

·基础研究·

# CFTR氯通道调控小鼠内毒素血症血小板活化及炎症因子生成

胡瑞<sup>1</sup>, 周仪<sup>1</sup>, 李梅<sup>2</sup>, 王冠蕾<sup>1</sup>

(1. 中山大学中山医学院药理学教研室和心脑血管研究中心, 广东广州 510080; 2. 中山大学附属第三医院特诊医疗病区, 广东广州 510630)

**摘要:**【目的】囊性纤维化跨膜转导调节因子(CFTR)氯通道参与血小板活化的调控。本研究探讨CFTR氯通道对脂多糖(LPS)引起的内毒素血症过程中血小板活化、血小板数目及血小板介导炎症因子生成的影响。【方法】应用8~12周龄CFTR全基因敲除(*Cftr*<sup>-/-</sup>)小鼠及野生型(*Cftr*<sup>+/+</sup>)小鼠,制备股静脉注射LPS诱导内毒素血症模型。分离小鼠外周血的血小板,采用免疫印迹法检测TLR4蛋白的表达,采用实时定量PCR法检测炎症因子*IL-1β*、*IL-6*、*IL-10*、*TNF-α*和*CRP*的表达。采用腺病毒介导的CFTR cDNA过表达(Ad-CFTR)和应用CFTR矫正剂VX-661处理人巨核细胞株MEG-01,检测CFTR对LPS引起的上述指标变化的影响。【结果】*Cftr*<sup>+/+</sup>小鼠静脉注射LPS后,外周血血小板TLR4和P-selectin表达增加、血小板数目减少、血小板表达促炎炎症因子mRNA水平升高,而CFTR全基因敲除加重之( $P<0.05$ )。体外MEG-01人巨核细胞应用LPS刺激后,CFTR蛋白表达降低,TLR4蛋白表达升高,LPS上调*IL-1β*、*CRP*、*TNF-α*而下调*IL-10*表达( $P<0.01$ );Ad-CFTR或VX661可部分或全部逆转上述效应( $P<0.01$ )。【结论】本研究揭示了CFTR氯通道可调控血小板活化及血小板TLR4介导的炎症因子生成。

**关键词:**CFTR;LPS;血小板;内毒素血症;炎症因子

中图分类号:R96

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2022)03-0344-08

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0302

## CFTR Chloride Channel Regulates Platelet Activation and Inflammatory Factors Production in Mouse Endotoxemia

HU Rui<sup>1</sup>, ZHOU Yi<sup>1</sup>, LI Mei<sup>2</sup>, WANG Guan-lei<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmacology, Cardiac and Cerebral Vascular Research Center, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. VIP Healthcare Center, The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Correspondence to: WANG Guan-lei, E-mail: wangglei@mail.sysu.edu.cn; LI Mei, E-mail: limei36@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:**【Objective】Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride channel is involved in the regulation of platelet activation. This study investigated the effects of CFTR on platelet activation, platelet count and platelet-mediated inflammatory factors production during lipopolysaccharide (LPS) induced endotoxemia.【Methods】The mouse model of LPS induced endotoxemia was established using *Cftr*<sup>-/-</sup> and wild-type *Cftr*<sup>+/+</sup> mice aged 8-12 weeks. The expression of TLR4 (Toll-like receptor 4) protein was detected by western blotting, and the mRNA expression of inflammatory factors including *IL-1β*, *IL-6*, *IL-10*, *TNF-α* and *CRP* was detected by real-time quantitative PCR. The adenovirus-mediated CFTR cDNA overexpression (Ad-CFTR) in human megakaryocyte MEG-01 and CFTR corrector VX-661 were used to detect the effects of CFTR on LPS-induced changes of these indexes.【Results】*Cftr*<sup>+/+</sup> mice injected with LPS dis-

收稿日期:2021-10-28

基金项目:国家自然科学基金(81773722,82073848);广州市民生科技攻关计划(201803010092)

作者简介:胡瑞,硕士生,E-mail:hurui8@mail2.sysu.edu.cn;王冠蕾,通信作者,教授,研究方向:心脑血管药理学,E-mail:wangglei@mail.sysu.edu.cn;李梅,共同通信作者,主治医师,研究方向:心脑血管代谢性疾病临床与基础研究,E-mail:limei36@mail.sysu.edu.cn

played increased TLR4 protein expression and inflammatory factor mRNA levels on peripheral circulating platelets, which were exaggerated by global *Cftr* knockout ( $P<0.05$ ). MEG-01 cells treated with LPS exhibited decreased CFTR protein expression, increased TLR4 protein expression, up-regulated *IL-1 $\beta$* , *CRP*, *TNF- $\alpha$*  levels and down-regulated *IL-10* level ( $P<0.01$ ), while Ad-CFTR or VX661 partially or completely reversed the above effects ( $P<0.01$ ).【Conclusion】 This study revealed that CFTR chloride channel may regulate platelet activation and platelet TLR4-mediated inflammatory cytokines production during endotoxemia.

