脾多肽对急性肺损伤大鼠 TLR9 信号相关因子的影响*

苏俊孟[1**],郭 晖[2***],夏 飞[2],申梓玄[2],马华星[2],赵坤垟[2]
(1. 贵州医科大学,贵州 贵阳 550000; 2. 贵州医科大学附院 急诊科,贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的**:分析脾多肽对急性肺损伤(ALI)大鼠 Toll 样受体 9(TLR9)信号相关因子的影响。**方法**:60 只无特定病原体级(SPF)Wistar 大鼠,40 只采用 BIM-Ⅱ型水平式生物撞击机持续撞击右侧胸部复制 ALI 大鼠模型,造模成功后的大鼠均分为脾多肽组(n = 20,经耳静脉注射 5mg/Kg 脾多肽)及 ALI 组(n = 20,经耳静脉注射等量生理盐水);20 只作为对照组(经耳静脉注射等量生理盐水),注射 6 h 后处死大鼠,HE 染色观察 3 组大鼠肺组织病理学改变,ELISA 法检测大鼠灌洗液中肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素-8(IL-8)和白细胞介素-6(IL-6)的水平,RT-PCR 法检测肺组织中 NF-κB、髓样分化因子(Myd88)、Toll 样受体(TLR9)mRNA 的水平。**结果**:HE 染色显示,ALI 与脾多肽组均出现了 ALI 表现;与对照组比较,ALI 组和脾多肽组大鼠 TNF-α、IL-8 及 IL-6 蛋白表达水平,NF-κB、Myd88 及 TLR9 mRNA 的表达均增加,脾多肽组低于 ALI 组,差异有统计学意义(P < 0.05)。**结论**:脾多肽可显著下调 ALI 大鼠 TLR9 信号相关因子表达水平,降低 ALI 程度。

[关键词] 脾多肽; 急性肺损伤; Toll 样受体 9; 创伤; 髓样分化因子
[中图分类号] R641;R619.5;R256.1 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2017)03-0296-04
DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.03.011

Influenc of Spleen Polypeptide on TLR9 Signal Related Factors in Rats with Acute Lung Injury

SU Junmeng[1], GUO Hui[2], XIA Fei[2], SHEN Zixuan[2], MA Huaxing[2], ZHAO Kunyang[2]
(*1. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Emergency Department, the Affiliated Hospital of Guizhou Meidcal University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the effect of spleen polypeptide on Toll-like receptor 9 (TLR9) signal-related factors in rats with acute lung injury(ALI). **Methods**: Sixty specific pathogen free Wistar rats were used as the research object,of which 20 were as the control group (by ear intravenous injection of normal saline at 5 mg/Kg, group CON), and the other 40 rats were prepared as ALI model by continuously striking with a BIM-Ⅱ type biological impact machine on the right chest. Then, the model rats were divided into ALI group (by ear intravenous injection normal saline at 5 mg/Kg)(group ALI) and spleen polypeptide group (by ear intravenous injection of spleen polypeptides at 5 mg/Kg) (group SPP). In 6 h after injection the rats were sacrificed, and lung histopathological changes were observed with HE staining technique, tumor necrosis factor (TNF-α), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-6(IL-6) in rat lavage fluid were assayed by ELISA, and the changes of NF-κB, Myd88 and Toll-like receptors (TLR9) mRNA in lung tissue were detected by RT-PCR. **Results**: HE staining observation showed ALI characteristics in groups ALI and SPP. Levels of TNF-α, IL-8, IL-6, and ex-

*[基金项目]安徽省科学技术厅(1604f0804011),安徽省 2016 年公益性技术应用研究联动计划项目[科技(2016)16 号]
**贵州医科大学 2014 级硕士研究生
***通信作者 E-mail:1051598132@qq.com
网络出版时间:2017-3-18 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170318.2320.020.html

pression of NF-κB, Myd88, and TLR9mRNA were higher in groups ALI and SPP than in group CON. And all of those indexes were higher in group ALI than in group SPP. The differences were statistically significant($P<0.05$). **Conclusion**: Spleen polypeptide can significantly down-regulate the TLR9 signal-related factors in ALI rats, and reduce the degree of lung injury.

