

程序性坏死特异性抑制剂-1 对创伤失血性休克大鼠肝脏保护作用的研究

张立亚 崔尧丽 王兵 于金宝 王林林 王玉亮 王勇强

【摘要】目的 探讨程序性坏死特异性抑制剂-1(Nec-1)对创伤失血性休克大鼠的肝脏保护作用。**方法** 采用左下肢股骨、胫骨骨折及腹部软组织损伤并失血/再灌注的方法制备大鼠创伤失血性休克模型。选择雄性 SD 大鼠,22 只按随机数字表法分为模型组和 Nec-1 组,每组 11 只,观察 72 h 死亡率。72 只同法随机分为假手术组、模型组、Nec-1 组,每组 24 只。假手术组仅麻醉和分离、结扎血管,不进行创伤、失血、再灌注;Nec-1 组于再灌注前 5 min 经股静脉给予 1 mg/kg Nec-1;模型组给予等体积溶剂。于再灌注后 2、4、8 h 采集各组血清和肝组织,用全自动生化仪检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)的水平;光镜下观察肝组织病理学改变;采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测肝组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)的 mRNA 表达;蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肝组织受体相互作用蛋白酶-1/3(RIP1/RIP3)的蛋白表达。**结果** Nec-1 组大鼠 72 h 死亡率较模型组明显降低[18.18%(2/11)比 63.64%(7/11), $P=0.040$]。模型组 2 h 血清 ALT、AST 即较假手术组明显升高[ALT(U/L):110.21 \pm 22.32 比 80.98 \pm 19.94,AST(U/L):364.29 \pm 64.83 比 279.76 \pm 70.64,均 $P<0.05$],8 h 达高峰[ALT(U/L):387.41 \pm 47.11 比 82.76 \pm 22.44,AST(U/L):973.35 \pm 77.51 比 261.49 \pm 52.03,均 $P<0.01$]。Nec-1 组血清 ALT、AST 水平较模型组明显降低[ALT(U/L)4 h:144.64 \pm 33.79 比 213.96 \pm 36.21,8 h:159.48 \pm 43.57 比 387.41 \pm 47.11;AST(U/L)4 h:398.78 \pm 59.48 比 630.61 \pm 59.93,8 h:427.38 \pm 80.75 比 973.35 \pm 77.51,均 $P<0.01$]。光镜下模型组大鼠肝窦扩张、淤血,肝细胞变性、坏死,大量炎性细胞浸润;Nec-1 组肝组织损伤程度明显减轻。模型组肝组织 TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 表达和 RIP1、RIP3 的蛋白表达随时间延长呈逐渐升高趋势;给予 Nec-1 后各时间点 TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 表达均较模型组明显降低,以 8 h 最为明显(TNF- α mRNA:1.457 \pm 0.081 比 2.317 \pm 0.062,IL-1 β mRNA:0.690 \pm 0.087 比 1.812 \pm 0.112,均 $P<0.01$),而肝组织 RIP1、RIP3 的蛋白表达与模型组相比差异无统计学意义(RIP1 蛋白 8 h:0.561 \pm 0.033 比 0.587 \pm 0.036,RIP3 蛋白 8 h:0.976 \pm 0.040 比 1.044 \pm 0.115,均 $P>0.05$)。**结论** Nec-1 对创伤失血性休克大鼠肝脏具有明显的保护作用,具体机制需进一步深入研究。

【关键词】 创伤; 休克,失血性; 肝损伤; 程序性坏死特异性抑制剂-1; 缺血/再灌注损伤

Protective effect of necrostatin-1 on the liver of rats with trauma induced hemorrhagic shock Zhang Liya*, Cui Yaoli, Wang Bing, Yu Jinbao, Wang Linlin, Wang Yuliang, Wang Yongqiang. *Tianjin Medical University First Center Clinical College, Tianjin 300070, China

Corresponding author: Wang Yongqiang, Department of Critical Care Medicine, Tianjin First Center Hospital, Tianjin Institute of Emergency Medicine, Tianjin 300192, China, Email: yongqiangwang1962@sina.com

