

论著·基础研究

鲨肝醇对支气管肺发育不良新生大鼠肺泡化阻滞的改善作用

谢小华¹, 陈 泽¹, 刘成博¹, 杨奕辉², 张拥军¹

1. 上海交通大学医学院附属新华医院新生儿科, 上海 200092; 2. 上海市嘉定区中心医院儿科, 上海 201880

[摘要] **目的**·探讨鲨肝醇 (batyl alcohol, BTA) 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的新生大鼠支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 的病理学改变的改善作用及其作用机制。**方法**·将孕 16.5 d 的 SD 大鼠随机分为 Saline 组、LPS 组、LPS+BTA 组, 羊膜腔注射 LPS 建立新生鼠 BPD 模型; LPS+BTA 组在注射 LPS 同时及出生后 1 ~ 7 d 每日注射 BTA 干预, 其他 2 组注射等体积生理盐水。取出生第 1、3、7 日新生鼠肺组织, 通过苏木精-伊红 (H-E) 染色和间苯二酚碱性品红染色观察肺泡化阻滞的改变; 利用荧光定量 PCR 和 ELISA 法分别检测新生鼠肺组织中炎症因子白细胞介素 1 β (IL-1 β) mRNA 水平及蛋白表达量。体外培养小鼠巨噬细胞系 RAW264.7, 检测 LPS 诱导及 BTA 干预后 IL-1 β mRNA 水平及蛋白表达量。分离 SD 大鼠骨髓巨噬细胞, 给予 LPS 刺激和 BTA 干预, 利用全转录组测序技术筛选 BTA 抑制炎症的可能靶点。**结果**·H-E 染色结果显示, 出生后第 1、3、7 日 LPS+BTA 组较 LPS 组肺泡数量增多、次级间隔数量增多、平均内衬间隔减小 (均 $P<0.05$); 且经 BTA 干预后肺组织 IL-1 β mRNA 及蛋白表达量均较 LPS 组下调 (均 $P<0.05$)。体外实验结果显示, LPS 刺激后巨噬细胞 IL-1 β mRNA 和蛋白均较 Saline 组显著增加 (均 $P=0.000$), 加入 BTA 后两者均较 LPS 组减少 (均 $P<0.05$)。全转录组测序结果显示, BTA 抑制血小板应答蛋白 1 (thrombospondin, *Thbs1*)、髓样细胞触发受体 1 (triggering receptor expressed on myeloid cells 1, *Trem1*)、表面抗原分化簇 274 (cluster of differentiation 274, *Cd274*) 等促炎症因子基因的表达, 促进补体 C1q C 链 (complement C1q C chain, *C1qc*)、RT1-Da (RT1 class II, locus Da)、RT1-Db1 (RT1 class II, locus Db1) 等抗炎因子基因的表达。**结论**·BTA 可下调巨噬细胞中 IL-1 β 的表达, 抑制炎症反应, 进而改善 LPS 诱导的 BPD 新生鼠肺组织病理学改变。

[关键词] 支气管肺发育不良; 炎症; 鲨肝醇; 白细胞介素 1 β ; 肺泡化阻滞

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.07.005 **[中图分类号]** R722.6 **[文献标志码]** A

Improvement of batyl alcohol on alveolarization arrest in newborn rats with bronchopulmonary dysplasia

XIE Xiao-hua¹, CHEN Ze¹, LIU Cheng-bo¹, YANG Yi-hui², ZHANG Yong-jun¹

1. Department of Neonatology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China; 2. Department of Pediatrics, Jiading District Central Hospital, Shanghai 201880, China

[Abstract] **Objective**·To investigate whether batyl alcohol (BTA) can improve the pathology of bronchopulmonary dysplasia (BPD) in newborn rats induced by lipopolysaccharide (LPS) and the mechanism. **Methods**·Pregnant SD rats (16.5 d) were randomly assigned into Saline group, LPS group, and LPS+BTA group. Amniocentesis injection of LPS was performed to establish neonatal bronchopulmonary dysplasia (BPD) rat model. In LPS+BTA group, LPS and BTA were injected at the same time. After birth, LPS+BTA group was injected with BTA continuously everyday for 7 days. The other two groups were injected with normal saline of equal volume. Lung tissues of neonatal rats on the first, third and seventh day after birth were stained by hematoxylin-eosin (H-E) and resorcin-fuchsin respectively, to observe alveolarization arrest. The mRNA and protein levels of interleukin 1 β (IL-1 β) in newborn rats lungs were detected by real-time PCR and ELISA. *In vitro*, mouse macrophages RAW264.7 were cultured to detect IL-1 β mRNA levels and protein levels after treatment with LPS and BTA. SD rat bone marrow macrophages were isolated and treated with LPS and BTA. RNA-sequence was taken to screen for possible targets of BTA inhibition of inflammation. **Results**·The results of H-E staining showed that LPS+BTA group had a milder pathology of BPD, with more secondary septa counts, more alveolar counts, and smaller mean linear intercept (all $P<0.05$); after BTA intervention the expression levels of IL-1 β mRNA and protein in lung tissues of neonatal rats were significantly lower than those in LPS group (both $P<0.05$). *In vitro*, IL-1 β mRNA and protein increased after LPS stimulation (both $P=0.000$), but decreased in the LPS+BTA group (both $P<0.05$). RNA-sequence results showed that BTA inhibited the expressions of some inflammatory factors, such as thrombospondin1 (*Thbs1*), triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (*Trem1*), and cluster of differentiation 274 (*Cd274*), and promoted the expressions of some anti-inflammatory factors, such as complement C1q C chain (*C1qc*), RT1 class II, locus Da (*RT1-Da*), and RT1 class II, locus Db1 (*RT1-Db1*). **Conclusion**·BTA can improve lung pathology of neonatal rats with BPD by downregulating the expression of IL-1 β and reducing inflammatory response.

