**分类号:**

**UDC:**

**密级:**

**IL-33 调节中性粒细胞抗金黄色葡萄球菌感**

**染的作用研究**

# **The effect of IL-33 regulating neutrophil to Staphylococcus aureus infection**

姓 名： 倪 倩

学 号： 2111243006

院 系： 基础学院

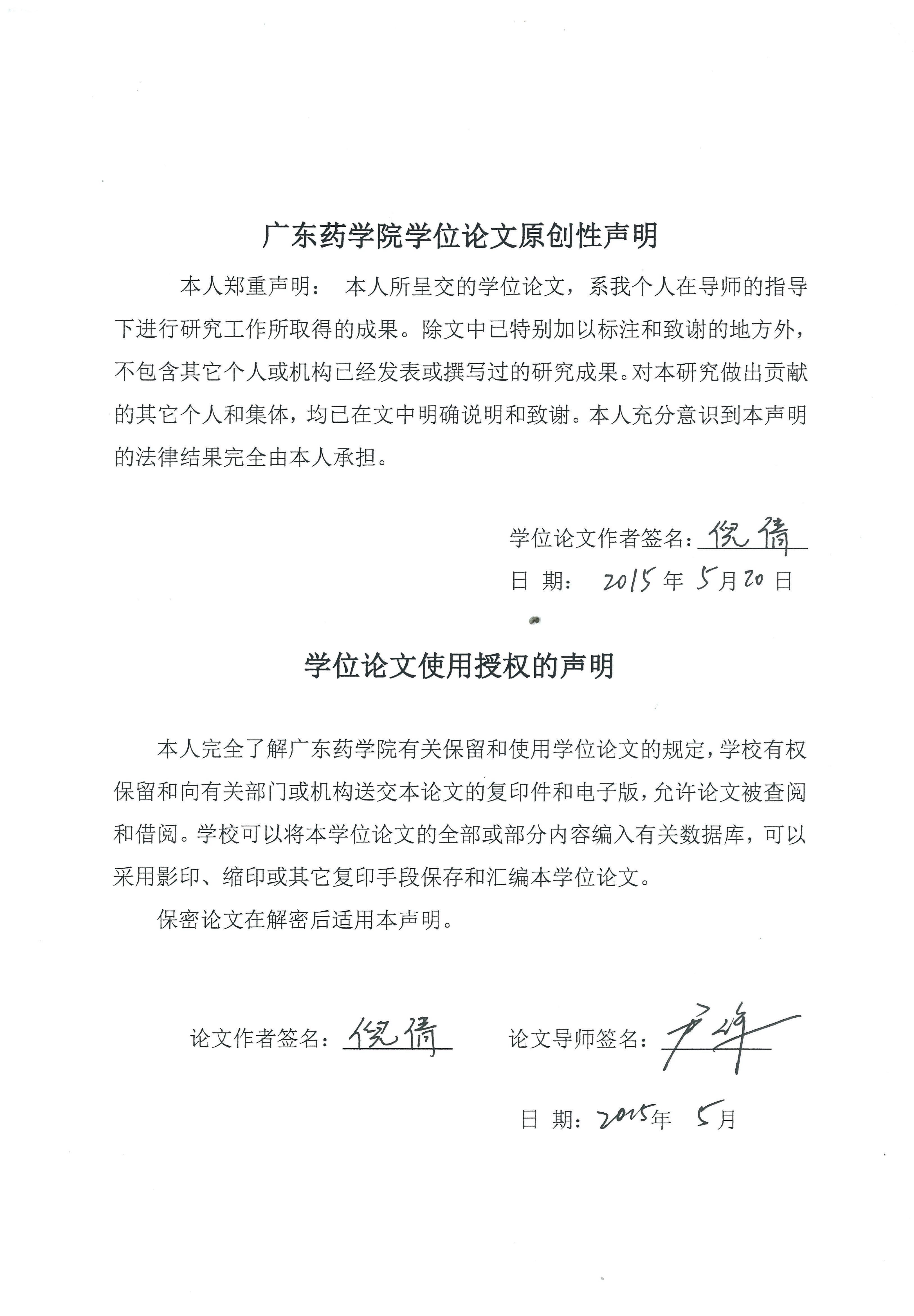
专 业： 免疫学 研究方向： 抗感染免疫

导师姓名： 尹 辉 教授

论文提交日期： 2015 年 3 月论文答辩日期： 2015 年 5 月 7 日学位授予单位： 广东药学院

二○一五年五月

广东药学院硕士研究生学位论文





IL-33

目 录

**[The effect of IL-33 regulating neutrophil to Staphylococcus aureus infection](#_Toc686967566)** 1

[调节中性粒细胞抗金黄色葡萄球菌感染的作用研究](#_Toc686967567) 4

[摘要](#_Toc686967568) 4

[结论：](#_Toc686967569) 4

[Abstract](#_Toc686967570) 4

[第一章 序言](#_Toc686967571) 5

[第二章 IL-33免疫调节MRSA腹腔感染的作用](#_Toc686967572) 5

[2.1 前言](#_Toc686967573) 6

[2.2 实验材料](#_Toc686967574) 6

[2.2.1 主要实验材料](#_Toc686967575) 6

[2.2.2 主要试剂](#_Toc686967576) 6

[2.2.3 主要仪器设备](#_Toc686967577) 6

[2.2.4 主要溶液配制](#_Toc686967578) 7

[2.3 实验方法](#_Toc686967579) 7

[2.3.1 金黄色葡萄球菌（MRSA）的培养](#_Toc686967580) 7

[2.3.2 腹腔感染模型的建立](#_Toc686967581) 8

[2.3.3 IL-33处理](#_Toc686967582) 8

[2.3.4 小鼠死亡曲线](#_Toc686967583) 8

[2.3.5 感染后小鼠的处理](#_Toc686967584) 8

[2.3.6 ELISA检测炎性细胞因子表达](#_Toc686967585) 8

[2.3.7 IL-33在中性粒细胞清除后腹腔感染中的作用](#_Toc686967586) 9

[2.3.8 统计分析](#_Toc686967587) 9

[2.4 实验结果](#_Toc686967588) 9

[2.4.1 小鼠存活率变化](#_Toc686967589) 9

[组小鼠的存活率明显上升。在84小时内，PBS对照组小鼠存活率仅为20%，而IL-33](#_Toc686967590) 9

[2.4.2 血液、腹腔液及脏器细菌负荷量](#_Toc686967591) 9

[2.4.3 血液与腹腔液中性粒细胞数目](#_Toc686967592) 9

[2.4.4 外周血及腹腔液中炎性细胞因子的表达](#_Toc686967593) 9

[2.4.5 IL-33免疫调节呈中性粒细胞依赖性](#_Toc686967594) 10

[2.5 讨论](#_Toc686967595) 10

[第三章 IL-33对中性粒细胞功能的影响](#_Toc686967596) 10

[3.1 前言](#_Toc686967597) 10

[3.2 实验材料](#_Toc686967598) 10

[3.2.1 主要实验材料](#_Toc686967599) 10

[3.2.2 主要试剂](#_Toc686967600) 10

[⑶Percoll分离液配制：Percoll使用液（100% Percoll）：取3.15 ml 100% Percoll加入](#_Toc686967601) 12

[3.3 实验方法](#_Toc686967602) 12

[3.3.1 金黄色葡萄球菌（MRSA）的培养（同第二章）](#_Toc686967603) 12

[3.3.2 中性粒细胞分离（不连续的密度梯度骨髓- Percoll离心法）](#_Toc686967604) 12

[3.3.3 Transwell检测中性粒细胞趋化功能](#_Toc686967605) 13

[3.3.4 流式细胞术检测中性粒细胞吞噬功能](#_Toc686967606) 13

[3.3.5 溶细胞法检测中性粒细胞的杀菌功能](#_Toc686967607) 13

[3.3.6 流式细胞术检测中性粒细胞趋化因子CXCR2或粘附分子CD11b的表达](#_Toc686967608) 14

[3.3.7 流式细胞术检测中性粒细胞的呼吸爆发](#_Toc686967609) 14

[3.3.8 流式细胞术检测p-AKT和p-mTOR表达](#_Toc686967610) 14

[3.3.9 mTOR信号对中性粒细胞杀菌功能的影响A．不同浓度雷帕霉素对中性粒细胞杀菌的影响](#_Toc686967611) 14

[⑸2、3号EP管各加入3µl 10µg/ml IL-33，1、4号EP管各加入3µl PBS，于37 ℃含](#_Toc686967612) 15

[3.3.10 统计分析](#_Toc686967613) 15

[3.4 实验结果](#_Toc686967614) 15

[3.4.1 IL-33对中性粒细胞趋化功能的影响](#_Toc686967615) 15

[3.4.2 IL-33对中性粒细胞吞噬功能的影响](#_Toc686967616) 15

[3.4.3 IL-33对中性粒细胞杀菌功能的影响](#_Toc686967617) 15

[3.4.4 流式细胞术检测IL-33对中性粒细胞呼吸爆发的影响](#_Toc686967618) 15

[3.4.5 流式细胞术检测IL-33对中性粒细胞粘附分子CD11b表达的影响](#_Toc686967619) 15

[3.4.6 mTOR信号调控中性粒细胞杀菌](#_Toc686967620) 16

[3.5 讨论](#_Toc686967621) 16

[第四章 IL-33参与抗MRSA皮肤感染的作用](#_Toc686967622) 16

[4.1 前言](#_Toc686967623) 16

[4.2 实验材料](#_Toc686967624) 16

[4.2.1 主要实验材料](#_Toc686967625) 16

[4.2.2 主要试剂](#_Toc686967626) 16

[anti-human IL-33-FITC美国Biolegend公司anti-mouse ELA2美国Abcam公司Donkey anti-rabbit IgG-FITC美国Biolegend公司](#_Toc686967627) 17

[4.2.3 主要仪器设备](#_Toc686967628) 17

[4.2.4 主要溶液配制](#_Toc686967629) 18

[4.3 实验方法](#_Toc686967630) 18

[4.3.1 皮肤感染模型建立](#_Toc686967631) 18

[4.3.2 给药方法](#_Toc686967632) 18

[4.3.3 组织切片HE染色、革兰氏染色和免疫组织化学1．HE染色](#_Toc686967633) 18

[4.3.4 小鼠皮肤脓肿部位IL-33的表达](#_Toc686967634) 19

[4.3.5 统计分析](#_Toc686967635) 20

[4.4 实验结果](#_Toc686967636) 20

[4.4.1 小鼠皮肤脓肿部位IL-33的表达](#_Toc686967637) 20

[4.4.2 小鼠背部皮肤脓肿溃烂面积和愈合时间](#_Toc686967638) 20

[4.4.3 伤口组织切片HE染色、革兰氏染色](#_Toc686967639) 21

[4.4.4 小鼠皮肤感染伤口局部NETs的形成](#_Toc686967640) 21

[4.5 讨论](#_Toc686967641) 21

[第五章 IL-33调控中性粒细胞胞外诱捕网（NETs）杀菌作用](#_Toc686967642) 21

[5.1 前言](#_Toc686967643) 21

[5.2 实验材料](#_Toc686967644) 21

[5.2.1 主要实验材料](#_Toc686967645) 21

[5.2.2 主要试剂](#_Toc686967646) 22

[5.2.3 主要仪器设备](#_Toc686967647) 22

[5.2.4 主要溶液配制](#_Toc686967648) 23

[5.3 实验方法](#_Toc686967649) 23

[5.3.1 金黄色葡萄球菌（MRSA）的培养（同第二章）](#_Toc686967650) 23

[5.3.2 中性粒细胞分离（同第三章）](#_Toc686967651) 24

[5.3.3 MRSA促进中性粒细胞表达IL-33](#_Toc686967652) 24

[5.3.4 不同浓度的IL-33对MRSA诱导NETs Th成和杀菌率的影响](#_Toc686967653) 24

[5.3.5 检测无NETs作用下，IL-33对MRSA诱导NETs Th成和杀菌率的影响](#_Toc686967654) 24

[用浓度10µg/ml）。](#_Toc686967655) 24

[5.3.6 检测ROS被抑制时，IL-33对MRSA诱导NETs Th成和杀菌率的影响](#_Toc686967656) 25

[按上述相同方法计数CFU。](#_Toc686967657) 25

[5.3.7 NETs免疫荧光染色](#_Toc686967658) 25

[5.3.8 统计分析](#_Toc686967659) 25

[5.4 实验结果](#_Toc686967660) 25

[5.4.1 MRSA促进中性粒细胞表达IL-33](#_Toc686967661) 25

[5.4.2 IL-33对MRSA诱导NETs Th成和杀菌率的影响](#_Toc686967662) 25

[5.4.3 DNA 酶（DNaseⅠ）对 NETs Th成和杀菌率的影响MRSA刺激中性粒细胞生成NETs。DNaseⅠ可降解破坏NETs网状结构，释放其](#_Toc686967663) 26

[5.4.4 ROS抑制剂（DPI）对NETs Th成和杀菌率的影响](#_Toc686967664) 26

[5.5 讨论](#_Toc686967665) 26

[全文总结](#_Toc686967666) 26

[参考文献](#_Toc686967667) 26

[参考文献](#_Toc686967668) 29

[附录1 英文缩写语中文对照](#_Toc686967669) 30

[附录2 攻读学位期间发表的论文](#_Toc686967670) 32

# 调节中性粒细胞抗金黄色葡萄球菌感染的作用研究

硕士研究生：倪倩专业：免疫 学

导师：尹辉教授

摘要

金黄色葡萄球菌是最常见的化脓性球菌，是引起全球院内感染的重要致病菌。近年来，由于抗生素的滥用，导致多重耐药性金黄色葡萄球菌产生，其致病性不断提高，病死率逐年增加。中性粒细胞作为机体固有免疫系统的重要成员，处于机体抵抗病原微生物入侵，特别是化脓性细菌感染的第一道防线。IL-33是近年来发现的一种具有多种生物学功能活性的细胞因子，在感染性疾病、心血管疾病和自身免疫性疾病中发挥重要的调节作用。本课题拟建立多重耐药金黄色葡萄球菌（MRSA）感染小鼠模型，研究IL-33在抗感染免疫中的调节作用，并探讨其相关的免疫学机制，为临床上治疗

MRSA感染提供新的思路和方向。

**研究目的：**

观察IL-33在小鼠MRSA感染模型中的免疫调节作用，并探讨其在抗感染免疫中相关机制；同时结合体外实验，进一步研究IL-33对中性粒细胞杀菌机制的影响，可望阐明抗感染免疫机制及防治多重耐药菌感染提供新的实验依据。

**研究方法：**

建立MRSA感染小鼠腹腔与皮肤两种模型，通过给予外源性IL-33处理，观察小鼠死亡率及感染伤口的愈合时间和愈合率，初步判断IL-33的治疗效果。取腹腔感染小鼠血液和腹腔液检测中性粒细胞数目变化，细胞因子水平及细菌分布情况；感染皮肤组织固定切片，组织病理学分析，观察伤口局部新生血管与肉芽组织生成、细菌的负荷量及皮肤感染部位NETs形成。流式细胞术及免疫荧光检测IL-33调节中性粒细胞的杀菌机制。

**研究结果：**

1. IL-33对MRSA腹腔感染的保护作用

建立小鼠腹腔感染模型，经IL-33治疗后，小鼠的摄食量明显改善，活动增多，

反应也较灵敏，小鼠存活率明显增高；外周血及腹腔液中性粒细胞数目升高；外周血、腹腔液及脏器中细菌负荷量降低；同时炎性细胞因子IL-6、IL-17A和TNF-a水平升高。

2. IL-33对MRSA皮肤感染的保护作用

建立小鼠皮肤感染模型，经IL-33治疗后，皮肤脓肿愈合时间缩短为14天，感染皮肤组织细菌负荷量减少，脓肿部位NETs生成增多。

3. IL-33对中性粒细胞杀菌机制的影响

IL-33预处理后，中性粒细胞的趋化、吞噬、杀伤功能增加；中性粒细胞呼吸爆发和粘附分子表达增加；PI3K/AKT/mTOR信号通路活化增强；促进中性粒细胞的胞外诱捕网（NETs）生成。

结论：

IL-33通过多途径调节中性粒细胞生物学活性，增强机体抗MRSA感染的免疫功

能。

**关键词**：IL-33； 耐药性金黄色葡萄球菌；中性粒细胞；中性粒细胞胞外诱捕网

**The effect of I**

**L-33 regulating neutrophil to Staphylococcus aureus infection**

Graduate: Ni Qian

Major: Immunology Supervisor: Professor Yin Hui

Abstract

*Staphylococcus (S.) aureus* is one of the most common pyogenic cocci, which is the major pathogenic bacterium of nosocomial infection in the world. In recent years, due to the abuse of antibiotics, *S. aureus* obtained drug resistance to multiple antibiotics, and its pathogenicity was constantly increasing with the increased mortality rate. Neutrophils are the important component of innate immune cells in the body against invading microbes, especially the first line of suppurative bacterial infection. IL-33 has recently been found to exhibit a large body of biological activities, which plays an essential role in infectious diseases, cardiovascular diseases and autoimmune diseases. In this article, we will establish the animal model of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) infection in mice, and study the therapeutic effect and immunological mechanism of IL-33 in this model for providing the new evidence for the clinical treatment of MRSA infection.

