

引用本文: 宗文辉, 程琳, 史梦柔, 陈斌, 刘伟伟, 刘壮, 王晓辉, 欧来良. 载氨基酸血液净化吸附剂调控炎症风暴及改善脓毒症小鼠生存率的研究 [J]. 离子交换与吸附, 2025, 41(4): 269-278.

Citation: ZONG Wen-hui, CHENG Lin, SHI Meng-rou, CHEN Bin, LIU Wei-wei, LIU Zhuang, WANG Xiao-hui, OU Lai-liang. Study on the Regulation of Inflammatory Storm and Improvement of Survival Rate in Septic Mice Using Amino Acid Loaded Blood Purification Adsorbent [J]. Ion Exchange and Adsorption, 2025, 41(4): 269-278.

· 研究论文 ·

文章编号: 1001-5493(2025)04-0269-10

DOI: 10.16026/j.cnki.iea.2025040269

## 载氨基酸血液净化吸附剂调控炎症风暴及改善脓毒症小鼠生存率的研究\*

宗文辉<sup>1</sup>, 程琳<sup>1</sup>, 史梦柔<sup>1</sup>, 陈斌<sup>1</sup>, 刘伟伟<sup>1</sup>, 刘壮<sup>2</sup>, 王晓辉<sup>1\*</sup>, 欧来良<sup>2\*\*</sup>

(<sup>1</sup>天津市医药科学研究所, 天津 300020; <sup>2</sup>南开大学生命科学学院, 生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071)

**摘要:** 文章以氯甲基化聚苯乙烯-二乙烯苯微球为载体, 通过氯甲基与氨基的化学偶联反应制备了负载不同电荷的吸附材料 PS-Arg 和 PS-Glu; 考察了吸附材料的表面形貌、元素组成、比表面积、孔径分布、力学强度以及对模拟血清中炎症因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的吸附率及体外生物相容性; 以脓毒症小鼠为模型, 通过腹腔注入的方式考察吸附材料对脓毒症小鼠血液指标、体重、炎症因子、组织病理损伤及生存率的影响。结果表明: PS-Arg 和 PS-Glu 吸附剂对模拟血清中 TNF- $\alpha$  的吸附量分别为 (15.48 $\pm$ 0.34) ng/g 和 (13.95 $\pm$ 1.33) ng/g, 高于 PS 吸附剂的 (12.35 $\pm$ 2.71) ng/g; 对 IL-6 的吸附量分别为 (6.86 $\pm$ 0.02) ng/g 和 (6.91 $\pm$ 0.04) ng/g, 亦高于 PS 吸附剂的 (5.70 $\pm$ 0.18) ng/g。PS-Arg 和 PS-Glu 吸附剂的溶血率均 < 5%, 活化部分凝血活酶时间 (APTT)、凝血酶原时间 (PT) 与阴性对照相当, 对全血组分无显著影响。造模后于腹腔注入吸附材料有助于提高脓毒症小鼠的生存率, 其中 PS 组脓毒症小鼠的 21 d 生存率最高, 可达 80%, 远高于模型组的 40%。造模后 24 h 取材结果显示, PS、PS-Arg 和 PS-Glu 组的血清中 TNF- $\alpha$  的含量分别下降了 28.29%、45.6% 和 33.47%, IL-6 的含量分别下降了 16.66%、22.91% 和 18.83%; 肺脏、胰腺和脾脏病理损伤降低, 证实在脓毒症发病早期采用吸附材料进行干预可减轻过度炎症反应, 减少组织损伤并提高生存率。本研究为临床血液净化治疗脓毒症的时机和吸附材料选择等临床实践提供了基础性研究数据。

**关键词:** 脓毒症, 炎症风暴, 生存率, 吸附剂, 血液净化

**中图分类号:** R459.5 **文献标志码:** A

### 1 前言

脓毒症 (Sepsis) 是感染或感染因素导致的宿主免疫反应失调所引起的危及生命的器官功能障碍综合征, 是临床创伤/烧伤和感染患者的常见并发症, 其中, 严重脓毒症和脓毒症休克患者的死亡率高达 30%~40%<sup>[1-3]</sup>。脓毒症早期主要表现为细胞因子风暴引起的过度炎症反应, TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎症细胞因子的水平与机体的损

伤程度密切相关。因此, 有效清除血液循环中的炎性细胞因子, 对治疗脓毒症、预防多器官衰竭及降低患者死亡率具有重要意义<sup>[4-6]</sup>。

血液吸附通过选择性或非选择性结合清除体液中的毒素或有害分子, 是临床上治疗脓毒症、高脂血症和自身免疫性疾病等的重要方法<sup>[7-9]</sup>。目前, 商品化的用于细胞因子清除的灌流器主要包括美国的 CytoSorb® 和珠海健帆的

\* 收稿日期: 2025-02-10

基金项目: 天津市应用基础研究多元投入基金面上项目 (项目号 21JCYBJC01680); 天津市卫健委科技项目面上项目 (项目号 TJWJ2022MS049)。

作者简介: 宗文辉 (1985—), 助理研究员。

\*\*通信作者: 王晓辉, E-mail: wangtxh@126.com; 欧来良, E-mail: ouyll@nankai.edu.cn.

HA330树脂血液灌流器,均采用中性多孔聚合物材料<sup>[10-14]</sup>。近年来研究发现,多数促炎因子是带负电荷的蛋白质,分子量<30 kDa,而炎症抑制因子多带正电荷<sup>[15-17]</sup>。基于此,本研究制备了带正电荷的PS-Arg和带负电荷的PS-Glu吸附材料,通过腹腔注入法考察不同电荷吸附材料对脓毒症小鼠血液学参数、炎症因子水平、组织脏器病理变化及生存率的影响,以期通过早期干预降低炎症细胞因子含量,减轻过度炎症反应,提高脓毒症小鼠的存活率,并为血液净化治疗脓毒症的时机、吸附材料选择等临床实践提供基础性研究数据。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器和试剂

