

• 论著 •

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

李锐 吴承堂 丘雪红

【摘要】 目的 探讨丙酮酸乙酯对严重腹腔感染大鼠肠黏膜过氧化损伤的防治作用。**方法** 将 36 只 SD 大鼠按照随机数字表法分成对照组、腹腔感染组和治疗组,每组 12 只。腹腔感染组采用盲肠结扎加穿孔术 (CLP) 制作严重腹腔感染模型;治疗组行 CLP 后皮下注射丙酮酸乙酯 40 mg/kg,每 8 h 1 次;对照组仅行单纯剖腹手术。各组于术后 24 h 和 48 h 分别取小肠组织进行病理学观察,记录小肠黏膜病理损伤分级,同时检测小肠及血清丙二醛 (MDA) 含量、小肠髓过氧化物酶 (MPO) 活性。**结果** 术后 24 h 和 48 h 腹腔感染组血清和小肠 MDA 水平均显著高于对照组 (P 均 < 0.05),且两者呈显著正相关 ($r = 0.867, P < 0.05$);治疗组较腹腔感染组小肠黏膜病理性损害明显减轻,病理分级显著降低 (P 均 < 0.05);治疗组血清 MDA 和小肠 MPO 水平均明显低于腹腔感染组 (P 均 < 0.05)。**结论** 严重腹腔感染时过氧化损伤导致肠黏膜屏障功能障碍,丙酮酸乙酯具有减轻大鼠肠黏膜过氧化损伤的作用。

【关键词】 腹腔感染; 丙酮酸乙酯; 丙二醛; 髓过氧化物酶

Effect of ethyl pyruvate on peroxidation injury of intestinal mucosa in rats with severe abdominal infection

LI Kun*, WU Cheng-tang, QIU Xue-hong. * Department of General Surgery, Nanfang Hospital, the Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

Corresponding author: WU Cheng-tang

【Abstract】 Objective To investigate the preventive effect of ethyl pyruvate (EP) on peroxidation injury to intestinal mucosa in rats with severe abdominal infection. **Methods** Thirty-six SD rats were divided randomly into three groups ($n = 30$ in each group): control group (laparotomy only), infection group [cecal ligation and puncture (CLP) was performed to reproduce severe abdominal infection model] and EP group (CLP plus 40 mg/kg EP subcutaneous injection, once per 8 hours). The changes in intestinal mucosa pathologic score were observed, and malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) activities in intestinal tissue, and serum MDA levels were determined at postoperative 24 and 48 hours. **Results** Inflammation of small intestine mucosa was more severe in the infection group than in EP group, and the pathologic scores were lower in EP group than those of the infection group at post-CLP 24 and 48 hours (all $P < 0.05$). There was a significant positive correlation between the intestinal and plasma MDA in the infection group ($r = 0.867, P < 0.05$). The MDA and MPO levels in intestinal tissue and serum were higher in the infection group than in EP group and control group (all $P < 0.05$). **Conclusion** With severe intraperitoneal infection in rats, the intestinal mucosa is damaged by the reactive oxygen species. EP could ameliorate the injury of intestinal mucosa by attenuating the injurious effects of the reactive oxygen species.

【Key words】 abdominal infection; ethyl pyruvate; malondialdehyde; myeloperoxidase

以往研究发现,外科重症、创伤、感染和休克等均可引起肠黏膜损伤,诱发肠道细菌和内毒素移位,并最终导致脓毒性休克和多器官功能障碍^[1-3]。丙酮酸乙酯 (ethyl pyruvate, EP) 是近年来在动物实验中发现的一种有效抗炎物质,具有抗氧化、抗炎症介质和脏器保护作用。本研究通过复制严重腹腔感染模型,观察模型动物肠黏膜损伤情况及 EP 对其的影响,探讨 EP 对严重腹腔感染时肠黏膜过氧化损伤的防治作用。

基金项目:广东省重点科技攻关项目 (2002C31004);广东省自然科学基金资助项目 (032901)

