

内毒素与革兰阳性菌致病因子的协同效应与意义

姚咏明 盛志勇

关于革兰阳性菌致病因子与内毒素(LPS)的协同效应早在 20 世纪 60 年代就有所报道,但是确切机制至今尚未完全明了。既往许多学者更关注革兰阴性菌感染及内毒素血症的研究,而对革兰阳性菌脓毒症少有问津。然而大规模流行病学资料显示,近年来由革兰阳性菌引起的脓毒症和脓毒性休克明显增多,目前已达脓毒症发病率的 50% 以上。其中金黄色葡萄球菌(金葡菌)感染的发病率位居首位,是烧伤创面感染、急性肝功能衰竭和血源性肾炎等疾病的主要病原菌。其致病的严重程度及致死率与革兰阴性菌相当,且通常与革兰阴性菌脓毒症同时发生、协同作用,使脓毒症的病理生理过程进一步恶化,严重威胁着患者的生命。

与革兰阴性菌相比,金葡菌为代表的革兰阳性菌致病成分更为复杂,包括细菌细胞壁成分、胞外酶和外毒素等多种因子,其中金葡菌细胞壁成分[主要是肽聚糖(peptidoglycans, PepG)和磷壁酸(lipoteichoic acid, LTA)]和外毒素[包括肠毒素和中毒性休克综合征毒素-1(toxic shock syndrome toxin-1, TSST-1)]在金葡菌脓毒症的发生、发展中可能占有重要地位。体内外研究表明, PepG 和 LTA 具有很强的抗原性及“内毒素样”生物学活性,可通过 LPS 受体 CD14 介导的信号途径诱导单核/巨噬细胞活化及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)和一氧化氮(NO)等炎症介质的合成。有关资料显示,尽管革兰阳性菌本身不能产生 LPS,但许多革兰阳性菌脓毒症患者常伴有内毒素血症的出现,并与革兰阳性菌致病因子协同致病,对脓毒症的发生与发展具有促进作用。现拟以金葡菌为例,初步探讨 LPS 与革兰阳性菌致病因子之间的协同效应及其可能机制。

1 LPS 与金葡菌外毒素的协同效应

1.1 金葡菌肠毒素与肠源性内毒素血症:众多研究表明,急性创伤、烧伤、感染和休克等打击可导致胃肠道黏膜屏障功能受损、免疫抑制和肠道菌群改变,三者相互作用可促使肠源性 LPS 移位至远隔器官,在脓毒症和多器官功能障碍综合征(MODS)的发病中具有重要作用。我们的资料证实,烫伤合并金葡菌感染可导致动物局部组织 LPS 水平明显升高,并与炎症介质的产生关系密切。相关分析显示,动物心、肝、肺、肾组织中 LPS 水平与血浆肠毒素 B(SEB)含量呈明显正相关,提示金葡菌攻击组织 LPS 的升高可能与 SEB 的毒性作用有关。进一步分析发现,烫伤脓毒症动物血浆 SEB 水平与小肠组织中二胺氧化酶(DAO)活性呈显著负相关,而采用抗 SEB 单克隆抗体进行干预后,不仅小肠黏膜的损伤程度有所减轻,组织中 LPS 水平亦有不同程度的降低。由于小肠黏膜含有极为丰富的淋巴组织,尤其是其固有层广泛分布的 T 淋巴细胞可作为“超抗原”SEB 作用的主要靶细胞,因此 SEB 攻击所致 T 细胞大量活化和炎症介质的生成,在介导小肠黏膜损伤中可能具有重要作用。由此可见,SEB 的毒性作用可加剧小肠黏膜屏障功能受损和肠道通透性增加,进而致肠源性 LPS 移位并蓄积于局部组织。

此外,组织 LPS 的蓄积还可能与相应器官对 LPS 的廓清能力下降有关。有研究表明,金葡菌肠毒素具有明显的肝脏毒性,可导致肝网状内皮系统的吞噬功能受损,使之对 LPS 的廓清能力降低。值得一提的是,曾有报道指出超抗原还可通过活化抑制性 T 淋巴细胞使机体免疫功能受抑,进而导致革兰阴性菌生长、LPS 释放增加,可能也参与了超抗原与 LPS 的协同过程。

1.2 TSST-1 与 LPS:虽然细菌内、外毒素在刺激炎症细胞应答反应和诱导细胞因子释放等方面存在明显

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(G1999054203);国家杰出青年科学基金资助项目(30125020);军队“十五”医药卫生科研基金资助项目(01MA207)

