

模拟微重力对猕猴肺组织趋化因子 CCL20 及其受体 CCR6 表达的影响

许崇玉¹,王萍¹,陈杨²,朱敏立²,司少艳³,蔡艺灵⁴,马华松⁵,陈志明⁵

摘要 目的 探讨模拟微重力对猕猴肺组织 CC 亚族趋化因子配体 20(CCL20)及趋化因子受体 6(CCR6)mRNA 和蛋白表达的影响。方法 15 只猕猴分为 3 组,每组 5 只;对照组、模拟组、恢复组。HE 观察猕猴肺组织结构,实时荧光定量 PCR、免疫组化法检测肺组织中 CCL20 及 CCR6 mRNA 和蛋白表达。结果 模拟组和恢复组猕猴肺组织可见肺泡间隔增厚,肺间质内及支气管旁可见淋巴细胞浸润,恢复组较模拟组减轻。模拟组、恢复组 CCL20 mRNA 的表达水平较对照组增高,但差异无统计学意义。模拟组 CCR6 mRNA 的表达水平较对照组、恢复组显著增高($P < 0.01$)。模拟组 CCL20 及 CCR6 蛋白表达较对照组、恢复组显著升高($P < 0.05$)。结论 中、长期模拟微重力可引起肺组织结构破坏、淋巴细胞浸润,并可引起猕猴肺组织中 CCL20 及 CCR6 表达增强。

关键词 模拟微重力;猕猴;肺组织;CCL20;CCR6

中图分类号 R 563.9;V 7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)04-0484-05

2016-01-18 接收

基金项目:总装备部试验技术研究重点项目(编号:SMFA13K02)

作者单位:¹安徽医科大学解放军 306 临床学院,北京 100101

解放军第 306 医院²呼吸与危重症学科,³特种医学实验研究中心,⁴神经内科,⁵骨科,北京 100101

作者简介:许崇玉,男,硕士研究生;

王萍,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: ping-wang306hplbj@163.com

随着我国载人航天事业的深入发展,空间环境中机体防护显得尤为重要。由于肺自身特点,导致其对重力变化极其敏感^[1]。研究^[2]表明,失重可导致肺组织结构病理损伤并伴有细胞因子的变化。CCL20 是近期发现的趋化因子,与其唯一同源性受体 CCR6^[3]结合,可诱导多种淋巴细胞迁移,在炎症损伤和免疫应答中发挥重要作用^[4]。研究^[5-6]表明 CCL20/CCR6 可参与多种肺组织疾病,促进气道炎症的发生和发展。汤楚华等^[7]发现,模拟失重可引起猕猴牙龈组织 CCL20 和 CCR6 表达增加,在牙龈组织应激过程中发挥作用。然而,目前国内外未见失重状态下 CCL20/CCR6 在肺组织中相关作用的报道。该研究以猕猴为对象,采用模拟微重力模型^[8],观察失重对肺组织结构及 CCL20、CCR6 mRNA 和蛋白表达的影响,为进一步研究空间环境下肺组织结构及功能变化提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试剂和动物模型

1.1.1 主要试剂 一抗为山羊抗人 CCL20 多克隆抗体、鼠抗人 CCR6 单克隆抗体(美国 R&G 公司);二抗为抗兔/抗鼠通用型免疫组化试剂盒(丹麦 Dako 公司);山羊超敏二步法检测试剂盒(北京中杉

signaling pathway on myocardial ischemia-reperfusion injury in SD rats. **Methods** 50 healthy male adult SD rats were randomly divided into 5 groups, model group(to make ischemia-reperfusion model by suture method), sham group(thoracotomy without vascular ligation), the low, medium and high dose leptin pretreatment groups(20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $n = 10$). After ischemia for 30 minutes and reperfusion for 24 hours, then to observe the pathological changes of cardiac HE staining in rats; using ELISA to test serum interleukin-6 (IL-6), tumor-stimulating factor- α (TNF- α) and mitochondrial permeability transition pore (mPTP); to test the expression of Bcl-2 and Bax apoptotic proteins by Western blot method. **Results** Compared with the model group, pathological characteristics of sham group and leptin preconditioning groups were improved; IL-6, TNF- α , mPTP and Bax expression was significantly decreased ($P < 0.05$); in leptin pretreatment groups, Bcl-2 expression was significantly increased, especially in high dose leptin group($P < 0.05$), and there was no obvious dose-dependence. **Conclusion** Leptin relieve inflammation and inhibit mPTP, up-regulate the expression of Bcl-2 and down-regulate the Bax, thereby protect cardiomyocytes and mitigate damage on MIRI.

