

中性粒细胞胞外诱捕网在热射病小鼠急性肝损伤中的作用及其机制

耿焱¹, 陈丽羽¹, 李茹², 马强², 彭娜^{3*}

¹解放军联勤保障部队第923医院消化内科, 广西南宁 530021; ²南方医科大学生物制药研究所, 广东广州 510515; ³南部战区总医院急诊科, 广东广州 510515

[中图分类号] R599.3

[文献标志码] A

[DOI]

10.11855/j.issn.0577-7402.2022.12.1209

[声明]

本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文]

耿焱, 陈丽羽, 李茹, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网在热射病小鼠急性肝损伤中的作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(12): 1209-1216.

[收稿日期] 2022-07-05

[录用日期] 2022-07-23

[上线日期] 2022-09-19

[摘要] **目的** 探讨中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)在热射病(HS)小鼠急性肝损伤发病中的作用及其机制。**方法** 56只SPF级雄性C57BL/6小鼠按随机数字表法随机分为对照组(予以假加热, $n=8$)、热打击(HS)组($n=32$)、氯脒(CA)组(给予假加热及CA预处理, $n=8$)及热打击+氯脒预处理组(HS+CA组, $n=8$)4组; HS组进一步按热打击结束后的时间点分为4个亚组, 分别为HS 0h组、HS 3h组、HS 6h组和HS 9h组, 每组8只。另取48只C57BL/6小鼠, 随机分为对照组、CA组、HS(9h)组和HS+CA组, 每组12只, 用于观察216h生存率。通过人工气候舱制备热打击小鼠模型, 监测小鼠直肠温度(T_r), 记录 T_r 达到42.9℃的时间。于热打击结束后根据分组时间点处死小鼠, 采用全自动生化分析仪测定血清谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性, HE染色观察肝组织病理损伤情况, 试剂盒检测血浆游离DNA和髓过氧化物酶(MPO)-DNA复合物浓度, 激光共聚焦显微镜观察肝组织瓜氨酸化组蛋白(Cit H3)和MPO的表达, ELISA法测定肝脏组织匀浆IL-1 β 浓度, Western blotting检测肝组织Nlrp3炎性小体激活水平。**结果** HS+CA组与HS组在热打击结束时热暴露时间和核心体温上升速率比较差异均无统计学意义($P>0.05$), 但HS+CA组的生存时间与HS组相比延长($P<0.05$)。热打击结束后3h、6h和9h, HS小鼠血清ALT和AST活性, 肝组织病理评分, 血浆游离DNA和MPO-DNA浓度, 以及肝组织Cit H3和MPO水平均随时间呈进行性升高, 且明显高于对照组($P<0.001$)。肝组织HE染色显示, 与HS组比较, HS+CA组肝细胞变性明显减轻, 炎症明显缓解, 肝窦少量淤血, 无出血。抑制NETs释放可显著缓解热应激诱导的肝损伤(HS+CA组 vs. HS 9h组, $P<0.001$)。生存分析显示, HS+CA组小鼠生存率高于HS组($\chi^2=4.719$, $P<0.05$)。HS+CA组Nlrp3和cleaved caspase-1蛋白表达水平, 以及肝组织IL-1 β 表达水平低于HS组($P<0.001$)。**结论** NETs在HS肝损伤的发病中起重要作用, 其机制可能是通过激活Nlrp3炎性小体/IL-1 β 信号通路介导热应激肝损伤。

[关键词] 热射病; 中性粒细胞; 胞外诱捕网; 肝功能不全

The role and mechanism of neutrophil extracellular traps in the acute liver injury of heatstroke mice

Geng Yan¹, Chen Li-Yu¹, Li Ru², Ma Qiang², Peng Na^{3*}

¹Department of Gastroenterology, the 923rd Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese PLA, Nanning, Guangxi 530021, China

²Institute of Biopharmacy, School of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China

³Department of Emergency, General Hospital of Southern Theater Command of Chinese PLA, Guangzhou, Guangdong 510515, China

[基金项目] 广西省自然科学基金重点项目(2017GXNSFDA198051)

[作者简介] 耿焱, 医学博士, 副主任医师, 主要从事热射病肝损伤方面的研究

[通信作者] 彭娜, E-mail: pnatz@163.com

*Corresponding author, E-mail: pnatz@163.com

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Province (2017GXNSFDA198051)

[Abstract] Objective To investigate the role and mechanism of neutrophil extracellular traps (NETs) in acute liver injury from heatstroke (HS) mouse model. **Methods** Fifty-six C57BL/6 mice were randomly (random number table) assigned into sham heated control group (control group, $n=8$), sham heated with Chlorine amidine (CA) treatment group (CA group, $n=8$), heatstroke group (HS, $n=32$), and heatstroke with CA treatment group (HS+CA, $n=8$). In the HS group, after heat-shock treatment, mice were further subgrouped into HS 0 h, HS 3 h, HS 6 h, and HS 9 h ($n=8$ /subgroup). Another forty-eight mice were randomized into the control group, CA group, HS(9 h) group, and HS+CA group ($n=12$ /group). We tracked the survival rate of these mice up to 216 h. Mice were prepared with the pre-warm chamber to initiate HS. The change in rectum temperature (Tr) was monitored and the time point reaching 42.9 °C was recorded. At the end of heat stress, the mice were sacrificed according to the group time point, and the serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities were measured by the automatic biochemical analyzer. HE staining was used to observe the pathological injury of liver tissue. Plasma-free DNA and myeloperoxidase (MPO)-DNA complex concentrations were detected by the kit. The expression of citrullinated histone (Cit H3) and MPO in liver tissue was observed by a laser confocal microscope. The concentration of IL-1 β in liver tissue homogenate was determined by ELISA. The activation level of Nlrp3 inflammasome in liver tissue was detected by Western blotting. **Results** There was no significant difference in heat exposure time and core body temperature rise rate between HS+CA group and HS group at the end of heat shock ($P>0.05$), but the survival time of HS+CA group was longer than that of HS group ($P<0.05$). At 3 h, 6 h, and 9 h after heat shock, the activities of serum ALT and AST, and the pathological scores of liver tissue increased progressively with time and were significantly higher than those in control group ($P<0.001$). At 3 h, 6 h, and 9 h after heat shock, the concentrations of plasma-free DNA and MPO-DNA, the levels of Cit H3 and MPO in liver tissue increased progressively with time and were significantly higher than those in control group ($P<0.001$). HE staining of liver tissue showed that, compared with HS group, the degeneration of hepatocytes in HS+CA group was significantly alleviated, inflammation was significantly alleviated, and there was little blood stasis in hepatic sinuses without bleeding. Inhibition of NETs release significantly alleviated heat stress-induced liver injury (HS+CA group vs. HS 9 h group, $P<0.001$). Survival analysis showed that the survival rate of mice in HS+CA group was higher than that in HS group ($\chi^2=4.719$, $P<0.05$). The expression levels of Nlrp3 and cleaved caspase-1 and IL-1 β in liver tissue of HS+CA group were lower than those in HS group ($P<0.001$). **Conclusion** NETs may play an important role in the pathogenesis of HS liver injury through the Nlrp3 inflammasome/IL-1 β signal pathway.

