DOI:10.16016/j.2097-0927.202410036

苹果酸林格液加温液体复苏改善严重创伤致死三联征的机制研究

吴银雨[1],佘 汉[1,2],杜云霞[1,2],张玉玺[1,2],周孝伟[2],李清晖[2],李 涛[2],胡 弋[1],毛庆祥[1],王亚玲[3] 陆军特色医学中心(第三军医大学大坪医院):[1]麻醉科,[2]野战外科研究部战伤休克与输血研究室,[3]护理部,重庆

[**摘要**] **目的** 探讨苹果酸林格液(malate ringer's solution,MR)加温液体复苏改善严重创伤致死三联征的作用及机制。**方法** SPF级SD大鼠(雌雄各半,体质量200~220 g),采用多发伤联合失血性休克构建大鼠严重创伤模型,以随机数字表法将SD大鼠分为8组(n=8):假手术(Sham)组,仅动静脉置管;严重创伤(trauma,Tra)不同时间点(10、30、60、90、120、180 min)组以及严重创伤(Tra)组,分别于模型建立后不做任何处理观察180 min。通过血栓弹力图检测不同时间点各组大鼠活化凝血时间(activated clotting time,ACT)、凝血反应时间(reaction time,R)、血栓最大振幅(maximum amplitude,MA)、血凝块形成速率(Angle)指标变化,检测大鼠尾部出血时间变化、核心体温变化以及动脉血气相关指标改变情况。检测血浆血管性血友病因子(von Willebrand Factor,vWF)水平、肺静脉内皮线粒体呼吸控制率、血管内皮钙黏蛋白(vascular endothelial cadherin,VE-Cadherin)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ共激活因子1α(peroxisome proliferator activating receptor gamma coactivator 1α,PGC1α)、线粒体动力相关蛋白1(dynamin-related protein 1,Drp1)、p-Drp1和线粒体融合蛋白(mitofusin 2,Mfn2)蛋白的表达水平,以评价血管内皮损伤和线粒体功能障碍情况。将SD大鼠按随机数字表法分为3组(n=8):严重创伤后180 min(Tra180 min)组,于创伤后180 min不做任何治疗;MR常温液体复苏(Tra180 min+MR)组,于创伤后60 min时使用医用输血输液加温器常温输注MR进行液体复苏;MR加温液体复苏(Tra180 min+MR+37 ℃)组,于创伤后60 min时使用医用输血输液加温器37 ℃加温输注MR进行液体复苏。观察及检测上述指标,以研究MR的复苏效果。**结果** 与Sham组比较,严重创伤大鼠180 min时ACT和R值显著延长(P<0.05),MA和Angle值显著缩短(P<0.05),尾部出血时间显著延长(P<0.05),二氧化碳分压(partial pressure of carbon dioxide,PCO_2)、HCO_3^-、剩余碱(base excess,BE)水平显著降低(P<0.05),K^+持续升高(P<0.05),Na^+持续降低(P<0.05),Ca^{2+}显著降低(P<0.05)。此外,与Sham组比较,严重创伤大鼠180 min时血浆vWF水平(P<0.05)和肺静脉内皮VE-Cadherin、PGC1α、Mfn2蛋白表达量显著降低(P<0.05),p-Drp1表达增强(P<0.05),肺静脉内皮线粒体呼吸控制率显著下降(P<0.05)。MR液体复苏使大鼠尾部出血时间缩短(P<0.05),核心体温升高(P<0.05),血浆vWF水平升高(P<0.05),VE-Cadherin、PGC1α、和Mfn2蛋白表达量显著升高(P<0.05),p-Drp1蛋白表达量显著降低(P<0.05),以上结果加温MR液体复苏比常温MR液体复苏效果更显著。**结论** MR加温液体复苏可明显改善严重创伤大鼠致死三联征,这可能与其改善血管内皮细胞线粒体功能减轻血管内皮损伤有关。

[**关键词**] 创伤;苹果酸林格液;加温液体复苏;致死三联征;血管内皮细胞

[**中图法分类号**] R641;R654.1;R977.8 [**文献标志码**] A

[**基金项目**] 国家自然科学基金青年科学项目(82300561);重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MSX0713);重庆市科卫联合青年项目(2025QNXM038);重庆英才创新领军人才项目(CSTC2024YCJH-BGZXM0011);陆军军医大学科技创新能力提升专项项目(2023XLC11)

[**通信作者**] 王亚玲,E-mail:hlbwangyl@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2025,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:吴银雨,佘 汉,杜云霞,等.苹果酸林格液加温液体复苏改善严重创伤致死三联征的机制研究[J].陆军军医大学学报,2025,47(03):216-225.DOI:10.16016/j.2097-0927.202410036.

Citation:WU Y Y,SHE H,DU Y X,*et al*.Mechanism of warmed malate ringer's solution in fluid resuscitation in improving the lethal triad of severe trauma[J].J Army Med Univ,2025,47(03):216-225.DOI:10.16016/j.2097-0927.202410036.

Mechanism of warmed malate ringer's solution in fluid resuscitation in improving the lethal triad of severe trauma

WU Yinyu[1], SHE Han[1,2], DU Yunxia[1,2], ZHANG Yuxi[1,2], ZHOU Xiaowei[2], LI Qinghui[2], LI Tao[2], HU Yi[1], MAO Qingxiang[1], WANG Yaling[3] [1]Department of Anesthesiology, [2]Department of War Wound Shock and Transfusion, Institute of Field Surgery, [3]Department of Nursing, Army Medical Center of PLA/Daping Hospital of Third Military Medical University, Chongqing, China

[**Abstract**] Objective To explore the role and mechanism of warm malate ringer's solution (MR) in resuscitation of the lethal triad caused by severe trauma. Methods A rat model of severe trauma was established in SPF-grade SD rats (half male and half female, weighing 200~220 g) using combined multiple injuries and hemorrhagic shock, and the rats were randomly divided into 8 groups (n=8): Sham group, only arterial and venous catheterization; Trauma (Tra) groups with different time points (10, 30, 60, 90, 120, 180 min) and a Trauma group that were observed without any treatment for 180 min after model establishment. The changes of activated clotting time (ACT), reaction time (R), maximum amplitude (MA), and rate of blood clot formation (Angle) at different time points were detected by using thromboelastography, and tail bleeding, core body temperature and arterial blood gas parameters, were also observed and detected. The plasma von Willebrand Factor (vWF) level, mitochondrial respiratory control ratio in pulmonary venous endothelium, and expression levels of vascular endothelial cadherin (VE-Cadherin), peroxisome proliferator activating receptor gamma coactivator 1α (PGC1α), dynamin-related protein 1 (Drp1), p-Drp1, and mitofusin 2 (Mfn2) were detected to evaluate the vascular endothelial injury and mitochondrial dysfunction. Another group of SD rats were randomly divided into severe trauma group (no treatment for 180 min after injury), and MR solution at room temperature and at 37 ℃ groups. MR solution at room temperature or at 37 ℃ was given to the rats using a medical blood transfusion apparatus at 60 min post-trauma. Above indicators were observed and detected to investigate the resuscitation effect of the MR solution. Results Compared with the Sham group, the severely traumatic rats at 180 min after injury had significantly prolonged ACT and R values (P<0.05), shortened MA and decreased Angle values (P<0.05), extended tail bleeding time (P<0.05), lower partial pressure of carbon dioxide (PCO_2) and HCO_3^- and base excess (BE) levels (P<0.05), and continuously increasing K^+ (P<0.05) and decreasing Na^+ (P<0.05) and Ca^{2+} levels (P<0.05). Additionally, plasma vWF level (P<0.05) and protein levels of VE-cadherin, PGC1α and Mfn2 in pulmonary vein endothelium were significantly reduced (P<0.05), the expression of p-Drp1 was enhanced and the mitochondrial respiration control rate was declined in the rats at 180 min after injury (P<0.05). MR solution resuscitation shortened tail bleeding time (P<0.05), increased core body temperature (P<0.05), elevated plasma vWF level (P<0.05), increased protein levels of VE-cadherin, PGC1α and Mfn2 (P<0.05), and decreased that of p-Drp1 protein expression (P<0.05) when compared with the rats at 180 min after severe traumatic injury. The above effects were more significant in the rats infused with the solution at 37 ℃ than those at room temperature. Conclusion Warm MR solution significantly improves the lethal triad in rats after severe trauma, which may be associated with its improving mitochondrial function and attenuating vascular endothelial damage.