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院普通外科 (李锐,吴承堂);510260 广州,广东省昆虫研究所 (丘雪红)

通讯作者:吴承堂,副教授

作者简介:李锐 (1977-),男 (汉族),福建寿宁人,硕士研究生。

1 材料和方法

1.1 严重腹腔感染动物模型制备:健康 SD 大鼠 36 只,体重 (220 ± 20) g,雌雄不拘,按照随机数字表法分为对照组 ($n = 12$)、腹腔感染组 ($n = 12$) 和治疗组 ($n = 12$)。腹腔感染组采用盲肠结扎加穿孔术 (cecal ligation plus puncture, CLP) 制作严重腹腔感染动物模型^[4];对照组仅剖腹而不行 CLP;治疗组行 CLP 后加用 EP 治疗。每组分别于 CLP 后 24 h 和 48 h 各取 6 只动物处死。

1.2 EP 配制及给药:EP 浓度为 130 mmol/L,其中含钠 130 mmol/L,氯 139 mmol/L。经皮下给药,每次 40 mg/kg,每 8 h 1 次。对照组应用相同剂量生理盐水皮下注射。

1.3 标本制备:CLP 术后 24 h 和 48 h 麻醉动物,

先行心脏采血,常温下血液自行凝固,析出血清后,低温保存。以盲肠为标志,分别在距盲肠 5 cm 处取回肠,体积分数为 10% 的中性甲醛固定,制成石蜡切片,苏木素-伊红(HE)染色,行常规病理检查;放血处死动物后取小肠组织,挤出肠内容物,置于冰生理盐水中冲洗后,准确称量 100 mg,加入质量分数为 0.85% 的盐水 5 ml,用超声细胞粉碎机(4×5 s)制成小肠组织匀浆,1 200 r/min 离心 15 min,离心半径 6 cm,取上清液检测。

1.4 小肠黏膜病理损伤分级:肠黏膜病理损伤程度分 5 级^[5]。0 级:小肠黏膜正常;1 级:上皮下腔隙扩大,血管充血;2 级:上皮下腔隙明显扩大,上皮与固有层分离;3 级:上皮剥脱;4 级:上皮剥脱显著;5 级:固有层分解、出血、溃疡。光镜下阅片由两人分别独立进行,取均值。

1.5 小肠髓过氧化物酶(MPO)活性检测:取小肠匀浆 1.0 ml,按试剂盒提供的方法检测 MPO 活性,试剂盒购自南京建成生物制品公司。

1.6 小肠及血清丙二醛(MDA)含量检测:取小肠匀浆上清液和血清各 1.0 ml,用硫代巴比妥(TBA)比色法按试剂盒提供的步骤检测 MDA 含量,试剂盒购自南京建成生物制品公司。

1.7 统计学方法:实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 12.0 统计分析软件进行单因素方差(one-way ANOVA)分析、两两对照 LSD-*t* 检验及 Spearman 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小肠黏膜病理改变:对照组光镜下可见空、回肠黏膜各层结构完整,肠绒毛排列整齐。腹腔感染组光镜下可见小肠黏膜和黏膜下层间质水肿,血管充血,黏膜层有中性粒细胞浸润,肠绒毛毛细血管充血,部分区域有黏膜上皮脱落,浆膜层有明显炎性渗出。治疗组光镜下也可见小肠黏膜和黏膜下层间质水肿,血管充血,黏膜层有中性粒细胞浸润,肠绒毛

毛细血管充血,浆膜层有明显炎性渗出,但未见黏膜上皮脱落。病理损伤分级可见腹腔感染组小肠黏膜病理损伤级别显著高于对照组,治疗组显著低于腹腔感染组(表 1)。

2.2 小肠 MPO 水平(表 1):腹腔感染组 MPO 水平均明显高于对照组同时时间点(P 均 <0.01);组内不同时间点比较未见明显差异;治疗组 MPO 水平明显低于腹腔感染组(P 均 <0.01)。

