

亲和吸附材料特异性清除肠源性内毒素 有效性和安全性探讨

向勇平^{1,2}, 崔辉^{2,3}, 刘丹^{2,3}, 于杰⁴, 周立冬⁴, 杨建明⁵, 刘爱兵^{2,3*}

- (1. 锦州医科大学武警总医院研究培养基地, 北京 100039; 2. 武警总医院医学实验中心, 北京 100039;
3. 灾害救援医学北京市重点实验室, 北京 100039; 4. 天津市阳权医疗器械有限公司, 天津 300350;
5. 天津市港口医院, 天津 300350)

【摘要】 目的 探究本课题组研发的亲和吸附材料特异性清除肠源性内毒素的有效性及安全性。**方法** 运用阑尾结扎穿孔的方法建立犬肠源性内毒素血症模型, 进行灌流治疗。实验过程中选取多个时间点, 监测生命体征, 采血检测内毒素含量及血液生理生化指标。**结果** 灌流吸附1、2 h后内毒素含量为 (0.49 ± 0.22) 、 (0.034 ± 0.00) Eu/mL, 与灌流开始 (7.25 ± 1.18) Eu/mL相比, 差异有显著性($P < 0.05$)。灌流2 h后平均清除率 $R = 99.52\%$ 。灌注治疗后白细胞、红细胞、血红蛋白、血小板、总蛋白、白蛋白、球蛋白、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、尿素、肌酐指标均有所下降, 与灌流开始相比差异有显著性($P < 0.05$), 各值均在正常值范围。灌流过程中犬的生命体征平稳。**结论** 本课题研发的亲和吸附材料能高效清除实验犬血液中内毒素并具有良好的血液相容性。

【关键词】 内毒素; 肠源性内毒素血症; 血液灌流; 亲和吸附材料; 犬

【中图分类号】 Q95-33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1005-4847(2018) 01-0052-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.01.008

Efficacy and safety of the removal of intestinal endotoxin in the blood by affinity adsorption materials

XIANG Yongping^{1,2}, CUI hui^{2,3}, LIU dan^{2,3}, YU jie⁴, ZHOU Lidong⁴, YANG Jianming⁵, LIU Aibing^{2,3*}

- (1. Postgraduate Training Base, the General Medical Experimental Center, Hospital of Chinese People's Armed Police Forces of Jinzhou Medical University, Beijing 100039, China. 2. General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039. 3. Beijing Key Laboratory of Disaster Rescue Medicine, Beijing 100039.
4. Tianjin Yangquan Medical Instrument Limited Company, Tianjin 300350. 5. Tianjin Port Hospital, Tianjin 300350)
Corresponding author: LIU Aibing. E-mail: doctor_liuailing@aliyun.com

【Abstract】 Objective To investigate the efficacy and safety of the affinity adsorption material for removal of intestinal endotoxin in the blood. **Methods** To establish a canine model of intestine-derived endotoxemia by ligation and perforation of the appendix. Hemoperfusion was performed to treat the endotoxemia in model dogs. In the experiment, we monitored vital signs and detect the content of endotoxin and blood physiological and biochemical indexes at different time points. **Results** The endotoxin content was (0.49 ± 0.22) , (0.034 ± 0.00) Eu/mL after hemoperfusion for 1 and 2 hours, compared with that before the beginning of perfusion (7.25 ± 1.18) Eu/mL, showing a significant difference ($P < 0.05$). After treatment for 2 hours, the average clearance rate was 99.52%. White blood cells, red blood cells, hemoglobin, platelets, total protein, albumin, globulin, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, urea and creatinine

【基金项目】 国家高技术研究发展计划(No. 2015AA033904)。

Funded by National High Technology Research and Development Plan(No. 2015AA033904).

【作者简介】 向勇平(1988-), 男, 在读硕士研究生, 专业: 临床检验诊断学。E-mail: 15727377289@163.com

【通信作者】 刘爱兵(1956-), 男, 博士生导师, 专业: 临床检验诊断学。E-mail: doctor_liuailing@aliyun.com

index were significantly decreased after perfusion ($P < 0.05$). The index values were in a normal range and vital signs were stable during the perfusion. **Conclusions** The affinity adsorption material developed by our team can effectively remove endotoxin in the blood of experimental dogs and has good blood compatibility.

