

## · 研究报告 ·

## 高容量血液滤过对严重脓毒症患者微小 RNA-146a 及炎症介质的影响

茅尧生 李智鑫 吕铁

机体免疫失衡即促炎反应与抗炎反应失衡,是导致脓毒症发生的重要机制之一<sup>[1-3]</sup>,无论是过度炎症反应还是过度免疫抑制都会给机体造成严重损害,治疗上强制性地抑制任何一方都是不可取的,有可能导致原有的失衡加剧或是引起另一种免疫失衡;所以维持或者重建机体免疫内稳状态被认为是治疗脓毒症的有效方法之一<sup>[4-5]</sup>。实践证明,高容量血液滤过(HVHF)对脓毒症有很好的疗效,且越早介入越好<sup>[6-7]</sup>。深入研究发现,HVHF对机体免疫的修复和调节正是其起到良好疗效的关键因素之一<sup>[5,8]</sup>。本研究以 HVHF 对严重脓毒症患者微小 RNA-146a(miR-146a)的影响为切入点,试图进一步阐明 HVHF 对重建机体免疫内稳状态的可能作用机制。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象的纳入与排除:**采用前瞻性对照研究方法,选择 2011 年 6 月至 2013 年 3 月入住绍兴市人民医院重症医学科严重脓毒症患者 60 例,均符合 2001 年华盛顿国际脓毒症会议诊断标准<sup>[9]</sup>。排除标准:年龄>80 岁;纽约心脏病协会(NYHA)心功能分级>Ⅲ级或Ⅳ级;肝功能不全(Child 肝功能分级 C 级);骨髓抑制或免疫抑制(包括正在接受糖皮质激素治疗或肿瘤)者。60 例患者中男性 37 例,女性 23 例;年龄 28~75 岁,平均(52.84±12.35)岁。肺部感染 27 例,重症急性胰腺炎 12 例,创伤后并发腹腔内感染 10 例,急性化脓性胆管炎并发腹膜炎 6 例,泌尿系统感染 3 例,颌面部感染 2 例。以重症医学科健康医护人员 15 例作为健康对照组,男性 8 例,女性 7 例;平均年龄(36.47±8.59)岁。

本研究符合医院伦理学标准,并经医院伦理委员会批准,所有治疗获得患者或家属知情同意。

**1.2 分组及治疗:**所有患者均给予常规治疗,包括抗感染、维持机体电解质及酸碱平衡、营养支持、保护器官功能及其他支持治疗。其中 30 例患者同意接受高容量连续性血液滤过治疗(HVHF 组),男性 18 例,女性 12 例;平均年龄(51.65±11.68)岁。使用美国 Baxter BM 25 机器,置换量 4 L/h,置换液为南京军区总医院配方,滤器为 AN69 膜,24 h 更换 1 次,持续 72 h。另 30 例患者因某些原因未能行 HVHF 治疗(脓毒症组),男性 19 例,女性 11 例;平均年龄(53.44±12.84)岁。

## 1.3 检测指标及方法

**1.3.1 标本采集及单核细胞分离:**于治疗 0、6、12、24、48 h(健康对照组只采集标本 1 次)采集外周静脉血 8 mL,枸橼酸

钠抗凝,用单个核细胞提取液分离出单核细胞,与含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液混匀后置于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 2 h,收集贴壁细胞备用,锥虫蓝染色证实 95%以上为活细胞,CD14 证实 85%以上为单核细胞,备检。

**1.3.2 外周血炎症细胞因子测定:**采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素(IL-1、IL-10)等细胞因子水平,按试剂盒(武汉博士德生物有限公司)说明书操作。

**1.3.3 外周血单核细胞 miR-146a 表达测定:**提取总 RNA:5×逆转录缓冲液 2 μL,RNA 酶抑制剂 0.5 μL,dNTP 混合物 1 μL,AMV 逆转录酶 0.5 μL,miR-146a 逆转录引物 0.5 μL,模板 RNA 3 μL,去 RNA 酶水 2.5 μL;总体积 10 μL,于聚合酶链反应(PCR)仪 45℃ 45 min,95℃ 5 min,冰浴 5 min。将合成的 cDNA 置于 -20℃ 保存备用。2×荧光染料(SYBR Green mix)25 μL,PCR 正向引物 1 μL,PCR 反向引物 1 μL,cDNA 模板 4 μL,DNA 拓扑异构酶 0.3 μL,ddH<sub>2</sub>O 18.7 μL。PCR 循环条件:94℃ 2 min,94℃ 10 s,60℃ 15 s,72℃ 30 s,40 个循环。引物及内参照由广州锐博公司提供(见表 1)。miRNAs 与 U6 相对表达量用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 方法表示。