**Key words:** CFTR; LPS; platelets; endotoxemia; inflammatory cytokines

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43 (3): 344-351]

血小板在体内主要的生理功能是参与凝血、血小板血栓形成及血管收缩<sup>[1]</sup>。近年来发现血小板通过免疫炎症机制在多种细菌和/或病毒性感染性疾病、心血管疾病及肿瘤的发生发展中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。活化的血小板还与单核细胞及淋巴细胞相结合形成微颗粒,促进中性粒细胞胞外捕获网(neutrophil extracellular traps, NETs)的形成,促进炎症因子的生成,从而加重炎症反应<sup>[3-4]</sup>。最近临床证据表明,部分 COVID-19 感染患者血小板过度激活,促血栓形成风险增加,并出现血小板减少的现象<sup>[5]</sup>。这些新发现支持血小板在疾病相关的炎症因子生成过程中发挥重要作用。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),也称为内毒素,是一种内源性炎症物质。LPS上的疏水区脂质 A 是 Toll 样受体 4 (TLR4)的配体,LPS 通过与 TLR4 结合,激活先天性免疫细胞(如单核细胞和巨噬细胞等)从而介导免疫和炎症反应<sup>[6]</sup>。LPS 亦可刺激血小板的 TLR4 表达上调,诱导促炎性细胞因子包括 IL-1 $\beta$ 、IL-6、CRP、TNF- $\alpha$  等的释放,是内毒素血症血小板介导的免疫和炎症反应的关键步骤<sup>[7-8]</sup>。活化的血小板还通过促进微血栓形成导致血小板减少和加重炎症反应,进一步加重感染<sup>[9-10]</sup>。但是 LPS 诱导内毒素血症血小板活化及其介导炎症因子生成的机制并未完全清楚。囊性纤维化跨膜电导调节体(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)是一种 cAMP 调节的 Cl<sup>-</sup> 通道蛋白,介导氯离子的跨膜转运。CFTR 单基因突变是一种常染色体隐性遗传病囊性纤维化(cystic fibrosis, CF)的主要病因。在 CF 患者及 CFTR 基因突变小鼠的研究发现:在 LPS 诱导的肺部炎症模型上,血小板-中性粒细胞相互作用增加<sup>[11]</sup>,主要是由于 CFTR 调控中性粒细胞功能所致。另外,应用 *Cftr*<sup>-/-</sup> 小鼠的研究发现,CFTR 可通过调控巨噬细胞的浸润参与动脉

粥样硬化<sup>[12]</sup>。但是,目前尚未有 CFTR 氯通道调控血小板炎症反应的报道。静脉注射 LPS 制备内毒素血症模型可模拟临床上如严重创伤、感染时 TLRs 介导的免疫和炎症。我们通过应用 VX-661 (一种 CFTR 矫正剂)和腺病毒介导的 CFTR cDNA 过表达和 LPS 诱导的内毒素血症小鼠模型,探索 CFTR 基因缺失是否可通过上调 TLR4 和活化血小板,进而促进内毒素血症时炎症因子的生成?

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

本研究所涉及的所有动物实验经中山大学实验动物伦理委员会的批准,批准编号为:SYSU-IA-CUC-2020-000446,并且符合科技部《实验动物护理和使用指南》。CFTR 基因敲除小鼠(CFTR<sup>tm1Un-cg</sup>(FABPCFTR)1Jaw/J; *Cftr*<sup>-/-</sup>)购于美国 The Jackson Laboratory,该小鼠是 C57BL/6, TVB/N 和 129 的混合遗传背景。文中所涉及的 C57BL/6 小鼠全部购置于中山大学实验动物中心,动物许可证编号为 SCXK(粤)2018-0003。本研究中所有小鼠均为 8~12 周龄,性别为雄性,体质量匹配。所有小鼠饲养于中山大学实验动物中心。饲养条件为:SPF 级动物房,每笼 5 只小鼠,每日清扫,专人喂养。室温(25 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度(60 $\pm$ 10)%,模拟正常昼夜生物节律。

