

血必净注射液对创伤弧菌脓毒症大鼠肺组织诱导型一氧化氮合酶及一氧化氮的影响

赵光举, 李忠旺, 孙 琦, 卢中秋, 周铁丽, 邱俏桦, 梁 欢, 洪广亮, 李萌芽

(温州医学院附属第一医院急诊科, 浙江 温州 325000)

【摘要】 目的 研究血必净注射液对创伤弧菌脓毒症大鼠肺组织诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性和一氧化氮(NO)含量的影响及意义。方法 将 110 只清洁级 SD 大鼠按随机数字表法分为正常对照组、模型组和血必净组。皮下注射创伤弧菌悬液制备创伤弧菌脓毒症模型。分别于术后 1、6、12、24、48 h 活杀 10 只动物, 留取肺组织, 检测 iNOS 活性、NO 含量、髓过氧化物酶(MPO)活性, 并观察肺组织病理变化。结果 模型组肺组织 iNOS 活性(U/mg)在染菌后 1、6、12、24 h(分别为 12.57 ± 3.20 , 22.17 ± 7.29 , 19.73 ± 6.23 , 14.37 ± 3.78)均明显高于正常对照组(6.69 ± 1.87 , 均 $P < 0.01$);血必净组 6、12、24 h iNOS 活性(分别为 14.97 ± 3.48 , 15.15 ± 5.46 , 10.28 ± 4.13)明显低于同时时间点模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。模型组肺组织 NO 含量($\mu\text{mol/g}$)在染菌后 1、6、12、24、48 h(分别为 14.53 ± 3.82 , 31.52 ± 7.01 , 41.32 ± 7.28 , 32.82 ± 5.42 , 24.82 ± 6.01)均显著高于正常对照组(4.94 ± 1.48 , 均 $P < 0.01$);血必净组肺组织 NO 含量在 12 h、24 h(分别为 30.93 ± 5.19 , 25.25 ± 4.67)与同时时间点模型组比较均明显下调(均 $P < 0.01$)。模型组肺组织 MPO 活性(U/g)在染菌后 1、6、12、24 h(分别为 1.21 ± 0.32 , 2.11 ± 0.28 , 2.05 ± 0.24 , 1.07 ± 0.36)也明显高于正常对照组(0.55 ± 0.18 , 均 $P < 0.01$);血必净组 MPO 活性在 6 h、12 h(分别为 1.69 ± 0.47 , 1.37 ± 0.42)与同时时间点模型组比较明显下调(均 $P < 0.01$)。染菌后 24 h, 模型组大鼠肺组织损伤明显, 血必净组大鼠肺损伤较模型组有所减轻。结论 iNOS 和 NO 参与了创伤弧菌脓毒症肺损伤的病理生理学过程;血必净注射液干预治疗能显著下调肺组织 iNOS 活性及 NO 生成, 减轻创伤弧菌感染所致的肺损伤。

【关键词】 创伤弧菌; 脓毒症; 一氧化氮; 诱导型一氧化氮合酶; 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.1008-9691.2010.02.011

