

输血相关急性肺损伤对大鼠血浆和肺组织血管生成素 -2 表达的影响

龚艳杰 魏明 涂玲 刘佳 梁颖红 张宜花 杨璐

作者单位: 450052 郑州市, 郑州大学第五附属医院输血科

通讯作者: 魏明, Email: gushiweiming@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.03.015

【摘要】 目的 探讨输血相关急性肺损伤 (TRALI) 时血浆和肺组织中血管生成素 -2 (Ang-2) 的表达及其意义。方法 选择 60 只 SD 大鼠, 按随机数字表法分为生理盐水 (NS) 对照组、脂多糖 (LPS) 对照组、TRALI 模型组、急性肺损伤 (ALI) 对照组, 每组 15 只。采用“LPS-血浆二次打击”法复制 TRALI 大鼠模型。NS 对照组腹腔注射 NS 2 mL, 移除大鼠血液 1 mL 后输注等体积 NS。LPS 对照组大鼠腹腔注射 2 mg/kg LPS (1 min 内注完) 1 mL 2 h 后静脉输注等体积 NS。TRALI 模型组腹腔注射 2 mg/kg LPS 1 mL, 2 h 后静脉输注血浆 1 mL。ALI 对照组静脉输注 5 mg/kg LPS 1 mL 诱导 ALI。制模完成后处死大鼠取肺组织观察病理学改变并进行肺损伤评分; 取支气管肺泡灌洗液 (BALF) 检测细胞总数、中性粒细胞比例 (NEUT); 用蛋白质免疫印迹试验 (Western Bolt) 检测血浆中 Ang-2 蛋白表达; 免疫组化法观察肺组织中 Ang-2 阳性表达; 实时荧光定量反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测大鼠肺组织中 Ang-2 mRNA 表达水平。**结果** 光镜下可见, NS 对照组大鼠肺组织结构清楚, 肺泡壁结构完整, 肺泡内未见炎性细胞渗出及肺泡萎陷, 肺泡间隔均一无增宽; LPS 对照组肺泡间隔轻度增宽、有少量炎性细胞浸润; TRALI 模型组肺泡间隔增宽、中等量出血并有较多炎性细胞浸润; ALI 对照组肺内大量炎性细胞浸润, 间质水肿加重, 伴出血、微血栓及灶性肺不张。ALI 对照组、TRALI 模型组血浆 Ang-2 蛋白和肺组织 Ang-2 mRNA 表达均显著高于 NS 对照组、LPS 对照组 [Ang-2 蛋白 (灰度值): 0.58 ± 0.09 、 0.43 ± 0.07 比 0.12 ± 0.03 、 0.20 ± 0.05 , Ang-2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.39 ± 0.10 、 0.29 ± 0.09 比 0.10 ± 0.05 、 0.16 ± 0.04 , P 均 < 0.01]; ALI 对照组、TRALI 模型组 BALF 细胞总数 ($\times 10^6/L$): 361 ± 78 、 310 ± 76 比 101 ± 63 、 165 ± 65 、NEUT (0.396 ± 0.125 、 0.335 ± 0.115 比 0.098 ± 0.035 、 0.114 ± 0.041) 均明显高于 NS 对照组和 LPS 对照组 (P 均 < 0.05); ALI 对照组、TRALI 模型组病理学评分、肺湿重/体重比值和动脉血氧分压 (PaO₂) 均显著高于 NS 对照组和 LPS 对照组 (P 均 < 0.05)。ALI 对照组与 TRALI 模型组各项指标比较差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。**结论** TRALI 大鼠肺组织和血浆中 Ang-2 的表达升高, 提示 Ang-2 可能参与了 TRALI 病理生理过程。

【关键词】 肺损伤, 急性, 输血相关; 血管生成素 -2; 脂多糖; 血浆

Expression of angiotensin-2 in plasma and lung tissue of rats with transfusion-related acute lung injury

GONG Yan-jie, WEI Ming, TU Ling, LIU Jia, LIANG Ying-hong, ZHANG Yi-hua, YANG Lu. Department of Transfusion, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

