

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2017.02.007

高盐饮食对内毒素休克小鼠 IL-6 IL-12p40 表达的影响

张青青^{1,2} 董冠军² 张 惠² 闫凤连² 司传平^{2△}¹ 济南大学 山东省医学科学院医学与生命科学学院, 济南 250062;² 济宁医学院免疫学与分子医学研究所, 济宁, 272067)

摘要 目的 观察高盐饮食对小鼠内毒素休克致死率及炎症因子 IL-6 和 IL-12p40 表达的影响。方法 雌性 C57BL/6 小鼠, 6~8 周, 随机分为 2 组, 每组各 10 只, 高盐饮食组饮用含 2.5 % NaCl 盐水; 正常饮食组饮用不含 NaCl 的清水, 喂食 14d。腹腔注射脂多糖(LPS, 500 μ g/只), 观察小鼠的死亡率; 腹腔注射 LPS(200 μ g/只), 观察小鼠血清、脾脏和腹腔细胞中细胞因子 IL-6 和 IL-12p40 水平。结果 1) 高盐饮食组小鼠死亡率明显高于正常饮食组; 2) 与正常饮食组相比, 高盐饮食组血清中 IL-6 和 IL-12p40 含量明显升高, 差异具有统计学意义($t=5.534, P<0.01$; $t=2.906, P<0.05$); 3) 与正常饮食组相比, 高盐饮食组脾脏细胞中 IL-6 和 IL-12p40 mRNA 水平明显升高, 差异具有统计学意义($t=4.075, P<0.05$; $t=4.758, P<0.01$), 腹腔细胞中 IL-6 和 IL-12p40 mRNA 水平明显升高, 差异具有统计学意义($t=25.47, P<0.001$; $t=8.589, P<0.001$)。结论 高盐饮食可增加内毒素休克小鼠的死亡率及其炎症因子 IL-6 和 IL-12p40 的分泌。

关键词 高盐; 内毒素休克; IL-6; IL-12p40

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2017)04-106-04

Effects of high salt on the expression of IL-6 and IL-12p40 in endotoxic shock mice

ZHANG Qingqing¹, DONG Guanjuan², ZHANG Hui², YAN Fenglian², SI Chuanping²¹ School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan & Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250000, China;² Institute of Immunology and Molecular Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To observe the effect of high salt on mortality of endotoxic shock mice and the expression of inflammatory factors IL-6 and IL-12p40. **Methods** Twenty female mice were randomly divided into normal control group and high salt diets group. Respectively, the high salt group was fed with drink containing 2.5 % NaCl and the normal control group was given water without NaCl. After 14 days, each mice was injected 500 μ g LPS to observe mortality. And each mice was injected 200 μ g LPS to observe the expression of IL-6 and IL-12p40 in serum, spleen and peritoneal cell. **Results** 1) The mortality of high salt diet mice was obviously higher than normal diet group. 2) Compared with normal control group, the serum IL-6 and IL-12p40 were significantly increased in high salt diet mice, and the difference was statistically significant ($t=5.534, P<0.01$; $t=2.906, P<0.05$). 3) Compared with normal control group, the expression of IL-6 and IL-12p40 in spleen was significantly increased in high salt diet group, and the difference was statistically significant ($t=4.075, P<0.05$; $t=4.758, P<0.01$). The expression of IL-6 and IL-12p40 in peritoneal cells was significantly increased in high salt diet group, and the difference was statistically significant ($t=25.47, P<0.001$; $t=8.589, P<0.001$). **Conclusion** High salt diet increased the mortality of endotoxic shock mice and increased the secretion of inflammatory cytokines IL-6 and IL-12p40.

Keywords: High salt; Endotoxic shock; IL-6; IL-12p40高盐饮食与心血管疾病^[1-2]、慢性炎症^[3]、自身免疫性疾病以及肿瘤有着密切的关系, 盐在高血压疾病过程的作用已经被广泛地研究和证实^[4-5]。

△ [通信作者] 司传平, E-mail: chpsi@163.com

随着对盐在多种不同疾病发病过程中的深入研究,使得很多疾病的预防和治疗有了新的突破和进展。最新研究发现高盐可能参与内毒素介导的败血症休克,并在炎症反应机制中发挥着至关重要的作用^[6]。本实验拟观察高盐饮食对内毒素休克小鼠炎症因子表达的影响。

1 材料和方法

1.1 动物及器材

C57BL/6 小鼠,雌性,6~8 周,体重 16~20g,购于济南朋悦实验动物技术有限公司,SPF 级饲养。高速冷冻离心机、全自动酶标分析仪购自美国 Thermo Fisher 公司,PCR 仪购自美国 BIO-RAD 公司,PCR 分析仪购自杭州博日科技有限公司。

