

doi:10. 13407/j. cnki. jpp. 1672-108X. 2021. 03. 001

• 论 著 •

## ODN2088 减轻线粒体 DNA 致脓毒症大鼠急性肺损伤

唐甜, 李少军, 郭鹏飞, 杨林, 敖晓晓, 胡兰, 谭利平 (重庆医科大学附属儿童医院, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

**[摘要]**目的:探讨血浆线粒体 DNA (mtDNA) 含量与脓毒症大鼠急性肺损伤 (ALI) 程度的关系及选择性 TLR9 受体抑制剂 ODN2088 对脓毒症大鼠 ALI 的保护作用。方法:按随机数表法将 80 只大鼠分为假手术 (sham) 组、脓毒症 (sepsis) 组、脓毒症大鼠腹腔注射 mtDNA 1.4 mg/kg (sepsis+mtDNA) 组、脓毒症大鼠腹腔注射 mtDNA 1.4 mg/kg+ODN2088 1 mg/kg (sepsis+mtDNA+ODN) 组四组各 20 只。采用盲肠结扎穿孔手术 (CLP) 制备脓毒症合并 ALI 模型。术后 6、12 h 采集血液标本、肺泡灌洗液 (BALF) 和肺组织以检测血浆 mtDNA 及肺组织 TLR9/p38MAPK 表达水平。结果:与 sham 组相比,sepsis 组大鼠病死率高,血浆 mtDNA 水平和肺组织 TLR9/p38MAPK 表达增加,ALI 程度加重[肺损伤评分、BALF 中炎症细胞、肺(湿-干)/干质量值和基因表达增加, $P$  均 $<0.05$ ]。与 sepsis 组大鼠相比,sepsis+mtDNA 组大鼠的病死率、血浆 mtDNA 水平、TLR9/p38MAPK 表达增加,ALI 程度加重( $P$  均 $<0.05$ )。sepsis+mtDNA+ODN 组大鼠较 sepsis+mtDNA 组病死率、血浆 mtDNA 水平、TLR9/p38MAPK 表达及 ALI 程度降低( $P$  均 $<0.05$ )。结论:血浆 mtDNA 水平与脓毒症致 ALI 有关,TLR9 抑制剂 ODN2088 可减轻 mtDNA 诱导脓毒症大鼠 ALI 的程度。

**[关键词]** 脓毒症;急性肺损伤;线粒体 DNA;TLR9/p38 受体

**[中图分类号]** R725.6

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1672-108X(2021)03-0001-06

### Relief of ODN2088 for Acute Lung Injury in Rats with Sepsis Induced by Mitochondrial DNA

Tang Tian, Li Shaojun, Guo Pengfei, Yang Lin, Ao Xiaoxiao, Hu Lan, Tan Liping (Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Chongqing 400014, China)

**[Abstract]** **Objective:** To probe into the correlation between plasma mitochondrial DNA (mtDNA) content and severity of acute lung injury (ALI) in rats with sepsis and the protective effects of selective Toll-like receptor 9 (TLR9) inhibitor ODN2088 on ALI in rats with sepsis. **Methods:** According to the random number table method, 80 rats were divided into the sham surgery (sham) group, sepsis (sepsis) group, intraperitoneal injection of mtDNA 1.4 mg/kg (sepsis+mtDNA) group and intraperitoneal injection of mtDNA 1.4 mg/kg +ODN2088 1 mg/kg (sepsis+mtDNA+ODN) group, with 20 rats in each group. The model of sepsis complicated with ALI was established by cecal ligation and perforation (CLP). After surgery of 6 and 12 h, blood samples, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissues were collected to detect plasma mtDNA and TLR9/p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) expression levels in lung tissues. **Results:** Compared with the sham group, the sepsis group had higher mortality, increased levels of plasma mtDNA and TLR9/p38 MAPK expression in lung tissues, and increased ALI degree such as lung injury score, inflammatory cells in BALF, lung (wet-dry)/dry weight ratio and gene expression ( $P<0.05$ ). Compared with the sepsis group, the mortality rate, plasma mtDNA, TLR9/p38MAPK expression and ALI degree increased in the sepsis+mtDNA group ( $P<0.05$ ). Compared with the sepsis+mtDNA+ODN group, the mortality rate, plasma mtDNA, TLR9/p38MAPK expression and ALI degree decreased in the sepsis+mtDNA+ODN group ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Plasma mtDNA is correlated with ALI induced by sepsis, and TLR9 inhibitor ODN2088 can relieve ALI in rats with sepsis induced by mtDNA.