【Abstract】 Objective To study the expression of angiotensin-2 (Ang-2) in plasma and lung tissue of rats with transfusion-related acute lung injury (TRALI) and its significance. **Methods** Sixty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal saline (NS) control group, lipopolysaccharide (LPS) control group, TRALI model group, and acute lung injury (ALI) control group, with 15 rats in each group. The rat model of TRALI was reproduced by "LPS-plasma two-hit" method. The rats in NS control group were intraperitoneally injected 2 mL NS, the same volume of NS was intravenously injected after 1 mL blood collection. The rats in LPS control group were intraperitoneally injected 2 mg/kg LPS 1 mL within 1 minute, and the same volume of NS was intravenously injected 2 hours later. The rats in TRALI model

group were challenged by intraperitoneal injection of 2 mg/kg LPS 1 mL at 2 hours before the transfusion of 1 mL plasma. The rats in ALI control group were challenged by intraperitoneal injection of LPS 5 mg/kg to reproduce the model of ALI. The lung tissues were harvested to observe the pathological changes, and lung injury score was evaluated. The total cells and neutrophils (NEUT) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined. Western Blot was used to detect Ang-2 protein expression in plasma, and immunohistochemical method was used to detect Ang-2 positive expression in lung tissue. The real-time fluorescent reverse transcription-quantitative polymerase chain (RT-PCR) was used to detect Ang-2 mRNA expression in the lung tissue. **Results** Under the light microscope, rat lung tissue structure in the NS control group was clear, the alveolar wall was intact, no alveolar exudate, alveolar collapse or inflammatory cells in alveolar septum was found, and alveolar septum did not increase. The alveolar septum was widened slightly in LPS control group, a small amount of inflammatory cell infiltration was found. The alveolar septum, moderate bleeding and more infiltration of inflammatory cells were found in TRALI model group. Lung inflammatory infiltration, interstitial edema, hemorrhage, micro-thrombosis and focal atelectasis were found in the ALI control group. Compared with NS control group and LPS control group, Ang-2 protein expression in plasma and Ang-2 mRNA expression in the lung tissue were significantly increased in ALI control group and TRALI model group [Ang-2 protein (gray value): 0.58 ± 0.09 , 0.43 ± 0.07 vs. 0.12 ± 0.03 , 0.20 ± 0.05 , Ang-2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.39 ± 0.10 , 0.29 ± 0.09 vs. 0.10 ± 0.05 , 0.16 ± 0.04 , P all < 0.01]. The total cells [total cells ($\times 10^6/L$): 361 ± 78 , 310 ± 76 vs. 101 ± 63 , 165 ± 65] and NEUT (0.396 ± 0.125 , 0.335 ± 0.115 vs. 0.098 ± 0.035 , 0.114 ± 0.041) in BALF of ALI control group and TRALI model group were significantly higher than those of NS control group and LPS control group (P all < 0.05). The pathological score, wet lung weight/body weight ratio and arterial partial pressure of oxygen (PaO₂) in ALI control group and TRALI model group were significantly higher than those of NS control group and LPS control group (P all < 0.05). There were no significant differences in above parameters between ALI control group and TRALI model group (P all > 0.05). **Conclusions** Expression of Ang-2 in the lung tissue and plasma were increased in rats with TRALI. Ang-2 may be involved in the TRALI pathophysiological process.

【 Key words 】 Transfusion-related acute lung injury; Angiopoietin-2; Lipopolysaccharide; Plasma

随着血液采集、血制品制备过程中消毒灭菌技术的提高和操作规程的不断完善,多数输血相关并发症已得到了较满意的控制。但免疫相关性输血并发症问题却日益突出^[1],输血相关急性肺损伤(TRALI)就是其中之一,TRALI通常发生于输血期间或输血后6 h内,以急性缺氧和非心源性肺水肿为特点,因其病死率高而越来越受到重视^[2-3],但TRALI的发病机制目前尚不明确。

血管生成素(Ang)在炎症和血管动态平衡中扮演着重要的角色,被认为可能具有前炎性介质的作用^[4],在急性肺损伤(ALI)过程中发挥着重要作用^[5-6],但其在TRALI发病中的作用尚不清楚。研究表明,脂多糖(LPS)诱导的小鼠ALI程度与剂量和时间呈正相关^[7]。

本研究通过“LPS-血浆二次打击法”^[8]建立TRALI大鼠模型,观察Ang-2在TRALI肺组织中表达水平的变化,探讨Ang-2在介导TRALI大鼠肺损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

