

苦柯胺 B 对脂多糖诱导的脓毒症小鼠小肠炎症反应的抑制作用及分子机制

吕汪洵 秦魏婷 张锦丽 沈唯长 王旭 孙炳伟

【摘要】 目的 探讨苦柯胺 B (KB) 对脓毒症小鼠小肠炎症反应的抑制作用及其分子机制。方法 按照随机数字表法将 24 只雄性 ICR 小鼠分为对照组、模型组、KB 干预组, 每组 8 只。腹腔注射脂多糖 (LPS) 20 mg/kg 制备脓毒症动物模型, 对照组注射等量生理盐水; KB 干预组于建模后 4 h 经尾静脉注射 KB 20 μg/kg 进行干预。各组于注射 LPS 后 8 h 取心脏血和空肠、回肠组织, 检测血浆 LPS 含量; 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血浆及小肠组织肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 和白细胞介素-1β (IL-1β) 水平; 光镜下观察小肠组织病理学改变; 比色法检测小肠组织髓过氧化物酶 (MPO) 活性; 免疫组化法观察小肠组织细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 表达; 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测小肠组织诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) mRNA 表达; 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测小肠组织核转录因子-κB (NF-κB) 蛋白表达。结果 模型小鼠表现为肠组织微血管通透性增加, 间质水肿, 白细胞浸润; 血浆 LPS、TNF-α、IL-1β 水平及小肠 TNF-α、IL-1β、MPO 活性、ICAM-1 阳性表达、iNOS mRNA、NF-κB 蛋白表达均明显升高; 而经 KB 干预后, 小肠组织微血管通透性降低, 水肿程度减轻, 白细胞浸润显著减少, 血浆 LPS、TNF-α、IL-1β 及小肠 TNF-α、IL-1β、MPO 活性、ICAM-1 阳性表达、iNOS mRNA 和 NF-κB 蛋白表达均较模型组均明显下降 [血浆 LPS (kEU/L): 654.09 ± 28.13 比 1 155.65 ± 47.15, TNF-α (ng/L): 12.75 ± 0.47 比 30.61 ± 0.71, IL-1β (ng/L): 53.06 ± 5.32 比 64.47 ± 2.61; 空肠 TNF-α (ng/L): 43.27 ± 1.20 比 64.82 ± 2.09, IL-1β (ng/L): 326.38 ± 14.47 比 535.22 ± 13.48, MPO (U/g): 0.14 ± 0.01 比 0.32 ± 0.02, iNOS mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.39 ± 0.13 比 10.80 ± 0.22, NF-κB 蛋白 (灰度值): 0.687 ± 0.062 比 1.404 ± 0.046; 回肠 TNF-α (ng/L): 62.75 ± 3.92 比 104.24 ± 2.82, IL-1β (ng/L): 408.06 ± 1.70 比 521.97 ± 1.16, MPO (U/g): 0.36 ± 0.08 比 0.66 ± 0.05, iNOS mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.65 ± 0.11 比 3.59 ± 0.29, NF-κB 蛋白 (灰度值): 0.830 ± 0.114 比 1.609 ± 0.051, 均 $P < 0.05$]。结论 KB 可以通过结合 LPS, 抑制 LPS/Toll 样受体 4 (TLR4) 信号通路活化, 从而显著抑制 LPS 诱导的脓毒症小鼠小肠炎症反应, 保护小肠功能。

【关键词】 脂多糖; 苦柯胺 B; 小肠; 炎症反应

Inhibitory effects of Kukoamine B on the inflammatory response of small intestine in lipopolysaccharide-induced septic mice and its potential mechanisms Lyu Wanghui, Qin Weiting, Zhang Jinli, Shen Weichang, Wang Xu, Sun Bingwei. Department of Burn and Plastic Surgery, the Affiliated Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu, China

Corresponding author: Sun Bingwei, Email: sunbinwe@hotmail.com

【Abstract】 Objective To study the role of Kukoamine B (KB) in inhibiting the inflammatory response of small intestine in septic mice and its molecular mechanisms. **Methods** Twenty-four male ICR mice were randomly divided into control group, model group, and KB intervention group (each, $n = 8$). Sepsis model was reproduced by intra-peritoneal injection of 20 mg/kg lipopolysaccharide (LPS), while equivalent normal saline was given in control group, and 20 μg/kg KB was injected through caudal vein 4 hours after LPS challenge in KB intervention group. The blood/tissue samples (jejunum and ileum) were harvested 8 hours after LPS injection. The levels of plasma LPS, tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-1β (IL-1β) were measured. The pathological changes in small intestine tissues were observed under light microscope, while the levels of inflammatory cytokines TNF-α and IL-1β in the tissue homogenates (jejunum and ileum) were assessed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The activity of myeloperoxidase (MPO) was measured by colorimetry. The expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) was determined by immunohistochemistry. The expressions of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA was

