

• 论著 •

严重烧伤早期中性粒细胞肺部浸润分布特征及中性粒细胞弹性蛋白酶促进肺损伤的机制研究

张鑫 郑淳方 陈佳慧 郭在文 李林斌 黄佳敏 孙炳伟

南京医科大学附属苏州医院烧伤整形科, 江苏南京 215002

通信作者: 孙炳伟, Email: sunbinwe@hotmail.com

【摘要】 目的 探讨严重烧伤早期中性粒细胞(PMN)在肺部的分布特征以及中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)促进肺损伤的机制。**方法** 选取6~8周龄雄性C57BL/6J小鼠用于实验。建立30%总体表面积(TBSA)Ⅲ度烧伤小鼠模型(严重烧伤组);假伤组用37℃水进行处理。西维来司他钠干预组(SV干预组)致伤后立即尾静脉注射NE竞争性抑制剂西维来司他钠100 mg/kg,其余组注射等量生理盐水。各组取10只小鼠观察72 h存活情况;分别于制模后0(即刻)、3、6、12、24 h检测呼吸功能。采用苏木素-伊红(HE)和免疫组化染色观察小鼠肺组织结构、炎症改变及PMN浸润情况;采用流式细胞仪检测小鼠肺组织内PMN绝对计数;分别于制模后6、12、24 h测定小鼠外周血、肺组织、支气管肺泡灌洗液(BALF)中PMN数量及NE浓度〔酶联免疫吸附试验(ELISA)〕。**结果** ① HE染色结果显示,与假伤组相比,严重烧伤组小鼠肺部出现炎症改变及PMN浸润,其中6 h时改变较为显著;免疫组化结果也证实,严重烧伤6 h PMN释放的NE蛋白表达明显增强[(3.79±0.62)%比(0.18±0.05)%, $t=11.56$, $P<0.01$]。② 与假伤组相比,严重烧伤组小鼠外周血、肺组织中PMN数量及NE浓度显著增加(F 值分别为13.709、55.350及29.890、13.286,均 $P<0.01$),其中6 h达到峰值〔外周血PMN计数($\times 10^9/L$): 2.92 ± 1.01 比 0.92 ± 0.29 ,肺组织PMN绝对计数(个): $48\ 788.03 \pm 11\ 833.91$ 比 $1\ 516.72 \pm 415.35$,血浆NE(ng/L): $24\ 522.71 \pm 3\ 842.92$ 比 $7\ 009.34 \pm 4\ 067.86$,肺组织NE(ng/L): $262\ 189.04 \pm 9\ 695.13$ 比 $65\ 026.03 \pm 16\ 016.31$,均 $P<0.01$]。严重烧伤小鼠肺部PMN数量与NE浓度呈高度相关($r=0.892$, $P<0.001$)。假伤组与严重烧伤组小鼠BALF中PMN绝对计数差异并无统计学意义($F=1.403$; $P>0.05$)。假伤组和严重烧伤组小鼠BALF中含有少量NE,严重烧伤6 h和12 h组BALF中NE浓度显著高于假伤组(ng/L: 328.58 ± 158.10 、 415.30 ± 240.89 比 61.95 ± 15.80 ,均 $P<0.05$)。③ Kaplan-Meier生存曲线显示,SV干预组小鼠72 h存活率显著高于严重烧伤组(100%比10%, Log-Rank检验: $\chi^2=19.12$, $P<0.001$)。④ 相较于假伤组,严重烧伤组各项肺功能指标均显著下降。SV干预组各项肺功能指标随时间变化逐渐改善,均明显优于严重烧伤组。⑤ 相较于假伤组,SV干预组肺组织PMN绝对计数、血浆和肺组织NE浓度均明显增高(F 值分别为46.709、3.535、32.701,均 $P<0.05$),其中6 h达峰值。与严重烧伤组相比,SV干预组肺组织PMN绝对计数(个: $8\ 870.80 \pm 7\ 013.89$ 比 $25\ 974.92 \pm 22\ 240.81$, $P<0.05$)、血浆和肺组织NE浓度(ng/L: $14\ 955.94 \pm 3\ 944.41$ 比 $21\ 972.75 \pm 4\ 573.05$, $81\ 956.87 \pm 38\ 658.35$ 比 $168\ 182.30 \pm 83\ 513.91$,均 $P<0.01$)均显著下降。**结论** 严重烧伤早期肺部即有PMN大量浸润;NE在严重烧伤早期可促进肺损伤,而抑制NE能明显改善肺损伤。

【关键词】 中性粒细胞; 浸润; 烧伤; 中性粒细胞弹性蛋白酶; 肺损伤**基金项目:** 国家自然科学基金(82072217, 81772135, U21A20370)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240816-00704

Distribution characteristics of polymorphonuclear neutrophil pulmonary infiltration and the mechanism of neutrophil elastase in promoting lung injury in the early stages of severe burns

Zhang Xin, Zheng Chunfang, Chen Jiahui, Guo Zaiwen, Li Linbin, Huang Jiamin, Sun Bingwei

Department of Burns and Plastic Surgery, Affiliated Suzhou Hospital of Nanjing Medical University, Suzhou 215002, Jiangsu, China

Corresponding author: Sun Bingwei, Email: sunbinwe@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the distribution characteristics of polymorphonuclear neutrophil (PMN) in the lungs during the early stage of severe burns and the mechanism of neutrophil elastase (NE) promoting lung injury. **Methods** 6–8-week-old male C57BL/6J mice were selected for the experiments. A 30% total body surface area (TBSA) III degree burn mouse model was established (severe burn group); the Sham-injury group was treated with 37℃ water. In the sodium sivelestat intervention group (SV intervention group), NE competitive inhibitor, sivelestat, 100 mg/kg, was injected via tail vein immediately after injury, while other groups received an equal volume of saline. Ten mice were harvested from each group to observe survival for 72 hours. Respiratory function tests were tested at 0 (immediate), 3, 6, 12, and 24 hours after molding. hematoxylin-eosin (HE) and immunohistochemical staining were used to observe lung tissue structure, inflammatory changes and PMN infiltration. The PMN absolute count in mice lung tissue was detected by flow cytometry. At 6, 12, and 24 hours after molding, PMN counts and the concentration of NE

[enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)] in peripheral blood plasma, lung tissue, and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected. **Results** ① HE staining results showed that compared with the Sham-injury group, the lungs of mice in the severe burn group showed inflammatory changes and PMN infiltration, with more significant changes at 6 hours. Immunohistochemistry results also confirmed that the expression of NE protein released from PMN significantly increased after 6 hours of severe burn injury [(3.79±0.62)% vs. (0.18±0.05)%, $t = 11.56$, $P < 0.01$]. ② Compared with the Sham-injury group, the number of PMN and the concentration of NE in the peripheral blood and lung tissues in the severe burn group were significantly increased (F values were 13.709, 55.350 and 29.890, 13.286, respectively, all $P < 0.01$), peaking at 6 hours [plasma PMN count ($\times 10^9/L$): 2.92 ± 1.01 vs. 0.92 ± 0.29 , lung tissue PMN absolute count (cells): $48\,788.03 \pm 11\,833.91$ vs. $1\,516.72 \pm 415.35$, plasma NE (ng/L): $24\,522.71 \pm 3\,842.92$ vs. $7\,009.34 \pm 4\,067.86$, lung tissue NE (ng/L): $262\,189.04 \pm 9\,695.13$ vs. $65\,026.03 \pm 16\,016.31$, all $P < 0.01$]. The number of PMN in the lung of severely burned mice was highly correlated with NE concentration ($r = 0.892$, $P < 0.001$). There was no significantly difference in the PMN absolute count in the BALF of mice between the Sham-injury group and severe burn group ($F = 1.403$, $P > 0.05$). The Sham-injury group and severe burn group contained a small amount of NE in the BALF, and the concentration of NE in the BALF of the severely burned 6 hours and 12 hours groups were significantly higher than those of the Sham-injury group (ng/L: 328.58 ± 158.10 , 415.30 ± 240.89 vs. 61.95 ± 15.80 , both $P < 0.05$). ③ Kaplan-Meier survival curve showed that the 72-hour survival rate of mice in the SV intervention group was significantly higher than that in the severe burn group (100% vs. 10%, Log-Rank test: $\chi^2 = 19.12$, $P < 0.001$). ④ Compared with the Sham-injury group, all lung function indices of the severe burn group decreased significantly. All lung function indices of SV intervention group improved gradually over time, which were significantly better than those of the severe burn group. ⑤ Compared with the Sham-injury group, the PMN absolute count in lung tissue and the concentration of NE in plasma and lung tissue were significantly higher in the SV intervention group (F values were 46.709, 3.535, 32.701, respectively, all $P < 0.05$), with a peak at 6 hours. Compared with the severe burn group, the SV intervention group had a higher PMN absolute count in lung tissue (cells: $8\,870.80 \pm 7\,013.89$ vs. $25\,974.92 \pm 22\,240.8$, $P < 0.05$), and higher plasma and lung tissue NE concentrations (ng/L: $14\,955.94 \pm 3\,944.41$ vs. $21\,972.75 \pm 4\,573.05$, $81\,956.87 \pm 38\,658.35$ vs. $168\,182.30 \pm 83\,513.91$, both $P < 0.01$) were significantly decreased. **Conclusions** In the early stage of severe burns, there is a significant infiltration of PMN into the lungs. The NE promotes lung injury in the early stage of severe burn, and improve lung injury by inhibiting the action of NE.

【Key words】 Polymorphonuclear neutrophil; Infiltration; Burn; Neutrophil elastase; Lung injury

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82072217, 81772135, U21A20370)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20240816-00704

烧伤是较常见的创伤类型之一。据报道,全世界每年有近 1 100 万人发生各种类型的烧伤,且严重烧伤具有很高的病死率,给社会带来了巨大的经济负担^[1]。严重烧伤可导致多器官损伤,其中包括肺损伤所致的肺炎和(或)急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrom, ARDS),这也是烧伤患者死亡的常见原因之一^[2-3]。因此,详细阐明严重烧伤早期急性肺损伤的病理机制极其重要。

中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)是天然免疫的重要组成部分,在严重烧伤早期,大量 PMN 在趋化因子的诱导下迅速迁移至损伤组织^[4-5],通过吞噬、释放活性氧、蛋白酶和抗菌蛋白以及释放中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular trap, NET)等非特异性杀伤病原体,防止病原菌的扩散以及全身炎症的发生^[6-8]。中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)是 PMN 脱颗粒产生的重要颗粒蛋白,可直接或间接激活炎症,缩短炎症过程,发挥抗菌活性,但过量的 NE 可通过各种机制损害先天性和适应性免疫系统,损伤肺泡和血管结构,介导肺通气功能障碍,与多种肺部疾病的病理生理过程相关^[9]。NE 水平和活性在一定程度上反映了

疾病的状态及严重程度^[10],但目前 NE 在严重烧伤肺损伤中作用的报道很少。本研究中通过建立严重烧伤小鼠模型,旨在探讨严重烧伤早期肺部 PMN 的分布特征,以及 PMN 脱颗粒产物 NE 对肺损伤的作用,以期严重烧伤肺损伤的机制探索提供新思路。

1 材料与方法

1.1 动物伦理声明:本研究已获得医院伦理委员会的批准(动物伦理批准号:KL901390),所涉及的实验程序均严格按照美国国立卫生研究院及微生物学和流行病学研究所病原体 and 生物安全国家重点实验室的实验动物护理和使用指南中的建议进行。

