

## RAGE与腹腔注射脂多糖诱导新生大鼠急性肺损伤的相关性研究

俞敏, 赵赛, 程怀平, 田兆方\*

(南京医科大学附属淮安第一医院新生儿科, 江苏 淮安 223300)

**[摘要]** **目的:**通过腹腔注射途径建立脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的新生大鼠急性肺损伤(acute lung injury, ALI)模型,探讨其与肺组织晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end-products, RAGE)的相关性。**方法:**30只SD新生大鼠随机分为5组,每组6只,根据注射LPS剂量分为0.3、1.0、3.0、9.0 mg/kg组及生理盐水对照组,24 h后观察大鼠的一般情况;ELISA法检测血清及支气管肺泡灌洗液(BALF)中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、可溶性RAGE(sRAGE)含量;Western blot法检测肺组织RAGE蛋白水平;real time-PCR法检测RAGE mRNA表达水平;HE染色下对肺组织进行病理学评估。**结果:**LPS 9 mg/kg组死亡率高达83.3%,故未计入实验组;其余4组结果显示,TNF- $\alpha$ 水平、肺组织RAGE蛋白、mRNA及肺组织损伤评分随梯度剂量的增加而升高,而BALF中sRAGE水平随剂量增加而降低。**结论:**腹腔注射LPS可以诱导产生新生大鼠的ALI,LPS剂量为3 mg/kg可作为模型最佳诱导剂量;RAGE可作为ALI的敏感指标。

**[关键词]** 脂多糖;晚期糖基化终末产物受体;肺损伤;新生;鼠

**[中图分类号]** R563

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)08-1051-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20140810

## Correlation between RAGE and intraperitoneal injection of lipopolysaccharide induced acute lung injury in neonatal rats

Yu Min, Zhao Sai, Cheng Huaiping, Tian Zhaofang\*

(Department of Neonatology, Huai'an First People's Hospital Affiliated to NJMU, Huai'an 223300, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a neonatal rat model of acute lung injury (ALI) induced by intraperitoneal administration of various doses of lipopolysaccharide (LPS) and investigate the role of receptor for advanced glycation end-products (RAGE) in ALI. **Methods:** Thirty newborn rats were randomly divided into five groups (six in each group) according to the different doses of LPS (0.3, 1, 3 and 9 mg/kg) and saline. All the rats were sacrificed and observed 24 h later. Levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and soluble RAGE (sRAGE) in the plasma and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). RAGE mRNA levels in tissue homogenates were detected by RT-PCR and RAGE protein levels by Western blot. The pathological assessment of lung tissues was performed by HE staining. **Results:** The LPS 9 mg/kg group was excluded due to its high mortality (83.3%). When compared to the control group, the levels of TNF- $\alpha$ , the expression of RAGE protein and RAGE mRNA, and the lung damage scores in the other four groups were increased. All these parameters increased in a dose-dependent manner in the LPS groups, while the levels of sRAGE in BALF decreased. **Conclusion:** LPS intraperitoneal injection can induce ALI in neonatal rats. LPS dosage of 3 mg/kg may be the optimal dose for ALI model in neonatal rats. RAGE can be used as a sensitive indicator of ALI.

**[Key words]** lipopolysaccharide; receptor for advanced glycation end-products; lung injury; newborn; rats

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(08): 1051-1055]

新生儿因为其免疫功能尚不完善易发生败血症,而对于低出生体重儿来说长时间住院和有创监测更是增加了败血症的风险<sup>[1]</sup>。革兰氏阴性菌败血性休克是引起新生儿死亡的重要原因。脂多糖

(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁上的一种结构成分,它可诱导机体产生大量炎症因子,如肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、白介素(IL)-6,从而引起机体组织炎症损伤,包括肺损伤<sup>[2]</sup>。临床上新生儿发生感染如败血症的情况下易并发急性肺损伤(acute lung injury, ALI)或急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),但其诊断往往依

**[基金项目]** 淮安市科技计划项目(HASZ2012014)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: lyh0729@163.com



赖于临床症状、动脉血气、影像学等,尚缺乏特异的能反映病情严重程度及相关预后的实验室指标。目前已有采用 LPS 诱导大鼠肺损伤的报道,但缺乏公认的模型,尤其是对于 LPS 诱导的新生鼠 ALI 模型尚缺乏公认的剂量和适合的途径。

晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end-products, RAGE) 是一种多配体受体,属于细胞表面分子免疫球蛋白超家族成员。RAGE 有两种形式:第一种为全长 RAGE, 又称膜 RAGE (mRAGE), 包括膜外域、跨膜域、膜内域,位于 I 型肺泡上皮细胞 (AEC I) 基底侧细胞膜,是 AEC I 的损伤标志物<sup>[3]</sup>;第二种是可溶性 RAGE (sRAGE), 缺乏跨膜域,被释放到细胞外和血浆中,可作为潜在的 I 型肺泡上皮细胞损伤标志物,循环中 sRAGE 水平增高与 ALI/ARDS 的严重程度相关<sup>[4]</sup>。本研究前期结果表明高氧肺损伤时肺泡灌洗液中 sRAGE 发生变化,与肺泡损伤程度相关<sup>[5]</sup>。

本实验采用腹腔注射不同剂量的 LPS 诱导新生大鼠急性肺损伤,通过观察大鼠的一般反应、死亡率及病理学损伤评分,研究不同剂量 LPS 对新生大鼠急性肺损伤的影响,摸索 LPS 诱导新生大鼠急性肺损伤适合的方法;通过检测血清及支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 TNF- $\alpha$  及 sRAGE、肺组织 RAGE 蛋白和 mRNA 表达情况,探讨 LPS 诱导新生大鼠急性肺损伤的可能机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

新生 SD 大鼠,日龄 10 d,体重 18~24 g,共 30 只,由南京医科大学动物实验中心提供。

抗 RAGE 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司,美国);抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体 (Bioworld Technology 公司,美国);ELISA 试剂盒 (上海西唐生物科技有限公司);羊抗兔 IgG-HRP 抗体、ECL 检测发光试剂盒 (Bioworld Technology 公司,美国);引物 (上海生物工程公司);PCR 相关的逆转录及扩增试剂盒、2 $\times$  SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液、BCA 法蛋白定量检测试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、PVDF 膜 (南京凯基生物科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 新生大鼠肺损伤模型的制备及分组

用不同剂量 LPS 腹腔注射制备新生大鼠肺损伤模型。将新生大鼠随机分为 5 组 (每组 6 只):生理盐水对照组 (NS)、LPS 0.3 mg/kg 组、LPS 1 mg/kg

组、LPS 3 mg/kg 组、LPS 9 mg/kg 组。

#### 1.2.2 标本收集

24 h 后,10%水合氯醛 (4 ml/kg) 腹腔麻醉后处死,摘除眼球取血 1 ml 用于血清 TNF- $\alpha$ 、sRAGE 含量测定。切断颈总动脉进一步放血处死。颈正中暴露气管,剪开一小口插入导管并固定,向导管内缓缓注入 1 ml 冷生理盐水反复回抽 3 次,回收率 80%~90%,留取 BALF 供检测 TNF- $\alpha$ 、sRAGE 含量。快速剪开胸腔,取出双侧肺脏,肉眼观察后,生理盐水冲洗。左上肺提取总 RNA 供检测 RAGE mRNA;左下肺提取肺组织总蛋白供检测 RAGE 蛋白;右上肺组织以 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋后连续切片,厚度为 4  $\mu$ m,供组织学检查用<sup>[5]</sup>。

#### 1.2.3 ELISA 测定 TNF- $\alpha$ 及 sRAGE 的含量

按照试剂盒说明书进行操作。

#### 1.2.4 real time-PCR 法检测肺组织 RAGE mRNA 的表达

应用 TRIzol 试剂常规一步法提取肺组织总标本总 mRNA。RAGE 的上下游引物分别是 5'-GGT-GCTGGTTCTTGCTC-3' 和 5'-TCCCTCGCCTGTTAG-TT-3';内参  $\beta$ -actin 上下游引物分别是 5'-GATGA-CAAGCAGCCCTAT-3' 和 5'-TCCATGCCAATTCAAC-3'。RAGE、 $\beta$ -actin 扩增的产物长度分别为 235、450 bp。测定 RNA 浓度和纯度,合成 cDNA。扩增程序:预热 95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 20 s,58 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 5 min,55 $^{\circ}$ C 10 s;每循环升温 0.5 $^{\circ}$ C,10 s,80 个循环。循环结束后进行熔点曲线分析,于 60~95 $^{\circ}$ C 进行测定,条件设置为升温幅度 0.5 $^{\circ}$ C/次,5 s/次。通过软件计算出所扩增的 RAGE mRNA 相对于管家基因的变化倍数。

