

## 5-Fu 减轻急性 MODS 模型全身性损伤的实验研究

卞建民\*, 江 强, 章世海

(南京医科大学附属南京第一医院普外科, 江苏 南京 210006)

**[摘要]** **目的:**观察单次剂量 5-氟尿嘧啶(5-Fu)对多器官功能障碍大鼠多脏器功能及其存活时间的影响。**方法:**应用多发性骨折+烫伤+绿脓杆菌感染方法制造 SD 大鼠急性多器官功能障碍模型。动物被随机分成多器官功能障碍综合征模型组(MODS 模型组,  $n = 36$ )和模型+5-Fu(50 mg/kg)处理组(5-Fu 组,  $n = 26$ ), 每组分 4 个亚组。分别于模型复制成功后 24、48、72、96 h 处死大鼠, 取血进行外周血白细胞计数, 检测白细胞功能、肝肾功能、心肌酶谱, 同时观察动物的死亡率。**结果:**与 MODS 模型组动物比较, 实验早中期 5-Fu 抑制了动物外周血白细胞计数增加。5-Fu 对白细胞的呼吸爆发无影响; 但能下调白细胞 CD11b 表达。实验期间, 5-Fu 处理组大鼠死亡率明显降低, 血清丙氨酸氨基转移酶和门冬氨酸氨基转移酶、磷酸肌酸激酶和肌酸激酶同工酶活性、尿素氮等指标改善不显著, 但实验组血糖值波动平缓, 而对照组血糖进行性上升。**结论:**单次给予 5-Fu 能够对多器官功能障碍模型大鼠产生器官保护作用。

**[关键词]** 5-氟尿嘧啶; 多器官功能障碍综合征; 大鼠

**[中图分类号]** R59

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2012)03-374-04

## Experimental study of 5-Fu to reduce systemic injury in acute model of MODS

BIAN Jian-min\*, JIANG Qiang, ZHANG Shi-hai

(Department of General Surgery, Nanjing First Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of a single dose of 5-fluorouracil (5-Fu) on multiple organ functions and the survival time of rats with multiple organ dysfunction syndrome (MODS). **Methods:** The study adopted the methods of multiple fractures + scald + *Pseudomonas aeruginosa* infection to produce the model of SD rats with acute MODS. The rats were randomly divided into MODS model group ( $n = 36$ ) and treatment group (MODS model+5-Fu,  $n = 26$ ), each being divided into four subgroups. The rats were sacrificed 24, 48, 72 or 96 h after the models were built successfully, blood samples were collected to examine the leukocyte numbers of peripheral blood, the leukocyte function, liver and kidney function and myocardial enzymes. Rats' mortality rate was observed as well. **Results:** Compared with MODS model group, 5-Fu restrained the leukocyte numbers of peripheral blood in the early and middle stages. 5-Fu had no effect on leukocyte respiratory burst but reduced the CD11b expression. During the experiment, rats' mortality rate of 5-Fu treatment group decreased significantly. There were no differences in serum activity of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, creatine kinase, creatine kinase isoenzyme, and no differences in blood urea nitrogen between the two groups. The blood glucose level were improved at different stages of 5-Fu group, but increased progressively in contrast group. **Conclusion:** A single administration of 5-Fu may protect rats with MODS against systemic injury.

**[Key words]** 5-fluorouracil; multiple organ dysfunction syndrome; rats

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 374-377]

急性多器官功能不全综合征(MODS)的发病过程中, 因正常的免疫调节失控, 导致超强的全身性炎症反应(SIRS), 结果组织器官出现序贯性损伤<sup>[1]</sup>。为控制 MODS 的发展, 一些控制超急炎症反应的方

法已经被应用于临床, 如通过血液滤过方法清除血液中过多的促炎细胞因子以下调全身性炎症反应, 在部分患者中得到了立竿见影的临床效果<sup>[2]</sup>。有文献报道, 5-Fu 具有免疫调节作用, 能减轻实验性脓毒血症动物的肺损伤和死亡率<sup>[3]</sup>。5-Fu 能够抑制骨髓增生, 外周血白细胞数减少是其临床治疗中最常见的不良反应。由于 SIRS 状态下, 过度的中性粒细

