

巨噬细胞移动抑制因子在脓毒症小鼠中的作用及其干预研究

张振辉 陈晓辉 林佩仪 江慧琳 熊旭明 朱永城

【摘要】 目的 观察巨噬细胞移动抑制因子(MIF)在脓毒症小鼠血清和肺组织中的表达及 MIF 拮抗剂 ISO-1 对脓毒症小鼠存活率的影响。方法 用盲肠结扎穿孔术(CLP)建立脓毒症 BALB/c 小鼠模型。40 只小鼠随机分为假手术组及 CLP 后 12、24、36、48 h 组,各取 8 只小鼠心脏血,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 MIF 水平,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测肺组织中 MIF 的 mRNA 和蛋白表达。另选择 40 只小鼠制备脓毒症模型,观察用 ISO-1 干预后脓毒症小鼠 10 d 的存活率。结果 与假手术组比较,脓毒症小鼠血清 MIF 水平逐渐升高,36 h 达峰值,48 h 有所下降,但仍高于假手术组(P 均 <0.01);肺组织 MIF mRNA 和蛋白表达自 12 h 起即明显增加,之后逐渐增加至 48 h 达峰值($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。使用 MIF 拮抗剂 ISO-1 的脓毒症组小鼠 10 d 存活率为 60% (12/20),较脓毒症对照组 25% (5/20) 明显升高($P < 0.05$)。结论 MIF 可能作为晚期炎症细胞因子参与脓毒症小鼠的发病过程,使用 MIF 拮抗剂 ISO-1 能提高脓毒症小鼠的存活率,提示 MIF 可作为脓毒症治疗的靶向。

【关键词】 巨噬细胞移动抑制因子; 脓毒症; 炎症因子; 巨噬细胞移动抑制因子拮抗剂 ISO-1

Role of macrophage migration inhibitory factor in mice with sepsis and after effect of its intervention

ZHANG Zhen-hui*, CHEN Xiao-hui, LIN Pei-yi, JIANG Hui-lin, XIONG Xu-ming, ZHU Yong-cheng. * Intensive Care Unit, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, Guangdong, China

Corresponding author: CHEN Xiao-hui, Email: cxhgz168@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression profile of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in serum and lung tissues of mice with sepsis, and to explore the effect of MIF antagonist ISO-1 on sepsis in a murine sepsis model. Methods Sepsis was reproduced in 40 mice by cecal ligation and puncture (CLP). Heart blood was obtained from 8 mice each at 12, 24, 36, 48 hours after CLP. The content of MIF in serum was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). MIF mRNA and protein expressions in lung tissues of septic mice were assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) or Western blotting. Another group of 40 mice were selected to investigate the role and the impact of MIF antagonist ISO-1 in septic mice. Results The content of MIF in serum was higher in septic mice than that in sham operation group, and it peaked at 36 hours, and decreased at 48 hours, but still higher than that in sham operation group (all $P < 0.01$). The MIF mRNA and protein expression in lung tissues of septic mice were higher than those in sham operation group, beginning at 12 hours, and peaked at 48 hours ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). ISO-1, which was the antagonist of MIF, could elevate the surviving rate of animals with sepsis [60% (12/20) vs. 25% (5/20), $P < 0.05$]. Conclusion MIF plays a role as a late mediator in sepsis, with a high expression of MIF in serum and lung tissue. ISO-1 can elevate the surviving rate in murine model of sepsis. It is concluded that MIF could be taken as a potential target of treatment of sepsis.

【Key words】 macrophage migration inhibitory factor; sepsis; inflammatory cytokine; ISO-1

脓毒症时极易并发多器官功能障碍综合征(MODS),是重症监护病房(ICU)非心血管疾病的主要死亡原因之一^[1],而其发生发展的病理生理机制目前仍不十分明确,已经成为临床救治的重要障碍。巨噬细胞移动抑制因子(MIF)是一种重要的炎症介质,其参与了脓毒症的发病过程,高水平的 MIF 通过激活下游炎症因子,负反馈调节糖皮质激素

