 h 活杀,每个时间点 10 只大鼠,检测器官功能指标改变。

1.3 指标检测及方法

1.3.1 血清生化指标检测:血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)及肌酸激酶(CK)水平检测使用 7170 自动生

化分析仪(日本 HITACHI 公司)测定。

1.3.2 肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性检测:取肺组织 100 mg,加 20 mmol/L 磷酸钾缓冲液 1 ml,冰浴匀浆,4℃、35 000×g 离心 30 min。弃上清,加入质量分数为 0.5%的溴代十六烷三甲胺(HTAB) 1 ml 混匀,-70℃过夜。取出融化,超声破碎,60℃水浴 60 min,4℃、35 000×g 离心 10 min,取上清 0.1 ml,加反应液 2.9 ml(含邻联茴香胺 167 mg/L、H₂O₂ 5 mmol/L),混匀后立即于波长 460 nm 处测 30 s 和 90 s 吸光度(A)值,并计算 $\Delta A_{460(90\text{ s}-30\text{ s})}$ 。

$$\text{MPO 活性(U/g)} = \Delta A_{460(90\text{ s}-30\text{ s})} \times 13.5$$

1.4 统计学方法:数据统计采用 SPSS12.0 统计软件,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, χ^2 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 对烫伤大鼠死亡率的影响(表 1):假烫伤组动物全部存活;EP 组与烫伤组动物总死亡率分别为 43.3%(26/60 只)和 75.0%(45/60 只),差异非常显著($P < 0.01$)。伤前 2 h 及伤后 2 h 给予 EP 处理动物的死亡率均低于烫伤组,但差异无显著性(P 均 > 0.05);伤后 12 h 给药,EP 组动物的死亡率显著低于烫伤组($P < 0.05$)。

表 1 不同时间点给予 EP 对烫伤大鼠死亡率的影响

Table 1 Effect of treatment with EP at various intervals on mortality in rats with delayed resuscitation after burn injury

组别	动物数(只)	伤前 2 h	伤后 2 h	伤后 12 h
EP 组	20	8(40)	11(55)	7(35)
烫伤组	20	14(70)	16(80)	15(75)
χ^2 值		3.636	2.849	6.465
P 值		0.055	0.088	0.012

2.2 EP 对烫伤大鼠器官功能的影响(表 2):与假烫伤组比较,烫伤组 ALT、AST、BUN、Cr、CK 水平及肺组织 MPO 活性均有不同程度升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与烫伤组相同时间点比较,EP 组伤后 12、24 和 72 h 血清 ALT、AST、BUN、Cr、CK 水平及肺组织 MPO 活性均有不同程度下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),除 MPO 外,其余各指标伤后 12 h 均明显高于假烫伤组。

3 讨 论

本实验中发现,EP 处理能显著降低烫伤延迟复苏动物的总死亡率,明显改善动物预后。但不同时间点给药对动物死亡率的影响有差异,伤前 2 h 或伤后 2 h 给药虽然也部分降低了动物死亡率,但与烫伤组比较差异无显著性。而 EP 延迟治疗,即在伤后