[**Key words**] trauma; malate ringer's solution; warmed fluid resuscitation; lethal triad; vascular endothelial cells

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82300561), the General Project of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2023NSCQ-MSX0713), the Joint Medical Research Project for Young Scholars of Chongqing Science and Technology Commission and Chongqing Health Commission (2025QNXM038), the Innovative Leading Talents of Chongqing Talent Program (CSTC2024YCJH-BGZXM0011), and the Special Project of Science and Technology Innovation Capacity Promotion of Army Medical University (2023XLC11). Corresponding author: WANG Yaling, E-mail: hlbwangyl@tmmu.edu.cn

创伤是威胁人类健康的重大疾病。在创伤早期阶段,由于严重失血导致的有效循环血量急剧减少,会引发低血压和组织灌注不足,若不及时治疗,极易导致“致死三联征”,即凝血功能障碍、低体温和代谢性酸中毒,这3种病理状态相互作用,形成恶性循环,对组织和器官功能造成严重损害,显著降低患者的生存率[1]。目前,针对这一综合征的治疗策略主要包括提高环境温度,建立多条输液通路快速扩容和输注血液制品,必要时使用碳酸氢盐纠正酸中毒等,但效果并不显著[2-3]。因此寻找针对严重创伤致死三联征的全新治疗措施具有重要意义。

血管内皮细胞覆盖在血管内壁,具有调节血流、血管通透性和炎症反应的功能[4]。严重创伤时,机械性应力、炎症和缺氧等因素会导致内皮细胞损伤,增加了血管通透性,导致血管内流体外漏,加重低体温和酸中毒[5-7]。同时,内皮损伤还会激活凝血系统,破坏正常的凝血平衡,进而引发或恶化凝血功能障碍[8]。线粒体是细胞的能量工厂,其健康状态对于细胞功能至关重要[9]。内皮细胞线粒体功能显著受损,可导致内皮细胞能量不足和氧化还原失衡,进而削弱其屏障功能。此外,线粒体损伤还会触发内皮细胞的程序性死亡,进一步加剧内皮细胞的丧失。线粒体也可以通过释放线粒体DNA和其他内在信号分子激活先天免疫反应,推动系统性炎症,加剧严重创伤致死三联征的症状[10-12]。因此,血管内皮细胞线粒体在严重创伤致死三联征的病理生理过程中具有重要作用。

苹果酸林格液(malate ringer's solution,MR)是一种临床应用的全新的等渗复苏晶体,理论渗透压309 mOsm/L,实测渗透压290 mOsm/L,与血浆保持一致[13]。同时,该液体模拟血浆电解质组分,电解质含量与血浆成分相近,HCO_3^-含量高达34 mmol/L,能持续有效维持酸碱平衡,防止酸中毒。此外,MR还含有关键成分L-苹果酸(330 mg/500 mL)[14]。L-苹果酸是三羧酸循环中重要的中间产物,对于线粒体内部的能量代谢至关重要[15]。研究发现,MR可通过保护线粒体功能,发挥对失血性休克和脓毒症心血管功能的保护作用[13,16]。在一项围术期肝部分切除术患者的随机对照临床研究中发现,MR相比乳酸林格液能更好地维持患者术中的内环境稳定,降低患者术后的乳酸水平,保护肝功能[17]。然而,MR是否能通过改善血管内皮细胞线粒体功能来减轻严重创伤引起的致死三联征,目前尚不清楚。针对严重创伤后,患者可能出现的低体温状态,加温输液是一种有效的干预手段。通过使用加温的复苏液体,可帮助维持患者核心体温,改善凝血功能,加快复苏进程,是创伤护理中非常重要的一环[18]。但MR加温液体复苏对于严重创伤引起的致死三联征是否具有改善作用,还需要进一步研究。

因此,本研究通过构建大鼠严重创伤模型,观察MR加温液体复苏对严重创伤致死三联征的治疗效果,并进一步阐明机制,以期为严重创伤患者的液体复苏和临床应用范畴提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF级SD大鼠,雌雄各半,12~14周龄,体质量200~220 g,由陆军特色医学中心实验动物中心提供,饲养于SPF级动物饲养环境,饲养期间自由饮水进食。昼夜各半循环照明,湿度恒定(40%~70%),温度控制在22~24 ℃。本研究中使用的所有方案经过陆军军医大学实验动物福利伦理委员会审核批准(AMUWEC20237118),涉及动物处死的方法符合动物伦理和动物福利要求。

1.1.2 主要试剂与仪器 血管内皮钙黏蛋白(vascular endothelial cadherin,VE-Cadherin)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ共激活因子1α(peroxisome proliferator activating receptor gamma coactivator 1α,PGC1α)、线粒体磷酸化动力相关蛋白1(phospho-dynamin-related protein 1,p-Drp1)、线粒体动力相关蛋白1(dynamin-related protein 1,Drp1)及线粒体融合蛋白(mitofusin 2,Mfn2)一抗、山羊抗鼠二抗抗体购自英国Abcam公司;β-actin一抗购自美国Cell Signaling Technology公司;山羊抗兔二抗购自美国Jackson公司;Minute™血管组织总蛋白提取试剂盒购自英文特生物技术(北京)有限公司;大鼠血管性血友病因子(von Willebrand Factor,vWF)ELISA试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司;血栓弹力图(Thromboelastography,TEG)检测试剂盒购自美国Haemonetics Corporation公司;MR(瑞咯啶)购自德国B. 布劳恩·梅尔桑根股份有限公司;医用输血输液加温器购自佰润(北京)生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠严重创伤模型制备 SD大鼠禁食过夜,自由饮水。使用3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔内注射麻醉后仰卧位固定于鼠板上,采用多发伤联合失血性休克构建严重创伤模型。行左侧股动、静脉置管用于放血和液体复苏,右侧股动脉置管监测平均动脉压,右侧颈总动脉置入温度探头测量核心体温。自耻骨

