

# 共刺激分子程序性死亡配体-1在急性肺损伤中的作用及机制初探

包晓玮 孙宏 杨倩 刘显东 陈春香 白建文 唐伦先

200120 上海, 同济大学附属东方医院急诊内科(包晓玮、孙宏、杨倩、刘显东、陈春香、白建文、唐伦先); 02903 美国普罗维登斯, 美国布朗大学附属罗德岛医院外科学研究室(陈春香)

通讯作者: 唐伦先, Email: 456tlx@163.com

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2016.06.005

**【摘要】** 目的 探讨程序性死亡配体-1(PD-L1)表达在急性肺损伤(ALI)中的作用机制。方法 清洁级健康雄性C57BL/6小鼠20只, PD-L1基因敲除雄性小鼠20只, 分别按随机数字表法分为假手术组(Sham)和ALI组, 每组10只。采用失血性休克/脓毒症双重打击方法制备ALI小鼠模型, Sham组仅显露双侧股动脉并结扎但不放血、仅分离盲肠但不结扎穿孔。于制模后24 h处死小鼠, 取肺组织和支气管肺泡灌洗液(BALF)。用实时定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)和蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肺组织PD-L1的mRNA和蛋白表达; 光镜下观察肺组织病理学改变, 测定BALF中蛋白含量; 用流式细胞仪检测粒细胞分化抗原1(Gr1)阳性细胞数及肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性; 用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肺组织和BALF中促炎因子白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )及趋化因子角化细胞源性趋化因子(KC)、巨噬细胞炎性蛋白-2(MIP-2)水平。**结果** 与Sham组相比, ALI组C57BL/6小鼠肺组织PD-L1的mRNA和蛋白表达均明显升高[PD-L1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $3.20 \pm 0.76$  比  $1.01 \pm 0.03$ , PD-L1蛋白(A值):  $0.98 \pm 0.16$  比  $0.15 \pm 0.04$ , 均  $P < 0.05$ ]; 光镜下显示, ALI组C57BL/6小鼠肺泡壁间隔增厚、充血水肿和点状出血, 肺组织有大量炎性细胞浸润, BALF中有明显的蛋白渗漏( $\text{ng/L}$ :  $0.18 \pm 0.06$  比  $0.05 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); 而PD-L1基因敲除小鼠肺损伤程度及BALF中蛋白渗漏较ALI C57BL/6小鼠明显减轻( $\text{ng/L}$ :  $0.11 \pm 0.02$  比  $0.18 \pm 0.06$ ,  $P < 0.05$ )。与相应Sham组比较, ALI小鼠肺组织Gr1阳性细胞数、MPO活性, 肺组织和BALF中促炎因子及趋化因子水平均明显增高; 但PD-L1基因敲除ALI小鼠肺组织和BALF中上述指标均较ALI C57BL/6小鼠明显降低[肺组织Gr1阳性细胞数: ( $39.0 \pm 4.0$ )% 比 ( $45.0 \pm 8.0$ )%, MPO活性( $\text{U} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ):  $2.85 \pm 0.62$  比  $4.52 \pm 1.16$ , IL-6( $\text{ng/g}$ ):  $461 \pm 111$  比  $728 \pm 28$ , TNF- $\alpha$  ( $\text{ng/g}$ ):  $1123 \pm 175$  比  $1500 \pm 327$ , KC( $\text{ng/g}$ ):  $150 \pm 34$  比  $250 \pm 28$ , MIP-2( $\text{ng/g}$ ):  $1263 \pm 468$  比  $1763 \pm 323$ ; BALF中IL-6( $\text{ng/L}$ ):  $134 \pm 22$  比  $258 \pm 38$ , TNF- $\alpha$  ( $\text{ng/L}$ ):  $598 \pm 102$  比  $889 \pm 139$ , KC( $\text{ng/L}$ ):  $934 \pm 286$  比  $1258 \pm 336$ , MIP-2( $\text{ng/L}$ ):  $650 \pm 130$  比  $950 \pm 256$ , 均  $P < 0.05$ ]。**结论** PD-L1基因缺陷可通过降低中性粒细胞趋化因子KC和MIP-2的产生, 减轻肺部中性粒细胞归巢, 对ALI小鼠发挥保护作用。

**【关键词】** 肺损伤, 急性; 程序性死亡配体-1; 程序性死亡受体-1; 中性粒细胞; 脓毒症

**基金项目:** 国家自然科学基金(81500059); 上海市浦东新区卫生系统学科带头人培养计划项目(PWRd2014-08)

**The potential role of co-inhibitory molecule programmed death ligand-1 in acute lung injury and its mechanism** Bao Xiaowei, Sun Hong, Yang Qian, Liu Xiandong, Chun Shiangchung, Bai Jianwen, Tang Lunxian