表 1 实验引物及内参

微小 RNA	引物	序列(5'-3')
微小 RNA-146a	RT 引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT GCACTGGATACGACAACCCA
	PCR 引物	正义链:TGCGGTGAGAACTGAATTCCA GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGT
U6	RT 引物	GCACTGGATACGACAAAATATGGAAC
	PCR 引物	正义链:TGCGGTGCTCGCTTCGGCAGC 下游引物 反义链:CCAGTGCAGGGTCCGAGGT

注:RT 为逆转录,PCR 为聚合酶链反应

**1.3.4 单核细胞体外培养的指标测定:**治疗 24 h 后取静脉血 8 mL,分离单核细胞,用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养,将各组细胞调整至相同浓度,以脂多糖(LPS,美国 Sigma 公司)10 mg/L 刺激后于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养,分别于刺激 4、8、12、24、48 h 收集单核细胞并检测 miR-146a 表达,并采用 ELISA 检测细胞培养液中的 TNF-α、IL-1 和 IL-10 水平。

**1.4 统计学处理:**所有数据应用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,计量资料均用均数±标准差( $\bar{x}±s$ )表示,组内比较采用配对 *t* 检验,组间比较采用单因素方差分析,重复测量的数据采用重复测量数据方差分析,以 *P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.04.017

基金项目:浙江省绍兴市社会发展重点科研项目(2011A23021)

作者单位:312000 浙江,绍兴市人民医院重症医学科

通信作者:茅尧生,Email:mys5959@163.com

2 结果

2.1 HVHF 组及脓毒症组患者外周血单核细胞 miR-146a 表达的变化(表 2):随着治疗的进行,脓毒症组和 HVHF 组 miR-146a 表达水平较治疗 0 h 皆有所下调( $F_1=6.871, F_2=8.346$ , 均  $P<0.01$ ); HVHF 组治疗后各个时间点 miR-146a 表达水平均低于脓毒症组(均  $P<0.05$ )。两脓毒症组在治疗过程中任何时间点的 miR-146a 表达量均明显高于健康对照组(均  $P<0.05$ )。

2.2 HVHF 组及脓毒症组患者外周血炎症细胞因子的变化比较(表 3):治疗前两组间 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-10 水平比较差异均无统计学意义(均  $P>0.05$ );随着治疗的进行,两组 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-10 水平较治疗 0 h 皆有不同程度下调,且 HVHF 组下调幅度明显大于脓毒症组(均  $P<0.05$ )。

2.3 体外培养外周血单核细胞分泌炎症细胞因子以及 miR-146a 的变化(表 4):3 组细胞在 LPS 刺激下, TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-10、miR-146a 表达水平随时间延长有不同程度升高。TNF- $\alpha$ 、IL-1 在 HVHF 组于 12 h 达高峰,脓毒症组在 8 h 即达高峰,健康对照组则呈持续升高趋势;3 组各时间点健康对照组>HVHF 组>脓毒症组(均  $P<0.05$ )。3 组细胞 IL-10 水平均持续升高;脓毒症组和 HVHF 组各时间点 IL-10 水平明显高于健康对照组(均  $P<0.05$ )。miR-146a 上调幅度 HVHF 组大于脓毒症组, HVHF 组 24 h 时因细胞凋亡出现衰减,至 48 h 时已检测不出 miR-146a 表达;脓毒症组 4 h、8 h miR-146a 表达都处于高水平状态,明显高于同时间点 HVHF

