

白细胞介素-37介导炎症反应平衡保护小鼠 心肌缺血再灌注损伤的机制*

吴帮卫¹ 孟凯¹ 赵晓琦¹ 刘宇宙¹ 俞坤武¹ 钟禹成¹ 吉庆伟² 曾秋棠¹

[摘要] 目的:探讨外源性重组人源性白细胞介素(IL)-37对小鼠心肌缺血再灌注损伤的影响。方法:8~10周雄性c57BL/6小鼠为实验对象,随机分为假手术组、缺血再灌注(I/R)对照组和I/R+IL-37干预组,每组6只。观察各组小鼠I/R后心肌坏死面积及心功能(24 h后),检测缺血心肌处中性粒细胞募集(MPO),以及缺血心肌和血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-1 β 、IL-6、IL-10、转化生长因子- β (TGF- β)表达(4 h后)。结果:与假手术组比较,I/R对照组心功能明显下降,TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平明显增高。IL-37干预组可以明显抑制TNF- α 、IL-1 β 和IL-6表达,增加IL-10与TGF- β 水平,减轻MPO,减少心肌坏死面积并改善心功能。结论:IL-37减轻小鼠心肌I/R损伤,可能与抑制MPO、降低促炎因子表达以及上调抗炎因子表达相关。

[关键词] 白细胞介素-37;缺血再灌注损伤;中性粒细胞;炎症反应

doi:10.13201/j.issn.1001-1439.2014.06.020

[中图分类号] R542.2 **[文献标志码]** A

Mechanism of interleukin-37 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by balancing inflammatory response in mice

WU Bangwei¹ MENG Kai¹ ZHAO Xiaochi¹ LIU Yuzhou¹
YU Kunwu¹ ZHONG Yucheng¹ JI Qingwei¹ ZENG Qiutang¹

(¹Department of Cardiology, Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China; ²Department of Cardiology, The people's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region)

Corresponding author: ZENG Qiutang, E-mail: zengqutang@gmail.com

Abstract Objective: To investigate the effect of IL-37 on myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. **Method:** Sham or I/R operations were performed on male C57BL/6J mice, and I/R mice were randomly divided into control group and IL-37 treated group (each group: $n=6$). Then the infarct size and cardiac function were detected in 24 hours after reperfusion, the MPO activity was measured as an indicator of neutrophil infiltration in the ischemic myocardium 4 hours after reperfusion, and the expressions of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF- β) in heart tissue and serum were measured 4 hours after reperfusion. **Result:** Compared with sham group, I/R mice showed a decreased cardiac function accompanying with an increased level of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6). However, compared with I/R control mice, IL-37 treated I/R mice significantly reversed the process as demonstrated by reduced infarct size, improved

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No:81270354,81160045)

¹华中科技大学附属协和医院心内科(武汉,430022)

²广西壮族自治区人民医院心内科

通信作者:曾秋棠,E-mail: zengqutang@gmail.com

- primary immunodeficiencies[J]. Gene Ther, 2004, 11: 956-961.
- [8] 智深深,田杰,刘官信,等. 小鼠 Islet-1 基因慢病毒表达载体的构建及其诱导 C3H10T1/2 细胞向心肌细胞特异性分化[J]. 基础医学与临床,2011,31(7): 740-745.
- [9] 张艳,陈彬,陈敏,等. DNA 甲基化 PCR 引物的设计[J]. 第三军医大学学报,2008, 30(3): 268-269.
- [10] YANG G, TIAN J, FENG C, et al. Trichostatin A promotes cardiomyocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells after 5-azacytidine induction or during co-culture with neonatal cardiomyocytes via a mechanism independent of histone deacetylase inhibition[J]. Cell Transplantation, 2012,21: 985-996.
- [11] 鲁荣,朱静,田杰,等. Islet-1 诱导 C3H10T1/2 细胞向心肌样细胞分化过程中对心肌特异蛋白基因上组蛋白乙酰化的促进作用[J]. 第三军医大学学报,2012,34(10): 938-942.
- [12] 林建萍,田杰,刘官信,等. Islet-1 在乙酰化调控网络中特异性辅助 C3H10T1/2 细胞向心肌样细胞分化[J]. 基础医学与临床,2012,32(4): 363-368.
- [13] GEELHOED J J, JADDOE V W. Early influences on cardiovascular and renal development[J]. Eur J Epidemiol,2010,10: 677-692.

