

程序性坏死特异性抑制剂 -1 对脓毒症大鼠肾脏 Toll 样受体 4 表达的影响

王平¹ 范铮² 王勇强³ 王兵³

(1. 天津医科大学总医院滨海医院, 天津 300480; 2. 天津医科大学一中心临床学院, 天津 300070;

3. 天津市第一中心医院重症医学科, 天津市急救医学研究所, 天津 300192)

【摘要】目的 研究程序性坏死特异性抑制剂 -1 (Nec-1) 对脓毒症大鼠肾脏 Toll 样受体 4 (TLR4) 表达的影响及机制。**方法** 将 60 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组 (Sham 组)、二甲基亚砜 (DMSO) 组、Nec-1 组, 每组 20 只。采用盲肠结扎穿刺术 (CLP) 制备脓毒症大鼠模型, Sham 组仅进行麻醉、开腹翻动盲肠后还纳, 关腹缝合。DMSO 组制模前 30 min 尾静脉给予溶剂 DMSO 1 mg/kg。Nec-1 组制模前 30 min 尾静脉注射 Nec-1 溶液 0.1 mL/kg。制模后即刻、制模后 24 h 取动物血清及肾脏组织, 用全自动生化分析仪检测血清尿素氮 (BUN) 及肌酐 (SCr) 的含量, 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-6 (IL-6) 水平, 用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测肾脏组织 TLR4 mRNA 表达。**结果** 制模后即刻, Sham 组、DMSO 组和 Nec-1 组血清 BUN (mmol/L: 7.20 ± 0.57 , 7.25 ± 0.35 比 7.32 ± 0.49), SCr ($\mu\text{mol/L}$: 28.32 ± 2.04 , 29.44 ± 2.24 比 28.04 ± 1.94), TNF- α (ng/L: 262.33 ± 18.13 , 264.59 ± 15.84 比 268.67 ± 40.70), IL-6 (ng/L: 308.65 ± 15.51 , 314.85 ± 44.11 比 311.72 ± 35.71), 及肾脏组织 TLR4 mRNA 表达比较差异均无统计学意义 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.01 ± 0.95 , 1.02 ± 0.09 比 1.03 ± 0.11 , 均 $P > 0.05$)。制模后 24 h, 与 DMSO 组比较, Nec-1 组血清 BUN (mmol/L: 24.91 ± 1.58 比 31.86 ± 3.47), SCr ($\mu\text{mol/L}$: 79.37 ± 6.38 比 114.16 ± 8.98), TNF- α (ng/L: 567.41 ± 36.87 比 726.62 ± 40.70), IL-6 (ng/L: 844.94 ± 54.69 比 1071.61 ± 82.21) 以及肾脏组织 TLR4 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 10.92 ± 1.52 比 20.17 ± 1.80) 均明显降低 (均 $P < 0.05$)。**结论** Nec-1 干预可有效保护脓毒症大鼠的肾脏细胞, 改善肾功能, 其机制可能与降低血清 TNF- α 和 IL-6 的含量及肾脏中 TLR4 的表达有关。

【关键词】 脓毒症; 程序性坏死; Toll 样受体; 肾损伤, 急性

The effect of necrostatin-1 on expression of toll-like receptor 4 of kidney in septic rats Wang Ping*, Fan Zheng, Wang Yongqiang, Wang Bing. *Binhai Hospital, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300480, China

