

内毒素检测在内毒素血症治疗中的应用

蒋庆军

(广西柳州市妇幼保健院, 广西 柳州 545001)

[关键词] 内毒素血症; 细菌内毒素; 检测

[中图分类号] R592.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1008-8849(2008)33-5229-04

血液中细菌或病灶内细菌释放出大量细菌内毒素至血液,或输入大量内毒素污染的液体引起的病症称为内毒素血症(endotoxaemia)。内毒素血症可引起如生物体的发热反应、使血管活性物质释放而导致微循环障碍等一系列病理生理改变。同时,可引起白细胞和血小板减少,产生出血倾向,还可直接或间接损害肝脏和引起糖代谢紊乱及酶学、蛋白质代谢的改变。内毒素血症进一步发展可能引起脓毒性休克、弥散性血管内凝血、急性呼吸窘迫综合征(serious acute respiration syndrome, SARS)、全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)或多器官功能衰竭(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的发生而导致死亡^[1]。所以,及时检测血液中内毒素水平对于临床诊断和治疗内毒素血症有着非常重大的意义。

1 内毒素的结构及其作用机制

细菌内毒素是革兰阴性细菌细胞壁的主要成分,其化学成分为脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)。LPS是炎症反应的关键递质,其化学成分主要是由O-特异性链、核心多糖、类脂A 3部分组成^[1]。O-抗原易变性,其抗原决定簇是菌种血清学特异性的结构基础。O-特异性链位于脂多糖分子最外层的多糖链,是由3~5个单糖(一般不多于25个)连成为1个多糖链。其单糖包括:戊糖、氨基戊糖、己糖、氨基己糖、脱氧己糖等。单糖的种类、位置、排列顺序和空间构型因菌种不同而异。因此,它决定菌体热原的特异性。核心多糖的变异性较小,位于类脂A和O-特异性链(内层)之间,在结构上分为内核心和外核心。外核心含有数种己糖,包括葡萄糖、半乳糖、乙酰氨基葡萄糖等。内核心含有庚糖及特殊的酮糖(3-脱氧-D-甘露糖-辛酮糖, KDO)。这部分结构对不同菌株的脂多糖基本相似,而且KDO是以不耐酸的酮糖链与类脂A的氨基葡萄糖连接,是构成内毒素脂多糖的核心部分。类脂A位于脂多糖分子结构的外层,是由氨基葡萄糖、磷酸和脂肪酸(1018e)组成,故称之为糖磷脂,也是细菌外膜的一种,形成单体聚合物。具有疏水性(强)和亲水性(弱)的双相性。但是,类脂A可从O-特异性链及核心多糖分离出来,游离的类脂A可自身凝聚成大分子的复合体而难溶于水,并具有生物活性。所以,类脂A(lipida)是内毒素多种生物活性或毒性反应的主要基团。该基团没有种属特异性,所以各属细菌的类脂A结构相似,其毒性反应相似。如发热、血流动力学改变、

弥漫性血管内凝血,并导致休克等。类脂部分最为稳定,在众多G⁻菌中基本相同。内毒素对人及某些动物具有很强的生理活性,毫微克水平的内毒素就能影响某些细胞的行为,而且性能稳定,在极端的温度及pH值下能保持活性。

内毒素对机体可产生致病作用,它作为外源性致热原作用于粒细胞和单核细胞等^[2],使之释放内源性致热原,引起发热;可激活血管活性物质的释放,使末梢血管扩张,通透性增高,静脉回流减少,心排血量减低,导致低血压并发休克^[3];因组织供血不足缺氧,导致代谢性酸中毒;可活化凝血因子,导致DIC^[4];可引起施瓦兹曼现象(Shwartzman phenomenon)。另一方面,它可发挥诸多对机体有益的生物学活性。适量的内毒素可增强机体非特异性免疫的作用,能够抗感染、抗辐射,并能增强网状内皮细胞的活力,并具有使肿瘤坏死消退的活性^[5-7]。严重创(烧)伤、休克及外科大手术等应急条件均可导致肠道细菌移位,进而引起体内炎症递质的大量合成、释放,最终诱发脓毒症和MODS^[8]。研究发现,早期的MODS可能是由于肠道细菌移位、血源性感染等因素引起部分组织和脏器的感染,出现内毒素休克。随后细菌和内毒素再一次触发超强的炎性反应,导致疾病后期的MODS。整个疾病过程中各种炎性细胞被激活后,脂多糖通过其结合受体或调节蛋白的作用,诱导宿主合成和释放多种细胞因子,其中包括肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、血小板活化因子(platelet activated factor, PAF)等,这些细胞因子在疾病的发展过程中起着主导作用,激发机体一系列病理生理改变。在此过程中,脂多糖结合蛋白(LBP)及脂多糖受体(CD14)系统是机体识别和调控内毒素作用的关键机制之一。体外试验发现,LBP/CD14能明显增强多种细胞对内毒素的敏感性,使内毒素的活性提高数百至数千倍。组织LBP/CD14 mRNA表达增加可能是发挥其生物学效应的主要分子基础。此外,大量的实验和临床资料显示,在正常人血清中不能检测到高迁移率族蛋白1(high mobility group 1 protein, HMG₁),但并发脓毒症和多器官功能衰竭的危重患者血清中HMG₁水平显著升高,且死亡组HMG₁水平高于存活组。这就提示,HMG可能是脓毒症病理过程中潜在的“晚期”递质之一。而且,在遭受相似程度打击后,在不同患者身上可以出现截然不同的结果,这就说明可能存在某种脓毒症相关

