

生物喋呤在脓毒症中的作用及其相关信号转导机制的研究进展

胥彩林 姚咏明 盛志勇

许多研究证实,一氧化氮(NO)过度产生在脓毒性休克和多器官功能障碍综合征的发生中具有重要意义,而生物喋呤(主要为5,6,7,8-四氢生物喋呤, tetrahydrobiopterin, BH₄)为一氧化氮合酶(NOS)重要的辅因子,调控着细胞内NO的产生,近年研究表明它可能参与了脓毒性休克的病理、生理过程^[1]。本文主要介绍BH₄的生理及病理作用,以及相关信号转导调控机制在脓毒症中的意义。

一、BH₄的生理及病理作用

BH₄主要是鸟苷三磷酸(GTP)的代谢产物,目前认为其合成主要有两条途径。一方面,GTP在鸟苷三磷酸环水解酶I(GTP-CHI)的作用下生成三磷酸-7,8-二氢新喋呤(NH₂TP),在非灵长类动物体内,NH₂TP由6-丙酮酰-四氢叶酸合成酶作用生成BH₄,人类因缺乏该酶而生成新喋呤;另一方面,墨喋呤在墨喋呤还原酶和二氢叶酸还原酶的作用下,经补救途径也可生成BH₄。内毒素/脂多糖(LPS)和促炎细胞因子可诱导多种细胞产生大量BH₄,BH₄与NOS紧密结合,促进NO的合成与释放,失去BH₄将导致NOS不可逆失活,因此BH₄在调节细胞的生理与病理反应中具有重要作用。

1. 生理效应:一般认为在正常生理状态下,单核-巨噬细胞内不表达NOS,血管平滑肌细胞极少产生BH₄和NO,内皮细胞可持续产生少量BH₄和NO,在维持细胞生理功能和调节血管紧张性、血压等方面具有重要作用。体外实验显示,BH₄作为NOS重要的辅因子,在调节内皮细胞增生、凋亡及血管形成等方面具有一定意义^[2]。据Shimizu等^[3]报道,大量释放的NO呈时间和剂量依赖性引起内皮细胞凋亡,用墨喋呤预处理内皮细胞,可见细胞内BH₄含量增加,且大大减少了NO供体诱导的内皮细胞凋亡。另有学者对BH₄与血管形成的关系进

行了研究,认为BH₄或墨喋呤在体外能刺激牛主动脉内皮细胞管状结构形成,应用墨喋呤还原酶的抑制剂则可完全阻断此过程,表明BH₄在体外具有刺激血管内皮细胞形成血管的功能^[4]。

2. 病理作用:有资料证实,未受刺激的人脐静脉平滑肌细胞(HUVSMC)BH₄含量极微,单独使用肿瘤坏死因子(TNF) α 、白细胞介素(IL)1、干扰素(IFN) γ 、LPS刺激HUVSMC,细胞内、外BH₄显著增加,其中IFN- γ 的作用最强;细胞因子联合使用可使BH₄增加600倍,LPS与细胞因子协同作用,BH₄含量增加更多,同时伴随GTP-CHI活性升高^[5]。金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)的细胞膜致病成分磷壁酸(LTA)为革兰阳性菌重要的表面抗原,与IFN- γ 协同作用,能促使鼠血管平滑肌细胞诱生型一氧化氮合酶(iNOS)、GTP-CHI mRNA表达及NO、BH₄合成显著增加。当BH₄合成限速酶GTP-CHI的选择性抑制剂-2,4-二胺-6-羟基嘧啶(DAHP)与LTA和IFN- γ 同时使用时,其BH₄合成及NO产生即受到抑制。在培养液中同时加入一定量墨喋呤,DAHP对BH₄合成及NO产生的抑制作用被解除。由此可见,NO的产生直接有赖于细胞内BH₄的浓度。

二、NO和(或)BH₄相关的信号转导机制

1. 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导途径:MAPK通路是信号从细胞表面转导至细胞核内部的重要传递者。在真核细胞中,已确定出4条MAPK信号转导通路,即细胞外信号调节激酶(ERK)、c-Jun N-末端激酶(JNK)、蛋白激酶p38和ERK5通路。

ERK至少包括ERK1、ERK2两个亚型。研究表明在鼠J774巨噬细胞、人T-84结肠上皮细胞中,LPS刺激后ERK1/2活化且iNOS、NO表达增加;采用ERK1/2上游激酶抑制剂处理可以抑制iNOS的表达,使NO产生下降40%~50%,提示ERK1/2虽然对NO的调节不是占据主导地位,但可以上调LPS诱导iNOS的表达,与NO产生及炎症反应有一定关系^[6]。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870286、30200293)

