

• 论 著 •

# 氯化锂抑制铜绿假单胞菌感染引起的炎症反应调节机制研究\*

傅 强, 陈 康<sup>△</sup>, 黄福达, 缪丽韶, 杨山虹, 张秀明  
(广东省中山市人民医院检验医学中心 528403)

**摘 要:**目的 探讨氯化锂(LiCl)在铜绿假单胞菌感染时对炎症反应的调节作用。方法 Western-blot 检测 LiCl 应用的有效性;实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)检测铜绿假单胞菌感染的巨噬细胞和中性粒细胞中炎症因子的表达;流式细胞术检测铜绿假单胞菌感染前后巨噬细胞和中性粒细胞凋亡情况。结果 Western-blot 结果显示, LiCl 能在巨噬细胞和中性粒细胞中促进糖原合成激酶 3, 9 位丝氨酸的磷酸化[p-GSK-3 $\beta$ (Ser 9)], 上调  $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)的表达, 证明 LiCl 应用的有效性; qPCR 结果显示, 在铜绿假单胞菌感染后, LiCl 促进抑炎因子的表达, 抑制促炎因子的表达;流式细胞术结果显示, 在铜绿假单胞菌感染后, LiCl 促进巨噬细胞和中性粒细胞的凋亡。结论 在铜绿假单胞菌感染后, LiCl 通过调节炎症因子的分泌和炎症细胞的凋亡发挥免疫负调节作用。

**关键词:**氯化锂; 铜绿假单胞菌; 炎症因子; 细胞凋亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.01.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)01-0013-03

## The modulation mechanism of LiCl inhibited the Pseudomonas aeruginosa-induced inflammation\*

FU Qiang, CHEN Kang<sup>△</sup>, HUANG Fuda, MIAO Lishao, YANG Shanhong, ZHANG Xiuming

(Division of Clinical Laboratory, Zhongshan City People's Hospital, Zhongshan, Guangdong 528403, China)

**Abstract:** Objective To explore the role of LiCl in modulating bacterial-mediated inflammation after Pseudomonas aeruginosa infection. Methods Western-blot was used to determine the efficacy of LiCl usage. The expression of inflammatory cytokines in Pseudomonas aeruginosa-infected macrophages and neutrophils was detected by qPCR. Cell apoptosis was measured by flow cytometry. Results Western-blot data showed that LiCl up-regulated the protein levels of p-GSK-3 $\beta$ (Ser 9) and  $\beta$ -catenin in macrophages and neutrophils, indicating the efficacy of LiCl usage. qPCR data indicated that LiCl enhanced the expression of anti-inflammatory cytokines and suppressed the expression of pro-inflammatory cytokines in Pseudomonas aeruginosa-infected macrophages and neutrophils. Flow cytometry data indicated that LiCl could promoted the apoptosis of Pseudomonas aeruginosa-infected macrophages and neutrophils. Conclusion LiCl inhibited the Pseudomonas aeruginosa-induced inflammation, via regulating the inflammatory cytokine expression and the apoptosis of inflammatory cells.

**Key words:** LiCl; pseudomonas aeruginosa; inflammatory cytokine; cell apoptosis

铜绿假单胞菌是广泛存在于自然界的革兰阴性条件致病菌,可引起多种机会感染,如医院获得性肺炎等。尽管抗菌药物的治疗可以控制细菌感染,却不可逆转因细菌感染引起的过度炎症反应<sup>[1]</sup>。因此,如何在杀菌的同时抑制过度炎症反应引起的免疫病理损伤是治疗细菌感染的关键。作为一个小分子化合物, LiCl 可参与调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路(经典 Wnt 通路),其通过促进 p-GSK-3 $\beta$ (Ser 9) 9 位丝氨酸的磷酸化,同时抑制 GSK3 $\beta$  酶活性,抑制  $\beta$ -catenin 的降解,使  $\beta$ -catenin 在胞浆中累积并转移到胞核促进靶基因的转录,参与调控多种生理或病理过程<sup>[2]</sup>。研究报道, LiCl 可发挥抑制炎症作用,如在 LPS 诱导的炎症反应<sup>[3]</sup>、TLR 介导的慢性小肠炎中抑制炎症反应<sup>[4]</sup>,在病原体感染如弗朗西斯氏菌感染中发挥抑制炎症作用<sup>[5]</sup>。然而, LiCl 在铜绿假单胞菌感染中的炎症调控作用尚未知。除了调节炎症反应, LiCl 可调节细胞凋亡。据报道, LiCl 促进巨噬细胞<sup>[6]</sup>和神经细胞<sup>[7]</sup>的凋亡;抑制淋巴细胞<sup>[8]</sup>和上皮细胞<sup>[9]</sup>的凋亡。然而, LiCl 对铜绿假单胞菌感染的巨噬细胞和中性粒细胞的凋亡的调节尚不清楚。本研究针对 LiCl 对炎症因子的分泌和炎症细胞凋亡的调节进行研究,明确在铜绿假单胞菌感染时 LiCl 对炎症反应的调控作用。作者

