论著

文章编号:1000-5404(2012)11-1062-05

苦柯胺B拮抗细菌内毒素和CpG DNA的实验研究

杨景程[1],刘 鑫[1],郑新川[1],祝元峰[1],鲁永玲[1],郑 江[1],罗奇志[2] (400038 重庆,第三军医大学西南医院:综合实验研究中心[1],全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[2])

[摘要] **目的** 观察中药活性成分苦柯胺B(kukoamine B,KB)体内外拮抗脓毒症的药理活性。**方法** 采用双偏振极化干涉测量技术测定KB与大肠埃希氏菌LPS、CpG ODN 1826的亲和力,并用鲎试剂法检测KB对大肠埃希氏菌LPS的体外中和作用,采用ELISA法体外检测KB对LPS和CpG DNA单独刺激RAW 264.7细胞释放炎症介质TNF-α和IL-6的抑制作用,ELISA法检测热灭活大肠埃希菌和热灭活金黄色葡萄球菌刺激RAW 264.7细胞释放炎症介质TNF-α和IL-6的抑制作用。在腹腔注射热灭活细菌菌液小鼠脓毒症模型中,将BALB/c小鼠分为对照组、KB(低、中、高剂量)组、和临床药物组(血必净和乌司他丁),观察比较7 d内各组动物死亡率。**结果** KB与LPS和CpG ODN1826的KD值分别为7.38 nmol/L和197.2 nmol/L,在体外KB能够明显抑制LPS对鲎试剂的促凝作用($P<0.05$,$P<0.01$),对热灭活细菌刺激RAW 264.7细胞释放TNF-α和IL-6具有显著的抑制作用,并呈现明确的量效关系($P<0.05$,$P<0.01$)。在体内实验中,KB对重度和极重度脓毒症模型均具有明确的保护作用,KB组小鼠生存率显著高于对照组和临床药物组($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** KB作为一种多病原分子的中和剂,能够抑制炎症介质的释放,发挥对脓毒症模型小鼠的保护作用,且效果显著优于现有临床用药血必净和乌司他丁。

[关键词] 苦柯胺B;脓毒症;细胞,培养的;小鼠
[中图法分类号] R285.5; R364.5; R631.05 [文献标志码] A

Antagonistic effect of kukoamine B on bacterial endotoxin and CpG DNA

Yang Jingcheng[1], Liu Xin[1], Zheng Xinchuan[1], Zhu Yuanfeng[1], Lu Yongling[1], Zheng Jiang[1], Luo Qizhi[2] ([1]General Laboratory Research Center, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the *in vitro* and *in vivo* pharmacological antagonistic activity of kukoamine B (KB) on sepsis. **Methods** Affinity of KB to lipopolysaccharide (LPS) and CpG DNA in *E. coli* was detected by dual polarization interferometry, *in vitro* ability of KB to neutralize LPS in *E. coli* was assayed by limulus amebocyte lysate (LAL) test, and inhibitory effect of KB on release of TNF-α and IL-6 from RAW 264.7 cells induced by either LPS and CpG DNA alone or by heat-inactivated *E. coli* and *Staphylococcus aureus* was detected by ELISA. A mouse sepsis model was induced by injecting heat-inactivated *E. coli* and *Staphylococcus aureus* into abdominal cavity of BALB/c mice. The BALB/c mice divided into control group, low dose KB group, medium KB dose group, high KB dose group, and clinical drug treatment group with their mortality observed for 7 days and compared. **Results** The affinity of KB to LPS and CpG ODN1826 was 7.38 and 197.2 nmol/L, respectively. KB significantly inhibited the *in vitro* coagulation effect of KB on LPS ($P<0.05$ or $P<0.01$) and the release of TNF-α and IL-6 from RAW 264.7 cells induced by heat-inactivated *E. coli* and *Staphylococcus aureus* in a dose-dependent manner. KB played a significant role in protecting mice against severe and extremely severe sepsis. The survival rate of mice was significantly higher in KB group than in control group and clinical drug treatment group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** KB, as a neutralizer of several pathogen molecules, can inhibit the release of inflammatory cytokines and plays a role in protecting mice against sepsis. Its effect is significantly better than that of Xuebijing and ulinastatin.

