

· 烧伤休克与缺血缺氧 ·

冬眠合剂对严重烫伤大鼠肺损伤的保护作用

乔亮 袁克俭 杨惠忠 董鹤亮 王文奎 许伟石



【摘要】 目的 观察早期应用冬眠合剂对严重烫伤大鼠肺损伤是否具有保护作用。 **方法** 建立Ⅲ度烫伤大鼠模型,随机分为冬眠合剂组和对照组(未用冬眠合剂),每组 36 只。分别在伤后 3、5、7、10 d 测定大鼠动脉血氧分压,检测肺组织中过氧化物酶(MPO)活性、丙二醛(MDA)含量、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)及 γ 干扰素(IFN- γ)蛋白表达,动态观察伤后肺组织病理学变化。 **结果** 与对照组大鼠伤后 3 d 动脉血氧分压(8.86 \pm 0.23)kPa(1 kPa=7.5 mm Hg)比较,冬眠合剂组该时相点明显升高[(12.58 \pm 0.41)kPa, P < 0.01]。冬眠合剂组大鼠伤后各时相点肺组织 MPO 活性和 MDA 含量下降(P < 0.05 或 P < 0.01);伤后 3、5、7 d 肺组织 TNF- α 表达显著下调(P < 0.05 或 P < 0.01),伤后 5、7、10 d 肺组织 IFN- γ 的表达亦显著下调(P < 0.01)。冬眠合剂组大鼠肺泡间质水肿减轻,炎性细胞浸润减少。 **结论** 大鼠烫伤后及时复苏并给予冬眠合剂,能适度抑制机体应激反应并下调促炎因子表达,改善早期肺功能。

【关键词】 烧伤; 应激; 肺; 呼吸窘迫综合征,成人; 冬眠合剂

Protective effect of lytic cocktail (inhibition of stress) on lung injury in severe burn rat QIAO Liang, YUAN Ke-jian, YANG Hui-zhong, DONG He-liang, WANG Wen-kui, XU Wei-shi. Department of Burns, Ruijin Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, P. R. China
Corresponding author: YUAN Ke-jian, Email: yuankj@126.com, Tel: 021-64370045

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of inhibition of stress (lytic cocktail) on lung injury in severe burn rats at early stage. **Methods** Sprague-Dawley rats inflicted with 30% TBSA full-thickness burn were randomly divided into A group (n = 36, fluid resuscitation with administration of lytic cocktail), B group (n = 36, fluid resuscitation only). Lung function was evaluated by partial pressure of oxygen (PaO₂) in arterial blood and histopathologic changes on 3, 5, 7, 10 post burn day (PBD). The levels of malonyldialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ) in lung tissue were measured at the same time points. **Results** The PaO₂ level in A group on 3 PBD (12.58 \pm 0.41 kPa) was significantly higher than that in B group (8.86 \pm 0.23 kPa, P < 0.01). Compared with those in B group, the levels of MDA and MPO were significantly decreased in A group at each time point (P < 0.05 or 0.01), the levels of TNF- α on 3, 5, 7 PBD (P < 0.05 or 0.01) and IFN- γ on 5, 7, 14 PBD (P < 0.01) were also decreased in A group. Swollen lung mesenchyme was alleviated, infiltration of inflammatory cell was lessened in A group. **Conclusion** Lytic cocktail combined with immediate fluid resuscitation can inhibit stress response, downregulate the expression of inflammatory factor, ameliorate lung function in severe burn rat at early stage.

【Key words】 Burns; Stress; Lung; Respiratory distress syndrome, adult; Lytic cocktail

严重烧伤不但造成局部组织变性坏死,还可以致远离创面的脏器继发性损伤,直接威胁患者生命^[1]。应激反应是机体对刺激的保护性反应。过度持久的应激反应不但不能保护机体,还可能造成致死性打击^[2]。研究显示,冬眠药物可减轻应激反应程度,降低烧伤后机体过度的炎性反应并调整机体免疫能力^[3]。本研究旨在观察大鼠严重烫伤后早期应用冬眠药物,是否对肺组织具有保护作用。