【Abstract】Objective To investigate the effects of necrostatin-1 (Nec-1) on the liver of rats with trauma induced hemorrhagic shock. **Methods** Trauma induced hemorrhagic shock model was produced by adopting the left femur, tibia fracture and soft tissue injury, bleeding and reperfusion in male Sprague-Dawley (SD) rats. A total of 22 rats were divided into model group and Nec-1 group with 11 rats in each group by randomized digital number method and the 72-hour mortality was observed. In addition, 72 rats were randomly divided into sham group, model group, Nec-1 group with 24 rats in each group. Rats in sham group were only received anesthesia, separating and ligating blood vessels, without trauma induced hemorrhagic and reperfusion, and the rats in Nec-1 group were received 1 mg/kg Nec-1 through femoral vein 5 minutes before reperfusion, while the rats in model group were received the same amount of solvent. The serum and liver tissues of each group were collected at 2, 4, 8 hours after reperfusion. Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were detected by automatic biochemistry analyzer. The pathology changes in liver were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The mRNA expressions of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in the liver were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The protein expressions of receptor interaction of protease 1/3 (RIP1/RIP3) were also assessed by

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.01.004

基金项目:国家自然科学基金青年基金(81301624);卫生部国家临床重点专科建设项目(2011-873)

作者单位:300070 天津医科大学一中心临床学院(张立亚、于金宝、王林林);300192 天津市第一中心医院重症医学科,天津市急救医学研究所(崔尧丽、王兵、王勇强);300384 卫生部危重病急救医学重点实验室(王玉亮)

通信作者:王勇强,Email:yongqiangwang1962@sina.com

Western Blot analysis. **Results** Compared with model group, Nec-1 significantly reduced the 72-hour mortality [18.18% (2/11) vs. 63.64% (7/11), $P=0.040$]. Two hours after trauma induced hemorrhagic shock and reperfusion, the expressions of ALT and AST in model group were significantly increased compared with those in sham group [ALT (U/L): 110.21 ± 22.32 vs. 80.98 ± 19.94 , AST (U/L): 364.29 ± 64.83 vs. 279.76 ± 70.64 , both $P<0.05$], and reached the peak at 8 hours [ALT (U/L): 387.41 ± 47.11 vs. 82.76 ± 22.44 , AST (U/L): 973.35 ± 77.51 vs. 261.49 ± 52.03 , both $P<0.01$]. Levels of serum ALT and AST in Nec-1 group were significantly decreased compared with model group [ALT (U/L) 4 hours: 144.64 ± 33.79 vs. 213.96 ± 36.21 , 8 hours: 159.48 ± 43.57 vs. 387.41 ± 47.11 ; AST (U/L) 4 hours: 398.78 ± 59.48 vs. 630.61 ± 59.93 , 8 hours: 427.38 ± 80.75 vs. 973.35 ± 77.51 , all $P<0.01$]. Under light microscopy, it was noted that the hepatic sinus expansion, liver cells degeneration, necrosis, as well as infiltration of abundant inflammatory cells were observed. But the pathology changes in hepatic tissues were significantly mitigated in Nec-1 group. Along with the time extension, the mRNA expressions of TNF- α and IL-1 β and the protein expressions of RIP1 and RIP3 were markedly up-regulated. Compared with model group, difference in the mRNA expressions of TNF- α and IL-1 β in hepatic tissues in Nec-1 group were statistically significant, and the most obvious difference was at 8 hours [TNF- α mRNA: 1.457 ± 0.081 vs. 2.317 ± 0.062 , IL-1 β mRNA: 0.690 ± 0.087 vs. 1.812 ± 0.112 , both $P<0.01$]. But there was no statistically significant difference in RIP1 and RIP3 between Nec-1 group and model group [RIP1 protein 8 hours: 0.561 ± 0.033 vs. 0.587 ± 0.036 , RIP3 protein 8 hours: 0.976 ± 0.040 vs. 1.044 ± 0.115 , both $P>0.05$]. **Conclusion** Nec-1 may be remarkable protect effect on the liver of rats with trauma induced hemorrhage shock and reperfusion, and the intrinsic mechanisms need further investigation.