[Key words] heat stroke; neutrophil; extracellular traps; hepatic insufficiency

热射病(heatstroke, HS)是最严重的环境热病,救治难度大,病死率为10%~30%,且随着全球热浪袭击频率和强度的增加,其病死率呈继续上升趋势,一旦发生大规模HS,将对公共健康产生灾难性影响^[1]。急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)是HS的常见并发症,但具体发病机制目前尚不完全清楚^[1-7]。由于缺乏确切有效的治疗措施,ALF仍然是从初始热打击中幸存下来的HS患者的主要死亡原因之一^[1-2]。动物研究证实,HS时肝组织存在多形核中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)浸润,浸润水平与肝损伤程度呈正相关,推测其可能在急性肝损伤(acute liver injury, ALI)的发生中起重要作用,但具体机制尚不清楚^[3]。中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)是由PMN释放到胞外的以DNA为骨架,富含髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、组蛋白及弹性蛋白酶等多种PMN来源蛋白的网状结构,在PMN的致病机制中起核心作用。NETs的主要成分为DNA, MPO-DNA是NETs的特征性复合物,血浆游离DNA浓度和MPO-DNA浓度均常用于检测外周

血NETs含量^[4-6]。以血浆游离DNA和MPO-DNA复合物等为NETs的标志物,越来越多的研究证实NETs在多种因素介导的肝损伤发病中起重要作用,通过药物抑制、基因敲除等方法抑制NETs释放对肝损伤具有保护作用^[8-10],但在HS肝损伤领域的研究甚少。基于NETs介导多种诱因所致肝损伤的报道,有理由推测NETs也可能在HS肝损伤发病机制中发挥作用。本研究利用前期改良的小动物HS模型^[11-12],在更接近自然状态的条件观察NETs在HS小鼠ALI发病中的作用,并初步探索其相关机制,为深入研究HS肝损伤的可能机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要仪器 SPF级雄性C57BL/6小鼠104只,6~8周龄,体重20~25 g,由南方医科大学实验动物中心提供(合格证号SYXK2016-0167),为避免雌激素对热打击发生及脏器损伤的影响^[13],实验全部选用雄性小鼠。环境温度23 °C,湿度55%±5%,12 h昼/夜循环,提供啮齿动物标准饮食,小鼠自由进食、饮水。模拟热气候动物舱由

南方医科大学公共卫生与热带卫生学学院提供。Powlalr 8sp生理记录仪购自澳大利亚ADInstruments公司。实验动物的相关方案通过动物伦理学委员会批准(批准号2018041003)。实验过程符合国家和单位有关实验动物的管理和使用规定。

1.2 实验动物分组及给药 56只C57BL/6小鼠按随机数字表法分为对照组(予以假加热, $n=8$)、氯胺(chlorine amidine, CA)组(予以假加热及CA预处理, $n=8$)、热打击组(HS组, $n=32$)、热打击+CA预处理组(HS+CA组, $n=8$)共4组, 其中HS组进一步按热打击结束后的时间点分为4个亚组, 分别为热打击后0 h、3 h、6 h和9 h组(HS 0 h、3 h、6 h和9 h组), 每组8只。CA预处理组和HS+CA组于建模开始前即刻予CA(Cayman, 美国, 1373232-26-8)腹腔注射1次, 剂量为1mg/kg。HS组和HS+CA组小鼠接受热打击, 对照组和CA组小鼠在实验期间室温饲养, 不予热打击。热打击结束后, HS组各个亚组分别在热打击后的0 h(HS 0 h组)、3 h(HS 3 h组)、6 h(HS 6 h组)和9 h(HS 9 h组)处死留取标本, HS+CA组在热打击结束后9 h处死留取标本, 对照组和CA组也在同一时间处死留取标本。另备48只C57BL/6小鼠, 随机分为对照组、CA组、HS(9 h)组和HS+CA组, 每组12只, 用于观察216 h生存率。

1.3 HS模型制备 参考前期实验建立的方法^[11-12,14-15]构建清醒状态热打击小鼠模型, 具体如下: 热打击前将高温舱预热到30℃, 将HS组与HS+CA组小鼠置于预热到30℃的仿真热气候动物舱, 于30 min内将舱内温度升至39℃, 湿度65%。每隔10 min将小鼠连接Powlalr 8sp生理记录仪, 直肠内放置热电偶, 记录直肠温度(T_r)用于代表核心体温(T_c)。在 T_r 达到42.9℃后将小鼠从气候舱中取出。对照组和CA组小鼠接受相同的处理, 但不予热打击。热打击期间, 小鼠禁食、禁水, 热打击结束后, 小鼠恢复进食、饮水, 放回原饲养环境中。

