

文章编号 1006-8147(2014)02-0085-04

论著

## z-VAD-FMK 与 Necrostatin-1 联合对 MODS 大鼠器官的保护作用研究

张立亚<sup>1</sup>, 崔尧丽<sup>2</sup>, 王兵<sup>2</sup>, 王勇强<sup>2</sup>, 王玉亮<sup>3</sup>

(1.天津医科大学一中心临床学院,天津 300192;2.天津市第一中心医院 ICU,天津 300192;3.卫生部危重病急救医学重点实验室,天津 300384)

**摘要** 目的:探讨 z-VAD-FMK 与 Necrostatin-1 联合对 MODS 大鼠器官的保护作用。方法:采用失血性休克-内毒素“二次打击”建立大鼠 MODS 动物模型。将 80 只雄性 SD 大鼠随机分为 4 组:z-VAD-FMK 组、Nec-1 组、z-VAD-FMK+Nec-1 组、模型组,每组 20 只,观察 72 h 死亡率。另取 40 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组:假手术组、z-VAD-FMK 组、Nec-1 组、z-VAD-FMK+Nec-1 组、模型组,每组 8 只,分别于注射内毒素和生理盐水后 24 h 收集血清和肝、肺、肠组织。全自动生化仪检测血清 ALT、AST 的变化,血气分析仪检测 PaO<sub>2</sub> 的变化,ELISA 检测血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的变化,HE 染色观察肝、肺、肠组织的病理学改变。结果:大鼠遭受失血性休克-内毒素“二次打击”后,血清 ALT、AST 明显升高( $P<0.01$ ),PaO<sub>2</sub> 显著下降( $P<0.01$ ),血清炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平明显升高( $P<0.01$ )。光镜下见肝窦明显扩张、淤血,肝小叶结构紊乱,肝细胞部分变性、坏死;肺泡壁结构被破坏,肺间质充血,大量炎性细胞浸润;肠绒毛结构被破坏,部分绒毛顶部细胞、隐窝细胞变性、坏死,大量炎性细胞浸润。而 z-VAD-FMK 组、Nec-1 组及 z-VAD-FMK+Nec-1 组 ALT、AST 升高程度、PaO<sub>2</sub> 下降程度、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  升高程度均显著低于模型组( $P<0.01$ ),以 z-VAD-FMK+Nec-1 组变化最明显。72 h 死亡率均较模型组显著降低( $P<0.05$ )。结论:z-VAD-FMK、Nec-1、z-VAD-FMK+Nec-1 联合治疗均可显著减轻 MODS 大鼠的器官损伤,联合治疗效果更佳。

**关键词** 多器官功能障碍综合征; z-VAD-FMK; Necrostatin-1; 大鼠

中图分类号 R36

文献标志码 A

### Protective effect of z-VAD-FMK and Necrostatin-1 on the organs of rats with MODS

ZHANG Li-ya<sup>1</sup>, CUI Yao-li<sup>2</sup>, WANG Bing<sup>2</sup>, WANG Yong-qiang<sup>2</sup>, WANG Yu-liang<sup>3</sup>

(1. Clinical Medicine College, First Central Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China; 2. Intensive Medicine, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China; 3. Key Laboratory of the Ministry of Health of Critical Care Emergency Medicine, Tianjin 300384, China)

