

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.09.005

文章编号: 1005-8982 (2018) 09-0028-05

保护素 DX 对脓毒症小鼠急性肺损伤的保护作用

卜克, 王璐, 刘林刚

(郑州大学第五附属医院, 河南 郑州 450052)

摘要: **目的** 探讨保护素 DX (PDX) 对小鼠脓毒症所致急性肺损伤的保护作用。**方法** 45 只健康雄性昆明小鼠利用随机数字表随机分为假手术组、脓毒症组和 PDX 干预组, 每组 15 只, 复制小鼠脓毒症模型, 术毕 60 min 后, PDX 干预组小鼠腹腔注射 1 μ g 的 PDX, 假手术组和脓毒症组则给予等量的生理盐水, 建模 24 h 后, 处死各组小鼠, 观察各组小鼠肺组织病理学变化, 检测各组小鼠肺组织中白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6) 及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 水平, Western blot 检测肺组织胞核中核因子 κ B (NF- κ B) 和胞浆中核因子 κ B 抑制蛋白 α 抗原 (I κ B- α) 蛋白表达。**结果** 与假手术组比较, 脓毒症组和 PDX 干预组小鼠肺组织损伤组织学评分均升高, 与脓毒症组比较, PDX 干预组小鼠肺组织损伤组织学评分则降低, 差异有统计学意义 ($F=253.323$, $P=0.000$); 与假手术组比较, 脓毒症组和 PDX 干预组小鼠肺组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、SOD 及 MDA 水平均升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 与脓毒症组比较, PDX 干预组小鼠肺组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、SOD 及 MDA 水平均降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与假手术组比较, 脓毒症组和 PDX 干预组小鼠肺组织胞核中 NF- κ B 蛋白相对表达量均升高, 而胞浆中 I κ B- α 蛋白相对表达量均降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与脓毒症组比较, PDX 干预组小鼠肺组织胞核中 NF- κ B 蛋白相对表达量均降低, 而胞浆中 I κ B- α 蛋白相对表达量均升高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。**结论** PDX 可减轻脓毒症所致小鼠肺组织损伤, 其机制与减轻氧化应激反应及通过调控 NF- κ B/I κ B- α 通路而抑制炎症因子释放有关。

关键词: PDX; 脓毒症; 急性肺损伤; 小鼠

中图分类号: R563

文献标识码: A

Protective effect of protectin DX on acute lung injury in mouse model of sepsis

Ke Bu, Lu Wang, Lin-gang Liu

(The Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of protectin DX (PDX) on acute lung injury (ALI) in mouse model of sepsis. **Methods** Totally 45 healthy male Kunming mice were randomly divided into sham group, sepsis group and PDX group. Sepsis model was prepared with standard protocol. At the 60th min post surgery, mice in PDX group was intraperitoneally injected with 1 μ g of PDX while mice in sham group and sepsis group received the same amount of normal saline. At the 60th post surgery, lungs were harvested. The histopathological change of lung tissue was scored. Levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in lung tissue were measured. Nuclear factor- κ B (NF- κ B) in the nucleus and nuclear factor κ B inhibiting α antigen (I κ B- α) in the cytoplasm of lung tissue were identified by Western blot. **Results** Compared with sham operation group, ALI the score were increased in the sepsis group, which was attenuated significantly by PDX ($F=253.323$, $P=0.000$). Levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , SOD and MDA

收稿日期: 2017-08-03

in the lung tissues of sepsis group were increased compared with sham group, which was dramatically ameliorated with treatment of PDX ($P < 0.05$). Relative concentration of NF- κ B in the nucleus upregulated while I κ B- α in cytoplasm was down regulated in sepsis group when compared with sham group ($P < 0.05$), which was significantly diminished by PDX therapy ($P < 0.05$). **Conclusion** PDX protects sepsis induced lung injury through alleviating oxidative stress and inhibiting the NF- κ B/I κ B- α mediated release of inflammatory factors.