作者单位:100037 北京,解放军总医院第三〇四临床部全军烧伤研究所

作者简介:姚咏明(1965-),男(汉族),湖北省人,博士后(奥地利),教授,博士研究生导师,主要从事脓毒症和多器官功能障碍综合征发病机制及防治的研究;现任中国微生物学会微生物毒素分会副主任委员,中国中西医结合急救学会委员兼基础学组组长等,《中华外科杂志》等 14 种杂志副主编或编委,《Crit Care Med》等 9 种杂志特约编审;发表论文 302 篇(SCI 收录 39 篇、ISTP 收录 6 篇),主编及参编专著 17 部,获国际希拉格奖 1 项,中国青年科技奖 1 项,国家科技进步二、三等奖各 1 项,北京市和军队科技进步一、二等奖 7 项。

差异,但二者在介导脓毒症发病过程中具有协同效应。例如,TSST-1 可显著提高宿主及细胞对 LPS 攻击的敏感性,与 LPS 发生致死性协同作用,这是该毒素最重要的特性之一。健康家兔单独接受 TSST-1 仅表现为发热反应,即使剂量高达 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 亦不能产生致死效应,提示该毒素本身致死性作用并不强。但如果同时给予较低剂量的 LPS 与 TSST-1,动物即可出现典型的中毒性休克综合征(toxic shock syndrome, TSS)的症状和体征,表现为呼吸、循环、肝、肾及消化道等多系统器官功能严重障碍,导致动物死亡。与之相似,对感染巴斯德菌的动物再进行 TSST-1 攻击也可产生较强的 LPS 增敏作用。体外观察亦证明,TSST-1 预处理大鼠肾小管细胞,能明显提高细胞对 LPS 的敏感性。此外,静脉注射 TSST-1 和 LPS 能明显降低家兔网状内皮系统清除胶质的能力,并可能抑制宿主对内源性 LPS 等物质的吞噬、清除,进而导致 LPS 的蓄积,增强机体对 TSST-1 的敏感性。

研究表明,TSST-1 是 TSS 的重要细菌致病性产物,且流行病学、微生物和动物模型的研究有力地证明它在 TSS 发病中的重要地位。但需要说明的是,TSST-1 并非引起 TSS 的惟一毒素,TSS 全部症状和体征可能系多种毒素共同作用的结果,其中许多重要方面由细菌 LPS 所介导。此外,其他毒素如金葡菌肠毒素 A (SEA)、SEB 等亦可诱发 TSS 样脓毒症和全身多脏器损害。有关这些毒素如何与宿主相互作用,诱发脓毒症的机制尚不十分清楚,有待于深入探讨。

2 协同作用的受体机制

业已明确,外界刺激因子与细胞表面受体的结合是诱导细胞内信号转导通路活化的重要步骤,它在机体的抗感染免疫过程中发挥着重要作用。下面以在 LPS 和革兰阳性菌致病因子信号转导中起重要作用的受体,如 Toll 样受体(TLRs)、T 细胞受体(TCR)和主要组织相容性复合物 II 类分子(MHC II)及其增敏系统,如脂多糖结合蛋白(LBP)/CD14 为例,分析二者协同作用的分子基础。

2.1 TLRs: TLRs 是一族归属于 TLR/IL-1 受体超家族的 I 型跨膜受体,介导了多种致病微生物的信号跨膜传递。目前已发现,该家族至少含有 10 个成员,其中 TLR2 和 TLR4 的作用尤为显著。一般认为,TLR2 是一种具有广泛识别能力的“模式”识别受体,能够识别革兰阳性菌、革兰阴性菌、真菌、螺旋体以及支原体等细胞壁成分,在多种微生物所致急、慢性感染中均具有重要的作用。而 TLR4 的作用较为局限,可能主要参与了 LPS 的识别与信号转导过程。

体外研究显示,以 LPS 攻击人和动物的单核/巨噬细胞后,不仅可有效刺激 LPS 受体 TLR4 的表达上调,同时 TLR2 表达亦显著升高,导致细胞对 LPS 和革兰阳性菌致病因子的敏感性均有所升高。我们在体内研究中亦发现,严重腹腔感染大鼠肝、肺、肾、肠等重要生命器官中 TLR2 和 TLR4 表达均显著升高,并与局部组织 LPS 水平关系密切,而用 LPS 的特异性拮抗剂——重组杀菌/通透性增加蛋白进行早期干预,可有效抑制上述组织中 TLR2 和 TLR4 的表达。同样,在大鼠烫伤合并金葡菌攻击所致脓毒症模型中,我们观察到金葡菌攻击也可导致动物肝、肺、肾等组织中 TLR2 和 TLR4 表达明显上调,并与多器官功能损害关系密切。这些结果提示,在感染过程中,无论是革兰阴性菌 LPS 还是革兰阳性菌的致病因子,均可促进两种类型的 TLRs 表达上调,而上调的 TLRs 作为上述致病因子的重要受体,对脓毒症的发生、发展起重要促进作用。

