

HIF-1 α 干预中性粒细胞胞外陷阱对SD脓毒症大鼠模型的影响

王宇飞¹, 田红军^{2*}

¹内蒙古科技大学包头医学院研究生院, 内蒙古 包头

²内蒙古包钢医院呼吸与危重症医学科, 内蒙古 包头

收稿日期: 2025年5月27日; 录用日期: 2025年6月19日; 发布日期: 2025年6月30日

摘要

目的: 证明缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)通过HIF-1 α /糖酵解途径调节中性粒细胞胞外陷阱(Neutrophil Extracellular Traps, NETs)的形成和释放, 影响脓毒症(sepsis)炎症反应。方法: 建立脓毒症大鼠模型, 给予HIF-1 α 抑制剂。收集各组大鼠外周血进行ELISA检测TLR4、NF- κ B、IL-10、CitH3、cfDNA、MPO含量; 肺组织样本进行苏木素-伊红(HE)染色、肺损伤评分及RT-qPCR检测HIF-1 α 、GLUT1、HK、PKM2、LDHA mRNA的表达。结果: 肺组织HE染色结果: 脓毒症模型组肺泡腔显著闭塞, 肺组织实变, 实变区肺组织内可见较多炎细胞浸润及损伤肺泡上皮细胞, 局灶可见出血, d4较d1炎性渗出明显增多、损伤程度加重; HIF-1 α 抑制剂组肺组织损伤程度较LPS组同时期减轻, 且时间越长, 减轻程度越明显。肺损伤评分、肺组织HIF-1 α 、GLUT1、HK、PKM2、LDHA表达和外周血TLR4、NF- κ B、IL-10、CitH3、cfDNA、MPO含量: LPS组d1、d4上述指标较NC组同时期均升高(均 $P < 0.05$), 且LPS组d4较LPS组d1均升高(均 $P < 0.05$), 差异有统计学意义; LPS + HIF-1 α (-)组d1较NC组同时期均升高(均 $P < 0.05$), LPS + HIF-1 α (-)组d7较d1均显著降低(均 $P < 0.05$), LPS + HIF-1 α (-)组d4、d7较LPS组同时期均降低(均 $P < 0.05$), 差异有统计学意义。结论: (1) 在LPS诱导的大鼠模型中, HIF-1 α 、糖酵解、NETs、炎症的表达均增高, 表明这一通路在脓毒症的调控中发挥了一定作用; (2) 通过抑制HIF-1 α , 糖酵解、NETs及炎症表达下降, 可能为脓毒症的治疗提供一个新的靶点。

关键词

脓毒症, 急性肺损伤, 缺氧诱导因子-1 α , 糖酵解, 中性粒细胞胞外陷阱

Effects of HIF-1 α Intervention on Neutrophil Extracellular Traps in a Sprague-Dawley Rat Model of Sepsis

Yufei Wang¹, Hongjun Tian^{2*}

*通讯作者。

文章引用: 王宇飞, 田红军. HIF-1 α 干预中性粒细胞胞外陷阱对 SD 脓毒症大鼠模型的影响[J]. 临床医学进展, 2025, 15(6): 1975-1984. DOI: 10.12677/acm.2025.1561938

¹Graduate School of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science & Technology, Baotou Inner Mongolia

²Respiratory and Critical Care Medicine Department of Inner Mongolia Baogang Hospital, Baotou Inner Mongolia

Received: May 27th, 2025; accepted: Jun. 19th, 2025; published: Jun. 30th, 2025

Abstract

Objective: To demonstrate that hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) regulates the formation and release of neutrophil extracellular traps (NETs) through the HIF-1 α /glycolysis pathway, thereby modulating the inflammatory response in sepsis. **Methods:** A rat sepsis model was established and treated with HIF-1 α inhibitors. Peripheral blood samples were collected for ELISA detection of TLR4, NF- κ B, IL-10, CitH3, cfDNA, and MPO levels. Lung tissue samples underwent hematoxylin and eosin (HE) staining, lung injury scoring, and RT-qPCR analysis of HIF-1 α , GLUT1, HK, PKM2, LDHA mRNA expression. **Results:** HE staining of lung tissue: The sepsis model group (LPS group) exhibited significant alveolar space occlusion, pulmonary consolidation, inflammatory cell infiltration, damaged alveolar epithelial cells, and focal hemorrhage. Inflammatory exudation and tissue damage worsened on day 4 compared to day 1. The HIF-1 α inhibition group showed reduced lung injury severity compared to the LPS group at the same time points, with greater improvement over time. Lung injury scores and expression of HIF-1 α , GLUT1, HK, PKM2, LDHA, and peripheral blood biomarkers (TLR4, NF- κ B, IL-10, CitH3, cfDNA, MPO): Compared to the normal control (NC) group, the LPS group showed elevated levels of all measured indicators at both d1 and d4 (all $P < 0.05$), with further increases from d1 to d4 (all $P < 0.05$) with statistical significance. In the LPS + HIF-1 α (-) group, levels of these markers were higher than in the NC group at d1 (all $P < 0.05$) but significantly decreased by d7 compared to d1 (all $P < 0.05$). Additionally, the LPS + HIF-1 α (-) group demonstrated lower levels of these indicators at d4 and d7 compared to the LPS group at the same time points (all $P < 0.05$), with statistical significance. **Conclusion:** (1) In the LPS-induced rat sepsis model, the expression of HIF-1 α , glycolysis, NETs, and inflammation significantly increased, indicating that this pathway plays a certain role in the regulation of sepsis. (2) Inhibition of HIF-1 α attenuated glycolysis, NETs formation, and inflammatory responses, indicating that targeting HIF-1 α may offer a novel therapeutic strategy for sepsis.