2.3 血清 MDA 和小肠 MDA 水平(表 1):与对照组同时时间点比较,腹腔感染组血清 MDA 和小肠 MDA 水平均明显增高(P 均 <0.05);组内不同时间点比较未见明显差异,治疗组血清 MDA 水平明显低于腹腔感染组(P 均 <0.05);腹腔感染组血清 MDA 和小肠 MDA 水平呈显著正相关($r=0.867$, $P < 0.05$)。

3 讨论

严重腹腔感染时,肠黏膜大量中性粒细胞浸润,并被肠黏膜中细菌和毒性介质激活,在其吞噬活动中产生呼吸爆发,活性氧生成剧增。活性氧是氧化应激产生氧的部分还原代谢产物,包括 O_2^- 、一氧化氮(NO)等自由基产物和 H_2O_2 、 $ONOO^-$ 等非自由基产物,其最重要的两个来源是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)^[6]。MPO 又称过氧化物酶,是一种重要的含铁溶酶体,存在于中性粒细胞和单核细胞的嗜苯胺蓝颗粒中,其活性反映了组织中炎症细胞的浸润程度,即炎症活动程度;同时,MPO 在肠组织氧自由基生成过程中扮演重要角色,与肠组织氧化程度密切相关^[7]。过量的活性氧可能引起严重组织损伤,并导致生物膜中富含的多不饱和脂肪酸发生过氧化而生成 MDA,因此 MDA 水平高低反映了组织过氧化和损伤程度^[8]。本研究证实,腹腔感染组动物 CLP 后小肠 MPO 和 MDA 均明显升高,血清 MDA 同时升高;说明严重腹腔感染时,肠道中活性氧生成过量,并与肠黏膜病理损害密切相关。

表 1 各组小肠黏膜病理损伤级别、小肠 MPO 和 MDA 水平及血浆 MDA 水平变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes of pathological grade, intestinal MPO, MDA levels and plasma MDA levels in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	术后时间(h)	动物数(只)	病理损伤分级(级)	小肠 MPO(U/g)	小肠 MDA(μ mol/g)	血清 MDA(nmol/L)
对照组	24	6	0.333±0.516	2.420±0.618	0.432±0.262	2.642±0.442
	48	6	0.500±0.548	2.500±0.510	0.415±0.319	2.767±0.360
腹腔感染组	24	6	3.000±1.095*	28.870±27.790**	1.113±0.362*	4.083±0.278*
	48	6	3.500±1.378*	25.720±22.913**	1.033±0.496*	4.412±0.671*
治疗组	24	6	1.500±0.548 [△]	4.280±4.229 ^{△△}	0.897±0.286	3.550±0.329 [△]
	48	6	1.667±0.817 [△]	5.430±2.482 ^{△△}	0.802±0.131	2.881±0.320 [△]

注:与对照组同时时间点比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与腹腔感染组同时时间点比较;[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

EP 是丙酮酸的酯化物,其结构式为 $\text{CH}_3\text{CO}-\text{COOCH}_2-\text{CH}_3$, 相对分子质量为 116.5, 原本作为食品添加剂被广泛应用。EP 具有 α -酮基, 这使其在体内无需酶作用即可和 H_2O_2 发生反应, 同时抑制其他活性氧基团如 NO 、 OH^- 等的产生。由于其抗氧化功能, 所以最初 EP 是作为一种经验性抗氧化剂和活性氧清除剂。进一步研究则发现, EP 还通过抑制 eNOS 等来抑制活性氧基团的生成^[6,9]。在本实验中, EP 治疗 SD 大鼠的肠黏膜上皮细胞病理变化、血清 MDA、小肠 MPO 均明显低于腹腔感染组, 说明严重腹腔感染时 EP 同样具有抗氧化作用, 并可减轻炎症细胞浸润。但对其治疗效果及量-效关系仍有待进一步研究。然而 EP 作为一种经验性抗氧化治疗药物, 国外研究还证实其具有抗炎作用; 虽然其抗炎机制仍未完全明确, 但 EP 本身就是一种相对无毒的食品添加剂^[10], 且其起效剂量也是在安全无毒范围内。此外, 实验研究证实, EP 能改善烫伤延迟复苏大鼠的细胞免疫功能^[11,12]。因此 EP 完全可能成为一种新的抗脓毒症药物。

