

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.32.002

细胞游离血红蛋白对小鼠脓毒症肺损伤的影响*

毕兴华,周龙媛,蔡 畅,漆 勇,李 炎[△]
(宁波市医疗中心李惠利东部医院麻醉科,浙江宁波 315040)

[摘要] 目的 探讨细胞游离血红蛋白(CFH)对小鼠脓毒症肺损伤的影响。方法 将 60 只 BALB/c 小鼠分为假手术组(A 组)、脓毒症组(B 组)、脓毒症+生理盐水组(C 组)、脓毒症+CFH 组(D 组),每组 15 只。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肺泡灌洗液和血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)水平。测定肺组织湿/干比值,苏木素-伊红染色观察肺组织病理改变并评分。免疫组织化学检测核因子- κ B(NF- κ B)及其抑制蛋白- α (I κ B- α)、血红素氧合酶-1(HO-1)及晚期糖基化终末产物受体(RAGE)的表达。结果 各组小鼠肺组织水肿、病理改变和炎症反应严重程度由轻至重依次为 A 组、B、C 组及 D 组。与 B、C 组比较,D 组小鼠肺组织 NF- κ B、HO-1 及 RAGE 表达均上调,I κ B- α 表达下调,差异均有统计学意义($P<0.05$);而 B、C 组间肺组织 NF- κ B、HO-1 及 RAGE 水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 CFH 加重小鼠脓毒症肺损伤的机制可能与 HO-1 及 RAGE 表达上调有关。

[关键词] 细胞游离血红蛋白;脓毒症;肺损伤,急性;血红素氧合酶-1

[中图法分类号] R392.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)32-4089-04

The effect of cell free hemoglobin on lung injury in mice with sepsis*
BI Xinghua,ZHOU Longyuan,CAI Chang,QI Yong,LI Yan[△]
(Department of anesthesiology,Ningbo Medical Center Lihuali Eastern
Hospital,Ningbo,Zhejiang 315040,China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of cell free hemoglobin (CFH) on lung injury in mice with sepsis. **Methods** A total of 60 BALB/c mice were divided into the sham operation group (group A),the sepsis group (group B),the sepsis+saline group (group C) and the sepsis+CFH group (group D),15 mice per group. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukins-1 β (IL-1 β)in alveolar lavage fluid and serum were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The wet/dry ratio of lung tissues were calculated,and hematoxylin-eosin stain was conducted to observe and score the pathological changes. The expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and its inhibitory protein (I κ B)- α ,heme oxygenase-1 (HO-1) and advanced glycation end product receptor (RAGE) were assessed by immunohistochemistry. **Results** The severity of lung edema,pathological changes and inflammation from light to heavy was group A,group B,group C,group D. Compared with group B and C,the expressions of NF- κ B,HO-1 and RAGE in group D were up-regulated while the expression of I κ B- α was down-regulated ($P<0.05$);there was no statistically significant difference between group B and C ($P>0.05$). **Conclusion** The mechanism of CFH aggravating lung injury in mice with sepsis may be related to the up-regulation of HO-1 and RAGE expression.

[Key words] cell free hemoglobin;sepsis;lung injury,acute;heme oxygenase-1

脓毒症是指严重感染引起的全身炎症反应,多发生于大手术后、休克或烧伤等,病死率较高^[1-3]。肺是脓毒症引起全身炎症反应的起始靶器官,导致肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞损伤、弥漫性肺间质水肿和炎性细胞渗出,即急性肺损伤/呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS),表现为进行性呼吸窘迫和低氧血症^[4-5]。脓毒症引起红细胞破坏,血红蛋白释放入血,细胞游离血红蛋白(cell free hemoglobin,CFH)产生自由基、损伤血管内皮细胞和作为损伤相关分子模式而激活炎症反应^[6-8],但 CFH 对小鼠脓毒症肺损伤的作用研究尚不明确。本研究拟建立小鼠脓毒症模型,探讨 CFH 对小鼠脓毒症肺损伤的影响,为防治脓毒症肺损伤提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂 无特定病原体 BALB/c 小鼠 60 只,雌雄不分,10~12 周龄,体重 20~30 g,均购自广东省医学实验动物中心,合格证号:SCXK(粤)2013-0002。将 60 只小鼠随机分为假手术组(A 组)、

