

李应明,陈华,伍燕. 小鼠模型中神经酰胺对血小板介导的输血相关急性肺损伤的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 86-91.

Li YM, Chen H, Wu Y. Effect of ceramide on platelet-mediated transfusion-related acute lung injury in mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 86-91.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.08.013

小鼠模型中神经酰胺对血小板介导的输血相关急性肺损伤的作用

李应明, 陈 华, 伍 燕*

(海南省海口市人民医院输血科, 海口 570208)

【摘要】 目的 评价老化的血小板中的神经酰胺对输血相关急性肺损伤(transfusion-related acute lung injury, TRALI)的作用机制。**方法** 通过脂多糖预刺激,随后输注 10 mL/kg 储存 1~5 d 的血小板,在 BALB/c 小鼠体内构建 TRALI 的二次打击模型。采用酸性鞘磷脂酶特异性抑制剂 ARC39 或输注来自酸性鞘磷脂酶缺乏小鼠的血小板对 TRAIL 模型小鼠进行干预,评价不同时间点小鼠血小板中鞘磷脂成分,以及 TRAIL 模型小鼠肺中性粒细胞积聚情况,内皮屏障功能,肺组织病理学损伤程度。**结果** 存储 1~5 d 的血小板输注到脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)预刺激后的 C57/B6 小鼠体内能够引起肺组织的特征性损伤,且损伤严重程度随血小板储存时间的增加而加剧。血小板中的神经酰胺在储存过程中不断积累和释放。与对照组相比,输注 ARC39 预处理后的血小板或酸性鞘磷脂酶缺乏的血小板可明显缓解肺组织的损伤。**结论** 老化的血小板会导致小鼠发生 TRALI,但这种损伤可以通过酸性鞘磷脂酶抑制剂或特异性敲除酸性鞘磷脂酶基因来逆转和治疗,针对鞘磷脂形成的干预措施有望成为增加血制品存储安全性和寿命的有效策略。

【关键词】 输血相关性急性肺损伤;神经酰胺;酸性鞘磷脂酶;血小板

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0086-06

Effect of ceramide on platelet-mediated transfusion-related acute lung injury in mice

LI Yingming, CHEN Hua, WU Yan*

(Department of Blood Transfusion, Haikou People's Hospital, Haikou 570208, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the mechanism of ceramide in aged platelets mediated by transfusion-related acute lung injury (TRALI). **Methods** The second hit model of TRALI was established in mice via lipopolysaccharide prestimulation, and platelets were transfused and stored for 1-5 days. ARC39 (a specific acid sphingomyelinase inhibitor) or platelets from acid sphingomyelinase-deficient mice were used to treat BALB/c mice. Temporal changes in platelet sphingomyelin composition were analyzed. We examined the accumulation of neutrophils in the lungs of TRALI mice, as well as the function of the endothelial barrier and the histology of injured lung tissue. **Results** Platelets were collected and stored for 1~5 days from mice prestimulated by LPS, which caused characteristic lung injury, and the severity of lung injury increased with time. Ceramide in platelets accumulated and decreased during storage. Compared with the control

[作者简介] 李应明(1982—),主管技师,研究方向:临床输血。E-mail:liqingyu111@163.com

[通信作者] 伍燕(1964—),副主任技师,研究方向:临床输血。E-mail:13389839601@163.com

group, transfusion of ARC39 preconditioned platelets or acid sphingomyelinase deficient platelets significantly alleviated lung injury. **Conclusions** Aging platelets can lead to TRALI in mice, but this damage can be reversed and treated by an acid sphingomyelinase inhibitor or specific knockout of the acid sphingomyelinase gene. Such intervention measures for sphingolipid formation are expected to be an effective strategy for increasing the storage safety and shelf life of blood products.

