

• 论著 •

白细胞介素-17对脂多糖致急性肺损伤小鼠炎症免疫调节的影响

秦翌佳 老启芳 黄冰 黎阳 覃韬 黄英明

广西医科大学附属肿瘤医院重症医学科, 南宁 530021

通信作者: 老启芳, Email: qifanggl@126.com

【摘要】目的 探讨白细胞介素-17(IL-17)对脂多糖(LPS)致急性肺损伤(ALI)小鼠炎症免疫调节的影响。**方法** 将36只SPF级C57BL/6小鼠按随机数字表法分为生理盐水对照组(NS组)、LPS致ALI模型组(LPS组, 气管内滴入LPS 5 mg/kg), 每组18只。分别于制模后2、6、24 h处死6只小鼠, 收集外周血、肺组织和脾组织, 采用苏木素-伊红(HE)染色, 光镜下观察肺组织病理学改变并检测淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞在肺泡壁及气管壁的浸润水平; 采用免疫组化法检测肺泡壁及气管壁IL-17蛋白表达, 分析IL-17蛋白表达与肺泡壁及气管壁淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞浸润的相关性; 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定肺组织匀浆中IL-17含量; 采用流式细胞仪检测外周血、肺组织、脾组织中CD4⁺IL-17⁺辅助性T细胞(Th17细胞)占CD4⁺T细胞的比例。**结果** ①光镜下观察, NS组制模后各时间点肺组织结构基本正常, 无明显炎性细胞浸润; LPS组制模后肺组织水肿、炎症反应逐渐加重, 各时间点肺损伤评分(分)明显高于NS组(2 h: 4.47±1.42比1.10±0.55, 6 h: 7.93±2.14比1.23±0.50, 24 h: 12.67±2.67比1.20±0.61, 均P<0.01)。②免疫组化结果显示, 随时间延长, LPS组肺泡壁及气管壁IL-17蛋白表达逐渐增强, 而NS组则呈阴性或弱阳性表达; 定量分析显示, LPS组各时间点肺泡壁及气管壁IL-17蛋白免疫组化染色评分(分)均高于NS组(肺泡壁: 2 h为2.70±1.40比0.90±0.37, 6 h为5.10±1.76比1.17±0.59, 24 h为9.67±1.32比1.10±0.45; 气管壁: 2 h为2.87±0.89比0.90±0.39, 6 h为4.97±1.48比1.10±0.41, 24 h为8.67±1.54比1.03±0.29, 均P<0.05)。③相关性分析显示, 肺泡壁、气管壁中IL-17蛋白表达与淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞数量均呈正相关(肺泡壁:r值分别为0.632、0.550、0.466, 气管壁:r值分别为0.695、0.662、0.575, 均P<0.01)。④LPS组制模后肺组织匀浆液中IL-17含量(μg/L)逐渐升高, 各时间点明显高于NS组(2 h: 1.37±0.14比1.01±0.18, 6 h: 1.65±0.19比1.11±0.18, 24 h: 1.92±0.36比1.17±0.24, 均P<0.01)。⑤与NS组比较, LPS组各时间点外周血、肺组织、脾组织中Th17细胞比例均明显升高[外周血: 2 h为(2.62±0.62)%比(1.42±0.40)%, 6 h为(3.74±0.43)%比(1.27±0.32)%, 24 h为(4.44±0.65)%比(1.59±0.45)%; 肺组织: 2 h为(2.32±0.44)%比(1.50±0.25)%, 6 h为(3.66±0.36)%比(1.33±0.24)%, 24 h为(4.60±0.54)%比(1.60±0.27)%; 脾组织: 2 h为(1.49±0.36)%比(0.69±0.21)%, 6 h为(2.58±0.55)%比(0.59±0.18)%, 24 h为(3.76±0.57)%比(0.65±0.26)%, 均P<0.01]。**结论** IL-17参与了ALI小鼠的炎症免疫调节过程。

【关键词】 急性肺损伤; 白细胞介素-17; 辅助性T细胞; 炎症; 免疫调节

基金项目: 广西自然科学基金(2015GXNSFBA139146); 广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费课题(Z2014243)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.08.014

Influence regulation of inflammatory immune response by interleukin-17 lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice

Qin Yijia, Lao Qifang, Huang Bing, Li Yang, Qin Tao, Huang Yingming

Department of Critical Care Medicine, Guangxi Medical University Cancer Hospital, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Lao Qifang, Email: qifanggl@126.com

【Abstract】 **Objective** To explore the immunomodulatory effects of interleukin-17 (IL-17) on acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Thirty-six SPF-class C57BL/6 mice were divided into normal saline control group (NS group) and LPS-induced ALI model group (LPS group, LPS 5 mg/kg intratracheal drip) according to random number table method, with 18 mice in each group. Six mice were sacrificed at 2, 6 and 24 hours after model reproduction, and peripheral blood, lung and spleen tissues were harvested. After staining with hematoxylin-eosin (HE), the pathological changes of lung tissue were observed under microscope and the infiltration level of lymphocytes, neutrophils and macrophages in the alveolar wall and tracheal wall were detected. Immunohistochemistry was used to detect the protein expression of IL-17 in alveolar wall and tracheal wall, and the correlation between IL-17 expression and lymphocytes, neutrophils and macrophages infiltration in alveolar wall and tracheal wall were analyzed. The level of IL-17 in lung tissue homogenate was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Flow cytometry was used to detect the proportion of CD4⁺IL-17⁺ helper T cells (Th17 cells) in CD4⁺ T cells in peripheral blood, lung tissue

