

脓毒症的发病机制及防治药物研发新思路^{*}

伏建峰 综述,何新建 审校

(兰州军区乌鲁木齐总医院全军临床检验诊断中心 830000)

关键词:脓毒症; 病症防治; 发病机制

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.01.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)01-0066-03

脓毒症是由感染因素导致的全身性炎性反应综合征,是临床创伤、烧伤和感染性疾病患者的常见并发症,进一步发展可

导致脓毒症性休克和多器官功能障碍综合征,病死率高达50%~60%^[1]。国际上针对脓毒症的防治性研究一直是临床

^{*} 基金项目:兰州军区医药卫生科研计划项目(LXH2009021),新疆军区医院人才基金(联卫〔2009〕62号)。

医学关注的焦点和热点,但由于脓毒症发病机制非常复杂,有关脓毒症拮抗措施的研究一直未取得突破性进展。因此,加强对脓毒症发病机制的研究,全面理解脓毒症的本质,制定合理的防治措施,对提高脓毒症患者的救治水平具有重要意义。

1 脓毒症的发病机制

脓毒症发病过程反映了病原微生物与宿主免疫应答的相互作用,涉及炎症反应、免疫和凝血等多个系统的功能紊乱。许多病原微生物如细菌、真菌等均能介导脓毒症的发生,但临床上由 G^- 菌、 G^+ 菌引发的脓毒症占 95% 以上。

1.1 脓毒症早期的免疫应答 宿主针对入侵病原体的免疫应答分为天然免疫应答和获得性免疫应答,天然免疫系统是宿主的第一道防线。天然免疫的启动依赖于种系编码受体的微生物模式识别,即模式识别受体 (PRRs) 对微生物在进化过程中保留着的保守结构基系,即病原体相关分子模式 (PAMPs) 的识别。

细菌多个 PAMPs 参与脓毒症的发生,目前明确的 PAMPs 主要有细菌脂多糖/内毒素 (LPS)、肽聚糖 (PGN)、细菌基因组 DNA (CpG DNA)、磷壁酸 (LTA)、鞭毛蛋白、脂蛋白、酵母多糖以及病毒 DNA 和 RNA 等,其中 LPS、PGN 和 CpG DNA 等细菌菌体成分是介导脓毒症的主要病原分子^[2]。Toll 样受体 (TLRs) 是哺乳动物重要的 PRRs,人类基因库有 12 种 TLR。目前,有关 TLRs 比较清楚的识别模式是:TLR4 识别 G^- 菌的 LPS,TLR2 识别 G^+ 菌的 PGN,TLR9 识别 G^+ 菌和 G^- 菌共有的 CpG DNA,PRRs 对 PAMPs 的识别是启动脓毒症的关键环节^[2-4]。细菌 PAMPs 通过与炎症反应细胞膜上/内的 TLRs 结合将胞外刺激信号导入胞内,从而激活胞内信号转导,进而活化 NF- κ B。激活的 NF- κ B 从胞浆进入胞核,结合于转录起始位点,启动下游细胞因子基因的转录,诱生 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 和 IL-4 等多种细胞因子,其中, TNF- α 、IL-1 β 是致炎细胞因子,IL-4、IL-10 等是抗炎细胞因子^[5-6]。

天然免疫系统适当的炎症反应可达到有效清除病原微生物、保持机体健康的目的,但过度的炎症反应则对机体产生有害作用。当致炎细胞因子产生过量或抗炎细胞因子相对合成不足时,机体内炎症细胞被过度激活,而造成抗炎细胞因子与致炎细胞因子的平衡失调。致炎细胞因子通过上调黏附受体表达激活内皮细胞,并通过募集中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和血小板黏附于内皮细胞,这些效应细胞释放多种介质,如:蛋白酶、自由基、前列腺素、白细胞三烯等,进而损伤内皮细胞,激活凝血系统^[7]。此外,致炎细胞因子还可激活获得性免疫系统,致使炎症反应进一步加剧。