Key words leptin pretreatment; myocardial ischemia reperfusion injury; mitochondrial pathway

金桥生物技术有限公司); TRIzol 试剂(美国 Invitrogen 公司); Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (美国 Thermo 公司); SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix 试剂盒(日本 TOYOBO 公司)。

1.1.2 模型制备 健康雄性猕猴 15 只, 年龄 4~8 岁, 体重约 8 kg, 由北京协尔鑫生物资源研究所提供。猕猴按体重配对, 随机均等分为 3 组, 即对照组: 在笼内自由活动 6 周; 模拟组: 在特制的头低位模拟失重效应装置上生活 6 周; 恢复组: 在特制的头低位模拟失重效应装置上生活 6 周, 随后在笼内自由活动 4 周。以猕猴卧床头低位 -10° 模拟微重力效应。所有猕猴用标准动物饲料喂养, 室温 (22 ± 2) °C, 人工控制室内照明, 保持 12 h 光照 (8:00 ~ 20:00) 和黑暗 (20:00 ~ 次日 8:00) 交替循环。实验动物的使用及操作过程全部符合实验动物国家标准, 且通过了中国人民解放军第 306 医院伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 取材与切片制作 饲养周期结束后, 猕猴在麻醉状态下放血处死。取猕猴肺组织标本, 分别置于 10% 福尔马林溶液、RNAlater 溶液及冻存于液氮中备用。按常规石蜡切片制作方法制作 4 μm 连续切片, 进行后续的 HE 及免疫组化染色。

1.2.2 HE 染色观察肺组织病理学变化 将上述石蜡切片按常规 HE 染色法染色, 即二甲苯脱蜡后经无水乙醇、90% 酒精、80% 酒精、75% 酒精下行至蒸馏水; 苏木精染色; 1% 盐酸酒精分化; 伊红染色; 从低至高梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 光学树胶封片。Leica 显微镜观察, 拍照。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (Q-PCR) 法检测肺组织 CCL20、CCR6 mRNA 的表达

1.2.3.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 中猕猴 CCL20 及 CCR6 mRNA 序列, 以 Primer Premier 3.0 软件设计特异性引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 以 GAPDH 为内参照, 引物序列见表 1。

表 1 Q-PCR 使用的特异性引物序列

基因	引物序列(5'-3')	长度(bp)
CCL20	F:TACAGACCGTATCCTTCATCCTAA	156
	R:CGACATACAATAAGTTTCACCCA	
CCR6	F:CTGTGCTCTATGCTTTTATTGGG	168
	R:CATTGTCTGTTATCTGCCGTCTC	
GAPDH	F:TGACCTGCCCTCTCGAAAAA	111
	R:CCACCTGCTGCTCAGTGTAG	

1.2.3.2 总 RNA 的提取 取冻存于 -80 °C 冰箱 RNAlater 溶液中的肺组织, 应用 TRIzol 试剂盒, 按照说明书提取总 RNA。以 ND-1000 核酸定量检测仪(美国 Thermo 公司)测定总 RNA 的浓度及吸光度 (absorbance, A) 值即 A_{260} 、 A_{280} , 以 $1.8 \leq A_{260}/A_{280} \leq 2.0$ 为合格。总 RNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 可见明显的 18 S、28 S 两条区带, 所有样本总 RNA 均为 $1.8 \leq A_{260}/A_{280} \leq 2.0$, 证明所提取的总 RNA 质量较好。

1.2.3.3 逆转录反应 吸取 2 μg 总 RNA, 按 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 说明书操作步骤逆转录合成 cDNA。逆转录条件: 65 °C、5 min; 42 °C、60 min; 70 °C、5 min; -20 °C 保存。

1.2.3.4 Q-PCR 法检测 反应体系: SYBR[®] Green Real-time PCR Master Mix 10 μl, 上游引物 (10 μmol/L) 0.4 μl, 下游引物 (10 μmol/L) 0.4 μl, cDNA 1 μl, RNase Free Water 8.2 μl; 以 GAPDH 为内参。反应条件为: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C、5 s; 60 °C、34 s; 共 40 个循环; 95 °C、15 s; 60 °C、1 min; 95 °C、15 s。实验数据应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行处理, 计算各样本平均 Ct 值及 ΔCt 值 ($\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{GAPDH}$), 计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 其数值表示 CCL20、CCR6 mRNA 相对于 GAPDH 的表达倍数。

