

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00869

乌司他丁对脓毒症小鼠生存率及淋巴细胞凋亡的影响

皇娜, 朱佳丽, 邓小明*, 李金宝, 娄景胜, 薄禄龙, 吴友平, 陈峰

第二军医大学长海医院麻醉科, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察乌司他丁(UTI)对脓毒症小鼠生存率及淋巴细胞凋亡的影响,探讨UTI对脓毒症的可能作用机制。**方法** 8~10周C57BL/6雄性小鼠40只,随机分成4组:假手术(Sham)组,盲肠结扎穿孔(CLP)组,CLP+UTI(10万U/kg)术后30min腹腔内给药(UTI ip)组和CLP+UTI(10万U/kg)术后30min尾静脉给药(UTI iv)组。在CLP模型建立成功后,每组10只小鼠首先进行7d生存状况观察研究,描绘7d生存曲线。另选取40只小鼠按以上方法分组,在CLP术后24h取材,计数外周血、胸腺和脾脏淋巴细胞,检测胸腺和脾脏淋巴细胞凋亡情况。数据采用Prism5.01(GraphPad Software, USA)软件包进行统计学处理。**结果** UTI治疗组7d生存率高于CLP组,差异有统计学意义($P<0.05$)。UTI组外周血、胸腺和脾脏淋巴细胞计数高于CLP组,差异有统计学意义($P<0.05$);UTI组脓毒症小鼠胸腺和脾脏淋巴细胞凋亡低于CLP组,差异有统计学意义($P<0.05$)。UTI ip和UTI iv组之间各项指标差异均无统计学意义。**结论** 应用UTI腹腔或尾静脉给药可明显改善脓毒症小鼠的生存状况,可能与其升高脓毒症小鼠外周血、胸腺和脾脏淋巴细胞数量,有效降低脓毒症小鼠胸腺和脾脏组织淋巴细胞凋亡等有关。

[关键词] 脓毒症;乌司他丁;盲肠结扎穿孔;淋巴细胞计数;细胞凋亡

[中图分类号] R 631 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)08-0869-05

Impact of ulinastatin on survival and lymphocyte apoptosis in septic mice

HUANG Na, ZHU Jia-li, DENG Xiao-ming*, LI Jin-bao, LOU Jing-sheng, BO Lu-long, WU You-ping, CHEN Feng

Department of Anesthesiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of ulinastatin on the survival and lymphocyte apoptosis in mice with cecal ligation and puncture (CLP) induced sepsis, so as to investigate the possible mechanism of ulinastatin action in sepsis. **Methods** Forty 8-10 weeks old male C57BL/6 mice(22-30 g body weight) were randomly assigned to four groups, i. e., Sham group, CLP group, CLP plus UTI ip group (100 000 U/kg by intraperitoneal injection at half an hour after operation), and CLP plus UTI iv group (100 000 U/kg by intravenous injection at half an hour after operation). After successful establishment of CLP model, the 7-day survival of the 10 animals in each group was observed and the survival curve was also plotted. Based on the 7-day survival of animals, another 40 mice were divided into the above 4 groups and specimens were collected 24 h after CLP to examine the lymphocyte count in the peripheral blood, thymus and spleen and the apoptosis of lymphocytes in the thymus and spleen. The statistical analyses were done with Prism5.01 (GraphPad Software, USA). **Results** The 7-day survival rates in the two UTI groups were significantly higher than that in the CLP group ($P<0.05$). The lymphocyte counts in the two UTI groups were significantly higher than that in the CLP group ($P<0.05$), and the lymphocyte apoptosis rates in the two UTI groups were significantly lower than that in the CLP group ($P<0.05$). The above parameters were not significantly different between the two UTI groups. **Conclusion** Both intraperitoneal and intravenous treatment with UTI can greatly improve the survival of septic mice, which might be related to the roles of UTI in increasing the lymphocytes count in the peripheral blood, thymus and spleen of septic mice and in alleviating lymphocyte apoptosis in the thymus and spleen.