【Key words】 Trauma; Hemorrhagic shock; Liver injury; Necrostatin-1; Ischemia/reperfusion injury

创伤失血性休克 / 再灌注损伤中肝细胞死亡方式以坏死为主,至今尚无有效的治疗手段。坏死一直被认为是被动、无序、不可逆的过程。然而近年来研究发现,某些细胞坏死也具有程序性死亡的特征^[1]。Degterev 等^[2]提出了一种细胞坏死的新概念,并将其命名为程序性坏死(necroptosis);同时还筛选了一种能特异性抑制这种非凋亡性程序性细胞死亡的小分子物质,即程序性坏死特异性抑制剂-1(Nec-1)。程序性坏死是天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)非依赖性的,由死亡受体如肿瘤坏死因子受体(TNFR)、Fas 等引发,进而由受体相互作用蛋白酶-1/3(RIP1/RIP3)激酶介导的一系列有序的信号调控过程,且具有细胞坏死的形态学表现,如细胞体积增大、细胞器肿胀、质膜完整性缺失^[3-5]。Nec-1 属于生物碱类物质^[6],它可通过作用于 RIP1 和 RIP3 的激酶部分抑制激酶活性,阻断 RIP1 和 RIP3 的相互磷酸化,可抑制 RIP1-RIP3 复合物形成而发挥效用^[4]。而对于 Nec-1 能否改善创伤性肝损伤的程度,目前尚无相关文献报道。本研究旨在探讨程序性坏死在创伤失血性休克 / 再灌注肝损伤中的作用及相关机制,并观察 Nec-1 在其中的影响,为临床治疗创伤失血性休克 / 再灌注肝损伤提供新的思路与靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂:二甲基亚砷(DMSO)和焦碳酸二乙酯(DEPC)购自美国 Amresco 公司,Nec-1 购自美国 ENZO 公司,TRIzol 和实时逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自大连 TaKaRa 公司;肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、 β -肌动蛋白(β -actin)引物均由大连 TaKaRa 公司合成;

鼠抗 RIP1 多克隆抗体(多抗)购自美国 BD 公司,兔抗 RIP3 多抗购自美国 Santa Cruz 公司,鼠抗三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体(单抗)购自美国 EarthOx 公司,羊抗鼠免疫球蛋白(IgG)和羊抗兔 IgG 购自美国 Immuno Reagents Inc 公司,酶促增强化学发光(ECL)试剂盒购自美国 Bio Vision 公司。

1.2 实验动物及分组:清洁级雄性 SD 大鼠 94 只,体质量 250 ~ 300 g,购自军事医学科学院实验动物中心,许可证号 SCXK-(军)2007-004。大鼠实验前禁食 12 h、自由饮水。其中 22 只大鼠按随机数字表法分为模型组、Nec-1 组 2 组,每组 11 只,观察 72 h 死亡率;72 只大鼠同法分为假手术组、模型组、Nec-1 组 3 组,每组 24 只,用于指标检测。

1.3 实验方法:制备改良创伤失血性休克 / 再灌注模型^[7-8]。腹腔注射 10%水合氯醛 300 mg/kg 麻醉大鼠并固定,钳断大鼠股骨及胫骨中下 1/3 段造成闭合性骨折。无菌情况下钝性分离颈动脉,插入导管(内含 0.1 mL 肝素生理盐水),另一端与多导生理监护仪连接,连续监测血压变化。同法分离右侧股静脉,插入导管,另一端与 5 mL 注射器(内含 0.3 mL 肝素生理盐水)相连。腹部切开约 5 cm 长的切口,随后分两层缝合。然后从股静脉放血,使平均动脉压(MAP)降至 30 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),并维持在 30 ~ 40 mmHg 之间 90 min。最后以恒定的速率将血液加 2 倍失血量的林格液回输给大鼠复苏 30 min,然后拔出导管,结扎血管,缝合切口。假手术组仅进行麻醉、分离血管、结扎血管,并不进行创伤失血和再灌注。Nec-1 组制模后于再灌注前 5 min 经股静脉给予 Nec-1 (1 mg Nec-1 溶于 0.04 mL DMSO 中,

加生理盐水至 0.5 mL)1 mg/kg。模型组制模后经股静脉给予等体积溶剂 DMSO。

本实验动物处理方法符合动物伦理学标准。

1.4 检测指标及方法: 分别于再灌注后 2、4、8 h 用 10%水合氯醛麻醉大鼠,下腔静脉取血,室温放置 2 h,3 000 r/min(离心半径为 13.5 cm)离心 15 min,收集血清于 -80 °C 保存。取肝左叶放入 10%多聚甲醛溶液中,4 °C 固定保存 48 h,苏木素-伊红(HE)染色;肝右叶放入液氮中冷冻,-80 °C 保存备检。

