

血必净通过上调血红素氧合酶-1减轻 脓毒症诱导肺损伤

龚 睿 蒋 磊 康 凯 费东生 潘尚哈 杨松林 赵鸣雁

摘 要 **目的** 探讨血必净(XBJ)是否能通过上调血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)的表达,来减轻脓毒症小鼠的肺损伤(ALI)。**方法** 本实验在哈尔滨医科大学附属第一医院肝脾外科中心实验室进行。采用改良盲肠结扎穿孔法(CLP)制作脓毒症小鼠模型。48只雄性C57BL/6小鼠,随机分为假手术组(Sham组, $n=12$)、模型组(CLP组, $n=12$)、血必净组(XBJ+CLP, $n=12$)和HO-1抑制剂组(XBJ+ZnPP+CLP组, $n=12$)。血必净进行干预时,造模前2h经尾静脉注射血必净(2ml/kg),HO-1特异抑制剂锌卟啉 ZnPP(40 μ mol/kg)在给予血必净1h后经腹腔注射,其余各组给予等体积的生理盐水。术后12h后处死,光镜下观察肺组织的形态学改变,检测肺组织的湿干重比值(W/D),测定小鼠血清中的炎性介质(TNF- α 、IL-6),采用Western blot法以及免疫组化法检测肺组织HO-1的表达情况,Western blot法检测HO-1上游转录因子——核因子E₂相关因子2(Nrf-2)的表达情况。用单因素方差分析(ANOVA)进行4组间比较,再进行Turkey检验,进行两组间多重比较差异有统计学意义($P<0.05$)。**结果** 与参照组(Sham组)相比,CLP组血清中TNF- α 、IL-6水平明显增加(32.45 $\pm$ 9.62 vs 573.51 $\pm$ 105.26, 47.38 $\pm$ 11.84 vs 853.72 $\pm$ 198.56pg/ml, $P<0.05$),光镜下观察肺损伤及炎性细胞浸润程度明显加重(肺损伤评分:3.24 $\pm$ 1.38 vs 12.32 $\pm$ 3.45, $P<0.05$),肺组织W/D比值增加(4.52 $\pm$ 0.34 vs 5.98 $\pm$ 0.85, $P<0.05$),蛋白印迹法及免疫组化法检测结果显示肺组织中HO-1、Nrf-2的蛋白表达含量均轻度的增加($P<0.05$)。给予血必净(XBJ)干预后,与CLP组相比,血清中TNF- α 、IL-6释放均减少(573.51 $\pm$ 105.26 vs 327.45 $\pm$ 68.52, 853.72 $\pm$ 198.56 vs 504.72 $\pm$ 113.28pg/ml, $P<0.05$),肺组织病理损伤及炎性细胞浸润程度减轻(肺损伤评分:12.32 $\pm$ 3.45 vs 6.34 $\pm$ 1.68, $P<0.05$),肺组织W/D比值减少(5.98 $\pm$ 0.85 vs 4.75 $\pm$ 0.56, $P<0.05$),肺组织中HO-1、Nrf-2蛋白表达含量均明显增加($P<0.05$)。XBJ对于肺组织的上述保护作用被HO-1抑制剂ZnPP所逆转,HO-1抑制剂组的肺损伤程度与CLP组差异无统计学意义(肺损伤评分:12.32 $\pm$ 3.45 vs 11.45 $\pm$ 2.85, $P>0.05$;肺W/D值:5.98 $\pm$ 0.85 vs 5.73 $\pm$ 0.64, $P>0.05$)。**结论** 血必净对于脓毒症小鼠所诱发的急性肺损伤具有保护作用,其可能机制为上调HO-1通路减轻炎性反应,继而减轻肺损伤

关键词 血必净 血红素氧合酶-1 脓毒症 急性肺损伤

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.02.027

Xuebijing Attenuates Septic Lung Injury Via Heme Oxygenase-1 Up-regulation. Gong Rui, Jiang Lei, Kang Kai, et al. ICU Department, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang 150001, China

