

# 肝素对高氧致支气管肺发育不良新生鼠血清及肺组织中性粒细胞诱捕网的影响

盛安群 陈翠娥 孙媛媛 张希希 钱燕 朱融和 周爱华 王楸 冯建华

**【摘要】** 目的 探讨肝素对支气管肺发育不良(BPD)新生鼠血清及肺组织中性粒细胞诱捕网(NETs)的影响。方法 将新生SD大鼠随机分为空气组、高氧组、肝素组、对照组,每组12只。空气组置于空气中,其他3组置于氧浓度为90%的高氧箱7d建立BPD模型。肝素组于造模开始后,每天腹腔注射低剂量肝素(250U/kg)至造模结束;对照组每天腹腔注射等量0.9%氯化钠溶液。分别在出生后第7、14天,每组各取6只麻醉并采集血液标本及肺组织标本,采用PicoGreen荧光染色法检测血清游离DNA(cf-DNA/NETs)水平,共聚焦显微成像观察肺组织NETs,HE染色观察肺组织形态学并测定肺泡辐射状计数(RAC)和平均内衬间隔(MLI)。结果 出生后第7、14天,高氧组、对照组新生鼠血清游离DNA水平较空气组明显升高(均 $P<0.05$ ),肝素组较高氧组明显降低( $P<0.05$ )。在荧光显微镜下观察,高氧组、对照组肺组织组蛋白、髓过氧化物酶荧光信号范围增加,NETs表达增加;肝素组荧光信号范围减少。与空气组比较,高氧组、对照组新生鼠RAC明显减少,MLI明显增加,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ );与高氧组比较,肝素组RAC明显增加,MLI明显减少,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$ )。结论 高氧致BPD新生鼠血清及肺组织中存在大量NETs,肝素可抑制NETs产生,并改善高氧引起的肺发育受阻。

**【关键词】** 肝素 中性粒细胞诱捕网 支气管肺发育不良 高氧

Effect of heparin on neutrophil extracellular traps in serum and lung tissue of neonatalratswith hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia SHENG Anqun, CHEN Cui'e, SUN Yuanyuan, et al. Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of heparin on neutrophil extracellular traps (NETs) in serum and lung tissue of neonatal rats with hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia(BPD). **Methods** Newborn SD rats were randomly divided into air group, hyperoxia group, heparin group and control group, with 12 rats in each group. All animals, except those of air group, were exposed to 90% oxygen continuously for 7d to induce BPD. The rats in heparin group were intraperitoneally injected with low dose of heparin(250 U/kg) daily until the end of modeling, the control group were injected with same volume of 0.9% sodium chloride solution. Six rats in each group were sacrificed at d7 and d14, respectively, the blood and lung tissue samples were collected. The serum free DNA (cfDNA/NETs) levels were detected using PicoGreen fluorescent staining method, lung tissue NETs were observed by confocal microscopy imaging, the Radical Alveolar Count(RAC) and Mean Linear Intercept(MLI) in lung tissue were measured. **Results** The serum free DNA levels in the hyperoxia group and control group were significantly higher than that in the air group (all  $P<0.05$ ), while that in the heparin group was significantly lower ( $P<0.05$ ). Compared with air group, the fluorescence signal range of histones, myeloperoxidase, and the expression of NETs in lung tissues of hyperoxia group and control group were increased, while those in heparin group decreased on d7 and d14. Compared with the air group, neonatal rats RAC in the hyperoxia group and the control group decreased significantly, while MLI increased significantly (all  $P<0.05$ ). Compared with the hyperoxia group, RAC significantly increased and MLI significantly decreased in the heparin group (all  $P<0.05$ ). **Conclusion** Large amount of NETs exist in serum and lung tissues of neonatal rats with high oxygen-induced BPD, heparin can inhibit the production of NETs and may attenuate hyperox-

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.23.2019-2861

基金项目:温州市科技局项目(Y20140497);义乌市科技局项目(19-3-100)

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院儿科(盛安群、孙媛媛、钱燕、朱融和、周爱华、王楸、冯建华);义乌市妇幼保健院新生儿科(陈翠娥);玉环市人民医院儿科(张希希)

通信作者:孙媛媛,E-mail:61132318@qq.com

ide-induced pulmonary development arrest.