[Key words] sepsis; ulinastatin; cecal ligation and puncture; lymphocyte count; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(8): 869-873]

脓毒症(sepsis)是以大量免疫细胞凋亡和严重的免疫麻痹为特征的高致命性免疫混乱状态^[1-2]。

Weber等^[3]证实严重脓毒症时存在大量淋巴细胞凋亡,其实验研究开创了调控淋巴细胞凋亡治疗脓毒

[收稿日期] 2011-03-16

[接受日期] 2011-07-14

[基金项目] 国家自然科学基金(30872454)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30872454)。

[作者简介] 皇娜, 硕士生。E-mail: hfn102angel@sina.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81873484, E-mail: xmdeng@anesthesia.org.cn

症的新思路。目前研究认为,感染早期机体免疫系统被过度激活引起的“细胞因子风暴”和感染后期机体免疫系统麻痹是脓毒症的重要发病机制,其中免疫细胞凋亡异常是导致免疫麻痹和多器官功能衰竭的重要原因^[4-5]。目前,应用半胱氨酸酶抑制剂等降低淋巴细胞凋亡,已成为脓毒症基础与临床研究的新方法^[6]。乌司他丁(ulinastatin,UTI)是从人类尿液中分离纯化的广谱蛋白酶抑制剂,能同时抑制多种水解酶活性。近年研究发现,UTI除可抑制以胰蛋白酶为主的多种酶活性外,也是膜稳定剂及氧自由基清除剂,能抑制炎症介质的过度释放,改善微循环和组织灌注,在脓毒症抗炎治疗中有应用潜力^[7-9]。本实验拟通过研究UTI对盲肠结扎穿孔(CLP)模型^[10]脓毒症小鼠7d生存率,外周血、胸腺和脾脏淋巴细胞计数,胸腺和脾脏组织淋巴细胞凋亡等指标的影响,来探讨其免疫调理方面的可能机制^[11],为脓毒症治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物与试剂 8~10周龄体质量为22~30g的雄性C57BL/6小鼠,由第二军医大学实验动物中心提供。UTI(药物批号H19990134)由广东天普生化医药股份有限公司提供。抗体CD3-APC-CY7(clone:17A2)、CD19-APC(clone:MB-19-1)分别购自Biolegend和eBioscience公司。AV-PI试剂盒(货号:56381000和56548000)购自eBioscience公司。TUNEL试剂盒(货号:11684817910)购自Roche公司。

1.2 CLP模型制作方法 小鼠在异氟烷吸入麻醉下,沿腹白线逐层切开腹部皮肤、皮下组织及筋膜,暴露盲肠,在距盲端1/2位置用0号丝线结扎盲肠,22G针穿孔一次,还纳盲肠,逐层缝合关闭腹腔,术毕皮下补液0.9%生理盐水1ml进行液体复苏。Sham组只开腹、关腹与复苏,不结扎或穿孔盲肠。各组小鼠术前、术后不限食水。

1.3 7d生存率实验 将40只小鼠随机分成4组:假手术(Sham)组,CLP组,CLP+UTI(10万U/kg)术后30min腹腔内给药(UTI ip)组和CLP+UTI(10万U/kg)术后30min尾静脉给药(UTI iv)组^[12],每组10只小鼠。在CLP术后30min,Sham组和CLP组分别给予0.2ml生理盐水腹腔内注射;UTI ip组将10万U/kg UTI溶于0.2ml生理盐水经腹腔给药;UTI iv组将10万U/kg UTI溶于0.2ml生理盐水经尾静脉给药。术后24h时UTI组重复给药1次,CLP组和Sham组同时再次给予等容量生理盐水。记录各组小鼠7d生存率(%),描

绘生存率曲线。

1.4 免疫功能研究 将40只小鼠按1.3项下方法进行分组,每组10只。各组小鼠在CLP术后30min,Sham组和CLP组分别给予0.2ml生理盐水腹腔内注射;UTI ip组将10万U/kg UTI溶于0.2ml生理盐水经腹腔给药;UTI iv组将10万U/kg UTI溶于0.2ml生理盐水经尾静脉给药。各组小鼠于CLP术后24h,在异氟烷吸入麻醉下心脏取血,并切除胸腺和脾脏组织待测。具体检测内容包括:外周血、胸腺和脾脏淋巴细胞计数;胸腺和脾脏淋巴细胞凋亡情况。