Abstract **Objective** To investigate the effects of Xuebijing (XBJ) on septic lung injury in mice and its modulation of heme oxygenase-1 (HO-1) in lung. **Methods** The experiment was carried out in the Key Hepatosplenic Surgery Laboratory of First Affiliated Hospital of Harbin Medical University. A model of sepsis in mice was made by using the modified method of Cecal ligation and puncture (CLP). 48 male C57BL/6 mice were randomly divided into four groups: Sham group ($n=12$), CLP group ($n=12$), XBJ+CLP ($n=12$) and XBJ+ZnPP+CLP group ($n=12$). XBJ (2ml/kg) was injected via tail vein 2 hours before the CLP procedures, and ZnPP IX, a inhibitor of HO-1, was intraperitoneally injected 1 hour after the XBJ injection. The mice in other groups were intraperitoneally injected with the same volume of normal saline. The mice were sacrificed 12 hours after the CLP procedures. The changes of morphology of lung tissue was observed with optical microscope, the lung injury score and wet/dry ratio (W/D) were measured. The TNF- α , IL-6 in serum were assayed by ELISA. The Western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression of HO-1 in the lung tissues. The protein expression of nuclear factor E₂ related factor 2 (Nrf-2), a HO-1 upstream transcription factor, was determined by Western blot. Comparison of continuous variables among four groups was performed using One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons. $P<0.05$ was considered as statistically significant. **Results** Compared with the sham group, the

TNF- α and IL-6 in serum were both increased (32.45 ± 9.62 vs 573.51 ± 105.26 , 47.38 ± 11.84 vs 853.72 ± 198.56 pg/ml, $P < 0.05$) by CLP, the pathological injury and pulmonary edema were both aggravated (lung injury score: 3.24 ± 1.38 vs 12.32 ± 3.45 , wet/dry weight ratio: 4.52 ± 0.34 vs 5.98 ± 0.85 , $P < 0.05$) under light microscope. The HO-1 and Nrf-2 proteins were both slightly up-regulated in lung tissue in CLP group ($P < 0.05$). After the intervention of XBJ, the TNF- α and IL-6 in serum (573.51 ± 105.26 vs 327.45 ± 68.52 , 853.72 ± 198.56 vs 504.72 ± 113.28 pg/ml, $P < 0.05$), pulmonary pathology injury (lung injury score: 12.32 ± 3.45 vs 6.34 ± 1.68 , $P < 0.05$) and lung pulmonary edema (W/D weight ratio: 5.98 ± 0.85 vs 4.75 ± 0.56 , $P < 0.05$) were all reduced, the HO-1 and Nrf-2 proteins were both significantly increased ($P < 0.05$). However, the protective role of XBJ on the lung injury induced by sepsis was partly reversed by ZnPP. No significant difference was detected between the XBJ + CLP + ZnPP and CLP group (LIS: 12.32 ± 3.45 vs 11.45 ± 2.85 , $P > 0.05$; W/D weight ratio: 5.98 ± 0.85 vs 5.73 ± 0.64 , $P > 0.05$). **Conclusion** XBJ has a protective effect on septic lung injury, reducing lung inflammation and alleviating lung injury, which may be related to heme oxygenase-1 up-regulation.

Key words Xuebijing; Heme oxygenase-1; Sepsis; Acute lung injury

脓毒症/全身性感染 (sepsis) 是宿主对感染的反应失调产生危及生命的器官功能障碍, 是创伤、休克、感染、胰腺炎等临床急危重患者的严重并发症之一^[1]。当脓毒症诱发器官功能障碍时, 肺脏是最易受累的靶器官, 临床表现为急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征 (ALI/ARDS)。脓毒症 ALI 的发病机制极为复杂, 近年来的研究证实, 炎症瀑布反应在脓毒症诱发急性肺损伤时具有重要作用, 因此能否短时间内控制炎症反应成为其治疗的关键^[2]。HO-1 是一种热休克蛋白, 是血红素分解的限速酶, 其代谢产物包括一氧化碳 (CO)、Fe²⁺ 和胆绿素。HO-1 及其产物具有抗炎、抗氧化、抗凋亡的作用, 被视为是机体防御反应的重要组成部分^[3]。已有文献证实, 上调肺脏 HO-1 对脓毒症诱导的急性肺损伤具有保护作用^[4,5]。血必净作为一种中药静脉制剂, 在临床上已经被广泛用于治疗脓毒症, 其能显著降低血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的水平及提高患者存活率。在一系列脓毒症 ALI 模型中, 血必净能够明显减轻肺损伤, 但是对于其作用机制及通路的研究目前仍旧缺乏^[6,7]。故本实验中采用盲肠结扎穿孔术 (CLP) 制备脓毒症小鼠模型, 观察血必净能否通过上调 HO-1 的表达起到减轻脓毒症所诱发的肺损伤。

材料与方法

1. 试剂: 血必净注射液购于天津红日药业股份有限公司 (批号: Z20040033), HO-1 抑制剂锌卟啉 ZnPP (ZnPP-IX) (美国 Sigma 公司), 小鼠 TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒购于蓝基生物科技有限公司, Western blot 法和免疫组化法兔抗小鼠 Nrf-2 多克隆抗体、HO-1 多克隆抗体以及 β -actin 抗体均购于美国 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物酶山羊抗兔 IgG 购于北京中山金桥公司。

