

[(38.8 ± 10.0)、(41.4 ± 12.3)、(47.2 ± 15.9)、(38.2 ± 21.8) μmol/L, t 值为 2.10 ~ 9.87, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$], SOD 活性[(180 ± 21)、(196 ± 24)、(186 ± 27)、(220 ± 18) U/mL]均明显高于生理盐水组相应时相点[(120 ± 16)、(100 ± 12)、(82 ± 10)、(115 ± 19) U/mL, t 值为 5.34 ~ 14.36, P 值均小于 0.01]。EP 组、生理盐水组大鼠伤后各时相点血浆丙二醛水平均明显高于伤前(P 值均小于 0.01), SOD 活性均明显低于伤前(P 值均小于 0.01)。(4)所有大鼠伤后不同时相点血浆 TNF- α 水平与丙二醛水平呈明显正相关($r = 0.7354$, $P < 0.01$), 与 SOD 活性呈明显负相关($r = -0.6263$, $P < 0.01$); 血浆 HMGB1 水平与丙二醛水平呈明显正相关($r = 0.5371$, $P < 0.01$), 与 SOD 活性呈明显负相关($r = -0.4897$, $P < 0.01$)。结论 EP 可有效减轻严重烫伤内毒素血症大鼠出现的过度炎症反应和氧自由基损伤。

【关键词】 烧伤; 内毒素血症; 肿瘤坏死因子 α ; 高迁移率族蛋白质类; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 丙酮酸乙酯

严重烧伤、大手术后并发感染造成内毒素血症, 诱发机体炎症反应, TNF- α 作为早期升高的炎症因子、高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 作为晚期升高的炎症因子, 参与 MODS 的发生与发展^[1]。有文献报道, 危重病患者发生炎症反应时, 也往往会出现氧化应激现象, 主要表现为血浆丙二醛水平升高和 SOD 活性下降^[2]。丙酮酸乙酯 (EP) 为丙酮酸酯化物, 溶于水, 相对分子质量为 116, 相对密度为 1.059 6, 无毒性, 还原性强。有文献报道, EP 对缺血缺氧性脑损伤新生大鼠具有抗氧化保护脑的作用^[3]。新近研究也表明, 对牛磺胆酸钠诱导的急性重症胰腺炎并发急性肺损伤大鼠, EP 可通过抑制 TNF- α 和 HMGB1 的释放, 降低机体炎症反应^[4]。但关于 EP 对严重烧伤感染后炎症因子和氧化应激指标影响的研

究, 国内外尚鲜见报道。为此, 笔者以严重烫伤内毒素血症大鼠为模型, 观察腹腔注射 EP 对血浆 TNF- α 、HMGB1、丙二醛水平及 SOD 活性的影响, 为临床应用 EP 防治严重创伤感染后炎症反应和氧化应激提供实验依据。

1 材料与方

1.1 实验动物及主要试剂与仪器

40 只健康清洁级 SD 大鼠购自江西中医学院实验动物中心 (合格证号为 SCXK-2011042), 雌雄各半, 体质量 200 ~ 250 g。

LPS 购自上海伊华临床医学科技有限公司, 分析纯。EP (分析纯)、TNF- α 和 HMGB1 ELISA 检测试剂盒均购自美国 Sigma 公司。丙二醛化学比色法检测试剂盒购自福建新大陆生物技术股份有限公司。SOD 活性酶促终点比色法检测试剂盒购自福建福缘生物科技有限公司。550 型酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司。AU2700 型全自动生化分析仪购自美国 Beckman 公司。

1.2 模型制作

大鼠适应性喂养 2 d 后, 参考文献[5]方法行乙醚麻醉, 背部剪毛并浸入 (92.1 ± 2.2) °C 水中 20 s, 造成 30% TBSA III 度烫伤 (经病理切片证实)。伤后 2 h 按 200 mg/kg 腹腔注射 LPS, 同时腹腔注射生理盐水 3 mL 抗休克, 制成严重烫伤内毒素血症模型。