联合至剑突下缘处开腹,钳夹伤左侧肝下缘(深度1 cm,持续2 s,重复4次,每次钳夹伤位置间隔0.5 cm)。关闭腹腔,经左侧股动脉抽血,使大鼠失血量为全身血量的30%[失血量(mL)=体质量×7%×30%],再行双侧胫骨上段闭合性骨折,创伤模型构建完成。30 min后监测大鼠动脉血压,若维持在40~50 mmHg内波动,表示模型构建成功。本实验模型成功率为80%。

1.2.2 实验分组

1.2.2.1 严重创伤后大鼠致死三联征发生情况及血管内皮线粒体功能检测 将SD大鼠采用随机数字表法分为8组(n=8):假手术(Sham)组、严重创伤(trauma,Tra)不同时间点(10、30、60、90、120、180 min)组、严重创伤(Tra)组。Sham组仅麻醉和动静脉置管,Tra组于创伤模型构建完成后不同时间点取各组大鼠腹主动脉血检测血栓弹力图,检测Tra60 min组和Tra180 min组动脉血气,通过温度探头实时监测并记录Sham组和Tra组大鼠核心体温。检测Sham组和Tra180 min组大鼠尾部出血时间、血浆vWF浓度、肺静脉内皮线粒体呼吸控制率和肺静脉血管总蛋白VE-Cadherin、PGC1α、Mfn2、Drp1、p-Drp1(s616)蛋白表达。

1.2.2.2 MR液体复苏后大鼠致死三联征及内皮线粒体功能检测 将SD大鼠采用随机数字表法分为3组(n=8):Tra180 min组、MR常温液体复苏组(Tra180 min+MR组)、MR加温液体复苏组(Tra180 min+MR+37 ℃组)。Tra180 min组:在创伤模型构建完成后不予任何治疗放置180 min;Tra180 min+MR组:在创伤模型构建完成后60 min时,使用医用输血输液加温器以20 mL/h的速度输注2倍失血量的常温MR;Tra180 min+MR+37 ℃组:将MR提前放置在水浴箱37 ℃水浴2 h,于创伤模型构建完成后60 min时,使用医用输血输液加温器以20 mL/h的速度加温输注2倍失血量的水浴2 h后的MR。检测各组大鼠尾部出血时间、核心体温、血浆vWF水平、肺静脉内皮线粒体呼吸控制率和动脉血气,检测肺静脉血管总蛋白VE-Cadherin、PGC1α、Mfn2、Drp1、p-Drp1(s616)蛋白表达。

1.2.3 血栓弹力图检测 在大鼠腹腔内注射戊巴比妥钠麻醉后,打开大鼠腹腔,暴露腹主动脉。5 mL注射器抽取2.7 mL腹主动脉血注入含有枸橼酸钠300 μL的动脉采血管中,轻轻颠倒混匀,15 min内上机检测。检测试剂需提前复温至室温,血栓弹力检测仪需提前开机自检并预热。待试剂杯预热至37 ℃,吸取20 μL纯水稀释检测试剂,每个试剂杯加入10 μL稀释后的检测试剂和20 μL复温后的$CaCl_2$试剂,再加入340 μL枸橼酸化的腹主动脉血样品,检测活化凝血时间(activated clotting time,ACT)、凝血反应时间(reaction time,R)、血栓最大振幅(maximum amplitude,MA)、血凝块形成速率(Angle)等指标。

1.2.4 动脉血气检测 在大鼠腹腔内注射戊巴比妥钠麻醉后,打开大鼠腹腔,暴露腹主动脉。用浓肝素湿润后的1 mL注射器抽取约500 μL的腹主动脉血,排空注射器内的空气并用橡胶塞封堵针头,立即上机检测动脉血酸碱度(potential of hydrogen,PH)、二氧化碳分压(partial pressure of carbon dioxide,PCO_2)、剩余碱(base excess,BE)、HCO_3^-、K^+、Na^+、Ca^{2+}、Cl^-和乳酸(lactic acid,Lac)水平,观察大鼠酸碱和电解质变化。

1.2.5 尾部出血实验 在大鼠腹腔内注射戊巴比妥钠麻醉后,用量尺测量并标记大鼠尾部3 mm直径处,然后将尾巴置于硬质平整台面上,双指固定标记两侧1 cm处,用外科手术刀片沿标记处垂直切断大鼠尾巴。每只大鼠使用一个新的手术刀片,确保切面平整无受损。立即将尾巴断端置于装有37 ℃生理盐水的EP管中,观察断尾处血流情况,记录出血时间。20 min后,无论出血是否停止,均终止试验。然后,将尾巴从EP管中取出,环形缝合断端,防止进一步出血。将大鼠放回笼中,继续饲养。

1.2.6 Western blot检测肺静脉蛋白表达 在大鼠腹腔内注射戊巴比妥钠麻醉后,正中开胸取心,将肺置于体式显微镜下用显微镊和显微剪分离远端肺静脉,小心去除附着在血管周围的组织后,纵向剪开血管,用预冷的PBS轻轻漂洗去除血管内的血液。称取20~30 mg血管组织,用剪刀将组织剪成1 mm×1 mm小块,放到离心管柱套管中。加入50~80 mg蛋白提取粉于离心管柱中并覆盖样品。立即用研磨棒向下反复按压旋转研磨2~3 min,再加入100 μL裂解液继续研磨1 min。盖上盖子,于4 ℃下以14 000×g离心1 min,拿掉离心柱,上清即为总蛋白。转移上清至新的离心管,加入loading buffer,105 ℃煮沸8 min使蛋白变性,然后行SDS-PAGE电泳,400 mA恒流转膜25 min,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加入一抗(VE-Cadherin、p-Drp1、Drp1、PGC1α、Mfn2、β-actin均为1∶1 000),4 ℃过夜孵育,TBST洗涤5 min×3次,加入荧光二抗(山羊抗鼠、山羊抗兔均为1∶20 000)室温孵育1 h,TBST洗涤5 min×3次,用双色红外成像系统扫描成像。用Image J分析软件读取灰度值,β-actin作为内参计算灰度比值。

