DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.05.001
第26卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 5
2004年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2004

文章编号:1000-5404(2004)5-0373-05

论著

内毒素结合肽在烧伤合并内毒素血症大鼠模型中的作用

麻 莉[1],刘友生[1],王晓东[1],章 容[1],李永旺[2] (第三军医大学:[1]西南医院病理科,重庆 400038,[2]新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 观察重组人内毒素结合肽蛋白在烧伤合并内毒素血症大鼠中的作用。方法 采用烧伤合并内毒素血症大鼠模型,分为模型组(n=36)、治疗组(n=36)及对照组(n=6)。模型组在烧伤后立即腹腔内注射1 mg/kg内毒素(用1 ml生理盐水配制);治疗组腹腔内注射1 mg/kg内毒素(用0.5 ml生理盐水配制)后,再注入400 μg/kg制备好的内毒素结合肽(用0.5 ml生理盐水配制);模型组和治疗组分别在处理后1、3、6、12、24、48 h取血和肝、肺组织,对照组仅在脱毛后腹腔内注入1 ml生理盐水,取血和肝、肺组织作总体对照。采用生化速率法、ELISA法及组织学切片染色和电镜制样等方法,测定血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-6(IL-6)的含量变化以及光、电镜观察肝、肺组织的病理学变化。结果 模型组于伤后1 h血清TNFα显著高于对照组(P<0.01),6 h达峰值;治疗组与模型组比较各时相点血清TNFα含量均显著降低(P<0.01, P<0.05)。血清IL-6含量测定结果,模型组于伤后1 h血清IL-6显著高于对照组(P<0.01),12 h达峰值。治疗组3~48 h各时相点血清IL-6含量均显著低于模型组(P<0.01, P<0.05)。大鼠血清中谷丙转氨酶的动态变化提示,模型组大鼠血清ALT水平较正常组显著升高(P<0.01),治疗组大鼠的血清ALT水平和模型组相比显著降低(P<0.01, P<0.05)。组织病理学变化方面,治疗组中肝细胞的变性程度减轻,炎细胞浸润减少;肺间质充血、出血及肺泡间隔的炎性改变也有不同程度减轻。结论 重组人内毒素结合肽EBP在烧伤合并内毒素血症大鼠中具有一定的生物活性和保护作用。

关键词:内毒素结合肽;脂多糖;内毒素血症
中图法分类号:R341.6;R631.1;R644.02 文献标识码:A

Roles of endotoxin binding peptide in rat model of burn combined with endotoxemia

MA Li[1], LIU You-sheng[1], WANG Xiao-dong[1], ZHANG Rong[1], LI Yong-wang[2] ([1]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Chongqing 400038; [2]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To observe the protective effect of recombinant human endotoxin binding peptide (EBP) on a rat model of burn combined with endotoxemia. **Methods** A total of 78 rats of model of burn combined with endotoxemia were divided into three groups: model group (n=36), treatment group (n=36), and control group (n=6). Rats in the model group were intraperitoneally injected with 1 mg/kg endotoxin (prepared with 1 ml saline) immediately after burn. After intraperitoneal injection of 1 mg/kg endotoxin (prepared with 0.5 ml saline), rats in the treatment group were intraperitoneally injected with EBP (prepared with 0.5 ml saline). Blood and liver and lung tissues of rats in the model and treatment groups were collected at 1, 3, 6, 12, 24, and 48 h after treatment. Rats in the control group were intraperitoneally injected with 1 ml saline after trichomadesis. Blood and liver and lung tissues of rats in the control group were collected for the total control. The changes of alanine aminotransferase (ALT), TNF-α, and IL-6 contents in serum were determined by biochemical velocity analysis, ELISA, and light microscopy. The pathological changes of the liver and lung tissues were observed light microscopically and electron microscopically. **Results** The serum TNF-α level of rats in the model group was significantly higher than that in the control at 1 h after injury (P<0.01) and reached the peak value at 6 h. Serum TNF-α level of rats at each time point in the treatment group was significantly lower than that in the model group (P<0.01, P<0.05). Serum Il-6 level of rats in the model group was significantly higher than that in the control group at 1 h after injury (P<0.01),