* 基金项目:浙江省医学会临床科研资金资助项目(2011ZYC-A52);宁波市医学科技计划项目(2013A01)。 作者简介:毕兴华(1984-),主治医师,本科,主要从事临床麻醉与药理的研究。 [△] 通信作者,E-mail:liyan894412@163.com。

脓毒症组(B组)、脓毒症+生理盐水组(C组)和脓毒症+CFH组(D组),每组 15 只。CFH 购自美国 Cell Sciences 公司;肿瘤坏死因子(TNF)- α 和白细胞介素(IL)-1 β 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自中国武汉华美生物工程有限公司;二喹啉甲酸(BCA)蛋白分析试剂盒购自中国碧云天生物技术有限公司;核转录因子(NF)- κ B 及其抑制蛋白(I κ B- α)、血红素氧合酶(HO)-1 及糖基化终末产物蛋白(RAGE)抗体均购自英国 Abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 脓毒症模型建立 参照文献[3,9]介绍的盲肠结扎穿孔术方法制备小鼠脓毒症模型。A 组小鼠仅开腹,不结扎穿孔;B、C、D 组小鼠进行盲肠结扎穿孔术;C 组术后立即气管内注射等量 NS;D 组小鼠术后立即气管内注射 CFH 100 μ g。各组小鼠术后背部均皮下注射生理盐水 0.5 mL/20 g 抗休克,放回鼠笼后自由饮水和进食。本实验中动物处置方法均符合动物伦理学标准。

1.2.2 标本收集 术后 24 h 处死小鼠,暴露心脏和双肺,右心室取血液标本,低温离心 10 min(1 800 r/min)后留取上清。结扎右侧主支气管,用预冷磷酸缓冲盐溶液(PBS)充分灌洗左肺并收集肺泡灌洗液(ALF)。剪开左心耳处心肌,经右心室灌注 PBS,冲洗左肺至肺组织变白后保留肺组织。所有标本保存在-80 $^{\circ}$ C 待检。

1.2.3 肺组织湿/干质量比值(W/D)测定 取小鼠新鲜右肺组织称取湿质量(W)后,置恒温烤箱(75 $^{\circ}$ C)中烘烤 48 h 至恒质量,称取干质量(D)并计算 W/D 值,评估肺组织水肿程度。

1.2.4 ALF 细胞计数及总蛋白测定 取出 ALF 低温离心 10 min(1 400 r/min),PBS 溶解沉淀后用改良 Neubauer 计数板进行细胞计数。采用 BCA 法检测 ALF 总蛋白水平,严格按照 BCA 蛋白检测试剂盒说明书进行操作。

1.2.5 肺组织病理学观察及评分 左肺组织行苏木素-伊红染色。光镜下观察并拍照,肺损伤病理学评分。评分根据以下方面:肺泡是否充血水肿;肺泡腔有无出血;白细胞有无渗出;肺泡间质是否损伤。每个评分标准:0 分轻微;1 分轻度;2 分中度;3 分重度;

4 分严重^[10]。
1.2.6 ELISA 检测血清及 ALF 中 TNF- α 和 IL-1 β 表达 采用 ELISA 检测血清及 ALF 中 TNF- α 和 IL-1 β 的水平,实验操作严格按照说明书步骤进行。

1.2.7 免疫组织化学检测肺组织 NF- κ B、I κ B- α 、HO-1 及 RAGE 蛋白表达 切片脱蜡后封闭,加相应的一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗涤后加辣根过氧化酶标记的二抗室温孵育 1.0 h,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色和苏木素染核,光镜下观察目标蛋白的表达情况,细胞及周围组织呈现褐色即为阳性表达。阴性对照用 PBS 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,采用 HMIAS-2000 型全自动图像分析系统拍照并分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS23.0 统计学软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较则采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组小鼠肺组织 W/D 比值及病理学评分等比较 与 A 组比较,B、C、D 组小鼠肺组织 W/D 比值、病理学评分、总蛋白水平和细胞计数均明显增加($P<0.05$)。与 B、C 组比较,D 组小鼠肺组织 W/D 比值、病理学评分、总蛋白水平和细胞计数均明显增加($P<0.05$);但 B、C 组间肺组织 W/D 比值、病理学评分、总蛋白水平和细胞计数比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 各组小鼠肺组织 W/D 比值及病理学评分等比较($\bar{x}\pm s,n=15$)