研究发现,在铜绿假单胞菌感染时, LiCl 通过调节细胞因子的表达,促进炎症细胞的凋亡,发挥抑制炎症反应的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞培养** RAW264.7 细胞培养于 DMEM 完全培养基中,于 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。中性粒细胞取自 SPF 级 6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠的骨髓细胞。Percoll 密度梯度离心法分离小鼠骨髓中的中性粒细胞,培养于 RPMI-1640 完全培养基中,于 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。进行试验时,在培养基中加入 10 mmol/L LiCl/10 mmol/L NaCl,刺激细胞 1 h,更换原培养基后进行试验。

**1.2 Western-blot** 蛋白裂解液收集细胞蛋白,蛋白定量后,经 SDS-PAGE 电泳按相对分子质量大小分离蛋白后,转膜至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉室温孵育 1 h,4℃过夜孵育 p-GSK-3 $\beta$ (Ser 9)(1:1 000)和  $\beta$ -catenin(1:1 000)的一抗,洗膜后孵育抗兔二抗。曝光法检测 p-GSK-3 $\beta$ (Ser 9)和  $\beta$ -catenin 的表达水平。

**1.3 qPCR** TRIzol 法提取 RNA。将 1  $\mu$ g RNA 反转录成 cDNA, SYBR Green 进行 Real-time RT-PCR 扩增,检测白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、

\* 基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(81401645);广东省医学科研基金资助项目(B2014447);中山市科技计划资助项目(2014A1FC098);中山市医疗科研项目(2015J004)。

作者简介:傅强,男,主管技师,主要从事临床检验方向的研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail: ck521620@163.com。

肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的表达。IL-10、IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和管家基因  $\beta$ -actin 的引物序列见表 1。

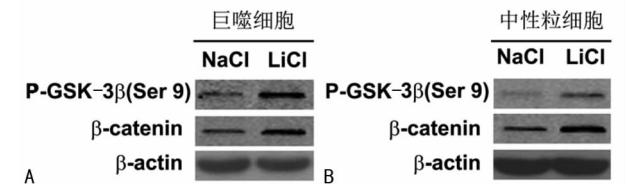
表 1 引物序列		
表达产物	引物序列(5'→3')	上下游
$\beta$ -actin	GAT TAC TGC TCT GGC TCC TAG C	上游
	GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG C	下游
IL-10	AGC TGG ACA ACA TAC TGC TAA CCG AC	上游
	CTT GAT TTC TGG GCC ATG CTT CTC TG	下游
IL-6	CAC AAG TCC GGA GAG GAG AC	上游
	CAG AAT TGC CAT TGC ACA AC	下游
IL-1 $\beta$	CGC AGC AGC ACA TCA ACA AGA GC	上游
	TGT CCT CAT CCT GGA AGG TCC ACG	下游
TNF- $\alpha$	CAC AGA AAG CAT GAT CCG CGAC	上游
	TGC CAC AAG CAG GAA TGA GAA GAG	下游

1.4 流式细胞术 收集 LiCl 或 NaCl 处理过的铜绿假单胞菌感染前后的单细胞悬液。细胞悬液避光孵育于含 5  $\mu$ L 膜联蛋白 (Annexin V) 和 5  $\mu$ L 碘化丙啶 (PI) 的结合缓冲液,流式细胞仪上分析细胞凋亡情况 (PI 阳性细胞数量)。

1.5 统计学处理 用 SPSS19.0 进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用配对  $t$  检验,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

