

白细胞介素-4 在脂多糖诱导急性肺损伤模型中的保护作用

赵 琨¹⁾, 肖 云¹⁾, 杨 纯¹⁾, 严志凌²⁾, 董敏娜³⁾, 向柄全¹⁾, 肖茗耀¹⁾
(1)昆明医科大学第三附属医院重症医学科; 2)妇瘤科, 云南 昆明 650118;
3)昆明医科大学第一附属医院急诊医学部, 云南 昆明 650032)

[摘要] 目的 探讨白细胞介素-4(IL-4)在急性肺损伤(acute lung injury, ALI)中的保护作用。方法 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导 A549 细胞形成 ALI 细胞模型。使用不同浓度的 IL-4(0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$)在不同时长下干预该模型, 通过流式细胞术检测 A549 细胞凋亡率, ELISA 法测定 A549 细胞分泌 IL-1、IL-6、IL-10、TNF- α 、TNF- γ 情况。结果 IL-4 可降低 ALI 模型中 A549 细胞凋亡率、抑制 Caspase3 表达($P < 0.05$), 其效果随 IL-4 浓度增加及干预时长延长而加强; 同时促进 Bcl-2 表达($P < 0.05$), IL-4 浓度 1 $\mu\text{g/mL}$ 干预 12 h 时效果最佳。上述条件下, IL-4 可降低 ALI 模型中 A549 细胞的 IL-1、IL-6、TNF- α 、TNF- γ , 并增加 IL-10($P < 0.05$)。结论 IL-4 可以通过改善 ALI 体外模型中细胞因子分泌情况, 在急性肺损伤中发挥正向调节作用。

[关键词] 急性肺损伤; 白细胞介素-4; 脂多糖; 调节性 T 细胞; 细胞因子

[中图分类号] R563.8 [文献标志码] A [文章编号] 2095-610X(2022)08-0041-06

Protective Effect of Interleukin-4 in Lipopolysaccharide-induced Acute Lung Injury Models

ZHAO Kun¹⁾, XIAO Yun¹⁾, YANG Chun¹⁾, YAN Zhiling²⁾,
DONG Minna³⁾, XIANG Bingquan¹⁾, XIAO Mingyao¹⁾

(1) Dept. of Critical Care Medicine; 2) Dept. of Gynecological Oncology, The 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650118; 3) Dept. of Emergency, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] Objective To investigate the protective effect of interleukin-4 (IL-4) on acute lung injury (ALI). Methods ALI cell models were developed using lipopolysaccharide (LPS) to induce A549 cells. The model was treated with different concentrations of IL-4 (0.1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$) for different durations. Then the apoptosis rate of A549 cells was detected by flow cytometry, and the secretion of IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , TNF- γ of A549 cells was determined by ELISA. Results IL-4 reduced the apoptosis rate of A549 cells and inhibited the expression of Caspase3 in ALI model ($P < 0.05$). The effect was enhanced with the increase of IL-4 concentration and the extension of intervention time. IL-4 promoted the expression of Bcl-2 ($P < 0.05$), and the best effect was achieved when the concentration of IL-4 was 1 $\mu\text{g/mL}$ for 12 h. Under the above conditions, IL-4 decreased IL-1, IL-6, TNF- α , TNF- γ and increased IL-10 in A549 cells in ALI model ($P < 0.05$). Conclusion IL-4 can positively regulate acute lung injury by improving cytokine secretion in ALI in vitro model.

[Key words] Acute lung injury; Interleukin-4; Lipopolysaccharide; Regulatory T cells; Cytokines

[收稿日期] 2022-03-28

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目(202001AY070001-081)

[作者简介] 赵琨(1993~), 男, 山西运城人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事重症医学研究工作。

[通信作者] 肖云, E-mail: dmn0406@163.com

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是肺内外的各种病因导致的急性低氧性呼吸功能不全综合征,其严重时可发展为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),大量炎症因子的激活是ALI发展为ARDS的主要机制,因此,调节炎症和凋亡可能是治疗ALI的新方案^[1]。有研究^[2]认为,模式识别受体可以启动炎症信号级联反应和促炎细胞因子如肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)和IL-6的释放;刺激自噬或细胞凋亡,进而导致ALI向ARDS进展。