**[Keywords]** sepsis; acute lung injury; mitochondrial DNA; TLR9/p38 receptor

脓毒症是严重创伤、感染、休克等重症患者常见的并发症,也是急诊科及重症监护室死亡事件的主要病因之一<sup>[1-2]</sup>。呼吸道、胃肠道和泌尿道感染是导致脓毒症常见的感染源<sup>[3]</sup>,而急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 和急性呼吸窘迫综合征是脓毒症引起多器官功能衰竭中常见的并发症<sup>[4]</sup>。目前脓毒症相关 ALI 除支持治疗外,仍无其他有效防治措施<sup>[5]</sup>。因此,从分子水平研究脓毒症相关 ALI 发病机制,为其防治提供新的方向具有

重要意义。脓毒症及其相关 ALI 是由细菌、病毒、真菌等感染与机体免疫系统相互作用介导的全身炎症反应,称为“细胞因子风暴”<sup>[6]</sup>。近年来有研究发现,脓毒症感染时线粒体功能障碍、线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 向细胞质及细胞外移位促发炎症反应导致 ALI 甚至死亡<sup>[7]</sup>。

线粒体作为细胞内的双膜包被细胞器,不仅与组织能量代谢、细胞程序性死亡有关,还涉及全身炎症反

**基金项目:** 重庆市科委前沿与应用基础研究计划项目,编号 cstc2014jcyjA10032。

**作者简介:** 唐甜 (1990.09-),女,硕士,住院医师,主要从事儿童急性肺损伤研究,E-mail: 751857137@qq.com。

**通讯作者:** 谭利平 (1972.08-),女,博士,副教授,主要从事儿童脓毒症研究,E-mail: tanlp0825@163.com。

应<sup>[8]</sup>。脓毒症感染时大量活性氧破坏线粒体膜并释放 mtDNA 到细胞质中<sup>[9]</sup>, 细胞凋亡和血小板激活促进 mtDNA 释放到细胞外导致血浆 mtDNA 水平升高<sup>[10-11]</sup>。mtDNA 是激活免疫系统促进人体炎症反应的激动剂<sup>[10]</sup>, 血浆 mtDNA 水平是评估脓毒症患者预后及病死率的重要生物学指标<sup>[12-13]</sup>。内共生学提出, 线粒体与细菌有同源性, 有相同的双膜结构且 DNA 中含有大量非甲基化胞嘧啶-鸟嘌呤核苷酸序列(即 CpG 基序)。机体通过 TLR9 受体识别细菌细胞核 DNA 中 CpG 基序, 因 mtDNA 具有相似的免疫源性而诱发免疫反应<sup>[14-15]</sup>。所以, 细菌 DNA 和 mtDNA 均能通过 TLR9 受体激活 p38 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)通路诱发炎症反应<sup>[16]</sup>。脓毒症感染时坏死组织释放线粒体碎片及 mtDNA 激活中性粒细胞 TLR9/p38 MAPK 信号通路, 导致基质金属蛋白酶 8(matrix metalloproteinase, MMP-8)、MMP-9、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)在肝脏累积<sup>[17]</sup>。因而, 靶向作用于 TLR9 受体, 抑制 p38 受体激活可减轻肺血管通透性和炎症反应并改善肺功能<sup>[18-19]</sup>。有研究发现, 内毒素诱导的脓毒症小鼠模型血浆 mtDNA 水平升高, 正常小鼠腹腔注射 mtDNA 出现 ALI 与 TLR9/p38 MAPK 通路激活促进炎症因子释放有关<sup>[20]</sup>。

本研究采用盲肠结扎穿孔手术(cecal ligation and perforation, CLP)建立脓毒症大鼠模型<sup>[21]</sup>, 探讨大鼠 mtDNA 在脓毒症 ALI 中的作用及 TLR9 受体抑制剂 ODN2088 对脓毒症 ALI 的影响, 为脓毒症及相关 ALI 的预防及治疗提供新的靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 6~8 周 SD 雄性大鼠, 体质量 210~220 g, 均购自重庆医科大学实验动物中心, 动物合格证号 SCXK(渝)2012-0001。

### 1.2 试剂

提取血 DNA 试剂盒(北京天根生化科技有限公司); 提取组织和细胞线粒体试剂盒(美国 Biovision 公司); 提取微量 DNA 试剂盒(德国 QIAGEN 公司); RNA 提取及荧光定量 PCR(QPCR)试剂(TaKaRa 公司); BCA 蛋白检测试剂(江苏凯基生物技术股份有限公司)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 大鼠 mtDNA 提取 在无菌条件下分离大鼠肝脏组织, 按照试剂盒说明书提取线粒体及 mtDNA。用紫外分光光度计检测 mtDNA 浓度 A(260)/A(280)为 1.8~2.0。QPCR 检测核 DNA 占 mtDNA 总量少于 0.1%, 除外核 DNA 污染。

1.3.2 动物分组和建立脓毒症合并 ALI 大鼠模型 随机数表法将 80 只大鼠分为假手术(sham)组、脓毒症(sepsis)组、脓毒症大鼠腹腔注射 1.4 mg/kg mtDNA(sepsis + mtDNA)组、脓毒症大鼠腹腔注射 1.4 mg/kg

mtDNA 和 1 mg/kg ODN2088(sepsis + mtDNA + ODN)组。参考文献[22]采用盲肠结扎穿孔法(CLP)方法制备脓毒症合并 ALI 大鼠模型: 大鼠麻醉并备皮消毒, 沿前腹正中中线做切口游离盲肠, 丝线应避开肠系膜血管结扎距盲肠末端 1.5 cm 处, 针头 2 次贯穿盲肠并挤出少许肠内容物后还纳腹腔。术后大鼠放回笼内自由进食、饮水。

