呼吸危重症 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001144

过度自噬对白介素-1β 在急性呼吸窘迫综合征中失控性炎症的调节作用研究

王川江，徐　昉
（重庆医科大学附属第一医院急诊医学科 & 重症医学科，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：探究白介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）在急性呼吸窘迫综合征（acute respiratory distress syndrome，ARDS）中的表达以及通过自噬调节 IL-1β 在 ARDS 中的作用。**方法**：将小鼠分为脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）模型组、LPS+3-甲基腺嘌呤（3-methyladenine，3-MA）干预组和 LPS+PBS 对照组，每组随机分配 5 只 C57BL/6 雄性小鼠，通过 ELISA 检测小鼠血清、肺泡灌洗液中 IL-1β 的表达，RT-PCR 对小鼠肺组织中 IL-1β 进行定量分析，Western blot 检测 LPS 诱导的 ARDS 小鼠肺组织中微管相关蛋白 LC3（LC3Ⅱ/LC3Ⅰ）以及 P62 表达，使用 3-MA 干预 ARDS 小鼠模型，后检测 IL-1β、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、白介素-6（interleukin-6，IL-6）、γ-干扰素（interferon-γ，IFN-γ）等细胞因子以及自噬水平变化。**结果**：①LPS 诱导 ARDS 小鼠模型中，IL-1β 在外周血、肺泡灌洗液以及肺组织中的表达较正常对照组明显升高（P 值分别为 0.000、0.000、0.021），Western blot 检测 P62 蛋白逐步降低（F=14.376，P=0.005），LC3Ⅱ/LC3Ⅰ值逐步升高（F=53.799，P=0.000）；②3-MA 处理 ARDS 小鼠模型后，IL-1β 以及 TNF-α、IL-6、IFN-γ 等细胞因子在外周血、肺泡灌洗液以及肺组织中的表达较对照组和模型组明显降低（P<0.01），Western blot 检测 P62 蛋白逐步降低（F=20.037，P=0.002），LC3Ⅰ/LC3Ⅱ值逐步升高（F=38.726，P=0.000）。**结论**：抑制过度自噬可降低 IL-1β 水平，减弱 IL-1β 的促炎作用，调控 ARDS 的失控性炎症效应。

【关键词】白介素-1β；急性呼吸窘迫综合征；自噬
【中图分类号】R563.1　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-08-29

Role of excessive autophagy in the regulation of interleukin-1β in inflammatory effect of acute respiratory distress syndrome

Wang Chuanjiang, Xu Fang
(*Department of Emergency and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To explore the expression of the interleukin-1β (IL-1β) in severe acute respiratory distress syndrome (ARDS) and the regulation of IL-1βby autophagy in ARDS. ***Methods***: Mice were divided into lipopolysaccharide (LPS) induced ARDS model group, LPS+3- methyladenine (3-MA) autophagy inhibition intervention group and LPS+PBS control group; each group were randomly assigned 5 C57BL/6 male mice. The expressions of IL-1βin serum and bronchoalveolar lavage fluid were detected by ELISA. Quantitative analysis of IL-1βin the lung tissue of mice was conducted by RT-PCR. Expressions of LPS induced blot related protein LC3 (LC3II/LC3I) and the P62 were detected by Western blot. 3-MA was used to intervene ARDS mouse model, and changes in expressions of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6), interferon-γ (IFN-γ) and other cytokines and autophagy levels were detected. ***Results***: ①In LPS induced ARDS mice model, the expressions of IL-1βin lung tissue and lavage fluid was obviously higher than those of normal control group in peripheral blood and bronchoalveolar lavage (P=0.000, P=0.000, P=0.021). P62 protein detected by Western blot (F=14.376, P=0.005) was decreased gradually; the ratio of LC3 was increased gradually (LC3Ⅱ/LC3Ⅰ F=53.799, P=0.000). ②In 3-MA mouse model of ARDS, IL-1β, TNF-α, IL-6, IFN-γ and cytokine expressions in lung tissue and lavage fluid were significantly lower than those of control group and model group in the peripheral blood and bronchoalveolar lavage (P<0.01). Western blot detection of P62 protein was decreased gradually (F=20.037, P=0.002), the ratio of LC3 Ⅰ/LC3 Ⅱ was increased gradually (F=38.726, P=0.000). ***Conclusion***: Inhibiting excessive autophagy can decrease the level of IL-1β and reduce the pro-inflammatory effect of IL-1β, thus controlling the inflammatory effect of ARDS.