1.1.1 实验动物 6~7周龄雄性SD大鼠180只,体重(235 ± 25)g,无特定病原体条件下饲养,标准颗粒饲料、饮水、垫料及一切物品均经无菌处理。

1.1.2 主要材料 实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测仪、SybrGreen PCR混合液(美国ABI公司);低温高速离心机(美国Beckman公司);-80℃冰箱(日本SANYO公司);电热恒温水浴箱(上海净化设备有限公司);LPS(美国Sigma公司);氯胺酮(福建古田药业有限公司);蛋白质免疫印迹试验(Western Bolt)检测试剂(上海生物工程技术服务有限公司);第1链cDNA合成试剂盒、TRIzol试剂、氯仿、异丙醇(美国BBI公司);无水乙醇(上海生物工程技术服务有限公司)。

1.2 动物模型制备及处理 将60只SD大鼠按随机数字表法分为生理盐水(NS)对照组、LPS对照组、TRALI模型组、ALI对照组,每组15只。参照

文献[8]方法采用“LPS-血浆二次打击”法复制 TRALI 模型。① NS 对照组经腹腔注射 NS 2 mL,并移除大鼠血液 1 mL 后输注等体积 NS。② LPS 对照组经大鼠腹腔注射 LPS 2 mg/kg(1 min 内注完)1 mL 2 h 后输注等体积 NS。③ TRALI 模型组腹腔注射 LPS 2 mg/kg(1 min 内注完)1 mL,回笼后 2 h,腹腔注射氯胺酮 80 mg/kg 麻醉大鼠分离股血管并插管,内充 50% 肝素-NS 混合液,5~10 min 内移除约大鼠 10% 血容量的血液(1 mL),再输注 1 mL 血浆,输注速度为 ≤ 4 mL/h。④ ALI 对照组:移除约为大鼠 10% 血容量的血液(1 mL)后输注 1 mL 5 mg/kg LPS。各组大鼠取血浆-80℃冰箱保存备用。

1.3 伦理学 本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 血浆制备 参照文献[9-10]方法,无菌条件下采集 120 只 SD 大鼠全血 1.5 U(1 U 含全血 150 mL 及枸橼酸钠、枸橼酸、葡萄糖、腺嘌呤与磷酸二氢钠混合制成的灭菌水溶液 45 mL),(4±2)℃ 储存 28 d 后,3 000 r/min(离心半径 10 cm)分离血浆 100 mL,无菌条件下分装 100 份,每份 1 mL,-80℃ 保存备用,输注前将血浆 56℃ 水浴 30 min。

1.4.2 肺组织相关指标检测及病理学观察 腹腔注射 0.35 mg/kg 水合氯醛麻醉大鼠后开胸,暴露心肺,右心室采血处死动物,左心室取血,检测动脉血氧分压(PaO₂);取左肺称重,计算肺湿重/体重比值;取支气管肺泡灌洗液(BALF),检测细胞总数及中性粒细胞比例(NEUT);取右肺石蜡包埋,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织病理损伤程度,并按 Mikawa 等^[11]方法进行肺损伤评分:按肺泡充血、出血、肺泡腔或血管壁中性粒细胞浸润或聚集、肺泡壁增厚和(或)透明膜形成 4 项指标,分别依病变程度评分:0 分为无病变或非常轻微;1 分为轻度病变;2 分为中度病变;3 分为重度病变;4 分为极重度病变。各项评分相加为 ALI 总评分。

1.4.3 Western Blot 检测血浆 Ang-2 蛋白表达 从血浆中提取总蛋白,取 50 μg 蛋白质行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转移到硝酸纤维素膜上。将膜放入含 50 g/L 脱脂奶粉的磷酸盐吐温缓冲液(PBS-T)中封闭,4℃ 过夜后用 PBS-T 洗膜 3 次,每次 10 min;然后加入一抗(1:500 Ang-2)、β-肌动蛋白(β-actin, 1:1 000)37℃ 孵育 2 h;除去一抗,用 PBS-T 洗膜 3 次,每

次 10 min;然后加入与一抗相应的二抗(1:2 000)37℃ 孵育 2 h;用 PBS-T 洗膜 3 次,每次 10 min;最后用电化学发光法(ECL)进行检测,压片、显影、定影,胶片进行图像分析。以目的蛋白与 β-actin 的灰度值比值作为目的蛋白的表达量。