and spleen tissue. **Results** ① Microscopy showed that the lung tissue structure of NS group was basically normal at each time after model reproduction, and there was no obvious inflammatory cell infiltration, while the lung tissue edema and inflammatory reaction were gradually aggravated in the LPS group, and the lung injury score was significantly higher than that in NS group at each time (2 hours: 4.47 ± 1.42 vs. 1.10 ± 0.55 , 6 hours: 7.93 ± 2.14 vs. 1.23 ± 0.50 , 24 hours: 12.67 ± 2.67 vs. 1.20 ± 0.61 , all $P < 0.01$). ② Immunohistochemistry showed that the protein expression of IL-17 in alveolar wall and tracheal wall of LPS group increased gradually with time, while that in NS group was negative or weak positive. Quantitative analysis showed that the immunohistochemical staining score of IL-17 protein in alveolar wall and tracheal wall of LPS group were higher than those of NS group (alveolar wall: 2.70 ± 1.40 vs. 0.90 ± 0.37 at 2 hours, 5.10 ± 1.76 vs. 1.17 ± 0.59 at 6 hours, 9.67 ± 1.32 vs. 1.10 ± 0.45 at 24 hours; tracheal wall: 2.87 ± 0.89 vs. 0.90 ± 0.39 at 2 hours, 4.97 ± 1.48 vs. 1.10 ± 0.41 at 6 hours, 8.67 ± 1.54 vs. 1.03 ± 0.29 at 24 hours; all $P < 0.05$). ③ Correlation analysis showed that the protein expression of IL-17 in alveolar wall and tracheal wall were positively correlated with the degree of lymphocyte, neutrophil and macrophage infiltration (alveolar wall: r value was 0.632, 0.550, 0.466; tracheal wall: r value was 0.695, 0.662, 0.575, respectively; all $P < 0.01$). ④ IL-17 content ($\mu\text{g/L}$) in lung tissue homogenate was significantly higher than that in NS group at each time after model reproduction (2 hours: 1.37 ± 0.14 vs. 1.01 ± 0.18 , 6 hours: 1.65 ± 0.19 vs. 1.11 ± 0.18 , 24 hours: 1.92 ± 0.36 vs. 1.17 ± 0.24 , all $P < 0.01$). ⑤ The proportion of Th17 cells in the peripheral blood, lung tissue and spleen tissue of the LPS group were higher than those of the NS group at each time after model reproduction [peripheral blood: $(2.62 \pm 0.62)\%$ vs. $(1.42 \pm 0.40)\%$ at 2 hours, $(3.74 \pm 0.43)\%$ vs. $(1.27 \pm 0.32)\%$ at 6 hours, $(4.44 \pm 0.65)\%$ vs. $(1.59 \pm 0.45)\%$ at 24 hours; lung tissue: $(2.32 \pm 0.44)\%$ vs. $(1.50 \pm 0.25)\%$ at 2 hours, $(3.66 \pm 0.36)\%$ vs. $(1.33 \pm 0.24)\%$ at 6 hours, $(4.60 \pm 0.54)\%$ vs. $(1.60 \pm 0.27)\%$ at 24 hours; spleen tissue: $(1.49 \pm 0.36)\%$ vs. $(0.69 \pm 0.21)\%$ at 2 hours, $(2.58 \pm 0.55)\%$ vs. $(0.59 \pm 0.18)\%$ at 6 hours, $(3.76 \pm 0.57)\%$ vs. $(0.65 \pm 0.26)\%$ at 24 hours; all $P < 0.01$]. **Conclusion** IL-17 is involved in the inflammatory immune regulation of ALI mice.

【Key words】 Acute lung injury; Interleukin-17; Helper T cell; Inflammation; Immune regulation

Fund program: Guangxi Natural Science Foundation of China (2015GXNSFBA139146); Medical and Health Research Projects in Guangxi Zhuang Autonomous Region (Z2014243)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.08.014

急性肺损伤(ALI)是由不同原因引起的包括肺泡上皮、肺泡毛细血管内皮和肺间质的急性弥漫性损伤,涉及多种免疫细胞的过度活化和免疫炎性因子的大量释放,肺内失控、过度的炎症免疫反应是其发生的主要原因^[1]。白细胞介素-17(IL-17)是CD4⁺IL-17⁺辅助性T细胞(Th17细胞)分泌的重要前炎性细胞因子,能够促进多种细胞释放炎性因子,具有强大的招募中性粒细胞的功能^[2]。然而,IL-17、Th17细胞在ALI炎症免疫调节过程中的作用目前尚不明了。本研究拟通过建立脂多糖(LPS)致ALI小鼠模型,观察ALI小鼠肺组织肺泡壁和气管壁IL-17的表达,以及外周血、肺组织和脾组织Th17细胞比例的变化,探讨IL-17在ALI免疫应答中的作用,为进一步阐明ALI的免疫学发生机制提供有力的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组: SPF级健康C57BL/6小鼠,6~8周龄,雌雄不限,体重18~22 g,由广西医科大学实验动物中心提供,动物合格证号:SYXK(桂)2014-0003。按随机数字表法将36只C57BL/6小鼠分为生理盐水对照组(NS组)和LPS致ALI模型组(LPS组),每组18只。