1 材料与方法

1.1 模型制作及分组

1.1.1 严重烫伤大鼠模型 90 只 SD 大鼠购自复旦大学动物实验部,体质量 250 ~ 300 g,雌雄不限。大鼠经腹腔注射 25 g/L 戊巴比妥钠麻醉(35 mg/kg),剔除背毛,24 h 后将其背部浸入 80 ℃ 热水 15 s,造成 30% TBSA Ⅲ度烫伤创面(经病理切片证实)。伤后腹腔注射乳酸林格液 5 mL 复苏。

1.1.2 实验分组 伤后大鼠按完全随机法分为对照组(未用冬眠合剂)与冬眠合剂组,每组 36 只。对照组大鼠伤后即刻腹腔注射乳酸林格液(2 mL ·

作者单位:200025 上海交通大学医学院附属瑞金医院烧伤科
通讯作者:袁克俭,Email:yuankj@126.com,电话:021-64370045

kg⁻¹ · 1% TBSA⁻¹); 第 2 天半量注射。冬眠合剂组除上述处理外, 同时注射 12 mL/kg 冬眠合剂[盐酸哌替啶(沈阳第一制药厂, 批号: H21022413) 100 mg + 氯丙嗪(上海禾丰制药有限公司, 批号: H31021060) 100 mg + 异丙嗪(上海禾丰制药有限公司, 批号: H31021490) 50 mg + 50 g/L 葡萄糖 250 mL]; 伤后第 2 天给予半量乳酸林格液和冬眠合剂。

1.2 检测指标

1.2.1 动脉血氧分压监测 分别在伤后 3、5、7、10 d, 采集 2 组大鼠腹主动脉血作血气分析[ABL-5 型自动血气分析仪, 罗氏诊断产品(上海)有限公司], 观察氧分压变化情况。

1.2.2 过氧化物酶(MPO)和丙二醛(MDA)检测

伤后 3、5、7、10 d, 腹腔麻醉下取大鼠肺组织, 按试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书检测 MPO 活性及 MDA 含量。

1.2.3 肺组织损伤评分 伤后 3、5、7、10 d, 腹腔麻醉下取大鼠肺组织标本, 置于体积分数 4% 甲醛溶液固定, 常规处理, HE 染色。每个标本于光学显微镜下取 3 个连续视野观察, 按组织水肿、中性粒细胞浸润、出血、支气管上皮细胞脱落程度进行评分。0 分表示没有病变或者病变极轻微, 1 分表示病变轻微局限, 2 分表示中度病变, 3 分表示病变明显而且范围广, 4 分表示病变极其明显且弥散^[4]。

1.2.4 肿瘤坏死因子 α(TNF-α) 和 γ 干扰素(IFN-γ) 检测 伤后 3、5、7、10 d, 腹腔麻醉下取大鼠肺组织, 匀浆, 用酶联免疫吸附测定试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司)检测肺组织 TNF-α、IFN-γ 含量。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SAS 6.12 统计软件行方差分析。

2 结果

2.1 动脉血氧分压监测结果

除烫伤后 10 d 外, 其余各时相点 2 组大鼠动脉血氧分压比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

表 1 2 组大鼠烫伤后动脉血氧分压的比较(kPa, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	伤后时间(d)			
		3	5	7	10
冬眠合剂组	36	12.58 ± 0.41 ^b	10.28 ± 0.33 ^a	13.01 ± 0.40 ^b	14.70 ± 1.01
		8.86 ± 0.23	9.15 ± 0.31	10.48 ± 0.45	12.47 ± 0.30
对照组	36	8.86 ± 0.23	9.15 ± 0.31	10.48 ± 0.45	12.47 ± 0.30

注: 1 kPa = 7.5 mm Hg; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

2.2 肺组织 MPO 和 MDA 检测结果

伤后各时相点, 冬眠合剂组大鼠肺组织 MPO 活性及 MDA 含量均低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2、3。