仪器:扫描电子显微镜(蔡司,型号MERLIN compact);X射线光电子能谱分析仪(Thermo SCIENTIFIC, K-ALPHA);全自动血细胞分析仪(日本光电工业株式会社,MEK-7222K);低速离心机(北京京立离心机有限公司,LD5-2B);高压蒸汽灭菌锅(ALP, CL-32L);红外分光光度计(安捷伦, CARY 630);酶标仪(瑞士TECAN公司, M200);全自动组织脱水机(ASP200S);石蜡包埋机(Leica EG1150H);石蜡切片机(Leica RM2255);全自动倒置荧光显微镜(蔡司, Axio Observer7);气麻机(深圳瑞沃德生命科技有限公司, R500IP);恒温空气摇床(上海精宏实验设备有限公司, HZP-150)。

试剂:精氨酸,谷氨酸(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),二甲基亚砜DMSO, NaOH,均为分析纯;PS微球、PS-Cl球(20~40目,平均氯含量为1.292 mmol/g,由南开大学欧来良课题组提供,批号20230912);生理盐水(大冢制药有限公司);TNF- $\alpha$ 和IL-6细胞因子冻干粉(R&D);小鼠ELISA试剂盒(Thermo Fisher Scientific; TNF- $\alpha$ : 88-7324-22, IL-6: 88-7064-22),凝血酶原时间(PT)测定试剂盒,活化部分凝血活酶时间(APTT)试剂盒,均购自上海太阳生物技术有限公司。

动物:日本大耳白兔(2.7 $\pm$ 0.3) kg,购自北京隆安实验动物养殖中心;SPF级KM小鼠(26 $\pm$ 2) g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司。饲养条件:正常饲料喂养,自由进食饲料和水,

室内通风良好,昼夜周期12 h,相对湿度(50 $\pm$ 10)%,室温(22 $\pm$ 3) °C。实验前适应性喂养1周。伦理审批:本动物实验经天津市医药科学研究所动物伦理委员会批准(编号IMPS-EAEP-Z-21JCYBJC01680-01)。

### 2.2 负载不同氨基酸的吸附材料的制备

PS-Cl载体使用前必须通过无水乙醇多次淋洗,直至洗脱液无色透明,再使用纯化水多次淋洗至无乙醇残留。反应前抽滤去除载体表面游离水,称取5 g湿态PS-Cl于25 mL DMSO中,并放置在40 °C摇床中溶胀30 min。加入6 mL精氨酸/谷氨酸的NaOH水溶液,其中氨基酸含量为12 mmol/L。将反应体系的温度缓慢升至70 °C,以60 r/min的转速振荡反应24 h<sup>[18]</sup>。反应结束后,用纯化水抽滤并清洗多次,除去未反应的氨基酸,获得偶联氨基酸的PS-Arg和PS-Glu吸附剂。将吸附剂储存在纯化水中,4 °C下备用。

### 2.3 理化性能表征

#### 2.3.1 扫描电子显微镜表征

分别取干态的PS、PS-Arg和PS-Glu吸附剂于烧杯中,在40 °C烘箱中干燥72 h,确保吸附剂中的水分被充分去除。采用扫描电子显微镜观察PS、PS-Arg和PS-Glu吸附剂的表面形貌和微观孔结构。

#### 2.3.2 XPS元素分析

将干燥后的PS、PS-Arg和PS-Glu吸附剂放入玛瑙研钵中,研磨成均匀的粉末。采用X射线光电子能谱分析仪进行测试,检测吸附剂中各元素的种类和相对含量。

#### 2.3.3 孔径分布和比表面积

取干态吸附剂,通过低温氮气吸附法(BELSORP-mini II)测试PS、PS-Arg和PS-Glu的氮气吸附-脱附等温线;利用Brunner-Emmet-Teller (BET)模型计算样品的比表面积;利用Barrett-Joyner-Halen (BJH)模型计算样品的孔径分布。

#### 2.3.4 力学性能

参照相关文献通过破碎率对吸附剂的力学强度进行测定<sup>[19]</sup>。称取5 g吸附剂(20~40目,质量记为 $m_1$ )置于锥形瓶中,依次加入相同质量和目数的玻璃珠( $m_2$ )、50 mL蒸馏水,随后密封。室温下250 r/min振荡2 h,烘干后用40目标准筛

去除破损微球, 将剩余吸附剂和玻璃珠称重得到  $m_3$ , 根据式 (1) 计算破损率。

$$B = (m_1 + m_2 - m_3) / m_1 \times 100\% \quad (1)$$

## 2.4 体外吸附实验

将一定量的 PS、PS-Arg 和 PS-Glu 置于 2 mL 离心管中, 分别加入 1 mL 富含细胞因子 TNF- $\alpha$  或 IL-6 的模拟血清。将吸附体系置于转速为 60 r/min、温度为 37 °C 的摇床中振荡吸附 2 h。使用 ELISA 试剂盒对吸附体系中的细胞因子浓度进行检测, 按照式 (2) 和式 (3) 分别计算吸附率 (%) 和吸附量 (pg/g)。

$$AR = \frac{C_A - C_B}{C_A} \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $AR$  为吸附剂对细胞因子的吸附率, %;  $C_A$  和  $C_B$  分别为吸附前后模拟血清中细胞因子的浓度, pg/mL。

$$AM = \frac{(C_A - C_B) \times V}{W} \quad (3)$$

式中:  $AM$  为吸附剂对细胞因子的吸附量, pg/g;  $C_A$  和  $C_B$  分别为吸附前后细胞因子的浓度, pg/mL;  $V$  为吸附体系中模拟血清的体积, mL;  $W$  为吸附剂的质量, g。

## 2.5 生物相容性

### 2.5.1 溶血实验

通过测定红细胞悬液中的血红蛋白含量来评价与之接触的吸附剂的溶血性能。将日本大耳白兔固定在手术台上, 在其耳缘静脉处采血并置于 EDTA-K<sub>2</sub> 真空采血管中, 将血液和抗凝剂轻轻混匀。按照抗凝血与生理盐水 4 : 5 的比例配制稀释血液。①阴性对照组 A: 在离心管中加入 5 mL 生理盐水; ②阳性对照组 B: 在离心管中加入 5 mL 去离子水; ③实验组 C: 在离心管中加入 5 mL 生理盐水和 2 g 吸附剂。接着, 分别向 3 组离心管中加入 100  $\mu$ L 上述配制好的稀释血液, 于 37 °C 水浴锅中孵育 1 h (每 15 min 轻轻混匀一次), 最后取出 3~4 mL 上清液, 在 2500 r/min 下离心 5 min, 使用酶标仪测定上清液在 545 nm 处的吸光度。按照式 (4) 计算吸附剂的溶血率:

$$HR = \frac{OD_C - OD_A}{OD_B - OD_A} \times 100\% \quad (4)$$

式中:  $HR$  为吸附剂的溶血率, %;  $OD_A$ 、 $OD_B$  和  $OD_C$  分别为阴性对照组、阳性对照组和

实验组的  $OD$  值。

### 2.5.2 凝血实验

通过测定新鲜血浆的凝血指标来评价与之接触的吸附剂的凝血性能。心脏采血后将血液和枸橼酸钠抗凝剂以体积比为 9 : 1 的比例轻轻混合均匀, 于 3000 r/min 下离心 10 min 后吸取上清液即为新鲜血浆。