组别	W/D 比值	病理学评分	总蛋白(g/L)	细胞计数($\times 10^5$ /mL)
A 组	1.62 $\pm$ 0.35	5.62 $\pm$ 0.99	0.97 $\pm$ 0.30	1.11 $\pm$ 0.24
B 组	3.76 $\pm$ 0.65 ^{ab}	10.48 $\pm$ 1.86 ^{ab}	3.12 $\pm$ 0.32 ^{ab}	4.96 $\pm$ 0.87 ^{ab}
C 组	3.46 $\pm$ 0.91 ^{ab}	10.89 $\pm$ 1.55 ^{ab}	3.00 $\pm$ 0.30 ^{ab}	5.18 $\pm$ 0.38 ^{ab}
D 组	5.40 $\pm$ 0.78 ^a	13.19 $\pm$ 2.86 ^a	4.21 $\pm$ 0.37 ^a	8.45 $\pm$ 0.53 ^a

^a: $P<0.05$,与 A 组比较;^b: $P<0.05$,与 D 组比较

2.2 各组小鼠肺组织病理学改变 A 组小鼠肺组织无明显病理学改变;B、C 组小鼠肺组织结构紊乱,肺间质充血水肿,肺泡内见炎性细胞和红细胞渗出;D 组小鼠肺组织结构明显紊乱,肺间质严重充血水肿,肺泡内有大量的炎性细胞和红细胞渗出,见图 1。

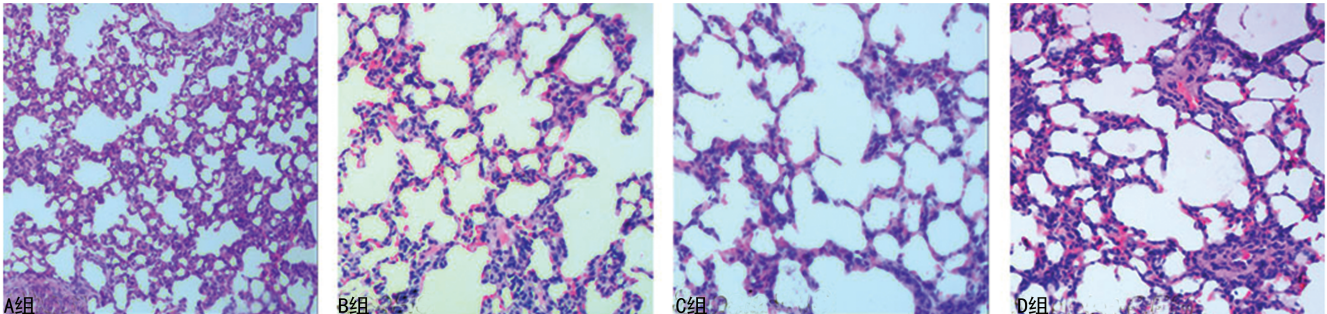


图 1 各组小鼠光镜下肺组织病理学改变($\times 100$)

2.3 各组小鼠血清及 ALF 中炎症因子表达水平比较 与A组比较,B、C、D组小鼠血清及 ALF 中炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 水平均增加($P<0.05$);与 B、C组比较,D组小鼠血清及 ALF 中炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 水平均明显增加($P<0.05$);但 B、C组间小鼠血清及 ALF 中 TNF- α 和 IL-1 β 水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见表 2。

2.4 各组小鼠肺组织 NF- κ B、I κ B- α 、HO-1 及 RAGE 蛋白质表达 与 A 组比较,B、C、D 组小鼠肺组织 NF- κ B、HO-1 及 RAGE 表达均上调,而 I κ B- α 表达下调,差异均有统计学意义($P<0.05$)。D 组小鼠肺组织 NF- κ B、HO-1 及 RAGE 表达均较 B、C 组明显升高,而 I κ B- α 表达降低,差异均有统计学意义($P<$