调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)是一类控制体内自身免疫反应性的T细胞亚群,它的抑制功能对于控制自身免疫、过敏和炎症反应及至关重要,在ALI的发展过程中起到保护性作用^[3-4]。IL-4是Th2细胞分泌的细胞因子,其对于Treg介导的免疫抑制可能具有多种正向调节作用^[5]。但对于在ALI中IL-4是否能够改善患者预后,目前鲜有报道。本研究将从体外细胞水平研究在ALI中IL-4对细胞凋亡及细胞因子分泌的作用,为临床ALI诊疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 研究材料

人肺上皮细胞A549细胞购自美国ATCC细胞库,SYBR Green qPCR Mix 2.0试剂盒购自广州Genecopoeia公司,Caspase-3抗体购自Abcam,Bcl-2抗体购自GeneTex,IL-1、IL-6、IL-10、TNF- α 、TNF- γ 的ELISA试剂盒均购自NeoBioscience,IL-4细胞因子购自PeproTech。

1.2 研究方法

1.2.1 LPS最佳干预条件测定 使用含10%胎牛血清的DMEM培养液培养A549细胞72 h后,将A549细胞分为13组,向培养基中加入LPS,使得培养基中LPS浓度分别为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每个浓度对应3组A549细胞,将上述各浓度中的3组细胞分别在含LPS的培养基中培养12 h、24 h、48 h,以未加入LPS的A549细胞培养48 h为空白对照。培养结束后,使用流式细胞术检测细胞凋亡率,确定LPS的最佳干预浓度及时间。

1.2.2 IL-4对ALI细胞凋亡的影响 选用上述最佳LPS干预浓度及时间诱导A549细胞凋亡,并将A549细胞分为浓度控制组及时间控制组,每

组各3个亚组:浓度控制组的3个亚组在加入LPS的同时,分别加入0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的IL-4,与同时LPS同时干预12 h;时间控制组的3个亚组分别在加入LPS前12 h、加入LPS后6 h、加入LPS后9 h加入1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的IL-4,即IL-4分别干预24 h、6 h、3 h;以只使用LPS干预的A549为对照组,不使用LPS及IL-4干预的A549为空白组。干预完成后,流式细胞术检测各组细胞凋亡率,实时荧光定量PCR(qPCR)检测Caspase3、Bcl-2的mRNA的表达,蛋白质印迹法(Western blotting)检测Caspase3、Bcl-2的蛋白表达情况。

1.2.3 IL-4对ALI中各细胞因子的影响 使用上一部分确定的最佳IL-4干预浓度及时间,使用LPS及IL-4同时干预实验组A549细胞,对照组A549细胞仅使用LPS干预,空白组A549细胞则不进行干预。干预结束后,离心取细胞培养上清液,酶联免疫吸附剂测定(ELISA)法测定各组细胞上清液中IL-1、IL-6、IL-10、TNF- α 、TNF- γ 分泌情况。

1.3 统计学处理

使用SPSS 21.0对数据进行分析,2组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,方差分析后使用Sidak法进行多重比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS最佳干预条件

通过不同浓度LPS对A549细胞培养进行不同时间的干预,根据A549细胞凋亡情况,LPS浓度10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 干预时间12 h时,A549细胞凋亡率最高,见图1。认为此条件为LPS诱导A549细胞体外ALI的最佳干预条件。

2.2 IL-4对ALI细胞凋亡影响的结果

使用上述LPS浓度诱导A549细胞形成ALI,作为对照组。与空白组(正常A549细胞)相比,对照组的细胞凋亡率显著升高(1.86% vs 10.37%),差异有统计学意义($P < 0.05$)。IL-4干预组细胞凋亡率显著低于对照组($P < 0.001$)。当干预时间相同,均为12 h时,细胞凋亡率随IL-4干预浓度的增加而降低(6.82% vs 3.38% vs 0.60%),差异有统计学意义($P < 0.05$);当IL-4浓度均为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,干预3 h及6 h细胞凋亡率无明显变化(5.01% vs 4.95%),差异无统计学意义($P >$

