

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.35.004

右美托咪定对脂多糖诱导大鼠外周血中性粒细胞 TREM-1 mRNA 表达的影响*

何绮霞,卢 燕[△],陈翠平,顾晓霞,庄海霞,张良清
(广东医学院附属医院麻醉科,广东湛江 524001)

[摘要] **目的** 探讨右美托咪定对脂多糖(LPS)诱导大鼠外周血中性粒细胞髓样细胞触发受体-1(TREM-1)mRNA 表达的影响。**方法** 健康雄性 Wistar 大鼠 40 只,取外周血分离培养中性粒细胞,采用随机数字表法,将其随机分为 4 组($n=10$),A 组:阴性对照;B 组:中性粒细胞中加入 LPS(终浓度为 100 $\mu\text{g/L}$);C 组:中性粒细胞中加入 LPS(终浓度为 100 $\mu\text{g/L}$)加右美托咪定(终浓度为 0.5 ng/mL);D 组:中性粒细胞中加入 LPS(终浓度为 100 $\mu\text{g/L}$)加右美托咪定(终浓度为 1.0 ng/mL)。孵育 24 h 后,收集上清液,采用 ELISA 法测定 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的浓度,采用 RT-PCR 法测定 TREM-1 mRNA 的表达。**结果** 与 A 组比较,B 组 TREM-1 mRNA 表达上调,TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的浓度升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与 B 组比较,C 组和 D 组 TREM-1 mRNA 表达下调,TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的浓度降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 C 组比较,D 组 TREM-1 mRNA 表达水平、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的浓度比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 右美托咪定可通过下调 TREM-1 mRNA 表达,抑制 LPS 诱导大鼠外周血中性粒细胞 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的生成及分泌。

[关键词] 脂多糖类;右美托咪定;髓样细胞触发受体-1;中性粒细胞
[中图分类号] R631 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)35-4907-03

Effects of dexmedetomidine on expression of TREM-1 mRNA in rat peripheral blood neutrophils exposed to lipopolysaccharide*

He Qixia, Lu Yan[△], Chen Cuiping, Gu Xiaoxia, Zhuang Haixia, Zhang Liangqing

(Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of dexmedetomidine on the expression of TREM-1 mRNA in rat peripheral blood Neutrophils exposed to lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Peripheral blood neutrophils isolated from male Wistar rats were seeded in 24-well plate in dextran saline culture medium in CO₂ incubator, and were randomly divided into 4 groups ($n=10$ each): group A negative control; group B was exposed to LPS 100 $\mu\text{g/L}$ and group C, D were exposed to LPS 100 $\mu\text{g/L}$ + dexmedetomidine 0.5, 1.0 ng/mL respectively. The neutrophils were then incubated for 24 h. The concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the supernatant of the cultured neutrophils were detected by ELISA. The expression of TREM-1 mRNA in the neutrophils was detected by RT-PCR. **Results** Exposure to LPS significantly increased the expression of TREM-1 mRNA and the concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in group B as compared with group A ($P<0.05$). Compared with group B, the expression of TREM-1 mRNA and the concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in group C and D were significantly reduced ($P<0.05$), the expression of TREM-1 mRNA and the concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in group C and D was no significant differences ($P>0.05$). **Conclusion** Dexmedetomidine can inhibit the synthesis of TREM-1 and inhibit the secretion and delivery of TNF- α , IL-1 β and IL-6 by down-regulating the gene expression of TREM-1 in rat peripheral blood neutrophils exposed to LPS.

[Key words] lipopolysaccharides; dexmedetomidine; TREM-1; neutrophils

脂多糖(LPS)是革兰阴性细菌细胞壁的主要成分,机体免疫系统会对 LPS 诱导产生免疫应答,大量细胞因子和炎性介质分泌,从而诱发全身炎症反应,严重者可导致脓毒血症和多器官功能障碍综合征。髓样细胞触发受体-1(triggering receptor expressed on myeloid cells-1, TREM-1)是近年来发现的表达于髓样细胞(如单核/巨噬细胞、中性粒细胞)表面的免疫球蛋白超家族活化受体,它介导的信号传导通路在炎症反应的发生和级联放大中起重要作用^[1],在盲肠结扎穿孔的脓毒症实验动物模型研究发现 LPS 能引起中性粒细胞和中性粒细胞 TREM-1 的表达明显增加^[2]。右美托咪定是一种高选择性的 α_2 肾上腺素能受体激动剂,可产生镇静、镇痛、抑制交感活动