2. 实验动物分组及脓毒症模型的制备: (1) 动物及实验分组: 清洁级雄性 C57BL/6 小鼠, 体重 18 ~ 22g, 购自哈尔滨医科大学实验动物中心。小鼠试验前 1 周饲养于哈尔滨医科大学附属第一医院动物实验中心, 控制饲养温度在 20 ~ 25℃, 湿度 50% $\pm$ 5%。48 只雄性 C57BL/6 小鼠按数字表法随机分为假手术组 (Sham 组)、模型组 (CLP 组)、血必净组 (XBJ + CLP)、HO-1 抑制剂组 (XBJ + ZnPP + CLP 组) 4 组, 每组 12 只。血必净组 (由天津红日药业股份有限公司提供) 于术前 2h (处理时间参考周莉莉等^[8]的研究) 经尾静脉注射血必净 (2ml/kg, 剂量参考脓毒症临床治疗剂量及陈华文等^[9]的研究), 1h 以后再腹腔注射 HO-1 特异抑制剂锌卟啉 ZnPP (40 μ mol/kg, 剂量参考曹天辉等^[10]的研究), Sham 组与 CLP 组于上述时间点给予等体积的生理盐水。小鼠试验处死标准符合哈尔滨医科大学动物伦理学标准。(2) 脓毒症模型的制备: 按照 Rittirsch 等^[11]报告的方法行盲肠结扎穿刺 (CLP), 复制严重腹腔感染致脓毒症模型。术前禁食 12h, 自由饮水。戊巴比妥 (50mg/kg) 腹腔注射麻醉, 于腹正中线做长约 1cm 切口, 打开腹膜、分离盲肠, 用 3-0 丝线在距盲肠根部 1/3 处结扎, 分别于盲肠近段和末端各穿 1 孔, 挤出少许粪便于腹腔内, 将盲肠还纳腹腔, 逐层缝合腹壁切口。术后立即给予小鼠背部皮下注射生理盐水 1ml 以补充术中液体流失。Sham 组仅做开腹, 分离盲肠远端, 但不结扎、不穿孔, 直接关腹。术后各组小鼠分笼饲养, 自由饮水和进食。

3. 检测指标及方法: (1) ELISA 法检测小鼠血清中炎症介质水平: 造模 12h 后将动物麻醉, 经腹主动脉无菌采血收集小鼠血液 1ml, 离心机 3000r/min, 10min 离心后取上清于 -80℃ 冰箱保存。炎症介质

水平($\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-6$)检测具体操作按照 ELISA 试剂盒说明书进行。(2)肺组织的湿干重比值(W/D):取左肺上叶,用滤纸吸取表面水分和血液,电子天平称湿重(W)。放于 60°C 烘箱内烘干 48h 后称干重(D),计算 W/D 比。(3)HE 染色观察肺部病理损伤情况:右下肺组织于 10% 多聚甲醛固定后,石蜡包埋,切为 $3\mu\text{m}$ 的切片行 HE 染色。光镜下观察肺泡内、肺间质水肿情况,炎性细胞浸润程度,肺脏血管内出血与肺泡透明膜形成情况,进行肺损伤评分,评分标准按:0 分为无损伤、1 分为轻度损伤($<25\%$)、2 分为中度损伤($25\% \sim 50\%$)、3 分为重度损伤($50\% \sim 75\%$)、4 分为极重度损伤($>75\%$)。(4)Western blot 法检测 HO-1 及 Nrf-2 在肺脏的蛋白表达情况:左肺下叶用于肺脏组织匀浆制备,提取并纯化蛋白。用 BCA 法进行蛋白定量,各取 $40\mu\text{g}$ 蛋白行十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳,80V、2.5h 电泳后,转入 PVDF 膜,用 5% 的脱脂奶粉(PBST 稀释, $\text{pH}7.14$) 4°C 封闭 1h 后分别滴加 HO-1、Nrf-2(抗体浓度 1:500)一抗过夜,次日应用辣根过氧化物酶标记的二抗(二抗抗体浓度 1:2000)孵育后显影,曝光后经图像分析系统分析蛋白条带。(5)免疫组化法检测肺脏 HO-1 表达的情况:右上肺组织经 10% 多聚甲醛固定后,石蜡包埋,切为 $3\mu\text{m}$ 的切片后脱蜡,枸橼酸钠溶液抗原修复,过氧化氢封闭抗原 10min, PBS 冲洗 3 次后,兔抗小鼠 HO-1 抗体(1:200 稀释) 4°C 孵育过夜,次日滴加羊抗兔二抗,孵育 1h 后, DAB 法显色,苏木素复染,显微镜下观察肺脏 HO-1 表达情况,肺泡内皮细胞、上皮细胞胞质中染色为棕黄色具有阳性意义。