1.2 ALI动物模型制备及处理: 小鼠麻醉固定后行

气管插管,自主呼吸,经气管内滴入LPS 5 mg/kg建立ALI模型;NS组则滴入等量生理盐水。

本实验中实验动物处置方法按动物伦理学要求进行,经医院伦理委员会审查(审批号:LW2019016)。

1.3 标本收集: 分别于制模后2、6、24 h经眼球放血,乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝;取脾组织和左肺组织放入含有磷酸盐缓冲液(PBS)的玻璃皿中,置于冰上;将右肺上叶于10%多聚甲醛溶液中固定;将剩余肺组织放入-80℃冰箱保存备检。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 肺组织病理学观察: 将右肺上叶固定于10%多聚甲醛溶液中48 h,行石蜡包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色。光镜下观察肺组织病理学改变,并采用Smith评分评价肺损伤程度^[3]。同时,光镜下观察肺泡壁和气管壁中淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞浸润情况,并计数。每张切片随机取5个视野,由2位病理科医生评分,取均值。

1.4.2 肺组织IL-17含量测定: 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定肺组织匀浆上清液中IL-17含量,操作步骤按照试剂盒(武汉华美生物工程有限公司)说明书进行。

1.4.3 免疫组化法检测肺组织IL-17阳性表达: 将用10%多聚甲醛溶液固定后的石蜡块切片、二甲苯

梯度乙醇脱蜡，枸橼酸钠抗原高压修复，10%过氧化氢溶液浸泡10 min；加入一抗(1:8 000)孵育过夜，二抗孵育，3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色，苏木素染色，晾干封片；参照文献[4]方法进行免疫组化染色评分。

1.4.4 流式细胞仪检测 Th17 细胞比例：制备外周血、肺组织、脾组织单细胞悬液^[5]。加入蛋白质转运抑制剂 GolgiPlug™(2 μL)、佛波酯(PMA, 25 μg/L)和离子霉素(1 μg/L)刺激细胞，加入含10%胎牛血清的 RMIP 1640 培养基使总体系为1 mL，在37 °C、5% CO₂条件下孵育4 h，CD4表面抗体染色，破膜后 IL-17 胞内抗体染色，24 h 内流式细胞仪上机检测。

1.5 统计学处理：使用 SPSS 22.0 软件分析数据。正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用单样本t检验，多组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA)，方差齐者用 SNK 法，方差不齐者用 LSD 法。采用 Pearson 相关分析或者 Spearman 秩相关分析肺泡壁、气管壁中 IL-17 蛋白表达与淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞数量的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺组织病理学改变(图1；表1)：NS组制模后各时间点肺组织结构基本正常，无明显炎性细胞浸润。LPS组制模后肺损伤随时间延长逐渐加重，炎性细胞逐渐增多，各时间点肺损伤评分以及肺泡壁、气管壁中淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞数量均明显高于NS组(均 $P < 0.01$)。

2.2 肺组织 IL-17 含量(图2)：NS组制模后各时间点肺组织中 IL-17 水平无明显变化($F=0.917$, $P=0.421$)。LPS组制模后肺组织 IL-17 水平随时间延长逐渐升高($F=7.210$, $P=0.006$)，各时间点 IL-17 水平均明显高于 NS 组(均 $P < 0.01$)。

2.3 肺泡壁和气管壁 IL-17 免疫组化结果：光镜下观察显示(图3)，LPS组制模后2、6、24 h 肺泡壁和

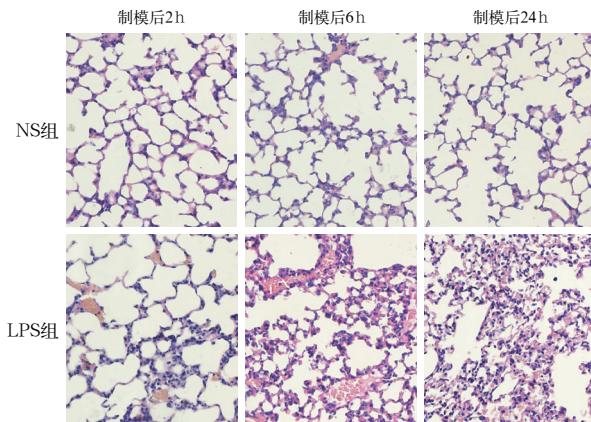
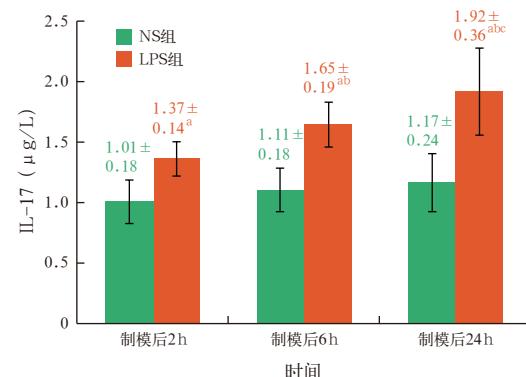