Keywords: pdx; sepsis; acute lung injury; mice

脓毒症作为常见的危重症,是由各种因素导致的全身炎症反应综合征,可导致全身各系统、多器官损伤,是危重病房患者主要致死因素^[1]。其中,肺往往是最易受损器官,早期便可导致急性肺损伤,且病情进展迅猛,尚无特效的治疗方法,病死率较高^[2]。因此,如何有效防治脓毒症所致急性肺损伤,已成为临床研究重点。研究发现^[3],过度炎症反应在脓毒症所致急性肺损伤发生、进展中发挥关键性作用。保护素 DX (protectin DX, PDX) 作为一种 ω -3 多不饱和脂肪酸代谢产物,近年来研究发现,可减少中性粒细胞中活性氧生成,具有较好的抗炎作用^[4]。本研究通过复制小鼠脓毒症所致急性肺损伤模型,观察 PDX 对肺损伤保护作用,并探讨可能的机制,以期对脓毒症所致急性肺损伤临床防治提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 PDX (购自美国 Cayman Chemical 公司), HE 染色试剂盒 (购自北京中杉金桥生物公司), 白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 检测试剂盒 (购自碧云天生物工程公司), 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (购自南京建成生物工程研究所), 兔抗小鼠核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 多克隆抗体 (购自美国 SAB 公司), 兔抗小鼠核因子 κ B 抑制蛋白 α 抗原 (nuclear factor kappa B inhibitor alpha antigen, I κ B- α) 多克隆抗体 (购自美国 Santa Cruz 公司)。

1.1.2 实验动物及分组 清洁级健康雄性昆明小鼠 45 只购自河南省实验动物中心 [合格证号: SCXX(豫) 2010-0002], 6 ~ 8 周龄, 体重 18 ~ 23 g, 饲养于标准条件下, 自由进食、饮水, 利用随机数字表随机分为假手术组、脓毒症组和 PDX 干预组, 每组 15 只。

1.2 方法

1.2.1 小鼠脓毒症模型复制 按照文献^[5]中的方法复

制小鼠脓毒症模型: 用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 取仰卧位, 消毒后, 取腹正中线切口, 将肠系膜和盲肠末端游离, 用 4 号无菌丝线在回盲瓣以下进行结扎, 用针头于盲端部位进行穿孔, 挤出少量粪便后, 还纳腹腔, 逐层关闭腹腔, 苏醒后自由进食、饮水。假手术组小鼠仅开腹而不结扎盲肠及穿孔。术毕 60 min 后, PDX 干预组小鼠腹腔注射 1 μ g 的 PDX^[6], 假手术组和脓毒症组则给予等量的生理盐水。实验过程中脓毒症组 3 只小鼠死亡, PDX 干预组 2 只小鼠死亡。

1.2.2 各组小鼠肺组织病理学观察 建模 24 h 后, 各组小鼠处死后, 开胸留取右肺组织, 4% 甲醛固定, 石蜡包埋、切片后, 行 HE 染色, 光学显微镜下观察肺组织病理学变化, 并进行肺损伤评分^[7]: 根据肺间质水肿、炎症细胞浸润、肺泡水肿、肺泡出血、肺不张、透明膜形成病变程度, 按照正常、轻度、中度、重度分别按 0 ~ 3 分计分。

1.2.3 各组小鼠肺组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、SOD、MDA 水平检测 取各组小鼠左下肺组织, 研磨后制备肺组织匀浆, 4 $^{\circ}$ C 下 3 500 r/min 离心 15 min, 留取上清, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱。利用 ELISA 检测血清中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、SOD 及 MDA 水平, 所有操作均在标准实验室完成。

1.2.4 Western blot 检测肺组织胞核中 NF- κ B 和胞浆中 I κ B- α 蛋白表达 取各组小鼠右下肺组织约 80 mg, 预冷 PBS 洗涤 3 次, 将核蛋白提取裂解缓冲液加入, 置于冰上静置 20 min, 匀浆后, 将细胞裂解液 NP-40 加入, 于 4 $^{\circ}$ C 下于 12 000 r/min 离心 40 s, 取上清作为胞浆蛋白。沉淀物则用预冷 PBS 冲洗 2 次, 4 $^{\circ}$ C 下于 12 000 r/min 离心 40 s, 将核蛋白提取裂解液加入, 置于冰上静置 25 min, 于 4 $^{\circ}$ C 下于 12 000 r/min 离心 120 s, 取上清作为核蛋白, 置于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存备检。用 Bradford 法检测蛋白浓度。取 30 μ g 总蛋白, 用 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 4 $^{\circ}$ C 条件下用湿式转膜法转移至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉室温下封闭 60 min, TBST 液漂洗 30 min, 分别将一抗兔抗小鼠 NF- κ B、I κ B- α 多克隆抗体 (稀释比

例 1 : 1 000、1 : 1 200) 加入, 室温下静置 60 min, TBST 漂洗 30 min, 加入二抗, TBST 漂洗 30 min, 加入 ECL 反应液显影, 拍照后, 用 Image J 图像分析软件分析条带获得胞核中 NF- κ B 和胞浆中 I κ B- α 蛋白相对表达量。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 行方差分析, 两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肺组织病理学变化