[**Key words**] spleen polypeptide; acute lung injury; Toll-like receptor 9; trauma; myeloid differentiation factor

急性肺损伤(acute lung injury,ALI)是指因各种直接或间接因素作用下肺泡上皮细胞或者是毛细血管内皮细胞(endothelial cell,ECs)损伤,形成弥漫性肺间质以及肺泡水肿所致的急性低氧性呼吸功能不全[1]。通常情况下,ALI 是患者出现呼吸窘迫后,病情没有得到有效控制发展而来[2]。脾多肽是从健康小牛提取的多肽类免疫调节药,对机体免疫机能有双向调节作用,能够纠正机体免疫功能紊乱,具有激活和增强机体非特异性免疫功能的作用,Toll 样受体(toll like receptor 9,TLR9)是参与非特异性免疫的一类重要蛋白质分子,并对特异和非特异性两种免疫有很好的连接作用,TLR9 相关因子包括肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-8(IL-8)、白细胞介素-6(IL-6)、NF-κB、髓样分化因子(Myd88)、TLR9 等。既往临床针对 ALI 的研究多集中于临床疗效方面,但关于 TLR9 相关因子与 ALI 之间的关联的研究较少。本次研究围绕脾多肽对 ALI 大鼠 TLR9 信号相关因子的作用展开分析,现报道如下。

1　材料与方法

1.1　动物与分组

60 只 SPF 级 Wistar 大鼠于 2016 年 5 月 ~6 月购自贵州医科大学动物实验中心,体质量≥200 g,周龄≥20 周。随机均分为脾多肽组、ALI 组及对照组。

1.2　方法

1.2.1　ALI 模型制备　参考文献[3],40 只大鼠采用 3% 戊巴比妥钠 5 mg/kg 经耳缘静脉注入,麻醉后,取仰卧位固定,剪去颈部手术视野毛并切开皮肤组织,钝性分离右侧颈总动脉以及颈内静脉;利用第三军医大学野战外科研究所研发的 BIM-Ⅱ型水平式生物撞击机持续撞击大鼠右侧胸部复制 ALI 模型,撞击点位位于大鼠右侧第 3、4 肋间与腋中线相交汇处,撞击模式为静态撞击,驱动压力 500 kPa,撞击面积 2 cm^2,胸壁压缩 2 cm,撞击时相均为吸气末。

1.2.2　分组及处理方法　造模成功的 Wistar 大鼠均分为脾多肽注射组和 ALI 组,剩余 20 只大鼠为对照组;脾多肽组大鼠经耳静脉以 5 mL/kg 剂量注射脾多肽注射液(吉林丰生制药有限公司,国药准字 H22026497),ALI 组和对照组经耳静脉注射同等剂量的生理盐水,以后所有大鼠均以 1 mL/(kg·h)剂量维持[4]。

1.2.3　观察指标　注射 6 h 后,所有大鼠于麻醉条件下处死,结扎其右支气管,抽取 5 mL 生理盐水经气管处实施左肺灌洗,灌洗液在肺部 30 s 以上并反复回抽 5 次,收集灌洗液,离心获得上清液,采用酶联免疫吸附实验(ELISA)测定上清液中 TNF-α、IL-8 及 IL-6 的水平,取一部分肺脏组织固定于中性的福尔马林溶液之中,常规制备病理切片,采用 HE 染色后进行组织学观察;另一部分病理组织采用 RT-PCR 肺组织中 NF-κB、Myd88、TLR9 mRNA 的水平,参考文献[5]设计 RT-PCR 引物,采用美国 ABI7700 实时荧光定量 PCR 检测,循环参数为 95 ℃ 120 s,92 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,40 个循环后收集荧光信号,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 的相对表达量[6]。

1.3　统计学方法

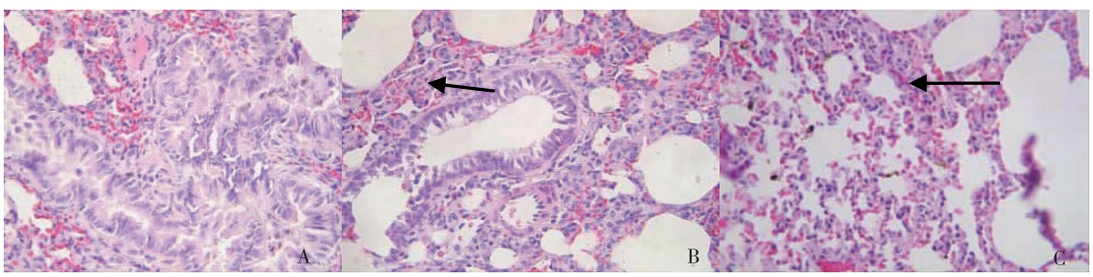
所有数据均采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理,计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$) 表示,数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　肺组织病理学改变

HE 染色结果显示,对照组大鼠肺组织及肺泡结构正常,肺组织内的肺泡结构和各级支气管上皮完整,肺泡间隔正常,无炎症细胞浸润,肺间质无明显水肿;ALI 组大鼠肺间隔明显增宽、增厚,并发弥漫性肺间质水肿,肺泡腔融合,可见大量的炎性细胞渗出、积聚,肺泡腔内可见明显出血,部分肺组织有实变。脾多肽组大鼠肺组织及肺泡结构病理改

