

内毒素休克大鼠核因子 κ B 活化规律及其在生物蝶呤诱生中的作用

姚咏明 胥彩林 姚凤华 于燕 盛志勇



【摘要】 目的 观察内毒素休克大鼠血浆及主要脏器核因子(NF) κ B 活化规律及其对生物蝶呤(BH₄)和一氧化氮(NO)表达水平的影响,探讨内毒素休克时 NF- κ B 信号通路对 BH₄ 诱生 NO 的分子调控机制及其与多器官功能损害的关系。方法 将 47 只大鼠按表格随机法分为正常组(8 只)、内毒素/脂多糖(LPS)组(24 只,每观察时相点 8 只,均同时注射 LPS 制成休克模型)和拮抗组[15 只,每观察时相点 5 只,均同时注射 LPS 并以吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(PDTC)拮抗]。休克及拮抗组于注射 LPS 后 2、6、12 h 观察,并与正常组同法处死,无菌留取大鼠血标本及肝、肺、肾组织,测定组织中 NF- κ B 活性和三磷酸鸟苷环水解酶 I(GTP-CH I)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS) mRNA 表达水平、血浆和组织中的 BH₄ 含量及 NO 水平、肝脏和肾脏功能指标、肺组织髓过氧化物酶活性。结果 与正常组(例如肺组织中 NF- κ B 活性为 26 ± 6)比较,LPS 组大鼠组织中 NF- κ B 迅速活化($P < 0.01$),并于注射后 2 h 达峰值(肺组织中为 291 ± 44);LPS 组各组织中 GTP-CH I 和 iNOS mRNA 表达、BH₄ 和 NO 水平也较正常组明显升高($P < 0.05$ 或 0.01),至伤后 12 h 仍持续较高水平。此外,该组相应器官功能均受到不同程度的损害。应用 PDTC 的拮抗组大鼠各组织中 NF- κ B 活性均较 LPS 组有所降低,GTP-CH I、iNOS mRNA 表达及 BH₄、NO 水平显著受抑,肝、肺、肾功能明显改善。结论 内毒素休克时机体内 NF- κ B 通路高度活化,并对 BH₄/NO 系统具有明显调节效应;可通过下调 BH₄ 介导的 iNOS 的过度活化抑制 NF- κ B 信号途径,从而减轻组织炎性反应,对机体脏器功能起到保护作用。

【关键词】 休克,脓毒性; 生物蝶呤; 一氧化氮; 多器官功能衰竭; 衔接蛋白质类,信号转导; NF- κ B

The pattern of nuclear factor- κ B activation in rats with endotoxin shock and its role in bioppterin-mediated nitric oxide induction YAO Yong-ming, XU Cai-lin, YAO Feng-hua, YU Yan, SHENG Zhi-yong. Burn Institute, First Hospital Affiliated to the PLA General Hospital, Beijing 100037, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the pattern of nuclear factor-kappaB (NF- κ B) activation in rats with lipopolysaccharide(LPS) shock, and to explore the mechanism of NF- κ B signal pathway in the bioppterin-mediated nitric oxide(NO) induction, as well as its role in the development of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) secondary to endotoxin challenge. Methods Forty-seven male Wistar rats were randomly divided into control group (C, n = 8), LPS group (n = 24, with 8 rats at each time-points, and shock model was made by injection of same dosage of LPS), and pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) treatment group (PDTC, n = 15, with 5 rats at each time-points, and the rats were injected with LPS and PDTC). The rats were sacrificed at 2, 6, 12 post-injection hour(PIH), and the blood and tissue samples from liver, lungs and kidneys were harvested for the determination of NF- κ B activity, GTP cyclohydrolase I (GTP-CH I), and inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA expression in the liver, lungs and kidneys, plasma and tissue content of bioppterin and NO, as well as hepatic and renal function, and pulmonary myeloperoxidase activity. Results NF- κ B DNA binding activity in LPS group was rapidly enhanced in liver, lungs and kidneys after endotoxin challenge when compared with that in controls (e. g. in pulmonary tissue it was 26 ± 6), and it reached the peak at 2 PIH, which was 291 ± 44 in pulmonary tissue($P < 0.01$). GTP-CH I mRNA expression and bioppterin levels in the liver, lung and kidney of each group were obviously higher than those in control group($P < 0.05$ or 0.01), and it maintained at high levels at 12 PIH. Additionally, different degrees of dysfunction of the above mentioned organs was observed. Treatment with PDTC, an inhibitor of NF- κ B signal transduction pathway, could reduce NF- κ B DNA binding activity, inhibit GTP-CH I and iNOS/NO mRNA expression, as well as BH₄ and NO levels in various tissues. Meanwhile the multiple organ damage was significantly ameliorated by PDTC pretreatment. Conclusion Endotoxin chal-