0.05);B、C 组小鼠肺组织 NF- κ B、HO-1 及 RAGE 表达水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),见图 2。

表 2 各组小鼠血清及 ALF 中炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s,n=15,\text{ng/mL}$)

组别	TNF- α		IL-1 β	
	血清	BALF	血清	BALF
A 组	1.16 $\pm$ 0.19	0.87 $\pm$ 0.19	1.24 $\pm$ 0.50	0.61 $\pm$ 0.23
B 组	3.38 $\pm$ 0.80 ^{ab}	1.83 $\pm$ 0.11 ^{ab}	5.19 $\pm$ 0.90 ^{ab}	1.54 $\pm$ 0.22 ^{ab}
C 组	3.00 $\pm$ 0.57 ^{ab}	1.92 $\pm$ 0.24 ^{ab}	5.51 $\pm$ 1.18 ^{ab}	1.66 $\pm$ 0.28 ^{ab}
D 组	4.75 $\pm$ 1.63 ^a	2.65 $\pm$ 0.63 ^a	6.27 $\pm$ 1.25 ^a	2.39 $\pm$ 0.24 ^a

^a: $P<0.05$,与 A 组比较;^b: $P<0.05$,与 D 组比较

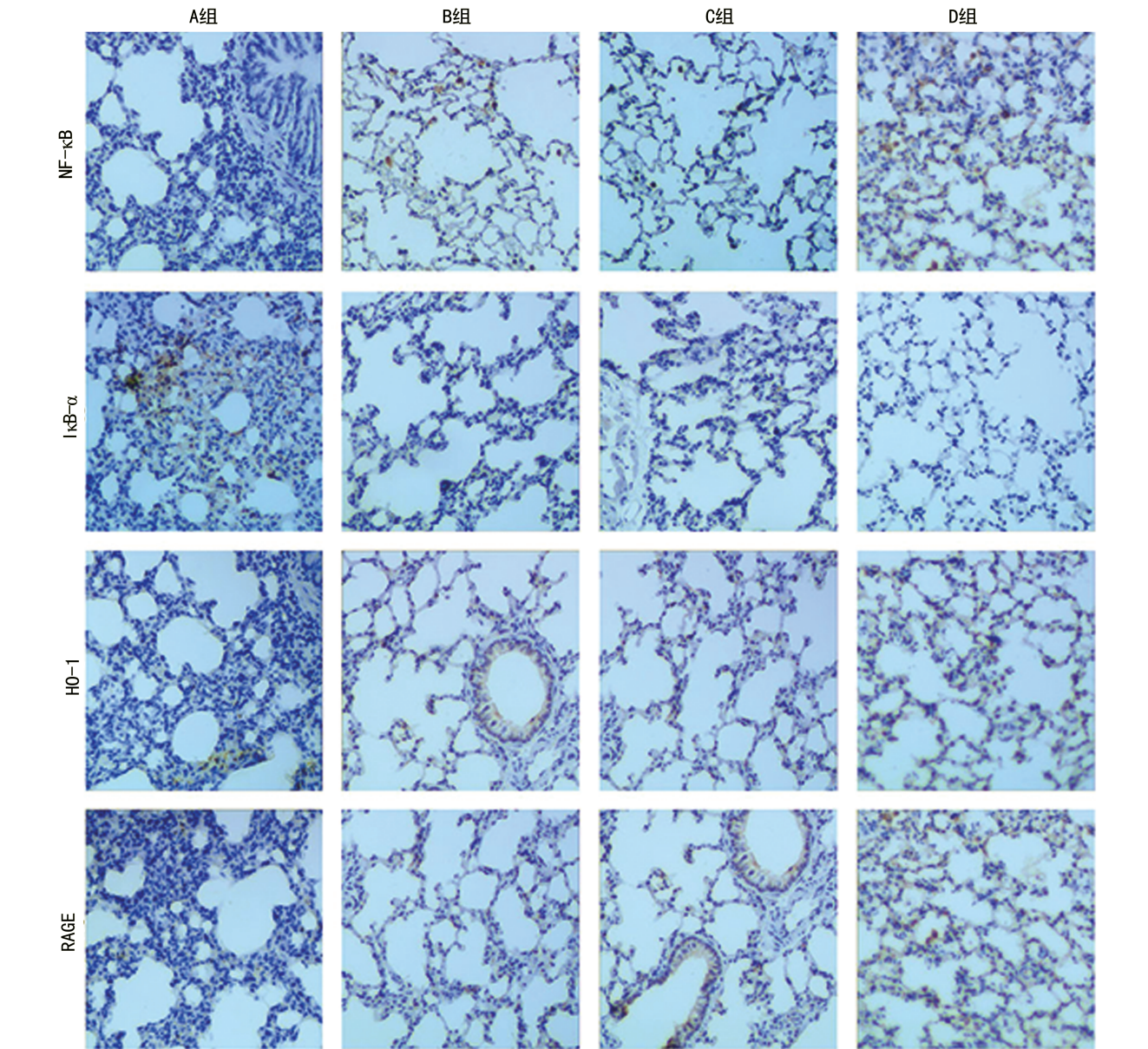


图 2 各组小鼠肺组织 NF- κ B、I κ B- α 、HO-1 及 RAGE 表达水平($\times 100$)

3 讨 论

脓毒症患者起病急骤,多数可导致 ALI/ARDS、休克和多器官功能障碍综合征(MODS)。炎性细胞

激活和炎症因子释放是脓毒症肺损伤发展的主要因素,肺损伤的早期出现是引起脓症患者死亡的重要原因,其发病机制目前尚不明确。本研究通过盲肠结