1.4.4 免疫组化链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)法检测肺组织 Ang-2 阳性表达 浓缩型 Ang-2 兔抗鼠多克隆抗体、SABC 试剂盒及 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒均购自中杉金桥生物技术有限公司,操作严格按说明书进行。

1.4.5 实时荧光定量 RT-PCR 检测肺组织 Ang-2 mRNA 表达 采用 TRIzol 方法提取细胞总 RNA。cDNA 合成 RT-PCR 前使用 DNA Eraser 去除基因组 DNA,纯化的 RNA 反转录合成 cDNA,反转录体系 20 μL。各样品目的基因和管家基因全部进行实时荧光定量 PCR,采用 SYBRGreen 法。引物设计参照 Genebank 的基因序列和 Primerbank 的推荐,Ang-2 扩增产物大小 236 bp,上游引物:5'-TTCGGA CTCTGTCACAAGCAA-3',下游引物:5'-ACAAGAC GGAACAACGAACTG-3';β-actin 扩增产物大小 229 bp,上游引物:5'-CGTAAAGACCTCTATGCCAACA-3';下游引物:5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCT-3'。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。每个样品按相同条件重复 3 次,与管家基因 β-actin 均一化以消除误差后取平均值,用 2^{-ΔΔCt} 法计算基因表达水平。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件分析数据,正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐时采用 Bonferroni 法进行多重比较,方差不齐时采用 Welch 分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肺组织病理学观察 光镜下可见,NS 对照组大鼠肺组织结构清楚,肺泡壁结构完整,肺泡内未见炎性细胞渗出及肺泡萎陷,肺泡间隔均一无增宽;LPS 对照组肺泡间隔轻度增宽,有少量炎性细胞浸润;TRALI 模型组肺泡间隔增宽、中等量出血并有较多炎性细胞浸润;ALI 对照组肺内大量炎性细胞浸润,间质水肿加重,伴出血、微血栓及灶性肺不张。见图 1。表 1 显示,ALI 对照组和 TRALI 模型组肺组织病理学评分明显高于 NS 对照组及 LPS 对照组(P 均 < 0.05);而 ALI 对照组与 TRALI 模型组比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05)。

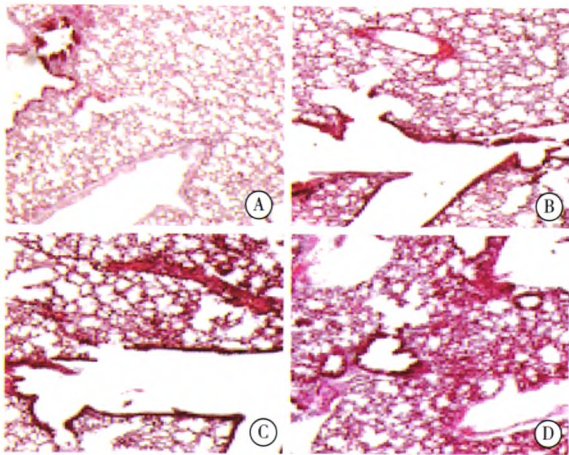


图 1 各组肺组织病理学改变(HE 染色 中倍放大)
注:A 为 NS 对照组;B 为 LPS 对照组;
C 为 TRALI 模型组;D 为 ALI 对照组

2.2 各组肺湿重/体重比值和 PaO₂ 比较 ALI 对照组和 TRALI 模型组大鼠肺湿重/体重比值显著高于 NS 对照组和 LPS 对照组(*P* 均 < 0.05),同时伴有换气功能的障碍,表现为 PaO₂ 降低(*P* 均 < 0.05);而 ALI 对照组与 TRALI 模型组比较差异无统计学意义(*P* 均 > 0.05)。见表 1。

表 1 各组大鼠肺湿重/体重比值、PaO₂ 及肺组织病理学评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	肺湿重/体重 比值	PaO ₂ (mmHg)	病理学评分 (分)
NS 对照组	15	0.10 ± 0.07	96.47 ± 5.64	0.00 ± 0.00
LPS 对照组	15	0.13 ± 0.07	75.34 ± 2.78	1.07 ± 0.48
TRALI 模型组	15	0.18 ± 0.06 ^{ab}	60.45 ± 3.68 ^{ab}	1.98 ± 0.87 ^{ab}
ALI 对照组	15	0.20 ± 0.05 ^{ab}	47.29 ± 4.28 ^{ab}	2.32 ± 0.70 ^{ab}

