

· 论 著 ·

## 下肢枪弹伤感染继发 DIC 中 IL-10 及其抗体的作用

王 玮, 林国强, 李楠楠, 杜 艳

**[摘要]** **目的** 研究在下肢枪弹伤后感染继发弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)过程中白细胞介素 10(interleukin-10, IL-10)所起作用,并尝试应用 IL-10 及其抗体在 DIC 不同发展过程中进行防治。**方法** 以 7.62 mm 枪弹击伤家兔后肢后,经耳缘静脉滴注内毒素(LPS),分别在不同时间检测凝血功能、血小板、D-二聚体等 DIC 指标,按 DIC 诊断标准建立模型。同时检测 IL-10 等因子水平,以了解 IL-10 在 DIC 发展中的作用;通过在 DIC 不同阶段进行 IL-10 或抗 IL-10 抗体治疗,检测肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1(IL-1)等促炎因子、DIC 指标的变化,了解 IL-10 或 IL-10 抗体在防治下肢枪弹伤后感染继发 DIC 中作用。**结果** 单纯枪弹伤组及对照组各项指标均未达到 DIC 标准,枪弹伤合并感染组以及单纯感染组,静脉滴注 LPS 后 6~24 h 其活化部分凝血活酶时间(APTT)较对照组、单纯枪弹伤组明显延长,血小板值随时间延长而呈下降趋势,D-二聚体持续阳性,且随时间延长,数值呈逐渐增高趋势,均达到 DIC 诊断标准;枪弹伤合并感染组与对照组及单纯枪弹伤组相比,静脉滴注 LPS 后 2~6 h 内 IL-10 即迅速升高,虽在 6~24 h 之间表达基本处于平台期,但仍高于对照组及单纯枪弹伤组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );枪弹伤感染继发 DIC 前期预防性应用 IL-10 可以导致 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等促炎因子表达降低;DIC 后应用 IL-10 抗体可以有效降低 IL-10 水平。**结论** 枪弹伤感染继发 DIC 前期预防性应用 IL-10, DIC 发生后应用 IL-10 抗体,可以减缓枪弹伤后感染继发 DIC 的进程。

**[关键词]** 枪弹伤;感染;白细胞介素 10;弥散性血管内凝血

**[中图分类号]** R826.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2011)03-0193-04

### Effect of IL-10 on DIC induced by gunshot wounds combined with infection

WANG Wei, LIN Guo-qiang, LI Nan-nan, DU Yan. Department of Hematology, 175 Hospital of PLA, Zhang-Zhou, Fujian 363000, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of IL-10 on prevention and treatment of DIC induced by gunshot wounds combined with infection. **Methods** After the rabbit model of DIC with gunshot wounds and infection was constructed, PT, APTT, FIB, PLT and D-dimer of the rabbits were tested by Diagnostic Satgo SAS and the level of IL-10 were tested by ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) in the different time. When IL-10 or anti-IL-10 antibody were used to treat DIC in the different phase, the level of TNF- $\alpha$ , IL-1 or the different diagnose index of DIC were tested to elucidate the function of IL-10 in prevention and treatment of DIC.

**Results** APTT of rabbit with DIC and infection effected by gunshot wounds were obviously longer than that of the control during 6-24 hours. Along with the time expanding, the value of PLT descended gradually. The value of D-dimer increased gradually. The level of IL-10 had a trend of increasing gradually within 2-6 hours and soon up to steady level. The level of TNF- $\alpha$  and IL-1 could be reduced by preventively using IL-10 in the prophase of DIC. The level of IL-10 could be reduced by using anti-IL-10 antibody in the developmental phase of DIC. **Conclusion** DIC could not be induced singly by gunshot wounds, but it easily induced by gunshot wounds with infection. In the prophase of DIC caused by gunshot wounds with infection, the level of IL-10 was lacking relatively. However, it was overabundant in the developmental phase. Maladjustment of IL-10 was one of the reasons of leading to the development of DIC. Preventive using IL-10 in the prophase of DIC or using anti-IL-10 antibody in the developmental phase of DIC maybe have positive function to treat DIC.