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000171)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30000171)
作者简介:麻 莉(1971-),女,河南省驻马店市人,博士,主治医师,主要从事分子病理学方面的研究,现在第二炮兵总医院妇产科。电话:(010) 66343165
通信作者:刘友生,电话:(023) 68754431, E-mail: youshengliu660@hotmail.com
收稿日期:2004-01-10;修回日期:2004-02-12
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

and reached the peak at 12 h. The serum IL-6 levels during 3—48 h in the treatment group were significantly lower than those in the model group. The dynamic changes of ALT showed that the serum ALT level in the model group increased significantly, as compared with that in the normal control group ($P<0.01$), but the serum ALT level in the treatment group decreases significantly, as compared with that in the model group ($P<0.01$, $P<0.05$). Histopathological changes revealed attenuated degree of degeneration of hepatocytes, decreased inflammatory cell infiltration, and attenuated interstitial congestion and hemorrhage and inflammatory changes of alveoli in the lungs. **Conclusion** The recombinant human EBP may possess a biological activity and play a potential protective role in the rat model of burn combined with endotoxemia.

Key words: entodoxin binding peptide; lipopolysaccharide; endotoxemia

研究表明,由细菌脂多糖/内毒素(lipopolysaccharide, LPS)介导的细胞激活反应和活性物质释放很大程度上有赖于脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharides binding protein, LBP)和 CD14 的参与[1,2]。LBP 的结构与功能关系研究表明[3],其 N 末端结合 LPS,C 末端结合 CD14,从而形成 LPS-LBP-CD14 三联复合物,LBP 起着催化放大 LPS 启动单核/巨噬细胞分泌炎性介质和细胞因子的作用。经修饰改造的氨基端脂多糖结合蛋白(NH°LBP)能有效地结合或中和内毒素,但存在表达不够稳定,其体内特异性保护作用不强,潜在有机体排异反应等缺陷[4]。研究表明 NH°LBP 的 LPS 特异结合区域位于第三个外显子,定位在 109~125 残基,共含有 17 个氨基酸。克隆 NH°LBP 的 LPS 特异结合区域位基因,并深入研究其结构与功能的关系,对小分子内毒素拮抗剂研究具有十分重要的意义。本实验在获得了分子量为 3.5×10^3 的重组人内毒素结合肽(endotoxin binding peptide, EBP)并在体外活性初步鉴定的基础上[5],应用烧伤合并内毒素血症大鼠模型在体内鉴定其生物学活性和潜在的保护作用,为 EBP 的进一步应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂

LPS(*E. coli* 0111: B4)购自 Sigma 公司;大鼠 TNF-α、IL-6 ELISA 试剂盒购自 Genzyme 公司;重组内毒素结合肽 EBP(序列: Leu-Ser-Ile-Arg-Val-Glu-Gly-Arg-lys-Val;纯度: 99.7%)由本所表达纯化并经初步鉴定;8%硫化钠:8 g 硫化钠溶于 100 ml 蒸馏水中;3%凝固汽油:将 3 g 凝固汽油用研石本研碎,加入 100 ml 高标号液体汽油,混匀置 4 ℃冰箱,每天振荡数次,3~4 d 后呈胶冻状时可用。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及处理 选用健康清洁级 Wistar 大鼠(第三军医大学大坪医院实验动物中心提供)78 只,雌雄不拘,体质量(220±30) g。分为模型组($n=36$)、治疗组($n=36$)及对照组($n=6$)。烧伤合并内毒素血症大鼠模型按照本所的方法建立[6]:实验大鼠背部以 8%硫化钠脱毛后,以凝固汽油(按 1 ml/100 g 计算)均匀涂抹于脱毛皮肤上,燃烧 30 s 造成 20% III度烧伤,立即腹腔内注射 1 mg/kg 内毒素(用 1 ml 生理盐水配制);治疗组烧伤后立即腹腔内注射 1 mg/kg 内毒素(用 0.5 ml 生理盐水配制)后,在 1 min 内再注入 400 μg/kg 制备好的内毒素结合肽(用 0.5 ml 生理盐水配制);分别在处理后 1、3、6、12、24、48 h 处死动物取血和肝、肺组织。对照组仅在脱毛后腹腔内注入 1 ml 生理盐水,取血和肝、肺组织作总体对照。