1.3.3 提取血浆 DNA 提取大鼠术后 6、12 h 血浆。将 50  $\mu$ L 血浆与等量磷酸盐缓冲液混匀, 在 4  $^{\circ}$ C 条件下以 16 100 g 离心 15 min, 取 90  $\mu$ L 上清液。根据微量 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA, 并溶于 200  $\mu$ L 溶解液。

1.3.4 荧光定量 PCR 测定 mtDNA 水平 细胞色素 B(cytochrome B, cytB)为大鼠 mtDNA 标志基因。线粒体 cytB 引物序列: 上游引物 5'-TCCACTTCATCCTCCCATTC-3', 下游引物 5'-CTGCGTCGGAGTTTAATCCT-3'。按 10 倍梯度稀释携带大鼠 mtDNA 质粒并制备标准曲线, 通过标准的转换系统(<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>)将 mtDNA 浓度转换为拷贝数(copies/ $\mu$ L)。血浆 mtDNA 浓度的计算公式:

$$c = Q \times V_{\text{DNA}} / V_{\text{PCR}} \times 1 / V_{\text{EXT}}$$

c 为血浆中 mtDNA 拷贝数;  $V_{\text{DNA}}$  为提取血浆 DNA 溶于溶解液体积, 本实验为 200  $\mu$ L;  $V_{\text{PCR}}$  为荧光定量 PCR 时 DNA 体积, 本实验为 0.8  $\mu$ L;  $V_{\text{EXT}}$  为提取血浆 DNA 的血浆体积, 本研究为 50  $\mu$ L。

1.3.5 实时 PCR 检测大鼠肺组织 TLR9/p38 mRNA 水平

根据 TRIzol 液说明书提取 50 mg 肺组织总 RNA, 逆转录合成 cDNA。以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参。目的基因: TLR9 上游引物 5'-TCCGTGACAATCACCTCTCT-3', 下游引物 5'-GGTCCAGGTCTCGCAGATT-3'; p38 上游引物 5'-AGTGGCTGACCCCTTATGAC-3', 下游引物 5'-CACAGTGAAGTGGGATGGA-3'。按  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算并统计分析实验结果。

1.3.6 评估肺损伤程度 将肺组织用 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 各肺组织标本在 400 倍光镜下随机选择 20 个视野对肺损伤程度行量化评分<sup>[23]</sup>。评分内容包括肺泡腔中性粒细胞计数、肺间质中性粒细胞计数、透明膜、肺泡腔蛋白碎片及肺泡间隔厚度, 肺损伤程度分为 0、1、2 分。取 5 项指标评分之和, 总分为 0~1 分, 评分越高, 越严重。

1.3.7 测肺水含量 用滤纸吸干肺组织多余水分, 称湿质量(W)。恒温电热干燥箱 70  $^{\circ}$ C 烘干 72 h 后称干质量(D), 计算肺组织水含量为 (W-D)/D 值。

1.3.8 测定肺泡灌洗液蛋白量和 WBC 大鼠处死后分离气管及主支气管行气管插管, 共收集 4 次右肺肺泡灌洗液, 均用 3 mL PBS 缓冲液灌洗, 离心后测定肺泡灌洗液上清液蛋白含量, 细胞沉淀重悬在 1 mL PBS 缓冲液中, 取 20  $\mu$ L 与 180  $\mu$ L 0.1% 的稀盐酸混匀, 测得 WBC。

### 1.4 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件, 正态分布计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析, 用 Tukey's 检验行两两比较,



不符合正态分布资料以中位数(四分位间距)表示;用Kaplan-Meier方法(long-rank检验)评价各组间病死率差异, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 脓毒症合并ALI大鼠临床表现

本研究建立脓毒症合并ALI模型,1周病死率达到60%,符合中度脓毒症标准<sup>[24]</sup>。因脓毒症模型大鼠病死率较高,本研究仅监测大鼠CLP术后12h内炎症表现和病死率。本研究发现,sepsis+mtDNA组较sepsis组大鼠病死率更高,脓毒症症状更严重,如竖毛、弓背、发绀、拒食、嗜睡和气促。然而,sepsis+mtDNA+ODN组大鼠较sepsis+mtDNA组大鼠病死率及脓毒症症状明显减轻。CCP术后大鼠生存曲线见图1。

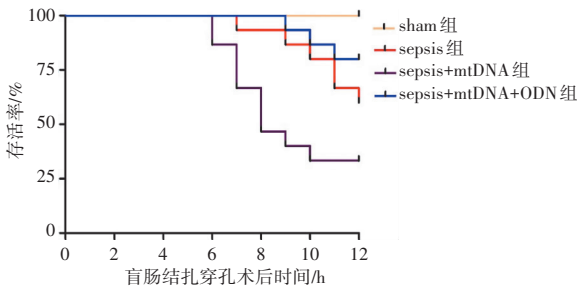
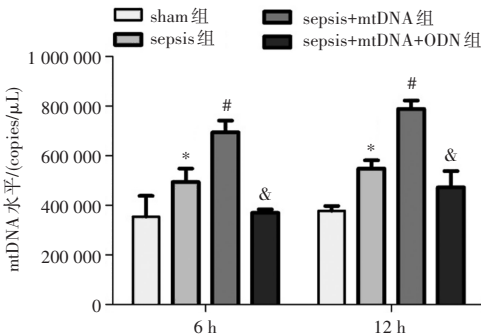


