论著

文章编号:1000-5404(2014)07-0678-04

淋巴细胞微粒诱导的小鼠气道炎症模型的建立及评价

杨再兴,邱 倩,焦 燕,但小苹,熊 玮 (400038 重庆,第三军医大学西南医院呼吸内科)

[摘要] **目的** 利用T淋巴细胞微粒诱导建立小鼠气道炎症模型,探讨淋巴细胞微粒在气道炎症发生中的作用。**方法** 放线菌素D溶液处理6T-CEM细胞24 h,收集淋巴细胞微粒;50 μg/mL的淋巴细胞微粒灌注BALB/c小鼠气道,24 h后处死小鼠并取肺组织;HE染色检测肺组织的形态变化,ELISA、Western blot和荧光定量PCR法分别检测免疫相关分子NLRP3、TLR4、IL-18和IL-1β的蛋白和mRNA表达水平。**结果** HE染色显示淋巴细胞微粒处理组小鼠肺泡细胞聚集且伴随淋巴细胞浸润,ELISA结果显示淋巴细胞微粒处理组小鼠肺组织中IL-18和IL-1β的蛋白分泌水平显著高于正常组($P<0.01$),荧光定量PCR和Western blot结果显示处理组小鼠肺组织中NLRP3、TLR4、IL-18和IL-1β的mRNA和蛋白表达水平显著高于正常组($P<0.01$)。**结论** 淋巴细胞微粒能够诱导小鼠气道炎症反应,其炎症反应与NLRP3、TLR4、IL-18和IL-1β等因子有关。

[关键词] 淋巴细胞微粒;气道炎症;细胞因子
[中图法分类号] R-332; R392.3; R562.11 [文献标志码] A

Establishment and evaluation of a mouse model of airway inflammation by lymphocyte-derived microparticles

Yang Zaixing, Qiu Qian, Jiao Yan, Dan Xiaoping, Xiong Wei (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To establish a mouse model of airway inflammation induced by lymphocyte-derived microparticels (LMPs) and investigate the role of LMPs in the incidence of airway inflammation. **Methods** After human T-leukemia cell line 6T-CEM was treated with actinomycin D for 24 h, the LMPs were collected. A total of 12 BALB/c mice were divided into normal group and LMPs group ($n=6$), and their airways were infused with 100 μL normal saline and 50 μg/mL LMPs respectively. In 24 h later, all mice were killed, and then the lung tissues were accessed. HE staining was used to analyze the morphological changes of lung tissues. ELISA, Western blotting and quantity RT-PCR assays were used to measure the expression of immune-related molecules, NLRP3, TLR4, IL-18 and IL-1β at protein and mRNA levels. **Results** HE staining revealed alveolar cells aggregation and lymphocytic infiltration in the lung tissues of LMPs-treated mice. ELISA showed that the secreted protein levels of IL-18 and IL-1β were significantly higher in the lung tissues in LMPs-treated mice than normal control ($P<0.01$). Quantity RT-PCR and Western blot assays showed that the mRNA and protein expression of NLRP3, TLR4, IL-18 and IL-1β were significantly increased in the lung tissues in LMPs-treated mice than normal control ($P<0.01$). **Conclusion** LMPs induce airway inflammation in mice, and the inflammatory response is related to NLRP3, TLR4, IL-18 and IL-1β.

[**Key words**] lymphocyte-derived microparticles; airway inflammation; chemokine

Corresponding author: Xiong Wei, E-mail: xiongwei64@126.com

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease,COPD)是一种常见的慢性气道炎症性疾病,它在导致患者死亡的重大疾病中排名第5位,并预计在2030年会提升至第4位,仅次于缺血性心脏病、脑血管疾病及艾滋病[1]。淋巴细胞微粒(lymphocyte-derived microparticels,LMPs)具有炎症调节的生物学活性。我们前期研究证实,淋巴细胞微粒在体外能导致支气管上皮细胞内炎症介质明显增多,并能导致上皮细胞凋亡[2];临床研究发现COPD患者的支气管肺泡