1.2 促凝-抗凝平衡失调 脓毒症时,凝血级联效应的激活主要依赖组织因子 (TF) 途径。致炎细胞因子的大量释放可激活内皮细胞,促使内皮细胞 TF 表达上调,TF 激活循环中 VII 因子,TF/ VIIa 复合物又激活 X 因子,使凝血酶原转变为凝血酶。在凝血酶的作用下,纤维蛋白原首先形成纤维蛋白单体,进而形成稳定的不溶性纤维蛋白。然后,纤维蛋白与血小板结合,促使小静脉内血小板聚集和纤维蛋白沉积,形成广泛的微血栓^[8]。微血栓的形成使微循环受阻,引起末梢缺血和组织缺氧,加之微血栓的形成还可引起多种介质的释放,结果造成更广泛的组织损伤。

正常生理情况下,宿主体内含有多天然抗凝因子,包括:蛋白 C (PC)、蛋白 S、抗凝血酶 III、组织因子途径抑制剂 (TFPI) 等,它们可以缓冲凝血级联效应,上调纤溶活性,进而消除微血栓,维持凝血与抗凝血的平衡。

如前所述,由 TF 介导的外源性凝血系统的激活促使凝血酶原转化为凝血酶,凝血酶与内皮细胞上的血栓调节蛋白结合后,使凝血酶空间结构发生改变,PC 进入结合位点,在凝血酶-血栓调节蛋白复合物作用下,PC 转变为具有丝氨酸蛋白酶活性的蛋白 C (APC)。在凝血过程中, $\text{V}\alpha$ 和 $\text{VIII}\alpha$ 是限速因子,APC 通过水解方式特异地灭活 $\text{V}\alpha$ 和 $\text{VIII}\alpha$ 。并且,APC 还可减少纤溶酶原激活物抑制剂 1 (PAI-1) 的合成,所以 APC 在控制凝血过程的局限性中起着关键作用。脓毒症时,PC、蛋白 S、抗凝血酶 III 和 TFPI 水平减低;在 TNF- α 和 LPS 的作用下,血栓调节蛋白和内皮蛋白 C 受体 (EPCR) 合成减少,从而抑制 PC 活化。机体内 PC 缺乏和 APC 转化减少,都会打破凝血-抗凝血的平衡,导致机体的高凝状态。此外,TNF- α 和 LPS 还可增加 PAI-1 的合成,进而抑制纤溶作用。其结果在临床上表现为弥散性血管内凝血 (DIC) 以及多器官功能衰竭^[9]。

1.3 脓毒症晚期的免疫抑制 传统观念认为,脓毒症是 1 种失控的、持久性炎症反应,是由感染因素诱发的全身性炎症反应综合征。近年来人们逐渐认识到,在脓毒症的发病过程中,机体并非总是处于一成不变的炎症反应激活状态,免疫抑制同样也是脓毒症的重要特征。体外实验证实,用 LPS 刺激晚期脓毒症患者的外周血单核细胞,其致炎细胞因子表达水平远低于采用同样方法处理的健康人外周血单核细胞,提示可能是相对的免疫抑制所致。

免疫抑制的机制目前还不是完全清楚,可能与抗炎介质的作用和免疫细胞的凋亡有关。机体为限制过度的炎症反应,上调抗炎介质和免疫抑制因子的表达,最终造成淋巴细胞大量凋亡,使机体处于免疫无能状态。在免疫抑制阶段,表现为淋巴细胞的增殖能力下降,呈现以辅助性 T 淋巴细胞 2 (Th_2) 性反应为主的免疫反应,从而使机体对病原体的易感性明显增加。研究表明,机体免疫抑制可能是导致晚期脓症患者死亡的重要原因^[10]。

