

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00731

大容量血液滤过防治多器官功能障碍中血管内皮细胞功能的变化

High-volume hemofiltration prevents changes of vascular endothelial cell function in pigs with multiple organ dysfunction syndrome

杨丰, 方国恩*, 毕建威, 薛绪潮, 申晓军, 杜成辉

第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433

[摘要] **目的:**探讨在大容量血液滤过(HVHF)防治多器官功能障碍综合征(MODS)中血管内皮细胞功能的变化及意义。**方法:**18只健康雄性家猪在接受失血性休克复苏再灌注联合内毒素血症的两次打击后,随机分为模型组(MODS组, $n=9$)和血液滤过组(HF组, $n=9$)。判断MODS的发生,并计算MODS发生率和病死率。利用ELISA法检测两组不同时间点血清中TXB₂和6-keto-PGF_{1 α} 的浓度及可溶性E-选择素(sE-selectin)和可溶性VCAM-1(sVCAM-1)的表达情况。**结果:**与MODS组比较,HF组MODS发生率和病死率明显降低($P<0.01$)。HF组血清中TXB₂浓度较MODS组明显降低,6-keto-PGF_{1 α} 有显著升高($P<0.01$);HF组血清中sE-selectin的表达在滤过开始后24h低于MODS组($P<0.01$),而在滤过72h后又高于MODS组($P<0.05$);同时血清中sVCAM-1的表达HF组在滤过48h后低于MODS组($P<0.05$),而处死前又高于MODS组($P<0.01$)。**结论:**在复合打击后早期予以HVHF干预,可有效改善血管内皮细胞功能,从而发挥防治MODS的作用。

[关键词] 多器官功能障碍综合征;大容量血液滤过;内皮细胞

[中图分类号] R 457 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2009)06-0731-03

多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)是临床危重症患者死亡的主要原因之一,全身炎症反应综合征(SIRS)和代偿性抗炎反应综合征(CARS)之间的平衡紊乱在MODS的发生发展中起了重要作用。目前大容量血液滤过(high-volume hemofiltration, HVHF)对于MODS的防治作用已经在临床应用上得到认可^[1-2],但其确切机制尚不清楚。我们前期工作^[3]发现, HVHF主要通过反复的超滤和吸附作用来清除循环中的高浓度可溶性促炎和抑炎因子(如TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-4、IL-10等),从而削弱血循环中促炎介质和抗炎介质两种物质的峰值浓度,降低过度的炎症反应和免疫抑制状态,重新建立机体的免疫平衡。

血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VEC)构成了血液与血管外组织的物理屏障,同时还具有调节血管通透性、改变血管张力、抗凝血栓以及介导中性粒细胞、单核细胞等穿越血管壁到周围组织发挥炎症效能等作用,是脓毒症、SIRS、MODS等发生病理生理改变的重要枢纽性环节。因此,研究VEC在HVHF防治MODS中的功能变化,可以从VEC角度进一步了解HVHF对MODS的防治机制,并为内皮细胞保护策略提供实验依据。

本研究构建了猪的MODS模型并给予HVHF干预,通过观察血清中血管内皮细胞在合成血管活性物质、分泌细胞黏附分子等方面的变化,阐述了HVHF对VEC功能的调节作用。

1 材料和方法

1.1 实验对象 健康雄性家猪18只(由第二军医大学实验动物中心提供),体质量(25.4 \pm 4.3)kg,随机分为MODS组(9只)和血液滤过组(HF组,9只)。

1.2 MODS动物模型的建立 两组动物均采用氯胺酮+地西洋持续静脉麻醉。在无菌条件下,予以气管切开、插管;解剖出颈动、静脉和股动、静脉,分别留置导管;颈动脉接心电图监护仪(惠普M1106B型)、股静脉处插入Swan-Gans漂浮导管。10min后,自股动脉处开始放血,在30min内将平均动脉压(MAP)降至(50 \pm 5)mmHg(1mmHg=0.133kPa),并维持1.5~2h。然后将60%所失血液及两倍失血量的平衡液经股静脉在1h内回输复苏。在实验第24h开始由股静脉注入大肠杆菌内毒素(*E. coli* O111B4,第二军医大学基础部微生物学教研室提供),剂量1.5mg/kg,持续24h。

