

小鼠CTRP6基因缺失对LPS介导的急性炎症反应的影响

徐珂^{1,2} 郭学民¹ 黄鑫^{1,2} 吉苗^{1,2} 郑诚² 彭永佳² 滕懿群³ 毋文静^{2*} 张瑾^{2*}

(¹河北科技师范学院农学与生物科技学院, 秦皇岛 066000; ²嘉兴学院生物与化学工程学院, 嘉兴 314000; ³嘉兴市第二医院, 嘉兴 314000)

摘要 C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白6(CTRP6)是一种新型脂肪细胞因子, 不仅对动物脂代谢具有重要的调控作用, 还参与机体的炎症反应。该文以CTRP6基因敲除鼠(CTRP6^{-/-})为材料, 通过腹腔注射脂多糖(LPS)建立急性炎症反应模型, 旨在分析CTRP6在炎症反应中的作用。首先, 取2月龄雄性CTRP6^{-/-}(KO)小鼠, 随机分为2组(5只/组): LPS处理组和生理盐水组, 分别以WT鼠为对照。利用Real-time PCR和ELISA分析LPS对WT小鼠机体内CTRP6表达水平的影响, 发现LPS刺激后WT小鼠各组织及血清中CTRP6的表达水平均下降, 表明CTRP6基因与LPS诱导的急性炎症反应密切相关。接下来, 对比两种基因型小鼠发现, KO组小鼠注射LPS后, 其炎症因子TNF- α 和IL-1 β 升高水平显著低于WT对照组。进一步通过肺部切片HE染色和肺组织干湿比评估炎症反应对肺的损伤程度, 发现KO组小鼠的肺损伤程度显著低于WT小鼠。最后, 在体外, 利用LPS刺激骨髓来源的巨噬细胞, 两种基因型巨噬细胞的炎症因子表达水平均显著升高, 但CTRP6^{-/-}型巨噬细胞的炎症因子升高水平以及NF- κ B的磷酸化升高水平均显著低于WT型巨噬细胞。综上所述, CTRP6基因与机体炎症反应密切相关, CTRP6基因缺失导致小鼠对LPS的应答减弱, 缓解了急性炎症反应对机体造成的伤害。

关键词 CTRP6; 基因敲除鼠; LPS; 急性炎症反应

Effect of CTRP6 Deficiency on LPS-Mediated Acute Inflammatory Response in Mice

XU Ke^{1,2}, GUO Xuemin¹, HUANG Xin^{1,2}, JI Miao^{1,2}, ZHENG Cheng², PENG Yongjia², TENG Yiqun³, WU Wenjing^{2*}, ZHANG Jin^{2*}

(¹College of Agronomy and Biotechnology, Hebei Normal University Of Science & Technology, Qinhuangdao 066000, China;

²College of Biological Chemical Sciences and Engineering, Jiaxing University, Jiaxing 314000, China;

³Jiaxing Second Hospital, Jiaxing 314000, China)

Abstract CTRP6 (C1q/TNF-related protein 6) is a novel adipocytokine, which has been proved to be a regulator in animal lipid metabolism, as well as a participant in the body's inflammatory response. In this study, CTRP6^{-/-} (CTRP6 knockout mice) were used to establish an acute inflammatory model by intraperitoneal injection of LPS (lipopolysaccharide) in order to unveil the effects of CTRP6 deficiency on acute inflammatory response in

收稿日期: 2019-06-21 接受日期: 2019-09-06

浙江省自然科学基金(批准号: LQ18C170001、LQ18C170002、LY17C170003、LY18H040014)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0573-83643695, E-mail: wuwenjing19851020@163.com; zhangjin7688@163.com

Received: June 21, 2019 Accepted: September 6, 2019

This work was supported by Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (Grant No.LQ18C170001, LQ18C170002, LY17C170003, LY18H040014)

*Corresponding authors. +86-573-83643695, E-mail: wuwenjing19851020@163.com; zhangjin7688@163.com

网络出版时间: 2020-01-06 17:08:17 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20200106.1707.014.html>

mice. Firstly, two-month old male *CTRP6*^{-/-} (KO) mice were randomly divided into two groups (5 mice/group), LPS treatment group and normal saline group, with WT (wild-type) mice as control groups. The analysis of Real-time PCR and ELISA showed that the expression of *CTRP6* was down-regulated in various tissues and serum of WT mice with LPS injection, which indicates that the *CTRP6* gene is closely related to the acute inflammation induced by LPS. Then, With the comparison of the two genotypes, the inflammatory factors *TNF- α* and *IL-1 β* in the KO mice were increased less than WT mice with LPS injection. Furthermore, the degree of lung injury was evaluated by tissue section and lung tissue dry-wet ratio analysis. The lung of KO mice showed less inflammatory than that of WT mice with LPS injection. Finally, BMDMs (bone marrow-derived macrophages) from each genotype were treated with LPS and both genotypes showed increased inflammatory factors, while inflammatory factors and NF- κ B phosphorylation of *CTRP6*^{-/-} BMDMs increased less than that of WT BMDMs. In conclusion, *CTRP6* gene is closely related to the inflammatory response. *CTRP6* deficiency lead to a lower level of acute inflammatory response, then reduce the damage in mice treated with LPS.