1.2 主要试剂

TRIzol、反转录试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司);SYBR Green MasterMix(美国 Vazyme 公司);IL-6 和 IL-12p40 ELISA 试剂盒(美国 BioLegend 公司);LPS(美国 Sigma 公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型制备及标本采集 C57BL/6 小鼠适应喂养 1 周后,将 20 只小鼠随机分为 2 组,每组各 10 只,分别为高盐饮食组和正常饮食组。高盐饮食组饮用含 2.5% NaCl 盐水,正常饮食组饮用不含 NaCl 的普通饮用水。14d 后,2 组分别腹腔注射 LPS(500 μg/只),观察致死率;腹腔注射 LPS(200 μg/只),12h 后摘眼球取血并断颈处死,取血清、脾脏和腹腔细胞检测 IL-6 和 IL-12p40 含量。

1.3.2 小鼠腹腔和脾脏细胞的制备 颈部脱臼法处死小鼠,置 75% 酒精浸泡消毒 5min,置动物于解剖台上,固定四肢,剪开腹壁暴露出腹膜,用 5 ml 注射器从小鼠下腹壁将 5 ml PBS 注入腹腔中,同时揉压腹膜壁,反复冲洗 3~5 次,吸出液体,离心后得到腹腔细胞。剪开腹壁取出脾脏,取 1/3 脾脏剪成碎块后,用毛玻片轻柔研磨组织碎片,经 400 目滤网制成单细胞悬液,离心后得到脾脏细胞。

1.3.3 小鼠血清 IL-6 和 IL-12p40 的水平检测 摘眼球取血后 4000 rpm,10 min 离心,取得血清后放于 -80℃ 保存。使用 IL-6 和 IL-12p40 的 ELISA 试剂盒检测其在血清中浓度,按照试剂盒说明书操作。

1.3.4 实时定量 PCR(qPCR)检测脾脏和腹腔细胞中 IL-6 和 IL-12p40 的表达 从 Pubmed 数据库

中获取小鼠的 IL-6 和 IL-12p40 序列,引物购买于上海生工生物工程公司。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参对照。具体引物序列如下:

IL-6

上游引物:5'-CCAGAAACCGCTATGAAGTTC-CT-3',

下游引物:5'-CACCAGCATCAGTCCCAAG-3';

IL-12p40

上游引物:5'-GACCATCACTGTCAAAGAGTTTCTAGAT-3',

下游引物:5'-AGGAAAGTCTTGTGTTTTGAAATTTTTTAA-3';

GAPDH

上游引物:5'-CTAGAG AGCTGACAGTGGG-TAT-3',

下游引物:5'-AGACGACCAATGCGTCCAAA-3'。

用 TRIzol 提取总的 RNA,用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒合成 cDNA,具体步骤按照试剂说明进行,将 20 μl 体系放入 PCR 仪中,进行 qPCR。反应条件为:95℃ 10 min 预变性;95℃ 15 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,共 40 个循环。qPCR 的结果分析: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法, $\Delta\Delta Ct = (\text{样本的 Ct 值} - \text{内参的 Ct 值}) - (\text{对照组 Ct 值} - \text{内参的 Ct 值})$ 。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 5 统计软件进行数据分析。

2 结果

2.1 高盐饮食增加小鼠内毒素休克的死亡率

高盐饮食能够显著增加内毒素引起的小鼠死亡率。在腹腔注射 LPS 96 h 后,高盐饮食组小鼠全部死亡,而正常饮食组小鼠近有 50% 的小鼠仍然存活。见图 1。

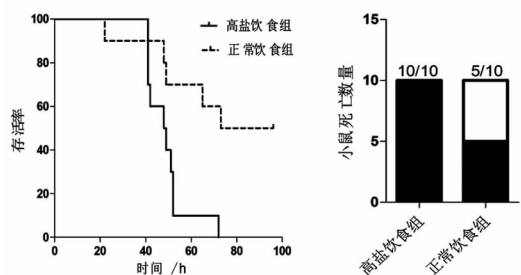


图 1 高盐饮食增加小鼠内毒素休克的死亡率

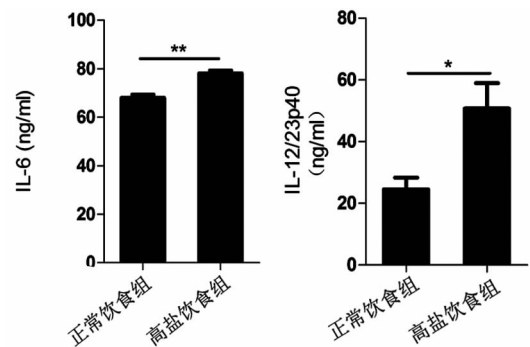
2.2 高盐饮食促进内毒素休克小鼠血清中 IL-6 和 IL-12p40 的表达