Department of Internal Emergency Medicine, East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China (Bao XW, Sun H, Yang Q, Liu XD, Chun SC, Bai JW, Tang LX); Department of Surgery, Division of Surgical Research, the Alpert School of Medicine at Brown University/Rhode Island Hospital, Providence, RI 02903, USA (Chun SC)

Corresponding author: Tang Lunxian, Email: 456tlx@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the regulatory role of programmed death ligand-1 (PD-L1) on acute lung injury (ALI), and its molecular mechanism. **Methods** Twenty C57BL/6 male mice and 20 PD-L1 knock out male mice were collected, and they were divided into two groups by random number table, respectively: namely sham group and ALI group, 10 mice in each group. The model of ALI was reproduced by two-hit of hemorrhagic shock and sepsis, and the mice in sham group were only got bilateral femoral artery exposure and ligation without bleeding, cecal separation without ligation and perforation. The mice were sacrificed 24 hours after model reproduction, and the lung

tissue and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected. The mRNA and protein expression levels of PD-L1 in the lungs were determined by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western Blot. The pathological changes were observed with microscopy. The protein levels in BALF were determined. The granulocyte differentiation antigen 1 (Gr1) positive cells was determined by cytometry, and myeloperoxidase (MPO) activity in lung tissue was determined. The levels of proinflammatory factors interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and chemotactic factors keratinocyte chemoattractant (KC), macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) in lung homogenates and BALF were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with sham group, the mRNA and protein levels of PD-L1 in lung tissue of C57BL/6 mice in ALI group were significantly elevated [PD-L1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $3.20 \pm 0.76$  vs.  $1.01 \pm 0.03$ , PD-L1 protein (A value):  $0.98 \pm 0.16$  vs.  $0.15 \pm 0.04$ , both  $P < 0.05$ ]. It was shown by light microscopy that the alveolar wall was thickened, congestive, edema and spot bleeding with a large number of inflammatory cell infiltration in the lung tissue of C57BL/6 mice in ALI group, and an obvious protein leakage was found in BALF (ng/L:  $0.18 \pm 0.06$  vs.  $0.05 \pm 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). The lung injury degree of PD-L1 knockout ALI mice was significantly less than that of C57BL/6 ALI mice, and the protein leakage was significantly reduced in BALF (ng/L:  $0.11 \pm 0.02$  vs.  $0.18 \pm 0.06$ ,  $P < 0.05$ ). Compared with corresponding sham group, the number of Gr1 positive cells, MPO activity in lung tissue as well as the levels proinflammatory factors and chemotactic factors in lung tissue and BALF in ALI group were significantly increased. However, when compared with C57BL/6 ALI mice, above parameters in lung homogenates and BALF were significantly decreased in PD-L1 knockout ALI mice [number of Gr1 positive cells:  $(39.0 \pm 4.0)\%$  vs.  $(45.0 \pm 8.0)\%$ , MPO activity ( $U \cdot \mu g^{-1} \cdot min^{-1}$ ):  $2.85 \pm 0.62$  vs.  $4.52 \pm 1.16$ ; lung IL-6 (ng/g):  $461 \pm 111$  vs.  $728 \pm 28$ , TNF- $\alpha$  (ng/g):  $1123 \pm 175$  vs.  $1500 \pm 327$ , KC (ng/g):  $150 \pm 34$  vs.  $250 \pm 28$ , MIP-2 (ng/g):  $1263 \pm 468$  vs.  $1763 \pm 323$ ; BALF IL-6 (ng/L):  $134 \pm 22$  vs.  $258 \pm 38$ , TNF- $\alpha$  (ng/L):  $598 \pm 102$  vs.  $889 \pm 139$ , KC (ng/L):  $934 \pm 286$  vs.  $1258 \pm 336$ , MIP-2 (ng/L):  $650 \pm 130$  vs.  $950 \pm 256$ ; all  $P < 0.05$ ]. **Conclusion** PD-L1 may play an important protective role in the immunological mechanism of ALI, which may be mediated by decreasing chemotactic factor KC and MIP-2 and mitigating neutrophil chemotaxis in lung tissue.

**【Key words】** Acute lung injury; Programmed death ligand-1; Programmed death-1; Neutrophil; Sepsis

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81500059); Academic Leadership of Health Bureau of Pudong New District in Shanghai (PWRd2014-08)