【Key words】interleukin-1 beta; acute respiratory distress syndrome; autophagy

作者介绍：王川江，Email：841735693@qq.com，
研究方向：自噬在肺部炎症性疾病中的作用。
通信作者：徐　昉，Email：527904228@qq.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81570069）；重庆市科委基础医学与前沿技术研究资助项目（编号：cstc2016jcyjA0005）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170103.1648.040.html（2017-01-03）

在重症医学临床工作中，急性呼吸窘迫综合征（acute respiratory distress syndrome，ARDS）是一种常见的肺部并发症，各种肺内和肺外因素都可以导致 ARDS 的发生[1]。近年来，尽管多种机械通气（mechanicalventilation，MV）策略的应用，糖皮质激素、肺泡表面活性物质的替代等治疗使 ARDS 的临床疗效取得了显著提高，但其死亡率仍居高不下[2]。白介素-1β（interleukin-1β，IL-1β）作为炎症细胞因子是白细胞介素-1（interleukin-1，IL-1）家族的成员，分子结构与 IL-18、IL-33 相似，其作用机制正逐渐被大家所认识[3]。有研究发现：急性肺损伤的小鼠模型中，血液和肺泡灌洗液中 IL-1β 水平明显升高，并且在急性肺损伤模型 IL-1β 基因敲除小鼠中，死亡率明显下降，表明 IL-1β 是 ARDS 发病过程中的重要炎症细胞因子[4]。自噬是近几年生物医学和临床医学的研究热点之一，可以发生在几乎所有细胞中，是一个选择性的降解过程。它可以选择性地降解特定的蛋白质、细胞器以及入侵的细菌，可见正常的自噬过程对稳定细胞内环境和维持细胞生命活动顺利进行十分重要[5]。最近研究发现，自噬与包括急性呼吸窘迫综合征、慢性阻塞性肺疾病、α1-抗胰蛋白酶缺乏症、肺动脉高压等肺部疾病有关，多数学者认为在病理生理状态下，自噬是一种细胞的保护性反应[6]，那么自噬是否能通过下调 IL-1β 的表达抑制 ARDS 的炎症反应过程目前还没有相关研究报道，本文就自噬在 ARDS 的发病过程与 IL-1β 的关系作如下研究。

1 材料和方法

1.1 小鼠和分组

C57BL/6 雄性小鼠（8~12 周）购自重庆医科大学实验动物中心。小鼠保持在无特定病原和温度（22 ± 2）℃、潮湿度 30%~40%、12 h 光/暗周期条件下。食物和水自由采食。所有研究方案均经机构动物护理和重庆医科大学使用委员会的指南。将小鼠分为脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）模型组、LPS+3-甲基腺嘌呤（3-methyladenine，3-MA）干预组和 LPS+PBS 对照组，每组随机分配 5 只 C57BL/6 雄性小鼠。

1.2 LPS 诱导小鼠急性肺损伤模型

小鼠腹腔注射水合氯醛（3.5%）进行麻醉，麻醉效果满意后将小鼠固定于一小木板上，消毒颈部皮肤，充分游离并暴露小鼠气管，向气管内缓慢滴注 50 μg LPS（055：B5；1 mg/mL；Sigma-Aldrich，St. Louis，MO，USA）溶于 50 μL PBS 诱导急性肺损伤，无菌 PBS 对照组采取上述方法进行气管内持续滴注 50 μL。LPS 模型组、LPS+3-MA 干预组和 LPS+PBS 对照组 3 个实验小鼠组分别于 6、12、24 h 收集其肺组织样本，然后于液氮中冷冻直到分析。采取摘眼球方式取其全血标本，血标本离心 1 000 r/min 4 ℃ 10 min 后将血清分装，冷冻保存在 -80 ℃用于细胞因子和趋化因子的测量。

1.3 血清及 BALF 液细胞因子的测定

血清及 BALF 液 IL-1β（明尼阿波利斯公司制造），TNF-α、IL-6、IFN-γ、CXCL1、CXCL8 和 CXCL10（中国上海制造）水平采用 ELISA 试剂盒定量测定。

1.4 组织病理学

将左肺上叶组织固定于 4%甲醛溶液 24 h，然后脱水石蜡包埋，连续切片，厚 4 μm，后进行苏木精-伊红染色，在光下观察肺组织病理改变。根据肺泡水肿、间质水肿、中性粒细胞浸润程度评估肺损伤。