[通信作者] 熊 玮,E-mail:xiongwei64@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140219.1115.016.html(2014-02-19)

灌洗液(BALF)中存在着病理性升高的 LMPs,且 LMPs 的量和疾病的严重程度密切相关。我们推测 LMPs 与 COPD 气道炎症可能密切相关,但 LMPs 在体内能否诱导气道炎症以及相关的炎症机制尚不清楚。本研究拟通过分离 T 淋巴细胞微粒,建立 BALB/c 小鼠气道炎症模型,并评价小鼠肺部炎症水平来探讨淋巴细胞微粒在气道炎症发生中的作用。

1 材料与方法

1.1 BALB/c 小鼠来源与饲养

SPF 级 BALB/c 小鼠,雌性,5 ~ 6 周龄,体质量 18 ~ 20 g,第三军医大学实验动物中心提供。饲养:温度 20 ~ 25 ℃,日温差 <3 ℃;相对湿度,40% ~ 70%;换气次数 10 ~ 20 次/h;气流速度 0.1 ~ 0.2 m/s;压强梯度 20 ~ 50 Pa;空气洁净度 10 000 级;菌落数 3 个/皿;氨浓度 14 mg/m^3;噪声 60 dB 工作照度 150 ~ 300 lx;动物照度 15 ~ 20 lx;昼夜明暗交替时间 12/12 h。

1.2 主要试剂及仪器

DMEM 培养基购于美国 IBCO 公司;胎牛血清、胰蛋白酶、Trizol reagent 购于美国 Invitrogen 公司;PrimeScript™ RT reagent Kit 购于大连 TaKaRa 公司;SYBR green 购于日本 TOYOBO 公司;T-Per Tissue Protein Extraction Reagent 购于美国 Pierce;NLRP3、TLR4、IL-18 和 IL-1β 一抗购于美国 Santa Cruz 公司,GAPDH 购于天津三箭生物技术有限公司,辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体购于北京中杉金桥;Supersignal WestDura Extended Duration substrate reagent 购于美国 Thermo 公司;6T-CEM 细胞株购于 ATCC 细胞库;CFX™96 Real-time PCR 仪购于美国 BIO-RAD 公司;ChemiDoc™ XRS + 购于美国 BIO-RAD 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 人 T 淋巴细胞白血病细胞 6T-CEM 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37 ℃,5% CO_2 条件下培养。

1.3.2 淋巴细胞微粒的制备 培养 6T-CEM 细胞,加入终浓度为 0.5 μg/L 的放线菌 D 溶液处理 24 h,收集培养上清,12 000 × *g* 低温离心 50 min,取沉淀,PBS 重悬,得到淋巴细胞微粒重悬液。

1.3.3 模型建立 BALB/c 小鼠分为 2 组,即正常组和淋巴微粒处理组,每组 6 只。分别将 100 μL 生理盐水灌注至正常组小鼠;100 μL 淋巴细胞微粒(50 μg/mL)灌注至小鼠气道,24 h 后处死小鼠,支气管灌插管,加入 1 mL 生理盐水灌洗支气管及肺泡,收集灌洗液;取肺组织于福尔马林溶液中固定。

1.3.4 HE 染色 二甲苯中脱蜡 5 ~ 10 min,苏木精染色,盐酸乙醇分化,置于伊红液 2 min,常规脱水,透明,封片。

1.3.5 ELISA 分别设空白孔、标准品孔和待测样品孔,每孔上样 100 μL,一抗 37 ℃反应 2 h,生物素标记二抗反应 1 h,加入底物 37 ℃避光显色,加入终止液终止反应,于 450 nm 波长测量各孔光密度值。

1.3.6 蛋白提取 按 T-Per Tissue Protein Extraction Reagent 说明书加入溶液匀浆裂解肺组织样本,取 40 μL 裂解产物加入 10 μL 10 × protein loading buffer 混匀,在沸水浴中加热 10 min,于 4 ℃保存。

