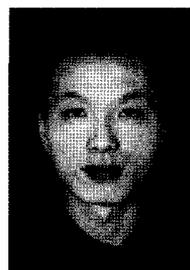


家兔烫伤后早期痂下水肿液中白蛋白吸收现象及药代动力学观察

王震 荣新洲 张涛 杨荣华



【摘要】 目的 了解家兔烫伤后早期痂下水肿液中白蛋白的浓度变化,分析其规律。 方法 采用成年雄性新西兰家兔 34 只,按随机数字表法分成对照组和实验组,每组 17 只。实验组家兔背部制成 8% TBSA 的Ⅲ度烫伤,同时痂下注射人血白蛋白作为示踪白蛋白,于伤后 2、4、8、16、24、48、72 h 取血液标本 1.5 mL;对照组家兔除不予烫伤外,其余处理同实验组。采用酶联免疫吸附测定试剂盒检测示踪白蛋白的浓度,以生化分析仪检测家兔血清白蛋白的浓度。采用 3P97 实用药代动力学计算程序拟合模型并计算示踪白蛋白的药代动力学参数。 结果 (1)实验组家兔伤后各时相点示踪白蛋白浓度均高于对照组 ($P < 0.01$),于伤后 8 h 达峰值 $[(421 \pm 10) \mu\text{g/L}]$ 。(2)实验组家兔血清白蛋白浓度呈先下降后回升趋势,对照组浓度变化不大。(3)实验组家兔示踪白蛋白的分布相半衰期 (4.0271 h) 约为对照组 (12.0907 h) 的 1/3,曲线下面积 $(22\ 336.38 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$ 则约为对照组 $(5827.77 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$ 的 4 倍。 结论 正常情况下,皮下组织中的白蛋白可以回吸收进入血液循环;出现明显炎症反应(如深度烧伤)后其白蛋白回吸收更早、更快、量更大;烧伤后早期白蛋白经血管外渗的同时也存在回吸收入血的现象。

【关键词】 烧伤; 药代动力学; 白蛋白; 痂下水肿液

Absorption of albumin in subeschar tissue fluid in early stage after burn in rabbit and its pharmacokinetics WANG Zhen, RONG Xin-zhou, ZHANG Tao, YANG Rong-hua. Department of Burns, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180, China

【Abstract】 Objective To observe the change in albumin concentration in the subeschar tissue fluid of rabbits in early stage after burn, and to analyze its regular pattern. **Methods** Thirty-four adult male New Zealand rabbits were divided into control group and experiment group according to the random number table, with 17 rabbits in each group. Rabbits in experiment group were subjected to 8% TBSA full-thickness scald on the back and were injected with human serum albumin in subeschar tissue serving as tracing albumin. 1.5 mL blood sample was collected at post scald hour (PSH) 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 respectively. Rabbits in control group were dealt with the above-mentioned procedures except for scald. The concentration of tracing albumin was measured with the enzyme-linked immunosorbent assay kit. The concentration of the serum albumin of rabbits were determined with biochemical analyzer. Pharmacokinetics parameters of tracing albumin were calculated with fitting model of 3P97 practical pharmacokinetics calculating program. **Results** (1) Concentration of tracing albumin of rabbits in experiment group was respectively higher than that in control group ($P < 0.01$) at each time point, and it peaked at PSH 8 $[(421 \pm 10) \mu\text{g/L}]$. (2) The concentration of serum albumin of rabbits in experiment group decreased in the beginning and increased later, while no significant change was observed in control group. (3) The distribution phase half-life of tracing albumin of rabbits in experiment group (4.0271 h) was about 1/3 of that of the control group (12.0907 h); while the area under the curve in the experiment group $(22\ 336.38 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$ was about 4 times of that in the control group $(5827.77 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$. **Conclusions** The albumin in the subcutaneous tissue could be absorbed into blood circulation in normal conditions. The resorption occurs earlier and faster and more when obvious inflammation occurs (such as deep burn). Exudation and resorption of albumin co-exist in the early stage after burn.