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2015.02.009

基金项目: 国家自然科学基金 (30772256, 81071546, 81272148); 江苏省自然科学基金 (BK2012703)

作者单位: 212001 江苏镇江, 江苏大学附属医院烧伤整形科

通讯作者: 孙炳伟, Email: sunbinwe@hotmail.com

assayed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B) was determined by Western Blot. **Results** The mice in model group were found to have an increase in microvascular permeability, interstitial edema, and infiltration of white blood cells, and the levels of LPS, TNF- α and IL-1 β in their plasma, with an increase in concentrations of TNF- α and IL-1 β , activity of MPO, positive expression of ICAM-1, expression of iNOS mRNA and NF- κ B protein in small intestine (jejunum and ileum). Compared with model group, in mice with KB intervention, microvascular permeability, interstitial edema, and infiltration of white blood cells were reduced significantly, while the levels of LPS, TNF- α and IL-1 β in plasma, the concentration of TNF- α and IL-1 β , the activity of MPO, the positive expression of ICAM-1, the expression of iNOS mRNA and NF- κ B protein in small intestine (jejunum and ileum) were significantly decreased [plasma LPS (kEU/L): 654.09 \pm 28.13 vs. 1 155.65 \pm 47.15, TNF- α (ng/L): 12.75 \pm 0.47 vs. 30.61 \pm 0.71, IL-1 β (ng/L): 53.06 \pm 5.32 vs. 64.47 \pm 2.61; jejunum TNF- α (ng/L): 43.27 \pm 1.20 vs. 64.82 \pm 2.09, IL-1 β (ng/L): 326.38 \pm 14.47 vs. 535.22 \pm 13.48, MPO (U/g): 0.14 \pm 0.01 vs. 0.32 \pm 0.02, iNOS mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.39 \pm 0.13 vs. 10.80 \pm 0.22, NF- κ B protein (gray value): 0.687 \pm 0.062 vs. 1.404 \pm 0.046; ileum TNF- α (ng/L): 62.75 \pm 3.92 vs. 104.24 \pm 2.82, IL-1 β (ng/L): 408.06 \pm 1.70 vs. 521.97 \pm 1.16, MPO (U/g): 0.36 \pm 0.08 vs. 0.66 \pm 0.05, iNOS mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.65 \pm 0.11 vs. 3.59 \pm 0.29, NF- κ B protein (gray value): 0.830 \pm 0.114 vs. 1.609 \pm 0.051, all $P < 0.05$]. **Conclusion** KB can combine with LPS and inhibit LPS/Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling pathway, thereby significantly inhibit the inflammatory response and protect the function of the small intestine in LPS-induced septic mice.

【Key words】 Lipopolysaccharide; Kukoamine B; Small intestine; Inflammatory response

感染引起的脓毒症发病率和病死率居于世界首位^[1],全球每年约 600 万人死于脓毒症引起的器官功能障碍^[2]。在脓毒症的治疗中,约 1/3 患者体内始终找不到原发感染灶,在这类患者和动物模型中发现有明显的肠道细菌移位现象,诱发和(或)促进了“二次打击”的发生发展^[3-5]。Ravin 提出胃肠道在脓毒症发展过程中起重要作用,而 Border 又进一步提出肠源性脓毒症(GOS)的概念^[6]。胃肠道是许多炎症反应的终末器官^[7],在脓毒症的发生发展过程中具有重要地位^[5, 8-10]。苦柯胺 B(KB,又名地骨皮乙素)是从中药地骨皮中提取的一种生物碱类成分,研究发现,KB 以脂多糖(LPS)和 CpG DNA 为靶标^[11-12],对重度和极重度脓毒症模型均具有显著的保护作用^[13]。本研究就 KB 对脓毒症模型小鼠小肠炎症反应的干预作用进行研究,以评价 KB 对脓毒症小肠炎症反应的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器: LPS (E.coli O55 : B5) 购自美国 Sigma 公司,溶于生理盐水使用。KB 由第三军医大学西南医院提供,溶于生理盐水使用。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 酶联免疫吸附试验(ELISA)测试盒购自上海巧伊生物有限公司。髓过氧化物酶(MPO)测试盒购自南京建成生物工程研究所。兔抗鼠细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、兔抗鼠核转录因子- κ B(NF- κ B)、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 及增强化学发光(ECL)抗体均购自英国 Santa Cruz 生物技