Effect of Xuebijing injection (血必净注射液) on inducible nitric oxide synthase activity and nitric oxide levels in lung of rats with *Vibrio vulnificus* sepsis ZHAO Guang-ju, LI Zhong-wang, SUN Qi, LU Zhong-qiu, ZHOU Tie-li, QIU Qiao-meng, LIANG Huan, HONG Guang-liang, LI Meng-fang. 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 investigate the effects of Xuebijing injection (血必净注射液) on the inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity and nitric oxide (NO) levels in lung of rats with acute lung injury after *Vibrio vulnificus* sepsis and their significance. **Methods** One hundred and ten clean Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal control, *Vibrio vulnificus* sepsis model and Xuebijing treatment groups. *Vibrio vulnificus* sepsis model was established by subcutaneous injection of *Vibrio vulnificus* suspension. Ten animals were sacrificed at each of the following time points: 1, 6, 12, 24 and 48 hours after *Vibrio vulnificus* infection in the model and Xuebijing treatment groups, respectively. The lung tissue samples were collected to determine NO levels, the activities of pulmonary myeloperoxidase (MPO) and iNOS. The pathological changes in lung tissues were observed with light microscopy after hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results** The pulmonary iNOS activities (U/mg) in rats of model group at 1, 6, 12, 24 hours (12.57 ± 3.20 , 22.17 ± 7.29 , 19.73 ± 6.23 , 14.37 ± 3.78 , respectively) after infection were markedly higher than the activity in normal control group (6.69 ± 1.87 , all $P < 0.01$). The pulmonary iNOS activities in Xuebijing treatment group at 6, 12, 24 hours (14.97 ± 3.48 , 15.15 ± 5.46 , 10.28 ± 4.13) were markedly lower than those at the corresponding time points in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The levels of NO ($\mu\text{mol/g}$) in lung tissue of rats in model group at 1, 6, 12, 24, 48 hours (14.53 ± 3.82 , 31.52 ± 7.01 , 41.32 ± 7.28 , 32.82 ± 5.42 , 24.82 ± 6.01 , respectively) after infection were significantly higher than the levels in normal control group (4.94 ± 1.48 , all $P < 0.01$). The pulmonary NO levels at 12 hours and 24 hours (30.93 ± 5.19 , 25.25 ± 4.67) after infection in the Xuebijing treatment group were obviously down-regulated compared with those at the corresponding time points in the model group (both $P < 0.01$). The pulmonary MPO activities (U/g) in rats of model group at 1, 6, 12, 24 hours (1.21 ± 0.32 , 2.11 ± 0.28 , 2.05 ± 0.24 , 1.07 ± 0.36 , respectively) after infection were markedly higher than the activity in normal control group (0.55 ± 0.18 , all $P < 0.01$). Compared with the activities of model group at the corresponding time points, the pulmonary MPO activities at 6 hours and 12 hours (1.69 ± 0.47 , 1.37 ± 0.42) in Xuebijing treatment group were significantly down-regulated (both $P < 0.01$). At 24 hours after infection, the degree of lung damage was marked in the model group, while in Xuebijing treatment group it was milder. **Conclusion** iNOS and NO appear to be involved in the pathophysiology of *Vibrio vulnificus* septic lung injury. Treatment with Xuebijing injection could obviously reduce the iNOS activity and NO level and attenuate the lung damage in rats after *Vibrio*

vulnificus infection.

【Key words】 *Vibrio vulnificus*; Sepsis; Nitric oxide; Inducible nitric oxide synthase; Xuebijing injection

创伤弧菌脓毒症起病急骤,病情发展迅速,在 24~48 h 即可出现多器官功能障碍,病死率高^[1]。业已明确,在创伤弧菌脓毒症的发病过程中,肺部损伤的发生较早且最为突出,可发展为急性呼吸窘迫综合征(ARDS),最终可导致多器官功能障碍综合征(MODS)甚至死亡^[1-2],但其致病机制迄今尚未完全阐明。新近有研究表明,在盲肠结扎穿孔术(CLP)致脓毒症及烧伤等动物模型中,肺组织诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达显著上调,其催化产生的过量内源性一氧化氮(NO)可能参与了局部组织的炎症反应和急性肺损伤(ALI)的发病过程^[3-4]。本研究中拟通过构建创伤弧菌脓毒症大鼠模型,观察肺组织中 iNOS 和 NO 的变化,探讨血必净注射液对 iNOS 活性、NO 含量以及肺组织损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株制备:从创伤弧菌感染患者下肢血疱中抽取疱液,血平板上接种,37℃培养 24 h 后分离纯化,细菌鉴定为创伤弧菌,菌株编号为 705258。按常规方法制成 6×10^8 cfu/ml 的创伤弧菌悬液备用。

1.2 动物模型制备:清洁级 SD 大鼠,雌雄各半,体重 180~260 g,由温州医学院动物实验中心提供。大鼠左后肢皮下注射 1 ml/kg 创伤弧菌悬液,制作创伤弧菌脓毒症模型,模型动物符合创伤弧菌脓毒症诊断标准^[1,5]。

1.3 实验分组及处理:110 只大鼠按随机数字表法分为正常对照组、模型组、血必净组,后两组又按染菌后不同处死时间分为 5 个亚组,每组 10 只大鼠。正常对照组大鼠麻醉后处死。血必净组染菌后立即腹腔注射血必净注射液(天津红日药业股份有限公司产品)4 ml/kg,以后每隔 12 h 注射 1 次。于染菌后 1、6、12、24、48 h 处死大鼠,取肺组织,4℃生理盐水冲洗后迅速置于液氮中速冻,转移至 -70℃超低温冰箱中保存待用。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 肺组织 iNOS、髓过氧化物酶(MPO)活性及 NO 含量检测:取肺组织 100 mg 制备组织匀浆,离