1.2.2 血清肿瘤坏死因子(TNF-α)、白介素-6(IL-6)测定 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测动物血清中 TNF-α 和 IL-6 的含量。

1.2.3 血清谷丙转氨酶(ALT)测定 采用速率法在日立 715 型全自动生化分析仪上检测动物血清中 ALT 的含量。

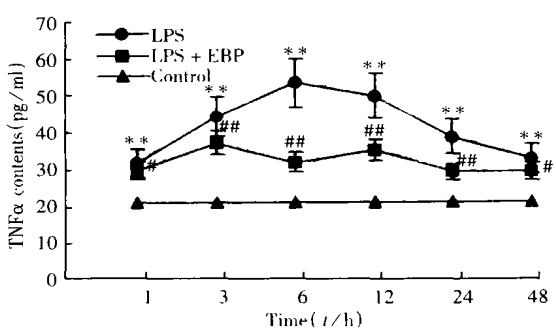
1.2.4 光、电镜观察组织病理学变化 光镜观察:取各时相点每组动物的肺、肝、肾组织以 10%福尔马林固定,常规石蜡包埋、切片、HE 染色,光镜下观察组织学改变。电镜观察:取 6、12、24 h 3 个时相点每组各 3 只动物的肺、肝组织,3%戊二醛固定→0.1 mol/L PBS 缓冲液冲洗→饱和醋酸铅染色→系列丙酮脱水→环氧树脂 618 包埋→行超薄切片→醋酸铅、枸橼酸铅染色→JEM-2000 型透射电镜下观察、摄像。

1.2.5 统计学分析 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 Excel 2000 统计程序对各组数据进行单因素方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 大鼠血清 TNF-α、IL-6 测定

血清 TNF-α 含量测定结果:模型组于伤后 1 h 血清 TNF-α 显著高于对照组,6 h 达峰值,至 48 h 仍高于对照组;治疗组与模型组比较各时相点血清 TNF-α 含量均显著降低(图 1)。



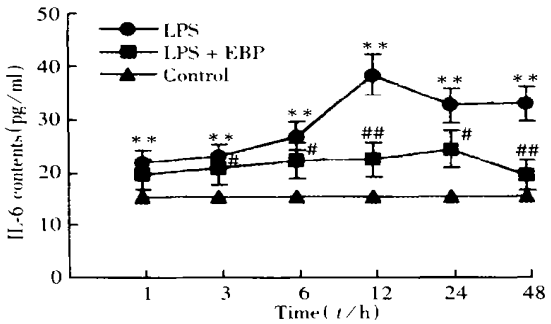
**: $P<0.01$, *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, *vs* LPS group

图 1 大鼠血清 TNF-α 含量变化

Fig 1 Changes of serum TNF-α content in rats

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

血清 IL-6 含量测定结果, 模型组于伤后 1 h 血清 IL-6 显著高于对照组, 12 h 达峰值, 至 48 h 仍高于对照组。治疗组伤后 1 h 血清 IL-6 水平与模型组相比无显著差异, 3 ~ 48 h 各时相点血清 IL-6 含量均显著低于模型组(图 2)。



