

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.01.002
文章编号: 1005-8982(2018)01-0006-05

亲和吸附材料应用于血液灌流治疗外源性 内毒素血症的安全性研究*

向勇平¹, 崔辉², 于杰³, 刘丹², 刘理金⁴, 周立冬⁴, 杨建明⁵, 刘爱兵²

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

摘要: 目的 评估课题组研发的亲和吸附材料特异清除外源性内毒素的安全性。**方法** 15只比格犬静脉输注内毒素(Sigma)复制内毒素血症模型, 随机分为治疗组($n=10$)和对照组($n=5$), 治疗组用课题组研发的一次性血液灌流器进行干预, 对照组不用该灌流器。实验前后监测生命体征并于灌流开始、灌流60及120 min采集血液标本检测生化、血常规和凝血功能。**结果** 治疗组体温及呼吸在灌流后逐步下降, 对照组则上升。灌流开始、灌流120 min治疗组血小板(PLT)为 $(222.50 \pm 14.19) \times 10^9/L$ 、 $(199.00 \pm 18.18) \times 10^9/L$, 对照组为 $(233.91 \pm 12.22) \times 10^9/L$ 、 $(222.07 \pm 7.62) \times 10^9/L$, 两组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 灌流开始、灌流120 min治疗组白细胞(WBC)为 $(7.14 \pm 0.10) \times 10^9/L$ 、 $(6.10 \pm 0.19) \times 10^9/L$, 对照组为 $(7.17 \pm 0.11) \times 10^9/L$ 、 $(5.52 \pm 0.54) \times 10^9/L$, 两组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、球蛋白(GLO)治疗组灌流120 min与灌流开始比较, 均差异有统计学意义($P < 0.05$), 灌流120 min均下降; 对照组灌流120 min与灌流开始比较, 均差异有统计学意义($P < 0.05$), 灌流120 min均上升。尿素(Urea)、肌酐(Cr)、尿酸(UA)治疗组灌流120 min后呈下降趋势, 对照组则轻微上升。**结论** 该亲和吸附材料清除实验犬血液中的内毒素具有安全性。

关键词: 亲和吸附材料; 血液灌流; 比格犬; 内毒素血症; 安全性

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Safety of affinity adsorption material used in hemoperfusion in treatment of exogenous endotoxemia*

Yong-ping Xiang¹, Hui Cui², Jie Yu³, Dan Liu², Li-jin Liu⁴, Li-dong Zhou⁴,
Jian-ming Yang⁵, Ai-bing Liu²

(1. Postgraduate Training Base in General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Jinzhou Medical University, Beijing 100039, China; 2. Medical Experimental Center, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China; 3. Tianjin Yangquan Medical Instrument Limited Company, Tianjin 300350, China; 4. Beijing Key Laboratory of Disaster Rescue Medicine, Beijing 100039, China; 5. Tianjin Port Hospital, Tianjin 300350, China)

Abstract: Objective To evaluate the safety of affinity adsorption material for the removal of exogenous endotoxin. **Methods** Fifteen beagle dogs were randomly divided into treatment group ($n=10$) and control group ($n=5$) after intravenous infusion of endotoxin. The treatment group was treated with a blood perfusion apparatus developed by our team, while the control group did not use it. Vital signs were monitored before and after the experiment. Blood samples were collected to detect the biochemical indexes, blood routine and coagulation function

收稿日期: 2017-02-23

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划 (No: 2015AA033904)

