

· 论著 ·

亚低温对脂多糖诱导巨噬细胞 Toll 样受体 4 mRNA 转录及炎症平衡的影响

汪首振 汤展宏 胡军涛 蒋良艳 尹祥

【摘要】 目的 探讨亚低温对脂多糖(LPS)刺激下巨噬细胞 Toll 样受体 4(TLR4)mRNA 转录及下游炎症平衡的影响。方法 实验用 RAW264.7 小鼠巨噬细胞株,将细胞分别置于 37 ℃ 和 32 ℃ 的温育箱中培养,干预组加入 10 ng/mL LPS 进行刺激,对照组加入等量生理盐水。分别于培养 2、8、24 h 取细胞上清液检测白细胞介素(IL-1 β 、IL-10)水平;用 TRIzol 提取细胞总 RNA,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 TLR4 mRNA 的转录水平。结果 LPS 刺激下,常温组和亚低温组 TLR4 mRNA 表达水平均呈先升高、后降低的趋势(均 $P < 0.001$);同一时间点,亚低温组 TLR4 mRNA 表达水平($2^{-\Delta\Delta Ct}$)均明显低于常温组(2 h: 9.19 ± 0.57 比 10.08 ± 1.02 , $t = -2.285$, $P = 0.036$; 8 h: 13.58 ± 1.57 比 15.24 ± 1.63 , $t = -2.201$, $P = 0.042$; 24 h: 6.85 ± 1.17 比 8.17 ± 1.21 , $t = 2.353$, $P = 0.032$)。LPS 刺激下,常温组和亚低温组随时间延长 IL-1 β 、IL-10 均逐步增高(均 $P < 0.001$);同一时间点,亚低温组 IL-1 β (ng/L)明显低于常温组(2 h: 87.08 ± 29.35 比 110.53 ± 26.58 , $t = 1.777$, $P = 0.047$; 8 h: 119.19 ± 49.14 比 173.25 ± 37.21 , $t = 2.631$, $P = 0.018$; 24 h: 208.66 ± 53.83 比 346.56 ± 64.30 , $t = 4.933$, $P < 0.001$); IL-10(ng/L)明显高于常温组(8 h: 170.01 ± 24.90 比 140.02 ± 15.08 , $t = -3.091$, $P = 0.007$; 24 h: 423.10 ± 52.40 比 165.06 ± 31.97 , $t = -12.611$, $P < 0.001$)。随着 LPS 刺激时间的延长,常温组 IL-1 β /IL-10 比值逐渐升高($F = 20.003$, $P < 0.001$),亚低温组 IL-1 β /IL-10 比值则逐渐降低($F = 1.811$, $P = 0.185$);同一时间点,亚低温组 IL-1 β /IL-10 比值明显低于常温组(2 h: 0.740 ± 0.214 比 0.993 ± 0.256 , $t = 2.275$, $P = 0.037$; 8 h: 0.701 ± 0.363 比 1.237 ± 0.455 , $t = 2.763$, $P = 0.014$; 24 h: 0.493 ± 0.292 比 2.099 ± 0.428 , $t = 9.299$, $P < 0.001$)。结论 亚低温可以降低 LPS 刺激下巨噬细胞 TLR4 mRNA 的转录水平,相对降低 IL-1 β 水平,但保留了更高水平的 IL-10,使炎症平衡向抗炎方向发展。

【关键词】 亚低温; 脂多糖; 巨噬细胞; Toll 样受体 4

Impact of hypothermia on Toll-like receptor 4 mRNA transcription and inflammatory balance of macrophage induced by lipopolysaccharide Wang Shouzhen, Tang Zhanhong, Hu Juntao, Jiang Liangyan, Yin Xiang, Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China