基金项目:国家重点基础研究发展计划资助项目(2005CB522602);国家自然科学基金资助项目(30200293);
国家杰出青年科学基金资助项目(30125020);首都医学发展科研基金重点资助项目(2003-2023)

作者单位:100037 北京,解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所

lenge can rapidly lead to activation of NF- κ B in various tissues, and NF- κ B pathway might markedly up-regulate the production of biopterin/NO following endotoxic shock. Inhibition of NF- κ B pathway attenuates inflammatory response and ameliorates multiple organ dysfunction, which might be associated with its down-regulation of the excessive activation of iNOS mediated by biopterin.

【Key words】 Endotoxic shock; Biopterin; Nitric oxide; Multiple organ failure; Adaptor proteins, signal transduction; NF-kappa B

脓毒症易发展为脓毒性休克和多器官功能衰竭 (MODS), 病死率居高不下, 其根本原因在于机体过度释放炎性介质引起失控性炎症反应和免疫功能紊乱。研究表明, 由生物蝶呤 (BH₄) 介导诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的活化及一氧化氮 (NO) 大量合成与释放, 可能是脓毒性休克和 MODS 的最后共同通路^[1,2]。但目前对脓毒性休克时 BH₄ 作用的信号转导机制缺乏系统研究。笔者在既往的研究基础上, 采用大鼠内毒素休克模型初步探讨核因子 (NF) κ B 对 BH₄ 诱导 NO 的分子调控机制及其在多器官功能损害中的意义。

材料与方 法

一、材料、试剂及仪器来源

清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 47 只, 体重 220 ~ 290 g, 购自中国医学科学院实验动物研究所。内毒素/脂多糖 (LPS, 来源于美国 Sigma 公司提供的大肠埃希菌 O55: B5 菌株); 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐 (PDTC, 美国 Alexis Biochemicals 公司); 总 RNA 提取试剂盒、逆转录 (RT) 试剂盒、Taq DNA 聚合酶、T₄ 寡核苷酸激酶 (美国 Promega 公司); PCR 引物及 NF- κ B 双链寡核苷酸探针 (上海申友生物技术有限责任公司); [γ -³²P] 腺苷三磷酸 (ATP, 北京福瑞生物工程公司); 蛋白定量分析试剂盒 (美国 Pierce 公司); NO 测定试剂盒 (北京晶美生物工程有限公司); 丙氨酸转氨酶 (ALT) 检测试剂 (法国豪迈生物工程有限公司); 天冬氨酸转氨酶 (AST) 检测试剂 (北京柏定生物工程有限公司); 血清肌酐 (Cr)、尿素氮 (BUN) 检测试剂 (北京利德曼生化技术有限公司)。MK2 型酶标仪 (英国 Denley 公司), HP-1050 反相高效液相分析系统 (美国惠普公司), LEICA Q-5501W 分析处理系统 (德国 Leica 公司), 7170 型自动生化分析仪 (日本 Hitachi 公司)。

二、动物分组及标本采集

将 47 只大鼠常规饲养 1 周以上, 实验前夜大鼠禁食、自由饮水。将大鼠按表格随机法分为 3 组: 正常组 (8 只)、LPS 组 [经大鼠阴茎背静脉注射 LPS (10 mg/kg) 约 2 h 后制成内毒素休克模型, 经腹腔给予二甲亚砷 4 ml/kg (24 只)]、拮抗组 [与 LPS 组

同法注射 LPS 制成大鼠内毒素休克模型后经腹腔给予 NF- κ B 信号通路阻断剂——PDTC (100 mg/kg, 以二甲亚砷作溶剂), 15 只]。后两组大鼠于注射 LPS 后 2、6、12 h (各组内每时相点平均分配鼠数) 同正常组大鼠一样, 经腹主动脉采血, 肌肉注射 20 g/L 戊巴比妥钠麻醉后依次切取左肝内侧叶、双肾和双肺标本待测。