[通信作者] 刘爱兵, E-mail: doctor_liuailing@aliyun.com

at the beginning of perfusion, after perfusion for 60 and 120 min. **Results** After treatment, the body temperature and respiratory rate of the treatment group gradually decreased, while those of the control group increased. At the beginning of perfusion and 120 min of perfusion, PLT was $(222.50 \pm 14.19) \times 10^9/L$ and $(199.00 \pm 18.18) \times 10^9/L$ in the treatment group, and $(233.91 \pm 12.22) \times 10^9/L$ and $(222.07 \pm 7.62) \times 10^9/L$ in the control group, there were significant differences between the two groups ($P < 0.05$); WBC was $(7.14 \pm 0.10) \times 10^9/L$ and $(6.10 \pm 0.19) \times 10^9/L$ in the treatment group, and $(7.17 \pm 0.11) \times 10^9/L$ and $(5.52 \pm 0.54) \times 10^9/L$ in the control group, there were significant differences between the two groups ($P < 0.05$). Liver function indexes including ALT, AST, ALP, TP and GLO of the treatment group at 120 min of perfusion were significantly lower than those at the beginning of perfusion ($P < 0.05$), while the indexes of the control group at 120 min of perfusion were higher than those at the beginning of perfusion ($P < 0.05$). Renal function indices including urea, creatinine and uric acid also showed downward trends after perfusion for 120 min in the treatment group, while increased slightly in the control group. **Conclusions** It is safe to remove the endotoxin in the blood of the dog by affinity adsorption material.

Keywords: affinity adsorption material; hemoperfusion; beagle dog; endotoxemia; safety

细菌释放大量的内毒素进入机体循环系统,或输入含有大量内毒素感染的液体,从而引发的一种病理表现称为内毒素血症(endotoxemia, ETM)^[1]。临床上治疗 ETM 的主要方式之一是清除血液中的内毒素,SHOJI 等^[2]通过血液灌流(hemoperfusion, HP)来清除血液中的内毒素取得了显著的效果,有研究证实^[3],不同的吸附材料对内毒素敏感程度不同,然而不同材料的 HP 对人体的副作用也不尽相同。由本课题组研发的高分子吸附材料制备而成的一次性血液灌流器,已在内毒素的清除实验中取得了效果,本文将探究该材料的安全性,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 亲和吸附材料 使用由天津市阳权医疗器械有限公司用低密度聚合物特异性亲和和高分子吸附材料制成的一次性血液灌流器(DHC-II-340),该灌流器供本课题犬血液灌流使用。

1.1.2 实验动物 本实验遵循有关实验动物保护和和使用指南,并通过动物伦理委员会的批准。成年比格犬 15 只,体重 (39 ± 1.8) kg (由军事医学科学院实验动物中心提供),制造内毒素血症模型后随机分为治疗组($n=10$)和对照组($n=5$),治疗组用本课题组研发的一次性血液灌流器进行干预,对照组不用该灌流器。

1.1.3 主要仪器与试剂 心电监护仪(深圳迈瑞科技有限公司 ipM12),大型动物麻醉机(北京众实迪创 ZS-M),内毒素(美国 Sigma 公司 L2880),生化分析仪(日本日立公司 7180),全自动血凝仪(日本积水公司 CP2000)。

1.2 内毒素血症模型的复制

犬禁食、水 12 h 后,用大型动物麻醉机将犬麻醉。内毒素 0.45 mg/kg 溶于生理盐水 100 ml 中经静脉 30 min 完成输注。

1.3 血液灌流的治疗

灌流器肝素化的处理:启动血泵,用含有肝素的生理盐水冲洗灌流器,排除灌流管道和灌流器中的空气。灌流治疗:内毒素输注完 45 min 后,分离犬左侧股动脉,连接灌流导管、血泵和灌流器,形成闭合体外循环通路,对复制模型后的犬使用 1 次性血液灌流器进行灌流。灌流 120 min 后,采用空气回血法让血液流回犬体内,缝合伤口。

1.4 生命体征的监测

在复制模型前及灌流前后监测实验犬的体温、呼吸频率等生命体征。

1.5 血液标本的采集与送检

在灌流开始、灌流 60 及 120 min 采集静脉血,送解放军 254 医院做血常规、凝血及生化分析。

1.6 统计学方法

数据采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用 t 检验或重复测量设计的方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生命体征的比较

复制模型前、灌流开始、灌流 60 及 120 min 实验犬体温、呼吸频率监测见图 1。复制模型后实验犬体温、呼吸频率都上升直到灌流开始,治疗组灌流 60 min 后体温和呼吸频率与灌流开始比较,差异