Keywords

Sepsis, Acute Lung Injury, Hypoxia-Inducible Factor-1 α , Glycolysis, Neutrophil Extracellular Trap

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

脓毒症(Sepsis)最新定义为由于宿主对感染的不当反应而引起的危及生命的器官衰竭[1] [2]。脓毒症发病机制复杂, 包括炎症失衡、免疫失调、线粒体损伤、凝血障碍等多种病理生理过程, 其中炎症和免疫介导的病理是脓毒症最常见的特征[3] [4]。目前针对脓毒症-ARDS 的治疗, 临床仍以呼吸支持、液体管理、糖皮质激素和其他药物治疗(包括抗感染等)为主, 但是仍具有高发病率和高死亡率的特点[5]。

有研究指出, 脓症患者外周血中性粒细胞的凋亡受到抑制, 而小鼠脓毒症模型中 NETs 的释放增

加[6]。NETs 是机体受到各种病原体侵入, 中性粒细胞释放的一种由基因组 DNA、组蛋白、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)以及瓜氨酸化组蛋白 3 (citrullinated histone 3, CitH3)等抗菌蛋白组成的纤维网状结构[7]。在炎症初期, 适量 NETs 通过诱捕、固定病原体发挥抗炎作用[8]。然而 NETs 中某些抗菌组蛋白和肽可以对组织细胞产生直接细胞毒性作用[9]。此外, 有研究表明 NETs 可能通过聚集局部高浓度的血小板、红细胞和凝血因子形成血栓, 当脓毒症时, 中性粒细胞被持续激活, 过度生成和释放的 NETs 则会对机体造成损害[10], NETs 的存在可被用于预测脓毒症患者的死亡率[11], 因此通过调节 NETs 的水平或许可以成为治疗脓毒症的一种新方法。

缺氧诱导因子(HIF)是一种异二聚体转录调节因子, 由氧调节的 α 亚基和稳定表达的 β 亚基组成, 在氧稳态的许多方面起关键作用[12]。低氧环境下, HIF-1 α 亚基的羟基化和乙酰化过程受到抑制, HIF-1 α 稳定性增加, 水平积累[13]。缺氧和炎症在脓毒症-ARDS 时同时发生, 有研究表明暴露于细菌感染和缺氧时, TLR4 作为一种跨膜识别受体, 可以识别并激活核因子- κ B (NF- κ B), 巨噬细胞中 IKK β (抑制性 κ B 激酶)特异性敲低则可以减弱 HIF-1 α 的表达[14]。

脓毒症-ARDS 情况下, 葡萄糖无法充分有氧化, 在细胞质中生成大量乳酸, 加重疾病严重程度。中性粒细胞因其代谢活跃, 需依靠糖酵解来调节和维持 ATP 的产生以快速供能, 并可通过乳酸水平的升高平衡细胞 pH 值[15]。然而脓症患者血浆中 ATP 水平升高会干扰中性粒细胞的功能和信号转导, 导致中性粒细胞过度激活, 降解受到抑制[16]。研究表明, 在缺乏葡萄糖的培养基中, 中性粒细胞无法响应 PMA 释放 NETs, 添加葡萄糖后 NETs 的释放恢复, 而抑制中性粒细胞糖酵解则可以直接抑制 ATP 的生成[17]。

多种白细胞受到免疫代谢调节, 巨噬细胞暴露于脂多糖(LPS)导致柠檬酸循环两次中断, 第二次断裂激活缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) [18]。在几种体外和体内炎症模型中, 小鼠模型研究显示, 特异性抑制 HIF-1 α 或敲除 HIF-1 α 基因能显著减少 NETs 生成, 从骨髓细胞中去除 HIF-1 α 还可以保护小鼠免受 LPS 诱导的死亡[19]。因此我们推测在严重的炎症反应时, 稳定表达的 HIF-1 α 通过增强与 NF- κ B 通路的串扰作用, 同时激活糖酵解来保持细胞活动所需的 ATP 使 NETs 水平升高[20], 最终加重脓毒症-ARDS 炎症反应。

2. 材料和方法

2.1. 实验动物和试剂

SPF 级 SD 雄性大鼠 54 只, 重量在 220~250 g, 购于斯贝福(北京)生物技术有限公司。注射用青蒿琥酯购于桂林南药(广西)。ELISA 试剂盒购于泽雨生物科技有限公司(江苏)。TransZol Up Plus RNA kit、TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix、PerfectStart Green qPCR SuperMix 购于全式金生物技术有限公司(北京)。引物购于生工生物工程股份有限公司(上海)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 分组及建模

将 54 只健康 SPF 级 SD 清洁级雄性大鼠置于标准实验鼠房, 适应性饲养 1 周后, 随机分为正常组(NC 组)、脓毒症模型组(LPS 组)、LPS + HIF-1 α 抑制剂组(LPS + HIF-1 α (-)组), 每组分第 1、4、7 天(d1, d4, d7)三个时间点, 处理如下: (1) NC 组: 尾静脉注射 PBS (与 LPS 等量)。(2) LPS 组: d1 尾静脉注射 LPS (1 次)按 5 mg/kg 计量。(3) LPS + HIF-1 α (-)组: d1 尾静脉注射 LPS (1 次)按 5 mg/kg 计量, 半小时后尾静脉注射 HIF-1 α 抑制剂(注射用青蒿琥酯按 30 mg/kg 计量)。为减少实验误差全部给药步骤由一人执行。本研究满足内蒙古包钢医院伦理委员会的实验伦理相关规定和标准, 已通过伦理委员会的批准(批准