称取湿态 PS、PS-Arg 和 PS-Glu 吸附剂各 100 mg 于 5 mL 离心管中, 加入 2 mL 新鲜血浆, 于温度为 37 °C、转速为 60 r/min 的摇床中振荡 15 min。取出上清液, 使用全自动血凝分析仪检测血浆上清液的 APTT 和 PT 值。

### 2.5.3 与全血相互作用的实验

将吸附剂与全血直接接触, 以考察吸附剂对全血中血细胞成分的影响。实验前将吸附剂置于生理盐水中孵育过夜。抽干表面水后, 称取 PS、PS-Arg 和 PS-Glu 吸附剂各 200 mg 于 5 mL 离心管中, 加入 2 mL EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝的新鲜全血, 于 60 r/min、37 °C 的摇床中振荡 1 h。分离全血, 使用全自动血细胞分析仪检测全血中红细胞、白细胞、血小板以及血红蛋白的数目。

## 2.6 腹腔注入吸附材料对脓毒症小鼠的干预治疗实验

(1) 采用盲肠结扎穿刺 CLP 法<sup>[15,20-22]</sup>构建脓毒症小鼠模型: 术前禁食不禁水, 全身麻醉后沿腹正中线切开皮肤大约 1 cm, 钝性分离肌肉层, 进入腹腔后识别盲肠并将其拉出; 在离盲肠末端 1.3 cm 处结扎, 距结扎处和盲肠末端 0.5 cm 处各穿刺一孔, 于穿刺孔处挤出少量内容物后将盲肠放回腹腔, 逐层关腹, 缝合切口。腹腔注入材料组于关腹前注入 50 mg 无菌湿态吸附材料, 手术结束后回笼饲养, 实时监测其生命体征, 保证食物、水供应充足。假手术组仅于开腹后识别盲肠, 放回腹腔后逐层缝合。

(2) 将 CLP 法造模获得的脓毒症小鼠随机分为模型组、PS 组、PS-Arg 组和 PS-Glu 组, 每组 10 只; 分别于术前 0 d, 术后 1、2、4、7、14 和 21 d 监测体重, 血液参数和死亡情况。(3) 将 CLP 法造模获得的脓毒症小鼠随机分为假手术组、模型组、PS 组、PS-Arg 组和 PS-Glu 组, 每组 10 只; 造模 24 h 后采集血清和主要脏器, 通过 Elisa 试剂盒检测炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6, 并通过 HE 染色检测脏器病理变化。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 负载不同电荷氨基酸的PS基吸附剂的制备

PS载体上的氯甲基与精氨酸/谷氨酸的氨基发生偶联反应得到PS-Arg和PS-Glu吸附剂,制备流程和材料结构如图1(A)~(C)所示;所用PS载体为20~40目,如图1(D)所示。制备得到的

PS-Arg和PS-Glu吸附剂如图1(E)所示,其中PS-Arg为微黄色。

#### 3.2 理化性能表征

由图2(A)~(C)可知,吸附材料是尺寸为400~600  $\mu\text{m}$ 的微球,大小较均匀;由图2(D)~(F)可知,PS、PS-Arg和PS-Glu微球表面分布着均匀的纳米级孔径结构。

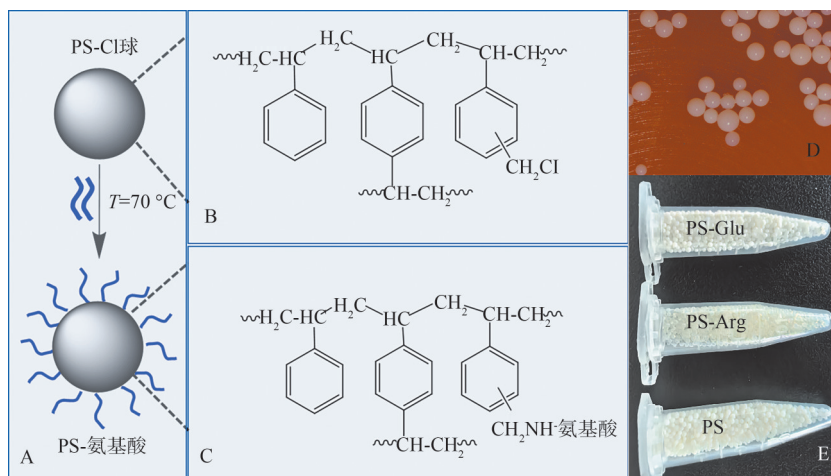


图1 (A)PS-Arg和PS-Glu的制备流程图;(B)~(C)分子结构图;(D)PS-Cl体视显微镜图;(E)PS-Arg和PS-Glu吸附剂实物图。

Figure 1(A) Preparation process diagram of PS-Arg and PS-Glu; (B)~(C) Molecular structure; (D) PS-Cl stereomicroscope image; (E) PS-Arg and PS-Glu adsorbent.

