

• 论著 •

血必净注射液对脓毒症大鼠蛋白 C 及肿瘤坏死因子基因表达的影响

李银平 乔佑杰 武子霞 钱芳芳 姚咏明 于燕 吴瑶

【摘要】 目的 探讨血必净注射液对脓毒症大鼠蛋白 C(PC)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)基因表达的影响。**方法** 将 96 只健康 Wistar 大鼠按随机数字表法分为正常对照组、假手术组、模型组和血必净治疗组,后两组又按处死时间分为术后 2、8、24、48 和 72 h 亚组,每组 8 只。采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症模型。取腹主动脉血进行血小板计数,并留取肝、肺组织分别检测各组动物组织 PC 和 TNF- α 的 mRNA 表达。**结果** CLP 后 8~72 h 模型组大鼠肝组织 PC mRNA 表达显著下调(P 均 <0.01),血必净注射液可显著提高脓毒症大鼠 PC mRNA 表达水平(P 均 <0.01)。CLP 后 2 h 模型组动物肝、肺组织 TNF- α mRNA 表达均迅速升高并持续至伤后 24 h($P<0.05$ 或 $P<0.01$);血必净注射液治疗可显著降低肝、肺组织 TNF- α mRNA 水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$),术后 24 h 均恢复至伤前正常范围。模型组动物 CLP 后 8~72 h 血小板计数不同程度减少,血必净治疗组较模型组能明显提高血小板计数($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 血必净注射液可以从基因水平影响脓毒症动物组织 PC 和 TNF- α 的 mRNA 表达。

【关键词】 脓毒症; 血必净注射液; 蛋白 C; 肿瘤坏死因子

Effects of Xuebijing injection (血必净注射液) on protein C and tumor necrosis factor- α mRNA in rats with sepsis LI Yin-ping*, QIAO You-jie, WU Zi-xia, QIAN Fang-fang, YAO Yong-ming, YU Yan, WU Yao. * Tianhe Hospital, Tianjin 300050, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of the integrated traditional Chinese medicine Xuebijing injection (血必净注射液) on protein C(PC) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA in rats with sepsis. **Methods** Sepsis was induced in Wistar rats by cecal ligation and puncture (CLP). Ninety-six healthy animals were randomly divided into four groups: normal group, sham-operation group, CLP model group, and Xuebijing-treated group. The two latter groups were divided into 2, 8, 24, 48, and 72-hour subgroups with 8 rats in each subgroup. Platelet count of blood obtained from abdominal aorta was determined and tissue samples from liver and lungs were collected to measure tissue PC and TNF- α mRNA expression. **Results** PC gene expression levels in lung tissues were significantly lowered (all $P<0.01$), but they were dramatically raised by Xuebijing injection during 8-72 hours post-CLP (all $P<0.01$). Compared with normal group, TNF- α mRNA levels in liver and lungs were significantly elevated at 2 hours post-CLP ($P<0.05$ or $P<0.01$). However, treatment with Xuebijing injection markedly reduced TNF- α mRNA both in liver and lungs at 2-24 hours ($P<0.05$ or $P<0.01$). In CLP group, blood platelet count was significantly decreased to certain extent at different intervals within 8-72 hours, and it was markedly elevated in the Xuebijing-treated group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** The current study suggests that Xuebijing injection could exert preventing effect on the development of severe sepsis by suppressing PC and TNF- α mRNA.