1.4.1 血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)的测定:应用全自动生化仪,采用速率法测定血清 ALT、AST 的浓度。

1.4.2 肝组织病理学改变:常规石蜡包埋肝组织标本,HE 染色,光镜下观察肝组织病理改变。

1.4.3 RT-PCR 检测肝组织 TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 表达:取 50 ~ 100 mg 冷冻肝组织,用 TRIzol 提取总 RNA,首先测定吸光度(A)值,然后用 1%琼脂糖凝胶电泳筛选标本;最后取 5 μ g RNA 进行逆转录、扩增,以 β -actin 作为内参照,计算 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 值。引物序列:
 ①TNF- α : 正义链 5'-GTTTCATCCGTTCTCTACC-3',反义链 5'-AGCGTCTCGTGTGTTTC-3',碱基对 186 bp;
 ②IL-1 β : 正义链 5'-AGCGGTTTGTCTTCAAC-3',反义链 5'-TCAACTATGTCCCGACC-3',碱基对 142 bp;
 ③ β -actin: 正义链 5'-GCGTGACATTAAGAGAA GCTG-3',反义链 5'-AGAAGCATTTGCGGTGCAC-3',碱基对 500 bp。

1.4.4 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肝组织 RIP1、RIP3 的蛋白表达:用细胞裂解液制备大鼠肝组织匀浆,4 °C 下 12 000 r/min(离心半径为 13.5 cm)离心 5 min,留取上清液并进行蛋白定量。取 50 μ g 蛋白经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、转膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗(RIP1 为 1 : 1 500,RIP3 为 1 : 400,GAPDH 为 1 : 2 500)4 °C 过夜,含吐温 20 的磷酸盐缓冲液(TBST)洗膜 3 次,每次 10 min;稀释二抗(羊抗鼠 IgG 为 1 : 1 000,羊抗兔 IgG 为 1 : 2 000)室温孵育

1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。ECL 法显影定影,以 GAPDH 作为内参照,比较各蛋白灰度值。

1.5 统计学方法:使用 SPSS 17.0 统计软件处理数据,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验;计数资料采用 χ^2 检验;当 *n* < 40 时用 Fisher 确切概率法;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠死亡率的比较:Nec-1 组大鼠 72 h 死亡率较模型组显著降低[18.18%(2/11)比 63.64%(7/11),*P* = 0.040]。

2.2 肝脏生化指标(表 1):与假手术组比较,模型组 2 h 血清 ALT、AST 浓度即明显升高,8 h 达高峰(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01);Nec-1 组 2 h ALT、AST 较模型组有所降低,但差异无统计学意义(均 *P* > 0.05),而 4 h 和 8 h 降低更明显(均 *P* < 0.01)。

2.3 肝组织病理学改变(图 1):肝脏 HE 染色显示,假手术组(1a)大鼠肝组织结构正常,无明显炎性细胞浸润,未见变性、坏死等。模型组(1b)大鼠肝脏 2 h 即出现肝窦扩张、淤血,少量淋巴及中性粒细胞浸润,肝小叶结构紊乱;4 ~ 8 h 时上述改变更加显著,部分肝细胞变性、坏死。Nec-1 组(1c)组织损伤程度较模型组显著减轻,肝细胞变性、坏死细胞明显减少,仅见少量炎性细胞浸润。

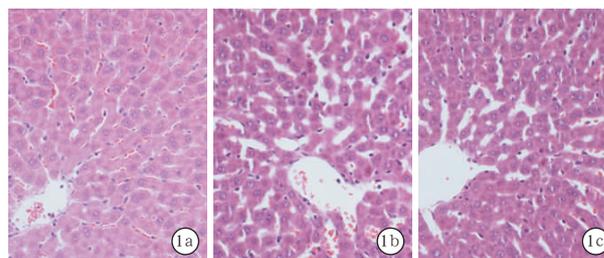


图 1 光镜下观察程序性坏死特异性抑制剂 -1(Nec-1)对创伤失血性休克/再灌注损伤大鼠肝组织病理改变的影响 假手术组(a)肝组织结构正常;模型组(b)再灌注后 8 h 时肝窦明显扩张、淤血、大量炎性细胞浸润,部分肝细胞变性、坏死; Nec-1 组(c)肝组织损伤程度较模型组减轻,仅少量炎性细胞浸润 HE 低倍放大

