

• 论著 •

血必净注射液对创伤弧菌脓毒症大鼠肺组织 Toll 样受体 4 及核转录因子- κ B 表达的影响

李志旺, 邱倩桦, 孙琦, 卢中秋, 洪广亮, 梁欢
(温州医学院附属第一医院急诊科, 浙江温州 325000)

【摘要】 目的 观察血必净注射液对创伤弧菌脓毒症大鼠肺组织 Toll 样受体 4 (TLR4) mRNA 表达和核转录因子- κ B (NF- κ B) 活性的干预作用。方法 将 110 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、血必净干预组, 后两组再分为染菌后 1、6、12、24、48 h 亚组, 每组 10 只大鼠。于大鼠左后肢皮下注射创伤弧菌悬液制备创伤弧菌脓毒症模型; 血必净组于染菌后 0.5 h 腹腔注射血必净注射液 4 ml/kg。各时间点处死大鼠取肺组织, 检测肺组织湿/干重比值 (W/D 比值)、TLR4 mRNA 表达、NF- κ B 活性和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量。结果 模型组大鼠肺组织 W/D 比值于染菌后 6、12、24、48 h 明显高于正常对照组, 而血必净组 24 h、48 h 较模型组明显减小 (均 $P < 0.05$)。模型组大鼠肺组织 TLR4 mRNA 表达在染菌后 6、12、24 h 明显高于正常对照组, 而血必净组 6 h 较模型组明显减少 (均 $P < 0.05$)。模型组大鼠肺组织 NF- κ B 活性在染菌后 1、6、12 h 明显高于正常对照组, 而血必净组 1 h、6 h 较模型组明显降低, 24 h、48 h 较模型组明显升高 (均 $P < 0.05$)。模型组大鼠肺组织 TNF- α 于染菌后 1、6、12、24 h 明显高于正常对照组, 而血必净组 12 h 较模型组明显降低 (均 $P < 0.05$)。结论 TLR4-NF- κ B 通路参与了创伤弧菌脓毒症肺损伤的早期病理生理过程; 血必净注射液能抑制 TLR4-NF- κ B 活化, 减轻创伤弧菌脓毒症大鼠肺损伤。

【关键词】 创伤弧菌; 脓毒症; Toll 样受体 4; 核转录因子- κ B; 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.1008-9691.2010.01.008

Effects of Xuebijing injection (血必净注射液) on expressions of toll-like receptor 4 and nuclear factor- κ B in lung tissue of rats with *Vibrio vulnificus* sepsis LI Zhong-wang, QIU Qiao-meng, SUN Qi, LU Zhong-qiu, HONG Guang-liang, LIANG Huan. Emergency Medical Department, the First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China
Corresponding author: LU Zhong-qiu, Email: lzq640815@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of Xuebijing injection (血必净注射液) on toll-like receptor 4 (TLR4) mRNA expression and nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity in the lung of rats with *Vibrio vulnificus* sepsis. Methods One hundred and ten Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal control group, model group and Xuebijing intervention group; the latter two groups were subdivided into five subgroups at 1, 6, 12, 24, 48 hours five time points after infection (each $n=10$). The rats were injected subcutaneously in the posterior left limb with suspension of *Vibrio vulnificus* in the model group, and the model rats were injected intraperitoneally with Xuebijing injection at the dose of 4 ml/kg 0.5 hour after infection in Xuebijing intervention group. At various time points, the rats were sacrificed, and the lungs were taken away to determine the lung wet/dry weight ratios (W/D ratios), the expressions of TLR4 mRNA, activities of NF- κ B and levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in lung tissues in the various groups and various subgroups. Results The W/D ratios of lungs in rats of model group at 6, 12, 24, 48 hours after infection were significantly higher than those in the normal control group, and compared with the model group, they were decreased significantly at 24 hours and 48 hours in the Xuebijing intervention group (all $P < 0.05$). The expressions of TLR4 mRNA in the lung tissue of rats in model group at 6, 12, 24 hours after infection were markedly higher than those in the normal control group, while the TLR4 mRNA expression in the lung tissue of rats in Xuebijing intervention group was markedly lower at 6 hours than that in the model group (all $P < 0.05$). The NF- κ B activities in lung tissue of rats in model group at 1, 6, 12 hours after infection were obviously higher than those in normal control group; and compared with model group, the NF- κ B activities in the lung tissue of rats were lower at 1 hour and 6 hours, but obviously higher at 24 hours and 48 hours in Xuebijing intervention group (all $P < 0.05$). The levels of TNF- α in lung tissue of rats in model group at 1, 6, 12, 24 hours after infection were significantly higher than those in normal control group, and compared with model group, the level of TNF- α in lung tissue of rats was markedly lower at 12 hours in Xuebijing intervention group (all $P < 0.05$). Conclusion TLR4-NF- κ B pathway involves in the early pathogenic process of acute lung injury induced by *Vibrio vulnificus* sepsis. Xuebijing injection can inhibit the activation of TLR4-NF- κ B pathway and reduce the injury of lung tissue in rats with *Vibrio vulnificus* sepsis.