HF组在内毒素注射结束后1h即进行HVHF。在颈静脉和股静脉之间建立体外循环通路,用BP-21自弹式血泵(宁波血液净化设备厂)驱动血流,血流量200ml/min。采用膜面积1.4m²、截留点30000的F50聚砜膜滤器(德国Fresenius公司),超滤量为3L/h,等量的乳酸盐置换液(上海长征富民药业有限公司)预热至37 $^{\circ}$ C后以稀释法输入。过滤前采用肝素5000U冲洗管道,过滤中肝素1500U/h持续抗凝。滤过每天持续12h,每次滤前更换滤器,总共滤过3d。过滤后HF组及MODS组均持续静脉滴注乳酸林格液

[收稿日期] 2009-04-02 **[接受日期]** 2009-05-26

[作者简介] 杨丰,博士,主治医师. E-mail:abundantf@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-81873339, E-mail:fangguo-en@sina.com

加葡萄糖液 100 ml/h 维持。存活动物均在观察 7 d 后处死。
 1.3 MODS 发生率和病死率的计算 行 HVHF 前和治疗后每 1 h 记录体温、呼吸、血压、心率等生命体征变化,每 24 h 查血常规、肝肾功能、电解质、动脉血血气分析等。参照文献^[4]的动物 MODS 诊断标准判断 MODS 的发生,并计算 MODS 发生率和病死率。

1.4 标本的采集及检测 MODS 组动物分别于放血前(T1),内毒素注射完毕后 1 h(T2)、24 h(T3)、48 h(T4)、72 h(T5)以及处死前(T6)留静脉肝素抗凝血标本 10 ml;HF 组动物分别于放血前(T1),HVHF 治疗前 1 h(T2),治疗后 24 h(T3)、48 h(T4)、72 h(T5)及处死前(T6)留静脉肝素抗凝血标本 10 ml;所有血标本离心取血清,-80℃保存备用。ELISA 方法检测:(1)血栓素 B2(TXB2)和 6-酮-前列腺素 F1 α (6-keto-PGF1 α)的浓度(美国 Cayman 公司);(2)可溶性 E-选择素(sE-selectin)和可溶性血管内皮细胞黏附分子 1(sVCAM-1)的表达(美国 R&D 公司)。

1.5 统计学处理 组间均数的比较采用单因素方差分析,MODS 的发生率与病死率的比较采用精确概率计算法。

2 结果

2.1 MODS 发生率及病死率 MODS 组中 MODS 发生率为 8/9,明显高于 HF 组的 3/9($P < 0.01$);同时,MODS 组动物病死率为 7/9,明显高于 HF 组的 2/9($P < 0.01$)。

2.2 高容量血液滤过对血清中 TXB2 和 6-keto-PGF1 α 的影响 MODS 组血清中 TXB2 的浓度在内毒素注射后明显升

高,并于内毒素注射后 24 h 达到峰值,其峰值维持约 24 h 后逐渐下降;而 HF 组在接受滤过治疗开始后 24 h,TXB2 浓度出现明显下降,各时间点均明显低于 MODS 组($P < 0.01$)。MODS 组和 HF 组血清中 6-keto-PGF1 α 的浓度在两次打击后,均出现显著下降,MODS 组于内毒素注射 24 h 后降至最低值,后有少量升高,HF 组治疗开始后 24 h,血清中 6-keto-PGF1 α 浓度较治疗前有增高。MODS 组在各时间点其血清中 6-keto-PGF1 α 浓度均低于 HF 组($P < 0.01, P < 0.05$)。比较两组间 TXB2/6-keto-PGF1 α ,发现 HF 组均低于 MODS 组($P < 0.01$,表 1)。

2.3 高容量血液滤过对血清中 sE-selectin 和 sVCAM-1 的影响 MODS 组和 HF 组血清中 sE-selectin 浓度均在失血后出现迅速上升,到内毒素注射结束后到达峰值。MODS 组中 sE-selectin 的峰值维持约 24 h 后开始逐渐下降;而在 HF 组中,滤过开始后 sE-selectin 浓度首先出现明显下降,滤过后 24 h 明显低于 MODS 组($P < 0.01$),但在之后基本保持在一定水平,到治疗后 72 h($P < 0.05$)和处死前($P < 0.01$)已经明显高于 MODS 组水平。MODS 组和 HF 组血清中 sVCAM-1 的浓度在两次打击后均出现显著上升,治疗开始后 24 h 内,两组的 sVCAM-1 水平无显著差异;治疗开始后 48 h,HF 组中 sVCAM-1 水平低于 MODS 组($P < 0.05$),此后维持于一定水平,而 MODS 组 sVCAM-1 的水平则逐渐下降,至处死前 HF 组 sVCAM-1 水平显著高于 MODS 组($P < 0.01$,表 1)。