有统计学意义 ($P < 0.05$), 灌流 60 min 后均有所下降; 对照组灌流 120 min 后体温、呼吸频率与灌流开始比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 灌流 120 min 后均上升。经灌流 120 min 后治疗组体温比较平稳 (37.5 ± 0.63) $^{\circ}\text{C}$, 呼吸频率也保持在 (26.85 ± 0.69) 次/min。

2.2 血常规的比较

治疗组、对照组灌流开始、灌流 60 及 120 min 血常规各指标的变化见表 1。治疗组与对照组灌流开始、灌流 60 及 120 min 相应的血常规指标比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间的白细胞(WBC)有差别 ($F = 7.542, P = 0.011$), 红细胞(RBC)、血红蛋白(Hb)及血小板(PLT)无差别 ($P > 0.05$); ②治疗组与对照组的 WBC、PLT 有差别 ($F = 8.658$ 和 $119.802, P = 0.021$ 和 0.000), RBC、Hb 无差别, 治疗组与对照组相比 WBC 量高, PLT 量低; ③治疗组和对照组 WBC、RBC、Hb、PLT 变化趋势无差别 ($P > 0.05$)。

2.3 血生化的比较

治疗组与对照组灌流开始、灌流 120 min 肝肾功能各指标见图 2。治疗组灌流 120 min 与灌流开始比较,

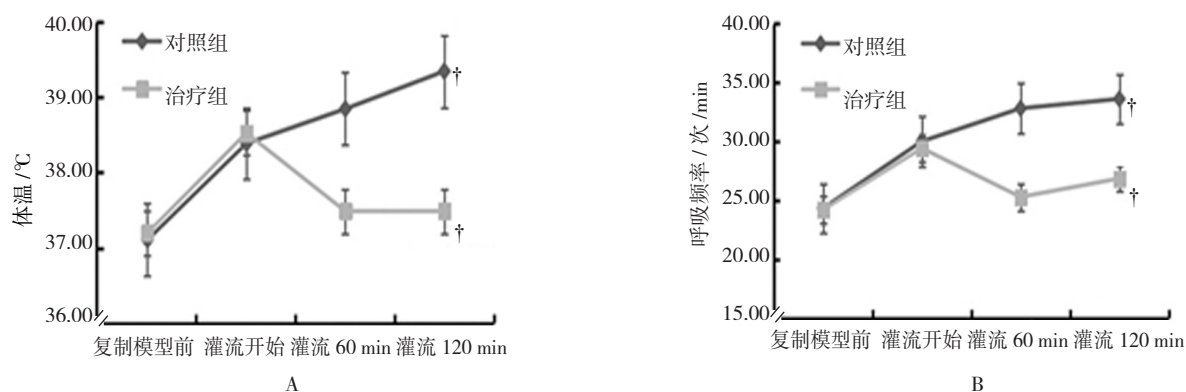
肝肾功能各指标差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 灌流 120 min 均下降 (见图 2A、B); 对照组肝肾功能各指标灌流 120 min 与灌流开始比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 灌流 120 min 都有所上升 (见图 2C、D)。

2.4 凝血指标的比较

治疗组、对照组灌流开始、灌流 60 及 120 min 对凝血各项指标检测见表 2。治疗组与对照组灌流开始、灌流 60 及 120 min 相应的凝血指标比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间的凝血酶原时间(PT)有差别 ($F = 5.892, P = 0.021$), 治疗组、对照组灌流前后 PT 缩短; 凝血酶时间(TT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、纤维蛋白原(FIB)无差别 ($P > 0.05$); ②治疗组与对照组的 PT、TT、APTT、FIB 无差别 ($P > 0.05$); ③治疗组与对照组的 PT、TT、APTT、FIB 变化趋势无差别 ($P > 0.05$)。

2.5 电解质的比较

治疗组、对照组血清中 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} 、 P^{3-} 、 Mg^{2+} 及二氧化碳结合力 (ECO_2) 的水平在灌流前后各时间点都趋于平稳状态, 且各指标变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3。