1.4.1 外周血、胸腺和脾脏淋巴细胞计数 (1)外周血B细胞和T细胞计数:小鼠在异氟烷吸入麻醉下心脏取血,收集血液试管为无热原和内毒素试管,EDTA抗凝,用裂红液去除外周血红细胞,严格按照试剂盒说明书,分别应用B细胞和T细胞标志性抗体CD19、CD3标记后用流式细胞仪检测。(2)胸腺T细胞计数:处死小鼠,收集胸腺组织,收集到的单个胸腺组织放置于预先盛有等容积PBS溶液的研磨皿中分别进行充分研磨。应用T细胞标志性抗体CD3标记后用流式细胞仪检测。(3)脾脏B细胞和T细胞计数:处死小鼠,收集脾脏组织,收集到的单个脾脏组织放置于预先盛有等容积PBS溶液的研磨皿中分别进行充分研磨。分别应用B细胞和T细胞标志性抗体CD19、CD3标记后用流式细胞仪检测。

1.4.2 胸腺和脾脏淋巴细胞凋亡检测 (1)胸腺淋巴细胞凋亡检测:处死小鼠,收集胸腺组织,收集到的单个胸腺组织放置于预先盛有等容积PBS溶液的研磨皿中分别进行充分研磨。应用T细胞标志性抗体CD3和凋亡检测抗体AV、PI标记后用流式细胞仪检测胸腺淋巴细胞凋亡。(2)脾脏淋巴细胞凋亡的检测:处死小鼠,收集脾脏组织,用10%甲醛溶液固定4h以上,TUNEL法检测脾脏淋巴细胞凋亡。

1.5 统计学处理 采用Prism5.01(GraphPad Software, USA)软件包进行统计学处理,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较应用单因素方差分析。多组间生存率比较用Kaplan-Meier分析,两组间比较用log-rank检验。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 各组小鼠7d生存率的变化 CLP组、UTI ip组和UTI iv组小鼠7d生存率均低于Sham组($P < 0.05$);UTI ip组和UTI iv组7d生存率均高于CLP组($P < 0.05$);UTI ip组和UTI iv组小鼠7d生存率差异无统计学意义(图1)。提示UTI治疗可以提高脓毒症小鼠的7d生存率。

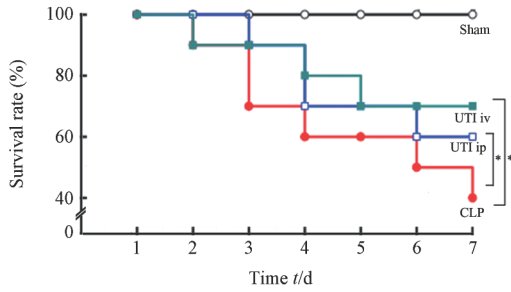


图 1 各组小鼠 7 天生存率

Fig 1 Seven-day survival of mice in each group

CLP: Cecal ligation and puncture; UTI ip: CLP plus UTI (100 000 U/kg) by intraperitoneal injection; UTI iv: CLP plus UTI (100 000 U/kg) by intravenous injection. * $P < 0.05$

2.2 各组小鼠外周血、胸腺和脾脏淋巴细胞计数的变化 CLP 组、UTI ip 组和 UTI iv 组脓毒症小鼠外周血 T 细胞和 B 细胞计数均低于 Sham 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); UTI ip 组和 UTI iv 组外周血 T 细胞和 B 细胞计数高于 CLP 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); UTI ip 组和 UTI iv 组外周血 T 细胞和 B 细胞计数差异无统计学意义 (表 1)。各组小鼠胸腺和脾脏淋巴细胞计数的变化趋势与外周血一致 (表 1)。提示 UTI 治疗可以提高脓毒症小鼠外周血、胸腺和脾脏淋巴细胞计数。

表 1 实验动物外周血、胸腺和脾脏淋巴细胞计数

Tab 1 Lymphocyte counts in blood, thymus, spleen of experimental animals

($n=10, \bar{x} \pm s$)