扎穿孔术建立小鼠的脓毒症模型,手术引起的组织损伤、结扎引起的组织坏死、混有细菌的肠内容物引起感染,引起腹膜炎和肠道细菌移位,激活免疫系统并导致呼吸、循环等系统衰竭、休克和 MODS。本课题组发现 B、C 组小鼠肺组织明显水肿、病理学损伤和炎症反应严重,同时炎症蛋白 NF- κ B 表达上调和 I κ B- α 表达下调,提示小鼠脓毒症肺损伤模型成功建立。

与 B、C 组比较,D 组小鼠肺组织明显水肿、病理学损伤和炎症反应明显增加,同时炎症蛋白 NF- κ B 表达明显上调,提示 CFH 加重了小鼠脓毒症肺损伤。CFH 是红细胞在病理情况下大量破坏,血红蛋白释放入血,产生自由基、损伤血管内皮细胞和作为损伤相关分子模式而激活免疫炎症反应^[6-8]。脓毒症引起的 ARDS 常引起肺泡内大量红细胞渗出并发生溶血^[11],因此升高的 CFH 可能参与并激活 ARDS 的免疫炎症反应,加重 ARDS。SHAVER 等^[12]研究发现,气管内注射外源性 CFH 导致呼吸机相关性肺损伤的肺泡毛细血管通透性增加、炎症反应和肺泡上皮细胞损伤明显加重。

本研究发现,CFH 处理后小鼠肺组织 HO-1 和 RAGE 蛋白表达明显上调,提示 CFH 加重脓毒症小鼠 ALI 可能与 HO-1 表达有关。RAGE 是诊断 ALI 的敏感指标^[13-14],其表达明显上调与肺损伤的严重程度呈正相关性。有研究表明,CFH 与结合珠蛋白结合并形成复合体,被肺泡巨噬细胞表面的 CD163 识别和摄取,上调效应酶 HO-1 的表达^[15-16]。HO-1 可能在脓毒症 ALI 中起到抗炎和抗氧化性组织损伤的作用,对脓毒症 ALI 的免疫和炎症反应平衡具有十分重要的意义^[17]。但本研究发现,HO-1 表达上调并不能改善脓毒症 ALI 的炎症反应和组织损伤,可能与氧化应激与抗氧化反应失衡有关。NF- κ B 是调节炎症反应中细胞因子、炎症介质和黏附分子基因转录过程的序列特异性 DNA 结合蛋白,在免疫炎症反应中起着非常关键的作用^[18]。脓毒症发生的 MODS 常伴有 NF- κ B 信号转导通路上调活化^[19]。本研究发现,CFH 处理后小鼠肺组织 NF- κ B 蛋白表达明显上调,而其抑制蛋白 I κ B- α 表达明显下调,提示 NF- κ B 蛋白可能参与了脓毒症肺损伤的炎症反应。