术公司。鲎试剂购自厦门鲎试剂试验厂有限公司。酶标仪 Elx808 购自美国伯腾仪器有限公司。其余试剂、器械均购自美国 Sigma 公司。

1.2 动物分组及模型制备: 6~8 周龄雄性 ICR 小鼠 24 只,体质量(20 \pm 2)g,由江苏大学动物实验中心提供,动物合格证号: SCXK(苏)2013-0011。将动物按随机数字表法分为对照组、模型组、KB 干预组 3 组,每组 8 只。腹腔注射 20 mg/kg LPS 制备脓毒症模型^[14],对照组则注射等量生理盐水;KB 干预组于注射 LPS 4 h 后经尾静脉注射 KB 20 μ g/kg。

本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 动物标本采集: 制模后 8 h,异氟烷吸入麻醉小鼠,用肝素处理的注射器经左心室穿刺取血备用。将小鼠断颈处死后开腹,在十二指肠悬韧带下方约 10 cm 处取全层空肠组织 2 cm,近回盲部约 5 cm 处取全层回肠组织 2 cm 备检。

1.3.2 肠组织形态学观察: 取空肠、回肠组织,干净处理后用 10% 甲醛固定,苏木素-伊红(HE)染色,显微镜下观察。

1.3.3 血浆 LPS 测定: 血浆制备按照试剂盒要求进行。取除热源微板,在各孔中分别加入 100 μ L 细菌内毒素检查用水、内毒素标准溶液或供试品,将微板置于酶标仪中,37 $^{\circ}$ C 温育 10 min,每孔加入 100 μ L 鲎试剂,混匀,测定波长 630 nm 处吸光度(A)值。应用 GEN 5 软件进行分析。

1.3.4 血浆、肠组织 TNF- α 、IL-1 β 含量测定: 取全

血离心收集血浆, -20℃保存待检。取空肠、回肠组织各0.1g, 加入磷酸盐缓冲液(PBS)制成10%组织匀浆, -70℃保存待检。用ELISA法测定血浆和肠组织匀浆中TNF- α 和IL-1 β 含量, 操作按试剂盒要求进行。用酶标仪在波长450nm处测定两种炎症因子A值, 应用ELISA分析软件计算其含量。

1.3.5 肠组织MPO活性测定:取空肠、回肠组织各0.1g, 制备5%组织匀浆, 利用分光光度计采用比色法检测, 操作按试剂盒说明书进行。

1.3.6 免疫组化检测ICAM-1表达:将石蜡包埋的空肠、回肠组织制成4 μ m厚的连续切片, 经二甲苯脱蜡及梯度乙醇脱水, 玻片经多聚赖氨酸预处理。用3% H₂O₂灭活细胞内源性过氧化物酶30min, 柠檬酸钠进行修复, 3%牛血清白蛋白封闭30min。甩去多余液体, 滴加ICAM-1一抗(1:200), 37℃3h, 4℃孵育过夜, 隔夜滴加HRP标记的羊抗兔二抗, 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)法检测ICAM-1蛋白表达, 镜下观察。血管内皮细胞表面着色呈棕黄色颗粒为ICAM-1阳性。

1.3.7 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA表达:取空肠、回肠组织, 加入TRIzol、氯仿、异丙醇、乙醇、无RN酶的水, 提取样本总RNA, 反转录生成cDNA, 实时定量PCR扩增, 结果以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的相对量校正, 采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算并统计。PCR引物由上海英潍捷基贸易有限公司合成。

1.3.8 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测NF- κ B表达:制备空肠、回肠组织匀浆, 按照核蛋白提取试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)说明书提取蛋白, -20℃保存待用。每组取等量蛋白20 μ g进行电泳, 经蛋白质电泳、转膜, 加入兔抗鼠NF- κ B一抗(稀释1:200)、HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(稀释3:5000)及ECL, 暗室中曝光, 蛋白条带应用Fluor Chem FC3分析软件分析^[15]。计算目的蛋白NF- κ B与内参蛋白 β -肌动蛋白(β -actin)的灰

度值比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.4 统计学处理:使用SPSS 17.0软件对数据进行统计, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 组间比较采用LSD-*t*检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血浆LPS含量比较(表1):模型组血浆LPS水平显著高于对照组($P<0.05$); KB干预组LPS水平显著低于模型组($P<0.05$)。说明KB能够降低血浆LPS水平。

2.2 各组血浆及小肠组织中炎症因子TNF- α 、IL-1 β 的表达(表1):模型组血浆、空肠和回肠中TNF- α 、IL-1 β 水平显著高于对照组(均 $P<0.05$); KB干预后各指标均显著低于模型组(均 $P<0.05$)。说明KB能明显抑制脓毒症时炎症因子的产生。

2.3 各组小肠组织MPO活性的变化(表2):模型组小鼠空肠、回肠组织MPO活性显著高于对照组(均 $P<0.05$); KB干预后MPO活性较模型组显著降低(均 $P<0.05$)。

