

基于 CLP 败血症小鼠中补体 C5a 与白细胞介素-6 相关性研究

周亚妮^{1,2}, 李 可¹, 刘 丹¹

[摘要] **目的:**探讨败血症发病机制中炎症介质 C5a 与细胞因子白细胞介素-6(IL-6)的关系。**方法:**利用经典盲肠结扎穿孔术(CLP)建立败血症动物模型,在败血症活动期,取不同时间段建模组和假手术组小鼠的腹腔灌洗液,检测补体 C5a 和 IL-6 的表达。**结果:**建模组小鼠的腹腔灌洗液中补体 C5a 和 IL-6 水平在建模后第 4、6、12、24 h 均明显高于假手术组($P < 0.01$);伴随病态恢复,2 组实验动物体内补体 C5a 和 IL-6 的表达水平逐渐趋于正常。**结论:**CLP 败血症小鼠发病机制中,炎症介质 C5a 与细胞因子 IL-6 的调节有一定的线性相关趋势。

[关键词] 败血症;盲肠结肠穿孔术;C5a;白细胞介素-6;小鼠

[中图分类号] R 515.3

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2017.02.003

Study on the correlation of complement C5a with IL-6 in CLP septicemic mice

ZHOU Ya-ni^{1,2}, LI Ke¹, LIU Dan¹

(1. School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an Shanxi 710061;

2. Department of Public Infrastructure, Shangluo Vocational and Technical College, Shangluo Shanxi 726000, China)

[Abstract] **Objective:**To explore the relationship between inflammatory mediator C5a and interleukin-6(IL-6) in the pathogenesis of sepsis. **Methods:**The animal model of sepsis was established using the cecal ligation and puncture(CLP). During the active stage of sepsis, the expressions of complement C5a and IL-6 in peritoneal lavage fluid of the different time-points model group and sham operation group were detected. **Results:**The levels of the complement C5a and IL-6 in peritoneal lavage fluid in model group after 4, 6, 12 and 24 h of establishing model were significantly higher than those in sham group ($P < 0.01$). With the recovery of disease, the levels of complement C5a and IL-6 in two groups gradually returned to the normal level. **Conclusions:**During the pathogenesis of CLP sepsis in mice, the inflammatory mediators C5a and IL-6 have a linear correlation trend.

[Key words] sepsis;cecal perforation of the colon surgery;C5a;interleukin-6;mice

败血症是一类由于多种致病菌进入机体血液后迅速繁殖并产生大量毒素,机体免疫系统过度活化而发生的一种自身损伤性疾病,死亡率高达 30% ~ 50%^[1]。败血症病程中存在怎样的免疫调节,成为近年来该领域研究的热点。补体系统是机体天然免疫的重要组成部分^[2],参与机体的特异性和非特异性免疫应答,在免疫调节和免疫病理损伤中发挥着重要作用,C5a 具有过敏毒素作用,通过与血管内皮细胞上 C5a 受体(C5aR)结合导致血管的通透性增加,活化的补体 C5a 能够导致炎症反应过度放大,对机体分泌白细胞介素-6(IL-6)有一定的刺激作用^[3]。本文利用经典盲肠结扎穿孔(CLP)模型,模

拟临床败血症的病理过程,探讨败血症小鼠体内补体 C5a 和 IL-6 表达的情况。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,购于西安交通大学医学部实验动物中心,SPF 级动物房饲养。

1.2 试剂和仪器 小鼠 C5a ELISA 抗体购于 BD 公司;IL-6 ELISA 检测试剂盒购于 eBioscience 公司;SYBR Green real-time PCR Master Mix 购于日本东洋纺公司;PE 标记抗小鼠 CD4⁺ 抗体购于 eBioscience 公司;抗凝剂(ACD)购于 Baxter. Deerfield 公司;高速台式离心机(德国 Eppendorf 5417R、5415R);酶联检测仪(美国 Bio-Rad);光学倒置显微镜(日本 Olympus);实时定量 PCR 仪(德国 Eppendorf);CO₂ 细胞培养箱(Forma 3111 型);缝合线、缝合针、结扎线购于上海医用缝合针厂有限公司。其他常用化学试剂均为进口或国产分析纯,由西安交通大学第二附属医院科学研究实验中心提供。

[收稿日期] 2015-11-16

[基金项目] 陕西省教育厅科研计划项目(15JK1221);商洛职业技术学院教科课题(2015JXKT15)

[作者单位] 1. 西安交通大学 医学部,陕西 西安 710061;2. 商洛职业技术学院 公共基础部,陕西 商洛 726000

[作者简介] 周亚妮(1980-),女,硕士,讲师。

[通信作者] 李 可,博士研究生导师,教授。E-mail: ke.li@mail.xjtu.edu.cn

1.3 方法

1.3.1 麻醉药配制 将氯氨酮、盐酸赛拉嗪注射液、0.9% 氯化钠溶液按 2:1.5:3.5 体积比配置,混合均匀后 4 °C 条件下冷藏,C57BL/6 小鼠麻醉剂量为每只 0.05 mL,腹腔注射法麻醉。

