

2 型髓系细胞触发受体在小鼠肺缺血 / 再灌注损伤中的作用及调控机制

梁芳特 刘豪 何小静 刘春霞 伍思怡 覃伊 潘灵辉 林飞

广西医科大学附属肿瘤医院麻醉科, 南宁 530021

通信作者: 林飞, Email: flylin0208@163.com

【摘要】 目的 探讨 2 型髓系细胞触发受体 (TREM2) 在小鼠肺缺血 / 再灌注损伤 (LIRI) 中的作用及其可能的调控机制。**方法** 将 36 只健康雄性 C57BL/6 小鼠按照随机数字表法分成正常对照组及 LIRI 2、6、12、24、48 h 组, 每组 6 只。采用开胸夹闭左肺门法建立 LIRI 模型。取各组小鼠左肺组织, 测定肺湿 / 干质量比值 (W/D), 苏木素 - 伊红 (HE) 染色后光镜下观察肺组织病理学改变, 透射电镜下观察肺组织超微结构改变; 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测肺组织白细胞介素 (IL-1 β 、IL-18) 水平; 用聚合酶链反应 (PCR) 检测肺组织 TREM2 和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1 (caspase-1) 的 mRNA 表达; 用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测肺组织 TREM2、caspase-1、细胞焦亡标志成孔蛋白 Gasdermin-D (GSDMD) 的蛋白表达。**结果** LIRI 后 2 h 模型小鼠肺组织开始出现损伤, 肺超微结构改变, 肺组织病理学评分增加; 6 h 时肺损伤程度最为严重; 12 h 后肺损伤逐渐减轻, 肺组织病理学评分逐渐降低。与正常对照组比较, LIRI 2、6、12、24、48 h 组肺 W/D 比值和肺组织病理学评分均明显增高, 差异均有统计学意义 [肺 W/D 比值: 7.06 ± 0.52 、 8.34 ± 0.17 、 6.42 ± 0.35 、 5.34 ± 0.25 、 5.59 ± 0.45 比 4.69 ± 0.23 , 肺组织病理学评分 (分): 5.50 ± 0.54 、 9.75 ± 0.89 、 5.88 ± 0.84 、 3.63 ± 0.74 、 4.13 ± 0.64 比 1.13 ± 0.35 , 均 $P < 0.05$]。与正常对照组比较, LIRI 后 2 h 肺组织 IL-1 β 、IL-18 水平即明显升高, 于 6 h 达峰值 [IL-1 β (ng/L): 502.76 ± 12.25 比 56.50 ± 8.07 , IL-18 (ng/L): 414.02 ± 10.75 比 81.63 ± 5.29 , 均 $P < 0.05$], 随后逐渐降低, 48 h 时仍显著高于正常对照组。PCR 和 Western blotting 结果显示, LIRI 后 2 h 模型小鼠 TREM2 表达即明显低于正常对照组, 于 6 h 达谷值 [TREM2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.47 ± 0.05 比 1.02 ± 0.05 , TREM2/GAPDH: 0.23 ± 0.13 比 0.48 ± 0.17 , 均 $P < 0.05$], 随后逐渐升高, 于 24 h 达峰值 [TREM2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 3.98 ± 0.15 比 1.02 ± 0.05 , TREM2/GAPDH: 0.71 ± 0.17 比 0.48 ± 0.17 , 均 $P < 0.05$]; 而 caspase-1 和 GSDMD 的表达趋势与 TREM2 相反, 呈先升高后降低趋势, 均于再灌注后 6 h 达到高峰 [caspase-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.20 ± 0.13 比 1.01 ± 0.02 , caspase-1/GAPDH: 0.64 ± 0.02 比 0.20 ± 0.06 , GSDMD/GAPDH: 1.23 ± 0.01 比 0.87 ± 0.02 , 均 $P < 0.05$]。**结论** TREM2 可能参与了小鼠 LIRI 的发生, 其机制可能与 TREM2 影响 caspase-1 介导的肺内细胞焦亡有关。

【关键词】 缺血 / 再灌注损伤, 肺; 2 型髓系细胞触发受体; 细胞焦亡; 炎症反应

基金项目: 国家自然科学基金 (81560018, 81960022); 广西自然科学基金面上项目 (2020GXNSFAA159123); 广西高等学校中青年骨干教师培育计划项目 (2017-53); 广西医学高层次骨干人才 “139” 计划培养项目 (G201903011)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20201013-00669

