

文章编号 1006-8147(2021)05-0487-05

论 著

IL-18 抑制剂对脓毒症并发血小板减少小鼠的保护作用

李家富¹, 许华², 王勇强²

(1.天津医科大学一中心临床学院,天津 300192;2.天津市第一中心医院重症医学科,天津市急救医学研究所,天津 300192)

摘要 目的:探究白细胞介素(IL)-18抑制剂(IL-18Bp)对脓毒症并发血小板减少小鼠的保护作用。方法:将30只C57BL/6雄性小鼠依次编号,按照随机数字表法分为3组:对照组、脂多糖(LPS)注射模型组(LPS组)、LPS加IL-18Bp干预组(LPS/IL-18Bp组)。其中LPS组和LPS/IL-18Bp组给予单次腹腔注射30 mg/kg LPS制备脓毒症并发血小板减少模型,对照组给予等体积生理盐水;LPS/IL-18Bp组在注射LPS后给予单次腹腔注射50 μ g/kg IL-18Bp,其余各组给予等体积生理盐水。观察各组72 h生存率,并于LPS注射后24 h时收集血液样本和脾脏组织,全血细胞分析仪检测血小板计数,ELISA法检测各组富血小板血浆中血小板活化标志物sCD40L以及IL-18和IL-6、IL-10、肿瘤坏死因子(TNF)- α 的表达情况;HE染色观察并分析各组脾脏的病理变化。结果:LPS/IL-18Bp组各时间点的生存率均高于LPS组($\chi^2=0.63, P<0.05$);LPS注射后24 h时LPS/IL-18Bp组血小板计数显著高于LPS组($t=8.37, P=0.001$);LPS/IL-18Bp组sCD40L表达量较LPS组低($t=4.34, P=0.012$);LPS/IL-18Bp组小鼠富血小板血浆中IL-18、IL-6、IL-10和TNF- α 的表达均较LPS组显著降低($t=8.18, 10.95, 5.34, 10.68$, 均 $P<0.05$);脾脏病理分析显示,LPS/IL-18Bp组脾脏炎症细胞较LPS组明显减少。结论:IL-18Bp能够缓解LPS诱导小鼠血小板减少、血小板活化和炎症反应,并提高LPS诱导血小板减少小鼠模型的生存率,对LPS诱导血小板减少模型小鼠具有一定的保护作用。

关键词 IL-18Bp;脂多糖;血小板减少;小鼠

中图分类号 R515.3

文献标志码 A

Protective effects of IL-18 inhibitors on sepsis associated thrombocytopenia in mice

LI Jia-fu¹, XU Hua², WANG Yong-qiang²

(1. The First Central Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China; 2. Department of Intensive Care Unit, Emergency Medicine Research Institute, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China)

Abstract Objective: To investigate the protective effect of interleukin (IL)-18 inhibitor (IL-18Bp) on mice with sepsis complicated with thrombocytopenia (TCP). **Methods:** Thirty C57BL/6 male mice were numbered sequentially, according to the random number table method, they were divided into three groups: control group, lipopolysaccharide (LPS) injection model group (LPS group), and IL-18Bp intervention group (LPS/IL-18Bp group). The model of sepsis mice with thrombocytopenia was prepared by single intraperitoneal injection of 30 mg/kg LPS in the LPS group and the LPS/IL-18Bp group, and the control group was given constant volume of normal saline. Mice in the LPS/IL-18Bp group were given a single intraperitoneal injection of 50 μ g/kg IL-18Bp after LPS injection, and the other groups were given the same volume of normal saline. The survival rate of mice in each group after 72 hours were observed. Blood samples and spleen tissues were collected 24 hours after LPS injection. The platelet count was measured by a whole blood cell analyzer. The expression of platelet activation marker sCD40L, IL-18 and inflammatory factors such as IL-6, IL-10 and tumor necrosis factor (TNF)- α in platelet-rich plasma was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pathological changes of spleen in each group were observed and analyzed by hematoxylin-eosin staining (HE). **Results:** The survival rate of mice in the IL-18Bp intervention group was higher than that in the LPS group at all time points ($\chi^2=0.63, P<0.05$). At 24 hours after LPS injection, the platelet count of IL-18Bp intervention group was significantly higher than that of LPS group ($t=8.37, P=0.001$). The expression of sCD40L in IL-18Bp intervention group was lower than that in LPS group ($t=4.34, P=0.012$). The expressions of IL-18, IL-6, IL-10 and TNF- α in platelet-rich plasma of mice in IL-18Bp intervention group were significantly lower than those in LPS group ($t=8.18, 10.95, 5.34, 10.68$, all $P<0.05$). The pathological analysis of spleen showed that the inflammatory cells in the spleen of mice of the IL-18Bp intervention group were significantly reduced compared with the LPS group. **Conclusion:** IL-18Bp can alleviate thrombocytopenia, platelet activation and inflammation in TCP mice induced by LPS, and improve the survival rate of TCP mice induced by LPS, and has a certain protective effect on the model of TCP mice induced by LPS.