Keywords CTRP6; knockout mice; LPS; acute inflammatory response

炎症反应是机体应对病原体感染的一种天然防御机制, 当机体发生炎症反应时, 免疫细胞会通过变形穿过毛细血管壁, 集中到病菌入侵部位, 将病菌包围、吞噬, 同时也造成血管通透性增强, 释放大炎症性细胞因子^[1]。在炎症反应期间, 机体与致炎因子进行不断抗争, 促进机体抗病机能增加, 清除致炎因子, 使受损的组织得以修复, 从而使机体的内环境和外环境之间达到新的平衡^[2]。但是, 一旦炎症反应失控, 将会引发组织内细胞的损坏, 使细胞变性、坏死, 造成心、脑、肾、肝、肺等要害器官的衰竭, 甚至导致死亡^[3]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌释放的一种重要的致病因子, 也是诱发炎症反应的重要病原分子^[4], 其可以激活巨噬细胞表面的Toll样受体4(toll like receptor 4, TLR4)受体, 并与MyD88衔接蛋白结合, 进一步来激活NF- κ B信号通路, 促进炎症因子如TNF- α 、IL-1 β 和IL-6表达量增加, 引起炎症反应^[5]。

补体C1q/肿瘤坏死因子相关蛋白(complement-C1q/tumor necrosis factor-related protein, CTRP)是近年来发现的新型分泌蛋白超家族, 它们都具有4个蛋白结构域: N-端信号肽、短的可变区、胶原结构域和C-端球型域^[6]。迄今为止共发现15个成员, 分别在代谢、炎症、细胞凋亡与分化、自身免疫等多种生物学过程中发挥重要作用^[7-9]。CTRP6蛋白与脂联素高度同源, 能够促进脂肪细胞的分化和甘油三酯的积累^[10]。此外, 多项研究表明, CTRP6可能在炎症反应中发挥重要的调控作用。Kim等^[11]发现, CTRP6蛋白在巨噬细胞中能够诱导抗炎性细胞因子

IL-10的表达; Murayama等^[12]发现, CTRP6蛋白在类风湿关节炎小鼠模型中表达量显著上升, 并发现在*CTRP6*敲除鼠的补体系统被激活, 免疫反应增强; 此外, Wong等^[13]还发现, CTRP6能够通过靶向巨噬细胞来调控局部的炎症反应, 其缺失会减少外周血中促炎细胞因子的表达。

为了更深入地了解CTRP6在炎症反应中的作用, 本研究通过腹腔注射LPS来建立小鼠急性炎症模型, 对比*CTRP6*基因敲除(KO)鼠与野生型(WT)鼠炎症反应的差异, 发现*CTRP6*基因缺失导致小鼠应答LPS诱导的急性炎症反应弱于野生型。

1 材料与方法

1.1 材料

通过胚胎干细胞注射法, 以C57BL/6J小鼠为材料构建*CTRP6*缺失杂合子小鼠^[14], 再通过扩繁获得*CTRP6*^{-/-}小鼠。实验用小鼠饲养于嘉兴学院医学院动物房(SPF级), 温度为(25 \pm 1) °C, 相对湿度为40%~60%, 12 h明暗交替, 自由摄取水, 采食。选取9周龄健康且体质量在22~25 g的雄性*CTRP6*^{-/-}(KO)小鼠和野生型(WT)小鼠各10只, 每种基因型的小鼠随机分为2组(即5只/组), 其中一组注射10 mg/kg的LPS诱导小鼠发生急性炎症反应(记为WT-LPS组和KO-LPS组), 另外一组注射0.9%的生理盐水作为对照(记为WT-CK组和KO-CK组)。每隔1 h通过红外温度计测量1次小鼠体温, 每次测量均选择同一部位, 同时观察小鼠精神状态, 注射后6 h处死小鼠, 收集血液, 将其静置于4 °C冰箱, 采集心、肝、肺、脑、皮下脂肪、

内脏脂肪和棕色脂肪组织,并迅速浸入液氮后, -80°C 保存。上述动物实验均遵照《中华人民共和国实验动物管理条例》的相关规定,并已通过嘉兴学院医学院动物实验及实验动物伦理委员会审查批准。

1.2 试剂及仪器

内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)购自美国Sigma公司;引物由通用生物系统(安徽)有限公司合成;酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒由南京建成生物工程研究所生产;BCA蛋白质测定试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司;Trizol试剂购自Invitrogen公司;反转录试剂盒购自TaKaRa公司;SYBR Green试剂购自北京百泰克生物技术有限公司;DEPC购自Sigma公司;胎牛血清购自中国杭州四季青生物技术有限公司。

实验仪器:珠磨仪(MP Biomedicals)、核酸测定仪(Thermo)、实时定量PCR仪(Thermo)、普通PCR仪(Eppendorf)、多功能凝胶成像系统(Bio-Rad)、细胞培养板(Corning)、 CO_2 细胞培养箱(Thermo)、荧光倒置显微镜(Leica)。

1.3 细胞培养

分别从WT和KO小鼠的股骨中分离骨髓来源的巨噬细胞(bone marrow-derived macrophage, BMDM),并在补充有10% FBS(fetal bovine serum)、10 ng/mL重组巨噬细胞集落刺激因子(eBioscience)、1%青霉素/链霉素和2 mmol/L L-谷氨酰胺的RPMI-1640培养基中培养^[15]。取出骨髓细胞后,2天换1次液,诱导出巨噬细胞后隔1天换1次,在第8天时用50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的LPS处理细胞,并用等量的PBS作为对照,48 h后收集细胞,用于提取RNA和蛋白质裂解。

1.4 肺组织病理学检查

取小鼠的左肺,10%的中性福尔马林固定,进行石蜡包埋、切片脱水、HE染色,利用光学显微镜观察各组小鼠肺组织的病理学变化^[16],并对肺组织进行了损伤评分^[17]。

1.5 肺组织干湿比检测

取右下肺,用滤纸吸干表面的水分后称重(湿质量);然后将其放置于烘箱中, 80°C 烘48 h,再次称重(干质量)。计算肺组织干湿比(干质量/湿质量)^[18]。

1.6 Real-time PCR检测

利用Trizol裂解法提取总RNA,参照TaKaRa反转录试剂盒说明进行反转录,采用ThermoFisher QuantStudio 3定量PCR仪检测 *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*TGF- β 1*和

