

白细胞介素 38 在慢性阻塞性肺疾病大鼠气道炎症形成中的相关性研究

贾卫红 杨栋才*通讯作者

(西北大学附属医院西安市第三医院呼吸与危重症医学科 陕西西安市 710083)

摘要: 目的: 研究白细胞介素 38 在慢阻肺血清和肺泡灌洗液中的表达水平, 探讨慢阻肺患者中 IL-38 在气道炎症中的作用。方法: 采用香烟烟雾+气管内注入脂多糖方法构建慢阻肺大鼠模型。ELISA 法、RT-PCT 及 WB、免疫组化检测方法测大鼠血清、肺泡灌洗液中 IL-38 的表达。结果: 模型组大鼠血清和肺泡灌洗液中的 IL-38 水平明显高于对照组, 8w 慢阻肺模型组显著高于 4 模型组(P<0.05)。结论: IL-38 在慢阻肺大鼠模型中呈现高表达, 所以 IL-38 可能参与了慢阻肺大鼠模型气道炎症的形成及调控作用。

关键词: 慢性阻塞性肺疾病; 气道炎症; 白细胞介素 38

Study on the correlation of interleukin-38 in the formation of airway inflammation in rats with chronic obstructive pulmonary disease

JIA Wei-hong, YANG Dong-cai*

Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Xi'an NO. 3 Hospital, the Affiliated Hospital of Northwest University, Xi'an, Shanxi 710083, P.R.China

【Abstract】 Objective To study the expression level of interleukin-38 in COPD serum and alveolar lavage fluid, and to explore the role of IL-38 in COPD airway inflammation. Methods A rat model of chronic obstructive pulmonary disease was constructed by smoking cigarettes and injecting lipopolysaccharide into the trachea. The expression of IL-38 in rat serum and alveolar lavage fluid was measured by ELISA, RT-PCT and WB, and immunohistochemical methods. Results The IL-38 levels in the serum and alveolar lavage fluid of the model group were significantly higher than those of the control group, and the 8w COPD model group was significantly higher than the 4w model group (P<0.05). Conclusion IL-38 is highly expressed in the COPD rat model, so IL-38 may be involved in the formation and regulation of airway inflammation in the COPD rat model.

【Key words】 Chronic obstructive pulmonary disease; airway inflammation; IL-38

慢性阻塞性肺疾病是慢性呼吸道疾病, 因其致残率、致死率高备受临床关注。临床表现: 持续的咳嗽、咳痰、气促, 严重时出现呼吸困难及呼吸衰竭, 并且伴随者显著的气流受限。进行性气流受限会伴随疾病的始终。白细胞介素38 (IL-38) 作为体内最重要的炎症促炎因子, 促进多种炎症细胞因子的产生, 从而出现组织及脏器炎症作用, 但参与气道炎症反应作用不详^[1-2]。IL-38在肿瘤、银屑病、脓毒症、哮喘、心肌损伤、鼻窦炎、伤口的愈合等方面均有作用^[3-9]。本研究通过检测慢阻肺大鼠血清、肺组织、肺泡灌洗液中IL-38的表达水平, 为慢阻肺寻求新的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物及实验设备

健康雌性, Wistar大鼠, 共30只, 6~8周龄, 体质量200~250g, 一般环境喂养, 实验动物购买与昆明医学院动物实验中心。细菌脂多糖(LPS), 购自Sigma公司; 红梅牌香烟; 自制吸烟染毒箱, 全自动酶标仪(Thermo scientific, 型号: Multiskan MK3); 微型高速离心机(美国Labnet, 型号: C2500-R-230V); 电热恒温培养箱(日本ASONE, 型号: ICV-450); 实时荧光定量PCR仪(ABI, 型号: QuantStudio 6); 分光光度计(上海舜宇恒科学仪器有限公司, 型号: 752); 电转仪(北京六一仪器厂, 型号: DYCZ-40), 其他: 干净的试管和Eppendorf管, 磁力搅拌器, 微量移液器, 系列可调节移液器及吸头, 多通道移液器, 蒸馏水, 容量瓶, 研钵等。本次研究经过本院医学伦理委员会同意。

1.2 方法

1. 模型建立: 采用随机法分组, 30只慢阻肺大鼠模型组, 4w、8w慢阻肺组各10只, 对照组10只。本实验组按照文献中反复熏雾红梅牌香烟联合气道内滴注LPS方法构建慢阻肺大鼠模型。实验时间: 4周~8周。对照组不进行烟熏处理。