1.5 RT-PCR

TRIzol 试剂（大连 Takara 公司），放射免疫试剂盒（大连 Takara公司），cDNA 第 1 链合成试剂盒及 PCR 扩增试剂盒（大连 Takara 公司），引物基因序列通过 GenBank 获得，引物序列设计由 Takara 公司合成，引物序列：GAPDH，上游引物（5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3'，下游引物：5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'）。IL-1β（上游引物：5'-GCTATGGCAACTGTCCCT-3'，下游引物：5'-TAGAGTGTCGTGTAGAGC-3'）。

1.6 Western blot

每组取左肺中叶组织匀浆，采用 RIPA 裂解液提取总蛋白，-80 ℃保存备用。电泳时取蛋白 50 μg 上样，然后依次进行转膜、封闭、一抗孵育过夜、二抗孵育、ECL 试剂盒显色、X 片曝光洗片。BIO-RAD 化学发光成像系统检测蛋白印记条带及 Image Lab 图像软件进行分析，比对 LC3II/LC3I 比例以及 P62 蛋白水平作为自噬水平指标。

1.7 自噬抑制

在造模前 20 min，按照 1 mL 生理盐水溶解 30 mg/kg 剂量予以小鼠腹腔内注射自噬抑制剂 3-MA，对照组予以同等剂量的生理盐水进行腹腔注射，分别取 6、12、24 h 小鼠血清及肺组织标本进行定量分析。

1.8 肺湿干重比

小鼠肺湿干重比（lung wet/dry weight ratio，W/D）用于评估肺水肿的严重程度。从小鼠体内分离左肺后，立即测定左肺的湿重，然后将分离出的左肺组织放入 60 ℃的烤箱中加热 3 d，然后测定其干重，最后通过湿重/干重得到小鼠的肺湿干重比。

1.9 数据分析

数据采用 SPSS 19.0 统计软件分析，以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。IL-1β 在正常和模型小鼠中的数据比较采用两独立样本 t 检验；其余数据采用单因素方差分析，组间两两比较使用 LSD-t 法。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 IL-1β 在正常和模型小鼠中的表达

采用 ELISA 方法检测正常和 LPS 模型小鼠外周血、肺泡

灌洗液中 IL-1β 的表达，RT-PCR 检测正常和模型小鼠肺组织 IL-1β 表达与外周血和肺泡灌洗液的表达结果见表 1，表达均增高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。

表 1 正常小鼠和 LPS 模型小鼠外周血、肺泡灌洗液、肺组织中 IL-1β 的表达

Tab.1 Expression of IL-1 in peripheral blood, bronchoalveolar lavage fluid and lung tissue of normal mice and LPS mice

组别	外周血	肺泡灌洗液	RT-PCR
正常小鼠（n=5）	49.88 ± 3.38	116.20 ± 28.16	1.07 ± 0.52
LPS 模型小鼠（n=5）	159.67 ± 18.05	544.34 ± 99.25	2.69 ± 1.13
t 值	13.370	9.280	2.910
P 值	0.000	0.000	0.019

2.2 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ及 P62 在 LPS 模型小鼠肺组织中的表达

P62、LC3Ⅰ、LC3Ⅱ蛋白在 LPS 模型小鼠肺组织中的表达情况见图 1。LC3Ⅱ/LC3Ⅰ蛋白 3 组数据之间总体差异比较有统计学意义（$P<0.05$），比值逐步增加，见表 2。6 h 表达低于 12 h（$t_D=-2.74$，$P=0.034$）；12 h 表达低于 24 h（$t_D=-7.29$，$P=0.000$）。P62 蛋白 3 组数据之间总体差异比较有统计学意义（$P<0.05$），其表达逐步降低（表 2），6 h 表达高于 12 h（$t_D=2.01$，$P=0.027$），12 h 表达高于 24 h（$t_D=2.45$，$P=0.050$）。通过 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ蛋白以及 P62 蛋白结果分析提示在 LPS 诱导的急性肺损伤模型中肺内存在过度自噬。

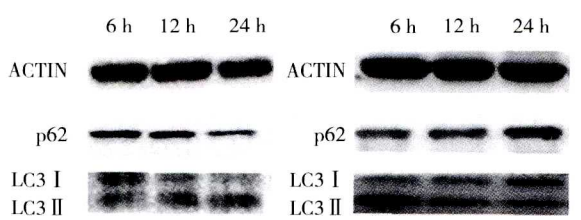


图 1 Western blot 检测 LPS 模型小鼠肺组织中 P62 蛋白及 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ表达

Fig.1 Detection of P62 protein and LC3Ⅱ/LC3Ⅰ expression in lung tissue of LPS model mice by Western blot

表 2 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ以及 P62 在 LPS 模型小鼠肺组织中的表达