特别值得一提的是,内皮细胞的大量活化在介导休克和器官损伤的发生中具有重要作用。然而既往研究表明,内皮细胞主要表达 TLR4,而 TLR2 表达极少。因此这类细胞对 LPS 反应强烈,但对 LTA 和 PepG 等 TLR2 配体反应较弱。新近有资料证实,LPS 可有效刺激人皮肤微血管内皮细胞和脐静脉内皮细胞 TLR2 的表达,从而使它们对 LTA 和 PepG 等 TLR2 的配体也发生反应。该结果为进一步解释脓毒症时 LPS 与革兰阳性菌致病因子间的协同作用机制提供了实验依据。

2.2 LBP/CD14 系统:一般认为,LPS 能有效刺激细胞内表面 LBP/CD14 表达上调,而上调的 LBP/CD14 作为 LPS 增敏系统可显著增加多种细胞对 LPS 的敏感性,使 LPS 的活性提高数百甚至数千倍,在革兰阴性菌脓毒症的发生、发展中发挥重要作用。虽然 CD14 依赖性信号途径在金葡菌脓毒性休克中并不占主导地位,但 LTA 和 PepG 均可与 CD14 结合促进单核/巨噬细胞活化和炎症介质的产生,同时 LBP/CD14 自身的表达亦明显上调;而抗 CD14 抗体可有效抑制 PepG 诱导的巨噬细胞内核转录因子- κB (NF- κB)的活化,表明 CD14 依赖的信号转导途径在一定程度上亦参与了革兰阳性菌诱发的某些病理生理反应。据报道,在 sCD14 存在的情况下,金葡菌致病因子诱导的 IL-6 合成能力可增强 100 倍,而阻断 CD14 则可使单核/巨

噬细胞对金葡菌的敏感性下降 1 000 倍。不仅如此,有资料证实,LBP 对可溶性 PepG 与 CD14 的结合还具有进一步的协同作用。

我们通过系列研究证实,烫伤后金葡菌感染可导致肠源性 LPS 移位及 TNF- α 等炎症介质大量生成。一方面,移位的 LPS 和炎症介质可与金葡菌致病因子共同作用促进 LBP/CD14 系统表达广泛上调;另一方面,LBP/CD14 又可能作为金葡菌致病因子与 LPS 作用的共同受体参与了炎症介质的诱生。这样,在金葡菌致病因子/LPS、LBP/CD14 和炎症介质之间形成一个正反馈环,使金葡菌感染所致炎症反应不断放大,最终导致脓毒症和多器官功能损伤。因此,我们认为 LPS 增敏系统在金葡菌脓毒症的发生、发展中同样具有重要意义,它们可能是金葡菌致病因子和低剂量 LPS 协同作用的重要分子基础。

2.3 TCR 和 MHC II:微生物学证据表明,具有超抗原特性的外毒素是金葡菌和 A 族链球菌等革兰阳性菌的重要致病因子。值得强调的是,这些超抗原不仅本身具有强大的抗原刺激能力,而且还可与 LPS 协同作用,显著增强 LPS 诱导炎症介质生成的能力。例如,当 SEB 与 LPS 共同作用时,可使各自的致死剂量下降两个数量级,而且体内 TNF- α 、 γ -干扰素 (IFN- γ)、IL-6 等炎症介质的水平更高、持续时间更长。

业已明确,T 淋巴细胞是超抗原的主要靶细胞。因此由超抗原引起的 T 淋巴细胞大量活化是金葡菌等革兰阳性菌脓毒症的重要特征之一。研究表明,细胞对超抗原的应答至少需要两种因子的参与,即 TCR 和 MHC II。但是正常情况下,静息状态的 T 淋巴细胞不表达 MHC II 类分子,肠毒素和 TSST-1 必须首先与抗原呈递细胞上的 MHC II 类分子结合形成毒素-MHC II 分子复合物,后者不经加工直接与 TCR 的特异性 V β 链结合,经 TCR 介导的信号转导途径激活细胞内的各种转录因子,最终导致 T 淋巴细胞的活化、增殖及炎症介质的合成与释放。

