急性肺损伤小鼠肺泡巨噬细胞 *TREM*1 mRNA 的表达及意义

王耀炜, 王惠芳
(西安医学院第二附属医院 呼吸科, 陕西 西安 710038)

[摘 要] **目的**: 研究脂多糖(LPS)致急性肺损伤(ALI)小鼠肺泡巨噬细胞(AM)髓系细胞触发受体 1(*TREM*1)mRNA 的表达及意义。**方法**:48 只小鼠分成对照组和实验组,对照组腹腔注射生理盐水,实验组腹腔注射 LPS 诱导 ALI 模型;于灌注后 3、6、12 及 24 h,采用荧光定量逆转录(RT-PCR)方法检测支气管肺泡灌洗液中提取的 AM 中 *TREM*1 mRNA 表达水平,用 ELISA 法检测支气管肺泡灌洗液上清液中的 TNFα、可溶性 TREM1(sTREM1)水平,并分析 *TREM*1 mRNA 与 sTREM1 和 TNFα 表达水平的相关性。**结果**:各对照组 AM 均表达 *TREM*1 mRNA,但各时间点比较差异无统计学意义($P>0.05$);观察组 *TREM*1 mRNA、TNFα 及 sTREM1 的表达均在 3 h 时上升致最高,之后下降;*TREM*1mRNA 与 sTREM1 及 TNFα 的表达水平呈正相关($r=0.783$,$P<0.001$;$r=0.472$,$P<0.05$)。**结论**:ALI 小鼠支气管肺泡灌洗液、及其 AM 中 *TREM*1 mRNA 表达水平升高,*TREM*1 mRNA 升高与 sTREM1、TNFα 呈正相关。

[关键词] 髓系细胞触发受体 1; 脂多糖; 急性肺损伤; 肺泡; 巨噬细胞; 肿瘤坏死因子 α
[中图分类号] R364.5 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2017)08-0911-04
DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.08.010

Expression and Clinical Significant of *TREM*1 mRNA of Rat Alveolar Macrophages in Acute Lung Injury

WANG Yaowei, WANG Huifang
(*Department of Respiration, Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical College, Xi'an 710038, Shaanxi, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the expression and clinical significance of *TREM*1 mRNA in the alveolar macrophages (AM) of acute lung injury induced by lipopolysaccharide (LPS) in rat. **Methods**:48 rats were randomly divided into control group and experiment group, control group was intraperitoneally injected with normal saline; experiment group was intraperitoneally injected with LPS to induce ALI model. After 3, 6, 12 and 24 h, RT-PCR was adopted to detect *TREM*1 mRNA expression level in AM extracted from bronchoalveolar lavage fluid. ELISA was used to detect the concentration of TNF-α and soluble *TREM*1 level in supernatant of bronchoalveolar lavage fluid; analyzing correlation between expression level of *TREM*1 mRNA and sTREM1 together with TNFα. **Results**:AM of control group expressed *TREM*1 mRNA, while comparison differences of each time point showed no statistical significance($P>0.05$);the expression of *TREM*1 mRNA, TNFα and sTREM1 rose to the highest in 3h, then declined; expression of *TREM*1 mRNA and TNFα and sTREM1 level were positively correlated($r=0.783$, $P<0.001$ *and* $r=0.472$, $P<0.05$). **Conclusion**:ALI rat bronchoalveolar lavage fluid and expression level of *TREM*1 mRNA increased, the increase of *TREM*1 mRNA was positively correlated with sTREM1 and TNFα.

[**Key words**] myeloid cell triggering receptor 1; lipopolysaccharide; acute lung injury; alveolar; macrophages; tumor necrosis factor α

网络出版时间:2017-8-17 网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170817.1032.020.html

肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage,AM)是肺内接触抗原最早的细胞,参与肺内早期炎症反应的启动与维持。髓系细胞触发受体(TREM)是最新发现的一组免疫球蛋白超家族受体,在巨噬细胞、中性粒细胞或树突状细胞等均有表达,迄今发现至少包括 TREM1、TREM2 两种受体[1]。既往的研究曾发现 AM 表面表达 TREM1 蛋白,sTREM-1 是 TREM-1 的可溶性形式,可以在血液、组织及支气管肺泡灌洗液等多种标本中被检测到。近期研究发现,sTREM1 表达水平对急性肺损伤(ALI)、急性呼吸窘迫综合症(ARDS)、社区获得性肺炎(CAP)等多种疾病诊断及病情严重程度评估有价值的指标[2],因此本研究检测 AM 培养上清液中 sTREM-1 水平,分析其与 *TREM*1 mRNA 表达的相关性探讨 TREM1 在 AM 介导炎症反应中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