Role and regulatory mechanism of triggering receptor expressed on myeloid cells 2 in mice lung ischemia/reperfusion injury

Liang Fangte, Liu Hao, He Xiaojing, Liu Chunxia, Wu Siyi, Qin Yi, Pan Linghui, Lin Fei

Department of Anesthesiology, the Affiliated Tumor Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Corresponding author: Lin Fei, Email: flylin0208@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the role and regulatory mechanism of triggering receptor expressed on myeloid cell 2 (TREM2) in mice lung ischemia/reperfusion injury (LIRI). **Methods** Thirty-six healthy male C57BL/6 mice were divided into six groups according to the random number method ($n = 6$): normal control group, and LIRI 2, 6, 12, 24, 48 hours group. Mice LIRI models were established by clamping the left hilum. The wet/dry weight ratio (W/D) of left lung tissue was measured. Lung injury was observed and evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining and electron microscopy. The levels of interleukins (IL-1 β , IL-18) in lung tissue were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA expressions of TREM2 and caspase-1 were determined by polymerase chain reaction (PCR). The protein expressions of TREM2, caspase-1, Gasdermin-D (GSDMD) were determined by Western blotting. **Results** At 2 hours after LIRI, lung injury began to appear, the lung ultrastructure changed, and the lung injury score increased; at 6 hours, the degree of lung injury was the most serious; after 12 hours, the lung injury gradually reduced and the lung injury score gradually decreased. Compared with the normal control group, lung W/D ratio and lung injury score of LIRI 2, 6, 12, 24, 48 hours groups were significantly higher, the differences were statistically significant (lung W/D ratio: 7.06 ± 0.52 , 8.34 ± 0.17 , 6.42 ± 0.35 , 5.34 ± 0.25 , 5.59 ± 0.45 vs. 4.69 ± 0.23 ;

lung injury score: 5.50 ± 0.54 , 9.75 ± 0.89 , 5.88 ± 0.84 , 3.63 ± 0.74 , 4.13 ± 0.64 vs. 1.13 ± 0.35 , all $P < 0.05$). Compared with the normal control group, the levels of IL-1 β and IL-18 in lung tissue were significantly increased at 2 hours after LIRI, reached a peak at 6 hours [IL-1 β (ng/L): 502.76 ± 12.25 vs. 56.50 ± 8.07 , IL-18 (ng/L): 414.02 ± 10.75 vs. 81.63 ± 5.29 , both $P < 0.05$], then decreased gradually, and were still significantly higher than the normal control group at 48 hours. The PCR and Western blotting showed that the expression of TREM2 was significantly lower than that in the normal control group at 2 hours after LIRI, and reached a valley at 6 hours [TREM2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$): 0.47 ± 0.05 vs. 1.02 ± 0.05 , TREM2/GAPDH: 0.23 ± 0.13 vs. 0.48 ± 0.17 , both $P < 0.05$], then gradually increased, and reached the peak at 24 hours [TREM2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$): 3.98 ± 0.15 vs. 1.02 ± 0.05 , TREM2/GAPDH: 0.71 ± 0.17 vs. 0.48 ± 0.17 , both $P < 0.05$]. The trend of expression of caspase-1 and GSDMD were opposite to that of TREM2, which increased at first and then decreased, and reached a peak at 6 hours after reperfusion [caspase-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta C_t}$): 2.20 ± 0.13 vs. 1.01 ± 0.02 , caspase-1/GAPDH: 0.64 ± 0.02 vs. 0.20 ± 0.06 , GSDMD/GAPDH: 1.23 ± 0.01 vs. 0.87 ± 0.02 , all $P < 0.05$]. **Conclusions** TREM2 might be involved in LIRI in mice. The mechanism may be related to the effect of TREM2 on caspase-1-mediated pyroptosis.