1.3.7 总 RNA 提取 肺组织从液氮取出后置于 DEPC 处理过的匀浆器中,以 50 mg/mL 的比例加入 Trizol Reagent 匀浆,按照 Trizol Reagent 操作说明提取组织总 RNA 并溶于 35 μL DEPC 水中,分装冻存于 -70 ℃。

孔上样 100 μL,一抗 37 ℃反应 2 h,生物素标记二抗反应 1 h,加入底物 37 ℃避光显色,加入终止液终止反应,于 450 nm 波长测量各孔光密度值。

1.3.8 Western blot 采用 BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μg 蛋白经 8% ~ 15% SDS-PAGE 胶分离后,半干转印至 PVDF 膜上,根据 Marker 标示切下 NLRP3 (Santa Cruz)、TLR4 (Santa Cruz)、IL-18 (Santa Cruz)、IL-1β (Santa Cruz)和 GAPDH (天津三箭生物)条带区域,5% 脱脂奶粉封闭,分别用抗上述蛋白的一抗(1∶500 稀释),抗-GAPDH 的一抗(1∶5 000 稀释)孵育过夜,再与辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体孵育 1 h,用 Supersignal West Dura Extended Duration substrate re-agent 处理并曝光显色。

1.3.9 Quantity RT-PCR 按照 PrimeScript™ RT reagent Kit 说明书推荐体系加入逆转录反应所需试剂,逆转录总 RNA。逆转录条件:42 ℃,15 min;85 ℃,15 s。合成的 cDNA 作为模板进行 qPCR 扩增,根据 SYBR green 试剂说明加入 PCR 试剂及 NLRP3、TLR4、IL-18、IL-1β 和 β-actin 扩增引物。qPCR 条件:95 ℃,2 min;40 次循环于 95 ℃,15 s;60 ℃,30 s;72 ℃,20 s。72 ℃采集荧光。20 μL 反应体系,β-actin 作为内参。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件,对 NLRP3、TLR4、IL-18 和 IL-1β 的蛋白和 mRNA 表达均采用非配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 淋巴细胞微粒处理 BALB/c 小鼠后支气管和肺组织的变化

HE 染色显示:淋巴细胞微粒处理组小鼠支气管发生管腔纤维化、闭塞,肺组织中淋巴细胞显著聚集,提示淋巴细胞微粒可能导致气道炎症。见图 1。

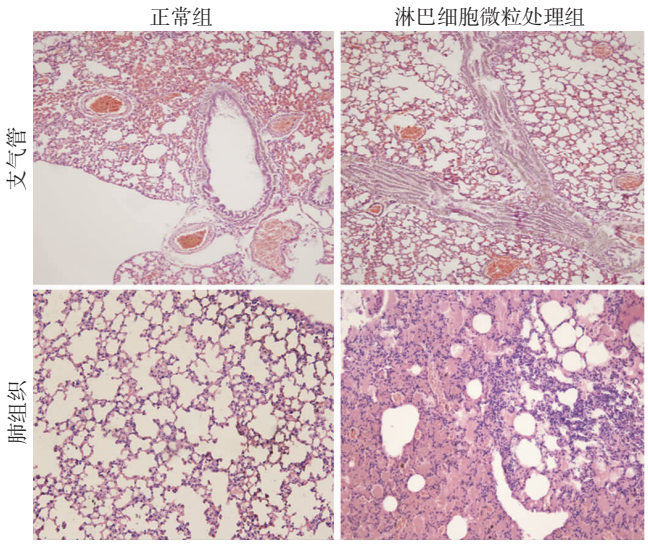


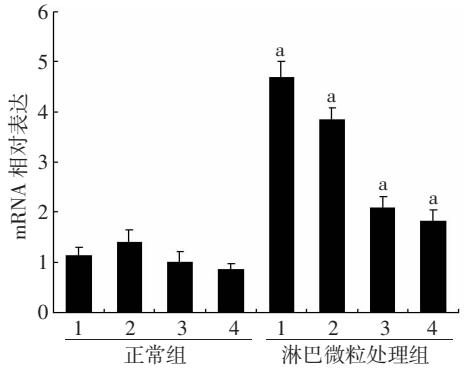
图 1 各组小鼠支气管和肺组织的病理变化 (HE × 300)