**Abstract Objective:** To investigate the protective effect of z-VAD-FMK and Necrostatin-1 on the organs of rats with MODS. **Methods:** Adult male SD rats were used and rat model was produced by hemorrhagic shock based on injecting LPS. A total of 80 rats were randomly divided into four groups: z-VAD-FMK group; Nec-1 group; z-VAD-FMK+Nec-1 group and model group with 20 rats in each group. And the 72 h mortality was observed. In addition, other 40 rats were randomly divided into five groups: sham group; z-VAD-FMK group; Nec-1 group; z-VAD-FMK+Nec-1 group; model group, with 8 rats in each group. The samples of different groups were collected at 24 h after injecting LPS or normal saline. Serum ALT and AST were detected by automatic biochemistry analyzer. PaO<sub>2</sub> was detected by blood gas analyzer. And serum TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were detected by ELISA. The pathological changes of liver, lung and intestine were observed by H&E staining. **Results:** After hemorrhagic shock, the expression of ALT, AST, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  significantly increased ( $P<0.01$ ) while the level of PaO<sub>2</sub> markedly reduced ( $P<0.01$ ). Under light microscopy, hepatic sinus expansion, liver cells degeneration, necrosis, as well as infiltration of abundant inflammatory cells were observed; the structure of alveolar walls were destroyed and the pulmonary interstitial hyperemia and infiltration of abundant inflammatory cells were observed; the structure of intestinal villi were destroyed and the top part of villi cells and crypt cells degeneration, necrosis, as well as infiltration of abundant inflammatory cells were observed. Compared with model group, the up-regulation degree of ALT, AST, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and the PaO<sub>2</sub> reduction were smaller in z-VAD-FMK group, Nec-1 group and z-VAD-FMK+Nec-1 group ( $P<0.01$ ). And the changes in z-VAD-FMK+Nec-1 group were the most significant. In addition, the 72 h mortality significantly reduced ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The z-VAD-FMK, Nec-1 and z-VAD-FMK+Nec-1 can significantly reduce the organ damage of rats with MODS, and combining z-VAD-FMK and Nec-1 can bring marked results.

**Key words** MODS; z-VAD-FMK; Necrostatin-1; rat

基金项目 国家临床重点专科建设经费及国家自然科学基金青年基金资助项目(81301624)

作者简介 张立亚(1988-),女,硕士在读,研究方向:多器官功能障碍综合征发病机制研究;通信作者:王勇强,E-mail:yongqiang-wang1962@sina.com。

多器官功能障碍综合征(MODS)是危重病患者死亡的主要原因之一,国内外有很多学者研究表明,MODS对体内重要脏器:肝、肺、肠等均可出现损害<sup>[1]</sup>,目前临床上仍缺乏有效的特异性治疗手段。器官损伤时细胞死亡方式包括:凋亡和坏死。z-VAD-FMK是一种人工合成的广谱半胱氨酸酶(caspase)抑制剂,静脉给予可抑制细胞凋亡,从而减轻器官损伤。坏死通常被认为是被动的、无序的、不可逆的过程,但随着对细胞死亡机制的不断研究,Degterev等<sup>[2]</sup>提出了一种细胞坏死的新概念,并将其命名为程序性坏死(necroptosis)。同时还筛选了一种能够抑制这种非凋亡性程序性细胞死亡的小分子物质Nec-1(necrostatin-1)。Nec-1可通过抑制RIP1(受体相互作用蛋白酶1)激酶活性,从而发挥作用<sup>[3]</sup>。本实验采用联合静脉微量注射Nec-1和z-VAD-FMK治疗MODS大鼠的器官损伤,并观察其治疗效果。

## 1 材料与方

1.1 主要试剂 DMSO(二甲基亚砷)购自美国Amresco公司,Nec-1购自美国ENZO公司,z-VAD-FMK购自瑞士Bachem公司,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 购自上海Biovalue公司。

1.2 实验分组 清洁雄性SD大鼠120只,体质量(250 $\pm$ 20)g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心[许可证号SCXK-(军)2007-004]。大鼠实验前禁食12h,自由饮水。将80只雄性SD大鼠随机分为4组:z-VAD-FMK组、Nec-1组、z-VAD-FMK+Nec-1组、模型组,每组20只,观察72h死亡率。另取40只雄性SD大鼠同法分为5组:假手术组、z-VAD-FMK组、Nec-1组、z-VAD-FMK+Nec-1组、模型组,每组8只,分别于注射内毒素和生理盐水后24h收集血清和肝、肺、肠组织。