#### 1.2.5 RAGE 蛋白 Western blot 检测

肺组织匀浆 12 000 r/min,离心 10 min 后,取上清用 BCA 法测蛋白浓度,加上样缓冲液,于沸水中煮沸 5 min 后以 10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,然后将胶上的蛋白电转移到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭,与待测蛋白的特异性抗体 (稀释度均为 1:1 000) 孵育杂交,4 $^{\circ}$ C 过夜洗膜后,再加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h,洗膜后进行显色,曝光于凝胶成像仪。

#### 1.2.6 肺组织病理检查

采用 HE 染色,光镜下依据肺泡间隔水肿、肺泡出血、肺泡内纤维蛋白沉积、肺泡内细胞浸润等四方面进行肺损伤病理学评分<sup>[6]</sup>,每个方面分别计 0~3 分;每个动物分别切取 4 张切片,每张切片观察不重



叠的 10 个视野, 分别记录病理学评分的值, 4 张切片的平均值即代表该动物的病理学评分。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS20.0 统计软件包, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。多组间的差异采用单因素方差分析, 组间比较采用 LSD 法, 相关分析用 Pearson 相关分析。  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 大鼠一般情况

不同剂量 LPS 组新生大鼠均出现活动减少、反应迟钝、嗜睡等表现, LPS 0.3 mg/kg 组、LPS 1 mg/kg 组全部成活, LPS 3 mg/kg 组、LPS 9 mg/kg 组死亡率分别为 33.3%、83.3%, LPS 9 mg/kg 组由于死亡率过高, 本实验不予探讨。

### 2.2 血清 TNF- $\alpha$ 、sRAGE 含量

TNF- $\alpha$  及 sRAGE 的水平在 4 组间差异均存在统计学意义 ( $F = 118.88, P < 0.001; F = 124.76, P < 0.001$ , 表 1)。组间比较, 差异也存在统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ )。与对照组相比, 3 个 LPS 组 TNF- $\alpha$  及

sRAGE 水平明显增高 ( $P$  均  $< 0.05$ )。

### 2.3 BALF 中 TNF- $\alpha$ 、sRAGE 水平

TNF- $\alpha$  及 sRAGE 的水平在 4 组间差异均存在统计学意义 ( $F = 173.64, P < 0.001; F = 39.21, P < 0.001$ , 表 1)。组间比较, 差异也存在统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ )。与对照组相比, 3 个 LPS 组 TNF- $\alpha$  随着 LPS 量的增加而增加 ( $P$  均  $< 0.05$ ); 而 3 个 LPS 组 sRAGE 水平明显下降 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 但 LPS 1 mg/kg 组与 3 mg/kg 组比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.4 肺组织 RAGE 蛋白与 mRNA 表达

与对照组相比, LPS 组 RAGE 蛋白与 mRNA 表达明显增加 (图 1)。

### 2.5 肺组织病理学评分

肺组织病理改变: NS 组, 肺组织结构完整, 基本无炎性细胞渗出; 当 LPS 0.3 mg/kg 时, 肺泡隔轻度增宽, 少量炎性细胞渗出, 组织结构基本完整; 当 LPS 1 mg/kg 时, 可见炎性细胞渗出, 肺泡间隔水肿增厚; 当 LPS 3 mg/kg 时, 水肿、炎细胞浸润以及出血等病变均加重。4 组肺组织损伤评分差异有统计学意义 (表 1, 图 2)。

