

# FLT3 信号通路介导常规树突状细胞启动和调节急性肺损伤早期炎症反应的机制研究

董亮 贺宏丽 刘军 刘玲 杨毅 邱海波

214023 江苏省无锡, 南京医科大学附属无锡人民医院重症医学科 (董亮); 210009

南京, 东南大学附属中大医院重症医学科 (贺宏丽、刘军、刘玲、杨毅、邱海波)

通信作者: 邱海波, Email: haiboq2000@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2016.11.012

**【摘要】目的** 明确 FLT3 信号通路依赖的肺常规树突状细胞 (cDCs) 对急性肺损伤 (ALI) 早期炎症反应和肺损伤的影响及其调控机制。**方法** SPF 级 C57BL/6 小鼠 30 只按随机数字表法分为正常对照组、ALI 组、FLT3L 预处理组、来他替尼预处理组和 DMSO 对照组, 分别给予 FLT3L、来他替尼预处理 5 d 后采用 LPS 气道内滴入复制 ALI 模型, 6 h 及 24 h 后处死小鼠留取肺组织, 采用流式细胞术检测 CD11c + CD11b + 双阳性细胞比例评价肺 cDCs 的数量, 检测肺 cDCs 的 MHC II 及 CD80 表达比例评价肺 cDCs 的成熟程度; ELISA 检测 IL-6、TNF- $\alpha$  评价肺部炎症反应的强度; 计算肺湿质量/体质量比 (LWW/BW) 评价肺水肿程度; 肺组织 HE 染色行组织病理学检查评价肺损伤程度; 比色法检测肺 MPO 活性评价中性粒细胞的浸润; qRT-PCR 检测转录因子 T-bet 及 GATA-3 mRNA 的表达比例评价辅助性 T 细胞 Th1/Th2 亚群漂移; ELISA 检测 IFN- $\gamma$  及 IL-4 表达评价 Th1/Th2 细胞因子的平衡。**结果** 肺 cDCs 聚集及成熟程度高峰出现于 ALI 成模后 6 h ( $P < 0.05$ )。FLT3L 预处理显著增加肺 cDCs 的聚集和成熟程度 ( $P < 0.05$ ), 上调肺部炎症反应并加重肺损伤, 同时肺 MPO 活性、T-bet/GATA-3 的表达比例和肺 IFN- $\gamma$  水平均显著上升 ( $P < 0.05$ )。来他替尼预处理显著抑制肺 cDCs 的聚集和分化成熟 ( $P < 0.05$ ), 下调肺部炎症反应并减轻肺损伤, 同时肺 MPO 活性、T-bet/GATA-3 的表达比例和肺 IFN- $\gamma$  水平均显著下降 ( $P < 0.05$ )。**结论** 肺 cDCs 可通过 FLT3 信号通路调节中性粒细胞的浸润和 Th1/Th2 免疫反应的平衡, 进而启动和调节 ALI 早期炎症反应和肺损伤。

**【关键词】** 急性肺损伤; 常规树突状细胞; FLT3 信号通路; 炎症反应; 中性粒细胞浸润; Th 免疫反应; 发病机制

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81400054); 江苏省自然科学基金 (BK 20140122)

## The control effects of FLT3 signaling-dependent pulmonary conventional dendritic cells on the initiation of acute lung inflammation response to lipopolysaccharide induced acute lung injury in mice

Dong Liang, He Hongli, Liu Jun, Liu Ling, Yang Yi, Qiu Haibo

Department of Critical Care Medicine, Affiliated Wuxi People's Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi 214023, China (Dong L); Department of Critical Care Medicine, Nanjing Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing 210009, China (He HL, Liu J, Liu L, Yang Y, Qiu HB)

Corresponding author: Qiu Haibo, Email: haiboq2000@163.com

**【Abstract】Objective** To clarify the role of FLT3 signaling-dependent pulmonary conventional dendritic cells (cDCs) in the pathogenesis of lipopolysaccharide (LPS) -induced acute lung injury (ALI), and as well as the modulation effects of cDCs in vivo on the inflammatory responses to acute lung injury.