的作用。最近国外多个研究报道地塞米松(DEX)还具有明显的脏器保护及抗炎作用^[3-7]。本研究拟探讨右美托咪定对 LPS 诱导大鼠外周血中性粒细胞 TREM-1 mRNA 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 右美托咪定(江苏恒瑞医药股份有限公司),LPS(Sigma 公司,美国),大鼠中性粒细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限公司),台盼蓝检测试剂盒(江苏碧云天生物公司),ELISA 试剂盒(大连宝生物工程有限公司),RT-PCR 相关试剂(Takara 公司,日本),引物合成(上海生工生物工程技术服务有限公司),9600 型 PCR 扩增仪(PE 公司,美国),DH2000 凝胶成像分析系统(中国计量科学研究所)。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81270196);广东省自然科学基金资助项目(S2011040005514)。 作者简介:何绮霞(1977—),副主任医师,本科,主要从事临床麻醉学研究。 [△] 通讯作者, Tel:15811714542; E-mail:stormbird2004@21cn.com。

1.2 动物选择及外周血中性粒细胞分离 选取健康雄性 Wistar 大鼠 40 只, 体质量 230~270 g, 由广东医学院实验动物中心提供。用肝素湿润过的注射器穿刺大鼠心脏取血样 6 mL, 加 2 mL 6% 右旋糖酐生理盐水, 混匀后在室温静置 30~45 min, 使红细胞下沉, 取上层细胞按 1:1 比例叠加到聚蔗糖-泛影葡胺分层液面上, 500 r/min 离心 30 min; 将沉淀细胞用 0.83% NH₄Cl 溶液破坏红细胞, 离心洗涤后, 悬于 2~3 mL 0.10% 白明胶 Hank's 液中, 计数并调整细胞浓度, 取细胞液涂片, 分别作台盼蓝拒染试验和 Giemsa 染色, 鉴定其存活率与纯度。

1.3 实验分组 随机数字表法将细胞随机分为 4 组($n=10$), A 组: 阴性对照; B 组: 中性粒细胞中加入 LPS(终浓度为 100 μ g/L); C 组: 中性粒细胞中加入 LPS(终浓度为 100 μ g/L)加右美托咪定(终浓度为 0.5 ng/mL); D 组: 中性粒细胞中加入 LPS(终浓度为 100 μ g/L)加右美托咪定(终浓度为 1.0 ng/mL)。

1.4 观察指标 各组细胞孵育 24 h 后, 收集培养上清液, -20 $^{\circ}$ C 存放, 采用 ELISA 法测定 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的浓度。另提取细胞总 RNA, RT-PCR 法测定 TREM-1 mRNA 表达水平。TREM-1 上游引物: 5'-ACC ACC ACC ATG GAA CTC CGA GCT GCA ACT AAA T-3'; 下游引物: 5'-GGG AAC ACA CCT CGA GCC TGA TGA TAT CTG TCA C-3'。扩增片段长度 552 bp。以 β -actin 作为内参, β -actin 上游引物: 5'-ACC ACA GCT GAG AGG AAT CG-3', 下游引物: 5'-AGA GGT TTA CGT GTC AAC GC-3', 扩增片段长度 256 bp。PCR 反应体系 25 μ L, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后, 按 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 扩增 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取各样本 PCR 产物 4 μ L 和溴酚蓝载样缓冲液 1 μ L, 加入 1.5% 琼脂糖凝胶样品孔中, 80 V 恒压电泳 20 min, 用 DH2000 凝胶图像分析系统进行分析结果, 以 TREM-1 mRNA 条带灰度值与 β -actin 条带灰度值的比值反映 TREM-1 mRNA 表达水平。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件分析处理, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 计数资料采用 χ^2 检验, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

4 组大鼠外周血中性粒细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 TREM-1 mRNA 的比较。与 A 组比较, B 组 TREM-1 mRNA 表达上调, TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的浓度升高($P<0.05$); 与 B 组比较, C 组和 D 组 TREM-1 mRNA 表达下调, TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的浓度降低($P<0.05$); C 组与 D 组 TREM-1 mRNA 表达及 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的浓度比较差异无统计学意义($P>0.05$), 见表 1。