1.3 实验方法 本实验采用失血性休克-内毒素“二次打击”建立大鼠MODS动物模型<sup>[4]</sup>。大鼠称重后,10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉后固定,左侧颈动脉置导管连接多导生理监护仪(天津医科大学药理学教研室提供)监测血压、放血,股静脉置导管回输血液及液体复苏,股静脉注射肝素(500 U/kg)后,10 min内自颈动脉放血至平均动脉压降至30 mmHg,并维持在30~40 mmHg之间,90 min后开始液体复苏,在30 min内由股静脉回输全部采集的血液及2倍林格液,使血压复苏到放血前的97%以上为复苏成功。复苏30 min后腹腔注射内毒素(2 mg/kg)。然后拔出导管,结扎血管,缝合切口。假手术组:仅进行麻醉、分离血管、结扎血管以及腹腔注射等体积生理盐水。z-VAD-FMK组:模型

制备+z-VAD-FMK(z-VAD-FMK溶于DMSO中,于复苏前5 min股静脉给药3 mg/kg)。Nec-1组:模型制备+Nec-1(Nec-1溶于DMSO中,于复苏前5 min股静脉给药1 mg/kg)。z-VAD-FMK+Nec-1组:模型制备+z-VAD-FMK+Nec-1(z-VAD-FMK和Nec-1分别溶于DMSO中,于复苏前5 min股静脉给药,z-VAD-FMK:3 mg/kg,Nec-1:1 mg/kg)。模型组:模型制备(复苏前5 min股静脉给予等量的DMSO溶剂)。

1.4 血清和肝、肺、肠组织的收集 分别于注射内毒素和生理盐水后24 h用10%水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血,行血气分析及肝功能检测。分别取出肝左叶、左肺及空肠上段放入10%多聚甲醛中4 $^{\circ}$ C固定保存48 h,行HE染色。

## 1.5 检测指标及方法

1.5.1 记录72 h各组大鼠死亡率。

1.5.2 应用全自动生化仪,采用速率法测定血清ALT、AST的浓度。

1.5.3 采用ELISA测定血清TNF- $\alpha$ 、IL- $\beta$ 的浓度,严格按照ELISA试剂盒说明书进行操作。

1.5.4 1 mL血气针腹主动脉采血,采用血气分析仪测定动脉血氧分压。

1.5.5 常规石蜡包埋,HE染色,光学显微镜下观察肝、肺、肠组织病理学变化。

1.6 统计学处理 采用SPSS17.0统计软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),方差齐时,组间多重比较采用LSD-t检验;方差不齐时,组间多重比较采用Tamhane's T2检验。率以百分数(%)表示,计数资料采用 $\chi^2$ 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 大鼠死亡率的比较 与模型组比较,z-VAD-FMK组、Nec-1组及z-VAD-FMK+Nec-1组72 h死亡率显著降低( $P<0.05$ );联合应用z-VAD-FMK及Nec-1虽较单独应用z-VAD-FMK、Nec-1死亡率有所下降,但差异无统计学意义(表1)。

表1 各组大鼠死亡率的比较

Tab 1 The comparison of rat mortality in each group

分组	n	死亡/只	存活/只	死亡率/%
z-VAD-FMK组	20	7	13	35.00 <sup>*</sup>
Nec-1组	20	7	13	35.00 <sup>*</sup>
z-VAD-FMK+Nec-1组	20	3	17	17.64 <sup>#</sup>
模型组	20	14	6	70.00

与模型组比较:<sup>\*</sup> $P<0.05$ ,<sup>#</sup> $P<0.01$

2.2 肝、肺功能的变化 与假手术组比较,模型组

血清 ALT、AST 浓度显著升高 ( $P<0.01$ ), 动脉氧分压 ( $\text{PaO}_2$ ) 明显下降 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, z-VAD-FMK 组、Nec-1 组及 z-VAD-FMK+Nec-1 组肝、肺功能均有明显改善 ( $P<0.01$ ); 而联合应用 z-VAD-FMK 及 Nec-1 效果显著优于单独应用 z-VAD-FMK、Nec-1 ( $P<0.05$ , 表 2)。

表 2 各组大鼠肝脏及肺脏功能的变化 ( $\bar{x}\pm s$ )

Tab 2 The changes of liver and lung function of rats ( $\bar{x}\pm s$ )