Objective

We observe the effect of IL-33 in two kinds of infection mice models, and explore the potential immunological mechanism in anti-infection immunity. At the same time, the effect of IL-33 on neutrophil bactericidal activity may be also elucidated *in vitro*. Altogether, this study will provide evidence for the prevention and therapy of MRSA infection.

Methods

To establish two models of peritoneal and cutaneous MRSA infection in mice, we observe the effect of IL-33 on mice survival rate and wound healing time in these animals, respectively. Load of bacteria in different organs, neutrophil in blood and [peritoneal fluid](http://www.iciba.com/peritoneal_fluid), and proinflammatory cytokines were measured in abdomen-infected mice. Local wound neovascularization, granulation tissue production, load of bacteria and the NETs production

Were checked in skin-infected mice. Flow cytometry and immunofluorescent staining were used to detect the bactericidal mechanism of IL-33-regulating neutrophils in bacterial infection.

Results

1. Protective effect of IL-33 on MRSA abdominal infection

After treatment of mice abdominal infection by IL-33, food intake of mice was significantly improved and reaction was sensitive. The survival rate of mice significantly increased. The number of white blood cells in peripheral blood and peritoneal fluid were increased. Bacterial load in peripheral blood, peritoneal fluid and organs were reduced. At

The same time, inflammatory cytokines IL-6、IL-17A and TNF-a levels were increased.

2. Protective effect of IL-33 on MRSA skin infection

After treatment of mice skin infection by IL-33, the healing time of mice was 14 days shorten than the control group. The bacterial load in the IL-33-treated group was decreased compared with the control group. The formation of Neutrophil extracellular traps (NETs) on the abscess parts were increased in the IL-33-treated group.

3. Effect of IL-33 on neutrophil bactericidal mechanism

Neutrophil chemotaxis, phagocytosis and cytotoxicity were increased in the IL-33-pretreated group. The activity of neutrophil respiratory burst and the expression of adhesion molecules were increased the IL-33-pretreated group. Meantime, the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway was activated and the generation of NETs was also increased in IL-33-pretreated mice.

Conclusion

IL-33 regulates neutrophil biological activity through multiple channels, and enhances the immune function of neutrophils in anti-MRSA infection.

**KEy words**

IL-33; *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; Neutrophils; Neutrophil extracellular traps

# 第一章 序言

金黄色葡萄球菌（简称金葡菌）分布广泛、传播快，是引起人类化脓性感染的主要致病菌。金葡菌常可以引起食物中毒、局部化脓性感染、肺炎、化脓性关节炎甚至[会引起坏死性筋膜炎](http://baike.sogou.com/lemma/ShowInnerLink.htm?lemmaId=7826779)、菌血症、脓毒血症等全身感染[1-4]。近年来，由于抗生素的滥用，金葡菌对抗生素产生了多重耐药性，致使其致病性不断升高，病死率逐年增加，尤其抗药性金黄色葡萄球菌（*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA）常引起院内感染的爆发流行。

目前，MRSA已经成为全球医院感染的首要致病菌，成为与HBV、HIV并列的世界范围的三大难题之一。其多重耐药性以及耐药性的迅速变迁成为临床治疗的主要难题。2004年，在美国大部分医院MRSA感染率超过50%，次年又增长了30%[5]。而在我国，自从上世纪七十年代报道MRSA出现以来，感染率逐年快速上升，2008年MRSA全国感染率为67.6%，个别地区高达到80%以上[6]。MRSA几乎对所有常用的抗生素（除万古霉素）都表现耐药[7]。因此，找到能够有效治疗此种多重耐药菌引起感染的有效手段成为亟待解决的难题。

在感染和抗感染的过程中，固有免疫体系处于机体抵抗微生物入侵的第一道防线，担负着控制感染扩散和降低炎症反应的重要角色。中性粒细胞是机体固有免疫的重要组成部分，占血液白细胞总数50%-70%。每微升血液中大约含有4500个中性粒细胞，是外周血中含量最多的白细胞。由于特殊的细胞核形态，常有2-5分叶，叶间有细丝相连，通常也被称为多形核白细胞（Poly-morphonuclear leukocyte, PMN）。中性粒细胞来源于骨髓造血干细胞，在骨髓中分化后，形成粒细胞集落单位，最后在某些特定的因子作用下分化形成各阶段的粒细胞。当细胞核分化到一定阶段时，细胞基本不再增殖。当中性粒细胞在骨髓中发育成熟后，在某些刺激因素下通过穿越骨髓内皮细胞的间孔进入血液，进而发挥其生理功能。中性粒细胞平均只有6-8小时在血管内停留，它们很快穿过血管壁进入组织发挥抗感染作用，而且进入组织后不再返回血液中来。

中性粒细胞处于机体抵抗病原微生物，特别是抵抗化脓性细菌入侵的第一线。当炎症发生时，它们能够被趋化性物质吸引至炎症部位。通过分泌一些细胞毒素使细菌和附近组织细胞的细胞膜被破坏，同时通过其体内的溶酶体酶将吞入细胞内的细菌和

组织碎片分解。这样，入侵的细菌被围困在一个局限的位置而不能向四周扩散。中性粒细胞具有强大的吞噬杀菌作用，其过程主要历经趋化，识别并结合病原微生物，进而将其摄入胞内，最终杀伤并解除病原微生物。中性粒细胞颗粒内含有很多具有抑菌杀菌作用的水解酶、多肽、蛋白质等，并且可以释放一些与抑菌杀菌作用的蛋白水解酶[8]。中性粒细胞强大的杀菌功能依赖于细胞中ROS的迅速产生和细胞内与抑菌杀菌作用相关的蛋白水解酶[9, 10]。并且中性粒细胞在吞噬微生物后，激活细胞内的膜结合

NADPH氧化酶，产生高浓度的超氧化物歧化酶，这一过程被称为“呼吸爆发”[11]。中性粒细胞的数量受到机体的严密调控，目前主要有两种调控方式：（1）控制中

性粒细胞从骨髓进入外周血：骨髓中表达的趋化因子CXCR2，通过结合中性粒细胞表面表达的趋化因子受体CXCR4，阻止中性粒细胞从骨髓渗透入外周血中，而IL-33则可上调骨髓中CXCR2的表达，阻断CXCR4介导的细胞信号传导，进而促进骨髓释放中性粒细胞；（2）及时清除体内多余的中性粒细胞：随着体内的中性粒细胞数量增多时，体内会发生一系列的负反馈调节，释放出相应的信号，从而使中性粒细胞的生成被抑制。

前面提到，当炎症发生时，中性粒细胞主要通过吞噬和脱颗粒两种方式杀灭病原微生物[12]。但这两种方式具有两面性：一方面可以有效杀灭病原微生物，另一方面还会释放出许多生物活性介质，诱发强烈的炎症反应和组织损伤[13]。近年，德国科学家

Brinkmann发现了中性粒细胞的第三种杀菌方式——通过形成中性粒细胞胞外诱捕网

（Neutrophil extracellular traps, NETs）[14]来杀灭微生物。NETs由解聚的染色体网状结构和镶嵌其中的抗微生物颗粒蛋白组成。中性粒细胞可以通过释放DNA网状结构，形成抗微生物的物理屏障和支架结构，限制病原微生物的扩散与转移，增强抗微生物蛋白的作用，并减少对宿主的组织损伤。独特的形态结构使NETs具有优越的抗菌作用[15]：独特的DNA骨架可以限制病原体的扩散及转移从而利于降解微生物的蛋白酶。在杀灭病原微生物时具有以下的优点：（1）促进对病原微生物的物理学屏障，限制病原微生物的活动范围；（2）减少弥散，增强了抗菌剂的生物有效性，使其有更高的杀菌作用；（3）减少抗菌剂对周边组织的损伤；（4）调节免疫反应。因此，NETs被认为是一种高效、广谱、低耗能、低组织损伤地杀灭病原微生物的方式[14-17]。中性粒细胞在释放NETs后死亡，细胞核的分叶状结构消失，常染色质和异染色质均化，随后，颗粒膜和核膜溶解，最后细胞膜破裂。这种死亡方式与传统的细胞坏死、调亡有所不

同，是一种新的细胞死亡途径[18]。NETs在中性粒细胞死亡后依然发挥抗菌功能，但只是在近年才发现NETs具有这种功能，NETs的形成和调控仍需要特定的条件，目前这方面的深入研究仍有欠缺。

IL-33属于IL-1家族新成员，2005年首次报道其基因序列和结构与IL-1þ和IL-18相似。它是近年来发现的一种具有多种生物学功能活性的细胞因子，可作为核内定位分子发挥转录因子的作用，亦可作为一种前炎性细胞因子参与组织特异性免疫病理损伤。IL-33广泛表达于多种免疫细胞和组织实质细胞，如上皮细胞、树突状细胞、活化的巨噬细胞和平滑肌细胞等。近来发现，在嗜酸性粒细胞、血管内皮细胞、肌成纤维细胞及心肌细胞中亦存在IL-33表达，如成纤维细胞在细胞因子IL-1þ、IFN-a刺激后，可明显上调IL-33水平[19]。在细胞发生坏死时，IL-33可作为一种新型“警报素”释放，引起自分泌或旁分泌的炎症反应，且其以促炎性介质释放的方式来源于细胞坏死并非细胞凋亡[20]。

据报道，IL-33与巨噬细胞表面的ST2L结合后，促进巨噬细胞分泌TNF-a，从而加强对脂多糖抗原的吞噬作用促进对微生物的清除[21]。IL-33能够刺激嗜碱性粒细胞能产生细胞因子和趋化因子，如IL-4、IL-6、IL-13等，从而增强嗜碱性粒细胞的粘附、趋化、整合素表达、脱颗粒和存活[22]。在IL-33潜在的刺激作用下，嗜酸性粒细胞在体内表达CXCL8和超氧离子及粘附分子，从而促进嗜酸性粒细胞的粘附和存活[23]。最新研究还发现IL-33能作用于中性粒细胞，通过抑制GRK2阻滞CXCR2内化，从而促进中性粒细胞迁移[24]。Alves-Filho等[25]发现IL-33能够阻止TLR4诱导的趋化因子CXCR2的下调，从而使中性粒细胞在趋化因子CXCR2的诱导下从外周血迁移至炎症部位加强对病原体的清除。

本课题旨在建立小鼠腹腔和皮肤感染耐药性金葡菌（MRSA）的模型，观察IL-33对小鼠死亡率和体内细菌清除率的影响，以及IL-33对小鼠背部皮肤脓肿溃烂面积和愈合时间以及炎性细胞浸润的影响。同时结合体外实验，研究IL-33对中性粒细胞功能的影响，IL-33对中性粒细胞趋化因子CXCR2、呼吸爆发及粘附分子表达的影响，及IL-33对中性粒细胞胞外诱捕网（NETs）的影响，探讨IL-33增强机体抗感染免疫的作用机制。为临床上耐药性细菌的治疗提供一个新的思路和方向。

# 第二章 IL-33免疫调节MRSA腹腔感染的作用

## 2.1 前言

随着MRSA致病性和病死率逐年提高，开辟新的诊断及治疗MRSA的方法迫在眉睫。腹腔感染是一种临床常见的疾病，主要包括急性胆囊炎、细菌性肝脓肿、急性腹膜炎以及急性胰腺炎等继发的细菌感染。IL-33属于IL-1家族新成员，是近年来发现的一种具有多种生物学功能活性的细胞因子，可作为核内定位分子发挥转录因子的作用，也可作为一种前炎性细胞因子参与特异性免疫组织病理损伤。中性粒细胞是机体免疫系统的重要组成部分，当炎症发生的时候，它们能够感受到炎症局部的危险信号，快速迁移至炎症局部。

本章实验以小鼠腹腔感染MRSA为模型，腹腔给于IL-33处理，观察IL-33对小鼠死亡率、体内中性粒细胞数目、体内细菌清除率的影响，检测IL-33对炎症相关细胞因子表达的影响，同时结合特异性抗体清除小鼠体内中性粒细胞实验，探讨IL-33介导的抗感染免疫功能与中性粒细胞生物学活性的联系。

## 2.2 实验材料

### 2.2.1 主要实验材料

（1）动物：BALB/c近交系小鼠，体重18~22 g, 6~8周龄，雄性，购自中ft大学实验动物中心，许可证号：SCXK（粤）2008-0002。

（2）耐药性金黄色葡萄球菌菌株（MRSA）由本实验室保存。

### 2.2.2 主要试剂

试剂名称生产厂家

Anti-mouse ly-6G(Gr1)美国Biolegend

ELISA试剂盒美国eBioscience

\*其他常规生化试剂为国产AR 级

### 2.2.3 主要仪器设备

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 仪器名称 | 仪器型号 | 生产厂家 |
| 超低温冰箱 | MDF-U52V | 日本 SANYO |
| 台式高速冷冻离心机 | UNIVERSAL 32R | 德国 Hettich |
| 恒温振荡器 | THZ-C | 太仓市实验设备厂 |
| 相差倒置显微镜 | CKX41SF | 日本 Olymbus |
| 超净工作台 | SW-CJ-2F | 江苏净化 |
| 低速离心机 | TDL-80-2B | 上海安亭 |
| 压力蒸汽灭菌锅 | Labo Autoclave | 日本 SANYO |
| 漩涡混合仪 | XW-80A | 海门其林贝尔 |
| 万分之一天平 | 梅特勒-托利多 | 上海 |
| 数显恒温水浴锅 | HH-2 | 郑州 |
| 超声清洗机 | SB-5200DT | 宁波新芝 |
| 酶标仪 | Model 680 | 美国 BIO-RAD |

### 2.2.4 主要溶液配制

⑴10×PBS（0.1 M）：称取80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g Na2HPO4, 2.4 g KH2PO4置于1 L烧杯中，加入900 ml ddH2O，混匀后调整pH至7.2-7.4，定容至1000 ml。

⑵红细胞裂解液：称取8.29 g NH4Cl, 1 g KHCO3, 37.2 mg EDTANa2，加ddH2O定容至1 L。

⑶染色缓冲液（Staining buffer）：1PBS+1% FBS+0.1% NaN3.

⑷LB液体培养基（500 ml）：称取2.5 g酵母提取物，5 g胰蛋白胨，5 g NaCl置于烧杯中，加入400 ml ddH2O混匀，搅拌溶解后，用5 M NaOH调pH至7.2，加

ddH2O定容至500 ml；121℃高压灭菌20 min，放于4℃冰箱备用。

⑸LB固体培养基（400 ml）：称取6 g琼脂粉，加入已配好的LB液体培养基200 ml，高压灭菌，121 ℃20 min。室温下冷却至55 ℃，在超净工作台中倒板，等培养

基冷却凝固后，置于4 ℃冰箱保存备用。

⑹包被液（碳酸盐缓冲液）：称Na2CO3 0.16 g, NaHCO3 0.29 g，蒸馏水加至100 ml，调节pH至9.6.

⑺稀释液（PBS- Tween20）：称KH2PO4 0.2 g，Na2H2PO4•12H2O 2.9 g, NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Tween20 0.5 ml，蒸馏水加至1000 ml，调节pH至7.4.

⑻洗涤液（Tris- HCl- Tween20）：称Tris 2.42 g，加0.1 mol/L HCl 13 ml, Tween20 0.5 ml，蒸馏水加至1000 ml，调节pH至7.4.