图1 CLP术后大鼠生存曲线

### 2.2 血浆mtDNA水平与脓毒症严重程度的关系

4组大鼠血浆mtDNA水平12h较6h升高( $P<0.05$ )。sepsis组大鼠血浆mtDNA水平较sham组升高( $P<0.05$ ),sepsis+mtDNA组较sepsis组血浆mtDNA水

平进一步升高( $P<0.05$ )。sepsis+mtDNA+ODN组大鼠血浆mtDNA水平较sepsis+mtDNA组降低( $P<0.05$ )。见图2。



注: \*与sham组比较, $P<0.05$ ; #与sepsis组比较, $P<0.05$ ; &与sepsis+mtDNA组比较, $P<0.05$

图2 4组大鼠血浆mtDNA水平比较

### 2.3 mtDNA加重脓毒症相关ALI

2.3.1 肺组织病理改变 Sepsis组较sham组大鼠肺泡间隔增宽、塌陷,肺泡间质水肿,肺泡腔及肺泡间隔可见少量中性粒细胞和红细胞渗出。sepsis+mtDNA组大鼠肺泡结构破坏严重,肺泡间隔增宽较sepsis组更严重,支气管壁、肺泡间隔、肺泡腔见大量中性粒细胞浸润,肺血管扩张明显,证实腹腔注射mtDNA加重脓毒症大鼠ALI。然而,sepsis+mtDNA+ODN组大鼠肺组织较sepsis+mtDNA组肺泡结构破坏、肺泡间隔增宽、支气管壁、肺泡间隔、肺泡腔中性粒细胞浸润、肺血管扩张病理改变明显减轻,证实ODN预处理可减轻腹腔注射mtDNA对脓毒症大鼠ALI的作用。见图3。

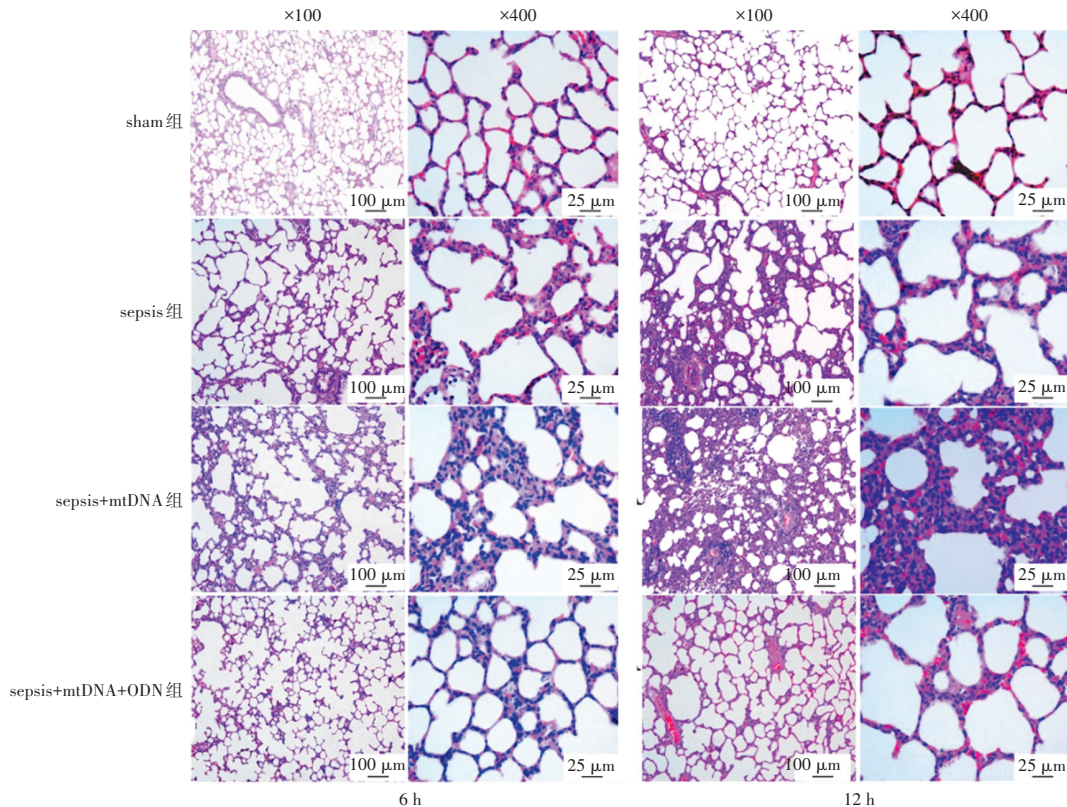


图3 4组大鼠肺组织病理学改变

2.3.2 肺组织病理评分 与 sham 组和 sepsis 组大鼠比较, sepsis+mtDNA 组大鼠的 ALI 评分更高, 且肺泡中性粒细胞浸润、透明膜形成、肺泡间质增宽更严重。然