Corresponding author: Wang Bing, Department of Critical Care Medicine, Tianjin First Center Hospital, Tianjin Institute of Emergency Medicine, Tianjin 300192, China; Email: egenbing@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of necrostatin-1 (Nec-1) on the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) mRNA of kidney in septic rats. **Methods** Sixty male Sprague-Dawley (SD) rats were divided into Sham group, dimethyl sulphoxide (DMSO) group and Nec-1 group by random number table, 20 rats in each group. The sepsis rat model was replicated by cecal ligation puncture (CLP). The rats in sham group received anesthesia, opening the abdomen, flipping cecum and closing the abdominal incision by sutures; at 30 minutes before modeling, the rats in DMSO group and in Nec-1 group were given DMSO solvent and Nec-1 solution via a tail vein respectively. The serum and kidney tissues of each group were collected at 0 hour and 24 hours after modeling. The levels of serum urea nitrogen (BUN) and creatinine (SCr) were detected by automatic biochemistry analyzer, and the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in serum were examined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of TLR4 mRNA in the kidney tissues was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** There were no statistical significant differences among sham group, DMSO group and Nec-1 group in the levels of serum BUN, SCr, TNF- α , IL-6 and the expressions of TLR4 mRNA in kidney tissues immediately after modeling [BUN (mmol/L): 7.20 ± 0.57 , 7.25 ± 0.35 vs. 7.32 ± 0.49 , SCr ($\mu\text{mol/L}$): 28.32 ± 2.04 , 29.44 ± 2.24 vs. 28.04 ± 1.94 ; TNF- α (ng/L): 262.33 ± 18.13 , 264.59 ± 15.84 vs. 268.67 ± 40.70 ; IL-6 (ng/L): 308.65 ± 15.51 , 314.85 ± 44.11 vs. 311.72 ± 35.71 , TLR4 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.01 ± 0.95 , 1.02 ± 0.09 vs. 1.03 ± 0.11 , all $P > 0.05$]. Twenty-four hours after molding, compared with DMSO group, the levels of serum BUN (mmol/L: 24.91 ± 1.58 vs. 31.86 ± 3.47), SCr ($\mu\text{mol/L}$: 79.37 ± 6.38 vs. 114.16 ± 8.98), TNF- α (ng/L: 567.41 ± 36.84 vs. 726.62 ± 40.70), IL-6 (ng/L: 844.94 ± 54.69 vs. 1071.61 ± 82.21) and the expression of TLR4 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 10.92 ± 1.52 vs. 20.17 ± 1.80) in Nec-1 group were obviously decreased (all $P < 0.05$). **Conclusions** The interference of Nec-1 can remarkably protect the kidney cells, improve the kidney function and effectively reduce the serum IL-6, TNF- α levels and the expression of TLR4 mRNA in kidney tissues of rats with sepsis.

【Key words】 Sepsis; Necroptosis; Toll-like receptor 4; Acute kidney injuries

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.06.022

基金项目: 天津市医药卫生重点攻关项目 (14KG101, 2014KR07)

通讯作者: 王兵, Email: egenbing@163.com

脓毒症是由于机体对感染的反应失控引起的致命性器官功能障碍^[1]。脓毒症免疫反应失控的主要原因是损伤相关分子模式(DAMPs)和病原相关分子模式(PAMPs)两大免疫源性物质^[2]。肾脏是脓毒症所致器官衰竭中比较容易受累的器官。有资料显示,在造成急性肾衰竭的原因中(脓毒症、外科手术和心功能衰竭),脓毒症处于第一位^[3],而肾脏功能又在维持内环境稳定中起到不可替代的作用。目前,虽然治疗脓毒症的药物和技术在不断发展与更新,但脓毒症病死率仍居高不下。2005年, Degtarev等^[4]提出了区别于坏死和凋亡的另一种细胞死亡方式,其具备坏死细胞死亡形态的同时又具备凋亡细胞的调控性,并命名为程序性坏死,他们的研究还筛选出程序性坏死特异性抑制剂-1(Nec-1),这为我们治疗脓毒症提供了另一种思路。本研究主要探究 Nec-1 是否会对脓毒症大鼠肾脏 Toll 样受体 4(TLR4)表达产生影响,并揭示其分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂与材料: Nec-1 购自美国 Sigma-Aldrich 公司,二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Amresco 公司。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。TRIzol 和反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒及引物购自大连 TaKaRa 公司。