表2 KB对LPS致脓毒症小鼠小肠组织MPO活性、iNOS mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (只)	MPO活性(U/g)		iNOS mRNA (2 ^{-$\Delta\Delta$Ct})	
		空肠	回肠	空肠	回肠
对照组	8	0.12 \pm 0.01	0.34 \pm 0.05	1	1
模型组	8	0.32 \pm 0.02 ^a	0.66 \pm 0.05 ^a	10.80 \pm 0.22 ^a	3.59 \pm 0.29 ^a
KB干预组	8	0.14 \pm 0.01 ^b	0.36 \pm 0.08 ^b	2.39 \pm 0.13 ^b	1.65 \pm 0.11 ^b
F值		268.700	24.660	3758.000	161.300
P值		0.000	0.001	0.000	0.000

注: KB为苦柯胺B, LPS为脂多糖, MPO为髓过氧化物酶, iNOS为诱导型一氧化氮合酶; 与对照组比较, ^a $P<0.05$; 与模型组比较, ^b $P<0.05$

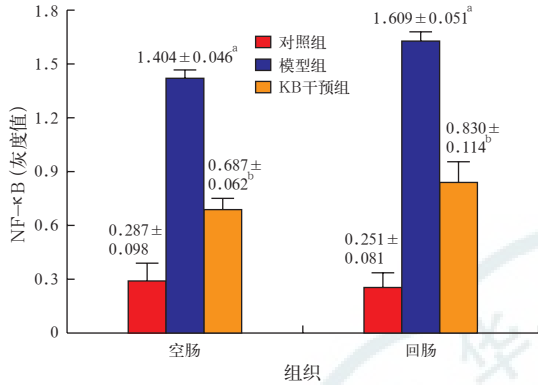
2.4 RT-PCR显示各组小肠iNOS mRNA表达(表2):模型组空肠、回肠组织iNOS mRNA表达明显高于对照组(均 $P<0.05$); KB干预后, iNOS mRNA表达较模型组明显降低(均 $P<0.05$)。说明KB能下调脓毒症时小鼠小肠组织iNOS基因表达。

表1 KB对LPS致脓毒症小鼠血浆LPS浓度以及血浆和小肠组织炎症因子表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (只)	血浆LPS (kEU/L)	TNF- α (ng/L)			IL-1 β (ng/L)		
			血浆	空肠	回肠	血浆	空肠	回肠
对照组	8	31.39 \pm 18.86	8.64 \pm 0.94	9.26 \pm 0.69	8.07 \pm 3.01	29.92 \pm 6.49	54.85 \pm 7.23	61.64 \pm 10.51
模型组	8	1155.65 \pm 47.15 ^a	30.61 \pm 0.71 ^a	64.82 \pm 2.09 ^a	104.24 \pm 2.82 ^a	64.47 \pm 2.61 ^a	535.22 \pm 13.48 ^a	521.97 \pm 1.16 ^a
KB干预组	8	654.09 \pm 28.13 ^b	12.75 \pm 0.47 ^b	43.27 \pm 1.20 ^b	62.75 \pm 3.92 ^b	53.06 \pm 5.32 ^b	326.38 \pm 14.47 ^b	408.06 \pm 1.70 ^b
F值		134.700	764.100	1129.000	647.700	36.120	1570.000	4510.000
P值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: KB为苦柯胺B, LPS为脂多糖, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , IL-1 β 为白细胞介素-1 β ; 与对照组比较, ^a $P<0.05$; 与模型组比较, ^b $P<0.05$

2.5 Western Blot 显示各组小肠 NF-κB 蛋白的表达 (图 1):模型组空肠、回肠组织 NF-κB 蛋白表达较对照组明显上调 (均 $P < 0.05$); KB 干预后, NF-κB 蛋白表达较模型组明显下调 (均 $P < 0.05$)。



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, KB 为苦柯胺 B, LPS 为脂多糖, NF-κB 为核转录因子 -κB; 与对照组比较 ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

图 1 Western Blot 检测 KB 对 LPS 致脓毒症小鼠小肠 NF-κB 表达的影响

2.6 光镜下观察各组小肠组织病理学改变 (图 2): 对照组空肠和回肠的小肠绒毛尖端致密, 绒毛上皮细胞排列整齐有序, 形态正常, 肠组织绒毛边缘整齐, 无间质水肿, 无明显中性粒细胞 (PMN) 浸润; 模

型组小肠绒毛变短, 部分脱落, 淋巴细胞浸润明显, 水肿、充血明显, 绒毛坏死, 间隙增宽, 伴有大量炎性细胞增生; KB 干预组小肠绒毛尖端致密, 排列有序, 绒毛上皮细胞排列较整齐, 形态大致正常, 肠腔内有极少量炎性渗出, 症状较模型组明显改善。

