论著

文章编号:1000-5404(2006)09-0932-04

C5a反义肽对实验性脓毒症小鼠肺损伤的作用研究

李保胜[1],崔社怀[1],吕凤林[2],陈 月[2],李元朝[2],胡承香[2],陈彩宇[2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]呼吸内科,[2]第一研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

提 要: 目的 研究C5a反义肽(NH_2-EARLQRVFLYVNPS-COOH)对盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)致脓毒症小鼠发生肺损伤的保护性作用。**方法** 实验组小鼠CLP后即经尾静脉注射反义肽R4 1、2、4、8 mg/kg,浓度0.5 mg/ml),观察不同剂量R4对小鼠96 h生存率的影响,并对肺组织进行病理观察,检测肺髓过氧化物酶(MPO)活性,检测动脉血氧分压、肺湿干比。**结果** 相较于对照组,治疗组小鼠在R4使用浓度2 mg/kg时96 h生存率明显提高($P<0.05$),动脉氧分压升高($P<0.01$)、MPO和肺湿/干比降低($P<0.01$)、病理改变减轻。**结论** 反义肽R4在小鼠体内有良好的拮抗C5a作用,对脓毒症小鼠肺的急性损伤有保护作用。

关键词: 过敏毒素C5a;反义肽;脓毒症;肺

中图法分类号: R563.05; R631.2; R977.6 **文献标识码:** A

Protective effects of complementary peptide of anaphylatoxin C5a on lung injury of experimental sepsis mouse

LI Bao-sheng[1], CUI She-huai[1], LU Feng-lin[2], CHEN Yue[2], LI Yuan-chao[2], HU Cheng-xiang[2], CHEN Cai-yu[2] ([1]Department of Respiratory Diseases, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 1, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To evaluate the protective effects of the antisense peptide of C5a (NH_2-EARLQRVFLYVNPS-COOH) on lung injury of mouse sepsis model by cecal ligation and puncture (CLP). **Methods** Mice were subjected to cecal ligation and puncture (CLP). Forty mice received 0.5 mg/ml antisense peptide of C5a at the dose of 1, 2, 4, 8 mg/kg through the tail vein after CLP, with ten mice receiving physiological saline as control and the survival rate was observed. The pathological change of the lung and the arterial partial pressure of oxygen, lung wet weight/dry weight and myeloperoxidase (MPO) were determined in normal controls, sham operation mice, CLP mice and CLP mice recceiving antisense peptide at dose of 4 mg/kg ($n=10$ in each group). **Results** The mice receiving antisense peptide at dose of over 2 mg/kg had higher 96-hour survival rate ($P<0.05$), higher arterial partial pressure of oxygen ($P<0.01$), the decreased activity of MPO and lung wet weight/dry weight ($P<0.01$), less pathological changes than the controls. **Conclusion** Our study suggests that the antisense peptide of C5a has an antagonistic effect against C5a *in vivo* and a possible new therapeutic drug category for sepsis.

Key words: anaphylatoxin C5a; complementary peptide; sepsis; lung

过敏毒素C5a在由脓毒症导致多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的过程中具有十分重要的作用[1],而在MODS中肺是最先受累的器官,即发生急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(acute lung injury/acute respiratory distress syndrome, ALI/ARDS)。目前阻断C5a在脓毒症实验动物模型中表现出显著的治疗性作用,通过拮抗C5a来阻滞C5a作用于多种靶细胞而产生的不良后果,这成为临床上治疗脓毒症进而控制ALI/ARDS发生的一个有意义的方向[2,3]。反义肽与其正义肽根据Kyte &Doolittle (hydrophobic anticomplementarity)而相互作用,的疏水/亲水复合指数的疏水性反互补机制这种独特的相互作用关系引起了人们的关注,试图把反义肽作为一种新型药物用于某些疾病的治疗。我们在前期工作中

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371339)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30371339)