**Methods** Thirty C57BL/6 male mice were divided into normal control group, LPS group, FLT3L pretreatment group, lestaurtinib, (a high efficient and specific blocker in FLT3 signal pathway) pretreatment group and vehicle (DMSD) control group. FLT3L and lestaurtinib were administrated subcutaneously for 5

days. Murine model of ALI was subsequently established by intra-tracheal application of LPS and lung specimens were harvested 6 h or 24 h later. The accumulation and maturation of pulmonary cDCs were assessed by flow cytometry. IL-6 and TNF- $\alpha$  were quantified to evaluate lung inflammation. Lung injury was estimated by lung wet weight/body weight ratio (LWW/BW) and histopathological assessment. Lung myeloperoxidase (MPO) activity was measured to evaluate neutrophil infiltration. Transcription factors T-bet/GATA-3 mRNA ratio was determined to estimate balance of Th1/Th2 response. IFN- $\gamma$  and IL-4 were quantified to evaluate Th1-specific and Th2-specific cytokine production respectively. **Results** The accumulation and maturation of pulmonary cDCs peaked at 6h after LPS challenge. FLT3L pretreatment significantly stimulated the accumulation and maturation of pulmonary cDCs ( $P < 0.05$ ), leading to markedly deterioration of LWW/BW and lung histopathological changes. Meanwhile lung MPO activity and T-bet/GATA-3 mRNA ratio were elevated ( $P < 0.05$ ). Furthermore, the production of IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  was markedly increased by FLT3L pretreatment ( $P < 0.05$ ). In contrast, lestaurtinib pretreatment markedly inhibited the accumulation and maturation of pulmonary cDCs ( $P < 0.05$ ), leading to significant improvement of LWW/BW and lung histopathological changes. Meanwhile lung MPO activity and T-bet/GATA-3 mRNA ratio were decreased ( $P < 0.05$ ). Furthermore lestaurtinib efficiently suppressed the production of IL-6, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** This study thus demonstrated that FLT3 signaling-dependent pulmonary cDCs could control the initiation of acute lung inflammation response to LPS-induced ALI through the regulation of neutrophil infiltration and balance of Th1/Th2 response.

**【Key words】** Acute lung injury; Conventional dendritic cells; FLT3 signaling; Inflammation; Neutrophils infiltration; T-helper-cell response; Pathogenesis

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81400054); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20140122)

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 根本病因在于失控的炎症反应, 明确 ALI 早期炎症反应的启动和调控机制, 有助于从源头上阻断或减弱失控的炎症反应, 突破 ALI 的治疗困境<sup>[1-2]</sup>。前期研究表明 ALI 早期即存在肺常规树突细胞 (conventional dendritic cells, cDCs) 的聚集和活化<sup>[3]</sup>, 但其调控 ALI 早期炎症反应的具体机制尚不清楚<sup>[4-6]</sup>。中性粒细胞的呼吸爆发和 Th 免疫反应的失衡可能在 ALI 早期炎症的发生发展中发挥着至关重要的作用<sup>[7]</sup>, 而 cDCs 可影响中性粒细胞的趋化、迁移<sup>[7-8]</sup>, 也可活化并决定辅助性 T 细胞 (Th) 亚群 (Th1/Th2) 的漂移<sup>[4]</sup>。因此笔者假设 ALI 早期存在肺 cDCs 的聚集和活化, 并通过影响中性粒细胞的浸润和 Th1/Th2 亚群的漂移参与启动和调节 ALI 早期炎症反应。本研究在 FLT3 信号通路调控肺 cDCs 的数量和成熟的基础上, 探索肺 cDCs 对 ALI 早期炎症反应的启动和调控机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及主要试剂

SPF 级 4-6 周龄 C57BL/6 雄性小鼠 30 只 (北京军事医学科学院实验动物中心)。脂多糖 (LPS)、

V 型胶原酶及二甲基亚砜 (DMSO) (美国 Sigma-Aldrich 公司)。FLT3-ligand (德国 Miltenyi Biotec 公司), 来他替尼 (美国 LC laboratory)。亚美尼亚仓鼠抗小鼠单克隆抗体包括异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的 CD11c 及同型对照、别藻蓝蛋白 (APC) 标记的 CD80 及同型对照, 大鼠抗小鼠单克隆抗体包括藻红蛋白 (PE) 标记的 MHC class II 及同型对照、多甲藻素-叶绿素-花青甙 5.5 (Percp-Cy5.5) 标记的 CD11b 及同型对照, 大鼠抗小鼠单克隆封闭抗体 CD16/32 (美国 eBioscience 公司)。髓过氧化物酶 (MPO) 活性检测试剂盒 (中国南京建成生物工程研究所)。RNA 抽提试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测试剂盒 (日本 Takara 公司)。IL-6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  及 IL-4 的酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测试剂盒 (中国上海依科赛生物制品有限公司)。