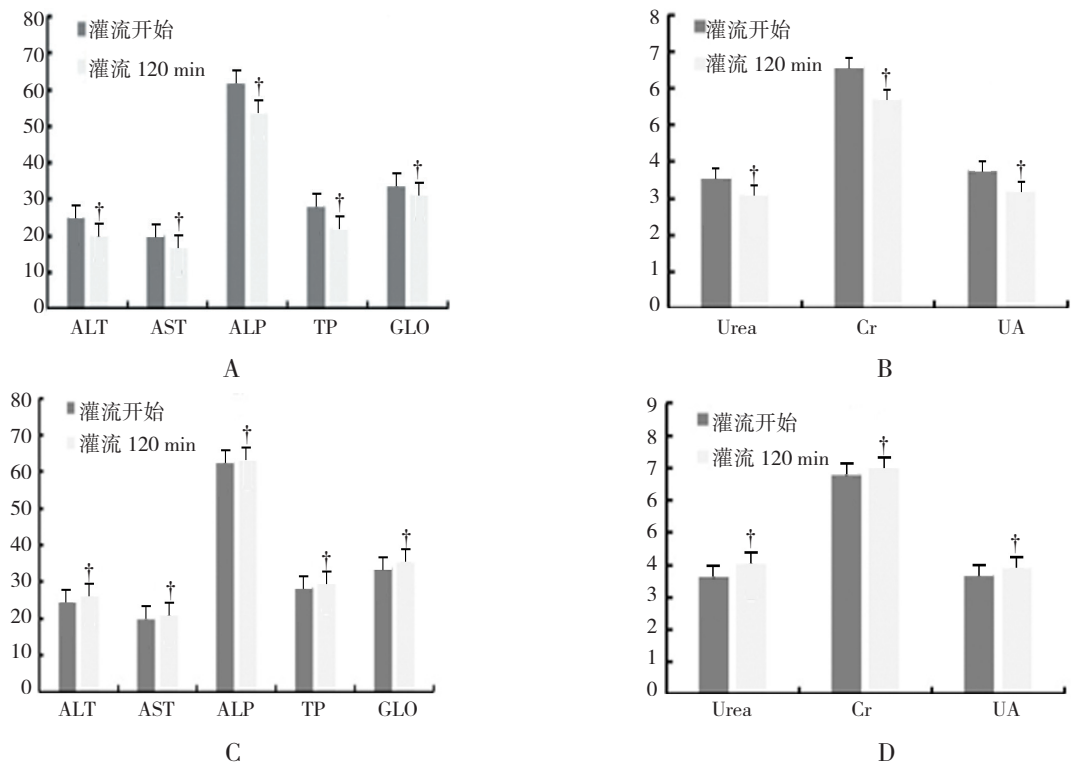


A: 体温变化, B: 呼吸频率变化; † 与灌流开始比较, $P < 0.05$

图 1 两组体温及呼吸频率变化比较

表 1 两组灌流前后血常规的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	灌流开始	灌流 60 min	灌流 120 min
治疗组 ($n = 10$)			
WBC ($\times 10^9/\text{L}$)	7.14 ± 0.10	6.83 ± 0.17	6.10 ± 0.19
RBC ($\times 10^{12}/\text{L}$)	5.91 ± 0.25	5.57 ± 0.34	5.42 ± 0.38
Hb (g/L)	146.14 ± 15.28	153.43 ± 15.94	142.00 ± 15.96
PLT ($\times 10^9/\text{L}$)	222.50 ± 14.19	199.00 ± 18.18	189.71 ± 15.57
对照组 ($n = 5$)			
WBC ($\times 10^9/\text{L}$)	7.17 ± 0.11	6.60 ± 0.17	5.52 ± 0.54
RBC ($\times 10^{12}/\text{L}$)	6.05 ± 0.18	5.80 ± 0.23	5.73 ± 0.45
Hb (g/L)	144.80 ± 4.38	146.00 ± 6.36	150.60 ± 5.50
PLT ($\times 10^9/\text{L}$)	233.91 ± 12.22	232.44 ± 12.39	222.07 ± 7.62