4. 统计学方法:使用 GraphPad Prism 6.0 进行统计学处理,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示统计数据,先用单因素方差分析(ANOVA)进行 4 组间比较的统计分析,再进行 Turkey 检验,进行两组间多重比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 血必净(XBJ)对脓毒症小鼠血清炎性介质的抑制作用:各组小鼠血清中炎性介质($\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-6$)的表达情况(表 1),与假手术组(Sham 组)相比,模型组(CLP 组)血清中 $\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-6$ 的水平均明显升高($P < 0.05$);与 CLP 组相比,给予血必净(XBJ)干预后血清中炎性介质($\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-6$)水平均明显下降($P < 0.05$),血清中促炎因子释放被抑制,而 XBJ + ZnPP 联合用药则对促炎因子释放的抑

制作用减弱($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠血清中 $\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-6$ 的表达情况
(pg/ml , $\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	$\text{TNF}-\alpha$	$\text{IL}-6$
Sham 组	32.45 ± 9.62	47.38 ± 11.84
CLP 组	$573.51 \pm 105.26^*$	$853.72 \pm 198.56^*$
XBJ + CLP 组	$327.45 \pm 68.52^{\#}$	$504.72 \pm 113.28^{\#}$
XBJ + ZnPP + CLP 组	$532.71 \pm 120.57^*$	$795.86 \pm 143.27^*$
<i>F</i>	96.61	89.38
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01

与 Sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 CLP 组比较, $^{\#}P < 0.05$

2. 血必净(XBJ)对于脓毒症小鼠肺脏病理损伤的保护作用:应用 HE 染色计算肺脏损伤评分,并测量肺组织干湿比重,对各组小鼠肺脏损伤情况进行评估(肺脏损伤评分及肺组织干湿重比见表 2,肺脏病理图片见图 1)。假手术组(Sham 组)小鼠肺泡结构清晰、无透明膜形成,肺泡以及肺间质无水肿,无明显炎性细胞浸润。CLP 模型组肺损伤最严重,肺泡、肺间质水肿明显,肺泡透明膜形成,肺组织炎性细胞浸润明显增加,部分肺脏血管有血栓形成。与 CLP 组相比,给予血必净(XBJ)干预后,肺泡组织结构清晰,肺组织病理损伤程度减轻($P < 0.05$),肺泡、肺间质水肿程度减轻($P < 0.05$),炎性细胞浸润减轻。而 XBJ + ZnPP 联合给药,肺组织损伤情况与 CLP 组相比无明显改善($P > 0.05$)。

表 2 各组小鼠肺损伤病理评分及肺湿干重比值($\bar{x} \pm s$)

组别	肺损伤评分	肺组织湿干质量比
Sham 组	3.24 ± 1.38	4.52 ± 0.34
CLP 组	$12.32 \pm 3.45^*$	$5.98 \pm 0.85^*$
XBJ + CLP 组	$6.34 \pm 1.68^{\#}$	$4.75 \pm 0.56^{\#}$
XBJ + ZnPP + CLP 组	$11.45 \pm 2.85^*$	$5.73 \pm 0.64^*$
<i>F</i>	35.89	15.84
<i>P</i>	< 0.01	< 0.01

与 Sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 CLP 组比较, $^{\#}P < 0.05$

3. HO-1 及 Nrf-2 蛋白在小鼠肺脏组织的表达情况:Sham 组小鼠肺脏组织 HO-1 及 Nrf-2 表达很低,CLP 组小鼠肺脏 HO-1 及 Nrf-2 表达轻微增加($P < 0.05$);与 CLP 组相比,给予 XBJ 干预后,HO-1 及 Nrf-2 蛋白含量表达明显增加($P < 0.05$);与 XBJ 组相比,XBJ + ZnPP 联合给药后 HO-1 及 Nrf-2 蛋白的表达有所减少($P < 0.05$,图 2)。