**: $P<0.01$, *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, *vs* LPS group

图 2　大鼠血清 IL-6 含量变化

Fig 2　Changes of serum IL-6 content in rats

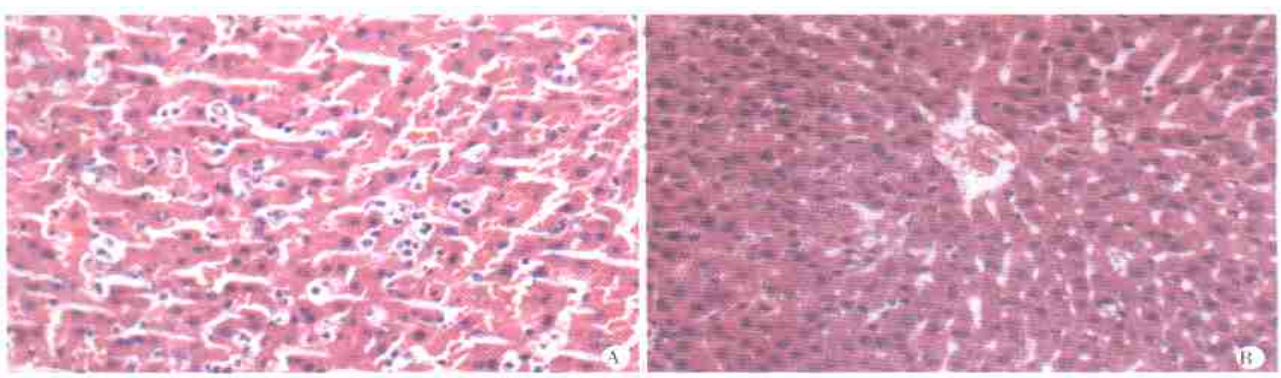
2.2　血清谷丙转氨酶(ALT)测定

大鼠血清中谷丙转氨酶的动态变化提示, 模型组大鼠血清 ALT 水平较正常组显著升高, 治疗组大鼠的血清 ALT 水平和模型组相比显著降低。

2.3　大鼠部分内脏器官的组织病理学观察结果

2.3.1　肝脏组织的主要病理学改变　　模型组: 光镜显示肝窦充血、扩张, 并可见较多中性粒细胞, 部分中性粒细胞向肝细胞索浸润(图 3A)。汇管区可见少量炎细胞浸润; 局部肝细胞肿胀, 偶见肝细胞嗜酸性变及点状坏死; 肝细胞肿胀较广泛, 嗜酸性变及点状坏死较少见, 灶性坏死偶见。电镜: 内皮细胞高度肿胀, 胞浆溶解, 并形成大量髓鞘样结构。可见部分肝细胞核染色质边集; 内皮细胞脱落; 肝细胞线粒体肿胀或灶性空化; 内皮细胞胞浆断裂, 呈游离的泡状结构或见该处大量髓鞘样结构形成; 狄氏间隙可见红细胞碎片, 近毛细胆管处肝细胞胞浆内出现大量髓鞘样结构(图 4A)。

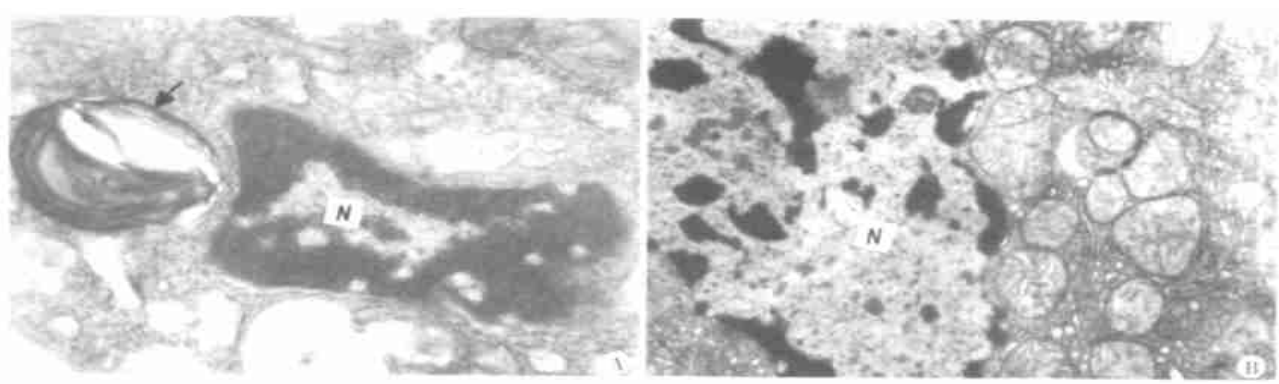
治疗组: 上述肝损伤有不同程度减轻, 肝窦内炎症反应不明显, 血小板聚集、纤维素沉积少见, 肝细胞肿胀不明显, 偶见肝窦腔内非实质细胞有反应增生性改变(图 3B); 电镜示 KC 与窦壁紧贴, 内皮细胞轻度肿胀, 未见坏死脱落; 肝细胞线粒体肿胀明显减轻, 未见线粒体空化; 髓鞘样结构少见(图 4B)。