【Key words】 Lung ischemia/reperfusion injury; Triggering receptor expressed on myeloid cell 2; Pyroptosis; Inflammatory reaction

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81560018, 81960022); Guangxi Natural Science Foundation of China (2020GXNSFAA159123); Thousands of Young Middle-Aged Teachers' Training Programs in Guangxi Colleges and Universities of China (2017-53); Guangxi Medical High-level Key Talents "139" Program Training Project of China (G201903011)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20201013-00669

临床中肺移植、体外循环、肺栓塞、失血性休克、心肺复苏等多种情况均可导致肺缺血/再灌注损伤(lung ischemia/reperfusion injury, LIRI), LIRI 发生率高达 10%~25%,是导致手术失败、患者死亡的重要因素^[1-2]。LIRI 最重要的病理生理特征是肺内“瀑布式”炎症爆发和弥漫性肺间质、肺泡水肿^[3-4]。目前, LIRI 导致肺内炎症反应及组织损伤的分子机制仍未明确。

近年来,细胞焦亡及其释放的大量炎性介质在器官损伤中发挥的重要作用越来越受到研究者的关注。焦亡可由天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1 (caspase-1) 经典通路介导,表现为 gasdermin 家族[主要为成孔蛋白 Gasdermin-D (GSDMD)]促使细胞膜形成直径为 1.1~2.4 nm 的孔道和细胞膜内外离子的交换,引发细胞肿胀、裂解,同时伴有炎性内容物大量释放,从而诱发“炎症风暴”^[5-6]。越来越多的研究表明,细胞焦亡介导的炎症反应及组织损伤在器官缺血/再灌注损伤中发挥重要作用^[7-8]。2 型髓系细胞触发受体(triggering receptor expressed on myeloid cell 2, TREM2)是近年来被发现的免疫球蛋白超家族受体新成员。TREM2 作为一种免疫调节因子,被证实可调控 caspase-1 介导的细胞焦亡^[9]。但是, TREM2 能否通过调控细胞焦亡从而参与 LIRI 鲜见报道。本研究期望通过建立小鼠 LIRI 模型,初步探讨 TREM2 在 LIRI 中的作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂: 健康 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 36 只, 8~10 周龄, 体质量 20~25 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。TREM2、caspase-1、GSDMD 抗体购自美国 Abcam 公司; 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购自美国 CST 公司; 山羊抗兔二抗购自上海碧云天生物技术有限公司; 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司。总 RNA 提取试剂、RNA 反转录试剂盒、RNA 引物均购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 小鼠 LIRI 模型制备及实验分组: 按随机数字表法将小鼠分成正常对照组及 LIRI 2、6、12、24、48 h 组, 每组 6 只。采用开胸夹闭左肺肺门的方法制备小鼠 LIRI 模型^[10], 夹闭肺门 60 min 后恢复血流灌注。分别于再灌注 2、6、12、24、48 h 正中开胸心脏采血并取左肺组织待检。正常对照组不做任何处理。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准, 并经医院伦理委员会审查(审批号: LW2020066)。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 肺湿/干质量比值(wet/dry weight ratio, W/D)测定: 取左肺上叶组织, 用预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲去残血, 滤纸吸干表面水分称湿质量, 然后放入 60℃ 烤箱 96 h 至恒重, 称干质量, 计算 W/D 比值, 用于评估肺水肿程度。

1.3.2 肺组织病理学观察: 取左肺下叶组织固定在 4% 多聚甲醛溶液中, 常规石蜡包埋后切片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱水, 经苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色后光镜下观察肺组织病理学改变并进行肺组织病理评分。

1.3.3 肺组织超微结构观察:取左肺下叶组织约 1 mm 小块固定于 4% 戊二醛中, 2 h 后在 1% 锇酸中浸泡后取出, 不同浓度丙酮脱水后树脂包埋, 超薄切片, 透射电镜下观察。

1.3.4 ELISA 检测肺内炎性介质水平:收集肺组织标本匀浆后, 按照 ELISA 试剂盒说明书步骤检测白细胞介素 (interleukins, IL-1 β 、IL-18) 水平。

1.3.5 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 测定肺组织 TREM2、caspase-1 的 mRNA 表达:提取肺组织总 RNA, 进行反转录, 获得 cDNA 后进行 PCR 扩增: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 共 40 个循环。用 ABI 7900 型荧光定量 PCR 仪, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行数据分析。PCR 引物序列均由日本 TaKaRa 公司设计合成。