### 1.2 主要材料

人巨核细胞株(megakaryocyte cell strains; MEG-01)细胞购自美国 American type culture collection (ATCC), RPMI-1640 培养基、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco 公司,CFTR 抗体购自美国 Novus 公司, $\beta$ -actin、GAPDH 抗体购自中国 Boster 生物公司,BCA 试剂盒购自美国赛默飞公司,ECL

试剂盒购自美国 Millipore 公司。

### 1.3 主要仪器设备

高速冷冻离心机:德国 Eppendorf Centrifuge 公司;电转装置:美国 Bio-Rad 公司;凝胶成像系统:美国 ChemiDoc XRS 公司;流式细胞仪,美国 Beckman Coulter 公司;细胞自动计数仪,美国 Corning 公司;Q-PCR 仪,美国赛默飞公司。

### 1.4 实验方法

1.4.1 LPS 诱导内毒素血症模型 取 8~12 周龄 *Cftr*<sup>-/-</sup> 和 *Cftr*<sup>+/+</sup> 雄性小鼠,分别给予股静脉注射 10 mg/kg LPS 刺激 12 h 以建立小鼠内毒素血症模型。

1.4.2 小鼠外周血血小板提取 静脉注射 LPS 12 h 后,再给予 10 g/L 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,打开小鼠腹腔,使用 2 mL 注射器进行腹主动脉取血,全血转移到 15 mL 离心管中。在 25°C, 300×g 条件下离心 2 min,得到上层富含血小板血清。将上层血清在 25°C, 500×g 条件下再次离心 5 min,弃去上清得到血小板沉淀,留下备用。

1.4.3 CFTR 过表达病毒转染 将约 2×10<sup>5</sup> 个/mL 细胞接种于培养皿,当 MEG-01 细胞密度达到 60%~70% 时,取 800 μL 无血清无抗生素的培养基稀释 CFTR 过表达病毒<sup>[21]</sup>。该病毒由美国爱荷华大学 John F. Engelhardt 教授赠与,扩增与优化使其 MOI 值为 100。将 800 μL 稀释后的病毒液加入培养皿,细胞培养箱中培养 6 h 后吸去培养基,加入正常培养细胞的培养基,继续培养。

1.4.4 CFTR 矫正剂 VX661 预处理 将 VX-661 充分溶解于 DMSO 中,之后将浓度调整为 0.1 mmol/kg;在 LPS 注射前 6 h,采用静脉注射的方式给与 VX-661 使其充分发挥作用。

1.4.5 流式细胞实验 将富含血小板(10<sup>6</sup>个细胞/mL)的 PRP 在 4°C 条件下用荧光偶联抗体(包括 FITC 偶联 CD61 (Biolegend, USA) 和 APC-eFlour 780 偶联 CD62p (P-selectin, Biolegend, USA)) 标记 30 min。然后 4% PFA 固定细胞 10 min。使用 Beckman Gallios 流式细胞仪测量样本,并使用 Cytexpert 软件 (Beckman Coulter, USA) 进行分析。

1.4.6 MEG-01 细胞培养 将 MEG-01 细胞株用含有 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基进行培养,待细胞密度至 5×10<sup>5</sup> 时进行后续实验。

1.4.7 免疫印迹法 将细胞或血小板加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂 (cocktail) 冰上裂解 20 min。在 4°C, 15 000×g 条件下离心 15 min,得到蛋白上

清液。SDS-PAGE 电泳 2 h,转膜。封闭 90 min 后,与一抗 4°C 孵育过夜,洗膜后,用二抗孵育 90 min, ECL 反应显色,显影。使用 Image J 1.42 软件,对目的蛋白表达进行相对定量分析。

1.4.8 实时定量 PCR 用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 从血小板和巨核细胞中提取总 RNA,用 Roche 的 Transcriptor cDNA Synthesis Kit 逆转录 RNA。以 GAPDH 和 β-actin mRNA 作为内参,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法测定各基因 mRNA 表达的倍数变化。

### 1.5 统计学分析

数据数值均采用均数±标准差表示。数据处理两样本间比较采用 *t* 检验。多组数据比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),多组数据比较差异有统计学意义后,对于不同浓度处理组检测结果和对照组比较采用 Dunnett's *t* 检验;所有数据均采用 Graphpad Prism version 8.20 软件统计。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