**[Key words]** gunshot wounds; infection; interleukin-10(IL-10); disseminated intravascular coagulation

基金项目:南京军区“十一五”课题(06MA94);福建省青年人才基金资助(2006F3149)

作者简介:王 玮(1969-),男,湖北麻城人,博士,副主任医师,从事外伤感染继发 DIC 防治及恶性血液病基因诊治研究

作者单位:363000 福建漳州,解放军 175 医院血液科

枪弹伤是战场上最主要外伤,限于战场条件,枪弹伤后继发感染,特别在形成脓毒血症后,在未及时救治情况下,极易形成弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC),因为在此过程中容易出现连锁的级链反应,包括促炎细胞因子产生,炎症细胞移行、外渗,炎性介质大量产生,以及凝血、纤溶系统激活,微血管通透性增加,最后导致 DIC、多脏器功能衰竭和死亡<sup>[1]</sup>。如何有效防治枪弹伤感染后继发 DIC 是一个重要的军事医学课题。其中白细胞介素 10(interleukin-10, IL-10)属于在此过程中出现的一种作用广泛的抗炎细胞因子,在体内炎症反应及凝血功能调控方面均发挥着重要的作用<sup>[2]</sup>。本研究拟深入探讨 IL-10 在外伤后感染继发 DIC 过程中的作用机制,为防治外伤后感染继发 DIC 提供理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 枪械参数** 军用 54 式手枪, 7.62 mm 手枪弹,经专业机构校准:子弹出膛初速度 430 ~ 435 m/s,弹丸重量 5.5 g,撞击能量 508.48 ~ 520.37 J。

**实验材料:**内毒素(LPS L2880 美国 Sigma 公司),凝血功能[包括凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、血小板(PLT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)]检测试剂(法国 SATGO 公司),D-二聚体检测试剂盒(福州贝肯医疗设备有限公司),IL-10、IL-1、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )单克隆抗体购自 santa cruz 公司。全自动血细胞分析仪及其配套试剂(美国 Beckman Coulter 公司),全自动血凝仪(法国 SATGO 公司)。

**1.2 动物模型制备及分组** 参考有关文献<sup>[3-4]</sup>及 1999 年第六届全国血栓与止血会议修订的 DIC 标准与宋善俊等<sup>[5]</sup>制定的动物模型标准,制备家兔枪弹伤后感染继发 DIC 模型。DIC 评价标准:①PT 较对照组延长或缩短 3 s 以上。②APTT 较对照组延长或缩短 5 s 以上。③血小板较对照组下降。纤维蛋白原较对照组进行性下降。④实验组 D-二聚体阳性。⑤肾脏、肺脏等脏器病理组织切片显示微血管中有纤维蛋白微血栓形成。同时有上列 3 项以上异常,即判断为 DIC。

实验动物采用健康家兔 16 只,雌雄各半,体重(2.5 ± 0.5) kg,由厦门大学实验动物中心提供[使用许可证号:SYXK(军) 2002-047]。实验前对动物涉及部位备皮。枪伤前动物常规禁食 12 h,自由饮水。5% 盐酸氯胺酮注射液 20 mg/kg + 0.05% 硫酸阿托品注射液 0.04 mg/kg 对兔臀部肌肉注射麻醉后,将兔

行走位悬吊,四肢自然下垂,用标准实验枪(7.62 mm 钢心枪弹)距离 2 m 处致伤双后肢皮区,尽量不使股骨骨折以便饲养,予不清创包扎,如有股动脉活动性出血应予以结扎止血和包扎。

将实验家兔编号后随机分为四组,每组 4 只:对照组、单纯枪弹伤组、单纯感染组、枪弹伤合并感染组。各观察时相点为经耳缘静脉滴注 LPS 前 1 h,及静脉滴注后 2、6、12、24 h。在上述各时间点取血后行 PLT、PT、APTT、TT、FIB 及 D-二聚体检测。24 h 后给予氯胺酮静脉麻醉处死家兔,取右侧肺脏、肾脏置于 10% 甲醛中固定,行病理学检查。