1.3.6 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测肺组织 TREM2、caspase-1、GSDMD 的蛋白表达:取肺组织标本, 加入 RIPA 裂解液与蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟 (100:1) 后匀浆, 冰上裂解, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心提取蛋白, 检测蛋白浓度, 蛋白上样量为 40 μg , 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜; 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 洗膜后置于稀释好的一抗 TREM2 (1:400)、caspase-1 (1:1000)、GSDMD (1:1000)、GAPDH (1:1000) 中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 再次洗膜后于辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔免疫球蛋白二抗中 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 用电化学发光试剂盒显影, ChemiDocTM MP 成像系统扫描分析, 测定灰度值, 以目的蛋白与内参 GAPDH 的灰度值比值表示蛋白表达量。

1.4 统计学方法:使用 SPSS 22.0 统计软件分析数据。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间数据采用单因素方差分析, 两组间比较如方差齐采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺 W/D 比值 (表 1):LIRI 2 h 模型小鼠肺 W/D 比值即较正常对照组明显增高 ($P < 0.05$), 6 h 达峰值后逐渐下降, 至再灌注 48 h 仍明显高于正常对照组 ($P < 0.05$)。

2.2 肺组织病理学改变 (表 1; 图 1):正常对照组肺组织结构清晰, 而 LIRI 各组肺组织结构均有不同程度的损伤。LIRI 2 h 肺泡腔内炎性细胞增多, 肺泡壁轻度增厚; 6 h 肺组织结构破坏严重, 肺泡间隔

增宽, 肺间质明显水肿, 大量炎性细胞浸润和红细胞渗出; 12 h 后肺损伤程度均较 6 h 时有不同程度减轻。LIRI 各时间点组肺组织病理学评分均较正常对照组明显升高 (均 $P < 0.05$), 其中 LIRI 6 h 组肺损伤最为严重, 病理学评分最高。

表 1 各组小鼠肺 W/D 比值及肺组织病理学评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	肺 W/D 比值	肺组织病理学评分 (分)
正常对照组	6	4.69 $\pm$ 0.23	1.13 $\pm$ 0.35
LIRI 2 h 组	6	7.06 $\pm$ 0.52 ^a	5.50 $\pm$ 0.54 ^a
LIRI 6 h 组	6	8.34 $\pm$ 0.17 ^a	9.75 $\pm$ 0.89 ^a
LIRI 12 h 组	6	6.42 $\pm$ 0.35 ^a	5.88 $\pm$ 0.84 ^a
LIRI 24 h 组	6	5.34 $\pm$ 0.25 ^a	3.63 $\pm$ 0.74 ^a
LIRI 48 h 组	6	5.59 $\pm$ 0.45 ^a	4.13 $\pm$ 0.64 ^a
F 值		56.350	138.600
P 值		0.000	0.000

注: LIRI 为肺缺血 / 再灌注损伤, 肺 W/D 比值为肺湿 / 干质量比值; 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$

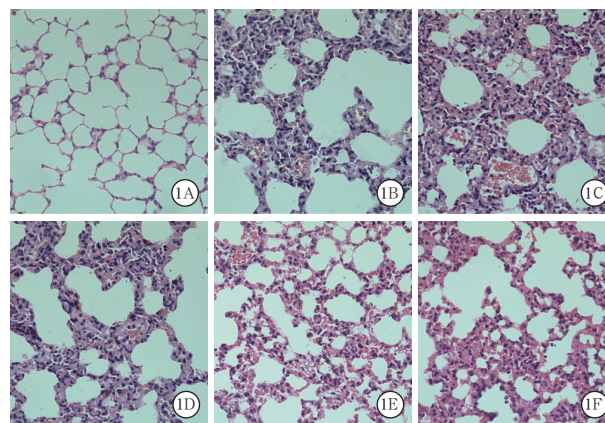


图 1 光镜下观察各组小鼠肺组织病理学改变 正常对照组 (A) 肺组织结构正常; 肺缺血 / 再灌注损伤 (LIRI) 2 h 组 (B) 肺组织结构改变, 有少量炎性细胞浸润; LIRI 6 h 组 (C) 肺组织结构损伤严重, 肺泡间隔增宽, 大量炎性细胞浸润; LIRI 12 h 组 (D) 肺组织损伤有所减轻, 炎性细胞浸润减少; LIRI 24 h 组 (E) 肺组织结构损伤较轻, 肺间质无明显水肿; LIRI 48 h 组 (F) 肺组织结构有轻度改变, 部分炎性细胞浸润 HE 染色 低倍放大