1.2.4 免疫组织化学染色 采用 SP 免疫组化法, 切片按常规经二甲苯脱蜡后经无水乙醇、90% 酒精、80% 酒精、75% 酒精下行至蒸馏水; 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液热抗原修复; 30% H_2O_2 室温封闭内源性过氧化物酶 30 min; 蒸馏水洗 3 次; 山羊血清封闭 30 min; 滴加 CCL20 抗体 (1:1 000) 或 CCR6 抗体 (1:2 000), 4 °C, 过夜; 蒸馏水、1 × PBS 分别洗 3 次; 滴加抗山羊或抗鼠/抗兔二抗, 室温孵育 1 h; 蒸馏水、1 × PBS 分别洗 3 次; DAB 显色; 苏木精染色; 1% 盐酸酒精分化; 从低至高梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 光学树胶封片。Leica 显微镜观察猕猴肺组织中 CCL20/CCR6 的表达情况。以肺组织和 (或) 结缔组织胞膜或胞质中有黄色或棕黄色颗粒为 CCL20/CCR6 阳性反应。

采用双盲法观察切片, 每张切片随机选取 5 个高倍视野 (×200), 主动排除“边缘效应”的干扰, 分别对阳性细胞的百分比和染色强度给予评分, 总分为两者之积, 半定量判断结果。阳性细胞的百分比: 阳性细胞数 <5% 为 0 分, 5%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, 76%~100% 为 4 分。染色强度: 无着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄

色为 2 分,棕褐色为 3 分。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本均数的比较采用单因素方差分析;两组间差异性比较,方差齐性者采用 LSD 法检验,方差不齐则采用 Dunnett *t* 检验;变量间的相关分析采用 Spearman 秩相关分析。

2 结果

2.1 肺组织病理结构改变 对照组猕猴肺组织肺泡壁形态、大小均匀,肺泡腔内未见淤血、水肿;模拟组肺组织部分肺泡间隔增宽,肺间质内及支气管旁可见淋巴细胞团块状浸润;恢复组上述病理改变较模拟组稍减轻。见图 1。

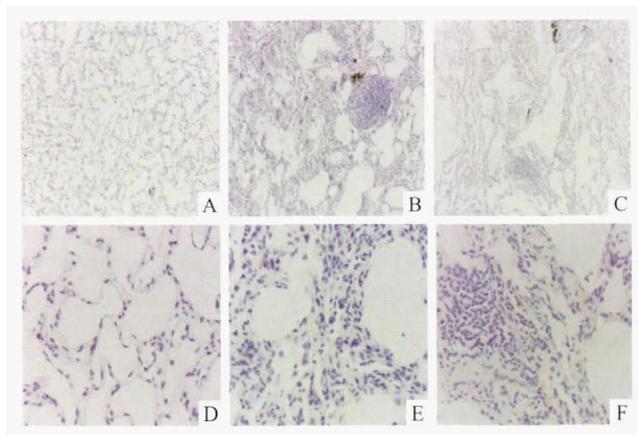


图 1 猕猴肺组织 HE 染色

A:对照组;B:模拟组;C:恢复组;1: $\times 100$;2: $\times 400$

2.2 肺组织 CCL20、CCR6 mRNA 表达情况 Q-PCR 结果显示,对照组(8.48 ± 5.36)、模拟组(7.27 ± 2.43)、恢复组(6.61 ± 1.51)猕猴肺组织 CCL20 mRNA 表达呈增高趋势,模拟组是对照组的 2.31 倍,恢复组是对照组的 3.65 倍,但各组间差异无统计学意义($F = 0.36$)。各组猕猴肺组织 CCR6 mRNA 表达分别为对照组(8.22 ± 1.93)、模拟组(5.10 ± 1.46)、恢复组(8.56 ± 1.32),模拟组是对照组的 9.63 倍,恢复组是对照组的 0.87 倍,模拟组表达 CCR6 较对照组、恢复组增高,差异有统计学意义($F = 7.19, P < 0.01$),但对照组和恢复组比较差异无统计学意义($F = 7.19$)。对 CCL20 和 CCR6 mRNA 在各组猕猴肺组织中表达变化进行相关性分析显示,两者之间无显著相关性($r_s = 0.48$)。见图 2。