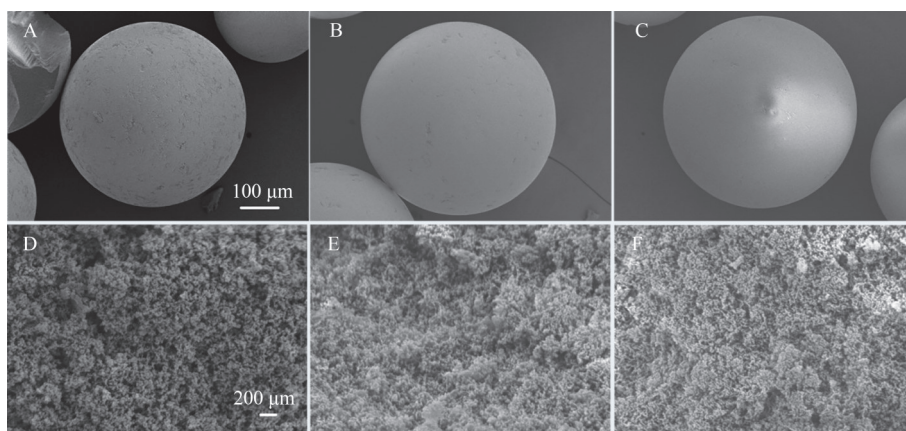


图2 SEM表征:(A)、(D)为PS微球;(B)、(E)为PS-Arg微球;(C)、(F)为PS-Glu微球(其中(A)(B)(C)的比例尺为100  $\mu\text{m}$ , (D)(E)(F)的比例尺为200 nm)。

Figure 2 SEM characterization: (A), (D) PS microsphere; (B), (E) PS-Arg microsphere; (C), (F) PS-Glu microsphere (The scale of (A)(B)(C) is 100  $\mu\text{m}$ , and the scale of (D)(E)(F) is 200 nm).

由图3可知,PS-Cl的Cl 2p峰明显可见,偶联氨基酸的PS-Arg和PS-Glu的Cl 2p峰显著减弱。根据不同吸附材料相对元素含量的分析结果(表1),PS-Cl不含N元素,而PS-Arg和PS-Glu的N元素含量分别为0.69%和0.8%,其中N元素来源于氨基酸,表明Arg和Glu的氨基与氯

甲基反应后成功偶联到了载体上;PS-Arg和PS-Glu的Cl元素含量分别为0.47%和0.46%,均小于PS-Cl的Cl元素含量(0.8%)。

采用氮气吸附-脱附法分析吸附材料的比表面积和孔径大小分布。如图4所示,3种材料的氮气吸附-脱附曲线具有明显的迟滞环,属于典

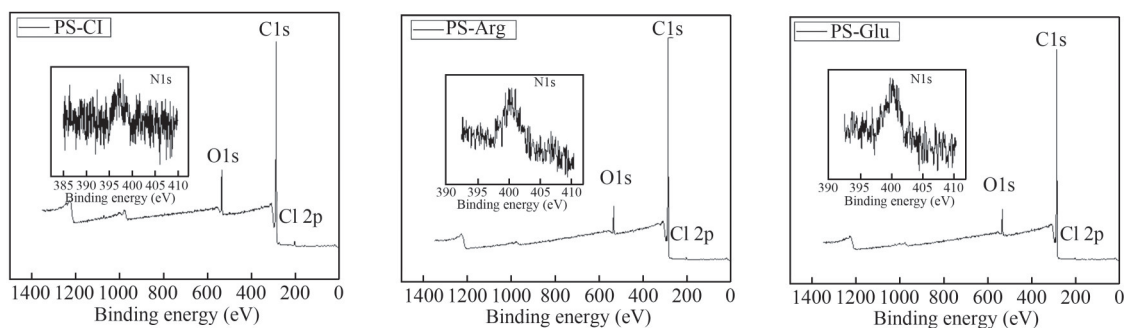


图3 XPS谱图.

Figure 3 XPS spectrum.

表1 不同吸附材料的相对元素含量.

Table 1 Relative elemental content of different adsorbent materials.

吸附材料	C (%)	O (%)	N (%)	Cl (%)
PS-Cl	90.6	8.6	0	0.8
PS-Arg	93.45	5.4	0.69	0.47
PS-Glu	93.31	5.44	0.8	0.46

型的IV型曲线。由表2可知, PS-Arg和PS-Glu吸附剂的平均孔径分别为5.1258 nm和4.2874 nm, 略小于PS的平均孔径6.1782 nm, 这可能是因为氯甲基化和氨基酸偶联占据了部分孔径。总体来说, 3种吸附材料均具有较大的比表面积和发达的介孔结构。

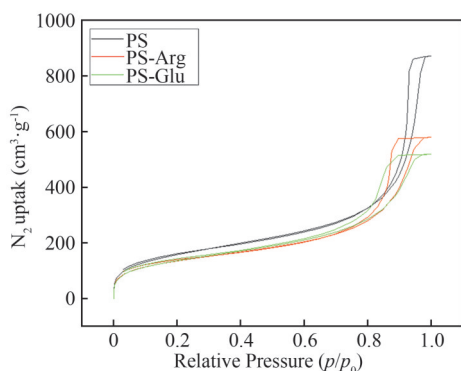
图4 材料的N<sub>2</sub>吸附/脱附曲线.Figure 4 N<sub>2</sub> adsorption/desorption curve.

表2 吸附剂的物理参数.

Table 2 The physical parameters of the adsorbents.

吸附剂	$S_{\text{BET}}$ (m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> )	$T_p$ (cm <sup>3</sup> ·g <sup>-1</sup> )	$D_p$ (nm)
PS	585.1	1.3474	6.1782
PS-Arg	500.06	0.8965	5.1258
PS-Glu	501.45	0.8028	4.2874

注:  $S_{\text{BET}}$ 为BET比表面积;  $T_p$ 为总孔容;  $D_p$ 为平均孔径。

通过破碎率来考察吸附材料的力学强度。由表3可知, 经氯甲基化和氨基酸化学偶联, PS-Arg和PS-Glu吸附剂的破碎率分别为(0.80±0.02)%和(0.81±0.04)%, 略大于PS微球的(0.55±0.03)%, 这可能是多步反应导致其力学强度略微下降。3组吸附材料均具有较高的力学强度<sup>[19]</sup>。

表3 不同吸附剂的破碎率.

Table 3 The fragmentation rate of different adsorbents.