1.2 实验动物分组及模型制备: SPF 级 SD 大鼠 60 只,体质量(300±20)g,购自军事医学科学院实验动物中心,动物合格证号:SCXK-(军)2009-003。所用动物均在无菌恒温(25±1)℃、湿度(55±1)%动物房饲养,自由饮食,并接受 12 h 交替光照射,大鼠实验前禁食 12 h、自由饮水。60 只大鼠按随机数字表法分为假手术组(Sham 组)、DMSO 组、Nec-1 组。每组 20 只,采用盲肠结扎穿刺术(CLP)制备脓毒症大鼠模型。手术结束后,腹部皮下注射生理盐水 30 mL/kg 以补充手术中丢失的体液。Sham 组仅进行麻醉、开腹翻动盲肠后还纳,关腹缝合。Nec-1 组于制模前 30 min 尾静脉注射 25 mg Nec-1(溶于 2.5 mL DMSO 中);DMSO 组则注射 DMSO 0.1 mL/kg。

1.3 伦理学: 本实验中动物处理方法均符合动物伦理学标准,并通过动物实验伦理委员会的批准。

1.4 检测指标及方法: 各组分别于制模后即刻和制模后 24 h 各处死 10 只大鼠,腹主动脉取血 5 mL,离心后取血清低温保存。取部分肾脏组织 -80℃保存备用。

1.4.1 肾功能指标测定: 采用全自动生化分析仪检测血清尿素氮(BUN)及血肌酐(SCr)水平。

1.4.2 血清 TNF- α 及 IL-6 水平检测: 用 ELISA 检测血清中 TNF- α 及 IL-6 水平。

1.4.3 肾脏组织 TLR4 mRNA 表达检测: 采用 RT-PCR 检测肝脏组织 TLR4 mRNA 含量,TLR4 上游引物:5'-ATGAGGACTGGGTGAGAAAC-3',下游引物:5'-CACCACCACAATAACTTTCC-3';以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参照。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

1.5 统计学方法: 使用 SPSS 20.0 统计软件处理数据,正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

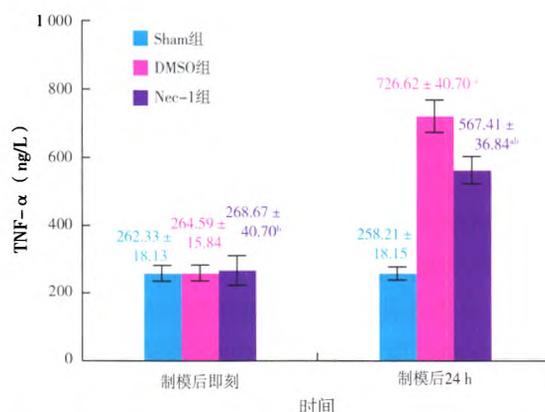
2.1 各组肾功能指标比较(表 1): 与 Sham 组比较,制模后 24 h DMSO 组和 Nec-1 组血清 BUN 和 SCr 均有明显升高(均 $P<0.05$);与 DMSO 组相比,Nec-1 组 SCr 及 BUN 均有明显下降(均 $P<0.05$)。

表 1 各组大鼠肾功能指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	BUN(mmol/L)		SCr(μ mol/L)	
		制模后即刻	制模后 24 h	制模后即刻	制模后 24 h
Sham 组	20	7.20±0.57	7.26±0.57	28.32±2.04	29.44±1.86
DMSO 组	20	7.25±0.35	31.86±3.47 ^a	29.44±2.24	114.16±8.98 ^a
Nec-1 组	20	7.32±0.49	24.91±1.58 ^{ab}	28.04±1.94	79.37±6.38 ^{ab}

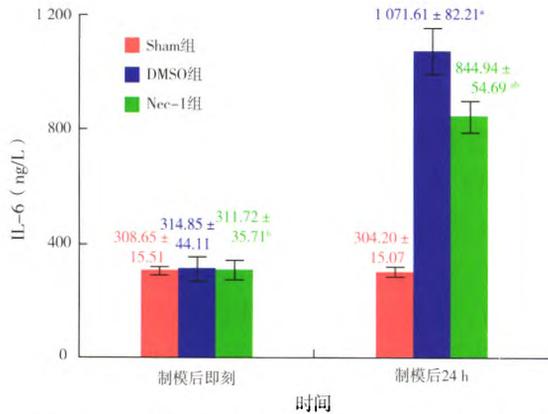
注:与 Sham 组比较,^a $P<0.05$;与 DMSO 组比较,^b $P<0.05$