的特异性基因,使不同机体对感染因子的敏感性有差异。

2 内毒素检测现状

2.1 与鲎试剂相关的检测方法 1950年Bang发现大肠杆菌的粗提物能使鲎血细胞凝集死亡,而肺炎的球菌、葡萄球菌、链球菌的提取物与鲎血细胞并无凝集反应。鲎的死亡是因感染的内毒素中活性物质LPS激活细胞因子C,使鲎血液中变形细胞内的凝结蛋白原(coagulogen)变为凝结蛋白(coagulin)而致血液凝集^[9-10]。由此利用鲎血中变形细胞该特性制备成变形细胞溶解物(amebocytelysate),用于检查革兰阴性菌内毒素,从而建立了鲎试剂内毒素检查法,也称鲎变形细胞溶解物(limulus ameobocyte lysate, LAL)反应。鲎试验法大体可分为三大类:①凝胶法。以凝胶形成为终点测定内毒素含量的方法即为常用的凝胶法。根据内毒素与鲎试剂反应形成凝胶过程中的浊度变化,以适当的浊度来进行定量测定细菌内毒素的方法。在临床医学研究方面,此法可用来检测患者体液(如脑脊液、血液、尿液、胸水、腹水等)中的内毒素。此法与传统的家兔法比较,具有快速、灵敏、简便、重现性好等特点。为了节省试剂,提出微量测定法,有毛细管法、干板显微检验法、微量凹片法等,但从定量角度考虑都有不足之处;②比浊法。是在凝结蛋白原形成凝结蛋白的过程中,鲎试剂透明度逐渐降低,以透明度的变化为终点的方法。具体有终点比浊法(Endpoint Assay)和动态浊度法(Kinetic Turbidimetric Assay)^[11];③基质显色法。鲎三肽遇到细菌内毒素,水解后产生有色产物,可在荧光分光光度计或紫外分光光度仪下测定,也称为分光光度法,这比用肉眼观察的凝胶法准确得多,准确度可达到0.001 Eu/mL^[12-13]。

2.2 与重组因子C相关的检测方法 将内毒素敏感LAL蛋白因子C在大肠杆菌^[14]、酵母^[15]、哺乳动物^[16]细胞内表达,重组得到的重组因子C(rFC)可结合内毒素^[17],而且在参与成胶过程中,不会受到钙离子和葡聚糖的干扰。基于rFC因子,现已发展形成了几种方法:荧光分光光度法、比浊法、ELISA法。

2.2.1 荧光分光光度法 指当含rFC因子的酶原遇到微量的内毒素即被激活,水解产生一种多肽,如Boc-Val-Pro-arg-MCA(Boc,butoxy-car-bonyl;MCA,7-amido-4-methylcoumarin),水解后的产物在380 nm发出激发波谱,在460 nm处发出发射特征波谱,根据特征谱就能判定内毒素的含量。这就是所谓的荧光分光光度法。将rFC的含量从10 μg提高到80 μg,则检测内毒素的灵敏度可从0.005 Eu/mL提高到0.001 Eu/mL。此法对比传统的LAL凝胶法,在同样的条件下,干扰因素少得多,而且对内毒素的敏感程度大大提高。

2.2.2 ELISA法 内毒素的脂质A部分与rFC因子结合后,与抗rFC抗体结合,在鲎过氧化酶的作用下,诱发出第二抗体,第二抗体水解生色物质ABTS; 2,2'-azino-di,产生一种有色产物,根据产物可判断相应的内毒素含量^[18]。