表 1 Nec-1 对创伤失血性休克/再灌注损伤大鼠血清 ALT、AST 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	ALT(U/L)			AST(U/L)		
		再灌注后 2 h	再灌注后 4 h	再灌注后 8 h	再灌注后 2 h	再灌注后 4 h	再灌注后 8 h
假手术组	24	80.98 \pm 19.94	86.29 \pm 18.81	82.76 \pm 22.44	279.76 \pm 70.64	278.61 \pm 53.69	261.49 \pm 52.03
模型组	24	110.21 \pm 22.32 ^a	213.96 \pm 36.21 ^b	387.41 \pm 47.11 ^b	364.29 \pm 64.83 ^a	630.61 \pm 59.93 ^b	973.35 \pm 77.51 ^b
Nec-1 组	24	106.98 \pm 26.42 ^a	144.64 \pm 33.79 ^{bc}	159.48 \pm 43.57 ^{bc}	355.59 \pm 68.44 ^a	398.78 \pm 59.48 ^{bc}	427.38 \pm 80.75 ^{bc}
F 值		3.867	34.932	130.386	3.738	76.742	218.532
P 值		0.037	0.001	0.001	0.041	0.001	0.001

注: Nec-1 为程序性坏死特异性抑制剂 -1,ALT 为丙氨酸转氨酶,AST 为天冬氨酸转氨酶;与假手术组比较,^a*P* < 0.05,^b*P* < 0.01;与模型组比较,^c*P* < 0.01

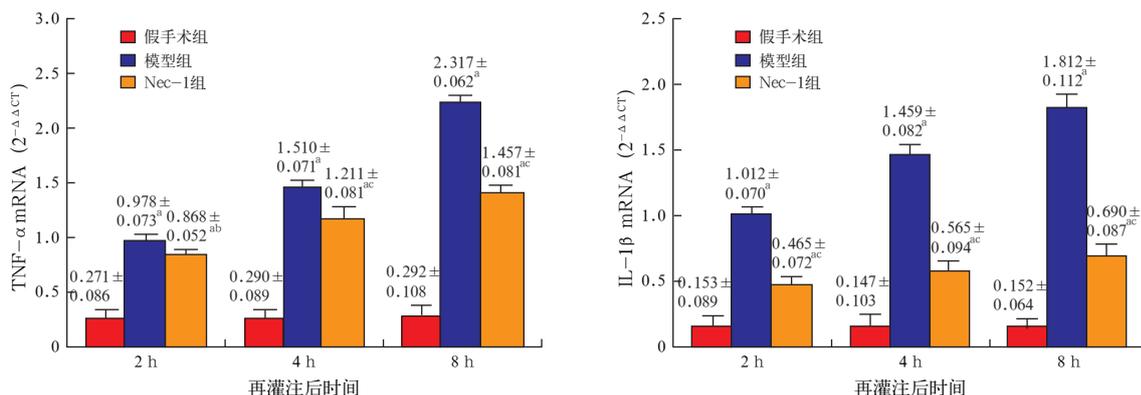
2.4 肝组织炎症介质的 mRNA 表达 (图 2):与假手术组相比,模型组各时间点肝组织 TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 表达水平均显著增高(均 $P < 0.01$)。Nec-1 组各时间点 TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 表达水平均显著低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但仍明显高于假手术组(均 $P < 0.01$)。

2.5 肝组织 RIP1 和 RIP3 的蛋白表达 (图 3~4):模型组和 Nec-1 组各时间点 RIP1、RIP3 的蛋白表达水平均较假手术组显著增加(均 $P < 0.01$),且随