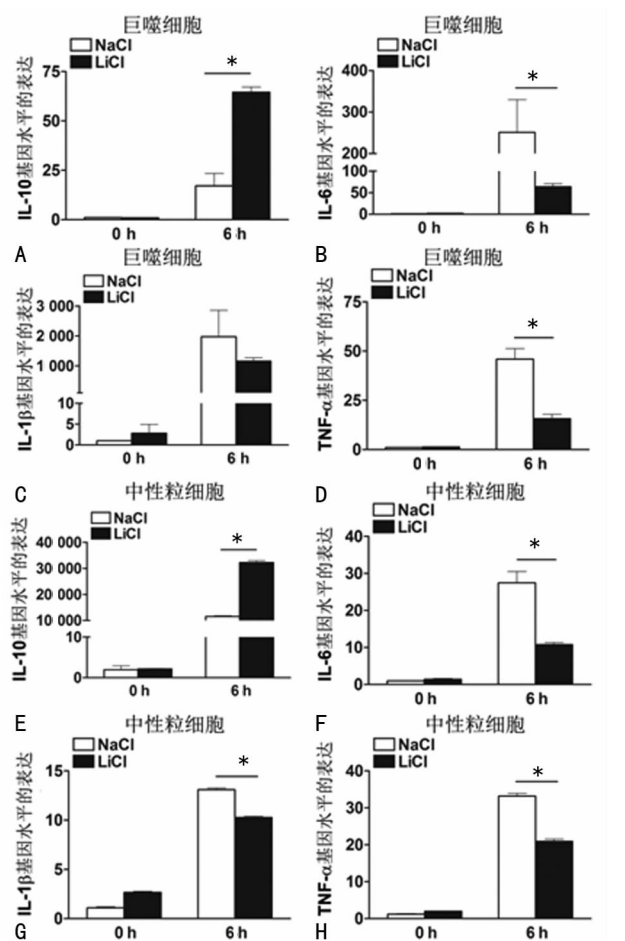
2.1 LiCl 应用的有效性 LiCl 可调节 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路,通过促进 p-GSK-3 $\beta$  (Ser 9) 丝氨酸的磷酸化,使 GSK3 $\beta$  酶活性丧失, $\beta$ -catenin 表达增高。因此,检测 p-GSK3- $\beta$  (Ser 9) 和  $\beta$ -catenin 的蛋白水平以验证 LiCl 应用的有效性。实验结果显示,在巨噬细胞 (图 1A) 和中性粒细胞 (图 1B) 中,相对于 NaCl 处理组, LiCl 均能上调 P-GSK-3 $\beta$  (Ser 9) 和  $\beta$ -catenin 的表达,证明 LiCl 在细胞中应用的有效性。



注:在 LiCl 或 NaCl 处理的巨噬细胞 (A) 和中性粒细胞 (B) 中用蛋白印迹的方法检测 p-GSK-3 $\beta$  (Ser 9) 和  $\beta$ -catenin 蛋白水平的表达。数据来源于 3 次独立实验。

图 1 LiCl 应用的有效性

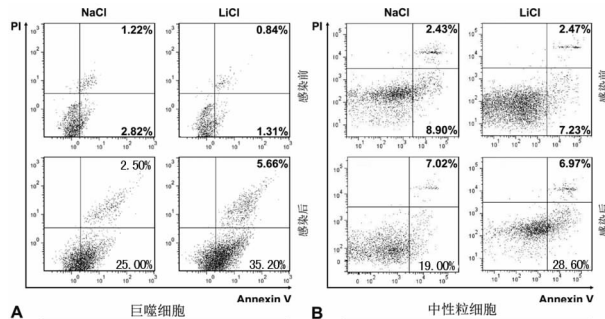
2.2 LiCl 调节炎症因子的分泌 为了研究 LiCl 对炎症因子分泌的调节作用, LiCl 或 NaCl 处理细胞后,采用 PCR 的方法检测了铜绿假单胞菌感染前后炎症因子的表达。实验结果显示,在铜绿假单胞菌感染巨噬细胞 6 h 后, LiCl 促进抑炎因子 IL-10 (图 2A) 的表达,抑制促炎因子 IL-6 (图 2B) 和 TNF- $\alpha$  (图 2D) 的表达,而对 IL-1 $\beta$  (图 2C) 的表达无影响。在中性粒细胞中, LiCl 在感染后 6 h 促进抑炎因子 IL-10 (图 2E) 的表达,抑制促炎因子 IL-6 (图 2F)、IL-1 $\beta$  (图 2G) 和 TNF- $\alpha$  (图 2H) 的表达。在巨噬细胞和中性粒细胞未受细菌感染时 LiCl 对各炎症因子无调节作用 (图 2 A~H, 0 h)。此结果提示 LiCl 在铜绿假单胞菌感染的巨噬细胞和中性粒细胞中抑制炎症反应。