[Key words] bronchopulmonary dysplasia (BPD); inflammation; batyl alcohol (BTA); interleukin-1 β (IL-1 β); alveolarization arrest

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81470201) (National Natural Science Foundation of China, 81470201)。

[作者简介] 谢小华 (1991—), 女, 硕士生; 电子信箱: Xiexh7166@163.com。

[通信作者] 张拥军, 电子信箱: zhangyongjun@sjtu.edu.com。



支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是肺发育不成熟等多种因素共同作用下致肺泡和肺内血管发育受阻的一种早产儿常见的慢性肺部疾病^[1]。21 世纪以来随着生命科学和早产儿重症监护技术的快速发展, 早产儿存活率提高的同时 BPD 的发病率也不断提升。随着 BPD 治疗方式的转变, 现在临床上 BPD 主要表现为肺泡次级间隔缩短, 肺泡数目减少、体积增大及结构简单化等肺泡化阻滞的现象^[2]。在 BPD 发病机制的研究中发现, BPD 发生时肺部微环境中的炎症细胞, 如巨噬细胞、中性粒细胞等集中到肺部, 释放白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、IL-6、IL-8、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等炎症介质, 且机械通气及辅助氧疗可加剧损伤肺泡单位, 加重 BPD^[3-5]。

烷基甘油 (alkylglycerols, AKGs) 是母乳的组成成分, 在鲨肝油中的含量丰富; 鲨肝醇 (batyl alcohol, BTA) 是 AKGs 重要的组成部分, 也是重要的免疫刺激因子, 具有提高抗炎反应, 改善肿瘤细胞的免疫应答等作用^[6]。基于 BPD 发病过程中的炎症反应和 BTA 的抗炎作用, 猜测 BTA 可能可以通过下调 BPD 的炎症反应改善 BPD 症状。本研究在宫腔内注射脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导新生大鼠 BPD 模型, 并给予 BTA 干预, 观察 BTA 对 BPD 病理及肺组织中 IL-1 β 表达的影响, 探究 BTA 在 BPD 中的可能作用机制; 同时在体外实验中, 用 BTA 干预 LPS 刺激后的小鼠巨噬细胞, 探究 BTA 对 LPS 诱导的炎症的调节机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及细胞来源 雌性 SPF 级 Sprague Dawley (SD) 大鼠 18 只, 12 ~ 16 周龄, 350 ~ 500 g, 购入时为孕 15 d; 雄性 SPF 级 SD 大鼠 8 只, 4 ~ 6 周龄, 60 ~ 100 g。实验动物均采购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 生产许可证号为 SCXK (沪) 2013-0016, 动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2013-0106。本研究已通过上海交通大学医学院附属新华医院 (简称新华医院) 伦理委员会批准, 实验动物饲养于新华医院动物房。RAW264.7 细胞购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.1.2 主要试剂及仪器 LPS 购于美国 Sigma 公司, BTA 购于瑞士 Bubendorf 公司, PrimeScriptTM RT 反转录试剂盒购于日本 TaKaRa 公司, 大鼠 IL-1 β 的 ELISA 试剂盒购于美国 eBioscience 公司。ABI 7500 全自动 Real-time PCR 仪

为美国 ABI 公司产品。

1.2 动物实验

1.2.1 新生大鼠 BPD 模型的建立及干预 将孕 16.5 d 的 SD 大鼠 (足月为 22 d), 平衡体质量等因素后将其随机分为生理盐水组 (Saline 组)、LPS 组, LPS+BTA 组, 每组 6 只; 用 1% 戊巴比妥钠按 40 mg/kg 体质量对大鼠进行腹腔麻醉, 待其进入深度麻醉状态后, 备皮、消毒、铺巾、逐层开腹, 将胚胎从腹腔中逐个移出, 平放于无菌纱布上, 操作应无菌、轻柔。用玻璃针行羊膜腔内注射药物 (LPS、BTA 的溶剂均为无菌生理盐水)。① Saline 组: 每个胚胎注射生理盐水 5 μ L。② LPS 组: 每个胚胎注射 LPS 1 μ g (5 μ L)。③ LPS+BTA 组: 每个胚胎注射 LPS 1 μ g 和 BTA 0.1 μ g (5 μ L)。注射完毕后, 将胚胎放回腹腔中, 温热生理盐水行腹腔灌洗后逐层缝合, 手术过程应保持腹膜湿润, 将孕鼠放于恒温电热毯上待其自然苏醒, 并做好标记, 待其自然分娩。LPS+BTA 组新生鼠出生后每日定时腹腔注射 BTA (0.1 μ g/g), Saline 组和 LPS 组新生鼠按体质量给予等体积无菌生理盐水至出生第 7 日。

