

血必净注射液对烫伤大鼠高迁移率族蛋白 B1 的影响

唐 冰, 朱 斌, 朱家源, 毕良宽, 刘 阳

(中山大学附属第一医院烧伤外科, 广东 广州 510080)

【摘要】 目的: 观察血必净注射液对烫伤大鼠高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 变化规律的影响。方法: 采用大鼠 30% 总体表面积Ⅲ度烫伤模型。将 112 只大鼠随机分为假伤组 ($n=24$)、烫伤组 ($n=44$) 和血必净治疗组 ($n=44$)。血必净治疗组于烫伤后 0.5 h 腹腔注射血必净注射液 4 ml/kg, 每日 2 次, 连用 3 d。3 组各选择 24 只大鼠分别于伤后 1、3 和 7 d 活杀, 采用蛋白质免疫印迹法 (Western blotting) 检测血浆 HMGB1 水平; 同时取烫伤组和血必净治疗组余下的 20 只大鼠用于观察死亡率。结果: 与假伤组比较, 大鼠烫伤后 1、3 和 7 d 血浆 HMGB1 水平均显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与烫伤组比较, 血必净注射液治疗后不同时间点血浆 HMGB1 表达显著下调 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 但仍稍高于假伤组。早期给予血必净注射液治疗, 大鼠 3 d 和 7 d 的死亡率显著低于未治疗的烫伤组 (P 均 <0.05)。结论: 血必净注射液能显著抑制晚期致炎因子 HMGB1, 对严重烫伤具有潜在的治疗作用。

【关键词】 血必净注射液; 烧伤; 高迁移率族蛋白 B1; 死亡率

中图分类号: R285.5; R644 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)02-0111-03

Effects of Xuebijing injection (血必净注射液) on plasma high mobility group box 1 protein in rats after severe scald injury TANG Bing, ZHU Bin, ZHU Jia-yuan, BI Liang-kuan, LIU Yang. Department of Burn Surgery, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China
Corresponding author: ZHU Jia-yuan (Email: zhujiayuan@163.net)

【Abstract】 Objective: To investigate the effects of Xuebijing injection (血必净注射液) on plasma high mobility group box 1 (HMGB1) protein levels in rats after severe scald injury. **Methods:** One hundred and twelve Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: sham scald ($n=24$), scald injury ($n=44$), and Xuebijing injection treatment ($n=44$). Scald injury model of rat was reproduced by a 30% total body surface area (TBSA) full-thickness scald injury. The rats in Xuebijing injection group were injected with Xuebijing injection (4 ml/kg) intraperitoneally 0.5 hour after scald injury, twice per day for 3 days. And 24 rats were sacrificed on the 1st, 3rd and 7th day after scald injury. The concentration of HMGB1 protein in plasma was assessed by Western blotting. Additional experiment was performed to observe the effects of Xuebijing injection on the mortality in burned rats ($n=20$). **Results:** Plasma HMGB1 protein levels were increased obviously on the 1st, 3rd and 7th day after scald compared to those in sham scald group ($P<0.05$ or $P<0.01$). The HMGB1 protein levels were markedly reduced in Xuebijing injection treatment group at different time points after scald injury ($P<0.05$ or $P<0.01$), but they were slightly higher than those in sham scald group. Furthermore, the treatment with Xuebijing injection could significantly decrease the rat mortality on the 3rd and 7th day in comparison with the scald rats without any treatment (both $P<0.05$). **Conclusion:** This study shows that Xuebijing injection could markedly inhibit plasma HMGB1 protein levels, and might have therapeutic potential for severe burns.

【Key words】 Xuebijing injection; burn; high mobility group box 1 protein; mortality

烧伤引起的脓毒症及多器官功能障碍综合征 (MODS) 是造成死亡的主要原因之一^[1]。目前研究发现, 脂多糖 (LPS) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 (IL-1) 等炎症细胞因子可刺激机体产生高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1), HMGB1 可能

通讯作者: 朱家源, 教授, 博士生导师 (Email: zhujiayuan@

163.net)

