

乌司他丁对脓毒症大鼠血浆高迁移率族蛋白 B1 水平的影响

寇秋野^{1a}, 杨祖立^{1b}, 管向东², 欧海燕^{1a}, 陈雷^{1a}, 胡文利^{1a}

(1. 中山大学附属第六医院①ICU, ②胃肠外科, 广东广州 510655;

2. 中山大学附属第一医院 SICU, 广东广州 510080)

【摘要】 目的 观察乌司他丁(UTI)对脓毒症大鼠高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)水平的影响。方法 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症大鼠模型。将 105 只大鼠随机分为假手术组、脓毒症组和 UTI 组,每组 35 只。UTI 组于制模成功后立即腹腔注射 UTI 20 kU/kg, 12 h 注射 1 次,连用 3 d。3 组分别于 CLP 后 1、3 和 7 d 各活杀 5 只大鼠,采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测血浆 HMGB1 水平;余下的 20 只大鼠观察术后 1、3、7 d 死亡率。结果 与假手术组比较,脓毒症组术后 1、3 和 7 d 血浆 HMGB1 水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);UTI 组各时间点血浆 HMGB1 水平较脓毒症组显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但术后 1 d、3 d 仍高于假手术组(P 均 < 0.05)。UTI 组大鼠术后 3 d 和 7 d 的死亡率显著低于脓毒症组(3 d: 30% 比 70%, 7 d: 50% 比 85%, P 均 < 0.05)。结论 UTI 能显著抑制晚期炎症介质 HMGB1 的释放,对脓毒症具有较长时间的“治疗窗”。

【关键词】 脓毒症; 乌司他丁; 高迁移率族蛋白 B1; 死亡率

中图分类号: R631 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.02.016

Effects of ulinastatin on plasma level of high mobility group box 1 protein in septic rat KOU Qiu-ye *, YANG Zu-li, GUAN Xiang-dong, OU Hai-yan, CHEN Lei, HU Wen-li. * Intensive Care Unit, the Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, Guangdong, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of ulinastatin (UTI) on the plasma level of high mobility group box 1 (HMGB1) protein in septic rat. **Methods** Cecal ligation and perforation (CLP) method was used to establish septic rat models. One hundred and five rats were randomly divided into three groups: sham operation group (A, $n = 35$), CLP group (B, $n = 35$) and CLP + UTI group (C, $n = 35$). Group A received sham operation and the others underwent CLP operation. In the C group, after the model was formed the rat received intraperitoneal injection of UTI 20 kU/kg, once every 12 hours for sequential 3 days, and in the other two groups, similar amount of normal saline was intraperitoneally injected. Five rats in each group were sacrificed on the 1st, 3rd and 7th day after operation, respectively. The concentration of HMGB1 protein in plasma was assessed by Western blotting. The remaining 20 rats in each group were observed for the mortality in rats at the time points of 1st, 3rd and 7th day. **Results** Compared to those in A group, the plasma HMGB1 protein levels were increased obviously on the 1st, 3rd and 7th day after operation in group B ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with group B, the HMGB1 protein levels were markedly reduced in group C at different time points after operation ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but they were slightly higher than those in A group on the 1st and 3rd day (both $P < 0.05$). Furthermore, the rat mortalities in group C were much lower on the 3rd and 7th day in comparison with those in group B (3 d: 30% vs. 70%, 7 d: 50% vs. 85%, both $P < 0.05$). **Conclusion** This study shows that UTI injection may markedly inhibit the later release of pro-inflammatory cytokine, plasma HMGB1 protein, thus it may prolong the time for treatment in septic rat.

【Key words】 sepsis; ulinastatin; high mobility group box 1 protein; mortality

目前对脓毒症的发病机制尚未完全阐明,但炎症介质无疑在其中起到关键作用,所以通过调整炎症介质网络,改善脓毒性休克患者的预后,一直是研究热点。研究发现,脂多糖(LPS)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)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^[1]。一系列药效动力学研究和临床研究表明,抗炎药物乌司他丁(UTI)具有抑制多种蛋白、糖和脂类水解酶的活性以及抑制炎症介质过度释放的作用^[2-3]。本研究中拟采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症大鼠模型,观察 UTI 是否对晚期炎症介质