【Key words】 Heparin Neutrophil extracellular traps Bronchopulmonary dysplasia Hyperoxia

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是胎龄<32周早产儿最常见的并发症,由高氧、感染、炎症、机械通气等多因素引起,易继发肺炎、肺动脉高压等并发症,严重影响患儿生长发育及生存质量<sup>[1-4]</sup>。近年来随着早产儿救治成功率的不断升高,BPD发病率逐年升高<sup>[5]</sup>。但治疗BPD的措施仍十分有限,且疗效欠佳。中性粒细胞诱捕网(neutrophil extracellular traps, NETs)是中性粒细胞释放到胞外的包含有游离DNA、组蛋白、髓过氧化物酶、中性粒细胞弹性蛋白酶、组织蛋白酶G的网状结构,是区别于凋亡与坏死的另一种细胞死亡方式<sup>[6]</sup>。NETs是机体重要的免疫防御机制,但其过度释放或清除不及时,NETs相关效应分子则会导致组织损伤、器官功能失调或衰竭。相关研究发现,在多种炎性肺疾病(如囊性肺纤维化、哮喘、慢性阻塞性肺疾病、急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征、肺气肿、输血相关性急性肺损伤等)中,均伴有NETs高表达及清除减少<sup>[7-11]</sup>。本研究建立高氧致BPD新生鼠模型并检测其血清及肺组织中NETs变化,以进一步探讨NETs在BPD发病机制中的作用,同时采用肝素干预并分析其对NETs的影响,现将结果报道如下。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物 取SD成年大鼠[体重180~200g,购自上海实验动物中心SCXK(沪)2012-0002],以雌雄比3:1合笼交配,每日清晨对雌鼠行阴道分泌物涂片、镜检,发现精子细胞后分笼饲养直到自然生产;取自然生产的48只新生SD大鼠为实验对象,体重6~7g。本实验得到温州医科大学实验动物中心的许可。

1.2 主要仪器和试剂 氧舱自动控制系统(温州医科大学机能实验中心自制),测氧装置(TRD-2E1500B,德国Envite C-Wismar公司),控氧仪(24h HBO-2B,浙江建德梅城电化分析仪器厂),二氧化碳检测仪(S80053,德国Envite C-Wismar公司),共聚焦显微镜(FV1000,日本OLYMPUS公司),荧光酶标仪(POLARstar OPTIMA,德国BMG公司)。定量PicoGreen dsDNA试剂盒(P7589,加拿大Invitrogen公司),抗组蛋白H3抗体(SC51716,美国Santa Cruz公司),抗髓过氧化物酶抗体(GB11224,武汉谷歌生物科技有限公司),肝素钠注射液(G2016,江苏千红生化制药股份有限公司)。

1.3 动物分组与处理 将新生鼠随机分为空气组、高

氧组、肝素组(O<sub>2</sub>+肝素)、对照组(O<sub>2</sub>+0.9%氯化钠溶液),每组12只。空气组置于空气中,其他3组置于氧浓度为90%的高氧箱7d建立BPD模型。肝素组于造模开始后,每天腹腔注射低剂量肝素(250U/kg)至造模结束;对照组每天腹腔注射约25μl 0.9%氯化钠注射液。室温控制在(25±2)℃,湿度维持在50%,给予动物12h光/暗交替的环境,保证饲料和水充足,每日开箱1h。分别在出生后第7、14天每组各取6只,水合氯醛腹腔注射麻醉,迅速切开左颈部皮肤,分离出颈总动脉,采集血液标本,并置于含3.8%枸橼酸三钠的EP管中,离心后吸出血清,置于-80℃冰箱保存,用于血清游离DNA水平检测。切开新生鼠胸前皮肤,钝性分离皮下组织、肌肉,切断肋骨,打开胸腔,暴露肺组织,结扎右侧支气管,4%多聚甲醛溶液灌注左肺并固定,置于4℃冰箱保存,用作肺组织形态学分析及共聚焦纤维成像。

1.4 血清中游离DNA水平检测 采用荧光染色法。使用PicoGreen双链DNA荧光定量测定试剂盒检测血清中游离DNA水平。稀释标准品储液和样品,每孔50μl加入到96孔板,加入PicoGreen荧光染料100μl,室温避光2~5min,荧光酶标仪检测荧光强度,根据标准曲线计算cf-DNA/NETs,即游离DNA水平。

