

脓毒症大鼠血清高迁移率族蛋白 B1 的变化规律及血必净的干预效果研究

赵士兵 何先弟 汪华学 郑胜永 邓晰明 段立彬

摘要 **目的** 观察脓毒症大鼠血清中高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 的变化规律及血必净的干预效果。**方法** 大鼠尾静脉注射内毒素 (Lipopolysaccharide, LPS) 5 mg/kg 体重, 制备脓毒症动物模型。实验一: 50 只 Wistar 大鼠按随机数字表法分为正常组 (A 组, 10 只), LPS 模型组 (B 组, 10 只), LPS + 血必净治疗组 (C 组, 30 只), C 组依不同血必净起始治疗时间再分为 C1、C2、C3 组即 LPS 造模前 2 h 治疗组、造模后 2、8 h 治疗组, 每组 10 只。各组大鼠分别于造模后 4、12、24、48、72 h 尾静脉采血, 采用 Western blot 法检测血清中 HMGB1 含量。实验二: 另取 30 只 Wistar 大鼠分为 LPS 模型组 (D 组) 和 LPS + 血必净治疗组 (E 组), 每组 15 只, 处理分别同 B 组和 C1 组, 于造模后 12、24、48 h 各处死 5 只, 留取血及组织标本, 检测 ALT、AST、Cr、BUN 指标并观察肝、肺、肾组织病理变化。**结果** (1) 与 A 组比较, B 组不同时间点血清中 HMGB1 含量均明显升高 ($P < 0.05$); 与 B 组比较, C1、C2、C3 组在 12、24、48、72 h 时间点血清 HMGB1 含量均下降, C3 组下降幅度小于 C1 和 C2 组 ($P < 0.05$)。 (2) 与 A 组比较, D 组 ALT、AST、Cr、BUN 均明显升高且于 24 h 达峰值 ($P < 0.05$); 与 D 组比较, E 组 ALT 各时间点及 AST、Cr、BUN 在 24、48 h 亦下降明显 ($P < 0.05$)。 (3) D 组大鼠肺、肝、肾组织病理切片显示: 有局部充血出血、细胞水肿、变性坏死、炎症细胞浸润、特征性结构破坏等, 且在 24、48 h 出现严重病变; E 组相应时间点较 D 组镜下病变明显减轻。**结论** 脓毒症大鼠血清中 HMGB1 含量增高, 峰值出现晚, 高值持续时间长; HMGB1 在脓毒症大鼠过度的炎症反应与多脏器功能损害中具有重要作用; 血必净注射液可以降低脓毒症大鼠血清中 HMGB1 的含量, 改善生化指标, 减轻肝、肺、肾组织严重的炎症反应, 且尽早使用效果更好。

关键词 脓毒症; 血必净; 高迁移率族蛋白 B1

Changing Laws of Serum High Mobility Group Box 1 Protein in Septic Rats and the Intervention Effect of Xuebijing ZHAO Shi-bing, HE Xian-di, WANG Hua-xue, ZHENG Sheng-yong, DENG Xi-ming, and DUAN Li-bin *Department of Intensive Care Unit, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Anhui (233004), China*

ABSTRACT **Objective** To investigate the changing laws of serum high mobility group box 1 protein (HMGB1) in septic rats and intervention effect of Xuebijing on it. **Methods** Lipopolysaccharide (LPS) (5 mg/kg BW) was intravenously injected into the tail vein of healthy male Wistar rats to prepare the sepsis rat model. In Experiment 1: 50 Wistar rats were randomly divided into three groups, i.e., the normal group (A, $n = 10$); the LPS model group (B, $n = 10$), the LPS + Xuebijing treatment group (C, $n = 30$). Rats in the C group were further divided into three subgroups, i.e., 2 h before LPS injection (group C1), 2 h after LPS injection (group C2), and 8 h after LPS injection (group C3), 10 in each group. Blood samples were collected from the caudal vein to detect serum HMGB1 levels by Western blot at 4, 12, 24, 48, and 72 h after LPS injection. Experiment 2: 30 Wistar rats were equally divided into the LPS model group (D) and the LPS + Xuebijing treatment group (E), 15 in each group. They were treated as rats in the B group and the C1 group respectively. Five rats were sacrificed at 12, 24, and 48 h after LPS injection in the two groups. Blood