2.7 光镜下观察各组小肠 ICAM-1 的表达 (图 3): 对照组血管内皮细胞表面没有或仅有少量 ICAM-1 阳性表达; 模型组血管内皮表面 ICAM-1 阳性表达明显增多, 棕褐色颗粒散在、广泛分布; KB 干预后血管内皮细胞上的棕黄色颗粒明显减少, ICAM-1 表达水平明显受到抑制。

3 讨论

脓毒症早期, 机体失去对感染早期促炎反应的调控而产生系统性全身炎症反应综合征 (SIRS), 过度的炎症反应导致机体毛细血管渗透性增加, 进而导致多器官功能障碍综合征 (MODS) [16-17]。近年研究结果证实, 脓毒症时常累及肠道, 造成肠黏膜上皮水肿, 上皮细胞膜和细胞间连接断裂, 细胞坏死, 肠道的通透性增加、肠屏障功能受损, 肠道细菌及其毒素吸收入循环系统而发生细菌移位, 加剧 SIRS, 严重时诱发 MODS, 甚至危及患者生命 [18-19]。

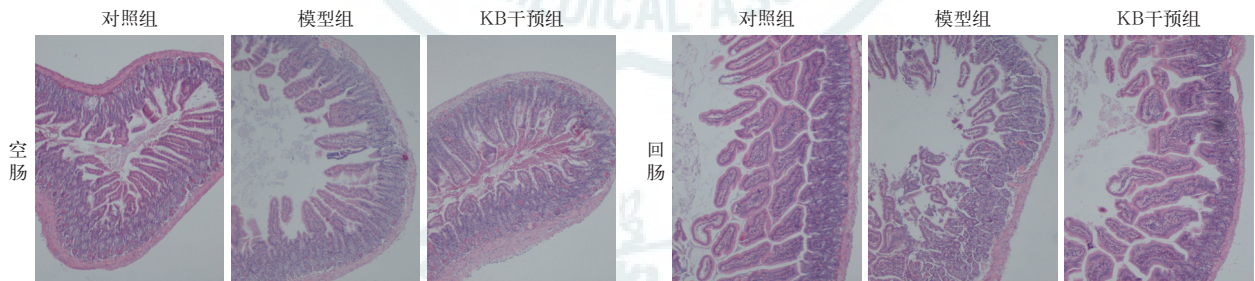


图 2 光镜下观察各组小鼠空肠和回肠组织病理学改变 对照组小肠绒毛尖端致密, 绒毛上皮细胞排列整齐有序, 形态正常, 肠组织绒毛边缘整齐, 无间质水肿, 无明显中性粒细胞浸润; 脂多糖致脓毒症模型组小肠绒毛变短, 部分脱落, 淋巴细胞浸润明显, 水肿、充血明显, 绒毛坏死, 间隙增宽, 伴有大量炎性细胞增生; 苦柯胺 B (KB) 干预组小肠绒毛尖端致密, 排列有序, 绒毛上皮细胞排列较整齐, 形态大致正常, 肠腔内有极少量炎性渗出, 症状较模型组明显改善 HE 空肠为低倍放大, 回肠为高倍放大

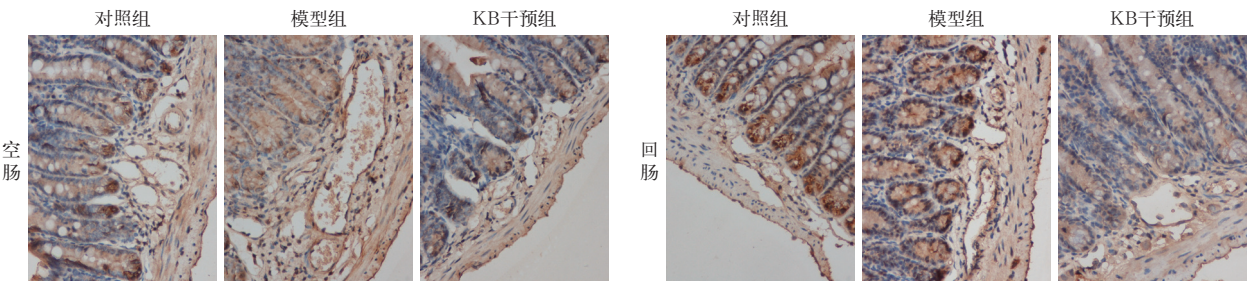


图 3 光镜下观察各组小鼠空肠和回肠组织细胞间黏附分子 -1 (ICAM-1) 表达 血管内皮细胞表面着色呈棕黄色颗粒为 ICAM-1 阳性表达; 对照组小肠组织血管内皮细胞表面没有或仅有少量 ICAM-1 阳性表达; 模型组血管内皮表面 ICAM-1 阳性表达明显增多, 棕褐色颗粒散在、广泛分布; 苦柯胺 B (KB) 干预后血管内皮细胞上的棕黄色颗粒明显减少, ICAM-1 表达明显受到抑制 免疫组化 高倍放大