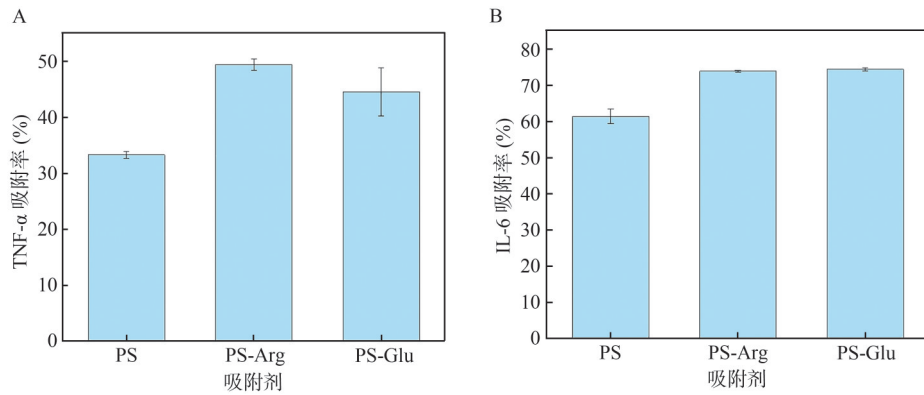
吸附剂	破碎率 (%)
PS	0.55±0.03
PS-Arg	0.80±0.02
PS-Glu	0.81±0.04

### 3.3 体外吸附实验

由图5可知, 相比于PS吸附剂, 负载氨基酸后的PS-Arg和PS-Glu吸附剂对模拟血清中TNF- $\alpha$ 的吸附率从(33.29±0.63)%提高到了(49.41±1.07)%和(44.53±4.25)%, 吸附量从(12.35±2.71) ng/g分别增长至(15.48±0.34) ng/g和(13.95±1.33) ng/g; 对IL-6的吸附率从(61.34±2.01)%分别增长到(73.87±0.21)%和(74.37±0.40)%, 吸附量从(5.70±0.18) ng/g分别增长至(6.86±0.02) ng/g和(6.91±0.04) ng/g。

### 3.4 血液相容性

在溶血试验中, 阴性对照组与阳性对照组的OD值分别为0.004±0.0005与0.871±0.001, 符合标准《YY/T 1651.1—2019医疗器械溶血试验第1部分: 材料介导的溶血试验》中溶血测试<sup>[23]</sup>的要求。如图6(A)所示, PS、PS-Arg和PS-Glu吸附剂的溶血率分别为(0.19±0.06)%、(0.35±0.00)%和(0.31±0.07)%, 均低于标准规定的5%, 表明固载精氨酸和谷氨酸不会增加溶血风险,

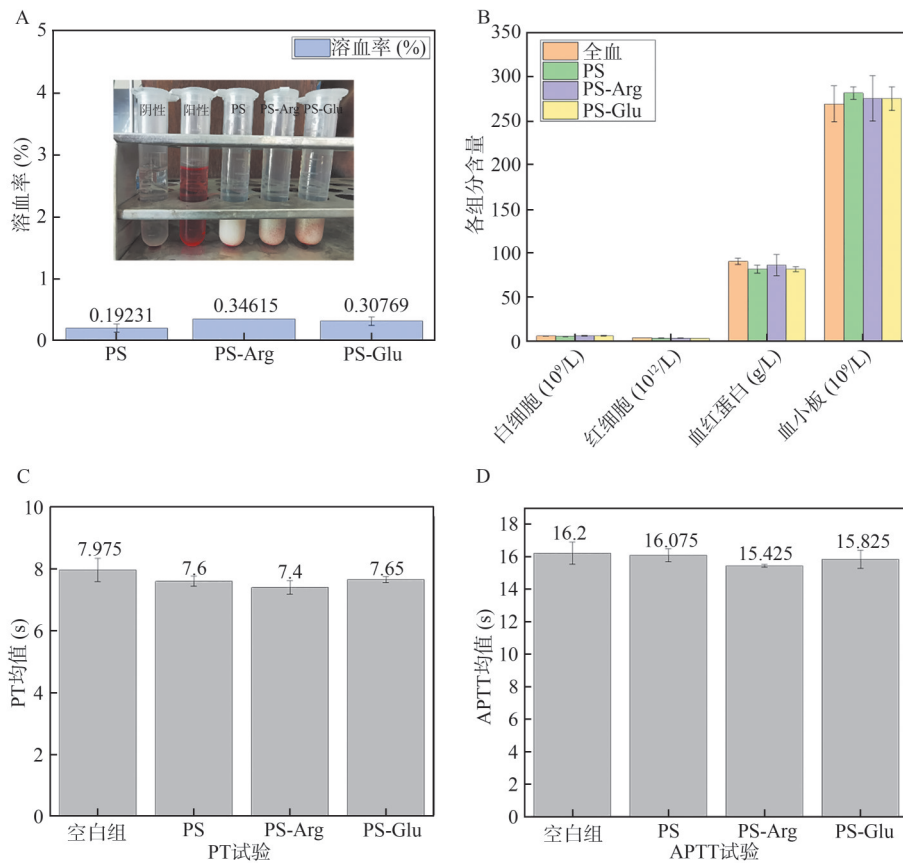


**图5** 体外吸附性能 (TNF-α浓度为939.97 pg/mL, IL-6浓度为929.18 pg/mL, BSA浓度为30 g/L).  
**Figure 5** Adsorption performance in vitro (TNF-α:939.97 pg/mL, IL-6: 929.18 pg/mL, BSA:30 g/L).

吸附材料的溶血性符合生物医用材料的临床应用标准。

如图6(B)所示, 3种吸附材料与血液直接接触后, 红细胞、白细胞、血小板和血红蛋白等

血液成分基本无变化, 说明负载氨基酸的吸附材料对红细胞、白细胞、血小板和血红蛋白等重要血液成分无显著影响, 具有良好的血液相容性。



**图6** 生物相容性表征:(A)溶血率; (B)吸附剂对全血组分的影响; (C) PT 试验; (D) APTT 试验.

**Figure 6** Biocompatibility: (A) Hemolysis rate; (B) Effect of adsorbent on whole blood components; (C) PT test; (D) APTT test.