急性肺损伤 / 急性呼吸窘迫综合征 (ALI/ARDS) 是重症加强治疗病房 (ICU) 最常见的急危重症, 临床上以肺泡上皮细胞和毛细血管内皮细胞通透性增加、顽固性低氧、肺顺应性降低和弥漫性双肺浸润为主要特征<sup>[1-2]</sup>。尽管随着机械通气等支持治疗技术的进步, ALI/ARDS 病死率已显著下降, 但仍是 ICU 患者的首要死因。目前, ALI/ARDS 的治疗措施仍十分有限, 尚无真正基于病因的治疗<sup>[1-2, 3]</sup>。因此, 寻找针对病因的干预措施和新的治疗靶点具有积极的临床意义。共刺激分子程序性死亡受体-1 (PD-1) 及其主要配体程序性死亡配体-1 (PD-L1) 是近年来研究的热点分子。已有研究结果显示 PD-1 参与了 ALI 的免疫炎性病理生理过程, 促进了 ALI 的进展<sup>[4]</sup>, 但有关其配体 PD-L1 的作用研究仍鲜有报道。本研究拟通过建立失血性休克 / 脓毒症双重打击致 ALI 小鼠模型, 初步观察 PD-L1 在肺组织中的表达变化, 同时利用 PD-L1 基因敲除小鼠观察 PD-L1 基因缺陷是否可以改善 ALI 小鼠肺部损伤并探讨其可能机制, 为 ALI 治疗提供一个新的干预靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物和主要试剂:** 10~12 周龄清洁级健康雄性 C57BL/6 小鼠 20 只, 体质量 28~30 g, 动物合格证号: SYXK (沪) 2015-2-0004; 10~12 周龄 PD-L1 基因敲除雄性小鼠 20 只, 体质量 28~30 g, 由美国布朗大学附属罗德岛医院陈春香教授馈赠。本研究所有动物的实验操作均符合动物伦理学标准, 并得到同济大学医学部动物管理和应用委员会许可。

**1.2 动物分组及模型制备:** 将 C57BL/6 小鼠和 PD-L1 基因敲除小鼠分别按照随机数字表法分为假手术 (Sham) 组和 ALI 组, 每组 10 只。参照文献 [5] 的方法制备失血性休克 / 脓毒症双重打击致 ALI 小鼠模型。双侧股动脉置管, 一侧用于持续血压监测, 另一侧放血使平均动脉压 (MAP) 降至 30 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa), 持续 90 min 后进行复苏; 24 h 后进行盲肠结扎穿孔术 (CLP)。Sham 组仅显露双侧股动脉并结扎但不放血, 24 h 后仅分离盲肠但不结扎穿孔。

**1.3 检测指标及方法:** 于制模后 24 h 处死小鼠, 留取肺组织和支气管肺泡灌洗液 (BALF) 待检。

**1.3.1 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肺组织 PD-L1 蛋白表达:**取 C57BL/6 小鼠右下肺组织制备匀浆后提取蛋白,进行凝胶电泳、转膜、封闭,加一抗、二抗,洗膜后电化学发光(ECL)增强发光,测定条带吸光度(A)值,以 PD-L1 与内参照  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)的 A 值比值作为表达量。

**1.3.2 实时定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测肺组织 PD-L1 mRNA 表达:**取 C57BL/6 小鼠右肺组织,提取总 RNA,反转录合成 cDNA。PCR 引物由上海信裕生物科技有限公司合成。操作按试剂盒说明书进行,以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参基因,采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因表达量。

**1.3.3 肺组织病理学观察及肺泡蛋白渗漏测定:**取小鼠左肺组织,经石蜡包埋、固定、切片、染色,光镜下观察病理学改变。取右肺收集 BALF,离心取上清,一部分置于低温冰箱保存备检细胞因子水平,另一部分用于检测蛋白水平。

**1.3.4 流式细胞仪检测肺组织粒细胞分化抗原 1(Gr1)阳性细胞:**取小鼠肺组织,用磷酸盐缓冲液(PBS)调整细胞密度为  $1 \times 10^4/\mu\text{L}$ ,分别加入藻蓝蛋白(APC)标记的抗小鼠 Gr1 和相应的同型对照荧光抗体,冰上避光放置 45 min 后加入 1 mL PBS, 4 °C 离心 10 min 弃上清,加入 150  $\mu\text{L}$  PBS,吹打混匀,采用流式细胞分析软件分析细胞 Gr1 荧光强度。

**1.3.5 肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性测定:**取小鼠右肺上叶组织制备匀浆,采用全自动酶标仪检测 MPO 活性,在 490 nm 波长处读取 A 值,计算 MPO 活性[(A 值<sub>3min</sub>-A 值<sub>15s</sub>) $\times$ 13.5  $\mu\text{g}$  肺组织],结果以  $\text{U} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  表示。

**1.3.6 肺组织和 BALF 中促炎因子及趋化因子水平测定:**取小鼠右下肺组织制备匀浆,并取出冰冻 BALF 上清液,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肺组织和 BALF 中白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、角化细胞源性趋化因子(KC)及巨噬细胞炎性蛋白-2(MIP-2)水平,操作严格按照试剂盒(美国 R&D 公司)说明书进行。

**1.4 统计学分析:**使用 GraphPad Prism 5 统计软件制图和分析数据。计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用非配对 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