作者单位:100037 北京,解放军第三〇四医院全军烧伤研究所

通信(讯)作者:姚咏明,Email:c_ff@sina.com,电话:010-

66867394

JNK 可被 LPS、TNF- α 、IL-1 等激活。IL-1 诱导肾小球系膜细胞 iNOS 表达和 NO 产生与 JNK 和 p38 α MAPK 级联活化相关。LPS 刺激后细胞内 TNF- α 等致炎细胞因子的合成需要 JNK 的活化,而转染了 JNK 突变体的巨噬细胞,LPS 刺激不能有效诱导 JNK 活化,同时细胞内 TNF- α 生成明显减少,提示 JNK 途径可能参与了这些细胞因子的表达、调控过程,与炎症反应及 NO 产生密切相关。

p38 是 MAPK 家族最重要的成员之一,在介导炎症反应中起着重要作用。在人脐静脉内皮细胞株 ECV304 中,LPS 刺激后细胞内 iNOS mRNA 和蛋白表达比基础水平显著升高,同时细胞内 p38 MAPK 活化明显增强,15 min 达峰值;p38 MAPK 抑制剂处理可显著下调 iNOS mRNA 和蛋白表达,证实 p38 MAPK 在 LPS 诱导 iNOS 表达和 NO 产生中具有一定意义。p38 MAPK 的调节作用在脓毒症动物模型中也得到证实,大鼠正常肝组织 p38 MAPK 总蛋白表达较为丰富,但磷酸化 p38 MAPK 蛋白水平较低;烫伤后脓毒症组织 p38 MAPK 总蛋白水平无明显变化,但其磷酸化水平伤后 2 h 即明显升高,并持续至伤后 24 h,BH₄ 生物合成抑制剂早期干预则可明显降低肝组织 p38 MAPK 的磷酸化水平^[7]。提示烫伤脓毒症时 BH₄ 可能通过激活 p38 MAPK 信号转导通路,进而介导 iNOS 产生。

2. 核因子(NF)- κ B 信号转导途径:新喋呤能诱导血管平滑肌细胞 NF- κ B 转移至核内,且 iNOS 基因表达和 NO 释放均增加,应用 NF- κ B 抑制剂-二硫代氨基甲酸酯吡咯烷(PDTC)后,新喋呤对 NF- κ B、iNOS 和 NO 的诱导效应则完全被抑制,提示 NF- κ B 调节了新喋呤对 iNOS 的诱导反应。此外,NF- κ B 还能调节新喋呤对炎症介质的诱导。在肺泡上皮细胞系 L2 中,新喋呤以剂量依赖方式促进细胞间黏附分子 1(ICAM-1) mRNA 和蛋白表达,PDTC 可显著下调该效应。因此,NF- κ B 可能介导了新喋呤对 ICAM-1 的诱导,从而延长炎症过程。与之相似的是,IL-1、IFN- γ 能诱导鼠新生期心肌细胞中 NO、BH₄ 的合成增加,PDTC 则通过抑制 iNOS、GTP-CHI mRNA 表达而减少细胞内 NO、BH₄ 合成;另一 NF- κ B 抑制剂亦可阻断此过程,表明 NO、BH₄ 合成至少部分受到 NF- κ B 调控。笔者在体内实验中证实,BH₄ 参与了内毒素休克动物肺组织 NF- κ B 信号通路的活化过程,抑制 BH₄ 可降低 NF- κ B 的 DNA 结合活性,并减轻急性肺损伤^[8]。