注:与 NS 对照组比较,^a*P* < 0.01;与 LPS 对照组比较,^b*P* < 0.05; 1 mmHg = 0.133 kPa

2.3 各组 BALF 细胞总数和 NEUT 比较 ALI 对照组和 TRALI 模型组 BALF 细胞总数及 NEUT 均显著高于 NS 对照组和 LPS 对照组(均 *P* < 0.05);而 ALI 对照组与 TRALI 模型组比较差异无统计学意义(均 *P* > 0.05)。见表 2。

表 2 各组大鼠 BALF 细胞总数和 NEUT 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	细胞总数(×10 ⁶ /L)	NEUT
NS 对照组	15	101 ± 63	0.098 ± 0.035
LPS 对照组	15	165 ± 65	0.114 ± 0.041
TRALI 模型组	15	310 ± 76 ^{ab}	0.335 ± 0.115 ^{ab}
ALI 对照组	15	361 ± 78 ^{ab}	0.396 ± 0.125 ^{ab}
<i>F</i> 值		13.820	5.410
<i>P</i> 值		< 0.001	0.001

注:与 NS 对照组比较,^a*P* < 0.01;与 LPS 对照组比较,^b*P* < 0.05

2.4 各组血浆 Ang-2 蛋白表达比较 ALI 对照组和 TRALI 模型组大鼠血浆 Ang-2 蛋白表达均显著高于 NS 对照组及 LPS 对照组(*P* 均 < 0.01);而 NS 对照组与 LPS 对照组血浆 Ang-2 蛋白表达比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 3 和图 2。

表 3 各组大鼠血浆 Ang-2 蛋白和肺组织 Ang-2 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	Ang-2 蛋白 (灰度值)	Ang-2 mRNA (2 ^{-ΔΔCt})
NS 对照组	15	0.12 ± 0.03	0.10 ± 0.05
LPS 对照组	15	0.20 ± 0.05	0.16 ± 0.04
TRALI 组	15	0.43 ± 0.07 ^{ab}	0.29 ± 0.09 ^{ab}
ALI 对照组	15	0.58 ± 0.09 ^{ab}	0.39 ± 0.10 ^{ab}

注:与 NS 对照组比较,^a*P* < 0.01;与 LPS 对照组比较,^b*P* < 0.01

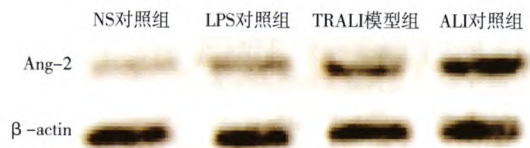


图 2 Western Blot 检测血浆 Ang-2 蛋白表达

2.5 各组肺组织 Ang-2 蛋白表达比较 NS 对照组和 LPS 对照组支气管上皮细胞、内皮细胞、平滑肌细胞均有 Ang-2 表达,而肺泡腔内无异常表达;TRALI 模型组和 ALI 对照组 Ang-2 除与 NS 对照组相同部位的表达之外,TRALI 模型组在支气管上皮细胞存在高表达,甚至黏膜下层有表达,肺泡腔内巨噬细胞高表达 Ang-2;ALI 对照组肺泡腔内巨噬细胞 Ang-2 表达增高,在血管外膜和浸润巨噬细胞亦存在 Ang-2 高表达。见图 3。

2.6 各组肺组织 Ang-2 mRNA 表达比较 ALI 对照组和 TRALI 模型组大鼠肺组织 Ang-2 mRNA 表达均显著高于 NS 对照组及 LPS 对照组(*P* 均 < 0.01);而 NS 对照组与 LPS 对照组比较差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 3。

3 讨论

关于 TRALI 的机制有多种学说,“二次打击学说”对 TRALI 发病机制的解释较为合理:第一次打击是患者输血当时的临床病理状态(如脓毒症、近期外科手术、大量输血),这种状态导致循环中的中性粒细胞(PMN)被激活并隐蔽在肺内^[12];呼吸系统细菌感染患者 PMN 体积参数的变化可为临床诊断呼吸系统疾病起到很好的提示作用^[13]。第二次打击是输入含白细胞抗体血液和(或)含生物活性