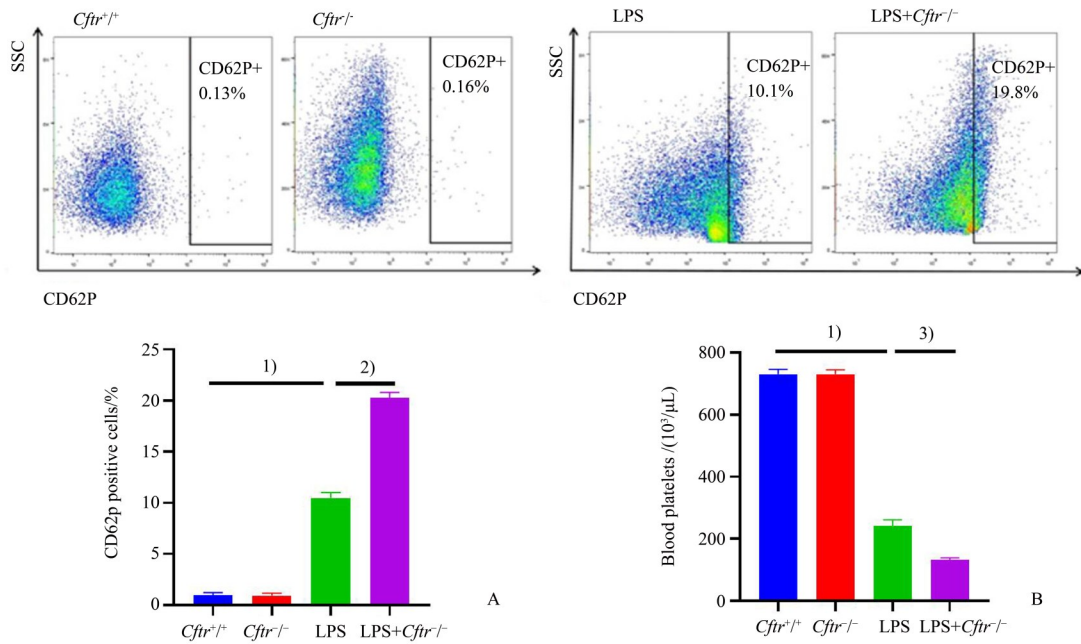
## 2 结果

### 2.1 CFTR 敲除促进 LPS 诱导的小鼠内毒素血症模型的血小板活化和血小板减少

8~12 周龄 *Cftr*<sup>-/-</sup> 和 *Cftr*<sup>+/+</sup> 小鼠分别给予股静脉注射 10 mg/kg LPS 刺激 12 h 以建立小鼠内毒素血症模型后,分离小鼠外周循环血液的血小板。如图 1A 所示,经单因素方差分析,四组间差异具有统计学意义 ( $F=476.4, P<0.000 1$ )。流式细胞仪分析实验显示, *Cftr*<sup>-/-</sup> 和 *Cftr*<sup>+/+</sup> 小鼠的血小板 P-selectin (CD62P) 表达并无显著差异,给予 LPS 刺激后,引起 P-selectin 表达显著升高,CFTR 敲除进一步促进 LPS 诱导的 P-selectin 升高 ( $P<0.001$ )。如图 1B 所示,经单因素方差分析,四组间差异具有统计学意义 ( $F=453.2, P<0.000 1$ )。血小板计数实验结果显示, *Cftr*<sup>-/-</sup> 和 *Cftr*<sup>+/+</sup> 小鼠血小板数量并无显著差异,给予 LPS 刺激后,血小板数量显著降低,CFTR 敲除进一步减低。LPS 刺激可引起血小板显著激活和血小板数量减少 ( $P<0.05$ ),CFTR 敲除进一步促进之。

### 2.2 CFTR 敲除加重 LPS 诱导的小鼠外周血血小板 TLR4 表达上调和促炎症因子 mRNA 表达上调

应用上述 LPS 诱导的小鼠内毒素血症模型,在分离的小鼠外周循环血液的血小板上应用 western blot 检测 TLR4 的表达。如图 2A 所示,经单因素方



LPS-induced platelet hyperactivity and thrombocytopenia were exacerbated in *Cfrt*<sup>-/-</sup> mice compared with *Cfrt*<sup>+/+</sup> mice, detected by A the flow cytometry analysis detecting CD62P expression (A) and the platelet count analysis in washed mouse peripheral circulating platelets (B). <sup>1)</sup>  $P < 0.001$  vs. *Cfrt*<sup>+/+</sup> group, <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  and <sup>3)</sup>  $P < 0.05$  vs. LPS group by *t*-test;  $n = 6$ .

