

深化对血必净注射液治疗脓毒症新机制的认识

姚咏明

(解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所, 北京 100048)

严重烧伤、创伤及外科大手术应激打击极易诱发脓毒症 (sepsis) 等感染并发症, 进一步发展可导致脓毒性休克、多器官功能障碍综合征 (MODS), 是临床烧伤、创伤和危重患者最主要的死亡原因之一^[1]。尽管早期液体复苏、新颖抗菌药物治疗、营养代谢及重要器官辅助性支持已取得长足进步, 但严重脓毒症的病死率仍居高不下 (30% ~ 70%), 成为直接影响患者预后、阻碍进一步提高急危重症救治成功率的世界性难题。因此, 深化对脓毒症的认识和防治水平无疑具有重要的理论价值及临床意义。

王今达教授是我国中西医结合急救医学的创始人, 血必净注射液是他根据“菌、毒、炎”并治理论, 经 30 余年临床实践研制成的国家中药二类新药, 是我国自主研发用于治疗脓毒症及 MODS 的有效药物, 目前已广泛应用于严重感染并发症等急危重症的临床救治^[2-3]。动物实验与临床观察表明, 血必净注射液具有活血化瘀、疏通脉络、溃散毒邪的功效, 能有效拮抗血中细菌内毒素活性, 抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等早期细胞因子大量产生, 减轻血管内皮细胞损伤; 在原发病控制的基础上, 可以辅助治疗由创伤、烧伤、感染等引起的脓毒症及 MODS, 临床疗效显著^[4]。尽管目前对于血必净注射液的作用机制已有所了解, 但其确切物质基础和关键调控环节仍不清楚, 新的作用途径值得进一步探讨。基于王今达教授提出“三证三法”的中医治则和“菌、毒、炎”并治理论, 我们认为中药多组分、多途径、多靶点的协同效应可能在脓毒症治疗中发挥独特作用。鉴于此, 从全新的角度深入探究中药血必净注射液对严重脓毒症的作用机制, 明确其详细干预途径和影响环节具有重要的理论意义和实用价值, 它将进一步提升我国中药防治脓毒症的研究水平和国际影响。近年来, 在国家重点基础研究发展计划项目和国家自然科学基金等课题的支持下, 我们系统探讨了中药血必净注射液防治脓毒症和 MODS 的分子及细胞作用机制, 发现其主要通过抑制晚期炎症细胞因子——高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 表达, 促进调节性 T 细胞凋亡及抑制调节性树突细胞活性, 减少单核细胞组织因子分泌等途径改善机体炎症、免疫和凝血功能, 进而针对严重脓毒症的 3 个核心环节发挥共同调节效应。

1 血必净注射液抑制晚期炎症介质合成与释放

既往普遍认为, “早期”致炎细胞因子 [包括 TNF- α 、白细胞介素-1 (IL-1) 等] 是引起机体失控性炎症反应与组织

损害的关键介质。新近的研究发现, HMGB1 可能作为新的“晚期”炎症因子参与了脓毒症的致病过程, 应用 HMGB1 合成抑制剂可有效防止脓毒症的发生与发展过程, 并不同程度地减轻组织损害和改善动物预后, 提示针对 HMGB1 这一潜在“晚期”细胞因子进行干预可能有助于脓毒症及 MODS 的防治^[5-6]。本课题组前期的实验结果显示, 严重损伤后机体肝、肺、肾等主要器官 HMGB1 基因与蛋白的表达均明显上调, 其动力学反应表现为产生较晚、下降缓慢的“晚期炎症介质”特征。进一步分析可见, 组织 HMGB1 表达水平与动物相应器官的功能损害密切相关, 提示 HMGB1 在诱导严重损伤后失控性炎症反应和多器官功能损害中发挥了重要作用^[7-9]。采用血必净注射液治疗在有效下调严重损伤机体组织 HMGB1 基因 / 蛋白表达的同时, 多器官病理损害明显减轻, 器官功能迅速改善, 实验动物的死亡率显著下降^[10]。由此可见, 血必净注射液干预主要通过抑制晚期炎症介质——HMGB1 的合成与释放, 保护动物的主要器官, 进而防止严重损伤后脓毒症和 MODS 的发生与发展, 改善动物预后^[7-12]。