1.2 动物及主要试剂:6~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠,体质量(20 ± 2)g,购自杭州子源实验动物科技有限公司,动物许可证号:SCXK(浙)2019-0004。兔抗小鼠 NE、Ly6G 单克隆抗体,NE 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自美国 Abcam 公司;中性粒细胞绝对计数珠购自美国 Biolegend 公司;乙二胺四乙酸真空采血管及流式分选型细胞仪购自美国 BD 公司;4% 多聚甲醛通用型组织固定液购自中国 Biosharp 公司;红细胞裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司;

RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司; NE 竞争抑制剂注射用西维来司他钠购自上海汇伦医药科技有限公司; 通用组织温和酶解试剂盒及单细胞悬液制备仪购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司。

1.3 动物模型制备: 使用异氟烷吸入式麻醉小鼠并固定, 用台式超级控温烫伤仪诱导背部全层烧伤 8 s, 建立 30% 总体表面积 (total body surface area, TBSA) III 度烧伤小鼠模型 (严重烧伤组); 假伤组使用 37 °C 水进行处理。用林格液补液, 根据 Parkland 公式 ($4 \text{ mL} \times \text{TBSA} \times \text{kg}$) 计算总补液量, 伤后立即腹腔注射 1/2, 伤后 4 h 和 8 h 分别腹腔注射 1/4。西维来司他钠干预组 (SV 干预组) 致伤后立即经尾静脉注射西维来司他钠 100 mg/kg, 其余组注射等量生理盐水。制模后小鼠继续饲养于清洁级的环境中, 可自由进食、饮水, 12 h/12 h 昼夜节律饲养。

1.4 动物分组及标本留取: 按照随机数字表法将 30 只小鼠分为假伤组、严重烧伤组、SV 干预组, 每组 10 只, 用于观察 72 h 存活情况及测定呼吸功能。另外选择 70 只小鼠随机分为假伤组, 烧伤 6、12、24 h 组, SV 干预 6、12、24 h 组, 每组 10 只, 分组处理后麻醉小鼠, 直接眼球取血, 用于检测外周血 PMN 计数及 NE 含量; 然后颈椎脱臼法处死小鼠, 其中 5 只小鼠用于获取支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF), 流式细胞仪检测 BALF 中 PMN 绝对计数及 ELISA 检测 NE 含量; 另外 5 只小鼠取整个肺组织, 右肺组织用于制备单细胞悬液, 流式细胞仪检测 PMN 绝对计数及 ELISA 检测 NE 含量; 左肺组织保存于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 用于苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色及免疫组化染色。

1.4.1 小鼠存活情况: 观察各组小鼠一般状况, 如活动情况、精神状态等, 并计算 72 h 存活率。

1.4.2 呼吸功能测定: 于各组制模后 0 (即刻)、3、6、12、24 h, 使用小动物全身无创肺功能仪进行呼吸功能检测, 包括呼吸频率 (respiratory rate, RR)、潮气量 (tidal volume, TV)、分钟通气量 (minute ventilation volume, MV)、最大呼气流速 (peak expiratory flow, PEF) 及最大吸气流速 (peak inspiratory flow, PIF)。

1.4.3 肺组织 HE 及免疫组化染色: 从 4% 多聚甲醛溶液中固定的左肺组织样本中随机选取 3 个样本进行脱水、石蜡包埋及切片染色, 光镜下观察组织病理学改变及 PMN 浸润程度。

1.4.4 BALF 采集: 于制模后相应时间点处死小鼠,

固定在手术台上, 暴露气管, 于咽喉稍下处的支气管置入静脉留置针, 用注射器抽取 0.5 mL 预冷磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer, PBS) 反复灌洗 2 次, 回抽的液体置于小离心管中, 即 BALF, $400 \times g$ 离心 5 min, 分离沉淀及上清液, 上清液用于后续 ELISA 检测 NE 含量, 沉淀的细胞团块用 PBS 重悬后用于流式细胞仪检测 PMN 绝对计数。

1.4.5 肺组织单细胞悬液制备和 PMN 绝对计数测定: 于制模后相应时间点处死小鼠, 迅速取右肺, 剪成 2~4 mm 大小的小块, 置于通用型组织温和酶解试剂盒配置的混合酶溶液中, 使用单细胞悬液制备仪进行处理后 $600 \times g$ 离心 6 min, 留取上清液于 -20 °C 冰箱保存, 用于 ELISA 检测 NE 含量。红细胞裂红液重悬细胞, 于冰上孵育 3~5 min 后终止反应, $500 \times g$ 离心 5 min 后弃去上清; PBS 清洗 1 次后离心, PBS 重悬细胞后用 2 μL 别藻蓝蛋白 (allophycocyanin, APC)-Ly6G 流式抗体染色, 冰上孵育 30 min 后 PBS 清洗、离心, 上机前加入细胞绝对计数珠, 混匀后上机进行 PMN 绝对计数检测。

1.4.6 ELISA 测定 NE 浓度: 在 96 孔酶标包被板中, 每孔加入 50 μL 倍比稀释的标准品或分组处理后的血浆、BALF 及肺组织单细胞悬液上清样本, 并同时加入 50 μL 混合抗体, 室温孵育 1 h 后甩干液体, 用 350 μL 稀释配置的 $1 \times$ 洗涤液洗涤 3 次, 加入 100 μL 显色剂室温避光孵育 10 min 后加入 100 μL 终止液。在 30 min 内用荧光酶标仪测量各孔的吸光度 (A) 值, 绘制标准曲线, 计算 NE 浓度。

1.5 统计学处理: 使用 GraphPad Prism 9.0 软件对数据进行分析。所有实验重复 3 次, 结果以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 通过方差分析确定多组之间的差异, 然后进行 Bonferroni 校正以进行多重比较检验。两组间比较采用非配对 t 检验。通过对数秩检验比较存活率。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 严重烧伤小鼠早期肺部炎症改变及 PMN 浸润: HE 染色观察肺组织病理学改变显示 (图 1), 与假伤组相比, 严重烧伤小鼠肺组织结构模糊、肺泡壁增厚、肺泡腔塌陷、细支气管周围及肺间质组织中出现炎症浸润、肺泡管壁内可见 PMN 浸润, 其中严重烧伤 6 h 组改变较为显著。免疫组化染色证实 (图 2), 严重烧伤 6 h 组 PMN 释放的 NE 较假伤组显著增多 [$(3.79 \pm 0.62) \%$ 比 $(0.18 \pm 0.05) \%$, $t = 11.56$, $P < 0.01$]。

