

· 论 著 ·

## 抑制补体对内毒素致急性肺损伤的保护作用\*

李 敏, 张 程, 张湘燕

(贵州省人民医院呼吸内科, 贵阳 550002)

**摘要:**目的 探讨抑制补体对内毒素致急性肺损伤的保护作用。方法 采用眼镜蛇毒因子(CVF)去除补体。以脂多糖(LPS)造成大鼠急性肺损伤。将 40 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 LPS 损伤组、3 个不同时间 CVF 组和生理盐水对照组。通过大鼠尾静脉注射 5 mg/kg LPS, 造成急性肺损伤模型。CVF 组于注射 LPS 前 24 h, 通过尾静脉注射 50 u/kg CVF 去除补体。在给予 LPS 后分别于 0.5、2、4 h 采集标本。分别测定各组血清补体活性和蛋白含量、肺泡灌洗液(BALF)中蛋白、TNF- $\alpha$ 、IL-8、ICAM-1 含量及多形核白细胞(PMN)比、计算肺通透指数(LPI)、测定肺湿/干质量比、检查肺组织病理学变化情况。结果 LPS 组肺间质水肿、出血, 大量炎性细胞浸润, 而 CVF 组肺组织损伤明显轻于 LPS 组; CVF 组肺湿/干质量比、LPI、PMN 比均明显低于 LPS 组( $P < 0.05$ ), 与对照组比较差异无统计学意义。而 CVF 各组 BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-8、ICAM-1 浓度均低于 LPS 组, 但差异无统计学意义。结论 补体在内毒素致急性肺损伤早期具有重要作用, 抑制补体可以有效减轻肺组织损伤, 减少肺组织液渗出和中性粒细胞聚集。

**关键词:**急性肺损伤; 补体; 脂多糖; 补体抑制; 眼镜蛇毒因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.16.003

中图分类号: R655.305

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)16-2095-03

## Protective effect of complement inhibition on acute lung injury in rats induced by lipopolysaccharide\*

LI Min, ZHANG Cheng, ZHANG Xiang-yan

(Department of Respiratory Diseases, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China)

**Abstract:** **Objective** To evaluate the protective effect of complement inhibition on acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Cobra venom factor (CVF) and LPS were used to deplete complement and injury lung, respectively. Forty male adult SD rats were randomly divided into five groups; LPS group, three CVF groups and normal saline control group. 5 mg/kg of LPS were injected into rats via tail vein to form ALI model. In CVF groups, 50 U/kg of CVF was injected into rat tail vein prior to LPS administration 24 h later. Then samples of 0.5, 2 and 4h, respectively, were collected. PMN count, TNF-, IL-8 and ICAM-1 in broncho alveolar lavage fluid (BALF), serum complement activity, protein concentration, lung permeability, and wet-to-dry weight ratio were measured. The change of pathology in lung tissue was observed by pathological section. **Results** Lung injury in rats received complement inhibition was significantly attenuated compared with that in LPS group by histopathology check. In CVF groups, wet-to-dry weight ratio, PMN count, lung alveolar permeability index were significantly decreased compared with those in LPS group. No significant difference was shown between control and CVF groups in parameters mentioned above. Although the levels of TNF- $\alpha$ , IL-8 and ICAM-1 in BALF of CVF groups were lower than that of LPS group, no significant difference was shown between them. **Conclusion** Complement plays an important role in the early process of ALI induced by LPS. Complement inhibition can attenuate lung tissue damage and inhibit neutrophil migration to the lung and bronchoalveolar vascular leakage in the early period of ALI.