三、检测指标

1. 组织匀浆中的微量蛋白含量: 将所取组织标本制成匀浆液, 采用蛋白定量分析试剂盒检测组织匀浆上清液中蛋白含量。用等渗盐水将试剂盒中蛋白标准品稀释为 9 管, 浓度依次为 0、0.025、0.125、0.250、0.500、0.750、1.000、1.500、2.000 g/L。取工作液 A 和 B 按 50:1 的比例混合, 直到试剂呈澄清的绿色。将 5 μ l 样本用 20 μ l 等渗盐水稀释后加入微量孔; 再加入 200 μ l 已混匀的工作液, 振荡混合 30 s, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。将微量板冷却至室温后, 在酶标仪上于波长 540 nm 下测定吸光度 (A) 值。以 9 管标准品 A 值对照相应稀释浓度, 求出标准曲线回归方程: $Y = 1\,000.711\,3X - 88.109\,0$, $r = 0.997\,7$ 。将待检样本的 A 值代入标准曲线, 计算其蛋白含量。

2. 细胞核内 NF- κ B 的 DNA 结合活性: 采用凝胶电泳迁移率分析法 (EMSA) 测定 NF- κ B 的 DNA 结合活性。NF- κ B 双链寡核苷酸探针的序列为 5'-AGTTGAGGGACTTTCCCAGGC-3', 3'-AGATCACTAAACGTAAGCTGT-5'^[3]。以 [γ -³²P] ATP 标记 NF- κ B 双链寡核苷酸 5' 末端。同时取大鼠肝、肺、肾组织制备胞核蛋白提取物, 采用蛋白定量分析试剂盒检测其蛋白含量。在 0.5 ml EP 管中依次加入蒸馏水, 以补足液体总体积至 20 μ l。将 4 μ l 5 倍稀释的蛋白结合反应缓冲液、2 μ l poly dI-dC (1 g/L) 和适量的核蛋白提取物 (含 15 μ g 蛋白) 混匀, 室温放置 15 min, 每管加 1 μ l [γ -³²P] ATP 标记的探针, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 保温 30 min。每管加 5 μ l 上样缓冲液, 混匀, 取 25 μ l 在 60 g/L 聚丙烯酰胺凝胶中进行垂直电泳 (12 V/cm 电泳约 2 h)。电泳结束后将凝胶转移到滤纸上抽干, 凝胶压于 X 线底片上置 -70 $^{\circ}$ C 放射自显影 24 h, 冲洗 X 线底片。分析图像, 以积分 A 值表示 NF- κ B 相对活性。

3. 组织中鸟苷三磷酸环水解酶 I (GTP-CH I) 及 iNOS mRNA 表达水平: 采用 RT-PCR 法测定组织 GTP-CH I 及 iNOS mRNA 表达水平。无菌条件下称取大鼠肝、肺、肾组织, 以异硫氰酸胍一步法提取细胞总 RNA。采用 RT 酶和随机引物进行 RNA RT, 严格按 RT 试剂盒说明书操作。采用高温启动法对转录产物进行 PCR 循环, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPD) 作为内参照。大鼠 GTP-CH I 序列 (扩增片段为 372 bp): 上游 5'-GGATACCAGGAGACCATCTCA-3', 下游 5'-TAGCATGGTGCTAGTGACAGT-3'^[12]; PCR 反应条件为 95 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环。大鼠 iNOS 序列 (扩增片段为 450 bp): 上游 5'-TGCCAGGATGAGAAGCTGAG-3', 下游 5'-CTGGTCGATGTCATGAGCAA-3'^[4]; PCR 反应条件为 95 °C 变性 45 s, 57 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 36 个循环。大鼠 GAPD 序列 (扩增片段为 309 bp): 上游 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3', 下游 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'^[5]; PCR 反应条件为 95 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环。扩增产物经 2 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色, 紫外灯下观察并照相, 底片冲洗后采用前述图像分析处理系统进行分析, 通过目的基因与内参照的积分 A 比值表示 mRNA 相对表达量。

4. 血浆及肝、肺、肾组织中 BH₄ 含量: 采用反相高效液相分析方法测定大鼠血浆及组织中 BH₄ 的含量^[2]。将组织在 50 mmol/L Tris-HCl (pH 值为 7.8) 缓冲液中冰浴匀浆, 12 000 × g 离心 20 min, 吸取上清液。在血浆及上清液中加入 0.2 mol/L HCl 和 9 g/L I₂ 及 18 g/L 碘化钾的溶液进行酸-碘氧化, 以孔径 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 超声波脱气 15 min, 采用反相高效液相分析系统测定标本 BH₄ 含量, 层析柱为 ZORBAX SB-C18 (高度为 4.6 mm、底半径为 150.0 mm)。取 10 μl 系列稀释的标准品或预处理的待测样品上样, 以 50 mmol/L 磷酸铵-甲醇缓冲液 (体积比为 9:1, pH 值为 3.2) 混合液作为流动相, 1.0 ml/min 恒定速度洗脱。在荧光激发波长 350 nm、发射波长 450 nm 下检测 BH₄ 的积分峰面积值。根据各管标准品积分峰面积值与对应的稀释浓度, 得出标准曲线回归方程: $Y = 0.01281X$, $r = 0.9993$ 。将样品积分峰面积值代入标准曲线, 计算出标本匀浆中 BH₄ 含量 (μg/L)。组织中 BH₄ 的含量应用以下公式计算: 组织 BH₄ 含量 (μg/g) = 组织匀浆 BH₄ 含量 (μg/L) × 1 000 ÷ 组织匀浆蛋白含