**[基金项目]** 南京市医学科技发展项目(YKK08085)

\*通讯作者, E-mail: jmbian0324@hotmail.com

胞激活与 MODS 的发生有关<sup>[4]</sup>,那么 5-Fu 能否通过下调外周血白细胞功能而对 SIRS/MODS 宿主模型产生保护作用?本研究通过复制 MODS 大鼠动物模型对此进行探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

清洁级健康雄性 SD 大鼠 62 只,体重 235~265 g,由南京医科大学附属南京第一医院实验动物中心提供。大肠杆菌国际标准菌株由南京医科大学附属南京第一医院微生物室提供。PE 标记的小鼠抗大鼠 CD11b 抗体和 PE 标记的大鼠 IgG<sub>2b</sub> 购自美国 Santa Cruz 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组

按数字随机表将实验动物分成 MODS 模型组和 MODS+5-Fu 处理组。预试验中发现动物的死亡高峰在造模后 24~72 h 间,据此进行实验动物亚组分组。每组按设定的实验终结观察点 24、48、72 和 96 h 分成 A、B、C、D 4 个亚组。MODS 模型组 A 组 7 只;B、C 组各 10 只;D 组 9 只;MODS+5-Fu 处理组 A、B 组每组 6 只;C、D 组每组 7 只。

#### 1.2.2 MODS 模型制备

按照文献方法<sup>[5]</sup>,应用多发性骨折+背部皮肤烫伤+创面绿脓杆菌感染方法制备动物急性 MODS 模型。按 0.7 ml/100 g 体重腹腔注射 10%水合氯醛麻醉实验动物,用夹钳造成大鼠双侧后肢多发性闭合性骨折和软组织广泛性挫伤(没有皮肤破损),伤后 1 h 腹腔注射 50 ml 生理盐水进行抗休克处理。骨折后 12 h 再次麻醉动物,将大鼠背部皮肤浸入 99℃水中 12 s,造成体表 30%面积的 III 度烫伤。伤后 30 min 向创面涂布  $1 \times 10^8$  个/ml 绿脓杆菌液 1 ml。烫伤后 1 h 腹腔再次注射 50 ml 生理盐水。在烫伤+感染后 30 min,5-Fu 处理组动物按照 50 mg/kg 体重剂量腹腔注射 5-Fu。MODS 模型组注射同等剂量的生理盐水。

#### 1.2.3 标本采集及指标测定

感染模型完成后 24、48、72 和 96 h 分别处死动物,从下腔静脉取血标本,进行外周血白细胞计数和中性粒细胞的计数。

白细胞 CD11b 黏附蛋白测定:100  $\mu$ l 抗凝血液标本与 PE 标记的小鼠抗大鼠 CD11b 抗体在 37℃ 下温育 15 min。加入 3 ml 溶血素温育 15 min 去除红细胞后离心。取  $5 \times 10^6$  个白细胞在流式细胞仪

上读取平均荧光强度(MFI)共 3 次取其平均值。

白细胞呼吸爆发试验:取 0.5 ml 抗凝血,先后加佛波酯和二氢罗丹明各自温育 15 min 后,上流式细胞仪读取 MFI,共 3 次取其平均值。

全自动生化分析仪进行丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、磷酸肌酸激酶(CPK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、葡萄糖(Glu)等指标分析。

大鼠死亡率:记录实验各时间点累计死亡动物。分实验组和对照组计算死亡率。死亡率=死亡大鼠/总实验大鼠 $\times 100\%$ 。

### 1.3 统计学方法

采用 Stata 7.0 统计软件对数据进行统计处理。实验数据进行多因素方差分析,数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;动物生存率应用 log-rank 法进行分析。 $P < 0.05$  为差异有显著意义。

## 2 结果

### 2.1 动物的一般情况和死亡率

MODS 模型组动物表现为精神状态差,呼吸急促,毛发直立,倦怠,不愿活动,进食进水较少。5-Fu 处理组动物 24 h 后一般情况逐渐改善,在实验后 48 和 96 h 各死亡 1 只,总死亡率为 7.69%。MODS 模型组在实验后 72 h 才出现一般情况改善现象,24、48、72、96 h 时间段分别死亡 1、5、4、3 只,总死亡率为 33.33%( $\chi^2 = 5.289, P < 0.05$ )。