*CTRP6*的mRNA相对表达水平,以 β -actin为内参基因,以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算基因相对表达丰度^[19]。

1.7 ELISA检测

通过眼球取血法收集小鼠血液, 4°C 过夜静置,于3 500 r/min、 4°C 离心10 min,收集血清^[20],按照试剂盒说明书利用ELISA法检测血清中CTRP6的相对表达量。

1.8 Western blot分析

LPS刺激巨噬细胞48 h后,收集总蛋白,使用BCA蛋白质测定试剂盒测定总蛋白的浓度后,将各组样本的蛋白浓度调整一致,再与1/4体积的蛋白上样缓冲液混合后煮沸变性;通过10% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离总蛋白,转膜;在室温下用5%脱脂奶粉封闭膜2 h, 1:500稀释p-NF- κ B、NF- κ B、 β -tubulin抗体, 4°C 过夜孵育;第2天洗膜后,用5%脱脂奶粉稀释HRP标记的二抗(1:1 000)于摇床上孵育1.5 h,洗膜后,加发光液,用Bio-Rad成像系统曝光,Image Lab软件测定灰度值, β -tubulin作为内参,目标蛋白分别与内参灰度值相比为各自表达水平。

1.9 数据统计

采用SPSS 13.0进行统计学分析,实验数据以“平均值 \pm 标准误”($\bar{x}\pm s$)的形式表示,采取Student's *t*-test检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义,其中, $*P<0.05$ 为差异具有显著性, $**P<0.01$ 为差异具有极显著性。

2 结果

2.1 LPS注射对CTRP6基因表达的影响

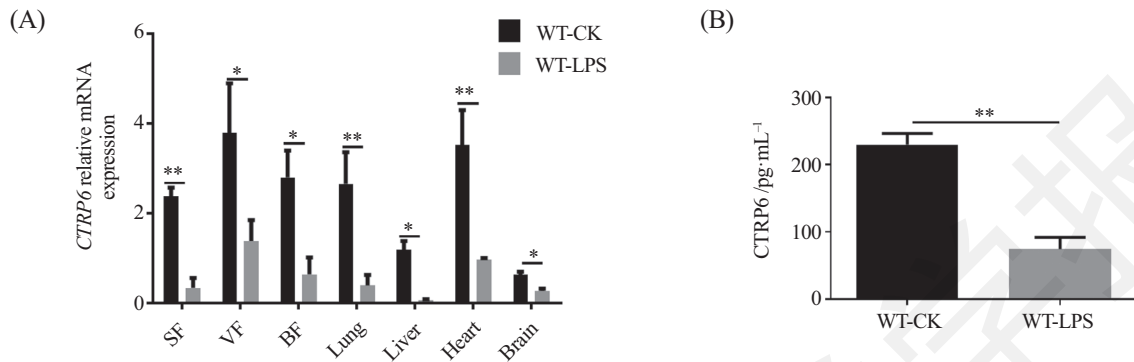
利用Real-time PCR分析LPS对WT小鼠各种组织中CTRP6表达水平的影响,WT-LPS组的7种组织[皮下脂肪(subcutaneous fat, SF)、内脏脂肪(visceral fat, VF)、棕色脂肪(brown fat, BF)、肺(lung)、肝脏(liver)、心脏(heart)和脑(brain)]中CTRP6的mRNA丰度均显著低于对照组WT-CK(图1A);ELISA分析小鼠血清中CTRP6蛋白的含量得到了相同的结果(图1B),表明CTRP6基因与LPS诱导的急性炎症反应具有密切相关性。

2.2 LPS注射对小鼠炎症反应的影响

观察小鼠的生理状态发现,CTRP6^{-/-}和WT小鼠经过腹腔注射LPS后,均迅速出现萎靡不振、嗜睡、毛发直立、腹泻、发热等症状,最高体温达到 37.8°C ,6 h后逐渐恢复。注射生理盐水的对照组未表现出上述症状,表明两种基因型小鼠注射LPS后均发生

了急性炎症反应。通过Real-time PCR检测炎症因子 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 和抗炎因子 $TGF-\beta1$ 的表达情况,发现皮下脂肪、内脏脂肪、棕色脂肪、肺、肝脏、

心脏中炎症因子 $TNF-\alpha$ (图2A)、 $IL-1\beta$ (图2B)和 $IL-6$ (图2C)的表达均升高,而抗炎因子 $TGF-\beta1$ (图2D)的表达均下降,说明LPS注射引起了小鼠全身性的急