【Keywords】 transfusion-related acute lung injury; ceramide; acid sphingomyelinase; platelets

输血相关急性肺损伤 (transfusion-related acute lung injury, TRALI) 定义为输血后前 6 h 内发生的非心源性肺水肿, 是严重的输血不良反应, 也是输血相关死亡的首要原因^[1-2]。根据 2015 年美国食品药品监督管理局报道, 输血引起的病毒感染显著下降, 而输血导致的致死性不良反应中位居前三位的依次是输血相关急性肺损伤、溶血性输血反应和输血相关脓毒血症。多项研究发现血小板制品中含有的多种免疫调节因子, 诸如如血小板衍生的生长因子、可溶性 CD40 配体、白介素-6 和白介素-8 等, 在血小板存储过程中不断积累, 在其活化后会参与 TRALI 等多种输血不良反应的发生。

血小板在 TRALI 中的具体作用机制一直存在疑问。目前的研究表明血小板对 TRALI 的致病过程具有促进作用。采用大剂量阿司匹林或血小板膜糖蛋白 (GP) IIb/IIIa 抑制剂, 阻断血小板后能有效遏制肺的病理损伤和死亡。对大鼠输注来自老化血小板的无细胞上清后能够诱发严重的 TRALI^[3-5]。以上研究均说明来自血小板分泌的可溶性介质可能触发和推动了 TRALI 的发生。存储的血液制品中的可溶性介质主要为具有生物活性的脂质, 对存储 5 d 后的血小板脂质成分分析发现鞘磷脂神经酰胺含量最为丰富, 神经酰胺主要由鞘磷脂经酸性鞘磷脂酶在体内进行生物合成, 是造成 TRALI 的关键性物质^[6]。因此, 本研究推测, 储存后的血小板可能通过酸性鞘磷脂酶增加神经酰胺的形成而诱导抗体非依赖性 TRALI 的发生。

为了检验这个假设, 本研究首先 LPS 预刺激小鼠后, 输注含有酸性鞘磷脂酶特异性抑制剂 ARC39 或酸性鞘磷脂酶特异性基因缺失的老化血小板构建 TRALI 的二次打击模型, 分析血小板中的脂质成分和肺损伤程度, 评估神经酰胺在血小板介导的 TRALI 发病过程中的具体作用机制, 现将研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选择近交系 8~10 周龄/雄性, SPF 级 BALB/c 小鼠, 共 35 只 [SCXK (川) 2018-0032], 每只小鼠体重 22~30 g; 以及 8~10 周龄, SPF 级酸性鞘磷脂酶 (acid sphingomyelinase, *Asm*) 基因敲除小鼠, 共 35 只 [SCXK (川) 2016-0030], 每只小鼠体重 22~30 g。所有实验动物由中南大学湘雅医学院大学实验动物中心提供和饲养 [SYXK (湘) 2018-0025]。实验前 1 周所有动物饲养于实验动物中心 SPF 级饲养间, 小鼠饲料、饮水及垫料均经标准化消毒灭菌处理, 自由饮水, 12 h 昼夜节律。所有动物实验内容符合中南大学湘雅医学院大学动物伦理和保护指南, 实验经过本单位伦理审批 (2018HK0342), 全部实验内容遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂

LPS (货号: L2630) 购自美国 sigma 公司; 巨噬细胞炎性蛋白 MIP-2 的 ELISA 检测试剂盒 (货号: MM200) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) (货号: MTA00B) 购买自加拿大 R&D 生物公司; 凝血酶-抗凝血酶复合物 ELISA 检测试剂盒 (货号: 2013-1727) 购买自上海广锐生物技术有限公司; 髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 活性检测试剂盒 (货号: ab144077) 购买自美国 Abcam 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 血小板的获取和存储

5 只雄性 8 周龄 BALB/c 小鼠及相同数量、性别、年龄的 *Asm* 基因缺失小鼠经麻醉后通过心脏穿刺收集全血标本, 全血在室温下 1200 r/min 离心 15 min 三次后富集获得富含血小板血浆并对其中的血小板进行计数, 再以无菌 PBS 溶液将血小板浓度标化为终浓度每毫升 1×10^9 个, 血小板存储液为 10% 柠檬酸-磷酸-葡萄糖-腺嘌呤混合而成的 CPDA 缓冲液, 其中一部分添加 ASM 抑制剂 ARC39 (10 mol/L) 后在无菌生物安全柜中存储。