图1 光镜下观察两组小鼠制模后各时间点肺组织病理学改变
生理盐水对照组(NS组)制模后2、6、24 h肺组织结构正常，无明显炎性细胞浸润，无红细胞或蛋白渗出物。脂多糖致急性肺损伤模型组(LPS组)制模后2 h偶有肺泡出血、肺间隔增宽、炎性细胞浸润；制模后6 h肺泡壁破坏较严重，肺泡腔内出血明显，炎性细胞较前增多；制模后24 h出现严重的肺组织病理学改变，包括广泛的炎性细胞浸润，间质和肺泡内水肿，斑片状出血，肺泡间隔增厚和透明膜形成，肺泡塌陷 HE染色 中倍放大



注：NS组为生理盐水对照组，LPS组为脂多糖致急性肺损伤模型组；
IL-17 为白细胞介素-17；与 NS 组比较，^a $P < 0.01$ ；
与本组 2 h 比较，^b $P < 0.01$ ；与本组 6 h 比较，^c $P < 0.01$

图2 两组小鼠制模后各时间点肺组织 IL-17 水平变化比较

气管壁 IL-17 蛋白阳性表达逐渐增强，而 NS 组制模后各时间点无 IL-17 蛋白阳性表达或呈弱阳性表达。定量分析结果显示(表2)，LPS 组制模后 2、6、24 h 肺泡壁和气管壁 IL-17 蛋白免疫组化染色评分均较 NS 组明显升高，并且随着时间的延长，IL-17

表1 两组小鼠制模后各时间点肺损伤评分以及肺泡壁、气管壁中炎性细胞数量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	肺损伤 评分(分)	肺泡壁炎性细胞数量(个/mm ²)			气管壁炎性细胞数量(个/mm ²)		
			淋巴细胞	中性粒细胞	巨噬细胞	淋巴细胞	中性粒细胞	巨噬细胞
NS 2 h 组	6	1.10 ± 0.55	0.60 ± 0.42	2.90 ± 1.87	1.23 ± 0.97	11.70 ± 7.07	52.10 ± 20.59	15.23 ± 6.44
NS 6 h 组	6	1.23 ± 0.50	0.53 ± 0.47	3.03 ± 1.92	1.40 ± 0.57	10.67 ± 6.19	49.13 ± 22.64	17.67 ± 6.91
NS 24 h 组	6	1.20 ± 0.61	0.57 ± 0.45	3.20 ± 2.03	1.30 ± 0.77	11.17 ± 3.68	57.90 ± 16.17	15.73 ± 7.18
LPS 2 h 组	6	4.47 ± 1.42 ^a	1.10 ± 0.21 ^a	5.87 ± 1.21 ^a	2.27 ± 0.56 ^a	20.60 ± 10.14 ^a	118.60 ± 38.86 ^a	31.70 ± 4.84 ^a
LPS 6 h 组	6	7.93 ± 2.14 ^{ab}	1.87 ± 0.39 ^{ab}	9.37 ± 1.22 ^{ab}	2.53 ± 0.48 ^a	44.47 ± 4.63 ^{ab}	116.27 ± 38.59 ^{ab}	49.80 ± 9.09 ^a
LPS 24 h 组	6	12.67 ± 2.67 ^{abc}	2.77 ± 0.92 ^{abc}	9.47 ± 1.22 ^{ab}	3.93 ± 1.80 ^{abc}	56.53 ± 12.69 ^{abc}	172.07 ± 31.55 ^{ab}	45.63 ± 11.03 ^{abc}

注：NS组为生理盐水对照组，LPS组为脂多糖致急性肺损伤模型组；与 NS 组同期比较，^a $P < 0.01$ ；与本组 2 h 比较，^b $P < 0.05$ ；与本组 6 h 比较，^c $P < 0.05$