图1 CFTR 敲除加剧LPS诱导的血小板活化和数量减少

Fig. 1 LPS-induced platelet activation and thrombocytopenia promoted by CFTR knockout

差分析,四组间差异具有统计学意义( $F = 116.1, P < 0.0001$ )。静息时,*Cfrt*<sup>-/-</sup>和*Cfrt*<sup>+/+</sup>小鼠血小板的TLR4蛋白表达并无显著性差异,LPS刺激后引起血小板TLR4蛋白表达升高;在*Cfrt*<sup>+/+</sup>小鼠,与给药前相比,LPS增加TLR4表达至274%;在*Cfrt*<sup>-/-</sup>小鼠,与给药前相比,LPS增加TLR4表达至351%;表明CFTR敲除增加了LPS诱导的血小板TLR4蛋白表达,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ,图2A)。采用实时定量PCR检测血小板炎症因子(*IL-6*、*IL-1β*、*TNF-α*、*IL-10*和*CRP*)的表达,如图2B所示,发现CFTR敲除会加剧LPS诱导的血小板炎症因子*IL-6* ( $F = 168.9, P < 0.0001$ )、*IL-1β* ( $F = 99.26, P < 0.0001$ )、*TNF-α* ( $F = 1336, P < 0.0001$ )和*CRP* ( $F = 271.1, P < 0.0001$ )表达,但降低*IL-10* ( $F = 93.69, P < 0.0001$ )表达。

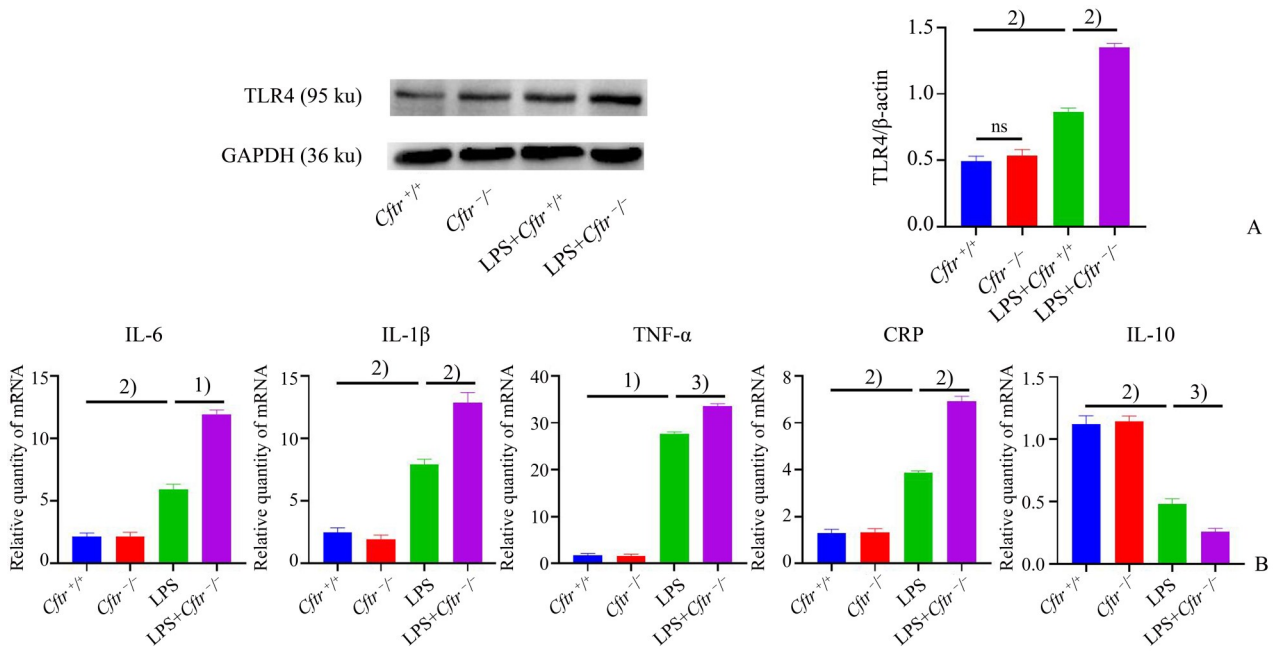
### 2.3 CFTR 过表达抑制 LPS 诱导的 MEG-01 细胞上 TLR4 蛋白表达升高