Tab.2 Expression of LC3Ⅱ/LC3Ⅰ and P62 in lung tissue of LPS model mice

目标蛋白	P62	LC3Ⅱ/LC3Ⅰ
6 h	0.528 ± 0.135	0.331 ± 0.047
12 h	0.341 ± 0.162	1.154 ± 0.216
24 h	0.184 ± 0.115	3.350 ± 1.389
F 值	14.376	53.799
P 值	0.005	0.000

2.3 抑制自噬后 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ及 P62 在 LPS 模型小鼠肺组织中的表达

造模前 20 min，按 1 mL 生理盐水中溶解 30 mg/kg 剂量予以小鼠腹腔内注射自噬抑制剂 3-MA，造模 6、12、24 h 后采用 Western blot 检测 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ及 P62。P62、LC3Ⅰ、LC3Ⅱ蛋白在 LPS 模型小鼠肺组织中的表达情况见图 2。LC3Ⅱ/LC3Ⅰ蛋白 3 组数据之间总体差异比较有统计学意义（$P<0.05$），比值逐步降低（表 3），6 h 表达高于 12 h（$t_D=5.29$，$P=0.002$）；12 h 表达高于 24 h（$t_D=3.45$，$P=0.014$）。P62 蛋白 3 组数据之间总体差异比较有统计学意义（$P<0.05$），其表达逐步升高（表 3），6 h 表达低于 12 h（$t_D=-2.59$，$P=0.041$），12 h 表达低于 24 h（$t_D=-3.70$，$P=0.010$）。通过 LC3Ⅱ/LC3I 蛋白及 P62 蛋白结果分析，在给予小鼠 3-MA 自噬抑制剂后肺内自噬水平明显降低。

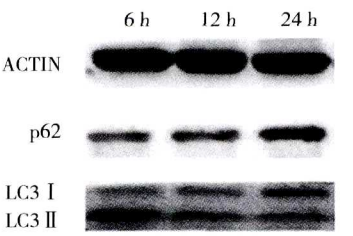


图 2 使用 3-MA 自噬抑制后 Western blot 检测 LPS 模型小鼠肺组织中 P62 蛋白及 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ表达

Fig.2 Detection of P62 protein and LC3Ⅱ/LC3Ⅰ expression in lung tissue of LPS model mice by Western blot after 3-MA autophagy inhibition

表 3 抑制自噬后 LC3Ⅱ/LC3Ⅰ及 P62 在 LPS 模型小鼠肺组织中的表达

Tab.3 Expression of LC3Ⅱ/LC3Ⅰ and P62 in the lung tissue of model mice after the inhibition of autophagy

目标蛋白	P62	LC3Ⅱ/LC3Ⅰ
6 h	0.139 ± 0.012	2.521 ± 0.590
12 h	0.360 ± 0.034	1.009 ± 0.140
24 h	0.676 ± 0.177	0.024 ± 0.004
F 值	20.037	38.726
P 值	0.002	0.000

2.4 抑制自噬后 IL-1β 在 LPS 模型组、LPS+3-MA 干预组以及 LPS+PBS 对照组小鼠中的表达

抑制自噬后取小鼠外周血、BALF（肺泡灌洗液）采用 ELISA 检测 IL-1β。IL-1β 在外周血中各组数据之间总体差异比较有统计学意义（$P<0.05$），见表 4，LPS 模型组高于 LPS+3-MA 干预组（$t_D=2.94$，$P=0.012$），LPS 模型组和 LPS+PBS 对照组无明显差异（$t_D=0.26$，$P=0.800$），LPS+PBS 对照组高于 LPS+3-MA 干预组（$t_D=2.68$，$P=0.020$）。IL-1β 在肺泡灌洗液中各组数据之间总体差异比较有统计学意义（$P<0.05$），见表4。LPS 模型组高于 LPS+3-MA 干预组（$t_D=2.62$，$P=0.022$），LPS 模型组和 LPS+PBS 对照组无明显差异（$t_D=-0.47$，$P=0.649$），LPS+PBS 对照组高于 LPS+3-MA 干预组（$t_D=3.08$，$P=0.009$）。通过 LPS 模型组、LPS+3-MA 干预组和 LPS+PBS 对照组外周血、肺泡灌洗液 IL-1β 数据之间比较，提示给予小鼠 3-MA 自噬抑制剂后肺内 IL-1β 表达水平明显降低。

表 4　抑制自噬后小鼠外周血、肺泡灌洗液中 IL-1β 表达结果

Tab.4　Expression of IL-1 in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid of mice after inhibition of autophagy