表 1 MODS 组和 HF 组血清中血管活性物质和细胞黏附分子浓度变化

[$\rho_B / (ng \cdot ml^{-1})$]

检测指标	T1	T2	T3	T4	T5	T6
TXB2						
MODS 组	149.8±14.9	477.9±23.6	516.5±19.3	485.5±22.2	396.7±13.9	228.7±17.4
HF 组	152.8±10.6	496.2±13.3	263.8±25.2**	184.0±24.7**	142.9±16.6**	138.8±10.3**
6-keto-PGF1 α						
MODS 组	95.2±7.9	49.1±9.0	42.3±5.5	50.8±4.7	56.9±7.3	57.0±4.6
HF 组	87.7±5.8	52.9±11.3	79.6±6.2**	78.8±2.5**	72.4±6.6**	67.2±10.4*
TXB2/6-keto-PGF1 α						
MODS 组	1.52±0.74	8.89±2.03	12.96±1.81	9.56±1.54	6.73±0.72	4.04±0.56
HF 组	1.69±0.61	9.43±0.71	3.19±1.89**	2.13±1.49**	2.01±0.75**	2.11±0.63**
sE-selectin						
MODS 组	27.7±1.9	79.7±4.1	78.0±6.6	57.6±10.1	54.2±9.3	45.1±10.4
HF 组	28.3±1.5	77.7±5.5	60.1±5.7**	61.4±7.3	64.1±5.5*	63.4±6.0**
sVCAM-1						
MODS 组	733.2±96.3	2 512.6±438.3	2 450.5±402.7	1 936.7±523.2	1 563.5±316.4	862.7±123.8
HF 组	698.1±108.9	2 356.5±380.9	2 136.9±396.0	1 466.6±246.2*	1 634.8±287.2	1 580.9±328.2**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与 MODS 组比较

3 讨论

血管内皮细胞(VEC)是体内分布广泛,具有多种生理功能的细胞群体。VEC 与免疫系统的功能异常被视为脓毒症、MODS、MOF 等重症的病理基础^[5],且两者功能存在互相交联反馈作用。当机体处于 SIRS 状态时,大量的炎性介质对

VEC 功能产生重要影响,主要表现为血管通透性增强,血管紧张度调节失控,与白细胞的黏附增强、凝血及抗凝血平衡失调以及 VEC 自身凋亡增加等。这一系列改变加重了 SIRS 向 MODS 的发展。早期 HVHF 可调整体内炎性介质水平,从而改善 VEC 的功能,使其朝有利于维持机体内稳态的方向改变,达到防治 MODS 发生发展的目的。本实验观察了

VEC在分泌血管活性因子以及细胞黏附分子两个方面的变化,进一步从VEC功能的角度阐释了早期HVHF防治MODS的机制。

前列环素(PGI₂)是由VEC分泌的一种重要的血管舒张因子,它和血小板分泌的TXA₂形成一对平衡关系。由于TXA₂和PGI₂在体内极其不稳定,生成后均迅速代谢为TXB₂和6-keto-PGF_{1α},所以多以测定TXB₂和6-keto-PGF_{1α}作为判断TXA₂和PGI₂浓度的指标^[6]。当组织缺血、缺氧时,血小板上的磷脂分解增多,TXA₂合成也随之增多;由于TXA₂合成过程中产生大量的自由基,更加剧组织损害,而组织损害则进一步促使TXA₂合成增多。增高的TXA₂引起血管收缩、组织局部血流灌注量减少,加重器官功能障碍的发生。同时缺血、缺氧等因素使VEC功能受损,合成PGI₂的能力下降,血管舒张不能,VEC抑制血小板黏附聚集功能降低,所以,TXA₂/PGI₂的失衡可严重影响血管张力,加剧血栓形成。本研究显示,动物接受失血再灌注和内毒素两次打击后,血清中反映TXA₂浓度的TXB₂明显升高,而反映PGI₂水平的6-keto-PGF_{1α}浓度显著减低,TXB₂/6-keto-PGF_{1α}朝有利于血栓形成的方向偏移。接受HVHF干预后,TXB₂浓度降低,6-keto-PGF_{1α}则显著升高,TXB₂/6-keto-PGF_{1α}被调整至抑制血小板聚集、减少血栓形成的水平,同时由于血管张力的调整,使脏器的血流灌注量增加,改善了脏器功能。MODS组在处死前TXB₂的浓度降低,可能与MODS后期,血小板被消耗后数量下降有关。