表 1 各组新生大鼠肺组织损伤评分和 TNF- $\alpha$ 、sRAGE 水平

Table 1 lung damage scores, TNF- $\alpha$  and sRAGE levels of neonatal rats in each group ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	肺损伤评分(分)	TNF- $\alpha$ (ng/L)		sRAGE(ng/L)	
			血清	BALF	血清	BALF
NS 组	6	0.60 $\pm$ 0.52	81.54 $\pm$ 12.46	48.45 $\pm$ 6.42	86.39 $\pm$ 9.36	115.70 $\pm$ 3.39
LPS 0.3 mg/kg 组	6	1.50 $\pm$ 0.53	148.22 $\pm$ 19.10	79.88 $\pm$ 10.67	145.68 $\pm$ 12.97	107.79 $\pm$ 3.79
LPS 1.0 mg/kg 组	6	2.20 $\pm$ 0.42	266.36 $\pm$ 30.36	119.70 $\pm$ 11.39	207.40 $\pm$ 11.18	97.64 $\pm$ 1.98
LPS 3.0 mg/kg 组	4	3.10 $\pm$ 0.74	393.92 $\pm$ 40.10	202.60 $\pm$ 15.07	259.53 $\pm$ 22.86	94.47 $\pm$ 4.28
F 值		35.47	118.88	173.64	124.76	39.21
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

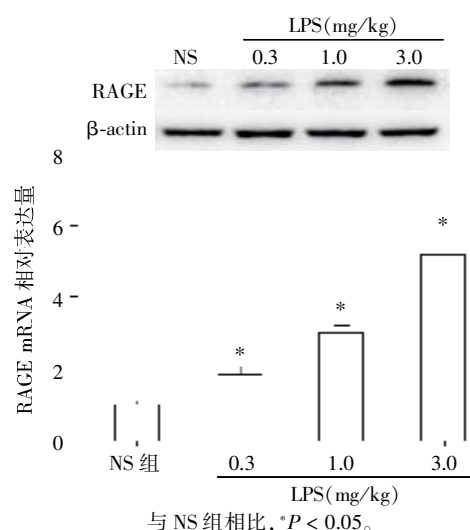


图 1 4 组 RAGE 蛋白与 mRNA 表达水平

Figure 1 Expression level of RAGE protein in the four groups

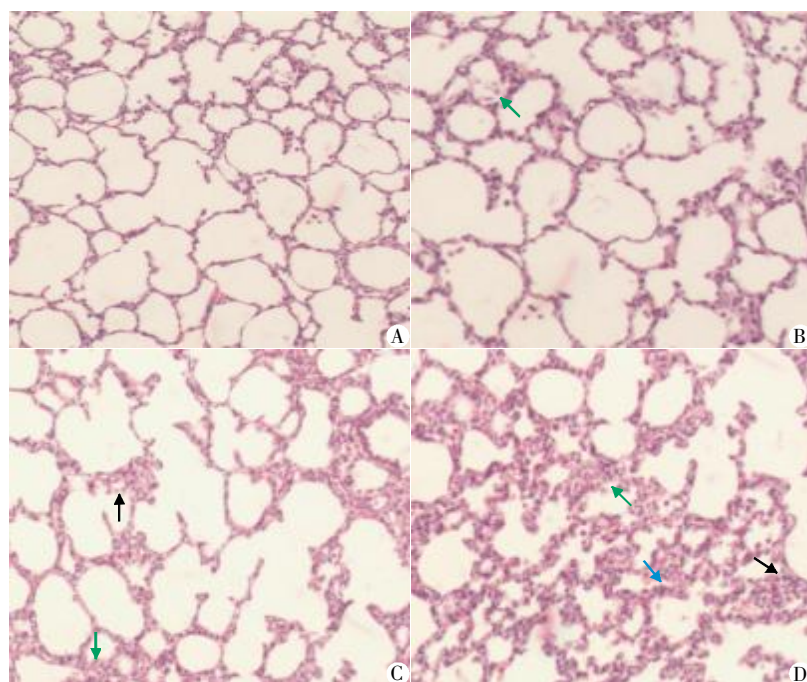
### 2.6 相关分析

经统计学处理, 肺组织病理评分与血清及 BALF 中 TNF- $\alpha$  水平存在正相关 ( $r = 0.988, P < 0.05; r = 0.974, P < 0.05$ )。肺组织病理评分与血清 sRAGE 水平存在正相关 ( $r = 0.997, P < 0.05$ ), 与 BALF 中 sRAGE 水平存在负相关 ( $r = -0.975, P < 0.05$ )。

