

文章编号:1000-582X(2002)04-0084-03

# 多粘菌素 B 对内毒素血症大鼠血流动力学作用\*

邵 阳, 王 翔, 蔡绍哲, 高 伟, 吴 西

(重庆大学生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆 400044)

**摘 要:**观察多粘菌素 B(PMX-B)对内毒素血症大鼠血流动力学的影响,并进行了实验。实验分为:内毒素(LPS)+多粘菌素 B 组、LPS+生理盐水组、LPS 模型组,给大鼠一次性静脉注射内毒素(0.5 mg/kg),前 2 组分别注入内毒素后 0.5 h 静脉给予多粘菌素 B(0.2 mg/kg)和 1 mL 生理盐水(NS),LPS 模型组大鼠注入内毒素后不作其它处理。给多粘菌素 B 后 0.5、1、2、4 h 抽血液,检测血浆中 LPS、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、全血粘度(WBV)、血球压积(HRC)的变化。结果表明:LPS+多粘菌素 B 组,在给内毒素 1 h,全血粘度、红细胞压积明显低于 LPS+生理盐水组。因此多粘菌素 B 治疗能改善内毒素血症早期的血液流变性。

**关键词:**多粘菌素 B; 内毒素血症; 血液流变学

**中图分类号:**R318

**文献标识码:**A

革兰氏阴性( $G^-$ )菌产生的内毒素所致的感染反应至今仍是临床上诊断和治疗的难题,仅在美国每年有超过 50 万罹患脓毒症的患者,其中约 35%~45%的患者死亡<sup>[1-3]</sup>。菌源性物质(如  $G^-$  细菌性 LPS)和宿主感染性炎性介质(如 TNF- $\alpha$ , IL-1)所引发的内毒素血症是导致脓毒症的重要因素,尽管有许多新的治疗脓毒症的措施,但脓毒症病人的致死率居高不下。多粘菌素 B 对内毒素有明显的亲和作用,探讨其对内毒素血症的治疗作用有一定的应用价值。

## 1 材料方法

### 1.1 内毒素血症动物模型建立

雄性 Wistar 大鼠由第三军医大学动物中心提供,每只体重 300~350 g,共 30 只随机分为 3 组,每组 10 只。实验分为 LPS+多粘菌素 B 组、LPS+生理盐水组、LPS 模型组,大鼠用 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(40 mg/kg),左侧股动脉、右侧股静脉插管,并连接三通,行全身肝素化(0.6 mg/kg)股动脉导管与多道生理记录仪相连后,测定平均动脉压(MAP),由股静脉插管抽取在不同时相点血液(补充等量的生理盐水)检测血液中的内毒素含量。经颈静脉一次性给予 Sigma 公司的 LPS(Ecoli O111:B4,0.5 mg/kg)。LPS+多粘菌素 B 组、LPS+生理盐水组大鼠分别注入内毒素后 0.5 h 静脉给予多粘菌素 B(0.2 mg/kg)1 mL 和等量的生理盐水,

LPS 模型组注射 LPS 后不作处理。在给多粘菌素 B 后 0.5、1、2、4 h 抽出血液,检测血浆中 LPS、TNF- $\alpha$  水平。

### 1.2 血粘度和血球压积<sup>[4]</sup>

从股动脉取各组的血样 1 mL/只,放入含 1:1 000 肝素钠试管抗凝。用 NXE-I 型锥板式粘度计测全血粘度,用 WAY-II 微量压积仪测量血球压积。

### 1.3 酶联免疫测 TNF- $\alpha$ 含量<sup>[5]</sup>:

酶标板包被,封闭及检测按常规双抗夹心法。用 2 mg/L 鼠抗人 TNF- $\alpha$  单抗包被,1% 牛血清白蛋白封闭,二抗用 1 mg/L 生物素标记的鼠抗人 TNF- $\alpha$  单抗,辣根过氧化物酶标链亲和素使用时按 1:5 000 稀释。加入四甲基联苯胺底物液,显色 20~30 min 后,加 2 mol/L  $H_2SO_4$  终止酶促反应,用 Bio-rad 450 型酶标仪读 490 nm 值。同时以 rhTNF- $\alpha$  做平行实验,制作标准曲线,计算样品中的 TNF- $\alpha$  含量。