[Key words] endotoxin; intestinal endotoxin; hemoperfusion; affinity adsorption material; dogs

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

内毒素血症可分为内源性和外源性,内源性内毒素主要来源于肠腔内细菌和毒素移位^[1],严重的创伤应激等可导致内毒素通过受损的肠屏障入侵到体循环^[2],引发内源性内毒素血症,进而引起一系列临床症状。目前,内毒素血症治疗方法有抗生素、抗内毒素抗体、中医药等^[3]。抗生素会造成菌体死亡破裂后产生更多的内毒素,而引起更严重的临床症状^[4]。抗内毒素抗体由于生产工艺复杂、成本高价格贵大面积推广尚不现实^[5]。中医药治疗内毒素血症的研究方面近年取得了一些进展^[6]。但以上治疗方法均无法有效快速的降低患者体内的内毒素含量。据研究早期迅速有效地清除患者体内的内毒素,及时阻断疾病的发生、发展,具有重要意义。因而血液净化灌流技术引起了学者的关注^[7],近年国内外通过血液灌流的方法直接清除血液中内毒素,并在动物实验中取得一定效果^[8]。本试验利用本课题组研发的亲和吸附材料,制成一次性血液灌流器,来清除实验犬肠源性内毒素,证明该材料对清除内毒素的有效性及其安全性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

普通级比格犬 7 只(雌性 3 只,雄性 4 只),体重 (10 ± 2) kg, 1 ~ 2 岁龄,均由军事医学科学院实验动物中心【SCXK(军)2012-0002】提供;无孕,在军事医学科学院实验动物中心【SYXK(军)2012-004】饲养 1 周后进行实验,实验前 12 h 禁食不禁水,实验按照实验动物 3R 原则给予人道主义关怀。

1.1.2 亲和吸附材料及灌流器

本课题组由天津市阳权医疗器械有限公司研发低密度聚合物特异亲和高分子吸附材料,制成一次性使用血液灌流器(DHC-II-340 型),该灌流器供本课题犬血液灌流使用。

1.1.3 主要器材和试剂

大型动物麻醉机(北京众实迪创 ZS-M) 心电监护仪(深圳迈瑞 ipM12) 异氟烷(河北一品制药) 氯安酮 胃复安 阿托品 盐酸曲马多 采血管(除热源)

ELX808 酶标仪(厦门鲎试剂生物科技有限公司) 内毒素检测鲎试剂盒(厦门鲎试剂实验厂有限公司) DTX880 酶标仪(美国贝克曼)。

1.2 实验方法

1.2.1 犬肠源性内毒素模型建立

实验犬给予 0.25 mL 阿托品肌注并氯胺酮 4 mg/kg 加胃复安 10 mg 肌注诱导麻醉,仰卧位固定四肢,异氟烷维持麻醉,备皮消毒,腹中线开口,切开腹膜,在阑尾与盲肠处 7 号线结扎,使用 7 号针头在阑尾上横穿扎孔,针头贯穿两次,从针孔处挤出少量肠内容物,将盲肠放回腹腔,缝合。术中静脉给予 250 mL 生理盐水补液,术后 10 mg/kg 肌注盐酸曲马多止痛,两次,每次 12 h。灌流结束后做阑尾切除术及相应的术后处理。

1.2.2 灌流器肝素化处理

启动血泵,生理盐水 300 mL + 肝素 10 mg 以 100 mL/min 的速度冲洗灌流器,排尽管道中的空气,完成灌流通路的肝素化,最后生理盐水 250 mL + 肝素 50 mg 在灌流通路中闭式循环 10 min 后备用。

1.2.3 血液灌流治疗

钝性分离实验犬右侧股动脉,连接灌流导管、血泵和灌流器,形成闭合体外循环通路。血泵提供动力,血液经过灌流器后返回体内。肝素 12 mg/h 泵入,结束前 30 min 停止使用。灌流 2 h 后,采用空气回血法使血液流回犬体内,缝合伤口。

1.3 检测指标

1.3.1 内毒素检测

在造模前和灌流开始(造模后 24 h)、灌流 1、2 h 抽血 2 mL,用动态浊度法测定犬血液中内毒素水平。内毒素清除率计算方法: $R(\%) = (C_0 - C_t) / C_0 \times 100\%$, C_0 、 C_t 分别为内毒素的初始浓度及 t 时间吸附后的浓度。

1.3.2 血常规、生化指标检测

造模前和灌流开始(造模后 24 h)、灌流 1、2 h 抽血 2 mL 送往解放军二五四医院检验科检测。造模开始前的所有指标均视为基础值。

1.3.3 生命体征监测

造模前、造模后的 4、12 h 和灌流开始(造模后

24 h)、灌流 0.5、1、1.5、2 h 测量犬的体温、心率。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,符合正态分布的资料结果均以($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用配对 t 检验和单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 灌流后犬血液中内毒素水平