Key words IL-18Bp; lipopolysaccharide; thrombocytopenia; mice

基金项目 天津市卫生和计划生育委员会攻关课题(14KG101);天津市第一中心医院科技基金(院CM201809)

作者简介 李家富(1993—),男,硕士在读,研究方向:脓毒症;通信作者:王勇强, E-mail: yongqiangwang1962@sina.com。

血小板减少是重症监护病房(intensive care unit, ICU)危重症患者常见的并发症^[1-2],与脓毒症患者的预后密切相关^[3-4]。脓毒症并发血小板减少患者的死亡率高于非血小板减少患者,且血小板减少持续2周以上者的死亡率高达66%^[5]。然而目前脓毒症相关性血小板减少的分子机制尚不明确。研究显示,白细胞介素(IL)-18与脓毒症患者的死亡率呈正相关^[6-7]。本课题组前期研究结果显示,IL-18与脓毒症并发血小板减少具有相关性,脓症患者IL-18表达水平与血小板减少程度呈负相关^[8]。在此基础上,本研究采用脂多糖(LPS)单次腹腔注射法诱导脓毒症并发血小板减少小鼠模型并添加IL-18抑制剂(IL-18Bp),观察抑制IL-18对LPS诱导血小板减少小鼠模型的保护作用。IL-6、IL-10、IL-18、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)是与机体发展为脓毒症密切相关的炎症标志物^[9-10],监测炎症细胞因子水平可评估IL-18Bp对脓毒症并发血小板减少小鼠的保护作用。本文旨在探讨IL-18与脓毒症并发血小板减少的关系,为脓毒症并发血小板减少的分子机制研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康清洁级 C57BL/6 雄性小鼠 30 只,8 周龄,体重 18~21g,购自中国医学科学院实验动物研究所,合格证号:SYXK(津)2019-0002,饲养于室温 25℃,湿度 45%~55%,每日光照 8 h,自由饮水、进食 1 周。

1.2 主要试剂 LPS(北京索莱宝科技有限公司),IL-18Bp(北京义翘神州科技股份有限公司),sCD40L 检测试剂盒(上海鑫乐生物科技有限公司),IL-18、IL-6、IL-10 和 TNF- α ELISA 检测试剂盒(深圳欣博盛生物科技有限公司)。

1.3 实验分组、模型制备与给药 将 30 只小鼠依次编号,按照随机数字表法分为 3 组:对照组、LPS 模型组(LPS 组)、LPS 加 IL-18Bp 干预组(LPS/IL-18Bp 组),每组 10 只。其中 LPS 组和 LPS/IL-18Bp 组给予单次腹腔注射 30 mg/kg LPS 制备脓毒症并发血小板减少模型^[11]。对照组给予等体积生理盐水, LPS/IL-18Bp 组在 LPS 注射后给予单次腹腔注射 50 μ g/kg IL-18Bp^[12]。

1.4 观察各组 72 h 生存率 在 LPS 注射后观察各组 72 h 生存/死亡情况。

1.5 采集血样检测各组血小板数量 在 LPS 注射后 24 h,每组各取 5 只小鼠,摘眼球取血,其中取 30 μ L 用 EDTA 抗凝后全血细胞分析仪检测血小板数量,其余血样制备富血小板血浆。