### 1.2 实验动物分组、处理及模型建立

将小鼠随机 (随机数字法) 分为 5 组: 正常对照组 (A 组), ALI 组 (B 组), FLT3L 预处理组 (C 组), 来他替尼 (lestaurtinib, FLT3 信号通路高效特异阻断剂) 预处理组 (D 组) 以及 DMSO 对照组 (E 组)。ALI 组小鼠麻醉后暴露颈前部气管,

以微量进液器直视下向气道内注入浓度 2 mg/mL 的 LPS 2 mg/kg 建立 LPS-ALI 模型<sup>[18]</sup>。正常对照组小鼠则向气道内注入等体积的生理盐水。FLT3L 预处理组小鼠予以皮下注射 FLT3L 10 μg/d, 持续 5 d 后复制 LPS-ALI 模型。来他替尼预处理组小鼠予以皮下注射来他替尼 40 mg/(kg·d), 持续 5 d 后复制 LPS-ALI 模型, 来他替尼以 10% DMSO 作为溶媒。DMSO 对照组予以皮下注射等量的 10% DMSO, 持续 5 d 后复制 LPS-ALI 模型。造模成功后 6 h 及 24 h 以断头法处死小鼠, 取出完整肺组织并称量记录。留取左肺, 采用机械分离联合胶原酶消化法制备肺实质单个核细胞悬液, 台盼蓝染色确认细胞活性大于 95%。右肺组织以液氮快速冷冻后置于 -80 °C 保存备用。

### 1.3 检测指标及方法

#### 1.3.1 流式细胞术检测肺 cDCs 的数量及成熟程度

肺单个核细胞悬液调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$ /mL, 分别加入单克隆抗体 FITC-CD11c, Percp-Cy5.5-CD11b, PE-MHC II 及 APC-CD80, 室温下避光孵育 30 min, PBS 缓冲液洗涤后以 1% 多聚甲醛固定, 4°C 避光保存, 24 h 内上机检测。各样本均设相应的同型对照管。样本以流式细胞仪 FASCanto (美国 BD 公司) 进行检测, 采用 Cellquest 软件 (美国 BD 公司) 获取分析细胞, 以 CD11c + CD11b + 双阳性细胞占肺单个核细胞的百分比反映肺 DCs 的数量<sup>[6,8]</sup>, 以 MHC II + 或 CD80 + 单阳性细胞占肺 CD11c + CD11b + 双阳性细胞的百分比反映肺 DCs 的成熟程度<sup>[6,9]</sup>。

1.3.2 ELISA 法检测肺炎症介质的水平 取右肺中叶制备组织匀浆, 检测各样品孔在 450 nm 处吸光度, 依据标准曲线分别计算肺组织 IL-6、TNF-α、IFN-γ 及 IL-4 的浓度。

1.3.3 肺水肿及肺组织病理学检测 计算肺湿质量/体质量比 (LWW/BW) 反映肺水肿<sup>[9]</sup>。取右肺上叶组织以 10% 中性甲醛固定后切片, 行 HE 染色后, 高倍镜 (400 ×) 下计算肺病理损伤评分 (LIS)<sup>[10]</sup>。

1.3.4 比色法检测肺 MPO 活性 取右肺中叶制备组织匀浆, 检测各样本在 460 nm 处吸光度, 依据下列公式计算 MPO 活性: MPO 活性 (U/g 肺组织) = (样本管 460 nm 吸光度 - 空白对照管 460 nm 吸光度) / 肺组织质量 × 11.3<sup>[11]</sup>。

1.3.5 qRT-PCR 检测转录因子 T-bet 以及 GATA-3

的表达 取右肺下叶肺组织, 提取总 RNA 反转录产生 cDNA, 通过 ABI Prism 7300 型定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司) 进行扩增。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算 T-bet 和 GATA-3 mRNA 的相对表达, 选取 β-actin 作为校正内参基因。PCR 使用的引物序列如下: (1) 小鼠 T-bet: forward, 5'-ACC ACC TGT TGT GGT CCA AG-3' 以及 reverse, 5'-CAC CAA GAC CAC ATC CAC AA-3'; (2) 小鼠 GATA-3: forward, 5'-ACC GGG TTC GGA TGT AAG TC-3' 以及 reverse, 5'-AGG CAT TGC AAA GGT AGT GC-3'; (3) 小鼠 β-actin: forward, 5'-CCT CTA TGC CAA CAC AGT GC-3' 以及 reverse, 5'-GTA CTC CTG CTT GCT GAT CC-3'。定量结果采用 β-actin mRNA 丰度进行校正, 并针对对照组基因表达水平进行标化处理。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计学软件包进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。计量资料采用成组 *t* 检验、方差分析 (ANOVA) 或 Mann-Whitney *U* 检验进行组内、组间数据比较, 计数资料采用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