在促炎因子(TNF α 、IL-1 β 等)的作用下,血管内皮细胞可通过表达细胞黏附分子和内皮素(ET)等黏附并活化免疫细胞,而可溶性细胞黏附分子是继发于细胞膜表面黏附分子表达的增多,依靠酶切作用从细胞膜上脱落下来的。其中sL-selectin、sE-selectin分别来自活化的白细胞和VEC,sP-selectin来自血小板和VEC,而sVCAM-1则主要来自VEC^[7]。E-selectin是选择素家族中唯一仅表达于VEC的成员,而且只在内皮细胞活化以后才从细胞上脱落下来成为可溶性形式,因此sE-selectin通常被作为内皮细胞活化的标志^[8]。而且,有研究^[9]证实伴有器官障碍的危重患者体内的sE-selectin水平与血流动力学改变和器官功能障碍的程度密切相关,因此sE-selectin也是MODS发生时反映内皮细胞活化程度的可靠定量标志物。同时,sVCAM-1在血清中的表达水平也可以作为预测炎症反应强度、创伤程度、内皮细胞活化及损伤程度或MODS预后的指标^[10]。本实验研究显示,MODS模型组中sE-selectin、sVCAM-1在两次打击后出现峰值浓度并维持2~3d,提示体内存在广泛的内皮细胞活化或者损伤,随后细胞黏附分子浓度出现降低,并在实验结束前达到最低值,预示着过度的血管内皮细胞活化和白细胞结合,最终导致不可逆的内皮损害。而HF组sE-selectin、

sVCAM-1在接受血液滤过后即出现明显降低,但分别在滤后72h以及处死前有增高,说明HVHF可以影响血管内皮细胞对于细胞黏附分子的分泌,从而调节炎症反应程度。这提示sE-selectin和sVCAM-1水平既可以作为进行HVHF干预的预警标志,也可以用来观察实施干预的效果。

总之,本研究发现在复合打击后早期予以HVHF干预,可有效改善血管内皮细胞功能,从而发挥防治MODS的作用。

[参考文献]

- [1] Hirasawa H, Sugai T, Ohtake Y, Oda S, Matsuda K, Kitamura N. Blood purification for prevention and treatment of multiple organ failure[J]. *World J Surg*, 1996, 20: 482-486.
- [2] Brophy P D. Renal supportive therapy for pediatric acute kidney injury in the setting of multiorgan dysfunction syndrome/sepsis[J]. *Semin Nephrol*, 2008, 28: 457-469.
- [3] 赵为国, 方国恩, 杜成辉, 姚 宁, 申晓军, 袁伟杰. 高容量血液滤过对多器官功能障碍家猪器官功能和细胞因子的影响[J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25: 1208-1211.
Zhao W G, Fang G E, Du C H, Yao N, Shen X J, Yuan W J. Influence of high volume hemofiltration on major organ function and plasma cytokine levels in MODS pigs[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2004, 25: 1208-1211.
- [4] Hu S, Sheng Z, Zhou B, Guo Z, Lu J, Xue L, et al. Study on delay two-phase multiple organ dysfunction syndrome[J]. *Chin Med J(Engl)*, 1998, 111: 101-108.
- [5] Gando S. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and endothelial cell injury[J]. *Nippon Rinsho*, 2004, 62: 2244-2250.
- [6] van Kooten F, Ciabattini G, Patrono C, Schmitz P I, van Gijn J, Koudstaal P J. Evidence for episodic platelet activation in acute ischemic stroke[J]. *Stroke*, 1994, 25: 278-281.
- [7] Ventetuo C E, Levy M M. Biomarkers, diagnosis and risk assessment in sepsis[J]. *Clin Chest Med*, 2008, 29: 591-603.
- [8] Blann A, Seigneur M. Soluble markers of endothelial cell function[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 1997, 17: 3-11.
- [9] Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis[J]. *Crit Care Med*, 2002, 30(5 Suppl): S302-S312.
- [10] Leone M, Boutière B, Camoin-Jau L, Albanèse J, Horschowsky N, Mège J L, et al. Systemic endothelial activation is greater in septic than in traumatic-hemorrhagic shock but does not correlate with endothelial activation in skin biopsies[J]. *Crit Care Med*, 2002, 30: 808-814.

[本文编辑] 孙 岩