假手术组小鼠肺组织形态正常, 肺泡腔清晰可见, 间隔无水肿及炎症细胞浸润; 脓毒症组小鼠肺组织间隔增加, 间质水肿, 有大量炎症细胞聚集, 出现肺泡腔融合, 腔内出现有点状或片状出血; PDX 干预组小鼠肺组织病变较脓毒症组减轻, 见图 1。

2.2 各组小鼠肺组织损伤严重程度组织学评分

假手术组、脓毒症组和 PDX 干预组小鼠肺组织损伤组织学评分分别为 (2.4 ± 1.0)、(13.7 ± 1.3) 及 (6.4 ± 1.6) 分, 与假手术组比较, 脓毒症组和 PDX 干预组小鼠肺组织损伤组织学评分均升高, 与脓毒症组比较, PDX 干预组小鼠肺组织损伤组织学评分则降低, 差异

有统计学意义 ($F = 253.323$, $P = 0.000$)。

2.3 各组小鼠肺组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、SOD 及 MDA 水平比较

假手术组、脓毒症组和 PDX 干预组小鼠肺组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、SOD 及 MDA 水平差异有统计学意义 ($F = 1980.915$ 、 141.627 、 62.851 、 44.720 及 78.345 , 均 $P = 0.000$), 两两比较, 与假手术组比较, 脓毒症组和 PDX 干预组小鼠肺组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、SOD 及 MDA 水平均升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与脓毒症组比较, PDX 干预组小鼠肺组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、SOD 及 MDA 水平均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.4 各组小鼠肺组织胞核中 NF- κ B 和胞浆中 I κ B- α 蛋白表达比较

假手术组、脓毒症组和 PDX 干预组小鼠肺组织胞核中 NF- κ B 和胞浆中 I κ B- α 蛋白相对表达量比较差异有统计学意义 ($F = 55.675$ 和 123.909 , 均 $P = 0.000$); 两两比较, 与假手术组比较, 脓毒症组和 PDX 干预组小鼠肺组织胞核中 NF- κ B 蛋白相对表达量均升高, 而胞浆中 I κ B- α 蛋白相对表达量均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与脓毒症组比较, PDX 干预组小鼠肺组织胞核中 NF- κ B 蛋白相对表达量均降低, 而胞浆中 I κ B- α 蛋白相对表达量均升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2 和图 2。

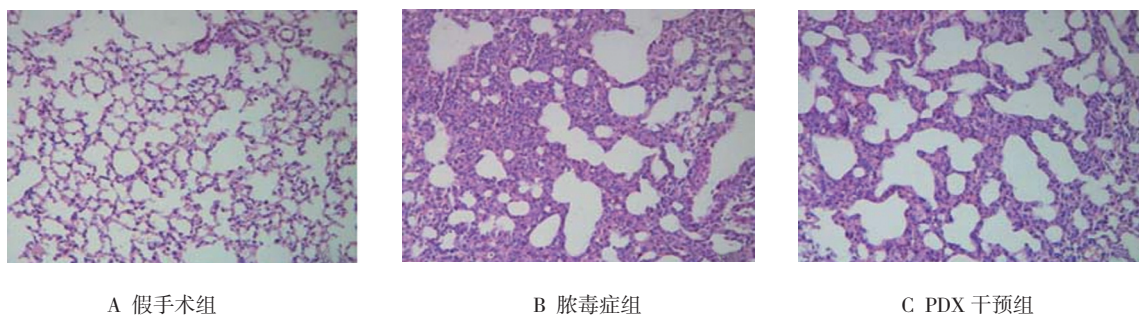


图 1 各组小鼠肺组织病理学变化 (HE $\times 200$)

表 1 各组小鼠肺组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、SOD 及 MDA 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-1 β / (pg/mg)	IL-6 / (pg/mg)	TNF- α / (pg/mg)	SOD / (u/mg)	MDA / (nmol/mg)
假手术组	15	47.1 $\pm$ 4.0	110.2 $\pm$ 39.5	88.1 $\pm$ 17.1	32.5 $\pm$ 6.9	5.7 $\pm$ 1.4
脓毒症组	12	159.5 $\pm$ 5.9 ¹⁾	359.5 $\pm$ 20.5 ¹⁾	158.6 $\pm$ 19.3 ¹⁾	59.0 $\pm$ 9.2 ¹⁾	14.8 $\pm$ 1.9 ¹⁾
PDX 干预组	13	74.4 $\pm$ 4.3 ¹⁾²⁾	162.4 $\pm$ 51.3 ¹⁾²⁾	115.1 $\pm$ 11.7 ¹⁾²⁾	38.7 $\pm$ 6.2 ¹⁾²⁾	8.6 $\pm$ 2.3 ¹⁾²⁾
F 值		1980.915	141.627	62.851	44.720	78.345
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与假手术组比较, $P < 0.05$; 2) 与脓毒症组比较, $P < 0.05$