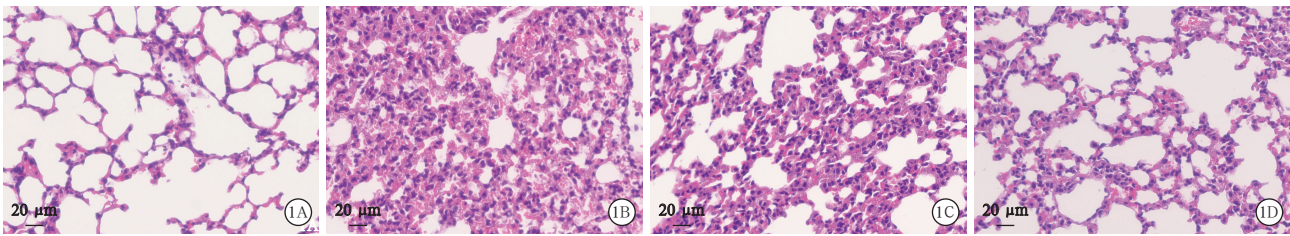


图 1 光镜下观察各组小鼠肺组织病理学改变 假伤组(A)肺组织无水肿,无炎症细胞浸润,肺泡结构清晰完整;严重烧伤 6、12、24 h 组(B、C、D)肺组织内大量炎症细胞浸润,肺泡壁增厚,肺泡腔塌陷,其中严重烧伤 6 h 组改变最为显著 苏木素-伊红(HE)染色 高倍放大

表 1 各组小鼠外周血、肺组织和 BALF 中 PMN 数量及 NE 浓度比较($\bar{x} \pm s$)						
组别	动物数 (只)	外周血 PMN 计数($\times 10^9/L$)	血浆 NE (ng/L)	肺组织 PMN 绝对计数(个)	肺组织 NE (ng/L)	BALF 中 PMN 绝对计数(个)
假伤组	5	0.92 ± 0.29	$7\,009.34 \pm 4\,067.86$	$1\,516.72 \pm 415.35$	$65\,026.03 \pm 16\,016.31$	1969.28 ± 324.19
严重烧伤 6 h 组	5	2.92 ± 1.01^a	$24\,522.71 \pm 3\,842.92^a$	$48\,788.03 \pm 11\,833.91^a$	$262\,189.04 \pm 9\,695.13^a$	1514.31 ± 198.96
严重烧伤 12 h 组	5	1.80 ± 0.44^c	$23\,814.59 \pm 3\,805.19^a$	$11\,245.96 \pm 378.78^d$	$215\,852.92 \pm 53\,561.19^a$	1675.86 ± 238.00
严重烧伤 24 h 组	5	1.02 ± 0.45^d	$17\,273.97 \pm 2\,877.33$	$2\,676.74 \pm 122.58^d$	$129\,661.21 \pm 61\,447.95$	1559.67 ± 394.87
F 值		13.709	29.890	55.350	13.286	1.403
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	0.002	0.294

注: BALF 为支气管肺泡灌洗液, PMN 为中性粒细胞, NE 为中性粒细胞弹性蛋白酶; 与假伤组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与严重烧伤 6 h 组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$

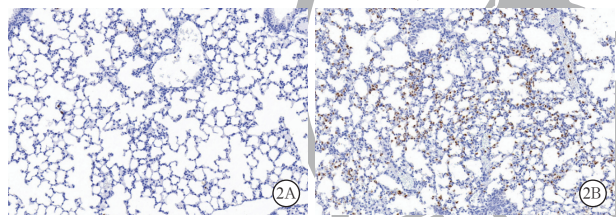


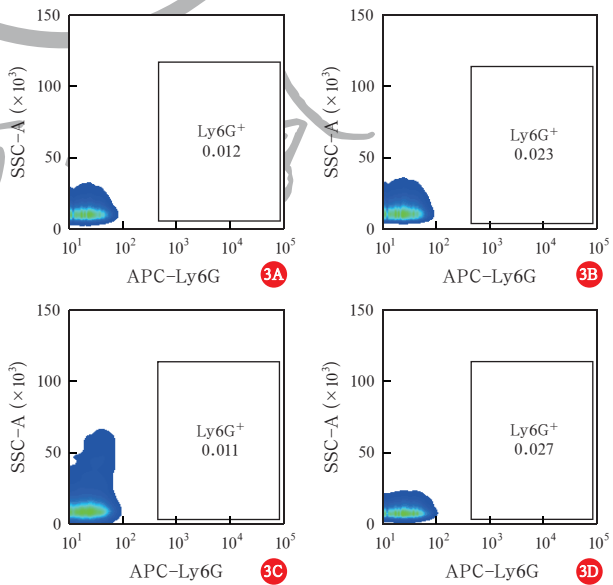
图 2 光镜下观察各组小鼠肺组织中中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)浸润程度 假伤组(A)NE 未见明显表达;严重烧伤 6 h 组(B)NE 表达显著上调 免疫组化染色 中倍放大

2.2 严重烧伤小鼠早期外周血和肺组织 PMN 数量、NE 浓度明显增加(表 1; 图 3):假伤组与严重烧伤 6、12、24 h 组外周血 PMN 计数差异有统计学意义($F=13.709, P<0.001$)。严重烧伤 6 h 组外周血 PMN 计数明显高于假伤组($P<0.01$); 严重烧伤 12 h、24 h 组 PMN 计数与假伤组接近。假伤组与严重烧伤 6、12、24 h 组血浆 NE 浓度差异有统计学意义($F=29.890, P<0.001$)。相较于假伤组,严重烧伤 6 h、12 h 组血浆 NE 浓度显著升高(均 $P<0.01$); 而严重烧伤 24 h 组 NE 浓度略低于 6 h 和 12 h 组。