### 1.4 内毒素测定<sup>[6]</sup>

用湛江安度斯生物有限公司生产的鲎试剂测定血液 LPS 浓度。

### 1.5 统计学分析

数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{X} \pm s$ )表示,多个样本均数比较采用方差分析,其两两比较采用  $q$  检验。同组内不同时间比较应用配对  $t$  检验。

## 2 结 果

\* 收稿日期:2001-12-10

基金项目:重庆市科委攻关项目(2001-6613);高等学校重点实验室访问学者基金资助项目

作者简介:邵阳(1965-),男,重庆人,重庆大学副教授,博士,主要从事生物医学工程研究。

2.1 平均动脉压变化

注射 LPS 后, 各组血压均明显下降(约为 30%); LPS + 多粘菌素 B 组大鼠在用药 1 h 后, MAP 明显升高, 2 h 明显高于其他 2 组。LPS + 生理盐水组、LPS 模型组 MAP 一直维持在低血压状态(见表 1)。

2.2 全血粘度变化和血球压积

与治疗前相比, 给 PMX - B 后 2 h 全血粘度明显

下降, 血球压积明显降低, 治疗后 4 h 与正常组无显著性差异(见表 2)。

2.3 肿瘤坏死因子水平变化

注射 LPS 后, 各组大鼠血浆 TNF -  $\alpha$  迅速升高, 随后有所下降, 一直维持较高浓度, LPS + 多粘菌素 B 组大鼠血浆 TNF -  $\alpha$  在用药后 1、2、4 h 明显低于其他 2 组(见表 3)。

表 1 给多粘菌素 B 后大鼠 MAP 的变化 (n = 10, X  $\pm$  s)

组别	注入 LPS 前	给多粘菌素 B 或 NS 后时间/h			
		0.5	1.0	2.0	4.0
LPS + 多粘菌素 B 组	11.89 $\pm$ 1.49	9.20 $\pm$ 1.51 # *	12.18 $\pm$ 2.82 # # **	12.27 $\pm$ 2.39 # # **	11.20 $\pm$ 1.30 # # **
LPS + 生理盐水组	11.68 $\pm$ 2.15	7.56 $\pm$ 2.23	8.97 $\pm$ 1.66	8.80 $\pm$ 1.60	6.37 $\pm$ 2.18
LPS 模型组	11.72 $\pm$ 2.06	7.33 $\pm$ 2.04	7.36 $\pm$ 2.08	6.98 $\pm$ 2.96	5.83 $\pm$ 2.32

说明: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, 与 LPS + 生理盐水组比较; # P < 0.05, # # P < 0.01, 与用 LPS 模型组比较。

表 2 多粘菌素 B 对全血粘度和血球压积的影响

组别	治疗后时间/h	全血粘度/mPa.s	血球压积
LPS + 多粘菌素 B 组	1	8.12 $\pm$ 0.22 # #	0.457 $\pm$ 0.004 1 # #
	2	7.44 $\pm$ 0.42* # #	0.423 $\pm$ 0.005 1*
	4	6.27 $\pm$ 0.34*	0.396 $\pm$ 0.005 8**
LPS + 生理盐水组		8.57 $\pm$ 0.50	0.586 $\pm$ 0.003 2
LPS 模型组		5.82 $\pm$ 0.24	0.390 $\pm$ 0.003 1

说明: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, 与 LPS + 生理盐水组比较; # P < 0.05, # # P < 0.01, 与 LPS 模型组比较。

表 3 多粘菌素 B 对大鼠血浆 TNF -  $\alpha$  的影响 (n = 10, X  $\pm$  s)