1.3.2 小鼠 TRALI 的二次打击模型构建及血小板输注

BALB/c 小鼠经腹腔注射 2 mg/kg LPS 或等效体积的生理盐水,2 h 后经尾静脉缓慢注射 10 mL/kg 剂量、浓度为每毫升 1×10^9 个,存储 1~5 d 的 BALB/c 小鼠血小板,或添加 ASM 抑制剂 ARC39 的 BALB/c 小鼠血小板,或 *Asm* 基因缺失小鼠血小板,对照组输注相同体积生理盐水。小鼠于室温下在笼子中观察 6 h。

1.3.3 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测肺泡灌洗液中炎症介质表达水平。

处死小鼠后,进行气管插管,肺内注射 1 mL 无菌 PBS 溶液后回收支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage, BALF),2000 r/min 离心 5 min 去除细胞获取上清得到 BALF,检测 BALF 中 TNF- α 、凝血酶-抗凝血酶复合物角和巨噬细胞炎症蛋白 2 (macrophage-inflammatory protein 2, MIP-2) 水平,大致步骤如下:每孔加入 50 μ L 样品稀释液,然后分别加入相应的 50 μ L 标准品及各组小鼠样品,轻轻摇匀,封上膜后室温孵育 2 h;配置好洗液并洗板 5 次,将孔中的液体拍打干净之后,每孔加 100 μ L 生物素耦联抗体,再封上新膜后室温孵育 2 h,洗板 5 次,每孔加入 100 μ L 显色底物,室温避光孵育 30 min 显色,每孔加入 100 μ L 反应终止液,读取 450 nm 和 540 nm 的吸光度值。根据标准品的浓度与 OD 值做标准曲线,根据标准曲线拟合出方程,并计算得到相应的指标浓度。

1.3.4 肺组织 MPO 活性定量检测

分别取各组小鼠的肺组织,在冰上使用匀浆器充分匀浆组织后 10000 r/min 离心 10 min,收集离心后上清,即为肺组织匀浆液。依照试剂盒说明书的操作步骤测定组织匀浆液在 480 nm 处的吸光度值,根据吸光度值计算不同肺组织的 MPO 活性。

1.3.5 肺组织 MPO 活性定量检测

输注血小板观察 6 h 后颈椎脱臼法处死各组小鼠,取小鼠左肺组织进行湿/干重比值测定:将肺组织置于电子天平上称量总质量 W1,随后置于 70℃ 恒温烘干箱烘干 72 h 使其水分完全蒸发。再次称量干燥后的组织记录为 W2。计算时采用公式“(湿重)/(干重) $\times 100\%$ =(W1)/(W2) $\times 100\%$ ”计算出数值。取右肺组织进行石蜡包埋、切片、苏木精-伊红(HE)染色后,用树胶封固,放在温箱中烤干后,

在光学显微镜下根据肺泡或间质中性粒细胞、透明膜、空隙碎片和肺泡间隔增厚等指标,使用组织学肺损伤评分对肺损伤进行分级。

1.3.6 血小板脂质谱成分分析

从储存后的血小板上清液中提取神经酰胺并采用液相色谱法进行定量测定,主要步骤如下:将冷冻后的血小板解冻并以 3000 r/min 离心 15 min,以四氯甲醇萃取收集脂质。采用 Q-TOF 6530 质谱仪 (Agilent Technologies, Waldbron, 德国) 及串联质谱对鞘磷脂成分进行分析,使用 Mass Hunter 软件 (Agilent Technologies) 进行量化处理。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 及 Prism 7.01 (美国 Graph Pad Software 公司) 软件进行统计学分析,计量数据表示为“平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$)”,多组间比较采用单因素方差分析,以 Dunnett 检验进行事后两两比较, $P < 0.05$ 为差异具有显著统计学意义。

2 结果

2.1 伴随血小板存储时间的增加 TRALI 肺损伤加剧

为了明确血小板储存时间对于 TRALI 的影响,本研究对 BALB/c 小鼠进行 LPS 腹腔注射后,分别输注存储 0、1、3、5 d 的血小板。6 h 后处死小鼠,观察小鼠肺发现,输注血小板后小鼠肺出现了严重的特征性损伤。肺组织病理切片出现了明显的肺水肿和组织损伤。湿/干肺重量比值在输注储存 3、5 d 血小板的小鼠中显著上调(图 1A)。BAL 蛋白含量在输注储存 5 d 血小板的小鼠体内增加明显(图 1A)。肺 MPO 活性在输注储存 1、3、5 d 血小板的小鼠中均显著上调超过 1 倍(图 1A)。HE 染色显示输注储存 1、3、5 d 血小板的小鼠肺组织损伤加重(图 1B)。以上结果表明,输注老化的血小板会导致肺水肿形成、血管屏障衰竭、肺中性粒细胞浸润和肺组织病理学损伤;并且 TRALI 的损伤程度与血小板储存时间呈现正相关。