### 1.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)法定量检测 IL-10

经耳缘静脉滴注 LPS 前 1 h,及静脉滴注后 2、6、12、24 h 各抽取兔静脉血 5 ml,置于无菌干试管,分离血清存于 4℃ 冰箱,等待测定。根据试剂盒说明书进行各项细胞因子测试。

**1.4 免疫印迹(WB)检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1** 静脉滴注 LPS 后 1 h 给予皮下注射 IL-10(25  $\mu$ g/kg),然后取血检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1<sup>[6]</sup>。

**1.5 WB 检测应用 IL-10 抗体后 IL-10 表达水平** 静脉滴注 LPS 后 12 h 再皮下注射 IL-10 抗体(10 mg/kg),然后取血检测 IL-10<sup>[6]</sup>。

**1.6 统计学处理** 用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析,检测数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用重复测量数据方差分析,两两比较采用 Dunnett *t* 检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 四组家兔 PLT 和凝血指标检测结果** 对照组家兔凝血功能、血小板、D-二聚体检测值均符合标准参照值;单纯枪弹伤组,2 h 内 APTT/PT 值及 D-二聚体值较对照组变化不大,12 h 后较对照组稍延长,D-二聚体值较对照组略增加;FIB 及 PLT 值变化无明显规律,均未达到 DIC 诊断标准,无统计学意义;枪弹伤后感染组,2 h 内 APTT 值较对照组稍延长,6 ~ 24 h 内 APTT 较对照组、单纯外伤组明显延长;PLT 值随时间延长而呈下降趋势;D-二聚体持续阳性,且随时间延长,呈逐渐增高趋势,均呈时间依赖性,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );PT/FIB 值变化规律不明显,差异无统计学意义。结合 APTT、PLT、D-二聚体等指标,枪弹伤后感染 2 h 即达到 DIC 诊断标准,未发现明显低凝血期,而 2 h 前可视为 DIC 发生前期。单纯感染组综合 APTT、PLT、D-二聚体等指标也达到 DIC 标准,但 DIC 程度较枪弹伤后感染组轻,差异有统计学意义。见表 1。

**2.2 各组家兔 IL-10 检测结果比较** 单纯枪弹伤组 IL-10 水平与对照组相比,12 h 较对照组高,差异有统计学意义。枪弹伤感染组与对照组及单纯枪弹伤组相比,2 h 内 IL-10 表达水平两组无明显差异;2~6 h 开始明显升高,而 12~24 h 之间达到平台期,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。枪弹伤感染组与单纯感染组相比则无统计学意义,见表 2。

**2.3 IL-10 对 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等促炎因子影响** 静脉滴注 LPS 后 1 h (DIC 前期)应用 IL-10 治疗后可以导致 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等促炎因子表达降低(图 1)。

**2.4 用药后 IL-10 水平的变化** 静脉滴注 LPS 后 12 h (DIC 发生)应用 IL-10 抗体(10 mg/kg)均可以有效降低 IL-10 水平(图 2)。

3 讨论

战场条件下严重感染甚至脓毒血症是枪弹伤的严重并发症之一,枪弹伤部位不同,其并发症不同,例如脏器损伤、出血休克、肝肾损害、感染等。枪弹伤和感染本身均可以通过自身机制激活凝血途径、消耗凝血因子,枪弹伤后合并感染更容易诱发 DIC,其相互关联因素就在于多种细胞因子的作用。单纯应用抗生素、血浆、肝素等传统疗法,DIC 常常继续发展,死亡率仍很高。因此,如何预防及寻求新的治疗方法防治枪弹伤后感染继发 DIC 具有重要的军事医学意义。为研究枪弹伤感染与 DIC 关系,选择下肢枪弹伤,尽量避免产生脏器损伤等其他因素。

