

· 基础论著 ·

小鼠脓毒症模型外周血和肺组织原位中性粒细胞胞外诱捕网的检测

张玥 韩俊燕 李国力 贾蓓 曾辉 朱鏐雯

【摘要】目的 本研究旨在通过体内和体外实验建立在小鼠脓毒症模型中检测中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)的方法,并初步探讨其与脓毒症肺组织损伤的相关性。**方法** 采用盲肠结扎穿孔手术建立脓毒症小鼠模型,以假手术小鼠作为对照组。术后7 d,采用PicoGreen[®]染料定量检测小鼠血浆游离DNA,采用髓过氧化物酶(MPO)-DNA ELISA检测小鼠外周NETs复合物的形成,反映NETs生成量。对脓毒症小鼠的肺组织进行病理分析,反映肺组织损伤情况。采用免疫荧光染色法对肺组织原位的NETs形成情况进行鉴定。**结果** 与对照组相比,脓毒症小鼠血浆中游离DNA含量(1 650 ng/ml)显著升高($t = 21.91$, $P = 0.0021$)。MPO-DNA复合物水平(4.85倍)也显著升高($t = 15.40$, $P = 0.0042$)。脓毒症小鼠的肺组织可见明显损伤,免疫荧光检测显示脓毒症小鼠肺部的NETs形成增加。**结论** 在小鼠中建立了稳定的NETs形成情况鉴定方法,且肺部NETs形成增加是脓毒症模型小鼠肺组织损伤的原因之一。

【关键词】 脓毒症; 中性粒细胞胞外诱捕网; 游离DNA; 肺损伤

Detection of neutrophil extracellular trap in sepsis mouse model Zhang Yue, Han Junyan, Li Guoli, Jia Bei, Zeng Hui, Zhu Liuluan. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University; Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China
Corresponding author: Zhu Liuluan, Email: zhuliuluan@aliyun.com

【Abstract】Objective To detect the neutrophil extracellular traps (NETs) levels and to investigate the lung injury in sepsis mouse models and sham controls. Discuss the potential mechanisms of NETs on sepsis induced lung injury. **Methods** The cell free DNA in the serum of sepsis mouse models and sham controls were detected with PicoGreen[®] dye for quantitative detection. The NETs compound content was detected by MPO-DNA ELISA. The injury of lung was determined by HE staining. The NETs formation in the lung of sepsis mouse models and sham controls were detected by immunofluorescence method. **Results** Compare with the sham control, the content of cell free DNA in the serum of sepsis mouse models (1 650 ng/ml) was significantly increased ($t = 21.91$, $P = 0.0021$). The content of MPO-DNA compound (4.85 folds) was also significantly increased ($t = 15.40$, $P = 0.0042$). The lungs of sepsis mouse models were injured. Immunofluorescence showed that NETs in lungs of sepsis mouse models were significantly increased than sham operation controls. **Conclusions** Established stable methods to detect the NETs formation in mouse model. Excessive formation of NETs is one cause of lung injury in the sepsis mouse models.

【Key words】 Sepsis; Neutrophil extracellular traps (NETs); Cell free DNA; Lung injury

脓毒症是感染、创伤、大手术后和休克等常见的并发症,是危重患者死亡的重要原因。肺脏是脓毒症发生和发展过程中最早和最易受到损伤的器官^[1]。既往研究认为,过量产生的炎性因子是导致肺损伤的主

要原因。然而,临床上单纯应用抗炎治疗有时并未起到明显的治疗效果^[2],提示还存在其他引起肺损伤的因素。

中性粒细胞是天然免疫系统的重要组成部分。在病原体入侵时,中性粒细胞被迅速趋化募集到感染部位,清除和杀伤病原体^[3]。Brinkmann等^[4]于2004年首次提出,中性粒细胞形成胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)是中性粒细胞参与机体防御的新机制。NETs由解聚

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2015.04.029

基金项目:北京市教委科技计划及人文计划项目(No. KM20150025026)

作者单位:100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所;新发突发传染病研究北京市重点实验室

通讯作者:朱鏐雯, Email: zhuliuluan@aliyun.com

的染色质形成骨架结构和镶嵌于其中的髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)和弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)等颗粒蛋白构成。然而,尽管NETs具有重要的防御作用^[5-6];过量形成的NETs一旦未被及时清除则会造成组织损伤^[7]。本研究通过脓毒症小鼠模型,对NETs的形成情况进行定性和定量检测,探讨NETs形成水平与肺损伤的关系。以期为脓毒症致肺损伤的治疗提供新的理论和实验依据。