分组	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	PaO <sub>2</sub> /(mmHg)
假手术组	62.72±9.23	250.15±24.67	92.21±7.68
z-VAD-FMK 组	153.78±10.83 <sup>#△</sup>	685.47±23.98 <sup>#▲</sup>	59.36±5.27 <sup>#▲</sup>
Nec-1 组	151.11±11.14 <sup>#</sup>	672.13±43.29 <sup>#▲</sup>	63.76±6.14 <sup>#△</sup>
z-VAD-FMK+Nec-1 组	137.58±10.79 <sup>#</sup>	548.83±25.01 <sup>#</sup>	71.01±4.94 <sup>#</sup>
模型组	191.27±18.46*	948.79±42.92*	42.15±6.05*

与假手术组比较, \* $P<0.01$ ; 与模型组比较, # $P<0.01$ ; 与 z-VAD-FMK+Nec-1 组比较, <sup>△</sup> $P<0.05$ , <sup>▲</sup> $P<0.01$

2.3 血清炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的变化 与假手术组比较, 模型组血清炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平显著升高 ( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 单独应用 z-VAD-FMK、Nec-1 及联合应用 z-VAD-FMK 及 Nec-1 均可明显降低血清炎性因子水平 ( $P<0.01$ ); 而联合应用 z-VAD-FMK 及 Nec-1 血清炎性因子水平下降更明显, 效果显著优于单独应用 z-VAD-FMK、Nec-1 ( $P<0.05$ , 表 3)。

2.4 各组大鼠肝、肺、肠的病理学变化 肝脏: 光镜

表 3 各组大鼠血清炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的表达 ( $\bar{x}\pm s$ )

Tab 3 Expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the serum of rats ( $\bar{x}\pm s$ )

分组	TNF- $\alpha$ /(pg/mL)	IL-1 $\beta$ /(pg/mL)
假手术组	30.69±7.28	1.36±0.27
z-VAD-FMK 组	70.71±7.85 <sup>#▲</sup>	2.87±0.16 <sup>#▲</sup>
Nec-1 组	64.83±6.13 <sup>#△</sup>	2.63±0.31 <sup>#△</sup>
z-VAD-FMK+Nec-1 组	55.68±5.60 <sup>#</sup>	2.27±0.21 <sup>#</sup>
模型组	93.07±8.49*	3.75±0.39*

与假手术组比较, \* $P<0.01$ ; 与模型组比较, # $P<0.01$ ; 与 z-VAD-FMK+Nec-1 组比较, <sup>△</sup> $P<0.05$ , <sup>▲</sup> $P<0.01$

下假手术组未见明显异常; 模型组显示肝窦明显扩张、淤血, 肝小叶结构紊乱, 肝细胞部分变性、坏死; z-VAD-FMK 组、Nec-1 组、z-VAD-FMK+Nec-1 组肝窦扩张程度减轻, 肝细胞变性、坏死减少, 以 z-VAD-FMK+Nec-1 组病理改变为最轻。肺脏: 光镜下假手术组未见明显异常; 模型组显示肺泡结构被破坏、肺泡壁增厚、肺间质充血、大量炎性细胞浸润; z-VAD-FMK 组、Nec-1 组、z-VAD-FMK+Nec-1 组肺泡受压程度、肺间质充血及炎性细胞浸润程度减轻, 以 z-VAD-FMK+Nec-1 组病理改变为最轻。肠: 假手术组未见明显异常; 模型组显示肠绒毛结构大量被破坏、部分绒毛顶部细胞、隐窝细胞变性、坏死, 大量炎性细胞浸润; z-VAD-FMK 组、Nec-1 组、z-VAD-FMK+Nec-1 组肠绒毛结构破坏、炎性细胞浸润程度减轻, 隐窝细胞变性、坏死减少, 以 z-VAD-FMK+Nec-1 组病理改变为最轻(图 1)。

