维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)03－0376－03

胸腺肽 β_4 提高内毒素休克小鼠存活率并下调炎症介质释放

赵裕光[1], 时　德[1], 王　爽[2]

(1.重庆医科大学临床学院普外科;2.重庆医科大学临床学院神经内科,重庆　400016)

【摘　要】目的:研究胸腺肽 β_4(thymosinβ_4, Tβ_4)对内毒素休克小鼠 72h 存活率的影响,检测 TNF－α 及 IL－1α 变化,初步探讨 Tβ_4 治疗内毒素休克的机制。方法:选用清洁级昆明小鼠腹腔注射脂多糖(LPS)制备内毒素休克动物模型,①观察内毒素休克前后 Tβ_4 变化情况。②Tβ_4 对内毒素休克小鼠存活率的影响。动物随机分为 4 组,每组 30 只,均腹腔注射 LPS(25mg/kg),Ⅰ组为 LPS 对照组,Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ组分别于 LPS 腹腔注射后 0h;0h、2h;0h、2h、4h 尾静脉注射 Tβ_4(5mg/kg),观察 72h 存活率。③ELISA 法检测 Tβ_4 对内毒素休克小鼠血浆 TNF－α 及 IL－1α 变化情况。结果:Tβ_4 在内毒素休克小鼠的血浆中明显降低,Tβ_4 可提高内毒素休克小鼠 72h 存活率,并下调 TNF－α 及 IL－1α 的释放。结论:Tβ_4 治疗内毒素休克应在 LPS 腹腔注射后 0h、2h、4h 连续注射 Tβ_4(5mg/kg),实验提示 Tβ_4 可能是通过下调炎症介质的释放来治疗内毒素休克的。

【关键词】胸腺肽 β_4;存活率;TNF－α;IL－1α

【中国图书分类法分类号】R363　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2004－10－08

Thymosin β_4 raises survival rate and down－regulates inflammatory mediators in septic shock mice

ZHAO Yuguang, et al

(*Department of General Surgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the mechanism of action of thymosin β_4(Tβ_4) in septic shock by observing the 72h survival rate of septic shock mice treated with thymosin β_4 and exploring the changes of TNF－α and IL－1α. *Methods*: LPS(lipopolysaccharide) was intraperitoneally injected into clean Kunming mice to establish the animal model. ①The Tβ_4, between normal and septic shock mice were determined. ②The survival rate of septic shock mice was studied by intraperitoneal injection of Tβ_4. Animals were divided into four groups of 30 and each received LPS(25mg/kg) intraperitoneal injection. Group Ⅰ was LPS control group. Group Ⅱ, Ⅲ and Ⅳ were individually injected with Tβ_4 at 0h, 0h, 2h; 0h, 2h, 4h post LPS through caudal vein. ③TNF－α and IL－1α were examined in septic shock mice by ELISA. *Results*: Tβ_4 was obviously decreased in the blood of septic shock mice. Tβ_4 could raise the 72h survival rate of septic shock mice and down－regulate inflammatory mediators. *Conclusion*: The optimal protective methods in the mouse appears to be 5mg/kg Tβ_4 given immediately following(0h) and at 2h and 4h successively post LPS. Tβ_4 down－regulates the inflammatory mediators, which may be the mechanism of Tβ_4 in curing the septic shock.

【Key words】Thymosin β_4; Survival rate; Tumor necrosis factor－α (TNF－α); Interleukin－1 α(IL－1α)

内毒素是革兰氏阴性细菌细胞壁的一种组成成分,其主要化学成分为脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)。LPS 是诱发炎症反应过程中的主要致病成分,通过诱导体内单核—巨噬细胞合成并释放多种炎症介质,参与机体免疫炎症反应,严重时可导致脓毒性休克。Tβ_4 是一种高度保守的肽,具有免疫调节特性,在哺乳动物细胞中 Tβ_4 的主要作用是使肌动蛋白处于单体状态[1]。近来有研究表明 Tβ_4 在皮肤全层损伤中可以加快皮肤的愈合[2],促进角膜烧伤后创面的愈合,并下调一些关键细胞因子的产生[3,4]。本实验以内毒素休克小鼠为实验对象,初步探讨 Tβ_4 治疗内毒素休克的机制。