的抗炎作用等机制,影响机体的适应性免疫反应。MIF 介导了内毒素对啮齿类动物的致死效应,使用抗 MIF 抗体能减少细菌性腹膜炎小鼠的死亡率^[2]。MIF 还可直接参与脓毒症急性肺损伤(ALI),从而加重脓毒症的器官功能损害^[3],但关于 MIF 在脓毒症机体组织器官的表达规律和 MIF 对组织器官的损伤机制,目前仍不十分清楚。本研究中通过建立脓毒症动物模型,探讨 MIF 在脓毒症小鼠组织中的表达规律,并通过抑制 MIF 的作用,观察其对脓毒症小鼠存活率的影响。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.08.012

作者单位:510260 广东广州,广州医学院第二附属医院危重病学科(张振辉、熊旭明),急诊科(陈晓辉、林佩仪、江慧琳、朱永城)

通信作者:陈晓辉,Email:cxhgz168@126.com

1 材料与方 法

1.1 实验动物及主要试剂:清洁级雄性 BALB/c 小鼠,体重 23~28 g,购自广东省医学实验动物中心。小鼠 MIF 定量酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(上海森雄科技有限公司),组织总 RNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司),反转录试剂盒(美国 NEB 公司),小鼠 MIF、 β -肌动蛋白(β -actin)引物(上海生工生物公司合成),聚合酶链反应(PCR)试剂盒(大连宝生物公司);兔抗 MIF 抗体(美国 Zymed 公司);MIF 拮抗剂 ISO-1(德国 Calbiochem 公司)。

1.2 动物分组:按随机数字表法将 40 只 BALB/c 小鼠分为假手术组及脓毒症 12、24、36 和 48 h 组,每组 8 只。假手术组观察至术后 24 h,其余各组于相应时间点处死小鼠后取全血和肺组织待检。另取 40 只 BALB/c 小鼠,按随机数字表法分为脓毒症对照组和 ISO-1 干预组,每组 20 只,进行 ISO-1 干预实验,以观察动物存活率。

1.3 脓毒症动物模型制备:用戊巴比妥腹腔注射麻醉小鼠,采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备小鼠脓毒症模型^[4]。术毕立即腹腔注射生理盐水 20 ml/kg 抗休克。假手术组只将盲肠拉出腹外后还纳,关腹。

1.4 检测指标及方法:于相应时间点麻醉小鼠,开胸取心脏全血,离心取血清于-80℃保存备用;同时取双侧肺组织置于液氮中保存备用。

1.4.1 血清 MIF 浓度测定:采用 ELISA 法,按照试剂盒说明书操作。将标准 MIF 稀释 2、4、8、16、32、64、128 倍,制备标准曲线;每孔加 100 μ l 待测标本,室温孵育 2 h,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗板 5 次;每孔加 50 μ l 第一抗体工作液,室温孵育 1 h,用 PBS 洗板 5 次;每孔加酶标抗体工作液 100 μ l,室温孵育 1 h,用 PBS 洗板 5 次;每孔加 100 μ l 底物溶液,避光室温孵育 10 min,显色;每孔加 50 μ l 终止液,在酶标仪上于波长 492 nm 处判读结果。

1.4.2 肺组织 MIF mRNA 表达测定:采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)。提取肺组织总 RNA,进行纯度鉴定,以 β -actin 为内参照。MIF 和 β -actin 引物序列设计按文献[5-6]方法,按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA。按 PCR 试剂盒说明书进行 PCR 扩增,反应条件:94℃预变性 2 min;94℃变性 45 s,58℃退火 45 s,72℃延伸 60 s,重复 30 个循环;72℃延伸 5 min,终止反应。取 5 μ l 扩增产物常规进行琼脂糖凝胶电泳,用凝胶分析仪拍照,并以 MIF 和 β -actin DNA 条带的吸光度(A)比值来表示 MIF mRNA 的表达水平。

1.4.3 肺组织 MIF 蛋白表达测定:采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)。将小鼠肺组织用细胞裂解液匀浆、静置 20 min,离心后取上清液,用常规方法测蛋白浓度。取蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,脱脂奶粉封闭液中封闭 1 h,加兔抗 MIF 抗体或鼠抗 β -actin 孵育。用 TBST 洗膜,加入抗兔含辣根过氧化物酶的 IgG 抗体(IgG-HRP)或抗鼠 IgG-HRP,再加入 HRP-抗生物素抗体孵育。TBST 洗膜后加入增强化学发光(ECL)试剂,经压片、曝光、洗片、图像扫描,对条带进行灰度及 A 值测定。