2 血必净注射液促进调节性 T 细胞凋亡及抑制调节性树突细胞活性

业已明确, 调节性 T 细胞系一类具有免疫调节功能的成熟 T 细胞亚群, 它不仅参与了免疫自稳、移植耐受、肿瘤免疫、过敏反应等病理生理过程, 而且在感染免疫方面可通过对细胞免疫抑制发挥核心调节作用。因此, 充分了解急性损伤后调节性 T 细胞介导免疫反应的确切作用环节, 可进一步阐明脓毒症的发生机制及调节途径, 从而为脓毒症的预防与治疗提供新思路^[13]。通过采用体外内毒素刺激细胞模型, 并结合严重腹腔感染诱发脓毒症动物模型, 我们系统探讨了调节性 T 细胞凋亡对效应 T 细胞免疫功能的影响及血必净注射液的干预作用, 该研究有助于深化对调节性 T 细胞介导的效应 T 细胞免疫功能异常的新认识^[14-15]。实验结果证实, 调节性 T 细胞凋亡能有效减轻调节性 T 细胞对效应 T 细胞的免疫抑制功能, 血必净注射液通过天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3/9 (caspase-3/9) 途径促进调节性 T 细胞凋亡, 从而显著改善脓毒症免疫紊乱状态^[16-18]。

近年来, 作为树突细胞 (DC) 亚群的调节性树突细胞受到广泛关注, 调节性树突细胞是一些具有负向调节免疫功能的未成熟 DC 亚型, 其表达共刺激分子和主要组织相容性复合物 II 的能力很弱。目前的研究显示, 调节性树突细胞负向调控免疫的作用主要是通过分泌 IL-10 从而影响“下游”细胞的分化及功能来实现的^[19-20]。IL-10 促进调节性 T 细胞的分化, 而调节性 T 细胞分泌的 IL-10 反过来又促进调节性 T 细胞的分化, 同时抑制辅助性 T 细胞 1 型细胞因子的生成^[20]。在本课题组前期的研究中观察了中药血必净

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2013.04.001

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81130035, 81071545, 30971192); 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2012CB518102, 2005CB522602)

通信作者: 姚咏明, Email: c_ff@sina.com

注射液体外对调节性树突细胞——CD11c^{low}CD45RB^{high} DC 分化成熟及其免疫功能的影响,旨在进一步明确血必净注射液能否通过调节 CD11c^{low}CD45RB^{high} DC 功能达到改善脓毒症预后的目的。结果证实,血必净注射液能抑制 CD11c^{low}CD45RB^{high} DC 的分泌功能,使 TNF-α 和 IL-10 产生明显减少,从而使促炎/抗炎细胞因子反应重新达到平衡;并且血必净注射液通过 CD11c^{low}CD45RB^{high} DC 促进 T 细胞增殖活性,提高细胞免疫应答效应,最终降低动物死亡率^[20]。因此,我们认为调节性树突细胞是血必净注射液作用于脓毒症的重要免疫调控途径之一^[21]。

3 血必净注射液减少单核细胞组织因子分泌

近年来的资料提示,血细胞源性组织因子主要参与病理性凝血过程,在血栓性疾病中含量和活性均增高;严重脓毒症同样存在凝血功能紊乱,并且血细胞源性组织因子在其中发挥重要促凝效应^[22-23]。本系列研究中,我们通过体外和体内试验,分析了血必净注射液是否通过干预脓毒症时单核细胞组织因子及其重要作用受体——蛋白酶激活受体家族(PAR)的表达,从而对机体凝血功能产生潜在影响。结果显示,低、中、高浓度血必净注射液均可不同程度地下调内毒素诱导单核细胞 PAR-1 表达,并明显减少组织因子、IL-6、TNF-α 的分泌,从而改善单核细胞介导凝血功能与炎症反应^[24-25]。同样,血必净注射液治疗后脓毒症动物单核细胞组织因子分泌能力及其表面 PAR-1 表达显著减弱,血浆炎症细胞因子水平迅速降低,血小板数量恢复至正常范围,凝血功能障碍得以有效纠正^[26-29]。

上述结果提示,血必净注射液阻断了脓毒症病理过程中炎症反应与凝血紊乱之间的“交汇作用”,遏制了炎症与凝血相互促进的恶性循环状态,进而对严重脓毒症的发生与发展产生显著的防护效应^[26-28]。

参考文献

[1] 梁华平,姚咏明,王正国. 创伤后脓毒症的治疗现状不容乐观——预警研究值得重视. 第三军医大学学报, 2011, 33 (21): 2223-2226.

[2] 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.

[3] 王今达,李志军,李银平. 从“三证三法”辨证论治脓毒症. 中国危重病急救医学, 2006, 18 (11): 643-644.

[4] 李志军,任新生,李银平,等. “三证三法”及“菌毒炎并治”治疗脓毒症的研究进展. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19 (6): 321-323.

[5] Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. Annu Rev Immunol, 2011, 29 (1): 139-162.

[6] Liu QY, Yao YM. Inflammatory response and immune regulation of high mobility group box-1 protein in treatment of sepsis. World J Emerg Med, 2010, 1 (2): 93-98.

[7] 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.

