

• 论著 •

脓毒症大鼠炎症与凝血相关性及药物干预的实验研究

田永超¹, 张照健¹, 何 英², 李 静¹, 王东强³, 李志军³

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津医科大学, 天津 300070; 3. 天津市第一中心医院, 天津 300192)

【摘要】 目的 应用基因芯片技术探讨脓毒症大鼠炎症与凝血相关性及其药物干预的影响, 以期从基因水平上研究药物对其的作用机制。**方法** 将 90 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、药物组, 每组 30 只。采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 复制脓毒症大鼠模型。药物组制模后腹腔注射泰能 0.1 g/kg、血必净注射液 10 ml/kg、连翘注射液 10 ml/kg; 对照组和模型组腹腔给予 10 ml/kg 生理盐水。72 h 处死大鼠, 用 BiostarR-40 s 芯片检测模型组/对照组、药物组/模型组大鼠肝组织基因, 并以 Cy3 和 Cy5 荧光信号相对强度比值 >2.0 或 <0.5 筛选差异显著基因, 通过美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 数据库查询基因功能并加以分类。**结果** 模型组/对照组筛选出差异基因 305 条, 其中上调基因 159 条, 下调基因 146 条; 药物组/模型组筛选出差异基因 342 条, 其中上调基因 102 条, 下调基因 240 条; 模型组、药物组已知功能共同差异表达基因 36 条, 上调基因 15 条, 下调基因 21 条; 其中涉及免疫、代谢、物质转运、细胞凋亡等多种相关基因。**结论** 药物组对脓毒症时发生紊乱的相关基因进行调控, 使异常表达基因发生回归, 特别是免疫相关基因及代谢相关基因中的超氧化物歧化酶 2 (SOD2) 基因, 使脓毒症病情得到良好的转归。

【关键词】 脓毒症; 炎症; 凝血; 基因芯片技术; 菌毒炎并治; 连翘; 血必净注射液

中图分类号: R285.5; R364.5 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.06.008

Correlation between inflammation and blood coagulation in septic rats and experimental studies of drug intervention TIAN Yong-Chao*, ZHANG Zhao-Jian, HE Ying, LI Jing, WANG Dong-qiang, LI Zhi-Jun. * Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China
Corresponding author: LI Zhi-Jun, Email: doctorzhijun@yahoo.cn

【Abstract】 Objective To apply gene chip technique to explore the correlation between inflammation and blood coagulation of rats with sepsis and the effect of drug intervention to study the drug mechanism at gene level. **Methods** Ninety Wistar rats were randomly divided into three groups: control, model and drug groups (each $n=30$). The septic rat models were established by cecum ligation perforation (CLP) method. The drug group was treated by intraperitoneal injection of imipenem/cilastatin (0.1 g/kg), Xuebijing injection (血必净注射液, 10 ml/kg) and forsythia injection (连翘注射液, 10 ml/kg) after CLP; while in the control and model groups, equal amount of normal saline was injected via the same route. BiostarR-40 s chip was used to detect the rat liver gene of model group/control group and drug group/model group, the ratio of fluorescein signal Cy3/Cy5 >2.0 or <0.5 was applied to screen the institias difference gene, through the database of American National Center of Biological Information (NCBI), the gene function and classification were inquired. **Results** Model group/control group had 305 institias difference gene, including up-regulation gene 159 institias, and down-regulation gene 146 institias; drug group/model group had 342 institias difference gene, containing up-regulation gene 102 institias, and down-regulation gene 240 institias. In the model group and drug group, there were 36 genes with known functions and differential expressions, including up-regulation gene 15 institias and down-regulation gene 21 institias and involving immune, metabolism, material transportation and apoptosis related genes, and so on. **Conclusion** In the drug group, the drugs can regulate the occurrence of disturbances of related genes in rats with sepsis and promote the regression of gene abnormal expressions to take place, especially the superoxide dismutase-2 (SOD2) gene in the immune and metabolism related genes. Thus, the septic condition will have a good prognosis.