量 (g/L)。

5. 血浆及组织中 NO 水平: 采用 NO 测定试剂盒测定 NO 水平, 严格按说明书进行操作。

6. 脏器功能指标: 用自动生化分析仪测定各组大鼠血清 ALT、AST、BUN、Cr 含量。

7. 肺组织髓过氧化物酶 (MPO) 活性: 采用酶学分光光度法测定^[6]。

四、统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件包进行方差分析。

结 果

1. 细胞核内 NF-κB 活性的改变: 与正常组比较, LPS 组大鼠各组织 NF-κB 于注射后 2 h 即迅速活化达到峰值, 此后其活性有所下降, 但均显著高于对照组 ($P < 0.01$)。拮抗组大鼠各组织中 NF-κB 活性较 LPS 组均有所降低, 其中注射后 2 h 肝、肾组织及注射后 2、12 h 肺组织的 NF-κB 活性明显受抑 ($P < 0.05$ 或 0.01), 其余时相点 NF-κB 活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠各脏器组织中 NF-κB 活性的比较 (积分 A 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	肝	肺	肾
正常组	8	62 ± 20	26 ± 6	64 ± 13
LPS 组				
注射后 2 h	8	276 ± 30*	291 ± 44*	194 ± 27*
注射后 6 h	8	121 ± 28*	218 ± 33*	150 ± 41*
注射后 12 h	8	94 ± 22*	168 ± 32*	168 ± 32*
拮抗组				
注射后 2 h	5	191 ± 28*☆	201 ± 24*△	145 ± 36*△
注射后 6 h	5	116 ± 19*	182 ± 24*	123 ± 20*
注射后 12 h	5	91 ± 25*	97 ± 14*☆	163 ± 26*

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, △ $P < 0.05$, ☆ $P < 0.01$

2. GTP-CH I mRNA 表达和 BH₄ 含量变化: 正常组大鼠肝、肺、肾组织中均有一定量 GTP-CH I mRNA 表达, 血浆及各组织中 BH₄ 含量亦较低。LPS 注射后 2 h, 各组织 GTP-CH I mRNA 表达、血浆及 BH₄ 含量显著升高, 于 6 ~ 12 h 达峰值, 并且 GTP-CH I mRNA 表达和 BH₄ 含量 2 ~ 12 h 均显著高于正常组 ($P < 0.05$ 或 0.01)。与 LPS 组比较, 拮抗组大鼠肝、肺、肾组织 GTP-CH I mRNA 表达水平明显下调; 同时, 各组织中 BH₄ 的水平亦有所降低, 其中肝组织 BH₄ 水平各时相点均显著降低 ($P < 0.05$ 或 0.01)、肺组织中 BH₄ 水平 6 h 显著下降 ($P < 0.05$)、肾组织 BH₄ 水平 6、12 h 显著降低 ($P <$

0.01);但血浆中 BH₄ 水平无明显改变。见表 2。

表 2 各组大鼠各脏器组织中 GTP-CH I mRNA 表达的比较 (积分 A 比值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	肝	肺	肾
正常组	8	1.33 ± 0.26	0.86 ± 0.18	0.33 ± 0.06
LPS 组				
注射后 2 h	8	2.31 ± 0.44*	1.28 ± 0.28*	0.85 ± 0.14*
注射后 6 h	8	2.48 ± 0.36*	1.63 ± 0.20*	1.18 ± 0.20*
注射后 12 h	8	2.55 ± 0.26*	1.72 ± 0.32*	1.06 ± 0.14*
拮抗组				
注射后 2 h	5	1.88 ± 0.37*	1.04 ± 0.23	0.66 ± 0.12*
注射后 6 h	5	2.02 ± 0.48*	1.18 ± 0.14 [△]	0.79 ± 0.09* [☆]
注射后 12 h	5	1.86 ± 0.27* [☆]	1.23 ± 0.26*	0.76 ± 0.10* [☆]