作者简介: 李保胜(1978-),男,河北省衡水市人,硕士,医师,主要从事急性肺损伤方面的研究。电话:(023)68757811

通讯作者: 吕凤林,电话:(023)68757811, E-mail: Lufenglin@hotmail.com

收稿日期: 2005-08-25;**修回日期:** 2006-01-24

针对 C5a 功能序列 L2（第 61 ~ 74 位氨基酸序列），设计并合成了针对 C5a 的反义肽 R4，体外细胞实验显示该 C5a 反义肽对 C5a 过敏毒素的生物学活性具有一定的拮抗作用；反义肽 R4 可以剂量依赖关系抑制 C5a 介导的人脐静脉内皮细胞（PVEC）上黏附分子 P-选择素的表达；另外，反义肽 R4 对 PVEC 与多形核白细胞（PMN）的黏附也有明显抑制作用，表现为 PVEC 上黏附的 PMN 和 MPO 活性的降低[4,5]。在本研究中，我们研究其在小鼠脓毒症致肺损伤模型中对小鼠的保护性作用。

1　材料与方法

1.1　主要仪器

ABL-Ⅲ型血气分析仪（丹麦），DU-640 型紫外分光光度计（美国，Beckman），JEM-2000EX 透射电镜（日本）。

1.2　主要试剂

C5a 反义肽 R4（NH_2-EARLQRVFLYVNPS-COOH，从自行设计、合成和纯化的 4 条 C5a 反义肽中，利用 BIA 技术筛选获得[5]）溶于无菌生理盐水，浓度 0.5 mg/ml；十六烷基三甲胺（HTAB）Serva 公司；邻联茴香胺（Sigma）；30% H_2O_2 国产分析纯；MPO 保护液：HTAB 0.5 g 加 50 mmol/L pH 6.0 PBS 至 100 ml；MPO 反应液：邻联茴香胺 16.7 mg + 50 mmol/L pH 6.0 PBS 10 ml，加双蒸水至 100 ml，临用前加 30 % 的 H_2O_2 至终浓度为 0.000 5%。

1.3　盲肠结扎穿孔小鼠脓毒症模型的建立

参照 Tsujimoto 等[6] 的方法稍加改进。SDF 级昆明小鼠，雌性，体质量 20 ~ 25 g。以速眠新Ⅱ（1 mg/ kg，长春军需大学兽医研究所）肌肉注射麻醉后沿腹正中线作 1 cm 切口，找到盲肠，在盲肠根部结扎盲肠。用 16 号针盲肠结扎部位远端刺一孔，并挤出少量盲肠内容物，将盲肠还纳腹腔，逐层缝合腹壁切口。术毕皮下注射 1 ml 无菌生理盐水。

1.4　实验动物及分组

雌性 SPF 级昆明小鼠 90 只，体质量约 20 g（大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供），完全随机的方法分为 9 组，每组 10 只，其中前 5 组观察反义肽对脓毒症小鼠生存率的影响，后 4 组观察反义肽对脓毒症小鼠肺损伤的作用。

1.4.1　观察反义肽对脓毒症小鼠生存率的影响　　昆明小鼠 50 只，完全随机的方法分为 5 组（A、B、C、D、E 组）：A 组为假给药组：CLP 术后每 6 h 静脉注射无菌生理盐水溶液 200 μl。B-E 组为反义肽 R4 治疗组：CLP 术后每 6 h 分别按 1、2、4、8 mg/kg 尾静脉注射反义肽溶液。以上各组不禁饮食，观察小鼠 1 ~ 4 d 存活率。

1.4.2　观察反义肽对脓毒症小鼠肺损伤的作用　　①正常对照组（F 组），麻醉后 6 h 活杀取样本；②假手术组（G 组），麻醉后开腹并找到盲肠，然后回纳腹中，逐层缝合关腹，经尾静脉注射生理盐水 0.2 ml，6 h 活杀取样本；③盲肠结扎穿孔组（H 组），于 CLP 后即经尾静脉注射生理盐水 0.2 ml，6 h 活杀取样本；④R4 治疗组（I 组），CLP 后即经尾静脉注射 C5a 反义肽 4 mg/kg，6 h 后活杀取样本。