灌流后犬血液中内毒素水平:灌流开始(即造模 24 h 后)为(7.25 ± 1.18) Eu/mL,灌流治疗 1、2 h

后分别为(0.49 ± 0.22)、(0.034 ± 0.00) Eu/mL,与灌流开始比较,差异有显著性($P < 0.05$)。灌流 2 h 后平均清除率 $R = 99.52\%$ 。

2.2 灌流前后血常规指标变化

造模后比格犬血液中的白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(Hb)、血小板(PLT)值均出现下降,如表 1 所示。灌流开始 WBC、RBC、PLT 与基础值比较差异有显著性($P < 0.05$)。灌流 1、2 h 后 WBC、RBC、PLT 与灌流开始相比,差异有显著性($P < 0.05$)。血红蛋白(Hb)灌流 1、2 h 后与灌流开始相比,差异无显著性($P > 0.05$)。

表 1 灌流前后犬血常规的变化($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Tab.1 Changes of the results of blood routine test in the dogs before and after perfusion($\bar{x} \pm s, n = 7$)				
组别 Groups	WBC ($10^9/L$)	RBC ($10^{12}/L$)	Hb (g/L)	PLT ($10^9/L$)
基础值 Base value	12.80 $\pm$ 2.16	6.30 $\pm$ 0.53	155.43 $\pm$ 7.23	352 $\pm$ 32.30
灌流开始 Perfusion begins	7.55 $\pm$ 0.41	5.55 $\pm$ 0.26	144 $\pm$ 17.84	219.43 $\pm$ 8.38
灌流 1 h 1 h perfusion	7.48 $\pm$ 0.55 *	5.15 $\pm$ 0.2	146.71 $\pm$ 25.61 *	184.29 $\pm$ 7.34 *
灌流 2 h 2 h perfusion	7.56 $\pm$ 0.55 *	5.30 $\pm$ 0.41	141.72 $\pm$ 19.57 *	191.71 $\pm$ 5.47 *

注:与灌流开始比较,* $P < 0.05$ 。
Note. Compared with that at the perfusion beginning, * $P < 0.05$.

表 2 灌流前后犬血液生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Tab.2 Blood biochemical indexes of dogs before and after perfusion($\bar{x} \pm s, n = 7$)						
组别 Groups	TP (g/L)	Alb (g/L)	Glo (g/L)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Urea (mmol/L)
基础值 Base value	64.59 $\pm$ 5.43	28.23 $\pm$ 2.32	36.36 $\pm$ 4.48	27.41 $\pm$ 3.97	30.21 $\pm$ 2.81	4.75 $\pm$ 1.15
灌流开始 Perfusion beginning	59.70 $\pm$ 5.45	26.39 $\pm$ 2.57	33.31 $\pm$ 3.76	29.10 $\pm$ 8.89	18.79 $\pm$ 5.20	3.84 $\pm$ 1.44
灌流 1 h 1 h perfusion	54.67 $\pm$ 4.59 *	24.39 $\pm$ 2.44 *	30.28 $\pm$ 2.42 *	25.89 $\pm$ 8.76	16.73 $\pm$ 5.25 *	3.63 $\pm$ 1.11 *
灌流 2 h 2 h perfusion	52.18 $\pm$ 3.33 *	22.16 $\pm$ 1.65 *	28.81 $\pm$ 2.60 *	20.05 $\pm$ 3.12	15.53 $\pm$ 5.57 *	3.10 $\pm$ 0.46 *

	Cr ($\mu\text{mol/L}$)	K ⁺ (mol/L)	Na ⁺ (mol/L)	Cl ⁻ (mol/L)	Ca ²⁺ (mol/L)
基础值 Base value	71.64 $\pm$ 10.74	4.75 $\pm$ 0.61	138.56 $\pm$ 7.39	107.78 $\pm$ 5.07	2.34 $\pm$ 0.21
灌流开始 Perfusion beginning	66.96 $\pm$ 9.95	4.76 $\pm$ 0.58	137.89 $\pm$ 6.94	105.80 $\pm$ 4.30	2.30 $\pm$ 0.31
灌流 1 h 1 h perfusion	65.61 $\pm$ 10.27 *	4.71 $\pm$ 0.56	137.39 $\pm$ 5.46	106.03 $\pm$ 4.52	2.22 $\pm$ 0.29
灌流 2 h 2 h perfusion	56.95 $\pm$ 1.49 *	4.60 $\pm$ 0.59	138.67 $\pm$ 4.45	105.32 $\pm$ 4.93	2.21 $\pm$ 0.32

注:与灌流开始比较,* $P < 0.05$ 。
Note. Compared with that at the perfusion beginning, * $P < 0.05$.

