

• 临床评价 •

异丙酚对重症脓毒症患者血管内皮细胞损伤的保护作用

孙杰^{1,2}, 陈蕊^{1,2}, 董家辉^{1,2}, 姜巧^{1,2}, 孙照琨^{1,2}, 郭振辉^{1,2*}

1. 广州军区广州总医院老年重症医学科, 广东 广州 510000

2. 广东省暨广州市老年感染与器官功能支持重点实验室, 广东 广州 510000

摘要: **目的** 观察异丙酚对重症脓毒症患者血管内皮细胞损伤的影响。**方法** 构建重症脓毒症患者血清攻击脐静脉模型, 监测异丙酚对重症脓毒症患者培养上清血循环血管内皮细胞 (CEC) 的数量、血管性假血友病因子 (von willebrand factor, vWF) 和可溶性血栓调节素 (soluble thrombomodulin, sTM) 水平的影响。**结果** 重症脓毒症患者血清 CEC 数量、vWF 和 sTM 水平明显高于健康对照组 ($P < 0.05$)。进一步体外实验发现重症脓毒症患者血清可损伤脐静脉内皮, 造成培养上清 CEC 数量、vWF 和 sTM 水平显著升高 ($P < 0.05$)。异丙酚可明显减少 CEC 数量 ($P < 0.05$), 同时下调 vWF 和 sTM 水平 ($P < 0.05$)。体外实验也发现异丙酚对重症脓毒症患者血清引起的脐静脉内皮损伤具有保护作用, 其培养上清的 CEC 数量明显减少, 同时 vWF 和 sTM 水平显著下降 ($P < 0.05$)。**结论** 重症脓毒症患者存在严重内皮细胞损伤, 异丙酚对重症脓毒症患者内皮细胞损伤具有保护作用。

关键词: 异丙酚; 重症脓毒症; 血管内皮细胞; 血循环血管内皮细胞; 血管性假血友病因子; 溶性血栓调节素

中图分类号: R969 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2014) 06 - 0544 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.06.017

Protective effects of propofol on vascular endothelial cell injury in patients with severe sepsis

SUN Jie^{1,2}, CHEN Rui^{1,2}, DONG Jia-hui^{1,2}, JIANG Qiao^{1,2}, SUN Zhao-kun^{1,2}, GUO Zhen-hui^{1,2}

1. Department of Elderly Intensive Medicine, General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 51000, China

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Geriatric Infection and Organ Function Support, Guangzhou 51000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Propofol on vascular endothelial cell injuries in patients with severe sepsis.. **Methods** Vascular endothelial damage markers including circulating endothelial cells (CEC), von willebrand factor (vWF), and soluble thrombomodulin (sTM) were tested. Serums derived from the patients with severe sepsis were used to attack the model of umbilical vein as an *in vitro* model and the effect of Propofol on vascular endothelial cell injury was observed. **Results** In both *in vivo* and *in vitro* studies, CEC, vWF, and sTM showed significantly increased. Furthermore, Propofol can significantly reduce the number of CEC and the serum concentration of vWF and sTM ($P < 0.05$). *In vitro* studies have found similar results. **Conclusion** Serious endothelial cell injuries are observed in the severe septic patients. Propofol has the beneficial protection on the endothelial cells in the patients with severe sepsis.

Keywords: Propofol; severe sepsis; vascular endothelial cell; circulating endothelial cells; von willebrand factor; soluble thrombus adjustment

血管内皮细胞 (vascular endothelial cell, VEC) 损伤和微循环障碍是重症脓毒症患者器官功能障碍的关键环节^[1]。研究表明炎症因子作用于血管内皮细胞, 从而引发内皮细胞的活化损伤, 参与重症脓

毒症的病理过程^[2]。循环内皮细胞 (circulation endothelia cells, CEC) 是在生理或病理情况下从循环中脱落的 VEC, 目前认为其是唯一能够在活体内持续检测到的可特异性直接反映毛细血管损伤程度

收稿日期: 2014-08-12

基金项目: 全军医药卫生科研课题重点专项 (10BJZ09); 广东省科技计划项目 (2012A061400010); 广东省广州市科研条件建设项目 (穗科信字[2012]224-5 号)