【Key words】 Burns; Pharmacokinetics; Albumin; Subeschar tissue fluid

正常机体受到热力损伤后血管通透性增高,烧伤痂下水肿液、体表水疱液内蛋白含量与血清含量

相近,约为血浆蛋白量的 80%,其中主要是白蛋白^[1]。早期白蛋白渗入痂下水肿液并滞留其中,造成血浆蛋白浓度降低^[2]。那么,渗入痂下水肿液中的白蛋白是否一直处于滞留状态?或者如同小分子物质那样渗出与吸收共存?本研究建立家兔局部皮

肤深度烫伤模型并在其痂下注射示踪白蛋白,检测血液中示踪白蛋白的浓度,以观察伤后早期白蛋白动态,同时分析其药代动力学变化,探讨伤后第三间隙大分子的转运及分布规律。

1 材料与方 法

1.1 动物来源及主要材料

普通级成年雄性新西兰家兔 34 只,体质量(2.8 ± 0.3)kg,购自广东省医学实验动物中心,通过广东省实验动物监测所检测合格,许可证号:SCXK(粤)2008-0002,粤鉴证字 2008A049。人血白蛋白静脉输注溶液(50 mL 含 10 g 人血白蛋白,下称示踪白蛋白),德国杰特贝林生物制品有限公司生产,产品批号:69244411A。人血清白蛋白酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒,购自武汉中美科技有限公司。

1.2 动物模型与分组

按随机数字表法将家兔分成实验组和对照组,每组 17 只。饲养 1 周后,实验组家兔于背部备皮(剪毛,使用硫化钠脱毛),戊巴比妥钠麻醉后,用电烫伤仪(西安奥蕾公司)100 ℃接触家兔背部 15 s,制成约 8% TBSA III 度烫伤(经病理切片证实)模型^[3]。随即在痂下注射示踪白蛋白溶液 5 mL(含 1 g 示踪白蛋白),自由饮水。伤后 2、4、8、16、24、48、72 h 分别在家兔后肢胫静脉剪毛抽取血液标本 1.5 mL;对照组家兔除不予烫伤外,其余处理同实验组。

1.3 检测指标

血液标本按照 ELISA 试剂盒的要求进行处理,采用双抗体夹心法(一抗为兔抗人白蛋白血清抗体、

二抗为羊抗兔 IgG 抗体)检测示踪白蛋白浓度,使用生化分析仪(意大利 LOGOTECH 公司)检测家兔血清白蛋白。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件行 *t* 检验。将不同时相点的示踪白蛋白浓度测定结果用 3P97 实用药代动力学计算程序(中国药理学会数学药理专业委员会编制)在微机上拟合药代动力学模型^[4] 求算参数,采用 *F* 分析、*R*² 及 AIC 分析。

2 结果

2.1 ELISA 检测家兔血浆示踪白蛋白浓度变化

实验组家兔伤后 8 h 示踪白蛋白浓度为(421 ± 10) μg/L,达到峰值;对照组伤后 16 h 该白蛋白浓度达到峰值,为(180 ± 12) μg/L,见表 1。

2.2 生化分析仪检测家兔血清白蛋白浓度的变化

实验组家兔白蛋白浓度呈先下降后回升的趋势,对照组家兔白蛋白浓度变化不大,见表 2。

2.3 药代动力学分析

结果显示以二房室模型为最佳(权重 $W = 1/C^2$)。实验组示踪白蛋白分布相半衰期(*t*_{1/2α})为 4.0271 h,明显短于对照组 *t*_{1/2α}(12.0907 h);实验组曲线下面积(AUC)为 22 336.38 μg · h · mL⁻¹,明显大于对照组(5827.77 μg · h · mL⁻¹)。见表 3。