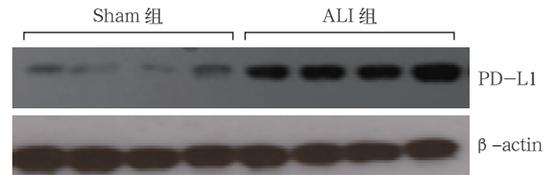
**2.1 肺组织 PD-L1 的基因和蛋白表达(表 1;图 1):**与 Sham 组相比,ALI C57BL/6 小鼠肺组织 PD-L1

的 mRNA 和蛋白表达水平均明显升高,差异有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。

**表 1 失血性休克/脓毒症双重打击对 C57BL/6 小鼠肺组织 PD-L1 mRNA 和蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	动物数(只)	PD-L1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	PD-L1 蛋白(A 值)
Sham 组	10	1.01 $\pm$ 0.03	0.15 $\pm$ 0.04
ALI 组	10	3.20 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>	0.98 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>

注:PD-L1 为程序性死亡配体-1,Sham 为假手术,ALI 为急性肺损伤;与 Sham 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验,PD-L1 程序性死亡配体-1,Sham 为假手术,ALI 为急性肺损伤, $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白

**图 1** Western Blot 检测失血性休克/脓毒症双重打击对 C57BL/6 小鼠肺组织 PD-L1 蛋白表达的影响

**2.2 光镜下观察肺组织病理学改变:**C57BL/6 小鼠 Sham 组肺组织无明显病理学改变(图 2A);ALI 组肺泡壁间隔增厚、充血水肿和点状出血,肺组织有大量炎性细胞浸润(图 2B)。PD-L1 基因敲除小鼠 Sham 组肺组织无明显病理学改变(图 2C);ALI 组肺泡间隔少量出血及炎性细胞浸润,但较 ALI C57BL/6 小鼠明显减轻(图 2D)。

**2.3 BALF 中蛋白渗漏(表 2):**C57BL/6 小鼠 ALI 组 BALF 中蛋白含量显著高于相应 Sham 组;PD-L1 基因敲除小鼠 ALI 组 BALF 中蛋白渗漏量尽管高于相应 Sham 组,但显著低于 C57BL/6 小鼠 ALI 组(均  $P < 0.05$ )。

**2.4 肺组织中性粒细胞趋化归巢情况(图 3;表 3):**C57BL/6 小鼠 ALI 组肺组织 Gr1 阳性细胞数和 MPO 活性均较 Sham 组明显升高(均  $P < 0.05$ );PD-L1 基因敲除小鼠发生 ALI 后肺组织 Gr1 阳性细胞数和 MPO 活性虽明显高于相应 Sham 组,但明显低于 C57BL/6 小鼠 ALI 组(均  $P < 0.05$ )。

**2.5 肺组织和 BALF 中促炎因子及趋化因子水平(表 4):**无论是 C57BL/6 小鼠还是 PD-L1 基因敲除小鼠,ALI 组肺组织和 BALF 中促炎细胞因子 IL-6、TNF- $\alpha$  和趋化因子 KC、MIP-2 水平均明显高于相应 Sham 组,但 PD-L1 基因敲除 ALI 小鼠各项指标均明显低于 ALI C57BL/6 小鼠(均  $P < 0.05$ )。

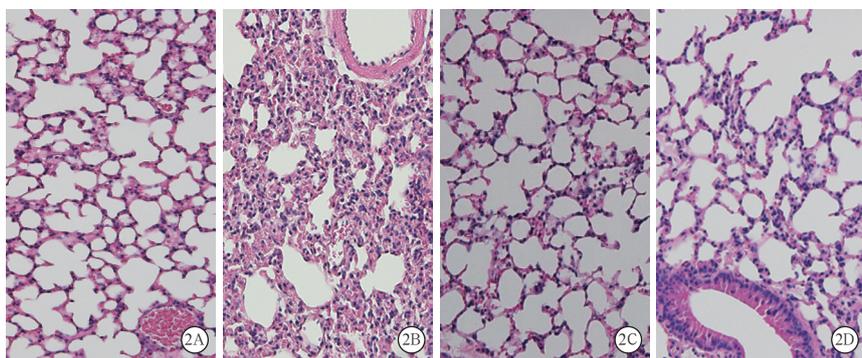
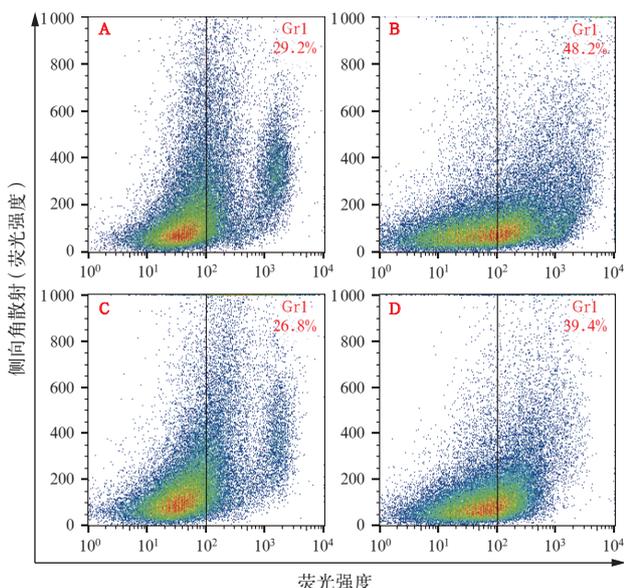