*通信作者 郭振辉 micugzh@126.com

的指标^[3]。血管性假血友病因子(von willebrand factor, vWF)和可溶性血栓调节素(soluble thrombomodulin, sTM)主要来源于血管内皮细胞,血浆vWF和sTM水平作为VEC损伤的标志物,与器官功能障碍程度有一定相关性。异丙酚为非巴比妥类麻醉药,目前已广泛应用于重症脓毒症、严重创伤等危重患者的镇静治疗。国内外学者研究已证实其具有抗炎抗氧化作用^[4]。本研究拟以CEC、vWF和sTM作为检测指标,观察异丙酚对重症脓毒症患者血管内皮损伤的保护作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集2012年7月至2014年6月入住广州军区广州总医院老年重症医学科的患者45例。男29例,女16例,年龄(71.3±7.8)岁。重症脓毒症诊断参考1991年美国胸科医师协会与危重病医学会(ACCP/SCCM)联席会议所提出的重症脓毒症诊断标准^[5]。排除既往心血管疾病病史患者。同时选择15例健康人作为健康组,男8例,女7例,年龄(73.9±7.5)岁。试验经医院伦理委员会审查,所有受试者均知情同意,自愿参加试验。

1.2 治疗方法

所有确诊患者均进入老年重症医学科病房监护治疗,随机分为健康组、重症脓毒症常规治疗组、咪唑安定治疗组和异丙酚治疗组,咪唑安定治疗组和异丙酚治疗组在常规治疗基础上加用咪唑安定或异丙酚治疗。两组患者的镇静程度均达到Rarrksay 3~4级,异丙酚组首次给予负荷量1.0 mg/kg,随后给予维持量0.5~4.0 mg/(kg·h)。咪唑安定组首次给予负荷量0.05 mg/kg,随后给予维持量0.05~0.1 mg/(kg·h)。各组患者于治疗后24 h留取血标本,置于-80℃低温冰箱中保存。所有的患者入住老年重症医学科后均给予呼吸、循环支持并根据培养结果选择敏感性抗生素进行抗感染治疗。

1.3 实验方法

1.3.1 人脐静脉片的培养 将脐带浸泡于PBS磷酸盐中,冲洗干净脐带表面血液和其他杂质,将脐带两端修剪平整。用37℃预热的PBS冲洗脐带4~5次,直至脐带流出液无色透明,去除脐带内PBS。将每条脐静脉以刀片分成长1 cm血管段,纵行剖开,取其中的一半以0.2% Trypan Blue染色约30 s,内皮覆盖大于80%者取另一半行下一步实验。将选取的脐静脉片内膜向上置于培养皿中。加入含小牛

血清的培养液5 mL,培养6 h后弃培养液。脓毒症血清攻击方法为加入3 mL含20%重症脓毒症患者血清的培养液,咪唑安定组在血清攻击的脐静脉培养基中加入终体积浓度0.05%的咪唑安定培养液,异丙酚组在血清攻击的脐静脉培养基中加入终体积浓度为1%的异丙酚培养液,对照组在血清攻击的脐静脉培养基中加入相应体积生理盐水。培养24 h,取培养上清液检测CEC、vWF和sTM。

1.3.2 等密度梯度离心法检测CEC 将3 mL抗凝血或培养上清用等量生理盐水稀释后加入到密度为1.050的Percoll液2 mL中,以1500 r/min离心20 min,取Percoll界面以上液体作为上层, Percoll层液体1.0 mL作为中层;将上层液体再次以2100 r/min离心20 min,弃管中上清液,加生理盐水0.5 mL中层震荡使细胞悬浮备检,取上述液体少许,滴于血细胞计数池中,观察全部9个大格中的内皮细胞数,同一标本计数4次,取均值。

1.3.3 vWF和sTM检测 抽取静脉血5 mL,室温放置2 h,1000 r/min离心10 min,分离血清,贮存于-80℃冰箱备用,vWF浓度测定采用laurell火箭电泳法(上海亚都生物技术公司),sTM浓度测定采用ELISA法(上海江莱生物科技有限公司),按说明书进行检测。

1.4 统计学处理

采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据的比较采用方差分析。

2 结果

2.1 异丙酚对重症脓毒症患者外周血CEC数量、vWF和sTM水平的影响

与健康组比较,重症脓毒症患者的外周血CEC数量、血清vWF和sTM水平显著升高($P < 0.01$),经异丙酚治疗后,重症脓毒症患者的外周血CEC数量显著下降,其血清vWF和sTM水平也明显降低($P < 0.05$),见表1。

2.2 异丙酚对重症脓毒症患者血清条件培养基攻击脐静脉的保护作用

各组分别选取6例的脐静脉内皮行体外培养。使用重症脓毒症患者的血清作为条件培养基培养脐静脉内皮24 h后,其培养基上清脱落CEC数量明显增加,同时,vWF和sTM水平也显著增加($P < 0.01$),而异丙酚治疗组培养基上清的CEC数量、vWF和sTM水平较重症脓毒症常规治疗组和咪唑安定组均明显下降($P < 0.05$),见表2。