1.5　观察指标

观察小鼠的呼吸等一般情况；测定动脉氧分压（PaO_2）和左肺叶组织湿质量/ 干质量值；测定肺组织 MPO 活性；肺组织大体观察、HE 染色光镜观察以及透射电镜下观察。

1.6　动脉氧分压的检测

用肝素抗凝处理的 1 ml 注射器，经左心室穿刺取动脉血约 0.2 ml，立即送检血气。

1.7　肺组织含水量测定

游离大鼠左肺，称量湿质量（wet weight，W），经 70 ℃脱水 24 h 后，再称量干质量（dry weight，D），以其质量湿/干比值（W/D）表示肺组织含水量。

1.8　肺组织 MPO 活性的检测

取肺组织约 100 mg，加入含 0.5% 十六烷基三甲基溴化胺的 PBS（pH 6.0）2 ml，冰浴中匀浆，反复冻融 4 次，4 ℃ 30 000 ×g 离心 15 min，取上清 0.1 ml 加磷酸钾缓冲液（pH 6.0）2.9 ml（含 0.0167% 邻联大茴香胺和 0.000 5% H_2O_2），于 460 nm 处测第 30 秒和第 90 秒的吸光度，得肺组织 MPO 水平，MPO 最小活力单位相当于 25 ℃时每分钟分解 1 μmol H_2O_2，MPO 活力值实为一个相对最小活力单位而言的比值，MPO = △A（460 nm 下每分钟变化值）×反应液体积/（11.3 × 所取组织重量）。

1.9　病理形态学观察

肉眼大体观察。并取肺组织，经 10% 甲醛溶液固定、石蜡包埋切片、HE 染色后，光镜下观察。另取肺组织 3% 戊二醛固定、1% 锇酸后固定，饱和醋酸铀过夜，系列丙酮脱水，环氧丙烷置换，环氧树脂包埋，切片后电镜下观察。

1.10　统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，运用 SPSS 10.0 行方差分析和均数间多重比较。

2　结果

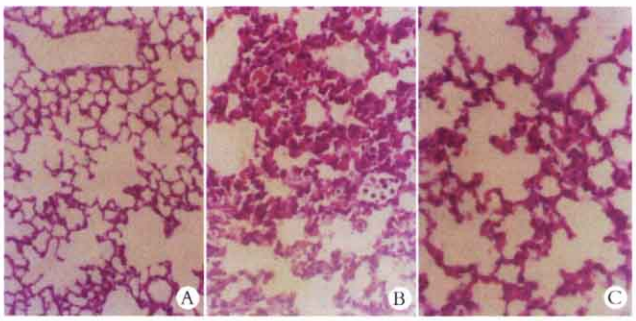
2.1　各组小鼠生存率的观察

假手术组小鼠的一般情况良好，呼吸平稳，均未死亡。假给药组小鼠术后，呼吸频率增加，均早期发生并持续存在呼吸困难或呼吸窘迫，生存率在 12 h 为 100%，24 h 生存率为 20%，48 h 内小鼠全部死亡。反义肽 R4 治疗组呼吸频率增加，部分小鼠发生呼吸困难。生存率未治疗组与治疗组比较，当给药剂量大于 2.0 mg/kg 时有显著差异（$P < 0.05$），即给药剂量大于 2.0 mg/kg 时有保护性效应。