Group	Peripheral blood ($\times 10^5$)		Thymus ($\times 10^6$) T cell	Spleen ($\times 10^6$)	
	T cell	B cell		T cell	B cell
Sham	4.820 ± 0.332	4.055 ± 0.152	2.793 ± 0.567	4.868 ± 0.307	7.983 ± 0.313
CLP	0.738 ± 0.061 *	0.779 ± 0.047 *	0.791 ± 0.161 *	2.017 ± 0.214 *	2.985 ± 0.345 *
UTI ip	1.197 ± 0.160 *△	1.192 ± 0.100 *△	1.181 ± 0.196 *△	3.530 ± 0.438 *△	4.682 ± 1.016 *△
UTI iv	1.210 ± 0.098 *△	1.206 ± 0.091 *△	1.170 ± 0.130 *△	3.360 ± 0.423 *△	4.906 ± 0.817 *△

All samples were harvested 24 h after surgery. CLP: Cecal ligation and puncture; UTI ip: CLP plus UTI (100 000 U/kg) by intraperitoneal injection; UTI iv: CLP plus UTI (100 000 U/kg) by intravenous injection. * $P < 0.05$ vs Sham group; △ $P < 0.05$ vs CLP group

2.3 各组小鼠胸腺和脾脏淋巴细胞凋亡的变化

2.3.1 各组小鼠胸腺淋巴细胞凋亡的变化 CLP 组、UTI ip 组和 UTI iv 组脓毒症小鼠胸腺淋巴细胞凋亡程度均高于 Sham 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); UTI ip 组和 UTI iv 组脓毒症小鼠胸腺淋巴

细胞凋亡程度与 CLP 组相比降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); UTI ip 组和 UTI iv 组脓毒症小鼠胸腺淋巴细胞凋亡程度差异无统计学意义 (图 2)。提示 UTI 治疗可以降低胸腺淋巴细胞凋亡程度。

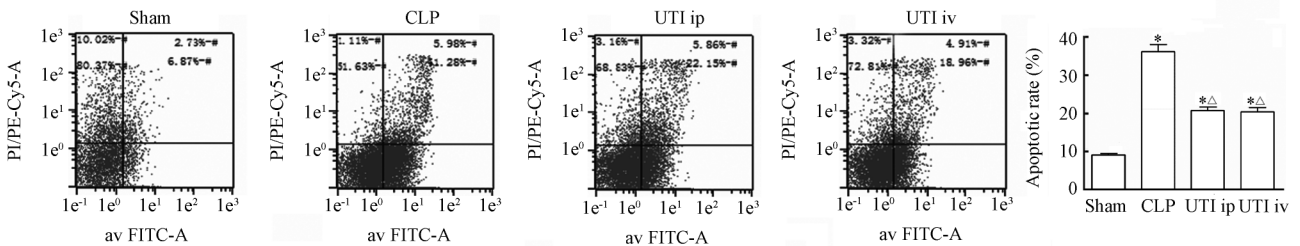


图 2 流式细胞术检测各组小鼠胸腺 T 细胞凋亡

Fig 2 Thymus T cell apoptosis in mice of different groups by flow cytometry

CLP: Cecal ligation and puncture; UTI ip: CLP plus UTI (100 000 U/kg) by intraperitoneal injection; UTI iv: CLP plus UTI (100 000 U/kg) by intravenous injection. * $P < 0.05$ vs Sham group; △ $P < 0.05$ vs CLP group. $n=10, \bar{x} \pm s$

2.3.2 各组小鼠脾脏淋巴细胞凋亡的变化 CLP 组、UTI ip 组和 UTI iv 组脓毒症小鼠脾脏淋巴细胞凋亡程度均高于 Sham 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); UTI ip 组和 UTI iv 组脓毒症小鼠脾脏淋巴

细胞凋亡程度与 CLP 组相比降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); UTI ip 组和 UTI iv 组脓毒症小鼠脾脏淋巴细胞凋亡程度差异无统计学意义 (图 3)。提示 UTI 治疗可以降低脾脏淋巴细胞凋亡程度。