Corresponding author: Tang Zhanhong, Email: tangzhanhong139@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the impact of hypothermia on Toll-like receptor 4 (TLR4) mRNA transcription and downstream inflammatory balance of macrophage induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** RAW264.7 mouse macrophage cell line was collected and cultivated in incubator at 37 ℃ or 32 ℃. The cells in stimulation group were incubated with 10 ng/mL LPS, while normal saline was used instead in control group. The cells culture supernatant was collected at 2, 8, 24 hours to determine the interleukin (IL-1 β and IL-10) levels. Total RNA was collected with TRIzol, and TLR4 mRNA transcriptional level was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Under the intervention of LPS, TLR4 mRNA expression in normal temperature group and hypothermia group was increased first followed by a decreasing trend (both $P < 0.001$), and at the same time point, TLR4 mRNA expression ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in hypothermia group was lower than that in normal temperature group (2 hours: 9.19 ± 0.57 vs. 10.08 ± 1.02 , $t = -2.285$, $P = 0.036$; 8 hours: 13.58 ± 1.57 vs. 15.24 ± 1.63 , $t = -2.201$, $P = 0.042$; 24 hours: 6.85 ± 1.17 vs. 8.17 ± 1.21 , $t = 2.353$, $P = 0.032$). After the administration of LPS, IL-1 β and IL-10 levels in both normal and hypothermia group were gradually increased (all $P < 0.001$), and at the same time point, the level of IL-1 β (ng/L) in hypothermia group was lower than that in normal temperature group (2 hours: 87.08 ± 29.35 vs. 110.53 ± 26.58 , $t = 1.777$, $P = 0.047$; 8 hours: 119.19 ± 49.14 vs. 173.25 ± 37.21 , $t = 2.631$, $P = 0.018$; 24 hours: 208.66 ± 53.83 vs. 346.56 ± 64.30 , $t = 4.933$, $P < 0.001$), whereas the level of IL-10 (ng/L) of hypothermia group was higher than that in normal temperature group (8 hours: 170.01 ± 24.90 vs. 140.02 ± 15.08 , $t = -3.091$, $P = 0.007$; 24 hours: 423.10 ± 52.40 vs. 165.06 ± 31.97 , $t = -12.611$, $P < 0.001$). The IL-1 β /IL-10 ratio in normal temperature group was gradually increased ($F = 20.003$, $P < 0.001$), and it was decreased gradually in hypothermia group

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.02.006

基金项目:广西自然科学基金(2013GXNSFAA019117);广西教委高校科研项目(201203YB046)

作者单位:530021 南宁,广西医科大学第一附属医院重症医学科

通信作者:汤展宏,Email: tangzhanhong139@sina.com

($F=1.811$, $P=0.185$). At the same time point, IL-1 β /IL-10 ratio in hypothermia group was lower than that in normal temperature group (2 hours: 0.740 ± 0.214 vs. 0.993 ± 0.256 , $t=2.275$, $P=0.037$; 8 hours: 0.701 ± 0.363 vs. 1.237 ± 0.455 , $t=2.763$, $P=0.014$; 24 hours: 0.493 ± 0.292 vs. 2.099 ± 0.428 , $t=9.299$, $P<0.001$). **Conclusion** Hypothermia can reduce TLR4 mRNA transcription level of macrophage after the challenge of LPS, and it can relatively lower the level of IL-1 β , but a higher level of IL-10 is maintained, thus creating a tendency of anti-inflammation.

【Key words】 Hypothermia; Lipopolysaccharide; Macrophage; Toll-like receptor 4

巨噬细胞通过 Toll 样受体 4 (TLR4) 受体识别并呈递脂多糖 (LPS), 再经过一系列细胞内信号转导、级联放大、合成和分泌肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 (IL-1 β 、IL-6) 等促炎细胞因子, 参与机体的炎症反应和损伤^[1], 并在中性粒细胞向肺部的迁移中也起着至关重要的作用。有研究证实, 去除肺部定植巨噬细胞可以有效减少炎症介质释放和中性粒细胞在肺部的聚集^[2]; 在炎症级联反应启动的同时, 巨噬细胞还可通过分泌抗炎介质 IL-10 来调节炎症反应的强度^[3], 所以在 LPS 引起的急性肺损伤 (ALI) 中起着中心作用。近年来, 研究证实亚低温能够在动物模型中减轻 LPS 引起的 ALI^[4], 进一步证实亚低温主要是通过调节促炎和抗炎介质平衡而起肺保护作用; LPS 通过 TLR4 受体介导引起 ALI, 炎症相关的促炎症介质 TNF- α 、IL-1 β 及抗炎介质 IL-10 主要由肺部定植的巨噬细胞产生。因此本课题组设想, 用 LPS 刺激巨噬细胞, 在不同时间点观察亚低温能否下调 TLR4 mRNA 表达量, 使炎症反应趋于平衡, 为此设计本研究进行验证。