表 2 EP 对烫伤大鼠血清 ALT、AST、BUN、Cr、CK 水平及肺组织 MPO 的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)Table 2 Effect of treatment with EP on serum ALT, AST, BUN, Cr, CK levels and MPO activity in lung tissue in rats with delayed resuscitation after burn injury ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	伤后时间	ALT(U/L)	AST(U/L)	BUN(mmol/L)	Cr(μ mol/L)	CK(U/L)	MPO(U/g)
EP 组	12 h	90.00 \pm 21.24** \wedge \wedge	320.18 \pm 62.42* Δ Δ	25.99 \pm 1.82** Δ Δ	19.17 \pm 4.58* Δ	4 273.40 \pm 1 831.39** Δ Δ	1.14 \pm 0.35**
	24 h	99.50 \pm 46.81* Δ	474.67 \pm 89.32* Δ Δ	11.91 \pm 2.73*	16.00 \pm 1.55 Δ	659.17 \pm 95.53**	0.95 \pm 0.60**
	72 h	50.67 \pm 8.21	147.33 \pm 14.49*	11.92 \pm 1.47	16.83 \pm 1.83 Δ	680.83 \pm 256.78	0.90 \pm 0.12*
烫伤组	12 h	143.67 \pm 17.61 \wedge \wedge	541.67 \pm 101.94 Δ Δ	30.51 \pm 1.01 Δ Δ	35.00 \pm 11.65 Δ Δ	12 937.20 \pm 4 031.39 Δ Δ	2.05 \pm 0.18 Δ Δ
	24 h	175.50 \pm 32.36 Δ Δ	796.67 \pm 172.42 Δ Δ	26.29 \pm 13.44	40.67 \pm 31.81 Δ Δ	1 389.33 \pm 480.55 Δ	2.36 \pm 0.38 Δ Δ
	72 h	65.67 \pm 17.75	226.50 \pm 49.19 Δ	13.85 \pm 4.44	17.17 \pm 1.83 Δ	1 090.17 \pm 351.93	1.84 \pm 0.43 Δ
假烫伤组		42.33 \pm 5.01	166.83 \pm 25.91	12.30 \pm 2.04	12.83 \pm 2.04	695.83 \pm 301.79	0.81 \pm 0.33

注:与烫伤组相同时间点比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与假烫伤组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

12 h 给药虽不能完全避免死亡的发生,但能显著降低动物 7 d 死亡率。目前,对于上述 EP 干预时一效反应差异性的确切原因还不清楚,推测与主要致炎因子分泌时相密切相关,提示烫伤后 12 h 给药,使 EP 发挥了对炎症反应的最佳调控效应,为其进一步应用提供了较宽的“时间窗”,具有潜在实用价值。

有资料证实,EP 可以调节多种炎症介质的合成与释放,包括早期和晚期炎症细胞因子^[6]。EP 可以降低肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)的表达,但可提高 IL-10 浓度。EP 还可提高脓毒症模型动物的存活率,并延长实验动物的生存时间^[4];同时可有效抑制内毒素诱导的鼠巨噬细胞 RAW 264.7 分泌一氧化氮(NO)和 IL-1,明显阻断诱生型一氧化氮合酶(iNOS)和 IL-1 mRNA 的转录^[7]。新近发现,高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)作为一种晚期炎症介质可能参与了脓毒症的致死效应^[8]。研究显示, HMGB1 在循环及不同组织中显示出延迟、高表达效应,并且与肝、肺及小肠等重要器官功能损害密切相关^[9]。据报道,EP 能减少内毒素诱导巨噬细胞产生 HMGB1 和 TNF- α ,并抑制核转录因子- κ B(NF- κ B)和 p38 丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)信号通路活化^[10]。本实验中,烫伤延迟复苏动物预后的显著改善可能与 EP 下调早期、晚期炎症细胞因子的产生,减轻淋巴细胞免疫功能抑制及细胞凋亡有关^[11],其确切的作用机制有待于深入探讨。

另外据报道,EP 通过降解谷胱甘肽成为二硫化物,使得细胞内氧化-还原状态发生改变^[12],进而抑制 NF- κ B 活性。NF- κ B 是一种参与多种炎症介质基因表达的转录因子,已证实 EP 可有效拮抗 NF- κ B 活化,下调 TNF- α 等促炎细胞因子的合成与分泌,同时维持机体的抗炎调节机制^[13],最终抑制促炎介质产生。因此,应用 EP 可能有助于调节炎症反应的平衡,防止过度炎症反应的发展。