近交系 C57BL/6 小鼠,8 ~12 周龄,体质量 22 ~26 g,由中国医学科学院实验动物研究所提供。

1.2 主要试剂和设备

脂多糖(LPS,Sigma)溶于磷酸盐缓冲液(PBS)中(5 g/L),配成腹腔注射 LPS 液;离心柱型总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司),一步法 cDNA 合成试剂盒(日本 Takara 公司),2 × Taq PCR sterMix、DNA Marker Ⅰ(天根生化科技北京有限公司);*TREM*1 mRNA 和 β-actin 引物序列由上海基康生物公司合成,GeneAmp PCRSystem 9700PCR 扩增仪(上海宏润医疗设备有限公司),凝胶成像分析仪(美国 Bio-Rad 公司),－80 ℃超低温冰箱(美国 Thermo 公司)。

1.3 方法

1.3.1 分组及采集 AM　随机将 48 只小鼠均分为对照组(24 只)和实验组(24 只),对照组腹腔注射生理盐水(4 mL/kg),实验组腹腔注射 LPS (20 mg/kg)建立 ALI 模型。两组小鼠腹腔注射后于 3、6、12、24 h 时间点各处死 6 只小鼠,并行支气管肺泡灌洗术。分别将两组各时间点所得灌洗液离心,所得细胞行细胞培养并提取、纯化 AM;同时留取各组各时间点灌洗液离心后上清液。

1.3.2 测定 AM 中 *TREM*1 mRNA 的表达　按试剂盒说明书提取纯化获得的 AM 中总 RNA,测定总 RNA 的浓度和纯度,使 A260/A280 >1.8,定量后进行一步法 cDNA 反转录反应。取 cDNA 4 μL 配置 PCR 反应溶液,加入模板引物和 Tap 酶至总反应体系 20 μL,置于 PCR 扩增仪上进行 PCR 反应。*TREM*1 mRNA 的 PCR 条件为:94 ℃ 2 min,然后 94 ℃变性 15 s、60 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 30 s、共 40 个循环,扩增片段长度为109 bp。β-actin 的 PCR 条件为:94 ℃ 3 min,94 ℃变性 15 s、60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 15 s,30 个循环,扩增片段长度为 123 bp。扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,marker 和 PCR 产物上样量均为5 μL,得到目的基因和内参的条带,经凝胶成像分析系统扫描后,通过目的基因与内参的吸光度(A)值的比值表示 *TREM*1 mRNA 的相对表达量。*TREM*1 mRNA 和内参 β-actin 的引物序列由本室设计,上海基康生物公司合成。*TREM*1 mRNA 扩增引物及荧光探针:上游引物 5’-GGTCTTGGAGTCACTATCATAAATGG-3’,下游引物 5’-TGATGAAAACCAGGCTCTTGCT-3’,荧光探针 5’-FAM-AGATGCTGACAGTGTCTCCACATCCAGTGT -MGB-3’。β-actin 扩增引物及荧光探针:上游引物 5’- AGCGGTTCCGATGCCCT -3’,下游引物 5’-AGAGGTCTTTACGGATGTCAACG-3’,荧光探针 5’-FAM-CCTTCCTTCTTGGGTATGGAATCCTGTG-BHQ1-3’。

1.3.3 支气管肺泡灌洗上清液中 TNFα 及 sTREM1 的含量　小鼠支气管肺泡灌洗液离心后取上清液,按照 ELISA 试剂盒说明操作,检测上清液中 TNFα 及 sTREM1 的含量。

1.4 统计学分析

计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,资料分析采用 SPSS 13.0 统计软件中的单因素方差分析,各时间点组间多重比较采用最小显著差法。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AM 中 *TREM*1 mRNA 表达

各对照组 AM 均表达 *TREM*1 mRNA,各时间点 AM 表达的 *TREM*1 mRNA 比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。在受到 LPS 刺激致 ALI 后 AM 中 *TREM*1mRNA 的表达各时间点均高于对照组,在 LPS 干预后的 3 h 时 *TREM*1 mRNA 的表达达到最高水平,之后逐渐下降,但均高于对照组,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1　AM 中 *TREM*1 mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1　Expression level of *TREM*1 mRNA in AM

时间	*TREM*1 mRNA 表达	
	对照组	实验组
3 h	0.34 ± 0.56	8.58 ± 5.43(1)
6 h	0.42 ± 0.26	6.27 ± 3.62(1)
12 h	0.46 ± 0.15	4.37 ± 2.64(1)
24 h	0.37 ± 0.18	2.35 ± 1.13(1)

(1) 与对照组比较, $P < 0.05$

2.2　支气管肺泡灌洗上清液中 TNFα 及 sTREM1 水平

ELISA 法对支气管肺泡灌洗上清液中 TNFα 的定量检测显示,各对照组支气管肺泡灌洗上清液中有少量 TNFα 及 sTREM1 表达,各时间点灌洗液比较差异无统计学意义($P > 0.05$);实验组 3 h 时 TNFα 及 sTREM1 上升到最高水平,之后逐渐下降,但到 24 h 仍高于对照组,与对照组相比差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2　支气管肺泡灌洗上清液中 TNFα 及 sTREM1 水平(ng/L, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2　The levels of TNFα and sTREM1 in bronchoalveolar lavage fluid