2. 测定大鼠血液指标: 取0.5mL尾静脉血做血常规; 生化检查, 分装, -80℃保存待测的血清中IL-36的含量。

3. 肺脏病理标本制备: 按照文献提供的肺脏病理标本制备方法, 取出肺组织, 进行固定、包埋切片, 脱蜡处理, 染色。

4. 血清和肺泡灌洗液中 IL-38 水平的检测: ELISA 测定, 购买于上海依科赛生物公司。操作步骤按照试剂盒八个步骤进行。

5. RT-PCR检测mRNA。采用Trizol法提取肺组织RNA, 逆转录成cDNA, 半定量RT-PCR检测, 实时荧光定量PCR检测。提取RNA采用Trizol法。将总RNA放于-80℃冰箱内保存以备用。引物序列: Rat IL-38 Forward: 5'-GGGAGACCCTGATTCAGACA-3', Reverse: 5'-CAGATCCCAAGCTTCTCTGG-3', 大小239bp。

6. Western blot 检测: BCA 法蛋白定量肺组织均浆, 实验操作步骤同试剂盒说明书。

7. 免疫组织化学 IL-38染色: 肺组织切片进行免疫组织化学染色严格按照实验操作步骤进行。石蜡切片免疫组化通过组织脱水、组织透明、浸蜡、包埋、切片和烤片、切片脱蜡、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、血清封闭、加一抗、加酶标二抗、加显色剂、复染、脱水、封片、镜检拍照16个步骤完成。

1.3 统计学处理

采用SPSS19.0统计软件进行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料使用t检验,以P值 < 0.05有统计学意义。

2 结果

1.1正常及慢阻肺模型组肺组织形态学观察

1.大体观察:电镜下发现模型组大鼠肺组织体积明显增大,大鼠肺组织表面颜色苍白,肺组织出现弹性差,肺脏组织表面无渗液,形成肺大疱。

2.镜下观察:模型组大鼠肺组织病理变化:支气管壁增厚、肺气肿形成。对照组无变化。结果详见图1。

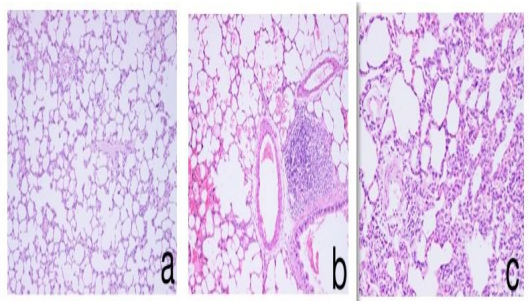


图1 大鼠肺部病理切片(×400)

a.正常大鼠肺组织; b.大鼠4W慢阻肺模型组; c.大鼠8W慢阻肺模型组

2.2血清和肺泡灌洗液中IL-38水平的检测

慢阻肺组IL-38表达在血清、肺泡灌洗液(BALF)中明显增高,有统计学意义。见表2、表3。

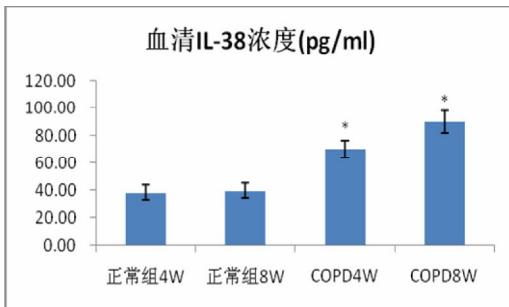


表2 检测血清中 IL38 的浓度

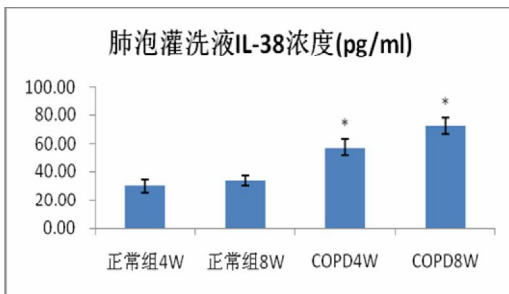


表3 检测肺泡灌洗液中IL38的浓度

2.3蛋白免疫印迹法(Western-blot)检测IL-38蛋白水平的表达水平

Western blot分析结果显示,IL-38蛋白表达慢阻肺组显著高于正常组(P<0.05),4W慢阻肺模型组与8W慢阻肺模型组无显著差异(P>0.05)。结果见表5、图2。GAPDH为标准对照品。