材料和方法

一、实验动物

本研究采用SPF级C57BL/6小鼠,雄性,鼠龄6~8周,体重18~20 g,由中国医学科学院动物研究所提供,动物许可证号SCXK(京)2014-0004。

二、主要材料和试剂

中性福尔马林固定液、苏木素、伊红染液购自中山金桥有限公司;Quant-iTTM PicoGreen[®] dsDNA Reagent and Kits购自Life Technology公司;Cell Death ELISA^{PLUS} Kit购自Roche公司;瓜氨酸化组蛋白H3(CitH3)抗体(ab5103)以及Alex Fluor[®] 488标记山羊抗兔抗体(ab150077)购自Abcam公司;DAPI染液购自碧云天公司;防淬灭封片剂(H-1000)购自Vector labs公司。

三、方法

1. 脓毒症动物模型的建立:参照Rittirsch等^[8]报道的操作方法建立盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)脓毒症动物模型。采用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,腹中线切口;用6/0号丝线结扎在盲肠末端和近端的中点位置,用18号针头于盲肠穿刺并挤出少量肠内容物以保持穿刺孔开放;将盲肠还纳腹腔并逐层关腹,术后于皮下注射1 ml生理盐水。假手术组(sham operation, Sham)小鼠仅进行开腹和分离盲肠,作为对照组。

2. 标本采集与处理:盲肠结扎穿孔造模7 d后,摘眼球取血,留取血浆。立即打开胸腔,取左肺固定于10%中性福尔马林。

3. 肺组织病理学检测:固定后的肺组织梯度乙醇脱水后石蜡包埋,制片(5 μ m),采用苏木素-伊红(haematoxylin and eosin, HE)染色法,高倍光学显微镜下观察肺组织结构变化,并于图像采集系统中随机选取10个视野图片观察结果。

4. 检测血浆中游离DNA:采用Quant-iTTM PicoGreen[®] dsDNA Reagent and Kits试剂盒检测细胞

上清中游离DNA含量。参考试剂盒说明书稀释标准品储液和样品,按50 μ l/孔加入到96孔板中,每孔加入50 μ l稀释的PicoGreen[®],标准品终浓度依次为1 000、100、10和0 ng/ml。室温避光2~5 min。用荧光读数仪检测信号强度,激发光480 nm,发射光520 nm。为防止荧光淬灭尽快上机。

5. 检测血浆中的MPO-DNA复合物:采用Cell Death ELISA^{PLUS} Kit试剂和抗-MPO检测小鼠血浆总的MPO-DNA复合物^[7]。首先进行抗-MPO包被:96孔板每孔加入50 μ l、5 μ g/ml(1:500)抗小鼠MPO抗体,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;包被液用0.05 mmol/L、pH 9.6的碳酸盐缓冲液。其次参考试剂盒说明书的操作步骤对捕获的MPO DNA复合物进行检测:300 μ l洗液洗3次,将20 μ l样品加入到80 μ l含有过氧化物酶标记的抗-MPO(1:25稀释)。室温孵育,300 r/min震荡2 h。300 μ l洗液洗3次,加入100 μ l过氧化物酶底物ABTS,室温避光孵育20 min,加入100 μ l反应终止液后测定波长为405 nm的吸光度值。血浆中NETs的含量以样品孔与对照孔的吸光度的比值表示。

6. 免疫荧光染色检测肺组织形成的NETs:肺组织石蜡切片脱蜡至水,pH9.0抗原修复液微波修复。PBS洗3次后,5%小牛血清封闭1 h;以抗-CitH3为一抗(1:300),4 $^{\circ}$ C过夜孵育;PBS洗3次,绿色荧光标记的二抗(1:1000)室温孵育1 h,PBS洗后,0.5 μ g/ml DAPI复染5 min,PBS洗后防淬灭封片,激光共聚焦荧光显微镜观察。

三、统计学处理

采用SPSS 13.0统计学软件进行分析。不同条件下NETs含量采用配对样本 t 检验的方法进行统计学分析,以 $\alpha = 0.05$ 为准,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

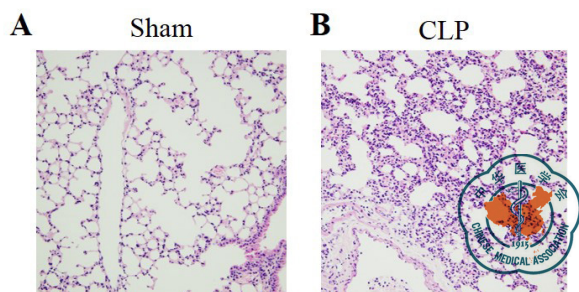
结 果

一、肺组织病理学变化

光镜下观察,假手术组肺组织无明显的病理学改变,肺泡腔清晰可见,未见炎性细胞浸润。而CLP脓毒症模型组肺组织可见间质、肺泡水肿,并有以中性粒细胞为主的炎性细胞浸润(图1)。