1.4 观察指标

1.4.1 热应激计算方法 参考Leon等^[15]的方法, 通过量化方法对比小鼠热应激反应的异同。以热打击开始到 T_r 达到42.9℃的时间代表热暴露时间。核心体温上升速率($\%$)=(42.9-基线核心体温)/总热暴露时间 \times 100%。

1.4.2 血浆及肝脏组织NETs含量检测 用血浆游离DNA和MPO-DNA复合物含量代表血浆中NETs含量。血浆游离DNA含量采用试剂盒(Quant-iTTM Pico Green[®] ds DNA, Invitrogen, 美国)按说明书步骤检测。血浆MPO-DNA复合物含量检测参考Huang等^[4]的方法, 采用小鼠MPO检测ELISA试剂盒(Hycult

Biotech, 荷兰)按说明书步骤捕获血浆中的MPO-DNA复合物, 再采用细胞死亡检测试剂盒(Roche, 瑞士)按说明书步骤检测MPO-DNA复合物, 以样品孔与对照孔405 nm吸光度的比值代表MPO-DNA复合物的相对含量。肝脏组织中NETs含量检测参考Yipp等^[16]的方法, 用瓜氨酸化组蛋白3(citrullinated histone, Cit H3)含量代表NETs含量, 利用兔抗Cit H3一抗(Sigma, 美国)标记, 通过免疫组化SP法标志肝脏组织冷冻切片中的Cit H3, 浓度为1:1000, 二抗为FITC标记的羊抗兔IgG(Sigma, 美国), 细胞核染色选择Hoechst33258(蓝色荧光, 碧云天, 中国), 在激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光表达情况, 用Image-Pro Plus 6.0软件比较绿色荧光强度, 代表NETs含量。

1.4.3 肝脏病理分析 剖取小鼠肝右叶1/3用于病理分析。按常规方法制备石蜡切片, 进行苏木精-伊红(HE)染色, 将所有切片随机编码后请病理医师在光学显微镜下进行盲法病理损伤评分。病理损伤评分参照Heijnen等^[17]的标准。

1.4.4 生化及炎症因子测定 采用心脏采血法留取血液样本, 常规方法分离血清。血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)水平采用全自动生化分析仪(Hitachi 7600, 日本日立公司)检测。肝脏组织匀浆中IL-1 β 水平采用酶联免疫吸附试剂盒(RayBiotech, 美国)按照说明书步骤检测。

1.4.5 PMN浸润程度检测 参考Wree等^[18]的报道, 利用兔抗MPO一抗(Sigma, 美国), 通过免疫组化SP法标志肝脏组织冷冻切片中的PMN, 浓度为1:1000, 二抗为罗丹明标记的羊抗兔IgG(Sigma, 美国), 细胞核染色选择Hoechst33258(蓝色荧光, 碧云天, 中国), 在激光共聚焦显微镜下计数每个高倍镜视野下PMN(红色荧光)的数量, 代表PMN浸润程度。

1.4.6 Western blotting检测通路相关蛋白的表达 从肝组织匀浆中提取总蛋白, 加入兔抗核苷酸寡聚化结构域(nucleotide-binding oligomerization domain, NOD)样含pyrin功能域受体家族(NOD-like receptor pyrin domain containing, Nlrp)3、pro-caspase-1和cleaved caspase-1一抗(Abcam, 美国), 二抗为HRP标记的羊抗兔IgG(Abcam, 美国), 常规Western blotting方法检测蛋白表达情况。UVI凝胶成像系统摄像, Image-Pro Plus 6.0软件分析条带灰度值, 用与 β -actin的比值代表相对表达量。每个实验重复3次, 结果取均值。

1.5 统计学处理 采用GraphPad Prism 9.0和SPSS 23.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 在

方差齐性基础上应用单因素方差分析比较各项测量值及检测指标的总体差异,进一步两两比较采用Bonferroni法;采用Kaplan-Meier生存曲线和Log-Rank检验进行生存分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠热应激反应特征 HS组与HS+CA组小鼠的热暴露时间和Tr上升速率均明显高于对照组与CA组($P < 0.001$),而HS组与HS+CA组小鼠之间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示热打击条件诱导小鼠Tr逐渐上升至突破体温调节阈,而未接受热打击的小鼠体温保持稳定(表1)。

表1 各组小鼠热应激反应特征定量分析($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Responses in mice subjected to heat stress in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	热暴露时间(min)	Tr上升速率(%)
对照组(n=8)	0	0
CA组(n=8)	0	0
HS组(n=32)	113.23 ± 17.43 ⁽¹⁾	4.15 ± 0.08 ⁽¹⁾
HS+CA组(n=8)	110.58 ± 20.37 ⁽¹⁾	4.11 ± 0.06 ⁽¹⁾
F	185.9	18195
P	0.000	0.000

CA. 氯眯; HS. 热打击; Tr. 直肠温度; 与对照组比较, (1) $P < 0.001$

2.2 热应激对小鼠肝脏组织损伤、PMN浸润和NETs释放的影响 HS 0 h组在HS起始阶段的组织病理评分及血清ALT、AST水平与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。恢复期Tr恢复正常,但HS 3 h、6 h和9 h组的肝组织病理评分,血清ALT、AST水平,血浆游离DNA含量和MPO-DNA复合物相对含量均明显高于对照组($P < 0.001$,图1A、B),且随时间延长呈进行性加重。相关分析显示,血浆游离DNA含量与MPO-DNA复合物含量呈显著正相关($P < 0.001$,图1C),提示血浆游离DNA含量的变化主要来源于NETs,NETs可能参与了HS肝损伤的发生。

