



lenge can rapidly lead to activation of NF- $\kappa$ B in various tissues, and NF- $\kappa$ B pathway might markedly up-regulate the production of biopterin/NO following endotoxic shock. Inhibition of NF- $\kappa$ 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 (BH<sub>4</sub>) 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<sup>[1,2]</sup>。但目前对脓毒性休克时 BH<sub>4</sub> 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)  $\kappa$ B 对 BH<sub>4</sub> 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 055: 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、T<sub>4</sub> 寡核苷酸激酶 (美国 Promega 公司); PCR 引物及 NF- $\kappa$ B 双链寡核苷酸探针 (上海申友生物技术有限责任公司); [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] 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, 经腹腔给予二甲亚砜 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- $\kappa$ B 信号通路阻断剂——PDTC (100 mg/kg, 以二甲亚砜作溶剂), 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  $\mu$ l 样本用 20  $\mu$ l 等渗盐水稀释后加入微量孔; 再加入 200  $\mu$ 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- $\kappa$ B 的 DNA 结合活性: 采用凝胶电泳迁移率分析法 (EMSA) 测定 NF- $\kappa$ B 的 DNA 结合活性。NF- $\kappa$ B 双链寡核苷酸探针的序列为 5'-AGTTGAGGGACTTTCCAGGC-3', 3'-AGATCACTAAACGTAAGCTGT-5'<sup>[3]</sup>。以 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP 标记 NF- $\kappa$ 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  $\mu$ l。将 4  $\mu$ l 5 倍稀释的蛋白结合反应缓冲液、2  $\mu$ l poly dI-dC (1 g/L) 和适量的核蛋白提取物 (含 15  $\mu$ g 蛋白) 混匀, 室温放置 15 min, 每管加 1  $\mu$ l [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP 标记的探针, 混匀, 37  $^{\circ}$ C 保温 30 min。每管加 5  $\mu$ l 上样缓冲液, 混匀, 取 25  $\mu$ 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- $\kappa$ 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'<sup>[12]</sup>; 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'<sup>[4]</sup>; 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'<sup>[5]</sup>; 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 BH<sub>4</sub> 含量: 采用反相高效液相分析方法测定大鼠血浆及组织中 BH<sub>4</sub> 的含量<sup>[2]</sup>。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 I<sub>2</sub> 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 BH<sub>4</sub> 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 BH<sub>4</sub> 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 BH<sub>4</sub> 含量 (μg/L)。组织中 BH<sub>4</sub> 的含量应用以下公式计算: 组织 BH<sub>4</sub> 含量 (μg/g) = 组织匀浆 BH<sub>4</sub> 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<sup>[6]</sup>。

#### 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 BH<sub>4</sub> 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 BH<sub>4</sub> 含量亦较低。LPS 注射后 2 h, 各组织 GTP-CH I mRNA 表达、血浆及 BH<sub>4</sub> 含量显著升高, 于 6 ~ 12 h 达峰值, 并且 GTP-CH I mRNA 表达和 BH<sub>4</sub> 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 BH<sub>4</sub> 的水平亦有所降低, 其中肝组织 BH<sub>4</sub> 水平各时相点均显著降低 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ )、肺组织中 BH<sub>4</sub> 水平 6 h 显著下降 ( $P < 0.05$ )、肾组织 BH<sub>4</sub> 水平 6、12 h 显著降低 ( $P <$

0.01);但血浆中 BH<sub>4</sub> 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 <sup>△</sup>	0.79 ± 0.09* <sup>☆</sup>
注射后 12 h	5	1.86 ± 0.27* <sup>☆</sup>	1.23 ± 0.26*	0.76 ± 0.10* <sup>☆</sup>

注:与正常组比较, \* P < 0.05, # P < 0.01;与 LPS 组比较, Δ P < 0.05, ☆ 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 (μmol/L)	组织 (μmol/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 <sup>☆</sup>	1.8 ± 0.4 <sup>☆</sup>	3.6 ± 0.5 <sup>☆</sup>	4.1 ± 0.9
注射后 6 h	5	107 ± 3*	2.5 ± 0.4* <sup>☆</sup>	5.8 ± 0.9* <sup>☆</sup>	4.8 ± 1.0*
注射后 12 h	5	129 ± 8* <sup>△</sup>	3.2 ± 0.6* <sup>△</sup>	6.3 ± 1.1* <sup>△</sup>	3.7 ± 0.8* <sup>☆</sup>