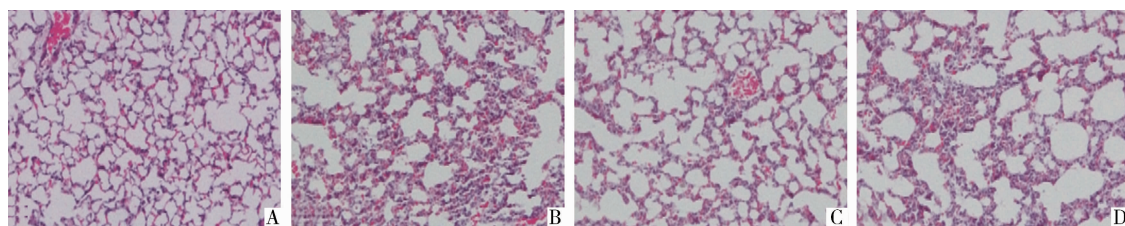


图 1 肺组织病理学改变情况 (HE, ×100)

A. Sham 组; B. CLP 组; C. XBJ + CLP 组; D. XBJ + ZnPP + CLP 组

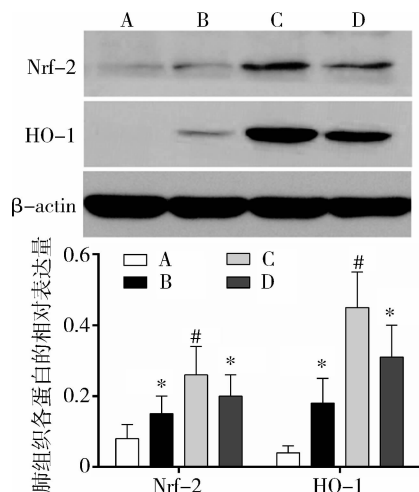


图 2 HO-1 在小鼠肺组织中表达情况

与 Sham 组比较, * $P < 0.05$; 与 CLP 组比较, # $P < 0.05$

4. 应用免疫组化法检测肺脏组织中 HO-1 的表达情况: 肺泡上皮细胞和毛细血管内皮细胞胞质棕黄色染色为阳性结果。Sham 组小鼠肺脏组织几乎没有 HO-1 表达, CLP 组小鼠肺脏 HO-1 表达稍有增加; 与 CLP 组相比, XBJ + CLP 组小鼠肺脏 HO-1 表达明显增加; 而 XBJ + ZnPP + CLP 组与 XBJ + CLP 组肺脏组织 HO-1 表达情况差别无统计学意义 (图 3)。

讨 论

尽管这些年来重症医学取得较大的进步, 但 ICU 内急性肺损伤 (ALI) 和急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 患者的病死率依然很高。ALI 以中性粒细胞肺间质和肺泡腔浸润、各种炎性介质释放为特征, 继而炎症侵袭导致肺泡屏障功能损失、肺泡上皮和内皮通透性增加、肺泡液体清除受损和透明膜形成^[12]。多种因

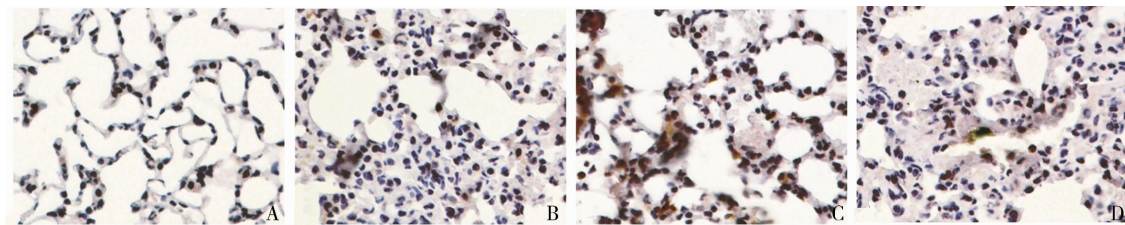


图 3 免疫组化法观察肺脏组织 HO-1 的表达情况 (IHC, ×200)

A. Sham 组; B. CLP 组; C. XBJ + CLP 组; D. XBJ + ZnPP + CLP 组

素包括肺炎、创伤、药物、机械通气等均可导致 ALI/ARDS, 而脓毒症不仅是 ALI 形成的一个重要因素, 而且也是危重患者死亡的一个主要原因。脓毒症是由感染引起的生理性、病理性和生物化学性异常综合征。脓毒症的主要特点是全身性的过度炎症反应, 在脓毒症早期, 内毒素与 Toll 样受体 4 (TLR4) 结合, 引起促炎因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的释放, 由 TNF- α 进一步促进 IL-1、IL-18 等炎症因子的大量释放, TNF- α 也被证实为促炎因子释放的始动因子^[13]。而在脓毒症晚期, 促炎因子主要以 IL-6 释放为主, 血清中 IL-6 水平的高低可作为脓毒症严重