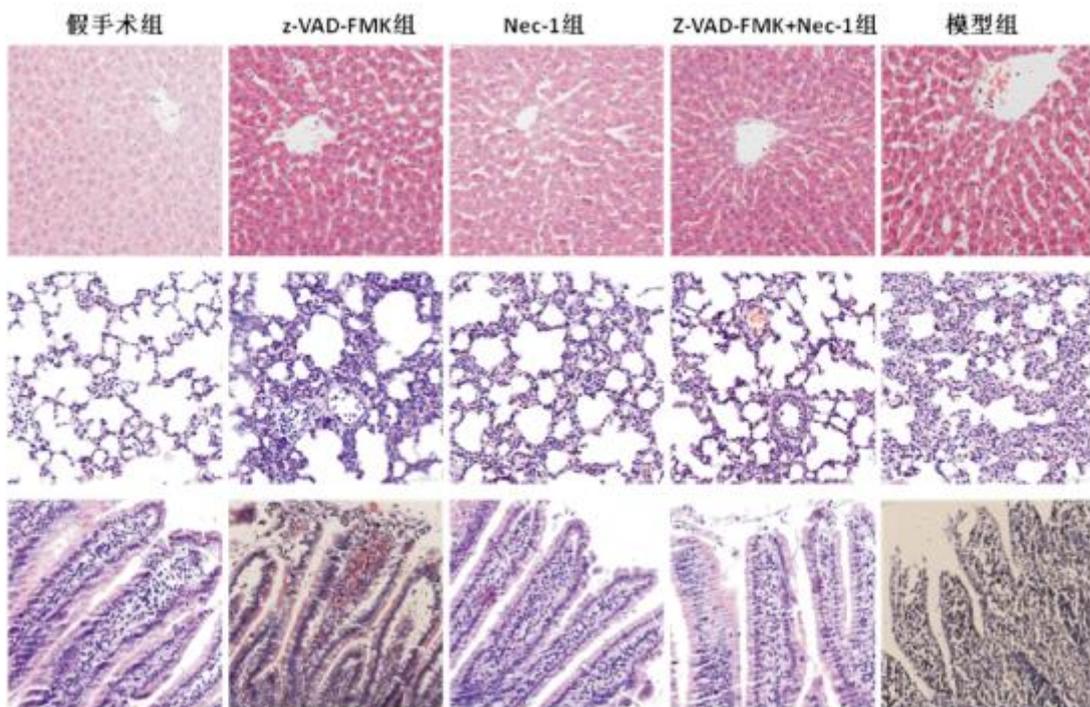


图 1 各组大鼠肝、肺、肠组织病理学改变 (HE×200)

Fig 1 Pathological changes in the liver, lung and intestine tissue of rats (HE×200)

### 3 讨论

MODS 的发生、发展是机体在感染与非感染因素的应激打击下,引起的炎症反应的启动、放大、组织细胞损伤及死亡,导致严重的病理生理紊乱,进而出现瀑布式的连锁效应的急性器官损伤过程。以往研究认为器官损伤中细胞死亡的机制包括:细胞凋亡及坏死,凋亡是主动的、有序的、基因调控的过程;而坏死被认为被动的、无序的、不可逆的过程。凋亡有两条信号通路,即细胞膜上死亡受体介导的非线粒体依赖性途径和线粒体释放细胞色素 C 启动的线粒体依赖性途径。两条途径均需 caspase 的活化及其诱发的级联反应,最终导致某些蛋白质的裂解进而引起 DNA 断裂<sup>[5]</sup>。如何抑制 caspase 的激活从而阻断凋亡信号通路则是研究的重点。z-VAD-FMK 是一种人工合成的广谱 caspase 抑制剂,能结合 caspase 蛋白酶的活性位点。一旦程序性细胞死亡被引起时,它能阻断细胞内蛋白降解,从而阻断了细胞凋亡,对器官起到保护作用。本研究结果表明,静脉注射 z-VAD-FMK 后,可降低 72 h 死亡率,降低血清炎性因子水平,改善肝脏及肺脏功能,减轻肝、肺、肠组织的病理学改变。