A: Liver tissue of model group　Showed hepatic stromal hyperemia and dilation with many neutrophils in the hepatic stroma, some of which infiltrated in to the hepatocyte cord; B: Liver tissue of EBP treatment group　Reactive hyperplasia of nonessential cells could be found accidentally in the hepatic stroma

图 3　大鼠处理后 24 h 肝脏的组织形态变化　(HE× 200)

Fig 3　Morphological changes of liver tissue of rat 24 h after treatment　(HE× 200)



A: Liver tissue of model group　Chromatin assembled to the verge of hepatocellular nucleolus (N). Medullary structure (→) could be found in the cytoplasm; B: Liver tissue of EBP treatment group　No medullary structure was found in the hepatocellular cytoplasm

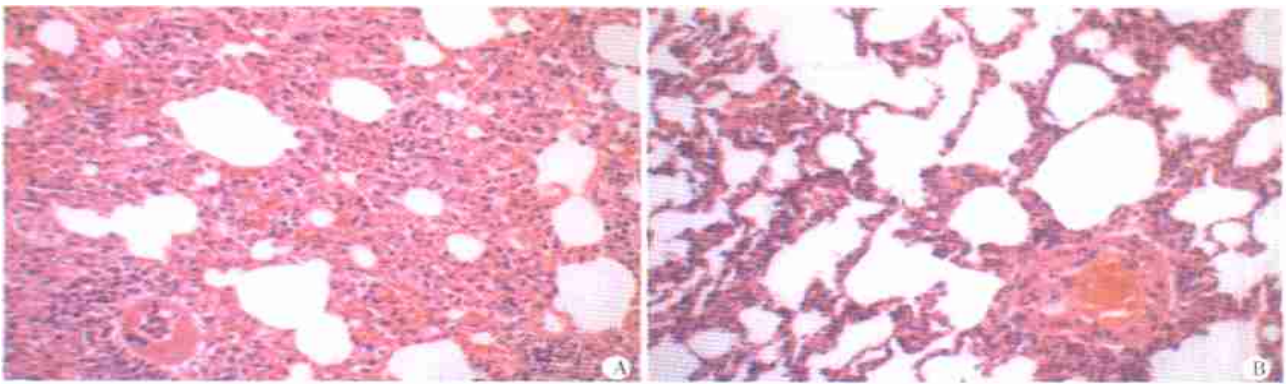
图 4　大鼠处理后 24 h 肝脏的组织超微结构变化　(TEM× 6 000)

Fig 4　Ultrastructural changes of liver tissue of rats 24 h after treatment　(TEM× 6 000)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3.2 肺脏组织的主要病理学改变 模型组 光镜：肺间质充血明显，局部肺泡隔明显增厚（图 5A）；肺小血管及部分毛细血管内可见较多中性粒细胞聚集；弥漫性毛细血管扩张，伴局灶性肺出血，可见灶性肺间质和肺泡内出血伴少量中性粒细胞浸润。电镜：肺间质水肿明显，毛细血管腔内可见血小板、PMN和红细胞成分，部分PMN嵌顿于血管腔内或伸出伪足与内皮细胞黏附，内皮细胞肿胀，胞浆连接间隙增宽，胞浆内吞饮泡增多，线粒体空化，内质网扩张；血管基底膜肿胀呈进行性加重；肺泡Ⅱ型上皮细胞大量脱落于肺泡腔内伴板层体排空（图6A）。