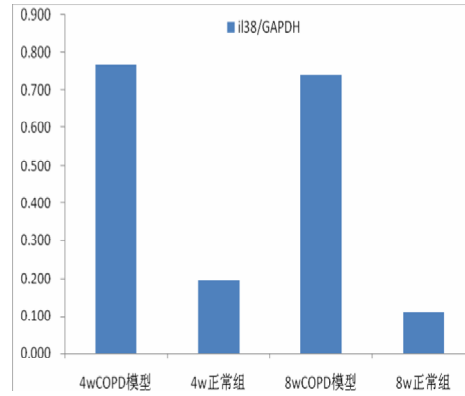


表5 大鼠肺组织内IL-38 mRNA表达

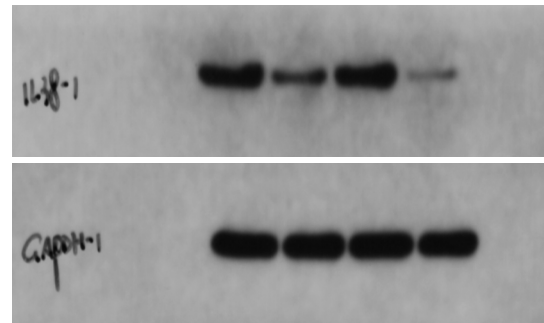


图2 大鼠肺组织内IL-38 mRNA Western blot表达

2.4IL-38免疫组化染色

使用IPP6.0软件对免疫组化标本行光密度分析检查。IL-38免疫组化染色阳性反应,主要镜下表现为大量的棕黄色颗粒沉着形成。慢阻肺组大鼠肺上皮细胞IL-38表达明显增加,且8w模型组要高于4w模型组P<0.05。对照组大鼠肺组织检测标本中仅见少量的IL-38表达。结果见图3。

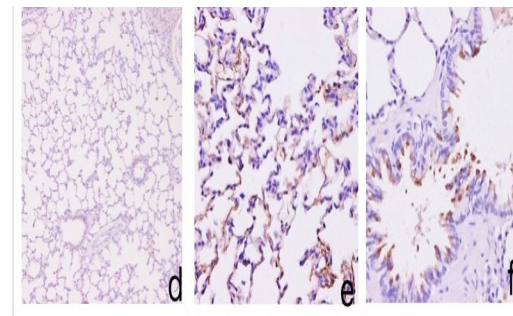


图3 鼠肺组织免疫组织化学病理像(×400)

d. 正常组; e. 慢阻肺4w模型组; f. 慢阻肺8w模型组

3 讨论

白介素-38(IL-38)为白介素-1家族(IL-1F)细胞因子的第10个成员。IL-38的编码基因位于人类染色体2q13-14.1上,编码IL-1受体拮抗剂和IL-36Ra的基因之间。IL-38主要在健康人皮肤、脾脏、扁桃腺、胸腺、心脏、胎盘和胎肝中表达^[1-2],在无特殊功能免疫组织中表达水平很低^[2]。IL-38参与炎症性疾病的发病机制,在一些自身免疫性疾病中发挥保护作用。许多的研究报道揭示IL-38与RA、SLE、克罗恩病、心血管疾病、银屑病、肥胖、糖尿病等多种疾病的发生、疾病的发展均有着密切的相关性,且它的表达水平在不同疾病中是不一样的^[3-7]。

IL-38作为重要的抗炎细胞因子,它能与IL-36受体相结合并抑制其作用,尤其是TH17应答反应。IL-38在呼吸系统疾病如鼻炎、鼻窦炎、支气管哮喘、急性特发性肺纤维化、肺癌中的相关研究较多^[8-9]。哮喘是慢性支气管炎疾病,过敏性哮喘是最常见形式,特征包括慢性气道炎症、重塑,气道高反应性和血清过敏原特异性IgE浓度升高。哮喘急性发作期痰上清中IL-38水平低于缓解期水平及健康人,IL-38水平与肺功能水平负相关可反应哮喘严重程度。研究报道过敏性哮喘患者血清IL-38高表达,具有临床意义。这可能是由于成人和婴儿免疫系统差异及检测标本种类的不同导致的。

IL-38在慢性阻塞性肺病的研究论文较少。张巍团队研究发现老年慢阻肺患者血IL-38水平升高,且与肺功能密切相关,因此可以作为诊断COPD急性加重期的血清标志物^[10]。朱亚茜^[11]等人采用双抗体夹心酶联免疫吸附(ELISA)法检测急性加重组慢阻肺患者、稳定期慢阻肺患者及老年健康体检者的血清IL-38水平,通过Pearson相关、Spearman秩相关分析IL-38与各变量之间的相关性,研究发现IL-38在慢阻肺患者血清中呈代偿性升高,可能被用作评价慢阻肺的血清学标志物之一。余芳芳^[12]等研究发现COPD急性加重期患者入院时血清IL-38呈现低表达,可能提示患者治疗后PE发生风险,血清IL-38水平,早期检测可能对预测患者急性肺栓塞发生风险有重要价值,可以用于指导早期防治。赵杰^[13]通过多元回归分析研究发现外周血中IL-38在慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者中表达呈现升高趋势,IL-6、C反应蛋白以及既往1年的急性加重次数是外周血IL-38的独立影响因素,升高且与体内炎症反应水平存在密切相关性,因此,可以将IL-38作为慢阻肺急性加重的独立危险因素。慢阻肺患者长期存在气道炎症,在急性加重期患者体内多种炎症介质表达呈现明显上调,赵杰的研究结果显示,急性加重期患者外周血IL-38表达水平显著高于稳定组及对照组,而且稳定组同时高于对照组,这个研究证实了IL-38参与了慢阻肺这一慢性炎症性疾病的进程^[14]。