注:与正常组比较, * P < 0.05, # P < 0.01;与 LPS 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\star P < 0.01$

3. iNOS mRNA 表达和 NO 水平的变化:正常组大鼠肝、肺、肾组织有少量 iNOS mRNA 表达,血浆及各组织中 NO 水平较低。LPS 组注射后 2 h,各组织 iNOS mRNA 表达明显上调,其后维持于较高水平 (P < 0.01);与 iNOS mRNA 变化规律相似,血浆及各组织 NO 水平亦明显增高 (P < 0.05 或 0.01),两者尤其在肝组织中升高较快,分别于 6、12 h 达峰。拮抗组大鼠除肾组织 12 h 的水平低于正常组外,各时相点肝、肺组织 iNOS mRNA 表达水平虽然受抑 (P < 0.05 或 0.01),但仍明显高于正常组 (P < 0.01);且肝、肺组织中 NO 水平各时相点均显著低于 LPS 组 (P < 0.05 或 0.01);肾组织中 NO 水平于 12 h 最低,且与 LPS 组差异有统计学意义 (P < 0.01);血浆中 NO 水平于 2、12 h 显著低于 LPS 组 (P < 0.05 或 0.01)。见表 3。

4. 脏器功能指标和肺组织 MPO 活性的变化:与正常组比较, LPS 组大鼠肝、肺、肾功能均表现为不同程度的损害;血清 ALT、AST、BUN、Cr 水平及肺组织 MPO 活性各时相点均显著升高 (P < 0.01),6 h 达峰值,12 h 时仍明显高于正常组 (P < 0.01)。与 LPS 组比较,拮抗组大鼠血清 ALT 水平先升高后降

表 3 各组大鼠血浆及各脏器组织中 NO 水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	血浆 ($\mu\text{mol/L}$)	组织 ($\mu\text{mol/g}$ 蛋白)		
			肝	肺	肾
正常组	8	46 ± 8	1.5 ± 0.3	4.3 ± 0.6	3.1 ± 0.8
LPS 组					
注射后 2 h	8	70 ± 7*	2.9 ± 0.5*	5.6 ± 0.6*	4.9 ± 1.1*
注射后 6 h	8	122 ± 19*	4.4 ± 0.6*	8.7 ± 1.7*	5.4 ± 1.0*
注射后 12 h	8	143 ± 7*	4.5 ± 0.7*	8.1 ± 1.3*	6.8 ± 1.2*
拮抗组					
注射后 2 h	5	43 ± 5 [☆]	1.8 ± 0.4 [☆]	3.6 ± 0.5 [☆]	4.1 ± 0.9
注射后 6 h	5	107 ± 3*	2.5 ± 0.4* [☆]	5.8 ± 0.9* [☆]	4.8 ± 1.0*
注射后 12 h	5	129 ± 8* [△]	3.2 ± 0.6* [△]	6.3 ± 1.1* [△]	3.7 ± 0.8* [☆]

注:与正常组比较, * P < 0.05, # P < 0.01;与 LPS 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\star P < 0.01$

低 (P < 0.05);AST 水平最初改变不明显,但 6~12 h 亦显著降低 (P < 0.05);BUN 水平于 6 h 显著降低 (P < 0.05),其他时相点改变不明显;Cr 含量亦呈现先升高后降低趋势,其中 6 h 改变较显著 (P < 0.05);肺组织 MPO 活性各时相点均显著降低 (P < 0.05 或 0.01),6 h 下降幅度最大。见表 4。

讨 论

核转录因子是一类蛋白质,具有与某些启动子固定核苷酸序列结合,从而启动基因转录的功能。NF- κ B 是细胞内重要的核转录因子,参与多种基因的转录调控过程。NF- κ B 一般以二聚体形式存在于细胞质内,其中最重要的是 P50/P65 二聚体。不同的二聚体可以影响 NF- κ B 与 DNA 不同位点结合,从而调控不同的基因表达^[7]。当细胞受到细胞因子 [白细胞介素 (IL) 1、IL-2、肿瘤坏死因子 (TNF) α 等]、LPS、NO 等多种因素刺激后,由信号诱导激活核因子抑制蛋白 (I κ B) 激酶,引起 I κ B α 迅速磷酸化,使 NF- κ B 通过核孔复合体上的受体快速进入细胞核内,结合于靶基因的启动子上,诱导靶基因 mRNA 的合成。NF- κ B 诱导表达的靶基因中多种物质是炎性反应的关键介质,在脓毒性休克的发生、发