表 2 2 组大鼠烫伤后肺组织过氧化物酶活性比较 (U/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	伤后时间(d)			
		3	5	7	10
冬眠合剂组	36	1.53 ± 0.13 ^a	2.94 ± 0.28 ^b	2.30 ± 0.21 ^b	1.23 ± 0.10 ^b
		2.48 ± 0.19	3.89 ± 0.15	3.64 ± 0.18	2.50 ± 0.32
对照组	36	2.48 ± 0.19	3.89 ± 0.15	3.64 ± 0.18	2.50 ± 0.32

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

表 3 2 组大鼠烫伤后肺组织丙二醛含量比较 (μmol/g, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	伤后时间(d)			
		3	5	7	10
冬眠合剂组	36	14.2 ± 0.6 ^a	22.7 ± 0.9 ^a	21.0 ± 1.0 ^a	13.7 ± 0.6 ^a
		22.6 ± 0.8	31.0 ± 0.7	30.1 ± 0.6	23.0 ± 1.2
对照组	36	22.6 ± 0.8	31.0 ± 0.7	30.1 ± 0.6	23.0 ± 1.2

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$

2.3 肺组织损伤评分结果

对照组大鼠烫伤后 3 d 肺部出现水肿, 肺内出血, 中性粒细胞浸润, 肺泡上皮细胞脱落; 伤后 5 d 病变尤为明显。冬眠合剂组大鼠较对照组明显好转。见图 1, 表 4。

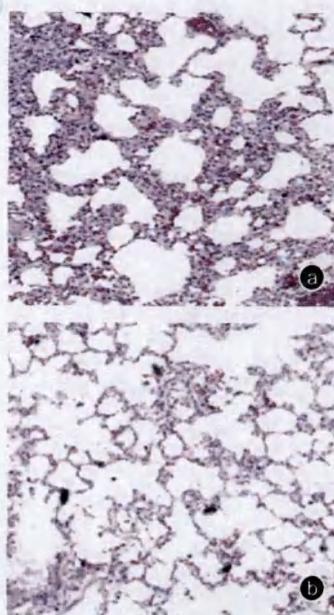


图 1 2 组大鼠烫伤后 3 d 肺组织病理学变化 HE × 40。a. 对照组大鼠肺组织明显充血, 部分肺泡塌陷, 大量炎性细胞浸润; b. 冬眠合剂组大鼠肺组织轻度充血, 有少量炎性细胞浸润

表 4 2 组大鼠烫伤后肺组织损伤评分(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	水肿	中性粒细胞	出血	上皮细胞
			浸润		脱落
冬眠合剂组					
伤后 3 d	3	2.02 ± 0.32 ^a	1.40 ± 0.24 ^a	0.60 ± 0.24 ^a	1.20 ± 0.24 ^a
伤后 5 d	3	2.40 ± 0.24 ^a	2.30 ± 0.31 ^a	1.50 ± 0.43 ^a	2.10 ± 0.51
伤后 7 d	3	1.80 ± 0.42	1.60 ± 0.32	1.20 ± 0.13	1.21 ± 0.21
伤后 10 d	3	1.10 ± 0.32	1.43 ± 0.24	0.63 ± 0.03	1.37 ± 0.32
对照组					
伤后 3 d	3	3.00 ± 0.32	2.20 ± 0.20	1.60 ± 0.24	2.40 ± 0.24
伤后 5 d	3	3.00 ± 0.32	3.20 ± 0.36	2.40 ± 0.20	2.80 ± 0.37
伤后 7 d	3	2.10 ± 0.13	2.50 ± 0.36	1.63 ± 0.34	1.45 ± 0.42
伤后 10 d	3	1.01 ± 0.21	1.87 ± 0.37	1.21 ± 0.21	2.01 ± 0.27

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$

2.4 肺组织 TNF- α 和 IFN- γ 检测结果

伤后 3、5、7 d,冬眠合剂组大鼠肺组织 TNF- α 蛋白含量均显著低于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 5。冬眠合剂组大鼠在伤后 5、7、10 d,肺组织 IFN- γ 蛋白含量亦显著低于对照组 ($P < 0.01$)。见表 6。

表 5 2 组大鼠烫伤后肺组织肿瘤坏死因子 α 含量变化 (pg/mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	伤后时间(d)			
		3	5	7	10
冬眠合剂组	36	13 ± 4 ^a	26 ± 4 ^b	29 ± 8 ^b	21 ± 3
对照组	36	24 ± 7	82 ± 9	68 ± 10	28 ± 8