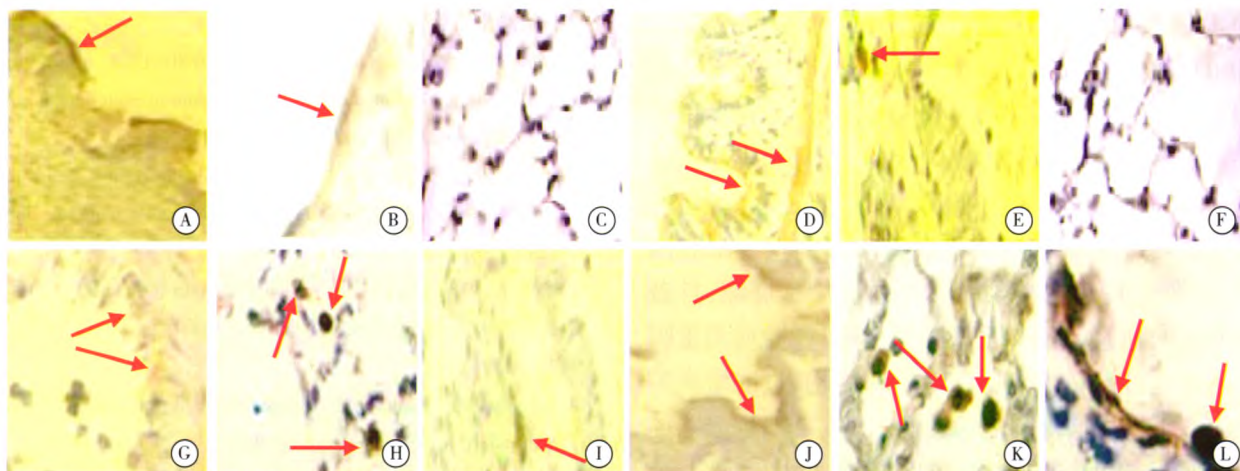


图3 免疫组化法检测肺组织 Ang-2 阳性表达 NS 对照组支气管上皮细胞、内皮细胞可见 Ang-2 阳性表达(A~B),肺泡腔无 Ang-2 阳性表达(C);LPS 对照组支气管上皮细胞、平滑肌细胞、支气管黏膜下层可见 Ang-2 蛋白表达(D~E),肺泡腔无 Ang-2 阳性表达(F);TRALI 模型组支气管上皮细胞、肺泡腔、支气管黏膜下层可见 Ang-2 阳性表达(G~I);ALI 对照组支气管上皮细胞、肺泡腔、血管内皮细胞和浸润巨噬细胞均可见 Ang-2 阳性表达(J~L) 箭头所示为 Ang-2 蛋白表达(SABC 高倍放大)

脂质的库存血,与受者白细胞发生反应并激活补体,肺微血管内皮细胞 $Fc\gamma$ 受体引起 PMN 在肺微血管内黏附、聚集和滞留^[14-15]。PMN 的脱粒产物导致肺微血管内皮损伤和通透性增加,肺微血管渗漏使液体和蛋白质渗入肺泡及间质中,发生渗透性肺水肿,从而影响气体交换,出现低氧血症,引起 TRALI 的临床表现。有关动物实验也证实 TRALI 依赖于机体基本情况的严重程度以及所输注的血液制品^[16]。危重患者往往有着可能激活 PMN 的基础条件,“二次打击学说”或许能够解释 TRALI 在这类人群中的高发病率^[17]。

PMN 于肺内大量积聚可能是导致 TRALI 的关键,但 PMN 聚集扣留于肺内的机制尚不清楚^[18]。张如愿等^[19]对 Ang-2 在脓毒症和 ALI/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)中作用的相关研究进行综述,认为 Ang-2 动态变化的研究将为针对 Ang-2 进行特异性干预的时机提供基础,此外,由于可溶性 Tie-2 具有与 Ang-1、Ang-2 结合的能力,因此需要进一步在临床研究中检测可溶性 Tie-2 水平,以加深对 Ang/Tie-2 系统在危重症中作用的理解。钟明媚等^[20]采用前瞻性观察性研究方法,通过检测 53 例 ARDS 患者血浆 Ang-2 浓度,探讨 Ang-2 在 ARDS 诊断及预后判断中的意义。结果显示,ARDS 患者血浆 Ang-2 水平显著升高,当 Ang-2 的最佳临界值为 $1.79 \mu\text{g/L}$ 时,诊断 ARDS 的特异度为 90.0%,敏感度为 92.5%,可以作为肺损伤病情严重程度判断和预后评估的辅助指标。齐志江等^[21]前瞻性序贯收集肠道病毒 71 型(EV71)感染性肺水肿患儿和