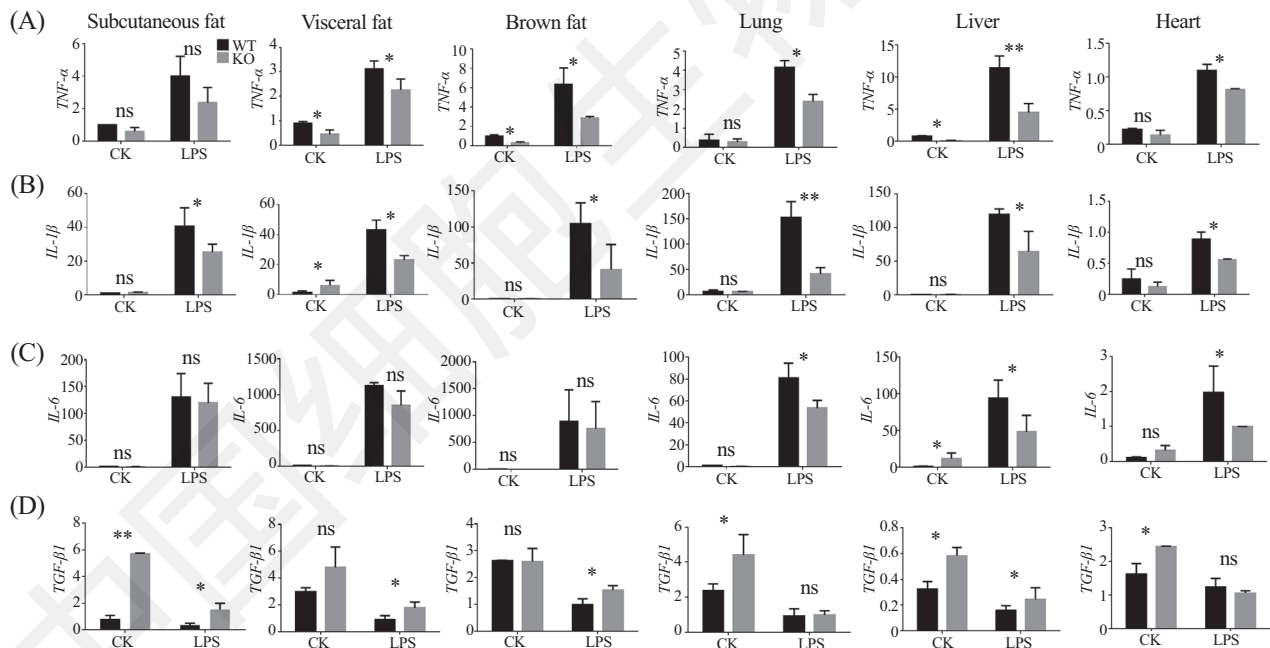


A: LPS对WT小鼠各组织中CTRP6基因表达的影响,其中包括皮下脂肪(SF)、内脏脂肪(VF)、棕色脂肪(BF)、肺(lung)、肝脏(liver)、心脏(heart)、脑(brain); B: 注射LPS后WT小鼠血清中CTRP6蛋白水平的变化。n=5, *P<0.05, **P<0.01。

A: effects of LPS on the expression of *CTRP6* genes in WT mice, including SF(subcutaneous fat), VF(visceral fat), BF (brown fat), lung, liver, heart, and brain; B: changes in the protein expression level of CTRP6 in the serum of WT mice after LPS injection. n=5, *P<0.05, **P<0.01.

图1 LPS注射对小鼠各组织中CTRP6表达及分泌的影响

Fig.1 LPS injection effects on the expression and secretion of CTRP6 in mice different tissues



LPS刺激后,促炎因子 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ 及抗炎因子 $TGF-\beta1$ 分别在小鼠的皮下脂肪(SF)、内脏脂肪(VF)、棕色脂肪(BF)、肺(lung)、肝脏(liver)、心脏(heart)中的mRNA表达变化。A: LPS注射对促炎因子 $TNF-\alpha$ 表达水平的影响; B: LPS注射对促炎因子 $IL-1\beta$ 表达水平的影响; C: LPS注射对促炎因子 $IL-6$ 表达水平的影响; D: LPS注射对抗炎因子 $TGF-\beta1$ 表达水平的影响。CK: 生理盐水对照组; LPS: 10 mg/kg剂量的LPS腹腔注射组; WT: 野生型对照组; KO: *CTRP6*基因敲除型实验组。n=5; ns: P>0.05; *P<0.05, **P<0.01,与WT相比。

After LPS stimulation, the mRNA expression change of proinflammatory factor $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ and anti-inflammation factor $TGF-\beta1$ in subcutaneous fat, visceral fat, brown fat, lung, liver, heart of mice. A: the effect of LPS injection on the expression level of pro-inflammatory factor $TNF-\alpha$; B: the effect of LPS injection on the expression level of pro-inflammatory factor $IL-1\beta$; C: the effect of LPS injection on the expression level of pro-inflammatory factor $IL-6$; D: the effect of LPS injection on the expression level of anti-inflammatory factor $TGF-\beta1$. CK: normal saline control group; LPS: 10 mg/kg dose of LPS intraperitoneal injection group; WT: wild type control group; KO: *CTRP6* gene knockout type experimental group. n=5; ns: P>0.05; *P<0.05, **P<0.01 compared with WT.

图2 LPS注射对小鼠各组织中炎症因子表达的影响

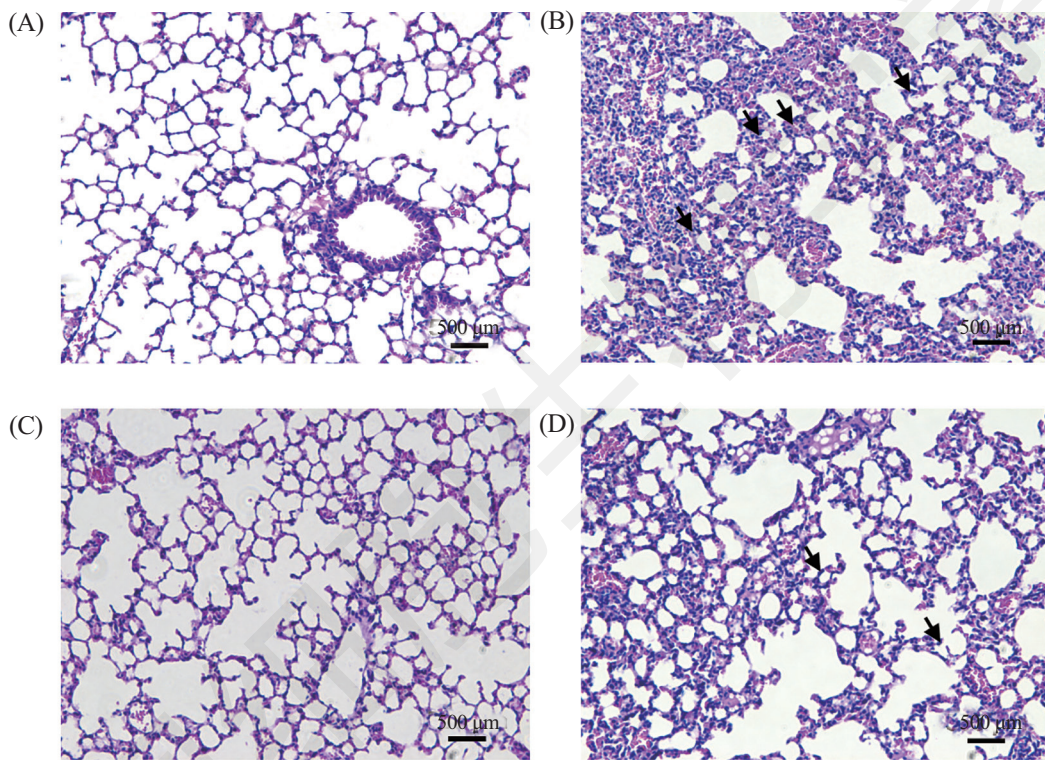
Fig.2 LPS injection effects on the expression of inflammatory cytokines in mice different tissues