未治疗组与治疗组比较，当给药剂量大于 2.0 mg/kg 时有显著差异（$P < 0.05$）。

2.2　肺大体观察、肺组织常规光镜检查

正常对照组及假手术组小鼠肺呈均匀淡粉红色，包膜光滑，弹性好，表面未见病损灶，切面均质，无液体溢出；光镜（图 1A）下肺组织结构完整，肺泡腔清晰，肺泡隔无水肿、炎症等特殊改变，偶见肺间质白细胞少量增加。CLP 组肺水肿体积增大显著；光镜（图 1B）下可见肺泡间隔增宽，肺间质水肿、炎细胞浸润，可见肺泡萎陷及肺泡出血。R4 治疗组小鼠肺轻度水肿，光镜（图 1C）下仅见肺泡隔增宽、少量炎细胞浸润。

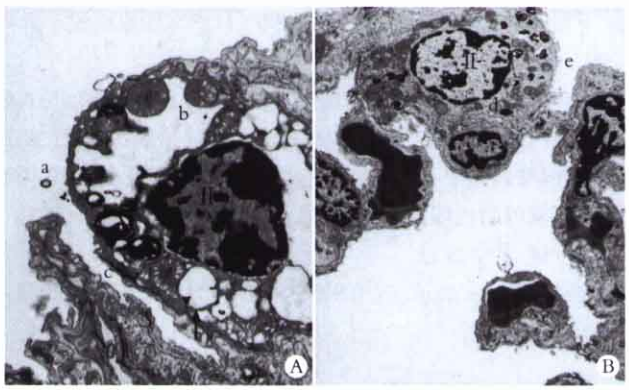


A：正常对照组(HE×200)；B：盲肠结扎穿孔组(HE×400)；C：R4治疗组(HE×400)

图2 CLP致伤小鼠肺组织病理改变

2.3 透射电镜检查

CLP组(图2A)可见肺泡隔增宽；Ⅱ型上皮细胞表面微绒毛消失，细胞质内板层体排空，细胞质空泡化。实验组(图2B)可见Ⅱ型上皮细胞表面微绒毛及细胞质内板层体存在，细胞损伤减轻。



A：盲肠结扎穿孔组 (TEM×7 000)；B：R4治疗组 (TEM×4 200)；a：细胞表面微绒毛消失；b：胞浆内板层体排空；c：胞浆空泡化；d：细胞表面微绒毛；e：胞浆内板层体存在

图2 CLP致伤小鼠肺组织透射电镜观察

2.4 肺组织MPO活性的变化

MPO是中性粒细胞嗜天青颗粒所释放的过氧化物酶，MPO水平与中性粒细胞数目之间存在极显著的相关性，可做为中性粒细胞的标志。CLP致伤小鼠以后，MPO较正常对照组和假手术组升高，R4治疗组小鼠MPO明显降低，说明CLP致伤后肺组织发生明显的中性粒细胞聚集，而反义肽R4可以逆转这一过程，见表1。

表1 CLP致伤小鼠MPO、PaO_2和W/D的变化($n=10$，$\bar{x}\pm s$)

组别	MPO(AU)	PaO_2(kPa)	W/D
正常对照组	0.069±0.037[a]	19.83±0.86[ab]	3.86±0.14[ab]
假手术组	0.148±0.027[a]	19.56±0.85[ab]	4.07±0.22[b]
盲肠结扎穿孔组	0.285±0.116	9.8±1.48[b]	5.76±0.46[b]
R4治疗组	0.077±0.027[a]	14.55±2.07[a]	4.42±0.49[a]

a：$P<0.01$，与盲肠结扎穿孔组比较；b：$P<0.01$，与R4治疗组比较

2.5 动脉氧分压(PaO2)的变化

CLP致伤小鼠以后，发生肺间质水肿以及肺泡上皮损伤，从而影响气体交换，CLP组PaO_2较正常对照组和假手术组降低，而R4治疗组小鼠PaO_2低于正常对照组和假手术组，但高于CLP组，说明反义肽R4治疗改善了肺气体交换，见表1。