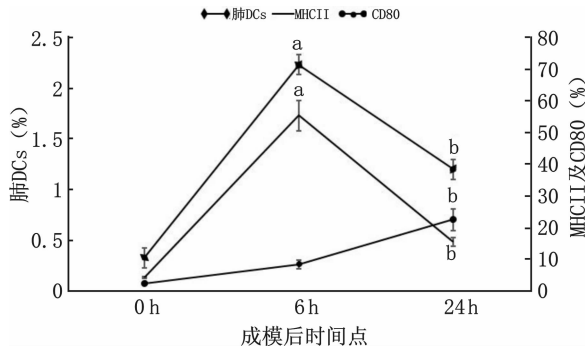
## 2 结果

### 2.1 肺 cDCs 的聚集和成熟状态在 ALI 成模后 6 h 达到高峰

与 0 h 比较, ALI 成模后 6 h 肺 cDCs 占肺单个核细胞的百分比显著增加, 同时肺 cDCs 的 MHC II 分子的表达亦较 0 h 显著增加。然而 ALI 成模后 24 h, 肺 cDCs 占肺单个核细胞的百分比及肺 cDCs MHC II 分子的表达较成模后 6 h 显著降低。ALI 成模后 6 h 组肺 cDCs 的 CD80 分子的表达与 0 h 比较差异无统计学意义, 但 ALI 成模后 24 h 肺 cDCs 的 CD80 分子表达较成模后 6 h 显著增加, 见图 1。

### 2.2 FLT3 信号通路对肺 cDCs 聚集和成熟状态的调控效应

ALI 成模后 6 h, FLT3L 预处理组肺 cDCs 占肺单个核细胞的百分比及肺 cDCs MHC II 分子的表达均较 ALI 组显著升高。与 DMSO 对照组比较, 来他替尼预处理显著降低预处理组肺 DCs 占肺单个核细胞的百分比及肺 cDCs MHC II 分子的表达。然而各实验组肺 cDCs CD80 分子的表达均差异无统计学意义, 见表 1。



与 0 h 比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与 6 h 比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05

图 1 ALI 成模后 0 h、6 h 及 24 h 肺 cDCs 数量、MHC II 及 CD80 表达的动态变化

Fig 1 Dynamic changes of accumulation and expression of MHC II and CD80 of cDCs at 0 h, 6 h, 24 h after ALI

### 2.3 肺 cDCs 对肺 TNF-α 和 IL-6 的表达的影响

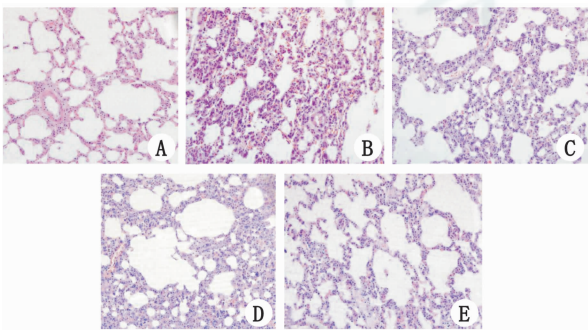
ALI 组成模后 6 h 肺 TNF-α 和 IL-6 的表达较对照组显著增加。FLT3L 预处理导致的肺 cDCs 数量增殖和成熟增加可进一步促进肺 TNF-α 和 IL-6 的表达。与之相反, 来他替尼预处理导致的肺 cDCs 数量减少和成熟抑制可显著下调肺 TNF-α 和 IL-6 的表达, 见表 2。

表 2 各实验组成模后 6 h 肺组织炎症因子浓度及活性比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of concentration and activity of lung inflammatory factors between groups ( $\bar{x} \pm s$ )