2.2 各组血清 TNF- α 及 IL-6 水平比较(图 1~2): 制模后 24 h,假手术组 TNF- α 、IL-6 与制模后即刻比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$),DMSO 组和 Nec-1 组 TNF- α 、IL-6 则均较制模后即刻明显升高(均 $P<0.05$);而 Nec-1 组 TNF- α 和 IL-6 较 DMSO 组明显下降(均 $P<0.05$)。



注:与 Sham 组比较,^a $P<0.05$;与 DMSO 组比较,^b $P<0.05$

图 1 各组中血清 TNF- α 的含量比较



注：与 Sham 组比较，^a*P*<0.05；与 DMSO 组比较，^b*P*<0.05

图 2 各组中血清 IL-6 的含量比较

2.3 各组 TLR4 mRNA 表达水平比较(表 2)：制模后 24 h, Sham 组 TLR4 mRNA 表达与制模后即刻比较差异无统计学意义 (*P*>0.05), DMSO 组和 Nec-1 组 TLR4 mRNA 较制模后即刻明显升高(均 *P*<0.05); DMSO 组 TLR4 mRNA 表达较 Sham 组明显升高, Nec-1 组则较 DMSO 组明显下降 (*P*<0.05)。

表 2 Nec-1 对大鼠肾组织 TLR4 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	TLR4 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	
		制模后即刻	制模后 24 h
Sham 组	20	1.01 ± 0.95	1.05 ± 0.08
DMSO 组	20	1.02 ± 0.09 ^a	20.17 ± 1.80 ^{ac}
Nec-1 组	20	1.03 ± 0.11 ^{ab}	10.92 ± 1.52 ^{abc}
<i>F</i> 值		0.93	475.38
<i>P</i> 值		> 0.05	< 0.05

注：与 Sham 组比较，^a*P*<0.05；与 DMSO 组比较，^b*P*<0.05；与制模后即刻比较，^c*P*<0.05

3 讨论

急性肾损伤 (AKI) 是脓毒症最严重的并发症之一, 当脓毒症并发 AKI 时, 患者病死率明显升高, 是脓毒症死亡的独立危险因素^[5]。脓毒症可对肾脏的血流动力学产生影响, 内毒素和炎性介质可直接对肾脏组织造成损害, 使凝血系统和血管内皮功能丧失, 这些原因直接导致了肾脏功能的破坏。脓毒症是机体对内源性和外源性免疫源性物质作出的反应。DAMPs 和 PAMPs 是引起脓毒症免疫失调的两大核心物质^[6]。DAMPs 和 PAMPs 都可以被细胞上模式识别受体 (PRRs) 识别, 它们的互相结合可以产生炎性介质和趋化因子, 并激活包括树突状细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞等免疫细胞, 从而引起机体的系统性炎症反应, 包括体液免疫反应和细胞免疫反应^[7]。所以, 减少 DAMPs 和 PAMPs 便可以从源头上降低免疫反应的强度。

程序性坏死的发现使我们为减少 DAMPs 的释

放成为可能。Nec-1 可以通过抑制程序性坏死通路上受体相互作用蛋白 1 (RIP1) 和 RIP3 互相磷酸化, 减少细胞程序性坏死^[8]。目前, 已经有许多研究表明, Nec-1 具有控制炎症、减少细胞损伤的作用^[9-10]。研究表明, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-8 是脓毒症的早期炎性因子, 其可以作为诊断和评估脓毒症严重程度的指标^[11]。TLRs 是识别革兰阴性菌胞壁成分脂多糖 (LPS) 的主要受体, 是最重要的模式识别受体之一, 可以通过髓样分化蛋白 88 (MyD88) 通路激活核转录因子 κ B (NF- κ B), 启动 TNF- α 、IL-6、IL-8 等的释放^[12], 这样 TLR4 与 TNF- α 及 IL-6 形成正反馈的“级联放大”效应, 产生过度炎症反应。TLR4 在脓毒症相关 AKI 的发生发展中有重要作用。研究表明, TLR4 不仅表达于固有免疫细胞表面, 在肾脏远曲和近曲小管上皮细胞及肾血管内皮细胞上也有表达^[13]。Cunningham 等^[14]通过给 TLR4 基因突变小鼠注射 LPS 复制脓毒症模型发现, 相对于野鼠, TLR4 缺陷鼠肾功能有明显改善, TNF- α 的表达也明显下降。而在盲肠结扎穿孔致脓毒症模型中也发现 TLR4 在远曲和近曲小管上皮细胞、肾小球及肾血管内皮细胞上均表达增加^[15]。所以, TLR4 在肾脏的水平与肾脏损伤有很好的相关性。