EV71 感染无肺水肿患儿各 20 例,观察 EV71 感染患儿肺水肿的临床特点及血清 Ang-2 的变化,探讨 Ang-2 与肺水肿发生的关系。结果显示,EV71 感染性肺水肿患儿肺水中富含蛋白,且血清及肺水中均高表达 Ang-2,Ang-2 可能参与肺部血管渗漏、肺水肿的发病过程。还有研究表明,Ang/Tie-2 系统在炎症反应、内皮细胞活化及炎性细胞渗出中起重要作用^[22]。Fiedler 等^[23]向小鼠腹腔注入金黄色葡萄球菌,收集腹腔灌洗液显示 Ang-2 基因缺陷鼠未能有效地招募 PMN,炎症反应减轻。Lemieux 等^[24]发现,Ang-2 可诱导人脐静脉内皮细胞 P 选择素的定位,而 Ang-2 可以激活 PMN 的 Tie-2,增强其黏附能力,说明 Ang-2 在介导 PMN 渗出方面其有重要作用。

本研究肺组织病理学显示,TRALI 模型组肺组织中有大量 PMN 浸润,可见肺泡壁增厚、充血、肺泡萎陷、肺水肿等 ALI 的病理改变;同时伴有换气功能障碍,表现为氧分压降低;BALF 细胞总数和 NEUT 较 NS 对照组和 LPS 对照组增加;免疫组化结果证实,肺泡腔内、支气管黏膜下层及大动脉、静脉外膜存在 Ang-2 表达的 PMN 和巨噬细胞,表明 Ang-2/Tie-2 可能与 TRALI 发病过程中 PMN 的浸润和炎症反应有关,由此可以推测,在 TRALI 病理生理过程中 Ang-2 可能发挥了一定作用,但其是否参与了 TRALI 肺毛细血管通透性增加的机制,尚待进一步探讨。

Ang-2 能与血管内皮细胞上的 Tie-2 受体相结合,导致血管失稳、增加血管渗漏、上调内皮对血管内皮生长因子和细胞因子的反应,从而引起肺血管

内皮细胞损伤,连续性破坏。本研究 Western Blot 和 RT-PCR 结果显示,ALI 对照组和 TRALI 模型组 Ang-2 表达较 NS 对照组和 LPS 对照组明显升高。也有资料显示 TRALI 模型组大鼠血浆 Ang-2 表达明显高于正常对照组^[25];Gallagher 等^[26]发现 Ang-2 是肺损伤时内皮屏障破坏的重要细胞因子,体外应用患者血浆可破坏内皮细胞屏障,且破坏程度与血浆 Ang-2 水平相关;体外单独应用重组 Ang-2 也可破坏内皮屏障功能和结构,过度增高的 Ang-2 水平可增加肺泡通透性。Ang-2 基因敲除的大鼠可以避免高氧所致的 ALI^[6],由此可以推测,肺血管内皮细胞损伤可能参与了 TRALI 的病理生理过程。

综上所述,通过“LPS-血浆二次打击”的方法建立 TRALI 模型,大鼠血浆 Ang-2 蛋白表达和肺组织 Ang-2 基因表达增高,免疫组化发现肺泡腔和血管及小气道周围炎症区有大量 Ang-2 在 PMN 和巨噬细胞表达,同时炎症附着区内皮细胞表达 Ang-2 增强,说明 Ang-2 可能参与了 TRALI 的病理生理过程,但其在 TRALI 发病过程中的具体作用机制尚有待进一步深入研究。