⑼封闭液：1% BSA pH9.6碳酸盐缓冲液。

⑽终止液（2 mol/L H2SO4）：浓H2SO4 22.4 ml，加蒸馏水177.6 ml。

## 2.3 实验方法

### 2.3.1 金黄色葡萄球菌（MRSA）的培养

从-80℃冰箱中取出MRSA菌种，按1: 100比例接种于10 ml无菌LB培养液中，置于恒温振荡箱中，37℃、200 rpm培养过夜，再按1: 200比例转接到30 ml无菌LB培养液中，37℃、200 rpm振摇培养至对数生长期，用无菌PBS调节细菌浓度至5×108 CFU/ml。

### 2.3.2 腹腔感染模型的建立

选择正常6周龄、体重为18~22克的雄性BALB/c小鼠随机分为对照组和IL-33

处理组，每组10只。每只小鼠腹腔注射1×108 CFU/200µl MRSA。

### 2.3.3 IL-33处理

IL-33本室制备，参照[26]。造模前2 h，对照组腹腔注射100µl PBS，实验组腹腔注射10µg/ml 100µl IL-33。

### 2.3.4 小鼠死亡曲线

选择正常6周龄、体重为18~22克雄性BALB/c小鼠，对照组和IL-33处理组，每组20只。每只小鼠腹腔注射2×108 CFU/200µl MRSA，造模前2 h，对照组腹腔注

射100µl PBS，实验组腹腔注射10µg/ml 100µl IL-33。后放于动物房饲养，并记录小鼠死亡情况。

### 2.3.5 感染后小鼠的处理

造模6 h/20 h后，小鼠眼眶取血，后将小鼠颈脱臼处死**血液**

⑴预先将10µl肝素加入EP管中，75%酒精对镊子及小鼠体外消毒，用无菌镊子摘除小鼠眼珠，血液从眼眶流出。取血后振荡EP管，使肝素与血液充分混匀，防止血液凝固。

⑵取10µl血，进行10-2、10-4、10-6系列稀释；取100µl稀释液均匀涂于LB培养板，

37℃培养箱24小时后计细菌菌落数（CFU）。

⑶取10µl血液，加90µl红细胞裂解液，37℃水浴10 min，血球计数板进行白细胞计数。

⑷将剩余的血液室温静置2 h后，12000 rpm离心5 min，上清冻存于-80℃。**腹腔液**

⑴颈脱臼处死小鼠后，75%酒精浸泡消毒后放入超净工作台中进行后续的工作。

⑵向小鼠腹腔注射6 ml预冷的PBS，用手捏住针孔防止PBS流出，轻柔小鼠腹部，头尾上下颠倒，以使腹腔内白细胞充分游离，2 min后，腹部皮肤剪一小口，镊子夹住腹壁一侧，用注射器小心吸取腹腔内液体，转至15 ml离心管。

⑶取10µl腹腔液加90µl红细胞裂解液1: 10稀释，37℃水浴10 min，血球计数板进行白细胞计数。

⑷取10µl腹腔液，进行10-2、10-4、10-6系列稀释；取100µl稀释液均匀涂于LB培养板，37℃培养箱24小时后计细菌菌落数（CFU）。

⑸将剩余的腹腔液2000 rpm离心5 min，上清冻存于-80℃。**脏器**

分别取1 cm2肺、肝、脾、肾用无菌玻璃匀浆器匀浆，将匀浆液进行10-2、10-4、10-6系列稀释；取100µl稀释液均匀涂于LB培养板，37℃培养箱24小时后计细菌菌落数（CFU）。

**骨髓**

⑴用无菌的剪刀镊子分离出小鼠的大腿骨，并将其表面的肌肉剔除干净，置于含10 ml PBS的60×15 mm的培养皿中，1 ml注射器反复冲洗骨髓，将悬液转至200目尼龙网过滤。

⑵取10µl悬液加90µl红细胞裂解液1: 10稀释，37℃水浴10 min，血球计数板进行白细胞计数。

### 2.3.6 ELISA检测炎性细胞因子表达

**腹腔液**

根据ELISA试剂盒说明书，每个样本设立3个检测复孔，具体操作步骤如下：

⑴IL-6:

1）用蒸馏水将5抗体包被液稀释为1抗体包被液。将捕获抗体用1抗体包被缓冲液进行1: 250倍稀释，即48µl捕获抗体加至11.952 ml 1抗体包被缓冲液中。将稀释后的捕获抗体加于酶标板中，100µl /每孔。

2）封板后置于4 ℃孵育过夜。

3）弃上清，控干，加封闭液，200µl /孔，置湿盒内，37℃孵育2h。

4）取出IL-6标准品，其浓度为1µg/ml，吸取1µl标准品溶液至1999µl检测稀释液中，得到第一个浓度梯度为500 pg/ml的标准品2 ml，用检测稀释液将标准品溶液进行1: 1稀释，得到第二个标准品溶液，浓度为250 pg/ml。依次得到标准品溶液浓度为125、62.5、31.25 pg/ml，室温放置备用。

5）加洗涤液100µl/孔，静置3 min，弃上清，控干，重复4～5次，去除游离的抗体。

6）加入相应标准抗原和检测样本，100µl/孔，封板后37℃孵育1 h。

7）弃上清，控干，重复4～5次，去除游离的抗体，将检测抗体用1抗体包被缓冲液进行1: 250倍稀释，即48µl检测抗体加至11.952 ml 1抗体包被缓冲液中。将稀释后的检测抗体加于酶标板中，100µl /每孔，封板后37℃孵育1 h。

8）弃上清，控干，重复4～5次，去除游离的抗体，将HRP偶联抗体用1抗体包被缓冲液进行1: 250倍稀释，即48µl HRP偶联抗体加至11.952 ml 1抗体包被缓冲液中。将稀释后的HRP偶联抗体加于酶标板中，100µl/每孔，封板后37 ℃孵育1 h。

9）弃上清，控干，重复4～5次，去除游离的酶标抗体。

10）加入底物溶液，100µl /孔，避光室温反应15～20 min。

11）加入终止液，50µl /孔，酶联检测仪测定其在450 nm波长下的吸光度值。

⑵IL-17A：（与IL-6的检测方法一致）

⑶TNF-a：

除了标准品准备步骤外，其他步骤与IL-6的检测方法一致。标准品的准备方法如下：取出TNF-a标准品，浓度为1µg/ml，吸取1µl标准品溶液至999µl检测稀释液中，得到第一个浓度为1000 pg/ml的标准品溶液1 ml。用检测稀释液将标准品溶液进行1: 1稀释，得到第二个标准品溶液，浓度为500 pg/ml。依次得到标准品浓度为250、125、62.5、31.25 pg/ml，室温放置备用。

血浆中相关炎性细胞因子检测方法与腹腔液一致。

### 2.3.7 IL-33在中性粒细胞清除后腹腔感染中的作用

⑴动物分组：选择正常6周龄雄性BALB/c小鼠随机分为对照组、IL-33治疗组、中性粒细胞清除组、中性粒细胞清除+IL-33治疗组，每组10只。

⑵造模前2d，中性粒细胞清除组和中性粒细胞清除+IL-33治疗组腹腔注射0.5 mg/ml Anti-mouse ly-6G(Gr1) 200µl /只，连续注射2 d，对照组和IL-33治疗组腹腔注射200µl PBS。

⑶造模前2 h, IL-33治疗组和中性粒细胞清除+IL-33治疗组腹腔注射IL-33 10µg/ml 100µl /只；对照组和中性粒细胞清除组腹腔注射100µl PBS。

⑷每只小鼠腹腔注射5×107 CFU/200µl MRSA。

⑸6 h后处理老鼠，处理小鼠腹腔液和血液，处理方法同步骤2.3.5。

### 2.3.8 统计分析

使用Prism软件进行数据处理，实验数据用平均数与标准差（mean±SD）表示。数据经方差分析之后进行*t*-检验分析，*P*﹤0.05显示有显著性统计学差异。

## 2.4 实验结果

### 2.4.1 小鼠存活率变化

如图2.1所示，小鼠经致死剂量细菌感染后，其存活时间缩短，但IL-33预处理

### 组小鼠的存活率明显上升。在84小时内，PBS对照组小鼠存活率仅为20%，而IL-33

处理组小鼠仍有60%存活。

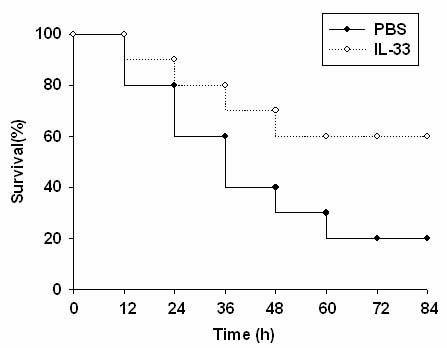


图2.1 腹腔感染小鼠存活率变化情况

### 2.4.2 血液、腹腔液及脏器细菌负荷量

金黄色葡萄球菌腹腔感染后，可移位进入血液循环。如图2.2所示，对照组血液中细菌数目在6 h至20 h明显增加，而经IL-33处理后，血液中细菌数目明显下降

（*P*<0.05）。在急性感染期（6 h）和感染后期（20 h），IL-33组腹腔液中细菌数目均低于对照组（*P*<0.05）。同时，在小鼠肝、脾、肺、肾等脏器中细菌学检测发现，IL-33处理组中，各脏器细菌数目明显下降（*P*<0.05）。



图2.2 腹腔感染小鼠体内细菌数目变化

A. 血液中细菌数目；B. 腹腔液中细菌数目；C.20 h脏器中细菌数目（\**P*<0.05, n=10）

### 2.4.3 血液与腹腔液中性粒细胞数目

如图2.3所示，IL-33处理后，血液中性粒细胞数目高于对照组(*P*<0.05)。同时，在急性感染期（6 h）腹腔液中浸润的中性粒细胞数目明显升高，且IL-33处理组高于对照组（*P*<0.05）。



图2.3 腹腔感染小鼠体内中性粒细胞数目变化

A. 血液中性粒细胞数目；B. 腹腔液中性粒细胞数目（\**P*<0.05, n=10）

### 2.4.4 外周血及腹腔液中炎性细胞因子的表达

小鼠腹腔感染后，在预定时间点取腹腔液和血清，ELISA检测细胞因子IL-6、IL-17A和TNF-a水平。结果如图2.4所示，IL-33预处理后，血液与腹腔液中IL-6、IL-17A和TNF-a表达水平均明显增高（*P*<0.05）。



图2.4 腹腔感染小鼠体内细胞因子表达水平

血液中IL-6(A)、IL-17A（B）和TNF-a（C）表达水平；腹腔液中IL-6(D)、IL-17A（E）和TNF-a（F）表达水平（\**P*<0.05, n=10）

### 2.4.5 IL-33免疫调节呈中性粒细胞依赖性

如图2.5所示，用特异性抗体清除小鼠体内中性粒细胞，血液与腹腔液中细菌负荷量明显增高，统计学显示两者存在显著性差异(*P*<0.05)；同时，IL-33增强机体抗细菌感染免疫功能受阻。



图2.5 特异性抗体清除后，体内细菌与中性粒细胞数目变化

A. 血液中细菌数目；B. 腹腔液中细菌数目；C. 血液中性粒细胞数目；D. 腹腔液中性粒细胞数目（\**P*<0.05, n=10）

## 2.5 讨论

腹腔感染是一种临床常见的疾病，主要包括急性胆囊炎、细菌性肝脓肿、急性腹膜炎以及急性胰腺炎等继发的细菌感染。它是造成脓毒血症、感染性休克、多器官功能障碍乃至死亡的重要原因。

腹腔细菌感染改变机体的生理行为。本研究发现，小鼠腹腔感染MRSA后，表现为精神萎靡、活动减少、反应迟钝、摄食量明显降低。而IL-33治疗组，摄食量明显改善，活动较多，反应也较灵敏。生存率结果显示，IL-33处理组小鼠生存率明显提高。MRSA腹腔感染后，可移位进入血液循环，而经IL-33处理后，可降低血液和腹腔液细菌的含量，而增加腹腔液中性粒细胞的浸润，结果表明，IL-33可能通过增加中性粒细胞生成和趋化从而增强杀菌作用。同时，IL-33处理组脏器内的细菌负荷量也比对照组低。IL-33与巨噬细胞表面的ST2L结合后，促进巨噬细胞分泌TNF-a，从而加强对脂多糖抗原的吞噬作用促进对微生物的清除[21]。IL-33能够刺激嗜碱性粒细胞产生细胞因子和趋化因子，如IL-4、IL-6、IL-13等，从而增强嗜碱性粒细胞的粘附、

趋化、整合素表达、脱颗粒和存活[22]。在本研究中，ELISA检测发现IL-33处理组，细胞因子IL-6、IL-17A和TNF-a分泌增加。该结果提示，IL-33刺激机体后，IL-6上调可增加中性粒细胞的趋化能力，同时TNF-a参与促进中性粒细胞清除细菌，但其具体机制未明确。同时我们采用特异性抗体清除小鼠体内中性粒细胞，发现腹腔液与血液中细菌负荷量明显增加，进一步证实IL-33抗细菌感染免疫作用与调节中性粒细胞功能密切相关。

# 第三章 IL-33对中性粒细胞功能的影响

## 3.1 前言

中性粒细胞处于机体抵抗病原微生物感染，特别是抵抗化脓性细菌入侵的第一线。当炎症发生时，它们能够感受到炎症部位危险信号，快速趋化至感染部位，随后吞噬、杀伤病原微生物。

第二章实验结果显示，IL-33具有降低小鼠腹腔感染死亡率、增加体内中性粒细胞数目、降低体内细菌负荷量的作用。本章将进一步探讨IL-33对中性粒细胞功能的影响；同时结合mTOR靶向抑制剂雷帕霉素处理，分析IL-33调控中性粒细胞杀菌的相关信号通路。

## 3.2 实验材料

### 3.2.1 主要实验材料

（1）动物：BALB/c近交系小鼠，体重18~22 g, 6~8周龄，雄性，购自中ft大学实验动物中心，许可证号：SCXK（粤）2008-0002。

（2）耐药性金黄色葡萄球菌菌株（MRSA）由本实验室保存。

### 3.2.2 主要试剂

试剂名称 生产厂家

Percoll分离液美国Sigma公司

DMEM高糖培养基美国Gibco公司

胎牛血清 美国 Gibco 公司

CFSE美国Biolegend公司

雷帕霉素（RAPA） 美国 LC Laboratories 公司二甲基亚砜（DMSO） 美国 Gibco 公司

anti-CD11b-FITC美国Biolegend公司

MIP2美国PeproTech公司

Rhodamine 123美国Cayman公司

p-AKT单克隆抗体美国CST公司

p-mTOR单克隆抗体美国CST公司

\*其他常规生化试剂为国产AR 级

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 3.2.3 | 3.2.3 主要仪器设备  仪器名称 | 仪器型号 | 生产厂家 |
|  | 超低温冰箱 | MDF-U52V | 日本 SANYO |
|  | 超纯水仪 | PROG00002 | 美国 |
|  | 电子分析天平 | BS 200S | 德国 Sartorius |
|  | 恒温振荡器 | THZ-C | 太仓市实验设备厂 |
|  | 相差倒置显微镜 | CKX41SF | 日本 Olymbus |
|  | 低速离心机 | TDL-80-2B | 上海安亭 |
|  | 压力蒸汽灭菌锅 | SYQ-DSX-28B | 上海 |
|  | 流式细胞仪漩涡混合仪 | CALIBUR XW-80A | 美国 BD  海门其林贝尔 |
| 3.2.4 | 3.2.4 主要溶液配制 |  |  |

⑴10×PBS（0.1 M）：称取80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g Na2HPO4, 2.4 g KH2PO4置于1 L烧杯中，加入900 ml ddH2O，混匀后调整pH至7.2-7.4，定容至1 L。

⑵3.6% NaCl: 称NaCl 3.6 g，加入100 ml ddH2O溶解。

⑶染色缓冲液（Staining buffer）：1PBS+1%FBS+0.1%NaN3.

⑷DEPC水：在1 L ddH2O中加入1 ml DEPC，37℃恒温放置过夜，高压灭菌。

⑴LB液体培养基（500 ml）：称取2.5 g酵母提取物，5 g胰蛋白胨，5 g NaCl置于烧杯中，加入400 ml ddH2O混匀，搅拌溶解后，用5 M NaOH调pH至7.2，加

ddH2O定容至500 ml；高压灭菌，121℃20 min，置于4℃冰箱保存备用。

⑵LB固体培养基（400 ml）：称取6 g琼脂粉，加入已配好的LB液体培养基200 ml，高压灭菌，121℃20 min。室温下冷却至55℃，在超净工作台中倒板，等培养基冷却凝固后，置于4 ℃冰箱中保存备用。

## ⑶Percoll分离液配制：Percoll使用液（100% Percoll）：取3.15 ml 100% Percoll加入

0.35 ml 10×PBS; 80% Percoll: 取1.6 ml 100% Percoll加入0.4 ml 1×PBS; 65%

Percoll: 取0.975 ml 100% Percoll加入0.525 ml 1×PBS; 55% Percoll: 取0.825 ml

100% Percoll加入0.675 ml 1×PBS。

⑷细胞培养液：DMEM高糖培养基，加入10%胎牛血清，1%双抗。

⑸RAPA贮存液：称取5 mg RAPA粉末，溶于1 ml DMSO中，-20℃保存。

## 3.3 实验方法

### 3.3.1 金黄色葡萄球菌（MRSA）的培养（同第二章）

### 3.3.2 中性粒细胞分离（不连续的密度梯度骨髓- Percoll离心法）

⑴颈脱臼法将小鼠处死。

⑵在通风的超净台中，用70%酒精对小鼠进行消毒，剪开一小块皮肤，暴露下腹部、软组织和后肢骨。

⑶小心将小鼠大腿骨分离出（用剪刀将骨头两关节连接处剪掉，小心别剪断骨头），将分离出的骨头转移至60×15 mm的培养皿中，加无菌PBS，用剪刀、镊子小心将骨头上的肌肉剥离干净。

⑷将剥离干净的骨头放入一干净的培养皿中，加入8 ml的DMEM，用注射器将骨头反复冲洗，直至骨头变白为止。

⑸将细胞悬液转至200目尼龙网过滤至15 ml离心管中，500 g，室温离心5 min。

⑹轻轻去上清，加入1.5 ml PBS重悬细胞沉淀。

⑺10 ml玻璃管，从底部往上依次加入：2 ml 80%Percoll、1.5 ml 65%Percoll、1.5 ml

55%Percoll（切勿混匀），静置5 min，最上层加入第6步的细胞悬液，1200 g，室温离心30 min。

⑻中性粒细胞分布在65% Percoll与80% Percoll层之间。

⑼将55%的Percoll层用枪头小心吸出，用一干净的15 ml离心管收集80%和65%的

Percoll层细胞，用PBS将液体补充至14 ml，充分混匀，500 g，4℃，离心5 min。

⑽将上清弃去，加3 ml预冷的去离子水重悬沉淀，静置30 s，立即加入1 ml 3.6%NaCl，轻轻混匀，500 g，4℃离心5 min。

⑾将上清弃去，中性粒细胞悬于1 ml DMEM细胞培养液中，取10µl用血球计数板计数，最后将中性粒细胞浓度稀释成1×107个/ml。

### 3.3.3 Transwell检测中性粒细胞趋化功能

⑴将MRSA 37℃、200 rpm培养至对数生长期，用无菌PBS稀释，并调节菌浓度至1×108CFU/ml。

⑵选择最适浓度的IL-33（60 ng/ml）设以下四组：4个EP管：1号：PBS组，2号：IL-33

组，3号：MRSA组，4号：MRSA+IL-33组。

⑶MRSA放于65℃水浴锅中，热灭活10 min，MRSA、细胞均不用血清孵育。

⑷各EP管加入500µl中性粒细胞培养液，2、4号EP管各加入3µl 10µg/ml IL-33，1、

3号EP管各加入3µl PBS，于37℃含5%CO2培养箱中孵育1 h。

⑸3、4号EP管中加入10µl MRSA，细胞与细菌比为1: 1，1、2号EP管各加入5µl PBS。

⑹将4个EP管竖直放在EP管架上，恒温振荡箱，37℃，100 rpm，振摇1 h后。

⑺将4个EP管中的细胞悬液分别加到趋化小室的上室中，下室加入500µl DMEM

含5% BALB/c鼠血清、0.5µl 20µg/ml MIP2.