2.2 检测气道灌洗液中IL-18和IL-1β的蛋白分泌水平

ELISA法检测表明：淋巴细胞微粒处理组中的IL-18（647.46±19.24）和IL-1β（46.28±2.57）蛋白分泌水平显著高于正常组（45.07±4.10，1.77±0.26）（$P<0.01$），提示淋巴细胞微粒诱导的BALB/c小鼠气道炎症模型具有较强的炎症反应。

2.3 相对定量PCR和Western blot检测肺组织中NLRP3、TLR4、IL-18和IL-1β的mRNA和蛋白表达水平

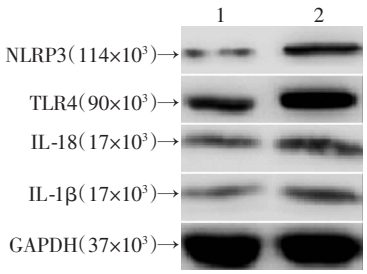
淋巴细胞微粒处理组的NLRP3、TLR4、IL-18和IL-1β的mRNA和蛋白表达水平显著高于正常组（$P<0.01$），进一步证实淋巴细胞微粒诱导的BALB/c小鼠气道炎症模型具有较强的炎症反应。见图2、3。



1～4：分别为NLRP3、TLR4、IL-18、IL-1β mRNA表达

a：$P<0.01$，与正常组比较

图2 荧光定量PCR检测2组小鼠肺组织中NLRP3、TLR4、IL-18和IL-1β的mRNA表达水平



1：正常组；2：淋巴细胞微粒处理组

图3 Western blot检测2组小鼠肺组织中NLRP3、TLR4、IL-18和IL-1β的蛋白表达水平

3 讨论

微粒是细胞激活、损伤或凋亡后从细胞膜脱落的直径小于1 μm的小囊泡，它具有调节信号传导、免疫功能、血管生成、组织修复等生物学活性，与疾病的发生、发展密切相关。新近研究发现循环微粒的数量在肺性高血压患者中显著增加，促凝肺泡微粒的数量在肺损伤、急性呼吸窘迫综合征以及COPD的患者肺泡水肿组织或支气管肺泡灌洗液中显著增加[3]。迄今，有关LMPs与COPD患者气道炎症以及免疫调节的关系在国内外尚少见报道。本课题组前期体外实验证实LMPs能够引起支气管上皮细胞炎症反应，与IL-1β和IL-18这2个因子有关；我们还发现高剂量LMPs能够诱导支气管上皮细胞凋亡[4]。IL-1β和IL-18作为一种促炎因子，在宿主防御和多种炎症疾病中发挥重要作用[5-8]。为了验证LMPs在体内能否诱导气道炎症，本研究在体观察了淋巴细胞微粒对小鼠气道的影响，发现经淋巴细胞微粒处理后，小鼠支气管发生管腔纤维化、闭塞，肺组织中淋巴细胞显著聚集；检测小鼠模型中IL-18、IL-1β的分泌水平发现，淋巴细胞微粒处理组的蛋白分泌水平显著高于正常组（$P<0.01$），HE染色显示肺泡细胞水肿聚集并伴随淋巴细胞的浸润，提示淋巴细胞微粒可能导致气道炎症，在诱导小鼠气道炎症过程中发挥着促炎的作用，说明它作为一种抗原引起了肺组织的免疫反应，但引起气道炎症反应具体机制尚不明确。

NLRP3是NOD样受体家族的成员，是天然免疫系统中关键的炎性小体，与人类多种疾病的发生密切相关，如矽肺[9]、动脉粥样硬化[10]等。TLR4是Toll样受体家族成员之一，在病原体识别和天然免疫激活中发挥十分重要的作用[11]。微粒是一种亚微米大小的膜囊泡，其从细胞脱出而形成，含有细胞膜蛋白和部分细胞质成分，如细胞表面抗原、mRNA、microRNA、细胞因子和生长因子等，可在细胞间传递重要的生物学信息[12]。研究已经证实细胞微粒中含有IL-1β和NLRP3蛋白[13-14]，我们推测淋巴细胞微粒中包含的蛋白质、脂类以及核酸等物质可能参与了炎症反应的调控。因此，我们检测了NLRP3、TLR4 mRNA和蛋白的表达水平，本研究检测淋巴细胞微粒处理小鼠肺组织NLRP3和TLR4的mRNA和蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$），提示淋巴细胞微粒可能通过转移自身蛋白或分子进入细胞，从而使小鼠肺组织中NLRP3、TLR4的表达上调，导致炎症的发生，为后续的机制研究提供了新的线索。