本实验中,我们对烫伤后 12、24 和 72 h 烫伤组及 EP 组进行了血清生化指标的对比分析,表明 EP 组动物反映心、肝、肾、肺等器官功能的指标较烫伤组均有不同程度改善,血清 ALT、BUN、CK、MPO 水平下降更为显著,尤其以伤后 12 h 各项生化指标的好转更加明显,有效地防止了烫伤延迟复苏动物组织损害的进一步发展。上述结果表明,EP 对烫伤延迟复苏诱发心、肝、肾、肺等器官功能障碍具有良好的治疗作用,从而有效降低动物的死亡率。研究证实,EP 可以显著减轻大鼠缺血/再灌注损伤模型器官的结构和功能损害,对心、肝、肾等重要生命器官有保护效应^[14];EP 治疗后,心肌缺血/再灌注模型大鼠心肌 ATP 含量平均高出对照组约 7 倍,心肌梗死面积则减少,心功能明显好于对照组,表明 EP 在心肌缺血/再灌注病理过程中具有减轻心肌损伤、提高局部组织能量供应的能力,从而保护心脏功能^[15]。在肝脏损伤模型中,EP 治疗组动物病理组织学提示,肝细胞的脂肪沉积及点状坏死明显减轻,血 ALT 降低^[16]。同样,EP 治疗后脓毒症模型动物血 Cr 水平显著降低,肾小管损伤程度也明显减轻^[4]。这些观察与本实验结论基本一致,说明 EP 对多种病理状态下的器官损害具有广泛保护作用。

值得指出的是,目前对于 EP 的应用仅限于动物实验,其安全性和有效性尚有待进一步验证。同时 EP 在脓毒症中的抗炎作用机制仍有待于进一步阐明。

参考文献:

- 1 姚咏明,盛志勇,林洪远,等.脓毒症定义及诊断的新认识[J].中国危重病急救医学,2004,16:321-324.
- 2 林洪远.脓毒症——挑战与对策[J].中国危重病急救医学,2004,16:325-327.
- 3 Fink M P. Reactive oxygen species as mediators of organ dysfunction caused by sepsis, acute respiratory distress syndrome, or hemorrhagic shock; potential benefits of resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care,2002,5:167-174.

- 4 Venkataraman R, Kellum J A, Song M, et al. Resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution prolongs survival and modulates plasma cytokine and nitrite/nitrate concentrations in a rat model of lipopolysaccharide - induced shock [J]. Shock, 2002, 18: 507 - 512.
- 5 董月青, 姚咏明, 魏鹏, 等. 丙酮酸乙酯对烫伤延迟复苏大鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 12 - 15.
- 6 Fink M P. Ethyl pyruvate: a novel anti-inflammatory agent [J]. Crit Care Med, 2003, 31: S51 - S56.
- 7 Song M, Kellum J A, Kaldas H. Evidence that glutathione depletion is a mechanism responsible for the anti-inflammatory effects of ethyl pyruvate in cultured lipopolysaccharide - stimulated RAW 264. 7 cells [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2004, 308: 307 - 316.
- 8 姚咏明, 刘辉. 对高迁移率族蛋白 B1 作用的新认识 [J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 385 - 387.
- 9 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.
- 10 Czura C J, Tracey K J. Targeting high mobility group box 1 as late-acting mediator of inflammation [J]. Crit Care Med, 2003, 31: S46 - S49.
- 11 董宁, 姚咏明, 董月青, 等. 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 [J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 393 - 396.
- 12 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.
- 13 姚咏明, 姚胜, 陈劲松, 等. NF- κ B 抑制剂对烫伤脓毒症大鼠致炎/抗炎细胞因子表达的影响 [J]. 解放军医学杂志, 2004, 29: 33 - 35.
- 14 Fink M P. Ethyl pyruvate: a novel treatment for sepsis and shock [J]. Minerva Anesthesiol, 2004, 70: 365 - 371.
- 15 Woo Y J, Taylor M D, Cohen J E, et al. Ethyl pyruvate preserves cardiac function and attenuates oxidative injury after prolonged myocardial ischemia [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004, 127: 1262 - 1269.
- 16 Yang R, Han X, Delude R L, et al. Ethyl pyruvate ameliorates acute alcohol - induced liver injury and inflammation in mice [J]. J Lab Clin Med, 2003, 142: 322 - 331.