【Key words】 sepsis; inflammation; blood coagulation; gene chip technique; bacterium-toxin-phlegmasia symphysic therapy; forsythia; Xuebijing injection

基金项目: 天津市医药卫生科研项目 (07003); 天津市科技创新专项基金 (06F22DSH00403) 及现代中药大品种群系统开发基金 (2006)

通信作者: 李志军, Email: doctorzhijun@yahoo.cn

作者简介: 田永超 (1983-), 男 (汉族), 河北省人, 硕士研究生。

凝血系统的激活和炎症反应相互促进、相互影响,共同形成了脓毒症的病理生理过程,炎症和凝血系统激活交叉也是临床弥散性血管内凝血(DIC)的标志^[1],甚至导致多器官功能障碍综合征(MODS)的发生,最终导致患者死亡。脓毒症发病机制非常复杂,属多基因疾病。本研究中利用中药药效靶点广的优势,以基因芯片技术为观察平台,研究脓毒症时大鼠炎症与凝血的相关性及血必净注射液、连翘、泰能干预的影响,以期从基因水平上研究上述药物对其作用的机制,为临床治疗脓毒症筛选有效药物。

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 90 只,体重(250±10)g,由中国医学科学院实验动物中心提供。采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备脓毒症大鼠模型^[2]。将 90 只大鼠按随机数字表法分为对照组、模型组、药物组 3 组。药物组制模后腹腔注射泰能(美国默沙东,批号:06525)0.1 g/kg、血必净注射液(天津市红日药业股份有限公司生产,批号:060812)10 ml/kg、连翘注射液(天津市红日药业股份有限公司提供)10 ml/kg,每日 2 次。对照组和模型组制模后腹腔给予生理盐水 10 ml/kg。

1.2 基因芯片杂交及检测分析:各组均于治疗后 72 h 处死大鼠,无菌条件下取右上叶肝组织,于液氮中保存备用。用本课题组前期报道的方法^[3]进行基因芯片杂交及检测。

2 结果

2.1 基因芯片杂交结果:①不同 RNA 样本双色荧光标记以叠加图表示:观察组 RNA 采用 Cy3 荧光标记,对照组 RNA 采用 Cy5 荧光标记。对于某一点的两种叠加荧光信号,如果 Cy3 信号加强,该点多显绿色;如果 Cy5 信号加强,该点多显红色;如果强度相似,即显黄色。不同 RNA 样本杂交信号强度以散点图表示:以 Cy3 荧光信号相对强度值为 X 轴,以 Cy5 荧光信号相对强度值为 Y 轴,每个基因相对于第一象限的一个点,这样形成了基因表达谱的散点图。中间 45°直线上的点 Cy5/Cy3 比值为 1.0,表示无表达差异;其上面直线上的点 Cy5/Cy3 比值为 2.0,下面直线上的点 Cy5/Cy3 比值为 0.5;远离 45°直线的点(即 Cy5/Cy3 比值>2.0 或<0.5)为差异表达基因,越靠近 X 轴或 Y 轴,则表明该点基因差异表达越显著。②模型组/对照组、药物组/模型组基因表达谱芯片双色荧光标记叠加图(图 1~2)中,黄色基因点代表该基因在对照组和模型组中表达无差异,红点表示该基因在模型组中的表达明显高于对

照组(上调),绿点表示该基因在模型组中的表达明显低于对照组(下调)。模型组/对照组、药物组/模型组基因表达杂交信号强度散点图(图 3~4)中,黄色基因点表示该基因在模型组和药物组中表达无差异,红点表示该基因在药物组中的表达明显高于模型组(上调),绿点表示该基因在药物组中的表达明显低于模型组(下调)。