[**Key words**] kukoamine B; sepsis; cultured cells; mice

Supported by the Major Project of Science and Technology for New Drugs of Chongqing (CSTC2009AB5090). Corresponding author: Zheng Jiang, E-mail: zhengj99219@gmail.com; Luo Qizhi, E-mail: luoqz333@yahoo.com

[基金项目] 重庆市重大科技专项"新药创制"项目(CSTC2009AB5090)
[通信作者] 郑 江,E-mail:zhengj99219@gmail.com
罗奇志,E-mail:luoqz333@yahoo.com

脓毒症(sepsis)是由感染因素介导的全身性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),起病隐匿,进展迅速,死亡率高,是导致危重症患者死亡的首要因素[1-3],有关其防治措施的研究一直是临床关注的难点和热点问题。

苦柯胺B(又名地骨皮乙素,Kukoamine B,KB)是通过基于亲和生物传感器技术的筛选和定向分离,以LPS和CpG DNA为靶标,从中药地骨皮中获得的一种生物碱类成分[4-5]。为明确其药理活性和成药前景,本研究通过测定KB对LPS和CpG DNA亲和力,分别检测KB对两者单独和联合刺激RAW 264.7细胞释放TNF-α和IL-6的抑制效果,并采用注射致死剂量热灭活细菌的方法构建重度和极重度脓毒症动物模型,观察KB对模型小鼠的保护作用,同时与临床用药血必净和乌司他丁进行平行比较,以评价KB对脓毒症小鼠的保护效果。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

KB由本实验室自制;RAW 264.7细胞、大肠埃希菌(*E. coli*)ATCC35218和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)ATCC25923均购自ATCC;大肠埃希氏菌LPS(O111:134,批号109k4054)与CpG ODN 1826(批号M355953)均购自生工生物有限公司;鲎试剂(批号1106161)。购自湛江安度斯生物有限公司;小鼠TNF-α检测试剂盒(批号E09483-1632)、IL-6检测试剂盒(批号E09362-1632)均购自Ebiosicence公司;血必净注射液(批号1011012)生产厂家为天津红日药业股份有限公司;乌司他丁(批号031101112)生产厂家为广东天普生化医药股份有限公司。

1.2 实验动物

8周龄BALB/c小鼠480只,体质量18~20 g,雌雄各半,购于军事医学科学院实验动物中心(北京华阜康生物科技股份公司销售),饲养于SPF级动物实验室。

1.3 KB与大肠埃希氏菌LPS、CpG ODN 1826的亲和力测定

采用双偏振极化干涉测量(DPI)分子相互作用检测系统,将大肠埃希氏菌LPS以及CpG ODN 1826分别包被在样品反应池中,检测11个倍比稀释浓度的KB(0~1 280 nmol/L)与LPS以及19个倍比稀释浓度的KB(0~640 μmol/L)与CpG ODN 1826的结合作用,并计算解离平衡常数(KD值)。

1.4 KB对大肠埃希氏菌LPS的体外中和作用测定

将0.01、0.03、0.10 μmol/L的KB与1 ng/ml的大肠埃希氏菌LPS于室温持续振荡孵育30 min,以蒸馏水为阴性对照,加入等体积鲎试剂,于37 ℃进行动态浊度检测,将浊度通过标准曲线换算为LPS的效价浓度(EU值)。

1.5 KB对LPS和CpG ODN1826单独刺激RAW 264.7细胞释放TNF-α和IL-6的抑制作用

将终浓度分别为0.01、0.03、0.10、0.30、1.00 μmol/L的KB分别加入由大肠埃希菌LPS(50 ng/ml)和CpG ODN1826(0.5 μg/ml)单独刺激的RAW 264.7细胞(1×10^6/ml)中,以未经刺激的RAW 264.7细胞为阴性对照,分别加样后12 h后取上清,ELISA法测TNF-α和IL-6,与未加KB组进行比较。