1.5 NETs免疫荧光染色及观察 取左肺组织,石蜡包埋,4μm切片,脱蜡,柠檬酸盐缓冲液提取抗原,0.1% Triton X-100渗透10min,封闭标本,抗瓜氨酸组蛋白H3(1:100)、抗髓过氧化物酶抗体(1:500)4℃孵育过夜,PBS清洗,二抗(1:400)37℃孵育1h。采用4,6-二氨基-2-苯基吲哚(DAPI)避光染色5~10min、90%甘油封片,共聚焦显微镜成像并观察切片荧光信号范围。

1.6 肺组织形态学观察 取左肺中叶,乙醇梯度脱水,石蜡包埋,4~5μm切片,HE染色,观察肺组织形态变化。在光镜下摄片,计数肺泡辐射状计数(RAC)<sup>[12]</sup>和平均内衬间隔(MLI)<sup>[13]</sup>。

1.7 统计学处理 应用SPSS 25.0统计软件。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验。*P*<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 4组新生鼠血清中游离DNA水平比较 出生后第7、14天,高氧组、对照组新生鼠血清游离DNA水平明显高于空气组,差异均有统计学意义(均*P*<0.05);肝素

组新生鼠血清游离 DNA 水平明显低于高氧组, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 4 组新生鼠血清中游离 DNA 水平比较(ng/ml)

组别	n	第 7 天	第 14 天
空气组	6	134.67 ± 4.97	138.00 ± 6.29
高氧组	6	323.00 ± 6.45*	335.50 ± 12.32*
肝素组	6	144.50 ± 8.26 <sup>△</sup>	148.33 ± 10.65 <sup>△</sup>
对照组	6	321.83 ± 10.99*	329.83 ± 17.36*
P 值		<0.05	<0.05

注:与空气组比较,\* $P < 0.05$ ;与高氧组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$

2.2 4 组新生鼠肺组织荧光显微镜下 NETs 变化 出生后第 7、14 天新生鼠肺组织 NETs 免疫荧光染色观察,与空气组比较,高氧组和对照组肺组织组蛋白、髓过氧化物酶荧光信号范围明显增加,提示 NETs 数量增加,见图 1(插页);这证实高氧暴露会增加肺组织损伤。肝素组与高氧组相比较,荧光信号范围减少;与空气组比较差异不明显,提示肝素干预可以减轻肺组织 NETs 形成。

2.3 4 组新生鼠肺组织形态学比较 随着鼠龄增加,空气组新生鼠肺组织发育逐渐成熟,肺泡明显增多;高氧组、对照组在第 7 天即可观察到肺泡简单化,即肺泡壁变薄,部分肺泡融合,第 14 天时肺发育依然受阻明显,肺泡腔扩大,数目减少,结构紊乱,提示肺组织发生了类似 BPD 的病理改变;肝素组肺泡发育受阻不明显,见图 2(插页)。出生后第 7、14 天,与空气组比较,高氧组、对照组新生鼠 RAC 明显减少,MLI 明显增加,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );与高氧组比较,肝素组 RAC 明显增加,MLI 明显减少,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ );肝素组与空气组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 2。

表 2 4 组新生鼠肺组织 RAC 及 MLI 比较

组别	n	RAC(个)		MLI(μm)	
		第 7 天	第 14 天	第 7 天	第 14 天
空气组	6	7.31 ± 1.99	9.05 ± 2.44	56.25 ± 3.72	44.42 ± 6.31
高氧组	6	4.91 ± 0.99*	6.71 ± 0.78*	66.67 ± 2.34*	69.41 ± 5.08*
肝素组	6	7.22 ± 1.07 <sup>△</sup>	9.04 ± 2.33 <sup>△</sup>	56.46 ± 3.07 <sup>△</sup>	44.08 ± 6.49 <sup>△</sup>
对照组	6	4.83 ± 0.95*	6.83 ± 1.72*	67.50 ± 4.81*	68.92 ± 4.23*
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与空气组比较,\* $P < 0.05$ ;与高氧组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$

### 3 讨论

BPD 是极低出生体重儿常见的呼吸系统并发症,严

重影响患儿的生存质量<sup>[5]</sup>。BPD 病因复杂,其中早产儿肺发育不完善是 BPD 的发病基础,其他因素如高氧、机械通气、感染、炎症等均可加重 BPD。中性粒细胞是人体固有免疫应答的重要细胞,在 BPD 发病机制中发挥着重要作用,中性粒细胞的聚集和激活是引起肺部毛细血管和肺泡损伤的主要原因。研究发现,高氧暴露后新生鼠肺组织中性粒细胞明显增多,肺组织明显受损;而通过减少或清除肺内中性粒细胞后,肺组织受损情况可出现明显好转<sup>[14]</sup>。