实验组	IL-6 (pg/mg)	TNF-α (pg/mg)	MPO (U/g)	IFN-γ (pg/mg)	IL-4 (pg/mg)
A 组	125.20 ± 14.23	360.65 ± 21.59	2.78 ± 0.25	0.65 ± 0.05	412.50 ± 18.25
B 组	270.94 ± 18.28 <sup>a</sup>	482.67 ± 19.39 <sup>a</sup>	5.71 ± 0.41 <sup>a</sup>	50.20 ± 3.55 <sup>a</sup>	390.90 ± 10.88
C 组	334.22 ± 25.67 <sup>b</sup>	590.20 ± 20.86 <sup>b</sup>	8.58 ± 0.87 <sup>b</sup>	65.80 ± 6.23 <sup>b</sup>	420.85 ± 9.56
D 组	223.15 ± 19.11 <sup>c</sup>	439.95 ± 27.71 <sup>c</sup>	4.43 ± 0.29 <sup>c</sup>	38.72 ± 5.85 <sup>c</sup>	385.88 ± 22.39
E 组	296.06 ± 19.44	607.34 ± 41.79	6.36 ± 0.28	60.24 ± 4.98	370.62 ± 21.99

注: A 组为正常对照组; B 组为 ALI 组; C 组为 FLT3L 预处理组; D 组为来他替尼预处理组; E 组为 DMSO 对照组; 与 A 组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与 B 组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05; 与 E 组比较, <sup>c</sup>*P* < 0.05



A: 正常对照组; B: ALI 组; C: FLT3L 预处理组; D: 来他替尼预处理组; E: DMSO 对照组

图 2 各实验组成模后 6 h 肺组织病理损伤比较 (HE × 400)

Fig 2 Pathological changes in the lung tissue of each group (HE × 400)

### 2.4 肺 cDCs 功能状态对肺组织病理损伤和肺水肿的影响

与正常对照组比较, ALI 组小鼠肺组织存在广泛的肺泡及间质的水肿和出血, 弥漫性的炎症细胞浸润, 严重肺泡塌陷和肺泡结构破坏, 其 LIS 和 LWW/BW 亦较对照组显著增高。FLT3L 预处理可进一步加重上述的病理改变, 其 LIS 和 LWW/BW ratio 也进一步的升高。与 DMSO 对照组比较, 来他替尼预处理可显著改善肺组织病理损伤的程度, 其 LIS 和 LWW/BW 也相应的改善, 见图 2、表 3。

表 1 各实验组成模后 6 h 肺 cDCs 聚集及成熟程度比较 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Comparison of accumulation and maturation of cDCs in the lung tissue between groups ( $\bar{x} \pm s$ )

实验组	肺 cDCs 数量 (%)	MHC II 表达 (%)	CD80 表达 (%)
A 组	1.11 ± 0.08	9.85 ± 0.87	1.85 ± 0.45
B 组	2.23 ± 0.16 <sup>a</sup>	55.30 ± 8.42 <sup>a</sup>	2.50 ± 1.02
C 组	4.98 ± 1.96 <sup>b</sup>	71.52 ± 6.75 <sup>b</sup>	2.18 ± 0.85
D 组	1.44 ± 0.11 <sup>c</sup>	37.54 ± 5.86 <sup>c</sup>	1.33 ± 1.10
E 组	2.19 ± 0.27	51.39 ± 6.88	2.25 ± 1.25

注: A 组为正常对照组; B 组为 ALI 组; C 组为 FLT3L 预处理组; D 组为来他替尼预处理组; E 组为 DMSO 对照组; 与 A 组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 与 B 组比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05; 与 E 组比较, <sup>c</sup>*P* < 0.05

### 2.5 肺 cDCs 对肺 MPO 活性的影响

ALI 组肺 MPO 活性较正常对照组显著升高。FLT3L 预处理可进一步增加肺 MPO 活性。与 DMSO 对照组比较, 来他替尼预处理可显著抑制肺 MPO 的活性, 见表 2。

### 2.6 肺 cDCs 对转录因子 T-bet/GATA-3 mRNA 表达比例的影响

通过检测转录因子 T-bet/GATA-3 mRNA 的表达比例以反映肺 DCs 对 Th1/Th2 亚群的漂移影响<sup>[12]</sup>。ALI 组 T-bet mRNA 的表达较对照组显著升高, FLT3L 预处理可进一步增加 T-bet mRNA 的表达。与 DMSO 对照组比较, 来他替尼预处理可显著抑制 T-bet mRNA 的表达。但各实验组 GATA-3 mRNA 表达并差异无统计学意义。ALI 组 T-bet/

