

血必净注射液对脓毒症大鼠基因调控的影响

李志军¹, 李银平², 盖慧荣³, 胡顺鹏³, 王晓飞³, 薛永来⁴, 冯喜增⁴

(1. 天津第一中心医院, 天津 300192; 2. 天津市天和医院, 天津 300050;

3. 天津中医药大学; 4. 南开大学生命科学院分子生物学研究所生物活性材料教育部重点实验室)

【摘要】 目的: 在基因水平探讨血必净注射液对脓毒症大鼠肝脏保护作用的机制。方法: 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症模型。选择 140 只 Wistar 大鼠, 其中 60 只随机均分为血必净治疗组和模型组, 观察术后 48 h 和 72 h 的存活率; 另 80 只按随机数字表法分为正常组、假手术组、模型组和血必净治疗组。透射电镜观察术后 24 h 肝脏病理学改变。采用含有 4 096 条大鼠基因 cDNA 克隆的表达谱基因芯片, 检测并分析脓毒症大鼠经血必净注射液治疗后 24 h 肝组织的基因表达变化, 并以计算机软件筛选出差异表达的基因。结果: 与模型组比较, 血必净治疗组大鼠 48 h 和 72 h 存活率显著升高, 且血必净注射液有延长存活时间的作用 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。24 h 血必净治疗组肝脏病理学损伤改变明显减轻。在 4 096 条基因中, 有差异表达的基因 122 条, 下调基因主要涉及神经细胞与神经传导、细胞信号转导、各种基本生物化学物质代谢酶类基因、能量代谢相关基因; 上调基因主要涉及细胞骨架与运动类蛋白、细胞周期调控、各种基本生物化学物质代谢酶类基因以及能量代谢相关基因。结论: 血必净注射液能延长脓毒症大鼠的存活时间, 并具有肝脏保护效应, 其作用环节可能涉及物质代谢、脂类代谢基因、免疫、细胞信号转导等多方面。

【关键词】 脓毒症; 盲肠结扎穿孔孔模型; 血必净注射液; 肝脏; 基因芯片

中图分类号: R285.5; R631 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2007)04-0233-05

Effect of Xuebijing injection (血必净注射液) on regulation of gene in rats with sepsis LI Zhi-jun¹, LI Yin-ping², GAI Hui-rong³, HU Shun-peng³, WANG Xiao-fei³, XUE Yong-lai⁴, FENG Xi-zeng⁴. 1. The First General Hospital, Tianjin 300192, China; 2. Tianjin Tianhe Hospital, Tianjin 300050, China; 3. Tianjin Traditional Chinese Medicine University, Tianjin 300193, China; 4. The Key Laboratory of Bioactive Materials, Ministry of Education, China, Institute for Molecular Biology, College of life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China

【Abstract】 Objective: To investigate the mechanism of Xuebijing injection (XBJI) in protection of liver in rats with sepsis on gene level. **Methods:** According to cecum ligation perforation (CLP) method, the sepsis model was prepared. One hundred and forty Wistar rats were selected; among them 60 rats were randomly divided into a model group and a XBJI treatment group, and the survival rates at postoperative 48 hours and 72 hours were observed; the other 80 rats were randomly divided into 4 groups as follows: sham operation group, normal control group, model group and XBJI treatment group to observe pathobiological changes of liver postoperative 24 hours through transmission electron microscope. After rat was treated by XBJI, adopted was expression spectra gene array which contains 4 096 rat gene cDNA, to detect and analyze the variation of gene expression of hepatic tissue in rats with sepsis at postoperative 24 hours, and to sieve genes that had differential expressions by means of a computer. **Results:** Compared with the model group, the survival rates of the rats in XBJI therapy group at 48 hours and 72 hours were notably raised ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The liver pathobiological injury of XBJI therapy group obviously was relieved at 24 hours. There were 122 genes that had differential expressions out all of 4 096 genes. Down-regulation genes mainly referred to nerve cell and nerve conduction, cell signal transduction, various kinds of metabolic enzyme genes of basic biochemistry materials, energy metabolism related genes. Up-regulation genes mainly contained cytoskeleton and motion protein, cell cycle control, various kinds of metabolic enzymes genes of basic biochemistry materials, energy metabolism related genes. **Conclusion:** XBJI can obviously prolong the survival time of rat with sepsis and has a protective effect on liver, and the effect link may refer to substance metabolism, lipid metabolism gene, immunization, cell signal transduction and so on.