LPS 是革兰阴性 (G^-) 菌细胞壁中的一类脂多糖物质^[20-21], 位于细胞壁的最外层, 覆盖于细胞壁的黏肽上, 当体内 G^- 菌死亡后 LPS 释放入血, 与巨噬细胞、中性粒细胞、血管内皮细胞等细胞膜表面 Toll 样受体 4 (TLR4) 结合^[22-24], 通过启动 NF- κ B 炎症信号转导通路发挥促炎功能^[25-26]。脓毒症时大量的 LPS 释放入血, 导致免疫系统的过度活化是造成脓症患者死亡的重要原因。KB 以 LPS 和 CpG DNA 为靶标^[11-12], 能有效中和脓毒症时体内产生的 LPS^[13], 从而减少 LPS 与 TLR4 结合, 抑制 TLR4 下游 NF- κ B 途径的炎症反应, 减轻脓毒症的炎症反应。本研究结果表明, 其机制可能是: 小鼠腹腔注射 LPS 后, 血中 LPS 含量显著增高; 而由于 KB 能特异性中和 LPS, 经 KB 干预后小鼠血中 LPS 含量明显下降。

NF- κ B 是 TLR4 受体下游重要的促炎信号分子, 当 LPS 与 TLR4 结合后, 激活的 NF- κ B 从胞质进入细胞核, 结合于转录起始位点, 启动下游细胞因子基因的转录, 诱生 TNF- α 、IL-1 β 、IL-4 和 IL-10 等多种细胞因子^[27-29], 其中 TNF- α 、IL-1 β 是机体炎症反应早期重要的致炎细胞因子^[30-32], 是诱发脓毒性休克和 MODS 的重要介质^[33-34]。同时 NF- κ B 对参与炎症级联放大效应的多种酶的基因转录也具有重要的调控作用^[35]。本研究中, 脓毒症小鼠血浆、空肠及回肠组织中 TNF- α 、IL-1 β 明显升高, 经 KB 干预治疗后, TNF- α 、IL-1 β 的表达水平显著下降。运用 Western Blot 对 NF- κ B 核转位检测显示, 模型组小鼠空肠、回肠 NF- κ B 核转位显著增强, 而 KB 干预能显著抑制小鼠空肠、回肠 NF- κ B 核转位, 表明 NF- κ B 信号通路的活化被有效抑制。

MPO 是中性粒细胞 (PMN) 的功能标志和激活标志, 其水平及活性变化代表着 PMN 的功能和活性状态, 其活性常被用以评估炎症组织中 PMN 的数量和聚集程度^[36-38]。脓毒症时, 由于 LPS 刺激导致组织中过多的白细胞滞留, 从而加重炎症反应或脓毒症的进展^[39-44]。本研究中, 脓毒症小鼠空肠和回肠组织中 MPO 活性明显升高, KB 干预治疗后其活性显著下调, 表明 KB 能有效抑制 LPS 刺激后组织中白细胞的浸润。同时, LPS 刺激引起的大量 ICAM-1 表达被认为是脓毒症后炎症机体 PMN 滞留的直接原因^[35]。脓毒症时 ICAM-1 增加, 激活 PMN 和内皮细胞, 继而促进各种炎症因子的释放, 导致 SIRS、急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 及

MODS^[40-44]。本实验中, 脓毒症小鼠小肠血管内皮细胞 ICAM-1 表达明显增加, KB 干预后 ICAM-1 表达明显减少, 证实 KB 能抑制 LPS 刺激后小肠组织 ICAM-1 表达, 从而抑制小肠组织中过多的白细胞滞留。

脓毒症时组织器官的功能障碍和破坏源于 LPS 刺激所诱导 iNOS 生成的一氧化氮 (NO)^[35,45]。NO、炎症因子是免疫细胞应对炎症刺激和内毒素产生的信号分子, 可促进炎症反应、组织损伤和器官功能紊乱^[46]。NO 在脓毒症的发病机制中有着重要的作用, 除直接致伤细胞组织外, 还可作为效应分子, 完成 TNF- α 、IL-1 β 等细胞因子在炎症中的病理作用^[47-49]。在本实验中, 脓毒症小鼠空肠和回肠组织中 iNOS mRNA 表达明显上升, KB 干预治疗后 iNOS mRNA 表达显著减低, 表明 KB 可能抑制 LPS 刺激所诱导的 iNOS 表达, 进而下调 NO 的表达水平, 减轻脓毒症时空肠、回肠的组织损伤及病理改变, 抑制炎症反应, 保护小肠组织。