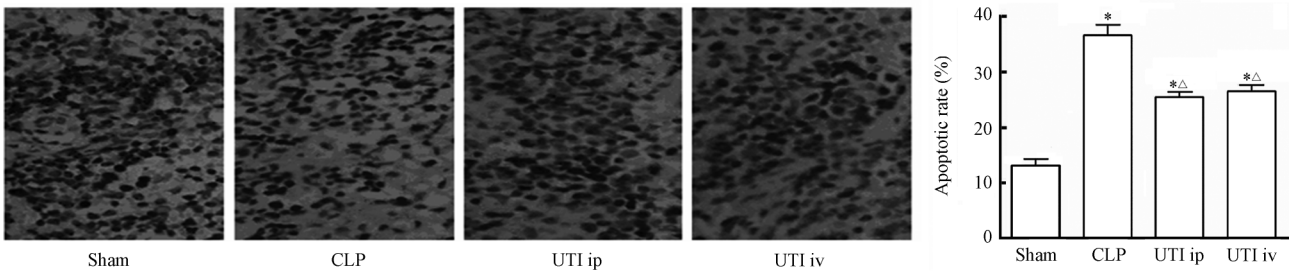


图3 TUNEL法检测各组小鼠脾脏淋巴细胞凋亡

Fig 3 Spleen lymphocyte apoptosis of mice in different groups by TUNEL

CLP: Cecal ligation and puncture; UTI ip; CLP plus UTI (100 000 U/kg) by intraperitoneal injection; UTI iv; CLP plus UTI (100 000 U/kg) by intravenous injection. * $P < 0.05$ vs Sham group; $\Delta P < 0.05$ vs CLP group. $n = 10, \bar{x} \pm s$

3 讨论

脓毒症是临床危重患者主要死亡原因之一,其发生和发展是机体促炎与抗炎机制失衡所致。当疾病发展到一定程度,机体免疫功能受到不同程度抑制,最终形成以大量免疫细胞凋亡和严重免疫麻痹为特征的高致命性免疫混乱状态。免疫细胞凋亡造成的免疫细胞数量与功能丧失是导致重度脓毒症患者高死亡率的主要原因之一^[2, 13]。UTI是从健康成年男性尿液中提取的一种广谱蛋白酶抑制剂,能有效抑制多种蛋白水解酶的活性,还具有调节炎症因子的释放,稳定溶酶体膜,抑制氧自由基和心肌抑制因子的产生等功能。近年来,有临床研究注意到UTI可以对手术应激反应引起的机体免疫功能障碍产生影响^[14],并能改善癌症患者围手术期的免疫状态^[15],可以调节脓毒症患者淋巴细胞亚群的比例^[16]。Sato等^[14]临床研究结果表明UTI对手术应激引发的免疫缺陷有较好的纠正作用。

本实验设计首先进行了7 d生存率的研究,进行7 d生存率的研究不仅可以验证CLP脓毒症模型的创建是否成功,还可以了解UTI对脓毒症的治疗效果。经过对本实验室既往研究结果以及国内外在脓毒症基础研究方面的成果^[10, 17-18]进行总结得出,CLP模型脓毒症小鼠7 d生存率的高低与动物年龄、性别、种系、穿孔大小、盲肠结扎程度,施术者手法以及漏入腹腔的粪便物质等有关。对于8~10周C57BL/6体质量为22~30 g的雄性小鼠,本实验室经过多次重复实验得出,在CLP模型创建成功后在无任何干扰因素的情况下小鼠7 d生存率为20%~40%,本实验中模型组小鼠7 d生存率为40%,提示CLP模型创建成功。CLP模型小鼠死亡率最高时段是术后24~48 h,一般来说存活时间超过7 d的小鼠,在不受外界干扰的情况下,机体逐步进入一个自愈期^[17]。临床上脓毒症的死亡率之所以居高不

下,其中一个最主要的原因就是脓毒症基础上的二重或三重感染^[19]。从生存率的研究结果中我们可以了解到,UTI治疗可以显著改善CLP模型脓毒症小鼠的7 d生存状况。