本部分体内实验研究初步证实了LMPs能够引起小鼠气道炎症反应，能够引起炎症因子IL-18、IL-1β的表达升高，可能通过NLRP3和TLR4的调节实现这一途径，为后续研究提供新的作用点。同时为进一步探讨LMPs与气道炎症的关系提供新的基础研究和线索，进而为临床防治气道炎症尤其是COPD、哮喘等慢性气道炎症提供新的干预靶点和方向。

参考文献：

[1] Mathers C D, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030[J]. PLoS Med, 2006, 3(11): e442.

[2] Qiu Q, Xiong W, Yang C, *et al*. Lymphocyte-derived microparticles induce bronchial epithelial cells' pro-inflammatory cytokine production and apoptosis[J]. Mol Immunol, 2013, 55(2/3): 220-230.

[3] Bastarache J A, Fremont R D, Kropski J A, *et al*. Procoagulant alveolar microparticles in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009, 297(6):

L1035 – L1041.
[4] 焦燕, 邱倩, 杨再兴, 等. 淋巴细胞微粒刺激 AKT/Foxo1 阻滞气道上皮细胞周期的研究[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(24): 2498 – 2502.
[5] Dinarello C A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 519 – 550.
[6] Jordan J A, Guo R F, Yun E C, *et al*. Role of IL-18 in acute lung inflammation[J]. J Immunol, 2001, 167(12): 7060 – 7068.
[7] Sawada M, Kawayama T, Imaoka H, *et al*. IL-18 induces airway hyperresponsiveness and pulmonary inflammation *via* $CD4^+$ T cell and IL-13[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54623.
[8] Kang M J, Homer R J, Gallo A, *et al*. IL-18 is induced and IL-18 receptor alpha plays a critical role in the pathogenesis of cigarette smoke-induced pulmonary emphysema and inflammation[J]. J Immunol, 2007, 178(3): 1948 – 1959.
[9] Cassel S L, Eisenbarth S C, Iyer S S, *et al*. The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(26): 9035 – 9040.
[10] Duewell P, Kono H, Rayner K J, *et al*. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals[J]. Nature, 2010, 464(7293): 1357 – 1361.
[11] Velayutham T S, Kolli D, Ivanciuc T, *et al*. Critical role of TLR4 in human metapneumovirus mediated innate immune responses and disease pathogenesis[J]. PLoS One, 2013, 8(10), 78838: 78849.
[12] Burnier L, Fontana P, Kwak B R, *et al*. Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine[J]. Thromb Haemost, 2009, 101(3): 439 – 451.
[13] Norling L V, Dalli J. Microparticles are novel effectors of immunity[J]. Curr Opin Pharmacol, 2013, 13(4): 570 – 575.
[14] Wang J G, Williams J C, Davis B K, *et al*. Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1beta-dependent manner[J]. Blood, 2011, 118(8): 2366 – 2374.