1.4.4 ISO-1 对脓毒症的干预作用:脓毒症动物模型制备方法同上,ISO-1 干预组于术后连续 3 d 腹腔注射 ISO-1(用二甲亚砜(DMSO)溶解成 5 g/L 溶液,每次 20 mg/kg,每日 1 次),并于术后立即腹腔注射亚胺培南/西司他丁(0.5 mg/kg);脓毒症对照组则用 DMSO 0.05 ml 代替 ISO-1。两组动物饲养至术后 10 d,每日记录存活动物数,统计存活率。

1.5 统计学分析:采用 SPSS 12.0 统计软件,计量资料以均数士标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用单因素方差分析(one-way ANOVA),单因素生存分析用对数秩检验(Log-rank), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

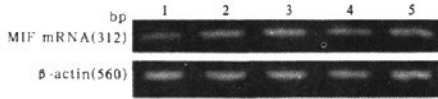
2.1 脓毒症小鼠血清 MIF 浓度(表 1):与假手术组比较,脓毒症 12 h 组小鼠血清 MIF 浓度即有所升高,但差异无统计学意义;24 h 升高明显,36 h 达峰值,48 h 略有下降,但仍维持在较高水平,差异有统计学意义(P 均 <0.01)。

表 1 各组小鼠血清 MIF 浓度及肺组织 MIF 的 mRNA 和蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

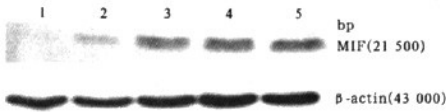
组别	动物数	血清 MIF (μ g/L)	肺组织 MIF 表达	
			mRNA	蛋白
假手术组	8	61.99 \pm 11.86		
脓毒症 12 h 组	8	93.52 \pm 28.45	215.77 \pm 73.09 ^a	224.03 \pm 43.08 ^a
24 h 组	8	136.40 \pm 36.64 ^b	283.56 \pm 72.57 ^b	278.33 \pm 78.99 ^b
36 h 组	8	158.46 \pm 39.97 ^b	326.93 \pm 91.73 ^b	324.28 \pm 63.39 ^b
48 h 组	8	139.70 \pm 31.22 ^b	379.89 \pm 88.56 ^b	328.88 \pm 96.38 ^b

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$

2.2 脓毒症小鼠肺组织 MIF mRNA 和蛋白表达水平(表 1;图 1~2):随脓毒症时间延长,小鼠肺组织 MIF mRNA 和蛋白表达均于 12 h 开始明显增加,48 h 达峰值,与假手术组比较差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

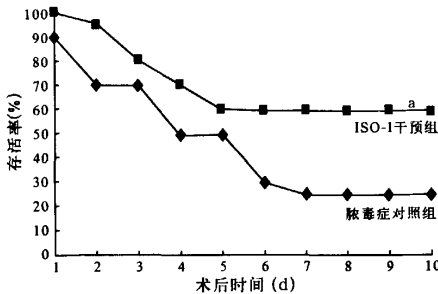


1:假手术组,2~5依次为脓毒症12、24、36、48 h组
图1 RT-PCR检测各组小鼠肺组织MIF mRNA表达



1:假手术组,2~5依次为脓毒症12、24、36、48 h组
图2 Western blotting检测各组小鼠肺组织MIF蛋白表达

2.3 ISO-1对脓毒症小鼠存活率的影响(图3):脓毒症对照组小鼠随时间延长存活率逐渐下降,7 d时趋于平稳。给脓毒症小鼠注射MIF拮抗剂ISO-1后,小鼠存活率明显升高,且于5 d时趋于平稳。ISO-1干预组10 d存活率[60%(12/20)]较脓毒症对照组[25%(5/20)]明显提高($P < 0.05$)。



注:与脓毒症对照组比较,* $P < 0.05$

图3 ISO-1对脓毒症小鼠存活率的影响

3 讨论

脓毒症指由感染引起的全身炎症反应综合征(SIRS),其发病机制复杂,炎症介质“瀑布样”释放、促炎/抗炎介质平衡失调、免疫功能紊乱等机制在其发生发展过程中起重要作用,其中细胞因子的作用显著^[7-8]。既往的研究多靶向于脓毒症发病早期的炎症因子,而事实上对患者进行干预治疗时,可能脓毒症过程的整个级联反应已经启动。因此,国外一些研究机构开始寻找晚期炎症因子,以便扩大脓毒症治疗的时间窗。目前,国内外已有关于高迁移率族蛋白B1(HMGB1)作为晚期炎症因子参与脓毒症发病及其相关机制的研究报道^[9-11],MIF是否有类似的作用,目前仍不清楚。