表 1 静脉滴注 LPS 前后 APTT、PLT、D-二聚体变化( $\bar{x} \pm s$ )

指标	<i>n</i>	-1 h	2 h	6 h	12 h	24 h
APTT(s)						
对照组	4	17.73 $\pm$ 0.47	17.43 $\pm$ 0.32	17.20 $\pm$ 0.36	17.27 $\pm$ 0.47	17.57 $\pm$ 0.55
单纯枪弹伤组	4	17.80 $\pm$ 0.66	17.40 $\pm$ 0.62	21.23 $\pm$ 0.90	21.97 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>	20.80 $\pm$ 0.95
单纯感染组	4	17.67 $\pm$ 0.59	20.80 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>	23.63 $\pm$ 1.03 <sup>a</sup>	24.73 $\pm$ 1.31 <sup>a</sup>	22.96 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>
枪弹伤感染组	4	16.90 $\pm$ 0.82	22.53 $\pm$ 0.78 <sup>abd</sup>	25.50 $\pm$ 1.20 <sup>abd</sup>	27.50 $\pm$ 1.25 <sup>abd</sup>	25.76 $\pm$ 1.20 <sup>abe</sup>
PLT( $\times 10^9/L$ )						
对照组	4	532.33 $\pm$ 44.65	516.00 $\pm$ 31.76	513.33 $\pm$ 25.03	525.36 $\pm$ 41.49	512.66 $\pm$ 37.09
单纯枪弹伤组	4	498.66 $\pm$ 30.53	488.00 $\pm$ 33.51	468.50 $\pm$ 22.55	424.33 $\pm$ 24.33 <sup>a</sup>	460.34 $\pm$ 25.32
单纯感染组	4	488.33 $\pm$ 31.72	469.33 $\pm$ 21.50	403.38 $\pm$ 30.92 <sup>a</sup>	277.66 $\pm$ 17.62 <sup>a</sup>	203.33 $\pm$ 21.59 <sup>a</sup>
枪弹伤感染组	4	519.00 $\pm$ 35.36	495.00 $\pm$ 34.04	378.00 $\pm$ 25.71 <sup>abf</sup>	208.67 $\pm$ 23.46 <sup>abd</sup>	113.00 $\pm$ 28.00 <sup>abe</sup>
D-二聚体( $\mu g/\mu l$ )						
对照组	4	0.38 $\pm$ 0.04	0.41 $\pm$ 0.02	0.37 $\pm$ 0.12	0.39 $\pm$ 0.10	0.36 $\pm$ 0.07
单纯枪弹伤组	4	0.36 $\pm$ 0.05	0.49 $\pm$ 0.07	0.80 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.95 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.17
单纯感染组	4	0.39 $\pm$ 0.09	0.59 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	1.09 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	1.02 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	0.82 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
外伤感染组	4	0.46 $\pm$ 0.03	0.75 $\pm$ 0.13 <sup>acf</sup>	1.39 $\pm$ 0.20 <sup>abf</sup>	1.44 $\pm$ 0.13 <sup>abe</sup>	1.08 $\pm$ 0.12 <sup>abd</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与单纯枪弹伤组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与单纯感染组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ ,<sup>e</sup> $P < 0.01$ ,<sup>f</sup> $P > 0.05$

表 2 静脉滴注 LPS 前后 IL-10 表达变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	IL-10 (ng/L)				
		-1 h	2 h	6 h	12 h	24 h
对照组	4	7.60 $\pm$ 0.75	8.00 $\pm$ 1.25	7.53 $\pm$ 0.85	7.50 $\pm$ 1.05	8.13 $\pm$ 0.71
单纯枪弹伤组	4	7.11 $\pm$ 0.62	8.57 $\pm$ 0.91	9.40 $\pm$ 0.80	10.83 $\pm$ 1.00 <sup>a</sup>	9.03 $\pm$ 0.90
枪弹伤感染组	4	6.75 $\pm$ 1.04	10.92 $\pm$ 0.97	17.53 $\pm$ 1.54 <sup>ab</sup>	26.03 $\pm$ 2.33 <sup>ab</sup>	28.83 $\pm$ 3.25 <sup>ab</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与单纯枪弹伤组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