表 4 各组大鼠各器官功能指标及肺组织 MPO 活性的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mmol/L)	Cr ($\mu\text{mol/L}$)	MPO (U/g 组织)
正常组	8	48 ± 6	112 ± 10	5.0 ± 1.1	43 ± 6	1.51 ± 0.19
LPS 组						
注射后 2 h	8	97 ± 19*	386 ± 45*	12.0 ± 2.4*	87 ± 16*	3.98 ± 0.62*
注射后 6 h	8	228 ± 73*	587 ± 142*	15.0 ± 3.3*	95 ± 19*	6.07 ± 0.49*
注射后 12 h	8	111 ± 13*	310 ± 77*	11.8 ± 1.9*	93 ± 14*	4.30 ± 0.56*
拮抗组						
注射后 2 h	5	131 ± 27* [△]	404 ± 87*	12.9 ± 1.1*	108 ± 10* [△]	2.67 ± 0.36* [☆]
注射后 6 h	5	76 ± 4* [△]	252 ± 30* [△]	11.2 ± 1.6* [△]	66 ± 8* [△]	3.66 ± 0.21* [☆]
注射后 12 h	5	81 ± 20* [△]	214 ± 45* [△]	15.1 ± 1.0*	76 ± 18*	3.08 ± 0.38* [△]

注:与正常组比较, * P < 0.05, # P < 0.01;与 LPS 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\star P < 0.01$

展中起着非常重要的作用^[8,9]。本组资料显示:正常组大鼠肝、肺、肾组织 NF- κ B 的 DNA 结合活性较弱。与正常组相比,受到 LPS 攻击后 2 h 大鼠肝、肺、肾组织 NF- κ B 迅速活化达到峰值,此后其活性迅速下降,但 12 h 仍维持于较高水平。由此推论,NF- κ B 通路可能参与了内毒素休克的致病过程,并具有重要的病理生理学意义。

许多资料证实,由 iNOS 介导 NO 的过度产生是引起休克发生的重要机制之一,合理调节 NO 成为脓毒性休克研究的焦点问题。NF- κ B 在 NO 等炎性介质表达中的作用已得到初步证明^[10]。本实验进一步证实,内毒素休克大鼠肝、肺、肾组织 iNOS 基因表达及 NO 水平明显增高,并且 NF- κ B 广泛活化。初步提示 NF- κ B 信号通路参与了内毒素休克的发病过程。其机制可能为 NF- κ B 经 LPS 激活进入细胞核,调控众多炎性介质的基因表达,尤其是 TNF- α 和 IL-1 等早期细胞因子的增加,进一步作用于巨噬细胞等产生大量的继发性细胞因子如 IL-6、IL-8、NO 等,这些炎性介质反过来进一步激活 NF- κ B,从而形成正反馈的级联放大效应。由于各种炎性介质之间相互影响、相互作用,导致组织和细胞的损害及炎症反应的过度产生。

基于 NF- κ B 在脓毒症病理过程中可能具有重要作用,笔者进一步设计了干预实验,旨在通过 PDTC 抑制 NF- κ B 通路来观察此试剂对 LPS 诱发脓毒症病理生理反应的影响。PDTC 是一种抗氧化剂,在体内外实验中均能有效拮抗 NF- κ B 的活化,因此被广泛用作 NF- κ B 的抑制剂。体外细胞实验已证实,NF- κ B 是 LPS 和炎性细胞因子诱导 iNOS 基因表达的重要转录因子^[10]。本实验采用 PDTC 对 NF- κ B 通路进行干预,观察到 PDTC 早期处理后,内毒素休克大鼠各组织中 iNOS mRNA 及 NO 表达水平明显受抑,并且 NF- κ B 活性均有所降低,其中肝、肾组织 2 h、肺组织 2、12 h NF- κ B 活性显著抑制,这些观察结果与以往体外实验资料相符。根据 NF- κ B 在内毒素休克中的作用,可以推测拮抗 NF- κ B 可能有利于减轻促炎介质及 iNOS 过度活化,从而有助于预防脓毒性休克及控制其多器官功能损害的发生与发展,这对于脓毒症的治疗将有潜在的临床意义^[9]。

为了进一步探讨 NF- κ B 是否参与内毒素休克时 BH₄ 介导 NO 的过度合成过程,本实验同时观察 PDTC 处理对内毒素休克大鼠 BH₄/NO 系统的影响。结果拮抗组大鼠肝、肺、肾组织 GTP-CH I、iNOS mRNA 表达水平明显下调;各组织中 BH₄、NO 水平