【Key words】 sepsis; model of cecum ligation perforation; Xuebijing injection; liver; gene array

脓毒症急性肝损伤可发生在脓毒症的任何阶段,肝功能不全是脓毒症发展为多器官功能衰竭(MOF)的标志之一^[1,2]。如何早期干预脓毒症急性肝损伤,保护肝功能,防止其形成不可逆的病理损害,关系到脓毒症的治疗全局。血必净注射液防治脓毒症多器官功能障碍综合征(MODS)的疗效已得到公认,其作用机制的研究多在于炎症介质、凝血等方面^[3-5],而涉及基因水平的研究较少。我们的前期研究已经发现了脓毒症大鼠肝脏基因表达特点^[6]。本研究采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备大鼠脓毒症模型,观察血必净注射液对脓毒症大鼠的肝脏保护效应,以期临床脓毒症并发急性肝损伤的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备及分组:清洁级雄性 Wistar 大鼠 140 只,体重 220~260 g,购自中国医学科学院实验动物繁育场,适应性饲养 1 周。实验前禁食过夜,自由饮水。按照 Chaudry 等^[7]介绍的方法进行改良,采用 CLP 制备大鼠脓毒症模型。术后立即皮下注射生理盐水 10 ml 以补充术中丢失的体液并抗休克治疗。术后正常饮食,自由饮水。

1.2 生存率实验:将 60 只大鼠按随机数字表法分为两组。血必净治疗组($n=30$)制模前连续 3 d 腹腔注射血必净注射液(由天津市红日药业股份有限公司提供)10 ml/kg,每日 2 次;制模后每 12 h 给予血必净注射液 10 ml/kg。模型组($n=30$)腹腔给予生理盐水 10 ml/kg,给药方式与血必净治疗组相同。记录术后 48 h 和 72 h 的大鼠存活率。

1.3 脏器功能保护实验:另选择 80 只大鼠,按随机数字表法分组:正常组($n=8$)断颈活杀;假手术组($n=8$)术后 24 h 断颈活杀;血必净治疗组($n=32$)给药方式同前,于 24 h 后断颈活杀;模型组($n=32$)腹腔给予生理盐水,给药方式与血必净治疗组同,术后 24 h 断颈活杀。

1.4 电镜观察:取大鼠厚约 1.5 mm 的肝脏,浸入体积分数为 2.5% 的戊二醛溶液和 1% 的四氧化锇溶液中双固定,经乙醇梯度脱水,树脂包埋,超薄切片后,进行透射电镜观察。

1.5 基因芯片杂交及检测分析:无菌条件下取右上叶肝组织,分别于电镜固定液及液氮中保存备用。按文献^[6]介绍的方法进行基因芯片杂交及检测。

2 结果

2.1 两组大鼠存活率比较(表 1):脓毒症大鼠制模成功后出现精神萎靡,活动困难,对刺激反应迟钝,

被毛蓬松少光泽,进食减少,腹泻。在术后 6 h 开始死亡,72 h 左右腹泻停止,进食增加者可能存活。血必净治疗组大鼠情况较模型组轻,毛发较光整,呼吸渐趋平稳,活动增多,食量增加,腹泻少。两组 48 h 和 72 h 存活率比较差异均有显著性($P<0.01$ 和 $P<0.05$);且血必净治疗组大鼠存活时间明显延长($P<0.05$)。

表 1 两组大鼠存活时间及 48 h 和 72 h 存活率比较

Table 1 Comparison of survival time and survival rate at 48 and 72 hours between two groups