(收稿日期:2013-11-07)

cardiac function, suppressed MPO activity and inflammation response balance characteristic with inhibited pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6) and improved anti-inflammatory cytokines (IL-10, TGF- β). **Conclusion:** IL-37 plays a protective role against mouse myocardial I/R injury, suppresses the infiltration of neutrophil towards ischemic myocardium, which may be associated with the balance of inflammation response.

Key words Interleukin-37; ischemia/reperfusion injury; neutrophil; inflammation response

心肌缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤是指心肌组织缺血一段时间后, 血流重新恢复, 组织损伤程度不仅没有减轻, 反而较缺血时进一步加重、器官功能进一步恶化^[1]。坏死心肌细胞和破坏的细胞外基质等通过激活 TLRs 介导的固有免疫炎症反应是再灌注损伤发生发展的重要机制之一^[2]。研究表明, 心肌组织缺血后 TLR4/NF- κ B 信号活化以及各种炎性因子及趋化因子表达增加, 随之募集大量的炎性细胞产生蛋白水解酶和氧自由基, 加剧心肌细胞损伤, 使心肌细胞对缺血、缺氧耐受性减低甚至出现死亡, 严重影响心功能^[3]。白细胞介素 (IL)-37 是 2010 年命名的 IL-1 家族新成员, 具有强大的抗炎和免疫调节作用, 是一种天然的固有免疫抑制剂, 在结肠炎、肝脏缺血再灌注等疾病中发挥保护作用^[4-9]。由于小鼠并不表达 IL-37, 本研究拟采用重组人 IL-37 以探讨其对心肌 I/R 损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组

实验动物为健康清洁级 C57BL/6 雄性小鼠, 鼠龄 8~10 周, 由武汉大学实验动物中心提供。实验材料包括麻醉药 (戊巴比妥)、小动物呼吸机、恒温床、用于气管插管的套管针、结扎用 6-0 丝线 (带针) 等。将 I/R 造模成功的小鼠随机分成对照组和 IL-37 干预组, 每组 6 只。IL-37 干预组进行再灌注时经尾静脉给予 1 μ g 人重组 IL-37 (溶于 200 μ l 0.9% NaCl 溶液中), 对照组给予相同剂量的 0.9% NaCl 溶液。手术方法: 麻醉小鼠后 (50 mg/kg), 经口腔进行气管插管, 小动物呼吸机辅助呼吸, 正中中线开胸暴露心脏, 以 6-0 丝线结扎左前降支 30 min 后松开, 假手术开胸暴露心脏但不结扎血管, 关胸, 分别于 4 h 后处死取心脏检测心功能、24 h 后处死染心肌检测坏死面积。

1.2 心肌缺血及坏死面积测定

灌注 24 h 后, 进行小鼠超声心动图检查, 检测射血分数 (EF) 和短轴缩短率 (FS) 值。测量结束后, 麻醉小鼠, 以 20 mM KCl 经腹腔注入小鼠, 使心脏猝死于心室舒张期, 然后开胸, 0.9% NaCl 溶液清洗掉心脏内残余血量。重新结扎左前降支, 将 1 ml 1% 的 Evans 蓝经主动脉注入心腔中, 非缺血区的心肌被染成蓝色后, 缺血区不被染成蓝色, 分离完成左心室后称其重量, 并切成厚度约 1 mm 的切片, 将其置于 1% TTC 溶液中 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min

后, 缺血区变为非蓝色部分, 而梗死区为白色部分, 利用 Image Pro Plus software 分别进行面积测量。每片心肌组织缺血区和梗死区面积百分比乘以每片组织重量分别得到该片组织缺血区心肌重量和梗死区重量, 然后各标本每片依次叠加之。标本心肌缺血区面积以缺血区心肌重量/左心室重量来表示, 心肌梗死区面积以梗死区心肌重量/缺血区心肌重量表示。

1.3 测定心肌 MPO 活性

实验结束后, 摘除心肌, 用 0.9% 氯化钠冲洗后, 切取缺血部分心肌, 制备成 10% 的心肌匀浆, 取上清液, 根据试剂盒说明检测心肌中性粒细胞募集 (MPO) 活性。

1.4 ELISA 法检测

实验结束后, 取小鼠动脉血, 3500 r/min 离心 10 min, 取上清, 检测血清中 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β 的浓度。