2.2.3 RFC比浊法 是指用短肽Boc-Val-PRO-ARG-pNA作为生色物质,当它遇到被内毒素激活的rFC因子时就生成

有色物质,这种有色物质可以被仪器测量^[18]。如果使用的rFC因子经过凝胶纯化,则经纯化的rFC因子对内毒素检测的敏感程度可以大大提高。

2.3 内毒素生物传感器 目前处于发展阶段的检测内毒素方法还有生物传感器,已经陆续有了相关报道,很有希望能满足临床上在线定量检测的要求。目前人们致力研究的内毒素传感器有2类:压电晶体传感器^[19]和光纤传感器^[20]。在内毒素传感器上装上一种硅晶片,在晶片上琢刻成千上万的微孔,并附着有能发光的纳米级晶体。当晶片上的受体分子与内毒素结合,就能引起波峰的红移变化,这个变化肉眼是观察不到的,但是可通过电子探测器测定。将内毒素传感器置于伤口绷带内,它可随着伤口感染的变化产生不同的颜色,从而判定病情的发展情况。生物传感器具有的“红外敏感”比现行使用的LAL法更加迅速,结果可信度更高,比显微镜下观察的结果更胜一筹。但是,目前传感器还有很多问题有待解决,距离真正的临床应用还有一段距离。

光学生物传感器是将具有分子识别和换能作用的固定化指示剂染料、酶、受体、抗原抗体、DNA和微生物等敏感物固定在光导纤维、平面波导或毛细管波导上,对样品中的被测物进行选择性的分子识别后,再转换为各种光信息以及表面等离子体共振信号输出。光纤生物传感器的尺寸可以做到纳米级,可以进行细胞级大小的活体测量,同时它是非接触测量,所以安全性较好,而且有强的抗电磁干扰的能力和对恶劣环境的适应能力。最近罗切斯特大学的Whelan等^[20]开发出了一种诊断伤口感染的智能绷带,他们在多孔渗水硅微孔共鸣器上蚀刻了数百万的细孔,采用合成的受体分子TWTCP,当TWTCP与类脂A结合时,将改变硅的折射率,同时使发光光谱谱峰产生约8 nm的红移,不过这个红移的检测现在只能靠光谱仪检测。如果能改进为肉眼可见的光,将会有很大的市场。上述内毒素传感器采用的均为间接测量法,传感器的制作比较烦琐。而近年发展起来的表面等离子体共振传感器通过测量结合反应后折射率变化,具有不需要标记的优点,是光学生物传感器的一个发展方向。

3 细菌内毒素测定的临床意义

3.1 内毒素测定在肝疾病诊治中的应用 肝是阻止肠道内毒素进入大循环的有效屏障,一旦肝功能障碍、肝脏受损后,其对内毒素解毒能力大为减弱,内毒素进入血循环并经直接及间接作用引起肝外组织的损伤^[21]。研究表明,肝炎患者的血浆内毒素水平会有不同程度的升高,同时由内毒素所诱导的一些细胞因子水平也会升高,从而进一步加重肝脏的损害^[22]。内毒素的水平与病毒性肝炎的病情程度有很大关系,检测血浆内毒素水平对判断病情和预后有一定临床意义,也为抗内毒素治疗作为病毒性肝炎的辅助治疗提供了理论基础。肝硬化并发内毒素血症十分常见。肝硬化后由于枯否细胞清除能力下降或由于肝内组织结构和血流的改变,使内毒素不能与枯否细胞充分接触,门脉高压侧支循环开放,也使内毒素不能在肝内清除或绕过肝脏而进入体循环。肝硬化患者

机体免疫功能下降,调理素、IgM 等不足或功能减弱,使进入人体循环的内毒素不易及时清除,造成严重的内毒素血症。肝脏可摄取血流中内毒素的 80%~90%,血中内毒素的升高反过来又加重了对肝功能和结构损伤。故肝硬化时高内毒素水平可造成肝功能的进一步损害^[23]。梗塞性黄疸时,单核巨噬细胞系统,尤其是肝脏枯否细胞功能受抑,肠道中胆汁缺失使内毒素池增大,致内毒素血症发生率增高^[24]。内毒素浓度与梗塞性黄疸的程度(血清胆红素)以及持续时间有一定关系,与术后并发症发生率也有密切关系。因此,术前检测内毒素对预测术后病情有一定价值。