表 1 4 组大鼠外周血中性粒细胞 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 TREM-1 mRNA 的比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	TNF- α (ng/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	TREM-1 mRNA
A 组	0.27 $\pm$ 0.11	23.00 $\pm$ 8.00	127.00 $\pm$ 18.00	0.47 $\pm$ 0.19
B 组	0.78 $\pm$ 0.17 Δ	79.00 $\pm$ 11 Δ	398.00 $\pm$ 42.00 Δ	0.78 $\pm$ 0.29 Δ
C 组	0.61 $\pm$ 0.15 $\blacktriangle$	55.00 $\pm$ 10.00 $\blacktriangle$	257.00 $\pm$ 25.00 $\blacktriangle$	0.62 $\pm$ 0.25 $\blacktriangle$
D 组	0.57 $\pm$ 0.13 $\blacktriangle$	51.00 $\pm$ 9.00 $\blacktriangle$	238.00 $\pm$ 23.00 $\blacktriangle$	0.59 $\pm$ 0.22 $\blacktriangle$

Δ : $P<0.05$, 与 A 组比较; $\blacktriangle$: $P<0.05$, 与 B 组比较。

3 讨 论

2001 年, Bouchon 等^[8]首次报道了 TREM-1 作为介导脓毒性休克的关键介质触发并扩大了炎症反应。TREM-1 能够通过跨膜调节蛋白 DAP12 引起髓样细胞内蛋白激酶磷酸化, 触发和放大炎症反应, 使中性粒细胞和单核细胞释放 IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、p40、TNF- α 、髓过氧化物酶(MPO)、中性粒细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、MCP-3、巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α), 以及活性氧自由基, 触发中性粒细胞和单核细胞的炎症反应, 诱导炎症因子的分泌和钙离子的动员, 使机体产生炎症因子形成瀑布效应, 使炎症扩大甚至失去控制^[1,9-10]。陆立仁等^[11]前期研究表明, 用 100 μ g/L 的 LPS 刺激人中性粒细胞系 THP-1 细胞表面的 TREM-1 表达上调。因此, 本研究将 LPS 终浓度定为 100 μ g/L, 结果表明, 给予 LPS 刺激后, B 组与 A 组比较, 大鼠外周血中性粒细胞 TREM-1 mRNA 表达上调, TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的浓度升高, 说明 LPS 可诱导中性粒细胞活化, 导致 TREM-1 合成增加, 从而诱发 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的生成与释放。临床上右美托咪定的推荐治疗靶浓度为 0.4~1.2 ng/mL。因此, 本研究选择 C、D 组分别加入右美托咪定终浓度为 0.5 ng/mL 和 1.0 ng/mL, 结果表明, 与 B 组比较, C 组和 D 组 TREM-1 mRNA 表达下调, TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的浓度降低, 说明右美托咪定可下调 TREM-1 mRNA 表达, 抑制 TREM-1 的合成, 抑制 LPS 诱导大鼠外周血中性粒细胞 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 生成与释放。

右美托咪定下调 TREM-1 mRNA 表达的机制目前尚不清楚。研究结果显示^[12-13], 在 TLR-4 配体存在的条件下, TREM-1 激活可放大促炎性细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 的释放, 同时减少抗炎细胞因子 IL-10 释放, 而且激活 TLR 可使 TREM-1 表达水平上升, TREM-1 表达水平可改变 TLR-4 信号转导途径关键受体和效应蛋白的表达, 从而调节 TLR-4 途径效应, 因而, TREM-1 与 TLR 信号通路可能存在协同作用。闫东来等^[14]研究显示, DEX 可通过下调 TLR-4 mRNA 的表达, 抑制 TLR-4 的合成, 从而抑制 LPS 诱导大鼠外周血单核细胞 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 生成与释放。因此, 作者推测右美托咪定下调 TREM-1 mRNA 表达与 TLR-4 信号转导途径关键受体和效应蛋白的表达有关。

参考文献

[1] Tessarz AA, Cerwenka A. The TREM-1/DAP12 pathway [J]. Immunol Lett, 2008, 116(2): 111-116.
[2] Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes [J]. J Immunol, 2000, 164(10): 4991-4995.
[3] Ibacache M, Sanchez G, Pedrozo Z, et al. Dexmedetomidine preconditioning activates pro-survival kinases and attenuates regional ischemia/reperfusion injury in rat heart [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822(4): 537-545.
[4] Yan M, Dai HB, Ding TT, et al. Effects of dexmedetomidine on the release of glial cell line-derived neurotrophic factor from rat astrocyte cells [J]. Neurochem Int, 2011,