【Key words】 *Vibrio vulnificus*; Sepsis; Toll-like receptor 4; Nuclear factor- κ B; Xuebijing injection

基金项目: 浙江省医学扶植重点建设学科计划项目 (07-F04); 浙江省中医药科技计划项目 (2007CA085); 浙江省温州市科技计划项目 (Y20080088)

通信作者: 卢中秋, Email: lzq640815@163.com 作者简介: 李志旺 (1982-), 男 (汉族), 浙江省人, 硕士研究生。

创伤弧菌是一种革兰阴性(G⁻)条件致病菌,其引起的脓毒症发病急骤,病情进展迅速,患者多于 24~48 h 内出现多器官功能障碍综合征(MODS),病死率高^[1]。G⁻菌外膜上的脂多糖(LPS)是 Toll 样受体 4(TLR4)识别的主要配体,可通过 TLR4 向胞内传导信号,活化核转录因子- κ B(NF- κ B),介导促炎症介质大量释放,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等,由此引起的过度炎症反应是脓毒症器官早期损伤的重要因素^[2-3]。有研究表明 NF- κ B 活化在大鼠早期肺损伤发生过程中起重要作用^[4]。另据报道,血必净注射液对盲肠结扎穿孔术(CLP)所致脓毒症大鼠的组织器官具有明显的保护作用^[5]。因此,本研究中拟构建大鼠创伤弧菌脓毒症模型,观察肺组织中 TLR4 mRNA 表达、NF- κ B 活性、TNF- α 含量和肺湿/干重(W/D)比值,并探讨血必净注射液对创伤弧菌脓毒症大鼠损伤肺组织的保护作用及机制。

1 材料与与方法

1.1 实验动物:SD 大鼠 110 只,雌雄各半,体重 180~260 g,由温州医学院动物实验中心提供。

1.2 细菌来源:从创伤弧菌感染患者下肢血疱中抽取疱液,接种到血平板上,培养 24 h 分离纯化,细菌鉴定结果为创伤弧菌,菌株编号为 812013,按常规制作成浓度为 6×10^{11} cfu/L 的创伤弧菌悬液备用。

1.3 实验试剂:血必净注射液购自天津红日药业股份有限公司,TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,逆转录试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,聚合酶链反应(PCR)试剂盒购自立陶宛 Fermentas 公司,凝胶电泳迁移率分析法(EMSA)试剂盒购自美国 Pierce 公司,生物素标记单链 NF- κ B 寡核酸探针由上海生工生物工程公司合成。BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究所,TNF- α 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒购自美国 R&D 公司。