1.4 多器官功能障碍 器官功能的紊乱涉及多个方面,是脓毒症中多种损伤效应的复合结果。炎症介质、神经内分泌紊乱和凝血功能亢进都可最终导致微循环障碍而影响器官功能;TNF- α 、NO 等可抑制线粒体呼吸链,阻断能量产生而导致细胞损伤、影响脏器功能;血管内皮细胞释放组织因子,导致大量组织因子的释放,激活凝血反应,进而导致 DIC 的形成;凝血因子与炎症介质交互作用,形成恶性循环,导致组织器官缺血缺氧、全身代谢紊乱,最终发展为多器官功能障碍。

2 脓毒症防治药物研发的新思路

国际上脓毒症的防治研究,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。在动物实验研究中,上述制剂对脓毒症所致的脏器损伤有一定的保护作用,但在临床实验中都因疗效不确切而未获美国 FDA 批准,表明仅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。目前,针对细菌脓毒症开发成功的唯一上市的药物为重组人活化蛋白 C (rhAPC),APC 通过负反馈抑制凝血酶原转变为凝血酶来调控凝血过程,适用于凝血紊乱的脓症患者。但 rhAPC 存在严重的副作用——出血,其在临床上的使用受到严格的限制,如用药的对象、用药的时机和剂量等都必须慎重地选择^[11-12]。因此,研究新的有效药物迫在眉睫。

中医、中药在我国具有得天独厚的条件和丰富的资源,中药在治疗脓毒症方面具有悠久历史。根据临床表现,脓毒症在中医理论中属于温病、热症等范畴。中医用药的原则是“辨证

论治”,故有“同病异治”或“异病同治”等法则。就中药的性而言,又有“热者寒之”,“寒者热之”等用药原则。这就可以认为在诸多寒性或热性药物中,必然有共同的物质基础,即相关的化学成分。现代研究认为,中药的清热解毒功效主要是由于其有效成分的抗 LPS 作用和抗病原微生物作用。通过对中草药抗 LPS 作用的研究,现已发现多种中草药具有较好的拮抗 LPS 作用;金银花、连翘、黄芩、青蒿等 20 余种单味中药具有体外抗菌、抗 LPS 作用;由丹参、大黄、甘草等中药组成的方剂能够显著抑制 LPS 刺激的巨噬细胞活化;金银花、板蓝根、赤芍、连翘、黄芩等单味中药具有降低 LPS 活性的作用,但是从中草药中分离到具有较好拮抗 LPS 作用的单体的报道却甚少。究其原因,一方面可能由于中药组成成分极其复杂,分离过程繁琐;另一方面则由于受技术手段的限制,无法对分离得到的组分进行活性检测与跟踪。

如前所述,PRRs 对 PAMPs 的识别是启动脓毒症的关键环节。基于从源头阻断 PAMPs 对效应细胞刺激的思路,本课题组在前期的研究工作中,应用生物传感器技术将 LPS 的活性中心 Lipid A 包被于生物传感器疏水样品池,使 Lipid A 结构上发挥重要生物学作用的阴离子基团外露,以此作为中草药抗内毒素化学成分筛选、分离和检测的靶点^[13]。通过测定样品与 Lipid A 的结合反应,可以直观地反映样品与 Lipid A 的结合活性,以此作为 1 项活性评估指标用于抗内毒素中草药的筛选和抗内毒素化学成分的分离制备。基于此技术平台,本课题组先后从中药赤芍、白鲜皮和黄芩中成功分离出具有抗 LPS 作用的单体化合物 1,2,3,4,6-O-五没食子酰-b-D-葡萄糖(1,2,3,4,6-b-D-pentagalloylglucose,PGG)、DPR-2(结构未解析出)和 2',5,6',7-四羟基二氢黄酮醇(2',5,6',7-tetrahydroxyflavanonol,THF)^[13]。