程度的检测指标^[14]。在机体内适当的促炎因子有利于触发机体固有免疫, 进而起到限制局部组织损伤和感染的作用。然而当受损脏器中促炎因子过度 and 持续性表达时, 则会导致毛细血管渗漏、组织损伤和多器官衰竭^[15]。研究表明, 降低血清中 TNF- α 和 IL-6 的产生可以起到肺保护和降低脓毒症小鼠的死亡率^[16,17]。

HO-1 作为一种应激蛋白, 可在多种应激因素下诱导表达, 是机体主要的保护性酶。脓毒症时, HO-1 具有抗炎、抗氧化和抗凋亡效应, 进而防止肺损伤。在脂多糖 (LPS) 输注前, 给予 HO-1 诱导剂

(血红素)预处理能产生显著的抗炎反应,小鼠血清中促炎因子(如 $\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-6$)减少,以及抗炎介质(如 $\text{IL}-10$)表达增加,其中下调 $\text{TNF}-\alpha$ 和上调 $\text{IL}-10$ 能减轻肺损伤^[18]。HMGB1 是一种核蛋白,是脓毒症的一种关键致命性介质。在脓毒症时,HO-1 基因缺陷小鼠与野生株小鼠相比,死亡率明显升高,肺部炎症加重,炎性细胞中 HMGB1 表达和释放均明显增加。在相应的在体外实验中,用 HO-1 诱导剂(如血红素)或转染 HO-1 预处理 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞可显著抑制 HMGB1 的释放及 HMGB1 从核到细胞质的易位,以及促炎细胞因子的释放,如 $\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-1\beta$ 和 $\text{IFN}-\beta$ ^[19]。本课题组也先后证实了 HO-1 的诱导在脓毒症模型能减少血浆中炎性介质 $\text{TNF}-\alpha$ 和 $\text{IL}-6$ 、血栓调节蛋白(TM)和内皮细胞蛋白 C 受体(EPCR),增加了血浆中 PC 和活化 PC(APC)的水平,增强了蛋白 C(PC)、TM 和 EPCR 在肺脏组织的表达,改善了凝血指标,减少了肺脏器内血栓形成,继而起到了保护肺脏的功能^[20,21]。不仅如此,笔者还发现 HO-1 的诱导能够减少 $\text{IL}-1\beta$ 和 $\text{IL}-18$ 在循环和肺组织中的释放,抑制 NLRP3 炎性体各组分在肺组织中的表达,抑制了 NLRP3 炎性体的活性,证实了 HO-1 能够通过抑制 NLRP3 炎性体的活性,保护脓毒症诱导的急性肺损伤^[4]。同时还发现青蒿琥酯保护脓毒症诱导的肺损伤跟 HO-1 的诱导有关^[10]。

血必净注射液主要由红花、赤芍、川芎、丹参、当归等中药提炼而成^[22]。已有研究证实,血必净中的丹参可改善微循环、具有较强的抗氧自由基功效;川芎可清除氧自由基,增加超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性、抑制中性粒细胞黏附集聚、活化;赤芍所含的赤芍总苷能限制缺氧、NO 和氧自由基对组织的损伤;当归和红花具有较强的清除活性氧自由基能力^[23,24]。血必净还具有拮抗内毒素诱导单核-吞噬细胞产生内源性炎性介质,抑制血小板聚集等作用。Liu 等^[7]研究发现血必净对脓毒症小鼠 ALI 有保护作用,主要是通过抑制 TLR4 及 MAPK 通路有关,而阻断 TLR-4 通路能起到肺保护作用。此外,血必净对内毒素损伤的内皮细胞有保护作用,可降低血浆中的肝细胞生长因子(HGF)、纤维母细胞生长因子-7 的异常升高,减轻肺脏的炎性反应,发挥肺组织的保护作用。最近研究显示,血必净对于脓毒症小鼠的肺保护作用,还与促进 cAMP/PKA 通路,抑制 NF- κ B 和 p38 MAPK 通路相关。本研究发现,血必