基金项目: 安徽省“十二五”临床重点培育专科建设项目 (No. 01P44)

作者单位: 安徽省蚌埠医学院第一附属医院重症医学科 (蚌埠 233004)

通讯作者: 何先弟, Tel: 0552-3086167, E-mail: byyfyhxd@sina.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.06.0739

as well as the tissue samples were harvested to measure such indices as ALT, AST, Cr, and BUN, as well as pathological changes of liver, lung, and kidney. Results (1) Compared with the A group, serum HMGB1 levels were higher at various time points in the B group ($P < 0.05$). Compared with the B group, serum HMGB1 levels at 12, 24, 48, and 72 h decreased in the C1, C2, and C3 groups. Besides, the decrease was more obvious at 24 h and 48 h. The decrement in the C3 group was less than that in the C1 and C2 groups ($P < 0.05$). (2) In the D group, ALT, AST, Cr, and BUN were significantly higher than those in the A group and reached the peak at 24 h ($P < 0.05$). Compared with the E group, AST, Cr, and BUN at 24 and 48 h, and ALT at each time point decreased significantly in the E group ($P < 0.05$). (3) The results of pathological section of liver, lung, and kidney showed local congestion and hemorrhage, cell edema/necrosis/degeneration, infiltration of inflammatory cells, damage of characteristic structures and so on; particularly serious lesion occurred at 24 and 48 h in the D group. The microscopic lesion was obviously alleviated in the E group than in the D group at corresponding time points. Conclusions The serum HMGB1 levels increased in septic rats, with late occurrence of peak value and longer duration of the high value. HMGB1 played an important role in excessive inflammatory response and multiple organ dysfunction. Xuebijing could reduce the serum levels of HMGB1, improve biochemical parameters, and attenuate severe inflammatory response of liver, lung, and kidney tissues in septic rats. Besides, the earlier use, the better effect obtained.

KEYWORDS sepsis; Xuebijing; high mobility group box 1 protein

脓毒症作为感染引起的致命性全身炎症反应综合征,是严重创伤、烧伤、休克、大手术后常见的并发症,在美国,每年有逾 40 万例脓毒症患者,病死率 > 30%,其较高的发病率与病死率一直无法得到有效控制^[1],近些年,Wang H^[2,3]等通过实验研究发现高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 参与了脓毒症的晚期发病过程,是内毒素致死效应的重要炎症介质。本实验通过大鼠尾静脉注射内毒素(LPS)制作脓毒症大鼠模型,研究其 HMGB1 的变化规律,并采用血必净治疗观测血清中 HMGB1 前后变化,以及对重要脏器功能的影响,从而能够为正确认识脓毒症的发病机制和临床治疗脓毒症提供实验依据。

材料与方法

1 动物 Wistar 大鼠 80 只,雄性,清洁级,体重 200 ~ 250 g,购自中科院上海动物实验中心,动物许可证号:SCXK(沪)2012-0002;蚌埠医学院实验动物中心,使用许可证号:SYXK(皖)2012-002,单笼饲养。

2 药物 血必净注射液(10 mL/支,天津红日药业股份有限公司,批号:1108151);生理盐水(10 mL/支,上海信谊金朱药业有限公司,批号:110902)。

3 试剂及仪器 LPS (Sigma 公司);兔抗 HMGB1 多克隆抗体 (Abcam 公司);羊抗兔 IgG-HRP、 β -actin 抗体 (深圳晶美生物工程有限公司);化学发光试剂 (Pierce 公司);SDS (Sigma 公司);

PVDF 膜 (Millipore 公司);水平和垂直电泳槽、电转移装置、凝胶成像分析系统 (Bio-Rad);全自动生化分析仪 (日本奥林巴斯公司, Olympus-AU5400i)。