3 讨论

烧伤后早期白蛋白即可渗入痂下水肿液并滞留

表 1 2 组家兔不同时相点血浆中示踪白蛋白的浓度变化(μg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数 (只)	伤后时间						
		2 h	4 h	8 h	16 h	24 h	48 h	72 h
实验组	17	28 ± 12 ^a	149 ± 12 ^a	421 ± 10 ^a	403 ± 11 ^a	343 ± 12 ^a	237 ± 14 ^a	112 ± 14 ^a
对照组	17	6 ± 3	14 ± 5	128 ± 18	180 ± 12	143 ± 28	90 ± 6	32 ± 9

注:与对照组比较,^a*P* < 0.01

表 2 2 组家兔不同时相点血清白蛋白的浓度变化(g/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	兔数 (只)	伤后时间						
		2 h	4 h	8 h	16 h	24 h	48 h	72 h
实验组	17	31.5 ± 3.1	29.9 ± 1.7	30.4 ± 2.5	30.8 ± 3.4	31.3 ± 2.7	32.1 ± 1.0	32.9 ± 2.6
对照组	17	31.8 ± 1.9	32.0 ± 1.0	31.2 ± 0.8	32.4 ± 1.8	31.9 ± 0.4	32.1 ± 1.2	32.1 ± 1.4

表 3 家兔体内示踪白蛋白的药代动力学参数

组别	α(h)	β(h)	<i>t</i> _{1/2α} (h)	<i>t</i> _{1/2β} (h)	K21(h)	K10(h)	K12(h)	AUC(μg · h · mL ⁻¹)	CLs(L/h)
实验组	0.1721	0.0305	4.0271	22.7307	0.0829	0.0632	0.0564	22 336.38	0.000 045
对照组	0.0573	0.0261	12.0907	26.5347	0.0571	0.0262	0.0001	5827.77	0.000 170

注:α 为药物在体内分布的表现一级速度常数;β 为药物消除的表现一级速度常数;*t*_{1/2α} 为分布相半衰期;*t*_{1/2β} 为消除相半衰期;K21 为周边室向中央室的转运速度常数;K10 为中央室的消除速度常数;K12 为中央室向周边室的转运速度常数;AUC 为曲线下面积;CLs 为总体清除率

在其中。这部分白蛋白含量较大,是造成血浆蛋白浓度下降、血浆胶体渗透压(COP)急剧降低和组织液 COP 升高的重要因素之一,同时也参与了烧伤后水肿的形成,进一步引发烧伤后机体的各种生理病理变化。

白蛋白由肝实质细胞合成,是血浆中含量最多的蛋白质,占血浆总蛋白的40%~60%,在体内发挥着维持血浆 COP、正常 pH 值、运输、免疫、催化、营养等重要作用^[5]。

有研究证实,万古霉素、亚胺培南、碳酸氢钠等小分子可在早期分布到痂下水肿液中,并在后期以痂下水肿液为“药物库”逐渐回吸收^[6-8]。目前尚未见有大分子物质经痂下水肿液回吸收的相关报道。人血白蛋白在家兔体内的生物半衰期为 80~143 h。异种蛋白质静脉注入家兔体内后很快通过血液系统均匀分布^[9]。

不同种属白蛋白具有各自的特异性,例如兔抗人白蛋白抗体与牛、羊、豚鼠等动物血清反应均呈阴性结果^[10]。本实验应用双抗体夹心 ELISA 法测定标本中人血白蛋白水平,这种试剂盒已经被广泛用于定量检测,其中包被的兔抗人白蛋白抗体能特异性结合人白蛋白,该抗体与兔白蛋白无交叉反应,因而具有很强的特异性。核素标记法半衰期短,易引起蛋白质活性变化;荧光标记容易脱落,不适用于本实验。而 ELISA 法可直接测定人白蛋白,不仅保持了其生物学活性,还显示出良好的稳定性。本实验应用 ELISA 试剂盒测定标本中特异白蛋白水平,该法建立在抗原与抗体免疫学反应的基础上,因而具有较强的特异性,与兔白蛋白亦无交叉反应。实验中在家兔皮下或痂下注射作为示踪白蛋白的人血白蛋白,伤后 2 h 就可以在血液标本中检测到示踪白蛋白,伤后约 8 h 示踪白蛋白浓度达到高峰,表明注射的人血白蛋白可以被吸收入血液。考虑到兔白蛋白相对分子质量约为 65×10^3 ,与人白蛋白相对分子质量(66.458×10^3)相近,分子结构相似,我们推测正常情况下组织与血液中的白蛋白处于一个低水平的动态平衡,而烧伤后渗入第三间隙的血浆白蛋白也可能在早期被回吸收。