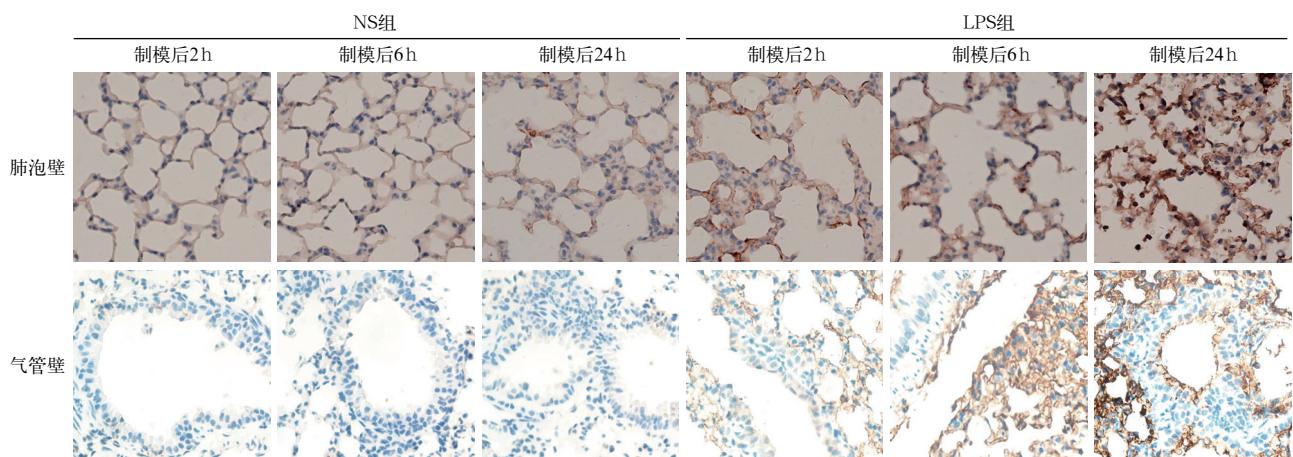
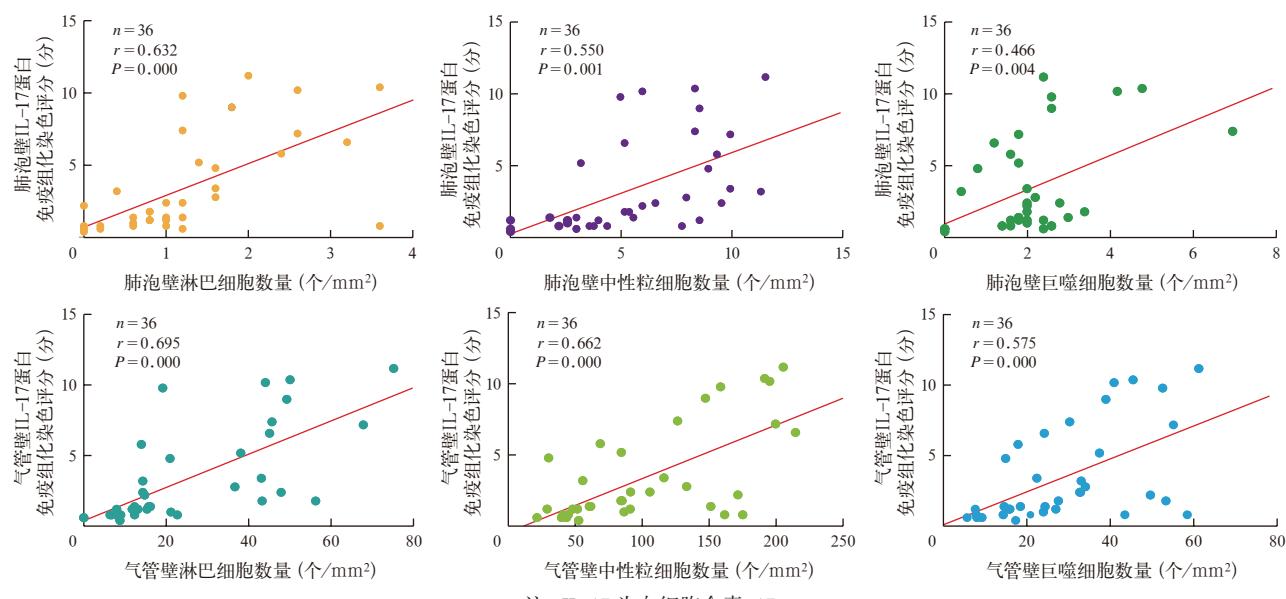


图3 光镜下观察两组小鼠制模后各时间点肺泡壁和气管壁白细胞介素-17(IL-17)蛋白表达。生理盐水对照组(NS组)制模后各时间点IL-17蛋白呈阴性或弱阳性表达;脂多糖致急性肺损伤模型组(LPS组)制模后2、6、24 h肺泡壁和气管壁IL-17蛋白分别呈浅棕黄色、棕黄色、棕褐色的阳性表达 免疫组化染色 高倍放大



注: IL-17 为白细胞介素-17

图4 ALI 小鼠肺泡壁、气管壁中 IL-17 蛋白表达与淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞数量的相关性

蛋白免疫组化染色评分逐渐升高(均 $P < 0.05$)。相关性分析显示(图4),肺泡壁、气管壁中 IL-17 阳性表达与淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞数量均呈正相关(均 $P < 0.01$)。