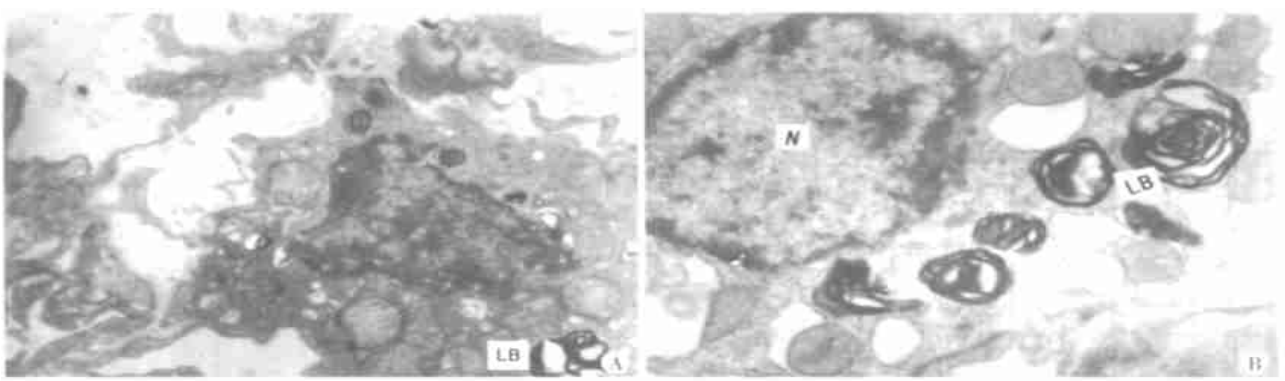
治疗组各时相点可见肺损伤呈不同程度减轻。肺泡腔内炎性渗出及肺泡间质充血水肿减轻，炎细胞浸润较少（图5B）。电镜：血管内皮细胞轻度肿胀，细胞连接间隙增宽不明显；Ⅱ型上皮细胞变性减轻，板层体排空少见（图6B）。



A: Lung tissue of model group Serious lung tissue congestion and incrassated alveolar spaces, accompanied by neutrophil soakage; B: Lung tissue of EBP treatment group The pathological changes were less significantly as compared with those of the model group

图5 大鼠处理后24 h肺脏的组织形态变化 （HE× 200）

Fig 5 Morphological changes of lung tissue of rats 12 h after treatment （HE× 200）



A: Lung tissue of model group The layer bodies (LB) of alveolar type Ⅱ epithelial cells decreased; B: Lung tissue of EBP treatment group Normal alveolar type Ⅱ epithelial cells

图6 大鼠处理后24 h肺脏的组织超微结构变化 （TEM× 6 000）

Fig 6 Ultrastructural changes of lung tissue of rats 24 h after treatment （TEM× 6 000）

对照组：光、电镜下肝、肺组织均未见明显病变。

3 讨论

内毒素血症的防治研究是近10多年来国际医药学界研究最为活跃的领域之一。研制高亲和力、能中和内毒素且毒性低的抗内毒素新药，对内毒素血症的防治具有重要的意义。针对LPS特异结合区域的肽类基因工程制剂，是目前研究和开发内毒素抑制剂的方向和趋势。

本研究根据公认的LBP中的LPS结合区域，应用PCR技术，已从含人NH-LBP cDNA的质粒中扩增得到内毒素结合肽（EBP）基因片段，并借助原核表达系统及多重分离纯化体系，得到分子量仅为3.5×10^3的小分子肽，可克服大分子药物的相对分子质量大、组织渗透性弱、体内运输能力差、不稳定、有宿主免疫原性等缺点。我们采用烧伤合并内毒素血症大鼠模型，观察在应用EBP后大鼠的血清TNF-α、IL-6变化情况，及器官功能障碍的改善情况，以评价EBP的内毒素拮抗效应及对部分重要脏器的保护作用。通过对模型大鼠在烧伤合并内毒素注射与EBP作用前后的动态对比观

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

察, 在组织病理学变化方面, 治疗组中肝细胞的变性、坏死程度减轻, 炎细胞浸润显著减少; 肺组织毛细血管充血减轻, 肺泡腔内、支气管内渗出减弱, 肺泡间隔的炎性改变也有不同程度减轻。

文献[6] 表明由于内毒素对肝脏的致伤性效应以及刺激单核巨噬细胞系统后产生的多种活性物质的损伤作用, 常常引起肝脏功能降低, 主要包括肝细胞损伤、肝内淤积胆汁以及肾功能损害等。在测定肝功能方面, 我们选用了 ALT 作为观察指标。众所周知, 血清转氨酶活性是肝功能损害的明显指标, 在除外肝外脏器病变的情况下(如急性心肌梗死、心肌炎和心肌病, 血清转氨酶升高反映了肝细胞损害和坏死程度[7]。大鼠血清中 ALT 的动态变化提示, 治疗组大鼠的肝脏功能较损伤组有所好转。