肝组织PMN浸润水平(图2A)和NETs含量(图2B)也表现出类似的时程变化。对照组、HS 0 h组、HS 3 h组、HS 6 h组、HS 9 h组的红色荧光数量(代表PMN浸润程度)分别为(5.31 ± 0.48)个、(10.17 ± 2.66)个、(22.87 ± 7.91)个、(38.64 ± 10.08)个和(58.39 ± 14.91)个,HS 9 h组的PMN浸润程度明显高于其他各组($P < 0.001$)。对照组、HS 0 h组、HS 3 h组、HS 6 h组、HS 9 h组的绿色荧光面积占比(代表Cit H3含量)分别为(4.9 ± 0.7)%、(7.3 ± 0.8)%、(15.1 ± 1.1)%、(37.1 ± 2.1)%和(51.7 ± 3.1)%,HS 9 h组的NETs含量明显高于其他各组($P < 0.001$)。进一步提示NETs可能参与了HS肝损伤的发生。

2.3 抑制NETs释放对HS小鼠肝损伤的保护作用

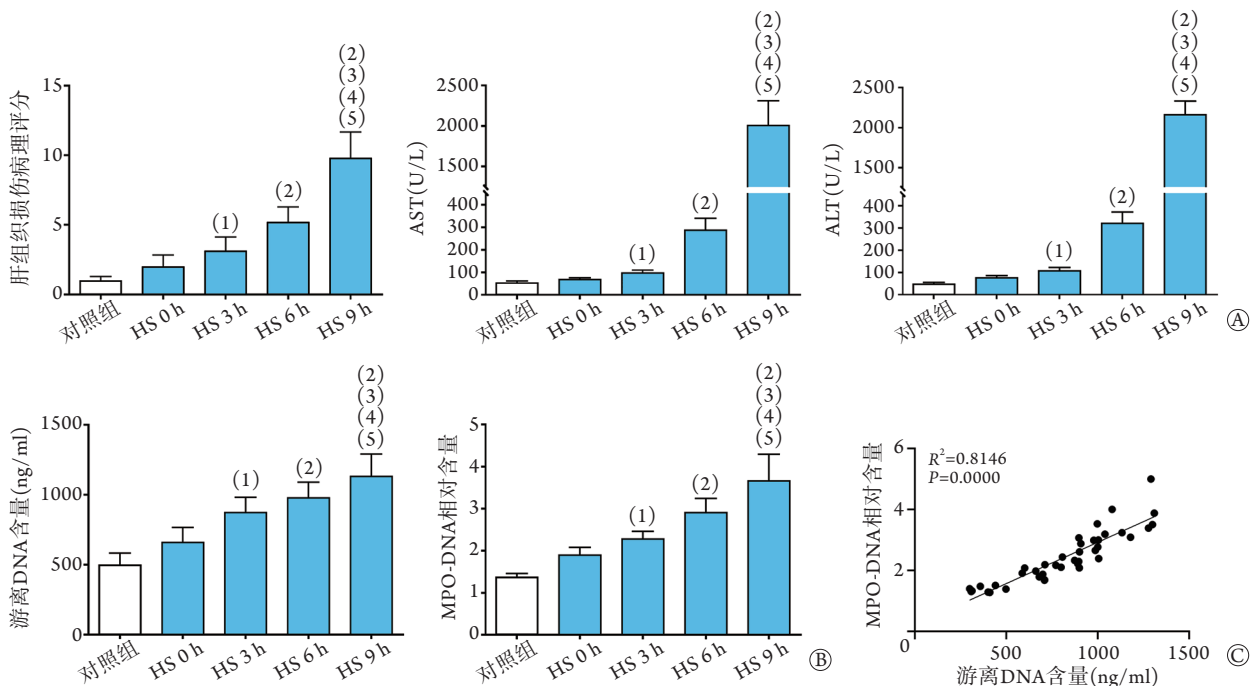


图1 热打击对小鼠肝损伤及NETs相关指标的影响(n=8)

Fig.1 The influence of heat stress on the level of liver injury and NETs releases of mice (n=8)

HS. 热打击; ALT. 谷丙转氨酶; AST. 谷草转氨酶; MPO. 髓过氧化物酶; A. 肝损伤指标; B. NETs相关指标; C. 血浆MPO-DNA复合物浓度与血浆游离DNA浓度的相关性; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.001$; 与HS 0 h组比较, (3) $P < 0.001$; 与HS 3 h组比较, (4) $P < 0.001$; 与HS 6 h组比较, (5) $P < 0.001$

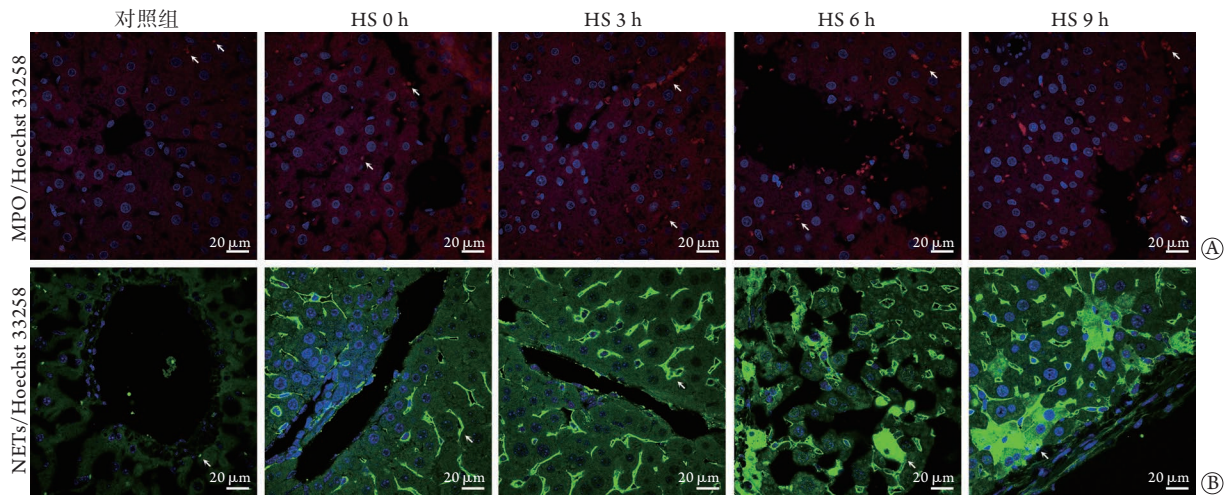


图2 热打击对小鼠肝组织PMN浸润和NETs释放水平的影响(激光共聚焦显微镜, n=8)

