

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.06.003
文章编号: 1005-8982(2020)06-0014-04

丙酮酸乙酯对脓毒症急性肺损伤大鼠的作用及其机制研究

谢娜, 吕兴华, 于澄, 高翠敏, 马玉清

(兰州大学第一医院, 麻醉科 甘肃 兰州 730000)

摘要: 目的 探讨丙酮酸乙酯(EP)对脓毒症急性肺损伤(ALI)大鼠的作用及其可能的作用机制。**方法** 选取健康成年雄性SD大鼠40只,采用随机数字表法分为对照组、假手术组、ALI组和EP组,每组10只。ALI组和EP组采用盲肠结扎穿孔法复制大鼠脓毒症模型,假手术组仅翻动盲肠,不做结扎穿孔。EP组术后腹腔注射EP溶液(40 mg/kg,间隔6 h),对照组、假手术组和ALI组腹腔注射等量乳酸林格液(间隔6 h)。模型复制24 h后心脏采血处死大鼠。酶联免疫吸附试验检测肺组织匀浆中高迁移率族蛋白B1(HMGB1)、Toll样受体4(TLR4)及核因子 κ B(NF- κ B)的表达;计算肺组织湿干重比;HE染色后光镜下观察肺组织病理结构变化。**结果** ALI组、EP组HMGB1、TLR4及NF- κ B水平高于假手术组($P < 0.05$),且EP组低于脓毒症ALI组($P < 0.05$);对照组与假手术组HMGB1、TLR4及NF- κ B水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。ALI组、EP组肺组织湿干重比高于假手术组($P < 0.05$),且EP组低于ALI组($P < 0.05$);对照组与假手术组肺组织湿干重比比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。对照组和假手术组肺组织结构完整,肺泡间隔无水肿、炎症;ALI组肺泡结构破坏严重,肺泡间隔增宽,肺间质明显渗出、出血和大量炎症细胞浸润;EP组肺泡结构较完整,与ALI组相比,肺间质渗出、出血及炎症细胞浸润症状明显减轻。**结论** EP可能通过抑制HMGB1/TLR4/NF- κ B信号通路,减轻肺组织炎症反应,改善肺损伤程度从而对脓毒症ALI发挥保护作用。

关键词: 脓毒症;急性肺损伤;高迁移率族蛋白B1/高迁移率族蛋白质类

中图分类号: R631

文献标识码: A

Effect of ethyl pyruvate on acute lung injury induced by sepsis

Na Xie, Xing-hua Lü, Cheng Yu, Cui-min Gao, Yu-qing Ma

(Department of Anesthesiology, the First Hospital of Lanzhou University,
Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: Objective To explore the protective effect of ethyl pyruvate on acute lung injury induced by sepsis and its possible mechanism. **Methods** Forty healthy adult male Sprague-Dawley rats were randomized into 4 groups ($n = 10$ each) using a random number table: normal control group (Normal group), sham operation group (Sham group), sepsis lung injury group (ALI group) and ethyl pyruvate intervention group (EP group). A rat model of sepsis was prepared by cecal ligation and puncture. In Sham group, the cecum was only flipped but not ligated and punctured. In EP group, ethyl pyruvate solution (40 mg/kg, every 6 h) was injected intraperitoneally after operation. In Normal, Sham and ALI groups were injected intraperitoneally with the same volume of lactated Ringer's solution (every 6 h). The rats were killed 24 hours after model establishment. The expression levels of HMGB1, TLR4 and NF- κ B in lung homogenate were detected by ELISA. The wet and dry lung weight ratio (W/D) of lung tissue was calculated, and after hematoxylin-eosin staining, pulmonary pathological changes were observed by light microscope. **Results** The expressions of HMGB1, TLR4, NF- κ B in the lung tissue homogenate and lung

收稿日期: 2019-09-19

[通信作者] 马玉清, E-mail: myq2392466@163.com; Tel: 15214033252

tissue W/D were significantly different among groups ($P < 0.05$); compared with sham group, the expressions of HMGB1, TLR4, NF- κ B and lung tissue W/D in ALI group were increased ($P < 0.05$); compared with sham group, the expressions of HMGB1, TLR4, NF- κ B and lung tissue W/D in EP group were increased ($P < 0.05$); compared with ALI group, the expressions of HMGB1, TLR4, NF- κ B and lung tissue W/D in EP group were decreased ($P < 0.05$). There were no significant difference in each detection index between normal and sham groups ($P > 0.05$). Under light microscope, the structure of lung tissue was intact in normal and sham groups, there was no edema and inflammation in alveolar septum; in ALI group, the alveolar structure was severely damaged, the alveolar septum was widened, and exudation, hemorrhage and massive inflammatory cell infiltration could be observed in the pulmonary interstitial; compared with ALI group, the alveolar structure of EP group was relatively intact, the alveolar exudation, hemorrhage and inflammatory cell infiltration were significantly alleviated. **Conclusions** Ethyl pyruvate may reduce the inflammatory response and improve the degree of lung injury by inhibiting the activation of HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway, thereby providing significant protection against acute lung injury induced by sepsis.