1.2.7 肺静脉内皮线粒体呼吸控制率测定 在大

鼠腹腔内注射戊巴比妥钠麻醉后,正中开胸取心,将肺置于体式显微镜下用显微镊和显微剪分离远端肺静脉,小心去除附着在血管周围的组织后,纵向剪开血管,PBS轻轻漂洗,去除血污,放入20 mL预冷的分离缓冲液中(分离缓冲液配方:0.25 mol/L蔗糖,0.10 mmol/L Na_2EDTA,0.01 mol/L Tris)研磨匀浆。将匀浆液于4 ℃以1 600×*g*离心12 min,收集上清。再于4 ℃,25 000×*g*离心15 min,收集沉淀,并重悬于2 mL分离缓冲液中,4 ℃放置待测。采用文献[19]中的Lowry法测定线粒体蛋白浓度。连接线粒体功能分析仪与恒温水浴锅(设置参数30 ℃),预热30 min。启动软件,并用饱和硫代硫酸钠、双蒸水校准仪器。依次在反应室中加入线粒体反应介质(0.25 mol/L蔗糖,15.00 mmol/L KCl,1.00 mmol/L Na_2EDTA,15.00 mmol/L KH_2PO_4,5.00 mmol/L $MgCl_2$,30 ℃温度下调节pH至7.4)150 μL、线粒体待测液150 μL,并平衡2 min,再加入0.2 mL的反应底物(苹果酸钠0.5 mol/L,L-谷氨酸钠0.5 mol/L),再次平衡后,加入50 μL的0.5 mol/L ADP。通过线粒体溶氧仪记录曲线,检测线粒体的耗氧量。计算线粒体呼吸控制率反映线粒体功能,线粒体呼吸控制率的计算是有无ADP耗氧量的比值。

1.2.8 血浆vWF检测 在大鼠腹腔内注射戊巴比妥钠麻醉后,打开大鼠腹腔,经腹主动脉抽取全血于4 ℃以1 200×*g*离心10 min,上清即为血浆。提前将样品和vWF ELISA试剂盒复温至室温,取出试剂盒孔板,设置空白对照孔、标准品孔及样本品孔,并对应设置1个复孔。配制标准品曲线浓度后,依次在试剂盒孔板内加入100 μL/孔标准品和待测样本,用封板膜封闭后于37 ℃恒温箱干浴90 min。弃去各反应孔内液体并在滤纸上拍干,每孔加入100 μL生物标记vWF抗体工作液至反应孔中,于37 ℃恒温箱继续干浴60 min。弃去各反应孔内液体并在滤纸上拍干,200 μL/孔洗涤液重复洗涤4次,每次2 min。将HRP标记链霉亲和素工作液100 μL/孔于37 ℃恒温箱干浴30 min。再次200 μL/孔洗涤液重复洗涤4次,每次2 min。然后每孔加入90 μL显色剂,于37 ℃恒温箱干浴15 min后,每孔加入50 μL终止液,5 min内在450 nm处检测光密度值[*OD*(450)]。绘制标准曲线,计算样品浓度。

1.3 统计学分析

采用SPSS 26.0统计软件分析数据。符合正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示。两组间采用非配对*t*检验,多组间比较采用单因素方差分析,用LSD进行多组间方差齐检验。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 严重创伤可诱发大鼠致死三联征

与Sham组比较,Tra30 min组大鼠表现为ACT和R值明显缩短,MA和Angle值明显延长,凝血功能呈激活状态;而Tra180 min组大鼠表现为ACT与R值明显延长,MA和Angle值明显缩短,凝血功能呈显著低凝状态($P<0.05$,图1A~D)。同时,Tra180 min组大鼠尾部出血时间明显延长($P<0.05$,图1E)。连续监测核心体温发现,严重创伤30 min时,大鼠核心体温呈断崖式下降,最终波动在35 ℃左右($P<0.05$,图1F)。同时检测了大鼠动脉血气,结果发现,Tra60 min组大鼠PH、PCO_2、HCO_3^-、BE显著低于Sham组,呈代谢性酸中毒;Tra180 min组大鼠PH显著高于Sham组,PCO_2、HCO_3^-、BE仍显著低于Sham组,呈呼吸性碱中毒($P<0.05$,表1)。此外,与Sham组比较,Tra60 min组大鼠的K^+、Ca^{2+}、Cl^-和Lac显著上升,Na^+下降,表现为高钾、低钠、高钙、高氯、高乳酸血症;与Sham组比较,Tra180 min组大鼠K^+持续升高,Na^+持续下降,Ca^{2+}显著降低,Lac虽有所回落但仍高于Sham组,呈高钾、低钠、低钙、高乳酸血症($P<0.05$,表2)。

表1 严重创伤对大鼠动脉血气(酸碱指标)的影响($n=8$,$\bar{x}\pm s$)

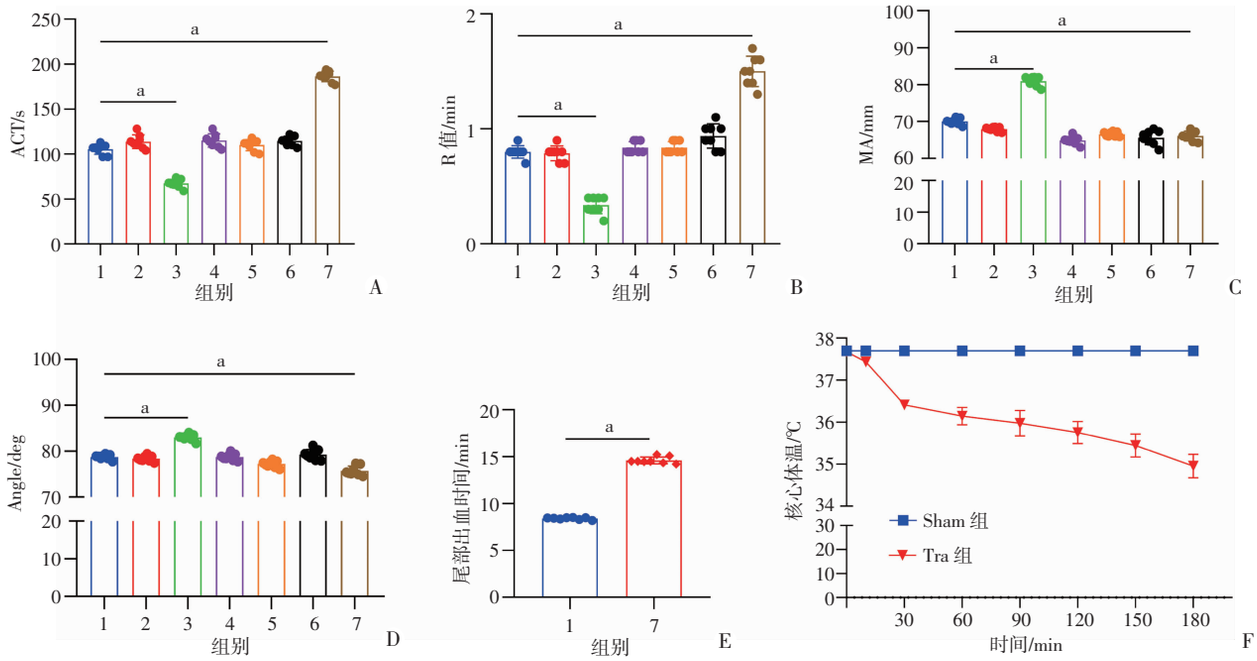
组别	PH	PCO_2 /mmHg	HCO_3^- /(mmol/L)	BE
Sham	7.39±0.04	44.34±1.04	25.80±1.14	2.36±0.70
Tra60 min	7.31±0.01[a]	35.63±2.54[a]	16.50±3.18[a]	−5.96±0.81[a]
Tra180 min	7.45±0.04[a]	26.20±1.53[a]	20.40±1.87[a]	−3.70±0.39[a]

a:$P<0.05$,与Sham组比较

表2 严重创伤对大鼠动脉血气(电解质和乳酸)的影响($n=8$,$\bar{x}\pm s$)