1.6 KB对热灭活细菌刺激RAW 264.7细胞释放TNF-α和IL-6的抑制作用

制备热灭活细菌悬液,将终浓度为0.01、0.03、0.10、0.30、1.00 μmol/L的KB分别加入热灭活大肠埃希菌(EC)(5×10^6 CFU/ml)和热灭活金黄色葡萄球菌(SA)刺激的RAW 264.7细胞(1×10^6/ml)中,以未经刺激的RAW 264.7细胞为阴性对照,分别于加样12 h后取上清,ELISA法测TNF-α和IL-6,与未加KB组进行比较。

1.7 腹腔注射热灭活大肠埃希菌悬液脓毒症模型的建立及动物保护实验

将小鼠用随机数字法分为6组,模型对照组、低浓度KB组(KB1)、中浓度KB组(KB2)、高浓度KB组(KB3)、血必净组和乌司他丁组,每组20只,雌雄各半。

热灭活大肠埃希菌重度脓毒症模型采用经腹腔注射菌液(1.2×10^{11} CFU/kg),之后0、6、12、20、28 h经尾静脉给药,0.1 ml/20 g,对照组注射生理盐水,KB组注射KB溶液(0.01、0.03、0.10 mg/kg),血必净组注射血必净注射液(5 ml/kg),乌司他丁组注射乌司他丁(10 000 U/kg),观察记录动物7 d死亡率。在极重度模型中将菌液攻击剂量增加为1.4×10^{11} CFU/kg,其余条件不变。

热灭活金黄色葡萄球菌重度脓毒症模型中,菌液攻击剂量为7×10^{11}CFU/kg,极重度模型菌液攻击剂量为9×10^{11} CFU/kg,KB组剂量分别调整为0.1、0.3、1.0 mg/kg,其余同热灭活大肠埃希菌脓毒症模型保护实验。

1.8 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件。数据以$\bar{x}\pm s$表示,体外实验结果采用单因素方差分析,小鼠的存活时间和生存率采用Kaplan-Meier生存分析法。

2 结果

2.1 KB与大肠埃希氏菌LPS、CpG ODN 1826的亲和力测定

KB种LPS和CpG ODN发生明确的结合反应,并呈现显著的量效关系。经换算,KB与LPS和CpG ODN1826均具有高亲和活性,KD值分别为7.38 nmol/L和197.20 nmol/L(图1、2)。

2.2 KB对大肠埃希氏菌LPS的体外中和作用测定

阴性对照和单独KB(0.01 mg/kg)不引起鲎试剂的凝集反应。相同浓度(1 ng/ml)的大肠埃希氏菌LPS能够引起鲎试剂的凝集反应,而分别加入浓度为0.01、0.03、0.10 μmol/L的KB