### 2.2 5-Fu 对大鼠外周血白细胞和中性粒细胞计数的影响

从结果可以看出,随着时间的进展,MODS 模型组动物外周血白细胞和中性粒细胞计数逐渐升高。5-Fu 对动物 24、48 和 72 h 时相的外周血白细胞计数和中性粒细胞计数有显著的抑制作用( $P < 0.01$ ),96 h 后,外周血白细胞计数上升,与 MODS 模型组无明显差别(表 1)。

### 2.3 5-Fu 对中性粒细胞功能的影响

结果显示,MODS 模型组有明显的粒细胞呼吸爆发现象,粒细胞表面 CD11b 的表达增强,而单次剂量 5-Fu 对动物外周血粒细胞呼吸爆发无明显影响。在给予 5-Fu 后 72 h,外周血粒细胞 CD11b 黏附分子的表达较 MODS 模型组下降( $P < 0.05$ ,表 2)。

### 2.4 5-Fu 对各组不同时段生化指标的影响

结果显示,MODS 模型对部分生化指标有影响,但给予 5-Fu 后,动物的肝肾功能和心肌酶活性与模型组相比没有显著差别。实验后 42、72 和 96 h,

表 1 造模后两组动物外周血白细胞和中性粒细胞计数的比较  
Table 1 Comparison of leukocyte and neutrophil numbers of peripheral blood of animals in two groups after modeling ( $\times 10^9$ )

组别	n	白细胞计数	中性粒细胞计数
MODS 模型组			
24 h	6	3.82 ± 0.52	1.73 ± 0.41
48 h	5	5.00 ± 1.59	2.19 ± 1.34
72 h	6	9.91 ± 1.68	4.60 ± 0.75
96 h	6	9.89 ± 2.96	3.96 ± 1.22
5-Fu 处理组			
24 h	6	1.78 ± 0.96*	0.63 ± 0.16*
48 h	5	2.40 ± 1.21*	0.74 ± 0.65*
72 h	7	2.98 ± 0.92*	1.25 ± 0.36*
96 h	6	9.51 ± 3.46	2.74 ± 1.76

与 MODS 模型组相比, \*P < 0.01。

表 2 5-Fu 对中性粒细胞呼吸爆发和 CD11b 表达的影响  
Table 2 Effect of a single administration of 5-Fu on neutrophil's respiratory burst and CD11b expression ( $\times 10^3$ )

组别	n	粒细胞呼吸爆发荧光强度	CD11b 阳性抗体荧光强度
MODS 模型组			
24 h	6	130.31 ± 6.19	51.55 ± 9.24
48 h	5	145.41 ± 1.36	76.29 ± 3.38
72 h	6	144.16 ± 8.10	45.61 ± 18.57
96 h	6	147.12 ± 2.23	34.83 ± 15.49
5-Fu 处理组			
24 h	6	138.17 ± 2.93	53.50 ± 16.87
48 h	5	134.61 ± 2.51	80.80 ± 8.05
72 h	7	128.77 ± 4.83	32.02 ± 4.05*
96 h	6	154.88 ± 1.07	39.86 ± 6.47