Keywords: sepsis; acute lung injury; HMGB1 protein

脓毒症是重症医学科常见的危重症之一,严重脓毒症患者常并发多器官损伤。肺脏往往是脓毒症时最易受损的靶器官,在病程早期便可出现急性肺损伤(acute lung injury, ALI),引起呼吸系统功能障碍,这是导致脓症患者死亡的首要病因^[1-2]。近年来研究发现,高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1) 是一种高度保守的核蛋白,其作为晚期炎症因子在脓毒症中发挥重要作用^[3]。丙酮酸乙酯(ethyl pyruvate, EP)是一种有效的 HMGB1 抑制剂,具有抗炎和免疫调节效应^[4]。有研究表明,EP 能降低致死性脓毒症大鼠的病死率且有效改善急性胰腺炎、病毒性心肌炎等疾病的临床症状,具有一定的器官保护作用^[5-6]。但 EP 对脓毒症 ALI 是否有保护作用及其可能机制尚未明确。本实验采用盲肠结扎穿孔法复制大鼠脓毒症模型,探讨 EP 对脓毒症 ALI 的保护作用,并分析其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

清洁级健康成年雄性 SD 大鼠 40 只,6 ~ 8 周龄,体重 200 ~ 240 g,由兰州大学医学院动物实验中心提供。EP(美国 Sigma 公司,批号:E47808),高效 RIPA 裂解液(北京索莱宝生物科技有限公司,货号:R0010),HMGB1、Toll 样受体 4 (TLR4)、核转录因子 κ B (NF- κ B)、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司)。

1.2 模型的复制

将 40 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为对照组、假手术组、ALI 组和 EP 组,每组 10 只。ALI 组和 EP

组采用盲肠结扎穿孔法复制脓毒症模型^[7]:大鼠称重后,腹腔注射 10% 水合氯醛(0.3 ml/100 g)麻醉后固定,沿腹正中线做 1.5 cm 长切口暴露盲肠,在回盲瓣与盲肠末端的正中间结扎,用 18 G 针头在盲肠结扎端对穿 2 次,形成盲肠漏,再将盲肠还纳回腹腔,逐层缝合腹壁切口。假手术组仅翻动盲肠,不做结扎穿孔。EP 组在术后 6、12 及 18 h 腹腔注射 40 mg/kg EP,对照组、假手术组和 ALI 组在以上相同时间点腹腔注射等量乳酸林格液。EP 溶液的配制方法:EP 溶解到乳酸林格液中,配置成 3.26 g/L 的溶液,4℃ 冰箱保存备用。

1.3 标本采集与观察指标

1.3.1 标本收集 模型复制 24 h 后心脏采血处死大鼠,沿胸骨正中线剪开胸骨,暴露肺脏,取出肺脏用无菌冷 PBS 漂洗表面的血液,收集肺组织标本。

1.3.2 HMGB1、TLR4 及 NF- κ B 水平 剪取适量左肺组织称重后,按 1 g 组织加入 9 ml PBS 的比例配置,再按照每 20 mg 肺组织加入 150 ~ 200 μ l RIPA 裂解液的比例配置,在冰上用匀浆器制备成 10% 肺组织匀浆,4℃、4 000 r/min 离心 20 min,吸取上清液,-80℃ 保存。ELISA 试剂盒检测肺组织匀浆中 HMGB1、TLR4 及 NF- κ B 水平。

1.3.3 肺组织湿干重比 取右上肺叶,用滤纸吸干肺组织表面的血液,用天平称出的重量为湿重;将肺组织放入 80℃ 烤箱干烤 48 h 后取出,称出的重量为干重,计算肺组织湿干重比。

1.3.4 肺组织病理结构观察 取右中肺叶,置于 10% 甲醛中固定,常规石蜡包埋、切片和 HE 染色,光镜下观察肺组织病理结构变化。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 进一步的两两比较用 SNK- q 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 HMGB1、TLR4 及 NF- κ B 水平比较

各组大鼠 HMGB1、TLR4 及 NF- κ B 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。ALI 组、EP 组较假手术组高 ($P < 0.05$), EP 组较 ALI 组低 ($P < 0.05$); 对照组与假手术组 HMGB1、TLR4 及 NF- κ B 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠肺组织湿干重比