【Key words】 sepsis; Xuebijing injection; protein C; tumor necrosis factor- α

脓毒症和全身炎症反应综合征(SIRS)是严重创伤、休克和多种感染性疾病的主要并发症之一,并

基金项目:天津市卫生局中西医结合科研资助项目(2005088)

作者单位:300050 天津市天和医院(李银平,乔佑杰,武子霞);518067 深圳蛇口人民医院(钱芳芳);100037 北京,解放军总医院第一附属医院(原解放军第三〇四医院)全军烧伤研究所(姚咏明,于燕,吴瑶)

作者简介:李银平(1961-),女(汉族),湖北省人,研究员,硕士生导师,享受国务院津贴专家,现任中国病理生理学会危重病医学分会全国委员,中国中西医结合学会急救医学专业委员会委员,天津市中西医结合学会急救专业委员会委员、青年委员会委员(E-mail:cccm.23042150@yahoo.com.cn)。

可能最终导致多器官功能障碍综合征(MODS),它已成为临床上一个十分棘手的问题。近年来的研究表明,失控性炎症反应、凝血系统失衡是脓毒症发展的重要因素^[1,2]。大量动物及临床研究证实,蛋白 C(PC)系统具有抗血栓形成、促进纤维蛋白溶解、抗炎特性,以及抗凋亡、保护内皮细胞、改善微循环、减缓器官功能障碍的作用,在严重脓毒症的发病机制中起着重要作用^[2]。目前,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)被认为是脓毒症早期释放的重要因子之一,可介导多种细胞因子合成,是导致脓毒症和 MODS 的关键启动因子^[3],已证实活化蛋白 C(APC)

可抑制 $\text{TNF}-\alpha$ 的合成^[4,5]。因此,本实验采用与临床相关性很强的盲肠结扎穿孔术(CLP)脓毒症模型,观察血必净注射液对脓毒症过程中 PC 以及 $\text{TNF}-\alpha$ 基因表达的影响,探讨血必净注射液在脓毒症防治方面的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备:清洁级雄性 Wistar 大鼠,体重 220~250 g,购自中国医学科学院实验动物中心。适应性饲养 1 周后按 Chaudry 等^[6]报道的方法行大鼠 CLP,复制严重腹腔感染致脓毒症模型。术前称重、编号,并禁食 12 h、自由饮水。盐酸氯胺酮注射液与速眠新 II 注射液按体积比 8:3 混合,0.4 ml/kg 肌肉注射麻醉大鼠后固定,常规消毒、铺无菌洞巾。沿腹正中中线作一长约 1.5 cm 的切口,暴露盲肠并于根部结扎,避免结扎回肠以及盲肠系膜血管,用 16 号穿刺针贯通穿刺盲肠 3 次形成肠痿,并留置一条宽 2.0 mm 的橡皮片以防针孔闭合。将盲肠还纳腹腔,逐层缝合腹壁切口,术毕立即皮下注射 10 ml 生理盐水抗休克,术后自由饮水。假手术组仅开腹翻动盲肠后关腹。

1.2 动物分组及给药:将 96 只大鼠按随机数字表法分为正常对照组($n=8$)、假手术组($n=8$)、模型组($n=40$)和血必净治疗组($n=40$)4 组,模型组和血必净治疗组再分为 CLP 后 2、8、24、48 和 72 h 组,每组 8 只动物。血必净治疗组分别于 CLP 后 0.5、12、24、36、48 和 60 h 经静脉注射血必净注射液(天津红日药业股份有限公司生产)4 ml/kg;模型组依同法分组并平行注射等量生理盐水作为对照。

1.3 组织及血标本的采集与处理:所用器具均预先进行去 RNA 酶处理,整个过程在严格无菌条件下进行。动物在复合麻醉条件下仰卧位固定,用体积分数为 2.5% 的乙醇消毒、铺无菌洞巾,沿腹正中中线开腹,分离腹主动脉,用 5 ml 注射器穿刺腹主动脉缓慢抽血 4~5 ml,将血标本分别放置于乙二胺四乙酸(EDTA)化试管,2 h 内进行血小板计数。依次摘除肝、肺组织,剪成小块后放置于无菌、无酶、深低温冻存管中,于液氮中快速冰冻保存备用。