1.4 大鼠创伤弧菌脓毒症模型的建立及实验分组:按随机数字表法将大鼠分为正常对照组(10 只)、模型组(50 只)、血必净注射液干预组(50 只),后两组再分为染菌后 1、6、12、24、48 h 5 个亚组,每个亚组 10 只大鼠。采用左后肢皮下注射创伤弧菌悬液 1 ml/kg 并按照大鼠脓毒症模型制备方法^[6-7]制作大鼠创伤弧菌脓毒症模型。血必净组染菌后 0.5 h 左侧腹腔注射血必净注射液 4 ml/kg,每隔 12 h 注射 1 次;正常对照组于麻醉后直接处死大鼠;模型组和血必净组于染菌后 1、6、12、24 和 48 h 麻醉处死大鼠;取约 300 mg 肺组织于液氮中速冻,随后转移至 -70 °C 冰箱中保存待测。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 肺组织 W/D 比值的测定:大鼠开胸取出约 60 mg 肺组织,称湿重后转至烤箱(60 °C,48 h)烤至恒重,称取干重,计算 W/D 比值。

1.5.2 肺组织 TLR4 mRNA 表达的检测:采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR),引物序列及反应条件见表 1。提取肺组织总 RNA,按试剂盒说明书进行 RT-PCR 扩增,产物用琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像系统成像,Gelpro 32 分析软件进行灰度分析,结果以目的基因与 β -肌动蛋白(β -actin)灰度值比值作为基因表达的相对表达量,比值越大,表达越强。

表 1 RT-PCR 引物序列及条件

基因	引物序列	温度 (°C)	产物大小 (bp)
β -actin	上游 5'-CCATTGAACACGGCATTG-3'	48	590
	下游 5'-GAAGGAAGGCTGGAAGAG-3'		
TLR4	上游 5'-TGCTGCCAACATCATCCA-3'	59	304
	下游 5'-TTTTCCATCCAACAGGGCTTTT-3'		

1.5.3 肺组织 NF- κ B 活性的测定:提取大鼠肺组织核蛋白后,按照 EMSA 试剂盒说明书进行测定,将最后显影结果扫描入电脑,用 Quantity one 图像分析软件行灰度分析,以灰度值表示,灰度值越大,NF- κ B 活性越强。

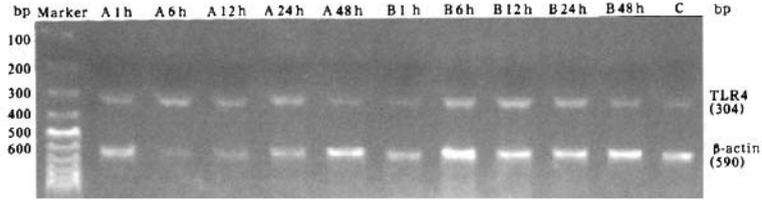
1.5.4 肺组织 TNF- α 含量的测定:制备肺组织匀浆,按照 BCA 蛋白测定试剂盒说明书测定总蛋白浓度,按照 ELISA 试剂盒操作说明书测定 TNF- α 含量,结果以 TNF- α 含量/总蛋白浓度比值表示。

1.6 统计学处理:实验数据以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 16.0 进行统计分析,采用单向方差分析,并用 LSD 法进行组间两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