Fig.2 The influence of heat stress on the level of PMN infiltration and NETs releases in liver tissues of mice (laser confocal microscope, n=8)

HS. 热打击; MPO. 髓过氧化物酶; NETs. 中性粒细胞胞外诱捕网; PMN. 多形核中性粒细胞; A. 肝组织PMN浸润(白色箭头所示); B. 肝组织NETs(白色箭头所示); PMN为红色荧光, NETs为绿色荧光, 细胞核为蓝色荧光

对照组、CA组、HS组和HS+CA组的绿色荧光面积占比(代表Cit H3含量)分别为(5.3 ± 0.8)%、(4.7 ± 0.5)%、(56.1 ± 5.3)%和(10.7 ± 1.8)%, HS+CA组的NETs含量较HS组明显下降(P<0.001, 图3A)。HS+CA组的血浆游离DNA和MPO-DNA复合物含量均较HS组明显下降(P<0.001, 表2)。光镜病理观察发现, HS组出现大量肝细胞肿胀, 呈空泡样及气球样变性, 部分坏死, 肝窦淤血及出血, 炎性细胞浸润明显。与HS组比较, HS+CA组肝细胞变性明显减轻, 炎症明显缓解, 肝窦少量淤血, 无出血(图3B)。HS+CA组血清ALT和AST活性较HS组明显下降(P<0.001, 表2)。对照组和CA组小鼠实验期间未发生死亡, HS组小鼠死亡率为66.7%(8/12), HS+CA组小鼠死亡率为25.0%(3/12)。生存分析显示, HS+CA组小鼠生存率高于HS组($\chi^2=4.719$, P<0.05, 图3C)。

2.4 抑制NETs释放对肝组织Nlrp3/IL-1 β 炎性小体信号通路的影响 与CA组比较, HS组肝组织匀浆中IL-1 β 水平明显升高(P<0.001, 表2); 与HS组

比较, HS+CA组肝组织匀浆中IL-1 β 水平明显降低(P<0.001, 表2), 提示CA腹腔注射预处理可明显抑制HS小鼠肝组织IL-1 β 水平的升高。以Nlrp3表达上调及caspase-1切割激活作为Nlrp3炎性小体激活的标志, 如图4所示, 与CA组比较, HS组的Nlrp3表达明显上调, caspase-1切割激活(P<0.001), CA预处理可明显抑制HS诱导的肝组织Nlrp3炎性小体激活(P<0.001)。

3 讨论

肝脏是HS常见的损伤部位, HS病例几乎均存在肝损伤的生化或病理学证据, 但由于HS肝损伤的机制尚不完全清楚, 缺乏有效的特异性治疗手段, 所以尽管目前采取积极的降温和脏器支持措施^[19], ALF在HS患者中仍频繁出现, 是HS患者的主要死亡原因之一^[1,20]。本研究利用更接近自然状态的清醒的热打击小鼠模型, 证实NETs在HS肝损伤的发病机制中起重要作用, 其机制可能与激活Nlrp3/IL-1 β 信号通路有关。

表2 各组小鼠肝组织损伤评分、NETs释放水平和IL-1 β 水平比较($\bar{x}\pm s$, n=8)

Tab.2 Comparison of liver tissue injury, NETs release level and IL-1 β level in each group of mice ($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	游离DNA (ng/ml)	MPO-DNA复合物含量(倍数)	组织损伤评分(分)	ALT (U/L)	AST (U/L)	IL-1 β (pg/mg)
对照组	449.81 ± 48.63	1.98 ± 0.07	0.35 ± 0.07	57.19 ± 6.26	49.11 ± 5.97	1.13 ± 0.04
CA组	458.26 ± 45.77	1.91 ± 0.06	0.33 ± 0.08	58.00 ± 5.90	47.31 ± 6.23	1.16 ± 0.03
HS组	1203.17 ± 158.26 ⁽²⁾⁽⁴⁾	4.07 ± 0.12 ⁽²⁾⁽⁴⁾	12.11 ± 1.91 ⁽²⁾⁽⁴⁾	2011.03 ± 226.00 ⁽²⁾⁽⁴⁾	2239.37 ± 208.31 ⁽²⁾⁽⁴⁾	6.10 ± 0.08 ⁽²⁾⁽⁴⁾
HS+CA组	674.38 ± 87.08 ⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁵⁾	2.29 ± 0.09 ⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁵⁾	3.78 ± 0.21 ⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁵⁾	118.26 ± 16.80 ⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁵⁾	106.71 ± 19.23 ⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁵⁾	2.83 ± 0.15 ⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁵⁾

CA. 氯胺; HS. 热打击; ALT. 谷丙转氨酶; AST. 谷草转氨酶; MPO. 髓过氧化物酶; 与对照组比较, (1)P<0.05, (2)P<0.001; 与CA组比较, (3)P<0.05, (4)P<0.001; 与HS组比较, (5)P<0.001