注:与正常组比较, \* P < 0.05, # P < 0.01;与 LPS 组比较, Δ P < 0.05, ☆ 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-κB 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-κB 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-κB 与 DNA 不同位点结合,从而调控不同的基因表达<sup>[7]</sup>。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 (IκB) 激酶,引起 IκBα 迅速磷酸化,使 NF-κB 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-κB 诱导表达的靶基因中多种物质是炎症反应的关键介质,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(μmol/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* <sup>△</sup>	404 ± 87*	12.9 ± 1.1*	108 ± 10* <sup>△</sup>	2.67 ± 0.36* <sup>☆</sup>
注射后 6 h	5	76 ± 4* <sup>△</sup>	252 ± 30* <sup>△</sup>	11.2 ± 1.6* <sup>△</sup>	66 ± 8* <sup>△</sup>	3.66 ± 0.21* <sup>☆</sup>
注射后 12 h	5	81 ± 20* <sup>△</sup>	214 ± 45* <sup>△</sup>	15.1 ± 1.0*	76 ± 18*	3.08 ± 0.38* <sup>△</sup>

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

展中起着非常重要的作用<sup>[8,9]</sup>。本组资料显示:正常组大鼠肝、肺、肾组织 NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B 在 NO 等炎性介质表达中的作用已得到初步证明<sup>[10]</sup>。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- $\kappa$ B 广泛活化。初步提示 NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\alpha$  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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B 的活化,因此被广泛用作 NF- $\kappa$ B 的抑制剂。体外细胞实验已证实,NF- $\kappa$ B 是 LPS 和炎性细胞因子诱导 iNOS 基因表达的重要转录因子<sup>[10]</sup>。本实验采用 PDTC 对 NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B 活性均有所降低,其中肝、肾组织 2 h、肺组织 2、12 h NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B 在内毒素休克中的作用,可以推测拮抗 NF- $\kappa$ 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<sup>[9]</sup>。

为了进一步探讨 NF- $\kappa$ B 是否参与内毒素休克时 BH<sub>4</sub> 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 BH<sub>4</sub>/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 BH<sub>4</sub>、NO 水平

亦有相应降低。证实 NF- $\kappa$ B 通路对 BH<sub>4</sub>/NO 系统均具有明显调节效应,可能参与了内毒素休克时 BH<sub>4</sub> 介导 NO 的合成。BH<sub>4</sub> 刺激能诱导血管平滑肌细胞 NF- $\kappa$ B 转移至核内,并且 iNOS mRNA 表达和 NO 释放均有所增加,阻断 NF- $\kappa$ B 后,BH<sub>4</sub> 对 NF- $\kappa$ B、iNOS 和 NO 的诱导作用完全被抑制,提示 NF- $\kappa$ B 调节了 BH<sub>4</sub> 对 iNOS 的诱导过程。不仅如此,NF- $\kappa$ B 还能调节 BH<sub>4</sub> 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<sup>[11,12]</sup>。

NF- $\kappa$ B 信号通路的活化与 BH<sub>4</sub> 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- $\kappa$ B 通路抑制剂 PDTC 干预后,内毒素休克大鼠组织 NF- $\kappa$ B 活性显著降低,BH<sub>4</sub>/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- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 等细胞因子基因启动子上均存在 NF- $\kappa$ B 的结合位点,抑制 NF- $\kappa$ B 通路活化一方面可能阻止 BH<sub>4</sub> 诱导 iNOS 转录及 NO 的过度产生,另一方面可减少 TNF- $\alpha$ 、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<sup>[13]</sup>。因此,应用 NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B 信号转导通路参与了内毒素休克的致病过程,并对 BH<sub>4</sub>/NO 系统具有明显调节效应。抑制 NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B pathway. Crit Care Med,