而, sepsis+mtDNA+ODN 组较 sepsis+mtDNA 组大鼠的 ALI 评分显著下降。总体而言, 各组大鼠 ALI 评分 12 h 较 6 h 时均有上升。见表 1。

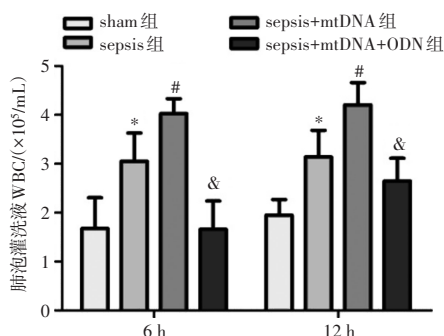
表 1 4 组大鼠肺组织病理评分比较

分

| 项目       | sham 组     |            | sepsis 组                  |                         | sepsis+mtDNA 组              |                         | sepsis+mtDNA+ODN 组            |                             |
|----------|------------|------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
|          | 6 h        | 12 h       | 6 h                       | 12 h                    | 6 h                         | 12 h                    | 6 h                           | 12 h                        |
| 总分       | 0.10±0.02  | 0.14±0.03  | 0.27±0.01 <sup>*</sup>    | 0.60±0.02 <sup>*</sup>  | 0.43±0.02 <sup>#</sup>      | 0.84±0.05 <sup>#</sup>  | 0.23±0.02 <sup>&amp;</sup>    | 0.40±0.03 <sup>&amp;</sup>  |
| 肺泡腔中性粒细胞 | 1.0(0~1.5) | 2.40±1.52  | 4.0(3.5~4.5) <sup>*</sup> | 13.40±1.82 <sup>*</sup> | 10.0(8.5~11.5) <sup>#</sup> | 25.40±3.85 <sup>#</sup> | 3.0(2.0~4.5) <sup>&amp;</sup> | 6.20±1.30 <sup>&amp;</sup>  |
| 肺间质中性粒细胞 | 13.20±2.77 | 16.00±3.54 | 24.40±2.07 <sup>*</sup>   | 38.40±1.67 <sup>*</sup> | 36.00±2.92 <sup>#</sup>     | 39.00±1.00 <sup>#</sup> | 23.60±2.30 <sup>&amp;</sup>   | 31.00±2.65 <sup>&amp;</sup> |
| 透明膜      | 2.40±1.14  | 3.40±2.88  | 7.20±0.84 <sup>*</sup>    | 20.40±4.16 <sup>*</sup> | 12.40±1.34 <sup>#</sup>     | 37.00±3.24 <sup>#</sup> | 7.60±1.67 <sup>&amp;</sup>    | 15.20±3.70 <sup>&amp;</sup> |
| 蛋白碎片     | 4.00±1.58  | 4.40±1.95  | 8.80±1.30 <sup>*</sup>    | 28.60±3.05 <sup>*</sup> | 10.40±1.14 <sup>#</sup>     | 37.20±2.95 <sup>#</sup> | 7.40±2.07 <sup>&amp;</sup>    | 14.20±3.49 <sup>&amp;</sup> |
| 肺泡间隔增宽   | 0.60±0.89  | 1.40±1.19  | 10.20±1.30 <sup>*</sup>   | 18.60±3.29 <sup>*</sup> | 16.40±1.14 <sup>#</sup>     | 29.80±4.92 <sup>#</sup> | 3.60±2.07 <sup>&amp;</sup>    | 14.00±2.55 <sup>&amp;</sup> |

注: \* 与 sham 组比较,  $P<0.05$ ; # 与 sepsis 组比较,  $P<0.05$ ; & 与 sepsis+mtDNA 组比较,  $P<0.05$

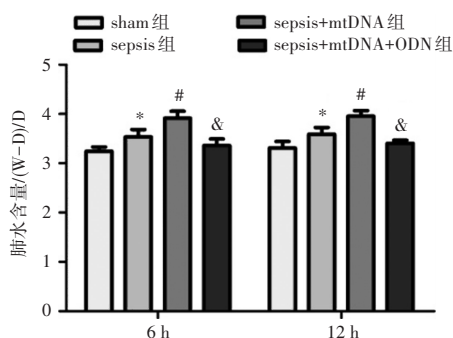
2.3.3 肺组织炎症反应 大鼠肺泡灌洗液 WBC sepsis+mtDNA 组较 sham 组和 sepsis 组升高 ( $P<0.05$ ), sepsis+mtDNA+ODN 组较 sepsis+mtDNA 组大鼠肺泡灌洗液 WBC 减少 ( $P<0.05$ ), 证实腹腔注射 mtDNA 可诱导肺组织炎症细胞的分泌和浸润, 而 ODN 预处理可减轻 mtDNA 诱导的肺组织炎症反应。见图 4。



注: \* 与 sham 组比较,  $P<0.05$ ; # 与 sepsis 组比较,  $P<0.05$ ; & 与 sepsis+mtDNA 组比较,  $P<0.05$