⑻将Transwell板放入5%CO2, 37 ℃培养，3 h后将下室液体充分混匀，取10µl

培养液进行细胞计数。

### 3.3.4 流式细胞术检测中性粒细胞吞噬功能

CFSE标记MRSA：

⑴将MRSA 37 ℃、200 rpm培养至对数生长期，用无菌PBS调节菌浓度至5×108

CFU/ml，加3µl 50 nM CFSE标记，37℃，50 rpm温箱中振摇1 h, 4000 rpm室温离心5 min，1×PBS洗涤1次。

⑵弃上清，将细菌沉淀悬于750µl PBS中，再加入250µl 4%多聚甲醛中固定30 min, 4000 rpm室温离心5 min，1×PBS洗涤2次。

⑶选择最适浓度的IL-33（60 ng/ml）设PBS对照组和IL-33组实验组。

⑷金黄色葡萄球菌预先用10%BALB/c鼠血清（65℃热灭活10 min）预处理30 min，细胞沉淀悬于含5%热灭活BALB/c鼠血清的DMEM中。

⑸各EP管加入500µl中性粒细胞培养液，对照组加入3µlPBS，实验组加入3µl

10µg/ml IL-33. 于37℃含5%CO2培养箱中孵育1 h。

⑹实验组与对照组各加入10µl MRSA。

⑺将2个EP管竖直放在EP管架上，恒温振荡箱，37 ℃，100 rpm，分别在振摇10min，

30min，60min后收集每孔细胞至流式管，加2 ml PBS 1500 rpm离心5 min，并洗涤

1次，细胞沉淀悬浮于80µl Staining buffer中。

⑻加入中性粒细胞表面标记抗体CD11b，室温避光15 min。

⑼Staining buffer 2 ml 1500 rpm×5 min洗涤2次。

⑽弃上清，沉淀悬浮于300～400µl staining buffer，用流式细胞仪检测。

### 3.3.5 溶细胞法检测中性粒细胞的杀菌功能

⑴将MRSA置于37℃、200 rpm培养箱培养至对数生长期，用无菌PBS稀释，调节菌浓度至5×107CFU/ml。

⑵MRSA预先用10%BALB/c鼠血清（65℃热灭活10 min）预处理30 min，细胞沉淀悬于含5%热灭活BALB/c鼠血清的DMEM中。

⑶各EP管加入500µl中性粒细胞培养液，EP管分别加入浓度为0、20、60、100、200 ng/ml IL-33，最后用PBS将各EP管体积配平，于37 ℃含5%CO2培养箱中孵育1 h。

⑷各EP管中加入2µl MRSA，细胞与细菌比为10: 1。

⑸将5个EP管竖直放在EP管架上，恒温振荡箱，37℃，100 rpm，振摇2 h后，进行10-4、10-5、10-6系列稀释；取100µl均匀涂于LB培养板，37℃培养箱24小时后计细菌菌落数（CFU）。

### 3.3.6 流式细胞术检测中性粒细胞趋化因子CXCR2或粘附分子CD11b的表达

⑴参照实验3.3.2分离鼠骨髓中性粒细胞，并对细胞计数，按1×106 cells/孔加至1.5 ml EP管中。

⑵实验组加入3µl 10µg/ml IL-33和2µl MRSA（5×107CFU/ml），对照组加入2µl

MRSA（5×107CFU/ml），同时设置空白组（只含细胞），置于培养箱37 ℃、5%CO2

培养1 h。

⑶向每孔加FITC标记的鼠抗人CXCR2抗体或FITC标记的鼠抗人CD11b抗体各

5µl，室温避光15 min. 收集细胞，1500 rpm×5 min离心。

⑷用PBS洗涤细胞，1500 rpm×5 min离心，重复洗涤一次。

⑸向EP管中加入400µl Staining buffer重悬细胞。

⑹用流式细胞仪检测中性粒细胞趋化因子CXCR2或粘附分子CD11b的表达情况。

### 3.3.7 流式细胞术检测中性粒细胞的呼吸爆发

⑴参照实验3.3.2分离鼠骨髓中性粒细胞，并对细胞计数，按1×106 cells/孔加至1.5 ml EP管中。

⑵实验组加入3µl 10µg/ml l IL-33和2µl MRSA（5×107CFU/ml），对照组加入2µl MRSA（5×107CFU/ml），同时设置空白孔（只含细胞），置于37 ℃、5%CO2培养箱分别培养15min，30min，60min后取样。

⑶向每孔加入Rhodamine 123（DHR），使其终浓度为10 nmol/L，置于培养箱37 ℃、

5%CO2避光培养5 min。

⑷收集细胞，1500 rpm×5 min离心。

⑸用PBS洗涤细胞，1500 rpm×5 min离心，重复洗涤一次。

⑹向EP管中加入400µl Staining buffer重悬细胞。

⑺流式细胞仪检测中性粒细胞呼吸爆发情况。

### 3.3.8 流式细胞术检测p-AKT和p-mTOR表达

⑴参照实验3.3.2分离鼠骨髓中性粒细胞，并对细胞计数，按1×106 cells/孔加至1.5mlEP管中。

⑵实验组加入3µl 10µg/ml IL-33和2µl MRSA（5×107CFU/ml），对照组加入2µl

MRSA（5×107CFU/ml），同时设置空白孔（只含细胞），置于37 ℃、5%CO2培养箱培养1h。

⑶2000 rpm，离心5 min，吸出上清液，收集细胞，用1×PBS洗涤细胞2次，去掉上清。用500µlPBS混悬细胞，加入4%多聚甲醛500µl，使其终浓度为2%，先37℃固定10 min，后冰上预冷60 s。

⑷加入1 ml PBS洗涤细胞1次，弃上清。细胞沉淀重悬于100µl PBS，再加入预冷的100%甲醇900µl，使其终浓度为90%，在冰上进行细胞透化30 min。

⑸透化完成后，将细胞平均分到各个EP管中，每管细胞0.5-1×106个，每管细胞悬

浮在2-3 ml孵育缓冲液（含0.5%BSA的PBS溶液），离心洗涤。重复2次。

⑹用100µl孵育缓冲液悬浮细胞，室温孵育10 min。往每个试管中加入经过合适比例稀释的一抗（AKT和mTOR抗体），室温孵育1h。

⑺加入孵育缓冲液1ml润洗离心洗涤2次，细胞沉淀重悬于100µl孵育缓冲液，加入合适比例稀释的带荧光二抗，室温孵育30 min。

⑻加入孵育缓冲液1 ml润洗离心洗涤2次，细胞沉淀重悬于500µl PBS，流式细胞仪分析。

### 3.3.9 mTOR信号对中性粒细胞杀菌功能的影响A．不同浓度雷帕霉素对中性粒细胞杀菌的影响

⑴将MRSA 37 ℃、200 rpm培养至对数生长期，用无菌PBS调节菌浓度至

5×107CFU/ml。

⑵MRSA预先用10%BALB/c鼠血清（65℃热灭活10 min）预处理30 min，细胞沉淀悬于含5%热灭活BALB/c鼠血清的DMEM中。

⑶各EP管加入500µl中性粒细胞培养液，EP管分别加入0.25 mg/ml RAPA 0、0.4、2、4µl，最后用PBS将各EP管体积配平，于37℃含5%CO2培养箱中孵育30 min。

⑷各EP管中加入2µl MRSA，细胞与细菌比为10: 1。

⑸将4个EP管竖直放在EP管架上，恒温振荡箱，37℃，100 rpm，振摇2 h后，进行10-4、10-5、10-6系列稀释；取100µl稀释液均匀涂于LB培养板，37℃培养箱24小时后计细菌菌落数（CFU）。

B. 雷帕霉素对IL-33调节中性粒细胞杀菌的影响

⑴将MRSA 37 ℃、200 rpm培养至对数生长期，用无菌PBS调节菌浓度至

5×107CFU/ml。

⑵选择最适的IL-33（60 ng/ml）与RAPA（0.25 mg/ml 4µl）剂量设以下四组：4个EP

管：1号：RAPA组，2号：RAPA+IL-33组，3号：IL-33组，4号：PBS组。

⑶MRSA预先用10%BALB/c鼠血清（65℃热灭活10 min）预处理30 min，细胞沉淀悬于含5%热灭活BALB/c鼠血清的DMEM中。

⑷各EP管加入500µl中性粒细胞培养液，1、2号EP管各加入4µl 0.25 mg/ml RAPA，

2、3号EP管各加入4µl PBS，于37℃含5%CO2培养箱中孵育30 min。

### ⑸2、3号EP管各加入3µl 10µg/ml IL-33，1、4号EP管各加入3µl PBS，于37 ℃含

5%CO2培养箱中孵育1 h。

⑹各EP管中加入2µl MRSA，细胞与细菌比为10: 1。

⑺将4个EP管竖直放在EP管架上，恒温振荡箱，37℃，100 rpm，振摇2 h后，进行10-4、10-5、10-6系列稀释；取100µl稀释液均匀涂于LB培养板，37℃培养箱24小时后计细菌菌落数（CFU）。

### 3.3.10 统计分析

使用Prism软件进行数据处理，实验数据以平均数与标准差（mean±SD）表示。数据经方差分析之后进行*t*-检验分析，*P*﹤0.05显示有显著性统计学差异。

## 3.4 实验结果

### 3.4.1 IL-33对中性粒细胞趋化功能的影响

如图3.1所示，MRSA组与PBS对照组相比，趋化细胞数目明显降低，两者相比有明显差异且具有统计学意义（*P*<0.05）；而IL-33+MRSA组与MRSA组相比，趋化细胞数目有所增加（*P*<0.05）。该结果提示，在MRSA感染时，中性粒细胞的趋化能力下降，而IL-33处理可增强中性粒细胞趋化功能。流式细胞术检测中性粒细胞趋化因子受体CXCR2表达，结果显示在作用1 h后，MRSA处理组明显降低中性粒细胞表面CXCR2表达，而IL-33预处理可阻滞MRSA诱导的CXCR2下调（*P*<0.05）。



图3.1 IL-33对中性粒细胞趋化的影响

A. 趋化的细胞数目；B. 细胞表面CXCR2的表达（\**P*<0.05, n=4）

### 3.4.2 IL-33对中性粒细胞吞噬功能的影响

CFSE标记MRSA, CD11b标记中性粒细胞，用流式细胞术检测IL-33处理的中性粒细胞对MRSA的吞噬率。流式结果显示（图3.2），在10 min时，对照组与实验组吞噬率未见差异；随着时间延长，IL-33 明显增强中性粒细胞吞噬细菌的能力

（*P*<0.05）。



图3.2 IL-33对中性粒细胞细菌吞噬率的影响（\**P*<0.05，n=4）

### 3.4.3 IL-33对中性粒细胞杀菌功能的影响

分离小鼠骨髓的中性粒细胞，用不同浓度的IL-33预处理，加入细菌孵育2 h后，进行细菌凃板。通过溶细胞法检测IL-33对中性粒细胞杀菌功能的影响。如图3.3所示，随着IL-33浓度升高，中性粒细胞杀菌能力明显增强（*P*<0.05）。



图3.3 IL-33对中性粒细胞杀菌能力的影响（\**P*<0.05，n=4）

### 3.4.4 流式细胞术检测IL-33对中性粒细胞呼吸爆发的影响

中性粒细胞实验组加入3µl 10µg/ml IL-33和2µl MRSA（5×107CFU/ml），对照组加入2µl MRSA（5×107CFU/ml），作用不同时间后加入DHR处理5 min，通过流式细胞术检测IL-33对中性粒细胞呼吸爆发的影响。如图3.4所示，在作用15 min, 30 min, 60 min后，实验组呼吸爆发强度明显高于对照组（*P*<0.05）。



图3.4 IL-33对中性粒细胞呼吸爆发的影响（\**P*<0.05，n=4）

### 3.4.5 流式细胞术检测IL-33对中性粒细胞粘附分子CD11b表达的影响

中性粒细胞实验组加入3µl 10µg/ml IL-33和2µl MRSA（5×107CFU/ml），对照组加入2µl MRSA(5×107CFU/ml)，1 h后加入FITC标记的鼠抗人CD11b抗体，流式细胞术检测中性粒细胞粘附分子CD11b表达。如图3.5所示，在作用1 h后，空白对照组CD11b阳性率为72±0.38%，对照组为78±0.33%，两者差异不明显，而实验组为85±0.45%明显高于对照组（*P*<0.05）。



图3.5 IL-33对粘附分子CD11b表达的影响（\**P*<0.05，n=4）

### 3.4.6 mTOR信号调控中性粒细胞杀菌

为探讨IL-33调节中性粒细胞功能与PI3K-AKT-mTOR信号的关系。分离的中性粒细胞经IL-33处理1 h后，流式细胞术检测细胞内AKT和mTOR磷酸化情况。结果显示（图3.6），MRSA感染后，p-AKT和p-mTOR磷酸化水平上升，IL-33预处理可进一步增加p-AKT和p-mTOR磷酸化水平（*P*<0.05）。采用mTOR特异性阻断剂雷帕霉素（RAPA）处理，我们发现RAPA可抑制中性粒细胞的杀菌能力，在浓度0～2µg/ml之间，随浓度的增加抑制作用增强（*P*<0.05）。



图3.6 IL-33调控中性粒细胞杀菌的信号通路

A. AKT磷酸化；B. mTOR磷酸化；C. RAPA对中性粒细胞杀菌的影响；D. IL-33杀菌效应与mTOR

信号关系（\**P*<0.05, n=4）

## 3.5 讨论

中性粒细胞是机体防御外界侵犯的重要防线，其作用是吞噬、杀伤病原微生物。中性粒细胞与内皮细胞表面的选择素通过各自的碳水化合物配体结合后，最初固定和随后招募的中性粒细胞可以沿内皮细胞壁移行[27]。粘附分子CD11b/CD18属于整合素家族中的一员，在中性粒细胞对血管内皮细胞形成较强粘附效应的过程中起重要作用[28]。当遇到白细胞粘附分子，如CD11b/CD18和CD11a/CD18时，中性粒细胞停止移行，致使中性粒细胞形成较强的粘附效应[29, 30]。致敏后的中性粒细胞可增强粘附效应，发挥吞噬作用，产生活性氧（ROS），释放相关细胞因子，合成白三烯，进而脱颗粒从而发挥抗菌作用[31]。前期研究结果显示，IL-33可增加感染部位的中性粒细胞数目，降低细菌的负荷量。因此，本实验选中性粒细胞作为细胞模型，体外分析IL-33对中性粒细胞杀菌功能、趋化因子CXCR2、呼吸爆发、粘附分子CD11b及AKT/mTOR信号通路的影响。

本实验结果表明，经IL-33处理后，中性粒细胞的趋化、吞噬、杀伤功能均增强；

呼吸爆发是中性粒细胞清除病原微生物的重要作用机制，也是造成机体损伤的主要因素。我们发现，MRSA刺激的中性粒细胞经IL-33处理，明显提高中性粒细胞的呼吸爆发强度，推测可能是由于MRSA刺激中性粒细胞后再经IL-33处理 ，

Phosphatidylinositol（磷脂酰肌醇）通路活化强度增高，开启钙通道，使胞内Ca2+浓度的上升，进而活化了膜上的NADPH氧化酶[32]，从而引发了ROS的大量产生，但其具体作用机制还需进一步研究。有关研究表明[33]，中性粒细胞在脱颗粒期间，细胞内相关元素可移位到细胞表面，导致CD11b/CD18的表达升高，其表达量的改变受一些趋化因子及细胞因子等诱导的影响。本研究中，IL-33可以增加中性粒细胞粘附分子CD11b的表达。这说明IL-33可能通过上调CD11b的表达增强中性粒细胞的粘附力，从而使中性粒细胞透过血管壁迁移至组织感染部位。粘附分子表达量的改变是机体发生感染及中性粒细胞迁移的一种重要生理表现[34]。研究发现[35]，mTOR除了在T细胞活化和分化功能发挥重要的调节作用，还影响其他免疫细胞（如单核细胞、中性粒细胞、树突状细胞、B细胞）的功能。本研究发现IL-33可增强AKT/mTOR信号通路的活化，同时结合mTOR靶向抑制剂雷帕霉素（RAPA）对中性粒细胞杀菌功能的影响，发现mTOR阻滞可下调中性粒细胞的杀菌效应，提示IL-33可能是通过增强AKT/mTOR信号通路的活化从而增强中性粒细胞的杀菌作用。