1.3 分组处理及存活情况观察

模型制备成功后, 按照随机数字表法将大鼠分为 EP 组和生理盐水组, 每组 20 只。将 EP 原液加入无菌生理盐水中, 使其终体积分数为 0.943 8%。参考文献[6], EP 组大鼠按 4 mL/kg 立即腹腔注射 EP 溶液, 每 8 小时注射 1 次, 生理盐水组大鼠同法注射同体积的生理盐水溶液。

于伤后 12 h 及伤后 1、3、5 d, 观察 2 组大鼠存活情况, 计算伤后 5 d 的存活率。

1.4 标本采集及检测指标

1.4.1 标本采集 分别于伤前、伤后 12 h 及伤后 1、3、5 d, 在 2 组存活大鼠尾静脉采血 1 ~ 2 mL, 肝素抗凝分离血浆, 于 -70 °C 保存待检。

1.4.2 血浆炎症相关指标 取冻存的血浆标本, 采用 ELISA 法检测 TNF- α 和 HMGB1 含量, 通过酶标仪进行测定, 操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.4.3 血浆氧化应激相关指标 取冻存的血浆标本, 采用化学反应比色法测定丙二醛水平和 SOD 活性, 通过全自动生化分析仪进行测定, 参数设置和操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件, 计数资料行 χ^2 检验; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行重复测量方差分析, 组间两两比较行 LSD- t 检验, 组内两两比较行 LSD 检验 (软件自动略去该统计量值); 对大鼠伤后炎症相关指标水平和氧化应激相关指标水平行直线相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠存活情况

EP 组大鼠伤后 12 h 有 17 只存活, 伤后 1 ~ 5 d 有 16 只存活; 生理盐水组大鼠伤后 12 h 有 15 只存活, 伤后 1 ~ 5 d 有 14 只存活。伤后 5 d, EP 组和生理盐水组大鼠存活率分别为 80% 和 70%, 组间比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.133$, $P > 0.05$)。

2.2 血浆炎症相关指标水平

EP 组大鼠伤后各时相点血浆 TNF- α 、HMGB1 水平均明显

表 1 2 组严重烫伤内毒素血症大鼠各时相点血浆炎症相关指标水平 ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	伤前	伤后 12 h	伤后 1 d	伤后 3 d	伤后 5 d
EP 组					
TNF- α	0.22 \pm 0.08	4.21 \pm 0.42 ^a	4.66 \pm 0.52 ^a	2.33 \pm 0.38 ^a	0.80 \pm 0.32 ^a
HMGB1	6.1 \pm 2.8	13.3 \pm 4.2 ^a	21.5 \pm 8.2 ^a	26.0 \pm 9.6 ^a	20.1 \pm 10.5 ^a
生理盐水组					
TNF- α	0.20 \pm 0.06	5.23 \pm 0.85 ^a	6.21 \pm 1.01 ^a	4.36 \pm 1.84 ^a	3.56 \pm 0.23 ^a
HMGB1	5.4 \pm 2.2	18.8 \pm 7.9 ^a	36.4 \pm 10.0 ^a	42.8 \pm 15.6 ^a	35.4 \pm 16.2 ^a
t_1 值	1.02	2.40	4.12	7.81	12.18
P_1 值	>0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01
t_2 值	1.01	3.36	6.44	5.62	4.54
P_2 值	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:EP 为丙酮酸乙酯, HMGB1 为高迁移率族蛋白 B1; EP 组伤前、伤后 12 h 及伤后 1、3、5 d 鼠数分别为 20、17、16、16、16 只, 生理盐水组伤前、伤后 12 h 及伤后 1、3、5 d 鼠数分别为 20、15、14、14、14 只; TNF- α 处理因素主效应, $F = 26.20$, $P < 0.01$; 时间因素主效应, $F = 15.68$, $P < 0.01$; 两者交互作用, $F = 18.30$, $P < 0.01$; HMGB1 处理因素主效应, $F = 24.22$, $P < 0.01$; 时间因素主效应, $F = 11.66$, $P < 0.01$; 两者交互作用, $F = 19.63$, $P < 0.01$; t_1 值、 P_1 值, t_2 值、 P_2 值分别为组间 TNF- α 、HMGB1 比较所得; 与组内伤前比较, ^a $P < 0.01$