如图6(C)所示, 与PS、PS-Arg和PS-Glu吸附剂直接接触后, 样品组的PT值与空白对照血浆相比无明显变化; 样品组的APTT值与空白对

照血浆相比变化均在3 s内。这表明PS、PS-Arg和PS-Glu吸附剂对新鲜血浆的凝血指标APTT和PT值均无明显影响, 负载不同电荷氨基酸的

吸附剂具有良好的抗凝血性能。

### 3.5 脓毒症小鼠干预实验

#### 3.5.1 血液学参数、体重和生存率变化

如图7所示, 造模后各组小鼠白细胞数量明显升高, 术后4 d达到峰值 ( $19.30 \times 10^9/L \sim 24.86 \times 10^9/L$ )。这可能是造模后部分盲肠内容物(包括肠道菌群)进入腹腔, 诱发炎症反应导致白细胞增加, 术后4~21 d会逐渐恢复。血小板数量在

术后2 d内明显下降, 术后2~10 d逐渐回升, 至术后21 d时仍高于术前水平, 血小板升高可能与术后血液高凝状态有关。红细胞与血红蛋白变化情况相似, 术后2 d内下降, 术后10 d逐渐回升至术前水平。材料组与模型组小鼠血液成分的变化规律相近, 表明腹腔注入吸附材料虽能改善小鼠生存率, 但无法完全逆转脓毒症病程中的血液学变化。

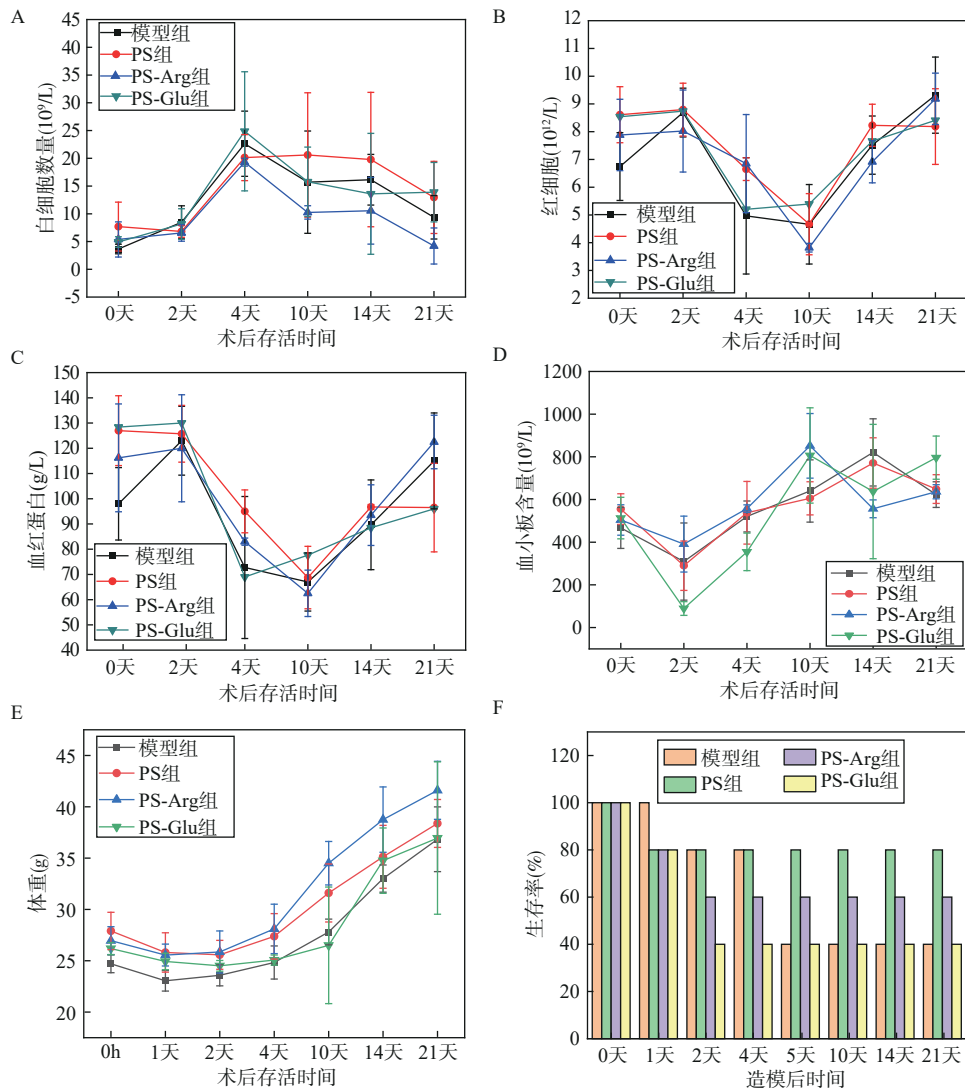


图7 脓毒症小鼠血液学参数、体重变化趋势和生存率。

Figure 7 Hematological parameters, weight change and survival rate of septic mice.

实验结果显示, 模型组的生存率为40%, 在造模后5 d内先后死亡, 病程更长。吸附材料腹腔注入组的小鼠死亡均发生在造模后2 d内, 其中电中性PS组小鼠的21 d生存率最高为80%, PS-Glu和PS-Arg组的小鼠生存率分别为40%和60%。这可能是由于不同吸附材料对机

体多种免疫反应和炎症反应的干预程度存在差异。另外, 脓毒症小鼠的21 d生存率还与个体基因型、易感性、病原菌特征和免疫状态等因素有关<sup>[15,16]</sup>。

#### 3.5.2 炎症细胞因子变化

脓毒症小鼠造模24 h后取血清检测炎症细胞

因子。如图8所示,通过CLP法造模后,模型组小鼠血清中的TNF- $\alpha$ 和IL-6含量明显增加。假手术组小鼠血清中的TNF- $\alpha$ 和IL-6的含量分别为(40.58 $\pm$ 16.58) pg/mL和(6.43 $\pm$ 2.94) pg/mL;模型组小鼠血清中2种炎症细胞因子的含量分别增至(102.59 $\pm$ 38.05) pg/mL和(468.83 $\pm$ 32.47) pg/mL。另外,如图9所示,模型组小鼠肺脏、脾脏和胰

腺病理损伤明显,表明造模成功<sup>[20,21]</sup>。

腹腔注入吸附材料后小鼠血清中的炎症细胞因子有不同幅度的下降,其中PS、PS-Arg和PS-Glu组小鼠血清中的TNF- $\alpha$ 分别下降了28.29%、45.6%和33.47%,IL-6的含量分别下降了16.66%、22.91%和18.83%,这说明腹腔注入吸附材料可一定程度降低炎症细胞因子的含量。