**Key words:** acute lung injury; complement; lipopolysaccharide; complement inhibition; cobra venom factor

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是机体在遭受严重感染、创伤、休克等打击后出现的一种以肺泡毛细血管损伤导致肺水肿和微肺不张为病理特征的肺部炎症与通透性增加综合征,是临床常见危重症<sup>[1-2]</sup>。目前临床上还缺乏治疗 ALI 的有效手段。有研究表明,补体与 ALI 密切相关,补体激活产物 C5a 在 ALI 病程发展中具有启动、放大的重要作用<sup>[3-5]</sup>。抑制补体能有效减轻肺损伤<sup>[6]</sup>。但近年来有研究表明,在脂多糖(LPS)导致的 ALI 中补体与病程发展无关<sup>[7]</sup>。由于 LPS 是 ALI 发病的常见诱因,而国内在这一方面几乎没有研究报道。因此探讨补体与 LPS 型 ALI 的关系,对于相关科学问题的阐明、临床治疗策略的确定以及药物研发都具有重要意义。

## 1 材料与与方法

**1.1 试剂与仪器** LPS、抗绵羊红细胞抗体购自 Sigma 公司,

高纯度眼镜蛇毒因子(cobra venom factor, CVF)由贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室孙黔云研究员赠送(其制备和活性测定方法分别参见参考文献[8-9]), TNF- $\alpha$ 、IL-8、ICAM-1 检测试剂盒为美国 ADL 公司产品, BCA 蛋白定量试剂盒购自江苏碧云天生物技术研究, 绵羊红细胞购自贵阳医学院实验动物中心, Bio-Rad 550 型酶标仪购自美国 Bio-Rad 公司, 5810R 冷冻离心机购自德国 eppendorf 公司, Revco 超低温冰箱购自美国 Thermo 公司。

**1.2 实验动物与分组** 健康雄性 SD 大鼠, 体质量 180~230 g, 鼠龄 10 周, 由第三军医大学附属医院实验动物中心提供, 合格证号为 SCXK(渝)2007-0005。将大鼠随机分为生理盐水对照组(对照组,  $n=8$ )、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)损伤组(LPS 组,  $n=8$ )、CVF 干预组(CVF 组, 分为 3 个时间组,

\* 基金项目:贵州省优秀教育科技人才省长专项资金资助项目(黔省专合字 2006-65)。

表 1 各组肺湿/干质量比和 PALF 中 PMN 比、LPI 变化

组别	湿/干质量比		PMN 比(%)		LPI( $\times 10^{-3}$ )	
	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$
对照组	6	4.35 $\pm$ 0.20	6	0.42 $\pm$ 0.66	5	1.83 $\pm$ 0.25
LPS 组	8	4.68 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	5	2.60 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	5	3.22 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>
0.5 h CVF 组	5	4.38 $\pm$ 0.22	6	1.50 $\pm$ 1.05	5	2.18 $\pm$ 0.13
2 h CVF 组	6	4.58 $\pm$ 0.15	7	1.00 $\pm$ 0.58 <sup>c</sup>	6	2.49 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup>
4 h CVF 组	6	4.63 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>	5	0.80 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>	6	2.81 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>
<i>F</i>	—	4.612	—	7.73	—	10.91

<sup>a</sup>:与对照组、0.5 h CVF 组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>:与 0.5 h CVF 组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>c</sup>:与 LPS 组比较,  $P < 0.05$ 。—:表示无此项。

表 2 BALF TNF- $\alpha$ 、IL-8、ICAM-1 浓度变化(pg/mL)

组别	TNF- $\alpha$		IL-8		ICAM-1	
	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$
对照组	6	2.33 $\pm$ 2.18	5	11.68 $\pm$ 5.38	5	3.08 $\pm$ 3.11
LPS	6	14.76 $\pm$ 11.91 <sup>a</sup>	6	36.35 $\pm$ 26.17 <sup>a</sup>	6	18.12 $\pm$ 13.93 <sup>a</sup>
0.5 h CVF 组	6	11.41 $\pm$ 7.36	6	18.39 $\pm$ 3.44	6	6.96 $\pm$ 5.71
2 h CVF 组	6	9.67 $\pm$ 3.05	6	19.64 $\pm$ 4.53	7	14.74 $\pm$ 9.34
4 h CVF 组	6	6.18 $\pm$ 1.51	6	21.98 $\pm$ 6.02	6	21.96 $\pm$ 14.93
<i>H</i>	—	14.46	—	10.65	—	13.48