2.3 肺组织 CCL20 免疫组化结果 CCL20 免疫组化染色结果表明,各组猕猴肺组织均可见 CCL20 弱阳性表达,呈黄色或棕黄色,阳性细胞既可分布于支气管上皮细胞、血管内皮细胞、肺泡上皮细胞,胞质、

胞核均有表达,胞质多见,亦可见于肺组织中浸润的淋巴细胞中(图 3)。各组 CCL20 免疫组化评分结果分别为:对照组(1.20 ± 1.10)分、模拟组(3.20 ± 0.84)分、恢复组(1.60 ± 1.14)分。与对照组、恢复组比较,模拟组 CCL20 免疫组化评分显著增高,差异有统计学意义($F = 5.25, P < 0.05$),对照组、恢复组间比较差异无统计学意义($F = 5.25$)。

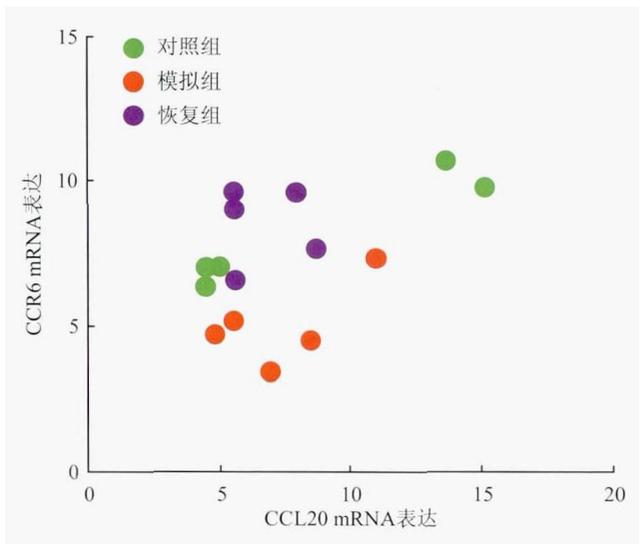


图 2 CCL20 mRNA 和 CCR6 mRNA 在猕猴肺组织中表达的相关性分析

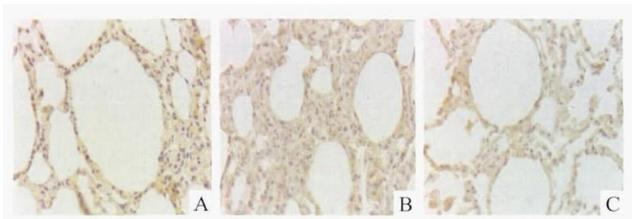


图 3 各组猕猴肺组织 CCL20 免疫组化染色结果 SP $\times 400$
A:对照组;B:模拟组;C:恢复组

2.4 肺组织 CCR6 免疫组化结果 CCR6 主要表达于支气管上皮细胞、血管内皮细胞、肺泡上皮细胞及淋巴细胞浸润区域,胞质、胞核均可着色,以胞质为主,呈黄色或棕黄色(图 4)。各组猕猴肺组织 CCR6 免疫组化评分结果分别为:对照组(1.20 ± 0.45)分、模拟组(5.20 ± 1.79)分、恢复组(2.00 ± 1.87)分。与对照组、恢复组比较,模拟组 CCR6 免疫组化评分分值显著增高,差异有统计学意义($F = 9.74, P < 0.01$),对照组、恢复组比较差异无统计学意义($F = 9.74$)。