高盐饮食组小鼠血清中 IL-6 和 IL-12p40 的表达较正常饮食组明显升高,差异具有统计学意义($t = 5.534, P < 0.01; t = 2.906, P < 0.05$),其中 IL-12p40 升高的更为明显。见图 2。

2.3 高盐饮食促进内毒素休克小鼠中 IL-6 和 IL-12p40 mRNA 水平的表达

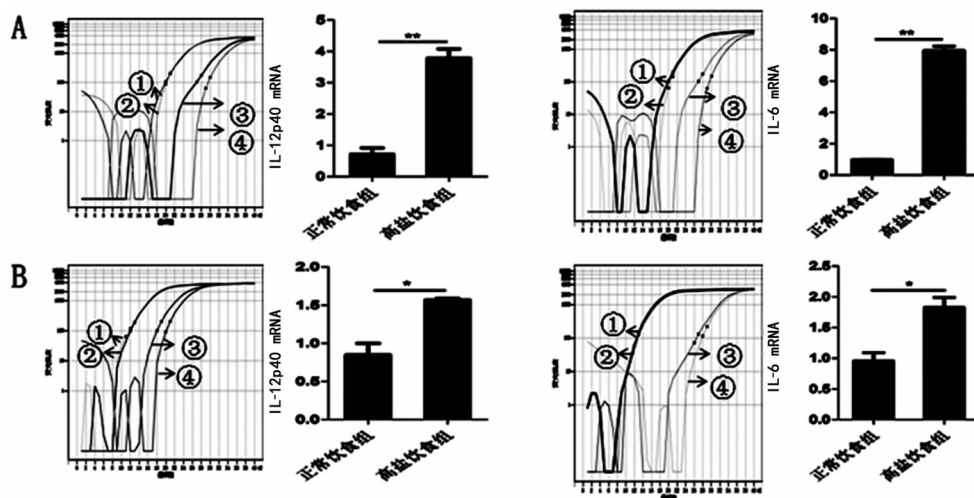
高盐饮食组小鼠脾脏细胞中 IL-6 和 IL-12p40 的表达较正常饮食组明显升高,差异具有统计学意义($t = 4.075, P < 0.05; t = 4.758, P < 0.01$)。特别是在高盐饮食小鼠腹腔细胞中,炎症因子 IL-6 和 IL-12p40 的表达水平升高的更加明显,差异具有统计学意义($t = 25.47, P < 0.001; t = 8.589, P <$

0.001)。见图 3。



注:与正常饮食组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图2 高盐饮食促进内毒素休克小鼠血清中 IL-6 和 IL-12p40 的表达



注:A为腹腔细胞中 IL-6 和 IL-12p40 的表达,B为脾细胞 IL-6 和 IL-12p40 的表达;与正常饮食组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;
①②分别为高盐饮食组和正常饮食组的 GAPDH 基因的扩增曲线,③④分别为高盐饮食组和正常饮食组 IL-12 p40 和 IL-6 基因的扩增曲线

图3 高盐促进内毒素休克小鼠中 IL-6 和 IL-12p40 mRNA 水平的表达

3 讨论

内毒素休克模型是目前最接近感染性休克患者病情的动物模型^[7]。因此,我们利用内毒素休克模型来探究高盐对感染性休克等炎症性疾病的影响,为临床预防和治疗提供理论依据。

盐是细胞存活不可或缺的矿物质,其对于机体内一些细胞的功能是至关重要的,比如维持渗透压、体内液体的分布、正常 pH 值和大部分的新陈代谢过程等^[8]。高盐与多种疾病的发病风险都存在着一定的关系,比如心血管疾病、慢性炎症、自身

免疫性疾病以及肿瘤^[9-10]。大量研究表明高盐不仅能升高血压,同时也会导致组织损伤,如左心室肥厚^[11]。近几年,对于盐在多种疾病中所起到的病理、生理作用引起了广泛的关注,很多研究人员也试图通过这个靶点来预防和治疗某些疾病。

有研究统计,临床上多数的脓毒血症是由于革兰氏阴性菌引起的,已被公认为引起脓毒血症的主要分子是位于革兰氏阴性菌的细胞壁上的 LPS,也称为内毒素。在 LPS 的作用下,体内会生成“细胞因子风暴”(cytokine storm),即会产生很多的 IL-6、IL-12、TNF- α 等,从而引起机体炎症性失控性级联

反应,最终引起内毒素休克、组织损伤和多器官功能障碍^[12]。很多病理发生发展的关键环节是炎症因子的释放。值得注意的是,有研究发现在皮肤炎症部位有钠离子的聚积,在高盐饮食的动物中钠离子的聚积能够增加皮肤的抗菌防御能力^[13]。然而钠离子的聚积在炎症反应中究竟发挥什么样的作用鲜有报道。本文就高盐对内毒素休克小鼠的炎症因子的影响做了初步的探讨。