表 2 各组小鼠肺组织细胞核中 NF-κ B 和胞浆中 Iκ B-α 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NF-κ B 蛋白	Iκ B-α 蛋白
假手术组	15	0.31 ± 0.07	0.98 ± 0.15
脓毒症组	12	0.77 ± 0.12 ¹⁾	0.30 ± 0.07 ¹⁾
PDX 干预组	13	0.51 ± 0.14 ^{1) 2)}	0.63 ± 0.09 ^{1) 2)}
F 值		55.675	123.909
P 值		0.000	0.000

注: 1) 与假手术组比较, $P < 0.05$; 2) 与脓毒症组比较, $P < 0.05$

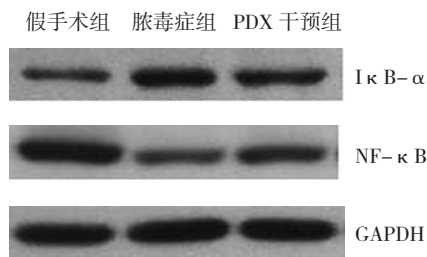


图 2 各组小鼠肺组织细胞核中 NF-κ B 和胞浆中 Iκ B-α 蛋白表达

3 讨论

脓毒症作为烧伤、创伤、外科手术及缺血再灌注损伤等常见严重并发症,是导致患者死亡的重要因素^[8],研究表明^[9],脓毒症所致难以控制的全身炎症反应,最终导致的多器官损伤是导致患者早期死亡的主要原因。肺作为发生脓毒症时最易受损的靶器官,近年来虽然各种诊疗技术不断进步,但脓毒症所致急性肺损伤仍是主要死亡原因^[10],是目前危重医学亟需解决的难题。有研究指出^[11],脓毒症引发的全身炎症及大量炎症因子释放导致的氧化/抗氧化失衡是发生急性肺损伤的主要因素。PDX 作为多不饱和脂肪酸经脂氧合酶代谢产物,在减少炎症反应及相关细胞因子释放中发挥重要作用^[12],戴映宁^[13]指出, PDX 可降低叔丁基过氧化氢诱导的炎症及炎症相关细胞因子释放,减轻视网膜色素上皮细胞氧化损伤。本研究利用文献^[5]中经典方法构建脓毒症所致小鼠急性肺损伤模型,病理学检查结果显示,脓毒症组小鼠肺组织出现典型的急性损伤改变,且肺组织损伤组织学评分显著增加,表明成功构建脓毒症所致小鼠急性肺损伤模型。

IL-1β、IL-6 及 TNF-α 作为机体内主要的促炎因子,其水平与体内炎症反应水平呈正相关,可反应机体炎症反应水平^[14],MDA 作为脂质过氧化反应产物,

是反应机体内氧自由基生成及活性的主要指标,而 SOD 作为一种保护性物质,则在保护细胞免受氧自由基损伤中发挥重要作用^[15]。本研究显示,与假手术组比较,脓毒症组和 PDX 干预组小鼠肺组织中 IL-1β、IL-6、TNF-α、SOD 及 MDA 水平均升高,说明脓毒症所致急性肺损伤时,肺组织发生氧化应激和炎症反应,而在给予 PDX 干预后,小鼠肺组织中 IL-1β、IL-6、TNF-α、SOD 及 MDA 水平均降低,说明 PDX 可减少小鼠肺组织中炎症因子及氧化应激反应,病理学检查亦显示, PDX 干预组小鼠肺组织病变较脓毒症组减轻,且肺组织损伤组织学评分降低,进一步说明 PDX 可通过抑制小鼠肺组织炎症及氧化应激反应而减轻脓毒症所致急性肺损伤。

有研究指出^[16],NF-κ B 可通过调控炎症因子释放而参与急性肺损伤发生。正常情况下,未活化的 NF-κ B 与抑制蛋白 Iκ B 结合而游离于胞浆中,当受到外界刺激时, Iκ B 发生降解而与 NF-κ B 解离, NF-κ B 快速移至细胞核内,在于特异性靶位结合后,促进多种炎症因子和介质大量释放^[17]。本研究显示,与假手术组比较,脓毒症组和 PDX 干预组小鼠肺组织细胞核中 NF-κ B 蛋白相对表达量均升高,而胞浆中 Iκ B-α 蛋白相对表达量均降低,说明发生脓毒症时可导致肺组织胞浆中 Iκ B-α 蛋白解离而使胞核中 NF-κ B 蛋白大量增加,引发炎症反应,从而导致肺组织发生急性损伤,而在给予 PDX 干预后, PDX 干预组小鼠肺组织细胞核中 NF-κ B 蛋白相对表达量均降低,而胞浆中 Iκ B-α 蛋白相对表达量均升高,说明 PDX 可能通过减少胞浆中 Iκ B-α 蛋白降解而阻止胞核中 NF-κ B 蛋白,从而减轻炎症因子释放,发挥肺保护作用。