作者简介: 唐 冰 (1972-), 男 (汉族), 湖南省人, 医学硕士, 讲师, 主治医师。

作为一种晚期炎症介质参与致死性全身炎症反应和脓毒症的病理生理过程^[2]。有资料显示, 血必净注射液能降低内毒素水平, 对早期炎症细胞因子 IL-6 及 TNF- α 有明显下调作用^[3], 本研究拟采用Ⅲ度烫伤脓毒症大鼠模型, 观察其是否对晚期炎症介质 HMGB1 具有拮抗作用。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与模型制备方法^[4]: 雄性 SD 大鼠

(中山大学北校区实验动物中心提供), 体重 200~250 g。给大鼠称重、编号, 禁食 12 h, 用质量分数为 3% 的戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 刮除背部及侧胸部毛, 浸于 (99.0±0.5) °C 沸水中 12 s, 造成 30% TBSA III 度烫伤, 创面涂以体积分数为 2% 的碘酒抗感染 (每日 2 次), 伤后立即腹腔注射生理盐水 (50 ml/kg) 抗休克, 麻醉苏醒后单笼饲养。假烫伤动物浸于 37 °C 温水中 12 s, 其余处理同上。

1.2 实验动物分组: 将 112 只大鼠按照随机数字表法分为假伤组 ($n=24$)、烫伤组 ($n=44$) 和血必净治疗组 ($n=44$)。血必净治疗组于伤后 0.5 h 腹腔注射 4 ml/kg 血必净注射液 (天津红日药业股份有限公司产品), 每日 2 次, 共 3 d。3 组各选择 24 只大鼠, 于伤后 1、3 和 7 d 各时间点均活杀 8 只。血必净治疗组和烫伤组余下的各 20 只大鼠于伤后 1、3 和 7 d 观察死亡率。

1.3 血浆 HMGB1 的检测: 用蛋白质免疫印迹法 (Western blotting) 检测血浆 HMGB1 含量。一抗由 Santa Cruz 公司提供山羊抗 HMGB1 多克隆抗体, 二抗由 Sigma 公司提供的抗山羊免疫球蛋白 G-辣根过氧化物酶 (IgG-HRP), 按试剂盒说明书的操作步骤进行。血浆中加入蛋白提取液, 12 000 r/min (离心半径 9.2 cm) 离心 20 min。取上清液, 采用 BCA 蛋白测定试剂盒 (美国 Bio-Rad) 测定蛋白质浓度; 再将提取的蛋白等量加样, 经质量分数为 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、转膜, 用含质量分数为 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 的血清封闭液 (TBST) 室温封闭 1 h, 然后依次加入山羊抗 HMGB1 多克隆抗体、羊抗大鼠磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 多克隆抗体, 4 °C 孵育过夜, HRP 标记的 IgG 二抗 37 °C 孵育 1 h, 洗膜后显色, 用凝胶成像和化学发光图像分析系统 (美国 Alpha Innotech 公司) 扫描分析结果。

1.4 统计学处理: 实验数据以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS12.0 统计软件包进行 t 检验、 χ^2 检验及相关分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血必净注射液对烫伤大鼠血浆 HMGB1 水平的影响 (表 1): 与假伤组相比, 烫伤组 1、3 和 7 d 血浆 HMGB1 水平均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 血必净注射液治疗后, 血浆 HMGB1 水平虽仍高于假伤组 ($P < 0.05$), 但与烫伤组相比, 血必净治疗组 1、3 和 7 d 血浆 HMGB1 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 血必净注射液对烫伤大鼠血浆 HMGB1 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=24$)

Table 1 Effect of Xuebijing injection on plasma HMGB1 in rats after scald injury ($\bar{x} \pm s, n=24$)

组别	伤后 1 d	伤后 3 d	伤后 7 d
假伤组	0.23±0.11	0.20±0.13	0.20±0.09
烫伤组	1.04±0.37**	0.92±0.38**	0.45±0.20*
血必净治疗组	0.65±0.28* $\Delta\Delta$	0.53±0.24* $\Delta\Delta$	0.28±0.14 Δ

注: 与假伤组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与烫伤组比较:

$\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 血必净注射液对烫伤大鼠死亡率的影响 (表 2): 烫伤后 1 d 两组动物死亡率比较差异无显著性 ($\chi^2_{1d} = 2.50, P > 0.05$); 烫伤后 3 d 和 7 d, 血必净治疗组动物死亡率显著低于烫伤组 ($\chi^2_{3d} = 4.91, \chi^2_{7d} = 4.80, P$ 均 < 0.05)。