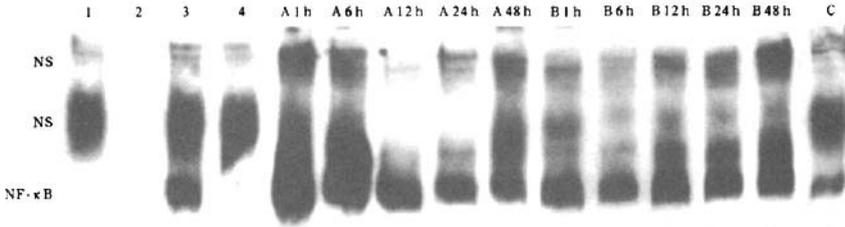
2 结果

2.1 肺组织 TLR4 mRNA 表达(图 1):正常对照组大鼠肺组织中仅有少量的 TLR4 mRNA 表达(0.569 ± 0.141);与正常对照组比较,模型组创伤弧菌染菌后 6、12、24 h 肺组织 TLR4 mRNA 表达均明显增高(1.213 ± 0.433 , 1.029 ± 0.401 , 0.992 ± 0.283 , 均 $P < 0.05$);与模型组比较,血必净组 6 h 肺组织 TLR4 mRNA 表达(0.737 ± 0.224)明显减少($P < 0.05$),而 12 h 时(1.122 ± 0.809)明显高于正常对照组($P < 0.05$)。

2.2 肺组织 NF- κ B 活性(图 2):正常对照组大鼠肺组织 NF- κ B 活性较低(1294.7 ± 378.6);与正常对照组比较,模型组染菌 1h NF- κ B 活性明显增高高达



A: 模型组; B: 血必净组; C: 正常对照组
 图 1 RT-PCR 检测各组大鼠肺组织 TLR4 mRNA 表达



1: 未加探针; 2: 阴性对照; 3: 阳性对照; 4: 特异性竞争; A: 模型组; B: 血必净组; C: 正常对照组; NS: 非特异性条带
 图 2 EMSA 法检测各组大鼠肺组织 NF-κB 活性

高峰(5 794.5 ± 522.7), 之后逐渐降低, 但至 12 h 时(2 154.2 ± 297.0) 与正常对照组比较仍有差异(均 $P < 0.05$)。与模型组比较, 血必净组 1 h、6 h 肺组织 NF-κB 活性(2 110.8 ± 655.0, 1 442.3 ± 453.7) 明显降低, 而 24 h、48 h(3 341.5 ± 1 160.5, 4 020.2 ± 773.1) 则明显增高(均 $P < 0.05$), 除 6 h 与正常对照组无差异外, 余时间点均较正常对照组明显增高(均 $P < 0.05$)。

2.3 肺组织 TNF-α 含量(表 2): 正常对照组大鼠肺组织 TNF-α 含量较少; 与正常对照组比较, 模型组染菌 1、6、12 和 24 h TNF-α 含量均明显增加(均 $P < 0.05$), 并于 12 h 达峰值; 与模型组比较, 血必净组 12 h 肺组织 TNF-α 含量明显减少, 12 h、24 h 较正常对照组明显增加(均 $P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠肺组织 TNF-α 含量和 W/D 比值的变化比较(̄x ± s)

组别	时间	动物数	TNF-α(×10 ⁻⁹)	W/D 比值
正常对照组		10	237.59 ± 26.56	3.136 ± 0.758
模型组	染菌 1 h	10	297.92 ± 41.68*	3.366 ± 0.626
	染菌 6 h	10	303.22 ± 25.83*	4.197 ± 0.499*
	染菌 12 h	10	366.78 ± 81.99*	4.413 ± 0.449*
	染菌 24 h	10	306.88 ± 55.62*	4.554 ± 1.136*
	染菌 48 h	10	254.69 ± 21.73	4.763 ± 0.289*
血必净组	染菌 1 h	10	275.41 ± 51.65	3.640 ± 0.414
	染菌 6 h	10	276.04 ± 37.11	3.695 ± 0.322
	染菌 12 h	10	294.68 ± 41.31 ^{ab}	3.847 ± 0.596*
	染菌 24 h	10	336.43 ± 103.57*	3.882 ± 0.657 ^{ab}
	染菌 48 h	10	256.59 ± 52.96	3.765 ± 0.699 ^b

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组同期比较, ^a $P < 0.05$

2.4 肺组织 W/D 比值(表 2): 正常对照组大鼠肺组织 W/D 比值较小; 与正常对照组比较, 模型组染菌 6、12、24 和 48 h W/D 比值明显增大(均 $P < 0.05$), 且呈递增趋势。血必净组 24 h、48 h 肺组织 W/D 比值较模型组明显减小(均 $P < 0.05$), 48 h 恢复至正常对照组水平($P > 0.05$)。