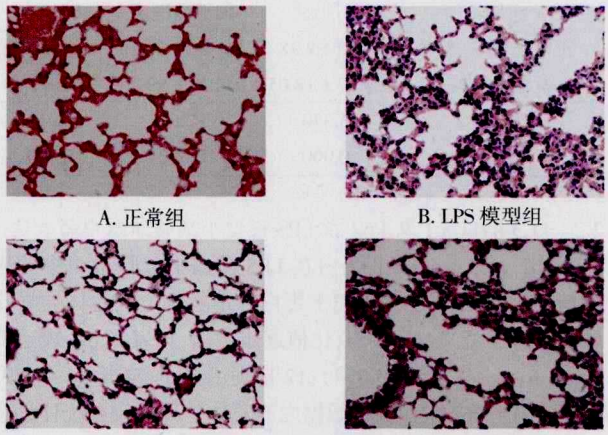
目标蛋白	外周血	肺泡灌洗液
LPS模型组	160.53 ± 18.29	541.08 ± 97.21
LPS+3-MA干预组	109.75 ± 19.78	399.44 ± 81.73
LPS+PBS对照组	156.05 ± 38.83	566.32 ± 76.29
F 值	5.308	5.529
P 值	0.022	0.020

2.5　抑制自噬后相关细胞因子在 LPS 模型组、LPS+3-MA 干预以及 LPS+PBS 对照组中的表达

抑制自噬后取小鼠外周血和肺泡灌洗液，采用 ELISA 方法检测其中 TNF-α、IL-6、IFN-γ、CXCL1、CXCL8 和 CXCL10 的表达。小鼠外周血相关细胞因子在 3 个实验组中的数据总体差异比较有统计学意义（$P<0.05$），见表 5。相应细胞因子 LPS 模型组高于 LPS+3-MA 干预组（t_D=3.37、3.31、2.40、2.58、3.67、3.03，P=0.006、0.010、0.033、0.024、0.003、0.010），而 LPS 模型组和 LPS+PBS 对照组无明显差异（t_D=0.95、0.45、0.36、−0.06、0.66、−0.02，P=0.361、0.659、0.725、0.956、0.519、0.985），LPS+PBS 对照组高于 LPS+3-MA 干预组（t_D=2.42、2.58、2.44、2.63、3.00、3.05，P=0.032、0.024、0.031、0.022、0.011、0.010）。小鼠肺泡灌洗液相关细胞因子在 3 个实验组中的数据总体差异比较有统计学意义（$P<0.05$），见表 6，相应细胞因子 LPS 模型组高于 LPS+3-MA 干预组（t_D=2.71、4.53、3.23、4.65、2.47、2.88，P=0.019、0.001、0.007、0.001、0.030、0.014），LPS 模型组和 LPS+PBS 对照组无明显差异（t_D=−0.95、0.46、−1.68、−1.53、−0.59、0.59，P=0.359、0.653、0.118、0.151、0.561、0.564），LPS+PBS 对照组高于 LPS+3-MA 干预组（t_D=3.67、4.07、4.91、6.18、3.06、2.28，P=0.003、0.002、0.000、0.000、0.010、0.041）。通过小鼠外周血、肺泡灌洗液相关细胞因子在 3 组模型之间的数据比较，提示在给予小鼠 3-MA 自噬抑制剂后肺内各种炎性细胞因子的表达水平明显降低。

2.6　不同处理肺组织病理结构变化

在自噬抑制前和自噬抑制后分别取各组左肺上叶组织进行苏木精-伊红染色，在光下观察肺组织病理改变（图 3）。根据肺泡水肿、间质水肿、中性粒细胞浸润程度判断其肺损伤严重度。



A. 正常组　　B. LPS 模型组

C. LPS+PBS 组　　D. LPS+3MA 组

图 3　正常组、LPS 模型组、LPS+3MA 干预以及 LPS+PBS 对照组肺组织 HE 染色结果

Fig.3　Lung tissue HE staining results of normal group, LPS model group, LPS+3-MA intervention and LPS+PBS control group

2.7　不同处理小鼠肺组织湿干重比变化

小鼠肺组织的湿干重比标本均采用整叶左肺组织，实验小鼠体质量均在 18~22 g。抑制自噬后取小鼠左肺组织采用湿重/干重方法进行 W/D 测定，LPS 模型组、LPS+3-MA 干预

表 5　抑制自噬后小鼠外周血中各相关细胞因子的表达

Tab.5　Expression of related cytokines in peripheral blood of mice after the inhibition of autophagy