表 2 HVHF 治疗对脓症患者各时间点外周血单核细胞 miR-146a 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	miR-146a 表达( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )				
		治疗 0 h	治疗 6 h	治疗 12 h	治疗 24 h	治疗 48 h
对照组	15	2.48 ± 1.32				
脓毒症组	30	7.05 ± 2.44 <sup>a</sup>	6.91 ± 2.39 <sup>a</sup>	6.74 ± 2.82 <sup>a</sup>	5.87 ± 1.58 <sup>a</sup>	5.45 ± 1.59 <sup>a</sup>
HVHF 组	30	7.18 ± 2.14 <sup>ab</sup>	6.63 ± 2.01 <sup>ab</sup>	5.24 ± 1.55 <sup>ab</sup>	3.76 ± 1.25 <sup>ab</sup>	3.62 ± 1.37 <sup>ab</sup>

注:HVHF 为高容量血液滤过, miR-146a 为微小 RNA-146a;与对照组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ;与脓毒症组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ ;空白代表无此项

组及健康对照组(均  $P<0.05$ ), 12 h 时即出现衰减, 48 h 时检测不出 miR-146a 表达;健康对照组 miR-146a 表达量始终处于低水平状态, 且 48 h 时未见明显衰减。

3 讨论

2007 年 Dai 等<sup>[9]</sup>首次将 miRNA 引入免疫系统的研究, 至今已证明, 某些 miRNA 分子在自身免疫疾病的发生发展中起重要作用, 目前已发现 miR-146a 在系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、口腔扁平苔藓及银屑病等自身免疫相关性疾病中发挥着重要调节作用, 甚至有可能成为治疗这些疾病的新靶点<sup>[10-14]</sup>。还有研究显示, 脓症患者血清总 RNA 浓度明显升高, 且与病情严重程度相关, 可以用于脓毒症时的检测<sup>[15]</sup>。

细胞因子产生的过程可大致分为刺激物与细胞表面受体结合、信号转导、基因激活、mRNA 转录和翻译成蛋白质或降解、前体蛋白质成熟及细胞因子分泌等几个步骤。LPS 首先与血清中脂多糖结合蛋白(LBP)结合形成 LPS-LBP 复合物, 再与细胞表面 CD14 受体结合, Toll 样受体 4(TLR4)是脓毒

表 3 两组脓症患者治疗后各时间点外周血炎症因子水平的变化比较( $\bar{x} \pm s$ )

指标	组别	例数	治疗 0 h	治疗 6 h	治疗 12 h	治疗 24 h	治疗 48 h
TNF- $\alpha$ (ng/L)	脓毒症组	30	143.07 ± 34.16	138.76 ± 37.35	122.73 ± 28.47	98.47 ± 25.56	74.99 ± 22.84
	HVHF 组	30	136.06 ± 35.25	73.35 ± 29.56 <sup>a</sup>	46.37 ± 18.57 <sup>a</sup>	35.95 ± 21.41 <sup>a</sup>	32.45 ± 15.49 <sup>a</sup>
IL-1 (ng/L)	脓毒症组	30	71.54 ± 26.40	66.44 ± 18.07	62.95 ± 21.41	48.72 ± 12.55	31.95 ± 13.49
	HVHF 组	30	67.23 ± 22.57	38.46 ± 19.36 <sup>a</sup>	23.23 ± 14.55 <sup>a</sup>	16.23 ± 7.57 <sup>a</sup>	16.54 ± 6.40 <sup>a</sup>
IL-10 (ng/L)	脓毒症组	30	94.22 ± 34.56	95.34 ± 28.75	91.88 ± 25.92	83.62 ± 26.40	75.83 ± 26.29
	HVHF 组	30	96.90 ± 27.19	75.43 ± 18.55 <sup>a</sup>	56.99 ± 22.84 <sup>a</sup>	54.78 ± 23.65 <sup>a</sup>	53.90 ± 17.19 <sup>a</sup>

注:HVHF 为高容量血液滤过, TNF- $\alpha$  为肿瘤坏死因子- $\alpha$ , IL-1、IL-10 为白细胞介素;与脓毒症组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$

表 4 HVHF 对体外培养脓症患者单核细胞分泌炎症因子及 miR-146a 表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