GATA-3 mRNA 表达比例较对照组显著上升, 而 FLT3L 预处理可进一步增加 T-bet/GATA-3 mRNA 表达比例; 与之相反来他替尼预处理可显著降低 T-bet/GATA-3 mRNA 表达比例, 见表 4。

表 3 各实验组成模后 6 h LWW/BW 和 LIS 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of LWW/BW and LIS between groups ( $\bar{x} \pm s$ )

实验组	LWW/BW (%)	LIS 评分
A 组	0.65 ± 0.05	3.65 ± 0.81
B 组	0.81 ± 0.07 <sup>a</sup>	10.92 ± 0.70 <sup>a</sup>
C 组	0.95 ± 0.06 <sup>b</sup>	13.55 ± 1.01 <sup>b</sup>
D 组	0.73 ± 0.04 <sup>c</sup>	6.88 ± 0.54 <sup>c</sup>
E 组	0.83 ± 0.05	11.48 ± 0.65

注: A 组为正常对照组; B 组为 ALI 组; C 组为 FLT3L 预处理组; D 组为来他替尼预处理组; E 组为 DMSO 对照组; 与 A 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 B 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 E 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

表 4 各实验组成模后 6 h T-bet 及 GATA-3 mRNA 表达水平及其比值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Comparison of T-bet mRNA, GATA-3 mRNA and T-bet/GATA-3 mRNA ratio between groups ( $\bar{x} \pm s$ )

实验组	T-bet mRNA (与 $\beta$ -actin 比较)	GATA-3 mRNA (与 $\beta$ -actin 比较)	T-bet/GATA-3 mRNA
A 组	1.00 ± 0.15	0.98 ± 0.18	1.10 ± 0.08
B 组	2.85 ± 0.33 <sup>a</sup>	1.34 ± 0.33	2.15 ± 0.15 <sup>a</sup>
C 组	3.98 ± 0.45 <sup>b</sup>	1.05 ± 0.15	5.98 ± 0.94 <sup>b</sup>
D 组	2.55 ± 0.30 <sup>c</sup>	1.10 ± 0.22	1.96 ± 0.10 <sup>c</sup>
E 组	3.40 ± 0.40	1.28 ± 0.25	3.88 ± 0.40

注: A 组为正常对照组; B 组为 ALI 组; C 组为 FLT3L 预处理组; D 组为来他替尼预处理组; E 组为 DMSO 对照组; 与 A 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 B 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 E 组比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

### 2.7 肺 cDCs 对 Th1/Th2 型细胞因子平衡的影响

通过检测细胞因子 IFN- $\gamma$  和 IL-4 的表达以反映肺 cDCs 对 Th1/Th2 型细胞因子平衡的影响。ALI 组 IFN- $\gamma$  的表达较对照组显著升高, FLT3L 预处理可进一步增加 IFN- $\gamma$  的浓度。与 DMSO 对照组比较, 来他替尼预处理可显著抑制 IFN- $\gamma$  的表达。但各实验组 IL-4 的浓度并差异无统计学意义, 见表 2。

### 3 讨论

目前认为 ALI 的本质是机体或肺部失控的炎症反应, 而肺 cDCs 在 ALI 发病机制中的作用也日益受到关注<sup>[1,3]</sup>。研究已经表明 ALI 早期的确存在肺 cDCs 的快速聚集和成熟<sup>[6,13]</sup>。本研究进一步证明肺 cDCs 的聚集和成熟仅在 ALI 成模后 6 h 即可达到高峰, 而在 ALI 成模后 24 h 肺 cDCs 的聚集和成熟程度已出现明显的下降。上述结果提示 cDCs 主

要在 ALI 起病的早期阶段发挥作用<sup>[3]</sup>。与此同时, 肺 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的水平持续升高, 提示显著的肺部炎症反应。因此, 本研究结果提示肺 cDCs 参与启动了 ALI 早期炎症反应。

本研究亦发现, 肺 cDCs 的快速聚集和成熟可显著加剧肺部炎症反应和肺损伤程度, 而抑制肺 cDCs 的聚集和成熟可显著减轻肺部炎症反应和肺损伤程度。上述结果提示肺 cDCs 能够调控 ALI 的早期炎症反应和肺损伤程度。