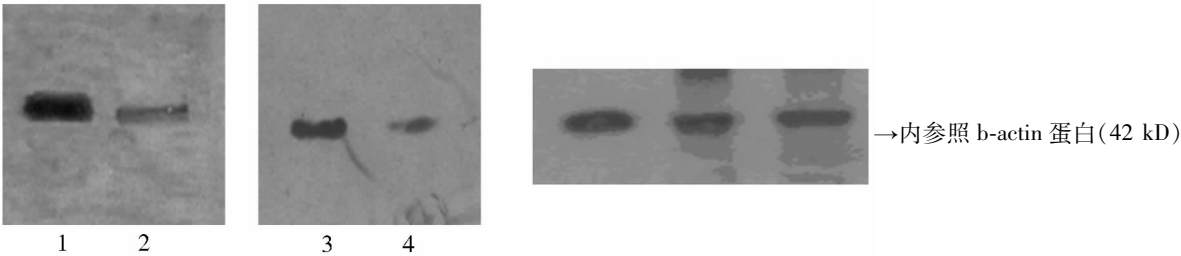


图 1 皮下注射 IL-10 后 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等炎性因子的表达

1. 对照 TNF- $\alpha$ (17 kD);2. 应用 IL-10 后 TNF- $\alpha$  表达下降;3. 对照 IL-1(17.5 kD);4. 应用 IL-10 后 IL-1 表达下降

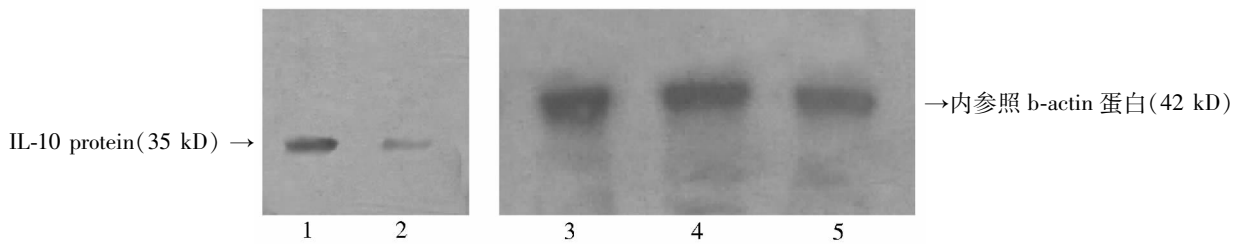


图 2 WB 检测 IL-10 的表达

1. 对照 IL-10; 2. 静脉滴注 LPS 后 12 h 应用 IL-10 抗体导致 IL-10 表达下降; 3. 标准 b-actin 蛋白;  
4. 对照组内参照 b-actin 蛋白; 5. 静脉滴注 LPS 后 12 h 后内参照 b-actin 蛋白(无差别)

在炎症反应与凝血系统异常之间细胞因子具有桥梁样作用,但各种不同细胞因子所起作用并不相同, TNF- $\alpha$ 、IL-1 属于促炎因子,而 IL-10 既具有抗炎因子作用,又在调节凝血功能上具有特殊意义,其在 DIC 发展的不同阶段具有双刃剑作用<sup>[7]</sup>, 需要进行精细调控,恰当应用 IL-10 或者 IL-10 抗体,可以限制枪弹伤后感染继发 DIC 的进程。