本研究表明，IL-33处理中性粒细胞后，可增强细胞的呼吸爆发活性，通过上调中性粒细胞表面CXCR2及CD11b表达等效应，招募大量中性粒细胞快速到达感染部位。

# 第四章 IL-33参与抗MRSA皮肤感染的作用

## 4.1 前言

皮肤脓肿是一种常见感染性疾病，多发生在躯干、腋窝、肢端或头颈部。形成脓肿的原因很多，如细菌感染、术后感染或创伤等，其中以金黄色葡萄球菌感染最为常见。在较小的皮肤创伤后通常容易产生脓肿，常伴随有局限性蜂窝组织炎、红肿和发热等特征。皮肤脓肿不但会导致直接的机体损伤，而且还会导致系列的继发性或复发性感染，往往可诱发潜在的全身性疾病。深入研究皮肤脓肿的病理特征，发病机制及探索有效的防治措施，仍是临床研究重点课题之一。

本章实验通过建立小鼠的皮肤感染MRSA模型，观察IL-33对小鼠皮肤脓肿溃烂面积、伤口的愈合时间、细菌负荷量以及组织病理损伤的影响，检测IL-33在局部感染部位的表达，检测NETs在局部感染组织中的形成率，探讨IL-33在皮肤细菌感染过程中的作用机制，为临床治疗细菌感染性疾病提供一条新的治疗途径。

## 4.2 实验材料

### 4.2.1 主要实验材料

（1）动物：BALB/c近交系小鼠，体重18~22 g, 6~8周龄，雄性，购自中ft大学实验动物中心，许可证号：SCXK（粤）2008-0002。

（2）耐药性金黄色葡萄球菌菌株（MRSA）由本实验室保存。

### 4.2.2 主要试剂

试剂名称生产厂家

TRIZOL试剂美国Invitrogen公司

M-MLV逆转录试剂盒美国Invitrogen公司TaKaRa TaqTM DNA聚合酶大连宝生物工程有限公司DL2, 000TM DNA Marker大连宝生物工程有限公司琼脂糖BIOWEST spain

DAPI美国Biolegend公司

### anti-human IL-33-FITC美国Biolegend公司anti-mouse ELA2美国Abcam公司Donkey anti-rabbit IgG-FITC美国Biolegend公司

\*其他常规生化试剂为国产AR 级

### 4.2.3 主要仪器设备

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 仪器名称 | 仪器型号 | 生产厂家 |
| 超低温冰箱 | MDF-U52V | 日本 SANYO |
| 超纯水仪 | PROG00002 | 美国 |
| 电子分析天平 | BS 200S | 德国 Sartorius |
| 相差倒置显微镜 | CKX41SF | 日本 Olymbus |
| 低速离心机 | TDL-80-2B | 上海安亭 |
| 压力蒸汽灭菌锅 | SYQ-DSX-28B | 上海 |
| 流式细胞仪 | CALIBUR | 美国 BD |
| 漩涡混合仪 | XW-80A | 海门其林贝尔 |
| PH 计 | PHS-25 | 上海智光 |
| 数显恒温水浴锅 | HH-2 | 郑州 |

### 4.2.4 主要溶液配制

⑴10×PBS（0.1 M）：称取80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g Na2HPO4, 2.4 g KH2PO4置于1L烧杯中，加入900 ml ddH2O，混匀后调整pH至7.2-7.4，定容至1 L。

⑵4%多聚甲醛：称4 g多聚甲醛溶于100 ml 1×PBS中，溶解后调整pH至7.2-7.4。

⑶麻醉剂（0.4%戊巴比妥钠）：称0.4 g戊巴比妥钠溶于100 ml 1×PBS中。

⑷染色缓冲液（Staining buffer）：1PBS+1%FBS+0.1%NaN3.

⑸DEPC水：在1 L ddH2O中加入1 ml DEPC，37℃恒温放置过夜，高压灭菌。

⑹LB液体培养基（500 ml）：称取2.5 g酵母提取物，5 g胰蛋白胨，5 g NaCl置于烧杯中，加入400 ml ddH2O混匀，搅拌溶解后，用5 M NaOH调pH至7.2，加ddH2O定容至500 ml；121℃高压灭菌20 min，4℃保存备用。

⑺LB固体培养基（400 ml）：称取6 g琼脂粉，加入已配好的LB液体培养基200 ml，

高压灭菌，121℃20 min。室温下冷却至55℃，在超净工作台中倒板，等培养基冷却凝固后，4 ℃冰箱中保存备用。

⑻1%琼脂糖凝胶：称0.3 g电泳级琼脂糖粉，加入30 ml 1×TBE电泳缓冲液，微波炉中火加热2 min，待琼脂糖凝胶完全融化，室温放置冷却至40℃左右加入10 mg/ml EB混匀即可。

⑼5×TBE: 分别称取450 mM Tris碱，450 mM 硼酸，10 mM EDTA（0.5 mol/L, pH8.0），加ddH2O 补足1 L，调整PH至8.3.

⑽抗原修复液：称Tris 0.847 g, EDTA 0.26 g加三蒸水使其终体积为700 ml，调pH9.0

后加0.35 ml Tween-20.

## 4.3 实验方法

### 4.3.1 皮肤感染模型建立

选择正常6周龄、体重18~22克雄性C57BL/6小鼠，设立对照组和IL-33处理组，随机分组，每组10只。腹腔注射0.4%戊巴比妥钠（50 mg/kg）进行麻醉，麻醉成功后用剃毛器剃去小鼠背部毛发，皮下注射5×107CFU /30µl MRSA。

### 4.3.2 给药方法

对照组：连续4天腹腔注射100µl PBS。

实验组：连续4天腹腔注射100µl 10µg/ml IL-33.

### 4.3.3 组织切片HE染色、革兰氏染色和免疫组织化学1．HE染色

⑴切片在二甲苯Ⅰ、Ⅱ中脱蜡15 min。

⑵置100％Ⅰ、100％Ⅱ、95％、90%、80％、70％、50%乙醇各2～5 min。然后经蒸馏水转入染液。

⑶苏木精染液染色5 min，流水返蓝10min。

⑷洗去玻片上多余染液，0.5～1％盐酸酒精（70％酒精配制）分色片刻。

⑸用自来水冲洗约15～30 min。

⑹细胞核呈现蓝色后，用蒸馏水短洗。

⑺伊红染色5 min左右。

⑻经浓度为70％5 min、85％5 min、95％3 min、100％5 min乙醇脱水。

⑼二甲苯透明（二次），约10 min。

⑽封片：擦去切片周围多余二甲苯，滴加适量中性树胶，加盖玻片封固即可。

2. 革兰氏染色

⑴烤片：50～60 ℃烤片2小时。

⑵切片脱蜡至水：放入二甲苯Ⅰ液5 min、二甲苯Ⅱ液5 min、浓度为100%Ⅰ液、

Ⅱ液、95%、85%、75%酒精各5 min、蒸馏水Ⅰ液、Ⅱ液各5 min。

⑶结晶紫染色1 min，自来水冲洗，去掉浮色，滤纸擦干，倒置显微镜下观察。

3. 免疫组化

1. 抗原修复

⑴烤片：50～60 ℃烤片2小时。

⑵切片脱蜡至水：放入二甲苯1液5 min、二甲苯2液5 min、100%乙醇Ⅰ液、100%乙醇Ⅱ液、95%乙醇、85%乙醇、75%乙醇各5 min、蒸馏水Ⅰ液、Ⅱ液各5 min。抗原修复（修复液现配现用）：将切片放入抗原修复缓冲液中，微波炉中高火煮沸后，以中火继续加热8 min，冷却后用PBS洗涤5 min×2次。

2. 荧光抗体检测

⑴3% H2O28 min, PBS洗涤8 min。

⑵加Staining buffer 孵育1 h。

⑶加入一抗（anti-mouse Elastase抗体），用含0.3%TritonX-100的Staining buffer（1: 500）稀释，将稀释液滴加至玻片上，4 ℃孵育过夜。

⑷PBS洗涤3次×5 min，加入用含0.3%TritonX-100的Staining buffer（1: 500）稀释的二抗（donkey anti-rabbit IgG-FITC）室温避光1 h。

⑸PBS洗涤3次×5 min，加DAPI染核室温孵育5 min。

⑹PBS洗涤2次×5 min。

⑺在载玻片上滴一滴抗荧光淬灭封片液，将一干净的盖玻片轻轻盖在封片液上（注意避免产生气泡）。

⑻荧光显微镜下观察NETs形成情况并拍照。

### 4.3.4 小鼠皮肤脓肿部位IL-33的表达

1．小鼠皮肤伤口总RNA提取

⑴取脓肿部位皮肤，加1 ml TRIzol试剂。

⑵用DEPC水处理且预冷过的玻璃匀浆器反复碾磨，直至皮肤组织完全被匀浆。

⑶转入1.5 ml EP管中，静置5 min，加入0.2 ml氯仿，涡旋振荡30 s，静置2~3 min，直至出现分层现象，12000 rpm, 4℃离心15 min。

⑷小心转移上层液体至新的EP管中，加入等体积的异丙醇，颠倒混匀后室温放置

10 min, 12000 rpm, 4℃离心10 min。

⑸弃上清，沉淀悬于用DEPC水新配制的1 ml 75%酒精，轻轻摇动，4 ℃，7500 rpm

离心洗涤5 min。

⑹弃上清，室温下干燥10 min，加入定量（根据沉淀多少决定）DEPC处理水溶解

RNA沉淀，检测RNA含量和纯度，置-80℃冰箱保存备用。

2. 以Oligo dT为引物逆转录合成cDNA

⑴在经高压灭菌的PCR管（0.2 ml）中加入以下各组分：

Total RNA 0.1~5g

0.5G/l Oligo(dT) 1l

10NM dNTP 1l

DEPC处理水补至13l

⑵轻轻混匀，短暂低速离心，使液体聚于管底。

⑶65℃水浴5 min，迅速置冰上冷却，保持3 min。

⑷依次加入以下组分：

5×buffer 4l

0.1M DTT 2l

⑸37℃孵育5 min。

⑹后加入M-MLV逆转录酶（200 U/l）1l至总体积为20l，混匀，短暂低速离心。

（7）37℃孵育50 min，随后置70℃孵育15 min，立即置冰上，直接用于于PCR扩增。

3．PCR扩增

⑴引物序列见下表（表3.1）

表3.1 引物序列

|  | 上游引物（5’‹3'） | 下游引物（5’‹3'） |
| --- | --- | --- |
| IL-33 | CCTGCCTCCCTGAGTACATACA | CTTCTTCCCATCCACACCGT |
| GAPDH | GGCATGGACTGTGGTCATGA | TTCACCACCATGGAGAAGGC |

⑵PCR反应体系

10 PCR buffer 2 l

2.5 mmol/L dNTP 1.6l

Taq DNA 聚合酶 0.1 l

5'端引物（10mol/L）0.5l

3'端引物（10mol/L）0.5l

CDNA 1 l

无菌 ddH2O 补至 20 l

在经高压灭菌的0.2 mlPCR管中加入上述成分，混匀，短暂低速离心。94C变性5 min，按下列条件进行PCR扩增。

变性温度94C 45 sec；

退火温度60C 45 sec；

延伸温度72C 60 sec；

共进行30个循环，最后一个循环后，72C延伸10 min。4．琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR扩增产物

用1×TBE配制1%琼脂糖凝胶，按每100 ml凝胶加入5l EB核酸染料（室温冷却至50C左右）充分混匀倒入制胶板中，取5l PCR产物在5 V/cm条件下电泳约15 min，后置于凝胶成像系统分析仪上，参照GADPH为目的基因分析所测基因的相对含量。

### 4.3.5 统计分析

使用Prism软件进行数据处理，实验数据用平均数与标准差（mean±SD）表示。数据经方差分析之后进行*t*-检验分析，*P*﹤0.05显示有显著性统计学差异。

## 4.4 实验结果

### 4.4.1 小鼠皮肤脓肿部位IL-33的表达

建立小鼠皮肤感染模型，在预定时间点提取脓肿皮肤组织RNA, RT-PCR鉴定IL-33基因表达。结果如图4.1所示，IL-33表达在小鼠皮肤感染后的第4天至第7天升高，而在第12天时表达水平下降，提示在皮肤感染早期IL-33表达明显增加，并且随着组织修复而逐渐降低。



图4.1 感染皮肤局部IL-33在不同时间的表达

A. 感染皮肤局部IL-33基因在0、4、7、12天的表达，0天即建模当天的正常皮肤；B. 感染皮肤局部IL-33基因表达统计结果（\**P*<0.05, n=10）

### 4.4.2 小鼠背部皮肤脓肿溃烂面积和愈合时间

如图4.2所示，在皮肤细菌感染后第1天，实验组与对照组背部均可见隆起，但界限不明显；在第2天，小鼠背部隆起范围局限，形成脓肿，界限明显；感染后第4天，对照组出现脓肿溃疡，而实验组也出现脓肿但无溃疡，两组差异明显（*P*<0.05）；至感染第10天时，各组小鼠背部脓肿表面紧绷发亮，两组脓肿与溃疡面积差异达到极显著水平（*P*<0.05）；感染后第13天，对照组背部皮肤仍有硬痂，实验组背部皮肤痂壳已脱落，伤口面积明显小于对照组；实验组与对照组最后的愈合时间分别是14天和17天。



图4.2 IL-33抗小鼠皮肤细菌感染的作用

A. 脓肿形成第4、7、10、13天进行拍照；B. 小鼠皮肤损伤面积（\**P*<0.05, n=10）

### 4.4.3 伤口组织切片HE染色、革兰氏染色

**1 HE染色**

组织病理学分别观察了第4天、第7天和第12天的皮肤修复情况。HE染色结果显示，在第4天，对照组溃疡面积较大，小鼠表皮层受到不同程度的破坏，真皮层、皮下组织结构基本消失，炎症细胞大量浸润，以中性粒细胞为主，实验组小鼠表皮层、真皮层、皮下组织仍有几处结构清晰；到第7天时，脓肿被吸收，肉芽组织开始增生，新生血管丰富，实验组表皮已完全覆盖整个伤口表面，对照组可见肉芽组织形成，但不完整。第12天时，实验组表皮开始结痂脱落，而对照组表皮仍不完整（图4.3）。



图4.3 小鼠感染皮肤在不同时间点的组织病理学变化（HE染色，×100）

**2革兰氏染色**

在小鼠皮肤感染后不同时间点，取脓肿部位皮肤，组织切片后，进行革兰氏染色。如图4.4所示，感染后第4天，实验组小鼠皮肤荷菌量与对照组相比有统计学差异

（*P*<0.05）；感染后第7天和第12天，实验组小鼠皮肤荷菌量与对照组相比均有显著差异（*P*<0.05）。



图4.4 小鼠感染皮肤在不同时间点的细菌负荷量（革兰氏染色，×100）

### 4.4.4 小鼠皮肤感染伤口局部NETs的形成

NETs是中性粒细胞重要的杀菌机制之一，为了检验NETs是否存在于小鼠局部感染组织中，我们采用免疫荧光染色方法来观察感染皮肤内NETs生成情况。细菌感染皮肤第4天发现，皮肤溃烂化脓部位，中性粒细胞大量浸润伴有弹性蛋白酶（Elastase）释放，提示细菌感染诱导NETs生成。同时发现，IL-33处理后可促进NETs的生成（图

4.5)。



图4.5 小鼠细菌感染皮肤组织NETs的生成

## 4.5 讨论

皮肤及软组织感染是由化脓性致病菌侵犯表皮、真皮和皮下组织引起的感染性疾病[36]，在临床上十分常见。在各类皮肤及软组织感染中，其中脓肿及外伤感染是最常见的感染类型。皮下注射细菌导致的皮肤脓肿模型的方法简便单一，而且该法可复制率高[37]，现已得到国内外研究者的普遍认可。据报道，IL-33在细菌感染中可通过上调Th2型免疫反应，激活相关的细胞因子对致病菌的杀伤与清除作用[38]。

本章实验结果表明，经IL33处理后，小鼠背部皮肤脓肿溃烂面积较对照组小，在感染后第10天差异最为明显，且愈合时间缩短；组织病理学观察发现IL-33治疗组小鼠的表皮层、真皮层以及肌肉的受损程度都比对照组轻，而肉芽生长、愈合速度比对照组快；革兰氏结果发现，小鼠表皮层、真皮层以及肌肉层中细菌的侵入量均比对照组少；本研究中我们还观察到NETs存在于皮肤脓肿溃烂部位，提示NETs可能在皮肤感染中扮演了一定的角色。自2004年发现至今，是中性粒细胞有效抗菌的新作用机制[13]，而且期间从未间断对NETs形成条件以及功能结构的研究。我们推断NETs可能是中性粒细胞在皮肤抗感染免疫中的一种潜在机制。