组别	K^+ /(mmol/L)	Na^+ /(mmol/L)	Ca^{2+} /(mmol/L)	Cl^- /(mmol/L)	Lac /(mmol/L)
Sham	3.75±0.13	142.50±1.20	1.369±0.026	105.13±1.96	0.88±0.25
Tra60 min	4.80±0.38[a]	138.00±2.14[a]	1.433±0.026[a]	109.00±2.78[a]	4.64±1.18[a]
Tra180 min	5.36±0.51[a]	135.38±1.51[a]	1.269±0.029[a]	104.00±2.07	2.69±0.34[a]

a:$P<0.05$,与Sham组比较



1:Sham组;2:Tra10 min组;3:Tra30 min组;4:Tra60 min组;5:Tra90 min组;6:Tra120 min组;7:Tra180 min组;a:$P<0.05$

A~D:严重创伤不同时间点各组ACT值、R值、MA值和Angle值的变化情况;E:严重创伤大鼠尾部出血时间情况;F:严重创伤大鼠核心体温变化情况

图1　严重创伤大鼠凝血功能及核心体温变化情况($n=8,\bar{x}\pm s$)

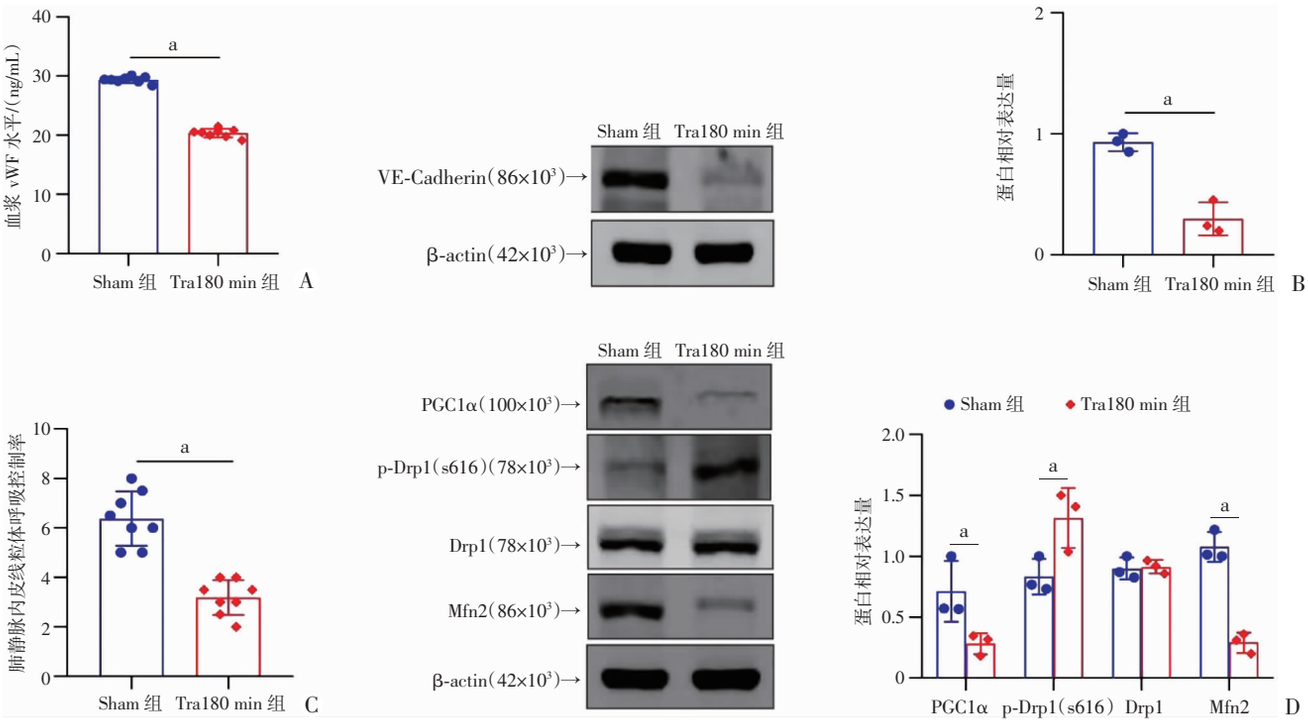
2.2　严重创伤可导致血管内皮细胞损伤和线粒体功能障碍

为了明确严重创伤对血管内皮细胞的影响,检测了血浆vWF水平和肺静脉VE-Cadherin蛋白的表达水平变化。结果显示,与Sham组比较,Tra180 min组大鼠血浆vWF水平明显下降,肺静脉VE-Cadherin蛋白表达显著降低($P<0.05$,图2A、B),表明严重创伤可导致血管内皮细胞损伤。进一步观察了严重创伤对血管内皮线粒体功能的影响,结果显示,与Sham组比较,Tra180 min组大鼠肺静脉内皮线粒体呼吸控制率显著下降($P<0.05$,图2C)。此外,线粒体生成相关蛋白PGC1α和线粒体融合相关蛋白Mfn2表达水平显著降低,而线粒体分裂相关蛋白Drp1(s616)磷酸化水平显著升高($P<0.05$,图2D),提示严重创伤可引起血管内皮线粒体功能障碍。

2.3　MR加温液体复苏对严重创伤大鼠致死三联征具有改善作用

进一步观察MR常温液体复苏和加温液体复苏对严重创伤大鼠的影响。结果显示,与Tra180 min组比较,Tra180 min+MR组和Tra180 min+MR+37 ℃组液体复苏均可显著改善严重创伤大鼠凝血功能,表现为尾部出血时间缩短($P<0.05$,图3A);均可改善严重创伤后大鼠核心体温,表现为核心体温升高($P<0.05$,图3B);均可显著减轻严重创伤大鼠肺静脉内皮细胞损伤,表现为血浆vWF水平升高和肺静脉VE-Cadherin蛋白表达量升高($P<0.05$,图3C、D);均可显著改善严重创伤大鼠肺静脉内皮细胞线粒体功能,表现为肺静脉内皮线粒体呼吸控制率显著升高($P<0.05$,图3E),线粒体生成相关蛋白PGC1α和线粒体融合相关蛋白Mfn2表达量升高,Drp1磷酸化水平下降($P<0.05$,图3F)。另外,Tra180 min+MR组和Tra180 min+MR+37 ℃组液体复苏后,严重创伤大鼠的酸碱平衡紊乱、电解质异常和高乳酸血症得到纠正,表现为PH降低接近正常水平,PCO_2、HCO_3^-、BE、Na^+和Ca^{2+}升高,K^+和Lac降低($P<0.05$,表3、4)。结果提示,Tra180 min+MR组和Tra180 min+MR+37 ℃组液体复苏均可改善严重创伤大鼠致死三联征。