组别	动物数 (只)	存活时间 ($\bar{x}\pm s, h$)	48 h 存活 [只(%)]	72 h 存活 [只(%)]
模型组	30	38.93±44.86	10(33.33)	6(20.00)
血必净治疗组	30	62.68±57.67*	21(70.00)**	18(60.00)*

注:与模型组比较:* $P<0.05$,** $P<0.01$

2.2 血必净注射液对脓毒症大鼠的器官保护作用:制模 24 h 后取部分肝组织进行电镜检查,结果显示:正常组肝细胞核位于中央、呈圆形,有明显核仁,染色质均匀;胞质中线粒体丰富,粗面内质网较发达,成群分布,间隙中可见部分糖原。假手术组肝细胞器可见线粒体、粗面内质网微体及较丰富的糖原,其中线粒体欠清晰,可能是实验性缺血所致。模型组肝细胞器变性,粗面内质网和糖原明显减少,大量脂质,胞膜不清晰,肝窦壁结构不清,内皮细胞凝聚变性,窦间隙消失,胞质内线粒体膜和嵴均不清晰,基质增多,并可见不定性包涵物。粗面内质网断裂失去正常结构,糖原消失;提示模型制备成功。血必净治疗组线粒体膜和嵴尚可分辨,部分线粒体内有少量不定形絮状物,核旁粗面内质网成群分布,线粒体旁粗面内质网断裂,糖原消失,肝窦水肿、窦壁内皮细胞菲薄、窦间隙缩窄、肝细胞窦面微绒毛杂乱无序,肝窦内见有游离的库普弗细胞及变形红细胞,有少量脂质,与模型组比较肝细胞器有改善,脂质明显减少。

2.3 血必净治疗组与模型组基因芯片杂交结果:基因芯片双色荧光标记叠加图(彩色插页图 1)显示,对于某一点的两种叠加荧光信号,如果 Cy3 信号较强,该点多显绿色,属下调趋势;如果 Cy5 信号较强,该点多显红色,属上调趋势;如果强度相似,即显黄色。杂交信号强度散点图结果(彩色插页图 2)显示, X 轴、Y 轴分别以 Cy3 荧光强度值(前景值-背景值)和 Cy5 荧光强度值为坐标,每个数据点代表芯片上一个基因点的杂交信号;数据点若为红色,则代表 Cy5/Cy3 比值在 0.5~2.0 之间,基本属非差异表达;数据点若为黄色,则代表 Cy5/Cy3 比值在

0.5~2.0 范围之外(该点很可能属于表达差异)。

2.4 基因芯片表达谱差异分析结果(表 2~4):在 4 096 条基因中,有差异表达的基因 122 条,其中上调基因 68 条,下调基因 54 条。血必净治疗组有 89 条新基因表达发生了变化,另外 33 条基因在模型组与正常组中同样也发生变化,有 8 条基因表达量发生了回归,即在模型组与正常组中下调的在血必净治疗组与模型组中都上调,或者在模型组与正常组中上调的在血必净治疗组与模型组中却下调。

表 2 血必净治疗组中 30 条表达下调的基因

Table 2 Thirty genes that down-regulation expression in Xuebijing treatment group