# 第五章 IL-33调控中性粒细胞胞外诱捕网（NETs）杀菌作用

## 5.1 前言

第四章实验结果提示IL-33可增加局部感染组织中NETs生成。本章体外检测中性粒细胞杀伤金黄色葡萄球菌感染与NETs的关系，及IL-33对中性粒细胞生成NETs和杀菌率的影响，为阐明IL-33调节中性粒细胞杀菌的新机制提供实验依据。

## 5.2 实验材料

### 5.2.1 主要实验材料

（1）动物：BALB/c近交系小鼠，体重18~22 g, 6~8周龄，雄性，购自中ft大学实验动物中心，许可证号：SCXK（粤）2008-0002。

（2）耐药性金黄色葡萄球菌菌株（MRSA）由本实验室保存。

### 5.2.2 主要试剂

试剂名称 生产厂家

Percoll分离液美国Sigma公司

DMEM高糖培养基美国Gibco公司

胎牛血清 美国 Gibco 公司

多聚赖氨酸 美国 Sigma 公司

DAPI美国Biolegend公司

anti- IL-33-FITC美国Biolegend公司

anti-mouse ELA2 美国 Biolegend 公司 Donkey anti-rabbit IgG-FITC 美国 Biolegend 公司

\*其他常规生化试剂为国产AR 级

### 5.2.3 主要仪器设备

仪器名称仪器型号生产厂家

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 超低温冰箱 | MDF-U52V | 日本 SANYO |
| 超纯水仪 | PROG00002 | 美国 |
| 电子分析天平 | BS 200S | 德国 Sartorius |
| 恒温振荡器 | THZ-C | 太仓市实验设备厂 |
| 相差倒置显微镜 | CKX41SF | 日本 Olymbus |
| 超净工作台 | SW-CJ-2F | 江苏净化 |
| 低速离心机 | TDL-80-2B | 上海安亭 |
| 压力蒸汽灭菌锅 | SYQ-DSX-28B | 上海 |
| 流式细胞仪 | CALIBUR | 美国 BD |
| 漩涡混合仪 | XW-80A | 海门其林贝尔 |
| 万分之一天平 | 梅特勒-托利多 | 上海 |
| 磁力搅拌器 | JB-2 | 上海雷磁泾 |
| PH 计 | PHS-25 | 上海智光 |
| 数显恒温水浴锅 | HH-2 | 郑州 |
| 超声清洗机 | SB-5200DT | 宁波新芝 |
| 制冰机 | SANYO SIM-F140AF65 | 日本 |

### 5.2.4 主要溶液配制

⑴10×PBS（0.1 M）：称取80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g Na2HPO4, 2.4 g KH2PO4置于1 L烧杯中，加入900 ml ddH2O，混匀后调整pH至7.2-7.4，定容至1 L。

⑵4%多聚甲醛：称4 g多聚甲醛溶于100 ml 1×PBS中，溶解后调整pH至7.2-7.4。

⑶染色缓冲液（Staining buffer）: 1PBS+1%FBS+0.1%NaN3.

⑷LB液体培养基（500 ml）：称取2.5 g酵母提取物，5g胰蛋白胨，5 g NaCl置于烧杯中，加入400 ml ddH2O混匀，搅拌溶解后，用5 M NaOH调pH至7.2，加ddH2O定容至500 ml；121℃高压灭菌20 min，置4℃冰箱保存备用。

⑸LB固体培养基（400 ml）：称取6 g琼脂粉，加入已配好的LB液体培养基200 ml，高压灭菌，121℃20 min。室温下冷却至55℃，在超净工作台中倒板，等培养基冷却凝固后，并将其置4 ℃冰箱中保存备用。

⑹Percoll分离液配制：Percoll使用液（100% Percoll）：取3.15 ml 100% Percoll加入

0.35 ml 10×PBS; 80% Percoll: 取1.6 ml 100% Percoll加入0.4 ml 1×PBS; 65% Percoll: 取0.975 ml 100% Percoll加入0.525 ml 1×PBS; 55% Percoll: 取0.825 ml 100% Percoll加入0.675 ml 1×PBS。

⑺细胞培养液：DMEM高糖培养基，加入10%胎牛血清，1%双抗。

⑻3.6% NaCl: 称NaCl 3.6 g，加入100 ml ddH2O溶解。

## 5.3 实验方法

### 5.3.1 金黄色葡萄球菌（MRSA）的培养（同第二章）

### 5.3.2 中性粒细胞分离（同第三章）

### 5.3.3 MRSA促进中性粒细胞表达IL-33

⑴将用多聚赖氨酸预处理15 mm的灭菌圆玻片加入至24孔细胞培养板。

⑵每孔加入中性粒细胞悬液500µl(浓度为1×107个/ml)，于37℃含5%CO2培养箱中孵育0.5h。

⑶加入金黄色葡萄球菌菌液10µ（l 浓度为5×107CFU/ml, MOI为10: 1）或25 nM PMA，

继续于37℃含5%CO2培养箱中孵育，在0、6、12、24 h分别收集细胞，离心，收集上清，用ELISA试剂盒检测IL-33的表达。

⑷IL-33表达的检测方法除了标准品准备步骤外，其他步骤与实验方法2.3.6中IL-6的检测方法一致。标准品的准备方法如下：取出IL-33标准品，浓度为1µg/ml，吸取3µl标准品溶液至997µl检测稀释液中，得到第一个浓度梯度为3000 pg/ml的标准品溶液1 ml。吸取3000 pg/ml的标准品溶液250µl加入至250µl检测稀释液中，得到第二个浓度为1500 pg/ml的标准品溶液。依次类推分别得到浓度为750、375、187.5、

93.75 pg/ml的标准品溶液，置于室温备用。

### 5.3.4 不同浓度的IL-33对MRSA诱导NETs Th成和杀菌率的影响

⑴将用多聚赖氨酸预处理15 mm的灭菌圆玻片加入至24孔细胞培养板。

⑵每孔加入中性粒细胞悬液500µl (浓度为1×107个/ml)，于37℃含5%CO2培养箱中孵育0.5 h。

⑶分别加入浓度为0、20、40、60、100 ng/ml的IL-33溶液，于37℃含5%CO2培养箱中孵育2 h。

⑷分两组分别测定NETs形成和NETs杀菌率。

⑸在各孔中加入金黄色葡萄球菌菌液10µl（浓度为5×107 CFU/ml, MOI为10: 1）继续孵育2 h。

⑹测定NETs生成组：吸去培养液，4%多聚甲醛固定10 min, PBS洗1次×5 min，加入新的PBS 4℃保存，待染色观察。

⑺测定NETs杀菌率组：在加入金黄色葡萄球菌的前15 min中加入细胞松弛素D（作用浓度10µg/ml）。

⑻充分混匀培养液，再培养液吸出，用0.01% TritionX-100冰上孵育20 min，用1 ml

移液枪抽吸培养液3次，使细胞充分裂解，使细菌均匀地分布在培养液中。

⑼无菌PBS将20µl培养液用连续梯度稀释法稀释1000倍，取100µl稀释液均匀涂于LB培养板，37℃恒温箱培养24小时后计细菌菌落数（CFU）。

⑽对照组：将菌液以相同的作用浓度加到DMEM培养液（含5%灭活血清）孵育2 h，按上述相同方法计数CFU。

⑾计算杀菌率杀菌率=（对照组CFU-实验组CFU）/对照组CFU

### 5.3.5 检测无NETs作用下，IL-33对MRSA诱导NETs Th成和杀菌率的影响

⑴将用多聚赖氨酸预处理15 mm的灭菌圆玻片加入至24孔细胞培养板。

⑵每孔加入中性粒细胞悬液500µl (浓度为1×107个/ml)，于37 ℃含5% CO2培养箱中孵育0.5 h。

⑶加入浓度为60 ng/ml的IL-33溶液，于37℃含5%CO2培养箱中孵育2 h。

⑷分两组分别测定NETs形成和NETs杀菌率。

⑸加入金黄色葡萄球菌菌液10µl浓度为5×107CFU/ml，MOI为10: 1），继续在37 ℃含5%CO2培养箱中孵育2 h，取出圆玻片加到新的24孔细胞培养板板中。

⑹加入DNaseⅠ（100 U/ml）孵育20 min。

⑺测定NETs生成组：在新的24孔板里将细胞用4%多聚甲醛固定10 min，吸去多聚甲醛PBS洗1次×5 min，后加入新的PBS 4℃保存，等待染色观察。

⑻测定NETs杀菌率组：在加入金黄色葡萄球菌的前15 min中加入细胞松弛素D（作

### 用浓度10µg/ml）。

⑼吸出培养液，用0.01% TritionX-100冰上孵育20 min，用1ml移液枪抽吸培养液3次，使细胞充分裂解，使细菌均匀地分布在培养液中。

⑽充分混匀培养液，再将培养液吸出，用0.01% TritionX-100冰上孵育20 min，用1 ml

移液枪抽吸培养液3次，使细胞充分裂解，使细菌均匀地分布在培养液中。

⑾无菌PBS将20µl培养液用连续梯度稀释法稀释1000倍，取100µl稀释液均匀涂于LB

培养板，37℃恒温箱培养24小时后计细菌菌落数（CFU）。

⑿对照组：将菌液以相同的作用浓度加到DMEM培养液（含5%灭活血清）孵育2 h，按上述相同方法计数CFU。

⒀计算杀菌率杀菌率=（对照组CFU-实验组CFU）/对照组CFU

### 5.3.6 检测ROS被抑制时，IL-33对MRSA诱导NETs Th成和杀菌率的影响

⑴将用多聚赖氨酸预处理15 mm的灭菌圆玻片加入至24孔细胞培养板。

⑵每孔加入中性粒细胞悬液500µl (浓度为1×107个/ml)，于37℃含5%CO2培养箱中孵育0.5 h。

⑶加入浓度为60 ng/ml的IL-33溶液，于37℃含5%CO2培养箱中孵育2 h。

⑷分两组分别测定NETs形成和NETs杀菌率。

⑸加入金黄色葡萄球菌菌液10µl（浓度为5×107 CFU/ml, MOI为10: 1）和200µM

DPI，继续在37℃含5%CO2培养箱中孵育2 h，取出圆玻片加到新的24孔细胞培养板板中。

⑹测定NETs生成组：在新的24孔板里将细胞用4%多聚甲醛固定10 min，吸去多聚甲醛PBS洗1次×5 min，后加入新的PBS 4℃保存，等待染色观察。

⑺测定NETs杀菌率组：在加入金黄色葡萄球菌的前15 min中加入细胞松弛素D（作用浓度10µg/ml）。

⑻充分混匀培养液，再将培养液吸出，用0.01% TritionX-100冰上孵育20 min，用1 ml

移液枪抽吸培养液3次，使细胞充分裂解，使细菌均匀地分布在培养液中。

⑼无菌PBS将20µl培养液用连续梯度稀释法稀释1000倍，取100µl稀释液均匀涂于LB

培养板，37℃恒温箱培养24小时后计细菌菌落数（CFU）。

⑽对照组：将菌液以相同的作用浓度加到DMEM培养液（含5%灭活血清）孵育2 h，

### 按上述相同方法计数CFU。

⑾计算杀菌率杀菌率=（对照组CFU-实验组CFU）/对照组CFU

### 5.3.7 NETs免疫荧光染色

⑴从冰箱取出固定好的24孔板，室温静置30 min，用PBS洗3次×5 min。

⑵加Staining buffer 孵育1 h。

⑶加入一抗（anti-mouse Elastase抗体），用含0.3% TritonX-100的Staining buffer（1: 500）稀释，将稀释液滴加至玻片上，4℃孵育过夜。

⑷PBS洗涤3次×5 min，加入用含0.3%TritonX-100的Staining buffer（1: 500）稀释的二抗（Donkey anti-rabbit IgG-FITC）室温避光1 h。

⑸PBS洗涤3次×5 min，加DAPI染核室温孵育5 min。

⑹PBS洗涤2次×5 min。

⑺取一干净的载玻片，滴抗荧光淬灭封片液一滴，细胞面朝下，轻轻盖在封片液上

（注意防止气泡的产生）。

⑻荧光显微镜下观察NETs形成情况并拍照。

### 5.3.8 统计分析

使用Prism软件进行数据处理，实验数据以平均数与标准差（mean±SD）表示。数据经方差分析之后进行*t*-检验分析，*P*﹤0.05显示有显著性统计学差异。

## 5.4 实验结果

### 5.4.1 MRSA促进中性粒细胞表达IL-33

中性粒细胞培养液中加入MRSA刺激，在不同时间点收集上清液，ELISA测定

IL-33表达。结果显示，随MRSA刺激时间延长，IL-33表达水平明显增加（*P*<0.05）

（图5.1）。



图5.1 IL-33在中性粒细胞中的表达（\**P*<0.05，n=4）

### 5.4.2 IL-33对MRSA诱导NETs Th成和杀菌率的影响

中性粒细胞经不同浓度IL-33预处理，加入MRSA刺激2 h观察NETs生成情况。IL-33浓度在20 ng/ml时，视野内可见少量NETs；在40 ng/ml时，视野内可见1/3细胞形成NETs；在60 ng/ml时，视野内NETs弥漫性分布（图5.2A）。结果提示，NETs生成在0～60 ng/ml内随着IL-33浓度升高而增多，呈正相关。NETs的杀菌率在0～40 ng/ml内随着IL-33浓度升高而增强；IL-33浓度为60 ng/ml时，NETs生成增多，但其杀菌率无明显上升（图5.2B）。



图5.2 IL-33对NETs形成和杀菌率的影响(\**P*<0.05，n=4)

### 5.4.3 DNA 酶（DNaseⅠ）对 NETs Th成和杀菌率的影响MRSA刺激中性粒细胞生成NETs。DNaseⅠ可降解破坏NETs网状结构，释放其

捕获的细菌。图5.3结果显示，相对于未处理组，DNaseⅠ处理组的NETs形成率和杀菌率均显著降低（*P*<0.05）。



图5.3 DNaseⅠ对NETs形成和杀菌率的影响(\**P*<0.05，n=4)

### 5.4.4 ROS抑制剂（DPI）对NETs Th成和杀菌率的影响

前期结果显示IL-33杀菌机制涉及ROS活性，为进一步探讨ROS在NETs生成中的作用。特异性ROS抑制剂（DPI）处理中性粒细胞，结果显示NETs的形成率明显减少，同时其杀菌率降低（图5.4A 和5.4B）。



图5.4 DPI对NETs形成和杀菌率的影响(\**P*<0.05，n=4)

## 5.5 讨论

Zychlinsky等在研究中性粒细胞胞外网（NETs）结构时发现，NETs由解聚的染色体网状结构、组蛋白和嗜天青颗粒蛋白组成，能够将包括金黄色葡萄球菌在内的多种病原微生物杀死[39]。最早在人类阑尾炎和细菌性痢疾动物模型的炎症部位发现NETs，其普遍存在于炎症部位[13]，并认为NETs参与机体抗感染作用。本研究证实MRSA诱导中性粒细胞生成NETs，并对MRSA具有杀伤作用；并发现IL-33处理能明显增加NETs生成，及随后杀伤MRSA的能力；用DNA酶降解NETs后，杀菌活

性受阻。另有报道亦证实NETs的抗感染功能，比如慢性肉芽肿患者因NETs形成障碍，常面临反复多重感染的灾难性后果，但是在接受针对性治疗后可以恢复形成NETs能力，有效地控制感染的发生[40]，新生儿因NETs迟发形成而导致细菌感染的易感性现象[18]。

本研究发现，MRSA感染刺激中性粒细胞分泌IL-33，在24 h内IL-33表达水平与作用时间呈正相关，随时间的继续延长，IL-33水平不再上升，其可能原因是中性粒细胞具有较短的活力时间相关[13, 41]。本研究探讨IL-33与中性粒细胞NETs形成及杀菌率的联系，发现低浓度IL-33有少量促进NETs的生成，在一定浓度范围内，NETs的形成随着作用浓度的增加而增加，杀菌率增高；若IL-33作用浓度继续增加，NETs的形成及杀菌率不再增加，提示IL-33促进NETs生成存在一定的最适浓度范围。同时结合细胞松弛素D，抑制中性粒细胞的吞噬和脱颗粒作用后，发现中性粒细胞的杀菌率下降，提示中性粒细胞对MRSA杀伤存在多种作用方式（吞噬、脱颗粒和NETs），相互协调，共同促进。NETs杀伤作用的确切机制尚不清楚，有证据显示NETs的形成与超氧化物（ROS）产生密切相关。本研究发现，ROS特异抑制剂DPI可抑制NETs的形成，而在第三章中发现IL-33可促进ROS产生，由此可以推测，IL-33促进NETs形成和杀菌机制可能与ROS信号密切相关。中性粒细胞由于其高效率的胞外杀菌效应受到广泛重视，其分子机制有待更加深入的研究和探索。

### 全文总结

金黄色葡萄球菌是最常见的化脓性球菌，成为全球院内感染的首要致病菌。近几年来，由于抗生素的滥用，金黄色葡萄球菌对抗生素的多重耐药性，导致其致病性不断升高，病死率逐年增加。

现有的研究数据已证实，中性粒细胞处于机体抵抗微生物入侵、特别是抵抗化脓性细菌入侵的第一道防线。IL-33近年来发现的一种具有多种生物学功能活性的细胞因子，在感染性疾病、心血管疾病和自身免疫性疾病中发挥重要的调节作用。

本课题通过建立腹腔与皮肤感染模型，研究IL-33对小鼠死亡率和小鼠体内细菌清除率的影响，以及IL-33对小鼠伤口愈合时间和愈合率以及炎性细胞浸润的影响。同时结合体外实验，研究IL-33对中性粒细胞功能的影响，IL-33对中性粒细胞趋化因子受体CXCR2、呼吸爆发及粘附分子表达的影响，以及IL-33对中性粒细胞胞外诱捕网（NETs）生成的影响，探讨IL-33增强机体固有免疫抗细菌感染的作用机制。本研究发现IL-33可促进机体抗感染免疫作用，其机制涉及IL-33增强中性粒细胞杀菌功能，增强呼吸爆发、粘附分子及相关炎症细胞因子的表达，诱导中性粒细胞胞外诱捕网的生成，从而多途径增强中性粒细胞的生物学效应。

本研究所取得的主要结果如下：

1. 借助小鼠腹腔与皮肤感染模型，证实IL-33可延长细菌感染小鼠的存活时间，上调体内中性粒细胞数目，降低细菌负荷量；并可促进细菌感染皮肤的愈合，减少细菌侵入，增加局部感染伤口NETs生成。

2. 体外实验显示，IL-33通过趋化、吞噬和杀伤等途径，增加中性粒细胞的杀菌活性。

3. IL-33调节中性粒细胞杀菌机制与PI3K/AKT/mTOR信号相关。

4. IL-33调节中性粒细胞杀菌机制与促进中性粒细胞胞外诱捕网生成相关。

参考文献

[1] Grundmann HM, Aires-de-Sousa M Boyce J, et al. Emergence and resurgence of meticillin-resistant Staphylococcus aureus as a public-health threat. Lancet, 2006. 368(9538): 874-885.