表 2 血必净注射液对烫伤大鼠死亡率的影响 ($n=20$)

Table 2 Effect of Xuebijing injection on mortality in rats after scald injury ($n=20$) 只 (%)

组别	伤后 1 d	伤后 3 d	伤后 7 d
烫伤组	6(30)	13(65)	18(90)
血必净治疗组	2(10)	6(30) Δ	12(60) Δ

注: 与烫伤组比较: $\Delta P < 0.05$

3 讨论

脓毒症和 MODS 是严重烧伤的常见并发症, 是烧伤死亡的主要原因之一。烧伤引发全身炎症反应综合征 (SIRS) 时, 机体免疫系统被过度激活, 免疫细胞释放促炎细胞因子, 进而启动多种生物级联反应, 包括炎症反应过程 (各种细胞因子、趋化因子等参与)、凝血纤溶系统改变以及细胞存活/死亡平衡关系的变化等^[5], 其中过度炎症反应较早发生, 且在脓毒症致病过程中占据重要地位。最近研究认为, HMGB1 可能是脓毒症致死效应的重要晚期炎症介质, 现已证实, HMGB1 在严重烧伤、烫伤后金黄色葡萄球菌感染及盲肠结扎穿孔等脓毒症动物模型的发病机制中具有重要作用^[6,7]。在本研究中, 烫伤大鼠伤后 1 d 血浆 HMGB1 水平明显升高, 达到峰值, 此后逐渐降低, 伤后 7 d 仍维持较高水平; 应用血必净注射液治疗后, 血浆 HMGB1 明显降低。实验结果进一步证实 HMGB1 与严重烫伤模型动物的致病机制有着密切联系, 也显示血必净注射液能够下调晚期炎症因子 HMGB1 水平, 对脓毒症具有保护效应。

血必净注射液是由赤芍、川芎、丹参、红花和当归等 5 味中药组成的, 具有活血化瘀、清热凉血、溃散毒邪功效的复方中药制剂, 具有对抗细菌毒素、降低内毒素水平、调节免疫功能、抑制多种炎症介质释

放、清除氧自由基、改善休克时的微循环状态、保护血管内皮细胞等作用。本研究结果显示,血必净注射液早期治疗可显著降低烫伤大鼠伤后 1、3 和 7 d 的晚期炎症介质 HMGB1 水平;同时观察到 3 d 和 7 d 烫伤大鼠死亡率也显著低于烫伤组,但伤后 1 d 大鼠死亡率差异无显著性。提示血必净注射液通过拮抗 HMGB1 水平,对烫伤大鼠产生保护作用,降低了死亡率。

动物实验表明,血必净注射液能明显下调 MODS 大鼠的血清 IL-6 及 TNF- α 水平^[3];对 MODS 大鼠组织及内皮细胞损伤具有明显保护作用,且高剂量的作用更强^[8];并且能明显降低严重烧伤延迟复苏大鼠的死亡率,对重要器官具有保护作用^[4]。临床研究也证实,加用血必净注射液可显著降低多发性创伤合并 MODS 患者的炎症介质释放,降低病死率^[9]。本研究结果显示,血必净注射液对烫伤大鼠晚期炎症介质 HMGB1 同样具有拮抗作用,能下调血浆 HMGB1 水平,表明在烫伤模型大鼠中,血必净注射液可能具有降低其早期及晚期炎症细胞因子的双重效应。目前研究证实,内毒素、TNF- α 、IL-1 及 γ -干扰素能特异性刺激 HMGB1 的产生^[10],因此我们推测,血必净注射液对 HMGB1 的下调作用可能部分与抑制早期炎症细胞因子水平有关,但是具体的作用机制有待进一步研究。

脓毒症作为感染引起的致死性炎症反应,尽管人们针对其发病机制采取了积极、合理的治疗措施,但其较高的发病率与病死率一直无法得到有效控制,而目前在临床上没有一种抗炎症因子治疗是确切有效的。由于脓毒症发生时致炎细胞因子复杂多样,交织成网络,相互影响、诱生,形成一个复杂的细胞因子分泌调节网络,针对某种致炎因子单一阻断的治疗措施往往流于失败,需要综合治疗以阻滞过多重叠的炎症级联反应^[11,12]。中医中药具有多靶