性炎症反应, 其中肺和肝脏组织的炎症因子上升幅度最高。此外, KO-LPS小鼠各组织中*TNF- α* 、*IL-1 β* 和*IL-6*的上升水平显著低于WT-LPS小鼠。

2.3 LPS介导的KO与WT小鼠的肺损伤差异

肺损伤是急性炎症反应中常见的一种并发症, 通过病理切片分析发现, 两种基因型的CK组小鼠的肺组织病理结构正常, 未见肺组织水肿、充血, 肺泡隔膜增厚以及炎性细胞浸润; 而LPS刺激后, 两种基因型小鼠肺组织均出现急性肺损伤, 肺组织结构明显受到破坏, 肺泡隔膜明显增宽, 充血水肿明显, 大

量炎症细胞浸润(图3), 各组小鼠肺组织损伤评分见图4。通过分析小鼠肺组织的干湿比, 发现LPS刺激后, 两种基因型小鼠的肺组织干湿比均降低(图5), 说明LPS刺激导致两种基因型小鼠肺部均出现了炎症损伤, 印证了切片的结果。此外, LPS刺激后, 对比两种基因型小鼠肺损伤程度, HE染色结果显示, KO-LPS组小鼠肺组织中免疫细胞浸润少于WT-LPS组, 且肺泡隔膜增厚程度较轻, 肺组织干湿比降低幅度小, 表明经LPS刺激后KO小鼠肺组织损伤轻于WT小鼠。



A: WT-CK组; B: WT-LPS组; C: KO-CK组; D: KO-LPS组。箭头所指为嗜中性粒细胞。

A: WT-CK group; B: WT-LPS group; C: KO-CK group; D: KO-LPS group. The arrows indicate neutrophils.

图3 LPS刺激诱导的小鼠肺损伤病理切片

Fig.3 The histopathological analysis of LPS induced lung injury in mice

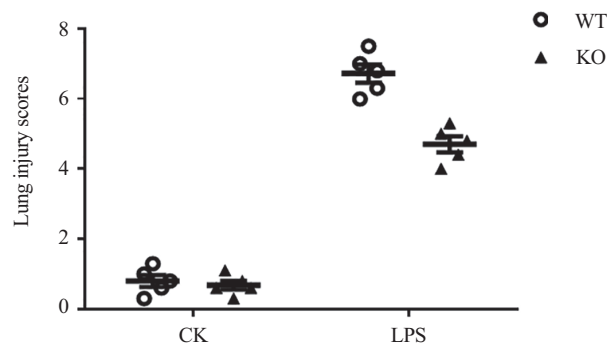
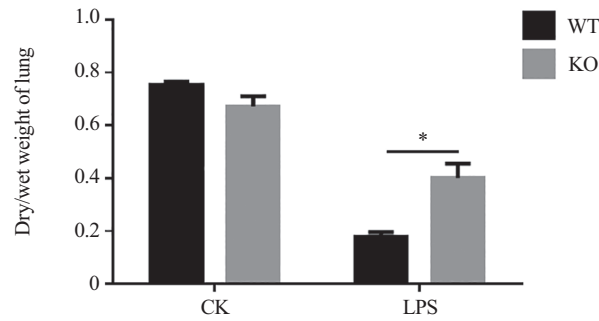


图4 LPS刺激诱导的小鼠肺损伤的病理学评分

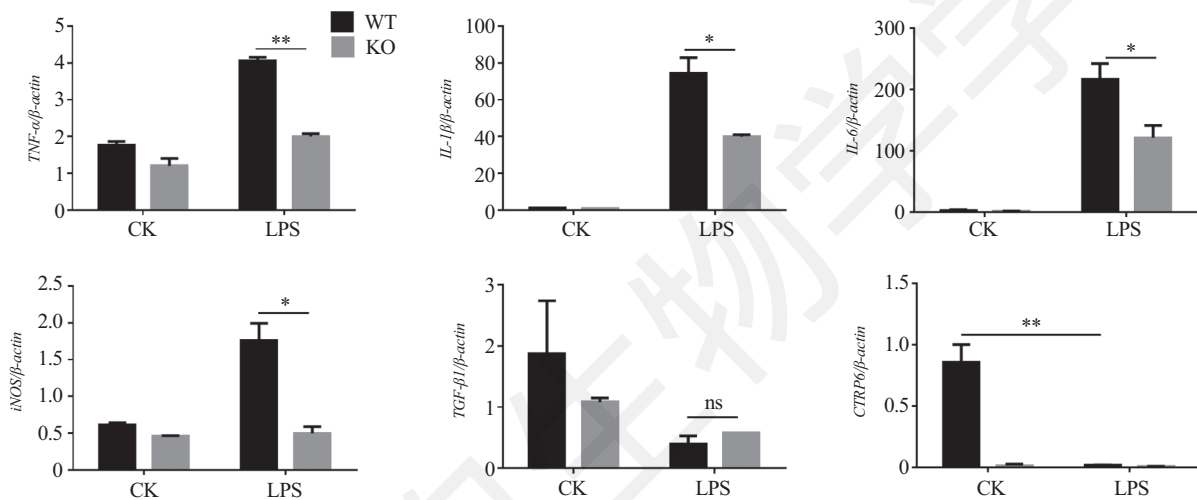
Fig.4 Pathological scores of lung injury in mice after LPS stimulation



* $P < 0.05$.