MIF是集细胞因子、神经-内分泌激素和酶特

性于一身的多效能蛋白分子,可抑制巨噬细胞的迁移,使巨噬细胞聚集在分泌MIF的组织部位,并促进多种促炎细胞因子如NO、前列腺素(PGE₂)等的分泌,加重炎症反应^[12-13]。Calandra等^[14]报道MIF参与了脓毒症的病理生理过程,并介导了内毒素对实验动物的致死效应,使用抗MIF抗体能减少细菌性腹膜炎小鼠的死亡率。在小鼠内毒素血症模型中,给予脂多糖(LPS)诱导的脓毒症小鼠注射重组MIF蛋白,可导致小鼠死亡,提示MIF能促进LPS的毒性;给注射致死量LPS的小鼠注射抗MIF抗体,则可能避免小鼠的死亡^[15]。

Lehmann等^[16]报道严重脓症患者血清MIF水平高于健康组4~5倍;脓毒性休克患者血清MIF水平与病死率显著相关^[17];多发性创伤患者MIF水平的升高则与血、尿及伤口细菌培养阳性相关^[18]。本实验中通过采用CLP方法建立腹腔革兰阴性(G⁻)菌感染脓毒症模型,结果显示,假手术组血清中MIF有基础水平的表达,CLP后24 h开始升高,至36 h达高峰,48 h有所下降,但仍维持较高水平,这与Al-Abed等^[4]报道的趋势一致,提示MIF作为晚期炎症因子参与了脓毒症的发病。

脓毒症通常可导致ALI/急性呼吸窘迫综合征(ARDS),为此,本研究中设计检测MIF在脓毒症小鼠肺组织的表达,探讨MIF在组织局部表达的规律。在正常肺组织,如支气管上皮组织、肺泡毛细血管内皮和肺泡巨噬细胞可低水平表达MIF^[19]。在ARDS患者的肺组织中,MIF的表达则上调,并且MIF扩散入肺泡腔,增加了肺泡炎症反应^[3]。Gao等^[20]的研究证实,在ALI动物模型的肺组织中,MIF mRNA和蛋白表达均升高,并认为MIF是ALI的生物标记分子。本研究结果显示,脓毒症小鼠肺组织mRNA在CLP后12 h已较假手术组升高,而且在CLP后48 h升高更明显;用Western blotting检测各时间点肺组织MIF蛋白亦较假手术组明显升高,且升高趋势与MIF mRNA表达趋势一致,证实MIF在肺组织有持续高水平的表达。本实验中设计检测的时间点最长是在CLP后48 h,MIF在肺组织的表达是否在CLP后48 h达高峰,有待设计更长的检测时间进一步确定。

MIF具有多巴色素互变异构酶的活性,小分子化合物ISO-1能与MIF互变异构酶活性位点特异性结合,从而抑制MIF的酶活性。Al-Abed等^[4]证实ISO-1干预后抑制LPS诱导的野生型脓毒症小鼠巨噬细胞释放肿瘤坏死因子(TNF),在CLP和

LPS 诱导的脓毒症小鼠动物实验中,均证实给小鼠注射 ISO-1 后能提高存活率。本实验中给脓毒症小鼠腹腔分次注射 ISO-1,结果显示,小鼠 10 d 存活率由 25% 上升至 60%,并且与临床治疗脓毒症的时间窗吻合,提示这种小分子 MIF 抑制物可能成为临床治疗脓毒症的有效药物。

综上所述,MIF 可能作为晚期细胞因子参与小鼠脓毒症的发病过程,MIF 在脓毒症小鼠血清和肺组织中表达均增高,使用 MIF 拮抗剂 ISO-1 能提高脓毒症小鼠的存活率,提示 MIF 可作为脓毒症治疗的靶向。