表1 异丙酚对重症脓毒症患者外周血 CEC 数量、vWF 和 sTM 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

Table 1 Effect of propofol on CEC, vWF, and sTM in patients with severe sepsis ($\bar{x} \pm s$, $n=15$)

组别	CEC/($\times 10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$)	vWF/%	sTM/(ng·mL ⁻¹)
健康	1.6±0.1	67.5±1.7	3.5±0.4
常规治疗	5.7±0.2**	100.5±4.0**	20.0±0.6**
咪唑安定	5.5±0.3	101.4±4.0	18.4±0.5
异丙酚	3.2±0.1 [#]	77.0±2.5 [#]	14.5±0.9 [#]

与健康组比较: ** $P<0.01$; 与常规治疗组比较: [#] $P<0.05$

** $P<0.01$ vs health group; [#] $P<0.05$ vs routine treatment group

表2 异丙酚对重症脓毒症患者血清培养基攻击脐静脉后的保护作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Protection of propofol on umbilical vein attacked by serum from patients with severe sepsis ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	CEC/($\times 10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$)	vWF/%	sTM/(ng·mL ⁻¹)
健康	2.4±0.2	22.4±3.0	3.6±0.3
常规治疗	6.5±0.2**	87.8±5.7**	18.2±0.9**
咪唑安定	6.4±0.3	89.8±6.3	17.1±1.1
异丙酚	3.8±0.8 [#]	52.5±2.4 [#]	10.2±0.4 [#]

与健康组比较: ** $P<0.01$; 与常规治疗组比较: [#] $P<0.05$

** $P<0.01$ vs health group; [#] $P<0.05$ vs routine treatment group

3 讨论

目前已公认内皮细胞损伤和功能障碍是重症脓毒症和多器官功能障碍综合征(MODS)的重要特征^[6]。在重症脓毒症病理过程中, 血管内皮细胞不仅是炎症反应过程中被动的靶细胞, 更为重要的是作为一种效应细胞, 在微循环障碍、脓毒性休克及多器官功能损伤中起着重要作用。越来越多的证据表明内皮细胞在重症脓毒症及 MODS 具有潜在诊断治疗和预后评估价值, 并且也可能作为重症脓毒症治疗的靶目标^[7,8]。重症脓毒症病理过程中 VEC 损伤或激活后, VEC 包膜或胞质中的物质释放入循环中, 因而检测血循环中内皮损伤相关物质可判断 EC 激活或受损程度, 从而有助于疾病的诊断、病情及预后的评估。

CEC 是目前公认的在活体内唯一可以特异性直接反映血管内皮细胞损伤的标志物^[8], 所有引起内皮细胞损伤的因素均可能使 CEC 增多。重症脓毒症患者中 CEC 数量的增多可能源于 VEC 受损或凋亡释放入血液。CEC 数量和血管内皮损伤的严重程度密切相关, 当血管内皮细胞受到内毒素、炎症因

子等因素刺激后, 造成了微血管损伤、微循环障碍和 CEC 数量增加。许多临床和动物研究也观察到了重症脓毒症中 VEC 损伤的直接证据^[9-11]。vWF 和 sTM 主要由 VEC 合成, 多种因素致 VEC 受损均可引起 vWF 和 sTM 的释放, 血浆 vWF 浓度可反映血管内皮细胞损伤的程度, 而 sTM 被认为不仅是内皮细胞破坏的一个参数, 也是中性粒细胞衍生的蛋白酶及氧自由基对内皮细胞膜造成损伤的早期指标。在本研究中首先观察到了重症脓毒症患者外周血的 CEC 数量、vWF 和 sTM 水平明显高于健康组。进一步借助体外脐静脉培养体系研究, 结果发现重症脓毒症患者血清也可明显损伤脐静脉内皮细胞, 这一结果基本与体内研究一致。综合以上结果, 认为重症脓毒症病理生理过程中存在明确的内皮细胞损伤。