图2 光镜下观察各组小鼠肺组织病理学改变 C57BL/6 小鼠假手术 (Sham) 组 (A) 肺泡间隔均一, 肺泡腔内未见明显渗出及炎性细胞浸润; 失血性休克 / 脓毒症双重打击致急性肺损伤 (ALI) 组 (B) 肺泡壁间隔增厚、充血水肿和点状出血, 肺组织有大量炎性细胞浸润。程序性死亡配体-1 (PD-L1) 基因敲除小鼠 Sham 组 (C) 肺泡间隔均匀, 肺泡腔内未见明显出血、渗出及炎性细胞浸润; ALI 组 (D) 肺泡间隔少量出血及炎性细胞浸润, 但较 ALI C57BL/6 小鼠明显减轻 HE 染色 中倍放大

表2 失血性休克 / 脓毒症双重打击对 C57BL/6 (B6) 和程序性死亡配体-1 (PD-L1) 基因敲除小鼠 (B7) 支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中蛋白含量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	BALF 中蛋白含量 (ng/L)
Sham 组 (B6)	10	0.05 ± 0.01
ALI 组 (B6)	10	0.18 ± 0.06 <sup>a</sup>
Sham 组 (B7)	10	0.06 ± 0.01
ALI 组 (B7)	10	0.11 ± 0.02 <sup>bc</sup>

注: Sham 为假手术, ALI 为急性肺损伤; 与 Sham 组 (B6) 比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 Sham 组 (B7) 比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 ALI 组 (B6) 比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$



注: A、B 为 C57BL/6 小鼠假手术 (Sham) 组和 ALI 组, C、D 为程序性死亡配体-1 (PD-L1) 基因缺陷小鼠 Sham 组和 ALI 组

图3 各组小鼠肺组织粒细胞分化抗原 1 (Gr1) 阳性细胞流式图

表3 失血性休克 / 脓毒症双重打击对 C57BL/6 (B6) 和程序性死亡配体-1 (PD-L1) 基因敲除小鼠 (B7) 肺组织 Gr1 阳性细胞及 MPO 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	Gr1 阳性细胞 (%)	MPO 活性 ( $U \cdot \mu g^{-1} \cdot min^{-1}$ )
Sham 组 (B6)	10	28.2 ± 3.2	1.52 ± 0.76
ALI 组 (B6)	10	45.0 ± 8.0 <sup>a</sup>	4.52 ± 1.16 <sup>a</sup>
Sham 组 (B7)	10	27.0 ± 3.5	1.65 ± 0.87
ALI 组 (B7)	10	39.0 ± 4.0 <sup>bc</sup>	2.85 ± 0.62 <sup>bc</sup>

注: Gr1 为粒细胞分化抗原 1, MPO 为髓过氧化物酶, Sham 为假手术, ALI 为急性肺损伤; 与 Sham 组 (B6) 比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 Sham 组 (B7) 比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 ALI 组 (B6) 比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

表4 失血性休克 / 脓毒症双重打击对 C57BL/6 (B6) 和程序性死亡配体-1 (PD-L1) 基因敲除小鼠 (B7) 肺组织及 BALF 中促炎因子、趋化因子水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	IL-6	
		肺组织 (ng/g)	BALF (ng/L)
Sham 组 (B6)	10	89 ± 18	45 ± 2
ALI 组 (B6)	10	728 ± 28 <sup>a</sup>	258 ± 38 <sup>a</sup>
Sham 组 (B7)	10	76 ± 24	48 ± 8
ALI 组 (B7)	10	461 ± 111 <sup>bc</sup>	134 ± 22 <sup>bc</sup>
组别	动物数 (只)	TNF-α	
		肺组织 (ng/g)	BALF (ng/L)
Sham 组 (B6)	10	289 ± 76	65 ± 12
ALI 组 (B6)	10	1 500 ± 327 <sup>a</sup>	889 ± 139 <sup>a</sup>
Sham 组 (B7)	10	213 ± 80	58 ± 10
ALI 组 (B7)	10	1 123 ± 175 <sup>bc</sup>	598 ± 102 <sup>bc</sup>
组别	动物数 (只)	KC	
		肺组织 (ng/g)	BALF (ng/L)
Sham 组 (B6)	10	61 ± 14	511 ± 102
ALI 组 (B6)	10	250 ± 28 <sup>a</sup>	1 258 ± 336 <sup>a</sup>
Sham 组 (B7)	10	75 ± 23	448 ± 142
ALI 组 (B7)	10	150 ± 34 <sup>bc</sup>	934 ± 286 <sup>bc</sup>
组别	动物数 (只)	MIP-2	
		肺组织 (ng/g)	BALF (ng/L)
Sham 组 (B6)	10	589 ± 150	198 ± 98
ALI 组 (B6)	10	1 763 ± 323 <sup>a</sup>	950 ± 256 <sup>a</sup>
Sham 组 (B7)	10	501 ± 180	150 ± 60
ALI 组 (B7)	10	1 263 ± 468 <sup>bc</sup>	650 ± 130 <sup>bc</sup>