1 材料与方法

1.1 试剂: RAW264.7 小鼠巨噬细胞株由中国科学院细胞库提供; LPS 为以色列 Sigma 公司产品; DMEM 高糖培养基、胎牛血清 (FBS) 为北京 Hyclone 公司产品; 青-链双抗、二甲基亚砷 (DMSO) 由碧云天生物技术有限公司提供; 小鼠 IL-1 β 、IL-10 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供; 总 RNA 提取试剂 TRIzol 为美国 Invitrogen 公司产品; 第一链 cDNA 合成试剂盒由 Fermentas 生物技术有限公司提供; 实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 试剂盒由天根生化科技有限公司提供。

1.2 细胞培养和干预: RAW264.7 小鼠巨噬细胞株在 37 °C 下用含 5% CO₂ 的 DMEM 培养皿培养, 添加 10% FBS、1% 青-链双抗。每 48 h 更换 1 次培养基。将细胞按 5×10^6 个 / 皿的密度接种于培养皿中, 培养 24 h 后用于实验。实验分为常温对照组、常温干预组、亚低温对照组、亚低温干预组; LPS 刺激浓度为 10 ng/mL, 对照组加入等量生理盐水; 常温组置于 37 °C 温育箱培养, 亚低温组置于 32 °C 温育箱恒温

培养。各组分别培养 2、8、24 h 后用于测定, 所有实验重复 3 次。

1.3 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 测定 TLR4 mRNA 表达: 使用 TRIzol 提取总 RNA, 分光光度计测定 RNA 纯度及浓度, 用第一链 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA。PCR 扩增片段由 1.5% 琼脂糖凝胶确认。引物由 Invitrogen 公司合成与设计, 目的基因 TLR4 反义链 5'-GAGCCGTTGTTGATCTTTGA-3', 正义链 5'-CTCCCACCAGGTAGGTGTT-3'; 管家基因三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 反义链 5'-CCTTCCGTGTTCCTACCCC-3', 正义链 5'-GCCCAAGATGCCCTTCAGT-3'。荧光实时定量 PCR 进行扩增检测, 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 40 个标准循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法对 TLR4 和 GAPDH 表达水平进行相对定量。

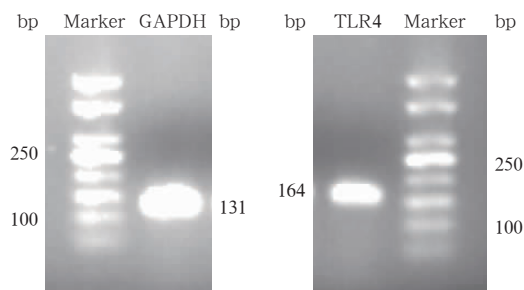
1.4 ELISA 检测炎症因子: 提取各组细胞上清液, 用 ELISA 试剂盒测定促炎因子 IL-1 β 、抗炎因子 IL-10 的水平, 相关步骤均按试剂盒说明书进行。采用 Curve Expert 1.3 软件进行 ELISA 标准曲线拟合。

1.5 统计学处理: 运用 SPSS 16.0 软件进行数据处理, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用配对 t 检验或单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TLR4 mRNA 表达

2.1.1 琼脂糖凝胶电泳检测 TLR4 和 GAPDH 的 RT-PCR 产物 (图 1): 梯度为 50 bp, TLR4 扩增片段 164 bp, GAPDH 扩增片段 131 bp。