NETs 是由德国科学家 Brinkmann 等<sup>[15]</sup>发现的,它是活化的中性粒细胞释放到胞外的,包含 DNA、组蛋白、髓过氧化物酶、中性粒细胞弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G 等构成的网状结构。它的形成是区别于凋亡和坏死的另一种细胞死亡方式,NETs 介导的杀灭途径是人体重要的天然免疫应答机制,组织中 NETs 的诱捕作用能使机体有效防御病原体感染,减少病原体向血液扩散。然而,如果机体局部出现高浓度 NETs,即可诱导大量胞外组蛋白释放,同时诱导内皮细胞损伤、凝血功能障碍和炎症反应,最终导致组织损伤、器官功能失调或衰竭。既往研究发现,多种炎症性肺疾病,包括囊性肺纤维化、哮喘、慢性阻塞性肺疾病、急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征等均伴有中性粒细胞及 NETs 高表达,且清除减少<sup>[10-11,16-19]</sup>。Saffarzadeh 等<sup>[20]</sup>研究发现,NETs 可直接导致肺上皮细胞和内皮细胞死亡,其细胞毒性呈剂量依赖性;同时抗组蛋白抗体及髓过氧化物酶抑制剂可明显改善 NETs 引起的细胞毒性。本研究检测了高氧致新生鼠 BPD 模型血清及肺组织中 NETs 水平,结果显示血清中游离 DNA 水平及肺组织 NETs 数量均明显升高;这提示 NETs 过度表达介导了 BPD 发病,为 BPD 发病机制提供了新的理论依据。

肝素是一种酸性黏多糖,带负电荷;组蛋白是真核生物细胞染色质中的碱性蛋白质,带正电荷。肝素可直接结合组蛋白,并能有效减轻组蛋白介导的细胞毒性反应<sup>[21-22]</sup>。近期多项研究结果提示,肝素可与细胞外组蛋白结合,降低 NETs 的活性,从而削弱 NETs 介导的凝血作用和感染相关的血管功能障碍,减轻 NETs 的生物毒性反应<sup>[21]</sup>。非抗凝血肝素也可以与组蛋白结合,抑制组蛋白介导的细胞毒性,并可降低无菌性炎症和脓毒症小鼠模型的死亡率<sup>[23]</sup>。低分子肝素亦可阻止活化的中性粒细胞自噬诱导和 NETs 的形成<sup>[24]</sup>,对脓毒症所致的急性肺损伤具有良好的治疗作用。本研究结果显示,高氧暴露可导致新生鼠肺泡发育停滞,表现为 RAC 下降、MLI 升高;而肝素干预后,肺泡发育停滞改善,RAC 升高,MLI

下降,同时 NETs 水平明显下降。

综上所述,NETs 在 BPD 发病中发挥了重要作用,而肝素可通过中和胞外组蛋白、破坏 NETs 结构来达到改善 BPD 的作用。本课题从全新的角度阐明了肝素在 BPD 治疗中的作用,为其临床应用转化提供了一定的理论依据。