2.3 灌流对生理生化指标的影响

造模前后血液中总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)、球蛋白(Glo)、谷草转氨酶(AST)、尿素(Urea)、肌酐(Cr)、钾(K^+)、钠(Na^+)、氯(Cl^-)、钙(Ca^{2+})的水平如表 2。由表 2 可知,造模后犬的 TP、Alb、Glo 下降。灌流治疗 1、2 h 后血清 TP、Alb、Glo 指标再次下降,与灌流开始相比差异有显著性($P < 0.05$)。造模后 ALT 值上升,灌流后逐渐下降。灌流 1、2 h 与灌流开始相比差异有显著性($P < 0.05$)。造模后 AST、Urea、Cr 值下降,灌流 1、2 h 后含量进一步下降,与灌流开始比差异有显著性($P < 0.05$)。电解质各组间相比较及与基础值比较,差异均无显著性($P > 0.05$)。

2.4 实验过程中比格犬体温和心率变化

由图 1、图 2 可见,与基础值相比,造模后比格犬体温上升,心率加快。经过灌流治疗 0.5、1、1.5、2 h 后,体温逐渐下降,心率减缓。灌流过程中比格犬的心率和体温变化不大,趋于平稳。

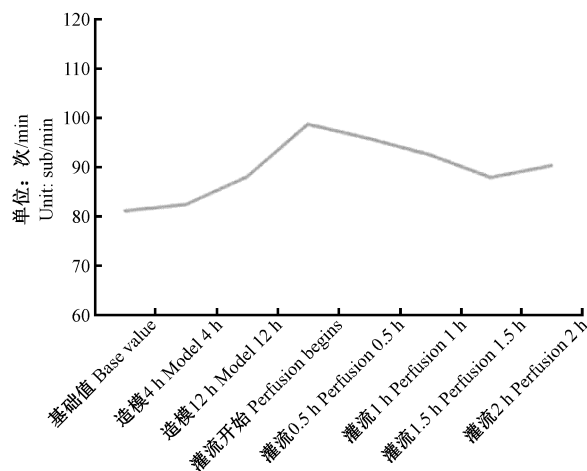


图 1 灌流前后比格犬心率变化

Fig. 1 Changes of heart rate in the beagle dogs before and after perfusion

3 讨论

近来随着材料技术和免疫学的快速发展,吸附材料的发展也日新月异,医学上所用到的吸附灌流材料也展现出不错的前景^[9-10]。与机体血液直接接触的灌流吸附剂必须具备如下条件^[11]:具有安全性无毒副作用且具有良好的血液相容性,理化性能稳定,易储存消毒方便,要有可靠而明显的疗效。本课题组选择亲水单烯和疏水芳香双烯单体制得“双亲性”大孔共聚物,再引入间隔臂将此共聚物与

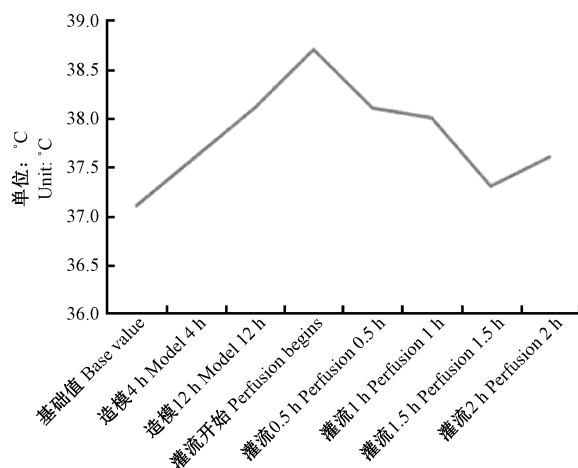


图 2 灌流前后比格犬体温变化

Fig. 2 Changes of body temperature in the beagle dogs before and after perfusion

含大量氨基酸的配基相连制成“双亲型”亲和吸附材料,这种吸附材料无毒、无味、可降解及良好的血液相容性,也能够高效的清除血液中的内毒素及内毒素作用下机体产生的炎症介质,并且能够在使用中具有良好的稳定性。