参考文献:

- 1 杨红明, 柴家科, 吴焱秋, 等. 烫伤大鼠肠道防御素-5 和相关酶转录表达及与细菌移位关系的探讨[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 345-347.
- 2 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[J]. 中国危重病急救医学, 1998, 10: 134-139.
- 3 杨红明, 柴家科, 盛志勇, 等. 严重烧伤延迟复苏后多器官功能障碍综合征的早期防治[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12: 610-612.
- 4 鲍扬, 李幼生, 黎介寿. 一种新型腹腔感染动物模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21: 99-100.
- 5 Moore F A. The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure[J]. Am J Surg, 1999, 178: 449-453.
- 6 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.
- 7 王永静, 陈学良. 外周血髓系细胞过氧化物酶特性及相关疾病[J]. 肿瘤学杂志, 2003, 10: 440-442.
- 8 Rackow E C, Astiz M E, Weil M H. Cellular oxygen metabolism during sepsis and shock; the relationship of oxygen consumption to oxygen delivery[J]. JAMA, 1988, 259: 1989-1993.
- 9 Fink M P. Ethyl pyruvate; a novel treatment for sepsis and shock[J]. Minerva Anesthesiol, 2004, 70: 365-371.
- 10 李银, 吴承堂. 丙酮酸乙酯抗脓毒症作用的研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 254-255.
- 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 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.

(收稿日期: 2005-10-31 修回日期: 2006-02-27)

(本文编辑: 李银平)

• 启事 •

关于召开“全国内科急危重病医学学术交流会”征文通知 暨“全国内科急危重病医学新进展高级学习班”报名通知

为提高急危重病医学学科的发展, 交流各地先进经验, 中华医学会继续教育部决定于 2006 年 5 月 26 日在辽宁省大连市举办“全国内科急危重病医学学术交流会”暨“全国内科急危重病医学新进展高级学习班”。本次活动为国家级继续教育项目(项目编号 2006-10-00-022, 12 学分)。欢迎从事内科工作的医务人员参加征文或报名参加会议。

征文内容: 内科急危重病的基础研究、内科各专科及重症监护室(ICU)的危重病临床诊断和治疗。

征文要求: 全文 2 500 字以内的论文打印稿 1 份, 并附摘要 1 份; 或只寄 600~800 字摘要 1 份。

会议期间举办高级学习班, 将邀请知名专家进行专题讲座。讲座主要内容有: 急性呼吸窘迫综合征(ARDS)进展; 危重病与机械通气进展; 心肺脑复苏中的新概念; 急性心肌梗死早期救治技术; 抗生素的合理应用; 细菌耐药与药物选择; 各型高血压治疗原则及合并症的控制标准; 各类中毒的诊疗进展; 危重病监测与治疗; 休克、多器官功能障碍综合征(MODS)、重症感染的诊治及营养支持; 紧急心脏起搏及电复律; 有创血流动力学监测及氧运输; 脑卒中的预防与诊疗进展等。

会议安排: 报到日期: 2006 年 5 月 26 日; 会议日期: 2006 年 5 月 27—31 日; 会议地点: 大连心族酒店(大连市西岗区长江路 586 号市政府后, 三星); 电话: 0411-83799999 转会务组。

来稿请寄: 100710 北京东四西大街 42 号中华医学会继续教育部“内科急危重病会议”梁鸿收。Email: cbcme@public3.bta.net.cn。Email 发稿时必须注明会议名称。

截稿日期: 2006 年 5 月 10 日。

参会报名联系人及电话: 杨桂芳, 梁鸿; 010-88283858, 88285962, 85158402。

(中华医学会继续教育部)