指标	组别	例数	刺激前	刺激后 4 h	刺激后 8 h	刺激后 12 h	刺激后 24 h	刺激后 48 h	
TNF- $\alpha$ (ng/L)	对照组	15		145.49 ± 43.84	235.07 ± 56.82	393.73 ± 64.53	436.40 ± 69.57	453.25 ± 75.64	
	脓毒症组	30		86.37 ± 23.56 <sup>a</sup>	118.06 ± 32.85 <sup>a</sup>	103.72 ± 37.40 <sup>a</sup>	84.90 ± 25.36 <sup>a</sup>	72.45 ± 22.84 <sup>a</sup>	
	HVHF 组	30		107.48 ± 44.57 <sup>ab</sup>	194.35 ± 49.86 <sup>ab</sup>	221.46 ± 55.28 <sup>ab</sup>	196.88 ± 46.62 <sup>ab</sup>	165.49 ± 39.84 <sup>ab</sup>	
IL-1 (ng/L)	对照组	15		75.46 ± 29.02	172.42 ± 49.96	252.95 ± 53.75	278.34 ± 56.81	302.46 ± 57.97	
	脓毒症组	30		41.54 ± 16.50 <sup>a</sup>	76.37 ± 27.92 <sup>a</sup>	72.95 ± 23.47 <sup>a</sup>	68.20 ± 24.56 <sup>a</sup>	53.45 ± 19.44 <sup>a</sup>	
	HVHF 组	30		62.76 ± 27.36 <sup>ab</sup>	105.64 ± 37.81 <sup>ab</sup>	139.35 ± 39.07 <sup>ab</sup>	117.23 ± 32.35 <sup>ab</sup>	95.20 ± 28.73 <sup>ab</sup>	
IL-10 (ng/L)	对照组	15		32.48 ± 11.83	43.50 ± 15.58	66.07 ± 17.52	94.82 ± 32.78	156.54 ± 43.56	
	脓毒症组	30		83.51 ± 25.83 <sup>a</sup>	148.53 ± 35.80 <sup>a</sup>	217.88 ± 47.92 <sup>a</sup>	250.28 ± 54.06 <sup>a</sup>	258.44 ± 51.39 <sup>a</sup>	
	HVHF 组	30		78.67 ± 25.06 <sup>a</sup>	134.52 ± 37.78 <sup>a</sup>	189.91 ± 44.65 <sup>a</sup>	235.78 ± 48.63 <sup>a</sup>	246.90 ± 53.16 <sup>a</sup>	
miR-146a	对照组	15	3.65 ± 1.46	3.02 ± 1.43	3.55 ± 1.68	3.76 ± 1.65	3.81 ± 1.70	3.72 ± 1.57	
	脓毒症组	30		5.77 ± 1.75 <sup>a</sup>	6.21 ± 2.07 <sup>a</sup>	6.30 ± 2.66 <sup>a</sup>	4.24 ± 2.19	1.79 ± 0.90	0
	HVHF 组	30		3.83 ± 1.89 <sup>ab</sup>	3.97 ± 1.53 <sup>ab</sup>	4.26 ± 1.72 <sup>ab</sup>	5.57 ± 2.06	2.02 ± 1.10	0

注:HVHF 为高容量血液滤过, miR-146a 为微小 RNA-146a, TNF- $\alpha$  为肿瘤坏死因子- $\alpha$ , IL-1、IL-10 为白细胞介素;与对照组比较,

<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与脓毒症组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ ;空白代表无此项



症发生发展的启动点<sup>[16]</sup>,以 LPS-LBP-CD14 三体复合物形式与细胞表面的 TLR4 结合,通过一系列细胞信号转导机制将信号从受体转导到细胞核,该过程涉及许多生化反应途径,如蛋白激酶 C、G 蛋白和磷脂酶 C 等,通过磷酸化作用对相应蛋白激酶进行活化,为其中最重要的途径之一。TNF 受体相关因子-6 (TRAF-6) 和 IL-1 受体相关激酶 1 (IRAK-1) 为与炎症反应密切相关的两种蛋白激酶,二者的激活可以诱导核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 的激活,从而启动炎症因子的“瀑布”反应<sup>[17]</sup>;已证实,TRAF-6 及 IRAK1 是 miR-146a 的直接靶分子,提示 miR-146a 主要于 TRAF-6 和 IRAK-1 的 3'UTR 区域互补结合,发挥负调控作用,在转录后抑制 TRAF-6 和 IRAK-1 的水平,从而减轻炎症因子的释放<sup>[17]</sup>。