注: BALF 为支气管肺泡灌洗液, Sham 为假手术, ALI 为急性肺损伤, IL-6 为白细胞介素-6, TNF-α 为肿瘤坏死因子-α, KC 为角化细胞源性趋化因子, MIP-2 为巨噬细胞炎性蛋白-2; 与 Sham 组 (B6) 比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 Sham 组 (B7) 比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 ALI 组 (B6) 比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

### 3 讨论

共刺激分子 PD-1 及其配体 PD-L1 信号通路属 CD28/B7 家族,为免疫系统的协同刺激分子。PD-L1 属 B7 家族,主要表达在 T 细胞、B 细胞、单核/巨噬细胞、间质干细胞和树突细胞表面,且随细胞活化而上调<sup>[6]</sup>;同时 PD-L1 还可可在一些非免疫细胞表面表达<sup>[7-8]</sup>。PD-1 与 PD-L1 结合后传递负性调控信号,抑制 T 细胞活化与增殖、促进 T 细胞凋亡<sup>[9]</sup>,参与诱导免疫耐受和免疫细胞功能降低。研究已证实 PD-1/PD-L1 通路在细菌、病毒、寄生虫感染及肿瘤免疫调节中发挥重要作用<sup>[7-9]</sup>,阻断此通路成为治疗上述疾病的新方法。既往研究发现,与野生型小鼠相比,PD-1 和 PD-L1 基因缺陷脓毒症小鼠存活率及细菌清除率均提高<sup>[10-11]</sup>。随着抗 PD-1 抗体进入抗肿瘤治疗的临床试验,有人提出抗 PD-1 或 PD-L1 抗体可进入治疗脓毒症患者的临床试验<sup>[12]</sup>。研究表明,脓毒症是引起 ALI 最常见的病因,严重脓毒症致 ALI 占间接 ALI 发病率的 33%<sup>[13]</sup>。研究发现,野生型 ALI 小鼠肺组织中 CD4<sup>+</sup>、CD11c<sup>+</sup>、Gr1<sup>+</sup> 细胞 PD-1 表达显著高于 Sham 组,PD-1 基因缺陷小鼠诱导 ALI 后的存活率高于野生型小鼠<sup>[4,10]</sup>。临床研究发现,ARDS 死亡者外周血 CD4<sup>+</sup> T 细胞 PD-1 表达显著高于存活者<sup>[4]</sup>,提示 PD-1 可能参与了 ARDS 发生发展的免疫调控过程。本研究发现,与 Sham 组相比,ALI 组野生型 C57BL/6 小鼠肺组织 PD-L1 表达上调;而 PD-L1 基因缺陷小鼠诱导 ALI 后肺损伤程度较野生型小鼠明显减轻,且 BALF 中蛋白渗漏量明显减少,提示 PD-L1 基因缺陷可能对 ALI 小鼠起保护作用。本研究还发现,与野生型 ALI 小鼠相比,PD-L1 基因缺陷 ALI 小鼠肺组织和 BALF 中促炎细胞因子 IL-6、TNF- $\alpha$  水平也明显降低,进一步证实 PD-L1 可能参与了 ALI 的免疫调控过程,降低了促炎因子水平。

ALI/ARDS 急性期一个组织学的标志性改变是中性粒细胞趋化募集至肺组织。一旦中性粒细胞溢出血管,经过肺间质进入肺泡腔,可诱发“瀑布样”免疫炎症反应,介导肺损伤<sup>[14-15]</sup>。大量研究已经证实,抑制中性粒细胞的趋化归巢和过度激活将有助于减轻 ALI。目前尚无 PD-L1 基因缺陷对 ALI 小鼠肺组织中性粒细胞归巢影响的报道。本研究显示,与 Sham 组相比,野生型 ALI 小鼠肺组织 Gr1 阳性细胞数和 MPO 活性均明显增加,而 PD-L1 基因敲除小鼠这两项指标却明显降低,与既往报道 PD-1

基因缺陷 ALI 小鼠肺组织 Gr1 阳性细胞数明显低于野生型 ALI 小鼠一致<sup>[4]</sup>,提示 PD-1/PD-L1 信号通路参与了对 ALI 中性粒细胞归巢的调控。