本研究显示, 制模后 24 h 血清 TNF- α 和 IL-6 较制模后即刻明显升高, Nec-1 组血清 TNF- α 和 IL-6 含量明显减少, 提示 Nec-1 干预可以明显降低体内炎性介质的产生; DMSO 组和 Nec-1 组大鼠肾脏 TLR4 mRNA 的表达较 Sham 组明显升高。Nec-1 组肾脏组织 TLR4 表达较 Nec-1 组明显下降。其机制为: Nec-1 可以通过减少细胞的程序性坏死, 减少内源性 DAMPs 释放^[16], 从而阻断了 TNF- α 和 IL-6 与 TLR4 形成的正反馈循环, 而目前的研究已经证实, 一些经典的 DAMP 分子, 例如高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 可以通过细胞表面的 TLRs 受体来“放大”免疫反应^[17-18]。所以, 减少 DAMPs 的释放, 可以减少细胞进一步生成 TLR4, 从而限制了炎症进一步放大的可能。

综上所述, 脓毒症大鼠肾脏中伴有程序性坏死的产生, Nec-1 干预可有效保护肾脏细胞, 改善肾功能; 并能有效降低血清 TNF- α 和 IL-6 的含量, 降低肾脏组织 TLR4 mRNA 表达。这为临床治疗脓毒症伴 ARI 提供一种新的思路和方法。

参考文献

[1] Gotts JE, Matthay MA. Sepsis: pathophysiology and clinical

management [J]. BMJ, 2016, 353: i1585.

[2] Kakihana Y, Ito T, Nakahara M, et al. Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management [J]. J Intensive Care, 2016, 4: 22.

[3] Uchino S, et al. Acute Renal Failure in Critically Ill Patients: a multinational, multicenter study. [J]. JAMA, 2005, 294(7): 813-8.

[4] Degtarev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury [J]. Nature Chemical Biology, 2005, 1(2): 112-119.

[5] Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure [J]. The Lancet, 2005, 365(9457): 417-430.

[6] Wiersinga WJ, Leopold SJ, Cranendonk DR, et al. Host innate immune responses to sepsis [J]. Virulence, 2014, 5(1): 36-44.

[7] Akcay A, Nguyen Q, Edelstein CL. Mediators of inflammation in acute kidney injury [J]. Mediators Inflamm, 2009, 2009: 137072.

[8] Linkermann A, Green DR. Necroptosis [J]. The New England Journal of Medicine, 2014, 370(5): 455-465.

[9] 张立亚, 崔尧丽, 王兵, 等. 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 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26(1): 17-22.

[10] 樊凌华, 李振伟, 范铮, 等. 程序性坏死特异性抑制剂-1 对脓毒症大鼠 肝脏单核细胞趋化蛋白-1 表达的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28(3): 262-266.

[11] Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis [J]. Crit Care, 2007, 11(2): R49.

[12] Castoldi A, Braga TT, Correa-Costa M, et al. TLR2, TLR4 and the MYD88 signaling pathway are crucial for neutrophil migration in acute kidney injury induced by sepsis [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37584.

[13] Wolfs TG, Buurman WA, van Schadewijk A, et al. In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation [J]. J Immunol, 2002, 168(3): 1286-1293.