组别	TNF-α	IL-6	IFN-γ	CXCL1	CXCL8	CXCL10
LPS模型组	148.49 ± 11.97	147.72 ± 19.03	341.78 ± 27.82	231.77 ± 30.29	121.43 ± 17.46	245.99 ± 34.50
LPS+3-MA干预组	90.22 ± 8.87	95.40 ± 22.88	261.81 ± 62.51	180.92 ± 35.31	79.82 ± 20.49	179.86 ± 32.93
LPS+PBS对照组	132.05 ± 44.99	139.91 ± 36.73	329.81 ± 60.15	232.89 ± 27.49	113.89 ± 15.53	246.40 ± 35.95
F 值	6.026	5.346	4.362	4.528	7.635	6.168
P 值	0.015	0.022	0.029	0.034	0.007	0.014

表 6　抑制自噬后小鼠肺泡灌洗液中各相关细胞因子的表达

Tab.6　ExPression of related cytokines in the bronchoalveolar lavage fluid of mice after the inhibition of

组别	TNF-α	IL-6	IFN-γ	CXCL1	CXCL8	CXCL10
LPS模型组	585.56 ± 111.88	214.98 ± 39.36	284.46 ± 27.79	344.88 ± 57.39	341.33 ± 54.35	440.83 ± 66.63
LPS+3-MA干预组	455.61 ± 36.56	138.50 ± 28.12	202.27 ± 26.54	179.11 ± 41.17	233.30 ± 45.98	314.27 ± 35.69
LPS+PBS对照组	631.23 ± 57.88	231.47 ± 39.58	327.26 ± 58.15	399.52 ± 67.45	367.49 ± 96.54	414.75 ± 93.86
F 值	7.239	12.454	12.460	20.719	5.275	4.612
P 值	0.009	0.001	0.001	0.000	0.023	0.033

组和 LPS+PBS 对照组 W/D 值在 3 组数据总体差异比较有统计学意义（F=52.666，P=0.000），LPS 模型组高于 LPS+3-MA 干预组（t_D=9.66，P=0.000），LPS 模型组和 LPS+PBS 对照组无明显差异（t_D=1.84，P=0.116），LPS+PBS 对照组高于 LPS+3-MA 干预组（t_D=7.83，P=0.000）。

通过 3 组实验 W/D 数据比较，结果提示小鼠经 3-MA 自噬抑制处理后，其肺组织 W/D 明显下降，肺内炎症反应明显降低。

3 讨 论

急性肺损伤是临床中一种常见的肺部并发症，它的严重阶段是 ARDS，具有毛细血管通透性增加、肺泡上皮细胞损伤以及炎症反应的激活等病理生理特点[7]，但其分子和细胞机制目前尚不清楚。研究发现其本质是机体的一种失控性炎症反应[8-9]。本研究结果表明，经气管插管滴入 LPS 后肺组织苏木精-伊红染色提示组织病理学损伤，表现为广泛的炎症细胞浸润，肺泡毛细血管屏障受损，肺泡间隔增宽，肺泡和肺间质充血、水肿。LPS 组小鼠血清和肺泡灌洗液中各种炎症因子，如 TNF-α、IL-6、IFN-γ、CXCL1、CXCL8 的表达均明显升高，这些结果都是急性肺损伤的有力证据，表明成功建立了 ALI 模型。而 IL-1β 属于 IL-1 家族的成员，是重要的炎症促进因子，单核巨噬细胞、内皮细胞、淋巴细胞等产生和释放的 IL-1β 作为信号共刺激 T 细胞活化，是自然免疫中宿主炎症应答的介质[10-11]。在急性肺损伤中，通过对肺局部炎症反应释放的介质，特异性作用于单核巨噬细胞和血管内皮细胞，合成和诱导 IL-1β。而 IL-1β 大量分泌入机体内血流时，则可引起机体失控性炎症反应，导致 TNF-α、IL-6、IFN-γ 等促炎因子释放，被认为是前炎症因子的“触点”，在急性肺损伤中发挥机体促进失控性炎症反应的靶点作用[12]。而 IL-1β 作为促进失控性炎症反应的靶点因子，它的分泌、活化过程又会受到哪些机制调控呢？据有关研究发现，NLRP3（NOD-LRRS，containing pyrin domain 3）炎性小体作为固有免疫的重要组分在机体免疫反应和疾病发生过程中具有重要作用，它属于 NLR（NOD-like receptor）家族成员之一，为机体感知内源性和外源性的危险信号以及危险信号引起的炎症反应的有序发生提供平台[13]。在过去近 10 年的研究中，人们对炎性小体及相关蛋白在天然免疫免疫系统中的功能有了深入认识，作为炎性小体 NLRP3 信号通路影响 IL-1β 释放的药物已被用于治疗自主炎症性疾病，比如，一种在糖尿病治疗中广泛应用的药物格列本脲（glyburide）就是通过抑制 NLRP3 炎性小体的功能从而抑制 IL-1β 释放发挥作用[14]。炎性小体 NLRP3 在治疗免疫性疾病的机制有很多，有研究发现，NLRP3 能够直接或通过接头蛋白 ASC 招募 caspase-1 前体，产生活化 caspase-1 发挥促炎作用[15]。NLRP3 启动子区域有两个 NF-κB 的结合位点（nt-1303 to nt-1292，nt-1238 to nt-1228），使得与 NF-κB 特异性结合，上调 NLRP3 的表达从而促进 caspase-1 的活化和 IL-1β 的成熟分泌[16]。而在经气道滴注脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）诱导的急性肺损伤中，活化的炎性小体 NLRP3 能够显著激活 caspase-1，从而切割 IL-1β 前体导致 IL-1β 在肺内大量释放发挥失控性炎症[17]。