[2] Daum RS, Seal JB. Evolving antimicrobial chemotherapy for Staphylococcus aureus infections: Our backs to the wall. Crit Care Med, 2001. 29(4 Suppl): N92-96.

[3] Zetola N, Francis JS, et al. Community-acquired meticillin-resistant Staphylococcus aureus: an emerging threat. Lancet Infect Dis, 2005. 5(5): 275-286.

[4] Goldstein EJ, Citron DM, Warren YA, et al. Virulence characteristics of community-associated Staphylococcus aureus and in vitro activities of moxifloxacin alone and in combination against community-associated and healthcare-associated meticillin-resistant and -susceptible S. aureus. J Med Microbiol, 2008. 57(Pt 4): 452-456.

[5] Nubel U, Dordel J, Kurt K, et al. A timescale for evolution, population expansion, and spatial spread of an emerging clone of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. PLoS Pathog, 2010. 6(4): e1000855.

[6] Xiao YH, Wang J, Li Y. Bacterial resistance surveillance in China: a report from Mohnarin 2004-2005. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008. 27(8): 697-708.

[7] Miller LG, Perdreau-Remington F, Rieg G, et al. Necrotizing fasciitis caused by community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Los Angeles. N Engl J Med, 2005. 352(14): 1445-1453.

[[8] Borregaard N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Borregaard%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17627888)1, [Sørensen OE](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=S%C3%B8rensen%20OE%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17627888), [Theilgaard-Mönch K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Theilgaard-M%C3%B6nch%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17627888). Theilgaard-Monch. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. Trends Immunol, 2007. 28(8): 340-345.

[9] Crist WM, Parmley RT, Holbrook CT, Castleberry RP, et al. Dysgranulopoietic neutropenia and abnormal monocytes in childhood vitamin B12 deficiency. Am J Hematol, 1980. 9(1): 89-107.

[10] Lyman GH, Delgado DJ. Risk and timing of hospitalization for febrile neutropenia in patients receiving CHOP, CHOP-R, or CNOP chemotherapy for

Intermediate-grade non-Hodgkin lymphoma. Cancer, 2003. 98(11): 2402-2409.

[11] Quinn MT, Ammons MC, DeLeo FR. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. Clin Sci (Lond), 2006. 111(1): 1-20.

[[12] Dalgetty DM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Dalgetty%20DM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18456670), [Sallenave JM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Sallenave%20JM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18456670), [Critchley HO](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Critchley%20HO%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18456670), [Williams AR](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Williams%20AR%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=18456670), et al. Altered secretory leukocyte protease inhibitor expression in the uterine decidua of tubal compared with intrauterine pregnancy. Hum Reprod, 2008. 23(7): 1485-1490.

[13] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science, 2004. 303(5663): 1532-1535.

[14] Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J Cell Biol, 2007. 176(2): 231-241.

[15] Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatinJCellBiol, 2012. 198(5): 773-783.

[16] Buchanan, JT, et al. DNase expression allows the pathogen group A Streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps. Curr Biol, 2006. 16(4): 396-400.

[17] Buchanan JT, Simpson AJ, Aziz RK, Liu GY, et al. An endonuclease allows Streptococcus pneumoniae to escape from neutrophil extracellular traps. Curr Biol, 2006. 16(4): 401-407.

[18] Yost CC, Cody MJ, Harris ES, et al. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. Blood, 2009. 113(25): 6419-6427.

[19] Sponheim J, Pollheimer J, Olsen T, et al. Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is preferentially expressed in ulceration-associated myofibroblasts. Am J Pathol, 2010. 177(6): 2804-2815.

[20] Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'PLoSOne, 2008. 3(10): e3331.

[21] Espinassous Q, Garciade-Paco E, Garcia-Verdugo, et al. IL-33 enhances lipopolysaccharide-induced inflammatory cytokine production from mouse

Macrophages by regulating lipopolysaccharide receptor complex. J Immunol, 2009. 183(2): 1446-1455.

[22] Suzukawa M, Iikura M, Koketsu R, et al. An IL-1 cytokine member, IL-33, induces human basophil activation via its ST2 receptor. J Immunol, 2008. 181(9): 5981-5989.

[23] Cherry W, Yoon J, Bartemes K, et al. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. J Allergy Clin Immunol, 2008. 121(6): 1484-1490.

[24] Roger T, Calandra T. Interleukin-33 safeguards neutrophils in sepsis. Nat Med, 2010.16(6): 638-639.

[25] Alves-Filho J C, SÉnego F, Souto Fo, et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. Nat Med, 2010. 16(6): 708-712.

[26] 胡世莲. IL-33在皮肤伤口愈合过程中的作用及机制研究. [D]. 广东药学院, 2013.

[27] Tedder TF, Penta AC, Levine HB, et al. Expression of the human leukocyte adhesion molecule, LAM1. Identity with the TQ1 and Leu-8 differentiation antigens. J Immunol, 1990. 144(2): 532-540.

[28] Arfors KE, Lundberq C, [Lindbom L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lindbom%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=3539230), et al. A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo. Blood, 1987. 69(1): 338-340.

[29] Moore KL, Patel KD, Bruehl RE, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. J Cell Biol, 1995. 128(4): 661-671.

[30] Von Andrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, et al. Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte beta 2 integrins in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(17): 7538-7542.

[31] Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C, et al. Neutrophils in the innate immune response. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005. 53(6): 505-517.

[32] 胡天惠, 贝泠, 沈恂, 等. 嗜中性白细胞呼吸爆发与胞内外钙信号的关系研究. 生物物理学报, 1998.14(2): 41-47.

[33] Jones DH, Schmalstieg FC, Dempsey K, et al. Subcellular distribution and

Mobilization of MAC-1 (CD11b/CD18) in neonatal neutrophils. Blood, 1990. 75(2): 488-498.

[34] Jutila M, Rott L, Berg E, et al. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo: comparison with LFA-1 and MAC-1. J Immunol, 1989. 143(10): 3318-3324.

[35] Thomas W, Sämann MD. The multiple facets of mTOR in immunity. Trends Immunol, 2009. 30(5): 218-226.

[36] Dryden MS. Skin and soft tissue infection: microbiology and epidemiology. Int J Antimicrob Agents, 2009. 34(1): S2-S7.

[37] Voyich JM, Otto M, Mathema B, et al. Is Panton-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus diseaseJInfectDis, 2007. 195(11): 1727-1728.

[38] Sandig, H, et al. IL-33 causes selective mast cell tolerance to bacterial cell wall products by inducing IRAK1 degradation. Eur J Immunol, 2013. 43(4): 979-988.

[[39] Papayannopoulos V](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Papayannopoulos%20V%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20974816), [Metzler KD](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Metzler%20KD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20974816), [Hakkim A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Hakkim%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20974816), [Zychlinsky A](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zychlinsky%20A%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=20974816). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. J Cell Biol, 2010.191(3): 677-691.

[40] Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. Blood, 2009. 114(13): 2619-2622.

[41] Ermert D, Urban CF, Laube B, Goosmann C, Zychlinsky A, Brinkmann V. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. J Innate Immun, 2009. 1(3): 181-193.

**已发表综述**

**IL-33与人类疾病关系的研究进展**倪倩胡世莲尹辉

**【摘要】**IL-33是近年来发现的一种具有多种生物学功能活性的细胞因子，属于IL-1家族新成员，可作为核内定位分子发挥转录因子的作用，亦可作为一种前炎性细胞因子参与组织特异性免疫病理损伤。IL-33还被认为是细胞坏死后释放的一种“警报素”，在激发免疫系统引起组织损伤或反应中发挥重要作用。近年来证实，IL-33通过与其受体ST2结合，活化胞内NF-nB等信号通路，参与调节炎症反应、感染性疾病、心血管疾病及肿瘤等多种疾病的发生发展过程。

【关键词】 IL-33； ST2

**Progress on IL-33 and human diseases**

NI Qian, HU Shi-lian, YIN Hui *Department of Microbiology and Immunology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China*

Corresponding author: YIN Hui, E-ma[il: huiyin0103@163. com](mailto:huiyin0103@163.com)

**【Abstract】**Interleukin (IL) -33, a new member of the IL-1 family of cytokines, has been found to exhibit a large body of biological activities. IL-33 may act as a nuclear localization factor and proinflammatory cytokine participating in specific immunopathological injuries. Meantime, IL-33 has also been identified as a new 'alarmin' released when cell damaged and play a critical role in modulating tissue injuries or response. Recent studies suggest that activation of T1/ST2 receptor by IL-33 induces intracellular signaling through the NF-nB pathway as well as MAPKs. It has been demonstrated that IL-33 plays a critical role in various diseases such as inflammatory response, infectious diseases and cardiovascular diseases. In this review the role of IL-33 in the inflammation of several disease pathologies will be elucidated.

**【Key words】**IL-33; ST2; Disease

IL-33属于IL-1家族新成员，2005年首次报道其基因序列和结构与IL-1þ和IL-18相似。近年来发现，IL-33是一个具有多种生物学功能活性的细胞因子，通过结合细胞表面受体ST2活化胞内核转录因子（NF-nB）等信号通路，在炎症、感染等多种疾病中发挥重要的调节作用。

**1 IL-33生物学功能**

1.1 IL-33的信号

IL-33的基因序列、结构与IL-1家族成员IL-1和IL-18相似。人IL-33基因定位于9号染色体（9p24.1），而小鼠IL-33基因位于19号染色体（19C1）。IL-33通过H2A-H2B组白白复合物与染色质结合，调节核染色质固缩，促进核小体间的相互作用，发挥潜在的转录抑制因子效应。IL-33与其受体ST2结合后，通过募集下游信号分子，如髓样分化因子88(MyD88)、IL-1相关蛋白激酶-1、IL-1相关蛋白激酶-4和TNF受体相关因子-6，激活核因子NF-nB和丝裂原活化蛋白激酶（MAPK），从而调节IL-4、IL-5、IL-13等Th2型细胞因子的转录以及随后的生物学活性[1-2]。近年来发现，功能活性的IL-33并非由原先认为的Caspase-1酶切所生成，在于IL-33缺乏Caspase-1剪切的作用位点。IL-33可由Caspase-3和Caspase-7分别在175和178位氨基酸残基位点剪切而活化[3]，亦能被中性粒细胞丝氨酸蛋白酶、组织蛋白酶G和弹性蛋白酶酶切产生三种不同的活性形式。

1.2 IL-33的功能

IL-33作为IL-1家族新成员，其多种生物学功能活性逐渐受到人们的关注。IL-1家族细胞因子在炎症反应、传染性疾病和自身免疫性疾病中发挥重要的调节作用，其中IL-1a，IL-1þ和IL-18作为此家族的主要成员，具有较强的致炎效应。IL-33广泛表达于多种免疫细胞和组织实质细胞，如上皮细胞、树突状细胞、活化的巨噬细胞和平滑肌细胞等。近来发现，在嗜酸性粒细胞、血管内皮细胞、肌成纤维细胞及心肌细胞中亦存在IL-33表达，如成纤维细胞在细胞因子IL-1þ、IFN-a刺激后，可明显上调IL-33水平[4]。在细胞发生坏死时，IL-33可作为一种新型“警报素”释放，引起自分泌或旁分泌的炎症反应，且其以促炎性介质释放的方式来源于细胞坏死并非细胞凋亡[5]。IL-33在调节Th2型免疫应答及相关炎症反应中扮演重要的角色。现已知，IL-33在诸多疾病，如类风湿性关节炎、心血管疾病及感染性疾病中发挥重要的免疫调节作用，参与这些疾病的发生发展过程。

**2 IL-33与疾病**

2.1炎症

2.1.1皮肤炎症：近来研究显示，特应性皮炎和银屑病患者皮肤组织IL-33的表达明显增高，且局部IL-33通过上调其它炎性细胞因子如IL-13分泌，促进皮肤炎性细胞聚集和胶原沉积，引起皮肤纤维化病变[6-7]. Cevikbas等[8]在特应性皮炎患者皮肤组织中

发现，IL-33及其受体表达显著上升，其病理机制涉及局部损伤组织中释放大量的IL-33，随后通过趋化、活化肥大细胞和嗜中性粒细胞，促进成纤维细胞增生和胶原沉积，诱发慢性炎症性皮肤病。此外，在佛波酯诱导的皮肤炎症模型中，ST2-/-小鼠相对野生型小鼠显示较轻的皮肤组织病理损伤[9]。

2.1.2肺纤维化：肺纤维化的形成主要由肺组织炎症损伤、组织结构破坏及随后伴有肺间质细胞积聚的组织修复多环节组成。在此过程中，肺炎症细胞（主要为单核巨噬细胞）、肺泡上皮细胞和肥大细胞分泌多种细胞因子、炎性介质等生物活性物质，通过直接或间接的作用，促进肺纤维化发生。在博来霉素诱导肺纤维化模型中发现，IL-33表达在肺损伤的急性期（肺泡炎过程）和肺损伤的慢性期（肺纤维化过程）均显著性升高[10]。同时，在博来霉素刺激下，ST2基因过表达小鼠中肺组织形态结构病理损伤减轻，炎性细胞因子表达下降，肺纤维化小鼠的存活率明显增加[11]。由此，肺组织中IL-33/ST2信号可能参与调节Th2型免疫应答和肺组织纤维化的炎症过程。

2.1.3类风湿性关节炎：在关节炎患者滑膜中IL-33表达水平升高，而在胶原诱导小鼠关节炎模型中亦发现，IL-33在关节炎症部位高表达，提示局部IL-33水平升高可能是关节炎症和骨质破坏的病理基础之一。Verri报道[12]，ST2预处理可减轻抗原诱导大鼠关节炎症的损伤及滑膜的过度增生，其作用可能与ST2作为“诱骗受体”阻滞IL-33功能活性相关，随后降低炎症细胞浸润，减少炎性细胞因子IL-6、IL-12和TNF-a生成，从而改善关节炎症的免疫病理损伤。IL-33参与类风湿性关节炎的病理损伤过程，其机制涉及IL-33趋化、激活肥大细胞分泌IL-6、IL-13和VEGF等细胞因子，及促进成纤维细胞分泌IL-6、CCL11和VEGF等炎性介质，诱发局部炎症性免疫细胞聚集和关节炎症损伤[13]。

2.2感染性疾病

2.2.1病毒性感染：IL-33作为一种新型“警报素（alarmin）”，在细胞坏死时从胞内释放，可促进细胞毒性CD8+T细胞（CTL）活化、克隆增殖及分化，并增强CTL 对

RNA/DNA病毒的防御能力，有效控制病毒感染[14]。Walzl 等[15]在呼吸道合胞病毒( RSV)感染模型中发现，抗-ST2单抗处理可减弱小鼠体内Th2型细胞因子介导的嗜酸性呼吸道炎症，而在非嗜酸性呼吸道炎症中使用抗ST2单抗未见其效果。IL-33通过上调nuocyte细胞和调节性（Treg）细胞，促进肝保护性细胞因子生成，缓解急性病毒性肝炎病理损伤[16]。现已知，IL-33/ST2 信号介导的免疫炎症反应在登革热病毒