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

表 6 2 组大鼠烫伤后肺组织 γ 干扰素含量变化 (pg/mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	伤后时间(d)			
		3	5	7	10
冬眠合剂组	36	5.75 ± 0.25	6.28 ± 0.74 ^a	10.50 ± 3.39 ^a	8.04 ± 1.64 ^a
		7.83 ± 1.09	24.28 ± 1.57	29.28 ± 7.69	25.27 ± 1.53
对照组	36	7.83 ± 1.09	24.28 ± 1.57	29.28 ± 7.69	25.27 ± 1.53

注:与对照组比较,^a $P < 0.01$

3 讨论

适当的应激反应有利于维持创伤后机体内环境稳定,但过度应激反应可导致机体遭受第 2 次打击。如何将应激反应控制在有利于机体保持稳态的水平,是严重烧伤治疗的难点。冬眠合剂在 20 世纪 50 年代由法国医师 Laborit 研制,在笔者单位得到广泛应用。研究结果显示,伤后在立即液体复苏的同时给予冬眠合剂可减轻应激反应,炎症反应过程虽然仍被启动,但延迟发生、程度减轻^[3,5-6]。

机体在遭受严重烧伤后,肺组织内巨噬细胞被激活,释放白细胞介素、TNF- α 、IFN- γ 等炎性细胞因子^[7]。这些细胞因子参与了中性粒细胞、淋巴细胞的游走和活化,引发肺组织病理改变。MPO 是存在于中性粒细胞中的酶,其活性可以间接反映肺组织中中性粒细胞的浸润程度;生物膜脂质过氧化是血管内皮损伤的基础,MDA 是脂质过氧化的降解产物,两者为判断肺组织病理损害的重要指标。

本研究对照组大鼠肺泡间质明显水肿,中性粒细胞浸润严重,肺组织间隙有出血现象,且 TNF- α 、IFN- γ 表达上调,MDA 含量和 MPO 活性增加,说明严重烫伤大鼠已出现明显肺损伤。冬眠合剂组大鼠动脉血氧分压显著优于对照组,提示伤后及时行液体复苏并给予冬眠合剂能改善机体氧合状况。

冬眠合剂具有局部抗炎特性,可能是其保护肺组织并减轻病理性损伤的重要机制。冬眠合剂通过下调促炎因子表达,抑制炎症细胞的激活、迁移和黏附,减少中性粒细胞聚集和炎性介质释放,MPO 活性明显降低,其产生的超氧离子减少。同时 MDA 含量下降,生物膜脂质过氧化反应减轻,肺血管内皮损伤减轻,间质水肿好转,动脉血氧分压上升。可见大鼠严重烫伤后早期复苏的同时给予冬眠合剂,能显著改善其肺功能。

参考文献

- [1] Baue AE, Durham R, Faist E. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? Shock, 1998, 10(2): 79-83.
- [2] 盛志勇,姚咏明. 脓毒症与多器官功能障碍综合征. 中华急诊医学杂志, 2003, 12(10): 653-654.
- [3] 乔亮,杨惠忠,袁克俭,等. 抑制应激反应措施对严重烧伤大鼠早期创面侵袭性感染的影响. 中华烧伤杂志, 2005, 21(2): 85-88.
- [4] Zhou ZH, Sun B, Lin K, et al. Prevention of rabbit acute lung injury by surfactant, inhaled nitric oxide, and pressure support ventilation. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161(2): 581-588.
- [5] 王世筠,许伟石,曹启栋,等. 抑制应激对烧伤血浆中 LPS、前炎症细胞因子和 Th1/Th2 细胞因子的影响. 中华烧伤杂志, 2001, 17(3): 177-180.
- [6] 王世筠,许伟石,曹启栋,等. 抑制应激对严重烧伤大鼠炎症反应的影响. 中华烧伤杂志, 2002, 18(5): 268-271.
- [7] Pfeffer K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(3): 185-191.

(收稿日期:2008-03-31)

(本文编辑:王旭)