图5 LPS诱导的小鼠肺损伤的干湿比分析

Fig.5 The dry/wet ratio analysis of LPS induced lung injury in mice



LPS处理WT、KO小鼠原代巨噬细胞48 h后, *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6*、*iNOS*、*TGF- β 1*和*CTRP6*的相对表达情况。LPS: 50 μ g/mL。n=3, ns: $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

the relative expression of *TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6*、*iNOS*、*TGF- β 1* and *CTRP6* in primary macrophages of WT and KO mice after treatment by LPS for 48 h. LPS: 50 μ g/mL. n=3, ns: $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图6 LPS刺激对外培养的巨噬细胞基因表达的影响

Fig.6 LPS effects on gene expression in the primary culture of macrophages

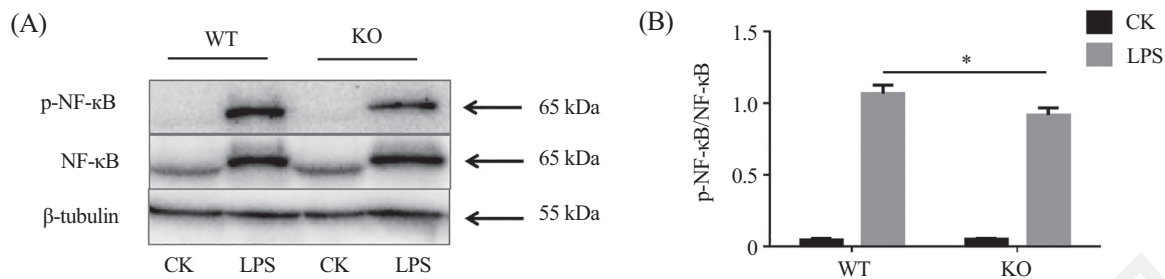
2.4 LPS介导的KO与WT小鼠巨噬细胞炎症反应的差异

巨噬细胞作为炎症反应中一种重要的免疫细胞,在机体炎症反应发生过程中扮演了十分重要的角色。为了明确*CTRP6*缺失对炎症反应的影响,分别从WT、KO小鼠分离获得巨噬细胞原代培养,分析两种基因型的巨噬细胞在LPS刺激下,炎症反应的差异。结果表明,在LPS的诱导下,两种基因型小鼠*TNF- α* 、*IL-1 β* 、*IL-6*和*iNOS*的表达水平显著升高,而*TGF- β 1*的表达水平显著降低(图6),说明LPS引起了巨噬细胞的炎症反应,进一步分析发现, KO组炎症因子的升高水平显著低于WT组,与活体结果一致;接下来分析了*CTRP6*基因的表达水平, KO组小鼠检测不到*CTRP6*的表达,而WT组在LPS刺激

后, *CTRP6*的表达水平显著降低(图6),也与活体结果一致。最后对比LPS处理后KO与WT小鼠巨噬细胞中NF- κ B的磷酸化水平,发现KO组比WT组的NF- κ B的磷酸化水平更低(图7),进一步说明在LPS刺激后, KO小鼠的炎症反应弱于WT。

3 讨论

炎症反应是机体应对病原微生物入侵的一种保护机制,但炎症的发生对机体也会造成一定的损害^[21],因此临床上通常把炎症定义为一个病理过程。深入了解炎症发生的分子机制,有助于提升抗炎治疗方案。本研究通过腹腔注射LPS建立了急性炎症模型小鼠,2~3 h后实验组小鼠均出现萎靡不振、嗜睡、毛发直立、腹泻、发热等生理症状,同时发现,



A: Western印迹分析WT-CK组、WT-LPS组、KO-CK组及KO-LPS组中p-NF-κB及NF-κB的蛋白质水平; B: ImageJ软件对WT-CK组、WT-LPS组、KO-CK组及KO-LPS组中p-NF-κB及NF-κB的蛋白质水平进行定量分析。n=3, *P<0.05。

A: Western blot analysis of protein levels of p-NF-κB and NF-κB in WT-CK group, WT-LPS group, KO-CK group and KO-LPS group; B: ImageJ software for WT-CK group, WT The protein levels of p-NF-κB and NF-κB in the LPS group, KO-CK group and KO-LPS group were quantitatively analyzed. n=3, *P<0.05.