假伤组与严重烧伤 6、12、24 h 组肺组织 PMN 绝对计数差异有统计学意义($F=55.350, P<0.001$)。严重烧伤 6 h 组肺组织 PMN 绝对计数显著高于其他组(均 $P<0.01$), 其余组间差异无统计学意义。假伤组与严重烧伤 6、12、24 h 组肺组织 NE 浓度差异有统计学意义($F=13.286, P=0.002$)。相较于假伤组,严重烧伤 6 h 和 12 h 组肺组织 NE 浓度显著增高(均 $P<0.01$)。相关性分析显示,严重烧伤小鼠肺组织 PMN 数量与 NE 浓度存在高度相关性

($r=0.892, P<0.001$)。

流式细胞仪检测结果显示,假伤组与严重烧伤 6、12、24 h 组 BALF 中 PMN 绝对计数差异无统计学意义($F=1.403, P=0.294$),说明烧伤早期 PMN 浸润主要以组织浸润为主, BALF 内 PMN 数量极少。假伤组与严重烧伤 6、12、24 h 组 BALF 中含有少量 NE, 组间总体比较差异具有统计学意义($F=10.932, P<0.001$)。相较于假伤组,严重烧伤 6 h 和 12 h 组 NE 浓度显著增高(均 $P<0.05$)。

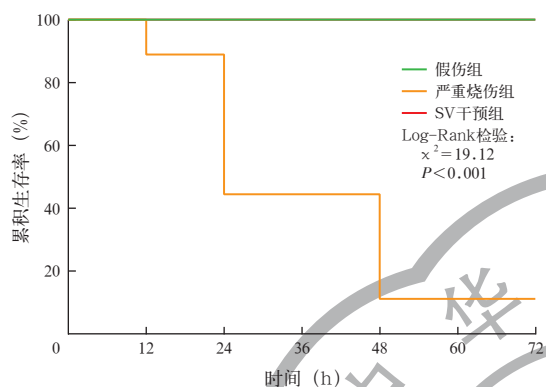


注: A 为假伤组, B、C、D 依次为严重烧伤 6、12、24 h 组; BALF 为支气管肺泡灌洗液, PMN 为中性粒细胞, APC 为别藻蓝蛋白, SSC-A 为侧向散射光

图 3 流式细胞仪检测各组小鼠 BALF 内 PMN 数量

2.3 NE 抑制剂西维来司他钠的干预作用

2.3.1 NE 竞争抑制剂可显著提高严重烧伤小鼠存活率(图4):假伤组和SV干预组小鼠72 h全部存活;严重烧伤组小鼠72 h存活率为10%。Kaplan-Meier生存曲线显示,3组间小鼠72 h累积生存率差异有统计学意义(Log-Rank 检验: $\chi^2=19.12, P<0.001$)。



注:SV为西维来司他钠

图4 各组小鼠制模后72 h Kaplan-Meier生存曲线

2.3.2 NE 竞争抑制剂可显著改善严重烧伤小鼠呼吸功能(表2;图5):假伤组、严重烧伤组和SV干预组间呼吸功能指标差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。相比假伤组,严重烧伤组各指标均显著下降(均 $P<0.01$);而SV干预组较严重烧伤组明显改善

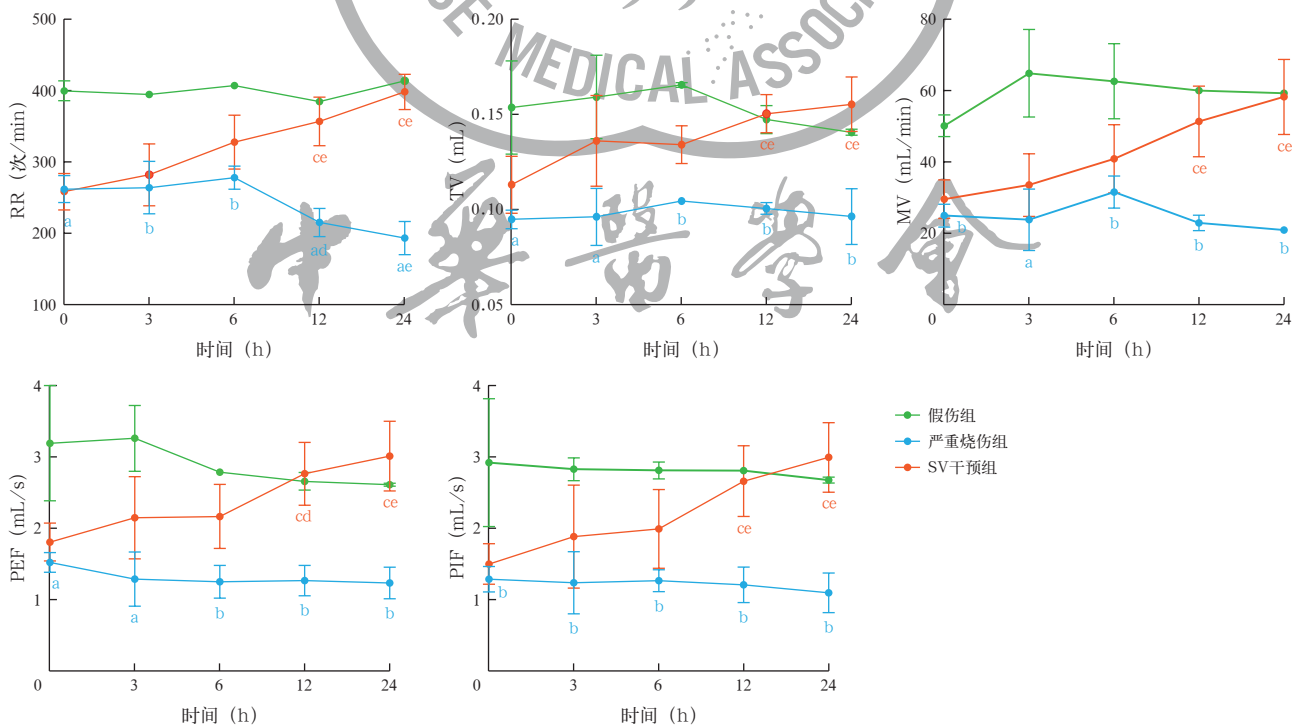
(均 $P<0.01$)。对各指标动态监测结果进行析因设计方差分析,RR、TV、MV、PEF和PIF分组主效应 F 值分别为69.37、69.95、51.26、54.29、41.27(均 $P<0.001$),时间主效应 F 值分别为1.538、1.536、2.798、0.3598、1.032(均 $P>0.05$),二者交互效应 F 值分别为9.783、2.685、4.032、3.823、3.087(均 $P<0.05$)。假伤组各指标随时间延长无明显改变;严重烧伤组RR随时间延长而减慢,其余指标无明显改变;SV干预组各指标明显改善,尤其12 h和24 h时(均 $P<0.05$)。