综上所述,CFH 加重小鼠脓毒症肺损伤,表现为肺水肿、形态学损伤、炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 水平增加,炎症蛋白 NF- κ B 和 RAGE 表达上调,可能与 HO-1 表达有关。

参考文献

- [1] FATTAHI F, WARD P A. Understanding immunosuppression after sepsis[J]. *Immunity*, 2017, 47(1): 3-5.
- [2] HASSAN U, GHONGE T, REDDY B, et al. A point-of-care microfluidic biochip for quantification of CD64 expression from whole blood for sepsis stratification[J]. *Nat Commun*, 2017(8): 15949.

- [3] 卞佳兰,莫清飞,罗欢,等. 生长停滞特异性蛋白 6 对脓毒症小鼠急性肺损伤的保护研究[J]. *中华急诊医学杂志*, 2017, 26(2): 161-167.
- [4] DICKSON R P, SINGER B H, NEWSTEAD M W, et al. Enrichment of the lung microbiome with gut bacteria in sepsis and the acute respiratory distress syndrome[J]. *Nat Microbiol*, 2016, 1(10): 16113.
- [5] LEAF D E, WAIKAR S S. Rosuvastatin for sepsis-associated ARDS[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(10): 968-969.
- [6] BILLINGS F T, BALL S K, ROBERTS L J, et al. Postoperative acute kidney injury is associated with hemoglobinemia and an enhanced oxidative stress response[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50(11): 1480-1487.
- [7] DUTRA F F, BOZZA M T. Heme on innate immunity and inflammation[J]. *Front Pharmacol*, 2014, 5(115): 115-134.
- [8] BUTTARI B, PROFUMO E, BUSINARO R, et al. Oxidized haemoglobin-driven endothelial dysfunction and immune cell activation: novel therapeutic targets for atherosclerosis[J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(37): 4806-4814.
- [9] 刘勇攀,王焱林,詹佳,等. 戊二醛预处理对脓毒症小鼠肺损伤时 MAPK 信号转导通路的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2009, 29(1): 53-56.
- [10] 荆忍,潘灵辉. 线粒体自噬在大鼠 VILI 中的作用及机制[J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29(1): 6-10.
- [11] 唐甜,谭利平. 炎症反应在脓毒症 ARDS 发病机制中的作用[J]. *重庆医学*, 2017, 46(15): 2146-2149.
- [12] SHAVER C M, UPCHURCH C P, JANZ D R, et al. Cell-free hemoglobin: a novel mediator of acute lung injury[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 310(6): 532-541.
- [13] 俞敏,赵赛,程怀平,等. RAGE 与腹腔注射脂多糖诱导新生大鼠急性肺损伤的相关性研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(8): 1051-1055.
- [14] 杜虹,朱江勃,李璟,等. 急性肺损伤的生物标记物[J]. *现代生物医学进展*, 2013, 15(2): 359-361.
- [15] 李海洲,夏豪,王薇. 游离血红蛋白及其受体 CD163 在大鼠动脉粥样硬化中的作用研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(9): 1695-1699.
- [16] BELCHER J D, YOUNG M, CHEN C S, et al. MP4CO, a pegylated hemoglobin saturated with Carbon monoxide, is a modulator of HO-1, inflammation, and vaso-occlusion in transgenic sickle mice[J]. *Blood*, 2013, 122(15): 2757-2764.
- [17] 聂佳,王海英,张永国,等. Nrf2/ARE 信号通路在硫酸锌预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. *中华麻醉学杂志*, 2017, 37(3): 370-374.
- [18] BAKER R G, HAYDEN M S, GHOSH S. NF- κ B, inflammation and metabolic disease cell[J]. *Cell Metab*, 2011, 13(1): 11-22.
- [19] EPSTEIN J, SANDERSON I R, MACDONALD T T. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies[J]. *Br J Nutr*, 2010, 103(11): 1545-1557.