本研究 HVHF 组随治疗进行,大量促炎介质及细胞因子得到及时清除,其水平明显低于脓毒症组;单核细胞受到促炎介质及炎症因子的刺激减少,TRAF-6、IRAK-1 两种蛋白激酶激活随之减少,从而降低了 miR-146a 表达量,因此 HVHF 组 miR-146a 表达的下降幅度明显大于脓毒症组。由此可见,miR-146a 表达量对机体炎症反应有一定的敏感性。

近年来研究提示,脓毒症的发生发展与机体的内环境失衡及免疫功能紊乱密切相关<sup>[18-19]</sup>。机体天然防御机制(主要包括中性粒细胞、单核/巨噬细胞、淋巴细胞、树突细胞等)功能衰退在脓毒症发病中占重要地位<sup>[20]</sup>。感染发生后首先以炎症反应为主,大量释放 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等炎症介质,随着病程发展,IL-10、转化生长因子- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) 等抗炎介质被释放,使机体出现免疫抑制<sup>[11,21]</sup>。在本研究中,行 HVHF 治疗的脓症患者存在一定的免疫抑制,其体外孵育的单核细胞在 LPS 刺激下抗炎因子 IL-10 很快达到并维持在高水平状态,明显高于同时间点的健康对照组;3 组细胞在 LPS 刺激下,TNF- $\alpha$ 、IL-1 分泌水平随时间推移有不同程度升高,脓毒症组的高峰出现时间晚于 HVHF 组,健康对照组对 LPS 刺激的反应能力>HVHF 组>脓毒症组;说明经 HVHF 治疗患者单核细胞的免疫功能较脓毒症组得到恢复,但未达到健康对照组水平,说明免疫功能的恢复是有限的。就是这种有限的免疫功能恢复对于脓毒症患者的预后具有重大影响,其恢复程度越大,预后越好<sup>[22]</sup>。Li 等<sup>[23]</sup>和 Nahid 等<sup>[24]</sup>的研究提示,miR-146a 参与了机体的免疫抑制,他们发现 TRAF-6 和 IRAK-1 的失活是脓症患者单核细胞对 LPS 耐受的重要因素之一;由于 miR-146a 以这两种激酶为靶点,进一步研究发现,转染了 miR-146a 抑制剂的单核细胞对 LPS 的反应性要明显强于 miR-146a 高表达的单核细胞,提示 TRAF-6 和 IRAK-1 的水平可被高表达的 miR-146a 所抑制,当机体再次受到外界刺激时,炎症因子的产生将受到明显抑制,大大削弱了机体的反应能力。

本研究结果与上述观点相符,脓毒症组体外培养的单核细胞在衰减前(刺激前及刺激后 4 h、8 h) miR-146a 表达明显高于 HVHF 组及健康对照组,呈现脓毒症组>HVHF 组>健康对照组;而此时 3 组细胞对 LPS 刺激的反应能力则呈现健康对照组>HVHF 组>脓毒症组。提示 HVHF 治疗可通过高效清除脓症患者机体中促炎介质及炎症因子,使单核细胞

miR-146a 表达下降,从而减轻其对 TRAF-6 和 IRAK-1 的抑制,使免疫细胞功能得到一定的恢复,这也许是 HVHF 参与机体免疫内稳状态重建的作用机制之一。