对照组、假手术组、ALI 组及 EP 组大鼠肺组织湿干重比分别为 (4.67 ± 0.15)、(4.79 ± 0.13)、(5.40 ± 0.16) 和 (5.08 ± 0.08), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 32.269, P = 0.000$)。ALI 组、EP 组较

表 1 各组大鼠 HMGB1、TLR4 及 NF- κ B 水平比较

($n = 10, \text{ng/ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	HMGB1	TLR4	NF- κ B
对照组	66.96 ± 3.75	13.87 ± 1.44	0.89 ± 0.07
假手术组	70.30 ± 4.29	14.96 ± 1.39	0.92 ± 0.08
ALI 组	118.33 ± 5.58 ^①	50.20 ± 2.64 ^①	1.49 ± 0.13 ^①
EP 组	96.41 ± 4.14 ^{①②}	25.56 ± 2.72 ^{①②}	1.30 ± 0.05 ^{①②}
F 值	313.048	680.933	140.251
P 值	0.000	0.000	0.000

注: ①与假手术组比较, $P < 0.05$; ②与 ALI 组比较, $P < 0.05$ 。

假手术组高 ($P < 0.05$), EP 组较 ALI 组低 ($P < 0.05$); 对照组与假手术组肺组织湿干重比比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 大鼠肺组织病理结构变化

对照组和假手术组肺组织结构完整, 肺泡间隔无水肿、炎症; ALI 组肺泡结构破坏严重, 肺泡间隔增宽, 肺间质渗出、出血和大量炎症细胞浸润; EP 组肺泡结构较完整, 与 ALI 组相比, 肺间质渗出、出血及炎症细胞浸润症状减轻。见图 1。

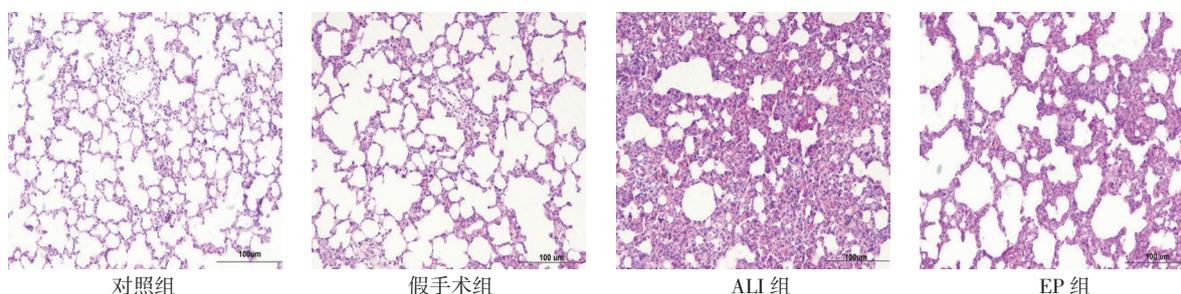


图 1 各组大鼠肺组织病理切片 (HE 染色)

3 讨论

本研究参照 RITTIRSCH 等^[7]研究方法采用盲肠结扎穿孔法复制大鼠脓毒症模型。结果表明, ALI 组大鼠 24 h 处死后, 打开腹腔有臭味和血性腹水, 腹腔内脏器粘连严重, 肠道充气扩张, 盲肠结扎段发黑, 甚至坏死; 肺组织病理学显示肺泡结构严重破坏, 肺间隔增宽, 肺间质渗出、出血和大量炎症细胞浸润, 提示大鼠脓毒症 ALI 模型复制成功。

HMGB1 被证实是导致脓毒症死亡的关键细胞因子, 其在体内的合成释放明显延迟且持续时间长, 对脓毒症发展与预后均有重要影响^[8]。TLR4 是 HMGB1 重要的胞膜受体, 在脓毒症的炎症反应激活、免疫

调节等过程中发挥重要作用^[9]。脓毒症时, 早期炎症介质和内毒素刺激单核/巨噬细胞, 以及坏死、损伤细胞会主动或被动分泌 HMGB1, 释放到细胞外的 HMGB1 与其内源性配体 TLR4 结合, 激活 MyD88 依赖性途径使 NF- κ B 活化, 诱导下游炎症介质大量释放, 使内皮细胞受损, 直接或间接损伤肺的结构和功能^[10-13]。本研究 ALI 组大鼠 HMGB1、TLR4 及 NF- κ B 水平升高, 同时肺组织病理切片显示肺泡结构严重破坏, 肺间质渗出、出血, 大量炎症细胞浸润; 肺组织肺组织湿干重比增加, 肺水肿加重。以上结果表明, 肺组织中 HMGB1、TLR4 及 NF- κ B 水平与肺组织结构的损伤、肺功能障碍相关并呈依赖性, 提示