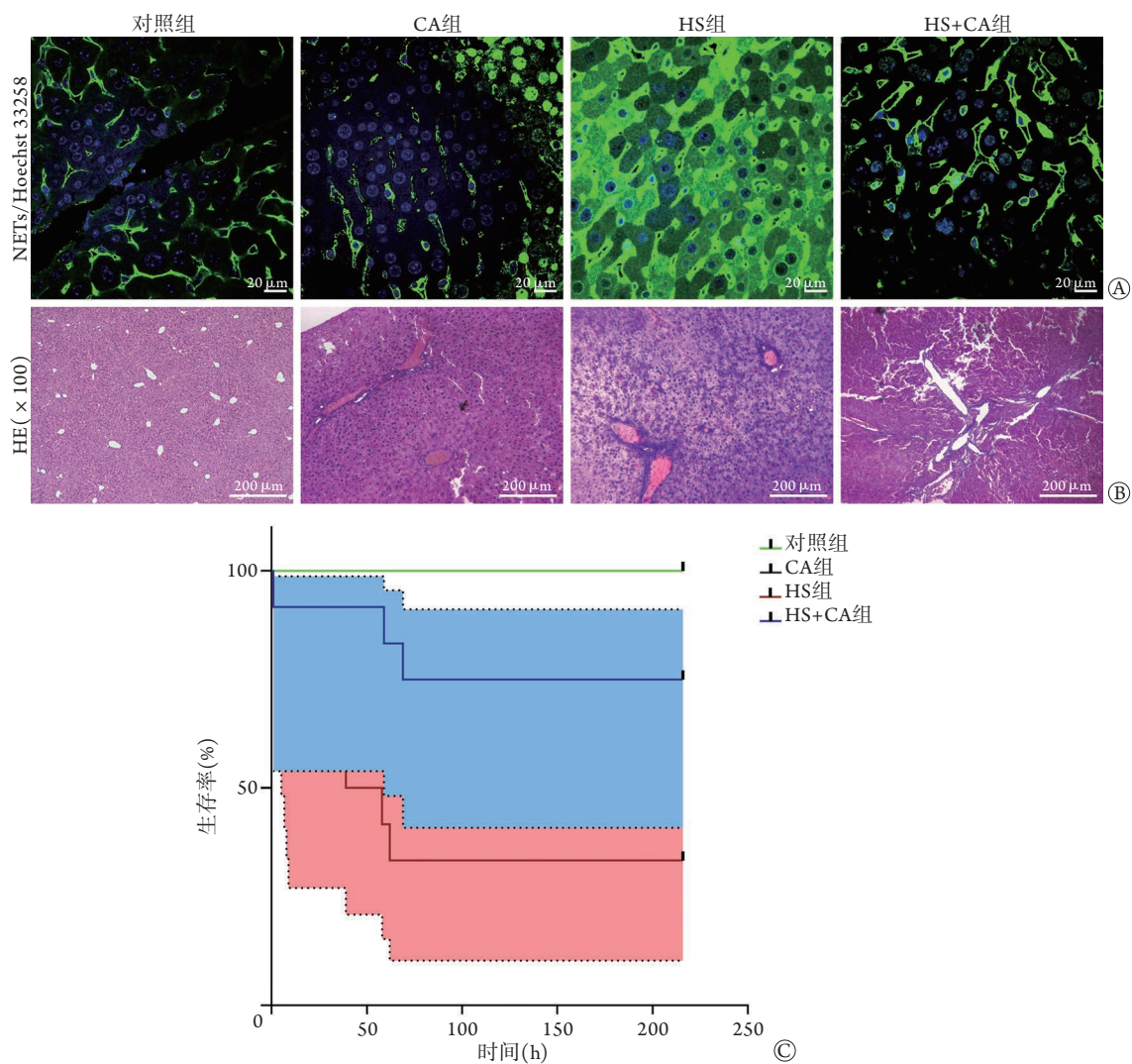


图3 抑制NETs释放对各组小鼠肝损伤的影响

Fig.3 Inhibition of NETs releases could ameliorate liver injury in HS mice

CA. 氯胺; HS. 热打击; NETs. 中性粒细胞胞外诱捕网; A. 肝组织NETs浓度(激光共聚焦显微镜, NETs为绿色荧光, 细胞核为蓝色荧光, $n=8$); B. 肝组织HE染色($\times 100$, $n=8$); C. Kaplan-Meier生存分析($n=12$)

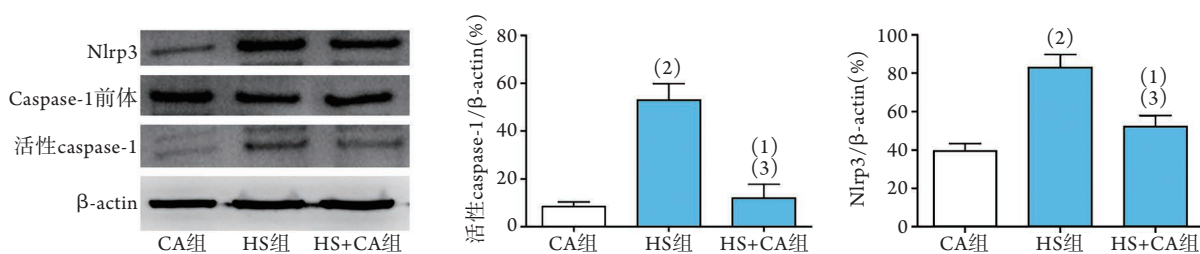


图4 HS组、HS+CA组及CA组小鼠肝组织Nlrp3炎性小体激活(Western blotting, $n=8$)

Fig.4 NETs attributed to HS induced Nlrp3 inflammasomes activation in liver tissues (Western blotting, $n=8$)

CA. 氯胺; 与CA组比较, (1) $P<0.05$, (2) $P<0.001$; 与HS组比较, (3) $P<0.001$

本研究中使用了NETs抑制剂CA, 为避免CA干扰小鼠热应激反应, 影响实验结果的可靠性, 首先观察了CA预处理对于小鼠热应激反应的影响, 结果显示, CA预处理不会干扰小鼠的热应激反应。

有研究显示, HS患者血清ALT通常在热应激发生后30 min升高, 3~4 d达到峰值^[21]。本研究中小鼠

热打击模型也观察到类似热应激反应, 小鼠在刚结束热打击时(HS 0 h组)肝损伤并不明显, 但随时间延长呈进行性加重, 在热打击结束后9 h(HS 9 h组)达到峰值, 提示HS肝损伤可能不仅是高热直接物理损伤的结果。进一步研究发现, 伴随热打击小鼠肝损伤的进展, 肝组织和外周循环血中的NETs含

