

## · 基础研究 ·

## 3-甲基腺嘌呤预处理对大鼠多发性创伤后急性肺损伤的保护作用

刘佳, 郝刚, 易龙, 孙天胜

(北京军区总医院骨科, 北京 100700)

**【摘要】** 目的: 通过 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)对多发性创伤模型大鼠进行预处理, 探讨自噬在多发性创伤后急性肺损伤中的作用。方法: 4 月龄成年雄性 SD 大鼠 45 只, 体重 250~300 g, 按照随机数字表随机分为 3 组: 假手术组, 对照组及 3-MA 组。假手术组仅在颅骨相应位置钻孔; 3-MA 组及对照组均采用液压打击器及自制骨折打击器制备股骨干骨折合并脑损伤模型, 且分别于造模前 1 h 给予 10 mg/kg 的 3-MA 或等量生理盐水。各组大鼠于术后 48 h 分别采用实时荧光定量 PCR 检测肺部 LC-3 II 及 Beclin-1 的表达; ELISA 法检测肺部炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的浓度; HE 染色观察肺部的组织病理学改变。结果: 术后 48 h, 对照组大鼠肺部 LC-3 II 及 Beclin-1 的 mRNA 水平明显高于假手术组( $P < 0.01$ ), 而 3-MA 组上述基因的表达显著低于对照组( $P < 0.01$ ); 术后 48 h, 对照组大鼠肺部的 TNF- $\alpha$  及 IL-6 浓度明显高于假手术组, 3-MA 组上述因子的浓度显著低于对照组( $P < 0.01$ )。3-MA 组大鼠肺组织病理评分显著低于对照组( $P < 0.01$ )。3-MA 组大鼠肺组织病理评分显著低于对照组( $P < 0.01$ )。结论: 自噬可以加重股骨干骨折合并脑损伤后的急性肺损伤, 而采用其抑制剂 3-MA 进行预处理可以降低细胞自噬水平, 进而减轻肺部的损害。

**【关键词】** 多发性创伤; 脑损伤; 股骨干骨折; 急性肺损伤; 3-甲基腺嘌呤

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2015.04.013

**Protective effects of 3-methyladenine on acute lung injury caused by multiple trauma in rats** LIU Jia, HAO Gang, YI Long, and SUN Tian-sheng. Department of Orthopaedics, Chinese PLA Beijing Army General Hospital, Beijing 100700, China

**ABSTRACT Objective:** To investigate the role of autophagy in acute lung injury (ALI) caused by multiple trauma in rats via pretreat with 3-methyladenine (3-MA). **Methods:** Forty-five Sprague-Dawley male rats, with age of 4 months and body weight of 250-300 g, were randomly divided into three groups. In the sham group, the rats received sphenotresia only; in the control group, the rats were made model of femur shaft fracture combined with brain injury, and treated with physiological saline by abdominal cavity at 1 hour before making model; in the 3-MA group, the rats were made model of femur shaft fracture combined with brain injury, and treated with 3-MA of 10 mg/kg by abdominal cavity at 1 hour before making model. Histologic changes and the concentration of related inflammatory factors in the damaged lung tissue were examined at 48 h after operation, at the same time, the effect of 3-MA on the expression of LC-3 II and Beclin-1 was examined through reverse transcriptase polymerase chain reaction technique (RT-PCR). **Results:** Compared with sham group, LC-3 II and Beclin-1 level in control group at 48 h after operation were obviously increased ( $P < 0.01$ ). Compared with control group, LC-3 II and Beclin-1 level in 3-MA group at 48 h after operation were obviously decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with sham group, the level of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6) in control group obviously enhanced ( $P < 0.01$ ). Compared with control group, above items in 3-MA group was obviously lower ( $P < 0.01$ ). Compared with control group, the histopathological damage of lung in 3-MA group obviously reduced ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Autophagy can aggravate the acute lung injury caused by fracture of shaft of femur combined with brain injuries, but 3-MA can reduce tissue damage by inhibiting the autophagy and inflammatory response.