4 参考文献

- Eder AF, Dy BA, Perez JM, et al. The residual risk of transfusion-related acute lung injury at the American Red Cross (2008–2011): limitations of a predominantly male-donor plasma mitigation strategy. *Transfusion*, 2013, 53: 1442–1449.
- 廖刃,刘进.围手术期血液管理:由限制性输血走向个体化输血. *中华医学杂志*, 2014, 94: 481–482.
- El Kenz H, Van der Linden P. Transfusion-related acute lung injury. *Eur J Anaesthesiol*, 2014, 31: 345–350.
- 刘明华,田君,陈翔宇,等.多发伤患者早期促血管生成素-2 的变化及临床意义. *中华创伤杂志*, 2010, 26: 328–331.
- Orfanos SE, Kotanidou A, Glynos C, et al. Angiotensin-2 is increased in severe sepsis: correlation with inflammatory mediators. *Crit Care Med*, 2007, 35: 199–206.
- Bhandari V, Choo-Wing R, Lee CG, et al. Hyperoxia causes angiotensin 2-mediated acute lung injury and necrotic cell death. *Nat Med*, 2006, 12: 1286–1293.
- 陶一帆,田方敏,郭向阳,等.不同剂量脂多糖在不同作用时间下诱导小鼠急性肺损伤的效果评价. *中国中西医结合急救杂志*, 2015, 22: 142–146.
- 李丽玮,花紫菱,张惠箴,等.输血相关急性肺损伤大鼠模型建立及肺组织病理研究. *中国输血杂志*, 2012, 25: 1121–1124.
- Kelher MR, Masuno T, Moore EE, et al. Plasma from stored packed red blood cells and MHC class I antibodies causes acute lung injury in a 2-event in vivo rat model. *Blood*, 2009, 113: 2079–2087.
- Silliman CC. The two-event model of transfusion-related acute lung injury. *Crit Care Med*, 2006, 34: S124–131.
- Mikawa K, Nishina K, Takao Y, et al. ONO-1714, a nitric oxide synthase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits. *Anesth Analg*, 2003, 97: 1751–1755.
- Looney MR, Roubinian N, Gajic O, et al. Prospective study on the clinical course and outcomes in transfusion-related acute lung injury. *Crit Care Med*, 2014, 42: 1676–1687.
- 俞蕾,翁文浩,施惠兰,等.中性粒细胞 VCS 参数在呼吸系统细菌感染性疾病中的变化及临床应用. *实用检验医师杂志*, 2012, 4: 39–42.
- Takahashi D, Fujihara M, Azuma H, et al. Stimulation of human neutrophils with sera containing HLA Class I alloantibody causes preferential degranulation of azurophilic granules and secretory vesicles. *Vox Sang*, 2010, 98: 560–566.
- West FB, Silliman CC. Transfusion-related acute lung injury: advances in understanding the role of proinflammatory mediators in its genesis. *Expert Rev Hematol*, 2013, 6: 265–276.
- Sayah DM, Looney MR, Toy P. Transfusion reactions: newer concepts on the pathophysiology, incidence, treatment, and prevention of transfusion-related acute lung injury. *Crit Care Clin*, 2012, 28: 363–372.
- Silliman CC, Bercovitz RS, Khan SY, et al. Antibodies to the HLA-A2 antigen prime neutrophils and serve as the second event in an in vitro model of transfusion-related acute lung injury. *Vox Sang*, 2014, 107: 76–82.
- 李玮,谢如锋,范华骅.中性粒细胞在输血相关的急性肺损伤中的作用. *中国输血杂志*, 2012, 25: 1335–1338.
- 张如愿,汤耀卿.血管生成素 2 在脓毒症和急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征中的作用. *中华危重病急救医学*, 2009, 21: 638–640.
- 钟明媚,张琳,王璠,等.急性呼吸窘迫综合征患者血浆血管生成素 2 水平及其对预后的诊断价值. *中华危重病急救医学*, 2014, 26: 804–809.
- 齐志江,李志,郝东,等.血管生成素 2 在 EV71 感染性肺水肿中的作用研究. *中华危重病急救医学*, 2014, 26: 89–93.
- 齐志江,王晓芝,韩兆东,等.大鼠急性肺损伤时 Ang-2/Tie-2 的表达及意义. *中国病理生理杂志*, 2010, 26: 314–317.
- Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, et al. Angiotensin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med*, 2006, 12: 235–239.
- Lemieux C, Maliba R, Favier J, et al. Angiotensins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. *Blood*, 2005, 105: 1523–1530.
- 李丽玮,李志强.输血相关急性肺损伤 SD 大鼠血管生成素 2 和白介素 10 的变化. *中国输血杂志*, 2013, 26: 439–442.
- Gallagher DC, Bhatt RS, Parikh SM, et al. Angiotensin 2 is a potential mediator of high-dose interleukin 2-induced vascular leak. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 2115–2120.

(收稿日期:2016-04-20)

(本文编辑:邸美仙)