量,以及肝组织PMN浸润程度均呈进行性增加,提示NETs可能参与了HS肝损伤的发生。

PMN是组织损伤固有免疫应答中的关键环节,既可参与宿主本身的防御功能,又可对致炎因素产生过度反应而加重组织损伤,在多种因素介导的肝损伤发病机制中起核心作用^[8,10]。NETs是由PMN释放到胞外的包含多种致炎物质的网状结构,不但可增强PMN的免疫功能,还可使PMN在死亡后继续发挥致炎作用^[20]。尽管NETs最早在感染性炎症中被发现,但越来越多的研究证实,NETs在非感染性炎症中也起到广泛且重要的作用^[22]。von Meijenfeldt等^[23]的研究证实,ALF患者的肝组织中高表达NETs标志物Cit H3,并发现NETs标志物水平与ALF预后不良呈正相关,推测其机制为NETs促进肝组织的炎症反应,激活止血系统,从而加重肝脏缺血性损伤。肽酰基精氨酸脱亚氨基酶4(peptidyl arginine deiminase 4, PAD4)介导染色质的去致密化和释放,在NETs的释放过程中起核心作用。作为应用最为广泛的PAD抑制剂之一,CA生物利用度高,可有效抑制体内PAD4活性,从而抑制NETs的释放^[24]。van der Windt等^[10]证实,非酒精性脂肪肝患者血清NETs标志物MPO-DNA显著升高,通过DNase或敲除PAD4基因抑制NETs生成,可显著缓解非酒精性脂肪肝小鼠的肝脏炎症反应。Zhang等^[25]的研究显示,肝脏缺血再灌注模型小鼠外周血NETs标志物游离DNA和肝组织NETs标志物Cit H3浓度显著增高,诱导NETs形成的关键酶PAD4的mRNA表达水平也显著增高,NETs表达水平与肝损伤指标成正相关。Duarte等^[26]证实,通过转基因技术抑制NETs生成,可显著缓解肝脏缺血再灌注模型小鼠的肝损伤,推测其机制可能为抑制缺血再灌注介导的炎症反应。Huang等^[4]证实,利用PAD4抑制剂抑制NETs生成,对于肝脏缺血再灌注模型小鼠的肝损伤具有显著的保护作用。尽管越来越多的研究证实NETs在多种因素介导的肝损伤发病机制中起重要作用^[23,25-31],但对热应激情况下NETs在肝损伤发病机制中的作用目前尚无报道。本研究结果显示,热打击小鼠外周血和肝组织NETs标志物含量显著增加,且随着肝损伤进展呈进行性加重。NETs抑制剂CA对于热打击小鼠的肝损伤有显著保护作用,表现为肝组织病理损伤改善及血清ALT、AST活性显著下降,且可提高热打击小鼠的生存率,提示NETs在HS肝损伤的发生中起重要作用。

NETs介导肝损伤的机制目前尚不完全清楚。NETs表面富含PMN功能蛋白,不但具有直接的细胞毒性作用,还具有很强的促炎效应,能激活肝巨噬细胞和PMN,释放炎症介质,加重肝损伤^[4]。随

着对NETs促炎机制的深入研究,NETs与Nlrp3炎性小体的关系受到越来越多的关注。Wright等^[32]的研究证实,NETs可通过其组分抗菌肽LL37激活Nlrp3炎性小体,促进炎症反应,介导脏器损伤。Yu等^[33]的研究显示,慢性乙型肝炎患者在NETs释放能力下降的同时,肝组织Nlrp3炎性小体的活化也明显降低。已有研究证实,Nlrp3炎性小体/IL-1 β 信号通路在HS肝损伤的发病机制中起重要作用^[3],因此,我们进一步研究了Nlrp3炎性小体/IL-1 β 信号通路在NETs介导HS肝损伤中的作用。结果显示,抑制NETs生成可显著抑制HS诱导的肝组织Nlrp3炎性小体激活,降低肝组织IL-1 β 浓度,提示NETs可能通过Nlrp3炎性小体/IL-1 β 信号通路介导HS肝损伤。

本研究的局限主要在于:(1)尽管CA是目前使用最为广泛的PAD抑制剂,可有效抑制NETs的生成,但使用转基因动物可进一步增加研究结果的可信度;(2)NETs的功能与PMN的表型关系密切,本研究缺乏热打击对于PMN表型影响的相关内容;(3)对于NETs与Nlrp3炎性小体/IL-1 β 信号通路关系的研究尚停留在现象层面,缺乏多层次的干预研究。

综上所述,NETs在HS肝损伤的发生中起重要作用,其机制可能是通过激活Nlrp3炎性小体/IL-1 β 信号通路促进炎症反应、加重组织损伤,进一步开展相关研究有助于深入阐明HS肝损伤的机制。

【参考文献】

- [1] Epstein Y, Yanovich R. Heatstroke[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(25): 2449-2459.
- [2] Garcin JM, Bronstein JA, Cremades S, et al. Acute liver failure is frequent during heat stroke[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(1): 158-159.
- [3] Geng Y, Ma Q, Liu YN, et al. Heatstroke induces liver injury via IL-1 β and HMGB1-induced pyroptosis[J]. *J Hepatol*, 2015, 63(3): 622-633.
- [4] Huang H, Tohme S, Al-Khafaji AB, et al. Damage-associated molecular pattern-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury[J]. *Hepatology*, 2015, 62(2): 600-614.
- [5] Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönemarker U, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis[J]. *Nat Med*, 2009, 15(6): 623-625.
- [6] Masuda S, Nakazawa D, Shida H, et al. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers[J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 459: 89-93.
- [7] Bouchama A, Abuyassin B, Lehe C, et al. Classic and exertional heatstroke[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2022, 8(1): 8.
- [8] Cai SY, Boyer JL. The role of inflammation in the mechanisms of bile acid-induced liver damage[J]. *Dig Dis*, 2017, 35(3): 232-234.