MHC II 在外毒素识别和信号转导中具有不可或缺的作用。由于 MHC II 基因启动子上存在 NF- κ B 的结合位点,其表达可受到 LPS 诱导活化信号途径的直接调控。因此 Appel 等报道,LPS 可刺激单核/巨噬细胞表面 MHC II 类分子表达增加,促进其抗原呈递能力,可能也是 LPS 与超抗原协同作用的发生机制之一。

3 协同效应的相关信号途径

研究表明,LPS、革兰阳性菌细胞壁成分和超抗原的靶细胞虽有所不同(分别为单核/巨噬细胞和 T 细胞),但它们均可通过各自的细胞表面受体(TLR/CD14 和 TCR/MHC II)激活细胞内多条信号转导途径,最终导致 NF- κ B、信号转导与转录激活子(STAT)等核转录因子的活化。而这些核因子作为信号转导途径的最后“共同通路”,调节着体内多种炎症介质的基因转录。有人因此推测 LPS 与革兰阳性菌致病因子的协同作用有可能发生在信号转导及转录水平。

已经明确,IFN- γ 的大量生成是产生“超抗原”外毒素的革兰阳性菌感染的重要标志之一。它作为体内强有力的免疫调节剂,可增强单核/巨噬细胞等细胞内多个信号转导途径中激酶的活化程度、促进 TNF- α 等介质的合成与释放,在“超抗原”与 LPS 的协同效应中起着关键的调节作用。

据报道,金葡菌的超抗原成分(如 SEB)可直接诱导细胞内 Janus 激酶(JAKs)/STAT 通路的活化,从而增强 STAT 调节的基因转录。由于 LPS 增敏系统的重要组分 LBP 的基因启动子上也具有 STAT 的结合位点,因此“超抗原”还可能通过 JAK/STAT 在转录水平直接调节 LBP 的表达,从而促进 LPS 的跨膜信号转导。此外,由于 JAKs 不仅是 STAT 的上游激酶,它们还在一定程度上影响 LPS 诱导的丝裂原活化蛋白激酶的激酶(MAPKK)以及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的活性,从而对 NF- κ B 和活化蛋白-1 等其他信号途径的核因子也有一定调节作用,成为调节多条信号转导通路的“交汇点”(cross-talk)。因此,由“超抗原”介导的 JAK/STAT 途径的活化可能在受体表达和信号转导两个水平直接调节了 LPS 诱导的病理生理反应。不仅如此,在 LPS 信号转导中具有重要意义的 MAPK 作为体内重要的激酶也可促进 STAT 蛋白第 727 位丝氨酸残基的磷酸化。

4 细菌 DNA 与 LPS 的协同效应

新近发现,TLR 家族的一个新亚型——TLR9 作为一种特殊的受体与革兰阳性菌 DNA 和革兰阴性菌 DNA 均可直接结合,在细菌 DNA 信号转导中具有重要意义。已证明细菌 DNA 可能是一种强有力的新免疫刺激剂,含有非甲基化 CpG 基序的革兰阳性菌 DNA 或革兰阴性菌 DNA 与 TLR9 结合后均可显著刺激单核细胞 NF- κ B 活化及细胞因子产生,细菌 DNA 或其某些特殊基序本身可能就是病原菌的致病因素之一。

特别引人注意的是,当细菌 DNA 与低剂量 LPS(0.3 $\mu\text{g}/\text{L}$)共同刺激巨噬细胞时,可促进 LPS 诱导 NF- κB 活化,同时炎症介质生成进一步增加,从而提示了一种重要的 DNA 致敏机制。另据报道,用小剂量 LPS(每只 0.1 μg)或细菌 DNA 给小鼠注射时,虽然二者单独作用均不能引起 TNF- α 的大量生成,但当二者联合应用时,TNF- α 水平显著增加,提示它们之间存在着协同效应,其确切机制仍有待澄清。基因转染实验发现,使用 NF- κB 突变体抑制 NF- κB 活性后,LPS 与细菌 DNA 的协同效应也明显减弱,提示 NF- κB 途径在这一过程中可能发挥了关键作用。此外,LPS 和 CpG DNA 诱导的 MAPK 活化也参与了对 TNF- α 诱生的调节过程。