编号: 2022-MER-134)。

2.2.2. 取材

外周血: 充分麻醉大鼠后切开胸骨, 暴露心脏及肺脏, 经大鼠右心抽取静脉血约 2 ml, 分离血清后于 -80°C 冰箱冻存备用。肺组织: 麻醉大鼠后暴露肺脏, 分离肺叶, 部分肺叶用于 HE 染色, 其余肺叶置于 EP 管中, 置于 -80°C 冰箱冻存备用。

2.2.3. RT-qPCR 检测肺组织中 HIF-1 α 、GLUT1、HK、PKM2、LDHA mRNA 的表达

提取大鼠肺组织 RNA 并测定浓度, 利用反转录试剂盒将 RNA 反转录 cDNA, 采用 RT-qPCR 法检测基因表达量。引物序列(5'-3') HIF-1 α (F: CCCCTCCTACCACCGTTCA, R: CATCCTGCCCACCAAAGC), GLUT1 (F: CTTCCTGCTCATCAATCGT, R: AGGTCTCGGGTCACATCG), HK (F: ATGGAGGACAGAG-GAAAGG, R: AGACTGGGATGAGCAACG), PKM2 (F: GGTGACCTGGGCATTGAG, R: CGCAGATGACTGGCTTCC), LDHA (F: ACAAGGAGCAGTGGAAGG, R: TCATGGTGGAAATGGGAT), 选择 β -actin 作为内参基因(F: CCCATCTATGAGGGTTACGC, R: TTTAATGTACACGCACGATTTC)。

2.2.4. ELISA 法检测外周血中 TLR4、NF- κ B、IL-10、CitH3、cfDNA、MPO 含量

使用 ELISA 技术检测 sepsis-ARDS 组和 NC 组血清中 TLR4、NF- κ B、IL-10、CitH3、cfDNA、MPO 的含量。实验步骤按 ELISA 试剂盒说明书进行。

2.3. 统计学方法

利用 GraphPad Prism 9.5.1 软件对数据进行分析, 并用 $\bar{x} \pm s$ 展示结果。满足正态分布的两个群体采取 t 检验; 样本量不足或未达到正态分布要求采取秩和检验。对比多个群体数据, 采取单因素方差分析, $P < 0.05$ 提示数据存在显著性差异。

3. 结果

3.1. 肺组织炎症程度判定

3.1.1. 各组大鼠肺组织 HE 染色对比

对大鼠肺组织进行 HE 染色, 结果显示, NC 组肺组织肺泡腔充盈良好, 少许肺泡腔稍闭塞, 可见个别炎细胞浸润, 肺泡腔及肺泡间隔内未见明显出血, 局灶肺泡间隔稍增厚; LPS 组肺泡腔显著闭塞, 肺组织实变, 实变区内可见较多炎细胞浸润及损伤肺泡上皮细胞, 局灶可见出血, d4 较 d1 炎性渗出明显增多、损伤程度加重, d7 较 d4 稍有减轻, 但未能达到 d1 水平; LPS + HIF-1 α (-)组肺泡腔局灶挤压变形, 部分肺泡腔闭塞, 未见明确肺实变, 肺泡间隔及肺泡腔内可见少许炎细胞浸润, 局灶可见出血, 损伤程度较 LPS 组同时期减轻, 且时间越长, 减轻程度越明显(见图 1)。

3.1.2. 各组大鼠肺损伤病理评分

使用 Mikawa 评分表对大鼠肺组织损伤程度进行评分, 评分结果如下: LPS 组和 LPS + HIF-1 α (-)组 d1 大鼠评分分别为(7.42 ± 0.74 , 7.33 ± 0.52)、d4 大鼠评分分别为(13.92 ± 0.59 , 4.92 ± 0.86)、d7 大鼠评分分别为(10.83 ± 0.88 , 1.42 ± 0.74)。研究发现: LPS 组 d1、d4 较 NC 组同时期相比评分升高($t = 24.684$ 、 58.319 , 均 $P < 0.01$), LPS 组 d4 较 LPS 组 d1 相比评分升高($t = 16.941$, $P < 0.01$); LPS + HIF-1 α (-)组 d1 较 NC 组同时期相比评分升高($t = 34.785$, $P < 0.01$), LPS + HIF-1 α (-)组 d7 较 LPS + HIF-1 α (-)组 d1 相比评分降低($t = 16.12$, $P < 0.01$), LPS + Hif-1 α (-)组 d4、d7 较 LPS 组同时期相比评分降低($t = 32.578$ 、 20.166 , 均 $P < 0.01$), 差异有统计学意义。