注:在铜绿假单胞菌感染前后的巨噬细胞 (A-D) 和中性粒细胞 (E-H) 中用 PCR 的方法检测 LiCl 或 NaCl 处理后炎症因子 IL-10、IL-6、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  基因水平的变化。数据来源于 3 次独立实验,用  $\bar{x} \pm s$  来表示, \*  $P < 0.05$ ; 0 h 和 6 h 分别表示铜绿假单胞菌未感染及感染后 6 h。

图 2 LiCl 调节炎症因子的分泌

2.3 LiCl 促进炎症细胞的凋亡 除了炎症因子的分泌,炎症细胞的凋亡也是调控炎症反应的一个重要措施。流式细胞术检测 LiCl 对细菌感染前后巨噬细胞和中性粒细胞凋亡的调节。实验结果显示,在细菌感染巨噬细胞后, LiCl 处理组早期凋亡细胞 (Annexin V 单阳性) 和晚期凋亡细胞 (Annexin V 和 PI 双阳性) 数量增多 (图 3A); 在细菌感染中性粒细胞后, LiCl 处理组早期凋亡细胞 (Annexin V 单阳性) 数量增多 (图 3B)。然而,在细菌感染前, LiCl 对巨噬细胞和中性粒细胞的凋亡均无影响 (图 3A、3B)。



注:在铜绿假单胞菌感染前后的巨噬细胞 (A) 和中性粒细胞 (B) 中用流式细胞术的方法检测细胞凋亡;数据来源于 3 次独立实验。

图 3 LiCl 促进细胞凋亡

3 讨 论

LiCl 作为情绪稳定剂可临床应用于精神双相障碍<sup>[10]</sup>的治疗,并在肺炎克雷伯菌感染<sup>[11]</sup>、胰腺炎<sup>[12]</sup>、糖尿病<sup>[13]</sup>中有潜在的治疗作用,然而在铜绿假单胞菌感染时,LiCl 发挥的作用还尚未知。本研究发现,LiCl 可通过调节细胞因子的分泌和炎症细胞的凋亡,在铜绿假单胞菌感染时发挥免疫负调节作用。

据报道,LiCl 在多种疾病中可抑制炎症反应而抑炎机制不尽相同;在精神双向障碍中,LiCl 通过抑制炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和活性氮自由基的表达抑制炎症反应<sup>[3]</sup>;在肺炎克雷伯菌感染时,LiCl 通过抑制炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和细胞趋化因子等抑制炎症反应<sup>[11]</sup>;Abed 等<sup>[12]</sup>报道 LiCl 通过抑制炎症反应中的多形核细胞的活性在胰腺炎中发挥抑炎作用。本研究发现,LiCl 通过调节多个细胞因子,抑炎因子 IL-10 和促炎因子 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ ,在铜绿假单胞菌感染的巨噬细胞和中性粒细胞中发挥炎症负调节作用。

炎症细胞的凋亡是机体降低炎症反应的另一策略。LiCl 可调节多种细胞的凋亡。研究报道,LiCl 促进巨噬细胞<sup>[6]</sup>和神经细胞<sup>[7]</sup>的凋亡,抑制急性 T 淋巴细胞白血病细胞<sup>[8]</sup>和肾小管上皮细胞<sup>[9]</sup>的凋亡。因此,不同的细胞类型或不同的刺激条件,LiCl 调节凋亡的作用存在差异。流式细胞术结果显示,在铜绿假单胞菌感染时,LiCl 促进巨噬细胞和中性粒细胞的凋亡。

综上所述,LiCl 通过调节炎症因子的分泌和炎症细胞的凋亡抑制炎症反应。本研究发现 LiCl 在铜绿假单胞菌感染时有免疫负调节作用,为感染引起的宿主过度炎症反应的治疗提供了备选方案。

参考文献

[1] Wu MH,Zhang P,Huang X. Toll-like receptors in innate immunity and infectious diseases[J]. *Front Med China*, 2010,4(4):385-393.