作者介绍:赵裕光(1976－　),男,博士,
主要研究方向:重症疾病的治疗研究。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物

清洁级昆明小鼠(重庆医科大学动物中心提供),雌雄不拘,体重 20±2g。

1.1.2　试剂

Tβ_4 购于 Advanced Chem Tech 公司,LPS 购于 Sigma 公

维普资讯 http://www.cqvip.com

司，$T\beta_4$ ELISA 试剂盒购于北京晶美生物技术公司，TNF－α及 IL－1αELISA 试剂盒购于北京邦定泰克生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 内毒素休克小鼠血浆 $T\beta_4$ 测定

选用 30 只清洁级昆明小鼠，随机分为正常对照组及 LPS 组（15 只/组），LPS 组腹腔注射 LPS（25mg/kg）复制内毒素休克小鼠模型，1h 后取眼球血，离心，取上清，用 ELISA 法测两组动物血浆 $T\beta_4$ 含量。

1.2.2 $T\beta_4$ 对内毒素休克小鼠 72h 存活率测定

选用 120 只清洁级昆明小鼠，随机分为四组，均腹腔注射 LPS（25mg/kg），Ⅰ组在腹腔注射 LPS 后 0h、2h、4h 自尾静脉注射生理盐水；Ⅱ组在腹腔注射 LPS 后，0h 自尾静脉注射 $T\beta_4$（5mg/kg），2h、4h 注射生理盐水；Ⅲ组在腹腔注射 LPS 后，0h、2h 自尾静脉注射 $T\beta_4$（5mg/kg），4h 注射生理盐水；Ⅳ组在腹腔注射 LPS 后，0h、2h、4h 自尾静脉脉注射 $T\beta_4$（5mg/kg）。分别记录四组小鼠 72h 存活率。

1.2.3 TNF－α及 IL－1α的测定

选用 30 只清洁级昆明小鼠，随机分为 LPS 对照组及 $T\beta_4$ 预处理 LPS 组（15 只/组），两组均腹腔注射 LPS（25mg/kg），$T\beta_4$ 预处理 LPS 组在注射 LPS 前 30min 自尾静脉注射 $T\beta_4$（5mg/kg）。两组均于 LPS 腹腔注射后 1h 采眼球血，离心，取上清，用 ELISA 法测 TNF－a 及 IL－1a 含量。

1.3 统计学处理

两均数间差异比较用 t 检验，内毒素休克小鼠 72h 存活率比较用 χ^2 检验，采用 SPSS10.0 统计学软件处理。

2 结 果

表 1 正常对照组与 LPS 组小鼠血浆 $T\beta_4$ 含量（$\bar{x} \pm s$）

	n	正常对照组	LPS 组
$T\beta_4$（ng/ml）	15	12.46±0.43	4.12±0.38

注：正常对照组 $T\beta_4$ 含量明显高于 LPS 组，$P<0.01$

表 2 四组内毒素休克小鼠 72h 存活率

组别	n	存活数	存活率
Ⅰ	30	6	20.0%
Ⅱ	30	16	53.3%
Ⅲ	30	20	66.7%
Ⅳ	30	28	93.3%

注：从表中可知四组小鼠存活率依次提高，Ⅰ组与Ⅱ组比较 $P<0.05$，Ⅰ组与Ⅲ组比较 $P<0.01$，Ⅰ组与Ⅳ组比较 $P<0.01$，说明 $T\beta_4$ 可以提高内毒素小鼠存活率。Ⅱ组与Ⅲ组比较 $P>0.05$，说明两组间无差异。Ⅱ组与Ⅳ组比较 $P<0.01$，Ⅲ组与Ⅳ组比较 $P<0.05$，说明Ⅳ组治疗效果最好。

小鼠腹腔注射 LPS 后，很快出现明显的症状：寒战、萎靡，呼吸急促，继之活动明显减少，嗜睡，小鼠间互相挤靠在一起，双眼紧闭有分泌物，不思饮食。小鼠死亡之前口唇明显紫绀，呼吸减慢，肌张力降低，抽搐、颤抖，然后死亡。