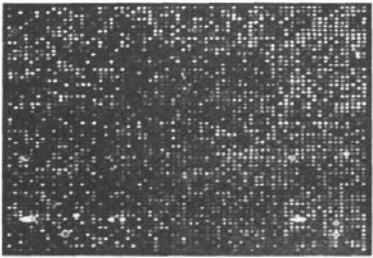


图 1 模型组/对照组基因表达谱芯片双色荧光标记叠加图



图 2 药物组/模型组基因表达谱芯片双色荧光标记叠加图

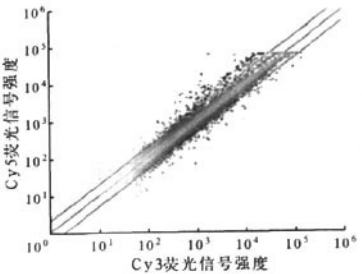


图 3 模型组/对照组基因表达杂交信号强度散点图

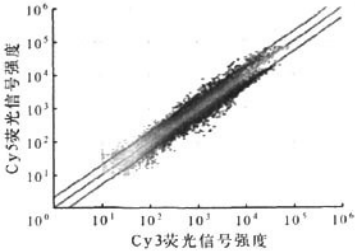


图 4 药物组/模型组基因表达杂交信号强度散点图

2.2 差异表达基因分析(表 1):以 BiostarR-40 s 芯片检测大鼠肝组织基因,模型组/对照组筛选出差异基因 305 条,其中上调基因 159 条,已知基因 109 条;下调基因 146 条,已知基因 89 条。药物组/模型组筛选出差异基因 342 条,其中上调基因 102 条,已知基因 75 条;下调基因 240 条,已知基因 120 条;模型组、药物组已知功能共同差异表达基因共 36 条,其中上调基因 15 条,下调基因 21 条。

3 讨论

3.1 炎症与凝血相关性分析:脓毒症可能的发病机制是微生物引起的感染触发了被致敏的单核/巨噬细胞、内皮细胞和中性粒细胞等炎性细胞失控性释放出炎症介质,包括白细胞介素(ILs)、肿瘤坏死因子(TNF)、诱生型一氧化氮合酶(iNOS)及其代谢产物一氧化氮(NO)等进入循环系统,使炎症反应在体内进一步呈级联“瀑布样”放大。过度释放的细胞因子通过各种途径激活凝血系统,使机体处于高凝状态,机体产生抗凝物质和启动纤维蛋白溶解系统,纤维蛋白大量沉积,微血管内凝血且功能受损,造成组织灌注减少,进而导致器官功能衰竭。如:①促炎因子IL-6激活核转录因子- κ B(NF- κ B),使内皮细胞、巨噬细胞等炎性细胞上调组织因子(TF)表达与释放,启动外源性凝血系统;②细胞损伤使位于细胞内

膜的氨基磷脂(一种强烈的促凝物质)翻转、暴露而促进凝血;③炎症反应损伤血管内膜,暴露其下胶原组织而激活内源性凝血系统。炎症引起的血管内皮功能紊乱是凝血反应过度激活的重要步骤,而内皮损伤又造成炎症反应加剧,引起中性粒细胞活化及其与内皮细胞黏附和炎症介质进一步释放,即凝血系统和免疫系统间“交叉对话”^[4-5]。血必净注射液可通过调节 TNF- α 改善脓毒症的凝血功能^[6]。本课题组前期的研究显示:脓毒症涉及一系列基因的表达异常,分析某些表达量下调或上调基因,显示出机体处于免疫功能紊乱及免疫炎症状态;血液中与凝血功能相关基因表达量上调,说明血液处于高凝状态^[7],而且炎症与凝血功能紊乱同时存在、相互影响。

3.2 药物干预机制分析:王今达教授将中医学的“三证三法”用于脓毒症治疗的理论^[8]已被广泛采用。连翘注射液主要成分为连翘苷、连翘酯苷和黄酮。文献报道,连翘有明显的抗炎作用,能降低毛细血管的脆性和通透性,减少炎性渗出,并能增强机体的防御功能;腹腔注射连翘醇提取物水溶液有非常明显的抗渗出作用,能降低炎症部位血管壁脆性,促进炎性屏障的形成^[9]。此外,连翘可直接摧毁内毒素,显著抑制细菌内毒素诱发的炎症因子如 IL-1 的过度表达;同时,连翘苷具有一定的清除氧自由基及