已证实,LPS,PGN 和 CpG DNA 3 个病原分子中任何一个单一分子均可介导致死性脓毒症的发生,然而临床上任何病原体所引发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,可能只能解决脓毒症的部分问题,这可能是既往主要以单一的 LPS 分子为靶点的脓毒症防治效果欠佳的原因。因此,如能同时有效地拮抗上述 3 个主要的病原分子,脓毒症的防治就有可能取得突破性进展。在以 LPS 为靶点的研究工作基础上,郑江等将另 2 个介导脓毒症的主要病原分子 PGN、CpG DNA 也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,结果显示在 114 种中药中有数十种含有能拮抗 LPS、PGN 和 CpG DNA 的物质,并从中筛选出大黄、大蒜和地骨皮等 9 种同时具有拮抗 LPS、PGN 和 CpG DNA 活性的中药。在对上述中药进行分离、制备的研究中,分别从大黄、大蒜水提液中分离出 D 组分和 ASLA 组分。活性研究显示,D 组分对 LPS、CpG DNA 具有拮抗作用,对热灭活大肠杆菌攻击的小鼠具有保护作用;而 ASLA 组分则对 LPS、PGN 和 CpG DNA 同时具有拮抗作用,不仅对热灭活的 G⁻菌(大肠杆菌、绿脓杆菌)攻击的小鼠具有保护作用,而且对热灭活的 G⁺菌(金黄色葡萄球菌)攻击的小鼠也同样具有很好的保护效应^[14]。

脓毒症的防治是临床亟待解决的难题,上述研究表明,从天然药物中筛选并分离提取具有拮抗细菌主要致炎分子的组分/单体化合物有望成为解决这一难题的新策略,同时也表明从传统中药中研究开发具有我国自主知识产权的防治脓毒症

的药物是完全可能的。

3 结 语

尽管对脓毒症发生的病理生理机制认识不断深入,但是目前仍然没有理想的治疗措施应用于临床脓毒症患者。因此,充分研究脓毒症发生的病理生理机制、更新研究策略、寻找新的有效药物仍然是今后相当长时间内从事脓毒症研究人员努力的方向。

参考文献

- [1] Xin L, Juan C, Xin CZ, et al. Targeting CpG DNA to screen and isolate anti-sepsis fraction and monomers from traditional Chinese herbs using affinity biosensor technology [J]. *International Immunopharmacology*, 2009, 9: 1021-1031.
- [2] Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response [J]. *Nature*, 2007, 449 (7164): 819-826.
- [3] Steven M, Opal. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer Ismail Cinel [J]. *Crit Care Med*, 2009, 37 (1): 291-304.
- [4] 王剑,沈立松. Toll 样受体在调节性 T 细胞增殖和功能中的作用 [J]. *国际检验医学杂志*, 2008, 29(4): 370-372.
- [5] Russell JA. Management of sepsis [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355(16): 1699-1713.
- [6] Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8: 776-787.
- [7] Marshal JC. The pathogenesis and molecular biology of sepsis [J]. *Crit Care Resusc*, 2006, 8: 227-229.
- [8] Daniel G, Remick. Pathophysiology of Sepsis [J]. *American Journal of Pathology*, 2007, 170(5): 1435-1444.
- [9] Cinel I, Dellinger RP. Advances in pathogenesis and management of sepsis [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2007, 20: 345-352.
- [10] Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis [J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(2): 138-150.
- [11] Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008 [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(1): 296-327.
- [12] Marti-Carvajal A, Salanti G, Cardona AF. Human recombinant activated protein C for severe sepsis [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007, 3: CD004388.
- [13] Fu J, Cao H, Wang N, et al. An anti-sepsis monomer, 2', 5, 6', 7-tetrahydroxyflavanonol (THF), identified from *Scutellaria baicalensis* Georgi neutralizes lipopolysaccharide in vitro and in vivo [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008, 8: 1652-1657.
- [14] 蒋栋能,郑江. 大蒜黄酮的分离及抗内毒素活性的评价 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(10): 1154-1156.