LPS 刺激反应导致细胞因子的过量产生被认为是革兰阴性菌脓毒症的发病机制[8]。LPS 通过与靶细胞作用而诱导细胞因子合成和分泌, 这些靶细胞包括单核/巨噬细胞、B 淋巴细胞、粒细胞、血小板、成纤维细胞和内皮细胞等, 所产生的细胞因子包括 IL-1α、IL-1β、TNF-α、IL-6、IL-8 等[9]。内毒素诱生的细胞因子中, TNF-α 和 IL-6 被认为是急性炎症反应的主要细胞因子, 其主要来源是 LPS 刺激的单核/巨噬细胞, 尤其是肝脏枯否细胞可能具有重要作用[11]。本研究对模型组大鼠肝脏的组织病理学观察中亦显示, 伴随 KC 激活和肝细胞损害的形态学改变, 表现为 KC 数量增多、体积增大、吞噬功能增强, 肝细胞出现胞浆内局部空化、退行性变及髓鞘样结构增多等变化, 同时血中 TNF-α 和 IL- 6 含量增加。大鼠血清中 TNF-α、IL-6 的 ELISA 检测显示, 在各时相点治疗组 TNF-α 、IL-6 的含量均有不同程度的下降, 提示 EBP 可能中和了部分 LPS, 从而减弱了 LPS 对 TNF-α、IL-6 等细胞因子释放的刺激作用。

因此, 经过动物在体实验的初步观察, 我们认为重组内毒素结合肽是具有一定的生物活性的重组蛋白, 对烧伤合并内毒素血症大鼠的脏器损伤具有一定的保护作用。其生物学功能及其作用机制则有待于进一步的深入研究。

参考文献:

[1] Gegner J A, Ulevitch R J, Tobias P S. Lipopolysaccharide (LPS) signal transduction and clearance: Dual roles for LPS binding protein and membrane CD14[J]. J Biol Chem, 1995, 270(10): 5320－5325.

[2] Schumann R R, Lamping N, Kirschning C, *et al*. lipopolysaccharide binding protein: its role and therapeutical potential in inflammation and sepsis [J]. Biochem Soc Trans, 1994, 22(1): 80－82.

[3] Schumann R R, Leong S R, Flaggs G W, *et al*. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein[J]. Science, 1990, 249(4975): 1429－1431.

[4] Chaby R. Strategies for the control of LPS-mediated pathophysiological disorders[J]. Drug Disc Today, 1999, 4(5): 209－221.

[5] 麻　莉, 刘友生, 王晓东, 等. 内毒素结合肽表达质粒的构建及其在大肠杆菌中的表达[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(4): 302－304.

[6] 刘友生, 晏良遂. 烧伤复合内毒素血症对肝脏的损害及其意义的研究[J]. 中华整形烧伤杂志, 1994, 10(2): 142－144.

[7] DeGasperi A, DeCian W, Vaiani F, *et al*. Endotoxemia following liver transplantation in humans[J]. Transplant Proc, 1994, 26(6): 3664－3665.

[8] 梁扩寰 著. 肝脏病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 208－211.

[9] Heumann D, Roger T. Initial response to endotoxins and Gram-negative bacteria[J]. Clin Chim Acta, 2002, 323(1－2): 59－72.

[10] Woltmann A, Hamann L, Ulmer A J, *et al*. Molecular mechanisms of sepsis[J]. Langenbecks Arch Surg, 1998, 383(1): 2－10.

[11] Wan Y H, Freeswick P D, Khemlani L S, *et al*. Role of lipopolysaccharide(LPS), interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor, and dexamethasone in regulation of LPS-binding protein expression in normal hepatocytes and hepatocytes from LPS-treated rats[J]. Infect Immun, 1995, 63(7): 2435－2442.

（编辑　汪勤俭）

参考文献类型及标识

根据 GB 3469 规定, 以单字母方式标识以下各种参考文献类型:

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献, 其文献类型标识建议采用单字母“A”; 对于其他未说明的文献类型, 建议采用单字母“Z”。

对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献, 建议以下列双字母作为标识:

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net