<sup>a</sup>:与对照组比较,  $P < 0.05$ 。—:表示无此项。

每组  $n=8$ )。大鼠经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉。对照组:尾静脉注射生理盐水, 2 h 后采集标本。LPS 组:尾静脉注射 LPS 5 mg/kg, 于 2 h 后采集标本。CVF 组:尾静脉注射 50 u/kg CVF 去除补体, 24 h 后尾静脉注射 5 mg/kg LPS, 然后分别于 0.5、2、4 h 采集标本。

**1.3 标本收集与指标测定** 大鼠麻醉后打开腹腔, 从下腔静脉抽取 5 mL 血, 室温下静置 1 h, 4 $^{\circ}$ C 放置 2 h, 然后 4 $^{\circ}$ C、2 000 r/min(离心半径 18 cm)离心 10 min, 吸取血清, 分装后置于-80 $^{\circ}$ C 保存, 用于测定补体活性和蛋白含量。打开胸腔, 切开气管, 经气管插入 12 号针头行右肺肺泡灌洗, 每次 2 mL, 共 3 次, 总回收量约为 3.6 mL。计数肺泡灌洗液(broncho alveolar lavage fluid, BALF)中 PMN 百分比。BALF 离心后, 取上清液分装, 保存于-80 $^{\circ}$ C, 用于蛋白含量、TNF- $\alpha$ 、IL-8、ICAM-1 测定。计算肺通透指数(lung alveolar permeability index, LPI), 即 BALF 蛋白/血浆蛋白。取左上肺, 称取湿重后, 置于 80 $^{\circ}$ C 烤箱中烤至恒重, 称干重, 计算湿/干重比。取左下肺, 经 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋切片, HE 染色, 进行病理学检查。

**1.4 血清补体溶血活性测定** 取-80 $^{\circ}$ C 冻存大鼠血清于室温水浴快速化冻, 以 GGVB 缓冲液 1:20 稀释, 取 100  $\mu$ L 稀释血清与 100  $\mu$ L 致敏绵羊红细胞( $5 \times 10^8$ /mL)混匀, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育, 不时轻轻振摇, 30 min 后加入 1 mL 冷生理盐水中止反应, 2 000 r/min(离心半径 18 cm)离心 10 min, 取上清液, 405 nm 测定 OD 值, 计算血清补体溶血活性。

**1.5 统计学方法** 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。采用方差分析或秩和检验(Kruskal-Wallis 法, 方差不齐时用秩和检验); 多个样本间两两比较采用 *q* 检验(Newman-Keuls 法)或秩和检验(Nemenyi 法)。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 肺组织病理学检查** 对照组:肺组织形态基本正常, 肺间

质有轻度炎性细胞浸润(插页 I 图 1A); LPS 组:肺间质水肿, 可见大量炎性细胞浸润, 弥漫性出血, 血管内有血栓形成(插页 I 图 1B、C)。CVF 组:肺组织各种渗出明显减少, 炎性细胞渗出减少, 但随着时间进程, 炎症有加重趋势(插页 I 图 1D、E、F)。

**2.2 肺湿/干质量比和 PALF 中 PMN 比、LPI 变化** LPS 组肺湿/干质量比、PALF 中 PMN 比、LPI 均明显高于对照组; 0.5 h CVF 组肺湿/干质量比、PALF 中 PMN 比、LPI 明显低于 LPS 组; 2 h CVF 组 PALF 中 PMN 比、LPI 明显低于 LPS 组; 4 h CVF 组肺湿/干质量比、PALF 中 PMN 比、LPI 明显高于 0.5 h CVF 组(表 1)。

**2.3 BALF TNF- $\alpha$ 、IL-8、ICAM-1 浓度变化** LPS 组 BALF TNF- $\alpha$ 、IL-8、ICAM-1 浓度明显高于对照组, 各 CVF 组普遍低于 LPS 组, 但差异无统计学意义(表 2)。