中性粒细胞浸润至肺组织的过程受来自不同种类细胞分泌的复杂趋化因子网络调控。在动物模型发现,与中性粒细胞归巢趋化至受损肺组织最密切相关的趋化因子是 KC 和 MIP-2<sup>[16]</sup>。研究发现,抑制或基因敲除趋化因子受体(CXCR)均可减少中性粒细胞归巢<sup>[17]</sup>。静脉使用抗 KC 或 MIP-2 抗体预处理阻断小鼠中性粒细胞趋化受体 CXCR2,并将处理后的中性粒细胞输入正常小鼠体内,经失血性休克和脓毒症双重打击后,受体小鼠中性粒细胞归巢明显减少,肺部炎症反应减轻,肺蛋白渗漏减少<sup>[18]</sup>。本研究进一步发现,PD-L1 基因缺陷 ALI 小鼠肺组织和 BALF 的中性粒细胞趋化因子 KC、MIP-2 均显著高于 Sham 组,但明显低于野生型 ALI 小鼠。因此推测,PD-L1 基因缺陷 ALI 小鼠肺组织中性粒细胞归巢减少与抑制趋化因子 KC 和 MIP-2 分泌有关。

综上,本研究提示失血性休克/脓毒症致 ALI 小鼠肺组织高表达 PD-L1,但 PD-L1 基因缺陷 ALI 小鼠肺损伤程度较轻,可能与降低趋化因子 KC 和 MIP-2 的表达,进而抑制肺组织中性粒细胞归巢有关。PD-1/PD-L1 信号分子主要表达于 T 细胞、B 细胞、树突细胞和单核/巨噬细胞等,究竟该信号通路是通过这些免疫细胞间接影响了中性粒细胞归巢,还是直接发挥抑制作用的,通过何种方式实现,还需要进一步的实验研究证实。

### 参考文献

- [1] Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition [J]. JAMA, 2012, 307 (23): 2526-2533. DOI: 10.1001/jama.2012.5669.
- [2] 刘军, 邹桂娟, 李维勤. 急性呼吸窘迫综合征的诊断新进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (2): 70-73. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.02.003.  
Liu J, Zou GJ, Li WQ. Advance of the diagnosis of acute respiratory distress syndrome [J]. Chin Crit Care Med, 2014, 26 (2): 70-73. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.02.003.
- [3] 葛庆岗, 姚智渊, 王铁华, 等. 急性呼吸窘迫综合征发生及预后危险因素的多中心前瞻性队列研究 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (11): 773-779. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.11.002.  
Ge QG, Yao ZY, Wang TH, et al. Risk factors of the occurrence and death of acute respiratory distress syndrome: a prospective multicenter cohort study [J]. Chin Crit Care Med, 2014, 26 (11): 773-779. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.11.002.
- [4] Monaghan SF, Thakkar RK, Heffernan DS, et al. Mechanisms of indirect acute lung injury: a novel role for the coinhibitory receptor, programmed death-1 [J]. Ann Surg, 2012, 255 (1): 158-164. DOI: 10.1097/SLA.0b013e31823433ca.
- [5] Tang L, Bai J, Chung CS, et al. Active players in resolution of