目前对于肺 cDCs 调控急性肺部炎症和肺损伤的机制尚不清楚。本研究结果表明, 调控 FLT3 信号通路可显著影响肺 cDCs 的聚集和成熟程度, 继而导致辅助性 T 细胞 Th1/Th2 亚群的漂移和后续的抗炎/促炎性细胞因子平衡的改变, 而既往研究已经证明 FLT3 信号通路对 T 细胞的增殖和活化并无影响<sup>[5]</sup>。因此本研究结果提示直接调控肺 Th1/Th2 型免疫应答的平衡及后续的 Th1/Th2 细胞因子的产生是肺 cDCs 调控 ALI 早期肺部炎症和肺损伤的重要机制。

本研究结果亦表明调控 FLT3 信号通路可显著影响肺 cDCs 的聚集和成熟程度, 进而可影响肺 MPO 活性, 提示肺 cDCs 可以在体调节中性粒细胞的浸润从而影响 ALI 早期炎症反应和肺损伤。

ALI 早期存在肺 Th1/Th2 型细胞因子的失衡, 但其浓度水平却令人困惑, 虽然各实验组成模后 24 h IFN- $\gamma$  表达的差异与相应的转录因子 T-bet 的变化一致, 但其浓度水平却徘徊在低值。既往研究表明, 从外界侵袭发生到 DCs 向次级淋巴中的 T 细胞提呈抗原的高峰至少需要 24 h<sup>[14]</sup>, 因此不难理解在 ALI 成模后 24 h 观察到较低的 Th1 型细胞因子浓度。但与 IFN- $\gamma$  不同, 虽然成模后 24 h 各实验组 IL-4 表达并差异无统计学意义, 但其浓度水平却大大高于 IFN- $\gamma$  的水平。既往研究表明, 为了抵御外界无害性抗原可能导致的 Th1 型免疫反应所致的组织损伤, 正常状态下肺内免疫微环境是向 Th2 型免疫反应漂移的<sup>[3]</sup>, 因此 ALI 早期肺组织较高的 IL-4 水平反映的是肺部固有的防御机制<sup>[15]</sup>。

本研究表明, 肺 cDCs 可通过 FLT3 信号通路影响肺部中性粒细胞的浸润和 Th1/Th2 型免疫反应平衡, 进而启动和调节 ALI 早期炎症反应和肺损伤。通过调控 ALI 早期肺 cDCs 的数量和成熟程度进而影响肺部炎症反应可能为 ALI 防控提供新的思路。