与 LPS 预孵育后，鲎试剂的凝集程度均降低，抑制率达到 60%～99% 以上，与 LPS 组比较具有统计学意义（$P<0.01$）。见图3。

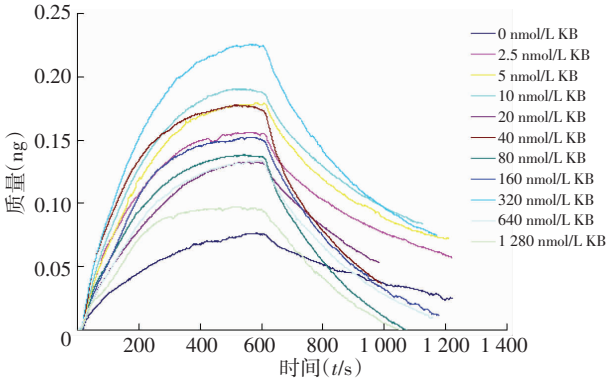


图1 KB 与大肠杆菌 LPS 的结合力测定

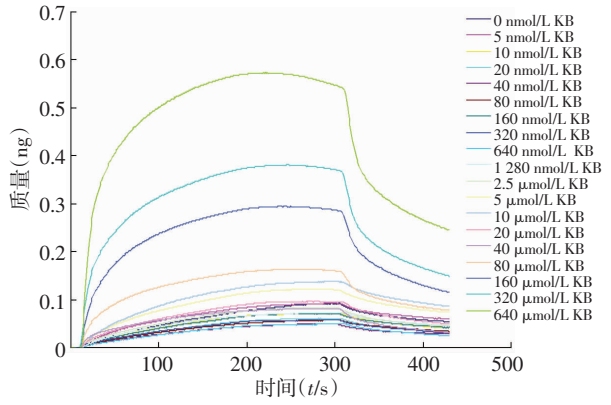
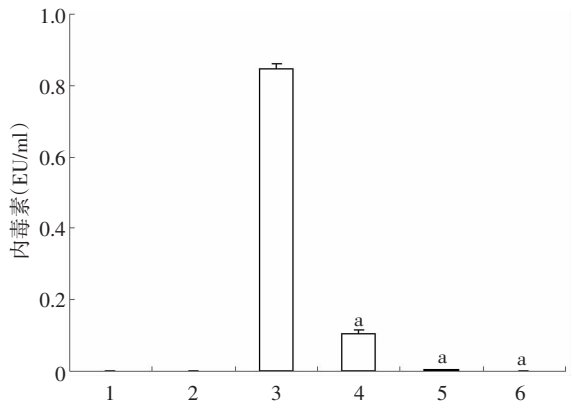


图2 KB 与 CpG ODN 1826 的结合力测定



1：阴性对照组；2：KB 组；3：LPS 组；4：LPS + 0.01 μmol/L KB 组；5：LPS + 0.03 μmol/L KB 组；6：LPS + 0.10 μmol/L KB 组

a：$P<0.01$，与 LPS 组比较

图3 KB 对大肠埃希氏菌 LPS 的体外中和作用

2.3 KB 对 LPS 和 CpG ODN1826 单独刺激 RAW 264.7 细胞释放 TNF-α 和 IL-6 的抑制作用

大肠埃希菌 LPS 和 CpG ODN1826 单独均可刺激活化 RAW 264.7 细胞，导致炎症介质 TNF-α 和 IL-6 的释放大量增加，而同时加入 KB（0.01～1.00 μmol/L）进行干预处理后，细胞上清中 TNF-α 和 IL-6 的水平显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$），表明 KB 能够抑制其引发的 RAW 264.7 细胞炎性活化（表1、2）。

表1 KB 对大肠埃希氏菌 LPS 刺激 RAW 264.7 细胞释放 TNF-α 和 IL-6 的抑制作用（$\bar{x}\pm s$）

组别	TNF-α（ng/ml）	IL-6（pg/ml）
阴性对照组	0.277 ± 0.044	103.851 ± 119.016
KB 组	0.256 ± 0.040	53.070 ± 33.566
LPS 组	52.273 ± 3.464	2 364.925 ± 197.089
LPS + 0.01 μmol/L KB 组	4.820 ± 2.661[b]	1 244.542 ± 172.796[a]
LPS + 0.03 μmol/L KB 组	8.308 ± 6.303[b]	680.505 ± 72.658
LPS + 0.10 μmol/L KB 组	2.801 ± 2.029[b]	1 498.430 ± 1 147.931[a]
LPS + 0.30 μmol/L KB 组	2.925 ± 1.585[b]	869.260 ± 358.793[a]
LPS + 1.00 μmol/L KB 组	2.286 ± 0.818[b]	663.812 ± 120.215[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 LPS 组比较