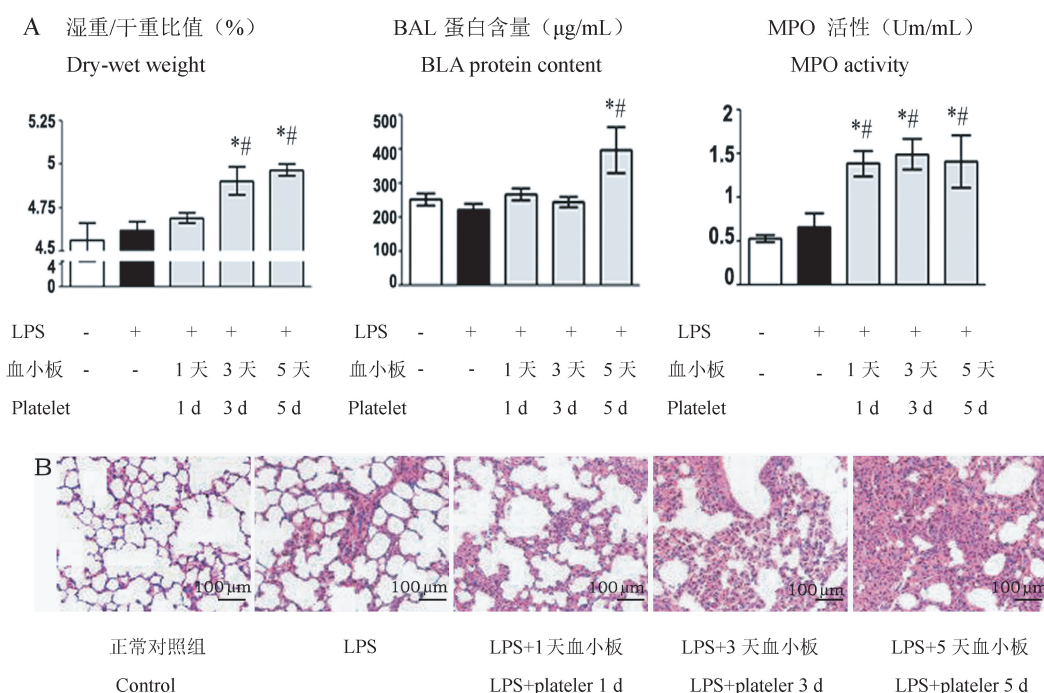
2.2 神经酰胺随着存储时间的增加在小鼠血小板中的含量增加

为了明确是否由于血小板中神经酰胺可以随储存时间的增加而积累,本研究通过液相色谱-质谱对存储后的血小板样品中神经酰胺成分的定量分析显示:神经酰胺随着存储时间的延长在血小板中不断增加,存储第 7 天的血小板中神经酰胺的含