4 方法

4.1 分组 大鼠适应性饲养 1 周后,称重编号,按随机数字表法分组,实验前后不禁食水。动物实验一:探讨脓毒症大鼠血清 HMGB1 变化规律。取大鼠 Wistar 50 只分为 3 组:正常对照组 (A 组) 10 只、LPS 模型组 (B 组) 10 只、LPS + 血必净治疗组 (C 组) 30 只, C 组依血必净起始治疗时间不同再分为 3 个亚组: C1 组 (造模前 2 h 开始注射血必净)、C2 组 (造模后 2 h 开始注射血必净)、C3 组 (造模后 8 h 开始注射血必净), 每组 10 只。动物实验二:探讨血必净对脓毒症大鼠重要脏器功能的影响。另取 Wistar 大鼠 30 只分为 LPS 模型组 (D 组)、LPS + 血必净治疗组 (E 组) 2 组, 每组 15 只, E 组于造模前 2 h 开始注射血必净。

4.2 模型制备 制备脓毒症大鼠模型参照文献 [4-6],除正常对照组外,其余各组大鼠均尾静脉注射 LPS, LPS 用生理盐水稀释为 1 mg/mL,按 5 mg/kg 体重给药,仅给药 1 次,同时给予正常对照组注射等量生理盐水。

4.3 给药及处理方法 分组给药:各时间点分别给予 C1、C2、C3 和 E 组大鼠尾静脉注射血必净,治疗剂量参照文献 [5-7], 4 mL/kg 体重 (剂量等同于临床剂量),用生理盐水等体积稀释,每 12 h 注射 1 次,共 6 次至 72 h;同时对对照组和模型组注射等量生理盐水。

处理方法:动物实验一,各造模组大鼠于造模后 4、12、24、48、72 h 各时间点大鼠尾静脉抽血 0.5~0.8 mL,4℃下静置 30 min,3 000 r/min,离心 10 min,吸取血清于-80℃保存待测;A 组于实验结束后麻醉处死,留血及肺、肝、肾组织标本。动物实验二,D、E 组大鼠分别于 LPS 造模后 24、48、72 h 3 个时间点麻醉处死,各 5 只,心脏采血留取血标本,取肺、肝、肾组织于 10% 中性甲醛中固定。

5 检测指标及检测方法

5.1 观察大鼠的一般状况 主要观察记录大鼠精神状态、活动量、进食进水、大便性状、毛发、呼吸状态以及死亡情况等。

5.2 血清 HMGB1 含量测定 采用 Western blot 的检测方法。取冻存血清融化后离心取上清, PBS 稀释,24 μL 血清加入 1×上样缓冲液 6 μL,煮沸 5 min,迅速冰浴,离心 30 s,吸取样品,每孔加样约 20 μL,15% 浓缩胶电泳,60 V 电压下电泳 45 min,然后在 100 V 电压下 4% 分离胶电泳 2 h,见溴酚兰迁移至分离胶底线为止,取出凝胶,取 PVDF 膜转膜完成后,在摇床上用 TBS 洗 10 min×3 次,以 5% 的脱脂奶粉 TBST 液封闭 1 h,从封闭液中取出 PVDF 膜加入一抗(兔抗 HMGB1 多克隆抗体),稀释比例为 1:500,37℃孵育 1 h,TBS 洗 10 min×3 次,加二抗(HRP 标记的山羊抗兔 IgG),稀释倍数为 1:10 000,37℃孵育 1 h,TBS 洗 10 min×3 次,在暗室中,进行化学发光反应、压片、显影、定影等处理,凝胶成像分析系统分析结果,目标蛋白相对表达量=目标蛋白吸光度/β-actin。

5.3 生化指标 ALT、AST、Cr、BUN 均在本院检验科由全自动生化分析仪测定。

5.4 病理学观察 肝、肺、肾组织由 10% 中性甲醛固定后,石蜡包埋,HE 染色,切片,光镜下观察。

6 统计学方法 数据采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析,组间比较采用 SNK 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠的一般状况 正常对照组大鼠精神良好、呼吸平稳、活动自如、饮食佳、毛发光亮、无腹泻;模型组大鼠注射 LPS 2~3 h 即可见精神不振、活动减少,12~24 h 症状明显加重,表现为精神萎靡、寒战、呼吸急促、被毛脏湿、拒饮拒食,腹泻,到 48 h 死亡率 50%,超过 48 h 后大鼠精神逐渐好转,活动和饮