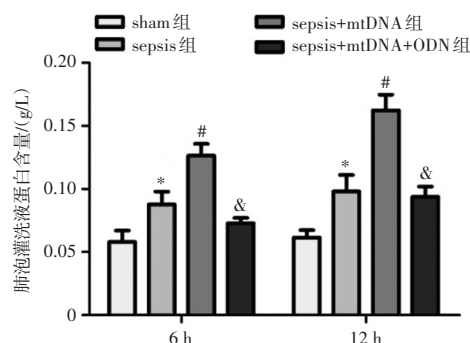
图 4 4 组大鼠肺泡灌洗液 WBC 水平比较

2.3.4 肺毛细血管通透性 Sepsis+mtDNA 组较 sham 组和 sepsis 组大鼠肺毛细血管通透性增加, 即肺水和肺泡灌洗液蛋白含量增高 ( $P<0.05$ )。而 ODN 预处理使 sepsis+mtDNA+ODN 组较 sepsis+mtDNA 组大鼠肺毛细血管通透性下降 ( $P<0.05$ )。见图 5、图 6。



注: \* 与 sham 组比较,  $P<0.05$ ; # 与 sepsis 组比较,  $P<0.05$ ; & 与 sepsis+mtDNA 组比较,  $P<0.05$

图 5 4 组大鼠肺水含量比较

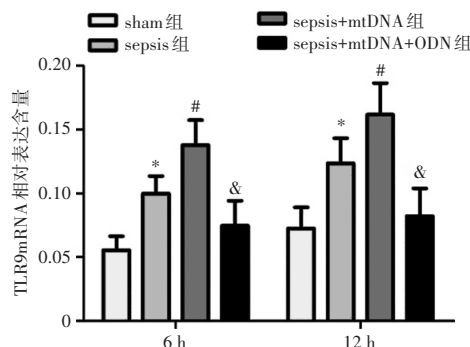


注: \* 与 sham 组比较,  $P<0.05$ ; # 与 sepsis 组比较,  $P<0.05$ ; & 与 sepsis+mtDNA 组比较,  $P<0.05$

图 6 4 组大鼠肺泡灌洗液蛋白含量比较

## 2.4 mtDNA 激活肺组织 TLR9/38 MAPK 通路

sepsis 组较 sham 组大鼠 TLR9/p38 MAPK 信号通路激活 ( $P<0.05$ )。sepsis+mtDNA 组较 sepsis 组 TLR9/p38 MAPK 信号通路表达进一步升高 ( $P<0.05$ )。与 sepsis+mtDNA 组比较, ODN 预处理可抑制 sepsis+mtDNA+ODN 组大鼠肺组织 TLR9/p38 MAPK 信号通路激活 ( $P<0.05$ )。见图 7、图 8。



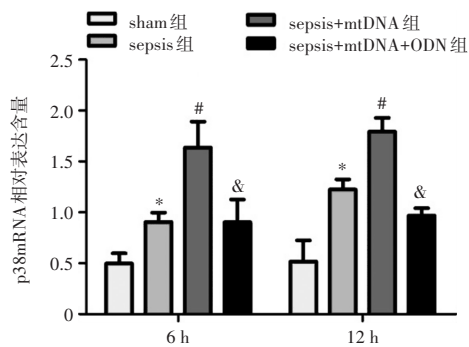
注: \* 与 sham 组比较,  $P<0.05$ ; # 与 sepsis 组比较,  $P<0.05$ ; & 与 sepsis+mtDNA 组比较,  $P<0.05$

图 7 4 组大鼠肺组织 TLR9 mRNA 相对表达含量比较

## 3 讨论

本研究分析大鼠血浆 mtDNA 水平与脓毒症及相关 ALI 的关系, 并探讨 TLR9 受体阻滞剂 ODN2088 对 mtDNA 所致脓毒症相关 ALI 的抑制作用。本研究结果

显示:(1) CLP 所致大鼠脓毒症与既往研究结果一致<sup>[21]</sup>; (2) 脓毒症及相关 ALI 严重程度与血浆 mtDNA 水平升高有关; (3) 腹腔注射 mtDNA 加重脓毒症大鼠 ALI; (4) TLR9 选择性抑制剂 ODN2088 减轻脓毒症及相关 ALI。本研究证实血浆 mtDNA 水平可预测脓毒症严重程度,且 TLR9 抑制剂可减轻脓毒症所致 ALI。



注: \* 与 sham 组比较,  $P < 0.05$ ; # 与 sepsis 组比较,  $P < 0.05$ ; & 与 sepsis+mtDNA 组比较,  $P < 0.05$

图 8 4 组大鼠肺组织 p38 mRNA 相对表达含量比较

mtDNA 与细菌和病毒 DNA 含有相同的 CpG 基序,可被表达在树突状细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞和其他抗原呈递细胞等免疫细胞的 TLR9 受体识别激活、促进促炎细胞因子释放<sup>[25-26]</sup>。此外,脓毒症早期病理过程即存在线粒体损伤和功能障碍,导致细胞凋亡并释放 mtDNA 到细胞外<sup>[11]</sup>。因此,mtDNA 作为一种内源性损伤分子,同脓毒症及相关 ALI 和病死率密切相关<sup>[27]</sup>。用脂多糖建立小鼠脓毒症模型腹腔注射 mtDNA 使血浆 mtDNA 水平显著升高,并与脓毒症严重程度相关<sup>[20]</sup>。此外,脓毒症患者血浆 mtDNA 水平较对照组明显升高,表明血浆 mtDNA 可能成为危重患者预测病死率的重要参考指标<sup>[28-29]</sup>。本研究进一步证实,脓毒症大鼠血浆 mtDNA 水平升高,腹腔注射 mtDNA 可增加脓毒症大鼠血浆 mtDNA 水平及病死率。