3. (Janus 激酶)/信号转导和转录激活因子

(JAK/STAT) 信号转导途径:在星型胶质细胞中,IFN- γ 能诱导 STAT1 表达显著增高,单独 LPS 并不能诱导 STAT1 增高,但 IFN- γ 和 LPS 联合刺激使 JAK2 和 STAT1- α 、 β 酪氨酸磷酸化、IFN 调节因子以及 iNOS mRNA 表达明显增强;反之,同时给予 JAK 和 STAT- α 、 β 酪氨酸磷酸化相应抑制剂,则上述指标显著降低,说明 JAK 和 STAT- α 、 β 酪氨酸磷酸化在调节细胞因子诱导 iNOS 的表达中具有重要意义。此外,在鼠巨噬细胞 RAW 264.7 中,基因转录核内切酶抑制剂可显著减弱 IFN- γ 诱导 iNOS 的表达和 NO 的产生,并降低 JAK1、JAK2 和 STAT1 的活性,减弱 IL-4、IL-10 引起 STAT3、STAT5 和(或)STAT6 酪氨酸磷酸化,从而干扰细胞因子活化 JAK/STAT 信号转导通路,抑制炎症反应的发生,这从另一方面证实了 JAK/STAT 通路在调节细胞因子诱导 iNOS 表达中的作用^[9]。虽然 JAK/STAT 对上述细胞 iNOS 表达起促进作用,但在有些细胞中却抑制 iNOS 产生,这可能与各细胞中信号转导机制不同有关。

三、BH₄ 在脓毒症中的作用及意义

1. 动物实验研究:姚咏明等^[10]的研究证实,内毒素引起休克动物体内肝、肾、肠等组织 BH₄ 含量明显增多,伤后 8 h 升高幅度尤为明显,同时不同组织 GTP-CHI mRNA 表达亦显著增强,其变化趋势与 BH₄ 基本相似。表明 LPS 攻击可诱导多种组织 GTP-CHI mRNA 的表达及促进 BH₄ 的合成与释放,肝、肾组织 BH₄ 的含量与其相应器官损害的功能指标呈显著正相关。同样,利用 20% TBSA III 度烫伤合并金葡菌感染动物模型进行研究也观察到,伤后金葡菌感染导致组织 GTP-CHI 基因的表达广泛上调、BH₄ 的合成显著增加,且组织 iNOS mRNA 表达和 NO 水平亦明显升高;给予 DAHP 预处理可显著抑制各组织 GTP-CHI mRNA 的表达和 BH₄ 的产生,iNOS mRNA 表达和 NO 生成明显受抑,同时 TNF- α 表达明显降低。此外,DAHP 早期干预随着 BH₄ 和 NO 的生成减少,动物早期死亡率也有所降低^[11,12]。值得指出的是,抑制 iNOS 的辅因子 BH₄ 可在一定程度上抑制 NO 的过度产生,既可减轻 NO 对机体的损害作用,又可维持其对微血管系统的保护作用,因此有望成为防治脓毒症的有效措施^[11]。

2. 新喋呤改变的临床意义:临床观察显示,与健康对照组比较,严重烧伤患者伤后 3 d 血清新喋呤水平开始升高,但与烧伤面积关系不明显;2 周后烧伤患者并发内毒素血症及脓毒症组血清新喋呤水

平显著高于无内毒素血症及脓毒症组,且伤后 14 ~ 21 d 循环内毒素与新喋呤水平呈显著正相关^[13]。提示烧伤后早期血清新喋呤升高可能是对急性组织损伤的应答反应,后期其持续升高则与循环内毒素的刺激作用有关。

BH₄ 作为 NOS 重要的辅因子,在维持机体正常的生理功能方面起着重要作用。LPS 和其他免疫刺激能诱导 BH₄ 合成增加,BH₄ 可在基因和蛋白表达双重水平调控着 iNOS 的表达及活性,促使 NO 过度生成,进而引起机体产生一系列病理生理改变。在此过程中,BH₄ 可能是通过激活多条信号转导通路参与 NOS、NO 的调节,从而介导脓毒性休克的发病过程。适度调节细胞内 BH₄ 的合成过程,可为防止脓毒性休克等严重并发症的发生与发展提供新的途径。

参 考 文 献

- 1 姚咏明. 多器官功能障碍综合征发病机制新认识:生物喋呤和新喋呤. 中华老年多器官疾病杂志, 2002, 1: 65 - 69.
- 2 Marinos RS, Zhang W, Wu G, et al. Tetrahydrobiopterin levels regulate endothelial cell proliferation. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 281: 482 - 489.
- 3 Shimizu S, Ishii M, Kawakami Y, et al. Protective effects of tetrahydrobiopterin against nitric oxide-induced endothelial cell death. Life Sci, 1998, 63: 1585 - 1592.
- 4 Tanaka J, Koshimura K, Sohmiya M, et al. Involvement of tetrahydrobiopterin in trophic effect of erythropoietin on PC12 cells. Biochem