#### 参考文献

- [1] Ronco C, Bonello M, Bordoni V, et al. Extracorporeal therapies in non-renal disease: treatment of sepsis and the peak concentration hypothesis [J]. *Blood Purif*, 2004, 22(1): 164-174.
- [2] 刘毅, 邓小明. 脓毒症与机体免疫状态紊乱 [J]. *中国急救医学*, 2003, 23(10): 710-711.
- [3] Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS and CARS [J]. *Crit Care Med*, 1996, 24(7): 1125-1128.
- [4] 林洪远, 盛志勇. 脓毒症免疫调理治疗的新思路 [J]. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(2): 67-69.
- [5] 余晨, 刘志红, 郭啸华, 等. 连续性血液净化治疗全身炎症反应综合征及脓毒症对机体免疫功能的影响 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2003, 12(1): 2-9.
- [6] 王国立. 血液灌流联合连续性肾脏替代治疗在严重脓症患者中的应用 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2011, 18(4): 228-230.
- [7] 赵素荣. 高容量血液滤过对脓毒症患者炎症因子及血流动力学的作用研究 [J]. *中国全科医学*, 2012, 15(33): 3856-3858.
- [8] Ronco C, Brendolan A, Lonnemann G, et al. A pilot study of coupled plasma filtration with adsorption in septic shock [J]. *Crit Care Med*, 2002, 30(6): 1250-1255.
- [9] Dai Y, Huang YS, Tang M, et al. Microarray analysis of microRNA expression in peripheral blood cells of systemic lupus erythematosus patients [J]. *Lupus*, 2007, 16(12): 939-946.
- [10] Nakasa T, Miyaki S, Okubo A, et al. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(5): 1284-1292.
- [11] Pauley KM, Satoh M, Chan AL, et al. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients [J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(4): R101.
- [12] Tang Y, Luo X, Cui H, et al. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(4): 1065-1075.
- [13] Sonkoly E, Wei T, Janson PC, et al. MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? [J]. *PLoS One*, 2007, 2(7): e610.
- [14] Thongprasom K, Dhanuthai K, Sarideechaigul W, et al. Expression of TNF- $\alpha$  in oral lichen planus treated with fluocinonide acetamide 0.1% [J]. *J Oral Pathol Med*, 2006, 35(3): 161-166.
- [15] 王慧娟, 解立新. 血清中总 RNA 浓度在脓毒症诊断与预后评估中的应用 [J]. *中国危重病急救医学*, 2012, 24(5): 269-273.
- [16] 陈德晖, 黎毅敏, 蓝淑玲, 等. 严重脓毒症患儿 Toll 样受体 4 水平及临床意义 [J]. *中国危重病急救医学*, 2011, 23(8): 475-477.
- [17] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity [J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(8): 675-680.
- [18] 盛志勇. 严重创、烧伤后脓毒症与多器官功能障碍综合征的防治 [J]. *中华创伤杂志*, 2005, 21(1): 11-14.
- [19] 李成荣. 脓毒症免疫功能紊乱机制研究概况 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2011, 26(12): 885-887.
- [20] 姚咏明, 盛志勇. 我国创伤脓毒症基础研究新进展 [J]. *中华创伤杂志*, 2003, 19(1): 9-12.
- [21] 张柳, 安友仲. 脓毒症的阶段性生物标志物 [J]. *中国危重病急救医学*, 2011, 23(8): 509-512.
- [22] Weighardt H, Heidecke CD, Emmanuilidis K, et al. Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon- $\gamma$ -resistant defects of monocyte cytokine production [J]. *Surgery*, 2000, 127(3): 309-315.

- [23] Li L, Cousart S, Hu J, et al. Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(30):23340-23345. endotoxin-induced tolerance: implication in innate immunity [J]. J Biol Chem, 2009, 284(50):34590-34599. (收稿日期:2013-08-07)
- [24] Nahid MA, Pauley KM, Satoh M, et al. miR-146a is critical for (本文编辑:李银平)

## ·医学人文·

# 白人教授和他的黑人助手

陈德昌

白人教授是指 Alfred Blalock(简称布拉洛克),黑人助手是指 Vivien Thomas(简称托马斯)。话说 1941 年,布拉洛克重返霍普金斯医院。时任小儿心内科主任的 Helen Taussig 对于法洛四联征的治疗颇感棘手。她认为这种先天性心脏病之所以产生紫绀,可能由于肺动脉血流受阻,肺的血流灌注量相应减少,造成体循环动脉血氧饱和度降低。她提出发病机制的假设,但不知如何纠正。布拉洛克深受启发,他要先通过动物实验来验证 Taussig 的假设,从而探索解决方案。1944 年 11 月 29 日,他第一次为一名 15 个月的婴儿做了锁骨下动脉与肺动脉吻合手术,使婴儿生命延长了几个月。接下来的两次手术,他又使另外 2 名患儿存活出院,手术非常成功。1945 年 5 月布拉洛克发表了第一篇论文。一年内,200 多名患病儿童从全国各地来到霍普金斯医院接受治疗,开创了现代心脏外科学的新纪元。布拉洛克之所以能取胜,是因为他坚持对理论假设用实验方法加以求证,以临床应用的实际效果来评估科研的成果。1928 年至 1941 年,布拉洛克曾在 Vanderbilt 大学医院从事休克生理学研究,他排斥传统的“毒血症”假设,提出“外科休克”起因于血容量的大量丢失而致机体无法代偿。他主张应用全血或血浆替代,这一措施在二次世界大战中挽救了千百万士兵的生命。1964 年,即霍普金斯医院建立 75 周年,临床医学大楼以布拉洛克命名,以示对他的表彰。