食均增加;C1、C2、C3 组 LPS 注射后 24 h 内大鼠总体表现与模型组类似,于 24 h 后大鼠症状开始改善,且恢复较快,死亡大鼠数分别为 1、2 和 3 只,48~72 h 间大鼠无腹泻、活动良好、自由进食水,表现与正常对照组比较无差异,到 72 h 治疗结束,死亡大鼠数分别是 2 只、2 只和 4 只。

2 各组大鼠不同时间点血清中 HMGB1 含量比较(表 1、图 1) 与 A 组比较,B 组 LPS 注射后 4 h 血清中 HMGB1 含量开始升高,24 h 达到峰值,48、72 h 血清中 HMGB1 仍维持较高的水平,对应各时间点均明显高于 A 组($P < 0.05$);与 B 组比较,C1、C2、C3 组在 4 h HMGB1 水平下降不明显($P > 0.05$);与 B 组比较,在 12 h,C1、C2 组下降明显($P < 0.05$),C3 组下降不明显($P > 0.05$);在 24、48、72 h 时间点,C1、C2、C3 组 HMGB1 水平较 B 组均明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。C 组内 HMGB1 水平比较,C1、C2 之间在各时间点比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$);在 4 h 时 C1、C2、C3 组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),在 12、24、48、72 h 时间点,C1、C2 组 HMGB1 水平均较 C3 组下降明显($P < 0.05$)。

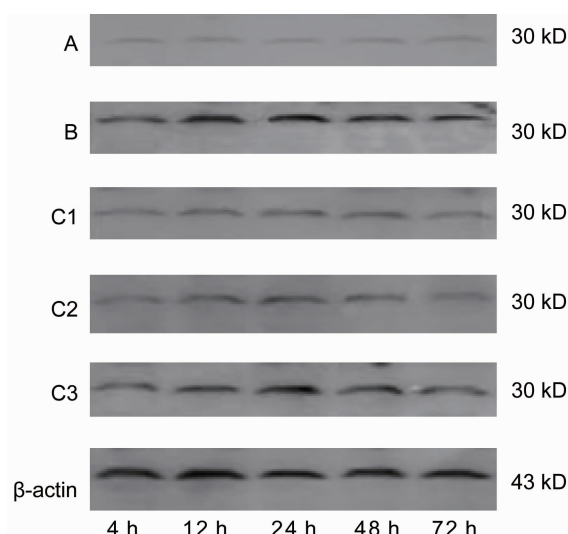


图 1 各组大鼠血清中 HMGB1 含量电泳图

3 各组大鼠 ALT、AST、Cr、BUN 测定结果比较(表 2) 与 A 组比较,D 组 ALT、AST、Cr、BUN 于 12、24、48 h 均升高($P < 0.05$),且于 24 h 达峰值。与 D 组比较,E 组 ALT 在 12、24、48 h 均有下降($P < 0.05$);AST、Cr、BUN 在 12 h 无明显下降($P > 0.05$),在 24、48 h 明显下降($P < 0.05$)。

4 病理结果(图 2)

4.1 肺脏病理学变化 A 组肺泡结构完整,形态

表 1 各组大鼠在不同时间点血清中 HMGB1 含量比较 [灰度比值(HMGB1/β-actin), $\bar{x} \pm s$]