2.3 肺组织超微结构改变 (图 2):正常对照组肺组织超微结构正常。小鼠 LIRI 后 2 h 肺组织超微结构开始出现损伤, 6 h 时损伤最为严重, 12 h 后肺组织超微结构损伤有所减轻。

2.4 肺组织炎性因子水平 (表 2):与正常对照组比较, LIRI 各时间点组肺组织 IL-1 β 、IL-18 水平均明显增高 (均 $P < 0.05$), 均于 LIRI 6 h 组达高峰。

2.5 肺组织 TREM2 和 caspase-1 的 mRNA 表达 (表 3):TREM2 mRNA 表达在 LIRI 后呈先降低后升高趋势, LIRI 2 h 即明显低于正常对照组 ($P < 0.05$), 并于 6 h 达谷值, 随后逐渐升高, 12 h 起明显高于

正常对照组 ($P<0.05$), 于 24 h 达高峰。caspase-1 mRNA 表达在 LIRI 后呈先升高后降低趋势, 2 h 即明显高于正常对照组 ($P<0.05$), 并于 6 h 达到高峰, 随后逐渐降低, 至 48 h 仍显著高于正常对照组 ($P<0.05$), 与 TREM2 的表达趋势相反。

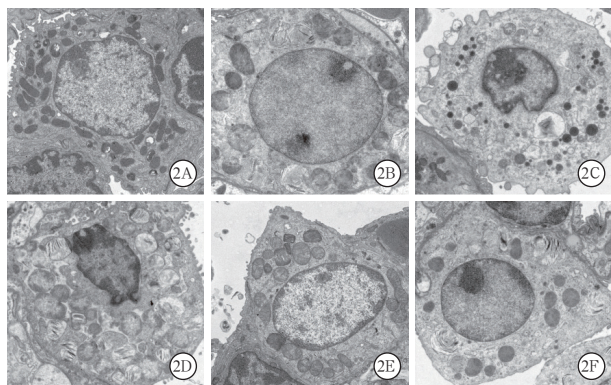


图 2 电镜下观察各组小鼠肺组织超微结构改变 正常对照组 (A) 肺组织超微正常; 肺缺血 / 再灌注损伤 (LIRI) 2 h 组 (B) II 型肺泡上皮细胞肺泡壁增厚, 微绒毛数量减少, 线粒体肿胀, 板层小体有排空迹象; LIRI 6 h 组 (C) 超微结构严重损伤, II 型肺泡上皮细胞核质脱落, 细胞核固缩, 微绒毛数目显著减少, 线粒体嵴破坏, 空泡变性, 板层小体数量明显减少; LIRI 12 h 组 (D) 超微结构损伤减轻; LIRI 24 h 组 (E) 细胞核边界较清晰, 染色质较清晰, 线粒体无明显肿胀; LIRI 48 h 组 (F) 细胞核轻度固缩, 板层小体轻度减少, 微绒毛数量减少 醋酸双氧铀 - 柠檬酸铅双染 $\times 10\,000$

表 2 各组小鼠肺组织炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	IL-1 β (ng/L)	IL-18 (ng/L)
正常对照组	6	56.50 $\pm$ 8.07	81.63 $\pm$ 5.29
LIRI 2 h 组	6	344.07 $\pm$ 14.45 ^a	347.81 $\pm$ 12.72 ^a
LIRI 6 h 组	6	502.76 $\pm$ 12.25 ^a	414.02 $\pm$ 10.75 ^a
LIRI 12 h 组	6	354.40 $\pm$ 12.03 ^a	318.93 $\pm$ 4.93 ^a
LIRI 24 h 组	6	248.69 $\pm$ 7.62 ^a	282.22 $\pm$ 8.08 ^a
LIRI 48 h 组	6	236.91 $\pm$ 10.71 ^a	249.97 $\pm$ 12.72 ^a
F 值		1 081.734	831.686
P 值		0.000	0.000