时间延长逐渐增高;但 Nec-1 组与模型组各时间点比较差异则无统计学意义。

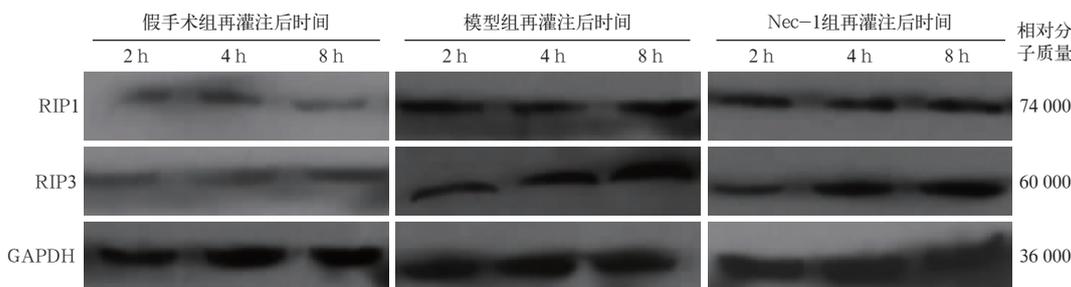
3 讨论

创伤失血性休克以有效血容量明显减少、心排量明显下降、血液灌流不足、微循环障碍为特点,是导致多器官功能障碍的主要因素之一。肝脏是机体重要的消化和免疫器官,严重创伤可引起肝细胞的损伤和功能障碍^[9],进一步导致全身器官衰竭。因此,对创伤失血性休克/再灌注后肝细胞坏死及其



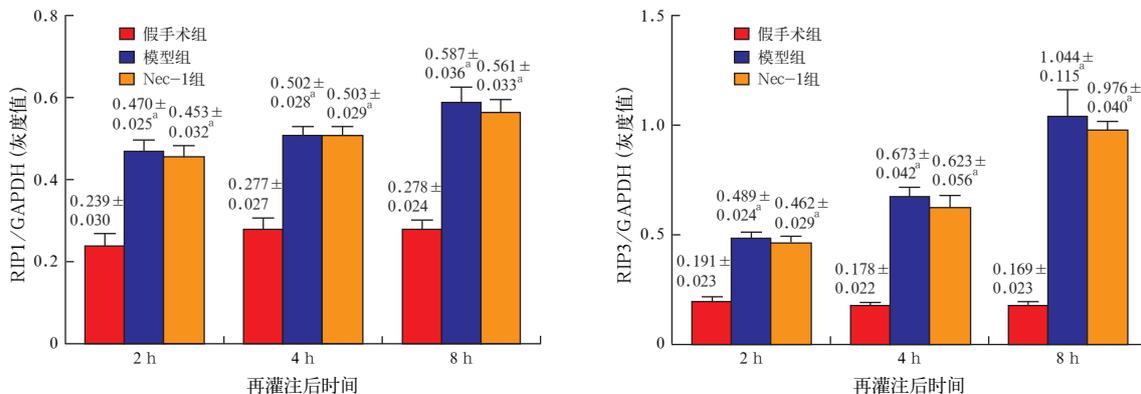
注:Nec-1 为程序性坏死特异性抑制剂 -1, TNF- α 为肿瘤坏死因子 - α , IL-1 β 为白细胞介素 -1 β ; 与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

图 2 Nec-1 对创伤失血性休克/再灌注损伤大鼠肝组织中 TNF- α mRNA 和 IL-1 β mRNA 表达的影响



注:RIP1/RIP3 为受体相互作用蛋白酶 -1/3, GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶, Nec-1 为程序性坏死特异性抑制剂 -1

图 3 蛋白质免疫印迹试验检测各组创伤失血性休克/再灌注损伤大鼠肝组织 RIP1、RIP3 的蛋白表达



注:Nec-1 为程序性坏死特异性抑制剂 -1, RIP1/RIP3 为受体相互作用蛋白酶 -1/3, GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶;与假手术组比较,^a $P < 0.01$