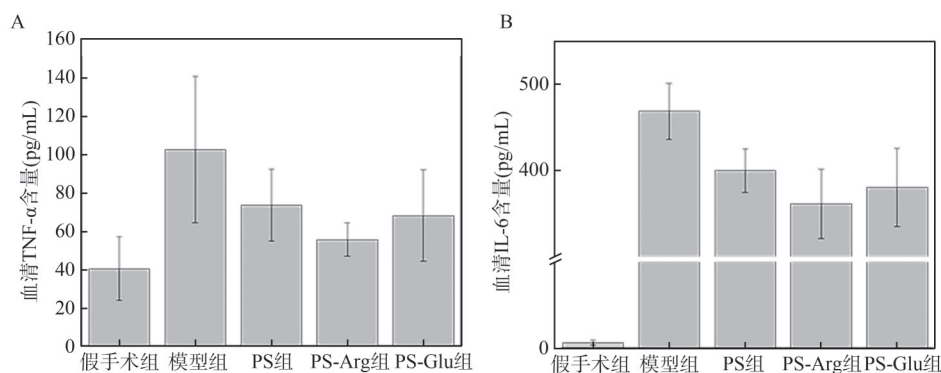


图8 脓毒症小鼠血清主要炎症细胞因子TNF- $\alpha$ 和IL-6的变化趋势。

Figure 8 Changes of major inflammatory cytokine TNF -  $\alpha$  and IL-6 in the serum of septic mice.

### 3.5.3 组织病理学

由图9可知,假手术组各脏器未见异常,模型组可见肺局部出血,少量炎细胞浸润;胰腺水肿,炎细胞浸润,少量出血,局部坏死;脾脏被膜外坏死,炎细胞浸润,实质局部坏死。肺脏、胰腺和脾脏病理损伤明显,表明造模成功。造模后腹腔注入吸附材料可不同程度地减轻肺部、胰

腺和脾脏的组织损伤。其中PS-Arg和PS组脓毒症小鼠肺脏无异常,病理损伤明显减轻;PS-Arg组脓毒症小鼠的胰腺和脾脏病理损伤最小。

从实验结果总体来看,脓毒症发病早期于腹腔注入吸附材料可减少炎症细胞因子含量,减轻病理损伤。这可能是因为腹腔注入吸附材料阻碍了盲肠结扎穿刺造成的脓毒症病程进展,进而降低了肺脏、脾脏和胰腺病理损伤,提高了脓毒症小鼠生存率。

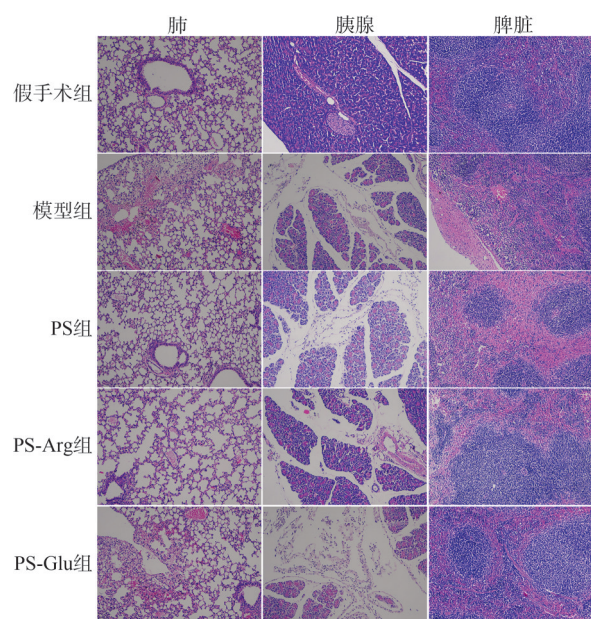


图9 组织病理图。

Figure 9 Histopathological images.

## 4 结论

(1) 以氯甲基化PS微球为载体,通过氯甲基化与氨基化学偶联制备分别带有正负电荷的PS-Arg吸附剂和PS-Glu吸附剂;吸附剂为粒径均匀的微球,表面介孔丰富;N元素相对含量分别为0.69%和0.8%。偶联氨基酸后,2种吸附材料对模拟血清中TNF- $\alpha$ 的吸附量从(12.35 $\pm$ 2.71) ng/g分别增长至(15.48 $\pm$ 0.34) ng/g和(13.95 $\pm$ 1.33) ng/g,对IL-6的吸附量从(5.70 $\pm$ 0.18) ng/g分别增长至(6.86 $\pm$ 0.02) ng/g和(6.91 $\pm$ 0.04) ng/g,血液相容性良好。

(2) 与模型组相比,腹腔注入吸附材料组能降低脓毒症小鼠血清中炎症细胞因子的含量,减轻肺脏、脾脏和胰腺的组织病理损伤,PS组

脓毒症小鼠的21 d生存率提高至80%, 远高于模型组的40%。因此, 通过腹腔注入吸附材料来早期干预脓毒症小鼠, 可降低过度炎症风暴, 改善组织损伤, 提高生存率。