3.2 内毒素测定在呼吸系统感染中的应用 研究支气管肺泡灌洗液中内毒素水平与革兰阴性菌感染之间的关系发现,支气管肺泡灌洗液中内毒素水平与革兰阴性菌定量培养结果之间有明显的相关性^[25]。

3.3 内毒素测定在胰腺疾病中的应用 据文献报道,急性胰腺炎的轻重程度与血浆内毒素水平呈正相关。急性胰腺炎患者肠道推动力下降,肠道细菌过度繁殖,肠黏膜屏障功能损害,血浆内毒素水平增加。内毒素还可以诱导巨噬细胞大量分泌肿瘤坏死因子,介导休克和组织损害。急性胰腺炎并发内毒素血症较为常见,约占 66%。

3.4 内毒素测定在溃疡性结肠炎中的应用 大多数认为溃疡性结肠炎患者内毒素血症的发病率甚高,甚至高达 100%,但也有个别报道该病内毒素的阳性率仅为 25%^[26]。

3.5 内毒素测定在全身性细菌感染中的应用 全身性细菌感染主要见于败血症。革兰阴性细菌性败血症常并发内毒素血症。这种败血症较常见的致病菌为沙门菌属、脑膜炎双球菌属及拟杆菌属等。这些致病菌多通过泌尿道、肠管、胆管及呼吸道而引起感染,也可通过外伤、外科手术、导管检查或留置,以及器械操作等途径而进入血液,并大量繁殖引起败血症,从而造成内毒素血症。另外,一些低致病力、长期以来未予以重视的细菌,如大肠杆菌、克雷伯菌、产气杆菌、沙雷菌、变形杆菌和绿脓杆菌等可导致泌尿系统感染、呼吸系统感染和伤口感染引起败血症。上述各类感染的患者多伴有免疫功能降低,尤其是体液免疫功能低下。因此,免疫防御和治疗非常重要,对患者进行血浆内毒素测定,可以指导治疗,及时控制感染。

3.6 内毒素测定在不明原因发热中的应用 内毒素是一个强力的热源物质,每毫升血液中达皮克级的内毒素就能使人发热。国外学者对一些检查不出菌血症和临床感染的发热的免疫低下儿童作了内毒素检查,其结果是所有发热儿童在发热期间内毒素水平均高于正常儿童,发热恢复后内毒素含量都降至正常水平。这与对成年人进行的类似研究结果一致。因此,内毒素血症可能是免疫低下患者原因不明发热的因素之一,血浆内毒素的检测可以发现隐蔽的易被忽略的感染。

鲎试剂检测血液标本的结果除应结合临床表现及其他相应的实验室检查等有关资料进行分析外,尚应考虑患者是否存在革兰阴性细菌感染、机体防御和免疫功能,特别是网状内

皮系统的功能状态、肠壁的完整性与通透性以及鲎试剂的实验条件、操作方法等进行综合分析,以得到客观的判断。

前述的检测方法中,以鲎试剂为基础的方法均在时间、温度、pH 值、实验器具、操作程序、处理作用、多糖、蛋白、离子、有机盐等干扰的弊端。对此,1981 年 Morita 和 Kakinuma 在研究中证实鲎试剂产生凝集反应的另一条途径(旁路)——在有 β -葡聚糖类的物质存在时,可能会出现假阳性。这些干扰因子来源于很多方面,广泛存在于水、医药器皿等品中。目前去除干扰因子的方法主要有:稀释、加热、用氯仿或乙醇提取^[10]。但是,要想彻底除去干扰因子几乎不可能。而基于 rFC 建立起来的方法比 LAL 法具有很多优点,更加迅速、灵敏,而且不受众多因子干扰,更加准确,结果的可信度更高。鲎试剂法、ELISA 法、荧光比色法已广泛应用于药品检验领域,应用相对比较成熟,但是还有一些方面仍不尽如人意,有待提高。当然,还有很多其他方法,比如罗氏蛋白染色法、荧光偏振法、同位素标记法、免疫火箭电泳法、细胞因子测定法等,但是都欠成熟。目前,由于鲎试剂检测内毒素仍存在一些问题,如影响因素甚多,包括时间、温度、pH 值、实验器具、操作程序、处理作用、多糖、蛋白、离子、有机盐等。相信随着实验技术的进一步改进,临床要求的进一步提高,细菌内毒素检查将得到更加广泛的应用。

[参 考 文 献]