与 MODS 模型组相比, \*P < 0.05。

表 3 各组不同时段的生化指标结果

Table 3 Results of biochemical indicators at different stages for different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	CPK(U/L)	CK-MB(U/L)	BUN(mmol/L)	Cr( $\mu$ mol/L)	Glu(mmol/L)
MODS 模型组							
24 h	122.33 ± 19.42	437.66 ± 97.55	748.00 ± 625.32	1 696.66 ± 1 305.40	8.31 ± 1.20	21.35 ± 3.07	7.93 ± 0.93
48 h	217.83 ± 33.59	417.83 ± 85.50	1 212.50 ± 335.73	2 623.50 ± 718.98	9.11 ± 0.23	12.45 ± 2.60	9.01 ± 0.87
72 h	370.50 ± 634.57	363.83 ± 186.85	1 276.33 ± 642.42	2 798.00 ± 1 445.39	11.44 ± 5.70	12.11 ± 8.84	7.66 ± 2.14
96 h	62.60 ± 4.15	152.20 ± 28.10	917.00 ± 405.49	1 504.80 ± 193.13	7.30 ± 0.31	24.56 ± 1.20	11.20 ± 0.51
5-Fu 处理组							
24 h	180.16 ± 69.10	461.16 ± 100.10	1 538.00 ± 1 199.46	3 329.16 ± 2 546.47	8.19 ± 1.25	24.71 ± 5.19	8.94 ± 2.86
48 h	148.83 ± 12.69	485.00 ± 32.11	1 369.00 ± 159.18	3 016.33 ± 350.33	10.56 ± 0.40	14.21 ± 3.04	7.83 ± 1.17*
72 h	90.83 ± 31.57	291.00 ± 91.00	525.16 ± 100.41	1 307.00 ± 272.36	5.89 ± 1.33	14.40 ± 4.79	3.69 ± 1.98*
96 h	63.83 ± 13.81	177.50 ± 19.26	440.66 ± 141.32	1 044.33 ± 339.03	6.62 ± 0.46	24.70 ± 2.69	7.23 ± 1.62*

与 MODS 模型组相比, \*P < 0.05, \*P < 0.01。

的骨髓抑制作用导致外周血白细胞总数减少。与炎症反应相关的细胞因子主要来源于淋巴细胞和粒

5-Fu 处理组动物血糖水平低于同时段的模型组 ( $P < 0.05$ ), 提示模型组动物的全身炎症反应程度较 5-Fu 处理组严重(表 3)。

### 3 讨论

本实验结果显示, 在应用多发性骨折+烫伤+绿脓杆菌感染方法制备实验大鼠 MODS 模型后<sup>[5]</sup>, 给予单次剂量 5-Fu 处理, 动物外周血白细胞总数和粒细胞数量较模型组下降, 且粒细胞 CD11b 表达也低于模型组, 动物的部分生化指标也较模型组有所改善, 血糖值较模型组接近正常值。而且, 5-Fu 处理组动物 96 h 内累计死亡率显著低于模型组动物。提示 5-Fu 下调外周血白细胞数量、抑制白细胞功能的作用与 MODS 模型动物的多器官损伤程度减轻及动物存活时间延长之间可能存在某种关联。

关于 5-Fu 控制 SIRS 病程进展方面的研究报道很少。芦灵军等<sup>[3]</sup>对脓毒血症大鼠模型给予 5-Fu, 结果发现动物肺损伤减轻, 存活时间延长。Chen 等<sup>[6]</sup>进一步探讨 5-Fu 治疗急性胰腺炎的机制, 观察实验动物在应用 5-Fu 后血液肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (IL)-1、IL-6 等促炎细胞因子和 IL-10、转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 等抗炎细胞因子在 24 h 内的消长演变。结果 5-Fu 处理组动物在发生急性胰腺炎后血液促炎细胞因子和抗炎细胞因子的失衡较对照组明显缓和。作者认为 5-Fu 通过其免疫调节作用, 减轻了动物急性胰腺炎的病理损害。

结合本实验结果, 可以观察到 5-Fu 对急性 MODS 模型动物具有保护作用。但有关实验研究很少, 推测其保护机制可能与以下因素有关: ① 5-Fu

细胞, 这些细胞数量的减少必然会导致相应的促炎细胞因子分泌减少, 从而起到下调 SIRS 炎症反应

程度的作用;② 5-Fu能抑制细胞内RNA的合成,这可能会影响一些细胞内蛋白如细胞因子的合成。在急性炎症反应的情况下,参与炎症反应的免疫细胞广泛性活化,5-Fu阻遏蛋白合成的作用可能下调了炎症相关细胞因子的生成。