1.5 RT-PCR 法检测

取缺血心肌组织, 以 TRIZOL 提取、酚仿抽提乙醇重新沉淀的方法提取总 RNA, 以 Random primer 为引物, 按照试剂盒说明书操作, 以总 RNA 为模板逆转录成 cDNA。实时荧光定量 PCR 检测心肌以上分子表达, 以 GAPDH 做为内参照物, 根据 CT 值计算相对表达量。各分子引物序列: TNF- α : GAAGTGGCAGAAGAGGCACT, AGGGTCTGGGCCATAGAACT; IL-1 β : GGGCCTCAAAGGAAAGAATC, TACCAGTTGGGGAAGCTC-TGC; IL-6: AGTTGCCTTCTTGGGACTGA, TC-CACGATTTCAGAGAGAAC; IL-10: CCAAGCCTTATCGGAAATGA, TTTTCACAGGGGAG-AAATCG; TGF- β : TTGCTTCAGCTCCACAGAGA, TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC; GAPDH: AACTTTGGCATTGTGGAAGG, ACACATTGGGGGTAGGAACA。

1.6 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计分析, 数据表示为 $\bar{x} \pm s$, 实验所得数据进行独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌缺血和梗死面积及心功能测定

假手术组无明显缺血, 对照组和 IL-37 干预组缺血区面积差异无统计学意义, IL-37 干预组梗死区面积较对照组明显减小, 见表 1。再灌注 24 h 检

测小鼠心功能,发现 IL-37 干预组 EF 和 FS 值明显增加(表 2)。

表 1 各组缺血区面积及梗死区面积

Table 1 Area of ischemia and infarct $\%$, $\bar{x} \pm s$

组别	缺血区面积	梗死区面积
假手术组(6 只)	0	0
I/R 对照组(6 只)	50.33 $\pm$ 1.86	38.83 $\pm$ 5.15
I/R+IL-37 干预组(6 只)	49.50 $\pm$ 2.74 ¹⁾	22.67 $\pm$ 3.27 ¹⁾

与 I/R 对照组比较,¹⁾ $P<0.05$ 。

表 2 各组 EF 及 FS 值

Table 2 Levels of EF and FS $\%$, $\bar{x} \pm s$

组别	EF	FS
假手术组(6 只)	83.88 $\pm$ 4.70	44.38 $\pm$ 3.11
I/R 对照组(6 只)	56.87 $\pm$ 6.15 ¹⁾	29.63 $\pm$ 3.78 ¹⁾
I/R+IL-37 干预组(6 只)	70.5 $\pm$ 5.54 ²⁾	35.75 $\pm$ 3.92 ²⁾

与假手术组比较:¹⁾ $P<0.05$;与 I/R 对照组比较:²⁾ $P<0.05$ 。

2.2 心肌 MPO 检测

与假手术组(0.18 $\pm$ 0.07) μ /mg 比较,I/R 对照组(0.87 $\pm$ 0.26) μ /mgMPO 水平显著升高($P<0.05$)。与 I/R 对照组比较,IL-37 干预组(0.49 $\pm$ 0.13) μ /mg MPO 水平显著降低($P<0.05$)。

2.3 血清和缺血心肌中炎症因子表达

各组血清和缺血心肌中的炎症因子表达水平分别见表 3 和表 4。其中血清炎症因子水平为实测值;缺血心肌炎症因子水平以假手术组为基准,为相对表达值。

3 讨论

目前对 I/R 损伤机制的研究很多,其中氧自由基损伤、钙超载是比较公认的机制^[11]。心肌缺血后细胞坏死数量、心功能降低程度与炎症因子水平呈正相关,表明炎症反应直接参与心肌 I/R 损伤的发

生^[2-3]。TLR4 激活的固有免疫炎症反应在心肌 I/R 损伤中发挥了重要作用,其通过活化 NF- κ B、P38 等下游信号分子,上调 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 等促炎症因子以及粘附趋化分子表达,募集中性粒细胞、巨噬细胞等,释放蛋白水解酶、氧自由基介导损伤的同时放大炎症反应,形成恶性循环,加剧 I/R 损伤^[3,12-13]。研究表明,抑制炎症反应可显著改善 I/R 损伤^[3]。