2.6 肺组织湿质量/干质量比值的变化

CLP致伤小鼠以后，发生肺间质水肿以及肺血管淤血，使肺组织含水量增加，CLP组W/D高于正常对照组、假手术组和R4治疗组，而R4治疗组W/D高于正常对照组，但低于CLP组，说明R4有助于降低肺组织含水量，见表1。

3 讨论

脓毒症死亡率的升高与MODS的不断进展密切相关，在此过程中，肺常常是最早受累的首发靶器官，即发生ALI/ARDS。在多种类型的ALI都存在补体激活，补体激活产物C5a在ALI中的重要作用已得到证实[7]。失控的炎症反应引发肺损伤的过程中，中性粒细胞是重要的效应细胞之一，C5a对中性粒细胞的激活和黏附浸润有关键性作用。C5a不但本身是中性粒细胞的强效趋化因子，而且还引起肺泡巨噬细胞的NF-κB激活，导致CXC趋化因子、单核细胞炎性蛋白-2和细胞因子诱导中性粒细胞趋化因子的生成；另一方面C5a刺激巨噬细胞等产生TNF-α、IL-1，从而诱导内皮细胞表达细胞间黏附分子-1和E-选择素等黏附分子的增加，因此，C5a在中性粒细胞趋化和黏附过程中发挥了重要作用，导致肺组织中大量的中性粒细胞浸润。中性粒细胞表面有大量的C5a受体，C5a对于中性粒细胞的激活具有重要意义。C5a在细菌、内毒素等的存在下，增强中性粒细胞组装NADPH氧化酶的组装，刺激颗粒酶的释放。中性粒细胞浸润和激活，一方面对杀伤和清除病原体必不可少，另一方面过度的反应也造成组织损伤。而且有报道C5a可以使中性粒细胞抵抗自发性凋亡[8]，延长其寿命，使炎症反应被放大。此外C5a直接刺激肺血管内皮细胞，提高其通透性，是形成肺水肿的重要环节之一。

针对C5a在失控性炎症过程中的重要作用，研究人员把C5a作为一个干预的靶点，国内外报道过不同的C5a拮抗剂，它们中有些在体外和活体内具有干扰C5a介导的生物学功能的作用[9-11]，但也存在一定的局限性，如特异性和异质性等问题。我们针对C5a末端第64~74位置活性片段而设计反义肽，并已通过体外细胞实验筛选，得到一种具有较强拮抗C5a活性的反义肽R4，R4针对C5a同C5aR结合的位点L2(C5a C-端8氨基残基)与C5a结合，以期阻断其受体后效应。在我们较早前的研究中，体外细胞实验显示该C5a反义肽对C5a过敏毒素的生物学活性具有一定的

拮抗作用；反义肽 R4 可以剂量依赖关系抑制 C5a 介导的 PVEC 上黏附分子 P-Selectin 的表达；另外，反义肽 R4 对 PVEC 与 PMN 的黏附也有明显抑制作用，表现为 PVEC 上黏附的 PMN 和 MPO 活性的降低[4,5]。

MPO 是中性粒细胞嗜天青颗粒所释放的过氧化物酶，过量生成可造成组织损伤，MPO 水平与中性粒细胞数目之间存在极显著的相关性，可做为中性粒细胞标志。本实验中我们通过测定小鼠肺部组织的 MPO 来反映小鼠肺白细胞变化，用 C5a 反义肽 R4 治疗小鼠我们发现其肺组织白细胞的聚集明显的减少，表明 C5a 的反义肽 R4 在体内可与 C5a 有效结合，并阻断 C5a 的受体后效应，减轻脓毒症小鼠的肺损伤，提高生存率，具有明显的保护效应。在我们的实验中，反义肽 R4 治疗组与 CLP 组比较，肺组织的病理改变明显减轻，光镜下可见肺水肿减轻、蛋白渗出减少；电镜可见Ⅱ型上皮细胞表面微绒毛及细胞质内板层体存在，细胞损伤减轻。与病理损伤的改善相关的，反义肽 R4 治疗组小鼠生存率明显提高，一般情况改善、动脉氧分压升高、MPO 和肺湿/干比降低，均提示在体内反义肽 R4 可以有效的拮抗 C5a 的作用，抑制中性粒细胞的过度激活和组织浸润，抑制其对组织的损伤作用，维持维持血管内皮细胞的正常屏障功能，减轻肺水肿，从而保护脓毒症过程中肺组织的损伤。