在枪弹伤及随后脓毒血症形成期而尚未达到 DIC 阶段可以认为处于 DIC 前期,此期特别是形成脓毒血症时 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等促炎因子表达明显增多。本实验同时检测 IL-10 水平,发现其较对照组等无明显变化,但相对于 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等促炎因子存在相对不足,此时需要增加应用 IL-10 发挥其抗炎作用,从而有利于延缓或者减轻 DIC 进展。而 IL-10 的合成晚于促炎性细胞因子<sup>[2]</sup>, IL-10 约在枪弹伤感染后 2 h 开始明显上升,并随着时间增加,说明此时 IL-10 的分泌过多。但是在外伤后感染向 DIC 发展过程中,大量 IL-10 的产生又会导致严重免疫抑制,有学者发现脓毒血症中后期 IL-10 水平明显升高者其死亡率更高,就是因为其有严重的免疫抑制作用<sup>[8-9]</sup>。感染不能控制,会加重 DIC 进程,故在感染及 DIC 发展过程中又必须发现机体代偿性分泌过多 IL-10 的时效性,并恰当应用 IL-10 抗体中和其不良反应,防止 DIC 的进展。

IL-10 对凝血功能的影响主要通过剂量依赖性抑制 TNF- $\alpha$  作用,间接抑制血小板活化、黏附功能以及 vWF(von willebrand 因子)功能,并抑制纤溶系统激活<sup>[10]</sup>。本研究证实 IL-10 可以导致 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等促炎因子表达降低,提示其抗炎机制及对凝血功能调节均与拮抗 IL-1、TNF- $\alpha$  的功能有关。由于 TNF- $\alpha$  主要在严重感染及 DIC 前期大量产生,故预防性应用 IL-10 必须在 DIC 前期才能产生好的效果。

本研究同时发现单纯下肢枪弹伤后不容易形成 DIC,可能与枪弹伤强度不够有关,但加入感染因素后则很容易形成 DIC,并且 DIC 阳性的各项指标也

较单纯感染组有实际意义,提示加强枪弹伤后感染防治是战场条件下的重要任务。

综上所述,本研究认为枪弹伤后感染极易诱发 DIC,选择合适的时机应用 IL-10 或者 IL-10 抗体有利于治疗枪弹伤后感染继发 DIC。

#### 【参考文献】

- [1] 王良馥,陈自力,熊建生,等.急性创伤性血胸凝血功能异常的临床研究[J].东南国防医药,2009,11(2):100-102.
- [2] Pajkrt D, Camoglio L, Tiel-van Buul MC, et al. Attenuation of proinflammatory response by recombinant human IL-10 in human endotoxemia: effect of timing of recombinant human IL-10 administration[J]. J Immunol, 1997, 158(8): 3971-3977.
- [3] 殷作明,李素芝,胡德耀,等.高原高寒战时环境肢体枪弹伤伤道组织血液灌注的变化特点[J].创伤外科杂志,2007,9(1):64-67.
- [4] Munoz MC, Montes R, Hermida J, et al. Effect of the administration of recombinant hirudin and/or tissue-plasminogen activator (t-PA) on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation model in rabbits[J]. Br J Haematol, 1999, 105(1): 117-121.
- [5] 宋善俊,王鸿利,李家增.弥散性血管内凝血[M].2版.上海:上海科学技术出版社,2001:54-59.
- [6] 奥斯伯 F,金斯顿 RE,布伦特 R.精编分子生物学实验指南[M].颜子颖,王海林,译.北京:科学出版社,1999:414-422.
- [7] Engles RE, Huber TS, Zander DS, et al. Exogenous human recombinant interleukin-10 attenuates hindlimb ischemia-reperfusion injury[J]. J Surg Res, 1997, 69(2): 425-428.
- [8] Ng PC, Li K, Leung TF, et al. Early prediction of sepsis-induced disseminated intravascular coagulation with interleukin-10, interleukin-6, and RANTES in preterm infants[J]. Clin Chem, 2006, 52(6): 1181-1189.
- [9] Olszyna DP, Pajkrt D, Lauw FN, et al. Interleukin 10 inhibits the release of CC chemokines during human endotoxemia[J]. J Infect Dis, 2000, 181(2): 613-620.
- [10] Fumeaux T, Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 166(11): 1475-1482.

(收稿日期:2011-02-09;修回日期:2011-03-11)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)