3 讨论

创伤弧菌是嗜盐性 G⁻ 杆菌, 广泛存在于近海及海湾的海水里, 可通过生食牡蛎等海洋生物或破损的皮肤接触海水感染机体, 并且在短时间内出现脓毒症、蜂窝织炎、出血性大疱, 最后可以发展为脓毒性休克。创伤弧菌脓毒症发病后病情发展迅速, 24~48 h 内常发生急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)等多器官功能障碍, 病死率较高, 但是创伤弧菌脓毒症导致肺损伤的机制目前尚不十分明确^[8]。

研究表明, 脓毒症患者中超过 40% 会发展为 ALI/ARDS, ALI 与 ARDS 是 G⁻ 菌感染所致脓毒症致死的主要原因。脓毒症发生时, 肺组织中的炎症细胞因子表达增加, 促使 ALI/ARDS 发生^[9]。TLR4 是识别 G⁻ 菌 LPS 的主要受体, LPS 先与 CD4 结合, 再与 TLR4 结合, 使信号转导到细胞内, 通过细胞内的一系列生化反应激活 NF-κB 抑制物激酶(IKKs)复合物, NF-κB 抑制物(IκB)在 IKKs 复合物作用下磷酸化, 再被泛素连接酶复合物泛素化而降解, IκB 降解使 NF-κB 从抑制状态下得以解除,

NF- κ B 向胞核中转移,诱导 TNF- α 等细胞因子表达^[10]。有研究称,外周血中单核细胞 NF- κ B 活性明显增加的脓毒症患者预后较差,死亡者外周血炎性细胞 NF- κ B 活化程度较生存者高,说明 NF- κ B 活性与脓毒症发生发展的关系非常密切^[11]。本研究结果显示,大鼠在感染创伤弧菌后 1 h,肺组织 NF- κ B 的活性即明显增高达峰值,随后活性逐渐降低,到 24 h 恢复到正常水平,到 48 h 时仍维持在低活性水平。大鼠肺组织 TLR4 mRNA 则于染菌后 6 h 表达明显增加达峰值,随后逐渐降低,至 24 h 仍明显高于正常水平。大鼠肺组织 TNF- α 含量从染菌 1 h 就明显增加,12 h 达峰值,48 h 降到正常水平。肺组织 W/D 比值于染菌后 6 h 随着时间推移逐渐增大,于 48 h 达峰值。提示 TLR4-NF- κ B 通路参与了大鼠创伤弧菌脓毒症肺损伤早期的发生发展,且其他因素与该通路存在相互促进的作用。

脓毒症的主要病理生理特点是内毒素促进多种细胞因子的过度释放,在治疗上仅抑制其中 1~2 种炎症介质是不能达到治疗目的的,只有对其上游转导信号进行有效干预才有可能逆转疾病的发展,达到治疗目的。因此,针对 NF- κ B 的研究可能成为治疗的重要靶点。大量研究发现很多对 NF- κ B 相关疾病具有显著疗效的中药都有抑制 NF- κ B 活性的作用^[12]。血必净注射液为红花、赤芍、丹参、当归、川芎 5 种中药提取物的复方中成药制剂,其主要成分是红花黄色素 A、川芎嗪、丹参素、阿魏酸、芍药苷、原儿茶醛^[13]。有研究报道,血必净注射液能有效拮抗内毒素,下调促炎介质水平,调节免疫反应,并通过保护受损内皮、改善微循环,避免内毒素攻击所致的组织损伤^[14]。本研究结果显示,经过血必净注射液干预后 1 h NF- κ B 活性明显降低,6 h 时 NF- κ B 活性达低谷,接近正常水平,而后逐渐升高,到 48 h 达峰值,但仍较模型组 1 h 时活性低;TLR4 mRNA 在血必净干预后 6 h 时较模型组表达降低,12 h 时达峰值,明显高于正常水平;在血必净干预后 12 h TNF- α 含量较模型组明显减少,与正常对照组比较,12 h、24 h TNF- α 含量明显增加,并于 24 h 达峰值;与模型组比较,大鼠肺 W/D 比值于 24 h、48 h