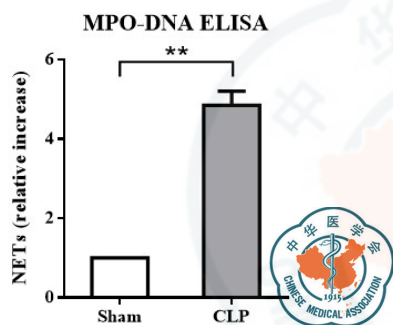
二、游离DNA检测法定量分析NETs含量

用PicoGreen[®]荧光分光光度法测定标准品和细胞上清中游离DNA含量,扣除背景后,绘制标准曲线(图2A)。标准曲线呈良好的直线关系, R^2 值为0.9998。如图2B所示,与假手术组相比,脓毒症组血浆中游离DNA含量显著增高($t = 21.91$, $P =$



注：A：组织病理学分析可见与假手术组（Sham）相比；B：脓毒症模型小鼠（CLP）肺病理损伤加重，肺泡壁毛细血管充血，肺泡间质和肺泡腔水肿浸润中性粒细胞数目增多

图1 小鼠肺组织切片 HE 染色（100 ×）



注：与假手术组（Sham）相比，脓毒症组（CLP）小鼠血浆 NETs 相对含量升高，差异具有统计学意义（** $P=0.0042$ ）

图3 MPO-DNA ELISA 法检测小鼠血浆中 NETs 相对含量

0.0021）。

三、MPO-DNA ELISA检测定量分析NETs含量

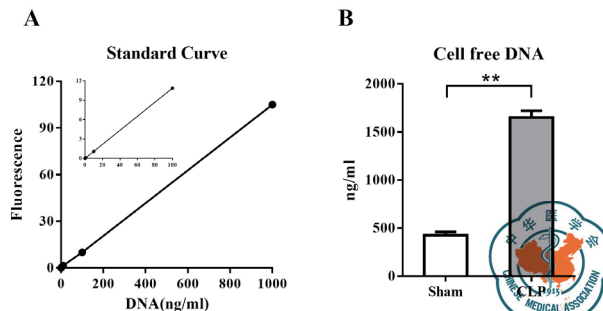
以DNA标准品绘制标准曲线，标准曲线呈良好的直线关系（图3A），脓毒症组血浆中MPO DNA复合物的含量显著高于假手术组（ $t=15.40$ ， $P=0.0042$ ）。

四、免疫荧光染色检测肺组织NETs形成情况

激光共聚焦显微镜观察抗-CitH3以及DAPI免疫荧光染色的CLP模型组和假手术组小鼠肺组织切片（图4）。CLP模型组肺组织原位荧光信号范围显著增加，进一步证实了脓毒症小鼠肺组织的损伤情况，而且原位形成的NETs数量增加。

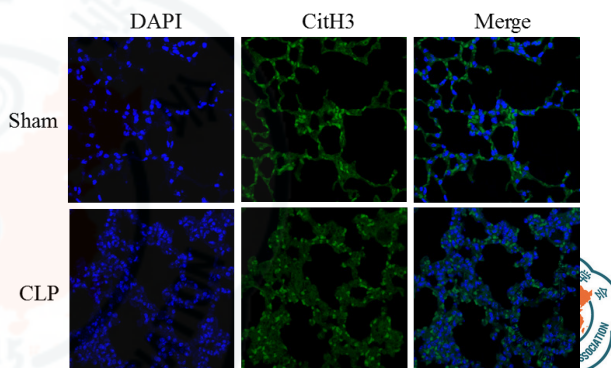
讨论

脓毒症可导致多脏器的损伤，其中，肺脏是最易受损且受损程度较重的器官^[1]。由于肺脏不仅发挥气体交换的功能，还是通过各种途径入血的毒



注：A：标准曲线。其中小图表示 DNA 含量 0 ~ 100 ng/ml 部分放大。B：与假手术组（Sham）相比，和脓毒症组（CLP）小鼠血浆游离 DNA 含量增高，差异有统计学意义（** $P=0.0021$ ）

图2 PicoGreen® 染料法检测小鼠血浆中游离 DNA 含量



注：假手术组（Sham）脓毒症组（CLP）小鼠肺组织 NET 免疫荧光染色。蓝色：DAPI 染细胞核；绿色：抗 - 瓜氨酸化组蛋白 H3（CitH3）；Merge：DAPI 和 CitH3 染色叠加图片

图4 组织免疫荧光染色法检测小鼠肺组织 NETs 形成情况（100 ×）

性物质、炎性因子等经静脉回流后流经的首个重要脏器。另外，肺脏的解剖结构与其他器官相比较脆弱，肺循环压力低、流速慢，血液中的毒性物质与肺内细胞的接触时间也较其他器官长。因此，肺脏最易发生功能受损，并表现为急性肺损伤，病情如果继续发展则会发生急性呼吸窘迫综合征，造成患者死亡。从病理学变化来看，本研究用小鼠CLP模型很好地模拟了腹膜炎感染引起的脓毒症导致的肺损伤。肺间质水肿，并伴有中性粒细胞的浸润。