同时,发现Tra180 min+MR+37 ℃组对严重创伤大鼠致死三联征的改善作用优于Tra180 min+MR组。结果显示,与Tra180 min+MR组比较,Tra180 min+MR+37 ℃组能进一步缩短尾部出血时间,提升核心体温,提高血浆vWF水平,增加肺静脉VE-Cadherin蛋白表达量,增加PGC1α、Mfn2的表达量和降低Drp1磷酸化水平($P<0.05$,图3)。此外,动脉血气显示,Tra180 min+MR+37 ℃组大鼠的PCO_2、BE进一步升高,K^+和Lac进一步降低($P<0.05$,表3、4)。



a:$P<0.05$

A:ELISA检测严重创伤大鼠血浆vWF水平($n=8,\bar{x}\pm s$);B:Western blot检测肺静脉VE-Cadherin蛋白相对表达量($n=3,\bar{x}\pm s$);C:线粒体溶氧仪检测严重创伤大鼠肺静脉内皮线粒体呼吸控制率($n=8,\bar{x}\pm s$);D:Western blot检测肺静脉PGC1α、p-Drp1、Drp1、Mfn2蛋白相对表达量($n=3,\bar{x}\pm s$)

图2 严重创伤对大鼠血管内皮细胞和线粒体功能的影响

表3 MR加温液体复苏对严重创伤大鼠动脉血气(酸碱指标)的影响($n=8,\bar{x}\pm s$)

组别	PH	PCO_2/mmHg	HCO_3^-/(mmol/L)	BE
Tra180 min	7.46±0.02	26.90±1.18	21.09±2.16	−4.18±0.85
Tra180 min+MR	7.37±0.01[a]	36.89±1.17[a]	23.75±0.60[a]	−1.08±1.37[a]
Tra180 min+MR+37 ℃	7.37±0.01[a]	44.48±0.58[ab]	24.69±0.51[a]	2.31±0.54[ab]

a:$P<0.05$,与Tra180 min组比较;b:$P<0.05$,与Tra180 min+MR组比较

表4 MR加温液体复苏对严重创伤大鼠动脉血气(电解质和乳酸)的影响($n=8,\bar{x}\pm s$)

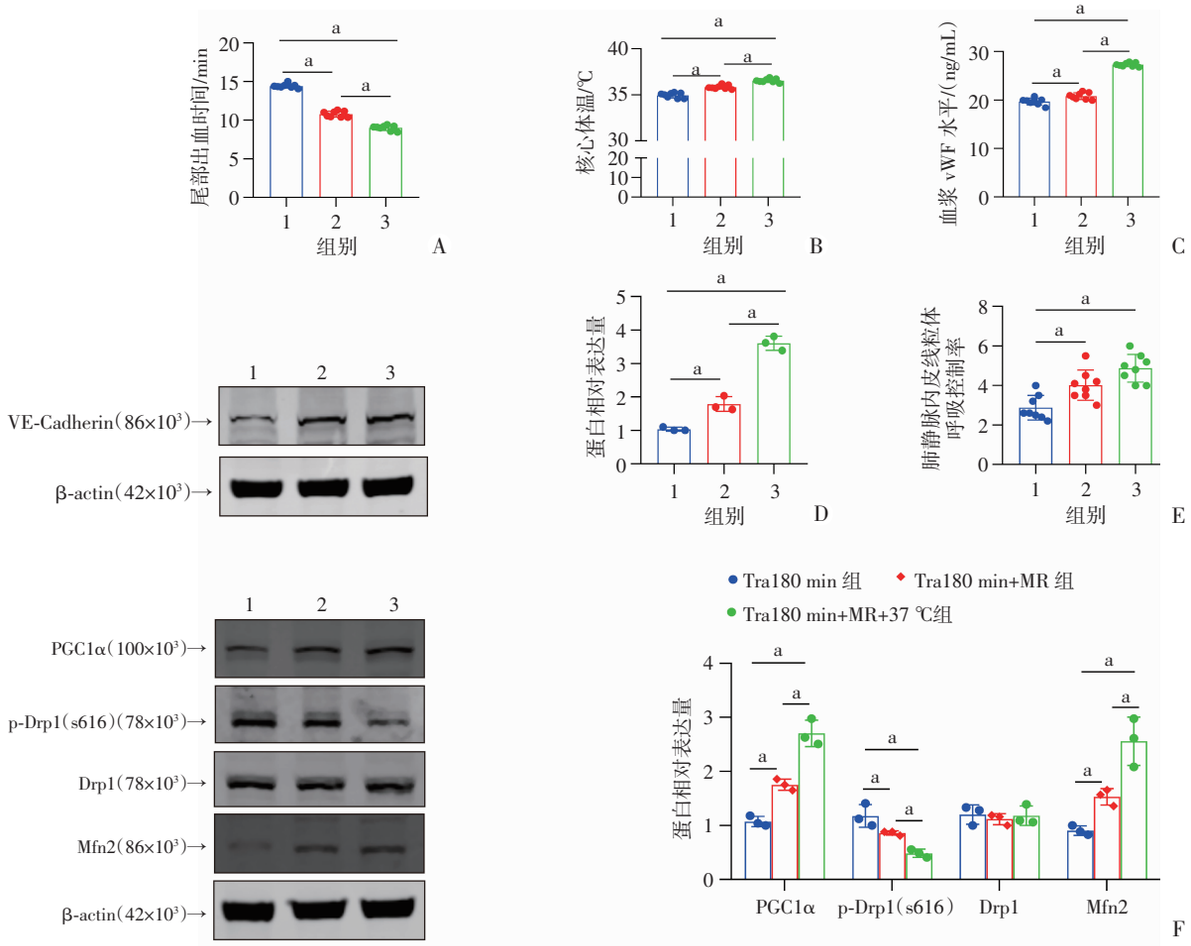
组别	K^+/(mmol/L)	Na^+/(mmol/L)	Ca^{2+}/(mmol/L)	Cl^-/(mmol/L)	Lac/(mmol/L)
Tra180 min	5.34±0.47	135.00±1.85	1.265±0.075	102.75±1.28	2.81±0.31
Tra180 min+MR	4.33±0.25[a]	140.88±2.23[a]	1.373±0.019[a]	103.63±1.06	1.39±0.20[a]
Tra180 min+MR+37 ℃	3.91±0.16[ab]	141.13±1.64[a]	1.394±0.011[a]	104.63±1.06	1.00±0.13[ab]

a:$P<0.05$,与Tra180 min组比较;b:$P<0.05$,与Tra180 min+MR组比较

3 讨论

3.1 血管内皮细胞的损伤是引起致死三联征的关键因素

本研究发现,MR可能通过减轻血管内皮细胞损伤改善严重创伤诱发的致死三联征。严重创伤后,机体大量出血导致血容量减少、组织灌注不足和缺血缺氧,引发致死三联征[1]。肺作为氧气交换的门户,含有丰富的血管,在全身应激时首先受到影响。血管内皮细胞是粘附在血管内皮的第一层细胞,具有调节血管内皮完整性和通透性的作用[20],对维持血管正常功能发挥关键作用。血管内皮细胞还负责合成和释放vWF因子,内皮细胞损伤可导致vWF水平下降,破坏凝血级联反应[21]。内皮细胞损伤还可导致血管通透