异丙酚是一种新型非巴比妥类静脉麻醉药, 目前已广泛应用于重症脓毒症、严重创伤等危重病患者的镇静治疗。国内外研究已证实异丙酚具有显著的抗炎抗氧化作用^[12,13]。大量研究证实异丙酚对体内或体外的内毒素血症均有抗炎作用^[12-14]。其抗炎作用主要是通过减少促炎因子的分泌、调节 NO₂ 的表达、抑制中性粒细胞和单核细胞的趋化、黏附以及氧化爆发等功能实现。因此推测异丙酚可能对重症脓毒症血管内皮损伤具有一定的保护作用。分析重症脓毒症患者血 CEC 变化, 结果显示重症脓毒症异丙酚治疗组较咪唑安定组、常规治疗组均明显减少 ($P<0.05$), 同时血清 vWF 和 sTM 也明显下降 ($P<0.05$)。由于重症脓毒症病理过程中, 患者个体影响因素众多, 单纯行体内试验具有一定局限性, 因此本研究进一步使用重症脓毒症患者的血清作为培养基攻击体外培养的脐静脉模型, 观察异丙酚在重症脓毒症患者血清损伤脐静脉内皮细胞的保护作用, 结果显示异丙酚培养上清的 CEC 数量明显减少 ($P<0.05$), vWF 和 sTM 水平也显著下降 ($P<0.05$)。这一结果提示了异丙酚对重症脓毒症血管内皮细胞损伤起保护作用。

通过以上研究初步发现了异丙酚在重症脓毒症患者中除了作为镇静治疗, 其更为重要的是对血管内皮损伤具有一定的保护作用。然而, 本研究只是初步观察了异丙酚对重症脓毒症患者血管内皮损伤的保护作用, 对于重症脓毒症病理过程中血管内皮损伤和异丙酚保护血管内皮损伤的机制有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 赵光举, 卢中秋. 重症脓毒症内皮细胞损伤与微循环障碍 [J]. 临床急诊杂志, 2012, 13(1): 8-13.
- [2] Rafat N, Hanusch C, Brinkkoetter P T, *et al.* Increased circulating endothelial progenitor cells in septic patients: correlation with survival [J]. *Crit Care Med*, 2007, 35(7): 1677-1684.
- [3] Becchi C, Pillozzi S, Fabbri L P, *et al.* The increase of endothelial progenitor cells in the peripheral blood: a new parameter for detecting onset and severity of sepsis [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2008, 21(3): 697-705.
- [4] Cheng B, Xie G, Yao S, *et al.* Epidemiology of severe sepsis in critically ill surgical patients in 10 university hospitals in China [J]. *Crit Care Med*, 2007, 35(11): 2538-2546.
- [5] American college of chest physicians. Society of critical care medicine consensus conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis [J]. *Crit Care Med*, 1992, 20(6): 864.
- [6] Aird W C. Endothelium as a therapeutic target in sepsis [J]. *Curr Drug Targets*, 2007, 8(4): 501-507.
- [7] Powell T C, Powell S L, Allen B K, *et al.* Association of inflammatory and endothelial cell activation biomarkers with acute kidney injury after sepsis [J]. *Springerplus*, 2014, 28(3): 207
- [8] Skibsted S, Jones A E, Puskarich M A, *et al.* Biomarkers of endothelial cell activation in early sepsis [J]. *Shock*, 2013, 39(5): 427-432.
- [9] Herwig M C, Tsokos M, Hermanns M I, *et al.* Vascular endothelial cadherin expression in lung specimens of patients with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome and endothelial cell cultures [J]. *Pathobiology*, 2013, 80(5): 245-251.
- [10] Roller J, Wang Y, Rahman M, *et al.* Direct *in vivo* observations of P-selectin glycoprotein ligand-1-mediated leukocyte-endothelial cell interactions in the pulmonary microvasculature in abdominal sepsis in mice [J]. *Inflamm Res*. 2013, 62(3): 275-282.
- [11] Schuetz P, Jones A E, Aird W C, *et al.* Endothelial cell activation in emergency department patients with sepsis-related and non-sepsis-related hypotension [J]. *Shock*, 2011, 36(2): 104-108.
- [12] Gokcinar D, Ergin V, Cumaoglu A, *et al.* Effects of ketamine, propofol, and ketofol on proinflammatory cytokines and markers of oxidative stress in a rat model of endotoxemia-induced acute lung injury [J]. *Acta Biochim Pol*, 2013, 60(3): 451-456.
- [13] 王文辉, 万 健, 李国民, 等. 异丙酚对重症脓毒症大鼠外周血 CD4⁺ CD25⁺ T 细胞及 IL-6、IL-10 的影响 [J]. 中华临床医师杂志, 2013, 7(1): 212-215.
- [14] Penna G L, Fialho F M, Kurtz P, *et al.* Changing sedative infusion from propofol to midazolam improves sublingual microcirculatory perfusion in patients with septic shock [J]. *J Crit Care*, 2013, 28(5): 825-831.