## 参 考 文 献

- [1] 董亮, 邱海波. 急性肺损伤的治疗进展 [J]. 中华急诊医学杂志, 2012, 21 (3): 235-238. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2012.03.002.  
Dong L, Qiu HB. Treatment progress of acute lung injury [J]. Chin J Emerg Med, 2012, 21 (3): 235-238.
- [2] Villar J, Sulemanji D, Kacmarek RM, et al. The acute respiratory distress syndrome: incidence and mortality, has it changed [J]. Curr Opin Crit Care, 2014, 20 (1): 3-9. DOI: 10.1097/MCC.000000000000057.
- [3] 董亮, 贺宏丽, 刘军, 等. 急性肺损伤早期肺常规树突状细胞的动态变化 [J]. 中华急诊医学杂志, 2012, 21 (6): 607-611. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2012.06.012.  
Dong L, He HL, Liu J, et al. The accumulation and maturation status of pulmonary conventional dendritic cells in the early phase of acute lung injury [J]. Chin J Emerg Med, 2012, 21 (6): 607-611.
- [4] Lee IT, Yang CM. Inflammatory signalings involved in airway and pulmonary diseases [J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013: 791231. DOI: 10.1155/2013/791231.
- [5] Ward PA, Fattahi F, Bosmann M, et al. New insights into molecular mechanisms of immune complex-induced injury in lung [J]. Front Immunol, 2016, 7: 86. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00086.
- [6] Venet F, Huang X, Chung CS, et al. Plasmacytoid dendritic cells control lung inflammation and monocyte recruitment in indirect acute lung injury in mice [J]. Am J Pathol, 2010, 176 (2): 764-773. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090765.
- [7] Riise RE, Bernson E, Aurelius J, et al. TLR-Stimulated neutrophils instruct NK cells to trigger dendritic cell maturation and promote adaptive T cell responses [J]. J Immunol, 2015, 195 (3): 1121-1128. DOI: 10.4049/jimmunol.1500709.
- [8] Wen H, Hogaboam CM, Gauldie J, et al. Severe sepsis exacerbates cell-mediated immunity in the lung due to an altered dendritic cell cytokine profile [J]. Am J Pathol, 2006, 168 (6): 1940-1950. DOI: 10.2353/ajpath.2006.051155.
- [9] Masten BJ, Lipscomb MF. Comparison of lung dendritic cells and B cells in stimulating naive antigen-specific T cells [J]. J Immunol, 1999, 162 (3): 1310-1317.
- [10] Smith KM, Mrozek JD, Simonton SC, et al. Prolonged partial liquid ventilation using conventional and high-frequency ventilatory techniques: gas exchange and lung pathology in an animal model of respiratory distress syndrome [J]. Crit Care Med, 1997, 25 (11): 1888-1897. DOI: 10.1097/00003246-199711000-00030.
- [11] Mullane KM, Westlin W, Kraemer R. Activated neutrophils release mediators that may contribute to myocardial injury and dysfunction associated with ischemia and reperfusion [J]. Ann N Y Acad Sci, 1988, 524: 103-121. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb38534.x.
- [12] Tanriver Y, Diefenbach A. Transcription factors controlling development and function of innate lymphoid cells [J]. Int Immunol, 2014, 26 (3): 119-128. DOI: 10.1093/intimm/dxt063.
- [13] Dong L, He HL, Lu XM, et al. Modulation of FLT3 signaling targets conventional dendritic cells to attenuate acute lung injury [J]. APMIS, 2012, 120 (10): 808-818. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2012.02906.x.
- [14] Hua J, Stevenson W, Dohlman TH, et al. Graft site microenvironment determines dendritic cell trafficking through the CCR7-CCL19/21 axis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016, 57 (3): 1457-1467. DOI: 10.1167/iovs.15-17551.
- [15] Na H, Cho M, Chung Y. Regulation of Th2 cell immunity by dendritic cells [J]. Immune Netw, 2016, 16 (1): 1-12. DOI: 10.4110/in.2016.16.1.1.

(收稿日期: 2016-04-20)

(本文编辑: 邵菊芳)

## · 资 讯 ·

## “救在身边 健康出行”主题活动暨灾害救援联盟启动仪式在京举行

2016 年 10 月 16 日上午, 由中国医学救援协会灾害救援分会、滴滴出行平台、优护送健康出行平台联合发起的“救在身边 健康出行”主题活动暨灾害救援联盟启动仪式在北京隆重举行。此次主题活动得到了国家卫计委、中华全国总工会、中华慈善总工会等相关部门的高度重视, 有来自全国 40 多家医院的专家以及志愿者共 100 余人参会。会议由中日友好医院急诊科主任张国强教授主持, 北京友谊医院副院长谢苗荣教授宣读《灾害救援联盟倡议书和专家共识》, 倡导科学救援、规范救灾, 加强灾害救援的培训、普及和提高, 推进中国灾害救援事业的普及化、规范化、科学化, 借助互联网思维, 践行“大救援”理念。

青海省人民医院党委副书记公保才旦教授介绍了主题活动的详细内容, 呼吁滴滴出行平台下的司机、从事应急救援工作的人员及公众应进行“自救互救”知识与技能培训; 呼吁相关部门建立、健全灾害救援的相关法律法规, 为“依法救援、科学救援”奠定法律基础, 建立立体化、网络化的综合防灾减灾、应急管理联动体系。中国医学救援协会灾害救援分会会长、北京朝阳医院西院急诊科主任曾红教授发表“灾害救援与护送医学”的主题演讲, 指出重视急救时效性, 把握白金十分钟, 掌握正确的抢救方法, 可能挽救他人生命, 创造生命奇迹。“灾害救援联盟”成立后将积极利用“优护送”健康出行平台和“滴滴出行平台”, 利用互联网+技术, 智能预警、灾害定位, 以最快的速度, 尽最大的可能, 最大效率地利用现有资源, 将灾害的损失减少到最低。本次活动适逢国际减灾日, 对习近平总书记主持召开中央全面深化改革领导小组第二十八次会议通过的《关于推进防灾减灾救灾体制机制改革的意见》的贯彻执行起到良好的推动作用。本次活动旨在向全社会推行以人为本、“寓救于防、科学救援”的理念, 为所有热心灾害救援公益事业的人士方便有效地参与灾害救援事业提供良好平台。