组别	注入 LPS 前	给多粘菌素 B 或 NS 后时间/h			
		0.5	1	2	4
LPS + 多粘菌素 B 组	未测到	464 $\pm$ 19.01	442 $\pm$ 17.22 #	383 $\pm$ 21.35 # # **	336 $\pm$ 14.60 # # **
LPS + 生理盐水组	未测到	468 $\pm$ 16.72	456 $\pm$ 18.6	460 $\pm$ 47.50	439 $\pm$ 23.45
LPS 模型组	未测到	477 $\pm$ 20.87	473 $\pm$ 30.20	460 $\pm$ 42.52	452 $\pm$ 28.40

说明: \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, 与 LPS + 生理盐水组比较; # P < 0.05, # # P < 0.01, 与用 LPS 模型组比较。

3 讨论

在研究治疗脓毒症措施和发病机制过程中, 发现脓毒症病人病理生理学的变化与 G<sup>-</sup> 菌源性产生的内毒素所致的感染反应有关。到目前为止, 已报道的能结合并能中和 LPS 的蛋白质主要包括多粘菌素 B、螯抗 LPS 因子以及杀菌性/通透性增加蛋白 (BPI)。虽然多粘菌素 B 具有中和 LPS 和降低 LPS 攻击动物死亡率的作用<sup>[3]</sup>, 但由于其具有神经毒性和肾毒性, 在临床上的应用受到一定的限制。脓毒症的本质是机体对感染性因素的反应, 而且这一反应一旦启动后可不断放大, 而不依赖原触发因素。经典的抗感染治疗或外科引流难以遏制这一过程, 尽管人们对抗内毒素抗体、抗 TNF 抗体、IL - 1 受体拮抗剂抱有很大希望, 但在脓毒症的临床试验性治疗中并未得到理想结果。因此 PMX - B 仍在临床上作为非首选药在使用。PMX - B 是一种阳离子性环状 10 缩氨酸结构, 是由多粘杆菌产生的一组

化学上相关的脂酰基缩氨酸抗生素的总称。这种两性分子试剂含有疏脂和亲脂性集团, 一个多肽尾(以脂肪酸终止), 与脂多糖的脂质 A 部分具有高度的亲和力, 能吸附除去介质中的内毒素。并能破坏 G<sup>-</sup> 菌外层或细胞质膜的通透性, 具有抗菌和灭活内毒素的作用。在生理 pH 时为阳离子表面活性化合物, 作用于敏感细菌脂膜中磷脂成分, 破坏细胞膜的渗透完整性而产生抗菌作用, 但确切机制仍未尽悉<sup>[7,8]</sup>。多粘菌素类杀菌剂对很多 G<sup>-</sup> 需氧菌, 包括对大肠杆菌、肺炎球菌、肠杆菌、沙门菌、志贺菌、嗜肝杆菌、博德特菌、巴斯德菌和弧菌有效, 尤其对绿脓杆菌。虽然它可能引起肾毒性, 但有报道低剂量(6 mg/d, 肌注)能减少血浆中内毒素水平, 而无明显的副作用。PMX - B 能结合 LPS 的脂质 A 部分, 无论是口服或是静脉内给予 PMX - B 能明显降低 G<sup>-</sup> 菌在盲肠中的数量。静注 PMX - B(0.3 mg/h) 不仅可以降低内毒素的水平, 而且可以维持正常的体温, 且无副作用, 同时 PMX - B 也可以提高自然杀伤细胞的活性。