TLR4 为 Toll 样受体 4, GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶

图 1 逆转录-聚合酶链反应检测小鼠巨噬细胞 TLR4 和 GAPDH 电泳扩增片段

2.1.2 各组不同时间点 TLR4 mRNA 的表达(表 1):在无 LPS 刺激时,常温对照组和亚低温对照组 TLR4 mRNA 表达量随时间延长并未出现明显变化,而且两组间各时间点比较差异也均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。在 LPS 刺激下,常温干预组和亚低温干预组 TLR4 mRNA 表达量随着时间延长均呈先升高、后降低的趋势,组内比较差异有统计学意义(均 $P < 0.001$);两组各时间点 TLR4 mRNA 表达量均较常温对照组明显升高(均 $P < 0.05$),且亚低温干预组 2、8、24 h TLR4 mRNA 表达量均明显低于常温干预组($t_1 = -2.285, P_1 = 0.036, t_2 = -2.201, P_2 = 0.042, t_3 = 2.353, P_3 = 0.032$)。

2.2 各组不同时间点细胞上清液 IL-1 β 和 IL-10 的含量(表 2~3;图 2):在无 LPS 刺激时,常温对照组和亚低温对照组 IL-1 β 、IL-10 水平随着时间延长均未出现明显变化(均 $P > 0.05$),均处于基础水平的表达量;两组间各时间点比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。在 LPS 刺激下,常温干预组和亚低温干预组 IL-1 β 、IL-10 水平随着时间延长均逐渐升高,组内比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。亚低温干预组 2、8、24 h IL-1 β 水平均明显低于常温干预组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而 8 h、24 h IL-10 水平均明显高于常温干预组(均 $P < 0.01$)。

另外,本实验以 IL-1 β /IL-10 比值来反映炎症平衡,可见常温下由于 LPS 刺激,IL-1 β /IL-10 比值逐渐升高($F = 20.003, P < 0.001$),说明炎症平衡在向着促炎方向发展,炎症反应逐步放大;而亚低温时尽管有 LPS 的刺激,但 IL-1 β /IL-10 比值随时间延长逐渐下降($F = 1.811, P = 0.185$),并且亚低温干预时间越长,其比值下降越多,说明随着时间的推移炎症平衡在向着抗炎方向发展。

3 讨论

革兰阴性(G-)菌脓毒症可以引起肺血管损伤和通透性增加,从而导致严重的低氧血症和非心源性肺水肿,出现急性呼吸窘迫综合征(ARDS)^[5]。在重症监护病房(ICU),ARDS 依然是发病和死亡的重要原

表 1 亚低温干预对脂多糖刺激小鼠巨噬细胞各时间点 TLR4 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	TLR4 mRNA(2 ^{-$\Delta\Delta C_t$)}			F 值	P 值
		2 h	8 h	24 h		
常温对照组	9	1.00 \pm 0.14	1.04 \pm 0.23	1.07 \pm 0.17	0.328	0.723
常温干预组	9	10.08 \pm 1.02 ^a	15.24 \pm 1.63 ^{ac}	8.17 \pm 1.21 ^{ac}	69.974	<0.001
亚低温对照组	9	1.03 \pm 0.09	0.98 \pm 0.12	0.95 \pm 0.16	0.917	0.413
亚低温干预组	9	9.19 \pm 0.57 ^{ab}	13.58 \pm 1.57 ^{ab}	6.85 \pm 1.17 ^{abc}	75.789	<0.001

注:TLR4 为 Toll 样受体 4,Ct 为初始循环数;与常温对照组比较,^a $P < 0.05$;与常温干预组比较,^b $P < 0.05$;与本组 2 h 比较,^c $P < 0.01$

表 2 亚低温干预对正常小鼠巨噬细胞上清液炎症因子的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	IL-1 β (ng/L)			F 值	P 值
		2 h	8 h	24 h		
常温对照组	9	27.41 \pm 4.34	29.80 \pm 4.45	32.40 \pm 5.95	2.271	0.125
亚低温对照组	9	26.86 \pm 4.32	28.43 \pm 3.90	31.35 \pm 4.71	2.501	0.103
t 值		0.270	0.695	0.415		
P 值		0.791	0.497	0.684		