表2 各组小鼠呼吸功能指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	RR(次/min)	TV(mL)	MV(mL/min)
假伤组	5	401.81 ± 12.16	0.15 ± 0.02	59.35 ± 8.66
严重烧伤组	5	246.02 ± 38.01 ^a	0.10 ± 0.01 ^a	24.76 ± 5.50 ^a
SV干预组	5	331.64 ± 61.63 ^b	0.14 ± 0.02 ^b	43.90 ± 14.19 ^b
F 值		28.269	38.146	29.179
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

组别	动物数(只)	PEF(mL/s)	PIF(mL/s)
假伤组	5	2.95 ± 0.46	2.80 ± 0.37
严重烧伤组	5	1.33 ± 0.24 ^a	1.23 ± 0.26 ^a
SV干预组	5	2.41 ± 0.63 ^b	2.26 ± 0.76 ^b
F 值		34.581	25.911
P 值		<0.001	<0.001

注:SV为西维来司他钠,RR为呼吸频率,VT为潮气量,MV为分钟通气量,PEF为最大吸气流量,PIF为最大呼气流量;与假伤组比较,^a $P<0.01$;与严重烧伤组比较,^b $P<0.01$



注:SV为西维来司他钠,RR为呼吸频率,VT为潮气量,MV为分钟通气量,PEF为最大吸气流量,PIF为最大呼气流量;与假伤组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与严重烧伤组比较,^c $P<0.01$;与本组0 h比较,^d $P<0.05$,^e $P<0.01$

图5 各组小鼠制模前后呼吸功能指标动态变化趋势

2.3.3 NE 竞争抑制剂可明显减少严重烧伤小鼠 PMN 浸润及降低 NE 浓度(表 3~4): 假伤组与 SV 干预 6、12、24 h 组肺组织 PMN 绝对计数差异具有统计学意义($F=46.709$, $P<0.001$), 其中 SV 干预 6 h 组肺组织 PMN 绝对计数显著高于其他各组(均 $P<0.01$), 而 SV 干预 24 h 组肺组织 PMN 绝对计数接近假伤组($P>0.05$)。与严重烧伤组相比, SV 干预组肺部 PMN 浸润明显减少($t=2.334$, $P=0.028$)。假伤组与 SV 干预 6、12、24 h 组血浆 NE 浓度差异具有统计学意义($F=3.535$, $P=0.033$), 其中 SV 干预 6 h 组 NE 浓度明显高于假伤组($P<0.05$); 其他干预组均接近于假伤组(均 $P>0.05$)。假伤组与 SV 干预 6、12、24 h 组肺组织 NE 浓度差异具有统计学意义($F=32.701$, $P<0.001$)。相较于假伤组, SV 干预组肺组织 NE 浓度均明显增高(均 $P<0.01$)。与严重烧伤组相比, SV 干预组血浆及肺组织 NE 浓度均显著降低(均 $P<0.01$)。

3 讨论

随着烧伤救治水平不断提高, 直接因烧伤休克或早期感染死亡的患者逐渐减少, 器官损害成为目前严重烧伤患者的主要死亡原因。肺脏是严重烧伤患者较早衰竭的器官之一。严重烧伤后, 机体处于低血容量休克状态, 进而释放大量炎症因子和趋化因子, 促进炎症反应的发生^[11]。炎症介质和趋化因子可诱导活化的炎症细胞向肺组织迁移, 进一步释放炎症介质损伤肺组织, 导致急性肺损伤或 ARDS^[12]。ARDS 主要病理生理表现以 PMN 为主要炎症细胞在肺部广泛浸润, 而 PMN 释放的以 NE 为代表的酶类物质在 ARDS 发生发展中起至关重要的作用^[13]。

NE 是由活化的 PMN 脱颗粒形成的一种颗粒蛋白^[14]。研究显示, NE 与炎症反应密切相关, 可通过增加细胞因子的表达和释放, 直接激活炎症; 并通过触发 NET 和外泌体的释放, 间接激活炎症, 从而增强蛋白酶活性和气道炎症^[15]。NE 是触发炎症级联反应的主要终极效应细胞, 因此在 ARDS 的启动和发展中极具破坏性^[16]。当 NE 过度活化时, 可导致细胞外基质成分如弹性蛋白、纤维黏连蛋白、蛋

表 3 假伤组与 SV 干预组小鼠肺组织 PMN 数量以及血浆和肺组织中 NE 浓度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	肺组织 PMN 绝对计数(个)	血浆 NE (ng/L)	肺组织 NE (ng/L)
假伤组	5	2 016.97 ± 927.21	10 317.70 ± 3 947.86	30 744.75 ± 15 489.20
SV 干预 6 h 组	5	18 415.31 ± 2 271.62 ^a	17 517.45 ± 5 421.19 ^b	125 311.16 ± 3 645.36 ^a
SV 干预 12 h 组	5	7 870.73 ± 3 971.96 ^{ac}	13 296.57 ± 3 378.26	100 589.50 ± 10 200.22 ^a
SV 干预 24 h 组	5	1 955.26 ± 664.25 ^c	14 053.80 ± 1 747.51	71 182.04 ± 29 283.83 ^{ac}
F 值		46.709	3.535	32.701
P 值		<0.001	0.033	<0.001