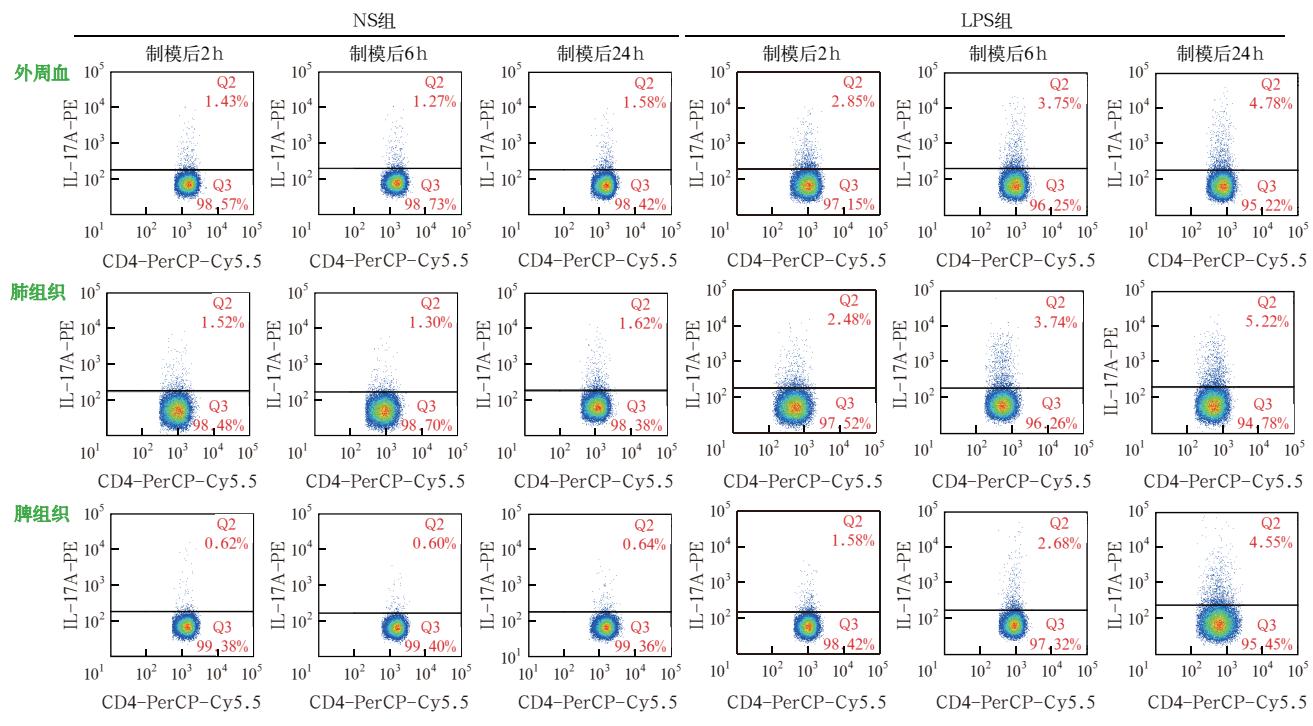
组别	动物数 (只)	IL-17 免疫组化染色评分(分)	
		肺泡壁	气管壁
NS 2 h 组	6	0.90±0.37	0.90±0.39
NS 6 h 组	6	1.17±0.59	1.10±0.41
NS 24 h 组	6	1.10±0.45	1.03±0.29
LPS 2 h 组	6	2.70±1.40 ^a	2.87±0.89 ^b
LPS 6 h 组	6	5.10±1.76 ^{bc}	4.97±1.48 ^{bc}
LPS 24 h 组	6	9.67±1.32 ^{bed}	8.67±1.54 ^{bed}

注: NS 组为生理盐水对照组, LPS 组为脂多糖致急性肺损伤模型组; IL-17 为白细胞介素-17; 与 NS 组同期比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与本组 2 h 比较, ^c $P < 0.01$; 与本组 6 h 比较, ^d $P < 0.01$

2.4 外周血、肺组织、脾组织 Th17 细胞比例(表4;图5):LPS 组制模后外周血、肺组织、脾组织中 Th17 细胞比例随时间延长逐渐升高,各时间点 Th17 细胞比例均明显高于 NS 组(均 $P < 0.01$)。

组别	动物数 (只)	Th17 细胞占 CD4 ⁺ T 细胞比例(%)		
		外周血	肺组织	脾组织
NS 2 h 组	6	1.42±0.40	1.50±0.25	0.69±0.21
NS 6 h 组	6	1.27±0.32	1.33±0.24	0.59±0.18
NS 24 h 组	6	1.59±0.45	1.60±0.27	0.65±0.26
LPS 2 h 组	6	2.62±0.62 ^a	2.32±0.44 ^a	1.49±0.36 ^a
LPS 6 h 组	6	3.74±0.43 ^{ab}	3.66±0.36 ^{ab}	2.58±0.55 ^{ab}
LPS 24 h 组	6	4.44±0.65 ^{abc}	4.60±0.54 ^{abc}	3.76±0.57 ^{abc}

注: NS 组为生理盐水对照组, LPS 组为脂多糖致急性肺损伤模型组; Th17 细胞为 CD4⁺IL-17⁺ 辅助性 T 细胞; 与 NS 组同期比较, ^a $P < 0.01$; 与本组 2 h 比较, ^b $P < 0.01$; 与本组 6 h 比较, ^c $P < 0.05$



注: NS 组为生理盐水对照组, LPS 组为脂多糖致急性肺损伤模型组; IL-17 为白细胞介素-17, PE 为藻红蛋白, PerCP 为多甲藻黄素; 横纵坐标指标单位为荧光强度

图 5 流式细胞仪检测两组小鼠制模后各时间点外周血、肺组织、脾组织 CD4⁺ IL-17⁺ 辅助性 T 细胞(Th17)细胞比例

3 讨论

本研究中通过气管内滴注 LPS 建立小鼠 ALI 模型。与 NS 组比较, LPS 组发生肺间质充血水肿、肺泡间隔增宽和炎性细胞浸润等病理改变,肺损伤评分明显增高,肺泡壁和气管壁均可见以中性粒细胞为主,伴有淋巴细胞、巨噬细胞等的炎性细胞浸润,提示 ALI 模型制备成功。随着 LPS 制模时间延长,上述改变更为明显,并出现肺透明膜形成,肺泡塌陷,广泛炎性细胞浸润,提示随着 ALI 的发生发展,炎症免疫反应呈“瀑布式”级联放大,不断加重组织损伤。