[14] Cunningham PN, Wang Y, Guo R, et al. Role of Toll-like receptor 4 in endotoxin-induced acute renal failure [J]. J Immunol, 2004, 172(4): 2629-2635.

[15] El-Achkar TM, Huang X, Plotkin Z, et al. Sepsis induces changes in the expression and distribution of Toll-like receptor 4 in the rat kidney [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2006, 290(5): F1034-1043.

[16] 范铮, 崔尧丽, 王兵, 等. Necrostatin-1 对创伤失血性休克大鼠肝脏 HMGB-1 表达的影响 [J]. 中华急诊医学杂志, 2016, 25(5): 580-585.

[17] Gouloupoulou S, McCarthy CG, Webb RC. Toll-like Receptors in the Vascular System: Sensing the Dangers Within [J]. Pharmacol Rev, 2016, 68(1): 142-167.

[18] Pahwa R, Jialal I. The role of the high-mobility group box1 protein-Toll like receptor pathway in diabetic vascular disease [J]. J Diabetes Complications, 2016, 30(6): 1186-1191.

(收稿日期: 2016-07-05)

(本文编辑: 邸美仙 李银平)

《腹部心肺复苏学》由人民军医出版社出版发行



武警总医院急救医学中心主任王立祥教授主编的《腹部心肺复苏学》由人民军医出版社出版发行, 全国各地新华书店均有售, 定价: 198.0 元 / 本, 购书服务电话: 4006-120-160。

《腹部心肺复苏学》是国内外第一部系统阐述腹部心肺复苏(CPR)的大型专著。第一篇全面论述了腹部 CPR 的概念、范畴、特征与途径, 深度解析了腹部 CPR 的解剖生理基础以及“腹泵”等参与复苏的“多泵机制”原理, 着重诠释了腹部提压 CPR 的研究与转化。第二篇系统归纳总结了腹部 CPR 的实验研究结果与临床实践案例。第三篇深刻揭示了 CPR 研究的现状、技术及趋势, 从整合医学的全新理念出发, 揭示腹部 CPR 的内在规律。本书内容翔实, 科学性强, 对于从事临床医学与基础医学的业界同仁具有重要的阅读价值。

· 书讯 ·

《热射病防治技术手册》由人民军医出版社出版发行

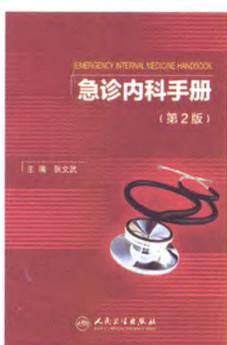


中国人民解放军第四〇一医院重症医学科李海玲教授组织主编的《热射病防治技术手册》由人民军医出版社出版发行, 全国各地新华书店均有售, 定价: 25.0 元 / 本。

《热射病防治技术手册》是一部热射病防治方面的工具书, 共 11 章约 17 万字。详细阐述了热射病的流行病学特点、发病原因、病理生理机制、临床表现、辅助检查、诊断、监测技术、现场急救与后送、治疗方案、预防与健康宣教、护理、预后及管理策略等。

本书内容简明实用, 指导性强, 可以作为基层部队卫生预防宣教、急救后送指导教材, 以及供二、三线医院救治热射病参考。

《急诊内科手册》第 2 版由人民卫生出版社出版发行



南方医科大学附属深圳宝安医院急诊医学科张文武教授组织主编的《急诊内科手册》第 2 版由人民卫生出版社出版发行, 全国各地新华书店均有售, 定价: 53.0 元 / 本。

本书是一部急诊内科学方面的工具书, 共 16 章约 83 万字。分别叙述了常见内科急症症状的诊断思路与处理原则, 休克、多器官功能障碍综合征、急性中毒、水电解质与酸碱平衡失调, 内科各系统疾病急诊的诊断与治疗措施等, 并较详细地介绍了内科常用急救诊疗技术。内容丰富, 资料新颖, 实用性强, 是急诊医师、内科医师和社区医师必备的工具书, 并可作为急诊医学教学和进修的参考读物。