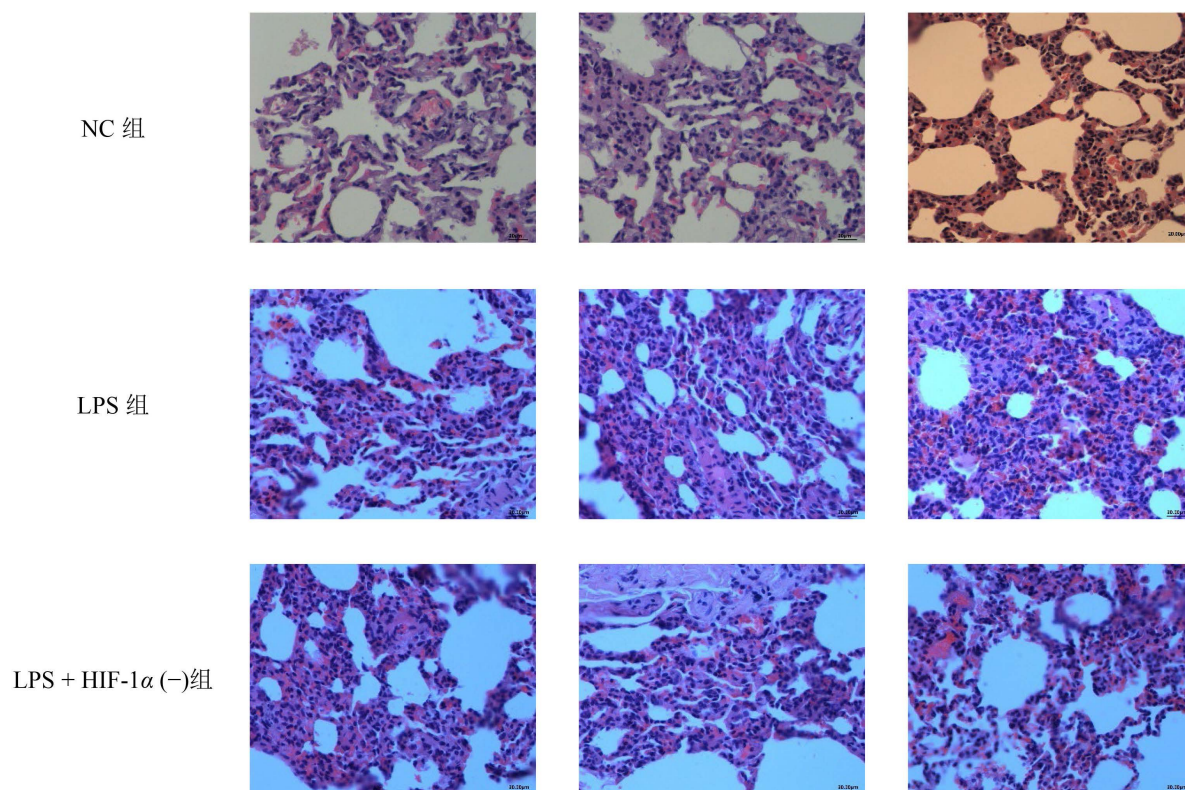


Figure 1. Representative hematoxylin and eosin (HE)-stained lung tissue sections from each experimental group at d1, d4, and d7

图 1. 各组大鼠 d1、d4、d7 天肺组织 HE 染色(400×)

3.2. 各组大鼠肺组织总 RNA 中 HIF-1 α 含量

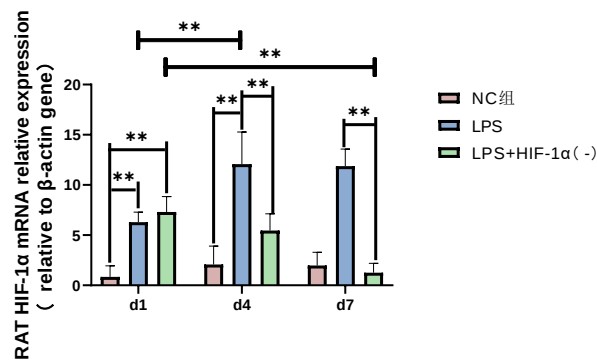
本研究检测了各组大鼠肺组织中的 HIF-1 α 的 mRNA 的表达量, 结果显示: 各组大鼠肺组织中 d1、d4、d7 HIF-1 α mRNA: NC 组(0.85 ± 1.09 , 2.08 ± 1.83 , 1.98 ± 1.31), LPS 组(6.28 ± 1.01 , 12.07 ± 3.20 , 11.87 ± 1.70), LPS + HIF-1 α (-)组(7.31 ± 1.54 , 5.45 ± 1.66 , 1.26 ± 0.93). 研究发现: LPS 组 d1 较 NC 组同时期相比表达升高($t = 6.498$, $P < 0.01$), LPS 组 d4 较 NC 组同时期相比表达升高($t = 5.434$, $P < 0.01$), LPS 组 d4 较 LPS 组 d1 相比表达升高($t = 4.228$, $P < 0.01$); LPS + HIF-1 α (-)组 d1 较 NC 组同时期相比表达升高($t = 5.38$, $P < 0.01$), LPS + HIF-1 α (-)组 d7 较 LPS + HIF-1 α (-)组 d1 相比表达降低($t = 8.247$, $P < 0.01$), LPS + HIF-1 α (-)组 d4 较 LPS 组同时期相比表达降低($t = 4.497$, $P < 0.01$), LPS + HIF-1 α (-)组 d7 较 LPS 组同时期相比表达降低($t = 13.398$, $P < 0.01$), 差异有统计学意义(见图 2)。

3.3. 各组大鼠肺组织总 RNA 中 GLUT1、HK、PKM2、LDHA 含量

为了研究抑制 HIF-1 α 是否能够抑制糖酵解途径, 本研究检测了各组大鼠肺组织中的 GLUT1、HK、PKM2、LDHA 的 mRNA 的表达量(结果见表 1、图 3)。

3.4. 各组大鼠外周血 TLR4、NF- κ B、IL-10、CitH3、cfDNA、MPO 含量

为了研究抑制 HIF-1 α 是否能抑制 NETs 生成及炎症反应, 本研究检测了大鼠外周血中 TLR4、NF- κ B、IL-10、CitH3、cfDNA、MPO 的含量(结果见表 2、图 4)。