托马斯是布拉洛克的助手,是一名非洲移民的后裔,其祖父是奴隶,家境贫困,不可能上大学。1929 年他当过木工,1930 年他谋得机会,进入到 Vanderbilt 大学医院外科实验室清洗动物笼子、喂养实验动物。布拉洛克发现他很勤快,指定他做些更多的由技术员来完成的工作。经过多年合作,托马斯成为布拉洛克在休克研究中的助手。1941 年布拉洛克返回母校任外科主任,他要求院长让托马斯跟随他到霍普金斯医院,并安排他在外科实验室。当年巴尔的摩市种族歧视严重,同样使托马斯不可能获得技术员职务,他的正式身份是实验室看门人,工资低,因为一位黑人穿上实验室白色工作服在医院内走动会招致非议。

然而,托马斯承担的任务是建立法洛四联征犬模型,并探索锁骨下动脉与肺动脉吻合术的可能性。经过两年的努力和 200 多条犬的实验,托马斯认定此法可行,说服布拉洛克在临床上开展此项手术。小儿心脏手术没有现成的器械,托马斯发挥他的手工艺技巧磨制小针头,改造血管钳。布拉洛克定下规则,托马斯本人不可能参加临床手术。但是,在最初几次手术中,他要托马斯站在他背后的木凳上随时加以指点,因为托马斯做过几百次动物实验,而布拉洛克只参加过一次。手术最终成功,命名为“Blalock-Taussig 分流术”,没有托马斯的名份。在一次房间隔缺损修复的实验中,布拉洛克赞赏托马斯缝合的切口几乎不露痕迹,他说:“这简直巧夺天功(like something the Lord made)。”1989 年作家 Katie McCabe 发表托马斯故事的第一篇文章就以这句话为命题。在霍普金斯 35 年,布拉洛克从来不给托马斯分享任何荣誉,医院内鲜有人知托马斯在干什么。直到 1976 年,布拉洛克去世 12 年后,霍普金斯大学才授予托马斯荣誉法学博士学位,而不是医学博士学位。托马斯的画像终于悬挂在布拉洛克大楼的门厅里。

布拉洛克和托马斯共事 34 年。布拉洛克雇用托马斯,因为他看好托马斯的聪明、技巧和勤劳。他需要托马斯的合作,但有歧视,没有友谊。两人之间只有专业层面的交流,缺乏人性的沟通。布拉洛克召唤托马斯参加家庭宴会当服务员。布拉洛克 60 岁诞辰举行盛大晚会,被邀请的 500 位嘉宾中没有托马斯。

托马斯为什么愿意跟随布拉洛克从 Vanderbilt 到霍普金斯,一辈子当他的助手呢?他喜欢布拉洛克有才华,善于思考,能出成果。托马斯早年就一直想当医生,到 1947 年他坚持报考医学院。可是摩根州立大学给他设置多种障碍,估计要到 50 岁才有可能从医学院毕业,他不得不放弃当初的志愿。在霍普金斯,种族歧视很严重,医院专门为黑人设置隔离病房、隔离食堂、隔离厕所,为黑人制订的准则带有羞辱性。托马斯知道自己没有力量改变美国社会,只能守住对医学的信念和追求。他有责任养家糊口,所以安于隐忍。托马斯是从贫困和种族歧视中冲出来的一位传奇人物,成为现代心脏外科的先驱者之一。我们应该纪念他。

作者单位:100730 北京协和医院

通信作者:陈德昌,Email: chendechang1932@aliyun.com

(收稿日期:2014-03-23)

(本文编辑:李银平)