明显减小,与正常对照组比较,于 12 h、24 h 明显增大。这些结果均提示血必净注射液能延缓和减轻创伤弧菌脓毒症大鼠肺脏的炎症损伤过程,可为临床治疗提供可靠依据。

综上所述,TLR4-NF- κ B 通路参与了创伤弧菌脓毒症肺损伤的早期病理生理过程,血必净注射液能抑制 NF- κ B 活性,延缓并减轻创伤弧菌脓毒症大鼠肺损伤,保护创伤弧菌脓毒症大鼠的肺组织。

参考文献

- [1] 李海燕,梁欢,卢中秋,等. 抗菌药物对创伤弧菌脓毒症大鼠血清抗炎/促炎细胞因子的影响. 中国危重病急救医学,2007,19(1):53-54.
- [2] Nemoto S, Vallejo JG, Knuefermann P, et al. Escherichia coli LPS-induced LV dysfunction: role of toll-like receptor-4 in the adult heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282(6): H2316-2323.
- [3] Wang P, Li N, Li JS, et al. The role of endotoxin, TNF-alpha, and IL-6 in inducing the state of growth hormone insensitivity. World J Gastroenterol, 2002, 8(3): 531-536.
- [4] 张秋金,沈洪,张维,等. 纳洛酮与甲基泼尼松龙联用对急性肺损伤大鼠肺组织核转录因子 κ B 表达的影响. 中国危重病急救医学,2005,17(6):370-373.
- [5] 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. 中国危重病急救医学,2002,14(8):489-491.
- [6] 梁欢,卢中秋,邱俏娜,等. 创伤弧菌脓毒症大鼠肝组织 CD14 和促/抗炎细胞因子基因表达及抗生素干预研究. 中华微生物学和免疫学杂志,2009,29(3):253-257.
- [7] Lu Z, Li M, Liang H, et al. Dynamic expressions of liver tissue apoptosis-related genes of vibrio vulnificus sepsis rats and the effects of antibacterial agents. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2009, 29(2): 193-197.
- [8] 卢中秋,卢才教,邱俏娜,等. 创伤弧菌脓毒症诊疗方案(草案). 中国危重病急救医学,2008,20(1):4-6.
- [9] Baumgarten G, Knuefermann P, Wrigge H, et al. Role of Toll-like receptor 4 for the pathogenesis of acute lung injury in Gram-negative sepsis. Eur J Anaesthesiol, 2006, 23(12): 1041-1048.
- [10] 杨玉荣,余锐萍,梁宏德. Toll-NF- κ B 信号途径及其介导的功能. 细胞生物学杂志,2007,29(4):483-486.
- [11] Böhrer H, Qiu F, Zimmermann T, et al. Role of NF-kappa B in the mortality of sepsis. J Clin Invest, 1997, 100(5): 972-985.
- [12] 陈红梅,李艳静,王进科,等. 中药调控 NF- κ B 活性的研究进展. 药学与临床研究,2008,16(2):118-124.
- [13] 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. 中国中西医结合急救杂志,2007,14(2):104-107.
- [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. 中国危重病急救医学,1998,10(6):323-325.

(收稿日期:2009-11-15)

(本文编辑:李银平)

欢迎订阅 2010 年《中国中西医结合急救杂志》

中文核心期刊 中国科技论文统计源期刊

中国中西医结合学会主办,全国各地邮局订阅,邮发代号:6-93

2010 年以前的刊物可在本刊社邮购部购买,电话:022-23042150