程序性坏死与凋亡是由死亡受体介导的两种不同的细胞死亡方式,它不依赖于 caspase,也不需线粒体释放细胞色素 C,而是由 RIP1/RIP3 介导的一系列有序的信号调控过程。细胞在 caspase 活性被抑制而不能发生凋亡的情况下会启动程序性坏死。Nec-1 作为程序性坏死的特异性抑制剂,可通过抑制 RIP1-RIP3 复合物的形成,抑制 RIP1 调节的程序性坏死<sup>[6]</sup>。已有研究表明,Nec-1 能够保护心肌缺血再灌注损伤<sup>[7]</sup>,同时还能抑制视网膜的缺血再灌注损伤及视网膜脱离引起的光感受器细胞的坏死<sup>[8-9]</sup>。由于坏死在失血性休克-内毒素“二次打击”模型中器官损伤中起重要作用,而程序性坏死是坏死的重要组成部分,因此研究 Nec-1 对失血性休克-内毒素“二次打击”致大鼠 MODS 的器官是否起到保护作用具有重要意义。本研究结果显示,静脉给予小剂量 Nec-1,可以明显降低 72 h 死亡率,降低血清炎性因子水平,改善肝脏及肺脏功能,减轻肝、肺、肠组织的病理学改变。

一般情况下,当 caspase 活性被抑制,细胞不能发生凋亡的情况下会启动程序性坏死<sup>[2]</sup>。目前也有研究表明,在一些细胞内凋亡与程序性坏死同时存

在<sup>[10]</sup>。由于 MODS 发生、发展是多种因素共同参与的复杂过程,联合阻断细胞死亡的两条信号通路,是否会起到更为有效的治疗效果? 本实验尝试对 MODS 大鼠应用 z-VAD-FMK 的基础上,联合静脉应用 Nec-1。结果显示在降低血清炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的水平,改善肝脏及肺脏功能,减轻重要器官的病理学改变方面联合效果更加明显,优于单用 z-VAD-FMK 或 Nec-1。

综上所述,我们的研究证实了静脉联合应用 caspase 抑制剂和程序性坏死特异性抑制剂对 MODS 大鼠器官具有明显的保护作用,提示抑制细胞死亡信号通路可能具有重要的临床意义,为延缓 MODS 的发生及改善器官损伤提供新的思路及靶点,但分子机制仍需进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 杨兴易,谢伟峰,王东.多器官功能障碍综合征的诊治[J].中华急诊医学杂志,2007,16(12):1343
- [2] Degtrev A, Huang Z, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of non-apoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury[J]. Nat Chem Biol, 2005, 1(2): 112
- [3] Cho Y S, Challa S, Moquin D, et al. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation[J]. Cell, 2009, 137(6): 1112
- [4] 李岩,段绍斌,姚华.大鼠多器官功能障碍综合征肺组织中 CEC, ICAM-1 及 VCAM-1 的表达意义[J].新疆医科大学学报,2009,32(4):446
- [5] Strasser A, O'Connor L, Dixit V M. Apoptosis signaling[J]. Annu Rev Biochem, 2000, 69(1): 217
- [6] Xu X, Chua C C, Kong J, et al. Necrostatin - 1 protects against glutamate - induced glutathione depletion and caspase - independent cell death in HT - 22 cells[J]. J Neurochem, 2007, 103(5): 2004
- [7] Oerlemans M I, Liu J, Arslan F, et al. Inhibition of RIP1-dependent necrosis prevents adverse cardiac remodeling after myocardial ischemia - reperfusion in vivo[J]. Basic Res Cardiol, 2012, 107(4): 1
- [8] Rosenbaum D M, Degtrev A, David J, et al. Necroptosis, a novel form of caspase - independent cell death, contributes to neuronal damage in a retinal ischemia - reperfusion injury model [J]. J Neurosci Res, 2010, 88(7): 1569
- [9] Trichonas G, Murakami Y, Thanos A, et al. Receptor interacting protein kinases mediate retinal detachment-induced photoreceptor necrosis and compensate for inhibition of apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(50): 21695
- [10] Galluzzi L, Joza N, Tasdemir E, et al. No death without life: vital functions of apoptotic effectors[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(7): 1113

(2013-11-13 收稿)