综上所述, PDX 可减轻脓毒症所致小鼠肺组织损伤,其机制与减轻氧化应激反应及通过调控 NF-κ B/Iκ B-α 通路而抑制炎症因子释放有关。

参考文献:

[1] CARVALHO J K, MOORE D B, LUZ R A, et al. Prediction of sepsis-related outcomes in neonates through systematic genotyping of polymorphisms in genes for innate immunity and inflammation: a narrative review and critical perspective[J]. Sao Paulo Med J, 2013, 131(5): 338-350.

[2] MIYASHITA T, AHMED A K, NAKANUMA S, et al. A three-phase approach for the early identification of acute lung injury induced by severe sepsis[J]. In Vivo, 2016, 30(4): 341-349.

[3] FUJISHIMA S, GANDO S, DAIZOH S, et al. Infection site is predictive of outcome in acute lung injury associated with severe

- sepsis and septic shock[J]. *Respirology*, 2016, 21(5): 898-904.
- [4] LIU M, BOUSSETTA T, MAKNI-MAALEJ K, et al. Protectin DX, a double lipoxygenase product of DHA, inhibits both ROS production in human neutrophils and cyclooxygenase activities[J]. *Lipids*, 2014, 49(1): 49-57.
- [5] CHEN S, HE Y, HU Z, et al. Heparanase mediates intestinal inflammation and injury in a mouse model of sepsis[J]. *J Histochem Cytochem*, 2017, 65(4): 241-249.
- [6] JUNG T W, KIM H C, EL-ATY AMA, et al. Protectin DX ameliorates palmitate- or high-fat diet-induced insulin resistance and inflammation through an AMPK-PPAR α -dependent pathway in mice[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1397-1406.
- [7] 李国民, 丁东亮, 杨娇娇, 等. 线粒体靶向抗氧化剂 SS-31 肽对脓毒血症小鼠急性肺损伤的影响 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(5): 476-479.
- [8] CHEN X, ZHU W, TAN J, et al. Early outcome of early-goal directed therapy for patients with sepsis or septic shock: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(16): 27510-27519.
- [9] LIU Y, HOU J H, LI Q, et al. Biomarkers for diagnosis of sepsis in patients with systemic inflammatory response syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. *Springerplus*, 2016, 5(1): 2091-2101.
- [10] HO M S, MEI S H, STEWART D J. The immunomodulatory and therapeutic effects of mesenchymal stromal cells for acute lung injury and sepsis[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(11): 2606-2617.
- [11] ZHAI Y, ZHOU X, DAI Q, et al. Hydrogen-rich saline ameliorates lung injury associated with cecal ligation and puncture-induced sepsis in rats[J]. *Exp Mol Pathol*, 2015, 98(2): 268-276.
- [12] STEIN K, STOFFELS M, LYSSON M, et al. A role for 12/15-lipoxygenase-derived proresolving mediators in postoperative ileus: protectin DX-regulated neutrophil extravasation[J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 99(2): 231-239.
- [13] 戴映宁. Protectin DX 对氧化应激状态下人视网膜色素上皮细胞的保护作用及机制的初步研究 [D]. 北京: 北京协和医学院中国医学科学院, 2015.
- [14] CHEN J J, HUANG C C, CHANG H Y, et al. *Scutellaria baicalensis* ameliorates acute lung injury by suppressing inflammation in vitro and in vivo[J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45(1): 137-157.
- [15] 彭骝, 程光, 马军, 等. 丹参酮 II A 对脓毒症大鼠肺损伤的保护作用 [J]. *中国中医急症*, 2015, 24(5): 766-768.
- [16] ZHU G, XIN X, LIU Y, et al. Geraniin attenuates LPS-induced acute lung injury via inhibiting NF- κ B and activating Nrf2 signaling pathways[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(14): 22835-22841.
- [17] LEE D I, JANG S K, PARK D W, et al. Diarylheptanoid hirsutenone attenuates osteoclastogenesis by suppressing IFN γ and NF- κ B signaling in Th1 and preosteoclastic cells[J]. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40(5): 630-637.
- (王荣兵 编辑)