- [1] 焦炳华,余庆. 内毒素的结构及其与功能的关系[J]. 国外医学分子生物学分册,1987,9(4):168-170
- [2] 许剑平,何晓凡,熊石龙,等. 血小板对单核细胞促凝活性的影响[J]. 中华血液学杂志,2001,22(9):478-479
- [3] Hardaway RM. A review of septic shock[J]. Am Surg,2000,66(1):22-29
- [4] 李家增,贺石林. 血栓形成与临床医学[M]. 长沙:湖南科学出版社,1991:382
- [5] Brade H, Opal S M, Vogel SN, et al. Endotoxin in health and disease[M]. New York:Marcel Dekker,1999:915-926
- [6] Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al. An endotoxin-induced serum factor that cause necrosis of tumors[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1975,72(9):3666-3670
- [7] Engelhardt R, Otto F, Mackensen A, et al. Endotoxin(Salmonella abortus equi) in cancer patients. Clinical and immunological findings[J]. Prog Clin Biol Res,1995,392(2):253-261
- [8] Denise Bohrer, Rosmari Homer, Paulo Cicerodo Nascimento, et al. Interference in the limulus amebocyte lysate assay for endotoxin determination in peritoneal dialysis fluids and concentrates for hemodialysis[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,2001,26:811-818
- [9] Horn DL. What are the microbial components implicated in the pathogenesis of sepsis? [J]. Clin Infect Dis,2001,31:851-858
- [10] Ho B. Electrophoretic analysis of endotoxin activated gelation reaction of Carinoscorpius rotundicauda amoebocyte lysate [J]. Biochen, Nol. BiolIml,1993,29:687-694
- [11] Iwauaga S. Hemolymph coagulation system in limulus[J]. Ilmeri-

- [12] Thomas A, Sturk LH, Kahle JW. Ten Cate Quasi-titration of endotoxin in determination in blood with a chromogenic substrate[J]. *Clinical Chimica Acta*, 1981, 116:63 - 68
- [13] Cooperslock MS, Tucker RP, Baublis V. Possible pathogenic role of endotoxin in Reye's syndrome[J]. *Lancet*, 1975; 1:1272 - 1274
- [14] Ding JL. Expression of full length arid deletion homologues of *Carcinoscorpis rotundicauda* Factor C in *Saccharomyces cerevisiae*, immunoreactivity and endotoxin binding[J]. *J Endotoxin Res*, 1997 (4):3343
- [15] Roopashree SD, Bow Ho, Jeak LD. Recombinant COS-1 cells express *Carcinoscorpis rotundicauda* Factor C[J]. *Biotechnology Letters*, 1997, 19(4):357 - 361
- [16] Pui AW. Yeast recombinant Factor C from horse-shoe crab binds endotoxin and causes bacteriostasis[J]. *J Endotoxin Res*, 1997(4):391 - 400
- [17] Roopashree SD. Expression of *Carcinoscorpis rotundicauda* Factor C cDNA Biochem[J]. *Mol Biol Intl*, 1995(4):841 - 849
- [18] Jeak, Ding Bow Ho. A new era in pyrogen testing[J]. *TRENDS in Biotechnology*, 2001, 19(8):277 - 281
- [19] Steyawan P, Sakti L. Disposable TSM-biosensor based on viscosity changes of the contacting medium[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, 16:1101 - 1108
- [20] Goh YY, Freceer V, Ho B. Rational design of green fluorescent protein mutants as biosensor for bacterial endotoxin[J]. *Protein Engineering*, 2002, 15:493 - 502
- [21] Clements WD, Erwin P, Mccaigue MD, et al. Conclusive evidence of endotoxin in biliary obstruction[J]. *Gut*, 1998, 42(2):293 - 299
- [22] Fujimoto M, Uemura M, Nakatani Y, et al. Plasma endotoxin and serum cytokine levels in patients with alcoholic hepatitis: relation to severity of liver disturbance[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2000, 24(4Suppl):48s - 54s
- [23] Hartung T, Fennrich S, Fischer M, et al. Development and evaluation of a pyrogen test based on human whole blood[J]. *ALTEX*, 1998, 15(5):9 - 10
- [24] 蒋建新, 谢国旗, 陈永华, 等. 库普弗细胞清道夫受体、CD14表达变化及其与内毒素性肝损伤的关系[J]. *中华创伤杂志*, 2000, 16(8):478 - 479
- [25] Nys M, Ledoux D, Canicet JL, et al. Correlation between endotoxin level and bacterial count in bronchoalveolar lavage fluid of ventilated patients[J]. *Crit Care Med*, 2000, 28(8):2825 - 2831
- [26] 马利. 内毒素与肠源性感染[J]. *第三军医大学学报*, 1990, 12(1):21 - 23