[8] 王强,姚咏明,王文江,等. 血必净注射液对烫伤大鼠肾组织高迁移率族蛋白 B1 和急性肾损伤的干预效果. 中国医学科学院学报, 2007, 29 (4): 478-483, 插 1.

[9] 王彦博,姚咏明,王强,等. 血必净注射液对烫伤大鼠高迁移率

族蛋白 B1 表达和急性肝损伤的影响. 中华烧伤杂志, 2009, 25 (3): 171-175.

[10] 王文江,姚咏明,咸力明,等. 血必净注射液对烧伤延迟复苏大鼠器官功能及死亡率的影响. 中国危重病急救医学, 2006, 18 (1): 16-18.

[11] Wang YB, Wang Q, Yao YM, et al. The effect of Xuebijing injection (血必净注射液) on systemic lupus erythematosus in mice. Chin J Integr Med, In press 2013.

[12] 焦丽娜,姚咏明,寿松涛. 脓毒症大鼠肝组织凝溶胶蛋白表达变化及血必净注射液干预的影响. 中华创伤杂志, 2010, 26 (9): 794-798.

[13] Jiang LN, Yao YM, Sheng ZY. The role of regulatory T cells in the pathogenesis of sepsis and its clinical implication. J Interferon Cytokine Res, 2012, 32 (8): 341-349.

[14] 戴新贵,姚咏明,艾宇航. 血必净注射液对脂多糖刺激大鼠调节性 T 细胞凋亡及其介导效应 T 细胞免疫功能的影响. 中华急诊医学杂志, 2009, 18 (9): 932-936.

[15] 艾宇航,姚咏明,戴新贵. 脓毒症大鼠调节性 T 细胞凋亡对效应性 T 细胞增殖和分泌功能的影响及血必净注射液的干预作用. 中华外科杂志, 2009, 47 (1): 58-61.

[16] 艾宇航,姚咏明,戴新贵. 不同剂量血必净对内毒素诱导调节性 T 细胞凋亡的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17 (3): 141-144.

[17] 戴新贵,姚咏明,艾宇航. 脓毒症大鼠调节性 T 细胞凋亡对辅助性 T 细胞漂移的影响及血必净注射液的干预作用. 中国危重病急救医学, 2009, 21 (3): 135-138.

[18] 戴新贵,姚咏明,艾宇航,等. 血必净促进内毒素/脂多糖刺激调节性 T 淋巴细胞凋亡并介导辅助性 T 细胞漂移的作用. 中华烧伤杂志, 2009, 25 (2): 106-110.

[19] Fujita S, Seino K, Sato K, et al. Regulatory dendritic cells act as regulators of acute lethal systemic inflammatory response. Blood, 2006, 107 (9): 3656-3664.

[20] 姚咏明,刘庆阳. 调节性树突状细胞对脓毒症的调控效应及潜在问题. 中国急救医学, 2011, 31 (7): 577-579.

[21] Liu QY, Yao YM, Zhang SW, et al. Astragalus polysaccharides regulate T cell-mediated immunity via CD11c^{high}CD45RB^{low} DCs in vitro. J Ethnopharmacol, 2011, 136 (3): 457-464.

[22] Mackman N. Alternatively spliced tissue factor—one cut too many?. Thromb Haemost, 2007, 97 (1): 5-8.

[23] 李银平,郑贵军,武子霞,等. 血必净注射液对脓毒症大鼠活化蛋白 C 及凝血功能的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15 (6): 361-364.

[24] 归咏刚,姚咏明,柴艳芬. 血必净注射液对内毒素刺激大鼠单核细胞组织因子的影响. 中华实验外科杂志, 2009, 26 (3): 289-291.

[25] 归咏刚,姚咏明,柴艳芬. 血必净注射液与活化蛋白 C 对脂多糖诱导大鼠单核细胞组织因子干预效果的比较研究. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16 (6): 326-329.

[26] 归咏刚,姚咏明,柴艳芬. 血必净注射液对脓毒症大鼠单核细胞组织因子及凝血功能的影响. 中华实验外科杂志, 2010, 27 (1): 32-34.

[27] 归咏刚,姚咏明,柴艳芬. 血必净注射液对脓毒症大鼠白细胞介素-6 表达及血小板的影响. 中国急救复苏与灾害医学杂志, 2009, 4 (1): 13-16.

[28] 郑贵军,武子霞,李银平,等. 脂多糖诱导大鼠主动脉内皮细胞蛋白 C 受体和蛋白酶活化受体 1 的表达及血必净注射液的干预作用. 中国危重病急救医学, 2009, 21 (3): 175-178.

[29] 郑贵军,武子霞,李银平,等. 脓毒症大鼠血小板膜糖蛋白的表达变化及血必净的干预作用. 中国危重病急救医学, 2008, 20 (12): 758-760.

(收稿日期: 2013-05-02)

(本文编辑: 李银平)