和流感病毒等病毒感染性疾病中发挥一定的作用，但其具体机制有待进一步阐明[17]。

2.2.2细菌性感染：大量研究显示，效应性Th1和Th17细胞在防御病原菌（如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和结核杆菌）感染中发挥极其重要的作用。近年来，IL-33在抗细菌感染免疫中的作用日益受到关注。在脓毒血症感染动物模型中，IL-33处理能明显改善小鼠的存活率，其作用涉及IL-33募集中性粒细胞到达感染部位，并增强其吞噬和杀菌能力[18]。Enoksson随后发现[19]，IL-33趋化中性粒细胞的机制表现为肥大细胞依赖性形式。Hazlett[20]等证实，在绿脓杆菌感染所致角膜炎症中，IL-33和ST2的表达明显增加，而经外源性IL-33处理后可减轻绿脓杆菌引起的角膜炎症状，其作用机制与上调Th2 型细胞因子IL-4表达，而抑制Th1型细胞因子IFN-y生成相关。

Wieland等[21]亦报道，ST2基因敲除小鼠在结核杆菌感染后，肺脏出现大量的淋巴细胞浸润和肺组织IFN-y水平升高，且脾脏中IFN-y+淋巴细胞比例增多，提示ST2具有负调节Th1型免疫应答的能力。

2.3心血管疾病

2.3.1冠心病：冠心病（CHD）的主要病理学基础是冠状动脉粥样硬化（CAS）斑块的形成。在动脉粥样硬化动物模型中发现，Th1/Th2型免疫细胞的比例失衡与CAS斑块的生成密切相关。IL-33通过诱导Th1/Th2型免疫偏移，促进Th2型细胞因子IL-4生成，减少Th1型细胞因子INF-y分泌，可降低炎症反应发生，促进CAS斑块稳定，缓解冠状动脉粥样硬化病理变化[22]。Th1型细胞因子属于强促炎因子，可激活全身的炎症反应，通过活化巨噬细胞、损伤的内皮细胞及诱导平滑肌细胞迁移等作用，促进低密度脂蛋白（LDL）进入内皮下继而被氧化成氧化型低密度脂蛋白（ox-LDL），促进巨噬细胞大量吞噬ox-LDL并转变成泡沫细胞，加剧炎症反应；而Th2型细胞因子（包括IL-33）可负调节Th1型免疫应答，阻止泡沫细胞的生成，进而抑制炎症反应，阻止CAS的发生[23]。

2.3.2肥胖：近年来发现，脂肪组织慢性轻度炎症导致的代谢紊乱在机体肥胖形成过程中发挥重要作用。IL-33及其受体ST2信号参与调节机体肥胖的发生，其可能机制为：

①调节Th1/Th2型免疫细胞活性。Rocha等[24]研究发现，白色脂肪组织中T细胞浸润引发的炎症反应在机体肥胖形成中起关键性作用，其中以Th1型免疫细胞活性增强为主，导致多种前炎性细胞因子分泌增加。IL-33/ST2信号可抑制Th1型免疫细胞的活化，并上调脂肪组织中Th2型细胞因子IL-4和IL-13的水平，在机体肥胖发病过程中

起保护作用；②促进脂肪组织中巨噬细胞从经典致炎性的M1型向具有免疫调节作用的M2型转化[25]；③参与调节多种肥胖相关性代谢途径，如重组IL-33治疗可缓解糖尿病小鼠肥胖发生。

2.4阿尔茨海默病（AD）

阿尔茨海默病（AD）是发生在老年期及老年前期的一种原发性退行性脑病，为一种持续性高级神经功能活动障碍，属于神经退行性疾病。AD病理特征是神经元外的þ-淀粉蛋白聚集形成老年班，神经元内tau蛋白异常聚集形成神经缠结，脑皮质及海马胆碱能神经元及其突触大量丢失，累积的皮质动脉出现血管淀粉样变性。有研究表明，AD神经病理损伤与炎性细胞因子增多相关。Chapuis等[26]在应用转录组织和遗传学技术寻找与AD相关联的基因过程中，发现AD患者脑内的IL-33表达显著减少，与AD的发生、发展密切相关。Aþ的沉积在AD发病中起关键作用，而IL-33表达的减少又显著增加患AD的风险，由此IL-33可能参与调节Aþ在体内的代谢过程。IL-33作为一种核因子可通过调节靶基因转录，减少细胞内Aþ的生成，但其具体作用机制尚未清楚。

2.5肿瘤

近来研究提示，体内IL-33及其受体ST2水平的变化对于白血病、肝癌和肺癌患者病情的进展、诊断及预后提供重要的参考价值[27-28]. Jovanovic等[29]在小鼠乳腺肿瘤动物模型中发现，阻断ST2信号可抑制肿瘤细胞的生长和转移，其机制与上调炎性细胞因子生成和促进自然杀伤细胞（NK）和CTL活化相关。此外，IL-33组成性表达于正常血管内皮细胞，参与调节内皮细胞的增殖、迁移和分化。现已发现，在肿瘤发生转移时，在肿瘤组织和血清中出现高水平的IL-33表达，且IL-33与血清中IFN-a、IFN-y的水平和病理评分呈正相关。IL-33在肿瘤早期时被激活表达，且发挥与IFN-a、IFN-y类似的促炎作用，提示IL-33有可能作为一种新的肿瘤诊断标志。

**3结语**

IL-1家族新成员的IL-33作为一种参与免疫调节的重要细胞因子，诱导Th2型免疫应答发生，并发挥核转录因子活性。IL-33还能激活机体的固有免疫和适应性免疫应答，并根据不同的疾病状态发挥特定的生物学效应。因此，针对IL-33/ST2信号途径的调控可作为防治多种炎症性疾病的重要靶点。然而，有关IL-33的基本生物学问题仍有待解决，如IL-33的核定位效应及在病理状态下的加工与释放。此外，IL-33

在其它免疫相关性疾病中的作用及机制还有待于进一步阐明。

参考文献

[1] Blom L, Poulsen LK. IL-1 family members IL-18 and IL-33 upregulate the inflammatory potential of differentiated human Th1 and Th2 cultures. J Immunol, 2012, 189 (9): 4331-4337.

[2] Yin H, Li XY, Jin XB, et al. IL-33 prolongs murine cardiac allograft survival through induction of TH2-type immune deviation. Transplantation, 2010, 89(10) : 1189-1197.

[3] Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Gabay C, et al. Interleukin-33 is biologically active independent of caspase-1 cleavage. J Biol Chem, 2009, 284(29): 19420-19426.

[4] Sponheim J, Pollheimer J, Olsen T, et al. Inflammatory bowel disease-associated interleukin-33 is preferentially expressed in 0µlceration-associated myofibroblasts. Am J Pathol, 2010, 177(6): 2804-2815.

[5] Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin. PLoSOne, 2008, 3(10): e3331.

[6] Seltmann J, Werfel T, Wittmann M. Evidence for a reg0µlatory loop between IFN-y and IL-33 in skin inflammation. Exp Dermatol, 2013, 22(2): 102-107.

[7] Rankin AL, Mumm JB, Murphy E, et al. IL-33 induces IL-33-dependent cutaneous fibrosis. J Immunol, 2010, 184(3): 1526-1535.

[8] Cevikbas F, Steinhoff M. IL-33: a novel danger signal system in atopic dermatitis. J Investig Med, 2012, 60(8): 1151-1156.

[9] Hueber AJ, Alves-Filho JC, Asquith DL, et al. IL-33 induces skin inflammation with mast cell and neutrophil activation. Eur J Immunol, 2011, 41(8): 2229-2237.

[10] 许姣, 刘超, 郑金旭, 吴立艳, 朱勤. IL-33在肺纤维化小鼠的表达. 江苏医药, 2013, 39 (4): 373-375.

[11] Tajima S, Bando M, Ohno S, et al. ST2 gene induced by type 2 helper T cell and proinflammatory cytokine stim0µli may mod0µlate lung injury and fibrosis. Exp Lung Res, 2007, 33(2): 81-97.

[12] Verri WJ, Souto F, Vieira SM, et al. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. Ann Rheum Dis, 2010, 69(9): 1697-1703.

[13] Xu D, Jiang HR, Kewin P, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(31): 10913-10918.

[14] BonillaWV, Anjia Fröhlich, Senn K, et al. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8+ T cell responses. Science, 2012, 335(6071): 984-989.

[15] Walzl G, Mathews S, Kendall S et al. Inhibition of T1/ST2 during respiratory syncytial virus infection prevents T helper cell type2 (Th2)–but not Th1-driven immunopathology. J Exp Med, 2008, 193(7): 785-792.

[16] Liang Y, Jie Z, Hou L, et al. IL-33 induces nuocytes and modulates liver injury in viral hepatitis. J Immunol, 2013, 190(11): 5666-5675.

[17] Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, et al. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. Nat Immunol, 2011, 12(11): 1045-1054.

[18] Alves-Filho JC, Sonego F, Souto FO, et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. Nat Med, 2010, 16(6): 708-712.

[19] Enoksson M, Möller-Westerberg C, Wicher G, et al. Intraperitoneal influx of neutrophils in response to IL-33 is mast cell-dependent. Blood, 2013, 121(3): 530-536.

[20] Hazlett LD, MoClellan SA, Barrett RP, et al. IL-33 shifts macrophage polarization, promoting resistance against Pseudomonas aeruginosa keratitis. Invest Ophtalmol Vis Sci, 2010, 51(3): 1524-1532.

[21] Wieland CW, Windt GJ, Florquin S, et al. ST2 deficient mice display a normal host defense against p0µlmonary infection with mycobacterium tuberculosis. Microbes Infect, 2009, 11(4): 524-530.

[22] Willems S, Hoefer I, Pasterkamp G. The role of the Interleukin 1 receptor-like 1 (ST2) and Interleukin-33 pathway in cardiovasc0µlar disease and cardiovascular risk assessment. Minerva Med, 2012, 103(6): 513-524.

[23] McLaren JE, Michael DR, Salter RC, et al. IL-33 reduces macrophage foam cell formation. J Immunol, 2010, 185(2): 1222-1229.

[24] Cozzone D, FröjdöS, Disse E, et al. Isoform-specific defects of ins0µlin stimulation of Akt/protein kinase B(PKB) in skeletal muscle cells from type2 diabetic patients. Diabetologia, 2008, 51(3): 512-521.

[25] Miller AM, Asquith DL, Hueber AJ, et al. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. Circ Res, 2010, 107(5): 650-658.

[26] Chapuis J, Hot D, Hansmanne F, et al. Transcriptomic and genetic identify IL-33 as a candidate gene for Alzheimer's disease. Mol Psychiatry, 2009, 14(11): 1004-1016.

[27] Bergis D, Kassis V, Ranglack A, et al. High serum levels of the Interleukin-33 receptor soluble ST2 as a negative prognostic factor in hepatocellular carcinoma. Transl Oncol, 2013, 6(3): 311-318.

[28] Hu LA, Fu Y, Zhang DN, et al. Serum IL-33 as a diagnostic and prognostic marker in non- small cell lung cancer. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(4): 2563-2566.

[29] Jovanovic I, Radosavljevic G, Mitrovic M, et al. ST2 deletion enhances innate and acquired immunity to murine mammary carcinoma. Eur J Immunol, 2011, 41(7): 1902-1912.

附录1 英文缩写语中文对照

**英文缩写英文全称中文全称**

LB lysogeny broth溶菌肉汤

Methicillin-resistant Staphylococcus

MRSA

aureus

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌

EDTA Ethylendiaminotetraacetic acid 乙二胺四乙酸二钠 Tris Tris(hydroxymethyl) aminomethane 三羟甲基氨基甲烷 ddH2O double-distilled water 双蒸水

PMN Poly-morphonuclear leukocyte 多形核白细胞

NETs Neutrophil extracellular traps 中性粒细胞胞外诱捕网

DMSO Dimethyl sulfoxide 二甲基亚砜

DMEM dulbecco's modified eagle medium Dulbecco's改良Eagle培养基 FBS Fetal bovine serum 胎牛血清

LPS Lipopolysaccharide 脂多糖

DEPC Diethylpyrocarbonate 焦碳酸二乙酯

TBE TBE buffer TBE 缓冲液

EB Ethidium Bromide 溴化乙啶

dNTP Deoxynucleoside triphosphate 脱氧核糖核苷酸

PBS Phosphate buffered saline 磷酸盐缓冲液

cDNA Deoxyribonucleic acid 脱氧核糖核酸

DNA Complementary DNA 互补 DNA

HE Hematoxylin-eosin 苏木素-伊红 FITC Fluorescein isothiocyanate 异硫氰酸荧光素 FCM Flow cytometry 流式细胞术

Suppression of tumorigenicity 2

ST2L

ligand

瘤变抑制因子2受体

RAPA Rapamycin雷帕霉素

RPM Revolutions per minute转/分钟

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| PE | Phycoerythrin | 藻红蛋白 |
| HBV | Hepatitis B virus | 乙型肝炎病毒 |
| HIV | Human Immunodeficiency Virus | [人类免疫缺陷病毒](http://baike.baidu.com/view/226769.htm) |
| IL | Interleukin | 白细胞介素 |
| IL-6 | Interleukin-6 | 白细胞介素-6 |
| IFN-y | Interferon-gamma | 干扰素-y |
| TNF-a | Tumor necrosis factor-a | 肿瘤坏死因子a |
| TLR | Toll Like Receptors | Toll 样受体 |
| mRNA | Messenger RNA | 信使 RNA |
| M-MLV | M-MLV Reverse transcriptase | M-MLV 逆转录酶 |
| PCR | Polymerase chain reaction | 聚合酶链反应 |

RT-PCR

Reverse transcription polymerase chain reaction

逆转录聚合酶链反应

PMA Phorbol-12-myristate-13-acetate 豆蔻酰佛波醇乙酯

DPI Diphenyleneiodonium 二联苯碘

CFU Colony-Forming Units 菌落形成单位

ml Millilitre 毫升

min Minute 分钟

DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole 4，6-联脒-2-苯基吲哚 DNase I Deoxyribonuclease I 脱氧核糖核酸酶I

附录2 攻读学位期间发表的论文

1. **Ni Q,** Yuan BH, Liu T, Lan F, Luo XC, Lu XY, Huang P, Dai LC, Jin XB, Yin H. Sphingosine 1 phosphate receptor 1 agonist SEW2871 prolongs heterotopic heart allograft survival in mice. Int Immunopharmacol. 2015,26(1):37-42. (SCI, IF=2.71)

2. **倪倩**，胡世莲，尹辉. IL-33与人类疾病关系的研究进展. 国际免疫学杂

志.2013,36(5):355-358.

3. Yin H, Li X, Zhang B, Liu T, Yuan B, **Ni Q**, Hu S, Gu H. Sirolimus ameliorates inflammatory responses by switching the regulatory T/T helper type 17 profile in murine colitis. Immunology. 2013, 139(4):494-502.

4. Yin H, Li X, Hu S, Liu T, Yuan B, Gu H, **Ni Q**, Zhang X, Zheng F. IL-33 accelerates cutaneous wound healing involved in upregulation of alternatively activated macrophages. Mol Immunol. 2013, 56 (4):347-353.

5. Yin H, Li X, Hu S, Liu T, Yuan B, **Ni Q**, Lan F, Luo X, Gu H, Zheng F. IL-33 promotes Staphylococcus aureus-infected wound healing in mice. Int Immunopharmacol. 2013, 17(2):432-438.

致 谢

光阴似箭，如月如梭，我三年的硕士研究生时光即将画下句点。回首三年的学习和生活，我得到了许多人的帮助和关心，在此聊表数笔以表达我最深切的敬意和谢意。

首先向我的导师尹辉教授表示崇高的敬意！正是在导师悉心的关怀与指导下，我能顺利地开展学位课题的研究，并顺利完成毕业论文。作为长者，导师在生活上也给予我无微不至的照顾，其谆谆教诲，终生难忘。渊博的专业知识、严肃的科学态度、精益求精的工作作风、敏锐的洞察力让我受益终生，是我一生学习的榜样。本论文从选题、实验设计、实施方案到查阅文献资料等，都离不开尹辉老师的精心指导，在此，谨向尹辉老师至以诚挚的谢意和崇高的敬意。

感谢广东药学院为我提供了既舒适又有着浓厚学术氛围的学习环境；感谢广东省生物活性药物研究重点实验室为我提供的实验平台。

感谢我们实验室的金小宝、卢雪梅、李小波、沈娟、褚夫江、刘涛、毛建文、王伟章、吴立蓉、马艳、梅寒芳、吴红梅、刘文彬等老师在日常生活和学习上给予的帮助和关心。

感谢广东药学院研究生院全体老师的关心与帮助。

感谢广东药学院基础学院各位领导在生活、学习方面给予我很多的指导和无私帮助。

三年里，我与我的同学鲍冬梅、陈鉴华、梁露露、吴慧以及邓璐璐结成了深厚的友谊，在此衷心地向他们表示祝福！

感谢实验室的师姐蒲俏虹、吴玉萍、汪洁以及师兄吴舜彬的帮组和支持！感谢实验室的师妹兰芳、罗晓春、卢小艳、黄萍、王影娇、曾文婷、王玉姣、

冯盼盼、师弟吴清清、胡文龙、周录泳，感谢你们的鼓励和支持！

感谢广东药学院2012级全体研究生同学。三年来，你们在生活、学习上都给予了我许多无私的帮助！

感谢我的爸爸、妈妈、妹妹、弟弟以及所有关心我的朋友，正是他们给予的支持与鼓励才使我坚持完成了三年的研究生学习，是他们给了我面对困难与挫折的勇气！