图 4 Nec-1 对创伤失血性休克/再灌注损伤大鼠肝组织 RIP1、RIP3 蛋白表达水平的影响

与肝损伤机制的研究,有利于寻找调节肝细胞死亡通路的新靶点以及更为有效的治疗药物,对深入探讨全身多器官功能不全的发生机制具有重要意义。

本研究结果显示,大鼠遭受创伤失血性休克/再灌注后,肝功能下降,肝组织内炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 释放。这将促发机体炎症反应,最终导致机体自身破坏,进而产生多器官功能障碍综合征^[10]。肝脏含有人体大约 80% 的单核/巨噬细胞,可大量分泌 TNF- α ^[11]。TNF- α 是严重创伤后最重要的细胞炎症因子,可直接导致内皮细胞功能减退^[12],增加血管通透性,降低循环阻力,并可诱发 IL-1 β 等细胞因子的“瀑布样”释放^[13]。IL-1 β 能够协同 TNF- α 提高组织对 TNF- α 效应的敏感性,加重 TNF- α 诱发的组织和细胞损伤^[14]。肝损伤的组织病理学改变以肝窦扩张、肝小叶结构紊乱、肝细胞变性和坏死、大量炎症细胞浸润为特点,而此病理过程的改变伴随肝组织 RIP1/RIP3 的表达增加。表明 RIP1、RIP3 在创伤失血性休克/再灌注后的肝脏继发性损害中发挥重要作用。由于 RIP1 和 RIP3 是调控程序性坏死的两种关键激酶,因此,本研究结果提示,程序性坏死可能参与了创伤失血性休克/再灌注大鼠肝损伤过程。

RIP1 定位于细胞质中,广泛分布于脑、心、肝、肾等多种组织中^[15]。RIP1 对程序性坏死的调控主要依赖于其丝氨酸/苏氨酸激酶活性^[16]。而 RIP3 作为 RIP1 的下游靶蛋白,调节了 RIP1 依赖的程序性坏死,且 RIP3 的激酶活性也是必不可少的^[4,17]。在程序性坏死信号(创伤、缺血/再灌注、病毒感染等)刺激下,RIP1 和 RIP3 可通过直接或间接方式相互磷酸化,磷酸化的 RIP1 与 RIP3 结合成 RIP1-RIP3 复合物来促进程序性坏死^[4,18-19]。目前认为发生程序性坏死的细胞具有以下特征:①有坏死样的形态学改变;②伴活性氧(ROS)增加;③该过程可被 Nec-1 特异性抑制,而不受凋亡抑制剂 Z-VAD 的影响^[2,20]。Nec-1 作为一种程序性坏死的特异性化学抑制剂,通过抑制 RIP1 的磷酸化,减少 RIP1-RIP3 复合物的形成,从而抑制 RIP1 调节的程序性坏死过程^[21-22]。

研究表明,Nec-1 能够保护心肌缺血/再灌注损伤^[23-25];保护雨蛙肽诱导的小鼠胰腺损伤^[26];降低新生儿缺血缺氧性脑损伤所致氧化损伤以及炎症因子的释放^[27];同时还能保护缺氧、缺血/再灌注脑损伤^[2,28]。由于创伤性肝损伤导致的肝细胞死亡方式以坏死为主,因此证实 Nec-1 对创伤失血性休克/再灌注大鼠肝脏的保护作用有重要意义。本研究结果显示,再灌注前 5 min 给大鼠静脉注射 Nec-1,可以

明显降低 72 h 死亡率,改善肝功能,减轻肝脏损伤程度,从而进一步证实程序性坏死参与了创伤失血性休克/再灌注大鼠的肝损伤过程。应用 Nec-1 后肝组织中 TNF- α 、IL-1 β 的 mRNA 表达也明显降低,说明 Nec-1 在抑制程序性坏死的同时直接或间接抑制了炎症因子的表达。这一结果与 Northington 等^[27]降低新生儿缺血缺氧性脑损伤过程中炎症因子释放的结果相一致。而应用 Nec-1 后肝组织 RIP1、RIP3 的表达并未降低,说明 Nec-1 的作用机制并不是影响 RIP1 和 RIP3 的蛋白表达,而是通过抑制 RIP1-RIP3 复合物的形成而发挥效用。