1.2.2 肺组织样本的收集 孕鼠自然分娩后, 随机取各组出生后 1、3、7 d 的新生鼠 (每组每个时间点取 6 只), 戊巴比妥钠麻醉, 打开胸腔并暴露气管, 结扎右肺根部, 左肺以 4% 多聚甲醛灌气管行内固定, 灌注压力为 20 cmH₂O (1 cmH₂O=0.098 kPa), 灌注完成的标志为肺叶轻度隆起, 肺尖边缘圆钝。摘右肺放入 EP 管中迅速放入液氮, 保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱; 左肺固定于 4% 多聚甲醛。

1.2.3 苏木精-伊红染色观察肺组织病理改变 左肺经 4% 多聚甲醛固定 24 h 后, 脱水、包埋、制片, 苏木精-伊红 (H-E) 染色, 显微镜下观察。各组随机选取 6 个样本, 每个样本经肺叶最大横截面切 3 张切片, 任选 1 张, 每张切片至少选取 4 个完全不重叠的视野 ($\times 200$) 摄片保留。采用 Image-J 软件分别统计肺泡数、次级间隔数、肺泡平均内衬间隔 (mean linear intercept, MLI)。MLI 代表肺泡腔内径的大小, 即在显微镜视野中央画十字交叉线, 计数线上经过的所有肺泡数量 (N), 并测出十字交叉线的总长度 (L), 计算 $MLI = L/N$, 单位为 μ m。每个统计量均取 4 个视野的平均值。

1.2.4 新生鼠肺组织间苯二酚碱性品红染色 左肺组织石蜡切片, 脱蜡至水, 高锰酸钾氧化, 草酸漂白, 间苯二酚碱性品红染色, 背景用盐酸乙醇分化, VG 染液 (饱和苦味酸与酸性品红 9:1) 复染, 封片, 显微镜下观察, 通常弹性蛋白呈紫红色, 背景为黄色或棕黄色, 染色过程中因染色时间长短不同和洗涤时间不同而颜色出现一定程度

的差异,但弹性蛋白的形态观察不受影响。

1.2.5 肺组织中炎症因子 *IL-1 β* mRNA 水平检测 按 TRIzol 试剂法提取各组右肺组织的总 RNA,应用 PrimeScript™ RT 反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA,采用 ABI7500 全自动 Real-time PCR 仪进行扩增检测。 β 肌动蛋白 (β -actin) 上、下游引物分别为 5'-GGAAATCGTGC GTGACATTA-3' 和 5'-AGGAAGGAAG-GCTGGAAGAG-3', *IL-1 β* 上、下游引物分别为 5'-GCCAA-CAAGTGGTATTCTCCA-3' 和 5'-TGCCGTCTTTCA-TCACACAG-3'。引物由生物工程 (上海) 股份有限公司合成。结果分析以 β -actin 为内参进行校正,以 Saline 组为对照组进行比较分析。

1.2.6 肺组织中炎症因子 *IL-1 β* 蛋白水平检测 将收集好的各组肺组织样本从 -80 °C 冰箱取出,每个样本准确称取 100 mg 组织置于 2 mL EP 管中,加入 400 μ L PBS,加入钢珠,高通量组织裂解仪裂解,组织匀浆完毕后,于 4 °C 5 000 \times g 离心 3 min,取上清液。按照 eBioscience 大鼠 *IL-1 β* 的 ELISA 试剂盒说明书步骤检测 *IL-1 β* 蛋白浓度。

1.3 细胞实验

1.3.1 测定不同刺激下小鼠巨噬细胞 *IL-1 β* mRNA 水平 培养小鼠巨噬细胞系 RAW264.7,培养基为 DMEM,10% 胎牛血清 (FBS),于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。LPS 组给予 LPS (1 μ g/mL) 刺激 6 h, LPS+BTA 组同时给予 LPS (1 μ g/mL) 和 BTA (50 nmol/L) 干预 6 h, Saline 组给予等量生理盐水。TRIzol 试剂法提取各组细胞的总 RNA,反转录生成 cDNA,采用 ABI 7500 全自动 Real-time PCR 仪进行扩增,检测 *IL-1 β* mRNA 的表达。 β -actin 上、下游引物分别为 5'-CTGAAGTACCCCATGAACA-TGGC-3' 和 5'-CAGAGCAGTAATCTCCTTCTGCAT-3', *IL-1 β* 上、下游引物分别为 5'-TGAAGGGCTGCTTCCAA-CCTTTGACC-3' 和 5'-TGTCCATTGAGGTGGAGAGCTTT-CAGC-3'。

1.3.2 测定不同刺激下小鼠巨噬细胞 *IL-1 β* 蛋白水平 体外培养 RAW264.7 细胞, LPS 组给予 LPS (1 μ g/mL) 刺激 12 h, LPS+BTA 组同时给予 LPS (1 μ g/mL) 及 BTA (50 nmol/L) 干预 12 h, Saline 组给予等量生理盐水。取

细胞培养上清液,用 ELISA 试剂盒检测巨噬细胞分泌 *IL-1 β* 的水平。

1.3.3 SD 大鼠骨髓巨噬细胞的培养、干预以及全转录组测序 取 4 周龄雄性 SD 大鼠 8 只,取股骨及胫骨,用 RPMI 1640 培养基将骨髓冲出并吹打均匀,裂解红细胞后重悬,用含有 40 ng/mL 巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) 的完全培养基 (含 10% FBS) 培养,弃去未贴壁细胞;培养至第 7 日 (培养基含 1% FBS) 将细胞分为 Saline 组、LPS 组 (LPS 1 μ g/mL)、LPS+BTA 组 (LPS 1 μ g/mL+BTA 50 nmol/L) 组,刺激 12 h 后抽提总 RNA。样本送北京贝瑞和康生物技术有限公司,应用 Illumina Hiseq2500V4 测序平台进行测序深度为 6 G 的全转录组测序,定量检测不同组别的基因表达水平。