注: ** $P < 0.01$ 。

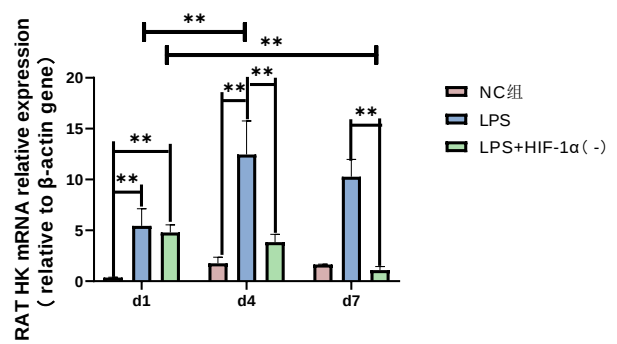
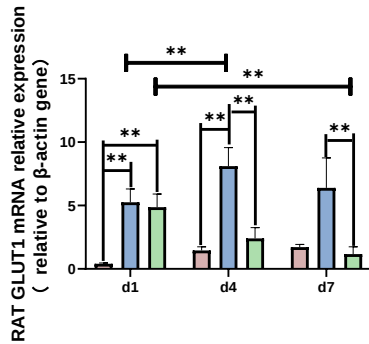
Figure 2. Comparison of HIF-1 α mRNA levels in lung tissues across experimental groups at d1, d4, and d7
图 2. 各组大鼠 d1、d4、d7 对比肺组织 HIF-1 α mRNA 含量

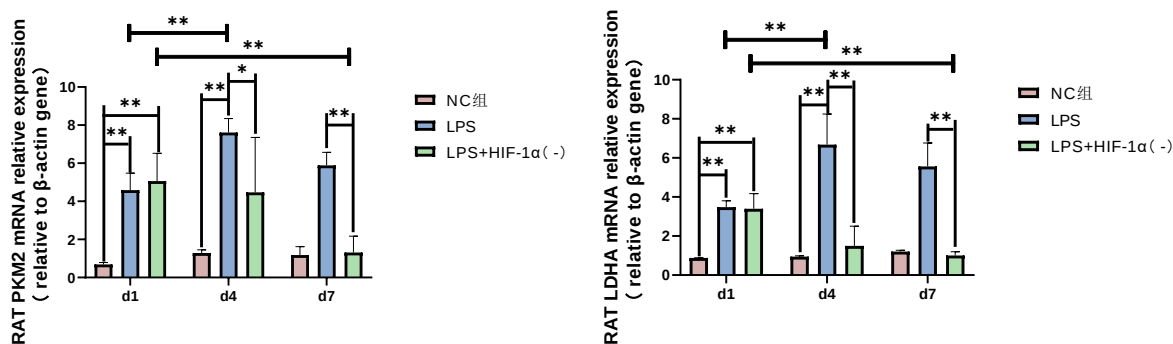
Table 1. mRNA expression levels of GLUT1, HK, PKM2, and LDHA in lung tissues of rats from each experimental group at d1, d4, and d7 (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

表 1. 各组大鼠 d1、d4、d7 肺组织 GLUT1、HK、PKM2、LDHA mRNA 表达量(n = 6, $\bar{x} \pm s$)

因子	组别	d1	d4	d7
GLUT1	NC 组	0.41 ± 0.06	1.45 ± 0.30	1.72 ± 0.21
	LPS 组	5.25 ± 1.06*	8.11 ± 1.46* [△]	6.39 ± 3.64
	LPS + HIF-1 α (-)组	4.87 ± 1.03*	2.41 ± 0.85 [#]	1.17 ± 0.58 ^{#*}
HK	NC 组	0.36 ± 0.03	1.75 ± 0.60	1.64 ± 0.03
	LPS 组	5.45 ± 1.68*	12.45 ± 3.30* [△]	10.27 ± 1.70
	LPS + HIF-1 α (-)组	4.80 ± 0.75*	3.85 ± 0.77 [#]	1.09 ± 0.36 ^{#*}
PKM2	NC 组	0.69 ± 0.10	1.29 ± 0.17	1.18 ± 0.44
	LPS 组	4.59 ± 0.90*	7.62 ± 0.73* [△]	5.89 ± 0.68
	LPS + HIF-1 α (-)组	5.06 ± 1.46*	4.47 ± 2.89 [#]	1.31 ± 0.86 ^{#*}
LDHA	NC 组	0.88 ± 0.01	0.95 ± 0.04	1.20 ± 0.07
	LPS 组	3.48 ± 0.33*	6.68 ± 1.57* [△]	5.56 ± 1.20
	LPS + HIF-1 α (-)组	3.40 ± 0.78*	1.50 ± 1.00 [#]	1.00 ± 0.20 ^{#*}

注: * $P < 0.05$ vs NC组, [#] $P < 0.05$ vs LPS组, [△] $P < 0.05$ 每组内大鼠d4 vs d1, * $P < 0.05$ 每组内大鼠d7 vs d1。





注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Figure 3. Comparison of GLUT1, HK, PKM2, and LDHA mRNA levels in lung tissues across experimental groups at d1, d4, and d7