2 组家兔 t1/2 α 参数显示,示踪白蛋白在烧伤家兔痂下组织的吸收明显快于未烧伤家兔;AUC 参数显示,烧伤家兔对示踪白蛋白的吸收明显大于未烧伤家兔。此结果可能与烧伤后局部炎性反应和血管反应有关。对照组实验结果表明,在没有炎性反应

和血管通透性改变的情况下,纵使局部有较高浓度的异种白蛋白,其吸收速度也比较缓慢。实验组炎性反应和血管细胞通透性增高使得大分子的白蛋白急剧渗出到痂下组织液中,同时痂下组织液中的白蛋白也能轻易通过血管屏障被回吸收入血液循环。

深度烧伤后早期痂下水肿液中示踪白蛋白被吸收入血的同时,家兔自身血浆白蛋白水平下降;而对照组家兔自身血浆白蛋白水平基本不变。虽然局部注射的人血白蛋白绝对量为 1 g,但考虑到烧伤后早期家兔体液以渗出为主,并且回吸收的人血白蛋白量远不足以改变家兔白蛋白浓度(从检测结果可见兔白蛋白浓度与人血白蛋白浓度相差 10^4 倍)。由此可以肯定,生化法检测到的白蛋白浓度基本可以反映兔白蛋白浓度变化。笔者认为,烧伤后早期存在大分子渗出与吸收共存的现象。大量蛋白外渗的同时,第三间隙水肿液中部分白蛋白也能被吸收到血液中,但早期外渗的速度大于吸收的速度,所以总体上表现为机体肿胀、血浆低蛋白。综上所述,烧伤后早期白蛋白渗出创面的同时,存在回吸收现象。当机体受到热损伤等引起局部炎性反应或者血管反应时,这种吸收的时间更早、速度更快,量更大。

参考文献

- [1] 周爱儒. 生物化学. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2002:348-349.
- [2] Jeschke MC, Herndon DN, Ebener C, et al. Nutritional intervention high in vitamins, protein, amino acids, and omega3 fatty acids improves protein metabolism during the hypermetabolic state after thermal injury. Arch Surg, 2001, 136(11):1301-1306.
- [3] 杨宗城. 烧伤治疗学. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2006:620-632.
- [4] 杨荣华,荣新洲,张涛,等. 严重烧伤后阿米卡星在痂下水肿液药代动力学变化. 南方医科大学学报,2007,27(2):172-175.
- [5] 朱大年. 生理学. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008:47-48.
- [6] 杨荣华,荣新洲,张涛,等. 严重烧伤患者应用万古霉素后痂下水肿液的药代动力学变化. 中华烧伤杂志,2007,23(2):94-96.
- [7] 荣新洲,贝春花,黄晓桦,等. 严重烧伤后亚胺培南在第三间隙代谢与滞留的临床评估. 中华烧伤杂志,2003,19(2):75-77.
- [8] 荣新洲,王震,黄晓桦. 从一例严重烧伤患者的救治看第三间隙滞留药物返释现象. 中华烧伤杂志,2009,25(2):90.
- [9] 刘宁,金建南,张叔渊,等. ¹²⁵I 标记人血白蛋白及其在家兔体内代谢的研究. 核技术,2000,23(11):816-820.
- [10] 黄英,黄缨,黄赞,等. 山羊 β -酪蛋白基因启动区指导人血清白蛋白在转基因小鼠乳汁中的高效表达. 科学通报,2000,45(19):2081-2085.

(收稿日期:2009-08-18)

(本文编辑:莫愚)