1.4 统计学方法

采用 SAS 6.0 软件进行统计学分析,定量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,3 组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

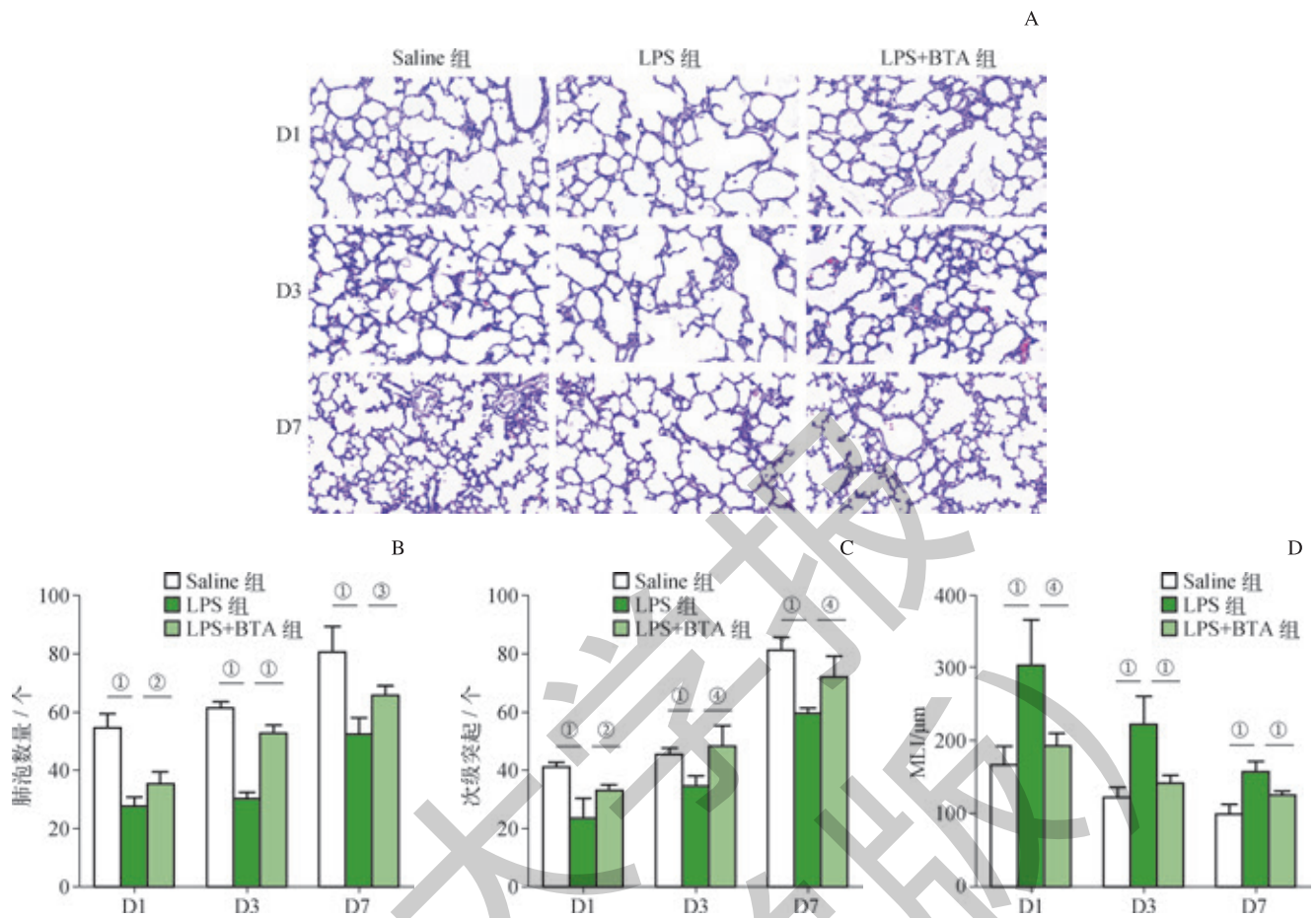
2 结果

2.1 新生鼠肺组织的病理改变

H-E 染色切片观察发现,与 Saline 组相比 LPS 组表现为典型的 BPD 病理改变:新生鼠肺泡数和次级间隔数明显减少,MLI 增大 (均 $P < 0.05$)。加入 BTA 干预可以改善这些病理变化,与 LPS 组相比肺泡数量、次级间隔数增多,MLI 缩小 (均 $P < 0.05$),肺泡化阻滞改善 (图 1)。