变较 ALI 组轻，仅肺内毛细血管扩张充血，部分肺组织内支气管周围，血管周围及肺泡间隔中可见嗜酸性，嗜中性粒细胞浸润，亦有少量淋巴细胞及单核细胞出现。见图 1。



注：A 为对照组，B 为 ALI 组，C 为脾多肽组

图 1　3 组大鼠肺组织学观察（HE，×40）

Fig. 1　Pictures of lung tissue of rats in the three groups

2.2　肺泡灌洗液中 TNF-α、IL-8、IL-6 水平

与对照组比较，ALI 组和脾多肽组大鼠肺泡灌洗液中 TNF-α、IL-8 及 IL-6 水平升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与 ALI 组比较，脾多肽组大鼠肺泡灌洗液中 TNF-α、IL-8 及 IL-6 水平反而降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 1 。

表 1　3 组大鼠肺泡灌洗液中 TNF-α、IL-8 及 IL-6 水平

Tab. 1　Levels of TNF-α, IL-8, and IL-6 in rat lung lavage fluid of the 3groups

组别	肺泡灌洗液（μg/L）		
	TNF-α	IL-8	IL-6
对照组	70.44 ± 5.56	15.46 ± 4.24	28.50 ± 3.50
脾多肽组	140.66 ± 5.34$^{(1)}$	29.88 ± 4.30$^{(1)}$	40.38 ± 3.62$^{(1)}$
ALI 组	210.49 ± 5.41$^{(1)(2)}$	40.67 ± 4.33$^{(1)(2)}$	62.49 ± 3.61$^{(1)(2)}$
t	8.554	8.443	8.420
P	0.005	0.017	0.022

$^{(1)}$ 与对照组比较，$P<0.05$；$^{(2)}$ 与脾多肽组比较，$P<0.05$

2.3　肺组织中 NF-κB、Myd88、TLR9 mRNA 的表达

与对照组比较，ALI 组和脾多肽组大鼠肺组织中 NF-κB、Myd88 及 TLR9 mRNA 水平升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；与 ALI 组比较，脾多肽组大鼠肺泡灌洗液中 NF-κB、Myd88 及 TLR9 mRNA 水平反而降低，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 2。

3　讨论

ALI 是目前临床中较为常见的病症类型，依据是否原发于肺部可以分为肺内因素以及肺外因素 2 种。近些年来 ALI 发生率显著提高。脾多肽是目前临床用于治疗原发性以及继发性细胞免疫缺陷疾病、呼吸道及肺部感染、放化疗所致的白细胞减少症、白血病、再生性障碍贫血、淋巴瘤及其他恶性肿瘤的治疗[7]。目前，已经有将脾多肽应用于慢性阻塞性肺病（chronic obstructive pulmonary disease，COPD）急性加重期的治疗，但是该药物是否能够应用于 ALI 以及具体的作用机理目前尚未有研究涉及。因此，针对脾多肽与 ALI 展开研究，不仅能够丰富现有研究体系内容，还可以丰富临床用药手段，具有重要的研究价值和指导意义。

表 2　3 组大鼠肺组织中 NF-κB、Myd88 及 TLR9 mRNA 表达（$\bar{x} \pm s$）

Tab. 2　Levels of expression of NF-κB, Myd88, and TLR9 mRNA in lung tissue of rats in the three groups

组别	肺组织		
	NF-κB	Myd88	TLR9
对照组	0.98 ± 0.10	0.99 ± 0.11	1.00 ± 0.13
脾多肽组	3.85 ± 0.44$^{(1)}$	4.40 ± 0.20$^{(1)}$	4.09 ± 0.15$^{(1)}$
ALI 组	5.72 ± 0.50$^{(1)(2)}$	5.95 ± 0.22$^{(1)(2)}$	6.11 ± 0.18$^{(1)(2)}$
t	8.341	8.337	8.298
P	0.034	0.037	0.041

$^{(1)}$ 与对照组比较，$P<0.05$；$^{(1)}$ 与脾多肽组比较，$P<0.05$

肺损伤相关的进展机制中，过度炎症反应有着极为关键的地位。研究发现，肺挫伤，实质上为肺组织出现撕裂伤。早期患者血液成分或者是血浆开始渗出，并流入肺泡[8]。随着损伤的加重，肺泡膜的厚度增多，肺原本的通透、弥散功能均受到损伤，使肺挫伤患者出现显著的低氧状态[9]。肺挫伤时，机体细胞和体液免疫都同时发生作用；促进炎性因子大量地集聚，肺泡毛细血管附近的毛细血管通透