[2] Hao HP,Wen LB,Li JR, et al. LiCl inhibits PRRSV infection by enhancing Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and suppressing inflammatory responses[J]. *Antiviral Res*, 2015, 117(5):99-109.

[3] Nahman SH,Belmarker RH,Azab AN. Effects of lithium on lipopolysaccharide-induced inflammation in rat primary glia cells[J]. *Innate Immun*, 2012,18(3):447-458.

[4] Hofmann C,Dunger N,Schoelmerich J, et al. Glycogen

synthase kinase 3- $\beta$ ; a master regulator of toll-like receptor-mediated chronic intestinal inflammation[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2010,16(11):1850-1858.

[5] Zhang, P, Katz J, Michalek SM. Michalek Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) inhibition suppresses the inflammatory response to Francisella infection and protects against tularemia in mice[J]. *Mol Immunol*, 2009,46(4):677-687.

[6] De Meyer I,Martinet W, Van Hove CE, et al. Inhibition of inositol monophosphatase by Lithium chloride induces selective macrophage apoptosis in atherosclerotic plaques[J]. *Br J Pharmacol*, 2011,162(6):1410-1423.

[7] Gomez-Sintes R, Lucas JJ. NFAT/Fas signaling mediates the neuronal apoptosis and motor side effects of GSK-3 inhibition in a mouse model of lithium therapy[J]. *J Clin Invest*, 2010,120(7):2432-2445.

[8] Pietruczuk K, Jóźwik A, Ruckemann-Dziurdzińska K, et al. Cytoprotective effect of Lithium against spontaneous and induced apoptosis of lymphoid cell line MOLT-4[J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2009,47(4):639-646.

[9] Ramchandran H, Rajadhyaksha MS. Lithium affects histogenesis of embryonic chick retina[J]. *Toxicol Int*, 2012, 19(2):153-157.

[10] Curran G,Ravindr A. Lithium for bipolar disorder: a review of the recent literature[J]. *Expert Rev Neurother*, 2014,14(9):1079-1098.

[11] Tsao N,Kuo CF, Chiu CC, et al. Protection against Klebsiella pneumoniae using Lithium chloride in an intragastric infection model[J]. *Antimicrob Agents Chem*, 2015, 59(3):1525-1533.

[12] Abed A,Minaiyan M, Mahzouni Possible beneficial effects of Lithium chloride on cerulein-induced acute pancreatitis in mice[J]. *Res Pharm Sci*, 2014,9(2):135-141.

[13] Kanzariya NR, Patel RK, Patel NJ. Antidiabetic and vasoprotective activity of lithium: Role of glycogen synthase kinase-3[J]. *Indian J Pharmacol*, 2011,43(4):433-436.

(收稿日期:2016-07-13 修回日期:2016-09-18)

(上接第 12 页)

of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases. Report of the interorganizational task force on nucleic acid amplification testing of blood donors[J]. *Transfusion*, 2000,40(2):143-159.

[3] 王芳,栾燕,刘显智. 核酸检测技术(NAT)在献血者人类免疫缺陷病毒筛查中的应用[J]. *中国输血杂志*, 2010,23(10):892-894.

[4] 于志军,邓雪莲,高慧卉,等. 血清学检测与核酸检测在献血者血液筛查中的相关性研究[J]. *实用预防医学*, 2014, 21(5):532-534.

[5] 张晶秋. 丙型肝炎临床检验技术现状及研究进展[J]. *中外医疗*, 2015,9(5):193-194.

[6] 郑春苏,黄湘宁,黄瑜璇. 血液标本检验前的质量控制[J]. *检验医学与临床*, 2009,6(18):1589.

[7] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京:人民军医出版社,2007.

[8] 王德文,师玲玲,刘赴平,等. 现行常规采血流程对 HIV RNA 筛查的影响评估[J]. *中国热带医学*, 2007,7(11):2100-2101.

[9] 邱本慧,杨冬燕. 储血设备温度监控方法比较[J]. *重庆医学*, 2016,45(2):241-242.

[10] 谢军,张鹏,殷锦堂,等. 血液运输中温度监控及温控效果比对[J]. *甘肃医药*, 2011,30(12):728-732.

(收稿日期:2016-08-28 修回日期:2016-11-17)