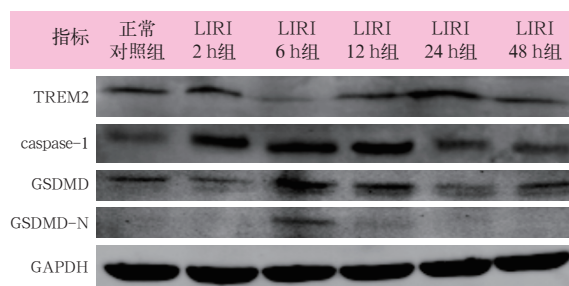
注: LIRI 为肺缺血 / 再灌注损伤, IL-1 β 为白细胞介素 -1 β , IL-18 为白细胞介素 -18; 与正常对照组比较, ^a $P<0.05$

表 3 各组小鼠肺组织 TREM2 和 caspase-1 的 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	TREM2 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	caspase-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
正常对照组	6	1.02 $\pm$ 0.05	1.01 $\pm$ 0.02
LIRI 2 h 组	6	0.80 $\pm$ 0.14 ^a	1.33 $\pm$ 0.66 ^a
LIRI 6 h 组	6	0.47 $\pm$ 0.05 ^a	2.20 $\pm$ 0.13 ^a
LIRI 12 h 组	6	2.95 $\pm$ 0.18 ^a	1.49 $\pm$ 0.08 ^a
LIRI 24 h 组	6	3.98 $\pm$ 0.15 ^a	1.08 $\pm$ 0.09
LIRI 48 h 组	6	3.20 $\pm$ 0.14 ^a	1.18 $\pm$ 0.07 ^a
F 值		771.712	171.995
P 值		0.000	0.000

注: LIRI 为肺缺血 / 再灌注损伤, TREM2 为 2 型髓系细胞触发受体, caspase-1 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1; 与正常对照组比较, ^a $P<0.05$

2.6 肺组织 TREM2、caspase-1、GSDMD 的蛋白表达 (图 3; 表 4): 与 PCR 基因检测结果一样, TREM2 蛋白表达在 LIRI 后同样呈先降低后升高趋势, 于 6 h 达谷值, 并显著低于正常对照组 ($P<0.05$), 随后逐渐升高, 24 h 达到高峰, 且显著高于正常对照组 ($P<0.05$); 而 caspase-1 蛋白表达趋势与 TREM2 相反。进一步检测细胞焦亡标志蛋白 GSDMD 表达, 结果显示, 小鼠 LIRI 6 h GSDMD 表达即明显高于正常对照组 ($P<0.05$), 随后呈降低趋势, 与 caspase-1 蛋白表达趋势一致。



LIRI 为肺缺血 / 再灌注损伤, TREM2 为 2 型髓系细胞触发受体, caspase-1 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1, GSDMD 为成孔蛋白 Gasdermin-D, GSDMD-N 为 GSDMD 活化切割后的 N 末端效应结构域, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 3 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组小鼠肺组织 TREM2、caspase-1、GSDMD 的蛋白表达

表 4 各组小鼠肺组织 TREM2、caspase-1、GSDMD 的蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	TREM2/ GAPDH	caspase-1/ GAPDH	GSDMD/ GAPDH
正常对照组	6	0.48 $\pm$ 0.17	0.20 $\pm$ 0.06	0.87 $\pm$ 0.02
LIRI 2 h 组	6	0.38 $\pm$ 0.13	0.46 $\pm$ 0.02 ^a	0.90 $\pm$ 0.01
LIRI 6 h 组	6	0.23 $\pm$ 0.13 ^a	0.64 $\pm$ 0.02 ^a	1.23 $\pm$ 0.01 ^a
LIRI 12 h 组	6	0.43 $\pm$ 0.14	0.59 $\pm$ 0.01 ^a	0.98 $\pm$ 0.01 ^a
LIRI 24 h 组	6	0.71 $\pm$ 0.17 ^a	0.39 $\pm$ 0.01 ^a	0.79 $\pm$ 0.03 ^a
LIRI 48 h 组	6	0.58 $\pm$ 0.16	0.42 $\pm$ 0.02 ^a	0.90 $\pm$ 0.01
F 值		7.008	390.545	268.310
P 值		0.000	0.000	0.000