表 2 2 组严重烫伤内毒素血症大鼠各时相点血浆氧化应激相关指标水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	伤前	伤后 12 h	伤后 1 d	伤后 3 d	伤后 5 d
EP 组					
丙二醛 ($\mu\text{mol/L}$)	12.0 \pm 2.0	30.3 \pm 8.2 ^a	28.5 \pm 10.2 ^a	26.8 \pm 13.4 ^a	16.8 \pm 11.9 ^a
SOD (U/mL)	281 \pm 25	180 \pm 21 ^a	196 \pm 24 ^a	186 \pm 27 ^a	220 \pm 18 ^a
生理盐水组					
丙二醛 ($\mu\text{mol/L}$)	11.2 \pm 3.8	38.8 \pm 10.0 ^a	41.4 \pm 12.3 ^a	47.2 \pm 15.9 ^a	38.2 \pm 21.8 ^a
SOD (U/mL)	276 \pm 24	120 \pm 16 ^a	100 \pm 12 ^a	82 \pm 10 ^a	115 \pm 19 ^a
t_1 值	0.98	2.10	5.54	7.11	9.87
P_1 值	>0.05	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01
t_2 值	0.99	5.34	8.55	13.61	14.36
P_2 值	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:EP 为丙酮酸乙酯; EP 组伤前、伤后 12 h 及伤后 1、3、5 d 鼠数分别为 20、17、16、16、16 只, 生理盐水组伤前、伤后 12 h 及伤后 1、3、5 d 鼠数分别为 20、15、14、14、14 只; 丙二醛处理因素主效应, $F = 25.26$, $P < 0.01$; 时间因素主效应, $F = 13.94$, $P < 0.01$; 两者交互作用, $F = 20.46$, $P < 0.01$; SOD 处理因素主效应, $F = 28.24$, $P < 0.01$; 时间因素主效应, $F = 16.72$, $P < 0.01$; 两者交互作用, $F = 22.78$, $P < 0.01$; t_1 值、 P_1 值, t_2 值、 P_2 值分别为组间丙二醛、SOD 比较所得; 与组内伤前比较, ^a $P < 0.01$

低于生理盐水组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。EP 组、生理盐水组大鼠伤后各时相点血浆 TNF- α 、HMGB1 水平均明显高于伤前 (P 值均小于 0.01)。见表 1。

2.3 血浆氧化应激相关指标水平

EP 组大鼠伤后各时相点血浆丙二醛水平明显低于生理盐水组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), SOD 活性均明显高于生理盐水组 (P 值均小于 0.01)。EP 组、生理盐水组大鼠伤后各时相点血浆丙二醛水平明显高于伤前 (P 值均小于 0.01), SOD 活性明显低于伤前 (P 值均小于 0.01)。见表 2。

2.4 血浆炎症相关指标与氧化应激相关指标水平的相关性

严重烫伤内毒素血症大鼠伤后不同时相点血浆 TNF- α 水平 (Y_1) 与丙二醛水平 (X_1) 呈明显正相关 ($Y_1 = 0.155 4X_1 - 1.261 5$, $r = 0.735 4$, $P < 0.01$), 与 SOD 活性 (X_2) 呈明显负相关 ($Y_1 = -0.028 4X_2 + 7.712 5$, $r = -0.626 3$, $P < 0.01$); 血浆 HMGB1 水平 (Y_2) 与丙二醛水平 (X_1) 呈明显正相关 ($Y_2 = 0.839 7X_1 - 1.989 4$, $r = 0.537 1$, $P < 0.01$), 与 SOD 活性 (X_2) 呈明显负相关 ($Y_2 = -0.154 1X_2 + 49.637 0$, $r = -0.489 7$, $P < 0.01$)。