内毒素休克小鼠血浆 $T\beta_4$ 明显降低，低于正常对照组，差异显著。见表 1。

四组内毒素休克小鼠 72h 存活率依次升高，差异显著。见表 2。

$T\beta_4$ 能够明显降低内毒素休克小鼠血浆中 TNF－α及 IL－1α的含量，差异显著，见表 3。

表 3 LPS 对照组与 $T\beta_4$ 预处理 LPS 组 TNF－α及 IL－1α血浆含量比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	TNFα（pg/ml）	IL－1α（pg/ml）
LPS 对照组	15	4549±105	1324±121
$T\beta_4$ 预处理 LPS 组	15	312±24	287±22

注：从表可以看出 $T\beta_4$ 预处理 LPS 组中 TNF－α及 IL－1α含量明显低于 LPS 对照组。$P<0.01$

3 讨 论

作为革兰氏阴性杆菌的主要致病物质，LPS 进入体内引起的炎症反应，组织细胞炎症损伤，甚至 MOF/MODS 等病理改变，并非其直接的损伤效应，而主要是通过“扳机”（trigger）样作用激活体内的炎性细胞（如单核巨噬细胞，中性粒细胞、内皮细胞），触发这些细胞释放炎性介质（尤其是 TNFα、IL－1、IL－6、IL－8），启动炎症级联反应过程而实现[5]。

LPS 刺激宿主炎性细胞的过程大致如下：在单核巨噬细胞和中性粒细胞，LPS－LBP 复合物与细胞表面的 CD14（mCD14）结合，在不表达 mCD14 的内皮细胞，LPS－LBP 复合物与可溶性 CD14（sCD14）结合，导致 LPS 快速地从细胞膜转位到细胞内，并通过某种信号转导分子激活细胞内多条信号转导途径，如酪氨酸激酶途径，最终导致细胞的炎性效应[6]。

虽然内毒素休克是一个普通临床现象，但是机制仍不是很清楚。正如内毒素诱导的病理过程。内毒素休克出现于一系列的级联反应，开始于细菌感染导致细菌内毒素释放激活宿主防御体系。尽管应用有效抗生素，但是很多患者死于并发症及多器官功能衰竭。

胸腺肽（胸腺素）最初于 1981 年由 Goldstein 自胎牛胸腺蛋白提取液中制备得到，含有 40 多种多肽成分，根据这些多肽在等电聚焦电泳分析图谱上的位置，划分为 α、β、γ 三个区：α 区 PI<5，β 区 PI 在 5～7 之间，γ 区 PI>7[7]。胸腺肽 α_1 能够增强机体细胞免疫功能，已经用于临床。胸腺肽 β_4（$T\beta_4$）不仅参

维普资讯 http://www.cqvip.com

与免疫过程,而且表现出多重生物学功能,吸引研究者广泛关注。

$T\beta_4$ 是一个由 43 个氨基酸组成的高度保守的肽,它普遍存在于许多组织的细胞内,尤其在血小板、中性粒细胞、巨噬细胞及其它淋巴细胞[1]。早期报道 $T\beta_4$ 具有免疫调节和神经内细胞迁移,增强巨噬细胞的抗原递呈,通过下丘脑增加 LHRF(黄体激素释放因子)的释放[8]。近来发现 $T\beta_4$ 可以明显加快全层损伤的皮肤愈合及角膜烧伤后的愈合,并且下调一些关键细胞因子[2~4]。

实验首先研究了 $T\beta_4$ 在内毒素休克小鼠血浆中的含量明显低于正常对照组,说明 $T\beta_4$ 与内毒素休克的发生发展关系密切。

在这里,发现 $T\beta_4$ 可以提高内毒素休克小鼠的存活率,治疗效果最好的是Ⅳ组,即在腹腔注射 LPS 后 0h、2h、4h 立即给予 $T\beta_4$(5mg/kg)注射。

然而,$T\beta_4$ 是如何提高内毒素休克小鼠的存活率的呢? 通过实验发现,$T\beta_4$ 可以降低内毒素休克小鼠血浆中的 TNFα 及 IL-1α 含量。因此,我们可以认为 $T\beta_4$ 是通过降低炎症介质的释放来治疗内毒素休克的。