**KEYWORDS** Multiple trauma; Brain injuries; Femoral shaft fracture; Acute lung injury; 3-methyladenine

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(4): 350-353 www.zggszz.com

随着交通运输业、建筑业的发展, 多发性创伤发

生率逐年上升, 具有极高的致死率。多发性创伤院内死亡原因分析结果显示, 80% 患者是死于感染和严重并发症<sup>[1]</sup>。急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是多发性创伤后的常见并发症之一, 极易发展为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS), 后者是导致多发性创伤患者院内死亡的主

基金项目: 国际科技合作项目(编号: 2010DFA31250)

Fund program: International Technical Cooperation and Communication Project (No.2010DFA31250)

通讯作者: 孙天胜 E-mail: suntiansheng@163.com

Coresponding author: SUN Tian-sheng E-mail: suntiansheng@163.com

要原因<sup>[2]</sup>。尽管如此,针对这一多发创伤后的严重并发症目前尚无特异疗法,主要是采取呼吸管理、控制感染及液体复苏等对症治疗<sup>[3]</sup>。近年来,针对 ALI 发生机制及治疗手段的研究日益增多<sup>[4-5]</sup>,本文采用自噬抑制剂 3-MA 进行干预,观察上述模型中肺部自噬水平及组织病理学的变化,探索自噬在多发创伤后 ALI 中的作用,从而为临床寻找新的治疗手段提供充足的实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要仪器与试剂

HPD-1700 型液压撞击仪,美国 DRAGONFLY 研究与发展公司。IQ5 PCR 仪,美国 Bio-rad 公司。3-MA,美国 Sigma 公司(货号与规格:M9281-100MG); RT-PCR 逆转录试剂盒, Promega 公司。大鼠 TNF- $\alpha$  及 IL-6 定量检测试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.2 实验动物及分组

健康 4 月龄雄性 SD 大鼠 45 只,体重 250~300 g,由北京海旺实验动物养殖有限公司提供 [许可证号:SCXK(京)2009-0017]。自由取水、进食,适应性饲养 7 d 后用于实验。所有动物根据随机数字表分成以下 3 组:假手术组,仅接受颅骨钻孔,不给任何干预;对照组(股骨干骨折合并脑损伤模型+生理盐水)和 3-MA 组(股骨干骨折合并脑损伤模型+3-MA),每组 15 只。

### 1.3 多发性创伤模型制备及药物处理

各组大鼠禁食水 12 h 后,腹腔注射 10%水合氯醛(3.5 ml/kg)常规麻醉。对照组及 3-MA 组大鼠参照 Floyd 等<sup>[6]</sup>方法制备闭合性脑损伤模型。大鼠头部固定于脑立体定位仪上,采用常规正中切口,暴露颅骨后,于前凶前 2 mm,颅骨中线偏左 3 mm 处,钻出直径约 5 mm 的圆形骨窗,保证硬脑膜的完整。而后连接 HPD-1700 型液压打击器,以 2.0 atm 的强度,制备中度闭合性颅脑损伤模型。而后参照动物骨折造模法支架理念,使用自制打击器制备股骨干闭合骨折模型(500 g $\times$ 25 cm)<sup>[7]</sup>。假手术组大鼠仅常规在额部颅骨钻孔。3-MA 组及对照组大鼠分别于造模前 1 h 经腹腔给予自噬抑制剂 3-MA 10 mg/kg 或等体积生理盐水。

### 1.4 观察项目与方法

**1.4.1 肺部 Beclin-1 及 LC-3 II 的表达** 各组大鼠均于术后 48 h 取右肺下叶组织 100 mg,提取总 RNA。对样品质量及浓度进行检测后,逆转录合成 cDNA。以上述 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 检测,目的基因 Beclin-1 引物序列为:上游引物 5'-CCGGAGACTCAAGGTCCTACTGA-3',下游引物 5'-

AGCTCATCATCCAGCTCCAG-3'; LC-3 II 上游引物 5'-CGGAGCTTCGAACAAAGAGT-3',下游引物 5'-CCATTCACCAGGAGGAAGAA-3'; 内参基因为 GAPDH 上游引物 5'-CCCCCATGTTTGTGATG-3',下游引物 5'-GTGGTCATGAGCCCTTCCA-3'。

**PCR 扩增:**在 50  $\mu$ l 反应体系中加入 cDNA 5  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 32  $\mu$ l, PCR buffer (5 $\times$ )10  $\mu$ l, 荧光探针 0.5  $\mu$ l, Taq DNA 聚合酶 1  $\mu$ l, dNTPs 0.5  $\mu$ l, LC-3 II 或 Beclin-1 上下游引物各 0.5  $\mu$ l。扩增条件:95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min 10 Cycles; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 35 Cycles。

**扩增产物分析:**数据采用仪器自带软件 ABI Prism 7300 SDS Software 分析。Beclin-1 mRNA 和 LC-3 II mRNA 表达水平以它们与 GAPDH 的相对表达量来计算。

**1.4.2 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测肺部 TNF- $\alpha$  及 IL-6 的水平** 各组大鼠均于术后 48 h 取右肺下叶组织 100 mg,至于玻璃匀浆器内匀浆后,于 4  $^{\circ}$ C (12 000 r/min)离心 10 min,留取上清液。采用 ELISA 法检测 TNF- $\alpha$  及 IL-6 的浓度,所有步骤按照试剂盒说明书进行操作。