IL-17 是 Th17 细胞分泌的重要促炎细胞因子,在免疫反应及各种免疫介导的组织损伤中起到重要的作用^[6]。本研究结果显示, LPS 制模后 2 h, 肺组织 IL-17 蛋白表达明显增加, IL-17 蛋白阳性表达于肺泡壁、气管壁周围,并且时间越长, IL-17 表达水平越高。同时, LPS 制模后 2、6、24 h 在肺泡壁、气管壁观察到中性粒细胞先增加后持平;巨噬细胞先少量增加,在 6~24 h 快速增长;淋巴细胞则持续增加。此外,相关性分析显示肺泡壁、气管壁 IL-17 蛋白表达与淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞的浸润程度呈正相关。提示 IL-17 在 ALI 肺

部炎性细胞浸润、炎症免疫调节过程中发挥重要作用。肺泡巨噬细胞是肺内第一道防御屏障的重要组成部分,最早、最多机会接触外界刺激物,成为炎症免疫反应的始动环节。内毒素进入机体后能显著刺激巨噬细胞 IL-17 的分泌和表达,合成并释放肿瘤坏死因子-α (TNF-α)、转化生长因子-β (TGF-β)、IL-1β 等多种细胞因子,启动炎症免疫反应级联放大机制^[7]。此外,在 ALI 炎症早期, IL-17 作为联系 T 淋巴细胞与中性粒细胞的重要介质,与表达于内皮细胞、气道上皮细胞、成纤维细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞等表面的相应受体结合后,通过 IL-17 受体信号转导复合体(IL-17R-Act1-TRAF6)激活核转录因子-κB(NF-κB) 和 c-Jun 氨基末端激酶(JNK) 等信号通路,促使 CXC 趋化因子、细胞间黏附因子-1、前列腺素 E、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、IL-8 等炎性细胞因子的基因转录及表达,诱导中性粒细胞聚集和活化^[8-9]。活化的中性粒细胞释放髓样过氧化物酶及弹力酶,使肺组织纤维支架结构破坏,肺泡毛细血管基底膜受损,是造成 ALI 失控炎症免疫反应的重要原因^[10]。IL-17 缺陷小鼠因为中性粒细胞趋化活性降低以及清除细菌功能受损,容易导致致命性的呼吸道感染肺炎;

过表达 IL-17 也可导致肺部趋化因子的表达和白细胞增高,提示 IL-17 在气道免疫中的重要作用^[11]。IL-17A 特异性抗体可以完全阻断小鼠 Th17 细胞趋化中性粒细胞和 CXCL5 表达,封闭 IL-17 和 IL-23 抗体可以有效抵抗中性粒细胞炎症^[12]。经 IL-17 抗体预处理可以使肺组织中炎性细胞因子 IL-6、IL-17A 和 TGF-β1 水平下调,最终减轻小鼠肺损伤^[13]。可见,IL-17 在 ALI 炎症免疫反应发生发展中起着独特免疫调节作用,是连接固有性免疫应答和适应性免疫应答的“桥梁”。

Th17 细胞是一类不同于 Th1、Th2 细胞的效应 CD4⁺T 细胞亚群,主要分泌 IL-17A/F、IL-21 及 IL-22 等细胞因子,并促进可吸引中性粒细胞及其他炎性细胞到免疫反应部位的细胞因子和趋化因子分泌,具有强大的促炎活性。在分化启动阶段,天然 T 细胞在 TGF-β 和 IL-6 共同刺激下,通过信号转导与转录激活因子 3(STAT3)信号转导,产生 IL-17 和 IL-21,后者再以自分泌形式进一步自我激活分化为 Th17,上调特异性转录因子维甲酸相关孤独核受体 γt(RORγt)以分泌大量 IL-17,同时在 IL-23、IL-1β 等的刺激下维持增殖状态^[14-16]。此外有研究表明,Th17 细胞特异性表达趋化因子受体 CCR6、CCR4,同时病变组织局部表达了其配体 CCL20 及 CCL22,可直接通过 CCR6/CCL20 和 CCR4/CCL22 趋化轴作用动员 Th17 细胞浸润到病变局部,继而启动炎症反应。在 Th17 细胞分泌的细胞因子刺激下,气道上皮细胞表面表达的 CCL20 上调,形成趋化正反馈环进一步促进 Th17 细胞浸润到炎症局部放大炎症反应^[17]。Risso 等^[18]研究表明,由感染导致的 ALI/ 急性呼吸窘迫综合征(ARDS)患者有明显的 T 细胞尤其是 Th17 细胞活化和增殖。本研究结果显示,与 NS 组比较,LPS 组制模后肺组织匀浆 IL-17 含量明显增加,外周血、肺组织、脾组织中 Th17 细胞比例均显著升高,且作用时间越长,IL-17 含量越高,Th17 细胞比例越高,提示 Th17 细胞与 IL-17 共同参与了 ALI 发病的免疫调节反应。