亦有相应降低。证实 NF- κ B 通路对 BH₄/NO 系统均具有明显调节效应,可能参与了内毒素休克时 BH₄ 介导 NO 的合成。BH₄ 刺激能诱导血管平滑肌细胞 NF- κ B 转移至核内,并且 iNOS mRNA 表达和 NO 释放均有所增加,阻断 NF- κ B 后,BH₄ 对 NF- κ B、iNOS 和 NO 的诱导作用完全被抑制,提示 NF- κ B 调节了 BH₄ 对 iNOS 的诱导过程。不仅如此,NF- κ B 还能调节 BH₄ 对炎性介质如细胞间黏附分子 1 等的诱生,从而推动炎症反应进程^[11,12]。

NF- κ B 信号通路的活化与 BH₄ 介导 iNOS 的表达密切相关,并且在内毒素休克及多器官功能损害中可能具有重要意义。本实验应用 NF- κ B 通路抑制剂 PDTC 干预后,内毒素休克大鼠组织 NF- κ B 活性显著降低,BH₄/NO 系统亦明显受抑,同时肝、肺、肾器官功能得到不同程度改善。由于 iNOS、TNF- α 、IL-1、IL-6 等细胞因子基因启动子上均存在 NF- κ B 的结合位点,抑制 NF- κ B 通路活化一方面可能阻止 BH₄ 诱导 iNOS 转录及 NO 的过度产生,另一方面可减少 TNF- α 、IL-1、IL-6 等炎性介质的合成与释放,从而减轻组织炎症反应,对器官功能发挥保护效应^[13]。因此,应用 NF- κ B 通路抑制剂可有效地拮抗肝、肺、肾组织中炎性介质及 NO 的过度产生,可能为组织损害的防治提供一条新思路。

总之,NF- κ B 信号转导通路参与了内毒素休克的致病过程,并对 BH₄/NO 系统具有明显调节效应。抑制 NF- κ B 通路可能成为适度调节体内炎性介质与 NO 的诱生、防治脓毒性休克及多器官损害新的靶标,但是其确切分子生物学机制仍有待于深入探讨。

参 考 文 献

- 1 姚咏明. 多器官功能不全综合征发病机制新认识: 生物蝶呤和新蝶呤. 中华老年多器官疾病杂志, 2002, 1: 65-69.
- 2 Li HY, Yao YM, Shi ZG, et al. Significance of biopterin induction in rats with postburn Staphylococcus aureus sepsis. Shock, 2003, 20:159-165.
- 3 Schow SR, Joly A. N-acetyl-leucinyl-leucinyl-norleucinal inhibits lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation and prevents TNF and IL-6, synthesis in vivo. Cell Immunol, 1997, 175:199-202.
- 4 Dell'Albani P, Santangelo R, Torrisi L, et al. JAK/STAT signaling pathway mediates cytokine-induced iNOS expression in primary astroglial cell cultures. J Neurosci Res, 2001, 65:417-424.
- 5 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.
- 6 Koike K, Moore FA, Moore EE, et al. Endotoxin after gut ischemia-reperfusion causes irreversible lung injury. J Surg Res, 1992, 52: 656-662.
- 7 Senftleben U, Karin M. The IKK/NF- κ B pathway. Crit Care Med,

2002, 30: 18 - 26.

8 Sun ZW, Andersson R. NF-κB activation and inhibition: a review. Shock, 2002, 18: 99 - 106.

9 姚咏明, 姚胜, 陈劲松, 等. NF-κB 抑制剂对烫伤脓毒症大鼠致炎/抗炎细胞因子表达的影响. 解放军医学杂志, 2004, 29: 33 - 35.

10 Lim S, Kang KW, Park SY, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression by a novel compound, mercaptopyrazine, through suppression of nuclear factor-kappaB binding to DNA. Biochem Pharmacol, 2004, 68: 719 - 728.

11 胥彩林, 姚咏明, 盛志勇. 生物蝶呤在脓毒症中的作用及其相关信号转导机制的研究进展. 中华烧伤杂志, 2004, 20: 382 - 384.

12 Hoffmann G, Rieder J, Smolny M, et al. Neopterin-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in type II-like alveolar epithelial cells. Clin Exp Immunol, 1999, 118: 435 - 440.

13 姚咏明, 柴家科, 林洪远, 主编. 现代脓毒症理论与实践. 北京: 科学出版社, 2005. 289 - 340.