当 LPS 所引起的内毒素休克发生时,机体免疫细胞因受到刺激发生活化,从而引发一系列的炎症反应^[14]。IL-6 可参与机体的免疫应答,诱导多种免疫细胞活化;IL-12p40 是树突状细胞分泌的重要细胞因子,它可促使 T 细胞活化,激活免疫细胞的应答反应。因此 IL-6 和 IL-12p40 在内毒素休克的炎症反应中发挥着重要的作用。

在本研究中,我们发现高盐饮食显著加重了内毒素引起的小鼠死亡。这就表明高盐饮食组小鼠不耐受内毒素休克所带来的损伤。随后我们发现高盐饮食组小鼠血清、腹腔和脾脏细胞中,炎症因子 IL-6 和 IL-12p40 的表达较正常饮食小鼠显著升高,高盐加重了 LPS 引起的细胞因子风暴,即加重了 LPS 引起的内毒素休克。研究表明 LPS 广泛作用于机体多组织、器官,其中最主要的效应细胞是内皮细胞、巨噬细胞和中性粒细胞^[15],然而高盐对内毒素休克的作用具体的机制仍不是很清楚,这也是我们下一步的要继续探索的。

参考文献:

- [1] Mozaffarian D, Fahimi S, Singh GM, et al. Global sodium consumption and death from cardiovascular causes[J]. N Engl J Med, 2014, 371(7): 624-634. DOI: 10. 1056/NEJMoa1304127.
- [2] He FJ, Li J, Macgregor GA. Effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2013(4): CD004937. DOI: 10. 1002/14651858. CD004937. pub2.
- [3] Sundström B, Johansson I, Rantap-Dahlqvist S. Interaction between dietary sodium and smoking increases the risk for rheumatoid arthritis: results from a nested case-control study[J]. Rheumatology (Oxford), 2015, 54(3): 487-493. DOI: 10. 1093/rheumatology/keu330.
- [4] Farez MF, Fiol MP, Gaitán MI, et al. Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatr, 2015, 86(1): 26-31. DOI: 10. 1136/jnnp-2014-307928.
- [5] DElia L, Galletti F, Strazzullo P. Dietary salt intake and risk of gastric cancer[J]. Cancer Treat Res, 2014, 159: 83-95. DOI: 10. 1007/978-3-642-38007-5_6.
- [6] Zhang WC, Zheng XJ, Du LJ, et al. High salt primes a specific activation state of macrophages, M (Na) [J]. Cell Res, 2015, 25(8): 893-910. DOI: 10. 1038/cr. 2015. 87.
- [7] Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock[J]. J Surg Res, 1990, 49(2): 186-196. DOI: 10. 1016/0022-4804(90)90260-9.
- [8] Pohl HR, Wheeler JS, Murray HE. Sodium and potassium in health and disease[J]. Met Ions Life Sci, 2013, 13: 29-47. DOI: 10. 1007/978-94-007-7500-8_2.
- [9] O'Donnell M, Mente A, Rangarajan S, et al. Urinary sodium and potassium excretion, mortality, and cardiovascular events[J]. N Engl J Med, 2014, 371(7): 612-623. DOI: 10. 1056/NEJMoa1311889.
- [10] Mente A, O'Donnell MJ, Rangarajan S, et al. Association of urinary sodium and potassium excretion with blood pressure[J]. N Engl J Med, 2014, 371(7): 601-611. DOI: 10. 1056/NEJMoa1311989.
- [11] 黄燕, 汪家瑞, 朱文玲, 等. 高盐饮食对大鼠左室肥厚的影响[J]. 高血压杂志, 2004, 12(3): 242-245. DOI: 10. 16439/j. cnki. 1673-7245. 2004. 03. 019.
- [12] 郭爱华, 姜勇. 从全身炎症反应综合征到脓毒性休克[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(08): 500-503.
- [13] Jantsch J, Schatz V, Friedrich D, et al. Cutaneous Na + storage strengthens the antimicrobial barrier function of the skin and boosts macrophage-driven host defense [J]. Cell Metab, 2015, 21(3): 493-501. DOI: 10. 1016/j. cmet. 2015. 02. 003.
- [14] 熊化保, 司传平, 张惠. 固有淋巴细胞研究进展[J]. 济宁医学院学报, 2015, 38(2): 77-81. Doi: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2015. 02. 001.
- [15] 冯晓彤, 罗燕薇, 永强, 等. 高盐摄入小鼠循环单核细胞亚群的动态变化[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(6): 775-779. DOI: 10. 13423/j. cnki. cjmi. 007786.

(收稿日期 2016-12-09)

(责任编辑:石俊强)