注: SV 为西维来司他钠, PMN 为中性粒细胞, NE 为中性粒细胞弹性蛋白酶; 与假伤组比较, ^a $P<0.01$, ^b $P<0.01$; 与 SV 干预 6 h 组比较, ^c $P<0.01$

表 4 严重烧伤组与 SV 干预组小鼠肺组织 PMN 数量以及血浆和肺组织中 NE 浓度比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	肺组织 PMN 绝对计数(个)	血浆 NE (ng/L)	肺组织 NE (ng/L)
严重烧伤组	15	25 974.92 ± 22 240.81	21 972.75 ± 4 573.05	168 182.30 ± 83 513.91
SV 干预组	15	8 870.80 ± 7 013.89	14 955.94 ± 3 944.41 ^a	81 956.87 ± 38 658.35 ^a
F 值		2.334	4.849	4.113
P 值		0.028	<0.001	<0.001

注: SV 为西维来司他钠, PMN 为中性粒细胞, NE 为中性粒细胞弹性蛋白酶

白多糖和胶原等降解, 直接损伤相关组织, 引发多种炎症相关疾病^[17]。本研究证实, 在严重烧伤早期, 小鼠肺部即出现大量 PMN 浸润, NE 浓度显著升高, 均于伤后 6 h 达到峰值, 随后逐渐减少; 严重烧伤后 PMN 数量与 NE 浓度呈高度相关。与假伤组相比, 烧伤后各时间点 BALF 中 PMN 数量差异无统计学意义, 说明烧伤早期 PMN 浸润主要以组织浸润为主。进一步 HE 染色显示, 与假伤组相比, 严重烧伤小鼠肺组织结构模糊、炎症浸润明显、肺间质及血管腔内可见大量 PMN, 6 h 时最为显著; 免疫组化结果也显示, 严重烧伤小鼠肺内 NE 蛋白表达明显增加, 证实了 PMN 的浸润情况。此外, 对小鼠呼吸功能动态监测显示, 严重烧伤组 RR、TV、MV、PEF 及 PIF 均显著低于假伤组。在烧伤早期, 可肉眼观察到烧伤小鼠 RR 增快, 表现为呼吸浅快, 之后随时间逐渐减慢。提示烧伤后小鼠出现明显肺部损伤, 呼吸功能明显降低。

人体内含有多能拮抗 NE 的内源性蛋白酶抑制剂, 它们能够维持体内蛋白酶-抗蛋白酶平衡, 防止 NE 破坏正常组织^[13]。西维来司他钠是一种化学合成的选择性 NE 活性抑制剂, 可以通过竞争性抑制人类、鼠类和兔的 NE 活性, 发挥减缓肺损伤的作用。本研究结果显示, SV 干预组烧伤小鼠存活率显著提升, 呼吸功能得到明显改善, 且肺组织 PMN 数量和 NE 浓度明显低于严重烧伤组。

本研究结果表明, NE 在严重烧伤早期可以显著促进急性肺损伤, 而西维来司他钠作为 NE 抑制剂可有效减轻相应肺损伤。目前 NE 在严重烧伤中导致肺损伤的作用机制尚不明确, 根据本实验结果, 推测原因可能为: ① 严重烧伤后, 随着疾病的发展, 机体由免疫亢进向免疫抑制状态转变导致全身性感染失控, 出现“细胞因子风暴”^[6, 18]。而炎症细胞因子不仅会损害肺组织, 还会吸引更多的免疫细胞 (包括 PMN 和单核细胞) 进入肺的间质和肺泡, 从而进一步加重肺损伤^[19-20]。因此, 防止免疫细胞在肺组织中的积累, 减少免疫细胞的分泌是减轻肺损伤的重要措施^[21]。② PMN 被过度激活时, 过量的 NE 可破坏蛋白酶-抗蛋白酶平衡, 从而加重感染, 影响炎症细胞的凋亡, 导致炎症迁延等。此外, NE 对细胞外基质存在水解活性, 加之自身能诱导上皮细胞分泌白细胞介素 (interleukins, IL-1、IL-8) 等, 促进 PMN 向肺部聚集和激活, 在此过程中, PMN 内多种物质如各种酶类、活性氧类及炎症介质等释放, 从而加重炎症反应, 造成肺组织损伤^[22-23]。在正常生理状态下, NE 蛋白的水解活性受到多种内源性抑制剂的严格调控, 然而在病理状态下, 内源性抗蛋白酶与 NE 的平衡被打破, NE 出现过度释放与富集, 活性不受控制, 表达增加, 破坏正常的肺组织结构, 同时诱导微血管通透性增加, 促进大量炎症因子产生与释放, 从而引起急性肺损伤^[24-25]。③ 西维来司他钠作为 NE 抑制剂, 具有高度的 NE 抑制特异性^[24], 可竞争性抑制 PMN 的活化、拮抗 PMN 的组织浸润及聚集、抑制炎症因子的过度释放, 从而有效减轻炎症反应、治疗性地逆转组织水肿、减少炎症渗出, 从而改善器官功能^[16]。这也从另一个侧面证明了 NE 在严重烧伤早期肺损伤中的重要作用。