参考文献

- [1] Padkin A, Goldfrad C, Brady AR, et al. Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. *Crit Care Med*, 2003, 31(9):2332-2338.
- [2] Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(10):791-800.
- [3] Donnelly SC, Haslett C, Reid PT, et al. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat Med*, 1997, 3(3):320-323.
- [4] Al-Abed Y, Dabideen D, Aljabari B, et al. ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsis. *J Biol Chem*, 2005, 280(44):36541-36544.
- [5] Shimizu T, Nishihira J, Watanabe H, et al. Macrophage migration inhibitory factor is induced by thrombin and factor Xa in endothelial cells. *J Biol Chem*, 2004, 279(14):13729-13737.
- [6] Xiao S, Zhang X, Mann KK, et al. Changes in sensitivity of peripheral lymphocytes of autoimmune gld mice to FasL-mediated apoptosis reveal a mechanism for the preferential deletion of CD4⁺ CD8⁻ B220⁺ T cells. *Int Immunol*, 2004, 16(5):759-766.
- [7] 林洪远, 盛志勇. 脓毒症免疫调节治疗的新思路. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(2):67-69.
- [8] 李海燕, 梁聚, 卢中秋, 等. 抗菌药物对创伤弧菌脓毒症大鼠血清抗炎/促炎细胞因子的影响. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(1):53-54.
- [9] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 1999, 285(5425):248-251.
- [10] 刘辉, 姚咏明, 董月青, 等. 高迁移率族蛋白 B1 诱导巨噬细胞 Janus 激酶/信号转导及转录激活子通路活化的研究. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(10):592-595.
- [11] 杨丽萍, 姚咏明, 李杰萍, 等. 高迁移率族蛋白 B1 真核表达载体的构建及其对肿瘤坏死因子- α 报告基因活性的影响. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15(3):171-174.
- [12] Bozza M, Satoskar AR, Lin G, et al. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med*, 1999, 189(2):341-346.
- [13] Mitchell RA, Liao H, Chesney J, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(1):345-350.
- [14] Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, et al. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med*, 2000, 6(2):164-170.
- [15] Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, et al. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*, 1993, 365(6448):756-759.
- [16] Lehmann LE, Novender U, Schroeder S, et al. Plasma levels of macrophage migration inhibitory factor are elevated in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med*, 2001, 27(8):1412-1415.
- [17] Beishuizen A, Thijs LG, Haanen C, et al. Macrophage migration inhibitory factor and hypothalamo-pituitary-adrenal function during critical illness. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(6):2811-2816.
- [18] Joshi PC, Poole GV, Sachdev V, et al. Trauma patients with positive cultures have higher levels of circulating macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 2000, 107(1-2):13-20.
- [19] Lai KN, Leung JC, Metz CN, et al. Role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *J Pathol*, 2003, 199(4):496-508.
- [20] Gao L, Flores C, Fan-Ma S, et al. Macrophage migration inhibitory factor in acute lung injury: expression, biomarker, and associations. *Transl Res*, 2007, 150(1):18-29.

(收稿日期:2009-04-03 修回日期:2009-07-22)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

急性呼吸性酸中毒或高碳酸血症可减轻脓毒症肺损伤

最近,爱尔兰的科研人员使用成年雄性 SD 大鼠对急性呼吸性酸中毒能否减轻严重脓毒症引起的肺和全身器官损伤进行了研究,发现适度的呼吸性酸中毒无论在早期还是在后期均可减轻脓毒症性肺损伤。研究人员麻醉大鼠并实施盲肠结扎穿孔术制备脓毒症模型,并将大鼠随机分为早期脓毒症组($n=24$)和持续脓毒症组($n=40$),然后将两组再随机均分为正常碳酸组和呼吸性酸中毒组,分别进行观察和指标监测。结果显示,早期脓毒症组中,呼吸性酸中毒组低血压发生几率和强度、血乳酸水平及大静脉的氧合血红蛋白水平均较正常碳酸组有所下降,同时支气管肺泡中性粒细胞的浸润和肺湿/干重比值减轻。在持续脓毒症组中,适度的呼吸性酸中毒降低了肺损伤的组织学指数。研究证明,呼吸性酸中毒在脓毒症早期或后期对肺部和全身的细菌量都没有影响。因此研究人员认为,在盲肠结扎穿孔术引起的多细菌脓毒症中,无论是早期还是后期,适度的呼吸性酸中毒对机体来说都是有益的。

杨明星, 编译自《Crit Care Med》, 2009-06-15(电子版); 胡森, 审校