尽管休克治疗取得一些进步,但是死亡率仍为 40%[9]。众所周知,在内毒素休克之前出现几种病理改变:大量肌动蛋白入血,花生四烯酸产物增加,炎症介质增加,自由基增加及细胞和组织损伤[10]。

将 $T\beta_4$ 微量注射入哺乳动物细胞证明 $T\beta_4$ 在有核细胞主要作用是使肌动蛋白处于游离状态[11]。有研究表明 $T\beta_4$ 是以 1:1 的方式与肌动蛋白单体结合的[12]。肌动蛋白在非肌肉细胞中具有重要作用,是细胞骨架的重要成分。当细菌、真菌、病毒损伤组织及细胞坏死,大量肌动蛋白入血[10]。因此我们可以设想 $T\beta_4$ 在内毒素休克中降低的原因可能为:大量入血的肌动蛋白单体结合了 $T\beta_4$,使 $T\beta_4$ 的抑制炎症介质释放能力下降,导致了内毒素休克的级联反应的发生。

研究表明对 $T\beta_4$ 的进一步研究是非常有意义的,如在高危病人中 $T\beta_4$ 可以作为一个早期预警标志。$T\beta_4$ 在内毒素性休克中作用提示:肌动蛋白毒性在脓毒性休克中病理生理作用非常重要。此外,TB4 在败血症中是一个早期,但是潜在可复性事件,对脓毒性休克患者给予药理剂量 $T\beta_4$ 对治疗其高病死率是有一个治疗前景。

参 考 文 献

[1] Mora CA, Baumann CA, Piano JE, et al. Biodistribution of synthetic thymosin beta 4 in the serum, urine, and major organs of mice[J]. Int J Immunopharmacol, 1997; 19(1): 1-8.

[2] Malinda KM, Sidhu GS, Mani H, et al. Thymosin beta 4 accelerates wound healing[J]. J Invest Dermatol, 1999; 113(3): 364-368.

[3] Sosne G, Chan CC, Thai K, et al. Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and modulates inflammatory mediators in vivo[J]. Exp Eye Res, 2001; 72(5): 605-608.

[4] Sosne G, Hafeez S, Greenberry AL, et al. Thymosin beta 4 promotes corneal wound healing and decreases inflammation in vivo following alkali injury[J]. Exp Eye Res, 2002; 74(2): 293-299.

[5] Suzuki K, Tateda K, Matsumoto T, et al. Effects of interaction between Escherichia coli verotoxin and lipopolysaccharide on cytokine induction and lethality in mice[J]. J Med Microbiol, 2000; 49(10): 905-910.

[6] Moreno C, Merino J, Ramirez N, et al. Lipopolysaccharide needs soluble CD14 to interact with TLR4 in human monocytes depleted of membrane CD14[J]. Microbes Infect, 2004; 6(11): 990-995.

[7] Low TL, Hu SK, Goldstein AL. Complete amino acid sequence of bovine thymosinbeta 4: a thymic hormone that induces terminal deoxynucleotidyl transferase activity in thymocyte populations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1981; 78(2): 1162-1166.

[8] Feinberg J, gery J, Heitz F, et al. Correlations between biological activity and structural properties for two short homologous sequences in thymosin beta 4 and gelsolin[J]. Int J Pept Protein Res, 1996; 47(1-2): 62-69.

[9] Butt W. Septic shock[J]. Pediatr. Clin. North Am, 2001; 48(3): 601-625.

[10] Boer C, van Nieuw Amerongen GP, Groeneveld AB, et al. Smooth muscle F-actin disassembly ar/d RhoA/Rho-kinase signaling during endotoxin-induced alterations in pulmonary arterial compliance[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004; 287(4): L649-655.

[11] Bonnet D, Lemoine FM, Frobert Y, et al. Thymosin beta 4, inhibitor for normalhematopoietic progenitor cells[J]. Exp Hematol, 1996; 24(7): 776-782.

[12] Ballweber E, Hannappel E, Niggemeyer B, et al. Induction of the polymerization of actin from the actin; thymosin beta 4 complex by phalloidin, skeletal myosinsubfragment 1, chicken intestinal myosin I and free ends of filamentous actin[J]. Eur J Biochem, 1994; 223(2): 419-426.