表 1 模型组、药物组已知功能的 36 条差异表达基因

基因编号	基因名称	模型组	药物组	基因编号	基因名称	模型组	药物组
代谢相关基因				免疫相关基因			
XM_001060853	三磷酸腺苷酶	2.011	0.469	NM_053288	类黏蛋白	4.227	0.370
NM_024391	羟类固醇(17- β)脱氢酶 2	2.532	0.278	NM_053587	S100 钙结合蛋白 A9	4.822	0.115
NM_017051	超氧化物歧化酶 2(SOD2)	2.240	0.344	NM_030845	趋化因子配基 1	10.480	0.302
NM_012716	单羧酸转运蛋白 1	5.433	0.131	NM_012488	α_2 巨球蛋白	34.770	0.480
XM_217138	尼克酰胺 N-甲基转移酶	2.682	0.350	NM_022194	白细胞介素-1(IL-1)受体拮抗剂	2.081	0.422
NM_031987	肉毒碱 O-辛酰基转移酶	0.438	3.249	NM_053289	再生岛衍生的 3 β	5.019	0.156
NM_001034090	环氧化物水解酶 1	0.432	2.297	细胞凋亡相关基因			
NM_178091	胰高糖素诱导的基因 2	0.200	2.175	NM_023987	杆状病毒 3	2.102	0.338
NM_053902	犬尿素酶	0.460	2.530	NM_130741	人脂质运载蛋白 2	4.739	0.393
NM_032082	羧酸氧化酶 2(SOD2)	0.274	3.431	细胞周期、增殖相关基因			
NM_012597	肝脂肪酶	0.485	2.488	NM_012843	上皮膜蛋白 1	3.384	0.260
NM_012624	丙酮酸激酶(肝型、红细胞型)	0.383	2.333	X84004	二元特异磷酸酶 1	0.250	2.394
NM_012545	二羧基苯丙氨酸脱羧酶	0.491	2.304	转录调节相关基因			
NM_019292	碳酸酐酶 3	0.345	2.952	XM_001077437	维甲酸诱导 1	0.411	2.733
NM_019184	细胞色素 P450 11C	0.337	2.177	NM_013060	DNA 结合蛋白抑制物 2	0.486	2.669
物质运输相关基因				细胞附着相关基因			
XM_575216	空泡的蛋白质分选 39 同系物	2.441	0.333	NM_134452	胶原 V α 1	2.278	0.422
NM_138826	金属硫蛋白 1 α	9.404	0.350	其他相关基因			
NM_145677	溶质传递族 25	0.439	2.754	XM_342793	类似假定的蛋白 FLJ22490	2.532	0.251
细胞骨架相关基因				NM_019125	无中文名称	2.191	0.276
NM_057191	无中文名称	3.596	0.297	NM_173293	嗅觉感受器 59	0.383	3.246
XM_001058799	猫眼综合征染色体 2 同系物	2.034	20.331				

抗氧化作用,从而保护血管内皮,减轻脓毒症的程度^[10-12]。连翘的应用符合毒热证的治疗原则。

血必净注射液具有强效拮抗内毒素及其诱导的单核/巨噬细胞产生的内源性炎症介质失控性释放作用^[13-14];增加血小板、纤维蛋白原含量和血小板聚集,并可保护血管内皮细胞,从而改善 DIC 的凝血机制异常,防止毛细血管内微血栓形成^[15];改善微循环,提高 SOD 活性;同时能够调节过高或过低的免疫反应,保护和修复应激状态下受损的脏器^[16]。血必净注射液的应用可缓解脓毒症血瘀证。

泰能、血必净、连翘同时应用,针对细菌感染、炎症反应及凝血功能障碍进行综合治疗,实现“细菌-内毒素-炎症介质并治”的防治策略,即“菌毒炎并治”^[14]。用中药拮抗内毒素,并抑制炎症介质失控性释放,提高 SOD 活性,从而保护血管内皮,阻断炎症与凝血相互影响的恶性循环,保护受损脏器,减轻脓毒症的严重程度,达到明显提高存活率的目的。