- Biophys Res Commun, 2001, 289: 358 - 362.
- 5 Fukuda Y, Teragawa H, Matsuda K, et al. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function of coronary arteries in patients with hypercholesterolaemia. Heart, 2002, 87: 264 - 269.
- 6 Lahti A, Lahde M, Kankaanranta H, et al. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase suppresses endotoxin-induced nitric oxide synthesis in mouse macrophages and in human colon epithelial cells. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 294: 1188 - 1194.
- 7 方文慧, 姚咏明, 李红云, 等. 生物喋呤对烫伤脓毒症大鼠肝组织丝裂原激活蛋白激酶 p38 活化的影响. 中华实验外科杂志, 2002, 19: 150 - 151.
- 8 胥彩林, 姚咏明, 于燕, 等. 生物喋呤对内毒素休克大鼠肺组织核因子-κB 活化的影响及意义. 中华急诊医学杂志, 2003, 12: 667 - 669.
- 9 Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Mazzone E, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation. Br J Pharmacol, 2002, 135: 496 - 510.
- 10 姚咏明, 赵晓东, 于燕, 等. 内毒素休克大鼠组织生物喋呤及其合成限速酶基因表达的改变. 中华外科杂志, 1999, 37: 267 - 270.
- 11 Li HY, Yao YM, Shi ZG, et al. Effect of 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine on postburn Staphylococcus aureus sepsis in rats. Crit Care Med, 2002, 30: 2520 - 2527.
- 12 Li HY, Yao YM, Shi ZG, et al. Significance of biopterin induction in rats with postburn Staphylococcus aureus sepsis. Shock, 2003, 20: 159 - 165.
- 13 Yao YM, Yu Y, Wang YP, et al. Elevated serum neopterin level: its relation to endotoxaemia and sepsis in patients with major burns. Eur J Clin Invest, 1996, 26: 224 - 230.

(收稿日期:2003-09-01)
(本文编辑:张 红)



· 病例报告 ·

复杂性电接触烧伤一例

吴静 孙曙光 孙勇

患者男,23 岁。因接触 10 kV 高压电线致伤,伤后 2 h 入院。查体:生命体征平稳,左腰部 20 cm × 30 cm 皮肤、肌肉缺损,左侧髂嵴部分炭化,左侧近脊柱处有 8 cm × 8 cm 后腹膜缺损,部分降结肠疝出。右侧腹股沟区有 10 cm × 15 cm 大小的创面,该处皮肤及缝匠肌、股四头肌近端大部分缺损,股动脉、股静脉、股神经外露。诊断:高压电接触烧伤,总面积 15% TBSA,Ⅲ度。入院后给予补液、碱化尿液、预防肾功能衰竭、防止感染及营养支持等治疗。急诊清创后,用右大腿前外侧股四头肌皮瓣修复右侧腹股沟区创面,以左臀部臀大肌皮瓣修复左腰部大部分缺损创面及腹壁缺损。剖腹探查时见空肠有两处穿孔,降结肠中段有 7 cm × 5 cm 的缺损,粪便溢出,腹腔严重污染。遂切除穿孔肠段,行空肠端端吻合;切除损伤、坏死的降结肠,行横结肠造瘘术,用带肠系膜的降结肠浆肌膜瓣修复后腹壁缺损,封闭腹腔。术后右下肢股四头肌皮瓣、左臀大肌皮瓣成活良好。伤后第 76 天创面

愈合。伤后半年行结肠还纳术,患者治愈,生活能自理。
讨论 电接触烧伤不但可引起局部皮肤、肌肉、骨骼坏死,还可引起内脏、神经损伤^[1],病程复杂,修复创面及预防并发症是治疗的关键。电接触烧伤创面呈进行性坏死,尽早清创、防止创面加深、选用带血管蒂的(肌)皮瓣有效封闭创面是基本的治疗措施。同时应防止创面受压,及时清创引流,根据药物敏感试验结果选用有效抗生素,加强营养支持治疗。躯干部深度电烧伤的患者,并发空腔脏器穿孔及腹腔内实质性脏器损伤的可能性极大^[2],故应密切观察病情,完善相关检查,有手术适应证时应及时进行手术探查,以防延误病情。

参 考 文 献

- 1 黎鳌,主编. 烧伤治疗学. 北京:人民卫生出版社,1997. 323.
- 2 葛绳德,主编. 烧伤临床解析. 天津:科技翻译出版公司,1997. 157.

(收稿日期:2003-12-29)
(本文编辑:罗 勤)

作者单位:221004 徐州,解放军第九十七医院烧伤整形科