总之,在细菌感染特别是混合感染中,革兰阴性菌 LPS 与革兰阳性菌致病因子不仅本身即具有很强的致病能力,而且还可多水平发生协同效应,使脓毒症的病理过程进一步恶化。因此,深入探讨革兰阴性菌与革兰阳性菌致病因子协同作用的机制将有助于我们进一步了解脓毒症的病理机制,以寻找新的防治措施。

(收稿日期:2004-12-21)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

内毒素血症时信号受体的分子和蛋白表达增加

为证明内毒素血症在脓毒症发病过程中的作用,最近澳大利亚学者采用随机、双盲以及安慰剂对照的方法,对白细胞介素-6(IL-6)、IL-6受体和信号受体 gp130 在内毒素血症中的分子调节机制进行了研究。研究纳入了 9 名健康男性志愿者,第 1 d 快速注射脂多糖(LPS),第 2 d 快速注射生理盐水。IL-6 mRNA 体内表达在 LPS 注射后任何时间均无明显变化,但在体外将 LPS(50 ng/L)与全血细胞孵育后 IL-6 mRNA 表达增加了 8 000~50 000 倍。LPS 注射 4 h 后 gp130 mRNA 转录比基础水平增加了 5.5 倍,安慰剂组则无明显变化。LPS 注射 8 h 后中性粒细胞 gp 130 阳性率比基础水平增加了 7 倍。IL-6 受体在轻度内毒素血症中无明显变化。研究者得出结论:内毒素在体内和体外均能增加信号受体 gp130 的表达,而循环白细胞中 IL-6 mRNA 的定量分析不适宜作为监测内毒素血症的指标。

周国勇,编译自《Clin Immunol》,2005,3:293-298;胡森,审校

重症脓毒症时血管内皮生长因子的变化

血管内皮生长因子(VEGF)是一种很强的血管通透性因子。脓毒症时普遍存在着毛细血管渗漏现象和大量 VEGF 产生,但 VEGF 在脓毒症发病中的潜在作用迄今尚不清楚。最近荷兰学者研究了脓毒症时循环 VEGF 水平及其与脓毒症严重程度的关系。他们通过测定 18 例脓毒症患者和 40 例健康志愿者的血浆 VEGF 水平,观察其与临床症状及体征的关系。结果显示:脓毒症患者 VEGF 水平较健康志愿者明显升高(134 ng/L 比 55 ng/L, $P < 0.001$);脓毒症时使用血清白蛋白能减轻血管渗漏;VEGF 水平与多器官功能障碍综合征(MODS)的严重程度相关($r = 0.75, P = 0.001$);死亡者 VEGF 峰值显著高于治愈者 VEGF 峰值($P = 0.018$)。研究者认为,血浆 VEGF 水平与脓毒症的严重程度和病死率相关,而 VEGF 与毛细血管渗漏的关系尚待进一步研究。

任清华,编译自《Shock》,2005,23:35-38;胡森,审校

创伤后全身炎症反应综合征及脓毒症心血管功能不全的选择性治疗

创伤后全身炎症反应综合征(SIRS)伴发心血管功能不全的产生源于心肌收缩力降低和血管阻力减小。最近,美国学者进行了一项临床研究,对创伤后 SIRS 伴发心血管功能不全的选择性治疗进行了探讨。研究包括了 8 个月内连续收治的 23 例创伤后 SIRS 患者,对其进行肺动脉导管(PAC)监测,通过心室压力-容积曲线定量评价心肌收缩力和后负荷,分别于休克复苏后、SIRS 发病时及强心或者血管活性药物治疗后监测心血管功能指标。选择性治疗的分组为:16 例患者(占 70%)SIRS 发病时心肌收缩力明显降低,但后负荷下降不明显,给予多巴酚丁胺治疗;其他 7 例患者 SIRS 发病时心肌收缩力和后负荷都下降,给予多巴胺或肾上腺素治疗。治疗结果显示,左心室压(LVP)和每搏做功指数(SWI)在选择性治疗开始后即明显改善[(235±55)mm Hg·L·min⁻¹·m⁻²比(328±77)mm Hg·L·min⁻¹·m⁻², $P < 0.000 01$; (3 060±848) mm Hg·ml·m⁻²比(4 554±1 423) mm Hg·ml·m⁻², $P < 0.000 01$]。研究者认为:选择性疗法可以改善心血管功能,而上述可用于床边诊断、反映心血管功能异常的指标有助于指导药物治疗。

周国勇,编译自《Shock》,2005,3:202-208;胡森,审校