1.4 组织基因表达检测方法:取约 100 mg 肝、肺

组织,以异硫氰酸胍一步法提取细胞总 RNA,采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术对转录产物进行扩增,扩增产物经质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶电泳后照相。电泳结果采用计算机图象分析系统(Gel-pro)进行扫描,以灰度值表示电泳带的强度。以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参对照,大鼠 GAPDH 序列(扩增片段 309 bp):5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3'(正义链),5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3'(反义链); $\text{TNF}-\alpha$ 序列(扩增片段:346 bp)^[3]:5'-GTA GCC CAC GTC GTA GCA AA-3'(正义链),5'-CCC TTC TCC AGC TGG AAG AC-3'(反义链);PC 序列(扩增片段 328 bp):5'-GTT GGA CCT GGA CAT CAA GGA-3'(正义链),5'-GCA GAG CAT GTT CTC CGA GAC-3'(反义链)。

1.5 统计学方法:应用 SPSS12.0 统计软件包,结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,计量资料行 t 检验和方差分析; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝组织 PC mRNA 表达(表 1):正常大鼠肝组织有一定量的 PC mRNA 表达,假手术组略微降低,但与正常对照组无明显差别。CLP 后 2 h 肝组织 PC mRNA 表达开始下降,但与正常对照组比较差异无显著性($P>0.05$),伤后 8 h PC mRNA 表达显著下调,24 h 呈进一步下降趋势,并持续至伤后 72 h (P 均 <0.01),其中正常对照组是降低最大幅度时的 2.674 倍。血必净注射液可显著抑制脓毒症大鼠伤后 24~72 h 肝组织 PC mRNA 表达的下调(P 均 <0.01);而对 CLP 后 2 h 和 8 h 肝组织 PC mRNA 表达无明显影响(P 均 >0.05)。

2.2 肝、肺组织 $\text{TNF}-\alpha$ mRNA 表达(表 2):正常对照组和假手术组大鼠肝、肺组织 $\text{TNF}-\alpha$ mRNA 表达较少。CLP 后 2 h 肝、肺组织 $\text{TNF}-\alpha$ mRNA 表达迅速升高(P 均 <0.01),其中肝组织升高幅度较大;伤后 8 h 和 24 h,肝、肺组织 $\text{TNF}-\alpha$ mRNA 表达逐渐降低,但与正常对照组比较,差异仍有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$),至伤后 48 h 基本恢复至术

表 1 血必净注射液对脓毒症大鼠肝组织 PC mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effect of Xuebijing injection on PC mRNA in liver tissue of rats with sepsis($\bar{x}\pm s, n=8$) 灰度值

组别	CLP 后 2 h	CLP 后 8 h	CLP 后 24 h	CLP 后 48 h	CLP 后 72 h
模型组	0.561±0.060	0.360±0.071**	0.227±0.055**	0.352±0.064**	0.485±0.080**
血必净治疗组	0.598±0.061	0.433±0.080**	0.458±0.090***	0.506±0.066***	0.658±0.074***

注:正常对照组为 0.607±0.097,假手术组为 0.597±0.087;与正常对照组比较:** $P<0.01$;与模型组比较:*** $P<0.01$

表 2 血必净注射液对脓毒症大鼠肝、肺组织 TNF- α mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 1 Effect of Xuebijing injection on TNF- α mRNA in liver and lung tissues of rats with sepsis($\bar{x} \pm s, n=8$)

标本来源	组别	灰度值				
		CLP 后 2 h	CLP 后 8 h	CLP 后 24 h	CLP 后 48 h	CLP 后 72 h
肝组织 TNF- α mRNA	模型组	0.740 $\pm$ 0.039**	0.636 $\pm$ 0.070**	0.342 $\pm$ 0.056**	0.240 $\pm$ 0.028	0.220 $\pm$ 0.077
	血必净治疗组	0.505 $\pm$ 0.056***#	0.336 $\pm$ 0.042***#	0.253 $\pm$ 0.063#	0.228 $\pm$ 0.068	0.224 $\pm$ 0.082
肺组织 TNF- α mRNA	模型组	0.667 $\pm$ 0.067**	0.501 $\pm$ 0.071**	0.299 $\pm$ 0.052*	0.230 $\pm$ 0.036	0.212 $\pm$ 0.048
	血必净治疗组	0.480 $\pm$ 0.078***#	0.345 $\pm$ 0.054***#	0.204 $\pm$ 0.038#	0.211 $\pm$ 0.069	0.197 $\pm$ 0.040