IL-37 广泛存在于各种器官组织如心、脑、肾、骨髓和睾丸等。生理状态下,外周单个核细胞、单核巨噬细胞、NK 细胞、树突状细胞、活化 B 细胞以及内皮细胞等低浓度表达 IL-37,炎症反应可显著上调其表达^[4,9]。体外实验表明,Toll 样受体激动剂、多种细胞因子如 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、IFN- γ 和 TGF- β 可上调 IL-37 的表达^[5]。IL-37 对受 LPS 刺激的外周单个核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、内皮细胞产生的炎症因子(IL-1 β 、TNF- α 及 IL-6 等)具有强烈的抑制效应,提示 IL-37 可以影响 TLR4 信号介导的炎症反应^[5,14]。临床研究显示,IL-37 在过敏性皮炎、系统性红斑狼疮、格林巴利、动脉粥样硬化等自身免疫性疾病中可能发挥作用^[9,15-17]。在药物 DSS 诱导的小鼠结肠炎模型中,IL-37 可以抑制促炎症因子的表达,同时上调 IL-10 水平,具有显著性保护作用^[7]。Nold 等^[5]发现,在 LPS 诱导的小鼠感染性休克模型中,IL-37 的炎症保护作用与抑制炎症因子的表达密切相关。IL-37 可以通过细胞外和细胞内两种机制发挥作用:在细胞外,结合细胞膜上的 SIGIRR 抑制炎症反应;在细胞内,与 Smad3 结合,抑制炎症因子的表达^[5,14]。研究显示,SIGIRR 和 Smad3 都具有抑制 TLR4 及其下游信号作用,这也和 IL-37 具有特异性影响 LPS 刺激产生的炎症反应相一致^[18-19]。

表 3 各组血清中炎症因子水平

Table 3 Levels of serum inflammatory cytokines

$\bar{x} \pm s$

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IL-10	TGF- β
假手术组(5 只)	36.18 $\pm$ 9.62	17.40 $\pm$ 8.51	520.10 $\pm$ 151.49	14.22 $\pm$ 4.93	0
I/R 对照组(5 只)	206.10 $\pm$ 31.41 ¹⁾	109.02 $\pm$ 19.91 ¹⁾	4106.20 $\pm$ 969.96 ¹⁾	584.22 $\pm$ 122.98 ¹⁾	21.80 $\pm$ 6.42 ¹⁾
I/R+IL-37 干预组(5 只)	116.21 $\pm$ 36.97 ²⁾	69.23 $\pm$ 18.43 ²⁾	2049.27 $\pm$ 817.87 ²⁾	1095.82 $\pm$ 208.28 ²⁾	30.40 $\pm$ 8.08 ²⁾

与假手术组比较,¹⁾ $P<0.05$;与 I/R 对照组比较,²⁾ $P<0.05$ 。

表 4 各组缺血心肌中炎症因子水平

Table 4 Levels of serum inflammatory cytokines

$\bar{x} \pm s$

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6	IL-10	TGF- β
假手术组(5 只)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
I/R 对照组(5 只)	6.94 $\pm$ 1.23 ¹⁾	5.86 $\pm$ 0.96 ¹⁾	4.22 $\pm$ 0.99 ¹⁾	1.61 $\pm$ 0.51 ¹⁾	1.46 $\pm$ 0.17 ¹⁾
I/R+IL-37 干预组(5 只)	3.84 $\pm$ 0.96 ²⁾	2.16 $\pm$ 0.81 ²⁾	2.44 $\pm$ 0.57 ²⁾	2.42 $\pm$ 0.63 ²⁾	2.18 $\pm$ 0.53 ²⁾

与假手术组比较,¹⁾ $P<0.05$;与 I/R 对照组比较,²⁾ $P<0.05$ 。

中性粒细胞的浸润在心肌 I/R 损伤中发挥重要作用^[10]。本研究发现 IL-37 显著减少中性粒细胞向缺血处心肌的募集,这和 McNamee 等^[7]发现 IL-37 可以抑制中性粒细胞向结肠固有层募集相一致。研究显示,在肝脏的 I/R 损伤中,IL-37 可以通过下调 KC、MIP-2 等中性粒细胞特异性趋化因子的表达,减少其向肝脏的募集。体外实验还显示,IL-37 能抑制中性粒细胞 TNF- α 介导的活化,这可能也和活性氧自由基的减少相关^[8]。目前 IL-37 介导的心肌 I/R 损伤中性粒细胞募集抑制作用机制仍不明确,推测与其影响中性粒细胞特异性趋化因子及抑制其活性有关^[8]。