表2 KB 对 CpG ODN1826 刺激 RAW 264.7 细胞释放 TNF-α 和 IL-6 的抑制作用（$\bar{x}\pm s$）

组别	TNF-α（ng/ml）	IL-6（pg/ml）
阴性对照组	0.183 ± 0.004	103.851 ± 119.016
KB 组	0.176 ± 0.004	53.070 ± 33.566
CpG 组	25.040 ± 0.723	431.257 ± 32.947
CpG + 0.01 μmol/L KB 组	20.068 ± 1.701	291.593 ± 22.983[a]
CpG + 0.03 μmol/L KB 组	16.156 ± 0.494[a]	224.856 ± 29.043[a]
CpG + 0.10 μmol/L KB 组	17.518 ± 3.714[a]	173.015 ± 37.321[a]
CpG + 0.30 μmol/L KB 组	15.079 ± 5.162[a]	260.393 ± 69.988[a]
CpG + 1.00 μmol/L KB 组	13.256 ± 2.027[a]	129.453 ± 25.343[a]

a：$P<0.01$，与 CpG 组比较

2.4 KB 对热灭活细菌刺激 RAW 264.7 细胞释放 TNF-α 和 IL-6 的抑制作用

未经处理以及仅加入 KB（1 μmol/L）的 RAW 264.7 细胞炎症介质 TNF-α 和 IL-6 的水平极低。热灭活 EC 菌液（5×10^6 CFU/ml）处理的 RAW 264.7 细胞炎症介质 TNF-α 和 IL-6 的释放大量增加，而同时加入 KB（0.01～1.00 μmol/L）干预处理后，细胞上清中 TNF-α 和 IL-6 的水平显著降低（$P<0.01$），并且该作用呈现明显的剂量效应关系（表3）。

经热灭活 SA 菌液（5×10^7 CFU/ml）处理的 RAW 264.7 细胞加入 KB（0.01～1.00 μmol/L）干预处理后，与未加 KB 组相比，细胞上清中 TNF-α 的水平显著降低，而 IL-6 水平下降不明显，仅高浓度 KB 组（1 μmol/L）降低（$P<0.01$），提示 KB 对 G^+ 细菌 SA 刺激引发的 RAW 264.7 细胞炎性活化也有抑制作用，但效果不如对 G^- 细菌 EC 的抑制作用明显（表4）。

表3 KB 对 EC 刺激 RAW 264.7 细胞释放 TNF-α 和 IL-6 的抑制作用（$\bar{x}\pm s$）

组别	TNF-α（ng/ml）	IL-6（pg/ml）
阴性对照组	0.183 ± 0.004	−20.913 ± 1.095
KB 组	0.176 ± 0.004	236.493 ± 6.661
EC 组	52.738 ± 1.870	5 987.083 ± 413.173
EC + 0.01 μmol/L KB 组	30.403 ± 4.199[a]	4 371.018 ± 992.703[a]
EC + 0.03 μmol/L KB 组	12.975 ± 1.048[a]	4 037.778 ± 628.724[a]
EC + 0.10 μmol/L KB 组	13.539 ± 2.180[a]	4 291.704 ± 864.992[a]
EC + 0.30 μmol/L KB 组	12.653 ± 3.680[a]	3 124.892 ± 418.430[a]
EC + 1.00 μmol/L KB 组	8.280 ± 0.241[a]	3 300.911 ± 702.233[a]

a：$P<0.01$，与 EC 组比较

表 4 KB 对 SA 刺激 RAW 264.7 细胞释放 TNF-α 和 IL-6 的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α (ng/ml)	IL-6 (pg/ml)
阴性对照组	0.183 ± 0.004	103.851 ± 119.016
KB 组	0.176 ± 0.004	53.070 ± 33.566
SA 组	31.035 ± 6.153	2 340.623 ± 170.055
SA + 0.01 μmol/L KB 组	26.963 ± 1.085	2 012.525 ± 280.186
SA + 0.03 μmol/L KB 组	21.761 ± 2.883[a]	1 970.722 ± 279.392
SA + 0.10 μmol/L KB 组	20.048 ± 2.015[a]	1 927.127 ± 319.817
SA + 0.30 μmol/L KB 组	21.395 ± 1.828[a]	1 990.229 ± 53.642
SA + 1.00 μmol/L KB 组	19.470 ± 2.427[a]	1 687.181 ± 310.013[a]