基因序号	基因名称	基因功能分类
XM_576138	PREDICTED:褐鼠类载脂蛋白 F,信使核糖核酸	载脂蛋白
XM_237521	PREDICTED:褐鼠类脂 2,信使核糖核酸	脂类代谢
XM_227765	PREDICTED:褐鼠类甘油三酯转移蛋白,信使核糖核酸	脂类代谢
BC088168	褐鼠类载脂蛋白 F	载脂蛋白
X96721	褐鼠类 P450 Ⅱ A23 蛋白质信使核糖核酸	能量代谢
BC089790	褐鼠细胞色素 P450,多肽 40	能量代谢
XM_215769	PREDICTED:褐鼠线粒体的同系物载体	线粒体载体
BC060565	褐鼠酰辅酶 A 水解酶 1	物质代谢
D85100	褐鼠长链酰辅酶 A 合成酶的信使核糖核酸	脂肪代谢
XM_575020	PREDICTED:褐鼠胰腺淀粉酶 2	物质代谢
BC072472	褐鼠类固醇脱氢酶 4 信使核糖核酸	物质代谢
AF182426	褐鼠脱乙酰基酶信使核糖核酸	物质代谢
BC081819	褐鼠 4-羟基苯丙酮酸信使核糖核酸	物质代谢
M93401	褐鼠甲基丙二酸半醛脱氢酶	物质代谢
BC061533	褐鼠卅甲基转移酶	物质代谢
NM_022521	褐鼠鸟氨酸转氨酶	物质代谢
BC072468	褐鼠 1A 硫疏转移酶	物质代谢
BC062042	褐鼠补体成分 1	免疫
BC088254	褐鼠免疫球蛋白重链 1a	免疫球蛋白
NM_031561	褐鼠 cd36 抗原	免疫
XM_573983	PREDICTED:褐鼠转化生长因子	转化生长因子
XM_214175	PREDICTED:褐鼠染色体 14 开放读码框 21	核酸代谢
BC092639	褐鼠 p300/糖结合蛋白关联因子	转录辅因子
L23413	褐鼠硫酸根运载体信使核糖核酸	运输蛋白
XM_343054	PREDICTED:褐鼠跨膜蛋白	跨膜蛋白
V01234	褐鼠弹性蛋白酶原	弹性蛋白酶原
AB108671	鼠肾切除后下调基因	肾相关
AF156540	褐鼠 2-羧基丙酰甘氨酸信使核糖核酸	肾相关
BC090021	褐鼠反向转录脱氧核糖核酸 2310001A20	神经相关

表 3 血必净治疗组中部分表达上调的基因

Table 3 Part genes that up-regulation expression in Xuebijing treatment group

基因序号	基因名称	基因功能分类
AF245040	褐鼠 II 5'-脱碘酶底物结合单位	脱碘酶
L03294	褐鼠脂蛋白酶	脂肪酶
XM_232466	PREDICTED:褐鼠低密度脂蛋白相关蛋白 6	脂类代谢
XM_342048	PREDICTED:褐鼠二氢吡咯-5-羧酸还原酶合成酶	物质代谢
U11038	褐鼠赖氨酸氧化酶细胞转化信使核糖核酸	物质代谢
BC081833	褐鼠甲丙氨酸	基质降解酶
XM_213618	PREDICTED:褐鼠尿苷酸合成酶	核苷酸代谢
AF121265	褐鼠 β 连环蛋白	信号通路
XM_213783	PREDICTED:褐鼠细胞周期调控蛋白	细胞周期调控
XM_573664	PREDICTED:信号转导相关蛋白	信号转导
XM_343823	PREDICTED:丝氨酸蛋白酶抑制剂	调节蛋白
BC087019	真核生物翻译起始因子 2	翻译因子
XM_221709	PREDICTED:连接蛋白	连接蛋白
BC085812	褐鼠神经前体细胞(下调基因)	神经信号转导
XM_235547	PREDICTED:神经相关	神经相关
AB070355	褐鼠驱动蛋白 1Bp204	驱动蛋白
AY310138	褐鼠阿糖胞苷 1055	肝再生相关
AB105879	褐鼠干细胞因子 KL-2	干细胞因子
BC085937	褐鼠锌指蛋白 655	锌指蛋白