心后取上清液,iNOS 和 MPO 用化学比色法测定,NO 用硝酸还原酶法测定,均严格按照测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书进行检测。

1.4.2 肺组织病理观察:取右肺中叶部分肺组织,甲醛水溶液固定,常规石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色后光镜下观察肺组织病理变化。

1.5 统计学处理:实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和 LSD 法进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织 iNOS 活性(表 1):模型组 1、6、12、24 h 肺组织 iNOS 活性均显著高于正常对照组,6 h 达峰值(均 $P < 0.01$)。血必净组 6、12、24 h iNOS 活性均较模型组明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠染菌后肺组织 iNOS 活性、NO 含量及 MPO 活性的变化比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	iNOS 活性(U/mg)	NO 含量(μ mol/g)	MPO 活性(U/g)
正常对照组	6.69±1.87	4.94±1.48	0.55±0.18
模型组 1 h	12.57±3.20 ^a	14.53±3.82 ^a	1.21±0.32 ^a
6 h	22.17±7.29 ^a	31.52±7.01 ^a	2.11±0.28 ^a
12 h	19.73±6.23 ^a	41.32±7.28 ^a	2.05±0.24 ^a
24 h	14.37±3.78 ^a	32.82±5.42 ^a	1.07±0.36 ^a
48 h	9.76±3.36	24.82±6.01 ^a	0.60±0.29
血必净组 1 h	12.45±4.50	15.95±4.01	1.26±0.30
6 h	14.97±3.48 ^b	27.49±4.06	1.69±0.47 ^c
12 h	15.15±5.46 ^c	30.93±5.19 ^c	1.37±0.42 ^c
24 h	10.28±4.13 ^c	25.25±4.67 ^c	0.93±0.23
48 h	8.48±3.62	21.88±4.36	0.60±0.26

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组同期比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

2.2 肺组织 NO 含量(表 1):模型组各时间点 NO 含量较正常对照组均显著增加(均 $P < 0.01$)。血必净组 12 h、24 h 肺组织 NO 水平明显受到抑制(均 $P < 0.01$)。

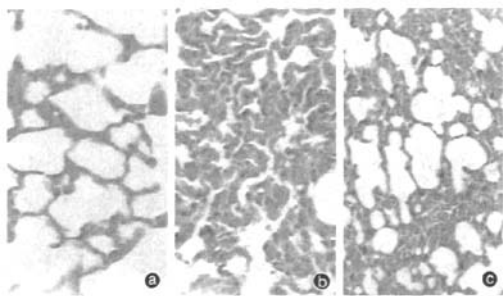
2.3 肺组织 MPO 活性(表 1):模型组 1 h MPO 活性较正常对照组显著升高($P < 0.01$),6 h 达峰值,48 h 恢复正常($P > 0.05$)。血必净组 6 h、12 h MPO 活性明显低于模型组(均 $P < 0.01$)。

2.4 肺组织病理观察(图 1):光镜下观察正常对照组肺组织结构清晰,肺泡壁完整,未见明显充血及水肿。模型组染菌 24 h 肺内毛细血管充血显著,肺间质水肿严重并伴有炎性细胞浸润,肺泡间隔不清,肺泡壁破裂,肺泡腔塌陷实变明显。血必净组肺间质充血、水肿较模型组明显减轻,炎性细胞浸润减少,肺泡腔仍然存在。

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:赵光举(1984-),男(汉族),江苏省人,医学硕士,医师。



①:正常对照组; ②:模型组; ③:血必净组

图 1 光镜下观察创伤弧菌脓毒症大鼠肺组织病理变化(HE, ×200)

3 讨论

本课题组在前期的研究中已经发现,创伤弧菌进入体内能激活脂多糖受体 CD14,即 Toll 样受体 4 (TLR4),导致机体损伤性炎症反应的级联放大,而这种损伤在肺部的表现较早且最为突出^[6],但其机制尚不清楚。业已明确,炎症因子、血小板活化因子、活性氧簇等均参与了脓毒症 ALI 的发生^[7];但有学者认为,NO 过度产生可能是脓毒性休克和组织器官损伤发生的最后共同通路之一^[8]。在正常肺组织中,NO 主要由气道上皮细胞、肺动脉内皮细胞中的神经型及内皮型一氧化氮合酶催化合成,是肺血管张力的重要调节物质^[9];但病理状态下,细菌内毒素及多种炎症因子可使 iNOS 活性增高,进而催化多种细胞合成大量 NO,最终引起血管病理性扩张及心肌收缩功能下降等病理损害^[10]。另据报道,通过 iNOS 抑制剂作用或 iNOS 基因敲除后,能显著减轻脓毒症发病过程中 ALI 的程度及微血管渗透^[11],但目前对于创伤弧菌脓毒症肺组织中 iNOS 和 NO 的变化规律及其与 ALI 的关系了解甚少。本研究表明,在创伤弧菌感染后 1 h,肺组织 iNOS 及 NO 已显著增加,且持续时间较长,24 h 仍明显高于正常对照组,并且与 MPO 及肺组织损伤程度密切相关。提示由 iNOS 催化合成的过量 NO 可能参与了创伤弧菌感染后肺部炎症反应和损伤的发生。