a: $P < 0.01$, 与 SA 组比较

2.5 KB 对热灭活大肠埃希菌腹腔注射攻击脓毒症小鼠的保护作用

KB 对极重度脓毒症小鼠(死亡率 80%)具有保护作用,延长小鼠生存时间,与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$);而血必净和乌司他丁效果不佳,与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$,表 5)。

在重度脓毒症小鼠模型中(死亡率 65%),血必净和乌司他丁均有保护作用,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);而 KB 保护作用更强,与对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$),与血必净组比较差异有显著性($P < 0.05$)。见表 5。

表 5 KB 对热灭活大肠埃希菌脓毒症小鼠的保护作用

组别	极重度脓毒症小鼠生存率	重度脓毒症小鼠生存率
模型对照组	20.0%	35.0%[ce]
EC + KB1 组	40.0%[ac]	95.0%[bc]
EC + KB2 组	30.0%	95.0%[bc]
EC + KB3 组	45.0%[ac]	100.0%[bde]
EC + 血必净组	20.0%	65.0%[a]
EC + 乌司他丁组	30.0%	75.0%[a]

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与模型对照组比较; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与血必净组比较; e: $P < 0.05$, 与乌司他丁组比较

2.6 KB 对热灭活金黄色葡萄球菌腹腔注射攻击脓毒症小鼠的保护作用

3 种成分均对此模型保护作用较差,除高浓度 KB 组外,其余组与对照组无显著性差异($P > 0.05$);在极重度(死亡率 95%)和重度(死亡率 69%)动物模型中,高浓度 KB 组均表现出保护作用且优于血必净和乌司他丁($P < 0.05$)(表 6)。

表 6 KB 对热灭活金黄色葡萄球菌脓毒症小鼠的保护作用

组别	极重度脓毒症小鼠生存率	重度脓毒症小鼠生存率
模型对照组	5.0%[d]	31.3%
EC + KB1 组	5.0%[b]	50.0%[bd]
EC + KB2 组	10.0%[d]	55.0%
EC + KB3 组	25.0%[ac]	80.0%[ace]
EC + 血必净组	0[e]	17.6%
EC + 乌司他丁组	10.0%[c]	18.8%

a: $P < 0.05$, 与模型对照组比较, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$, 与血必净组比较, d: $P < 0.05$, e: $P < 0.01$, 与乌司他丁组比较

3 讨论

脓毒症是由感染因素介导的全身性炎症反应综合征,病原分子与模式识别受体结合,导致炎症细胞活化,造成大量炎症介质的释放,继而引起补体系统和凝血反应的过度活化,导致失控性炎症反应的发生,发生多器官功能衰竭[6]。临床上由细菌介导的脓毒症占 95% 以上。其中约 50% 的细菌脓毒症是直接由 G^- 细菌引起。在 G^- 细菌中,LPS 和细菌 DNA 是两种分布最为广泛,作用最为重要的 PAMPs[7]。近年来,革兰阳性菌脓毒症的发病率逐年上升,至 20 世纪 90 年代已达脓毒症发病率的 40 % 以上,并仍有升高趋势。其中金黄色葡萄球菌发病率位居首位,其致病因素复杂、耐药性不断增强,所致脓毒症的防治已成为现代创伤外科和危重病医学面临的棘手难题之一[8-9]。国际上对于脓毒症的防治研究,主要以拮抗炎症反应中的关键分子和纠正凝血、补体等系统的紊乱为导向,主要有各种细胞因子的抗体及其受体拮抗剂,TNF 抗体、白细胞介素-1(IL-1)抗体、IL-6 抗体以及 NO 拮抗剂等[10],到目前为止,上述药物研究没有取得任何突破性进展,表明针对某个或数个细胞因子调控的策略并不能从根本上解决脓毒症防治的问题。因此,从拮抗脓毒症主要病原分子的角度出发,从源头阻断炎症反应细胞的活化,避免休克和多器官衰竭等威胁患者生命的后续事件发生,可能才是解决脓毒症问题的关键。