3 讨论

感染是严重创伤包括烧伤后的常见并发症, 伤口感染和肠源性感染均可引起内毒素血症, 使患者出现过度炎症反应和氧自由基损害, 导致 MODS 的发生与发展, 晚期病死率高, 笔者制作的严重烫伤内毒素血症大鼠模型病死率接近 30%, 符合其病死率较高的特征。

TNF- α 为严重烧伤后早期升高的炎症因子, 是导致 MODS 发生的重要细胞因子^[7]。HMGB1 为存在于真核细胞内可与染色体结合的一类非组蛋白类蛋白质, 早期被认为是一种转录因子, 近年来研究显示, HMGB1 可分泌到细胞外与 TNF- α 相互诱导, 参与机体的过度炎症反应^[8]。丙二醛为氧自由基氧化机体组织细胞膜多不饱和脂肪酸的降解产物, 可作为间接反映机体氧自由基损害的指标。SOD 属于金属酶中的一种, 催化超氧化物阴离子自由基歧化为过氧化氢与氧气, 在过氧化氢酶作用下最终生成水, 被认为是清除体内氧自由基的关键酶之一。血浆 SOD 活性下降提示机体自由基含量升高, 检测血浆 SOD 活性可作为反映机体清除氧自由基能力的评估指标^[9]。本研究中 2 组大鼠伤后不同时相点

血浆 TNF- α 、HMGB1 和丙二醛水平均明显高于伤前,血浆 SOD 活性明显低于伤前,提示严重烧伤内毒素血症机体存在过度炎症反应,同时氧自由基生成增多而清除能力下降。

有研究显示,EP 可下调内毒素诱导的实验犬外周血单个核细胞分泌的 TNF- α 、IL-6 等多种炎症因子^[10]。本研究中 EP 组大鼠伤后不同时相点血浆 TNF- α 水平明显低于生理盐水组,提示 EP 具有拮抗严重烧伤后早期炎症反应的作用。有文献报道,EP 可通过抑制机体表达 HMGB1,降低大鼠心肌缺血再灌注损害的程度^[11]。本研究中 EP 组大鼠伤后不同时相点血浆 HMGB1 水平均明显低于生理盐水组,提示 EP 具有减轻机体晚期炎症反应的作用。据文献报道,EP 下调严重烫伤内毒素血症大鼠血浆 TNF- α 和 HMGB1 水平可能与其下调 NF- κ B 基因表达等机制有关^[12-13]。

研究提及,EP 可防治肝外胆汁淤积症大鼠的肠道炎症反应^[14]。本研究中 EP 组大鼠伤后各时相点血浆丙二醛水平均明显低于生理盐水组,SOD 活性均明显高于生理盐水组,证实腹腔注射 EP 可有效降低严重烫伤内毒素血症大鼠血浆丙二醛水平,同时升高 SOD 活性水平,提示 EP 具有减轻严重烫伤内毒素血症机体氧自由基损害的作用。EP 抗氧化机制可能与 EP 的 α 酮基有关, α 酮基可直接与过氧化物发生还原作用,清除过氧化物及其氧自由基等有害物质^[15]。

有研究提出,糖尿病性心脏病患者氧化应激水平与炎症反应呈明显正相关^[16],为探讨严重烧伤内毒素血症患者炎症反应和氧化应激的关系,笔者对所有大鼠伤后血浆炎症相关指标和氧化应激相关指标进行了直线相关分析。结果表明,严重烫伤内毒素血症大鼠血浆 TNF- α 和 HMGB1 水平与丙二醛水平呈明显正相关,与 SOD 活性呈明显负相关,提示严重烧伤感染机体炎症反应程度与氧化应激程度呈明显正相关,二者可能存在一定的联系。EP 的抗氧化应激作用,也可能是其发挥抗炎作用的重要机制。

据文献报道,EP 治疗尽管没有对心脏手术后患者预后带来益处,但对人体是安全的,无毒性及不良反应^[17-18]。本研究动物实验结果为 EP 用于烧伤临床治疗提供了新思路,但其安全性和疗效尚需进一步探讨。