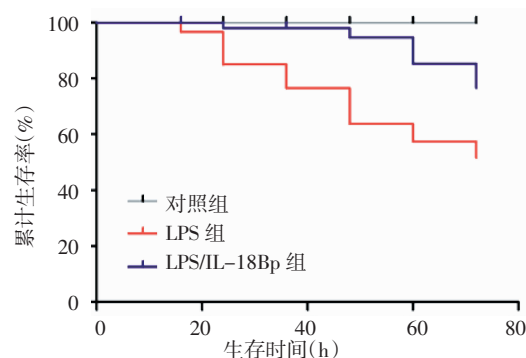
1.6 ELISA 检测各组富血小板血浆中 sCD40L、IL-18、IL-6、IL-10 和 TNF- α 水平 取各组富血小板血浆,按 ELISA 试剂盒操作步骤对每组血浆中 sCD40L、IL-18、IL-6、IL-10 和 TNF- α 的表达水平进行检测。

1.7 HE 染色观察并分析各组脾脏的病理变化 收集各组造模 24 h 脾脏,经 4%多聚甲醛固定后,常规石蜡包埋,5 μ m 厚度切片,二甲苯及梯度酒精脱蜡水化后,苏木素染色 5 min,伊红复染后封片,显微镜下 200 倍放大采集图像,观察脾脏组织的病理变化。

1.8 统计学处理 使用 SPSS20.0 软件进行数据统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析;采用 GraphPad Prism 5.0 软件绘制小鼠生存曲线,采用 Long-rank 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IL-18 抑制剂对 LPS 诱导血小板减少小鼠生存率的影响 对照组 72 h 存活率为 100%,LPS 组 24 h、48 h 和 72 h 存活率分别为 85%、64%、52%, LPS/IL-18Bp 组分别为 98%、95%、77%, LPS/IL-18Bp 组各时间点的生存率均显著高于 LPS 组($\chi^2=0.63$, $P < 0.05$),见图 1。



注:LPS 组:脂多糖注射模型组;LPS/IL-18Bp 组:LPS 加 IL-18Bp 干预组;IL:白细胞介素;IL-18Bp:白细胞介素-18 抑制剂;LPS:脂多糖;TCP:血小板减少

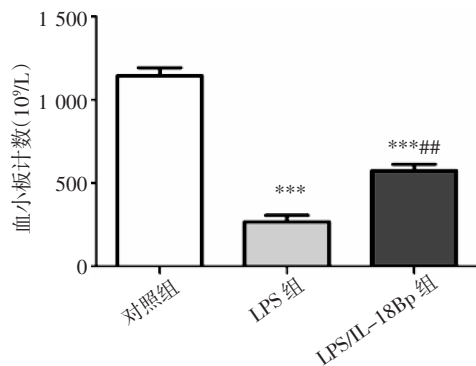
图1 IL-18Bp 对 LPS 诱导 TCP 小鼠生存率的影响

Fig 1 The effect of IL-18Bp on the survival rate of LPS-induced TCP mice

2.2 IL-18Bp 对 LPS 诱导血小板减少小鼠外周血小板数量的影响 在 LPS 注射 24 h 时,LPS 组血小板数量显著下降,而 LPS/IL-18Bp 组血小板数量较 LPS 组高($574.23 \times 10^9/L$ vs. $267.10 \times 10^9/L$),且差异具有统计学意义($t=8.37$, $P=0.001$),见图 2。

2.3 IL-18 抑制剂对 LPS 诱导血小板减少小鼠外

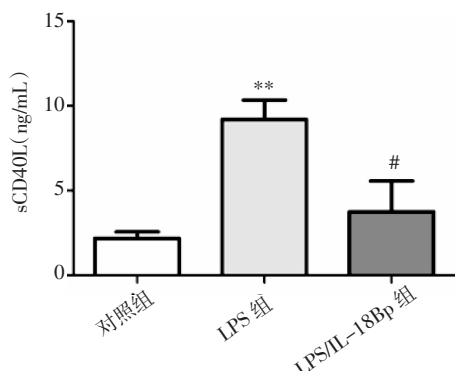
周血血小板活化的影响 在LPS注射24 h时,LPS组血小板活化标志物sCD40L的表达较对照组显著升高,而LPS/IL-18Bp组血小板活化标志物sCD40L较LPS组下降(3.74 ng/mL vs.9.18 ng/mL),且差异具有统计学意义($t=8.33, P=0.001; t=4.34, P=0.012$),见图3。