(**收稿**:2013-12-18;**修回**:2014-01-21)
(编辑 王 红)

文章编号:1000-5404(2014)07-0681-01

个案与短篇

2 型糖尿病患者合并成人 Still 病 1 例

郝宏铮, 于世家 (110032 沈阳, 辽宁中医药大学附属医院内分泌科)

[**关键词**] Still 病; 2 型糖尿病
[**中图法分类号**] R589.2 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者, 女性, 73 岁, 以"口渴多饮 8 年, 加重伴发热、尿痛 1 周"为主诉入院。入院 1 周前因吹空调着凉后出现发热, 体温波动在 37.5 ~ 39.4 ℃, 伴有尿痛症状, 查体温 39.0 ℃, 尿常规: 白细胞 >40/HP, 血常规: WBC 17.5×10^9/L, GR 88.5%, 静滴喹诺酮类药物 3 d 症状未见明显好转入院治疗。入院时: 口渴多饮, 尿频量多, 乏力, 发热, 咽痛, 尿痛, 手足麻凉, 无恶心、呕吐等症状。既往史: 冠心病史 30 年。无家族遗传病史。入院时查: 体温 37.8 ℃, 脉搏 72 次/min, 呼吸 18 次/min, 血压 90/50 mmHg。患者神清语明, 形体肥胖, 气息平稳。全身皮肤黏膜无黄染及出血点, 面、颈、躯干及四肢散在红色斑丘疹, 以胸背部及双侧大腿为甚, 全身浅表淋巴结无肿大。咽红, 扁桃体无肿大。心肺未见明显异常。肝脾肋下未触及。辅助检查: 随机血糖: 血糖仪未测出数值。入院诊断: 2 型糖尿病、尿路感染。治疗予胰岛素泵控制血糖, 后据血糖情况改为基础甘精胰岛素配合三餐前门冬胰岛素的治疗方案。继续静滴乳酸左氧氟沙星 0.3 g, 每天 2 次, 静滴控制感染。入院后完善血生化检查: 糖化血红蛋白 10.4%, CRP 63 mg/L, 总蛋白 59.9 g/L, 白蛋白 31 g/L。肺 CT: 右肺间质性改变。彩超: 右肾囊肿, 肝内胆管结石, 轻度脂肪肝, 甲状腺多发结节。患者静滴 5 d 乳酸左氧氟沙星, 尿路刺激症状明显缓解, 但发热、斑疹情况无明显改善, 改用氨曲南 1.0 g, 每天 2 次静滴抗感染。多次外周血培养及尿培养均为阴性。进一步检查 ANA 谱示 ANA(+), 抗 SSA 抗体(±), ANCA 抗体阴性, 类风湿检测示 RF(–), ASO 正常, 血清铁蛋白 >1 500 ng/mL。多次复查血常规 WBC 在 16.6×10^9/L 以上。结合患者目前间断性发热, 热型为弛张热, 无热期一般状态尚可, 白细胞总数持续升高, 血清铁蛋白增高, 伴有全身皮疹, 足量应用抗生素效果不明显, 暂不考虑其它自身免疫性疾病或脓毒血症, 确诊为成人 Still 病, 予甲泼尼松片 32 mg, 每天 1 次口服抗炎, 配合甲氨蝶呤片 10 mg, 每周 1 次口服抑制免疫。用药当天体温缓解, 出院前 1 周体温最高为 38.4 ℃。出院 3 d 后退热, 随访 2 周无发热, 无咽痛及关节痛等症状。现甲泼尼松片已减至 20 mg, 每天 1 次口服。

2 讨论

成人 Still 病(adult onset still's disease, AOSD)是一种病因及发病机制不清的临床综合征, 临床以高热、一过性多形性皮疹、关节炎(痛)和白细胞升高为主要表现。好发于青壮年, 老年患者少见。本例患者为老年女性, 2 型糖尿病史 8 年, 持续发热后开始出现皮疹, 热型为弛张热, 多次查血常规白细胞计数增高, 无热期一般状态较好。合理应用抗生素无效, 结合其他生化检查, 明确诊断为成人 Still 病, 应用激素配合免疫抑制剂效果确切, 预后较好。现将我们的诊治体会总结如下。

糖尿病患者不明原因的发热不能仅局限于感染因素。2 型糖尿病患者细胞和体液免疫功能低下, 且受血糖因素的影响, 随着血糖升高而免疫功能降低, 随着血糖的恢复, 一些免疫学指标可以得到改善。同时感染、病情的严重程度、高血糖等因素

(下转 686 页)

[**通信作者**] 郝宏铮, E-mail: isaachhz@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140320.1737.001.html(2014-03-20)