组别	样本数	IL-10(ng/L)			F 值	P 值
		2 h	8 h	24 h		
常温对照组	9	26.69 \pm 5.48	28.64 \pm 4.04	30.52 \pm 5.43	1.306	0.290
亚低温对照组	9	28.00 \pm 4.09	29.82 \pm 5.17	31.14 \pm 4.24	1.092	0.351
t 值		-0.575	-0.540	-0.270		
P 值		0.574	0.597	0.791		

组别	样本数	IL-1 β /IL-10 比值			F 值	P 值
		2 h	8 h	24 h		
常温对照组	9	1.03 \pm 0.08	1.04 \pm 0.09	1.06 \pm 0.12	0.218	0.806
亚低温对照组	9	0.96 \pm 0.11	0.95 \pm 0.10	1.01 \pm 0.07	1.033	0.371
t 值		1.544	2.007	1.080		
P 值		0.142	0.062	0.296		

注:IL-1 β 为白细胞介素 -1 β ,IL-10 为白细胞介素 -10

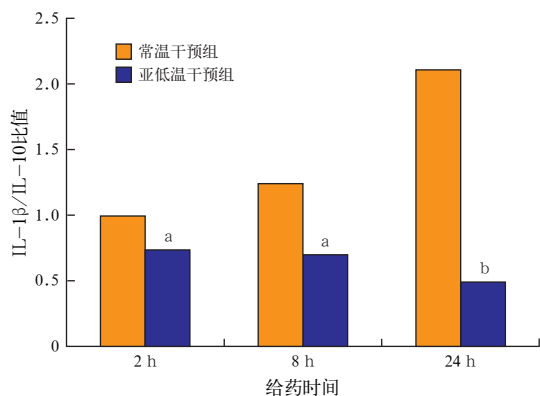
表 3 亚低温干预对脂多糖刺激各时间点小鼠巨噬细胞上清液炎症因子的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	IL-1 β (ng/L)			F 值	P 值
		2 h	8 h	24 h		
常温干预组	9	110.53 \pm 26.58	173.25 \pm 37.21	346.56 \pm 64.30	64.823	<0.001
亚低温干预组	9	87.08 \pm 29.35	119.19 \pm 49.14	208.66 \pm 53.83	15.909	<0.001
t 值		1.777	2.631	4.933		
P 值		0.047	0.018	<0.001		

组别	样本数	IL-10(ng/L)			F 值	P 值
		2 h	8 h	24 h		
常温干预组	9	111.31 \pm 15.94	140.02 \pm 15.08	165.06 \pm 31.97	12.990	<0.001
亚低温干预组	9	117.66 \pm 24.85	170.01 \pm 24.90	423.10 \pm 52.40	180.855	<0.001
t 值		-0.645	-3.091	-12.611		
P 值		0.528	0.007	<0.001		

组别	样本数	IL-1 β /IL-10 比值			F 值	P 值
		2 h	8 h	24 h		
常温干预组	9	0.993 \pm 0.256	1.237 \pm 0.455	2.099 \pm 0.428	20.003	<0.001
亚低温干预组	9	0.740 \pm 0.214	0.701 \pm 0.363	0.493 \pm 0.292	1.811	0.185
t 值		2.275	2.763	9.299		
P 值		0.037	0.014	<0.001		

注:IL-1 β 为白细胞介素 -1 β ,IL-10 为白细胞介素 -10



注:IL-1β/IL-10 为白细胞介素-1β/白细胞介素-10 比值;
与常温干预组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$