2.2 新生鼠肺组织弹性蛋白的形态改变

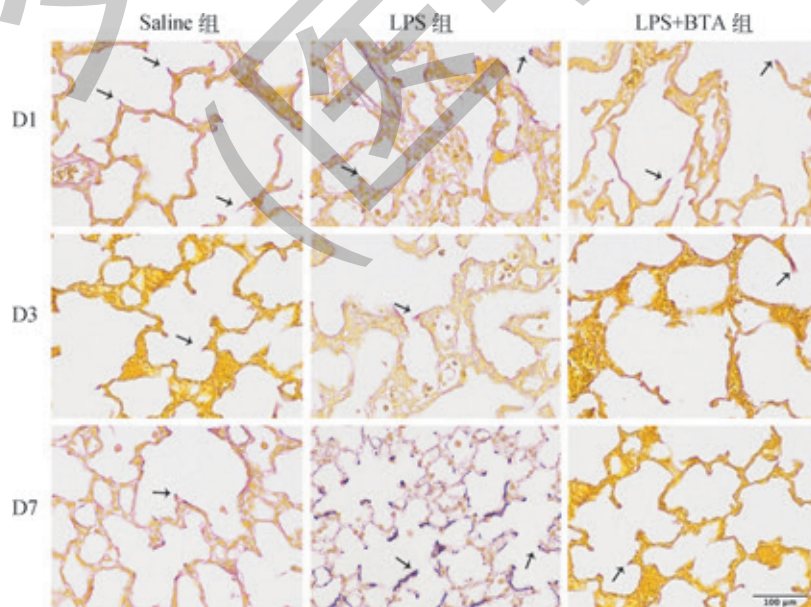
间苯二酚碱性品红染色结果显示:随着新生鼠日龄 (出生后 1、3、7 d) 的增加,Saline 组中弹性蛋白适量而有序地沉积在次级间隔顶端、肺泡间隔以及终末支气管骨架;而 LPS 组中次级间隔形成较少,弹性蛋白异常增生、增厚,沉积紊乱,肺泡间隔增厚,弹性蛋白广泛分布在远端终末肺泡腔壁上;加入 BTA 干预后,弹性蛋白的沉积紊乱得到了改善 (图 2)。



注: A. 新生鼠肺组织 H-E 染色切片 ($\times 200$); B. 新生鼠的肺泡数量比较; C. 新生鼠次级间隔数比较; D. 新生鼠 MLI 比较。^① $P=0.000$, ^② $P=0.001$, ^③ $P=0.009$, ^④ $P=0.002$ 。D1、D3、D7 分别表示出生后第 1 日、第 3 日、第 7 日

图 1 新生大鼠肺组织的病理学观察

Fig 1 Pathological observation of lung tissues in neonatal rats



注: 图中箭头所指为紫红色的弹性蛋白

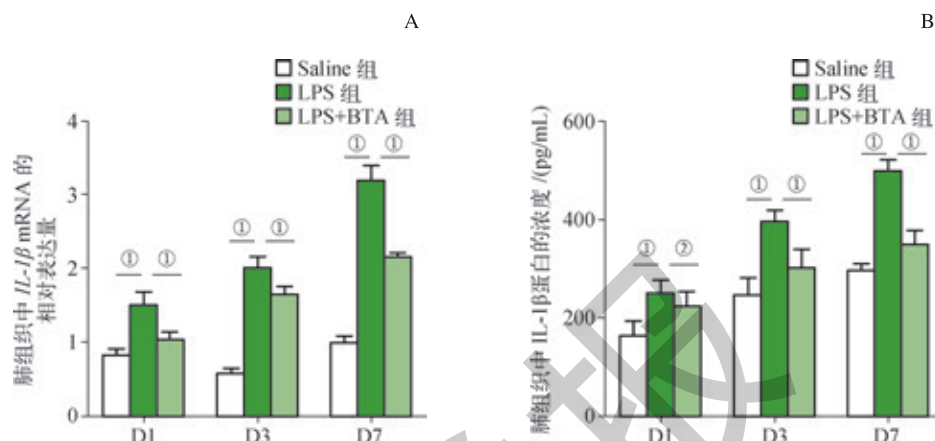
图 2 新生鼠肺组织的弹性蛋白分布 (间苯二酚碱性品红染色, $\times 200$)

Fig 2 Distribution of elastin in the lung tissues of neonatal rats (resorcin-fuchsin staining, $\times 200$)

2.3 新生鼠肺组织中 *IL-1 β* mRNA 和蛋白的表达情况

对于出生后 1、3、7 d 的新生鼠肺组织中的 *IL-1 β* mRNA 和蛋白水平, LPS 组均较 Saline 组增高, 并且

BTA 可以改善 *IL-1 β* mRNA 和蛋白水平的高表达, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 3)。



注: A. *IL-1 β* mRNA 的表达; B. *IL-1 β* 蛋白的表达。① $P=0.000$, ② $P=0.035$

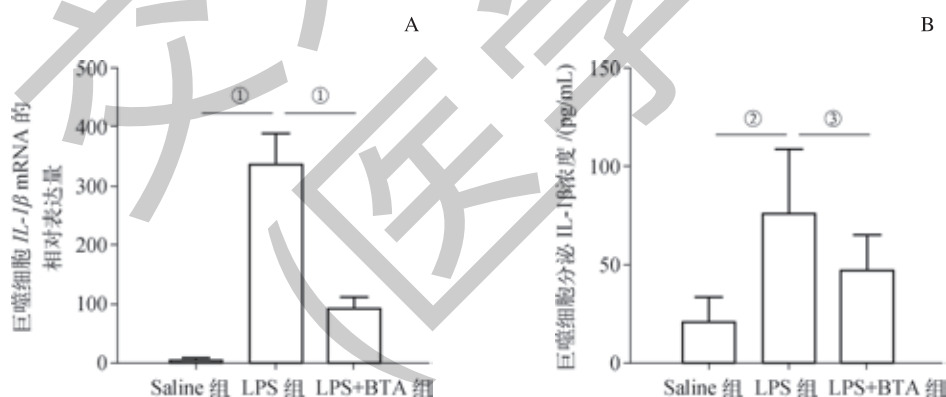
图 3 BTA 对 BPD 新生鼠的肺组织 *IL-1 β* mRNA 和蛋白表达的影响