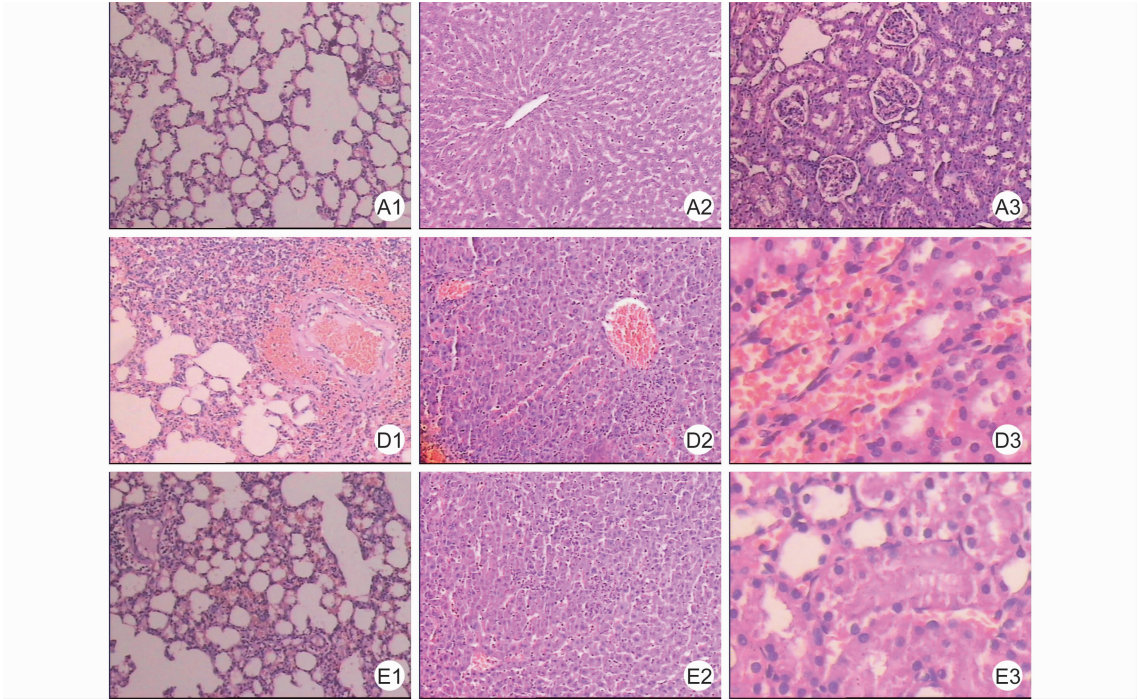
组别	HMGB1/β-actin				
	4 h	12 h	24 h	48 h	72 h
A	15.32 ± 2.78 (10)	15.42 ± 2.80 (10)	15.96 ± 3.32 (10)	16.14 ± 2.05 (10)	15.85 ± 2.56 (10)
B	22.75 ± 4.45* (9)	61.96 ± 6.52* (8)	90.30 ± 6.32* (6)	78.65 ± 7.49* (5)	50.91 ± 6.16* (5)
C1	19.57 ± 3.74 (10)	39.92 ± 3.50 [△] (10)	47.97 ± 7.05 [△] (9)	38.57 ± 7.42 [△] (8)	20.57 ± 4.29 [△] (8)
C2	21.37 ± 3.54 (10)	41.76 ± 4.74 [△] (9)	52.58 ± 5.62 [△] (8)	41.96 ± 4.18 [△] (8)	22.66 ± 3.97 [△] (8)
C3	20.92 ± 3.94 (10)	59.61 ± 6.72 [▲] (9)	69.18 ± 7.07 [▲] (7)	51.07 ± 8.89 [▲] (7)	28.09 ± 5.45 [▲] (6)

注:与 A 组同期比较,* $P < 0.05$;与 B 组同期比较, $^{\Delta}P < 0.05$;与 C 组内同期比较, $^{\Delta}P < 0.05$;()内数据为动物数

表 2 各组大鼠血清中 ALT、AST、Cr、BUN 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	ALT (U/L)	AST (U/L)	Cr (μmol/L)	BUN (mmol/L)
A	5		53.65 ± 7.67	139.79 ± 8.92	47.82 ± 4.56	4.58 ± 1.50
D	5	12 h	100.47 ± 7.39*	428.50 ± 44.25*	86.70 ± 8.28*	12.96 ± 1.49*
		24 h	241.07 ± 16.85*	561.28 ± 124.65*	131.12 ± 11.22*	16.76 ± 2.28*
		48 h	161.60 ± 6.41*	370.72 ± 75.82*	108.62 ± 18.51*	11.44 ± 2.12*
E	5	12 h	87.49 ± 7.21 [△]	378.27 ± 46.75	99.87 ± 9.83	11.98 ± 1.81
		24 h	110.35 ± 8.92 [△]	248.11 ± 41.14 [△]	72.48 ± 7.51 [△]	11.08 ± 1.17 [△]
		48 h	76.27 ± 5.68 [△]	219.31 ± 22.29 [△]	64.40 ± 9.74 [△]	7.86 ± 1.09 [△]