性提高,使渗出加剧。近年的研究还发现,TLR9 在对坏死细胞 DNA 进行识别之后,可以再次被激活[10]。TLR9 一旦被激活后,就利用 TIR 区和 MyD88 分子之间进行绑定,激活 MyD88 信号通路,对 IL-1 受体及其激酶(IRAK4、IRAKI)进行招募[11-12];同时对转化生长因子 G 和激酶(TAKl)进行激活,使 NF-κB 也将重新拥有活性。此时,IL-6 和 TNF-α 等多种促炎症因子将会大幅地表达,患者出现炎症反应[13]。本次研究数据证实,在注入脾多肽后,大鼠的 TLR9 相关因子指标虽然仍然高于对照组,但是却明显低于 ALI 大鼠。推测脾多肽进入到 ALI 大鼠体内后能够对激活的 TLR9 信号通路而发挥抑制 ALI 的作用,提示脾多肽可显著下调 ALI 大鼠 TLR9 信号相关因子表达水平,降低 ALI 程度。但脾多肽治疗 ALI 用于人体是否有效的有效性,尚需要今后临床研究的验证。

4　参考文献

[1] 赵彦瑞,刘洋,王东,等. PI3K/Akt 和 JAK2/STAT3 信号转导通路在 SO_2 抗大鼠肢体缺血再灌注致急性肺损伤中的作用[J]. 中国病理生理杂志,2015(11):2076-2082.

[2] 苏伟,欧娅,杨自力,等. Toll 样受体 9 信号通路在重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜屏障功能障碍中的作用[J]. 广东医学,2014(23):3609-3612.

[3] 彭朝胜,盛晓燕,田力,等. 脾多肽辅助治疗 COPD 急性加重期患者的临床疗效及安全性观察[J]. 北京医学,2015(2):184-187.

[4] 黄翠源,潘灵辉,林飞,等. 肺泡巨噬细胞 TLR4/MyD88 信号通路参与并介导了机械通气所致的肺损伤[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2015(2):182-185,189.

[5] 洪辉华,杨珺超,高润娣,等. 芪冬活血饮对急性肺损伤大鼠 TLR4/NF-κB 炎症信号通路的影响[J]. 温州医科大学学报,2015(5):332-337.

[6] 刘洋,王守田. 右美托咪啶对内毒素血症大鼠急性肺损伤 TLR9 信号相关因子的作用[J]. 解剖科学进展,2015(6):635-638.

[8] 曾宝梅,王予川,黄栋. 高氧肺损伤中肺泡形成基因 P311 的动态变化及意义[J]. 贵阳医学院学报,2016(1):27-31.

[9] 岳冬梅,佟雅洁,薛辛东. 肺组织肺泡表面活性物质相关蛋白与高氧肺损伤肺水肿的关系[J]. 新乡医学院学报,2016(12):1036-1040.

[10] 王子威,杨丽君. TLR-9、MyD88 及 NF-κB 在过敏性紫癜中的表达及意义[J]. 中国现代医生,2016(29):9-13.

[11] 徐晓明,尹春梅,严志凌,等. 云南汉族人群 TLR9 基因多态性与宫颈癌发生及发展的相关性[J]. 贵州医科大学学报,2017(1):1-5.

[12] Boi M, Gaudio E, Bonetti P, et al. The BET bromodomain inhibitor OTX015 affects pathogenetic pathways in preclinical B-cell tumor models and synergizes with targeted drugs.[J]. Clinical Cancer Research, 2015(7):1628-1638.

[13] Gao C, Kozlowska A, Nechaev S, et al. TLR-9 signaling in the tumor microenvironment initiates cancer recurrence after radiotherapy[J]. Cancer Research, 2013(24):7211-7221.

(2017-01-02 收稿,2017-03-01 修回)
中文编辑:文箐颖;英文编辑:苏晓庆

连续性数据分组的正确表示

问　“0~≤10 岁,>10~≤20 岁,>20~≤30 岁……”的表示正确吗?

答　这其实是一个涉及连续性数据正确分组的问题。在少数书刊中,这组数据被莫名其妙地错写为“0~10 岁,~20 岁,~30 岁……”。而在众多书刊中,这组数据写为“0~10 岁,10~20 岁,20~30 岁……”。显然也是错误的,错在相邻 2 组数据中都有一个数值重叠,如 20 岁,既可属于“10~20 岁”组,也可属于“20~30 岁”组。将其改写为“0~≤10 岁,>10~≤20 岁,>20~≤30 岁……”,纠正了相邻 2 组数据中存在数值重叠的错误,当然是正确的;但是,从科学表述的角度去衡量,这一表示中明显存在完全多余的符号“≤”,“0~≤10 岁”就是“0~10 岁”,因此,这组数据最科学、简明、正确的表示应为“0~10 岁,>10~20 岁,>20~30 岁,……”。

《贵州医科大学学报》编辑部