作者简介:寇秋野(1972-),男(汉族),辽宁省人,医学博士,副主任医师。

HMGB1 具有拮抗作用。

1 材料与方 法

1.1 动物分组与 CLP 模型制备:雄性 SD 大鼠(由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,按随机数字表法分为假手术组、脓毒症组、UTI 组 3 组,每组 35 只。采用 CLP 制备脓毒症大鼠模型:用质量分数为 3%的戊巴比妥(30 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,无菌条件下开腹,在距盲肠末端 1 cm 处用 7-0 丝线结扎盲肠,用 22G 针头贯穿盲肠 3 次,注意避免粪便污染,用生理盐水 2 ml 湿润肠管,并按生理位置还纳;术毕逐层关腹,腹壁皮下注射林格液 50 ml/kg 抗休克,术后自由进食水。假手术组无菌状态下开腹寻找到盲肠后再将其还纳腹腔,然后逐层关腹。各组术后立即腹腔注射生理盐水 2 ml,12 h 重复 1 次,连用 3 d;UTI 组术后立即腹腔注射 UTI 20 kU/kg 加生理盐水 2 ml,12 h 注射 1 次,连用 3 d。3 组于术后 1、3 和 7 d 各活杀 5 只大鼠留取标本,余下的 20 只大鼠观察术后 1、3 和 7 d 的死亡率。

1.2 血浆 HMGB1 的检测:用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测血浆 HMGB1 含量,按试剂盒说明书步骤操作:血浆中加入蛋白提取液,离心 20 min,取上清液,采用二喹林甲酸(BCA)蛋白测定试剂盒(美国 Bio-Rad 公司)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 后,依次加入山羊抗 HMGB1 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)、羊抗大鼠磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体,4 ℃ 孵育过夜,加辣根过氧化物酶(HRP)标记的 IgG 二抗(美国 Sigma 公司)37 ℃ 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。

1.3 统计学处理:计量资料的实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 统计软件包进行 *t* 检验、 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 UTI 对脓毒症大鼠血浆 HMGB1 水平的影响(表 1):与假手术组比较,脓毒症组术后 1、3 和 7 d 血浆 HMGB1 水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。UTI 组术后 1、3 和 7 d 血浆 HMGB1 水平均显著低于脓毒症组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);但术后 1 d、3 d 时仍显著高于假手术组(P 均 < 0.05)。

表 1 UTI 对脓毒症大鼠血浆 HMGB1 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	HMGB1(mg/L)		
	术后 1 d	术后 3 d	术后 7 d
假手术组	0.46±0.21	0.33±0.19	0.41±0.20
脓毒症组	1.65±0.65 ^b	1.12±0.41 ^b	0.78±0.26 ^a
UTI 组	0.81±0.47 nd	0.68±0.35 ^{ac}	0.47±0.21 ^c

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与脓毒症组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

2.2 UTI 对脓毒症大鼠死亡率的影响(表 2):假手术组术后各时间点均无死亡大鼠。脓毒症组和 UTI 组随术后时间的延长,大鼠死亡率均逐渐增加,但 UTI 组增加的幅度明显低于脓毒症组,术后 3 d 和 7 d,UTI 组动物死亡率显著低于脓毒症组($\chi^2_{3d}=6.40, \chi^2_{7d}=5.58, P$ 均 < 0.05)。

表 2 UTI 对脓毒症大鼠死亡率的影响

组别	动物数	死亡率(%(例))		
		术后 1 d	术后 3 d	术后 7 d
假手术组	20	0(0)	0(0)	0(0)
脓毒症组	20	30(6)	70(14)	85(17)
UTI 组	20	10(2)	30(6) ^c	50(10) ^c

注:与脓毒症组比较,^c $P < 0.05$

3 讨 论

尽管抑制早期炎症介质如 TNF、白细胞介素-1(IL-1)治疗脓毒症的动物实验取得成功,但临床试验未能改善脓毒症患者的生存率,甚至使患者的病死率增加^[4-5]。原因可能与炎症介质的多样性和炎症网络的复杂性有关,尤其是针对新近发现的晚期炎症介质 HMGB1 的研究为解开这一困惑提供了新的思路。1999 年 Wang 等^[6]首先发现 HMGB1 释放到胞外后可介导炎症反应,将其归类为内毒素血症和脓毒症的晚期炎症介质。近年有研究显示, HMGB1 与全身炎症反应综合征(SIRS)及脓毒症的发生发展密切相关,而且 HMGB1 表达水平与脓毒症严重程度及预后也相关^[7]。单核/巨噬细胞、垂体细胞受内毒素、IL-1、TNF 刺激后均能释放 HMGB1,而 HMGB1 也可刺激单核/巨噬细胞释放致炎因子,如 TNF、IL-1 α 、IL-1 β 等^[6]。因此, HMGB1 已成为抗炎治疗的新靶点^[6,8-9]。在感染 24 h 内给予 HMGB1 抗体仍可明显改善脓毒症动物的症状及死亡率^[10],其治疗“时间窗”在所有炎症因子中是最宽的。因此, HMGB1 作为炎症性疾病的重要晚期炎症因子,抑制其作用对炎症性疾病实验动物具有明显的保护作用。