PGN、CpG DNA 和 LPS 是引起脓毒症的主要病原相关分子,其中任何单一分子均可介导致死性脓毒症的发生,然而临床上的脓毒症其病原分子都不是单一的,因此只将某一种病原分子作为靶点,并不能完全解决脓毒症防治的问题。因此,我室将 3 种病原分子包被于生物传感器上,对 114 种具有抗炎作用的植物中药进行筛选,采用定向分离技术从筛选处的中药地骨皮中提取 KB[11]。本体外实验表明,KB 与介导脓毒症的主要病原菌大肠埃希氏菌 LPS 和 CpG ODN 1826 均具有高亲和活性,其解离平衡常数为 nmol/L 水平,表明 KB 能够与引发脓毒症的主要病原分子 LPS 和 CpG DNA 产生良好的结合作用,这种作用可能是其发挥药效活性的前提和基础。同时,KB 能够抑制 LPS 对鲎试剂的促凝作用,表明 KB 不仅可结合 LPS,同时也能中和 LPS,发挥对 LPS 的拮抗活性。体外细胞因子实验结果显示, KB 不论是对单一病原分子 LPS 和 CpG ODN1826 刺激 RAW 264.7 细胞释放炎症介质 TNF-α 和 IL-6,还是对包含复合病原分子的热灭活细菌刺激 RAW 264.7 细胞释放炎症介质 TNF-α 和 IL-6 都具有很好的抑制活性,并呈现明确的剂量效应关系,提示 KB 通过与病原分子的结合,阻断病原分子对机体免疫细胞的刺激作用,从而从源头发挥对炎症介质释放的抑制作用。

目前多通过单一病原分子攻击动物建立脓毒症模型,但临床上脓毒症的发生往往不是由单一的病原分子诱发,且不同病原分子间存在协同作用,且单一注射

LPS动物,血清细胞因子水平远远高于脓毒症患者,因此单一病原分子的刺激并不能较好模拟脓毒症发生[12]。本研究分别采用致死剂量的灭活大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌攻击动物建立脓毒症动物模型。热灭活大肠埃希菌等革兰阴性菌主要含有病原分子LPS及CpG DNA,热灭活金黄色葡萄球菌则主要含有病原分子PGN及CpG DNA,比单一病原分子引起的脓毒症模型更接近于临床上细菌引起的脓毒症。体外实验表明,两者均可刺激细胞炎性活化,导致炎症介质TNF-α和IL-6的释放大量增加。但由于建模所注射菌液浓度较大,小鼠体型小,尾静脉注射易引起动物栓塞死亡,故改用腹腔注射方法。

血必净注射液是从红花、赤芍、当归、川芎、丹参五味中药中提取有效成分制成的注射液,具有清热解毒、活血化瘀、扶正祛邪等功效,乌司他丁是由肝脏分泌的种具有广谱蛋白酶抑制作用的糖蛋白,目前均广泛应用于脓毒症的临床治疗[13-16],在本研究中与KB比较,评价KB的保护作用。结果表明,不论在大肠埃希菌还是金黄色葡萄球菌所致脓毒症小鼠模型中,KB都表现出较强的保护作用,这可能与KB结合中和了内毒素与CpG DNA有关,从源头阻断了脓毒症的发生发展,同时下调TNF-α、IL-6水平,抑制动物失控炎症反应,提高动物生存率。

综上所述,KB能显著中和多个病原分子并抑制其诱导的炎症反应,提高脓毒症模型动物生存率,优于现有主要临床药物血必净与乌司他丁,有很好的开发应用前景。

参考文献:

[1] Levy M M, Fink M P, Marshall J C, *et al*. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference[J]. Intensive Care Med, 2003, 29(4): 530-538.