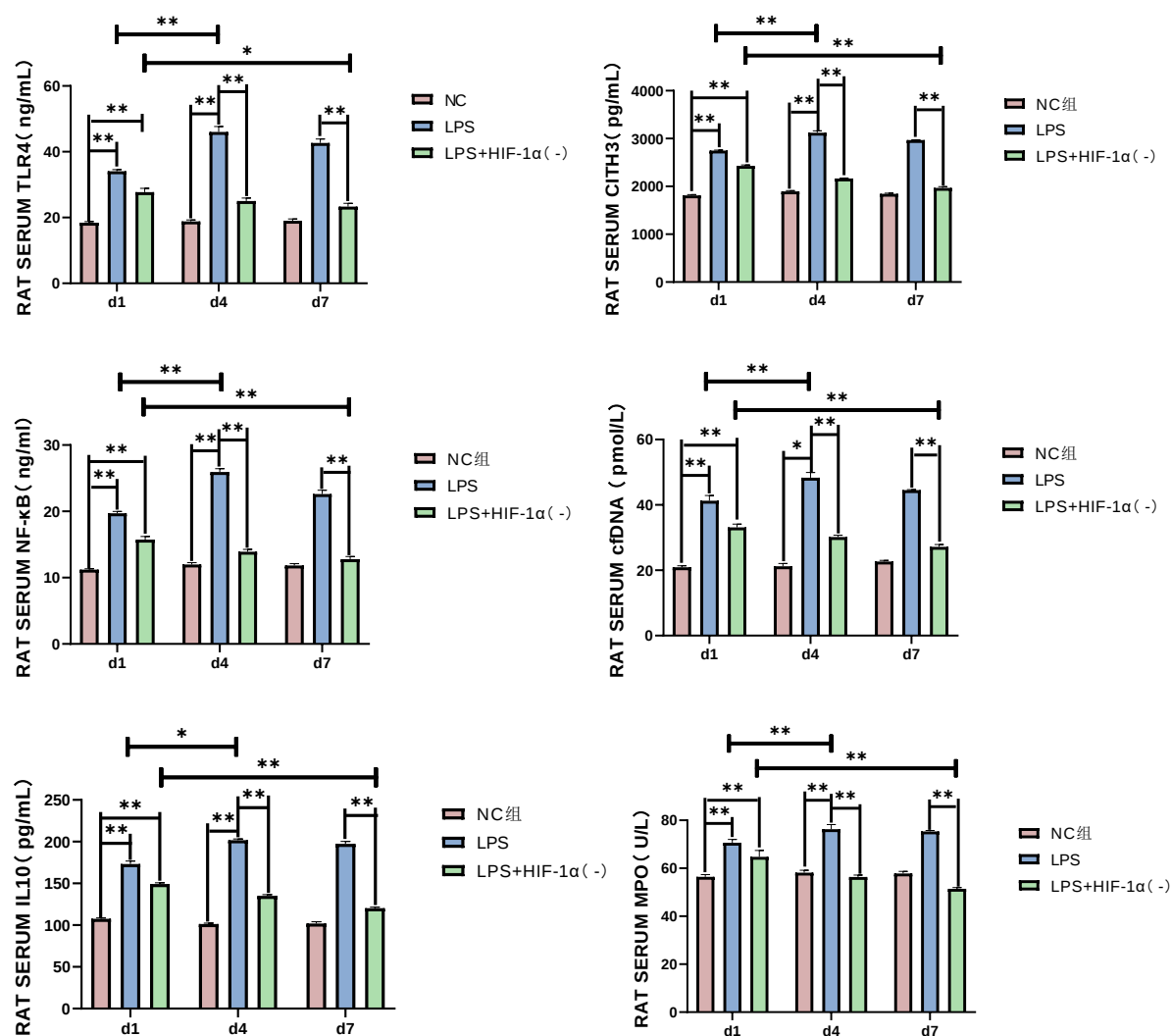
图 3. 各组大鼠 d1、d4、d7 对比肺组织 GLUT1、HK、PKM2、LDHA mRNA 含量

Table 2. Levels of TLR4, NF- κ B, IL-10, CitH3, cfDNA, and MPO in peripheral blood of rats from each experimental group at d1, d4, and d7 ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

表 2. 各组大鼠 d1、d4、d7 外周血 TLR4、NF- κ B、IL-10 和 CitH3、cfDNA、MPO 含量($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

因子	组别	d1	d4	d7
TLR4 (ng/ml)	NC 组	18.075 $\pm$ 0.73	18.86 $\pm$ 0.13	19.16 $\pm$ 0.44
	LPS 组	33.5 $\pm$ 0.13*	47.43 $\pm$ 0.64* Δ	41.06 $\pm$ 0.83
	LPS + HIF-1 α (-)组	26.2 $\pm$ 0.71*	24.20 $\pm$ 0.18 $\#$	21.71 $\pm$ 0.72* $\star$
NF- κ B (ng/ml)	NC 组	11.21 $\pm$ 0.13	11.99 $\pm$ 0.27	11.83 $\pm$ 0.27
	LPS 组	19.72 $\pm$ 0.27*	25.93 $\pm$ 0.50* Δ	22.62 $\pm$ 0.57
	LPS + HIF-1 α (-)组	15.73 $\pm$ 0.48*	13.90 $\pm$ 0.35 $\#$	12.79 $\pm$ 0.38* $\star$
IL-10 (pg/ml)	NC 组	107.04 $\pm$ 0.86	102.14 $\pm$ 2.23	103.42 $\pm$ 1.97
	LPS 组	174.44 $\pm$ 5.83*	203.26 $\pm$ 0.64* Δ	191.30 $\pm$ 3.96
	LPS + HIF-1 α (-)组	147.07 $\pm$ 0.76*	134.56 $\pm$ 1.29 $\#$	121.06 $\pm$ 0.86* $\star$
CitH3 (pg/ml)	NC 组	1810.98 $\pm$ 15.70	1893.87 $\pm$ 18.75	1846.29 $\pm$ 11.67
	LPS 组	2747.16 $\pm$ 12.12*	3120.7 $\pm$ 40.96* Δ	2967.59 $\pm$ 6.04
	LPS + HIF-1 α (-)组	2429.88 $\pm$ 19.41*	2163.73 $\pm$ 10.14 $\#$	1968.69 $\pm$ 26.24* $\star$
cfDNA (pmol/l)	NC 组	20.91 $\pm$ 0.46	22.70 $\pm$ 0.31	21.23 $\pm$ 0.85
	LPS 组	41.29 $\pm$ 1.60*	48.31 $\pm$ 1.62* Δ	44.50 $\pm$ 0.19
	LPS + HIF-1 α (-)组	33.10 $\pm$ 1.02*	30.18 $\pm$ 0.52 $\#$	27.19 $\pm$ 0.69* $\star$
MPO (U/l)	NC 组	56.44 $\pm$ 0.92	58.14 $\pm$ 1.03	57.86 $\pm$ 0.87
	LPS 组	70.64 $\pm$ 1.39*	76.31 $\pm$ 1.90* Δ	75.35 $\pm$ 0.41
	LPS + HIF-1 α (-)组	64.78 $\pm$ 2.65*	56.33 $\pm$ 0.84 $\#$	51.46 $\pm$ 0.51* $\star$