注:LPS组:脂多糖注射模型组;LPS/IL-18Bp组:LPS加IL-18Bp干预组;与对照组相比,*** $P<0.001$;与LPS组相比,# $P<0.01$;IL-18Bp:白细胞介素-18抑制剂;LPS:脂多糖;TCP:血小板减少

图2 IL-18Bp对LPS诱导TCP小鼠血小板数量的影响

Fig 2 The effect of IL-18Bp on the platelet counts of TCP mice induced by LPS

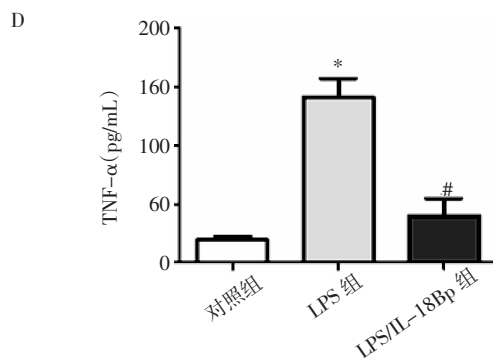
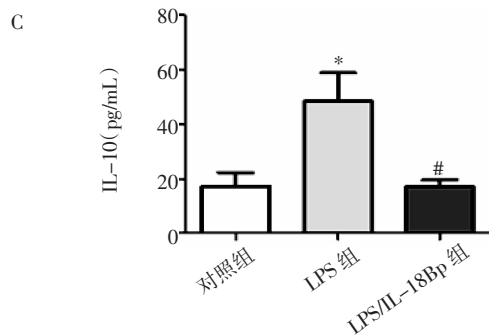
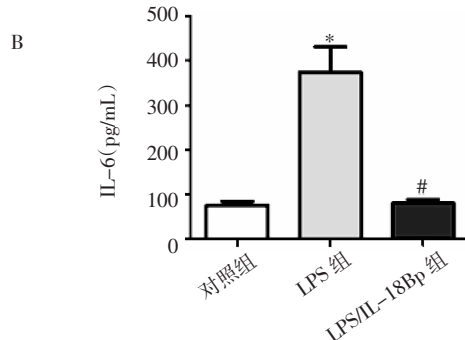
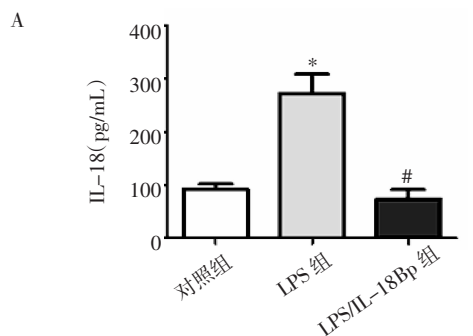


注:LPS组:脂多糖注射模型组;LPS/IL-18Bp组:LPS加IL-18Bp干预组;与对照组相比,** $P<0.01$;与LPS组相比,# $P<0.05$;IL-18Bp:白细胞介素-18抑制剂;LPS:脂多糖;TCP:血小板减少

图3 IL-18Bp对LPS诱导TCP小鼠血小板活化标志物sCD40L表达的影响

Fig 3 The effect of IL-18Bp on the expression of the platelet activation marker sCD40L of TCP mice induced by LPS

2.4 IL-18抑制剂对LPS诱导血小板减少小鼠IL-18、IL-6、IL-10和TNF- α 表达的影响 与对照组相比,LPS组炎症因子IL-18、IL-6、IL-10、TNF- α 表达量均升高,但抑制IL-18后,LPS对IL-18、IL-6、IL-10、TNF- α 表达量的促进作用均明显下降,且组间差异具有统计学意义(与对照组相比, $t=7.68、10.92、5.14、16.93, P=0.002、0.001、0.007、0.000$;与LPS组相比, $t=8.18、10.95、5.34、10.68, P=0.001、0.001、0.006、0.001$),见图4。