- [9] Cai SY, Ouyang XS, Chen YL, *et al.* Bile acids initiate cholestatic liver injury by triggering a hepatocyte-specific inflammatory response[J]. *JCI Insight*, 2017, 2(5): e90780.
- [10] van der Windt DJ, Sud V, Zhang HJ, *et al.* Neutrophil extracellular traps promote inflammation and development of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Hepatology* Baltim Md, 2018, 68(4): 1347-1360.
- [11] Geng Y, Peng N, Liu YN, *et al.* Physical effort affects heatstroke thermoregulatory response and mortality in rats[J]. *Shock*, 2015, 44(2): 149-156.
- [12] Geng Y, Fu W, Liu YN, *et al.* Comparison of conscious and unconscious classic heat stroke rat models[J]. *Med J Chin PLA*, 2013, 38(8): 615-619. [耿焱, 付炜, 刘亚楠, 等. 清醒与麻醉状态经典型热射病大鼠模型比较[J]. *解放军医学杂志*, 2013, 38(8): 615-619.]
- [13] Chen SH, Chang FM, Niu KC, *et al.* Resuscitation from experimental heatstroke by estrogen therapy[J]. *Crit Care Med*, 2006, 34(4): 1113-1118.
- [14] Peng N, Geng Y, Zhang S, *et al.* Correlation of kidney injury and inflammatory response in rats with classic heatstroke[J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27(5): 327-331. [彭娜, 耿焱, 张爽, 等. 重症中暑大鼠肾损伤与炎症反应的关系[J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27(5): 327-331.]
- [15] Leon LR, DuBose DA, Mason CW. Heat stress induces a biphasic thermoregulatory response in mice[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 288(1): R197-R204.
- [16] Yipp BG, Petri B, Salina D, *et al.* Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking *in vivo*[J]. *Nat Med*, 2012, 18(9): 1386-1393.
- [17] Heijnen BHM, Straatsburg IH, Gouma DJ, *et al.* Decrease in core liver temperature with 10 °C by *in situ* hypothermic perfusion under total hepatic vascular exclusion reduces liver ischemia and reperfusion injury during partial hepatectomy in pigs[J]. *Surgery*, 2003, 134(5): 806-817.
- [18] Wree A, Eguchi A, McGeough MD, *et al.* NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice[J]. *Hepatology*, 2014, 59(3): 898-910.
- [19] Gao JX, Li TS. Research progress on safety and efficacy of intravascular cooling technique in the treatment of heat stroke[J]. *Med J Chin PLA*, 2021, 46(2): 207-211. [高建新, 黎檀实. 血管内降温技术及其治疗热射病的有效性和安全性研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(2): 207-211.]
- [20] Weigand K, Riediger C, Stremmel W, *et al.* Are heat stroke and physical exhaustion underestimated causes of acute hepatic failure?[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(2): 306-309.
- [21] Hassanein T, Razack A, Gavalier JS, *et al.* Heatstroke: its clinical and pathological presentation, with particular attention to the liver[J]. *Am J Gastroenterol*, 1992, 87(10): 1382-1389.
- [22] Jorch S K, Kubers P. An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease[J]. *Nat Med*, 2017, 23(3): 279-287.
- [23] von Meijenfeldt FA, Stravitz RT, Zhang JW, *et al.* Generation of neutrophil extracellular traps in patients with acute liver failure is associated with poor outcome[J]. *Hepatology*, 2022, 75(3): 623-633.
- [24] Luo Y, Arita K, Bhatia M, *et al.* Inhibitors and inactivators of protein arginine deiminase 4: functional and structural characterization[J]. *Biochemistry*, 2006, 45(39): 11727-11736.
- [25] Zhang SG, Zhang QY, Wang FR, *et al.* Hydroxychloroquine inhibiting neutrophil extracellular trap formation alleviates hepatic ischemia/reperfusion injury by blocking TLR9 in mice[J]. *Clin Immunol*, 2020, 216: 108461.
- [26] Duarte S, Matian P, Ma S, *et al.* Adeno-associated virus-mediated gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 impairs neutrophil extracellular trap formation and ameliorates hepatic ischemia and reperfusion injury[J]. *Am J Pathol*, 2018, 188(8): 1820-1832.
- [27] Ortmann W, Kolaczowska E. Age is the work of art? Impact of neutrophil and organism age on neutrophil extracellular trap formation[J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 371(3): 473-488.
- [28] Kumar S, Gupta E, Kaushik S, *et al.* Quantification of NETs formation in neutrophil and its correlation with the severity of sepsis and organ dysfunction[J]. *Clin Chim Acta*, 2019, 495: 606-610.
- [29] Cannistrà M, Ruggiero M, Zullo A, *et al.* Hepatic ischemia reperfusion injury: a systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers[J]. *Int J Surg*, 2016, 33(Suppl 1): S57-S70.
- [30] Al-Khafaji AB, Tohme S, Yazdani HO, *et al.* Superoxide induces neutrophil extracellular trap formation in a TLR-4 and NOX-dependent mechanism[J]. *Mol Med*, 2016, 22: 621-631.
- [31] Arumugam S, Girish Subbiah K, Kemparaju K, *et al.* Neutrophil extracellular traps in acrolein promoted hepatic ischemia reperfusion injury: therapeutic potential of NOX2 and p38MAPK inhibitors[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(4): 3244-3261.
- [32] Wright TK, Gibson PG, Simpson JL, *et al.* Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease[J]. *Respirology*, 2016, 21(3): 467-475.
- [33] Yu X, Lan P, Hou X, *et al.* HBV inhibits LPS-induced NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β production *via* suppressing NF- κ B pathway and ROS production[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(4): 693-702.

(责任编辑: 熊晓然)