3 讨论

趋化因子是一组有相似结构特点、低分子量(8

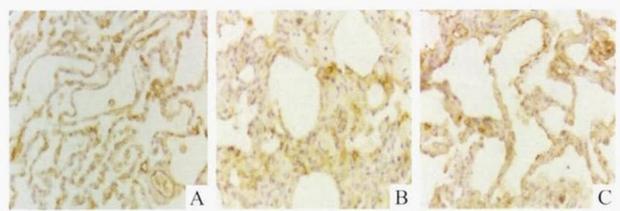


图4 各组猕猴肺组织 CCR6 免疫组化染色结果 SP×400
A:对照组;B:模拟组;C:恢复组

~10 ku)细胞因子家族,由多种组织细胞及炎性细胞产生,有多种生物学活性,能够趋化多种免疫细胞的迁移,在多种疾病的炎症损伤和免疫应答中发挥重要作用^[9-10]。根据其 N 末端保守的半胱氨酸残基的排列方式,趋化因子可分为 4 类:CC 亚族、CXC 亚族、C 亚族和 CX3C 亚族^[11]。趋化因子受体属于 G 蛋白偶联受体家族,主要表达于内皮细胞和免疫细胞。根据结合的配体不同,亦可分为 4 类:CCR 类、CXCR 类、CR 类和 CX3CR 类。趋化因子与其相应受体结合,对多种免疫细胞发挥趋化作用,在特异性和非特异性免疫应答中发挥重要作用,同时在生理及病理条件下也参与机体多种生物学功能^[7]。CCL20 是近年来发现的 CC 亚族新成员,CCR6 是 CCR 类趋化因子受体,是一个高度保守的 G 蛋白偶联受体,主要表达于未成熟的树突状细胞,也可表达于 T 细胞、NKT 细胞、B 细胞及肺、肠和肝等组织^[3,12],CCL20 和 CCR6 间相互作用可介导上述免疫细胞向黏膜组织的转移,参与局部炎症反应及免疫应答。

目前,国内外尚未见失重或模拟失重状态下肺组织 CCL20 和 CCR6 表达情况及 CCL20/CCR6 是否在失重状态下肺组织淋巴细胞浸润中发挥作用的相关报道。因此本研究首次采用了在生物进化上以及组织器官结构、生理习性和代谢机能上同人类相近的猕猴,利用地面模拟微重力模型观察中、长期微重力状态下猕猴肺组织结构的病理改变及从 mRNA 和蛋白水平上对肺组织中 CCL20、CCR6 的表达进行探讨。本研究显示模拟微重力状态下猕猴肺组织间隔增厚、部分肺泡融合,淋巴细胞浸润程度较高,呈团块状浸润,证实了失重或模拟微重力可引起肺组织结构破坏、淋巴细胞浸润增多,这与王小辉等^[13]的研究结果一致。

本实验 Q-PCR 结果显示对照组、模拟组、恢复组猕猴肺组织 CCL20 mRNA 的表达水平呈增加趋势,但差异无统计学意义,可能与 CCL20 在肺组织

本身表达量较低有关;与对照组、恢复组比较,模拟组肺组织 CCR6 mRNA 表达水平显著增加,但对照组与恢复组之间差异无统计学意义。免疫组化结果表明,CCL20 和 CCR6 在模拟组肺组织中表达较对照组及恢复组显著增高,表明失重或模拟微重力效应可引起猕猴肺组织 CCL20、CCR6 蛋白表达增加。Q-PCR 和免疫组化结果提示:模拟微重力状态下猕猴肺组织中 CCR6 mRNA 和蛋白表达水平增高,而 CCL20 mRNA 表达水平未见明显升高,但蛋白表达增强。CCR6 作为 CCL20 的唯一同源性受体,两者 mRNA 的表达无显著相关性。模拟微重力引起趋化因子 CCL20 mRNA 和蛋白水平表达的不一致性,可能与基因的转录后调控有关,具体机制有待于进一步研究。Conejo-Garcia et al^[14]发现 β-防御素是人体内能够作用于 CCR6 的生物活性物质,能够与 CCL20 竞争 CCR6 结合位点,而发挥相似的作用。Zissel et al^[15]的初步研究结果显示 CCL18 也可作用于 CCR6 而发挥趋化作用。结合本研究结果,考虑 CCL20/CCR6 可能参与模拟微重力下肺组织中淋巴细胞浸润过程,但通过何种途径介导该过程,还需进一步的研究。

综上所述,中、长期模拟微重力可引起猕猴肺组织结构破坏、淋巴细胞浸润,同时可引起 CCL20 及 CCR6 表达增强,这可能是介导模拟微重力状态下肺组织中淋巴细胞浸润增多的原因之一。