净可以上调 HO-1 的表达,至少可以部分说明,血必净对于脓毒症 ALI 的保护作用与上调体内 HO-1 的表达有关。

笔者先前的研究显示小鼠 CLP 术后 12h 血清中促炎因子明显升高,肺损伤较重^[4,5]。本研究应用经典的 CLP 法成功复制了脓毒症所诱发的 ALI 模型,通过检测血清中促炎因子浓度,以及通过对肺组织病理改变等方面了解血必净对 ALI 可能的作用。结果发现血必净干预组血清中促炎因子($\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-6$)较对照组明显降低,差异有统计学意义,肺组织 HE 染色、病理损伤评分及肺 W/D 比也有明显改变,证实了血必净对于脓毒症 ALI 具有保护作用。为探究血必净的抗炎通路,笔者检测小鼠肺组织 HO-1 以及 Nrf-2 的表达情况,因为 Nrf-2 作为 HO-1 转录的上游因子,能上调其表达,在细胞氧化应激中起到关键作用^[25]。Reddy 等^[26]研究表明,敲除小鼠肺泡上皮细胞 Nrf-2 基因,可加速小鼠 ALI 的进展,另外,阻断 Nrf-2 通路可以切断 HO-1 对脓毒症时脏器保护作用,这至少可以说明 HO-1 表达的一部分是依赖 Nrf-2 通路的。笔者发现血必净干预后,小鼠肺组织中 HO-1 以及 Nrf-2 的表达水平均明显增加。ZnPP 作为 HO-1 的竞争性拮抗剂,可逆转血必净的上述作用。因此,血必净可能增强 HO-1 及上游转录因子 Nrf-2 的表达,继而起到抗炎作用,减轻肺损伤。

本研究也存在以下不足:①为了提前充分诱导 HO-1,本次实验采用血必净预先给药的方式,尽管这与临床治疗有所不同,不过也有研究报道称预处理和治疗均能起到相似效果,并且预处理的效果更好^[24];②没有使用 Nrf-2 和 HO-1 基因敲除小鼠,就不能排除血必净和 ZnPP 药物其他效应在其中的作用,HO-1 敲除是否能完全逆转血必净的作用仍然需要明确。

综上所述,本研究证实了血必净可以通过激活 Nrf-2 通路进而促进脓毒症小鼠体内 HO-1 表达起到抗炎作用,这也为血必净的抗炎作用提供了新的理论基础。血必净对于脓毒症 ALI 的保护作用可能涉及其他机制,这需要在今后试验中加以证实。同样,血必净上调 HO-1 对于肺血管内皮细胞和肺泡上皮的保护是否是通过 HO-1 的催化产物胆绿素和一氧化碳而起作用也需要进一步的研究。