综上所述,本研究发现 Nec-1 对创伤失血性休克/再灌注大鼠肝脏具有保护作用,为揭示抑制创伤性肝损伤时肝细胞的程序性坏死可能具有重要的临床意义,为创伤失血性休克的治疗、延缓多器官功能障碍的发生提供了新的思路和靶点,但其分子机制仍需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Kroemer G, Martin SJ. Caspase-independent cell death [J]. Nat Med, 2005, 11(7): 725-730.
- [2] Degtarev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury [J]. Nat Chem Biol, 2005, 1(2): 112-119.
- [3] Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death [J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 263-268.
- [4] Cho YS, Challa S, Moquin D, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation [J]. Cell, 2009, 137(6): 1112-1123.
- [5] Zhang DW, Shao J, Lin J, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis [J]. Science, 2009, 325(5938): 332-336.
- [6] 李澎,任钧国,付建华,等. Necroptosis——一种新的程序性死亡的研究进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(12): 2487-2492, 2496.
- [7] 魏永军,王瑞兰,李国平. 眼镜蛇毒因子抑制补体激活对创伤失血性休克大鼠血浆内毒素含量的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(3): 180-183.
- [8] Zaets SB, Xu DZ, Lu Q, et al. Recombinant factor XIII mitigates hemorrhagic shock-induced organ dysfunction [J]. J Surg Res, 2011, 166(2): e135-142.
- [9] 赵志伶,曹书华,王勇强. 凉膈散抑制创伤失血性休克大鼠肝脏实质细胞凋亡的机制研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2011, 18(2): 82-85.
- [10] 吴骅,余小云,雷涌,等. 乌司他丁对危重患者器官功能保护作用的研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(5): 269-271.
- [11] 刘勇军,毛恩强,李磊,等. 失血性休克大鼠器官组织中促炎细胞因子表达及释放的时相性研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(5): 290-294.
- [12] 郑运江,汤耀卿,刘伟,等. 肿瘤坏死因子- α 对血管内皮细胞通透性及细胞骨架和紧密连接形态变化的诱导作用 [J]. 中国危重病急救医学, 2009, 21(3): 160-163.
- [13] Alam HB, Stanton K, Koustova E, et al. Effect of different resuscitation strategies on neutrophil activation in a swine model of hemorrhagic shock [J]. Resuscitation, 2004, 60(1): 91-99.

- [14] Dinarello CA. Proinflammatory cytokines[J]. Chest, 2000, 118(2): 503-508.
- [16] Degterev A, Hitomi J, Germscheid M, et al. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(5): 313-321.
- [17] He S, Wang L, Miao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- α [J]. Cell, 2009, 137(6): 1100-1111.
- [18] Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. RIP kinases at the crossroads of cell death and survival [J]. Cell, 2009, 138(2): 229-232.
- [19] 谢婉丽, 王惠清, 武庆平. 程序性坏死的分子调控机制[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2012, 33(12): 829-832, 861.
- [20] Han W, Xie J, Li L, et al. Necrostatin-1 reverts shikonin-induced necroptosis to apoptosis[J]. Apoptosis, 2009, 14(5): 674-686.
- [21] Xu X, Chua CC, Kong J, et al. Necrostatin-1 protects against glutamate-induced glutathione depletion and caspase-independent cell death in HT-22 cells[J]. J Neurochem, 2007, 103(5): 2004-2014.
- [22] You Z, Savitz SI, Yang J, et al. Necrostatin-1 reduces histopathology and improves functional outcome after controlled cortical impact in mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(9): 1564-1573.
- [23] Oerlemans MI, Liu J, Arslan F, et al. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia-reperfusion in vivo[J]. Basic Res Cardiol, 2012, 107(4): 270.
- [24] 王亮, 王晓樑, 张睫, 等. Necrostatin-1 对大鼠慢性心肌缺血损伤的保护作用[J]. 中国心血管病研究, 2008, 6(7): 542-544.
- [25] Smith CC, Davidson SM, Lim SY, et al. Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent? [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2007, 21(4): 227-233.
- [26] 胡国勇, 沈杰, 熊杰, 等. Necrostatin-1 对雨蛙肽诱导的小鼠急性胰腺炎的保护作用 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2012, 21(2): 180-184.
- [27] Northington FJ, Chavez-Valdez R, Graham EM, et al. Necrostatin decreases oxidative damage, inflammation, and injury after neonatal HI[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2011, 31(1): 178-189.
- [28] Xu X, Chua KW, Chua CC, et al. Synergistic protective effects of humanin and necrostatin-1 on hypoxia and ischemia/reperfusion injury[J]. Brain Res, 2010, 1355: 189-194.

(收稿日期: 2013-08-29)

(本文编辑: 李银平)