本实验结果表明,灌流 2 h 后内毒素平均清除率达到 99.52%。说明吸附柱灌流治疗能明显的降低犬血液中内毒素的水平。体现了灌流治疗的有效性。造模后比格犬体温上升,心率增快,灌流治疗中体温逐渐下降,心率减缓,趋于平稳。造模后血常规各项指标下降,灌注后 WBC、RBC、PLT 继续下降,可能是由于内毒素本身引起的^[12],或是实验中大量补液导致,PLT 下降还可能与使用肝素有关^[13],有待进一步研究。灌流过程中 TP、Alb 及 Glo 均出现一定程度下降,与灌流开始相比差异有显著性($P < 0.05$)。原因有待进一步研究分析。ALT 在造模后升高,灌流后有所下降,AST、Urea、Cr 造模后含量下降,吸附灌注后进一步下降。灌流治疗对内毒素血症比格犬电解质影响甚微,各组间相比较及与基础值比较,差异均无显著性($P > 0.05$)。结果提示灌流治疗内毒素血症比格犬体内 WBC、RBC、Hb、PLT、ALT、AST、Urea、Cr 指标下降,但均未超出正常值范围。以上说明灌流治疗具有较好的血液相容性,安全性良好。

综上所述,本课题所研发的亲和吸附材料对血液内毒素有高效的清除作用且具有良好的血液相容性。能较好的处理战地、地震等灾害中由烧伤、挤压和严重感染等引发的内毒素血症,从而缓解病情

挽救生命,同时也具有广阔的临床应用前景。

参 考 文 献(References)

- [1] Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes [J]. World J Surg, 1996, 20(4): 411–417.
- [2] Redan JA, Rush BF, Mccullough JN, et al. Organ distribution of radiolabeled enteric Escherichia coli during and after hemorrhagic shock [J]. Ann Surg, 1990, 211(6): 666–668.
- [3] 李永桂, 杨正根, 曾萍, 等. 内毒素血症的发病机制及治疗研究进展 [J]. 广东化工, 2016, 43(11): 143–144.
Li YG, Yang ZG, Ceng P, et al. Progress in pathogenesis and treatment of endotoxemia [J]. Guangdong Chem Ind, 2016, 43(11): 143–144.
- [4] 蒋建新, 姚咏明, 郑江. 细菌内毒素基础与临床 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2004.
Jiang JX, Yao YM, Zheng J. Basic and clinical of bacterial endotoxin [M]. Beijing: People's Military Medical Publishing House, 2004.
- [5] Axtelle T, Pribble J. IC14, a CD14 specific monoclonal antibody, is a potential treatment for patients with severe sepsis [J]. J Endotoxin Res. 2001, 7(4): 310–314.
- [6] 毛毛, 李勇. 大黄解毒汤灌肠治疗慢性乙型病毒性肝炎肠源性内毒素血症 45 例 [J]. 陕西中医, 2010, 31(5): 515–516.
Mao M, Li Y. Rhubarb detoxification decoction enema treatment of chronic hepatitis B 45 cases of intestinal endotoxemia [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2010, 31(5): 515–516.
- [7] Chandy T, Rao GH. Evaluation of heparin immobilized chitosan-PEG microbeads for charcoal encapsulation and endotoxin removal [J]. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 2009, 28(1): 65–77.
- [8] Mitaka C, Fujiwara N, Yamamoto M, et al. Polymyxin B-immobilized fiber column hemoperfusion removes endotoxin throughout a 24-hour treatment period [J]. J Crit Care, 2014, 29(5): 728–732.
- [9] 张波, 何建川. 血液灌流用内毒素吸附剂的研究进展 [J]. 医学研究杂志, 2011, 40(5): 153–154.
Zhang B, He JC. Research progress of endotoxin adsorbent for hemoperfusion [J]. J Med Res, 2011, 40(5): 153–154.
- [10] Harm S, Falkenhagen D, Hartmann J. Endotoxin adsorbents in extracorporeal blood purification; do they fulfill expectations? [J]. Int J Artif Organs, 2014, 37(3): 222–232.
- [11] 田爽, 李涛. 用血液灌流治疗内毒素血症的研究进展 [J]. 国际生物医学工程杂志, 2009, 32(1): 50–54.
Tian S, Li T. Research progress of hemoperfusion in the treatment of endotoxemia [J]. Int Biomed Eng, 2009, 32(1): 50–54.
- [12] Shoji H. Extracorporeal endotoxin removal for the treatment of sepsis: endotoxin adsorption cartridge (toraymyxin) [J]. Ther Apher Dial, 2003, 7(1): 108–114.
- [13] 王质刚. 血液净化模式与临床应用 [M]. 北京: 科学技术出版社, 2008.
Wang ZG. Blood purification model and clinical application [M]. Beijing science and Technology Press, 2008.

[收稿日期] 2017-07-24