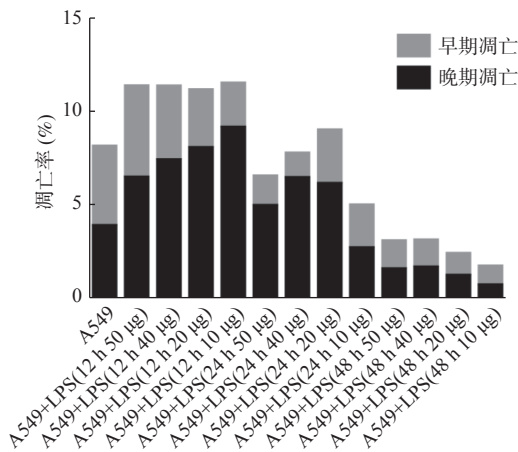


图 1 LPS 最佳干预条件

Fig. 1 Optimal LPS intervention concentration

0.05); 而干预 12 h 及 24 h 以后, 细胞凋亡率逐渐降低(3.38%, $P=0.001$; 2.07%, $P<0.001$), 差异有统计学意义($P<0.05$), 见图 2、图 3。

以 β -actin 为内参, 各组 Caspase-3 与 Bcl-2 蛋白表达水平, 见图 4。与空白组相比, 对照组中 Caspase-3 蛋白表达水平显著升高(1.75 vs 2.00, $P=0.017$), Bcl-2 蛋白表达水平显著降低(1.27 vs 0.31, $P<0.001$)。与对照组相比, IL-4 干预的各实验组 Caspase-3 蛋白表达水平均下降 ($P=0.0122$), 干预时间均为 12 h 时, Caspase-3 蛋白表达水平随 IL-4 浓度增加而下降(1.56 vs 0.87 vs 0.31); 当 IL-4 浓度均为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 干预 6 h 及 12 h 时 Caspase-3 蛋白表达水平降至最低(0.86 vs 0.87, $P>0.05$), 干预 24 h 后表达水平回升(0.87 vs 1.17, $P>0.05$)。IL-4 干预各组的 Bcl-2

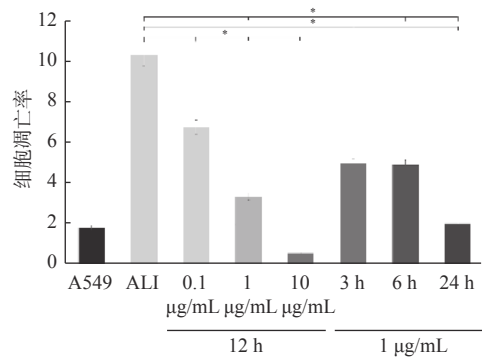


图 2 各组细胞凋亡情况

Fig. 2 Apoptosis in each group

* $P<0.05$ 。

蛋白表达水平均高于对照组($P<0.001$), 干预时间均为 12 h 时, IL-4 浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, Bcl-2 蛋白表达水平显著高于 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.51 vs 1.36, $P<0.001$), 但 IL-4 浓度升高到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以后, Bcl-2 蛋白表达也未明显升高(1.36 vs 1.41, $P>0.05$); 干预浓度均为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, IL-4 干预 12 h 后的 Bcl-2 蛋白表达水平明显上升(0.54 vs 1.36, $P<0.001$), 但继续干预至 24 h 后, Bcl-2 蛋白表达水平也未继续升高(1.36 vs 1.27, $P>0.05$)。qPCR 验证 Caspase3、Bcl-2 mRNA 表达情况的结果与其蛋白表达结果一致, 以 GAPDH 为内参, 各组 Caspase-3 与 Bcl-2 mRNA 表达水平, 见图 5。