3.3 药物干预后基因表达分析:药物组在已检测出的各功能分类异常表达基因中均有较好的回归调节,从基因水平上使脓毒症病情得到良好的转归。特别是一些调节免疫反应的基因,如急性时相反应蛋白(类黏蛋白、 α_2 巨球蛋白等)、炎症因子(S100 钙结合蛋白 A9、趋化因子配基 1 等)、IL-1 受体拮抗剂等模型组表达异常,而经连翘、血必净、泰能方案治疗后回归到基线水平,说明机体免疫系统的紊乱得到了有效调节,炎症反应好转;另外,代谢相关基因中 SOD2 基因在模型组中表达明显上调,治疗后发生了回归,推测可能是由于药物清除了部分自由基,使机体 SOD 反射性降低调节幅度所致,从而防止了炎症放大化及血管内皮损伤。由于炎症的好转及血管内皮损伤的减轻,阻断了炎症与凝血系统间的恶性循环,从基因水平体现出炎症及凝血系统紊乱同时得到改善,脓毒症病情得到良好的转归。

综上所述,本研究从基因水平显示泰能、血必净加连翘注射液能很好地阻断炎症与凝血间交叉影

响的恶性循环,从而减少了 DIC 和 MODS 的发生,明显提高了脓毒症大鼠的存活率。

参考文献

- [1] Thijs LG, de Boer JP, de Groot MC, et al. Coagulation disorders in septic shock [J]. Intensive Care Med, 1993, 19 (Suppl 1):S8-15.
- [2] Chaudry IH, Wicherman KA, Baue AE. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels [J]. Surgery, 1979, 85 (2): 205-211.
- [3] 李志军,李银平,盖慧荣,等.血必净注射液对脓毒症大鼠基因调控的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2007,14(4):233-236.
- [4] 卢晓,赵良.低分子肝素防治脓毒症机制的研究进展[J].中国急救医学,2008,28(11):1033-1036.
- [5] 张宇.脓毒症的发病机制探讨[J].职业与健康,2006,22(18): 1514-1515.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 王今达,李志军,李银平.从“三证三法”辨证论治脓毒症[J].中国危重病急救医学,2006,18(11):643-644.
- [9] Ko HC, Wei BL, Chiou WF. The effect of medicinal plants used in Chinese folk medicine on RANTES secretion by virus-infected human epithelial cells [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 107(2):205-210.
- [10] 高淑娟,戴锡珍,要华民.几种清热解毒中药抗内毒素作用的比较实验[J].天津中医药,1992,2(3):42.
- [11] 傅强,崔华雷,崔乃杰.连翘提取物抑制内毒素诱导的炎症反应的实验研究[J].天津医药,2003,31(3):161-163.
- [12] 赵咏梅,黄新炜,马蕊,等.连翘苷对氧自由基清除作用的研究[J].西安文理学院学报(自然科学版),2008,11(4):14-17.
- [13] 张晔,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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.

(收稿日期:2009-10-14)

(本文编辑:李银平)

2008 年度中国百种杰出学术期刊

目前科技部中国科技信息研究所公布了 2008 年度的中国科技论文统计结果。根据《中国科学技术期刊综合评价指标体系》,采用分层分析法,由专家打分确定了重要指标的权重,对各学科的每种期刊进行了综合评定,评出了 2008 年度“中国百种杰出学术期刊”,其中医药卫生类期刊有 30 种,分别为:CHINESE MEDICAL JOURNAL、中华医学杂志、中华外科杂志、中华心血管病杂志、中华儿科杂志、中华结核和呼吸杂志、中华神经科杂志、中华流行病学杂志、中华口腔医学杂志、中华肿瘤杂志、中华骨科杂志、中华放射学杂志、中华检验医学杂志、中华耳鼻咽喉头颈外科杂志、中华护理杂志、中国危重病急救医学、中国病理生理杂志、中国药理学通报、中国中西医结合杂志、中国组织工程研究与临床康复、中国感染与化疗杂志、中国心理卫生杂志、中国中药杂志、遗传学报、药学报、营养学报、中草药、WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY、第三军医大学学报、第四军医大学学报。