本实验结果通过ELESA实验、RT-PCR、免疫组化三项实验显示,模型组大鼠血清、肺泡灌洗液中的IL-38水平显著高于对照组,8w慢阻肺模型组高于4模型组,且经统计学分析具有统计学意义。因此推断,IL-38可能参与了慢阻肺疾病自然病程,IL-38的上调及其调控分泌的炎症性细胞因子的增加可能为气道炎症加重,从而引起气流受限,甚至是出现气道结构再损伤及气道重塑,最终形成肺气肿、肺组织纤维化。

总之,IL-38作为体内重要的促炎因子在慢阻肺呼吸道炎症反应机制中起重要调节作用,通过监测和调节它们的表达水平,可能会为慢阻肺气道炎症反应的控制提供新的思路、新的治疗方法。随着研究的深入,IL-38可能为慢阻肺疾病的早期控制提供有力的证据,在慢阻肺疾病的预防、治疗等方面也具有重要的意义。

参考文献:

- [1]李媛,陈丝丝,翁琳洁,等.白介素-38的生物学特性及其在炎症与免疫性疾病中的作用[J].生命的化学,2020,40(09):1485-1492.
 - [2]伍利芝,莫碧文.白介素-38在呼吸系统疾病中的相关研究进展[J].世界最新医学信息文摘,2019,19(28):95-96+98.
 - [3]夏华松.IL-38对LPS诱导内皮损伤的作用及其机制研究[D].南昌大学,2022.
 - [4]刘越.IL-38对脓毒症心肌损伤的作用及机制研究[D].南昌大学,2022.
 - [5]陈益馨.IL-38在食管鳞癌中的表达及其临床病理学意义[D].福建医科大学,2021.
 - [6]张娇.IL-36、IL-36Ra及IL-38与寻常型银屑病发病机制的相关性研究[D].安徽医科大学,2017.
 - [7]杨瑞端.白介素-38在慢性鼻-鼻窦炎伴鼻息肉中的表达及临床意义[D].山西医科大学,2022.
 - [8]杨瑞端,柴向斌.白介素-38在哮喘和变应性鼻炎中表达的研究进展[J].中国全科医学,2021,24(S2):15-18.
 - [9] Takada K, Okamoto T, Tominaga M, et al. Clinical implications of the novel cytokine IL-38 expressed in lung adenocarcinoma: possible association with PD-L1 expression[J]. PLoS One, 2017, 12(7):e0181598.
 - [10]张巍,朱娅丽,杜维桓,等.血清FABP4与IL-38水平对老年COPD患者病情严重程度的临床价值[J].西部医学,2023,35(01):82-86.
 - [11]朱亚茜,马淑萍,李波,等.白细胞介素38在慢性阻塞性肺疾病患者血清中的表达及临床意义[J].中华医学杂志,2018,98(10):759-762.
 - [12]余芳芳,刘威,彭笑.慢性阻塞性肺疾病急性加重期患者血清白介素-38表达水平与肺栓塞发生的相关性[J].中国医学工程,2021,29(06):35-37.
 - [13]赵杰.外周血白介素38在慢性阻塞性肺疾病急性加重期中的表达及价值[D].安徽医科大学,2021.
 - [14]赵杰,朱洪斌.外周血白介素38在慢性阻塞性肺疾病急性加重期中的表达及价值[J].医学信息,2020,33(20):65-68.
- 基金项目:西安市科技局项目(2017113SF/YX007(2));西安市卫健委项目(2021lyb41);西安市卫健委项目(2021lyb42)
- 作者简介:贾卫红,1979年11月21日,西北大学附属医院西安市第三医院呼吸与危重症医学科,2006年毕业于解放军第四军医大学,本科,副主任医师,现从事呼吸疾病临床及免疫、影像学研究工作。
- *通讯作者:杨栋才,主治医师,在职研究生,学士学位,研究方向:呼吸常见疾病的临床及基础研究。