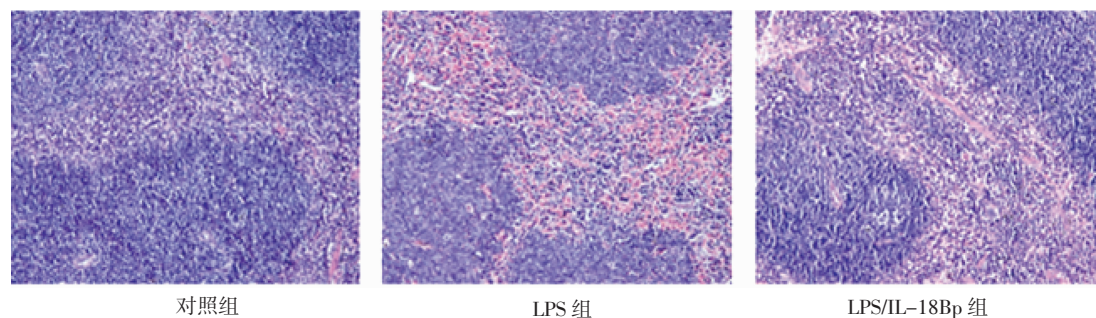


注:LPS组:脂多糖注射模型组;LPS/IL-18Bp组:LPS加IL-18Bp干预组;与对照组相比,* $P<0.05$;与LPS组相比,# $P<0.05$;LPS:脂多糖;TCP:血小板减少;IL:白细胞介素;IL-18Bp:白细胞介素-18抑制剂;TNF- α :肿瘤坏死因子- α

图4 IL-18Bp对LPS诱导TCP小鼠IL-18、TNF- α 等炎症因子表达的影响

Fig 4 The effect of IL-18Bp on the expression of IL-18, TNF- α and other inflammatory cytokines in the TCP mice induced by LPS

2.5 IL-18抑制剂对LPS诱导血小板减少小鼠脾脏组织的影响 LPS组脾脏组织有炎症细胞因子浸润,对照组、LPS/IL-18Bp组未见明显异常,见图5。



注:LPS 组:脂多糖模型组;LPS/IL-18Bp 组:LPS 加 IL-18Bp 干预组;IL-18Bp:白细胞介素-18 抑制剂;LPS:脂多糖;TCP:血小板减少

图 5 IL-18Bp 对 LPS 诱导 TCP 小鼠脾脏组织的影响(200×)

Fig 5 The effect of IL-18Bp on the spleen tissue of TCP mice induced by LPS(200×)

3 讨论

脓毒症是指宿主对感染产生的免疫失控反应,进而发生器官功能障碍,是目前急危重症患者死亡的主要原因,亦是全球医疗健康体系最主要的问题之一^[13-15]。据统计,约 66.7%的脓毒性休克患者会合并不同程度的血小板减少,并且约有 5%~20%的患者进展为严重血小板减少^[16-17]。ICU 患者血小板减少 30%是死亡的独立危险因素,不依赖于疾病的严重程度或器官衰竭的数目,同危重病评分具有同等预测死亡率的价值^[1]。然而目前关于血小板计数在脓毒症患者中减少的机制尚不清楚。

IL-18 是一种参与机体感染和炎症起始免疫反应的重要促炎细胞因子^[18]。多项研究显示,IL-18 与脓毒症具有相关性,并且前期临床研究显示,外周血 IL-18 的表达量与脓毒症患者血小板减少程度呈负相关^[8,19-20]。本研究制备了 LPS 诱导小鼠血小板减少模型,并通过添加 IL-18Bp 干预,探讨 IL-18 与脓毒症并发血小板减少的关系。