注: * $P < 0.05$ vs NC 组, $\#P < 0.05$ vs LPS 组, $\Delta P < 0.05$ 每组内大鼠 d4 vs d1, * $P < 0.05$ 每组内大鼠 d7 vs d1。



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Figure 4. Comparison of TLR4, NF- κ B, IL-10, CitH3, cfDNA, and MPO levels in peripheral blood across experimental groups of rats at d1, d4, and d7

图 4. 各组大鼠 d1、d4、d7 对比外周血 TLR4、NF- κ B、IL-10 和 CitH3、cfDNA、MPO 含量

4. 讨论

脓毒症是宿主被感染后机体的一种免疫失调反应, 尽管目前医学界已在积极探索其发生机制, 但因其复杂的病理生理学仍有许多问题尚未解决, 且由于其进展迅速, 短期可累及多脏器, 脓毒症的发病率及死亡率仍然很高[20]。脓毒症时, 多种信号通路参与其中, 包括 NF- κ B、MAPK/ERK, JAK/STAT 和 PI3K/Akt [21] [22]。TLR4 是一种跨膜识别受体, 能识别各种外源性病原体相关分子或毒素, 并与相应配体发生相互作用, NF- κ B 是 TLR4 信号通路下游的关键转录因子, 在调节免疫应答中起重要作用。既往研究表明, NETs 在介导脓毒症-ARDS 的发生发展中发挥关键作用[10]。本研究建立大鼠脓毒症模型, 采用肺组织 HE 染色及肺损伤评分验证造模成功, 通过 ELISA 法检测外周血炎症通路及 NETs 水平, 发现 LPS 组 d1、d4 较 NC 组同时期相比含量均升高(均 $P < 0.01$), 且 LPS 组 d4 较 LPS 组 d1 含量均升高(均 $P < 0.05$), 提示脓毒症时, 炎症与 NETs 的高表达。

HIF-1 α 是一种异二聚体转录因子, 可调节细胞对缺氧的适应性反应[12]。目前已知的 HIF-1 α 可调节的下游靶基因超过 100 个, 作用包括血管舒缩的控制、血管再生、红细胞生成、铁代谢、细胞分化、细胞死亡、能量代谢、转录及凋亡等其他[13]。中性粒细胞具有高度代谢活性, 脓毒症时, 中性粒细胞凋亡受到抑制, 糖酵解通量增加以维持其各种活动, 包括为中性粒细胞提供持续生成、释放 NETs 的 ATP。为验证抑制 Hif-1 α 是否可以通过抑制糖酵解抑制 NETs 生成并减轻脓毒症-ARDS 炎症反应, 研究选取青蒿琥酯进行干预, 结果发现, 大鼠肺组织 HIF-1 α 、GLUT1、HK、PKM2、LDHA mRNA 的表达: LPS + HIF-1 α (-)组 d1 较 NC 组同时期相比表达升高(均 $P < 0.01$), LPS + HIF-1 α (-)组 d7 较 LPS + HIF-1 α (-)组 d1 相比表达降低(均 $P < 0.01$), LPS + HIF-1 α (-)组 d4、d7 较 LPS 组同时期相比表达降低(均 $P < 0.05$), 差异有统计学意义。以上结果表明通过抑制 HIF-1 α 可以抑制 GLUT1 和糖酵解中的几种重要酶的表达。大鼠外周血中 TLR4、NF- κ B、IL-10 及 CitH3、cfDNA、MPO 含量: LPS + HIF-1 α (-)组较 LPS 组同时期均下降(均 $P < 0.01$), 差异有统计学意义。大鼠肺组织 HE 染色 LPS + HIF-1 α (-)组肺泡腔局灶挤压变形, 部分肺泡腔闭塞, 未见明确肺实变, 肺泡间隔及肺泡腔内可见少许炎细胞浸润, 局灶可见出血, 损伤程度较 LPS 组同时期减轻, 且时间越长, 减轻程度越明显。以上结果表明抑制 HIF-1 α 后, 糖酵解水平降低、NETs 水平下降, 肺炎性浸润、肺损伤程度减轻。

综上所述, 我们认为, HIF-1 α 可以通过调节糖酵解水平改变 NETs 含量、并通过调控与 NF- κ B 通路的串扰作用影响脓毒症的发展, 抑制 HIF-1 α 可以调节糖酵解途径中各种酶的水平, 减少中性粒细胞胞外陷阱表达所需的 ATP, 从而减少 NETs 水平, 最终缓解了炎症反应并减轻脓毒症所致的 ARDS, 为脓毒症及脓毒症肺损伤提供新的治疗方向。