综上, 本研究证实, KB 通过有效中和脓毒症时体内的 LPS, 减少 LPS 与 TLR4 结合, 抑制 NF- κ B 活化, 减少小肠组织中 iNOS、ICAM-1 和重要细胞因子表达水平, 抑制白细胞滞留, 从而减轻肠道组织炎症反应, 保护肠功能。

参考文献

- [1] Carchman EH, Whelan S, Loughran P, et al. Experimental sepsis-induced mitochondrial biogenesis is dependent on autophagy, TLR4, and TLR9 signaling in liver [J]. *FASEB J*, 2013, 27(12): 4703-4711.
- [2] Lewis SM, Khan N, Beale R, et al. Depletion of blood neutrophils from patients with sepsis: treatment for the future? [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(4): 1226-1232.
- [3] Gennari R, Alexander JW. Effects of hyperoxia on bacterial translocation and mortality during gut-derived sepsis [J]. *Arch Surg*, 1996, 131(1): 57-62.
- [4] 庄颖, 张雅萍. 肠源性脓毒症的研究进展 [J]. *国际外科学杂志*, 2007, 34(6): 403-406.
- [5] Rosero O, Kovács T, Onody P, et al. Bacterial translocation: gap in the shield [J]. *Orv Hetil*, 2014, 155(8): 304-312.
- [6] Carrico CJ, Meakins JL, Marshall JC, et al. Multiple-organ-failure syndrome [J]. *Arch Surg*, 1986, 121(2): 196-208.
- [7] Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study [J]. *Crit Care Med*, 2006, 34(2): 344-353.
- [8] Deitch EA. Gut-origin sepsis: evolution of a concept [J]. *Surgeon*, 2012, 10(6): 350-356.
- [9] 张艳敏, 崔乃强, 张淑坤. 重症腹腔感染大鼠肠系膜淋巴液成分分析 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26(7): 503-507.
- [10] 肖光复. 肠源性感染的研究 [J]. *中华烧伤杂志*, 2008, 24(5): 331-333, 364.
- [11] Liu X, Zheng X, Long Y, et al. Dual targets guided screening and isolation of Kukoamine B as a novel natural anti-sepsis agent from traditional Chinese herb *Cortex lycii* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(1): 110-120.
- [12] Liu X, Zheng X, Wang N, et al. Kukoamine B, a novel dual