**2.4 血清补体溶血活性变化** 对照组补体溶血度为(0.53 $\pm$ 0.12)%( $n=5$ ), 而 LPS 组血清补体溶血度只有(0.30 $\pm$ 0.21)%( $n=8$ ), LPS 组补体明显下降。各 CVF 组大鼠体内补体被耗竭, 基本上检测不出补体溶血活性(数据未列出)。

## 3 讨 论

近年来研究发现, 在 ALI 发病早期, 补体系统首先被激活, 总补体活性明显降低, 中性粒细胞聚集活性升高, 引起多形核白细胞(PMN)在肺血管内聚集<sup>[10]</sup>。PMN 聚集是 ALI 的重要发病因素。因此抑制补体激活能改善或减轻急性肺损伤的症状。

本实验采用 CVF 去除大鼠体内补体。CVF 可激活和消耗补体替代途径成分<sup>[9]</sup>, 常被用于补体相关疾病研究动物模型中去除补体。在本实验中所采用的 CVF 剂量可使大鼠在实验期间处于完全的补体消除状态<sup>[8]</sup>。

本研究表明, 在注射 LPS 后大鼠血清补体活性显著下降, 大鼠出现较典型的 ALI 症状, 提示在 LPS 所致急性肺损伤的

发病过程中有补体的激活和消耗。而预先用 CVF 去除补体后大鼠 BALF 中蛋白和细胞渗出减少,肺水肿程度和病理改变减轻,说明抑制补体确实可减轻 LPS 所致 ALI 的症状。但 BALF TNF- $\alpha$ 、IL-8、ICAM-1 浓度没有明显降低。在本实验中可以看到,抑制补体在 ALI 早期可以明显减轻炎性细胞浸润,但随着时间进程,炎性细胞浸润程度加重,提示在 LPS 导致的 ALI 中,早期的炎性细胞浸润与补体有密切关系,而其后的炎性细胞浸润程度加重则可能与核因子- $\kappa$ B 的激活调控有关<sup>[11]</sup>。Rittirsch 等<sup>[7]</sup>2008 年曾报道在 LPS 导致的 ALI 中,补体与病程发展无关。而本实验结果则明确表明,补体参与了 LPS 所致 ALI 的早期病程发展。该文献采用气管内给予 LPS 造模,而作者采用尾静脉注射 LPS 造模。实验结论的不同很可能是这两种不同的造模途径在体内引起的 LPS 清除反应有差异所致。而静脉注射 LPS 造模无疑与临床情况更为接近。LPS 造模在本实验中还观察到对照组在注射生理盐水后肺组织有轻度的炎性细胞浸润,近年来也有文献报道了这一现象<sup>[12]</sup>。

本研究表明,在内毒素(LPS)引起的 ALI 发病早期采用抗补体治疗策略能有效减轻早期病理症状,对 ALI 的治疗具有积极的意义和价值,但对 ALI 总体病程的影响尚需系统深入的研究与评价。

#### 参考文献:

- [1] Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(18):1334.
- [2] Brower RG, Ware LB, Berthiaume Y, et al. Treatment of ARDS[J]. *Chest*, 2001, 120(4):1347.
- [3] Hammerschmidt DE, Weaver LJ, Hudson LD, et al. Association of complement activation and elevated plasma-C5a with adult respiratory distress syndrome. Pathophysiological relevance and possible prognostic value[J]. *Lancet*,

1980, 1(8175):947.