鉴于由 iNOS 催化合成的过量内源性 NO 在创伤弧菌脓毒症 ALI 发病过程中可能发挥关键作用,本实验中应用血必净注射液进行干预,并观察其对创伤弧菌脓毒症大鼠肺组织 iNOS 活性和 NO 含量的影响及对 ALI 的防治作用。研究发现,血必净注射液治疗后 6 h 即可降低肺组织 iNOS 活性,12 h 后 NO 含量也明显下降,同时肺组织 MPO 活性及肺损伤程度明显减轻,表明血必净注射液能有效减

轻 ALI 的发生,从而为创伤弧菌脓毒症组织器官损害的防治提供了新的依据和途径。

在血必净注射液的研究中已发现,单纯使用抗生素并不能提高严重脓毒症小鼠的存活率,而联合血必净注射液治疗则能显著提高其存活率,提示血必净注射液在脓毒症治疗中有着重要的价值^[12];血必净注射液具有显著的活血化瘀、改善微循环、抗炎及清除氧自由基的作用,因而能够有效降低脓毒症发病过程中组织器官损害的发生^[13];血必净注射液能够下调严重烧伤大鼠晚期炎症介质高迁移率族蛋白 B1 的表达,进而减轻烧伤大鼠肺组织炎症损害,有助于改善烧伤延迟复苏动物的预后^[14]。本实验结果表明,血必净注射液能减轻创伤弧菌脓毒症大鼠肺损伤的程度,其机制可能与抑制 iNOS 活性及其催化合成的内源性 NO 有关。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 卢中秋,李景荣.创伤弧菌脓毒症研究进展.中国危重病急救医学,2005,17(7):439-441.
- [3] Enkhbaatar P, Murakami K, Shimoda K, et al. The inducible nitric oxide synthase inhibitor BBS-2 prevents acute lung injury in sheep after burn and smoke inhalation injury. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167(7):1021-1026.
- [4] Razavi HM, Wang le F, Weicker S, et al. Pulmonary neutrophil infiltration in murine sepsis: role of inducible nitric oxide synthase. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 170(3):227-233.
- [5] 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.
- [6] 郑阿迈,陈玉素,李萌芳,等.创伤弧菌脓毒症大鼠肺组织脂多糖受体 CD14 mRNA、核因子- κ B 的基因动态表达.温州医学院学报,2008,38(6):534-536,540.
- [7] Brigham KL, Meyrick B. Endotoxin and lung injury. Am Rev Respir Dis, 1986, 133(5):913-927.
- [8] 李红云,姚咏明,施志国,等.抑制生物蝶呤合成对大鼠烫伤后金黄色葡萄球菌所致肺损伤的影响.解放军医学杂志,2001,26(3):182-185.
- [9] Gaston B, Drazen JM, Loscalzo J, et al. The biology of nitrogen oxides in the airways. Am J Respir Crit Care Med, 1994, 149(2 Pt 1):538-551.
- [10] Tinker AC, Wallace AV. Selective inhibitors of inducible nitric oxide synthase: potential agents for the treatment of inflammatory diseases? Curr Top Med Chem, 2006, 6(2):77-92.
- [11] Hesslinger C, Strub A, Boer R, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in respiratory diseases. Biochem Soc Trans, 2009, 37(Pt 4):886-891.
- [12] 王今达,雪琳.细菌、内毒素、炎症介质并治——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.
- [13] 李银平,乔佑杰,武子震,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] 王强,姚咏明,王文江,等.血必净注射液对烫伤大鼠肺组织高迁移率族蛋白 B1 表达的影响及意义.解放军医学杂志,2007,32(4):374-376.

(收稿日期:2010-01-22)

(本文编辑:李银平)