1:Tra180 min 组;2:Tra180 min+MR 组;3: Tra180 min+MR+37 ℃组;a:$P<0.05$

A:严重创伤大鼠尾部出血时间($n=8,\bar{x}\pm s$);B:严重创伤大鼠核心体温变化($n=8,\bar{x}\pm s$);C:ELISA 检测严重创伤大鼠血浆 vWF 水平($n=8,\bar{x}\pm s$);D:Western blot 检测肺静脉 VE-Cadherin 蛋白相对表达量($n=3,\bar{x}\pm s$);E:线粒体溶氧仪检测严重创伤大鼠肺静脉内皮线粒体呼吸控制率($n=8,\bar{x}\pm s$);F:Western blot 检测肺静脉 PGC1α、p-Drp1、Drp1、Mfn2 蛋白相对表达量($n=3,\bar{x}\pm s$)

图3　MR 加温液体复苏对严重创伤大鼠凝血功能、核心体温及血管内皮线粒体的影响

性增加,引发组织水肿,影响氧气交换[22],从而影响内皮屏障功能,恶化凝血障碍[22-23]。其次,内皮细胞还参与微循环的调节,影响血流量和热量散失[24]。最后,内皮细胞也是氧化和炎症反应中重要的调节者,受损的内皮细胞可促进炎症级联反应,引发广泛的组织缺氧和酸中毒[25-26]。因此,血管内皮细胞的损伤是引起致死三联征的关键因素,通过改善血管内皮细胞功能,可能是纠正严重创伤后致死三联征的重要策略。

3.2　血管内皮屏障功能与线粒体功能密切相关

线粒体是细胞的能量工厂,可通过产生 ATP 提供内皮细胞维持其完整性和功能所需的能量支持[27]。研究发现,线粒体功能障碍可以导致内皮细胞受损,增加血管通透性,削弱屏障功能[28]。此外,线粒体是活性氧的重要来源,适度的活性氧在信号转导中起到关键作用,可调节内皮细胞的增殖、迁移和分化。然而,过量的活性氧可能导致氧化应激,引发细胞损伤和内皮屏障功能紊乱[29-30]。因此,可以通过改善内皮细胞的线粒体功能,维持内皮细胞的屏障功能。

3.3　MR 通过改善血管内皮线粒体功能纠正血管内皮损伤

MR 是一种含有苹果酸的新型电解质溶液。苹果酸是三羧酸循环中的一个重要中间产物,直接参与能量的产生。在线粒体内,苹果酸通过苹果酸脱氢酶催化,生成富能量的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide,NADH)和草酰乙

酸,这一过程对维持细胞的能量代谢平衡至关重要[15]。此外,苹果酸还能作为底物,通过苹果酸-天冬氨酸穿梭系统运输NADH跨越线粒体内膜,实现胞质和线粒体内的还原当量交换,从而支持氧化磷酸化途径的高效运作。因此,苹果酸不仅助力于直接的能量生成,更通过促进NADH的交互,增强线粒体的整体代谢效率和功能稳定性[15,31]。因而,使用MR进行液体复苏,可能通过改善线粒体功能,纠正严重创伤导致的血管内皮损伤。

3.4 加温液体复苏可纠正严重创伤致死三联征

本研究发现,MR加温液体复苏对严重创伤致死三联征具有良好的改善作用。在严重创伤患者中,大量失血、暴露于冷环境以及休克引发的体温中枢调节紊乱是低体温的始动因素[32]。同时,在救治过程中大量输注低温复苏液和血液制品,会加剧低体温的发生[33]。低体温可以通过影响血小板功能和凝血酶原酶系的活性来延长凝血时间,加剧患者出血,也可以影响机体代谢率和氧合效率,对酸碱平衡产生一定影响[34-35]。致死三联征是严重创伤早期极易诱发的严重并发症之一,加温液体复苏是提升核心体温的一种简单而有效的干预手段,可以通过阻止低体温的恶化进而避免凝血功能障碍、酸中毒等,在改善机体的代谢状态等方面快速调节患者的临床状态,从而提高患者的生存率。

本研究发现,严重创伤可诱发大鼠致死三联征,表现为凝血功能障碍、核心体温下降、酸碱平衡失调及电解质紊乱、高乳酸血症,其机制可能与血管内皮细胞损伤和线粒体功能障碍有关。本研究表明MR加温液体复苏策略可纠正严重创伤致死三联征,为严重创伤患者的液体复苏提供理论依据。

虽然本研究通过大鼠模型验证了MR加温液体复苏对于严重创伤致死三联征的改善作用,但其结果还需要在临床研究中进一步验证,以评估其安全性、有效性和适用范围,力争未来在危重症患者救治中推广应用。此外,本研究未深入探讨MR加温液体复苏改善内皮线粒体功能的具体分子机制,需要在以后的研究中进一步深入阐明。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] MOORE E E, MOORE H B, KORNBLITH L Z, *et al*. Trauma-induced coagulopathy [J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7(1): 30. DOI:10.1038/s41572-021-00264-3.

[2] SHAH A, KERNER V, STANWORTH S J, *et al*. Major haemorrhage: past, present and future [J]. Anaesthesia, 2023, 78(1): 93-104. DOI:10.1111/anae.15866.

[3] DITZEL R M Jr, ANDERSON J L, EISENHART W J, *et al*. A review of transfusion- and trauma-induced hypocalcemia: is it time to change the lethal triad to the lethal diamond?[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2020, 88(3): 434-439. DOI: 10.1097/TA.0000000000002570.

[4] TRIMM E, RED-HORSE K. Vascular endothelial cell development and diversity [J]. Nat Rev Cardiol, 2023, 20(3): 197-210. DOI:10.1038/s41569-022-00770-1.

[5] MOLEMA G, ZIJLSTRA J G, VAN MEURS M, *et al*. Renal microvascular endothelial cell responses in sepsis-induced acute kidney injury[J]. Nat Rev Nephrol, 2022, 18(2): 95-112. DOI:10.1038/s41581-021-00489-1.

[6] JOFFRE J, HELLMAN J. Oxidative stress and endothelial dysfunction in sepsis and acute inflammation [J]. Antioxid Redox Signal, 2021, 35(15): 1291-1307. DOI: 10.1089/ars.2021.0027.

[7] POBER J S, SESSA W C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation [J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(10): 803-815. DOI:10.1038/nri2171.

[8] WITTIG J, DREKOLIA M K, KYSELOVA A, *et al*. Endothelial-dependent S-Sulfhydration of tissue factor pathway inhibitor regulates blood coagulation [J]. Redox Biol, 2023, 62: 102694. DOI:10.1016/j.redox.2023.102694.

[9] NUNNARI J, SUOMALAINEN A. Mitochondria: in sickness and in health [J]. Cell, 2012, 148(6): 1145-1159. DOI: 10.1016/j.cell.2012.02.035.