1.3.2 CLP 败血症小鼠模型建立 48 只 C57BL/6 实验小鼠,体质量 18 ~ 20 g,随机分为假手术组和建模组,每组 24 只。均在室温 22 °C 环境下,建模组取禁食 8 h 不禁水的雄性 C57BL/6 小鼠,用配制的麻醉药,采用腹腔注射麻醉后,取仰卧位,并固定于手术台上,用 75% 乙醇常规消毒腹部,剑突下一指沿腹白线用手术刀正中切口 2 ~ 3 cm。暴露腹部,寻找盲肠与小肠及大肠交界处,找到盲肠部位,以 3 - 0 号丝线环形结扎盲肠远端部位,结扎 2/3 宽度,并用 8 号针头穿刺肠壁 2 次,2 个针孔相距约 3 mm,挤出适量肠内容物,将肠内容物及盲肠按原位放回腹腔,逐层关腹,分别缝合结扎。术后即刻皮下注射 0.9% 氯化钠注射液,剂量为 5 mL/100 g 体质量,补充手术过程中体液的丢失。假手术组同样需暴露肠内容物,但不进行肠结扎及穿孔操作。每组独立实验重复 3 次。

1.3.3 腹腔灌洗液离心收集 分别于 CLP 模型建立后第 4、6、12、24 h,每个时间点选取 6 只实验小鼠(考虑到建模动物的死亡情况)将其脱臼处死,腹部外皮剪开以便清楚看到腹膜。5 mL 注射器吸取 2 mL 0.9% 氯化钠注射液注入小鼠腹腔内,用手反复揉搓小鼠腹腔 30 s 左右,注射器吸出腹腔灌洗液,2 500 r/min 离心 3 min,收集上清液用于小鼠 C5a 水平的检测和 IL-6 的测定,-40 °C 保存备用。

1.3.4 灌洗液中补体 C5a 和 IL-6 检测 C5a 和 IL-6 检测严格按照试剂盒说明书操作。一抗(1 ~ 5 μg/mL)溶解于包被液(碳酸盐缓冲液 pH 9.6),每孔 100 μL 包被 ELISA 亲和 96 孔板,4 °C 放置过夜后,10% FCS/PBS 封闭 2 h。PBS-T 洗板 3 次,每孔加入 100 μL 样品(1:10 ~ 1:100 稀释),室温放置 1 h,PBS-T 洗板 3 次,加入 Biotin 化抗体(1 ~ 5 μg/mL),室温放置 1 h,PBS-T 洗 5 次,加入 Avidin-HRP(1:1 000 稀释,每孔 100 μL)室温放置 30 min,以 TMB 显色系统显色,测 OD₄₅₀ 值,根据标准曲线确定细胞因子量。

1.4 统计学方法 采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 2 组小鼠不同时间段腹腔灌洗液中 C5a 水平

比较 结果显示,与假手术组比较,建模组小鼠腹腔中的 C5a 水平明显升高($P < 0.01$)(见表 1)。

表 1 2 组小鼠不同时间段腹腔灌洗液中 C5a 水平 (pg/mL)

分组	<i>n</i>	4 h	6 h	12 h	24 h
假手术组	6	1.98 ± 0.72	5.66 ± 1.75	4.93 ± 0.98	2.07 ± 0.81
建模组	6	9.62 ± 4.24	19.84 ± 5.26	27.09 ± 7.58	17.59 ± 4.36
<i>t</i>	—	3.97	5.72	6.48	7.83
<i>P</i>	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.2 2 组小鼠不同时间段腹腔灌洗液中 IL-6 的表达水平比较 结果显示,建模组 IL-6 水平明显高于假手术组($P < 0.01$)(见表 2)。

表 2 2 组小鼠不同时间段腹腔灌洗液中 IL-6 水平 (pg/mL)

分组	<i>n</i>	4 h	6 h	12 h	24 h
假手术组	6	1.89 ± 0.39	18.22 ± 3.18	13.14 ± 2.24	1.71 ± 0.32
建模组	6	23.96 ± 5.27	45.91 ± 9.42	65.08 ± 10.62	42.43 ± 8.66
<i>t</i>	—	9.34	6.23	10.70	10.51
<i>P</i>	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

败血症是一类由病原菌感染引起的自身损伤性疾病,主要表现为补体系统的活化、高水平炎性细胞因子产生、淋巴细胞大量凋亡、多种脏器出现病理性破坏,最终出现多器官功能衰竭^[4]。目前关于败血症的发病机制主要有以下两种观点:(1)败血症是由于机体过度炎症反应所引起的自身组织损伤,炎症因子补体 C5a 所介导的“补体损伤”是主要始动因素^[5]。(2)败血症主要由于疾病发生过程中机体的免疫系统受到抑制引起,胸腺淋巴细胞大量凋亡是机体免疫功能受损的基础^[6]。IL-6 是一种重要细胞因子,介导炎症细胞到局部的浸润及组织损伤^[7],并通过诱导炎症介质、趋化因子等导致组织器官的炎性损伤^[8-10]。