- 58(5):549-557.
- [5] Zhang XY, Liu ZM, Wen SH, et al. Dexmedetomidine administration before, but not after, ischemia attenuates intestinal injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats[J]. *Anesthesiology*, 2012, 116(5):1035-1046.
- [6] Tasdogan M, Memis D, Sut N, et al. Results of a pilot study on the effects of propofol and dexmedetomidine on inflammatory responses and intraabdominal pressure in severe sepsis [J]. *J Clin Anesth*, 2009, 21(6):394-400.
- [7] Taniguchi T, Kurita A, Kobayashi K, et al. Dose- and time-related effects of dexmedetomidine on mortality and inflammatory responses to endotoxin-induced shock in rats [J]. *J Anesth*, 2008, 22(3):221-228.
- [8] Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, et al. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock[J]. *Nature*, 2001, 410(6832):1103-1107.
- [9] Bleharski JR, Kiessler V, Buonsanti C, et al. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response [J]. *J Immunol*, 2003, 170(7):3812-3818.
- [10] Radsak MP, Salih HR, Rammensee HG, et al. Triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in neutrophil inflammatory responses: differential regulation of activation and survival[J]. *J Immunol*, 2004, 172(8):4956-4963.
- [11] 陆立仁, 张良清, 卢燕. 异丙酚对内毒素诱导人单核细胞系 THP-1 细胞 TREM-1 表达的影响 [J]. *天津医药*, 2014, 42(8):759-761, 785.
- [12] Unoshima M. Therapeutic effect of anti-HMGB1 antibody and anti-RAGE antibody on SIRS/sepsis[J]. *Nippon Rinsho*, 2004, 62(12):2323-2329.
- [13] Ornatowska M, Azim AC, Wang X, et al. Functional genomics of silencing TREM-1 on TLR4 signaling in macrophages[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293(6):L1377-1384.
- [14] 闫东来, 于泳浩, 刘宏伟, 等. 右美托咪定对脂多糖诱导大鼠外周血单核细胞 Toll 样受体 4 mRNA 表达的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2011, 31(1):115-117.

(收稿日期:2015-05-28 修回日期:2015-07-16)

(上接第 4906 页)

- 上皮细胞和基质细胞的分离纯化及培养方法的探讨[J]. *中国医科大学学报*, 2007, 36(5):608-610.
- [6] 俞超芹, 石书芳, 刘玉环, 等. 人子宫内膜异位症在位和异位内膜细胞原代培养及形态学观察[J]. *中西医结合学报*, 2006, 4(2):189-193.
- [7] Schickling BM, Aykin-Burns N, Leslie KK, et al. An inhibitor of K^+ channels modulates human endometrial tumor-initiating cells[J]. *Cancer Cell Int*, 2011, 11(1):25.
- [8] Guo X, Liu G, Schauer IG, et al. Overexpression of the β subunit of human chorionic gonadotropin promotes the transformation of human ovarian epithelial cells and ovarian tumorigenesis[J]. *Am J Pathol*, 2011, 179(3):1385-1393.
- [9] 陈诚, 常青, 梁志清, 等. 人子宫内膜细胞原代培养方法的改良[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(6):507-509.
- [10] 许艳丽, 杨卓, 陈英汉, 等. 人子宫内膜异位症在位内膜间质细胞原代培养方法探讨[J]. *中国全科医学*, 2009, 12(18):1669-1672.
- [11] 王欣, 成娅, 程湘, 等. 人子宫内膜腺上皮细胞原代培养方法的改进[J]. *重庆医学*, 2005, 34(5):702-703, 705.
- [12] Arnold JT, Kaufman DG, Seppala M, et al. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(5):836-845.
- [13] Akoum A, Lawson C, Herrmann-Lavoie C, et al. Imbalance in the expression of the activating type I and the inhibitory type II interleukin 1 receptors in endometriosis [J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(5):1464-1473.
- [14] Gazvani R, Smith L, Fowler PA. Effect of interleukin-8 (IL-8), anti-IL-8, and IL-12 on endometrial cell survival in combined endometrial gland and stromal cell cultures derived from women with and without endometriosis[J]. *Fertil Steril*, 2002, 77(1):62-67.
- [15] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001:94-95.

(收稿日期:2015-05-22 修回日期:2015-07-17)

《重庆医学》开通微信公众平台

《重庆医学》已开通微信公众平台(微信号:ChongqingMedicine),《重庆医学》将以微信平台渠道向广大读者发送终审会动态报道、各期杂志目录、主编推荐文章、学术会议、《重庆医学》最新资讯等消息。欢迎广大读者免费订阅。读者可以点击手机微信右上角的“+”,在“添加朋友”中输入微信号“Chongqing Medicine”,或在“添加朋友”中的“查找公众号”一栏输入“重庆医学”,添加关注。