注:正常对照组肝组织 TNF- α mRNA 为 0.229 $\pm$ 0.028,肺组织 TNF- α mRNA 为 0.204 $\pm$ 0.038;假手术组肝组织 TNF- α mRNA 为 0.285 $\pm$ 0.062,肺组织 TNF- α mRNA 为 0.253 $\pm$ 0.084;与正常对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较:# $P<0.05$,## $P<0.01$

表 3 血必净注射液对脓毒症大鼠血小板计数的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)Table 3 Effect of Xuebijing injection on platelet count of rats with sepsis($\bar{x} \pm s, n=8$) $\times 10^9/L$

组别	CLP 后 2 h	CLP 后 8 h	CLP 后 24 h	CLP 后 48 h	CLP 后 72 h
模型组	984.50 $\pm$ 153.60	637.67 $\pm$ 210.64*	188.17 $\pm$ 49.60**	145.00 $\pm$ 98.20**	277.83 $\pm$ 99.83**
血必净治疗组	1 000.00 $\pm$ 193.89	876.67 $\pm$ 191.96#	264.67 $\pm$ 68.77***#	435.00 $\pm$ 159.02***#	332.17 $\pm$ 98.74**

注:正常对照组为(920.83 $\pm$ 162.91) $\times 10^9/L$;假手术组为(855.33 $\pm$ 113.51) $\times 10^9/L$;与正常对照组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较:# $P<0.05$,## $P<0.01$

前范围(P 均 >0.05)。血必净注射液治疗可不同程度地抑制肝、肺组织 TNF- α mRNA 表达上调,CLP 后 2~24 h 肝、肺组织 TNF- α mRNA 表达明显低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),至伤后 24 h 肝、肺组织 TNF- α mRNA 表达水平与正常对照组比较差异无显著性(P 均 >0.05)。

2.3 血小板计数(表 3):与正常对照组比较,模型组大鼠 8~72 h 血小板计数显著减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。血必净注射液可不同程度提高脓毒症大鼠血小板数量,CLP 后 8~48 h 血小板计数明显高于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3 讨论

近年来,随着对脓毒症发病机制研究的不断深入,人们认识到炎症、凝血与纤溶失衡以及内皮细胞损伤共同构成的内环境紊乱是脓毒症病情恶化和造成脓毒性休克、MODS 的根本原因^[1,3,6-8]。新近研究发现,PC 系统具有抗炎、抗凝、促纤溶及调节内皮细胞凋亡等多种生物学活性,是连接脓毒症失控性炎症反应与凝血紊乱的桥梁,在脓毒症的发病机制中起重要作用^[2]。PC 是 PC 系统中的主要活性成分,已明确其是由肝脏合成的维生素 K 依赖性糖蛋白酶原,受凝血酶与血栓调节蛋白复合物(T-TM)的作用转化为有生物活性的 APC,内皮细胞蛋白 C 受体(EPCR)可进一步增强这种转化^[9]。我们的前期研究已经显示,脓毒症大鼠术后 8~48 h 肝、肺组织中 EPCR mRNA 表达明显增强^[10]。