图7 CTRP6对LPS刺激下巨噬细胞NF-κB磷酸化的影响

Fig.7 Effect of CTRP6 on phosphorylation of NF-κB in macrophages after LPS stimulation

促炎因子均显著升高, 抗炎因子显著下降, 说明本实验通过腹腔注射LPS成功建立了小鼠全身急性炎症模型。其中, TNF-α和IL-1β是炎症反应中重要的炎症因子, 对加剧炎症反应起着重要作用。TNF-α主要作用于血管内皮细胞, 可诱导iNOS、趋化因子和细胞黏附分子的表达, 增加IL-1β分泌, 进而引起全身炎症反应^[22]。IL-1β主要由激活的单核细胞、巨噬细胞产生, 可发挥与TNF-α相似的作用, 作用于血管内皮, 促进趋化细胞因子的分泌, 刺激单核巨噬细胞及中性粒细胞等释放更多的炎症介质, 对炎症反应起放大作用^[23]。而TGF-β1可由机体多种细胞产生, 能够抑制免疫活性细胞的增殖, 抑制TNF-α等细胞因子产生, 从而起到抗炎的作用。本实验中, 经LPS刺激后TNF-α和IL-1β两种促炎因子的表达水平均显著升高, 且KO组促炎因子的升高水平显著低于WT组。Wong等^[14]的研究结果也显示, 在饮食诱导的肥胖小鼠中, CTRP6缺失小鼠的外周血中促炎因子TNF-α表达量显著低于同窝出生的WT小鼠, 且KO小鼠脂肪中巨噬细胞浸润减少, 进一步通过重组CTRP6蛋白处理小鼠巨噬细胞, 证明CTRP6可以直接调节巨噬细胞中TNF-α的表达, 这可能是导致KO小鼠体内促炎因子升高水平低于WT小鼠的重要原因之一。此外, 我们还发现, 在LPS的刺激下TGF-β1表达下降, 同时CTRP6缺失时TGF-β1表达升高。LPS本身能够促进炎症的发生, 当LPS刺激时导致抗炎因子TGF-β1下降, 而根据我们的实验结果, CTRP6敲除时能够抑制炎症反应的程度, 因此, TGF-β1的表达升高, 进一步证实了我们的结论。

急性肺损伤是急性呼吸衰竭的综合征, 由肺泡

毛细血管屏障紊乱引起, 并伴有多种临床疾病, 其发病率和死亡率都很高, 临床上没有有效的药物^[24]。因此, 找到预防急性肺损伤的有效药物是一项长远且重要的目标。本研究发现, LPS刺激后小鼠肺组织的炎症反应剧烈, 并进一步通过HE染色和肺组织干湿比评估了不同处理组小鼠的肺损伤程度, 结果显示, KO-LPS组比WT-LPS组的肺损伤程度更弱, 说明敲除CTRP6基因可以降低由炎症反应引起的肺损伤。也许CTRP6可以成为一个药物靶点, 通过药物降低其在体内的表达水平, 实现人类肺部炎症性疾病的预防或治疗。

LPS介导的信号通路在诱导炎症反应、激活宿主的免疫应答过程中具有重要作用。其中NF-κB是最重要的转导通路之一, NF-κB由p50、p52、REL、REL-A和REL-B组成, 这些蛋白质二聚化后形成有功能的NF-κB。IκB(inhibitor of NF-κB)降解是NF-κB通路激活的前提, 在正常情况下, NF-κB由于受到IκB的抑制作用而处于非活化状态, 当IκB被活化的IKKα和IKKβ复合物作用, 其会发生磷酸化修饰, 从而脱颗粒不再抑制NF-κB。此时的NF-κB与IκB分离, 导致NF-κB活化并且转移至细胞核内, 诱导TNF-α、IL-1β等炎症因子的活化表达^[25-27]。在急性炎症反应过程中, 炎症细胞大量聚集, 释放多种炎症因子, TNF-α、IL-6、IL-1β等炎症介质激活对炎症反应具有调节作用的NF-κB信号通路, NF-κB信号通路又可以反馈调节它的下游基因TNF-α、IL-6、IL-1β等, 最终导致级联性炎症反应无限放大^[28-29]。本研究结果表明, 在急性炎症反应中, CTRP6基因缺失, 可引起TNF-α的表达水平下降, 该结果与Wong等^[13]的结

果相一致,同时CTRP6基因缺失也会减弱NF- κ B磷酸化程度,进而NF- κ B信号通路被抑制。因此,这些结果再次证明了CTRP6基因缺失可能对LPS诱导的巨噬细胞的急性炎症反应的缓解作用,同时也暗示CTRP6可能通过调控TNF- α 的表达来调节NF- κ B信号通路。

综上所述,CTRP6基因缺失可缓解LPS诱导的小鼠急性炎症,病理组织切片及Real-time PCR结果表明,敲除CTRP6改善了LPS诱导的小鼠肺脏损伤,并使炎症因子基因水平表达量降低。提示CTRP6基因可能对机体的炎症反应起到重要的调控作用,有望成为一种潜在的用以防止炎症疾病的药物靶点。

参考文献 (References)

- Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Relevance of granulocyte apoptosis to resolution of inflammation at the respiratory mucosa. *Mucosal Immunol* 2008; 1(5): 350-63.
- Zhang Y, Liu X, She ZG, Jiang DS, Wan N, Xia H, *et al.* Interferon regulatory factor 9 is an essential mediator of heart dysfunction and cell death following myocardial ischemia/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2014; 109(5): 434.
- Patel U, Rajasingh S, Samanta S, Cao T, Dawn B, Rajasingh J. Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. *Drug Discov Today* 2017; 22(1): 186-93.
- Kim Y, Lee EJ, Jang HK, Kim CH, Kim DG, Han JH, *et al.* Statin pretreatment inhibits the LPS-induced EMT via the down-regulation of TLR4 and NF- κ B in human biliary epithelial cells. *J Gastroen Hepatol* 2015; 31(6): 1220-8.
- Wang NA, Yue SU, Che XM, Zheng H, Shi ZG. Penehyclidine ameliorates acute lung injury by inhibiting Toll-like receptor 2/4 expression and nuclear factor- κ B activation. *Exp Ther Med* 2016; 11(5): 1827-32.
- Wong GW, Wang J, Hug C, Tsao TS, Lodish HF. A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(28): 10302-7.
- Schäffli A, Buechler C. CTRP family: linking immunity to metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2012; 23(4): 194-204.
- Zheng QJ, Yuan YX, Yi W, Lau BW, Wang YJ, Wang XL, *et al.* C1q/TNF-related proteins, a family of novel adipokines, induce vascular relaxation through the adiponectin receptor-1/AMPK/eNOS/nitric oxide signaling pathway. *Arterioscl Throm Vas* 2011; 31(11): 2616-23.
- Seldin MM, Tan SY, Wong GW. Metabolic function of the CTRP family of hormones. *Rev Endocr Metab Disord* 2014; 15(2): 111-23.
- Wu WJ, Mo L, Zhao CZ, Zhao C, Chen YS, Pang WJ, *et al.* Knockdown of CTRP6 inhibits adipogenesis via lipogenic marker genes and Erk1/2 signalling pathway. *Cell Biol Int* 2015; 39(5): 554-62.
- Kim MJ, Lee W, Park EJ, Park SY. C1q/TNF-related protein-6 increases the expression of interleukin-10 in macrophages. *Mol Cells* 2010; 30(1): 59-64.
- Murayama MA, Kakuta S, Inoue A, Umeda N, Yonezawa T, Maruhashi T. CTRP6 is an endogenous complement regulator that can effectively treat induced arthritis. *Nat Commun* 2015; 6: 8483.
- Lei X, Seldin MM, Little HC, Choy N, Klonisch T, Wong GW. C1q/TNF-related protein 6(CTRP6) links obesity to adipose tissue inflammation and insulin resistance. *J Biol Chem* 2017; 292(36): 14836-50.
- 孔唯力, 黄鑫, 徐珂, 吉苗, 李媛, 陆海伦, 等. CTRP6基因缺失对小鼠白色脂肪组织“棕色化”的影响. *中国细胞生物学学报* (Kong Weili, Hang Xin, Xu Ke, Ji Miao, Li Yuan, Lu Hailun, *et al.* Allele Deficiency of CTRP6 Affects the Browning of White Adipose Tissue in Mice. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2018; 40(12): 52-61.
- Chan KL, Pillon NJ, Sivaloganathan DM, Costford SR, Liu Z, Theret M, *et al.* Palmitoleate reverses high fat-induced proinflammatory macrophage polarization via AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Bio Chem* 2015; 290(27): 16979-88.
- Wang X, Yan J, Xu X, Duan C, Xie Z, Su Z, *et al.* Puerarin prevents LPS-induced acute lung injury via inhibiting inflammatory response. *Microb Pathogenesis* 2018; 118: 170-6.
- Gao HC, Zhu K, Gao HM, Miao CS, Zhang LN, Liu W, *et al.* Role of tissue transglutaminase in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy and the intervention effect of rutin. *Exp Ther Med* 2015; 9(4): 1103-8.
- Jiang X, Chen L, Zhang Z, Sun Y, Wang X, Wei J. Protective and Therapeutic Effects of engeletin on LPS-induced acute lung injury. *Inflammation* 2018; 41(4): 1259-65.
- Wu W, Sun Y, Zhao C, Zhao CZ, Chen X, Wang G, *et al.* Lipogenesis in myoblasts and its regulation of CTRP6 by AdipoR1/Erk/PPAR γ signaling pathway. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 2016; 48(6): 509-19.
- Ng QY, Lee KW, Byrne C, Ho TF, Lim CL. Plasma endotoxin and immune responses during a 21-km road race under a warm and humid environment. *Ann Acad Med Singapore* 2008; 37(4): 307-14.
- Hu W, Zhou P, Rao T, Zhang XB, Wang W, Zhang LJ. Adrenomedullin attenuates interleukin-1 β -induced inflammation and apoptosis in rat Leydig cells via inhibition of NF- κ B signaling pathway. *Exp Cell Res* 2015; 339(2): 220-30.
- Liu W, Chen JL, Liu H, Yan H. Effects of meglumine cyclic adenylylate pretreatment on systemic inflammatory response syndrome induced by lipopolysaccharide in rats. *Journal of Huazhong University of Science and Technology* 2017; 37(3): 332-6.
- 李艳丽, 胡彦武. 紫花地丁抗炎作用及机制研究. *中国实验方剂学杂志* (Li YL, Hu YW. Anti-inflammatory effects and mechanism of *Viola diversa*. *Chinese Journal of Experimental Traditional Chinese Medicine*) 2012; 18(24): 244-7.
- Rubinfeld GD. Epidemiology of acute lung injury. *Crit Care Med* 2003; 31(31): 76-84.
- Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 2002; 109(4): 81-96.
- Shishodia S, Koul D, Aggarwal BB. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates TNF-induced NF- κ B activation through inhibition of activation of I kappa B alpha kinase

- and Akt in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of COX-2 synthesis. *J Immunol* 2004; 173(3): 2011.
- 27 Bakker RA, Schoonus SB, Smit MJ, Timmerman H, Leurs R. Histamine H(1)-receptor activation of nuclear factor-kappa B: roles for G beta gamma- and G alpha(q/11)-subunits in constitutive and agonist-mediated signaling. *Mol Pharmacol* 2001; 60(5): 1133-42.
- 28 Maybauer DM, Maybauer MO, Szabó C, Westphal M, Traber LD, Salzman AL, *et al.* The peroxynitrite catalyst WW-85 improves microcirculation in ovine smoke inhalation injury and septic shock. *Burns* 2011; 37(5): 842-50.
- 29 Wu QC, Li RS, Soromou LW, Chen N, Yuan X, Sun GQ, *et al.* p-Syneprine suppresses lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibition of the NF- κ B signaling pathway. *Inflamm Res* 2014; 63(6): 429-39.

勘误声明

2019年第41卷第10期1962、1963页, 文章题目为《过表达FGD6对肝细胞分化的调控作用》, 作者为余诗诗、沙鸥、李宛玲、胡倩、何通川和张秉强的稿件图2和图3交换位置(图注位置不换)。