#### 4 参考文献

- [1] Kalikkot TR, Guaman MC, Shivanna B. Bronchopulmonary dysplasia: A review of pathogenesis and pathophysiology[J]. *Respir Med*, 2017,132:170–177.DOI:10.1016/j.rmed.2017.10.014.
- [2] Jeng SF, Hsu CH, Tsao PN, et al. Bronchopulmonary dysplasia predicts adverse developmental and clinical outcomes in very-low-birthweight infants[J]. *Dev Med Child Neurol*, 2008, 50(1):51–57.DOI:10.1111/j.1469–8749.2007.02011.x.
- [3] Doyle LW. Respiratory function at age 8–9 years in extremely low birthweight/very preterm children born in Victoria in 1991–1992[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2006, 41(6):570–576. DOI:10.1002/ppul.20412.
- [4] Gibson AM, Reddington C, McBride L, et al. Lung function in adult survivors of very low birth weight, with and without bronchopulmonary dysplasia[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2015, 50(10):987–994. DOI:10.1002/ppul.23093.
- [5] 早产儿支气管肺发育不良调查协作组. 早产儿支气管肺发育不良发生率及高危因素的多中心回顾调查分析[J]. *中华儿科杂志*, 2011, 49(9):655–662. DOI:10.3760/cma.j.issn.0578–1310.2011.09.004.
- [6] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. *Science*, 2004, 303:1532–1535. DOI:10.1126/science.1092385.
- [7] 陈熙, 肖钢, 李园园, 等. 中性粒细胞胞外诱捕网与肺部炎症性疾病的关系[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2019, 46(5):465–473. DOI:10.16476/j.pibb.2018.0213
- [8] Li H, Pan P, Su X, et al. Neutrophil Extracellular Traps Are Pathogenic in Ventilator-Induced Lung Injury and Partially Dependent on TLR4[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017:8272504. DOI:10.1155/2017/8272504.
- [9] Narasaraju T, Yang E, Samy RP, et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179:199–210. DOI:10.1016/j.ajpath.2011.03.013.
- [10] Dwyer M, Shan Q, D'Ortona S, et al. Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor[J]. *J Innate Immun*, 2014, 6:765–779.DOI:10.1159/000363242.
- [11] Dicker AJ, Crichton ML, Pumphrey EG, et al. Neutrophil extracellular traps are associated with disease severity and microbiota diversity in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(1):117–127. DOI:10.1016/j.jaci.2017.04.022.
- [12] Cooney TP, Thurlbeck WM. The radial alveolar count method of Emery and Mithal: a reappraisal 2--intrauterine and early post-natal lung growth[J]. *Thorax*, 1982, 37:580–583. DOI:10.1136/thx.37.8.580.
- [13] 张超凤, 区庆坚, 王志红, 等. 骨髓间充质干细胞移植治疗大鼠慢性阻塞性肺疾病[J]. *心血管病杂志*, 2011, 30(1):62–66. DOI:10.3969/j.issn.1007–5062.2011.01.018.
- [14] Deng H, Mason SN, Anten RL. Lung inflammation in hyperoxia can be prevented by antihemokine treatment in newborn rats [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162(6):2316–2323. DOI:10.1164/ajrccm.162.6.9911020
- [15] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria[J]. *Science*, 2004, 303(5663):1532–1535. DOI:10.1126/science.1092385.
- [16] Liu T, Wang FP, Wang G, et al. Role of neutrophil extracellular traps in asthma and chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2017, 130(6):730–736. DOI:10.4103/0366–6999.201608.
- [17] Czaikoski PG, Mota JM, Nascimento DC, et al. Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2):e0148142.DOI:10.1371/journal.pone.0148142.
- [18] Li H, Zhou X, Tan H, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of acid-aspiration-induced ALI/ARDS[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(2):1772–1784.DOI:10.18632/oncotarget.22744.
- [19] Liu S, Su X, Pan P, et al. Neutrophil extracellular traps are indirectly triggered by lipopolysaccharide and contribute to acute lung injury[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:37252.DOI:10.1038/srep37252.
- [20] Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2):e32366. DOI:10.1371/journal.pone.0032366.
- [21] Shute JK, Puxeddu E, Calzetta L. Therapeutic use of heparin and derivatives beyond anticoagulation in patients with bronchial asthma or COPD[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2018, 40:39–45.DOI:10.1016/j.coph.2018.01.006.
- [22] Ludwig RJ. Therapeutic use of heparin beyond anticoagulation in patients with bronchial asthma or COPD[J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2009, 6(4):281–289. DOI:10.1016/j.coph.2018.01.006.
- [23] Wildhagen KC, Garciade FP, Reutelingsperger CP, et al. Non-anticoagulant heparin prevents histone-mediated cytotoxicity in vitro and improves survival in sepsis[J]. *Blood*, 2014, 123(7):1098–1101. DOI:10.1182/blood-2013-07-514984.
- [24] Manfredi AA, Rovere-Querini P, D'Angelo A, et al. Low molecular weight heparins prevent the induction of autophagy of activated neutrophils and the formation of neutrophil extracellular traps[J]. *Pharmacol Res*, 2017, 123:146–156. DOI:10.1016/j.phrs.2016.08.008.

(收稿日期:2019-09-23)

(本文编辑:陈丹)