注: LIRI 为肺缺血 / 再灌注损伤, TREM2 为 2 型髓系细胞触发受体, caspase-1 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1, GSDMD 为成孔蛋白 Gasdermin-D, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与正常对照组比较, ^a $P<0.05$

3 讨论

LIRI 发病机制复杂, 其发生与各种炎性细胞激活并释放一系列炎性介质造成肺组织损伤有关, 严重时可导致急性低氧性呼吸功能不全或呼吸衰竭^[11-13]。本研究通过构建小鼠 LIRI 模型, 观察 LIRI 后不同时间点肺组织损伤和肺内炎症反应情况, 结果显示, LIRI 各时间点组肺 W/D 比值均较正常对照组明显增高, 表明 LIRI 后肺含水量升高, 肺微

血管通透性增高,出现肺水肿症状;HE 染色观察肺组织病理改变、电镜下观察肺组织超微结构改变显示,LIRI 后各时间点出现不同程度肺损伤,肺组织病理学评分均较正常对照组明显增高,表明 LIRI 小鼠模型构建成功;同时发现,LIRI 2 h 肺组织即已出现损伤,6 h 时肺组织损伤和炎症反应达到高峰,12 h 时肺损伤开始缓解,至 24 h 时肺损伤减轻最为显著。以上结果表明,LIRI 后小鼠肺内呈现炎症反应,肺组织损伤逐步加剧,6 h 时最为严重,随后炎症反应和组织损伤逐步减轻。

TREM2 是免疫球蛋白超家族受体,在髓系细胞中表达,TREM2 受体与配体结合后,通过跨膜结构域间的极性作用与适配器蛋白 DNAX 活化蛋白 12 结合传递细胞内信号。研究表明 TREM2 可以作为保护性介质抑制各种因素导致的炎症反应^[14-15]。Liu 等^[16]研究发现,在给予小鼠脂多糖刺激后,TREM2 mRNA 表达降低,肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和 IL-10 表达升高,而沉默 TREM2 后小鼠肺组织炎症损伤明显加重,表明 TREM2 参与脂多糖介导的急性肺损伤炎症反应过程并起保护性作用。在肺部炎症性疾病中,TREM2 在肺内各类细胞中均有表达,如肺泡巨噬细胞、成纤维细胞^[13]。本研究中检测 LIRI 后不同时间点 TREM2 的 mRNA 和蛋白表达结果显示,小鼠 LIRI 后 TREM2 表达呈先降低后增高趋势,其中再灌注后 6 h 表达最低,与肺组织损伤和炎症反应的峰值相反,认为 TREM2 的低表达可能与缺血/再灌注后肺内炎症“爆发”密切相关。

细胞焦亡后介导的大量炎性介质释放被证实,在各种因素导致的器官损伤中发挥重要作用,依赖 caspase-1 经典途径的细胞焦亡可以活化 GSDMD 蛋白在细胞形成孔洞过程中导致细胞肿胀、细胞膜破裂溶解死亡,并且释放大量的 IL-1 β 和 IL-18^[5]。有研究报道,TREM2 可作为负性炎症调控因子调控 caspase-1 介导的细胞焦亡,与野生型小鼠相比,铜绿假单胞杆菌感染 TREM2 基因敲除小鼠 NOD 样受体蛋白 3 (NOD like receptor protein 3, NLRP3)、caspase-1 以及炎性介质 IL-1 β 、IL-18 表达增加,细胞焦亡的发生亦明显增加^[9]。本研究中检测肺内细胞焦亡标志蛋白 caspase-1 和 GSDMD 显示,LIRI 后细胞焦亡相关蛋白的表达趋势与肺内组织损伤和炎症反应发生的趋势相吻合,与 TREM2 的表达相反。