本实验在7 d生存率研究的基础上对CLP术后24 h小鼠外周血、胸腺和脾脏淋巴细胞进行计数并对胸腺和脾脏淋巴细胞凋亡进行检测,开展UTI对CLP模型脓毒症小鼠免疫功能指标的研究。国内外研究已证实适应性免疫反应主要由淋巴细胞介导,它们在细胞因子和特异性抗原的刺激下可迅速扩增,产生特异性免疫反应。淋巴细胞凋亡增加是脓毒症常见的病理变化。Hotchkiss等^[20]发现淋巴细胞凋亡与脓毒症严重性相关。一方面,淋巴细胞凋亡促使细胞免疫功能低下,另一方面大量淋巴细胞凋亡使机体处于免疫抑制状态,不能有效调控特异性的免疫反应以抵抗病原体的感染,导致多器官衰竭甚至死亡^[21-22]。在本研究中,CLP术后24 h,UTI治疗组外周血、胸腺和脾脏淋巴细胞计数高于模型组,胸腺和脾脏组织淋巴细胞凋亡低于模型组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。本研究还对不同给药方式进行了对比研究,结果发现不同给药方式组间各项观测指标差异无统计学意义,表明不同给药方式对UTI治疗效果影响不大。本实验之所以设置不同给药方式的对照研究,是因为在以小鼠为研究对象的脓毒症基础研究中UTI给药方式大多是采用腹腔内给药^[23],但临床应用UTI治疗脓毒症大多采用的是静脉给药,为了使实验研究更接近临床,所以设置了经静脉给药治疗组。

综上所述,应用UTI治疗可以显著改善脓毒症小鼠的7 d生存率,可能与其显著升高脓毒症小鼠外周血、胸腺和脾脏淋巴细胞数量,有效降低脓毒症小鼠胸腺和脾脏组织淋巴细胞凋亡等有关。不同给药方式(UTI ip和UTI iv)对脓毒症小鼠的7 d生存率及免疫功能指标的影响差异无统计学意义。但

该研究也存在着一定的不足之处。因为脓毒症免疫细胞凋亡机制相当复杂,已经明确的有:(1)半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)家族在细胞凋亡过程中起着重要的作用^[24]; (2)Bcl家族在T细胞凋亡中起着精确调控的作用^[25-26]; (3)线粒体可通过释放诱发caspase激活的蛋白,参与免疫细胞的凋亡; (4)TNF- α 还可以通过与TNFR1结合而激活caspase-2,引起细胞凋亡的增加^[27]。基础研究发现,caspase抑制剂能通过减少免疫细胞的凋亡而增强机体的免疫功能,从而降低脓毒症动物的死亡率^[28]。也有研究证明,上调抗凋亡基因Bcl-2,可以降低免疫细胞的凋亡,改善实验脓毒症动物的生存状况,减少MODS及免疫抑制的发生^[19]。本实验在UTI对免疫细胞凋亡机制的影响方面,还有待于进一步探讨和研究。

[参考文献]

[1] Unsinger J, McGlynn M, Kasten K R, Hoekzema A S, Watanabe E, Muenzer J T, et al. IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis[J]. *J Immunol*, 2010, 184: 3768-3779.

[2] Hotchkiss R S, Tinsley K W, Karl I E. Role of apoptotic cell death in sepsis[J]. *Scand J Infect Dis*, 2003, 35: 585-592.

[3] Lang J D, Matute-Bello G. Lymphocytes, apoptosis and sepsis: making the jump from mice to humans[J]. *Crit Care*, 2009, 13: 109.

[4] Sriskandan S, Altmann D M. The immunology of sepsis[J]. *J Pathol*, 2008, 214: 211-223.

[5] Weber S U, Lehmann L E, Schewe J C, Thiele J T, Schröder S, Book M, et al. Low serum alpha-tocopherol and selenium are associated with accelerated apoptosis in severe sepsis[J]. *Biofactors*, 2008, 33: 107-119.

[6] Weber P, Wang P, Maddens S, Wang P Sh, Wu R, Miksa M, et al. VX-166: a novel potent small molecule caspase inhibitor as a potential therapy for sepsis[J]. *Crit Care*, 2009, 13: R146.

[7] Cao Z L, Okazaki Y, Naito K, Ueno T, Natsuaki M, Itoh T. Ulinastatin attenuates reperfusion injury in the isolated blood-perfused rabbit heart[J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, 69: 1121-1126.

[8] Inoue K, Takano H. Urinary trypsin inhibitor as a therapeutic option for endotoxin-related inflammatory disorders[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010, 19: 513-520.

[9] Tanaka R, Fujita M, Tsuruta R, Fujimoto K, Aki H S, Kumagai K, et al. Urinary trypsin inhibitor suppresses excessive generation of superoxide anion radical, systemic inflammation, oxidative stress, and endothelial injury in endotoxemic rats[J]. *Inflamm Res*, 2010, 59: 597-606.