既往研究发现，中性粒细胞在组织中大量聚集会造成组织损伤^[9]。脓毒症致肺损伤模型中能够检测到肺部中性粒细胞浸润显著增加^[10]，中性粒细胞在组织中的数量与肺损伤的严重程度呈正相关关系^[11]。然而，之前的研究多认为，中性粒细胞对组织造成损伤是由于其脱颗粒释放的颗粒酶成分以及

呼吸爆发作用造成肺血管内皮细胞和肺泡上皮细胞的损伤,导致肺泡通透性增加,形成肺水肿。近期研究发现,NETs除了具有防御病原体入侵的作用外,在组织内含量增加也能够造成组织损伤。中性粒细胞可以受多种因素刺激形成NETs,包括细菌、病毒、细菌毒力因子LPS、抗菌药物佛波酯(PMA)、汞化合物等^[4, 12]。目前已发现,体内存在感染病灶处会生成较多NETs,如肺炎链球菌感染的小鼠肺泡、化脓性链球菌所致坏死性筋膜炎小鼠皮肤感染部位均有NETs检出^[13]。因此,推测NETs在脓毒症引起的肺损伤中也起到一定的作用。

本课题组之前建立并优化了稳定的体外诱导人外周血中性粒细胞NETs生成以及定性、定量检测NETs的方法^[14]。在临床应用中,本研究只能获得人外周血的样本。然而,为了进一步研究NETs产生和调控的具体机制,本研究以小鼠为模型,研究对象可以不仅仅局限于外周血样本,还可以对骨髓来源的粒细胞、NETs形成的组织进行体内研究。本研究以脓毒症CLP小鼠为模型,以PicoGreen[®]染料法检测小鼠外周血中游离DNA的含量,同时以MPO-DNA ELISA法检测小鼠外周血中MPO DNA复合物的含量,反应小鼠血浆中NETs的含量^[7]。实验结果表明,与假手术组相比,脓毒症组小鼠血浆中NETs的含量均显著升高。与肺组织病理学改变相结合,可以看到在脓毒症小鼠中,肺组织的损伤程度与血浆中NETs的含量具有一定的相关性。血液循环中大量NETs的形成而不能及时清除是脓毒症相关肺损伤的病因之一。如果本研究能对NETs的产生有更深入的了解,明确其形成的分子机制及涉及的下游信号途径,明确脓毒症时各种因素对NETs形成的影响,将有利于针对NETs形成过量造成的组织损伤进行治疗,对临床治疗提供一定的帮助。

参考文献

- 1 Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353(16):1685-1693.
- 2 Cohen J, Opal S, Calandra T. Sepsis studies need new direction[J]. *Lancet Infect Dis*, 2012, 12(7):503-505.
- 3 Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils[J]. *Annu Rev Pathol*, 2014, 9:181-218.
- 4 Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. *Science*, 2004, 303(5663):1532-1535.
- 5 Jenne CN, Wong CH, Zemp FJ, et al. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps[J]. *Cell Host Microbe*, 2013, 13(2):169-180.
- 6 Brinkmann V, Zychlinsky A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5(8):577-582.
- 7 Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(7):2661-2671.
- 8 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.
- 9 Wiedermann FJ, Mayr AJ, Kaneider NC, et al. Alveolar granulocyte colony-stimulating factor and alpha-chemokines in relation to serum levels, pulmonary neutrophilia, and severity of lung injury in ARDS[J]. *Chest*, 2004, 125(1):212-219.
- 10 Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation[J]. *Nat Med*, 2011, 17(11):1381-1390.
- 11 Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury[J]. *Mol Med*, 2011, 17(3-4):293-307.
- 12 Haase H, Hebel S, Engelhardt G, et al. Ethylmercury and Hg induce the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) by human neutrophil granulocytes[J]. *Arch Toxicol*, 2015 (Epub ahead of print).
- 13 Moon AF, Midon M, Meiss G, et al. Structural insights into catalytic and substrate binding mechanisms of the strategic EndA nuclease from *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(7):2943-2953.
- 14 朱镠雯, 张玥, 李国力, 等. 建立体外诱导和检测中性粒细胞外诱捕网的方法[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2015, 9(3):104-106.

(收稿日期: 2015-01-11)

(本文编辑: 孙荣华)

张玥, 韩俊燕, 李国力, 等. 小鼠脓毒症模型外周血和肺组织原位中性粒细胞胞外诱捕网的检测[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2015, 9(4): 551-554.