Fig 3 Effects of BTA on the expression of *IL-1 β* mRNA and protein in lung tissues of neonatal rats with BPD

2.4 LPS 刺激和 BTA 干预后的巨噬细胞 *IL-1 β* mRNA 和蛋白的表达情况

在 LPS 诱导巨噬细胞的体外实验中, 实时定量 PCR 显示, LPS 刺激后 *IL-1 β* mRNA 表达较 Saline 组增

高 ($P < 0.05$); 加入 BTA 干预后, 与 LPS 组相比 *IL-1 β* mRNA 的表达下调 ($P < 0.05$)。通过 ELISA 实验测定蛋白水平的 *IL-1 β* 表达变化, 结果同转录水平一致 (图 4)。



注: A. *IL-1 β* mRNA 的表达; B. *IL-1 β* 的蛋白水平。① $P=0.000$, ② $P=0.002$, ③ $P=0.042$

图 4 BTA 对 LPS 刺激后小鼠巨噬细胞 RAW264.7 *IL-1 β* mRNA 和蛋白表达的影响

Fig 4 Effect of BTA on *IL-1 β* mRNA and protein expression in mouse macrophages RAW264.7 stimulated by LPS

2.5 大鼠骨髓巨噬细胞的全转录组测序

为了探究 BTA 对 BPD 的作用, 我们通过体外培养 SD 大鼠骨髓巨噬细胞, 抽提总 RNA, 做测序深度为 6 G 的全转录组测序。根据 RPKM 值 (reads per kilobase per million mapped reads, 表示消除基因长度和测序差异后的基因表达量, 可直接用于比较不同样本间基因表达差

异), 并通过 GO (Gene Ontology) 数据库分析, 筛选出 LPS 组中相较于 Saline 组表达上调或下调的免疫或炎症的相关基因, 且加入 BTA 后可以抑制 LPS 的这种上调或者下调作用。结果显示: BTA 可以抑制一些 LPS 诱导的炎症因子基因高表达, 如 Toll 样受体 2 (toll-like receptor 2, *Tlr2*)、髓样细胞触发受体 1 (triggering receptor expressed

on myeloid cells 1, *Trem1*)、表面抗原分化簇 274 (cluster of differentiation 274, *Cd274*)、IgG 受体 II b Fc 段 (Fc fragment of IgG receptor II b, *Fcgr2b*)、*Fcgr2a* 等 (表 1); 而 BTA 对一些 LPS 引起的抗炎因子基因表达下调也有反向调节作用, 如补体 C1q C 链 (complement C1q C chain, *C1qc*)、*C1qa*、*RT1-Da* (RT1 class II, locus Da)、*RT1-Db1* (RT1 class II, locus Db1)、*Cd74* 等 (表 2)。

表 1 可被 BTA 抑制的 LPS 诱导表达上调的炎症或免疫相关基因 (RPKM 值)
 Tab 1 Upregulated inflammatory or immune-related genes induced by LPS inhibited by BTA (RPKM values)

基因缩写	Saline 组	LPS 组	LPS+BTA 组
<i>Thbs1</i> ^①	4.079 0	601.435 5	130.443 9
<i>Trem1</i>	17.143 0	246.401 2	100.278 8
<i>Cd274</i>	19.578 1	276.548 6	72.562 9
<i>Fcgr2b</i>	36.109 6	437.157 4	129.329 0
<i>Fcgr2a</i>	59.900 1	722.821 4	353.711 8
<i>Adgre1</i> ^②	325.160 0	3 743.143 3	444.533 2
<i>Tlr2</i>	53.494 0	429.866 4	159.589 5
<i>Ctsl</i> ^③	600.891 6	2 009.532 2	506.958 3
<i>Csf1r</i> ^④	200.108 1	667.690 0	213.538 8
<i>Psmal</i> ^⑤	42.432 9	123.344 7	43.520 8
<i>Skap2</i> ^⑥	79.978 8	173.021 8	47.356 7
<i>Ccr5</i> ^⑦	0.373 5	8.467 0	0.620 7
<i>RT1-CE16</i> ^⑧	0.110 3	69.190 8	0.205 9
<i>RT1-Bb</i> ^⑨	0.353 0	12.464 4	0.256 2

注: ^① 血小板应答蛋白 1 (thrombospondin 1); ^② adhesion G protein-coupled receptor E1; ^③ 组织蛋白酶 L (cathepsin L); ^④ 集落刺激因子 1 受体 (colony stimulating factor 1 receptor); ^⑤ 蛋白酶体亚基 $\alpha 1$ (proteasome subunit $\alpha 1$); ^⑥ Src 激酶相关磷蛋白 2 (Src kinase-associated phosphoprotein 2); ^⑦ CC 趋化因子受体 5 (CC chemokine receptor 5); ^⑧ RT1 class I, locus CE16; ^⑨ RT1 class II, locus Bb

表 2 可被 BTA 反向调控的 LPS 诱导表达下调的炎症或免疫相关基因 (RPKM 值)
 Tab 2 Inflammatory or immune-related genes downregulated by LPS reversibly regulated by BTA (RPKM values)