## 3 讨 论

ALI 模型动物的选择种类比较广泛, 如大鼠、小鼠、兔、犬、猪及灵长类动物等。相对于其他动物来说, 大鼠、小鼠繁殖快, 来源容易, 在大样本试验、需要观察死亡率/生存率等项目时是一种良好的选择。跟小鼠相比, 大鼠在基因研究方面基因组的可用性





A: NS 组; B: LPS 0.3 mg/kg 组; C: LPS 1 mg/kg 组; D: LPS 3 mg/kg 组。→: 炎症细胞浸润; →: 肺泡内出血等; →: 肺泡壁水肿增厚。

图 2 各组病理切片 HE 染色 (×100)

Figure 2 HE staining of pathological sections in each group (×100)

高,且能更好地研究肺损伤的生理机制<sup>[7]</sup>。鼠肺的发育分为假腺肺阶段(胚胎期第 9.5~16.5 天),微管肺阶段(胎期第 16.5~17.5 天),囊状肺阶段(胎期第 17.5 天~生后第 5 天),泡状肺阶段(生后第 5~28 天)<sup>[8]</sup>。本实验选择 10 日龄的新生大鼠是因为其肺发育已接近成熟,且对内毒素敏感度较高<sup>[9]</sup>。目前研究成年大鼠 ALI 的模型 LPS 多数选择剂量为 5 mg/kg<sup>[10-11]</sup>,但对于新生大鼠来说,剂量的选择尚未有统一论。

建立 LPS 致大鼠急性肺损伤模型常见的是气管雾化或滴入、腹腔注射、静脉注射。静脉给药速度宜慢而匀,易引起明显感染性休克<sup>[12]</sup>,气管给药则病变更偏重于肺部。由于新生大鼠的气管插管较难操作,且难以控制剂量,而腹腔注射相对于气管内滴入模型可以减小给药创伤,故本实验选用腹腔注射方法。LPS 腹腔给药,腹腔内有大量的巨噬细胞,腹腔内炎症因子的激活反应可能比肺部更为强烈。这些炎症因子都可以进入肺部,成为诱导肺损伤的重要原因。比如 TNF- $\alpha$  是 ALI 发展中重要的促炎细胞因子, TNF- $\alpha$  可与肺组织 TNF- $\alpha$  受体结合,使溶酶体受损,还可激活内皮细胞活化,刺激单核巨噬细胞释放 IL-1、IL-2 等损伤肺组织。本实验观察腹腔注射 LPS 后 24 h 肺损伤的变化,因为该时间段与临床上 ALI 和 ARDS 的急性期一致,如肺泡壁增厚、炎症细胞激活和浸润最明显,包括中性粒细胞和滞留巨噬

细胞等<sup>[13]</sup>。通过选择不同浓度梯度的 LPS,观察肺损伤模型的死亡率、损伤严重程度等,选择更适合的剂量,为以后新生大鼠 ALI 模型相关研究打下基础。

RAGE 是免疫球蛋白超家族的成员之一,是细胞表面模式识别受体,可结合多种配体:如 AGEs、 $\beta$  淀粉样肽、两性素/高速泳动族盒 1 蛋白(HMGB1)、S100/钙粒蛋白等<sup>[14]</sup>。本研究发现 LPS 可诱导急性肺损伤,LPS 作用于机体引起全身炎症反应后进一步引起肺损伤,其病理过程包括肺泡上皮细胞及肺血管内皮损伤等。作为 I 型肺泡上皮细胞受损的标志物,RAGE 与相应的配体(如 HMGB1)结合后可启动若干信号通路,引起组织损伤,且 RAGE 水平与肺组织病理评分具有相关性,这与文献报道相符<sup>[3]</sup>。由于 sRAGE 具有阻断 RAGE 信号、保护组织和细胞免受配体相关性损伤的能力,其发挥诱饵受体作用,随着 LPS 剂量增加,炎症加重,sRAGE 的缺失不足以中和 mRAGE 与配体结合后的炎症损伤,使 mRAGE/sRAGE 失衡<sup>[15]</sup>,这可能是导致 1 mg/kg 组与 3 mg/kg 组的 BALF 中 sRAGE 差异无统计学意义的原因。RAGE 与配体结合后可激活核因子(NF)- $\kappa$ B 通路,RAGE-NF- $\kappa$ B 通路的激活启动及随后多种促炎症因子的转录是一种正反馈环。此外 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6 等与急性肺损伤相关的一些细胞因子的基因启动子区域均含有 NF- $\kappa$ B 的固