指标	组别	3 h	6 h	12 h	24 h
TNFα	对照组	7.28 ± 0.26	7.59 ± 0.39	8.16 ± 1.36	8.32 ± 1.53
	实验组	35.25 ± 4.56(1)	31.19 ± 4.18(1)	25.37 ± 3.14(1)	18.59 ± 2.15(1)
sTREM1	对照组	58.18 ± 9.26	60.17 ± 10.18	59.34 ± 10.37	57.39 ± 8.15
	实验组	180.39 ± 22.16(1)	158.16 ± 23.08(1)	106.17 ± 21.45(1)	81.78 ± 18.13(1)

(1) 与对照组比较, $P < 0.05$

2.3　*TREM*1 mRNA 与 TNFα、sTREM1 表达的关系

*TREM*1 mRNA 与 TNFα 表达呈正相关($r = 0.472$, $P < 0.05$),与 sTREM1 的表达呈高度正相关($r = 0.783$, $P < 0.001$)。

3　讨论

TREM1 是近年来发现在炎症中有重要作用的免疫球蛋白超家族成员。既往研究发现其主要在单核或巨噬细胞、中性粒细胞及树突状细胞表达,主要由赖氨酸残基的跨膜结构域、V 型 Ig 样胞外结构域和缺乏信号基序的胞浆结构域等 3 个部分组成[2]。既往研究发现,TREM1 参与和辅助炎症反应的级联放大,起到促发和扩大炎症的作用。Haselmayer P 等[3]的研究发现 TREM1 可以应答内源和外源性危险信号,协同和放大 TLR4 介导的信号通路,加强炎症反应,最终导致失控性炎症反应。既往在脓毒症、急性胰腺炎、肺炎等炎症反应中均发现 TREM1 的过度表达[4]。本实验前期研究曾发现正常情况下 AM 表面即低表达 TREM1 蛋白,受到 LPS 刺激后表达上升。本次研究利用 RT-PCR 检测方法着重从分子水平揭示 LPS 刺激小鼠致 ALI 后肺泡巨噬细胞 *TREM*1mRNA 的表达规律,进一步探讨 TREM1 在炎症反应中作用。

本研究结果显示,在正常情况下 AM 即低水平表达 *TREM*1 mRNA,在给予 LPS 刺激造成 ALI 后 3 h 时,*TREM*1 mRNA 表达大幅度上升到达最高点,然后从 6 h 开始又逐渐下降,到 24 h 仍然高于正常水平。支气管肺泡灌洗液中炎症因子 TNFα 的表达在 3 h 时达到最高,此后逐渐下降,到 24 h 仍然高于正常水平;sTREM1 表达在实验组均明显升高,3 h 时达到最高值。AM 中 *TREM*1 mRNA 表达水平与支气管肺泡灌洗上清液中 TNFα 含量相关性分析发现两者呈正相关($r = 0.472$);而 *TREM*1 mRNA 与 sTREM1 的含量呈高度正相关($r = 0.783$)。从而进一步推断 TREM1 的功能可能是促进炎症反应的扩大,其是 TREM 家族中的一个刺激性受体,sTREM1 表达水平的高低可能更好的反应炎症反应的程度。TREM1 发挥促炎的机制如何目前尚未完全阐释清楚,Arts RJ 等[4]的研究发现抗 TREM1 抗体可以抑制 LPS 导致 TNFa 的产生,而用特定的 TLR4 抑制剂可以导致 TREM1 水平的下调,间接表明 TREM1 可以通过 LPS-TLR4 通路起作用。TREM1 可以刺激并放大 TLR4 通路,产生多种炎症因子。而相反,TLR4 通路中的炎症因子等物质可能反向刺激并调控 TREM1 的表达水平。而 Molad Y 等[5]的研究表明一种新的 CpG-ODN(CpG 寡聚核苷酸)可以通过 TLR9 途径调节巨噬细胞 TREM-1 表达和脱落,证明 TREM1 的表达与调控尚与 TLR9 通路相关。近年 Zheng H 等[6]的研究表明 TLR 受体通路下游的转导蛋白 MYD88 可以诱导 TREM1 的表达,说明 LPS-TLR-TREM 通路调节的中间环节可能受到多种受体、细胞因子的共同参与。sTREM1 既往的研究多集中