2.3 IL-4 对 ALI 中各细胞因子影响的结果

虽然 IL-4 降低 ALI 细胞细胞凋亡、抑制 Caspase3 表达的效果随浓度和作用时间逐渐加强, 但其促进 Bcl-2 表达的效果在 IL-4 浓度为

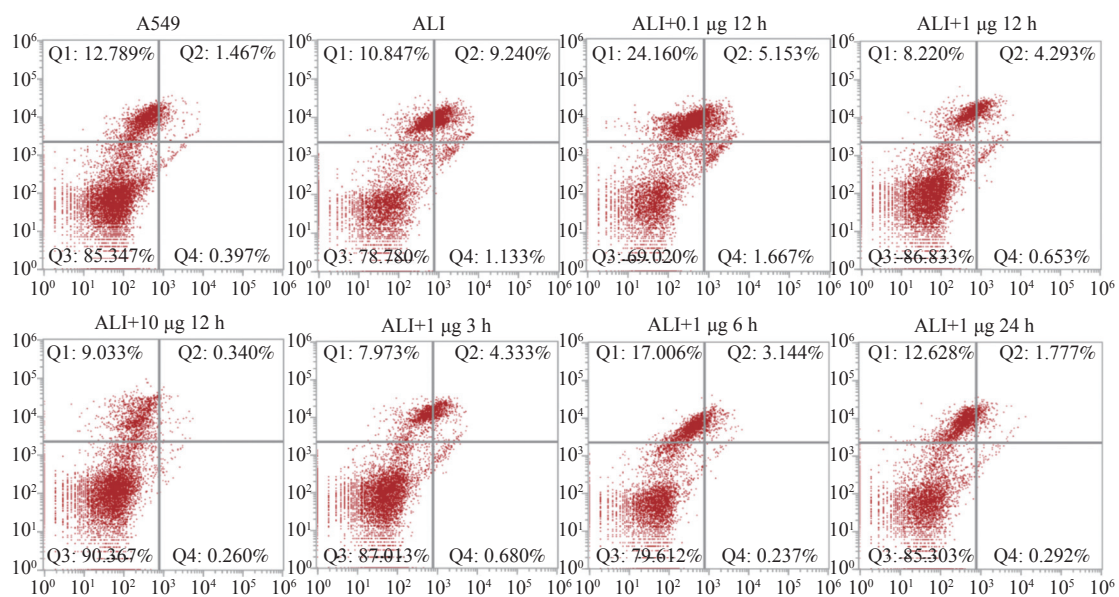


图 3 流式细胞术检测细胞凋亡结果

Fig. 3 The results of apoptosis detected by flow cytometry

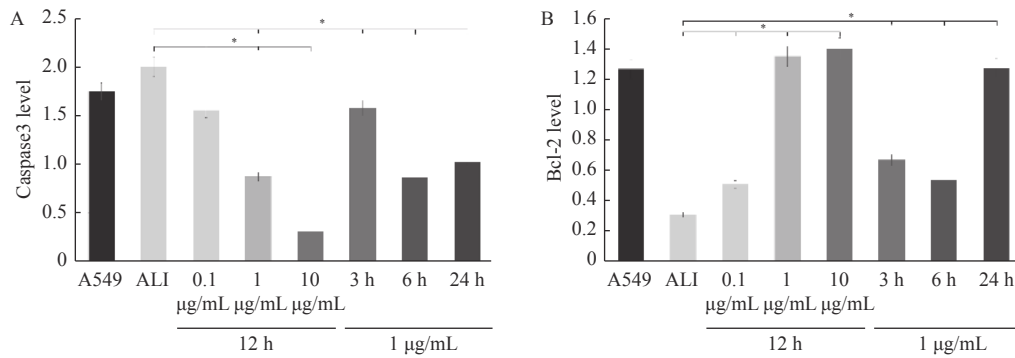


图 4 各组 Caspase3、Bcl-2 蛋白表达情况

Fig. 4 Expression of Caspase3 and Bcl-2 proteins in each group

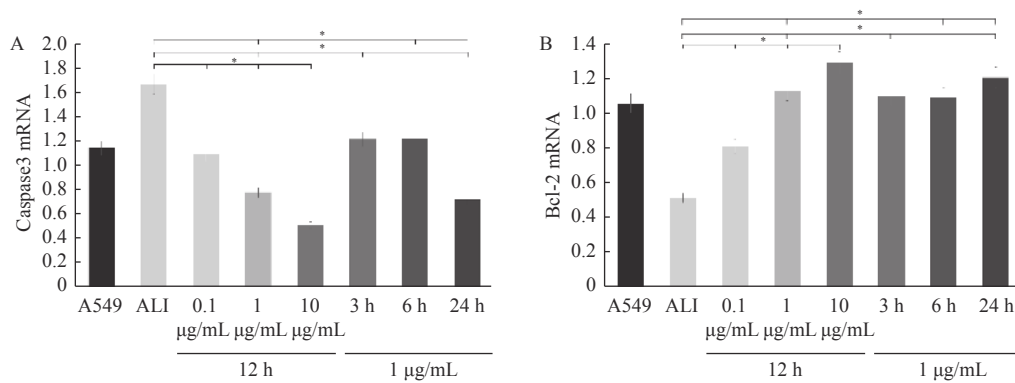
A. Caspase3 表达; B. Bcl-2 表达。* $P < 0.05$ 。