基因缩写	Saline 组	LPS 组	LPS+BTA 组
<i>RT1-Da</i>	141.571 4	37.875 1	95.929 8
<i>RT1-Db1</i>	21.056 1	1.721 2	11.684 3
<i>S100a9</i> ^①	28.456 1	2.467 2	10.869 1
<i>C1qc</i>	99.246 5	18.374 1	30.298 8
<i>C1qa</i>	91.839 1	17.705 3	30.058 7
<i>Cd74</i>	618.966 8	183.174 9	361.814 8
<i>Ptms</i> ^②	9.496 4	3.757 6	8.605 0

注: ^① S100 钙结合蛋白 A9 (S100 calcium binding protein A9); ^② 蛋白质翻译后修饰蛋白 (post translational protein modifications)

3 讨论

BPD 是导致新生儿残疾及死亡的主要原因之一^[7]。自 BPD 概念提出以来, BPD 的流行病学和病理生理学发生了很大的变化。以往认为 BPD 是由于氧疗和机械通气引起肺损伤而导致的, 现在发现 BPD 的发生主要是由于正常发育的中断。BPD 主要影响人群为出生体质量少于 1 500 g 和胎龄小于 32 周的婴儿。近年来合并宫内感染或炎症的超低出生体质量儿的 BPD 发生率居高不下^[8]。有学者提出, 炎症和感染是 BPD 发生发展的关键因素; 近年来多项研究^[4-5, 9]均证实妊娠晚期宫腔内感染与 BPD 有关, 绒毛膜羊膜炎会增加早产儿 BPD 发病率。

AKGs 具有多种生物学效应, 能促进血细胞如粒细胞、淋巴细胞及血小板增生, 尤其是其免疫调节功能的作用得到业内的广泛关注。研究^[10-11]发现 AKGs 能提高淋巴细胞增殖与成熟, 可通过辅助 T 淋巴细胞活化来影响 Th1/Th2 平衡。BTA 作为 AKGs 中重要的组成成分, 能在炎症反应中降低 IL-1 β 、IL-6 等炎症因子的分泌, 具有显著的抗炎活性^[3, 12-13]。

本研究通过宫腔内注射 LPS 诱导新生大鼠的 BPD 模型并给予 BTA 干预, H-E 染色结果显示 BTA 可以改善 BPD 的病理改变, 弹性蛋白间苯二酚碱性品红染色结果显示 BTA 一定程度上可以改善 BPD 模型中的弹性蛋白沉积紊乱、肺泡间隔增厚等现象, 提示了 BTA 可以改善 BPD 的肺泡化阻滞。临床研究^[14]证明, 脐血中 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 和干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ) 等的水平与 BPD 呈正相关, 并且发现 IL-1 β 和 IFN- γ 会增加 BPD 的发生, 临床上抑制免疫细胞活化产生炎症因子的药物如激素, 对 BPD 的防治具有明确的效果。IL-1 β 是炎症反应的起始因子, 研究^[15]证实在动物模型中注射 IL-1 β 受体拮抗剂能够抑制 LPS 诱导的炎症反应综合征, 改善炎症引起的肺组织病理改变。由此可见, IL-1 β 是 BPD 发病的关键环节。

通过分析 BPD 中 IL-1 β 分泌增多的潜在机制, 并结合 BTA 在炎症中的作用机制, 我们提出 BTA 可能通过调节 IL-1 β 的分泌从而调节 BPD 的病理改变。本研究结果显示 BPD 新生鼠肺组织中 *IL-1 β* mRNA 及蛋白表达量均明显增加, 给予 BTA 干预后, *IL-1 β* mRNA 及蛋白表达量均较 LPS 组明显降低, 提示 BTA 可能通过抑制 IL-1 β 的表达减轻肺组织炎症。同时在体外实验中, 我们进一步证明了 BTA 可以改善 LPS 诱导的巨噬细胞 IL-1 β 分泌增多。因此我们认为 BTA 可能具有调节巨噬细胞功能的作用, 从而影响 IL-1 β 的表达。

BTA 如何调节 IL-1 β 的表达, 以及 BTA 与巨噬细胞

功能之间的作用机制研究仍未明了, 我们通过全转录组测序寻找 BTA 调控炎症的靶基因, 探索 BTA 改善 BPD 的具体机制。在全转录组测序中, BTA 可以下调 LPS 诱导的炎症因子表达增高, 并上调被 LPS 抑制的抗炎因子, 从而改善炎症反应。其中促炎因子 CD274、TREM1 等与免疫细胞的激活有关^[16], 并且 ADGRE1、CSF1R 等与巨噬细胞的黏附和趋化有关^[17], PSMA1 通过 Src 通路调节炎症^[18]。在抗炎因子中 RT1-CE16 对 T 细胞介导的细胞毒作用有正向调节作用并能促进 CD8⁺T 细胞的增殖; RT1-Bb 参与 B 细胞亲和力的成熟, 正向调节 Th1 型免疫反应, 参与细胞对糖皮质激素刺激所发生的反应^[19]; C1qC、

C1qA 通过补体系统调节炎症反应, 清除外来有害物质^[20]; S100a9 与中性粒细胞炎症因子有关^[21]; PTMS 通过调节炎症蛋白转录后修饰干扰炎症反应^[22]。这在一定程度上解释了 BTA 如何抑制 LPS 引起的炎症反应, 同时为研究 BTA 如何调节炎症反应提供了思路。