注:与 A 组同期比较,* $P < 0.05$;与 D 组同期比较, $^{\Delta}P < 0.05$



注: A 为正常组,其中 A1 为肺组织,A2 为肝组织,A3 为肾组织;D 为模型组,其中 D1 为模型组肺组织,D2 为模型组肝组织, D3 为模型组肾组织;E 组为造模前 2 h 血必净治疗组,其中 E1 造模前 2 h 血必净治疗组肺组织,E2 造模前 2 h 血必净治疗组肝组织,E3 造模前 2 h 血必净治疗组肾组织

图 2 A、D、E 组大鼠 24 h 肺、肝、肾组织病理切片观察结果
(HE 染色,A1 × 40;A2、A3、D1、D2、E1、E2 × 100;D3、E3 × 400)

正常,未见充血、水肿以及炎症细胞浸润等表现。12 h:D 组可见肺泡壁和肺间质广泛充血出血,炎症细胞浸润,间质水肿;E 组可见病变较 D 组有所减轻,肺泡大小不一,肺间质内可见红细胞渗出及炎症细胞浸润。24 h:较 12 h 损伤的范围进一步扩大,D 组出现肺泡大量出血,肺间质明显水肿,微血栓形成,可见局

灶性肺不张和肺泡间隔明显增宽,部分肺组织出现明显实变;E 组较 D 组病变减轻,局部有小灶性轻度充血,肺泡壁轻度增厚伴间质水肿及炎症细胞浸润。48 h:D 组病变与 24 h 相似,但病变范围更加广泛, E 组病变减轻,可见局灶性轻—中度的肺泡壁充血、增厚,可见较多炎症细胞浸润。

4.2 肝脏病理学变化 A 组肝小叶结构完整,无肝细胞变性坏死。12 h:D 组肝脏内可见较为广泛的中央静脉及肝窦内充血、淤血,并有肝窦扩张,间质内能见到较多的炎症细胞浸润;E 组较 D 组病变轻,可见中央静脉及肝窦内淤血、扩张,间质内有少许炎症细胞浸润。24 h:较 12 h 损伤范围逐步扩大,D 组肝窦、肝索形态结构出现不同程度的破坏和消失;间质内伴有大量的炎细胞浸润和红细胞渗出,肝细胞水肿,并开始出现片状肝细胞坏死;E 组病变明显轻于 D 组,仍可见肝窦内充血,间质炎症细胞浸润,有小灶性肝细胞坏死。48 h:D 组病变较 24 h 进一步加重,可见有成片的肝细胞水肿、空泡变性及坏死,肝索断裂与肝窦结构变形消失,局部呈现出残存肿胀的肝细胞,其间有广泛的炎细胞浸润;E 组病变较 D 组显著减轻。

4.3 肾脏病理学变化 A 组可见肾小球、肾小管结构完整,未见有炎细胞浸润及细胞变性坏死;D 组肾间质出现较为大量的炎细胞浸润,并在炎症灶周围可见有肾小管结构破坏,上皮细胞空泡变性、脱落,细胞边界模糊,可见红细胞渗出,病变以 24 h 为重;E 组镜下病变与相应时间点 D 组比较,可见炎细胞浸润、肾小管结构破坏、空泡变性情况明显减轻。

讨 论

脓毒症是重症感染、创伤、大手术后、SAP 和休克等疾病的常见并发症,病情持续进展可导致脓毒性休克、多脏器功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome,MODS)甚至死亡。内毒素系革兰阴性细菌细胞壁主要结构成分之一,为脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)。LPS 与 CD14 或 TLRs 结合后通过跨膜受体将信号传入胞核,最终产生大量促炎和抗炎介质失控释放,从而导致脓毒症、脓毒性休克、乃至 MODS 的发生^[2,8]。本实验观察到,大鼠注射 LPS 后即可见精神不振、活动减少、寒战、呼吸急促、被毛脏湿、拒饮拒食、腹泻,不断有大鼠死亡等表现,表明通过 LPS 注射成功复制了脓毒症模型。

脓毒症早期,TNF- α 、IL-1 等炎症介质迅速合成与释放,研究者认为这些“早期”的炎症介质作为“核心因子”触发了 SIRS、Sepsis、MODS,但是多年来,临床上针对拮抗 TNF- α 和 IL-1 的治疗并未取得满意疗效。有人做如下研究,用致死剂量的内毒素去攻击实验小鼠,结果部分小鼠直到 5 天后才死亡,而此时检测 TNF- α 和 IL-1 水平已恢复至正常水平,这一发现提示在脓毒症病程的晚期可能还存在着起相当重要作用的炎症介质^[9,10]。Wang H^[3]等用内毒素(LPS)刺激大鼠巨噬