众所周知，细胞死亡分为程序性细胞死亡和细胞坏死 2 种方式。其中，程序性细胞死亡又具有Ⅰ型（细胞凋亡）和Ⅱ型（自噬性细胞死亡）2 种类型。自噬是广泛存在于真核细胞中的细胞内蛋白降解途径[18]。在真核细胞内，物质分解代谢主要有 2 条途径，即泛素蛋白酶体途径和自噬途径。泛素蛋白酶体途径以将待降解的蛋白质泛素化作为标志，并最终通过蛋白酶体将其分解，主要是发挥选择性降解细胞内短效蛋白质的作用；而细胞内的长效大分子和受损细胞器则主要通过自噬途径降解[19-20]。因此，适度的自噬有利于维持机体细胞内环境的稳态，以适应外环境的变化，而超负荷的刺激将诱发机体过度自噬，导致细胞功能紊乱，严重者甚至引发炎症的瀑布性放大作用，导致机体出现多器官功能障碍综合征（multiple organ dysfunction syndrome，MODS）[21-22]。那么，过度自噬是否可能通过改变机体内 IL-1β 这一失控性炎症靶点的表达水平，进而促进急性肺损伤？为了验证上述推论，本研究使用 LPS 诱导小鼠急性肺损伤模型，探讨改变自噬水平对 IL-1β 的影响，进而影响急性肺损伤的进程。

3-MA 和雷帕霉素是经典的自噬抑制剂和诱导剂。作为自噬诱导剂，雷帕霉素研究较为广泛，其作用靶点为 mTOR，通过抑制 mTOR 磷酸化水平，增加细胞自噬水平发挥作用[23]。关于雷帕霉素在急性肺损伤中的作用研究，结果不尽相同。Yen 等研究发现，雷帕霉素诱导的自噬在脓毒血症诱导的急性肺损伤中起着保护作用[24]。Wang 等[25]研究发现在 LPS 诱导的急性肺损伤模型中，雷帕霉素通过 mTOR 途径抑制支气管肺泡灌洗液中炎症因子水平，但是小鼠急性肺损伤的严重程度和生存率并没有改变。Fiel-

haber等[26]发现雷帕霉素通过 mTOR 途径加重 LPS 诱导的急性肺损伤和凋亡。但作为经典的自噬抑制剂 3-MA 在急性肺损伤中研究较少，本研究发现自噬抑制剂 3-MA 可以有效缓解 LPS 诱导的急性肺损伤，对 ALI 有保护性作用。病理结果提示，3-MA 可以减轻肺部炎性细胞浸润和蛋白液渗出，减少肺出血和充血；通过 Western blot 检测，提示雷帕霉素增加机体自噬水平；通过 ELISA、PCR 检测，提示IL-1β、TNF-α、IL-6、IFN-γ、CXCL1、CXCL8 等炎症因子明显下降。综上可得：减轻机体过度自噬能够通过降低 IL-1β 炎症因子，进而发挥抑炎作用，减少 TNF-α、IL-6、IFN-γ 等促炎因子的释放，降低LPS 诱导的炎症反应，从而发挥对急性肺损伤的保护作用。

在本研究中，已经证实：减轻机体过度自噬能够通过降低 IL-1β 这一“靶点”炎症因子的释放对急性肺损伤发挥保护性作用，但抑制机体过度自噬能否通过降低肺内炎性小体 NLRP3 的活化程度，减少招募 caspase-1 前体，从而达到抑制 IL-1β 在肺内的释放发挥其保护作用这一途径目前尚未有相关文献报道，这将在本课题组的后续研究中去证实。

参 考 文 献

[1] Phua J, Badia JR, Adhikari NK, et al. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time: A systematic review [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(3): 220-227.