综上, 我们认为 BTA 通过作用于巨噬细胞, 通过调节炎症细胞分泌炎症因子如 IL-1 β 表达水平从而改善 LPS 诱导的新生鼠 BPD。临床药理学研究证明, AKGs 具有非常好的耐受性, 安全剂量范围很大^[23]。因此, 研究 BTA 对 BPD 的作用机制, 并探究 BTA 对 BPD 的最佳剂量, 可以促进 BPD 的防治, 有助于 BPD 发病机制的研究及治疗。

参 · 考 · 文 · 献

- [1] Kalikkot Thekkevedu R, Guaman MC, Shivanna B. Bronchopulmonary dysplasia: a review of pathogenesis and pathophysiology[J]. Respir Med, 2017, 132: 170-177.
- [2] Jobe AH. The new bronchopulmonary dysplasia[J]. Curr Opin Pediatr, 2011, 23(2): 167-172.
- [3] Ambalavanan N, Carlo WA, D'Angio CT, et al. Cytokines associated with bronchopulmonary dysplasia or death in extremely low birth weight infants[J]. Pediatrics, 2009, 123(4): 1132-1141.
- [4] Rivera L, Siddaiah R, Ojimmuo C, et al. Biomarkers for bronchopulmonary dysplasia in the preterm infant[J]. Front Pediatr, 2016, 4: 33.
- [5] Rudloff I, Cho SX, Bui CB, et al. Refining anti-inflammatory therapy strategies for bronchopulmonary dysplasia[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(6): 1128-1138.
- [6] Deniau AL, Mosset P, Pédrone F, et al. Multiple beneficial health effects of natural alkylglycerols from shark liver oil[J]. Mar Drugs, 2010, 8(7): 2175-2184.
- [7] Jensen EA, Schmidt B. Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2014, 100(3): 145-157.
- [8] Voynow JA. "New" bronchopulmonary dysplasia and chronic lung disease[J]. Paediatr Respir Rev, 2017, 24: 17-18.
- [9] Plakkal N, Soraisham AS, Trevenen C, et al. Histological chorioamnionitis and bronchopulmonary dysplasia: a retrospective cohort study[J]. J Perinatol, 2013, 33(6): 441-445.
- [10] Qian L, Zhang M, Wu S, et al. Alkylglycerols modulate the proliferation and differentiation of non-specific agonist and specific antigen-stimulated splenic lymphocytes[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e96207.
- [11] Yamamoto N, St Claire DA Jr, Homma S, et al. Activation of mouse macrophages by alkylglycerols, inflammation products of cancerous tissues[J]. Cancer Res, 1988, 48(21): 6044-6049.
- [12] Ocaña A, Gómez-Asensio C, Arranz-Gutiérrez E, et al. *In vitro* study of the effect of diesterified alkoxyglycerols with conjugated linoleic acid on adipocyte inflammatory mediators[J]. Lipids Health Dis, 2010, 9: 36.
- [13] Köksal N, Kayik B, Çetinkaya M, et al. Value of serum and bronchoalveolar fluid lavage pro- and anti-inflammatory cytokine levels for predicting bronchopulmonary dysplasia in premature infants[J]. Eur Cytokine Netw, 2012, 23(2): 29-35.
- [14] Kunzmann S, Collins JJ, Kuypers E, et al. Thrown off balance: the effect of antenatal inflammation on the developing lung and immune system[J]. Am J Obstet Gynecol, 2013, 208(6): 429-437.
- [15] 杨奕辉, 刘成博, 陈泽, 等. 白介素-1 β 在羊膜腔内注射脂多糖导致的新生鼠肺泡阻滞中的作用[J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2017, 37(4): 478-482.
- [16] Chan FC, Scott DW, Hother C, et al. Genetic alterations in immune cell crosstalk genes in diffuse large B-cell lymphoma predict survival[J]. Blood, 2013, 122(21): 500.
- [17] Hamann J, Hsiao CC, Lee CS, et al. Adhesion GPCRs as modulators of immune cell function[J]. Handb Exp Pharmacol, 2016, 234: 329-350.
- [18] Safari-Alighiarloo N, Taghizadeh M, Tabatabaei SM, et al. Identification of new key genes for type 1 diabetes through construction and analysis of protein-protein interaction networks based on blood and pancreatic islet transcriptomes[J]. J Diabetes, 2017, 9(8): 764-777.
- [19] Ettinger RA, Moustakas AK, Lobaton SD. Open reading frame sequencing and structure-based alignment of polypeptides encoded by RT1-Bb, RT1-Ba, RT1-Db, and RT1-Da alleles[J]. Immunogenetics, 2004, 56(8): 585-596.
- [20] McCloskey ML, Curotto de Lafaille MA, Carroll MC, et al. Acquisition and presentation of follicular dendritic cell-bound antigen by lymph node-resident dendritic cells[J]. J Exp Med, 2011, 208(1): 135-148.
- [21] Gebhardt C, Németh J, Angel P, et al. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(11): 1622-1631.
- [22] Liu J, Qian C, Cao X. Post-translational modification control of innate immunity[J]. Immunity, 2016, 45(1): 15-30.
- [23] Anadón A, Martínez MA, Ares I, et al. Acute and repeated dose (28 days) oral safety studies of an alkoxy glycerol extract from shark live roil in rats[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(3): 2040-2046.

[收稿日期] 2019-03-05

[本文编辑] 瞿麟平