表 4 大鼠肝组织中 8 条回归基因

Table 4 Eight recurrence genes in liver tissue of rat

基因序号	基因名称	基因功能分类
BE118638	信使核糖核酸序列	未知
U07201	褐鼠天冬酰胺合成酶	氨基酸代谢
BG374765	信使核糖核酸序列	未知
AB009686	褐鼠固醇 12α 羟化酶 p450 的环磷酸腺苷 8B 信使核糖核酸	脂类代谢
BC079135	褐鼠反向转录脱氧核糖核酸	神经相关
AF208125	褐鼠绒毛促性素-长链调节脂酰辅酶 A 合成酶	物质代谢
X14552	唾液腺球蛋白信使核糖核酸	物质代谢
BC079125	褐鼠核黄素激酶	物质代谢

板、凝血、纤溶及体内抗凝系统功能失调,血液处于高凝状态,纤维蛋白大量沉积,微血管内凝血,导致各系统器官功能障碍或功能衰竭^[10-12]。脓毒症主要是由凝血活化、炎症反应及纤溶抑制相互作用形成的级联反应过程,其中凝血活化是脓毒症的重要环节^[5,13],如此反复作用,必然导致恶性循环。如何打破这种恶性循环,现代医学主要从凝血/抗凝角度出发;中医学则从活血化瘀角度出发。Bernard 等^[14]先后完成了人类重组活化蛋白 C(rhAPC)治疗脓毒症的Ⅱ、Ⅲ期临床研究,2001 年美国食品与药品监督管理局(FDA)批准使用 rhAPC 的Ⅳ期临床研究,用于治疗成人脓毒症。临床及实验研究证实活血化瘀法不仅具有改善凝血/抗凝失衡的作用,抑制有害的血管活性介质释放,还能阻断不同病因及不同病机的凝血功能紊乱触发因素,在凝血功能紊乱不同阶段发挥有益的作用^[15]。

3 讨论

脓毒症发病机制复杂,临床救治十分困难。虽然近年来器官支持、容量复苏、胰岛素应用和重组活化蛋白 C(APC)治疗的实验研究显示出很好的势头,但现在临床仍缺乏有效治疗方法^[8]。本院长期以来依据“三证三法”治疗脓毒症观点^[9],采用中西医结合方法治疗大量脓毒症患者,取得了较好的效果。

有研究显示,脓毒症病理生理过程为促炎/抗炎因子失控性释放,导致机体血管内皮细胞损伤,血小

血必净注射液的主要有效成分包括红花黄色素 A、川芎嗪、丹参素、阿魏酸、芍药苷、原儿茶醛。文献报道,血必净注射液能在体内外有效拮抗内毒素,抑制体内多种炎症介质的病理生理作用,恢复受到抑制的免疫反应^[3,16],对应激性脏器损伤具有良好的保护作用^[17],并通过保护血管内皮细胞,改善内毒素引起的大鼠器官超微结构损伤^[4]。在小鼠菌血症模型中,抗生素联合血必净注射液治疗可显著提高动物的存活率^[3]。在本组实验中,脓毒症动物模型使用血必净注射液治疗后,术后 48 h 和 72 h 生存率明显提高,并能改善 24 h 肝脏病理学改变,说明血必净注射液对脓毒症有一定的器官保护作用。

动物实验与临床观察提示,机体炎症反应失控所致脓毒性休克、MODS 不仅与细胞因子等炎症介质过度表达、分泌有关,也与体内免疫功能障碍有密切关系。Hotchkiss 等^[18]的研究发现,脓毒症患者发病初始阶段就有明显的 T 细胞免疫功能抑制现象,为脓毒症存在原发性低免疫反应提供了理论证据。有文献报道,大手术后并发脓毒症与患者外周血单个核细胞产生促炎/抗炎细胞因子功能缺陷有关,脓毒症患者能否生存与炎症反应而不是抗炎反应的恢复相关^[19]。另有报道显示,内毒素攻击后动物循环血中白细胞介素-4(IL-4)、IL-10 以及转化生长因子- β 1(TGF- β 1)等抗炎因子均显著增加,这可能与维持机体防御机制、防止致炎因子产生有害作用有关^[20]。