量是第 0 天的 1.6~2.9 倍(如图 2 所示)。以上结果表明随着血小板储存时间的延长,神经酰胺会持续积累,从而加剧小鼠 TRALI。

2.3 ASM 抑制或缺失后,老化血小板介导的 TRALI 明显减弱

为了进一步探讨鞘磷脂在老化血小板介导的

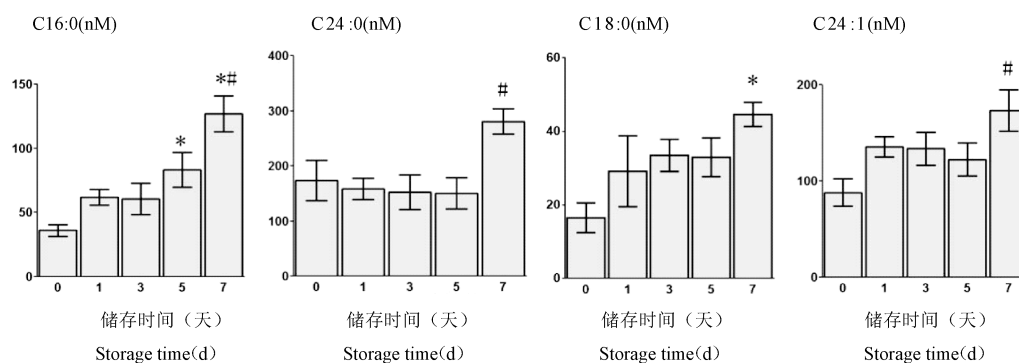


注:A;输注不同储存时间的血小板后,小鼠的湿重/干重量比值,BAL 中的蛋白浓度,肺组织中 MPO 活性;B;输注不同储存时间的血小板后小鼠肺组织的组织病理改变(HE 染色)。n=5。与正常对照组比较,* $P<0.05$;与存储 1 d 血小板组比较,# $P<0.05$ 。

图 1 老化的血小板输注到 LPS 预刺激后的小鼠体内中会加剧 TRALI 的组织病理损伤

Note. A, Ratio of wet weight to dry weight of mice, the concentration of protein in BAL and the activity of MPO in lung tissue. B, Histopathological photos of HE staining of lung tissue after transfusion of platelets with different storage time. Compared with the normal control group, * $P<0.05$. Compared with platelet storage group, # $P<0.05$.

Figure 1 The ratio of wet weight to dry weight, the concentration of protein in BAL and the activity of MPO in lung tissue of mice after transfusion of aged platelets into LPS pre-stimulated mice with different storage time of TRALI



注:高效液相色谱法对存储后的血小板样品中不同种类的神经酰胺含量的定量分析:C16:0,C18:0,,C24:0和 C24:1 的浓度随存储时间的增加而增加。n=5。与正常对照组比较,* $P<0.05$;与存储 1 d 血小板组比较,# $P<0.05$ 。

图 2 不同种类的神经酰胺随储存时间的增加在小鼠血小板中的积累

Note. The contents of different kinds of ceramides in stored platelet samples were quantitatively analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Compared with the normal control group, * $P<0.05$. Compared with platelet storage group, # $P<0.05$.

Figure 2 Accumulation of different kinds of ceramides in mouse platelets with the increase of storage time

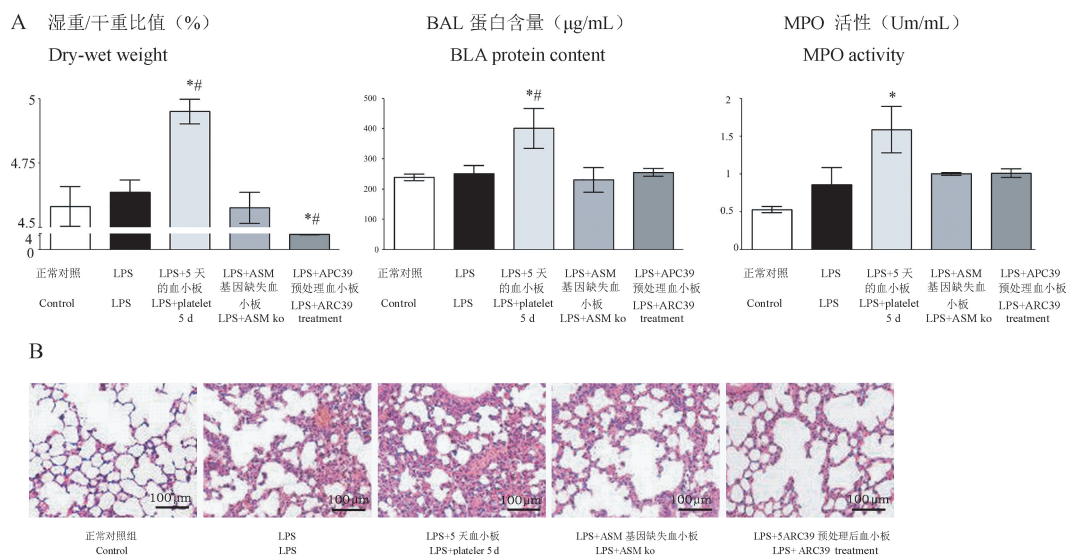
TRALI 中的具体机制,本研究通过两种不同的途径阻断鞘磷脂的生成:药物抑制鞘磷脂形成(ASM 的抑制剂 ARC39 预处理血小板)和输注 *Asm* 基因缺失小鼠来源的血小板。我们观察到抑制或阻断鞘磷脂的生成后,肺 MPO 活性和肺组织病理学损伤显著好转,湿/干肺重量比和 BAL 蛋白含量降低(图 3A)。HE 染色也显示小鼠肺在输注 *Asm* 基因缺失血小板或 ARC39 预处理后的血小板后显著改善了肺损伤(图 3B)。