本研究显示,在小鼠心脏 I/R 模型中,IL-37 不仅可以抑制促炎因子 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 的表达,还能升高抗炎因子 IL-10 和 TGF- β 的水平,其机制可能为 IL-37 通过抑制促炎因子的表达反馈性引起其升高^[11]。既往研究表明,IL-37 抑制单核巨噬细胞促炎型 M1 细胞因子的表达以及树突状细胞的成熟,推测 IL-37 可能通过抑制单核巨噬细胞、树突状细胞表型转变,诱导其分化为抗炎型从而维持免疫炎症反应平衡,但具体机制有待进一步研究^[5,14]。

本研究首次发现,IL-37 在心肌 I/R 损伤中发挥保护作用,可以明显减小心肌坏死面积,改善心功能,这可能和其抑制促炎因子表达、上调抗炎因子水平从而维持机体免疫炎症平衡相关。

参考文献

- [1] YELLON D M, HAUSENLOY D J. Myocardial reperfusion injury[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357: 1121—1135.
- [2] ARSLAN F, DE KLEIJN D P, PASTERKAMP G. Innate immune signaling in cardiac ischemia[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2011, 8: 292—300.
- [3] BARTON G M, MEDZHITOV R. Toll-like receptor signaling pathways[J]. *Science*, 2003, 300: 1524—1525.
- [4] TETE S, TRIPODI D, ROSATI M, et al. IL-37 (IL-1F7) the newest anti-inflammatory cytokine which suppresses immune responses and inflammation[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2012, 25: 31—38.
- [5] NOLD M F, NOLD-PETRY C A, ZEPP J A, et al. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11: 1014—1022.
- [6] BULAU A M, FINK M, MAUCKSCH C, et al. In vivo expression of interleukin-37 reduces local and systemic inflammation in concanavalin A-induced hepatitis[J]. *Sci World J*, 2011, 11: 2480—2490.
- [7] MCNAMEE E N, MASTERSON J C, JEDLICKA P, et al. Interleukin 37 expression protects mice from colitis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 16711—16716.
- [8] SAKAI N, VAN SWERINGEN H L, BELIZAIRE R M, et al. Interleukin-37 reduces liver inflammatory injury via effects on hepatocytes and non-parenchymal cells[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012, 27: 1609—1616.
- [9] Wu B, Zeng Q, Meng K et al. The potential role of IL-37 in atherosclerosis. [J]. *Pharmazie*, 2013, 68: 857—860.
- [10] KAMINSKI K A, BONDA T A, KORECKI J, et al. Oxidative stress and neutrophil activation—the two keystones of ischemia/reperfusion injury[J]. *Int J Cardiol*, 2002, 86: 41—59.
- [11] BOROS P, BROMBERG J S. New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury[J]. *Am J Transplant*, 2006, 6: 652—658.
- [12] BOYD J H, MATHUR S, WANG Y, et al. Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 72: 384—393.
- [13] OYAMA J, BLAIS C JR, LIU X, et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice[J]. *Circulation*, 2004, 109: 784—789.
- [14] LI S Z, HONG J, NOLD M F, et al. Recombinant IL-37 inhibits LPS induced inflammation in a SIGIRR-and MAPK-dependent manner[abstract] [J]. *Cytokine*, 2013, 63: 281—281.
- [15] LI C, ZHAO P, SUN X, et al. Elevated levels of cerebrospinal fluid and plasma interleukin-37 in patients with Guillain-Barre syndrome [J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 639712.
- [16] FUJITA H, INOUE Y, SETO K, et al. Interleukin-37 is elevated in subjects with atopic dermatitis[J]. *J Dermatol Sci*, 2013, 69: 173—175.
- [17] SONG L, QIU F, FAN Y, et al. Glucocorticoid regulates interleukin-37 in systemic lupus erythematosus [J]. *J Clin Immunol*, 2013, 33: 111—117.
- [18] MCCARTNEY-FRANCIS N, JIN W, WAHL S M. Aberrant Toll receptor expression and endotoxin hypersensitivity in mice lacking a functional TGF-beta 1 signaling pathway[J]. *J Immunol*, 2004, 172: 3814—3821.
- [19] HUANG X, HAZLETT L D, DU W, et al. SIGIRR promotes resistance against *Pseudomonas aeruginosa* keratitis by down-regulating type-1 immunity and IL-1R1 and TLR4 signaling[J]. *J Immunol*, 2006, 177: 548—556.

(收稿日期: 2014-01-10)