向、多位点干预的特点,在脓毒症的防治上,越来越显示其具有独特的作用,日益受到人们的关注^[13]。虽然血必净注射液对 HMGB1 抑制的确切分子机制仍不甚清楚,但本实验已初步表明,在烫伤大鼠脓毒症模型中其能有效抑制血浆 HMGB1 水平,并显著改善动物预后,在脓毒症发病后有较长“治疗窗”,无潜在的免疫反应及细胞毒性。这些优点显示其在烧伤、创伤、感染等引起的脓毒症中具有较好的应用前景。

参考文献:

- [1]王正国. 脓毒症研究概况[J]. 中华创伤杂志, 2003, 19(1): 5-8.
- [2]姚咏明, 刘辉. 对高迁移率族蛋白 B1 作用的新认识[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(7): 385-387.
- [3]曹书华, 高红梅, 王永强, 等. “神农 33 号”对多器官功能障碍综合征大鼠细胞因子的影响[J]. 中华急诊医学杂志, 2003, 12(2): 94-96.
- [4]王文江, 姚咏明, 威力明, 等. 血必净注射液对烧伤延迟复苏大鼠器官功能及死亡率的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(1): 16-18.
- [5]Pugin J. Sepsis and the immune response [J]. Intensive Care Med, 1999, 25(9): 1027-1028.
- [6]Andersson U, Tracey K J. HMGB1 in sepsis [J]. Scand J Infect Dis, 2003, 35(9): 577-584.
- [7]Wang H, Yang H, Tracey K J. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis [J]. J Intern Med, 2004, 255(3): 320-331.
- [8]曹书华, 王今达. 血必净对感染性多器官功能障碍综合征大鼠组织及内皮损伤保护作用的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(8): 489-491.
- [9]梁显泉, 李志军, 刘红栓, 等. 血必净注射液治疗脓毒症 42 例[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(4): 251-252.
- [10]Rendon-Mitchell B, Ochani M, Li J, et al. IFN- γ induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism [J]. J Immunol, 2003, 170(7): 3890-3897.
- [11]李春盛. 关于脓毒症的几个问题[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(6): 323-328.
- [12]胡森, 高飞. 中医药防治多器官功能障碍综合征回顾与展望[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8(6): 323-325.
- [13]盛志勇. 努力提高脓毒症的认识水平[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(3): 131.

(收稿日期: 2006-12-30 修回日期: 2007-02-20)

(本文编辑: 李银平)

• 消息 •

国际血瘀证及活血化瘀研究学术大会暨中西医结合防治循环系统疾病高层论坛征文通知

血瘀证及活血化瘀研究是中医、中西医结合研究中最活跃、最富有成果的领域之一。循环系统疾病已经成为世界范围内危害人类健康的重大疾病, 鉴于活血化瘀在防治循环系统疾病中的重要地位, 为进一步推动血瘀证及活血化瘀的深入研究, 加强国际学术交流, 经中国科协和中国中西医结合学会批准, 活血化瘀专业委员会拟于 2007 年 8 月在哈尔滨市举办“国际血瘀证及活血化瘀研究学术大会、中西医结合防治循环系统疾病高层论坛”, 同时举办活血化瘀专业委员会继续医学教育班。届时将邀请国内外知名专家和院士, 结合循环系统疾病的防治, 就血瘀证及活血化瘀研究的新成果、新理论、新方法作讲演。

大会主题: ①中西医结合防治心脑血管病研究; ②中西医结合防治其他血管源性疾病; ③中西医结合防治微循环疾病; ④血瘀证诊断标准的研讨; ⑤活血化瘀方药(包括注射剂)的临床应用及研发; ⑥血瘀证相关的其他临床及基础研究。

征文要求: ①来稿请寄全文及 1 000 字以内摘要各 1 份, 请附软盘或用电子邮件发送; ②请自留底稿, 恕不退稿; ③截止日期: 2007 年 6 月 30 日; ④来稿请寄: 北京市中日友好医院全国中西医结合心血管病中心邮编: 100029。

联系方法: 联系人: 刘燕; 联系电话: 010-84205043 或 84205053; 传真: 010-64284945; Email: shizaixiang@163.com
(中国中西医结合学会)