[10] Medina E. Murine model of polymicrobial septic peritonitis using cecal ligation and puncture (CLP) [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 602: 411-415.

[11] Hotchkiss R S, Opal S. Immunotherapy for sepsis—a new approach against an ancient foe[J]. *N Engl J Med*, 2010, 363: 87-89.

[12] Inoue S, Unsinger J, Davis C G, Muenzer J T, Ferguson T A, Chang K, et al. IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis [J]. *J Immunol*, 2010, 184: 1401-1409.

[13] Bilbault P, Lavaux T, Lahlou A, Uring-Lambert B, Gaub M P, Ratomponirina C, et al. Transient Bcl-2 gene down-expression in circulating mononuclear cells of severe sepsis patients who died despite appropriate intensive care[J]. *Intensive Care Med*, 2004, 30: 408-415.

[14] Sato N, Endo S, Kimura Y, Ikeda K, Aoki K, Iwaya T, et al. Influence of a human protease inhibitor on surgical stress induced immunosuppression[J]. *Dig Surg*, 2002, 19: 300-305.

[15] Hosokawa T, Hori Y, Nakagawa H, Nakagawa M, Hashimoto T, Miyazaki M. [Effect of urinastatin on immunity during anesthesia and surgery for malignant disease][J]. *Masui*, 1989, 38: 1341-1348.

[16] 杜春艳, 邢韩, 孙栎. 乌司他丁对重度脓毒症患者淋巴细胞亚群的影响[J]. *中华急诊医学杂志*, 2006, 15: 441-443.

[17] Lin Z Y, Xu P B, Yan S K, Meng H B, Yang G J, Dai W X, et al. A metabonomic approach to early prognostic evaluation of experimental sepsis by ¹H NMR and pattern recognition[J]. *NMR Biomed*, 2009, 22: 601-608.

[18] Xu P B, Lin Z Y, Meng H B, Yan S K, Yang Y, Liu X R, et al. A metabonomic approach to early prognostic evaluation of experimental sepsis[J]. *J Infect*, 2008, 56: 474-481.

[19] O'Brien J M Jr, Ali N A, Abercgg S K, Abraham E. Sepsis[J]. *Am J Med*, 2007, 120: 1012-1022.

[20] Hotchkiss R S, Osmon S B, Chang K C, Wagner T H, Cooper-Smith C M, Karl I E. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways [J]. *J Immunol*, 2005, 174: 5110-5118.

[21] Carrol E D. Comment on "IL-15 prevents apoptosis, reverses innate and adaptive immune dysfunction, and improves survival in sepsis" and comment on "IL-7 promotes T cell viability, trafficking, and functionality and improves survival in sepsis" [J]. *J Immunol*, 2010, 185: 789-790.

[22] Feng H, Guo L, Song Z, Gao H, Wang D, Fu W, et al. Caveolin-1 protects against sepsis by modulating inflammatory response, alleviating bacterial burden, and suppressing thymocyte apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 25154-25160.

[23] Zhang Y J, Li M, Meng M, Feng M, Qin C Y. The effect of ulinastatin on the small intestine injury and mast cell degranulation in a rat model of sepsis induced by CLP[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2009, 61: 481-490.

[24] Hotchkiss R S, Chang K C, Swanson P E, Tinsley K W, Hui J J, Klender P, et al. Caspase inhibitors improve survival in sepsis; a critical role of the lymphocyte[J]. *Nat Immunol*, 2000, 1: 496-501.

[25] Hotchkiss R S, Swanson P E, Knudson C M, Chang K C, Cobb J P, Osborne D F, et al. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis[J]. *J Immunol*, 1999, 162: 4148-4156.

[26] Wagner T H, Drewry A M, Macmillan S, Dunne W M, Chang K C, Karl I E, et al. Surviving sepsis; bcl-2 overexpression modulates splenocyte transcriptional responses *in vivo* [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007, 292: R1751-R1759.

[27] 姚咏明, 盛志勇. 脓毒症防治学[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2008: 171.

[28] Fukuzuka K, Edwards C K 3rd, Clare-Salzler M, Copeland E M 3rd, Moldawer L L, Mazingo D W. Glucocorticoid-induced, caspase-dependent organ apoptosis early after burn injury[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000, 278: R1005-R1018.