细胞组 RAW264.7 细胞,刺激到 6~8 h 开始检出 HMGB1,在 16 h 达到峰值,且持续增高至 24 h,显示出时间依赖性;进一步研究用亚致死量的内毒素去攻击小鼠,到 8 h 可在血浆中检测 HMGB1,在 16 h 达到峰值,且持续至 32 h。姚咏明等^[11]研究严重烫伤和腹腔感染大鼠,在 6~24 h 大鼠的肝、肺及小肠组织中 HMGB1 mRNA 表达明显增多,并且一直持续到伤后 72 h。还有研究发现,脓毒症患者血清 HMGB1 水平持续升高,可达 144 h,当测试结束时,HMGB1 的水平仍高出 TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-10 等炎症介质 300 倍^[12]。本实验中,脓毒症大鼠发病 4 h 后血清中 HMGB1 含量即增加,12 h 持续升高,至 24 h 达峰值,且在 48~72 h 仍维持较高水平,尽管此时存活大鼠脓毒症症状已明显好转,说明晚期炎症介质 HMGB1 在脓毒症发病机制起着极其重要的作用,这也符合其在脓毒症发病机制中所表现的出现时间晚、持续时间长的特征。

HMGB1 与多种炎症介质可以互为诱生相互刺激,如 TNF- α 、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-6、IL-8、和 MIP-1 α 等一些炎症介质,HMGB1 还可以引起 NF- κ B 的核移位^[3,13]。在脓毒症整个病程中,这些促炎和抗炎炎症介质之间互相诱生、相互促进,进而促使炎症反应级联放大、加重甚至失控^[14]。本研究发现,血清中 HMGB1 的水平是与脓毒症的病情发展相伴生的,当大鼠随时间的推移逐渐出现脓毒症、脓毒性休克甚至 MODS 症状时,血清中 HMGB1 含量也随症状的加重而迅速升高,当大鼠脓毒症症状好转时 HMGB1 水平也随之下降,但下降幅度小且慢,大鼠的重要脏器功能指标以及病理改变亦有相似的时间变化规律。通过抑制 HMGB1 表达释放是否可以控制脓毒症,是否可以将其用于评估脓毒症的病情?人们做了如下研究。将实验小鼠注射致死剂量的内毒素前 0.5 h,应用单剂量 HMGB1 抗体治疗显示无效,分析原因这与 HMGB1 迟发释放特点有关;分别在内毒素注射前 0.5 h、注射后 2 h 和 12 h 分次给予 HMGB1 抗体治疗,结果显示:5.0 mg 抗体治疗组小鼠全部存活,2.0 mg 抗体治疗组 2 周存活率为 50%,但对照组小鼠全部死亡^[3]。HMGB1 合成抑制剂正丁酸钠在感染后 0.5 h 和 4 h 给予,组织 HMGB1 基因表达可下降,同时组织 TNF- α 基因和蛋白表达水平下调及心、肝、肾功能改善和肺组织炎症反应减轻,循环和组织的 TLR-2 基因表达下调;抗炎介质 IL-10 则表现出不同程度的表达增强^[15,16]。