参考文献

- [1] Prisk G K. Microgravity and the respiratory system[J]. *Eur Respir J*, 2014, 43(5): 1459-71.
- [2] 李天志,刘长庭,李向红,等.模拟失重大鼠血清及肺组织细胞因子的影响研究[J]. *重庆医学*, 2007, 36(12): 1152-4.
- [3] Ito T, Carson W F 4th, Cavassani K A, et al. CCR6 as a mediator of immunity in the lung and gut[J]. *Exp Cell Res*, 2011, 317(5): 613-9.
- [4] Lee A Y, Phan T K, Hulett M D, et al. The relationship between CCR6 and its bidding partners: does the CCR6-CCL20 axis have to be extended? [J]. *Cytokine*, 2015, 72(1): 97-101.
- [5] Demedts I K, Bracke K R, Van Pottelberge G, et al. Accumulation of dendritic cells and increased CCL20 levels in the airways of patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175(10): 998-1005.
- [6] Pichavant M, Charbonnier A S, Taront S, et al. Asthmatic bronchial epithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases selective dendritic cell recruitment[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 115(4): 771-8.
- [7] 汤楚华,牛忠英,郑燕华,等.模拟失重 30 d 后再超重对猴牙龈组织趋化因子 CCL20 及其受体 CCR6 表达的影响[J]. *上海口*

- 腔医学,2014,23(3):273-9.
- [8] Regnard J, Heer M, Drummer C, et al. Validity of microgravity simulation models on earth[J]. *Am J Kidney Dis*,2001,38(3):668-74.
- [9] Balkwill F R. The chemokines system and cancer[J]. *J Pathol*,2012,226(2):148-57.
- [10] Blanchet X, Langer M, Weber C, et al. Touch of chemokines[J]. *Front Immunol*,2012,3:175.
- [11] Zlotink A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity[J]. *Immunity*,2000,12(2):121-7.
- [12] Elgueta R, Marks E, Nowak E, et al. CCR6-dependent positioning of memory B cells is essential for their ability to mount a recall response to antigen[J]. *J Immunol*,2015,194(2):505-13.
- [13] 王小辉,王萍,朱敏立,等.N-乙酰半胱氨酸对模拟失重肺炎大鼠的保护性研究[J]. *安徽医科大学学报*,2014,49(11):1544-8.
- [14] Conejo-Garcia J R, Benencia F, Courreges M C, et al. Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A[J]. *Nat Med*,2004,10(9):950-8.
- [15] Zissel G, Hohne K, Kilic A, et al. CCR6 is a receptor for CCL18 expressed on human lung fibroblasts from IPF lungs[J]. *Eur Respir J*,2011,38(Suppl 55).

Effect of simulated weightlessness on the expression of chemokine CCL20 and it's receptor CCR6 in lung of rhesus monkey

Xu Chongyu¹, Wang Ping¹, Chen Yang², et al

(¹The 306th Hospital of PLA Cinical College of Anhui Medical University, Beijing 100101;

²Dept of Respiratory and Critical Care Medicine, The 306th Hospital of PLA, Beijing 100101)

Abstract Objective To investigate the effect of simulated weightlessness on the mRNA and protein expression of chemokine CCL20 and it's receptor CCR6 in lung of rhesus macaque. **Methods** Fifteen healthy young male rhesus monkeys were randomly divided into 3 groups; control group, simulated group and recovery group. HE staining was used to observe the histopathological structure changes of pulmonary tissues. And the mRNA and protein expression of CCR6 and CCL20 in lung tissue were detected by immunohistochemistry and quantitative real-time PCR (Q-PCR). **Results** Compared with the control group, histopathological examination revealed alveolar septal thickening, and alveolar and interstitial lymphocytic infiltration in simulated group and recovery group, and the pathological changes in recovery group were lighter than those in simulated group. The expressions of CCL20 mRNA in simulated group and the recovery group were higher than that in the control group, but there was no significant difference; the expression of CCR6 mRNA in simulated group was significantly higher than that in the control group and the recovery group ($P < 0.01$), but there was no significant difference between the control group and the recovery group. Immunohistochemistry results showed that CCL20 and CCR6 were expressed in the lung tissues of each group, but the expression of CCL20 was weak. The positive cells were found mainly in the cytoplasm of bronchial and alveolar epithelial cells and vascular endothelial cells. The protein expression of CCL20 and CCR6 in simulated group were significantly higher than that in the control group and the recovery group ($P < 0.05$). **Conclusion** Medium or long term simulated weightlessness can induce the destruction of lung tissue structure and infiltration of lymphocytes, and it can also significantly enhance the mRNA and protein expression of CCL20 and its receptor CCR6 in lung tissues.

Key words simulated weightlessness; rhesus macaque; lung; CCL20; CCR6