此外,mtDNA 诱导 TLR9 和 p38 受体激活对促炎细胞因子释放、中性粒细胞内流和肺组织血管通透性增加至关重要<sup>[30-32]</sup>。有研究发现,mtDNA 可激活中性粒细胞 TLR9/p38 MAPK 信号通路促进炎症因子释放,增加钙通道和 MAPK 磷酸化提高内皮细胞通透性<sup>[17]</sup>。同时,气管内或静脉注射 mtDNA 均可激活 TLR9/p38 MAPK 通路加重肺组织炎症反应<sup>[20,33]</sup>。因此,TLR9 受体在 mtDNA 介导的肺部炎症及损伤中具有重要意义。本研究采用 CLP 建立大鼠脓毒症模型,探讨 mtDNA 在脓毒症所致 ALI 的作用,发现血浆 mtDNA 可促进肺组织 TLR9/p38 MAPK 受体表达。然而,TLR9 受体阻滞剂 ODN2088 预处理大鼠,在降低血浆 mtDNA 水平同时,可抑制肺组织 TLR9/p38 MAPK 受体表达并减轻 ALI。

综上所述,本研究发现 mtDNA 在脓毒症及相关 ALI 中的作用以及 TLR9 受体阻滞剂减轻 mtDNA 所致肺损伤。进一步检测脓毒症患儿血浆 mtDNA 水平动态变化以及 TLR9 受体阻滞剂在脓毒症患者中的临床应用,为脓毒症的诊断、治疗提供新的方向。

## 参考文献:

- [1] SCHLICHTING D, MCCOLLAM J S. Recognizing and managing severe sepsis: a common and deadly threat [J]. South Med J, 2007, 100(6): 594-600.
- [2] 张明静, 王兴勇, 卢仲毅. 白藜芦醇对内毒素休克损伤大鼠 Th1/Th2 失衡的干预作用[J]. 儿科药理学杂志, 2003, 9(3): 1-4.
- [3] MARTIN G S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2012, 10(6): 701-706.
- [4] MATUSCHAK G M, LECHNER A J. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: pathophysiology and treatment [J]. Mo Med, 2010, 107(4): 252-258.
- [5] EICKMEIER O, SEKI H, HAWORTH O, et al. Aspirin-triggered resolvin D1 reduces mucosal inflammation and promotes resolution in a murine model of acute lung injury [J]. Mucosal Immunol, 2013, 6(2): 256-266.
- [6] DEUTSCHMAN C S, TRACEY K J. Sepsis: current dogma and new perspectives [J]. Immunity, 2014, 40(4): 463-475.
- [7] HARRINGTON J S, AMK C, NAKAHIRA K. Mitochondrial DNA in sepsis [J]. Curr Opin Crit Care, 2017, 23(4): 284-290.
- [8] HU Z D, XU J Q. Mitochondria and innate immunity [J]. Bing Du Xue Bao, 2011, 27(4): 395-401.
- [9] PATRUSHEV M, KASYMOV V, PATRUSHEVA V, et al. Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments [J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(24): 3100-3103.
- [10] BOUDREAU L H, DUCHEZ A C, CLOUTIER N, et al. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group II A-secreted phospholipase A2 to promote inflammation [J]. Blood, 2014, 124(14): 2173-2183.
- [11] KACZMAREK A, VANDENABEELE P, KRYSKO D V. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance [J]. Immunity, 2013, 38(2): 209-223.
- [12] KUNG C T, HSIAO S Y, TSAI T C, et al. Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels as predictors of outcome in severe sepsis patients in the emergency room [J]. J Transl Med, 2012 (100): 130. doi: 10.1186/1479-5876-10-130.
- [13] MCCARTHY C G, WENCESLAU C F, GOULOPOULOU S, et al. Circulating mitochondrial DNA and Toll-like receptor 9 are associated with vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats [J]. Cardiovasc Res, 2015, 107(1): 119-130.
- [14] HEMMI H, TAKEUCHI O, KAWAI T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA [J]. Nature, 2000, 408(6813): 740-745.
- [15] DYALL S D, BROWN M T, JOHNSON P J. Ancient invasions: from endosymbionts to organelles [J]. Science, 2004, 304(5668): 253-257.
- [16] ZHANG Q, ITAGAKI K, HAUSER C J. Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase [J]. Shock, 2010, 34(1): 55-59.
- [17] SUN S, SURSAL T, ADIBNIA Y, et al. Mitochondrial DAMPs increase endothelial permeability through neutrophil dependent and independent pathways [J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59989.