图2 亚低温干预对脂多糖刺激小鼠巨噬细胞各时间点上清液 IL-1β/IL-10 比值的影响

因。大量研究揭示,LPS 是 G⁻ 菌细胞壁的主要成分,在 ARDS 的发生发展中起重要作用,诱导了一系列的细胞活化和炎症介质生成^[6]。LPS 被认为是肺部炎症中导致 ALI/ARDS 的主要成分^[7]。有研究证实,与常温相比较,亚低温可以减轻 LPS 造成的 ALI^[8];可以减少大鼠肺泡灌洗液中 TNF-α、IL-1β、核转录因子-κB(NF-κB)的浓度^[9];还可以减少中性粒细胞的渗出^[10]。而中性粒细胞在肺泡腔内的聚集与活化,可以引起促炎和抗炎失衡,使炎症平衡向着促炎方向发展^[11]。动物实验发现,亚低温保留了更多的可供机体利用的 ATP,减轻了线粒体的损伤^[12];亚低温还可有效降低动物体内 IL-1β 和 IL-6 水平,从而抑制大鼠脊髓损伤后的炎症反应^[13];亚低温亦可通过相关基因的表达调控减少损伤后的细胞凋亡^[14]。相关临床研究发现,亚低温通过抑制脑水肿和细胞凋亡等作用对缺血性脑损伤起到保护作用^[15]。

Toll 样受体家族(TLRs)被证实可以通过识别病原微生物的特定组分而在天然免疫的激活中起着重要作用^[16]。TLRs 中的 TLR4 识别 LPS,启动 NF-κB 细胞内信号途径,进而上调黏附分子和炎症介质如细胞因子和趋化因子。相关研究证实,TLR4 是肺上皮细胞对 G⁻ 菌来源的分子反应的关键因素,系统性地给予 LPS 导致致死性休克和中性粒细胞在肺部的聚集都是 TLR4 受体依赖性的^[17]。TLR4 变异鼠被证实对 LPS 低反应,在给予雾化的 LPS 时不发生 ALI^[18]。亚低温对急性炎症疾病如 ALI、急性胰腺炎具有保护作用;而通过阻断 TLR4 也同样显示对急性炎症疾病具有保护作用。但是到目前为止,很少有研究探讨治疗性亚低温对巨噬细胞 TLR4 的转录及表达,及其对炎症平衡的影响。

巨噬细胞、树突细胞均为抗原呈递细胞,通过小鼠肺损伤模型证实,树突细胞的聚集和活化亦可能是肺损伤的重要机制^[19]。LPS 诱导小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 表达 TLR4,被广泛用于与炎症相关的研究中。但在 LPS 造成的 ALI 动物模型中,由于动物很少能存活超过 12 h,故研究时间一般不超过 8 h。目前很少能有研究探讨亚低温在不同时间点对 TLR4 转录水平及其对炎症平衡的影响。

本研究用 RAW264.7 细胞株在体外进行实验,探讨亚低温对炎症反应的影响。结果表明,与常温比较,亚低温可以抑制 TLR4 mRNA 的转录,并且随着亚低温干预时间的延长,抑制作用更加明显。在 ALI 中,IL-1β 主要由肺内巨噬细胞合成和分泌,是最早升高的促炎因子之一^[20];抗炎介质 IL-10 主要由 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞生成,调节相关炎症介质产量,并影响 T 细胞、B 细胞和肥大细胞的生长及功能^[21]。本研究结果显示,在 LPS 刺激下,无论是亚低温还是常温,IL-1β 水平都有明显升高。但在同一时间点,亚低温组 IL-1β 水平低于常温组,这与亚低温组 TLR4 mRNA 转录水平相应降低是一致的。巨噬细胞通过 TLR4 识别 LPS,促进促炎细胞因子如 IL-β、IL-6、TNF-α 合成和分泌的同时,也通过分泌 β-干扰素(IFN-β),IFN-β 和 IFN-α 受体结合,促进 IL-10 的合成和分泌,机体内通过这种基因级别的负反馈机制来调节炎症平衡。本研究发现,LPS 刺激下,亚低温组和常温组 IL-10 水平均随时间的延长而升高,这与 Stewart 等^[22]的研究结果一致。但亚低温下 IL-10 升高更加显著,这可能与亚低温可以减少巨噬细胞的氧化应激损伤、线粒体损伤及其凋亡有关。ALI 时 II 型肺泡上皮细胞凋亡是重要的机制之一,研究发现相关的微小 RNA34(miR-34)是凋亡调控的主要参与者,而 rno-miR-21-5p 是重要的抗凋亡基因^[23]。国内研究提示,机械牵张引起的 ALI 可以促进单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、IL-8、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的 mRNA 表达^[24],而这一发现是否与 TLR4 受体有关同样值得探讨。