综上,小鼠 LIRI 后 TREM2 的低表达可能通过

促发 caspase-1 依赖的细胞焦亡,进而引起肺内炎症“爆发”和组织损伤。在未来的研究中,我们可用 TREM2 激动剂或 TREM2 基因敲除鼠进一步证实并探讨 TREM2 在 LIRI 中的作用机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Diamond JM, Lee JC, Kawut SM, et al. Clinical risk factors for primary graft dysfunction after lung transplantation [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2013, 187 (5): 527-534. DOI: 10.1164/rccm.201210-1865OC.
- [2] Porteous MK, Diamond JM, Christie JD. Primary graft dysfunction: lessons learned about the first 72 h after lung transplantation [J]. Curr Opin Organ Transplant, 2015, 20 (5): 506-514. DOI: 10.1097/MOT.0000000000000232.
- [3] Eltzschig HK, Bratton DL, Colgan SP. Targeting hypoxia signalling for the treatment of ischaemic and inflammatory diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13 (11): 852-869. DOI: 10.1038/nrd4422.
- [4] Laubach VE, Sharma AK. Mechanisms of lung ischemia-reperfusion injury [J]. Curr Opin Transplant, 2016, 21 (3): 246-252. DOI: 10.1097/MOT.0000000000000304.
- [5] Shi JJ, Zhao Y, Wang K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. Nature, 2015, 526 (7575): 660-665. DOI: 10.1038/nature15514.
- [6] Ding JJ, Wang K, Liu W, et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family [J]. Nature, 2016, 535 (7610): 111-116. DOI: 10.1038/nature18590.
- [7] Toldo S, Mauro AG, Cutter Z, et al. Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2018, 315 (6): H1553-H1568. DOI: 10.1152/ajpheart.00158.2018.
- [8] Wang L, Chen ZY, Weng XD, et al. Combined ischemic preconditioning and ozone preconditioning provides synergistic protection against renal ischemia and reperfusion injury through inhibiting pyroptosis [J]. Urology, 2019, 123: 296.e1-296.e8. DOI: 10.1016/j.urol.2018.10.015.
- [9] Qu WT, Wang Y, Wu YJ, et al. Triggering receptors expressed on myeloid cells 2 promotes corneal resistance against *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting caspase-1-dependent pyroptosis [J]. Front Immunol, 2018, 9: 1121. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01121.
- [10] 肖靖远, 林飞, 潘灵辉, 等. 地塞米松调控 PI3K/AKT 通路减轻肺缺血/再灌注损伤的作用及机制 [J]. 中华危重病急救医学, 2020, 32 (2): 188-193. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20190723-00035.
- [11] Xiao JY, Lin F, Pan LH, et al. Dexamethasone on alleviating lung ischemia/reperfusion injury in rats by regulating PI3K/AKT pathway [J]. Chin Crit Care Med, 2020, 32 (2): 188-193. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20190723-00035.
- [12] Qu LH, Chen C, Chen YY, et al. High-mobility group box 1 (HMGB1) and autophagy in acute lung injury (ALI): a review [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 1828-1837. DOI: 10.12659/MSM.912867.
- [13] 宁金环, 刘肇绩, 李荆州, 等. 髓样细胞触发性受体 2 及其在阿尔茨海默病中的研究进展 [J]. 中华神经医学杂志, 2019, 18 (10): 1049-1053. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2019.10.017.
- [14] Ning JH, Liu ZJ, Li JZ, et al. Recent advances in triggering receptor expressed in myeloid 2 and its role in Alzheimer's disease [J]. Chin J Neuromed, 2019, 18 (10): 1049-1053. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2019.10.017.
- [15] 李小茜, 杨爱冬. 急性肺损伤发病机制及中医辨证治疗的思考 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2018, 25 (1): 9-14. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2018.01.003.
- [16] Li XQ, Yang AD. Study on pathogenesis and traditional Chinese medicine syndrome differentiation of acute lung injury [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2018, 25 (1): 9-14. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2018.01.003.
- [17] Klesney-Tait J, Turnbull IR, Colonna M. The TREM receptor family and signal integration [J]. Nat Immunol, 2006, 7 (12): 1266-1273. DOI: 10.1038/ni1411.
- [18] Daws MR, Sullam PM, Niemi EC, et al. Pattern recognition by TREM-2: binding of anionic ligands [J]. J Immunol, 2003, 171 (2): 594-599. DOI: 10.4049/jimmunol.171.2.594.
- [19] Liu D, Dong YT, Liu ZL, et al. Impact of TREM-2 gene silencing on inflammatory response of endotoxin-induced acute lung injury in mice [J]. Mol Cell Biochem, 2014, 394 (1-2): 155-161. DOI: 10.1007/s11010-014-2091-6.

(收稿日期: 2020-10-13)