[2] Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre M C, *et al*. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 168(2): 165-172.

[3] Bernard G R, Vincent J L, Laterre P F, *et al*. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis[J]. N Engl J Med, 2001, 344(10): 699-709.

[4] 龙宇鹏, 郑江. 以lipid A为靶点应用生物传感器技术筛选抗炎中药[J]. 中国药业, 2008, 17(7): 4-6.

[5] Liu X, Zheng X, Long Y, *et al*. Dual targets guided screening and isolation of Kukoamine B as a novel natural anti-sepsis agent from traditional Chinese herb Cortex lycii[J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(1): 110-120.

[6] Gottar M, Gobert V, Michel T, *et al*. The Drosophila immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein[J]. Nature, 2002, 416(6881): 640-644.

[7] Opal SM, Gluck T. Endotoxin as a drug target[J]. Crit Care Med, 2003, 31(1): 57-64.

[8] 姚咏明, 盛志勇. 重视金黄色葡萄球菌脓毒症的研究[J]. 中华烧伤杂志, 2000, 16(2): 75-77.

[9] 刘杜姣, 张新玲, 李菊莲, 等. 脓毒症金黄色葡萄球菌感染监测及治疗体会[J]. 中国实用内科杂志, 2011, 31(2): 149-151.

[10] 伏建峰, 何新建. 脓毒症的发病机制及防治药物研发新思路[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(1): 66-68.

[11] Liu X, Zheng X, Wang N, *et al*. Kukoamine B, a novel dual inhibitor of LPS and CpG DNA, is a potential candidate for sepsis treatment[J]. Br J Pharmacol, 2011, 62(6): 1274-1290.

[12] 姚咏明. 脓毒症动物模型的选择与评价[J]. 继续医学教育, 2008, 22(1): 28-31.

[13] 胡晶, 商洪才, 李晶, 等. 血必净注射液治疗脓毒症的系统评价[J]. 解放军医学杂志, 2010, 35(1): 9-12.

[14] Bingyang J, Jinping L, Mingzheng L, *et al*. Effects of urinary protease inhibitor on inflammatory response during on-pump coronary revascularisation. Effect of ulinastatin on inflammatory response[J]. J Cardiovasc Surg (Torino), 2007, 48(4): 497-503.

[15] 谢康, 黄跃生. 乌司他丁对严重烧伤大鼠血清中致炎因子的影响及意义[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(18): 1643-1645.

[16] 安宇, 何敬远, 王义兴, 等. 乌司他丁联合血必净治疗重症脓毒症的研究[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(15): 2898-2900.

(**收稿**:2012-02-17;**修回**:2012-03-04)

(编辑 王 红)

2010年医科大学学报类期刊主要指标(按综合评价总分排名)

刊名	总被引频次		影响因子		综合评价总分	
	数值	排名	数值	排名	数值	排名
第三军医大学学报	3153	1	0.668	3	68.5	1
第二军医大学学报	1733	3	0.478	13	59.7	2
新乡医学院学报	970	12	0.891	1	57.5	3
北京大学学报医学版	1132	5	0.582	7	56.8	4
中国医学科学院学报	1158	4	0.620	6	56.3	5
南方医科大学学报	2126	2	0.451	18	56.2	6
中山大学学报医学版	826	19	0.647	5	55.9	7
中南大学学报医学版	1014	9	0.548	8	53.9	8
复旦学报医学版	881	16	0.481	12	51.4	9
浙江大学学报医学版	466	39	0.498	11	49.0	10

——摘自《2011版中国科技期刊引证报告(核心版)》