综上所述,在 LPS 致小鼠 ALI 模型中,随着 ALI 的发生发展,IL-17 表达和 Th17 细胞比例均增高,且肺泡壁、气管壁 IL-17 蛋白表达与淋巴细胞、中性粒细胞、巨噬细胞浸润程度呈正相关,提示 IL-17 参与了 ALI 炎症免疫调节过程。抑制 Th17 细胞的产生,降低 IL-17 表达,可能成为 ALI 治疗的新靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, et al. Acute respiratory distress syndrome [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5 (1): 18. DOI: 10.1038/s41572-019-0069-0.
- [2] Li Z, Lu G, Meng G. Pathogenic fungal infection in the lung [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1524. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01524.
- [3] Smith KM, Mrozek JD, Simonton SC, et al. Prolonged partial liquid ventilation using conventional and high-frequency ventilatory techniques: gas exchange and lung pathology in an animal model of respiratory distress syndrome [J]. Crit Care Med, 1997, 25 (11): 1888-1897. DOI: 10.1097/00003246-199711000-00030.
- [4] Xue H, Yuan G, Guo X, et al. A novel tumor-promoting mechanism of IL6 and the therapeutic efficacy of tocilizumab: hypoxia-induced IL6 is a potent autophagy initiator in glioblastoma via the p-STAT3-MIR155-3p-CREBRF pathway [J]. Autophagy, 2016, 12 (7): 1129-1152. DOI: 10.1080/15548627.2016.1178446.
- [5] Qiu SL, Duan MC, Liang Y, et al. Cigarette smoke induction of interleukin-27/WSX-1 regulates the differentiation of Th1 and Th17 cells in a smoking mouse model of emphysema [J]. Front Immunol, 2016, 7: 553. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00553.
- [6] Deng J, Yu XQ, Wang PH. Inflammasome activation and Th17 responses [J]. Mol Immunol, 2019, 107: 142-164. DOI: 10.1016/j.molimm.2018.12.024.
- [7] Huang X, Xiu H, Zhang S, et al. The role of macrophages in the pathogenesis of ALI/ARDS [J]. Mediators Inflamm, 2018, 2018: 1264913. DOI: 10.1155/2018/1264913.
- [8] Qu F, Gao H, Zhu S, et al. TRAF6-dependent Act1 phosphorylation by the IκB kinase-related kinases suppresses interleukin-17-induced NF-κB activation [J]. Mol Cell Biol, 2012, 32 (19): 3925-3937. DOI: 10.1128/MCB.00268-12.
- [9] Lee CY, Chen SP, Su CH, et al. Zerumbone from Zingiber zerumbet ameliorates lipopolysaccharide-induced ICAM-1 and cytokines expression via p38 MAPK/JNK-IκB/NF-κB pathway in mouse model of acute lung injury [J]. Chin J Physiol, 2018, 61 (3): 171-180. DOI: 10.4077/cjp.2018.BAG562.
- [10] da-Palma-Cruz M, da Silva RF, Monteiro D, et al. Photobiomodulation modulates the resolution of inflammation during acute lung injury induced by sepsis [J]. Lasers Med Sci, 2019, 34 (1): 191-199. DOI: 10.1007/s10103-018-2688-1.
- [11] Newcomb DC, Boswell MG, Reiss S, et al. IL-17A inhibits airway reactivity induced by respiratory syncytial virus infection during allergic airway inflammation [J]. Thorax, 2013, 68 (8): 717-723. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2012-202404.
- [12] Righetti RF, Dos Santos TM, Camargo LDN, et al. Protective effects of anti-IL17 on acute lung injury induced by LPS in mice [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1021. DOI: 10.3389/fphar.2018.01021.
- [13] 孙宏, 刘显东, 吕迪宇, 等. 转化生长因子-β/Smad 信号通路对急性肺损伤小鼠免疫平衡的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28 (11): 967-972. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.11.004.
- [14] Sun H, Liu XD, Lyu DY, et al. Regulatory role of transforming growth factor-β/Smad pathway on immune imbalance in a mouse model of acute lung injury [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (11): 967-972. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.11.004.
- [15] Linehan JL, Dileepan T, Kashem SW, et al. Generation of Th17 cells in response to intranasal infection requires TGF-β1 from dendritic cells and IL-6 from CD301b⁺ dendritic cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112 (41): 12782-12787. DOI: 10.1073/pnas.1513532112.
- [16] Chen SY, Liu MF, Kuo PY, et al. Upregulated expression of STAT3/IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus [J]. Clin Rheumatol, 2019, 38 (5): 1361-1366. DOI: 10.1007/s10067-019-04467-8.
- [17] Samuels JS, Holland L, López M, et al. Prostaglandin E2 and IL-23 interconnects STAT3 and RORγt pathways to initiate Th17 CD4⁺ T-cell development during rheumatoid arthritis [J]. Inflamm Res, 2018, 67 (7): 589-596. DOI: 10.1007/s00011-018-1153-8.
- [18] Kaneko S, Kondo Y, Yokosawa M, et al. The RORγt-CCR6-CCL20 axis augments Th17 cells invasion into the synovia of rheumatoid arthritis patients [J]. Mod Rheumatol, 2018, 28 (5): 814-825. DOI: 10.1080/14397595.2017.1416923.
- [19] Risso K, Kumar G, Ticchioni M, et al. Early infectious acute respiratory distress syndrome is characterized by activation and proliferation of alveolar T-cells [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2015, 34 (6): 1111-1118. DOI: 10.1007/s10096-015-2333-x.

(收稿日期: 2018-08-10)