本研究表明,小鼠单次腹腔注射 LPS 后血小板计数开始下降,且 LPS 组 72 h 生存率仅为 52%,提示血小板减少模型构建成功。本实验还观察到 IL-18Bp 的干预能够显著增加 LPS 诱导小鼠血小板减少模型的 72 h 生存率,说明抑制 IL-18 对 LPS 诱导小鼠血小板减少模型具有一定的保护作用。为进一步探究 IL-18Bp 对 LPS 诱导小鼠血小板减少模型的具体保护作用,笔者对其血小板计数、血小板活化以及 IL-18 等炎症因子和免疫器官脾脏的组织病理进行了检测分析。

由于在前期研究中,笔者对 30 mg/kg LPS 单次腹腔注射诱导血小板减少小鼠模型血小板减少的发生率为 96.7%,并对血小板计数进行了监测,发现在 LPS 注射后 2 h 左右可发生血小板减少,24 h 时血小板计数达到最低值,之后血小板计数会逐渐回

升,故此次采用 IL-18 抑制剂干预 LPS 诱导血小板减少小鼠时,着重观察了 LPS 注射后 24 h 时血小板计数等各项观察指标的变化。结果显示,IL-18Bp 不仅能够缓解 LPS 诱导的小鼠血小板计数的减少,而且能够减少 LPS 刺激引发的血小板活化标记物 sCD40L 的表达,提示 IL-18Bp 能够在一定程度上减少 LPS 诱导的血小板活化。除此之外,笔者还观察到在给予小鼠 IL-18Bp 干预后,LPS 诱导血小板减少小鼠体内 IL-18 表达量减少,同时 IL-6、IL-10 和 TNF- α 的表达量也较未使用 IL-18Bp 干预的 LPS 诱导血小板减少小鼠减少,同时脾脏病理分析结果显示 LPS 刺激后的脾脏有明显的炎症因子浸润,而 IL-18Bp 干预的小鼠脾脏未见明显异常,这些观察结果均提示 IL-18Bp 干预能够在一定程度上抑制 LPS 刺激引发的小鼠的炎症反应。

综上所述,IL-18Bp 对 LPS 诱导血小板减少小鼠具有一定的保护作用,能够在一定程度上缓解 LPS 诱导血小板减少小鼠的血小板计数减少、血小板活化和炎症反应,但其具体的分子作用机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] BURUNSUZOĞLU B, SALTÜRK C, KARAKURT Z, et al. Thrombocytopenia: a risk factor of mortality for patients with sepsis in the intensive care unit[J]. Turk Thorac J, 2016, 17(1):7
- [2] CLAUSHUIS T A, VAN VUGHT L A, SCICLUNA B P, et al. Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response in critically ill sepsis patients[J]. Blood, 2016, 127(24):3062
- [3] VENKATA C, KASHYAP R, FARMER J C, et al. Thrombocytopenia in adult patients with sepsis: incidence, risk factors, and its association with clinical outcome[J]. J Intensive Care, 2013, 1(1):9
- [4] LI M F, LI X L, FAN K L, et al. Platelet desialylation is a novel mechanism and a therapeutic target in thrombocytopenia during sepsis: an open-label, multicenter, randomized controlled trial [J]. J Hematol Oncol, 2017, 10(1):104
- [5] GREINACHER A, SELLENG S. How I evaluate and treat thrombocy-