本实验结果显示,常温下 IL-1β/IL-10 比值随着 LPS 刺激时间的延长而逐渐增大,提示炎症平衡在向着促炎方向发展;亚低温下 IL-1β/IL-10 比值逐渐减小,提示炎症平衡在向着抗炎方向发展。亚低温促进 IL-10 的合成和分泌,使得炎症平衡向着抗炎方向发展,这与目前大量动物实验证实亚低温对 ALI 具有保护作用相一致。有研究显示,氢气可通过其抗氧化、抗炎作用而用于肺损伤的治疗^[25]。还有研

究者对内毒素性肺损伤大鼠雾化吸入普通肝素,通过控制局部凝血、减弱纤溶抑制、促进纤溶、降低炎症反应等作用治疗肺损伤^[26]。国内相关研究亦证实,吸入一氧化氮(NO)能够减轻肝移植术后相关 ALI,降低支气管肺泡灌洗液中 IL-1 β 、IL-6 等促炎介质的水平^[27]。近年来中医药治疗 ALI 亦有进展,白藜芦醇对内毒素性 ALI 有显著的保护作用,其作用机制可能与 NF- κ B 活化抑制、肺组织炎症反应降低有关^[28]。甘草酸二胺与黄芪注射液可改善 ALI 患者肺损伤评分、急性生理学与慢性健康状况评分系统 II (APACHE II) 评分、全身炎症反应综合征(SIRS) 评分,减轻肺损伤,有利于患者尽早脱机,对 ALI 有一定治疗作用^[29]。将以上研究所发现的 ALI 治疗策略与亚低温相结合可能对 ALI 治疗效果更好。

此外,亚低温对炎症平衡影响的分子机制有待进一步研究。亚低温可相对降低巨噬细胞 TLR4 mRNA 转录水平,减少下游 IL-1 β 的合成和分泌,但相对促进了 IL-10 的合成和分泌,调节了炎症平衡,防止了炎症的过度放大。巨噬细胞在固有免疫中起中心性作用,对 ALI 的发生发展也起着至关重要的作用,因此可以认为,亚低温对 RAW264.7 巨噬细胞株炎症平衡的调节和动物实验显示亚低温对 ALI 和脓毒症具有的保护作用^[30]相一致。

限于有限的实验规模,本次实验未进行更多时间点的检测,也未对 TLR4 蛋白表达和细胞表面 TLR4 受体数量随时间的变化进行研究,未来将进一步致力于细胞实验结合动物实验研究以上的关注点。