在对炎症反应的早期预测以及疾病预后评估。最新的研究发现,sTREM1 可以抵抗膜表面 TREM1 的促炎作用,从而起到抗炎作用,并与多种炎性疾病发生发展密切相关[7],从而初步推测 AM 在受到外界刺激导致 TREM1 表达增加促进炎症级联放大的同时启动炎症反应自我调节机制,通过其下游产物 sTREM1 表达的增加来抑制炎症反应的进一步扩大。如果外界刺激不能及时去除而持续扩大,则 sTREM1 调节作用下降从而导致炎症反应继续加重。总之在促炎物质引发炎症反应后,TREM1 通过表达上调来扩大炎症反应,产生的致炎和抗炎细胞因子可能又反作用于 TREM1 受体,调节其在细胞的表达,提示可能存在调控 TREM1 表达的自分泌环。对 TRME1 在 AM 表达以及调控机制的研究可能为将来 ALI、ARDS、脓毒症等多种炎性疾病的治疗提供新的治疗方法,需要更进一步深入的研究。

4 参考文献

[1] Siranovi M, Kovac J, Gopcevi S, et al. Human soluble TREM-1:lung and serum levels in patients with bacterial ventilator associatedpneumonia[J]. Acta Clin Croat,2011(3):345 - 349.

[2] Tintinger GR, van der Merwe JJ, Fickl H, et al. Soluble triggering re-ceptor expressed on myeloid cells in sputum of patients with commu-nity-acquired pneumonia or pulmonary tuberculosis:a pilot study[J]. Eur Respir J,2012(1):73 - 76.

[3] Haselmayer P, Daniel M, Tertilt C, et al. Signaling pathways of the TREM-1- and TLR4-mediated neutrophil oxidative burst[J]. J Innate Immun,2009(6):582 - 591.

[4] Arts RJ, Joosten LA, Dinarello CA, et al. TREM-1 interaction with the LPS/TLR4 receptor complex[J]. Eur Cytokine Netw,2011(1):11 - 14.

[5] Molad Y, Pokroy-Shapira E, Carmon V. CpG-oligodeoxynucleotide-induced TLR9 activation regulates macrophage TREM-1 expression and shedding[J]. Innate Immun, 2013 (6):623 - 630.

[6] Zheng H, Heiderscheidt CA, Joo M, et al. MYD88-dependent and -independent activation of TREM-1 via specific TLR ligands[J]. Eur J Immunol,2010(1):162 - 171.

[7] Gomez-pin AV, Martinez E, Fernandez-ruiz I, et al. Role of MMPs inorchestrating In-flamematory response in human monocytes via a TREM-l-PI3K-NF-kappaB pathway[J]. J Leukoc Biol,2012 Jun;91(6):933 - 45.

(2017-03-26 收稿,2017-06-18 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 赵 毅

(上接第 905 页)

[18] Jia LF, Wei SB, Gan YH, et al. Expression, regulation and roles of miR-26a and MEG3 in tongue squamous cell carcinoma[J]. Int J Cancer, 2014(10):2282 - 2293.

[19] Gao W, Chan JY, Wong TS. Long non-coding RNA deregulation in tongue squa-mous cell carcinoma[J]. Biomed Res Int, 2014(2014):405860.

[20] Zhang H, Zhao L, Wang YX, et al. Long non-coding RNA HOTTIP is correlated with progression and prognosis in tongue squamous cell carcinoma[J]. Tumour Biol, 2015(11):8805 - 8809.

[21] Liang J, Liang L, Ouyang K, et al. MALAT1 induces tongue cancer cells´EMT and inhibits apoptosis through Wnt/ beta-catenin signaling pathway[J]. J Oral Pathol Med , 2017 (2):98 - 105.

(2017-05-12 收稿,2017-07-21 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 乐 萍

(上接第 910 页)

[14] Shi J, Zhang C, Yi Z, et al. Explore the variation of MMP3, JNK, p38 MAPKs, and autophagy at the early stage of osteoarthritis[J]. IUBMB Life,2016(4):293 - 302.

[15] Kong CG, Park JB, Kim MS, et al. High glucose accelerates autophagy in adult rat intervertebral disc cells[J]. Asian Spine J, 2014(5):543 - 548.

[16] Jiang L, Jin Y, Wang H, et al. Glucosamine protects nucleus pulposus cells and induces autophagy via the mTOR-dependent pathway[J]. J Orthop Res, 2014(11):1532 - 1542.

[17] Zhang Z, Zhu JY, Roh J, et al. TOR signaling promotes accumulation of BZR1 to balance growth with carbon availability in arabidopsis[J]. Curr Biol, 2016 (14): 1854 - 1860.

[18] Pellegrini C, Columbaro M, Capanni C, et al. All-trans retinoic acid and rapamycin normalize Hutchinson Gilford progeria fibroblast phenotype[J]. Oncotarget, 2015(30):29914 - 29928.

(2017-04-19 收稿,2017-06-28 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 赵 毅