在本研究中证实了我们设计合成的反义肽 R4 在活体内拮抗 C5a 的活性，该反义肽对脓毒症小鼠肺损伤具有保护性作用，提示了临床治疗 ALI 的一个新的靶点，可能运用于人 ALI 的治疗中。

参考文献：

[1] WARD P A. The dark side of C5a in sepsis[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(2): 133 - 142.

[2] RIEDEMANN N C, GUO R F, BERNACKI K D, *et al*. Regulation by C5a of neutrophil activation during sepsis[J]. Immunity, 2003, 19(2): 193 - 202.

[3] HUBER-LANG M S, RIEDEMAN N C, SARMA J V, *et al*. Protection of innate immunity by C5aR antagonist in septic mice[J]. FASEB J, 2002, 16(12): 1567 - 1574.

[4] 巫振洪，吕凤林，胡承香，等. C5a 反义肽对肺血管内皮细胞与中性粒细胞黏附的影响[J]. 中国免疫学杂志，2003，19(10)：672 - 676.

[5] 吕凤林，巫振洪，李元朝，等. 人过敏毒素 C5a 反义肽与其正义肽的相互作用研究[J]. 中华微生物和免疫学杂志，2004，24(7)：514 - 518.

[6] TSUJIMOTO H, ONO S, MOCHIZUKI H, *et al*. Role of macrophage inflammatory protein 2 in acute lung injury in murine peritonitis[J]. J Surg Res, 2002, 103(1): 61 - 67.

[7] GUO R F, WARD P A. Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model[J]. Free Radic Biol Med, 2002, 33(3): 303 - 310.

[8] PERIANAYAGAM M C, BALAKRISHNAN V S, PEREIRA B J, *et al*. C5a delays apoptosis of human neutrophils *via* an extracellular signal-regulated kinase and Bad-mediated signalling pathway[J]. Eur J Clin Invest, 2004, 34(1): 50 - 56.

[9] HUBER-LANG M, SARMA V J, LU K T, *et al*. Role of C5a in multiorgan failure during sepsis[J]. J Immunol, 2001, 166(2): 1193 - 1199.

[10] GUO R F, HUBER-LANG M, WANG X, *et al*. Protective effects of anti-C5a in sepsis-induced thymocyte apoptosis[J]. J Clin Invest, 2000, 106(10): 1271 - 1280.

[11] SPRONG T, BRANDTZAEG P, FUNG M, *et al*. Inhibition of C5a-induced inflammation with preserved C5b-9-mediated bactericidal activity in a human whole blood model of meningococcal sepsis[J]. Blood, 2003, 102(10): 3702 - 3710.

（编辑　张大春）

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是：凡是可以使用阿拉伯数字，而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字：

1　公历世纪、年代、年、月、日和时刻　　例如：公元前 5 世纪、20 世纪 90 年代、1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。

表示年份要写全称，1995 年不能写成 95 年或'95 年；1953 - 1958 年不能写成 1953 - 58 年。年月日可以写成 1995-06-08。时刻用":"分隔的形式。如：13 时 45 分 8 秒可以写成 13:45:08。

2　计数和计量（整数、小数、分数、百分数、均数）包括序数、编号　　4 位和 4 位以上的数字采用三位分节法，不用"千分撇"，节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙（如 2.431 改为 2 431）。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节，也不加千分撇。尾数"0"多，5 位以上的数字，可以用"万""亿"表示，但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示，例如 3 579 000 可写成 357.9 万但不能写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

本刊编辑部