本实验结果显示 PMX - B(0.2 mg/kg) 处理后可以显著地降低血液中的内毒素、TNF -  $\alpha$  水平,并能有效地改善 MAP。其可能原因是 PMX - B 的阳离子氨基与内毒素类脂 A 的带负电的磷酸根结合,使内毒素失去生物活性,即 PMX - B 对内毒素有灭活作用,使内毒素介导的信号转导通路中断。TNF -  $\alpha$  水平降低与 LPS 被 PMX - B 灭活,减少了对细胞刺激,阻止细胞因子网络激活有关。同时细胞因子如 TNF -  $\alpha$  水平下降可减少因呼吸爆发和磷脂酶 A2 途径产生的一氧化氮和氧自由基<sup>[8]</sup>。MAP 的恢复表明 LPS 的清除有利于组织血供改善和减轻微循环障碍。本实验观察到给予 PMX - B 治疗能纠正内毒素引起的血液流变学的改变。其可能的原因是血液中内毒素去除,降低了血液炎症性介质水平,改善了血液中循环动力、促进代谢恢复<sup>[9]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] O'REILLY M, NEWCOMB D E, REMICK D, et al. Endotoxin, sepsis, and the primrose path[J]. Shock, 1999, 12(6): 411 - 420.
- [2] BONE R C. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome(SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome(MODS) [J]. Ann Intern Med, 1996, 125(8): 680 - 687.
- [3] CASEY L C, BALK R A, BONE R C, et al. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival on patients with the sepsis syndrome[J]. Ann Int Med, 1993, 119(9): 771 - 778.
- [4] 翁格文, 杨志焕, 李晓炎, 等. 大鼠模拟高原冲击伤早期伤情和血液流变学的变化[J]. 创伤外科杂志, 1999, 1(3): 157 - 158.
- [5] SROKES D C, SHENEP J L, FISHMAN M, et al. Polymyxin B prevents lipopolysaccharide induced release of tumor necrosis factor - alpha from alveolar macrophages [J]. J Infect Dis, 1989, 160(1): 52 - 7.
- [6] BERGER D, MARZINZIG E, MARZINZIG M, et al. Quantitative endotoxin determination in blood chromogenic modification of the limulus amoebocyte lysate test[J]. Eur Surg Res, 1988, 20(2): 128 - 136.
- [7] AOKI H, KODAMA M, TANI T, et al. Treatment of sepsis by extracorporeal elimination of endotoxin using polymyxin B - immobilized fibre[J]. Am J Surg, 1994, 167(4): 412.
- [8] SRIMAL S, SUROLIA N, BALASUBRAMANIAN S, et al. Titration calorimetric studies to elucidate the specificity of the interactions of polymyxin B with lipopolysaccharides and lipid A [J]. Biochem J, 1996, 315(3): 679 - 686.
- [9] YAO Y M, TIAN H M, SHENG Z Y, et al. Inhibitory effects of low - dose polymyxin B on hemorrhage - induced endotoxin/ bacterial translocation and cytokine formation in rats [J]. J Trauma, 1995, 38(6): 924 - 930.

## Hemodynamic Effect of Polymyxin B Sulfate on Rats with Endotoxemia

SHAO Yang, WANG Xiang, CAI Shao - xi, GAO Wei, WU Xi

(Key Lab for Biomechanics and Tissue Engineering under the State Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

**Abstract:** To evaluate the effect of polymyxin B on hemodynamic in endotoxemia rats. Wistar rats were divided into three groups randomly: group 1, the group of LPS (lipopolysaccharide, LPS) plus polymyxin B were treated with polymyxin B sulfate 1ml(0.2 mg/kg) half an hour after giving endotoxin; group 2, the group of LPS plus normal saline were treated with normal saline solution 1 ml half an hour after giving endotoxin; group 3, the group of LPS model were untreated. Wistar rats were first injected intravenously with lipopolysaccharide (LPS, Escherichia coil O111:B4, 1mg/kg), Endotoxin, TNF -  $\alpha$ , whole blood viscosity, hematocrit of red cells in the blood were detected. After treatment with polymyxin B, whole blood viscosity, hematocrit of red cells in the group of LPS plus polymyxin B were significantly decreased than that of the group of LPS plus normal saline solution. Polymyxin B can reduce level of TNF -  $\alpha$  and LPS in circulation and improve hemorheological.

**Key words:** polymyxin B; endotoxemia; hemorheological

(责任编辑 李胜春)