用,为临床治疗脓毒症、脓毒性休克及多器官功能障碍综合征(MODS)等开辟了新途径。

本研究结果表明,UTI 在脓毒症模型大鼠制模后各时间点对晚期炎症介质 HMGB1 均有抑制作用,并且能明显降低脓毒症大鼠各时间点的死亡率,说明其在脓毒症发病全过程中均可使用。UTI 这种具有较长“时间窗”的特点,无疑使其与其他专门抑制 TNF 和 IL-1 药物相比更具有优势。尽管脓毒症发病过程有关信号转导的机制未能完全阐明,但 UTI 在治疗脓毒症时明显的治疗效果及无毒性等优点,充分说明了 UTI 用于治疗脓毒症具有较好的前景,值得继续进行研究和探索。

参考文献

[1] Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis[J]. J Intern Med, 2004, 255(3): 320-331.
 [2] 景炳文. 乌司他丁在急危重症临床应用的进展[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(2): 117-120.
 [3] 邵义明, 张良清, 邓烈华, 等. 乌司他丁对全身炎症反应综合征

的治疗作用[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(4): 228-230.
 [4] Marshall JC. Such stuff as dreams are made on; mediator-directed therapy in sepsis[J]. Nat Rev Drug Discov, 2003, 2(5): 391-405.
 [5] Fisher CJ Jr, Agosti JM, Opal SM, et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor; Fc fusion protein[J]. N Engl J Med, 1996, 334(26): 1697-1702.
 [6] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice[J]. Science, 1999, 285(5425): 248-251.
 [7] 邵义明, 姚华国, 梁小仲, 等. 高迁移率族蛋白 B1 表达水平与大鼠脓毒症严重程度及预后关系的实验研究[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(11): 668-672.
 [8] 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.
 [9] 唐道林, 肖献忠. 高迁移率族蛋白-1 与脓毒症[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(2): 113-116.
 [10] Yang H, Ochani M, Li J, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(1): 296-301.
 (收稿日期: 2008-09-15 修回日期: 2008-12-30)
 (本文编辑: 李银平)

• 消息 •

科技部中国科技信息研究所万方数据 2008 年《中国期刊引证报告》(扩刊版)
 ——基础医学类期刊影响因子和总被引频次前 10 位排序表

期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	总被引频次	排位
中国计划免疫	1.823	1	中国危重病急救医学	3 632	1
中国危重病急救医学	1.686	2	中华麻醉学杂志	3 310	2
中华高血压杂志	1.331	3	中国病理生理学杂志	2 704	3
中华病理学杂志	0.921	4	中华血液学杂志	2 339	4
细胞与分子免疫学杂志	0.912	5	中华病理学杂志	1 842	5
中国健康心理学杂志	0.893	6	中国健康心理学杂志	1 696	6
Cellular & Molecular Immunology	0.856	7	中华高血压杂志	1 687	7
中华麻醉学杂志	0.852	8	中国计划免疫	1 670	8
中国寄生虫学与寄生虫病杂志	0.832	9	中国人兽共患病学报	1 580	9
中华医学遗传学杂志	0.792	10	解放军医学管理杂志	1 556	10

科技部中国科技信息研究所 2008 年版《中国科技期刊引证报告》(核心版)
 ——基础医学、医学综合类期刊影响因子和总被引频次前 10 位排序表

期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	总被引频次	排位
中华医院管理杂志	1.342	1	中华医学杂志	5 028	1
中国危重病急救医学	1.208	2	中国现代医学杂志	2 952	2
医学研究生学报	0.858	3	中国危重病急救医学	2 348	3
ASIAN JOURNAL OF ANDROLOGY	0.847	4	中华医院管理杂志	2 292	4
中华医学杂志	0.820	5	CHINESE MEDICAL JOURNAL	2 103	5
细胞与分子免疫学杂志	0.773	6	中国病理生理学杂志	1 950	6
中华病理学杂志	0.756	7	重庆医学	1 537	7
生理学报	0.744	8	中国卫生检验杂志	1 481	8
CHINESE MEDICAL JOURNAL	0.734	9	中国急救医学	1 418	9
医疗卫生装备	0.683	10	解放军医学杂志	1 390	10

科技部中国科技信息研究所 2008 年版《中国科技期刊引证报告》(核心版)
 ——中国科技期刊影响因子总排序表中前 100 位医学类期刊名单

期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	影响因子	排位
中国药理学通报	1.708	31	中华骨科杂志	1.347	64	中国危重病急救医学	1.208	82
中华结核和呼吸杂志	1.494	48	中华医院管理杂志	1.342	65	中国修复重建外科杂志	1.174	89
中华护理杂志	1.473	49	中华儿科杂志	1.338	66	中华神经外科杂志	1.152	93
中华流行病学杂志	1.436	51	中华显微外科杂志	1.227	80	中华消化杂志	1.123	98
中华医院感染学杂志	1.370	61	中华心血管病杂志	1.217	81	中国感染与化疗杂志	1.121	100