在基因表达方面,与模型组比较,血必净治疗组有 89 条新基因的表达发生了变化,另外 33 条基因在模型组与正常组的比较中同样也发生了变化。下调基因主要涉及神经细胞与神经传导、细胞信号转导、DNA 结合转录和转录调节因子、细胞骨架与运动类蛋白、离子通道与运输蛋白、免疫相关基因、各种基本生物化学物质代谢酶类(包括核苷酸、氨基酸、脂类等)基因、能量代谢相关基因。上调基因主要涉及神经细胞与神经传导、细胞信号转导、细胞骨架与运动类蛋白、细胞周期调控、各种基本生物化学物质代谢酶类(包括核苷酸、氨基酸、脂类等)基因、能量代谢相关基因、生长因子类基因。33 条基因中有 8 条基因表达量发生了回归,我们能看见一些物质代谢和脂类代谢基因恢复正常,说明血必净注射液可能是通过此类机制达到治疗效果的。

总之,应用基因芯片可快速找到药物作用的靶基因。血必净注射液对肝脏的影响是多环节、多层次、多靶点综合作用的结果,这与中医理论的整体观

是一致的,其更深层次的作用机制尚需采用其他分子生物学技术进一步研究。

参考文献:

- [1] Wang P, Chaudry I H. Mechanism of hepatocellular dysfunction during hyperdynamic sepsis [J]. *Am J Physiol*, 1996, 270 (5 pt 2):927-938.
- [2] Cohen J J, Duke R C, Fadok V A, et al. Apoptosis and programmed cell death in immunity [J]. *Ann Rev Immunol*, 1992, 10(2):267-293.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 李银平, 乔佑杰, 武子霞, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠组织肿瘤坏死因子- α 及凝血功能的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2007, 14(2):104-107.
- [6] 李志军, 李银平, 盖慧荣, 等. 脓毒症大鼠肝组织基因表达的研究 [J]. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(3):156-159.
- [7] Chaudry I H, Wichterman K A, Baue A E. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels [J]. *Surgery*, 1979, 85 (2):205-211.
- [8] 林洪远, 盛志勇. 脓毒症免疫调理治疗的新思路 [J]. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(2):67-69.
- [9] 王今达, 李志军, 李银平. 从“三证三法”辩证论治脓毒症 [J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(11):643-644.
- [10] 袁修学, 张天明. 凝血抑制剂替代疗法: 治疗脓毒症的新突破 [J]. *内科急危重症杂志*, 2002, 8(1):46-48.
- [11] 陶晓根, 承韶辉, 赵劲松, 等. 蛋白 C 系统与脓毒症 [J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15(1):53-55.
- [12] Scherer R U, Spangenberg P. Procoagulant activity in patients with isolated severe head trauma [J]. *Crit Care Med*, 1998, 26 (1):149-156.
- [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.
- [14] Bernard G R, Vincent J L, Laterre P F, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis [J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(10):699-709.
- [15] 李银平. 从“三证三法”看中西医结合治疗危重病的研究思路——王今达教授学术思想探讨 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2004, 11(1):7-9.
- [16] 张畔, 曹书华, 崔克亮, 等. 血必净对多脏器功能障碍综合征单核细胞 HLA-DR 表达影响的研究 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2002, 9(1):21-23.
- [17] 李志军, 孙元莹, 吴云良, 等. 血必净注射液防治家兔应激性脏器损伤的研究 [J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(2):105-108.
- [18] Hotchkiss R S, Karl I E. The pathophysiology and treatment of sepsis [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(2):138-150.
- [19] 姚咏明, 柴家科, 林洪远. 现代脓毒症理论与实践 [M]. 北京: 科学出版社, 2005:73.
- [20] Gaini S, Koldkjaer O G, Pedersen C, et al. Procalcitonin, lipopolysaccharide-binding protein, interleukin-6 and C-reactive protein in community-acquired infections and sepsis: a prospective study [J]. *Crit Care*, 2006, 10(2):R53.

(收稿日期:2006-12-18 修回日期:2007-04-10)

(本文编辑:李银平)