急性多器官功能不全是外科最危重的并发症之一,其发生多是严重感染、严重创伤、急性重症胰腺炎、持续性休克等病症发展的终末期结果。在致病因子的作用下,宿主体内呈瀑布样释放一系列促炎细胞因子,动员大量免疫细胞发生超急全身性炎症反应。中性粒细胞是参与全身性炎症反应的主要炎症效应细胞,在致伤因子的作用下,通过细胞内信号转导,中性粒细胞会出现活化、抗凋亡、游走、释放等一系列反应,对组织器官产生损伤<sup>[7-8]</sup>。不少研究表明,抑制中性粒细胞会对炎症反应引起的器官损伤产生保护作用。如用CD11b单抗阻断白细胞的黏附分子后,白细胞在炎症区域的附壁和游走被明显抑制,微循环通畅,组织水肿减轻<sup>[9]</sup>。对发生急性呼吸窘迫综合征(ARDS)和弥散性血管内凝血(DIC)的脓毒症患者应用中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂Sivelestat进行治疗,患者的 $P_AO_2/FIO_2$ 指标和DIC评分均较用药前改善,ICU停留时间也较对照组缩短<sup>[10]</sup>。5-Fu是抗代谢类恶性肿瘤化疗药物,长期大剂量使用会导致严重的骨髓抑制、全身免疫力低下、黏膜溃疡、细菌的易感性明显增加等不良反应。尽管其治疗急性胰腺炎的效果已被临床肯定,但是否能将其应用于重症SIRS和MODS的临床治疗,还需要大量的研究。严重感染是SIRS的主要发病因素之一,出现严重感染后,早期应用5-Fu是否会显著下调宿主的抗感染能力,导致感染迁延或进一步加重? SIRS前期阶段,炎症反应占主导地位,如果致病因子不能及时消除,宿主体内的抗炎反应可能逐渐占据主导地位,此时患者全身免疫力下降,感染可能会进一步加重甚至成为患者的死亡原因,如何适时应用5-Fu控制过度的SIRS也是一个十分复杂并且个体差异很大的问题。再者,5-Fu控制超急SIRS的药代动力学也有待于进一步研

究。本文认为需要更深入地探讨5-Fu减轻由SIRS引起的全身性损害的机制,为其临床应用寻找理论依据。

#### [参考文献]

- [1] Hoesel LM, Neff TA, Neff SB, et al. Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis [J]. Shock, 2005, 4(1):40-47
- [2] 李 宓, 杜 艺, 彭 莉, 等. 连续性血液净化治疗老年多器官功能障碍及对机体免疫功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(1):33-35
- [3] 芦灵军, 胥 楠, 陈晓理. 5-氟尿嘧啶对脓毒性休克大鼠的保护作用 [J]. 中华急诊医学杂志, 2006, 15(1):44-46
- [4] 林福清, 邓小明, 李金宝, 等. 多器官功能障碍综合征患者病情发展不同阶段中性粒细胞功能的变化 [J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(5):557-559
- [5] 班 雨, 沈 洪, 黎檀实. 一种创伤感染致多器官功能障碍综合征动物模型的建立 [J]. 中国危重病急救医学, 2008, 20(1):41-44
- [6] Chen XL, Ciren SZ, Zhang H, et al. Effect of 5-Fu on modulation of disarrangement of immune-associated cytokines in experimental acute pancreatitis [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(16):2032-2037
- [7] Martin EL, Souza DG, Fagundes CT, et al. Phosphoinositide-3 kinase gamma activity contributes to sepsis and organ damage by altering neutrophil recruitment [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182(6):762-773
- [8] Paunel-Görgülü A, Lögters T, Flohé S, et al. Stimulation of Fas signaling down-regulates activity of neutrophils from major trauma patients with SIRS [J]. Immunobiology, 2011, 216(3):334-342
- [9] 张雪萍, 任永功, 刘新波, 等. 粘附分子在中性粒细胞-脐静脉内皮细胞粘附中作用机制的研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(5):321-333
- [10] Hayakawa M, Katabami K, Wada T, et al. Sivelestat (selective neutrophil elastase inhibitor) improves the mortality rate of sepsis associated with both acute respiratory distress syndrome and disseminated intravascular coagulation patients [J]. Shock, 2010, 33(1):14-18

[收稿日期] 2011-09-06