血必净注射液^[17-19]由红花、赤芍、丹参、当归、川芎 5 味中药提取物组成,在研究中人们逐渐认识到血

必净既有强效、广谱的抗内毒素作用,也有拮抗内源性炎性介质作用;可以对抗 TNF- α 、IL-6 及内毒素的释放,也能增强单核细胞 HLA-DR 表达,进而有利于促进机体免疫功能恢复;同时,血必净还能对内毒素诱导的内皮细胞损伤具有显著的保护作用,且增大剂量效果更强,能够起到早期保护组织、防治 MODS 的作用。本实验显示,血必净治疗后,在造模后 12 h 血清中 HMGB1 水平较 LPS 模型组无明显下降,但在 24、48、72 h 均较模型组有下降,显示出有峰值低、下降幅度大、显效晚和持续时间长的特点;于造模前 2 h 和造模后 2 h 开始血必净治疗的大鼠血清中 HMGB1 的水平在各时间点之间比较,差异无统计学意义,但较造模后 8 h 开始血必净治疗组血清中 HMGB1 水平下降,这说明将血必净应用于脓毒症的治疗可以降低其血清中晚期炎症介质 HMGB1 水平,且早期应用效果更好。鉴于脓毒症炎症介质网络十分复杂,很多炎症介质可以促进 HMGB1 的释放, HMGB1 亦可以使多种炎症介质表达增加,血必净能够抑制血清中 HMGB1 水平可能受多种因素的影响,是多种机制共同作用的结果。本实验结果显示了通过血必净的治疗不仅能够生在生化指标上改善脓毒症大鼠重要脏器的功能,还可以使各脏器的病理改变明显好转,从而起到保护重要脏器功能的作用,这为血必净治疗脓毒症及其所并发的 MODS 提供了重要的依据。

参 考 文 献

- [1] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care[J]. Crit Care Med, 2001, 29(7): 1303-1310.
- [2] Wang H, Ward MF, Sama AE. Novel HMGB1-inhibiting therapeutic agents for experimental sepsis[J]. Shock, 2009, 32(4): 348-357.
- [3] 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.
- [4] Patrick S, Sandra H, Christian H, et al. Comparing hemodynamics, blood gas analyses and proinflammatory cytokines in endotoxemic and severely septic rats[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(6): 719-723.
- [5] 张之岭,沈琪琦,朱健,等. 血必净对脂多糖诱导的急性肺损伤大鼠肺组织纤溶酶原激活物抑制剂-1 表达的影响[J]. 中国临床保健杂志, 2011, 14(2): 163-166.
- [6] 孙元莹,郭茂松,李志军,等. 血必净对急性肺损伤大鼠肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(4): 531-532.
- [7] 武子霞,李银平,乔佑杰,等. 血必净注射液对脓毒症大鼠器官功能及死亡率的影响[J]. 天津中医药大学学报, 2007, 26(2): 68-70.
- [8] Kim TH, Yoon SJ, Lee SM. Genipin attenuates sepsis by inhibiting Toll-like receptor signaling[J]. Mol Med, 2012, 18(1): 455-465.
- [9] Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, et al. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation[J]. J Immunol, 2000, 165(6): 2950-2954.
- [10] Ulloa L, Brunner M, Ramos L, et al. Scientific and clinical challenges in sepsis[J]. Curr Pharm Des, 2009, 15(16): 1918-1935.
- [11] 姚咏明,张立天,陆家齐,等. 脓毒症大鼠内毒素增敏系统改变与高迁移率族蛋白-1 表达的关系[J]. 中华创伤杂志, 2002, 18(9): 540-543.
- [12] Sundén-Cullberg J, Norrby-Teglund A, Rouhiainen A, et al. Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock[J]. Crit Care Med, 2005, 33(3): 564-573.
- [13] Zhu S, Li W, Ward MF, et al. High mobility group box 1 protein as a potential drug target for infection-and injury-elicited inflammation[J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2010, 9(1): 60-72.
- [14] An G, Namas RA, Vodovotz Y. Sepsis: from pattern to mechanism and back[J]. Crit Rev Biomed Eng, 2012, 40(4): 341-351.
- [15] 姚咏明. 创伤脓毒症发病机制新认识——“晚期”介质高迁移率族蛋白 B1 的作用[J]. 中国急救医学, 2009, 29(8): 678-680.
- [16] Davis K, Banerjee S, Friggeri A, et al. Poly ADP-ribosylation of high mobility group box 1 (HMGB1) protein enhances inhibition of efferocytosis[J]. Mol Med, 2012, 18(1): 359-369.
- [17] 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.
- [18] 陈云霞,李春盛. 血必净治疗脓毒症的随机对照多中心临床研究[J]. 中华急诊医学杂志, 2013, 22(2): 130-135.
- [19] 陆地,茅尧生,吕铁,等. 血必净注射液对重症脓毒症患者 Toll 样受体 4 及下游细胞因子的影响[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(4): 776-779.

(收稿:2013-07-18 修回:2014-02-19)