定的核苷酸  $\kappa$ B 序列, NF- $\kappa$ B 活化后和  $\kappa$ B 序列的 DNA 结合, 启动基因的转录和表达<sup>[16]</sup>。所以 LPS 所致的新生大鼠 ALI 可能与 RAGE-NF- $\kappa$ B 的通路激活有关。

本实验通过腹腔注射不同剂量的 LPS, 成功诱导新生大鼠的急性肺损伤; LPS 剂量为 3 mg/kg 时致 ALI 不仅病理损伤较明显, 且血清中 sRAGE 水平也易于检测, 这对于临床及实验室的监测提供了可能。LPS 诱导的肺损伤与 RAGE 及 sRAGE 的水平密切相关, 这为 LPS 诱导的 ALI 研究及干预提出了新思路。

#### [参考文献]

- [1] Shah BA, Padbury JF. Neonatal sepsis: An old problem with new insights[J]. *Virulence*, 2013, 5(1): 170-178
- [2] Yamamoto Y, Harashima A, Saito H, et al. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS[J]. *J Immunol*, 2011, 186(5): 3248-3257
- [3] Guo WA, Knight PR, Raghavendran K. The receptor for advanced glycation end products and acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. *Intensive Care Med*, 2012, 38(10): 1588-1598
- [4] Christie JD, Shah CV, Kawut SM, et al. Plasma levels of receptor for advanced glycation end products, blood transfusion, and risk of primary graft dysfunction[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180(10): 1010-1015
- [5] Tian Z, Li Y, Ji P, et al. Mesenchymal stem cells protects hyperoxia-induced lung injury in newborn rats via inhibiting receptor for advanced glycation end-products/nuclear factor kappaB signaling[J]. *Exp Biol Med*(Maywood), 2013, 238(2): 242-247
- [6] Matute-Bello G, Winn R K, Jonas M, et al. Fas(CD95) induces alveolar epithelial cell apoptosis in vivo: implications for acute pulmonary inflammation[J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(1): 153-161
- [7] Matthay MA, Zimmerman GA, Esmon C, et al. Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(7): 1027-1035
- [8] Fineschi S, De Cunto G, Facchinetti F, et al. Receptor for advanced glycation end products contributes to postnatal pulmonary development and adult lung maintenance program in mice[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48(2): 164-171
- [9] Tillema MS, Lorenz KL, Weiss MG, et al. Sublethal endotoxemia promotes pulmonary cytokine-induced neutrophil chemoattractant expression and neutrophil recruitment but not overt lung injury in neonatal rats [J]. *Biol Neonate*, 2000, 78(4): 308-314
- [10] Gao J, Zhan Y, Chen J, et al. Triptolide ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats [J]. *Eur J Med Res*, 2013, 18(1): 58
- [11] Zhou GJ, Jiang SY, Zhang M, et al. Evaluation of the inflammatory response in a two-hit acute lung injury model using [18F]FDG microPET[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 6(4): 894-898
- [12] Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(3): L379-L399
- [13] Alvira M, Abate A, Yang G, et al. Nuclear factor-kappaB activation in neonatal mouse lung protects against lipopolysaccharide-induced inflammation[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175(8): 805-815
- [14] Chuah YK, Basir R, Talib H, et al. Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases[J]. *Int J Inflam*, 2013, 2013: 403460
- [15] Reynolds PR, Schmitt RE, Kasteler SD, et al. Receptors for advanced glycation end-products targeting protect against hyperoxia-induced lung injury in mice [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2010, 42(5): 545-551
- [16] Choudhary S, Kalita M, Fang L, et al. Inducible tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor-1 expression couples the canonical to the non-canonical NF-kappaB pathway in TNF stimulation[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(20): 14612-14623

[收稿日期] 2014-01-15