**1.4.3 组织病理学检测** 各组大鼠于术后 48 h,分别取各组大鼠 5 只,使用生理盐水和 4%多聚甲醛经心脏灌流后,取右下肺叶,浸泡入多聚甲醛液固定 48 h 后,石蜡包埋,连续切片,切片厚度 4  $\mu$ m。常规苏木素-伊红(HE)染色后在光镜下观察组织形态学的变化,并进行肺组织损伤评分。其标准为:(1)肺间质水肿;(2)肺泡水肿;(3)炎症细胞浸润;(4)肺泡出血;(5)透明膜形成;(6)肺不张。上述 6 项,按无、轻、中、重 4 个等级,分别记为 0、1、2、3 分,每张切片于高倍镜下取 10 个视野,平均后为肺病理损伤评分。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。肺部自噬标志基因的表达,炎症因子水平及肺组织损伤评分的组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肺部 Beclin-1 及 LC-3 II 的表达

对照组大鼠损伤后 48 h,肺部自噬标志性基因 Beclin-1 及 LC-3 II 的 mRNA 水平明显升高,与假手术组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。3-MA 预处理可以显著下调上述基因的表达( $P < 0.01$ ),见表 1。

### 2.2 肺部炎症因子水平

对照组大鼠损伤后 48 h,肺部炎症因子 TNF- $\alpha$  及 IL-6 的水平明显升高,与假手术组比较差异有统

表 1 3-MA 对肺部自噬标志基因表达的影响( $\bar{x}\pm s$ )

**Tab.1 Effect of 3-MA on the expression of autophagic genes in lung ( $\bar{x}\pm s$ )**

组别	鼠数	自噬基因	
		Beclin-1	LC-3 II
假手术组	5	1.06±0.10	1.09±0.11
对照组	5	7.53±0.03 <sup>△</sup>	10.84±0.03 <sup>△△</sup>
3-MA 组	5	4.28±0.02 <sup>#</sup>	6.10±0.01 <sup>##</sup>

注:与假手术组相比, <sup>△</sup>t=6.42, P<0.01; <sup>△△</sup>t= 6.42, P<0.01。与对照组相比, <sup>#</sup>t=3.27, P<0.01; <sup>##</sup>t=4.77, P<0.01

Note: Compared with sham group, <sup>△</sup>t=6.42, P<0.01; <sup>△△</sup>t=6.42, P<0.01. Compared with control group, <sup>#</sup>t=3.27, P<0.01; <sup>##</sup>t=4.77, P<0.01

计学意义(P<0.01)。3-MA 预处理可以显著降低两种炎症因子的水平(P<0.01), 见表 2。

### 2.3 肺部组织病理学改变

假手术组大鼠肺组织结构完整, 间质无水肿, 肺泡腔清晰, 血管周围未见出血及明显炎症细胞浸润。对照组大鼠肺泡壁结构破坏, 肺泡腔塌陷, 肺泡隔增宽明显, 可见大量渗出液及广泛的炎性细胞浸润。3-MA 组上述表现明显轻于对照组, 两组的肺组织损伤评分差异有统计学意义(P<0.01)(见图 1, 表 2)。

## 3 讨论

### 3.1 多发性创伤模型的选择

ALI 作为多发性创伤后的常见并发症, 因严重威胁患者的生命而备受关注。目前, 由于缺乏对 ALI 发生机制的深入了解, 其治疗手段仅限于抗炎, 对症治疗。由于多发性创伤的复杂性, 相关研究的动物模型选择十分关键, 本课题小组经过长期探索, 发现股骨干骨折合并脑损伤模型制备较容易, 且一致性好, 可重复性较高, 因此以此为基础开展了一系列关于多发伤后 ALI 发病机制及治疗相关的研究。笔者在前期的研究中发现这种大鼠模型肺部肺泡壁结构破

表 2 3-MA 对肺部炎症因子浓度及肺组织损伤评分的影响( $\bar{x}\pm s$ )