图 5 各组 Caspase3、Bcl-2 mRNA 表达情况

Fig. 5 mRNA expression of Caspase3 and Bcl-2 in each group

A. Caspase3 mRNA 表达; B. Bcl-2 mRNA 表达。* $P < 0.05$ 。

1 $\mu\text{g/mL}$, 作用 12 h 时达到高点, 因此后续研究均在此条件下进行。与空白组(正常 A549 细胞)相比, 对照组(ALI)IL-1、IL-6、TNF- α 、TNF- γ 分泌显著增多, IL-10 分泌降低($P < 0.05$); 经 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 IL-4 干预 12 h 后, 实验组 IL-1、IL-6、TNF- α 、TNF- γ 分泌显著降低, 低于对照组($P < 0.05$); 而实验组 IL-10 分泌增加, 高于对照组($P < 0.05$)。各组细胞因子分泌浓度见表 1、图 6。

表 1 各组细胞因子分泌情况 (pg/mL)

Tab. 1 Secretion of cytokines in each group (pg/mL)

分组	IL-1	IL-6	IL-10	TNF- α	TNF- γ
A549	2.62	43.93	0.91	10.94	74.60
ALI	5.17	62.58	0.31	16.78	89.17
ALI + IL-4	2.34	38.75	0.51	8.35	62.87

3 讨论

ALI 是肺内外的各种病因导致的急性低氧性

呼吸功能不全综合症, 其发病机制复杂, 治疗效果不佳, 平均病死率高达 50% 以上^[6], 研究认为炎症与抗炎反应的平衡被打破是导致肺部炎症损伤的主要原因之一^[1]。当肺部受到肺内外的各种病因因素影响时, 中性粒细胞通过肺泡巨噬细胞和其他肺细胞类型产生的趋化信号募集到肺泡腔内部, 释放蛋白酶、氧自由基、花生四烯酸代谢产物等损伤肺泡毛细血管内膜^[7-8]。急性肺损伤的进展过程中炎症和抗炎反应持续发生, 促炎症细胞因子, 例如 IL-1、IL-6、TNF- α 、TNF- γ 等是引发肺部炎症反应的主要介质。其他炎症分子如趋化因子, 巨噬细胞和中性粒细胞等则促进肺部炎症的进展^[9]。

Tregs 是存在于正常人体内的一种具有负向调节免疫功能特征 T 细胞亚群, 其在维持免疫稳态中具有重要意义^[10]。当 Treg 细胞受到抗原特异性刺激活化时, 能够通过分泌抑制性细胞因子 IL-10, 转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 等细胞因子介导免疫抑制, 防止机体发生过度的免疫反应^[11]。Garibaldi^[3] 等的研究证实, Treg 能够通过抑制