本文结果显示,补体系统被活化导致炎症介质 C5a 增多,在此过程中,细胞因子 IL-6 的表达也增高,提示在败血症发病机制中,补体 C5a 与细胞因子 IL-6 有一定的相关性,这可能与炎症急性期刺激作用下,导致免疫应答过程中单核巨噬细胞以及 Th2 细胞活化,引起 IL-6 分泌增多有一定关系^[11]。结果还显示,在建模后第 12 h 时两种物质的表达均达到最高值,随后,伴随着炎症的恢复,又出现下降趋势。在败血症感染过程中,建模组与假手术组炎

症介质 C5a 和细胞因子 IL-6 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), C5a 和 IL-6 在感染的不同时间段都有明显的变化。因此,在 CLP 实验性败血症小鼠发病机制中,在炎症活动期,由于补体系统的活化, C5a 作为重要的炎症介质,可促进细胞活化并释放促炎细胞因子 IL-6,使炎症反应进一步放大,从而直接、间接导致组织损伤^[12]。

另外,补体系统过渡活化后产生的 C5a 作为重要的过敏毒素,通过与血管内皮细胞上 C5aR 结合能导致血管的通透性增加,对诱导 IL-6 分泌有一定的作用^[13]。这些炎症介质以及细胞因子的产生,导致自身免疫损伤,是败血症发病机制中重要的环节^[14]。本实验证明在败血症发病过程中,炎症介质补体 C5a 与细胞因子 IL-6 在介导炎症作用中起到了重要的作用,为探索败血症的发病机制提供了科学的实验依据和研究方向^[15-18]。

[参 考 文 献]

- [1] 王立燕,徐若男,韩根成,等. 实验性败血症小鼠模型的建立及评价[J]. 中国实验血液学杂志,2010,18(3):766.
- [2] 葛均波. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:425.
- [3] 金伯泉. 细胞和分子免疫学[M]. 北京:科学出版社,2011:253.
- [4] 石增立,刘凤,于小玲,等. 败血症大鼠促炎性细胞因子与炎性细胞变化的实验研究[J]. 滨州医学院学报,2004,27(4):241.
- [5] KIYOSHI H, KAMRAN G, XIANG PY, *et al.* Interleukin-27 Priming of T Cells Controls IL-17 Production In trans via Induction of the ligand PD-L1[J]. Immunity,2012,(6):543.
- [6] KOLLS JK, LINDÉNA. Interleukin-17 family members and inflammation[J]. Immunity,2004,21(4):467.
- [7] FOSSIEZ F. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce

proinflammatory and hematopoietic cytokines [J]. Exp Med, 2012,183(15):2593.

- [8] AHJOKU AO, YU CR, LIU XB, *et al.* Th17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/Stat-1[J]. Nat Med,2007,13(6):711.
- [9] WONG CK, HO CY, LI EK, *et al.* Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus [J]. Lupus,2000,9(8):589.
- [10] LOONG CC, HSIEH HG, LUI WY, *et al.* Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection[J]. J Pathol,2002,197(3):322.
- [11] ROMANO H, SIRONI M, TONIATI C, *et al.* Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment[J]. Immunity,2012,6(11):315.
- [12] 王会会,陈国江,黎燕,等. 补体 C5a、C5a 受体及其拮抗剂的研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2010,37(3):181.
- [13] 何维. 医学免疫学[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:76.
- [14] 胡荣,左大鹏,梁瑞彬,等. 败血症动物模型中胸腺细胞凋亡及 TNF- α 作用的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2000,20(2):113.
- [15] GU D, XIONG L, HAN Y, *et al.* Transfusion of necrotic cells redresses regulatory T cell and Th17 cell imbalance in septic mice [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao,2014,34(7):956.
- [16] 施荣,王倩,韩丹,等. 炎调方抑制 LPS 诱导人肺泡上皮细胞炎症因子释放机制研究[J]. 中国中医急症,2016,25(4):572.
- [17] 荆喜中,贾欢欢,罗挺,等. 小鼠脓毒症模型的建立和评价[J]. 中国实验动物学报,2016,24(2):158.
- [18] SCHABBAUAR G. Polymicrobial sepsis models: CLP versus CASP[J]. Drug Discov Today Dis Mod,2012,9(1):17.

(本文编辑 姚仁斌)

不同语境下基因及其表达产物名称的正确写法(一)

论文中一般在基因首次出现时,使用基因全名。基因的全名不用斜体,也不用希腊字母,如 insulin-like growth factors 1(胰岛素样生长因子1)。除了首次出现显示基因全名,文中其他位置均可使用基因符号,即基因全名的缩写。基因符号使用斜体,第一个字母大写,其余小写,不用希腊字母和连字符,如 *Igf1*(胰岛素样生长因子1)。蛋白质的缩写名称和基因相同,但不用斜体,并全部大写,如 IGF1。