参考文献

- [1] Piva, S., Berton, M., Gitti, N., Rasulo, F.A. and Latronico, N. (2023) Neurological Complications of Sepsis. *Current Opinion in Critical Care*, **29**, 75-84. <https://doi.org/10.1097/mcc.0000000000001022>
- [2] Srzić, I. (2022) Sepsis Definition: What's New in the Treatment Guidelines. *Acta clinica croatica*, **61**, 67-72. <https://doi.org/10.20471/acc.2022.61.s1.11>
- [3] Caraballo, C. and Jaimes, F. (2019) Organ Dysfunction in Sepsis: An Ominous Trajectory from Infection to Death. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, **92**, 629-640.
- [4] Zhu, C., Wang, Y., Liu, Q., Li, H., Yu, C., Li, P., et al. (2022) Dysregulation of Neutrophil Death in Sepsis. *Frontiers in Immunology*, **13**, Article 963955. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.963955>
- [5] Matthay, M.A., Zemans, R.L., Zimmerman, G.A., Arabi, Y.M., Beitler, J.R., Mercat, A., et al. (2019) Acute Respiratory Distress Syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*, **5**, Article No. 18. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0069-0>
- [6] Wang, Y., Zhu, C., Li, P., Liu, Q., Li, H., Yu, C., et al. (2023) The Role of G Protein-Coupled Receptor in Neutrophil Dysfunction during Sepsis-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. *Frontiers in Immunology*, **14**, Article 1112196. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1112196>
- [7] Hidalgo, A., Libby, P., Soehnlein, O., Aramburu, I.V., Papayannopoulos, V. and Silvestre-Roig, C. (2021) Neutrophil Extracellular Traps: From Physiology to Pathology. *Cardiovascular Research*, **118**, 2737-2753. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab329>
- [8] Wen, S.W., Shim, R., Hall, P., Bedo, J., Wilson, J.L., Nicholls, A.J., et al. (2022) Lung Imaging Reveals Stroke-Induced Impairment in Pulmonary Intravascular Neutrophil Function, a Response Exacerbated with Aging. *The Journal of Immunology*, **208**, 2019-2028. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100997>
- [9] Islam, M.M. and Takeyama, N. (2023) Role of Neutrophil Extracellular Traps in Health and Disease Pathophysiology: Recent Insights and Advances. *International Journal of Molecular Sciences*, **24**, Article 15805. <https://doi.org/10.3390/ijms242115805>
- [10] Fuchs, T.A., Brill, A. and Wagner, D.D. (2012) Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **32**, 1777-1783. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.111.242859>
- [11] Kuang, L., Wu, Y., Shu, J., Yang, J., Zhou, H. and Huang, X. (2024) Pyroptotic Macrophage-Derived Microvesicles Accelerate Formation of Neutrophil Extracellular Traps via GSDMD-N-Expressing Mitochondrial Transfer during Sepsis. *International Journal of Biological Sciences*, **20**, 733-750. <https://doi.org/10.7150/ijbs.87646>

-
- [12] Balamurugan, K. (2015) HIF-1 at the Crossroads of Hypoxia, Inflammation, and Cancer. *International Journal of Cancer*, **138**, 1058-1066. <https://doi.org/10.1002/ijc.29519>
- [13] Qiu, B., Yuan, P., Du, X., Jin, H., Du, J. and Huang, Y. (2023) Hypoxia Inducible Factor-1 α Is an Important Regulator of Macrophage Biology. *Heliyon*, **9**, e17167. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17167>
- [14] Bandarra, D., Biddlestone, J., Mudie, S., Muller, H.A. and Rocha, S. (2014) HIF-1 α Restricts NF- κ B Dependent Gene Expression to Control Innate Immunity Signals. *Disease Models & Mechanisms*, **8**, 169-181. <https://doi.org/10.1242/dmm.017285>
- [15] Shimoda, L.A., Fallon, M., Pisarcik, S., Wang, J. and Semenza, G.L. (2006) HIF-1 Regulates Hypoxic Induction of NHE1 Expression and Alkalinization of Intracellular Ph in Pulmonary Arterial Myocytes. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, **291**, L941-L949. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00528.2005>
- [16] Zhang, J., Shao, Y., Wu, J., Zhang, J., Xiong, X., Mao, J., *et al.* (2025) Dysregulation of Neutrophil in Sepsis: Recent Insights and Advances. *Cell Communication and Signaling*, **23**, Article No. 87. <https://doi.org/10.1186/s12964-025-02098-y>
- [17] Basheeruddin, M. and Qausain, S. (2024) Hypoxia-Inducible Factor 1- α (HIF-1 α): An Essential Regulator in Cellular Metabolic Control. *Cureus*, **16**, e63852. <https://doi.org/10.7759/cureus.63852>
- [18] Burczyk, G., Cichon, I. and Kolaczowska, E. (2022) Itaconate Suppresses Formation of Neutrophil Extracellular Traps (NETs): Involvement of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and Heme Oxygenase (HO-1). *Frontiers in Immunology*, **13**, Article 864638. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.864638>
- [19] Peyssonnaud, C., Cejudo-Martin, P., Doedens, A., Zinkernagel, A.S., Johnson, R.S. and Nizet, V. (2007) Cutting Edge: Essential Role of Hypoxia Inducible Factor-1 α in Development of Lipopolysaccharide-Induced Sepsis. *The Journal of Immunology*, **178**, 7516-7519. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7516>
- [20] Rudd, K.E., Johnson, S.C., Agesa, K.M., Shackelford, K.A., Tsoi, D., Kievlan, D.R., *et al.* (2020) Global, Regional, and National Sepsis Incidence and Mortality, 1990-2017: Analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*, **395**, 200-211. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(19)32989-7)
- [21] Sol, A., Skvirsky, Y., Blotnick, E., Bachrach, G. and Muhlrade, A. (2016) Actin and DNA Protect Histones from Degradation by Bacterial Proteases but Inhibit Their Antimicrobial Activity. *Frontiers in Microbiology*, **7**, Article 1248. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01248>
- [22] Wang, C., Wei, Z., Han, Z., Wang, J., Zhang, X., Wang, Y., *et al.* (2019) Neutrophil Extracellular Traps Promote Cadmium Chloride-Induced Lung Injury in Mice. *Environmental Pollution*, **254**, Article ID: 113021. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113021>