综上所述, 在严重烧伤小鼠急性肺损伤早期, 肺内即可出现 PMN 大量浸润及 NE 含量升高, 加重肺损伤; 西维来司他钠的早期应用可减少肺内 PMN 浸润, 降低 NE 含量, 改善呼吸功能, 减轻肺损伤。本研究为严重烧伤早期急性肺损伤的防治提供了新思路, 但其具体作用机制仍需进一步探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- Jeschke MG, van Baar ME, Choudhry MA, et al. Burn injury [J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6 (1): 11. DOI: 10.1038/s41572-020-0145-5.
- Krishnan P, Frew Q, Green A, et al. Cause of death and correlation with autopsy findings in burns patients [J]. Burns, 2013, 39 (4): 583-588. DOI: 10.1016/j.burns.2012.09.017.
- Qi XX, Yu Y, Sun R, et al. Identification and characterization of

- neutrophil heterogeneity in sepsis [J]. Crit Care, 2021, 25 (1): 50. DOI: 10.1186/s13054-021-03481-0.
- 戚欣欣, 杨云稀, 孙炳伟. 严重烧伤患者早期外周血中性粒细胞趋化功能变化及影响因素 [J]. 中华烧伤杂志, 2020, 36 (3): 204-209. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20190801-00329.
- Huang JM, Zhu ZC, Ji DD, et al. Single-cell transcriptome profiling reveals neutrophil heterogeneity and functional multiplicity in the early stage of severe burn patients [J]. Front Immunol, 2022, 12: 792122. DOI: 10.3389/fimmu.2021.792122.
- 唐远洋, 罗高兴, 贺伟峰. 严重烧伤感染后细胞因子风暴发生发展机制浅析 [J]. 四川大学学报 (医学版), 2021, 52 (1): 16-21. DOI: 10.12182/20210160206.
- Shao YM, Li LB, Liu L, et al. CD44/ERM/F-actin complex mediates targeted nuclear degranulation and excessive neutrophil extracellular trap formation during sepsis [J]. J Cell Mol Med, 2022, 26 (7): 2089-2103. DOI: 10.1111/jcmm.17231.
- Wang X, Qin WT, Xu XH, et al. Endotoxin-induced autocrine ATP signaling inhibits neutrophil chemotaxis through enhancing myosin light chain phosphorylation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114 (17): 4483-4488. DOI: 10.1073/pnas.1616752114.
- Suzuki K, Okada H, Takemura G, et al. Neutrophil elastase damages the pulmonary endothelial glycocalyx in lipopolysaccharide-induced experimental endotoxemia [J]. Am J Pathol, 2019, 189 (8): 1526-1535. DOI: 10.1016/j.ajpath.2019.05.002.
- Zeng WL, Song YQ, Wang RZ, et al. Neutrophil elastase: from mechanisms to therapeutic potential [J]. J Pharm Anal, 2023, 13 (4): 355-366. DOI: 10.1016/j.jpah.2022.12.003.
- Liu L, Shao YM, Zhang YX, et al. Neutrophil-derived heparin binding protein triggers vascular leakage and synergizes with myeloperoxidase at the early stage of severe burns (with video) [J]. Burns Trauma, 2021, 9: tkab030. DOI: 10.1093/burnst/tkab030.
- 李虎山, 杨薛康, 郝振明, 等. BAY11-7082 对严重烧伤大鼠急性肺损伤及早期肺炎反应的干预作用 [J]. 中华烧伤杂志, 2018, 34 (2): 88-95. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2018.02.006.
- 袁亮, 朱曦. 中性粒细胞弹性蛋白酶及其抑制剂在急性呼吸窘迫综合征中作用的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (5): 364-368. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.05.19.
- Yang YX, Liu L, Guo ZW, et al. Investigation and assessment of neutrophil dysfunction early after severe burn injury [J]. Burns, 2021, 47 (8): 1854-1862. DOI: 10.1016/j.burns.2021.02.004.
- Voynow JA, Shimbashi M. Neutrophil elastase and chronic lung disease [J]. Biomolecules, 2021, 11 (8): 1065. DOI: 10.3390/biom11081065.
- 姚璐, 徐继前, 杨小博, 等. 中性粒细胞弹性蛋白酶及其抑制剂在脓毒症中作用的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2022, 34 (11): 1209-1212. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220419-00389.
- Kummarapurugu AB, Zheng S, Ma J, et al. Neutrophil elastase triggers the release of macrophage extracellular traps: relevance to cystic fibrosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2022, 66 (1): 76-85. DOI: 10.1165/rcmb.2020-04100C.
- Huang J, Chen Y, Guo ZW, et al. Prospective study and validation of early warning marker discovery based on integrating multi-omics analysis in severe burn patients with sepsis [J]. Burns Trauma, 2023, 11: tkac050. DOI: 10.1093/burnst/tkac050.
- Meyer NJ, Gattinoni L, Calfee CS. Acute respiratory distress syndrome [J]. Lancet, 2021, 398 (10300): 622-637. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00439-6.
- 孙炳伟, 黄佳敏. 中性粒细胞生理与病理生理作用再认识 [J]. 中华烧伤与创面修复杂志, 2022, 38 (2): 109-113. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20211122-00391.
- Zhang H, Zeng J, Li JK, et al. Sivelestat sodium attenuates acute lung injury by inhibiting JNK/NF- κ B and activating Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. Biomol Biomed, 2023, 23 (3): 457-470. DOI: 10.17305/bb.2022.8549.
- 沈道雁, 斯明强. 中性粒细胞弹性蛋白酶和纤维蛋白原联合肿瘤坏死因子- α 在预测儿童重症肺炎预后中的应用价值 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2019, 26 (2): 147-151. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2019.02.004.
- 张金权, 许才明, 张桂信, 等. 丝氨酸蛋白酶抑制剂是急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征发病过程中的重要保护因子 [J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (3): 368-372. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200922-00644.
- 王中伟, 文辉, 王雨辰, 等. 人中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂的研究进展 [J]. 药学报, 2023, 58 (4): 909-918. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1116.
- Lodge KM, Vassallo A, Liu B, et al. Hypoxia increases the potential for neutrophil-mediated endothelial damage in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2022, 205 (8): 903-916. DOI: 10.1164/rccm.202006-24670C.

(收稿日期: 2024-08-16)
(责任编辑: 保健媛 李银平)