- inhibitor of LPS and CpG DNA, is a potential candidate for sepsis treatment [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 162(6): 1274-1290.
- [13] 杨景程, 刘鑫, 郑新川, 等. 苦柯胺 B 拮抗细菌内毒素和 CpG DNA 的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(11): 1062-1066.
- [14] Nishioku T, Dohgu S, Takata F, et al. Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29(3): 309-316.
- [15] Kahner BN, Dorsam RT, Mada SR, et al. Hematopoietic lineage cell specific protein 1 (HS1) is a functionally important signaling molecule in platelet activation [J]. *Blood*, 2007, 110(7): 2449-2456.
- [16] Namas R, Zamora R, Namas R, et al. Sepsis: Something old, something new, and a systems view [J]. *J Crit Care*, 2012, 27(3): 314.e1-11.
- [17] Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, et al. Sepsis definitions: time for change [J]. *Lancet*, 2013, 381(9868): 774-775.
- [18] 韩磊, 任爱民. 脓毒症胃肠功能损伤机制及保护修复的研究进展[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16(5): 314-317.
- [19] 孔立, 郭琪钰, 赵浩. 脓毒症胃肠功能障碍中医证候分布规律探讨[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20(3): 134-137.
- [20] Savva A, Roger T. Targeting toll-like receptors: promising therapeutic strategies for the management of sepsis-associated pathology and infectious diseases [J]. *Front Immunol*, 2013, 4: 387.
- [21] Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin [J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(2): 169-176.
- [22] Giannini TL, Weiss JP. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells [J]. *Immunol Res*, 2007, 39(1-3): 249-260.
- [23] Alves-Filho JC, de Freitas A, Russo M, et al. Toll-like receptor 4 signaling leads to neutrophil migration impairment in polymicrobial sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2006, 34(2): 461-470.
- [24] Wittebole X, Castanares-Zapatero D, Laterre PF. Toll-like receptor 4 modulation as a strategy to treat sepsis [J]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010: 568396.
- [25] Dennehy KM, Ferwerda G, Faro-Trindade I, et al. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors [J]. *Eur J Immunol*, 2008, 38(2): 500-506.
- [26] Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, et al. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF- κ B activation through Raf-1 and Syk [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(2): 203-213.
- [27] Qin W, Zhang J, Lv W, et al. Effect of carbon monoxide-releasing molecules II -liberated CO on suppressing inflammatory response in sepsis by interfering with nuclear factor kappa B activation [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75840.
- [28] Zhao W, Zhou X, Lu Y, et al. Mycobacterium bovis ornithine carbamoyltransferase, MB1684, induces proinflammatory cytokine gene expression by activating NF- κ B in macrophages [J]. *DNA Cell Biol*, 2014, 33(5): 311-319.
- [29] Cheng BC, Ma XQ, Kwan HY, et al. A herbal formula consisting of Rosae Multiflorae Fructus and Lonicerae Japonicae Flos inhibits inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153(3): 922-927.
- [30] 李晨, 徐军, 袁莹, 等. 氢化可的松琥珀酸钠对感染性休克时血清肿瘤坏死因子- α 和白细胞介素-10的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26(7): 513-515.
- [31] 罗悦晨, 梁林, 臧照辉, 等. 青蒿素对脑缺血/再灌注损伤大鼠肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20(1): 27-28.
- [32] Han EH, Yang JH, Kim HK, et al. 1-Bromopropane up-regulates cyclooxygenase-2 expression via NF- κ B and C/EBP activation in murine macrophages [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(5): 1616-1622.
- [33] 张萍, 邹向前, 石庚生, 等. 外源性一氧化碳释放分子对脓毒症小鼠肺部炎症反应的抑制作用[J]. 江苏大学学报(医学版), 2010, 20(2): 117-120, 125.
- [34] Sun B, Sun H, Liu C, et al. Role of CO-releasing molecules liberated CO in attenuating leukocytes sequestration and inflammatory responses in the lung of thermally injured mice [J]. *J Surg Res*, 2007, 139(1): 128-135.
- [35] 左祥荣, 曹权, 阙军, 等. 白藜芦醇对内毒素性急性肺损伤小鼠核转录因子- κ B及炎症反应的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20(1): 16-19.
- [36] Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, et al. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker [J]. *J Invest Dermatol*, 1982, 78(3): 206-209.
- [37] Odobasic D, Kitching AR, Yang Y, et al. Neutrophil myeloperoxidase regulates T-cell-driven tissue inflammation in mice by inhibiting dendritic cell function [J]. *Blood*, 2013, 121(20): 4195-4204.
- [38] Zhang N, Francis KP, Prakash A, et al. Enhanced detection of myeloperoxidase activity in deep tissues through luminescent excitation of near-infrared nanoparticles [J]. *Nat Med*, 2013, 19(4): 500-505.
- [39] Sun B, Sun Z, Jin Q, et al. CO-releasing molecules (CORM-2) -liberated CO attenuates leukocytes infiltration in the renal tissue of thermally injured mice [J]. *Int J Biol Sci*, 2008, 4(3): 176-183.
- [40] Tazzari PL, Cappellini A, Ricci F, et al. Multidrug resistance-associated protein 1 expression is under the control of the phosphoinositide 3 kinase/Akt signal transduction network in human acute myelogenous leukemia blasts [J]. *Leukemia*, 2007, 21(3): 427-438.
- [41] Park KH, Lee TH, Kim CW, et al. Enhancement of CCL15 expression and monocyte adhesion to endothelial cells (ECs) after hypoxia/reoxygenation and induction of ICAM-1 expression by CCL15 via the JAK2/STAT3 pathway in ECs [J]. *J Immunol*, 2013, 190(12): 6550-6558.
- [42] Wantha S, Alard JE, Megens RT, et al. Neutrophil-derived cathelicidin promotes adhesion of classical monocytes [J]. *Circ Res*, 2013, 112(5): 792-801.
- [43] Deveci M, Eski M, Sengezer M, et al. Effects of cerium nitrate bathing and prompt burn wound excision on IL-6 and TNF- α levels in burned rats [J]. *Burns*, 2000, 26(1): 41-45.
- [44] Cuschieri J, Gourlay D, Garcia I, et al. Modulation of endotoxin-induced endothelial activity by microtubule depolymerization [J]. *J Trauma*, 2003, 54(1): 104-112; discussion 112-113.
- [45] Rahat MA, Hemmerlein B. Macrophage-tumor cell interactions regulate the function of nitric oxide [J]. *Front Physiol*, 2013, 4: 144.
- [46] Liu JS, Jung F, Yang SH, et al. FJU-C4, a new 2-pyridone compound, attenuates lipopolysaccharide-induced systemic inflammation via p38MAPK and NF- κ B in mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82877.
- [47] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology [J]. *Pharmacol Rev*, 1991, 43(2): 109-142.
- [48] Boscá L, Zeini M, Través PG, et al. Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate [J]. *Toxicology*, 2005, 208(2): 249-258.
- [49] 张锦丽, 秦魏婷, 吕汪涸, 等. 苦柯胺 B 对脓毒症小鼠肺部炎症反应的抑制作用[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26(7): 493-497.

(收稿日期: 2014-08-04)

(本文编辑: 李银平)