APC 有直接抗炎效应,体外研究发现,APC 可降低内毒素诱导的单核细胞释放 TNF- α 、白细胞介素-1(IL-1)、IL-6 等炎症细胞因子,并可调节

细胞信号转导通路。细胞核转录因子- κ B(NF- κ B)是控制炎症和免疫的主要核转录因子,与炎症信号传递紧密关联^[4]。APC 通过阻断抑制性- κ B(I- κ B)降解而下调 NF- κ B 的表达^[11]。Yuksel 等^[12]也证实,APC 可抑制 NF- κ B 的核移位和活化蛋白-1(AP-1)活性,抑制内毒素诱导的单核细胞产生 TNF- α 、IL-1 等细胞因子。Slofstra 等^[13]通过吸入 APC 治疗内毒素诱导急性肺损伤动物,发现 APC 能剂量依赖性降低支气管肺泡灌洗液(BALF)中炎症介质,减少肺泡腔的蛋白渗出,从而减弱肺部炎症,改善肺功能。在同样的动物模型中,Kotanidou 等^[14]也发现,APC 能降低 BALF 中 TNF- α 、IL-6、巨噬细胞炎症蛋白-1 α (MIP-1 α)的含量。

严重脓毒症发展过程中常见继发性 PC 缺乏。PC 水平降低与脓毒症的发生及死亡率密切相关。继发性 PC 缺乏的原因主要有:向 APC 的持续高速转化;中性粒细胞弹性蛋白酶降解、肝合成减少,与 sEPCR 结合增强等^[15,16]。Heuer 等^[17]在脓毒症模型中发现,感染后 20 h 肝组织 PC mRNA 表达迅速下降;我们在实验中也观察到,CLP 后 8 h 肝组织 PC mRNA 表达明显下调,一直持续至伤后 72 h,其中伤后 24 h 下调幅度最大,说明脓毒症对肝组织 PC 的生成功能具有强烈的抑制作用;同时发现,CLP 早期实验动物肝、肺两个重要脏器 TNF- α mRNA 表达迅速增高,早期应用血必净注射液干预后,肝组织 PC mRNA 表达在 CLP 后 24~72 h 显著上调,于伤后 72 h 恢复至伤前正常范围,说明血必净注射液有效延缓了肝组织 PC mRNA 表达下调时间及降低其下调幅度,减轻了脓毒症对组织 PC mRNA

表达的负向影响。同样,血必净注射液对脓毒症动物肝、肺组织 TNF- α mRNA 表达的影响规律与 PC mRNA 基本相似,CLP 后 2~24 h TNF- α mRNA 表达较模型组明显下降,且能恢复至正常范围。该结果提示,血必净注射液可以在基因水平促进肝组织 PC 的合成,同时降低局部组织 TNF- α 基因表达,阻断 TNF- α 介导的失控性炎症反应。因此,血必净注射液可能通过对 PC 的作用而影响 TNF- α 基因表达,但其具体作用机制有待进一步阐明。

参考文献:

- 林洪远,盛志勇. 全身炎症反应和 MODS 认识的变化及现状[J]. 中国危重病急救医学,2001,13(11):643-646.
- 武子霞,李银平,姚咏明. 活化蛋白 C 的生物学活性及其作用机制研究进展[J]. 中国危重病急救医学,2007,19(3):182-185.
- Tracey K J, Fong Y, Hesse D G, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies septic shock during lethal bacteraemia[J]. Nature, 1987, 330(6149):662-664.
- Stephenson D A, Toltl L J, Beaudin S, et al. Modulation of monocyte function by activated protein C, a natural anticoagulant[J]. J Immunol, 2006, 177(4):2115-2122.
- Kotanidou A, Loutrari H, Papadomichelakis E. Inhaled activated protein C attenuates lung injury induced by aerosolized endotoxin in mice[J]. Vascu Pharmacol, 2006, 45(2):134-140.
- Chaudry I H, Wichterman K A, Baue A E. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels [J]. Surgery, 1979, 85 (2): 205-211.
- 王今达,雪琳. 细菌、内毒素、炎性介质并治——治疗重症脓毒症的新对策[J]. 中国危重病急救医学,1998,10(6):323-325.
- Zervos E E, Kramer A A, Salhab K F, et al. Sublethal hemorrhage blunts the inflammatory cytokine response to endotoxin in a rat model[J]. J Trauma, 1999, 46(1):145-149.
- Ye X, Fukudome K, Tsuneyoshi N, et al. The endothelial cell protein C receptor (EPCR) functions as a primary receptor for protein C activation on endothelial cells in arteries, veins, and capillaries[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 259 (3): 671-677.
- 李银平,乔佑杰,武子霞,等. 血必净注射液对脓毒症大鼠血栓调节蛋白及内皮蛋白 C 受体基因表达的影响[J]. 中国危重病急救医学,2007,19(6):365-368.
- Brueckmann M, Hoffmann U, Dvortsak E, et al. Drotrecogin alfa (activated) inhibits NF-kappa B activation and MIP-1-alpha release from isolated mononuclear cells of patients with severe sepsis[J]. Inflamm Res, 2004, 53(10):528-533.
- Yuksek M, Okajima K, Uchiba M, et al. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by inhibiting activation of both nuclear factor-kappa B and activator protein-1 in human monocytes [J]. Thromb Haemost, 2002, 88(2):267-273.
- Slofstra S H, Groot A P, Maris N A, et al. Inhalation of activated protein C inhibits endotoxin-induced pulmonary inflammation in mice independent of neutrophil recruitment[J]. Br J Pharmacol, 2006, 149(6):740-746.
- Kotanidou A, Loutrari H, Papadomichelakis E, et al. Inhaled activated protein C attenuates lung injury induced by aerosolized endotoxin in mice[J]. Vascu Pharmacol, 2006, 45(2):134-140.
- Kurosawa S, Stearns-Kurosawa D J, Carson C W, et al. Plasma levels of endothelial cell protein C receptor are elevated in patients with sepsis and systemic lupus erythematosus; lack of correlation with thrombomodulin suggests involvement of different pathological processes [J]. Blood, 1998, 91 (2): 725-727.
- Regan L M, Stearns-Kurosawa D J, Kurosawa S, et al. The endothelial cell protein C receptor: inhibition of activated protein C anticoagulant function without modulation of reaction with proteinase inhibitors [J]. J Biol Chem, 1996, 271 (29): 17499-17503.
- Heuer J G, Sharma G R, Gerlitz B, et al. Evaluation of protein C and other biomarkers as predictors of mortality in a rat cecal ligation and puncture model of sepsis [J]. Crit Care Med, 2004, 32 (7):1570-1578.

(收稿日期:2007-05-28)

(本文编辑:保健媛)

• 读者 • 作者 • 编者 •

欢迎订阅 2007 年《中国危重病急救医学》杂志

《中国危重病急救医学》杂志系中华医学会和天津市天和医院主办的中华医学会系列杂志,是我国急救医学界权威性学术刊物,为中文核心期刊和中国科技核心期刊。本刊为月刊,每月 10 日出版,国际通用 16 开大版本,内文用 80 克铜版纸印刷,内容丰富,且适合各种病理图片印刷。欢迎广大读者到当地邮局办理 2007 年的订阅手续。邮发代号:6-58;定价:8.6 元/期,全年 103.2 元。

订阅本刊的读者如果遇有本刊装订错误,请将刊物寄回编辑部调换,我们将负责免费邮寄新刊。

《中国危重病急救医学》杂志已进入美国《医学索引》(MEDLINE)、美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、CMCC 数据库、“万方数据网络系统(China Info)”、“中文科技期刊数据库”、CNKI“中国期刊全文数据库”、“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”和“em120.com 危重病急救在线”。投本刊论文作者需对本刊以上方式使用论文无异议,并由全部作者或由第一作者全权代表其他作者在版权转让协议和校稿上签字同意。稿酬已在本刊付酬时一次付清,不同意者论文可不投本刊。本刊设有各种栏目,欢迎广大作者踊跃投稿。

2007 年以前的合订本和单行本请在杂志社发行部电话订购:022-23042150。

地址:天津市和平区睦南道 122 号天和医院内;邮编:300050。

(本刊编辑部)