- [18] FANG W, CAI S X, WANG C L, et al. Modulation of mitogen-activated protein kinase attenuates sepsis-induced acute lung injury in acute respiratory distress syndrome rats [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(6): 9652-9658.
- [19] HU D, YANG X, XIANG Y, et al. Inhibition of Toll-like receptor 9 attenuates sepsis-induced mortality through suppressing excessive inflammatory response [J]. Cell Immunol, 2015, 295(2): 92-98.
- [20] ZHANG L, DENG S, ZHAO S, et al. Intra-peritoneal administration of mitochondrial DNA provokes acute lung injury and systemic inflammation via toll-like receptor 9 [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(9): E1425.
- [21] WICHTERMAN K A, BAUE A E, CHAUDRY I H. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal [J]. J Surg Res, 1980, 29(2): 189-201.
- [22] RITTIRSCH D, HUBER-LANG M S, FLIERL M A, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. Nat Protoc, 2009, 4(1): 31-36.
- [23] LI K, YANG J, HAN X. Ketamine attenuates sepsis-induced acute lung injury via regulation of HMGB1-RAGE pathways [J]. Int Immunopharmacol, 2016(34): 114-128.
- [24] SCHNEBERGER D, CALDWELL S, KANTHAN R, et al. Expression of Toll-like receptor 9 in mouse and human lungs [J]. J Anat, 2013, 222(5): 495-503.
- [25] MARTÍNEZ-CAMPOS C, BURGUETE-GARCÍA A I, MADRID-MARINA V. Role of TLR9 in Oncogenic virus-produced cancer [J]. Viral Immunol, 2017, 30(2): 98-105.
- [26] NOTLEY C A, JORDAN C K, MCGOVERN J L, et al. DNA methylation governs the dynamic regulation of inflammation by apoptotic cells during efferocytosis [J]. Sci Rep, 2017(7): 42204.
- [27] NAKAHIRA K, KYUNG S Y, ROGERS A J, et al. Circulating mitochondrial DNA in patients in the ICU as a marker of mortality: derivation and validation [J]. PLoS Med, 2013, 10(12): e1001577.
- [28] TIMMERMANS K, KOX M, SCHEFFER G J, et al. Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels, and markers of inflammation, shock, and organ damage in patients with septic shock [J]. Shock, 2016, 45(6): 607-612.
- [29] DI C V, WALKO T D, BOLA R A, et al. Plasma mitochondrial DNA--a novel DAMP in pediatric sepsis [J]. Shock, 2016, 45(5): 506-511.
- [30] BRANGER J, VAN DEN BLINK B, WEIJER S, et al. Anti-inflammatory effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia [J]. J Immunol, 2002, 168(8): 4070-4077.
- [31] NASH S P, HEUERTZ R M. Blockade of p38 map kinase inhibits complement-induced acute lung injury in a murine model [J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5(13-14): 1870-1880.
- [32] PEI Y H, CAI X M, CHEN J, et al. The role of p38 MAPK in acute paraquat-induced lung injury in rats [J]. Inhal Toxicol, 2014, 26(14): 880-884.
- [33] GU X, WU G, YAO Y, et al. Intratracheal administration of mitochondrial DNA directly provokes lung inflammation through the TLR9-p38 MAPK pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2015(83): 149-158.

(编辑:杨丹)

(收稿日期:2020-02-19 修回日期:2020-04-29)

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2021.03.002

· 论 著 ·

## 复方紫草汤对咪喹莫特所致银屑病小鼠的治疗作用

徐志立, 梁晗业, 边澈, 于彩娜 (辽宁中医药大学, 辽宁大连 116600)

**[摘要]**目的:探讨复方紫草汤对咪喹莫特所致银屑病小鼠的治疗作用。方法:选取昆明种小鼠 60 只,随机分为正常对照组,模型对照组,复方紫草汤高、中、低剂量组和甲氨蝶呤阳性对照组。造模及给药后,采用银屑病严重程度评分标准观察银屑病小鼠皮损变化情况,病理切片法观察皮损组织形态学变化,免疫组化法和 ELISA 法分别检测皮损内和血浆内肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的表达。结果:与模型组比较,复方紫草汤组小鼠银屑病样皮损症状缓解,疾病严重程度评分降低,表皮角质形成增殖减少,皮损内和血浆内 TNF- $\alpha$  表达减少。结论:本研究表明复方紫草汤可通过下调 TNF- $\alpha$  表达水平发挥缓解银屑病的作用。

**[关键词]**银屑病;咪喹莫特;复方紫草汤

**[中图分类号]**R363

**[文献标识码]**A

**[文章编号]**1672-108X(2021)03-0006-05

### Compound *Radix Arnebiae* Decoction on Mice with Psoriasis Induced by Imiquimod

Xu Zhili, Liang Hanyue, Bian Che, Yu Caina (Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Liaoning Dalian 116600, China)

**[Abstract]** **Objective:** To probe into the therapeutic effects of compound *Radix Arnebiae* decoction on mice with psoriasis induced by imiquimod. **Methods:** Sixty Kunming mice were extracted to be randomly divided into the normal control group, the model control group, compound *Radix Arnebiae* decoction high-dose, medium-dose and low-dose group and the methotrexate positive control group.

**作者简介:**徐志立(1972-),男,博士,副教授,硕士生导师,主要从事中药药理学研究,E-mail: xu\_zhili@126.com。