- topenia in the intensive care unit patient[J]. *Blood*, 2016, 128(26): 3032
- [6] EIDT M V, NUNES F B, PEDRAZZA L, et al. Biochemical and inflammatory aspects in patients with severe sepsis and septic shock: the predictive role of IL-18 in mortality[J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 453: 100
- [7] ZHU M, RONG X, LI M, et al. IL-18 and IL-35 in the serum of patients with sepsis thrombocytopenia and the clinical significance[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(2): 1251
- [8] CUI Y L, WANG B, GAO H M, et al. Interleukin-18 and miR-130a in severe sepsis patients with thrombocytopenia[J]. *Patient Prefer Adherence*, 2016, (10): 313
- [9] 王婷, 韦小碗, 杨亮, 等. 脓毒症患者血清 PCT、CRP、IL-6 和 IL-10 水平检测及临床意义[J]. *陕西医学杂志*, 2020, 49(11): 1510
- [10] 黄雨晴, 廖品琥. IL-18 与脓毒症关系的研究进展[J]. *中国临床新医学*, 2018, 11(5): 503
- [11] 吉祥. LPS 诱导小鼠血小板减少症机制的研究[D]. 天津医科大学, 2013
- [12] GÖNÜL Y, GENÇ A, AHSEN A, et al. The effects of IL-18BP on mRNA expression of inflammatory cytokines and apoptotic genes in renal injury induced by infrarenal aortic occlusion[J]. *J Surg Res*, 2016, 202(1): 33
- [13] DEWITTE A, LEPREUX S, VILLENEUVE J, et al. Blood platelets and sepsis pathophysiology: a new therapeutic prospect in critically ill patients? [J]. *Ann Intensive Care*, 2018, 8(1): 32
- [14] FLEISCHMANN C, SCHERAG A, ADHIKARI N K, et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital treated sepsis. Current estimates and limitations[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016, 193(3): 259
- [15] LARKIN C M, SANTOS-MARTINEZ M J, RYAN T, et al. Sepsis-associated thrombocytopenia[J]. *Thromb Res*, 2016, 141: 11
- [16] VARDON-BOUNES F, RUIZ S, GRATACAP M P, et al. Platelets are critical key players in sepsis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(14): 3494
- [17] CLAUSHUIS TAM, VAN VUGHT L A, SCICLUNA B P, et al. Thrombocytopenia is associated with a dysregulated host response in critically ill sepsis patients [J]. *Blood*, 2016, 127(24): 3062
- [18] VECCHIÉ A, BONAVENTURA A, TOLDO S, et al. IL-18 and infections: is there a role for targeted therapies? [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(3): 1638
- [19] WU Q, XIAO Z, PU Y, et al. TnI and IL-18 levels are associated with prognosis of sepsis[J]. *Postgrad Med J*, 2019, 95(1123): 240
- [20] ZHU M, RONG X, LI M, et al. IL-18 and IL-35 in the serum of patients with sepsis thrombocytopenia and the clinical significance[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(2): 1251
- (2021-02-20 收稿)

·读者·作者·编者·

《天津医科大学学报》关于“ppm、ppb、ppt”英文缩写的使用换算说明

在医学论文中,“ppm、ppb、ppt”这类英文缩写常常被作者作为单位符号使用,但“ppm、ppb、ppt”既不是数学符号,更不是单位符号,只是表示数量份额的英文名词缩写(英文全称分别为 parts per million、parts per billion、parts per trillion)。在实际研究中,仪器测量的数值可能会以“ppm、ppb、ppt”形式给出结果,作者在撰写文章进行数据描述时则需对“ppm、ppb、ppt”进行换算。

对溶液而言,换算前需了解体积比还是质量比。 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 是质量-体积比,如果溶液的密度是 1 g/mL ,则 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 相当于 1 ppm ;如果溶液密度不是 1 g/mL ,则需要进行换算。

对大气中的污染物而言,常用体积浓度和质量-体积浓度来表示其在大气中的含量。体积浓度是用每立方米大气中含有污染物的体积数来表示(如 cm^3/m^3 、 mL/m^3),换算关系是: $1\text{ ppm}=1\text{ cm}^3/\text{m}^3=10^{-6}$, $1\text{ ppb}=10^{-9}$, $1\text{ ppt}=10^{-12}$;质量-体积浓度是用每立方米大气中污染物的质量数来表示(如 mg/m^3 、 g/m^3),换算关系是: $C=22.4\text{ X}/M$,式中: X 为污染物以 mg/m^3 表示的浓度值, C 为污染物以 ppm 表示的浓度值, M 为污染物的分子质量。

在土壤、动植物、固体废弃物中“ppm、ppb、ppt”与质量含量的换算关系为: $1\text{ ppm}=1\text{ mg}/\text{kg}=1\text{ }000\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}$, $1\text{ ppb}=1\text{ }\mu\text{g}/\text{kg}=10^{-3}\text{ mg}/\text{kg}$, $1\text{ ppt}=1\text{ ng}/\text{kg}=10^{-6}\text{ mg}/\text{kg}$ 。

本刊编辑部