参考文献

- [1] Maus UA, Koay MA, Delbeck T, et al. Role of resident alveolar macrophages in leukocyte traffic into the alveolar air space of intact mice [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002, 282(6): L1245-1252.
- [2] Zhang Y, Lin X, Koga K, et al. Strain differences in alveolar neutrophil infiltration and macrophage phenotypes in an acute lung inflammation model[J]. *Mol Med*, 2011, 17(7-8): 780-789.
- [3] Lomas-Neira J, Chung CS, Perl M, et al. Role of alveolar macrophage and migrating neutrophils in hemorrhage-induced priming for ALI subsequent to septic challenge [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(1): L51-58.
- [4] Rim KP, Kim K, Jo YH, et al. Effect of therapeutic hypothermia according to severity of sepsis in a septic rat model [J]. *Cytokine*, 2012, 60(3): 755-761.
- [5] Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome [J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(18): 1334-1349.
- [6] Garber BG, Hébert PC, Yelle JD, et al. Adult respiratory distress syndrome: a systemic overview of incidence and risk factors[J]. *Crit Care Med*, 1996, 24(4): 687-695.
- [7] Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(2): 169-176.
- [8] Chu SJ, Perng WC, Hung CM, et al. Effects of various body temperatures after lipopolysaccharide-induced lung injury in rats [J]. *Chest*, 2005, 128(1): 327-336.
- [9] Lim CM, Kim EK, Koh Y, et al. Hypothermia inhibits cytokine release of alveolar macrophage and activation of nuclear factor kappaB in endotoxemic lung[J]. *Intensive Care Med*, 2004, 30(8): 1638-1644.
- [10] Lim CM, Kim MS, Ahn JJ, et al. Hypothermia protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats [J]. *Intensive Care Med*, 2003, 29(3): 453-459.
- [11] 李超然,王智刚. 内毒素所致急性肺损伤发病机制的研究进展 [J]. *中国医药科学*, 2011, 1(10): 47-49.
- [12] Beurskens CJ, Aslami H, Kuipers MT, et al. Induced hypothermia is protective in a rat model of pneumococcal pneumonia associated with increased adenosine triphosphate availability and turnover [J]. *Crit Care Med*, 2012, 40(3): 919-926.
- [13] 宋祖军,马俊清,余厚友,等. 亚低温对急性脊髓损伤后炎症性细胞因子表达的影响 [J]. *中国急救医学*, 2009, 29(3): 137-139.
- [14] 陈辉,毕长柏,薛春琴,等. 亚低温对大鼠全脑缺血再灌注损伤后神经元凋亡的干预研究 [J]. *中国全科医学*, 2012, 15(33): 3858-3860.
- [15] 綦斌,冯兴慧,鲁质成,等. 脑室内亚低温对缺血性脑损伤的保护作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2012, 29(12): 2517-2519.
- [16] Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product [J]. *J Immunol*, 1999, 162(7): 3749-3752.
- [17] Andonegui G, Bonder CS, Green F, et al. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(7): 1011-1020.
- [18] Jeyaseelan S, Chu HW, Young SK, et al. Distinct roles of pattern recognition receptors CD14 and Toll-like receptor 4 in acute lung injury [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(3): 1754-1763.
- [19] 张朋书. 脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠肺树突状细胞的变化及意义 [M]. 东南大学, 2011.
- [20] 李胜亮,武志宏,张淑琴,等. 脂多糖致肺血管内巨噬细胞分泌功能的改变 [J]. *中国危重病急救医学*, 2011, 23(3): 176-178.
- [21] Spits H, de Waal Malefyt R. Functional characterization of human IL-10 [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 1992, 99(1): 8-15.
- [22] Stewart CR, Landseadel JP, Gurka MJ, et al. Hypothermia increases interleukin-6 and interleukin-10 in juvenile endotoxemic mice [J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2010, 11(1): 109-116.
- [23] 耿慧,陈森,钱明江,等. II 型肺泡上皮细胞凋亡相关微 RNA 的筛选 [J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25(9): 546-549.
- [24] 傅威,毛璞,张容,等. 机械牵张对人肺动脉内皮细胞中细胞因子及细胞间黏附分子-1 表达的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25(8): 484-488.
- [25] 陈红光,谢克亮,韩焕芝,等. 氢气对肺损伤的保护效应及其机制研究进展 [J]. *中国危重病急救医学*, 2011, 23(11): 696-698.
- [26] 汪宗昱,杨拔贤,朱曦,等. 普通肝素雾化吸入对内毒素性肺损伤大鼠肺泡局部凝血及炎症反应的影响 [J]. *中国危重病急救医学*, 2011, 23(4): 239-242.
- [27] 罗晨芳,刘德昭,张瓊兰,等. NO 吸入对肝移植急性肺损伤大鼠肺组织 iNOS、IL-1 β 及 IL-6 的影响 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2013, 34(1): 65-69.
- [28] 左祥荣,曹权,阙军,等. 白藜芦醇对内毒素性急性肺损伤小鼠核转录因子- κ B 及炎症反应的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2013, 20(1): 16-19.
- [29] 李峥,黄华,陈凤坤,等. 甘草酸二胺与黄芪注射液治疗急性肺损伤疗效分析 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2013, 20(4): 213-215.
- [30] 汤展宏,盘璇,胡军涛,等. 亚低温对急性肺损伤大鼠肺泡表面活性蛋白 A 含量的影响 [J]. *中国危重病急救医学*, 2011, 23(4): 236-238.

(收稿日期:2013-08-30)

(本文编辑:李银平)