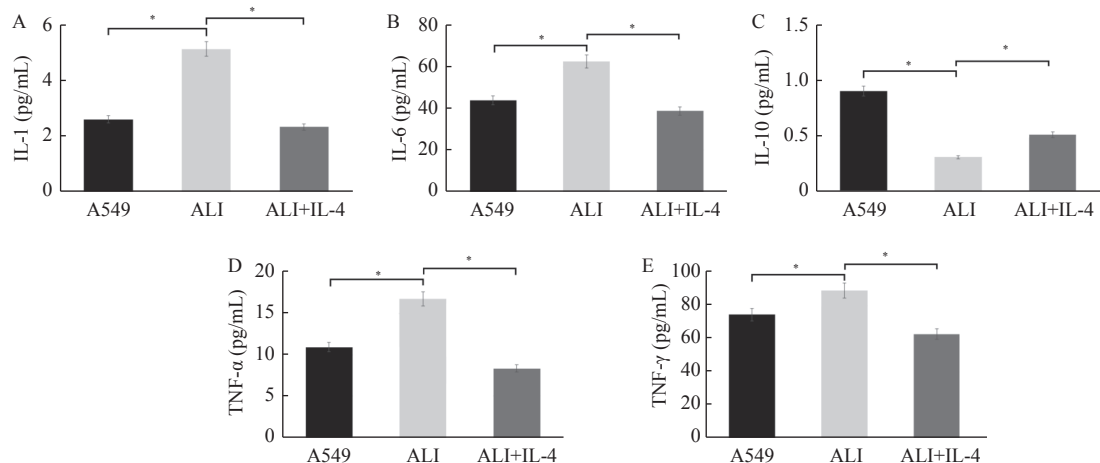


图 6 各组细胞因子分泌情况

Fig. 6 Secretion of cytokines in each group

A: IL-1 浓度; B: IL-6 浓度; C: IL-10 浓度; D: TNF- α 浓度; E: TNF- γ 浓度。* $P < 0.05$ 。

LPS 损伤后肺纤维细胞募集, 从而减轻急性肺损伤过程中的肺纤维化。而在 ALI 炎症修复期, 肺泡内 Treg 细胞数量明显增多。临床观察也证实了肺泡 Treg 细胞较多的 ALI 患者死亡率降低^[4]。因此, Treg 可能能够减轻 ALI 患者的炎症反应, 加强 ALI 修复期的修复作用。

抗炎细胞因子 IL-4 主要由 CD4⁺T 细胞产生的, 具有多种生物学活性, 对 B 细胞、T 细胞、肥大细胞和单核巨噬细胞都具有免疫调节作用^[12]。研究表明, 在 IL-4 敲除的小鼠 ALI 模型中, 其发病进展及炎症反应远高于 ALI 正常小鼠模型, 这表明 IL-4 在 ALI 过程中扮演重要角色^[13-14]。Wehrmann F^[15] 等研究发现, $\gamma\delta$ T 细胞可防止 LPS 诱导的肺损伤, 但抗 IL-4 阻断抗体可以逆转这种保护作用。但目前对 IL-4 在 ALI 中的作用机制尚无定论。本研究结果显示, 与 ALI 模型组相比, IL-4 干预的各组 ALI 细胞的凋亡率显著降低, 说明 IL-4 对 ALI 具有保护作用。除此之外, 笔者还发现 IL-4 浓度及其作用时间呈正相关。在本研究中, 笔者也观察到 IL-4 处理后 Caspase-3 表达下调及 Bcl-2 表达上调。Caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, 其可以促进细胞凋亡, 而 Caspase-3 的作用可以被 Bcl-2 阻断; Bcl-2 可以抑制由多种细胞毒因素所引起的细胞死亡, 其过度表达能增强细胞对多数细胞毒素的抵抗性。因此, 笔者认为 IL-4 在 ALI 的发生发展中是保护性因素, 其可以通过上调 Bcl-2 表达, 从而降低肺上皮细胞的凋亡, 并改善其预后。

本研究检测了经 IL-4 处理后相关炎性细胞因子的变化情况, 结果显示, ALI 时促炎因子 IL-1、

IL-6、TNF- α 、TNF- γ 分泌显著升高, 而抗炎细胞因子 IL-10 在 ALI 组分泌显著降低, 该结论与以往 ALI 相关研究一致。而通过 IL-4 干预后, 实验组的 IL-1、IL-6、TNF- α 、TNF- γ 分泌显著降低, 其中 TNF- α 、TNF- γ 甚至可低于正常 A549 细胞, 且 IL-10 分泌增加。Wehrmann F 等^[15] 认为 $\gamma\delta$ T 细胞可能通过调节肺中的 TNF- α 水平来限制巨噬细胞的扩增, 进而抑制肺损伤。而 Farivar 等^[16] 研究发现, 在缺血再灌注肺损伤模型中, IL-4 与 IL-10 可以协同降低 IL-1 β 和 TNF- α 的水平, 以达到减轻肺损伤的作用。有学者认为^[17], 受损肺泡中的活化巨噬细胞、中性粒细胞和潜在的上皮细胞可以产生 IL-6, 后者可通过介导炎症反应导致肺损伤。上述结论均支持本研究的结果, 因此笔者推断, IL-4 可能通过多种途径抑制 ALI 发生发展过程中的过度免疫反应, 从而发挥其保护性作用。Pace L 等^[18] 的研究发现, IL-4 可促进 Treg 细胞增殖, 且 Treg 细胞的免疫抑制能力增强。笔者推断其可能的机制: IL-4 可阻止叉头翼螺旋转录因子 3 (Forkhead Box P3, Foxp3) 表达下调, 而 Foxp3 是 Treg 细胞的特异标志物, 并对其增殖和功能发挥起决定性作用。因而通过维持 Foxp3 的表达, 增强了 Treg 细胞免疫调节功能^[19-20]。