(收稿日期: 2006 - 04 - 27)
(本文编辑: 赵敏)

· 病例报告 ·

新生儿皮肤软组织广泛坏死一例

杨顺江 张元海

患儿男, 系孕 36 周剖宫产双胞胎早产儿之一, 出生后因缺血缺氧性脑病一直在当地医院小儿科新生儿室住院治疗。出生后 13 d 静脉输液渗漏致患儿左上肢大面积皮肤软组织损伤, 该院给予头孢曲松抗感染, 并行换药及营养支持, 但患儿病情无好转, 随即转入笔者单位。入院查体: 患儿体温 39℃, 呼吸 62 次/min, 心率 178 次/min。体重 1.9 kg, 哭音不响亮。左上臂前区近端与三角肌远端 1/3 连线至腕关节以上 3 cm 处大范围皮肤呈紫黑色, 软组织损伤面积 11.0 cm × 7.5 cm, 肘关节、前臂近端皮肤软组织明显凹陷, 部分已干性坏死, 触之有脓性分泌物自边缘溢出。诊断: 左上肢皮肤及皮下组织广泛坏死伴感染。

次日在基础麻醉下加用颈丛神经阻滞麻醉行左上肢坏死组织切除术, 术中见皮下有液化脂肪及脓性液共 60 ml, 且与深部组织分离, 肱三头肌及肱二头肌肌腱外露, 上臂、前臂肌膜浅面的软组织均已坏死。头静脉、贵要静脉、肘正中静脉均已栓塞坏死。逐一切除坏死组织, 保留虽外露但尚未坏死、且无明显感染的腱性组织。严格止血、冲洗创面待植皮。以辊刀取左侧头皮, 注液肿胀止血^[1], 取厚度约 0.15 mm 的薄中厚自体头皮 8.0 cm × 6.5 cm, 小片状移植于左上肢, 一次性封闭创面。

术后 5 d 供皮区愈合, 术后 10 d 左上肢创面基本愈合。伤后 35 d, 患儿左上肢植皮区轻度瘢痕增生, 手背皮肤稍肿、温度不高、色泽不红、无压痛。肩关节、腕关节、掌指关节及手指功能基本正常, 指端痛觉反应存在, 肘关节伸直功能稍受限, 被动伸屈活动范围约为 75 ~ 160°。

讨论 曾有文章报道输液渗漏等医源性损伤可造成患者截肢等严重后果^[2]。该例患儿因输液渗漏致伤收入笔者单位后, 经必要的检查即果断手术切除坏死组织, 同时取头皮一次性封闭创面, 是治疗成功的关键。但是早产低体重新生儿感染创面行大范围坏死组织切除植皮术难度及风险较大, 主要存在以下问题: (1) 新生儿心肺功能不全, 代偿能力差, 易发生麻醉意外; (2) 新生儿的总血容量少, 若术中失血达 20 ~ 30 ml 且未及时补充, 就可能引起较严重的循环障碍; (3) 早产新生儿免疫功能存在缺陷^[3], 在其感染创面上行大范围坏死组织切除植皮术易使感染扩散, 从而加重病情。鉴于以上几点, 笔者采用简单的抢救性手术方式: 两组人员同时进行手术, 以缩短麻醉时间, 降低手术风险; 切除坏死组织后, 小片状移植患儿头部薄中厚自体皮, 该皮片不蜷缩、操作方便、易成活。术中严格止血, 用干纱布吸血, 精确计算失血量, 并根据失血量持续输血。另外, 取头皮时采用肿胀法止血, 供皮区基本上未见出血, 术中及术后各输血 50 ml, 使血容量始终处于相对稳定状态。同时, 围手术期使用敏感抗生素, 加强全身营养支持治疗, 从而有效地避免了术后感染。

参 考 文 献

1 吕国忠, 顾在秋, 朱宇刚, 等. 注液肿胀法止血在烧伤手术中的应用. 中华烧伤杂志, 2004, 20: 371.

2 沈余明, 沈祖尧, 李迟. 22 例医源性皮肤损伤的治疗. 中华烧伤杂志, 2002, 18: 22.

3 吴瑞萍, 胡亚美, 江载芳, 主编. 诸福棠实用儿科学. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 423.

(收稿日期: 2006 - 02 - 22)
(本文编辑: 赵敏)

作者单位: 324004 浙江衢州, 衢化医院烧伤整形科

· 消息 ·

本刊 2005 年被美国《医学索引》收录情况

根据中华医学会杂志工作通讯 2006 年第 6 期报道, 《中华烧伤杂志》2005 年有 219 篇论文被美国《医学索引》收录, 位居该索引收录的中国 97 种期刊中的第 28 位。