- [4] Solomkin JS, Cotta LA, Satoh PS, et al. Complement activation and clearance in acute illness and injury; evidence for C5a as a cell-directed mediator of the adult respiratory distress syndrome in man[J]. *Surgery*, 1985, 97(6):668.
- [5] Mulligan MS, Schmid E, Beck-Schimmer B, et al. Requirement and role of C5a in acute lung inflammatory injury in rats[J]. *J Clin Invest*, 1996, 98(2):503.
- [6] Proctor LM, Strachan AJ, Woodruff TM, et al. Complement inhibitors selectively attenuate injury following administration of cobra venom factor to rats[J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6(8):1224.
- [7] Rittirsch D, Flierl MA, Day DE, et al. Acute lung injury induced by lipopolysaccharide is independent of complement activation[J]. *J Immunol*, 2008, 180(11):7664.
- [8] Sun QY, Chen G, Guo H, et al. Prolonged cardiac xenograft survival in guinea pig-to-rat model by a highly active cobra venom factor[J]. *Toxicon*, 2003, 42(3):257.
- [9] Vogel CW, Muller-Eberhard HJ. Cobra venom factor; improved method for purification and biochemical characterization[J]. *J Immunol Methods*, 1984, 73(1):203.
- [10] 朱元珏, 陈文彬. 呼吸病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2003:1396.
- [11] 罗真春, 黄燕, 秦开秀, 等. 核因子- $\kappa$ B 在急性肺损伤小鼠中的动态表达[J]. *重庆医学*, 2009, 38(16):2005.
- [12] 林琴, 王广发, 汤秀英, 等. 地塞米松对内毒素致急性肺损伤大鼠肺的保护作用[J]. *北京大学学报:医学版*, 2006, 38(4):393.

(收稿日期:2010-02-04 修回日期:2010-03-22)

(上接第 2094 页)

制 HPA 轴过度反应。本实验发现,小鼠海马 NR1 蛋白表达于致伤后 2 h 开始明显降低,至 24 h 基本恢复,72 h 明显增加。而 F 组 2、24 h 明显高于 N 组,但伤后 72 h F 组明显低于 N 组。这是一个有趣的现象,当 NR1 蛋白表达降低时,应用咪唑安定-氯胺酮可以减轻这种变化;当 NR1 蛋白表达增高时,却又可以抑制这种增高,即趋向于维持一种稳态。而单独应用咪唑安定-氯胺酮却无此现象,这似乎提示咪唑安定-氯胺酮在小鼠严重 TBI 中调控应激、影响 GR 表达,其作用机制除了通过 NR、GABA 等环路作用影响 HPA 轴兴奋性、通过外周直接作用影响细胞因子释放外,是否还具有其他机制直接影响或维持海马 NR 稳态,从而控制 HPA 轴状态,尚有待进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] 李军, 史忠, 粟永萍, 等. 安定-氯胺酮对烧伤小鼠肝组织糖皮质激素受体的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2003, 25(2):144.
- [2] 屈强, 史忠, 粟永萍, 等. 清醒小鼠严重颅脑闭合性撞击伤模型的建立[J]. *四川动物*, 2005, 24(1):81.
- [3] Stockner T, Sterk H, Kaptein R, et al. Molecular dynamics studies of a molecular switch in the glucocorticoid recep-

tor[J]. *J Mol Biol*, 2003, 328(2):325.

- [4] Cho JE, Shim JK, Choi YS, et al. Effect of low-dose ketamine on inflammatory response in off-pump coronary artery bypass graft surgery[J]. *Br J Anaesth*, 2009, 102(1):23.
- [5] Kawasaki C, Kawasaki T, Ogata M, et al. Ketamine isomers suppress superantigen-induced proinflammatory cytokine production in human whole blood[J]. *Can J Anaesth*, 2001, 48(8):819.
- [6] 屈强, 史忠, 粟永萍, 等. 清醒小鼠严重颅脑闭合性撞击伤后外周血 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、皮质醇和肝脏 GR 蛋白表达的变化[J]. *中国急救医学*, 2005, 25(2):97.
- [7] Michailidou Z, Carter RN, Marshall E, et al. Glucocorticoid receptor haploinsufficiency causes hypertension and attenuates hypothalamic-pituitary-adrenal axis and blood pressure adaptations to high-fat diet[J]. *FASEB J*, 2008, 22(11):3896.
- [8] Kaufer D, Ogle WO, Pincus ZS, et al. Restructuring the neuronal stress response with anti-glucocorticoid gene delivery[J]. *Nat-Neurosci*, 2004, 7(9):947.

(收稿日期:2009-06-06 修回日期:2010-01-13)