参考文献

- [1] Eskici ZM, Açıkgöz S, Pişkin N, et al. High mobility group B1 levels in sepsis and disseminated intravascular coagulation [J]. *Acta Biochim Pol*, 2012, 59(4):561-566.
- [2] 王新颖,潘莉雅,李维勤,等. n-9 单不饱和脂肪酸减轻危重症病人的氧化应激和过度炎症反应 [J]. *肠外与肠内营养*, 2010, 17(6):323-325.
- [3] 欧阳颖,苏浩彬,薛红漫,等. 丙酮酸乙酯对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织的保护作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(7):1181-1185.
- [4] Luan ZG, Zhang J, Yin XH, et al. Ethyl pyruvate significantly inhibits tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and high mobility group box 1 releasing and attenuates sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis associated with acute lung injury [J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 172(3):417-426.
- [5] 王占科,许霖水,汪仕良,等. 极化液对严重烧伤伴多器官功能障碍综合征大鼠炎症细胞因子水平及预后的影响 [J]. *中华烧伤杂志*, 2005, 21(6):422-425.
- [6] 马艳梅,梅冰,詹剑勇,等. 脓毒症大鼠肺损伤时肺组织巨噬细胞移动抑制因子变化及丙酮酸乙酯的干预作用 [J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2009, 8(2):161-165.
- [7] 梁蓉,荣新洲,张涛,等. 甘露醇对新西兰兔严重烧伤早期血清 TNF- α 和 IL-6 的影响及其脏器功能的保护机制 [J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33(4):598-602.
- [8] 孙立,陈旭林,郭峰,等. 高迁移率族蛋白 B1 对严重烧伤大鼠枯否细胞的影响及晚期糖基化终末产物受体的作用 [J]. *中华烧伤杂志*, 2013, 29(2):158-161.
- [9] 殷召雪,施小明,徐建伟,等. 我国长寿地区 90 岁以上老人血浆超氧化物歧化酶和丙二醛含量及影响因素 [J]. *中华预防医学杂志*, 2010, 44(2):123-127.
- [10] Yu DH, Noh DH, Song RH, et al. Ethyl pyruvate downregulates tumor necrosis factor alpha and interleukin (IL)-6 and upregulates IL-10 in lipopolysaccharide-stimulated canine peripheral blood mononuclear cells [J]. *J Vet Med Sci*, 2010, 72(10):1379-1381.
- [11] Hu X, Cui B, Zhou X, et al. Ethyl pyruvate reduces myocardial ischemia and reperfusion injury by inhibiting high mobility group box 1 protein in rats [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(1):227-231.
- [12] Kao KK, Fink MP. The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(2):151-159.
- [13] Su X, Wang H, Zhu L, et al. Ethyl pyruvate ameliorates intracerebral hemorrhage-induced brain injury through anti-cell death and anti-inflammatory mechanisms [J]. *Neuroscience*, 2013, 245:99-108.
- [14] Wang P, Gong G, Wei Z, et al. Ethyl pyruvate prevents intestinal inflammatory response and oxidative stress in a rat model of extrahepatic cholestasis [J]. *J Surg Res*, 2010, 160(2):228-235.
- [15] Cruz RJ, Harada T, Sasatomi E, et al. Effects of ethyl pyruvate and other α -keto carboxylic acid derivatives in a rat model of multivisceral ischemia and reperfusion [J]. *J Surg Res*, 2011, 165(1):151-157.
- [16] 黄海,宋成运,马建新,等. 氧化应激和炎症反应在糖尿病性心脏病中的作用及相互关系 [J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2012, 6(16):4905-4906.
- [17] Bennett-Guerrero E, Swaminathan M, Grigore AM, et al. A phase II multicenter double-blind placebo-controlled study of ethyl pyruvate in high-risk patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass [J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2009, 23(3):324-329.
- [18] Kao KK, Fink MP. The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 80(2):151-159.

(收稿日期:2013-09-26)

(本文编辑:贾津津)