(收稿日期: 2006 - 01 - 10)

(本文编辑: 郭方)

· 经验交流 ·

三套管行脑脊液置换术治疗蛛网膜下腔出血的临床应用

于瑛 王宝华 邢玉波

【关键词】蛛网膜下腔出血; 脑脊液置换术; 三套管

蛛网膜下腔出血(SAH)预后较差,病死率高。近年来在其治疗方法上国内外都在不断探索。传统的脑脊液置换术(先缓慢放出一定量血性脑脊液,然后用注射器缓慢向鞘内注射等量生理盐水,再如此重复)已作为治疗SAH的有效方法之一,被广泛应用。但是,我们在实践中认为上述方法有以下缺陷:①注射速度不易控制,过快易影响脑脊液循环,而诱发脑疝;②注射速度不易控制,置换不充分,易出现先注射的生理盐水随后被放出的现象(假置换现象);③反复抽注等暴露性操作,易发生鞘内感染。为此,我们设计一种较为合理的方法,即用三套管行脑脊液置换治疗SAH。

1 所需材料

无菌医用三套管 1 个;医用输液器

基金项目:山东省烟台市科技局立项课题(2005-3-30a-2)

作者单位:265100 青岛大学医学院附属医院海阳分院神经内科

作者简介:于瑛(1955-),女(汉族),山东烟台人,副主任医师。

1 副;生理盐水 250 ml + 地塞米松 5 mg;腰椎穿刺包 1 个。

2 手术方法

首先将地塞米松 5 mg 加入生理盐水 250 ml 中,接输液器,排气后待用。常规腰椎穿刺成功后,迅速接三套管,测脑脊液压力,然后缓慢放出血性脑脊液 5 ml(压力过高可调整旋钮,控制流出滴数);三套管侧端衔接装有生理盐水 250 ml + 地塞米松 5 mg 的输液器。调整输液器的控制旋钮,以 10 滴/min 的速度(0.5 ml/min)滴入,10 min 后调整三套管旋钮缓慢放出血性脑脊液 5 ml,如此重复。每次置换脑脊液 25~35 ml,每日 1 次,或隔日 1 次,直至脑脊液变为淡红色或黄色为止。

3 治疗效果

40 例中,男 18 例,女 22 例。入院时意识清醒 16 例,意识恍惚 18 例,昏迷 6 例。脑脊液压力增高 35 例[(2.830 ± 0.901)kPa],出血量平均为(17.188 ± 5.616)ml。治疗后头痛缓解及消失时间为(6.615 ± 3.142)d;治愈(颅脑 CT 显示出血完全吸收)30 例,有效(颅脑 CT

显示出血明显缓解)9 例,无效(颅脑 CT 显示出血无缓解)1 例,总有效率为 97.65%;脑积水 2 例(占 5.00%);共死亡 5 例(占 12.50%),死于蛛网膜下腔再出血。

4 讨论

生理条件下脑脊液的生成速度为 0.35 ml/min,出血或炎症情况下可明显增多。调整输液器旋钮,以 10 滴/min 的速度(即 0.5 ml/min)滴入生理盐水 + 地塞米松,基本上接近脑脊液的生成速度,对脑脊液循环影响较少,可以避免脑疝的发生。因为速度接近,置换充分,避免了前面所述的假置换现象。用三套管行脑脊液置换,使脑脊液循环处于相对封闭的环境,减少了感染的机会。应用地塞米松治疗可抗炎,减少渗出,防止蛛网膜粘连。

总之,我们认为本方法比传统的脑脊液置换术更合理,更具科学性。且操作简便、费用低,易被患者及家属接受,适合在基层医院开展。

(收稿日期:2005-12-03)

(本文编辑:李银平)