A: 治疗组肝功能; B: 治疗组肾功能; C: 对照组肝功能; D: 对照组肾功能; ALT、AST、ALP 单位: u/L; TP、GLO 单位: g/L; Urea、Cr 单位: 10 mmol/L; UA 单位: 10 μmol/L; †与灌流开始比较, P < 0.05

图 2 两组灌流前后肝肾功能各指标变化

表 2 两组灌流前后凝血指标的比较 (x̄ ± s)

组别	灌流开始	灌流 60 min	灌流 120 min
治疗组 (n = 10)			
PT/s	12.68 ± 0.77	11.77 ± 0.34	11.35 ± 0.27
TT/s	16.07 ± 1.27	16.91 ± 1.36	16.11 ± 1.37
APTT/s	25.12 ± 4.52	25.00 ± 4.58	25.30 ± 4.71
FIB	2.81 ± 0.46	2.88 ± 0.53	2.73 ± 0.46
对照组 (n = 5)			
PT/s	12.51 ± 0.53	11.98 ± 0.46	12.09 ± 0.42
TT/s	16.25 ± 0.29	16.44 ± 0.44	16.23 ± 0.11
APTT/s	25.72 ± 0.91	25.07 ± 0.10	25.40 ± 0.38
FIB	2.68 ± 0.24	2.85 ± 0.08	2.70 ± 0.19

表 3 两组灌流前后电解质指标的比较 (x̄ ± s)

组别	K ⁺ / (mmol/L)	Na ⁺ / (mmol/L)	Cl ⁻ / (mmol/L)	Ca ²⁺ / (mmol/L)	P ³⁺ / (mmol/L)	Mg ²⁺ / (mmol/L)	ECO ₂ / (mmol/L)
治疗组 (n = 10)							
灌流开始	4.69 ± 0.05	136.68 ± 3.39	112.30 ± 4.16	2.33 ± 0.31	1.80 ± 0.26	0.81 ± 0.12	23.90 ± 4.06
灌流 120 min	4.37 ± 0.54	136.60 ± 3.30	110.94 ± 4.18	2.12 ± 0.34	1.56 ± 0.25	0.75 ± 0.13	23.30 ± 2.19
对照组 (n = 5)							
灌流开始	4.39 ± 0.24	135.56 ± 0.93	112.20 ± 1.40	2.27 ± 0.12	1.81 ± 0.06	0.83 ± 0.05	23.52 ± 0.25
灌流 120 min	4.30 ± 0.06	134.60 ± 1.73	111.55 ± 0.93	2.24 ± 1.12	1.78 ± 0.04	0.84 ± 0.05	22.70 ± 0.26

3 讨论

临床上针对 ETM 的治疗主要有血液置换, 药物控制, 灌流吸附清除^[4]。药物治疗中多采用多黏菌素 B 破坏致病菌(革兰阴性菌)膜的通透性减少内毒素的释放源^[5], 但是在杀灭的致病菌本身也会释放部分内毒素而引起反跳效应, 同时多黏菌素 B 也可以结合细胞膜的磷脂从而破坏机体细胞的完整性与稳定性致使细胞溶解, 使其使用受限^[6], 因此 HP 应用于临床血液毒素的清除已引起了国内外学者的高度关注^[7-8]。灌流中灌流材料与血液直接接触要具备如下要求^[9]: 无毒、无过敏反应对机体安全, 理化学性能稳定与血液接触耐磨不发生形变脱落更无化学反应, 有良好的血液相容性, 效果明显等。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含大量氨基酸的配基相连制成“双亲型”亲和吸附材料, 可以满足以上要求。

实验中在复制模型后体温、呼吸频率都上升至灌流开始, 灌流开始后治疗组体温、呼吸频率有所下降并保持平稳, 对照组体温、呼吸频率保持上升趋势直到灌流 120 min。体温、呼吸频率的升降与体内的内毒素水平有关, 治疗组在灌流开始后随着内毒素被清除, 减轻了内毒素的致热作用导致了体温下降, 呼吸频率稳定。对照组中内毒素持续作用致使体温上升, 呼吸频率增快。