3 讨论

通过本研究,我们发现存储后的血小板中累计产生的神经酰胺是触发血小板介导的抗体非依赖性 TRALI 的新机制,特异性的通过抑制 ASM 活性减少神经酰胺的产生能够明显减轻 TRALI 症状,潜在延长血小板的存储时间并增加输血的安全性,为临床血制品的存储开辟了新的前景。

血小板是一种临床稀缺的血液制品,因此常常需要尽可能延长其存储时间和最大限度的提高其临床利用率,但是长时间存储的血小板会增加 TRALI 的风险^[7]。我们通过构建小鼠 TRALI 的二次打击模型,在输注血小板 6 h 后即触发 TRALI 的

特征性临床表现:肺水肿形成、血管屏障衰竭、肺中性粒细胞积聚和肺组织学损伤,并且发现 TRALI 病情的严重程度呈现血小板的储存时间的依赖性。既往的研究已经证明神经酰胺是内皮屏障失效和肺损伤的重要介质。在肺组织和细胞中鞘脂类相关酶类的表达量非常高,当机体受到诸如肿瘤坏死因子- α 和血小板活化因子等刺激时,支气管肺泡灌洗液中酸性鞘磷脂酶的活性增高,神经酰胺量也相应增加。并且 ASMase 的活性与神经酰胺量的同步增加,而应用 ASMase 抑制剂后,神经酰胺的生成显著减少,肺功能得到了改善^[8-9]。神经酰胺通过抑制内皮细胞一氧化氮合酶活性增加肺内皮细胞通透性,导致内皮细胞 Ca^{2+} 内流以及内皮屏障破坏和肺水肿形成^[10-12]。此外,神经酰胺可以促进内皮细胞凋亡,从而进一步加重肺中的内皮屏障破坏^[13-15]。我们通过鞘磷脂成分分析发现在长时间存储的血小板中神经酰胺的含量增加最为显著,提示在 TRALI 的致病过程中,神经酰胺可能发挥重要作用,进一步通过 ASM 抑制剂或输注 ASM 基因缺陷小鼠来源的血小板可以明显缓解 TRALI 症状。因此,我们的动物实验成功证实神经酰胺可能是血小板介导的抗体非依赖性 TRALI 的重要分子,而且



注:A:如图标注处理后的各组小鼠的肺湿重/干重比值,BAL 中的蛋白质浓度,肺组织中的 MPO 活性;B:如图标注处理后的各组小鼠肺的组织病理分析(HE 染色)。n=5。与正常对照组比较,* $P<0.05$;与输注存储 5 d 血小板组比较,^{##} $P<0.05$ 。

图 3 输注 *Asm* 基因缺失小鼠来源的血小板或 ASM 特异性抑制剂处理后的存储血小板可明显减弱 TRALI 损伤

Note. A. Ratio of lung wet weight to dry weight, the protein concentration in BAL and the activity of MPO in lung tissue of each group of mice were marked as shown in the figure. B, HE staining tissue sections of the lungs of each group of mice. Compared with the normal control group, * $P<0.05$. Compared with platelet transfusion group, ^{##} $P<0.05$.