参考文献

- 1 Shankar - Hari M, Phillips GS, Levy ML, et al. Developing a new

- definition and assessing new clinical criteria for septic shock[J]. JAMA, 2016, 315(8): 775 – 787
 - 2 马岳峰, 徐正宽, 刘志海. 脓毒症抗炎治疗的研究进展[J]. 中华急诊医学杂志, 2010, 19(2): 120 – 123
 - 3 Constantin M, Choi AJ, Cloonan SM, *et al.* Therapeutic potential of heme oxygenase – 1/carbon monoxide in lung disease[J]. Int J Hypertens, 2012, 2012: 859235
 - 4 Luo YP, Jiang L, Kang K, *et al.* Hemin inhibits NLRP3 inflammatory activation in sepsis – induced acute lung injury, involving heme oxygenase – 1[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 20(1): 24 – 32
 - 5 Cao TH, Jin SG, Fei DS, *et al.* Artesunate protects against sepsis – induced lung injury via heme oxygenase – 1 modulation[J]. Inflammation, 2016, 39(2): 651 – 662
 - 6 Wang Q, Wu X, Tong X, *et al.* Xuebijing ameliorates sepsis – induced lung injury by downregulating HMGB1 and RAGE expressions in mice[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 860259
 - 7 Liu MW, Wang YH, Qian CY, *et al.* Xuebijing exerts protective effects on lung permeability leakage and lung injury by upregulating Toll – interacting protein expression in rats with sepsis[J]. Int J Mol Med, 2014, 34(6): 1492 – 1504
 - 8 周莉莉, 常瑞明, 蒋龙元, 等. 血必净对脓毒症大鼠回肠黏膜形态学的影响[J]. 中华急诊医学杂志, 2009, 18(7): 707 – 710
 - 9 陈华文, 李树生, 祝伟. 血必净注射液对脓毒症大鼠肺损伤的保护作用[J]. 内科急危重症杂志, 2011, 17(2): 91 – 92
 - 10 曹天辉, 蒋磊, 康凯, 等. 青蒿琥酯上调血红素氧合酶 – 1 对脓毒症小鼠急性肺损伤的作用研究[J]. 中华急诊医学杂志, 2015, 24(11): 1227 – 1233
 - 11 Rittirsch D, Huber – Lang MS, Flierl MA, *et al.* Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture[J]. Nat Protoc, 2009, 4(1): 31 – 36
 - 12 Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome[J]. J Clin Invest, 2012, 122(8): 2731 – 2740
 - 13 Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis[J]. Nature, 2002, 420(6917): 885 – 891
 - 14 Remick DG, Bolgos G, Copeland S, *et al.* Role of interleukin – 6 in mortality from and physiologic response to sepsis[J]. Infect Immun, 2005, 73(5): 2751 – 2757
 - 15 Rossaint J, Zarbock A. Pathogenesis of multiple organ failure in sepsis[J]. Crit Rev Immunol, 2015, 35(4): 277 – 291
 - 16 Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, *et al.* Anti – cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia[J]. Nature, 1987, 330(6149): 662 – 664
 - 17 Riedemann NC, Neff TA, Guo RF, *et al.* Protective effects of IL – 6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression[J]. J Immunol, 2003, 170(1): 503 – 507
 - 18 Tamion F, Richard V, Renet S, *et al.* Protective effects of heme – oxygenase expression against endotoxic shock: inhibition of tumor necrosis factor – alpha and augmentation of interleukin – 10[J]. J Trauma, 2006, 61(5): 1078 – 1084
 - 19 Tamion F, Richard V, Renet S, *et al.* Protective effects of heme – oxygenase expression against endotoxic shock: inhibition of tumor necrosis factor – alpha and augmentation of interleukin – 10[J]. J Trauma, 2006, 61(5): 1078 – 1084
 - 20 Fei D, Meng X, Zhao M, *et al.* Enhanced induction of heme oxygenase – 1 suppresses thrombus formation and affects the protein C system in sepsis[J]. Transl Res, 2012, 159(2): 99 – 109
 - 21 Fei D, Meng X, Kang K, *et al.* Heme oxygenase – 1 modulates thrombomodulin and activated protein C levels to attenuate lung injury in cecal ligation and puncture – induced acute lung injury mice[J]. Exp Lung Res, 2012, 38(4): 173 – 182
 - 22 Deng J, Huo D, Wu Q, *et al.* Xuebijing for paraquat poisoning[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2013, 7: CD010109
 - 23 周长福, 李志军, 刘红栓. 血必净联合前列腺素 E₁ 对肺纤维化大鼠转化生长因子 – β 1 的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(3): 186
 - 24 李志军, 刘红栓, 王今达. 血必净联合前列腺素 E₁ 防治急性肺纤维化的实验研究[J]. 中华急诊医学杂志, 2007, 16(3): 255 – 259
 - 25 周圆圆, 张泓. Nrf2 – ARE 信号通路在神经系统疾病中的作用[J]. 中华急诊医学杂志, 2012, 21(4): 444 – 446
 - 26 Reddy NM, Potteti HR, Mariani TJ, *et al.* Conditional deletion of Nrf2 in airway epithelium exacerbates acute lung injury and impairs the resolution of inflammation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 45(6): 1161 – 1168 (收稿日期: 2016 – 06 – 17)
(修回日期: 2016 – 07 – 02)
-
- (上接第 89 页)
- 13 宋书宁, 张福奎, 乌力吉, 等. 原发性胆汁性肝硬化患者的血脂观察[J]. 北京医学杂志, 2006, 28(11): 700
 - 14 Longo M, Crosignani A, Battezzati PM, *et al.* Hyperlipidaemic state and cardiovascular risk in primary biliary cirrhosis[J]. Gut, 2002, 51(2): 265 – 269
 - 15 Solaymani – Dodaran M, Aithal GP, Card T, *et al.* Risk of cardiovascular and cerebrovascular events in primary biliary cirrhosis: a population – based cohort study[J]. Am J Gastroenterol, 2008, 103(11): 2784 – 2788
 - 16 Doycheva I, Chen C, Pan JJ, *et al.* Asymptomatic primary biliary cirrhosis is not associated with increased frequency of cardiovascular disease[J]. World J Hepatol, 2011, 3(4): 93 – 98
 - 17 Wang C, Zhao P, Liu W. Risk of incident coronary artery disease in patients with primary biliary cirrhosis[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(9): 2921 – 2924
 - 18 Ghonaim M, Al – Ghamdi A, El – Bana H, *et al.* Autoantibodies in chronic liver disease[J]. Egypt J Immunol, 2005, 12: 101 – 111
 - 19 黄毅, 马晓宁, 伍严安, 等. 原发性胆汁性肝硬化患者抗核抗体荧光核型的表现及意义[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(2): 153
 - 20 Sener AG. Autoantibodies in autoimmune liver diseases[J]. APMIS, 2015, 123(11): 915 – 919 (收稿日期: 2016 – 06 – 15)
(修回日期: 2016 – 06 – 27)