- shock/sepsis induced indirect lung injury: immunomodulatory effects of Tregs and PD-1 [J]. *J Leukoc Biol*, 2014, 96 (5): 809-820. DOI: 10.1189/jlb.4MA1213-647RR.
- [6] Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC [J]. *J Immunol*, 2002, 169 (10): 5538-5545. DOI: 10.4049/jimmunol.169.10.5538.
- [7] Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses [J]. *Eur J Immunol*, 2003, 33 (10): 2706-2716. DOI: 10.1002/eji.200324228.
- [8] 邵瑞, 李春盛. 负性共刺激分子在脓毒症中的免疫调节 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (9): 681-684. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.09.016.
- Shao R, Li CS. Immune regulation of negative co-stimulatory molecules in sepsis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2014, 26 (9): 681-684. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.09.016.
- [9] Riella LV, Paterson AM, Sharpe AH, et al. Role of the PD-1 pathway in the immune response [J]. *Am J Transplant*, 2012, 12 (10): 2575-2587. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2012.04224.x.
- [10] Huang X, Venet F, Wang YL, et al. PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106 (15): 6303-6308. DOI: 10.1073/pnas.0809422106.
- [11] Huang X, Chen Y, Chung CS, et al. Identification of B7-H1 as a novel mediator of the innate immune/proinflammatory response as well as a possible myeloid cell prognostic biomarker in sepsis [J]. *J Immunol*, 2014, 192 (3): 1091-1099. DOI: 10.4049/jimmunol.1302252.
- [12] Chang K, Svabek C, Vazquez-Guillamet C, et al. Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis [J]. *Crit Care*, 2014, 18 (1): R3. DOI: 10.1186/cc13176.
- [13] Rocco PR, Zin WA. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: are they different? [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2005, 11 (1): 10-17. DOI: 10.1097/00075198-200502000-00003.
- [14] 张国友, 邓小明. 中性粒细胞在急性呼吸窘迫综合征发病机制中的作用 [J]. *中国急救医学*, 2005, 25 (11): 830-833. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2005.11.021.
- Zhang GY, Deng XM. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome [J]. *Chin J Crit Care Med*, 2005, 25 (11): 830-833. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2005.11.021.
- [15] 孙中吉, 卢青, 李银平. 急性呼吸窘迫综合征发病中的细胞因子和炎性介质 [J]. *中华危重病急救医学*, 2003, 15 (3): 186-189. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2003.03.021.
- Sun ZJ, Lu Q, Li YP. Cytokines and inflammatory mediators in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome [J]. *Chin Crit Care Med*, 2003, 15 (3): 186-189. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2003.03.021.
- [16] 蒋莉娅, 黄继人, 赵弘卿, 等. 针对重症急性胰腺炎早期急性肺损伤大鼠血清 MIP-2 蛋白及肺与大肠组织 MIP-2 mRNA 表达的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33 (7): 958-962. DOI: 10.7661/CJIM.2013.07.0958.
- Jiang LY, Huang JR, Zhao HQ, et al. Effect of acupuncture on serum MIP-2 and MIP-2 mRNA expressions in isolated Fei and Dachang of severe acute pancreatitis induced acute lung injury rats in the acute phase [J]. *CJITWM*, 2013, 33 (7): 958-962. DOI: 10.7661/CJIM.2013.07.0958.
- [17] Zarbock A, Allegretti M, Ley K. Therapeutic inhibition of CXCR2 by Reparixin attenuates acute lung injury in mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 155 (3): 357-364. DOI: 10.1038/bjp.2008.270.
- [18] Lomas JL, Chung CS, Grutkoski PS, et al. Differential effects of macrophage inflammatory chemokine-2 and keratinocyte-derived chemokine on hemorrhage-induced neutrophil priming for lung inflammation: assessment by adoptive cells transfer in mice [J]. *Shock*, 2003, 19 (4): 358-365. DOI: 10.1097/00024382-200304000-00011.

(收稿日期: 2016-03-22)

(本文编辑: 孙茜, 李银平)

## • 科研新闻速递 •

## 拔管后高流量鼻导管吸氧与常规氧疗对低风险患者气管再插管影响的比较: 一项随机临床试验

研究显示, 进行机械通气的危重病患者拔管后, 对有再次插管高风险和低风险人群推荐高流量鼻导管吸氧治疗较常规氧疗更能改善患者氧合, 然而缺乏关于再插管的确凿数据。因此近期有学者进行了一项多中心随机临床研究, 旨在确定对于机械通气再插管低风险人群, 是否高流量鼻导管吸氧疗法在预防再插管方面优于常规氧疗。该研究纳入了西班牙 7 个重症加强治疗病房 (ICU) 2012 年 9 月至 2014 年 10 月收治的 527 例符合计划拔管标准再插管低风险的成人危重患者。再插管低风险定义为: <65 岁; 拔管当日急性生理学与慢性健康状况评分系统 II (APACHE II) 评分 <12 分; 体质指数 <30 kg/cm<sup>2</sup>; 充分的气道分泌物管理; 无呼吸机依赖; 最多有一种并发症; 无心力衰竭、中重度慢性阻塞性肺疾病 (COPD), 无明显气道问题和长时间机械通气。所有患者拔管后随机分为两组, 分别接受 24 h 高流量或常规氧治疗。主要研究终点是 72 h 内再插管率; 次要终点包括拔管后呼吸衰竭 (呼衰)、呼吸道感染、脓毒症和多器官功能衰竭 (MOF) 发生率, ICU 和住院时间, 住院病死率, 不良事件发生情况和再插管时间。结果显示: 共纳入 527 例患者, 男性比例为 62%; 年龄 51 (18, 64) 岁; 其中 264 例接受高流量治疗, 263 例接受常规氧疗。与常规氧疗组比较, 高流量组 72 h 内再插管率明显降低 [4.9% (13/264) 比 12.2% (32/263), 绝对差为 7.2%, 95% 可信区间 (95%CI) = 2.5% ~ 12.2%, P=0.004], 拔管后呼衰发生率明显降低 [8.3% (22/264) 比 14.4% (38/263), 绝对差为 6.1%, 95%CI=0.7% ~ 11.6%, P=0.03]。高流量组和常规氧疗组再插管时间无显著差异 [19 (12, 28) h 比 15 (9, 31) h, 绝对差为 4, 95%CI=54 ~ 46, P=0.66], 且均无不良反应报告。研究者据此得出结论, 在机械通气拔管后再插管低风险人群, 采用高流量鼻导管吸氧治疗较常规氧疗可减少 72 h 内再插管风险。

喻文, 罗红敏, 编译自《JAMA》, 2016, 315 (13): 1354-1361