[2] Chiumello D, Brioni M. Severe hypoxemia:which strategy to choose [J]. Crit Care, 2016, 20(1): 132.

[3] Butt Y, Kurdowska A, Allen TC. Acute lung injury: a clinical and molecular review[J]. Arch Pathol Lab Med, 2016, 140(4): 345-350.

[4] Hudock KM, Liu Y, Mei J, et al. Delayed resolution of lung inflammation in Il-1rn-/- mice reflects elevated IL-17A/granulocyte colony-stimulating factor expression[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2012, 47(4): 436-444.

[5] Mizumura K, Cloonan SM, Haspel JA, et al. The emerging importance of autophagy in pulmonary diseases[J]. Chest, 2012, 142(5): 1289-1299.

[6] Ryter SW, Choi AM. Autophagy in the lung[J]. Proc Am Thorac Soc, 2010, 7(1): 13-21.

[7] Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome[J]. N Engl J Med, 2000, 342(18): 1334-1349.

[8] Puneet P, Moochhala S, Bhatia M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(1): L3-15.

[9] Williams AE, José RJ, Mercer PF, et al. Evidence for chemokine synergy during neutrophil migration in ARDS[J]. Thorax, 2016, Epub ahead of print.

[10] Geiser T, Atabai K, Jarreau PH, et al. Pulmonary edema fluid from patients with acute lung injury augments in vitro alveolar epithelial repair by an IL-1beta-dependent mechanism[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(6): 1384-1388.

[11] Wonnenberg B, Bischoff M, Beisswenger C, et al. The role of IL-1β in pseudomonas aeruginosa in lung infection[J]. Cell Tissue Res, 2016, 364(2): 225-229.

[12] 管向东，张政伟，隋 宏，等. 细胞因子 IL-1β IL-6 IL-10 肿瘤坏死因子-α 在急性肺损伤模型中动态变化的实验研究[C]. 北京：第十二届全国风湿病学学术会议，2007.

[13] Wang CY, Guo XC, Zhang JP. Research advances in NLRP3 inflammasome-related regulatory mechanisms[J]. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2015, 37(5): 618-622.

[14] Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, et al. Glyburide inhibits the cryopyrin/Nalp3 inflammasome[J]. J Cell Biol, 2009, 187(1): 61-70.

[15] Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes[J]. Cell, 2010, 140(6): 821-832.

[16] Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression[J]. J Immunol, 2009, 183(2): 787-791.

[17] Zhang Y, Li X, Grailer JJ, et al. Melatonin alleviates acute lung injury through inhibiting the NLRP3 inflammasome[J]. J Pineal Res, 2016, 60(4): 405-414.

[18] Bursch W. The autophagosomal lysosomal compartment inprogrammed cell death[J]. Cell Death Differ, 2001, 8(6): 569-581.

[19] Hussey S, Terebiznik MR, Jones NL. Autophagy: healthy eating and self-digestion for gastroenterologists[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2008, 46(5): 496-506.

[20] Hurley JH, Schulman BA. Atomistic autophagy: the structures of cellular self-digestion[J]. Cell, 2014, 157(2): 300-311.

[21] Gomes LC, Dikic I. Autophagy in antimicrobial immunity[J]. Mol Cell, 2014, 54(2): 224-233.

[22] Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases[J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(9): 709-730.

[23] Gao Y, Wang N, Liu L, et al. Relationship between mammalian target of rapamycin and autophagy in lipopolysaccharide-induced lung injury[J]. J Surg Res, 2016, 201(2): 356-363.

[24] Yen YT, Yang HR, Lo HC, et al. Enhancing autophagy with activated protein C and rapamycin protects against sepsis-induced acute lung injury[J]. Surgery, 2013, 153(5): 689-698.

[25] Wang L, Gui YS, Tian XY, et al. Inactivation of mammalian target of rapamycin (mTOR) by rapamycin in a murine model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury[J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(19): 3112-3117.

[26] Fielhaber JA, Carroll SF, Dydensborg AB, et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin augments lipopolysaccharide-induced lung injury and apoptosis[J]. J Immunol, 2012, 188(9): 4535-4542.

（责任编辑：冉明会）