[10] LIN R Z, IM G B, LUO A C, *et al*. Mitochondrial transfer mediates endothelial cell engraftment through mitophagy[J]. Nature, 2024, 629(8012): 660-668. DOI:10.1038/s41586-024-07340-0.

[11] DAVIDSON S M, DUCHEN M R. Endothelial mitochondria: contributing to vascular function and disease [J]. Circ Res, 2007, 100(8): 1128-1141. DOI: 10.1161/01.RES.0000261970.18328.1d.

[12] LI S P, DENG J J, SUN D D, *et al*. FBXW7 alleviates hyperglycemia-induced endothelial oxidative stress injury *via* ROS and PARP inhibition[J]. Redox Biol, 2022, 58: 102530. DOI:10.1016/j.redox.2022.102530.

[13] TAN L, SHE H, ZHENG J, *et al*. Effects of Malate Ringer's solution on myocardial injury in sepsis and enforcement effects of TPP@PAMAM-MR[J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 591. DOI:10.1186/s12967-022-03811-y.

[14] DAI Z L, WU J, MENG C, *et al*. Ringer's malate solution protects against the multiple organ injury and dysfunction caused by hemorrhagic shock in rats[J]. Shock, 2012, 38

(3): 268-274. DOI:10.1097/SHK.0b013e318264e664.

[15] DAO O, KUHNERT F, WEBER A P M, *et al*. Physiological functions of malate shuttles in plants and algae [J]. Trends Plant Sci, 2022, 27(5): 488-501. DOI: 10.1016/j.tplants.2021.11.007.

[16] TAN L, SHE H, WANG Y, *et al*. The new nano-resuscitation solution (TPP-MR) attenuated myocardial injury in hemorrhagic shock rats by inhibiting ferroptosis[J]. Int J Nanomedicine, 2024, 19: 7567-7583. DOI: 10.2147/IJN.S463121.

[17] 季节, 蔡林林, 傅海龙, 等. 苹果酸醋酸钠林格液用于围手术期肝缺血保护的随机对照临床研究[J]. 肝脏, 2018, 23(8): 676-680.
JI J, CAI L L, FU H L, *et al*. A randomized controlled trial of Ringer's malate solution in perioperative hepatic ischemia protection [J]. Chin Hepatol, 2018, 23(8): 676-680.

[18] CAMPBELL G, ALDERSON P, SMITH A F, *et al*. Warming of intravenous and irrigation fluids for preventing inadvertent perioperative hypothermia [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2015, 2015(4): CD009891. DOI: 10.1002/14651858.CD009891.pub2.

[19] HIRAKAWA A, TAKEYAMA N, NAKATANI T, *et al*. Mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in ischemia-reperfusion injury of the rat liver[J]. J Surg Res, 2003, 111(2): 240-247. DOI: 10.1016/s0022-4804(03)00091-x.

[20] OPAL S M, VAN DER POLL T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock[J]. J Intern Med, 2015, 277(3): 277-293. DOI:10.1111/joim.12331.

[21] ZIFKOS K, BOCHENEK M L, GOGIRAJU R, *et al*. Endothelial PTP1B deletion promotes VWF exocytosis and venous thromboinflammation [J]. Circ Res, 2024, 134(10): e93-e111. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.124.324214.

[22] TANG F, ZHAO X L, XU L Y, *et al*. Endothelial dysfunction: Pathophysiology and therapeutic targets for sepsis-induced multiple organ dysfunction syndrome [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 178: 117180. DOI:10.1016/j.biopha.2024.117180.

[23] YING J Y, ZHANG C Y, WANG Y D, *et al*. Sulodexide improves vascular permeability *via* glycocalyx remodelling in endothelial cells during sepsis[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1172892. DOI:10.3389/fimmu.2023.1172892.

[24] FUJII N, MEADE R D, SCHMIDT M D, *et al*. The effect of acute intradermal administration of ascorbate on heat loss responses in older adults with uncomplicated controlled hypertension[J]. Exp Physiol, 2022, 107(8): 834-843. DOI:10.1113/EP090422.

[25] JUNG E, BAEK E B, HONG E J, *et al*. TXNIP in liver sinusoidal endothelial cells ameliorates alcohol-associated liver disease *via* nitric oxide production[J]. Int J Biol Sci, 2024, 20(2): 606-620. DOI:10.7150/ijbs.90781.

[26] GUO L, LI S Y, JI F Y, *et al*. Role of Angptl4 in vascular permeability and inflammation[J]. Inflamm Res, 2014, 63(1): 13-22. DOI:10.1007/s00011-013-0678-0.

[27] DIKALOVA A, FEHRENBACH D, MAYOROV V, *et al*. Mitochondrial CypD acetylation promotes endothelial dysfunction and hypertension[J]. Circ Res, 2024, 134(11): 1451-1464. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.123.323596.

[28] KLUGE M A, FETTERMAN J L, VITA J A. Mitochondria and endothelial function[J]. Circ Res, 2013, 112(8): 1171-1188. DOI:10.1161/CIRCRESAHA.111.300233.

[29] XU T, DONG Q, LUO Y X, *et al*. *Porphyromonas gingivalis* infection promotes mitochondrial dysfunction through Drp1-dependent mitochondrial fission in endothelial cells[J]. Int J Oral Sci, 2021, 13(1): 28. DOI: 10.1038/s41368-021-00134-4.

[30] LI W J, NIE S P, YAO Y F, *et al*. *Ganoderma atrum* polysaccharide ameliorates hyperglycemia-induced endothelial cell death *via* a mitochondria-ROS pathway[J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(37): 8182-8191. DOI: 10.1021/acs.jafc.5b03462.

[31] WEISSHAAR N, MA S C, MING Y N, *et al*. The malate shuttle detoxifies ammonia in exhausted T cells by producing 2-ketoglutarate[J]. Nat Immunol, 2023, 24(11): 1921-1932. DOI:10.1038/s41590-023-01636-5.

[32] STAAB D B, SORENSEN V J, FATH J J, *et al*. Coagulation defects resulting from ambient temperature-induced hypothermia[J]. J Trauma, 1994, 36(5): 634-638. DOI:10.1097/00005373-199405000-00006.

[33] PAAL P, PASQUIER M, DAROCHA T, *et al*. Accidental hypothermia: 2021 update[J]. Int J Environ Res Public Health, 2022, 19(1): 501. DOI:10.3390/ijerph19010501.

[34] BERNABEI A F, LEVISON M A, BENDER J S. The effects of hypothermia and injury severity on blood loss during trauma laparotomy[J]. J Trauma, 1992, 33(6): 835-839. DOI:10.1097/00005373-199212000-00007.

[35] GONG P, ZHANG M Y, ZHAO H, *et al*. Effect of mild hypothermia on the coagulation-fibrinolysis system and physiological anticoagulants after cardiopulmonary resuscitation in a porcine model[J]. PLoS ONE, 2013, 8(6): e67476. DOI:10.1371/journal.pone.0067476.

(**收稿**:2024-10-12;**修回**:2025-01-03)

(编辑 刘秋池)