**Tab.2 Effect of 3-MA on the concentration of inflammatory factors and tissue lesion score of lung ( $\bar{x}\pm s$ )**

组别	鼠数	炎症因子(pg/ml)		肺组织损伤评分(分)
		TNF- $\alpha$	IL-6	
假手术组	5	38.34±2.54	12.55±2.11	0.15±0.03
对照组	5	94.49±3.23 <sup>△</sup>	48.87±2.63 <sup>△△</sup>	8.52±0.25 <sup>△△△</sup>
3-MA 组	5	63.36±0.85 <sup>#</sup>	39.22±0.89 <sup>##</sup>	6.6±1.59 <sup>###</sup>

注:与假手术组比较, <sup>△</sup>t=56.16, P<0.01; <sup>△△</sup>t=36.32, P<0.01; <sup>△△△</sup>t=8.30, P<0.01。与对照组比较, <sup>#</sup>t=30.80, P<0.01; <sup>##</sup>t=9.65, P<0.01; <sup>###</sup>t=1.98, P<0.01

Note: Compared with sham group, <sup>△</sup>t=56.16, P<0.01; <sup>△△</sup>t=36.32, P<0.01; <sup>△△△</sup>t=8.30, P<0.01. Compared with control group, <sup>#</sup>t=30.80, P<0.01; <sup>##</sup>t=9.65, P<0.01; <sup>###</sup>t=1.98, P<0.01

坏, 肺泡腔塌陷, 肺泡隔增宽明显, 可见大量渗出液, 同时伴有大量的炎症细胞浸润, 具有典型的 ALI 组织病理学特征<sup>[8]</sup>。

### 3.2 3-MA 对多发性创伤大鼠肺部自噬水平的影响

自噬是细胞对一些细胞质成分, 如长寿命蛋白和损伤的细胞器, 进行回收利用的一种相对保守的生理过程<sup>[9]</sup>。正常情况下, 它通过上述过程对细胞进行修复, 在生命体的发育过程中也发挥了十分重要的作用<sup>[10]</sup>。近年来, 自噬作为除凋亡以外另一种重要的程序性细胞死亡方式, 已被证实广泛参与各种疾病的病理进程, 包括各种脏器的损伤。目前, 关于自噬在一些肺部疾病中的作用已有一些研究<sup>[11]</sup>, 但在多发性创伤后 ALI 中的作用尚未见相关文献报道。

本文在前期工作的基础上首次证实了自噬性细胞死亡可以加重多发性创伤后 ALI 的病理进程, 采用自噬抑制剂 3-MA<sup>[12]</sup>预处理可以下调股骨干合并

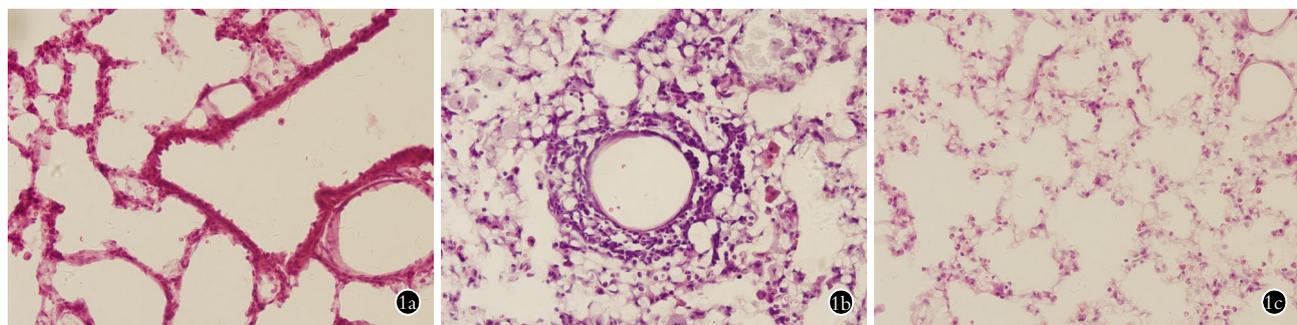


图 1 3-MA 预处理对多发性创伤大鼠肺部组织病理学改变的影响(HE×400) 1a. 假手术组大鼠肺组织结构完整, 无明显渗出及炎症细胞浸润 1b. 对照组大鼠肺部肺泡间隔明显增宽, 可见大量炎症细胞浸润 1c. 3-MA 预处理可以显著减轻炎症细胞的浸润

**Fig.1** Effects of 3-MA on the histological changes in lung of rats (HE×400) **1a.** Images of lung tissue in sham group showed almost no leakage and infiltration of inflammatory cells **1b.** Images of lung tissue in control group showed that mutiple trauma induced the significant widen of alveolar septum and infiltration of inflammatory cell **1c.** The inflammatory cell infiltration reduced after pretreat of 3-MA