Figure 3 Transfusion of platelets derived from *Asm* gene deleted mice or stored platelets treated with ASM specific inhibitors could significantly attenuate TRALI damage

靶向抑制 ASM 依赖的神经酰胺的形成可以降低老化血小板介导 ALI 的风险,从而增加储存血液制品的安全性。

在早期研究中,通过输注针对小鼠血小板的兔多克隆血清耗竭血小板或者高剂量阿司匹林可以有效遏制 TRALI 的发生发展。我们前期实验发现:这种高剂量的阿司匹林仅能降低 TRALI 小鼠的死亡率,而在药理学剂量(10 mg/Kg)下并没有观察到保护作用。鉴于阿司匹林对 COX-1 有抑制作用,这表明大剂量阿司匹林的保护作用可能源于其血小板非依赖性的抗炎和抗氧化特性,或来自代谢衍生物水杨酸盐的特性,而不是其抗血小板活性。此外,临床上血小板常规的存储时间为 3~5 d,在美国基于预防细菌污染的考虑,血小板存储时间限定在 5 d 以内^[16]。在本研究中,靶向抑制 ASM 活性,不仅能够缓解输注存储 5 d 的血小板之后的 TRALI 症状,并且可成功将小鼠血小板的储存时间延长至 7 d,有助于提高临床血小板使用率,缓解血制品的供需矛盾。

参考文献:

- [1] Roubinian NH, Triulzi DJ. Transfusion-associated circulatory overload and transfusion-related acute lung injury: etiology and prevention [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2019, 33(5): 767-779.
- [2] Vlaar APJ, Kleinman S. An update of the transfusion-related acute lung injury (TRALI) definition [J]. *Transfus Apher Sci*, 2019, 58(5): 632-633.
- [3] Hechler B, Maître B, Magnenat S, et al. Platelets are dispensable for antibody-mediated transfusion-related acute lung injury in the mouse [J]. *J Thromb Haemost*, 2016, 14(6): 1255-1267.
- [4] Tariket S, Hamzeh-Cognasse H, Laradi S, et al. Evidence of CD40L/CD40 pathway involvement in experimental transfusion-related acute lung injury [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 12536.
- [5] Tong S, Wang H, Zhang T, et al. Accumulation of CD62P during storage of apheresis platelet concentrates and the role of CD62P in transfusion-related acute lung injury [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 7777-7781.
- [6] McVey MJ, Kim M, Tabuchi A, et al. Acid sphingomyelinase mediates murine acute lung injury following transfusion of aged platelets [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 312(5): L625-L637.
- [7] Levy JH, Rossaint R, Zacharowski K, et al. What is the evidence for platelet transfusion in perioperative settings? [J]. *Vox Sang*, 2017, 112(8): 704-712.
- [8] Hoehn RS, Jernigan PL, Japtok L, et al. Acid sphingomyelinase inhibition in stored erythrocytes reduces transfusion-associated lung inflammation [J]. *Ann Surg*, 2017, 265(1): 218-226.
- [9] Freed JK, Beyer AM, LoGiudice JA, et al. Ceramide changes the mediator of flow-induced vasodilation from nitric oxide to hydrogen peroxide in the human microcirculation [J]. *Circ Res*, 2014, 115(5): 525-532.
- [10] Fu M, Li Z, Tan T, et al. Akt/eNOS signaling pathway mediates inhibition of endothelial progenitor cells by palmitate-induced ceramide [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(1): H11-H17.
- [11] Medler TR, Petrusca DN, Lee PJ, et al. Apoptotic sphingolipid signaling by ceramides in lung endothelial cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 38(6): 639-646.
- [12] Kuebler WM, Wittenberg C, Lee WL, et al. Thrombin stimulates albumin transcytosis in lung microvascular endothelial cells via activation of acid sphingomyelinase [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 310(8): L720-L732.
- [13] Niaudet C, Bonnaud S, Guillonnet M, et al. Plasma membrane reorganization links acid sphingomyelinase/ceramide to p38 MAPK pathways in endothelial cells apoptosis [J]. *Cell Signal*, 2017, 33: 10-21.
- [14] Li W, Yang X, Xing S, et al. Endogenous ceramide contributes to the transcytosis of oxLDL across endothelial cells and promotes its subendothelial retention in vascular wall [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 823071.
- [15] Wang A, Li C, Liao J, et al. Ceramide mediates inhibition of the Akt/eNOS pathway by high levels of glucose in human vascular endothelial cells [J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2013, 26(1-2): 31-38.
- [16] Lacerda SH, Semberova J, Holada K, et al. Carbon nanotubes activate store-operated calcium entry in human blood platelets [J]. *ACS Nano*, 2011, 5(7): 5808-5813.

[收稿日期] 2020-01-06