在 ALI 的发生发展中, 炎症及抗炎反应占据核心地位, 涉及多种复杂调节机制。本研究阐明急性肺损伤中 IL-4 可能刺激相关炎性因子发挥正向调节作用, 从而缓解急性肺损伤。但本研究目前仅限于体外实验, 其具体机制尚未完全阐明, 仍需要后续动物实验及基因、信号通路层面的研

究验证笔者的猜想。以期通过分子学的角度进行干预治疗,提高急性肺损伤的治愈率。

[参考文献]

- [1] Luo S, Ding X, Zhao S, et al. Long non-coding RNA CHRF accelerates LPS-induced acute lung injury through microRNA-146a/Notch1 axis[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(16): 1299.
- [2] Peukert K, Fox M, Schulz S, et al. Inhibition of caspase-1 with tetracycline ameliorates acute lung injury[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 204(1): 53-63.
- [3] Garibaldi B T, D' Alessio F R, Mock J R, et al. Regulatory T cells reduce acute lung injury fibroproliferation by decreasing fibrocyte recruitment[J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2013, 48(1): 35-43.
- [4] Singer B D, Mock J R, Aggarwal N R, et al. Regulatory T cell DNA methyltransferase inhibition accelerates resolution of lung inflammation[J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2015, 52(5): 641-652.
- [5] Kawalkowska J Z, Hemmerle T, Pretto F, et al. Targeted IL-4 therapy synergizes with dexamethasone to induce a state of tolerance by promoting Treg cells and macrophages in mice with arthritis[J]. *European Journal of Immunology*, 2016, 46(5): 1246-1257.
- [6] 赵亚杰, 曹江北, 米卫东. 肺保护性通气策略在围手术期的应用进展[J]. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(12): 1229-1232.
- [7] Standiford T J, Ward P A. Therapeutic targeting of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome[J]. *Translational Research*, 2016, 167(1): 183-191.
- [8] 莫磊, 朱黎明, 戴爱国. 中性粒细胞迁移与肺部疾病的研究进展[J]. *临床与病理杂志*, 2016, 36(4): 481-485.
- [9] Gouda M M, Shaikh S B, Bhandary Y P. Inflammatory and fibrinolytic system in acute respiratory distress syndrome[J]. *Lung*, 2018, 196(5): 609-616.
- [10] Lin S, Wu H, Wang C, et al. Regulatory T cells and acute lung injury: Cytokines, uncontrolled inflammation, and therapeutic implications[J]. *Front Immunol*, 2018, 9(9): 1545.
- [11] 罗超, 曾佐静, 彭顺林. 调节性T细胞在变应性鼻炎免疫应答中的作用[J/OL]. *中国免疫学杂志*, 2022, 19(06): 1-15.
- [12] 黄洁媛, 刘文明. 白细胞介素-4负调控NF- κ B通路抑制炎症反应的机制研究[J]. *天津医药*, 2019, 47(10): 1025-1029.
- [13] Yang W C, Yih-Shiou H, Chen Y Y, et al. Interleukin-4 supports the suppressive immune responses elicited by regulatory T cells[J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8(1): 1508.
- [14] Huaux F, Liu T, McGarry B, et al. Dual roles of IL-4 in lung injury and fibrosis[J]. *The Journal of Immunology*, 2003, 170(4): 2083-2092.
- [15] Wehrmann F, Lavelle J C, Collins C B, et al. $\gamma\delta$ T cells protect against LPS-induced lung injury[J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 99(2): 373-386.
- [16] Farivar A S, Krishnadasan B, Naidu B V, et al. Endogenous interleukin-4 and interleukin-10 regulate experimental lung ischemia reperfusion injury[J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 76(1): 253-259.
- [17] Witzenrath M, Kuebler W M. The lung-brain axis in ventilator-induced brain injury: Enter IL-6[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2021, 65(4): 339-340.
- [18] Pace L, Pioli C, Doria G. IL-4 modulation of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cell-mediated suppression[J]. *Journal of Immunology*, 2005, 174(12): 7645.
- [19] Prochazkova J, Fric J, Pokorna K, et al. Distinct regulatory roles of transforming growth factor- β and interleukin-4 in the development and maintenance of natural and induced CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells[J]. *Immunology*, 2009, 128(1pt2): 670-678.
- [20] 赵磊, 冯学斌, 王跃嗣, 等. 抗ICOS抗体体外对哮喘大鼠血液和淋巴液CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性T细胞数量及其功能影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(10): 1029-1032,1036.