### 参考文献

- 1 Cecconi M, Evans L, Levy M, et al. Sepsis and septic shock[J]. *Lancet*, **2018**, 392(10141): 75-87.
- 2 Pandey S. Sepsis, management & advances in metabolomics[J]. *Nanotheranostics*, **2024**, 8(3): 270-284.
- 3 Martin-Loeches I, Singer M, Leone M. Sepsis: Key insights, future directions, and immediate goals. A review and expert opinion[J]. *Intensive care medicine*, **2024**, 50(12), 2043-2049.
- 4 Brandenburg K, Ferrer-Espada R, Martinez-de-Tejada G, et al. A comparison between SARS-CoV-2 and gram-negative bacteria-induced hyperinflammation and sepsis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, **2023**, 24(20): 15169.
- 5 Chen L, Huang Q, Zhao T, et al. Nanotherapies for sepsis by regulating inflammatory signals and reactive oxygen and nitrogen species: New insight for treating COVID-19[J]. *Redox Biology*, **2021**, 45: 102046.
- 6 Fisher C J, Agosti J M, Opal M, et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein[J]. *New England Journal of Medicine*, **1996**, 334(26): 1697-1702.
- 7 Guo C, Yu Y, Jiang X, et al. Photorenewable azobenzene polymer brush-modified nanoadsorbent for selective adsorption of LDL in serum[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **2022**, 14(30): 34388-34399.
- 8 Wang J, Cheng C, Sun S, et al. Metal-organic framework-based adsorbents for blood purification: Progress, challenges, and prospects[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, **2024**, 12(15): 3594-3613.
- 9 Yu Y, Ou L. The development of immunosorbents for the treatment of systemic lupus erythematosus via hemoperfusion[J]. *Frontiers in Medicine*, **2023**: 9.
- 10 Cotoia A, Parisano V, Mariotti P S, et al. Kinetics of different blood biomarkers during polymyxin-B extracorporeal hemoperfusion in abdominal sepsis[J]. *Blood Purification*, **2024**, 53(7): 574-582.
- 11 Graf H, Gräfe C, Bruegel M, et al. Extracorporeal elimination of pro- and anti-inflammatory modulators by the cytokine adsorber cytoSorb® in patients with hyperinflammation: A prospective study[J]. *Infectious Diseases and Therapy*, **2024**, 13(9): 2089-2101.
- 12 Lacquaniti A, Smeriglio A, Campo S, et al. In vitro simulated hemoperfusion on seraph®-100 as a promising strategy to counteract sepsis[J]. *Biomedicines*, **2024**, 12(3): 575.
- 13 Li Y, Han M, Yang M, et al. Hemoperfusion with the HA330/HA380 cartridge in intensive care settings: A state-of-the-art review[J]. *Blood Purification*, **2024**: 122-137.
- 14 Moriyama K, Nishida O. Targeting cytokines, pathogen-associated molecular patterns, and damage-associated molecular patterns in sepsis via blood purification[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, **2021**, 22(16), 8882.
- 15 Shi C, Wang X, Wang L, et al. A nanotrap improves survival in severe sepsis by attenuating hyperinflammation[J]. *Nature Communications*, **2020**, 11(1): 3384.
- 16 Wang H, Ma S. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome[J]. *The American Journal of Emergency Medicine*, **2008**, 26(6): 711-715.
- 17 Zampieri F G, Kellum J A, Park M, et al. Relationship between acid-base status and inflammation in the critically ill[J]. *Critical Care*, **2014**, 18(4): R154.
- 18 Rossi R A, Pierini A B, Peñeñory A B. Nucleophilic substitution reactions by electron transfer[J]. *Chemical Reviews*, **2003**, 103(1): 71-168.
- 19 Fang H, Wei J, Yu Y. In vivo studies of endotoxin removal by lysine-cellulose adsorbents[J]. *Biomaterials*, **2004**, 25(23): 5433-5440.
- 20 Mishra S K, Choudhury S. Experimental protocol for cecal ligation and puncture model of polymicrobial sepsis and assessment of vascular functions in mice[J]. In: Tharakan B (ed). *Traumatic and Ischemic Injury: Methods and Protocols*. Springer New York: New York, NY, **2018**: 161-187.
- 21 Rittirsch D, Huber-Lang M S, Flierl M A, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture[J]. *Nature Protocols*, **2009**, 4(1): 31-36.

- 22 Siempos I I, Lam H C, Ding Y, et al. Cecal ligation and puncture-induced sepsis as a model to study autophagy in mice[J]. *JoVE*, 2014(84): e51066.
- 23 国家药品监督管理局. 医疗器械溶血试验 第1部分:材料介导的溶血试验:YY/T 1651.1—2019[S]. 北京:中国标准出版社, 2019.

## Research paper

## Study on the Regulation of Inflammatory Storm and Improvement of Survival Rate in Septic Mice Using Amino Acid Loaded Blood Purification Adsorbent

ZONG Wen-hui<sup>1</sup>, CHENG Lin<sup>1</sup>, SHI Meng-rou<sup>1</sup>, CHEN Bin<sup>1</sup>, LIU Wei-wei<sup>1</sup>, LIU Zhuang<sup>2</sup>,  
WANG Xiao-hui<sup>1\*</sup>, OU Lai-liang<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> Tianjin Institute of Medical Science, Tianjin 300020, China;<sup>2</sup> Key Laboratory of Bioactive Materials of Ministry of Education, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract** In this study, PS-Cl microspheres were used as carriers to prepare adsorption materials PS-Arg and PS-Glu with different charges through chemical coupling of chloromethyl and amino groups; The surface morphology, element composition, specific surface area, pore size distribution, mechanical strength, the adsorption rate for TNF- $\alpha$  and IL-6 and the biocompatibility of the adsorbent material were investigated; Using sepsis mice as a model, the effects of adsorption materials on blood indicators, body weight, inflammatory factors, histopathological damage, and survival rate of sepsis mice were investigated by intraperitoneal injection. The results showed the adsorption capacities of PS-Arg and PS-Glu for TNF- $\alpha$  in simulated serum were  $(15.48 \pm 0.34)$  ng/g and  $(13.95 \pm 1.33)$  ng/g, respectively, which were higher than that of PS adsorbent  $(12.35 \pm 2.71)$  ng/g; The adsorption capacity for IL-6 is  $(6.86 \pm 0.02)$  ng/g and  $(6.91 \pm 0.04)$  ng/g, which are also higher than that of PS adsorbent  $(5.70 \pm 0.18)$  ng/g. The hemolysis rate of the adsorbents does not exceed 5%, and the APTT and PT values are comparable to the negative control, with no significant effect on blood components. Implanting adsorbent materials into the abdominal cavity after modeling can improve the survival rate, and the PS group having the highest survival rate of 80% at 21 days, far higher than the 40% in the model group. After 24 hours of modeling, the TNF- $\alpha$  levels in the PS, PS-Arg and PS-Glu group decreased by 28.29%, 45.6%, and 33.47%, respectively; While the IL-6 levels decreased by 16.66%, 22.91%, and 18.83%, respectively; The pathological damage of the lungs, pancreas, and spleen is reduced, confirming that intervention with adsorbent materials in the early stages of sepsis can alleviate super inflammatory reactions, reduce tissue damage and improve survival rates. This study provides fundamental research data for clinical practice such as the timing of starting blood purification therapy for sepsis and the optimal type of adsorption material.

**Keywords** Sepsis, Inflammatory storm, Survival rate, Adsorbent, Blood purification

\* Corresponding author: WANG Xiao-hui, E-mail: wangtxh@126.com; OU Lai-liang, E-mail: ouyll@nankai.edu.cn.