脓毒症所致 ALI 与 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路激活密切相关。

EP 是一种稳定性高、亲脂性强的丙酮酸酯化物, 作为丙酮酸的替代物广泛应用于动物实验。不同的动物实验模型证实, EP 可以通过抑制 HMGB1/TLR4 信号通路的激活, 抑制促炎因子的释放, 从而减轻肠道炎症反应、肝损伤和心肌缺血再灌注损伤, 保护脏器功能^[14-16]。但 EP 作为一种有效的 HMGB1 抑制剂, 是否通过抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路来发挥对脓毒症 ALI 的保护作用, 目前尚未完全明确。本研究观察到, 给予 EP 进行干预后, 大鼠肺组织匀浆中 HMGB1、TLR4 及 NF- κ B 水平较 ALI 组降低, 说明 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路被抑制, 同时肺组织结构和功能障碍改善, 表明 EP 可以缓解脓毒症 ALI, 推测其作用机制可能是通过抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路, 减少炎症因子释放, 减轻肺组织炎症反应, 从而对脓毒症 ALI 产生保护作用。

综上所述, 脓毒症所致 ALI 与 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路密不可分, EP 干预后, 可减轻肺组织结构和功能损伤, 其作用机制可能是通过抑制 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路, 减少炎症因子释放, 减轻肺组织炎症反应, 从而对脓毒症 ALI 起保护作用, 可为临床治疗脓毒症 ALI 提供理论依据。

参 考 文 献:

- [1] 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.
- [2] LINDNER H A, BALABAN Ü, STURM T, et al. An algorithm for systemic inflammatory response syndrome criteria-based prediction of sepsis in a polytrauma cohort[J]. *Critical Care Medicine*, 2016, 44(12): 2199-2207.
- [3] GREGOIRE M, TADIE J M, UHEL F, et al. Frontline science: hmgb1 induces neutrophil dysfunction in experimental sepsis and in patients who survive septic shock[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2017, 101(6): 1281-1287.
- [4] JUNG S M, LEE J, BAEK S Y, et al. Ethyl pyruvate ameliorates inflammatory arthritis in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 52: 333-341.
- [5] YAO L, CHENG C, YANG X, et al. Ethyl pyruvate and analogs as potential treatments for acute pancreatitis: a review of in vitro and in vivo studies[J]. *Pancreatology*, 2019, 19(2): 209-216.
- [6] YU Y, YU Y, LIU M, et al. Ethyl pyruvate attenuated coxsackievirus B3-induced acute viral myocarditis by suppression of HMGB1/RAGE/NF- κ B pathway[J]. *Springerplus*, 2016, 5: 215.
- [7] RITTIRSCH D, HUBER-LANG M S, FLIERL M A, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture[J]. *Nature Protocol*, 2009, 4(1): 31-36.
- [8] WANG H, WARD M F, SAMA A E, Targeting HMGB1 in the treatment of sepsis[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2014, 18(3): 257-268.
- [9] CAO C, CHAI Y, SHOU S, et al. Toll-like receptor 4 deficiency increases resistance in sepsis-induced immune dysfunction[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 54: 169-176.
- [10] YIN H, HUANG L, OUYANG T, et al. Baicalein improves liver inflammation in diabetic db/db mice by regulating HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55: 55-62.
- [11] 荆祥阳, 刘运龄, 路利平, 等. MicroRNA-155 通过 MyD88 抑制泡沫细胞免疫炎症反应 [J]. *天津医药*, 2017, 45(10): 1013-1016.
- [12] QIN M Z, GU Q H, TAO J, et al. Ketamine effect on HMGB1 and TLR4 expression in rats with acute lung injury[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10): 12943-12948.
- [13] CHAWLA L S, FINK M, GOLDSTEIN S L, et al. The epithelium as a target in Sepsis[J]. *Shock*, 2016, 45(3): 249-258.
- [14] WANG F C, PEI J X, ZHU J, et al. Overexpression of HMGB1 A-box reduced lipopolysaccharide-induced intestinal inflammation via HMGB1/TLR4 signaling in vitro[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(25): 7764-7776.
- [15] ZHANG M, HU X, LI S, et al. Hepatoprotective effects of ethyl pyruvate against CCl4-induced hepatic fibrosis via inhibition of TLR4/NF- κ B signaling and upregulation of MMPs/TIMPs ratio[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2018, 42(1): 72-81.
- [16] SOH S, JUN J H, SONG J W, et al. Ethyl pyruvate attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury exacerbated by hyperglycemia via retained inhibitory effect on HMGB1[J]. *Int J Cardiol*, 2018, 252: 156-162.

(李科 编辑)

本文引用格式: 谢娜, 吕兴华, 于澄, 等. 丙酮酸乙酯对脓毒症急性肺损伤大鼠的作用及其机制研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(6): 14-17.