实验过程中观察灌流对血常规的影响, RBC、Hb 在灌流前后没有变化, 提示灌流治疗对 RBC、Hb 没有影响; 而 WBC 和 PLT 数量有所下降; 内毒素会导致 WBC 贴壁, 数小时内造成周围血液 WBC 下降^[2], 虽然灌流会清除血液中的内毒素, 但复制模型时血液中的内毒素急剧升高, 此过程就已经对 WBC 产生了影响, 对照组 WBC 下降程度大于治疗组, 这与治疗组内毒素的清除有关; HP 和一定剂量的肝素都会影响 PLT 含量^[10], 这与本实验结果相符。但 WBC 和 PLT 数的下降程度并不大且在可控范围。

治疗组肝功能中 ALT、AST、ALP、TP、GLO, 肾功能中的 Urea、Cr、UA 都下降, 而治疗组中的相应指标则持续上升, 说明内毒素可使肝肾功能各指标上升, 但随着治疗组 HP 对内毒素的清除, 解除了内毒素对肝肾的直接损伤导致各指标下降。治疗组、对

照组血清中 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 Ca^{2+} 、 P^{3-} 、 Mg^{2+} 及 ECO_2 等电解质各指标都趋于平稳, 说明没有出现电解质紊乱。灌流过程中 PT 有所缩短但 APTT、TT、FIB 都趋于正常, 这与文献报道^[11] 肝素会延长 PT、APTT 相矛盾, 因此针对凝血功能的作用有待进一步的研究。

综上所述, 本课题组研发的亲和吸附材料通过灌流治疗清除血液中的内毒素, 对血常规影响甚微, 对肝脏、肾脏具有保护作用, 没有出现电解质紊乱和血液凝集异常。结果表明, 亲和吸附材料应用于 HP 治疗外源性 ETM 副作用小, 具有安全性。

参 考 文 献:

- [1] 蒋庆军. 内毒素检测在内毒素血症治疗中的应用[J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 17(33): 5229-5232.
- [2] SHOJI H. Extracorporeal endotoxin removal for the treatment of sepsis: endotoxin adsorption cartridge (Toraymyxin)[J]. Ther Apher Dial, 2003, 7(1): 108-114.
- [3] ANISIMOVA N Y, GROMOVA E G, KUZNETSOVA L S, et al. Dynamics of elimination of bacterial endotoxins and cytokines from the blood of tumor patients with sepsis in hemoperfusion using carbon adsorbents[J]. Bull Exp Biol Med, 2011, 151(5): 622-624.
- [4] 曾振国, 刘芬. 高容量血液滤过对内毒素诱导急性肺损伤犬肺表面活性蛋白的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 12(18): 25-26.
- [5] 安茂竹, 孙静, 孟建中. 内毒素吸附[J]. 国际移植与血液净化杂志, 2007, 3(5): 8-10.
- [6] RUDNICK M R, GOLDFARB S, WEXLER L, et al. Nephrotoxicity of ionic and nonionic contrast media in 1196 patients: a randomized trial. The iohexol cooperative study[J]. Kidney Int, 1995, 47(1): 254-261.
- [7] AOKI H, KODAMA M, TANI T, et al. Treatment of sepsis by extracorporeal elimination of endotoxin using polymyxin B-immobilized fiber[J]. Am J Surg, 1994, 167(4): 412-417.
- [8] STAUBACH K H, BOEHME M, ZIMMERMANN M, et al. A new endotoxin adsorption device in gram-negative sepsis: use of immobilized albumin with the MATISSE adsorber[J]. Transfus Apher Sci, 2003, 29(1): 93-98.
- [9] 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.
- [10] 赵彬, 梅丹, 李拥军, 等. 肝素诱导的血小板减少症[J]. 中国药师, 2007, 10(8): 822-824.
- [11] 赵嵩, 安莲英, 彭丽霞, 等. 子痫前期患者应用低分子肝素钠辅助治疗对其凝血功能及肾功能的影响[J]. 疑难病杂志, 2016, 15(7): 716-719.

(张蕾 编辑)