脑损伤大鼠模型肺组织局部自噬相关基因的表达,减轻肺组织的病理学损害。

### 3.3 3-MA 对多发性创伤大鼠肺部炎症因子的影响

目前,大部分学者认为造成多发性创伤后 ALI 甚至 ARDS 的主要原因是全身炎症反应导致循环中大量炎症细胞向肺部浸润,同时肺组织局部的巨噬细胞大量激活,共同释放高浓度的炎症介质<sup>[13-14]</sup>。本文对各组大鼠肺组织炎症因子水平进行了检测,发现在多发性创伤 48 h 后大鼠肺部 TNF- $\alpha$  及 IL-6 浓度显著升高,而采用 3-MA 进行预处理可以显著降低上述两种因子的水平。

现有的证据表明自噬活性与 IL-6、TNF- $\alpha$  的表达存在着复杂的关系<sup>[15]</sup>,各种促炎性因子对于自噬具有激活作用,同时自噬有可能降解炎性因子前体抑制炎性因子的表达。但是其具体的相互作用机制及其意义,目前尚未阐明<sup>[16]</sup>。尽管本实验的研究结果初步表明降低细胞自噬水平可以减轻多发性创伤后肺部的炎症反应,但是其中复杂的相互作用机制仍在进一步的实验探索中。

综上所述,尽管本研究证实了自噬在股骨干合并脑损伤大鼠模型中有加重 ALI 的作用,但是其发挥作用的具体机制尚未阐明。另外,国外有学者发现在肾脏的缺血再灌注损伤中自噬发挥的作用与损伤程度密切相关,在较轻的损伤模型中发挥保护作用,而在较重的损伤模型中则起到加重损伤的作用<sup>[16]</sup>。自噬在多发性创伤所导致的 ALI 中是否有此特点尚不清楚,有待更多更全面的动物实验来证实。

#### 参考文献

- [1] Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care[J]. Crit Care Med, 2001, 29(7):1303-1310.
- [2] Veeravagu A, Jiang B, Rincon F, et al. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury in patients with vertebral column fracture(s) and spinal cord injury: a nationwide inpatient sample study[J]. Spinal Cord, 2013, 51(6):461-465.
- [3] Berly M, Shem K. Respiratory management during the first five days after spinal cord injury[J]. J Spinal Cord Med, 2007, 30(4):309-318.
- [4] Rieder SA, Nagarkatti P, Nagarkatti M. Multiple anti-inflammatory pathways triggered by resveratrol lead to amelioration of staphylococcal enterotoxin B-induced lung injury[J]. Br J Pharmacol, 2012, 167(6):1244-1258.
- [5] Weng TI, Wu HY, Kuo CW, et al. Honokiol rescues sepsis-associated acute lung injury and lethality via the inhibition of oxidative stress and inflammation[J]. Intensive Care Med, 2011, 37(3):533-541.
- [6] Floyd CL, Golden KM, Black RT, et al. Craniectomy position affects morris water maze performance and hippocampal cell loss after parasagittal fluid percussion[J]. J Neurotrauma, 2002, 19(3):303-316.
- [7] Shefelbine SJ, Simon U, Claes L, et al. Prediction of fracture callus mechanical properties using micro-CT images and voxel-based finite element analysis[J]. Bone, 2005, 36(3):480-488.
- [8] Reino DC, Pisarenko V, Palange D, et al. Trauma hemorrhagic shock-induced lung injury involves a gut-lymph-induced TLR4 pathway in mice[J]. PLoS One, 2011, 6(8):e14829.
- [9] Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, et al. Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: an overview[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2010, 298(4):C776-785.
- [10] Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development[J]. Cell, 1997, 88(3):347-354.
- [11] Araya J, Hara H, Kuwano K. Autophagy in the pathogenesis of pulmonary disease[J]. Intern Med, 2013, 52(20):2295-2303.
- [12] Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure[J]. Surg Clin North Am, 1995, 75(2):257-277.
- [13] Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response[J]. Mol Cell, 2010, 40(2):280-293.
- [14] Dutta RK, Kathania M, Raje M, et al. IL-6 inhibits IFN- $\gamma$  induced autophagy in Mycobacterium tuberculosis H37Rv infected macrophages[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(6):942-954.
- [15] Yoshizaki T, Kusunoki C, Kondo M, et al. Autophagy regulates inflammation in adipocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417(1):352-357.
- [16] Suzuki C, Isaka Y, Takabatake Y, et al. Participation of autophagy in renal ischemia/reperfusion injury[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 368(1):100-106.

(收稿日期:2014-09-10 本文编辑:李宜)