如图3B所示,经单因素方差分析,四组间差异具有统计学意义( $F = 269.4, P < 0.0001$ )。以1 μg/mL LPS与MEG-01细胞共孵育不同时间,发现LPS呈时间依赖性地升高TLR4蛋白表达,这与前述小鼠内毒素血症模型结果一致。为了特异性地研究

CFTR对血小板TLR4和血小板介导的炎症因子生成,我们在MEG-01细胞上过表达CFTR cDNA (Ad-CFTR)的腺病毒。应用构建的腺病毒介导的CFTR cDNA感染MEG-01细胞后,在荧光显微镜下观察,发现与Ad-CFTR组相比,CFTR过表达病毒感染之后荧光显著增强,CFTR蛋白表达显著增加,Ad-CFTR组CFTR表达量为Vector组的约183%,表明CFTR过表达后MEG-01细胞CFTR蛋白表达显著增加(图3A,  $F = 94.44, P < 0.0001$ )。CFTR cDNA过表达后,可显著降低LPS诱导的TLR4蛋白表达升高( $P < 0.01$ ),单独应用CFTR过表达病毒则对TLR4蛋白表达并无显著影响(图3C,  $F = 122.1, P < 0.0001$ )。

### 2.4 VX661 抑制 LPS 诱导的 MEG-01 细胞和小鼠血小板炎症因子 mRNA 表达升高

已报道HEK-293细胞给予CFTR特异性矫正剂VX-661(5 μmol/L)后,可促进胞内CFTR蛋白转运至细胞膜上。VX-661不仅上调CF突变体细胞膜CFTR氯通道的功能,也可在非CF细胞上促进细胞膜CFTR氯通道的功能。我们在LPS诱导的MEG-01细胞上预先孵育CFTR特异性矫正剂VX-661以上调CFTR氯通道功能,再采用实时定量



CFTR KO further enhances platelet TLR4 protein expression and pro-inflammatory responses in platelets from endotoxemic mice intravenously injected with LPS. A: Western blot analysis of platelet TLR4 protein expression B: The mRNA levels of *IL-6*, *IL-1β*, *TNF-α*, *IL-10* and *CRP* were analyzed by qRT-PCR in platelets of *Cfrt*<sup>-/-</sup> and *Cfrt*<sup>+/+</sup> mice injected with LPS for 12 h. <sup>1)</sup>  $P < 0.001$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.05$  and ns (no significance) means  $P > 0.05$  vs. *Cfrt*<sup>+/+</sup> group and vs. LPS group by *t*-test;  $n=6$ .

图2 CFTR敲除加重LPS诱导的小鼠外周血血小板TLR4表达上调和促炎症因子mRNA表达上调

Fig. 2 TLR4 protein expression and mRNA expression of pro-inflammatory cytokines enhanced by CFTR KO in peripheral circulating platelets from mice injected with LPS

PCR测定VX661对LPS诱导的炎症因子表达的影响<sup>[13-14]</sup>。如图4所示,LPS可诱导促炎症因子*IL-1β* ( $F=226.4$ ,  $P<0.0001$ ), *CRP* ( $F=63.77$ ,  $P<0.0001$ ), *TNF-α* ( $F=278$ ,  $P<0.0001$ ), *IL-6* ( $F=105.4$ ,  $P<0.0001$ )表达增加( $P<0.001$ ),而减少抗炎因子*IL-10* ( $F=71.56$ ,  $P<0.0001$ )的表达( $P<0.001$ ),预先孵育VX661可显著逆转之( $P<0.01$ )。我们继而在LPS诱导的小鼠内毒素血症模型上重复了该实验,得出了相似的结果。如图5所示,预先孵育VX661可显著逆转LPS诱发的小鼠外周血血小板上促炎症因子*IL-1β* ( $F=435.5$ ,  $P<0.0001$ ), *CRP* ( $F=88.9$ ,  $P<0.0001$ ), *TNF-α* ( $F=817.1$ ,  $P<0.0001$ ), *IL-6* ( $F=252.4$ ,  $P<0.0001$ )表达增加,而增加抗炎因子*IL-10* ( $F=96.92$ ,  $P<0.0001$ )的表达( $P<0.01$ )。

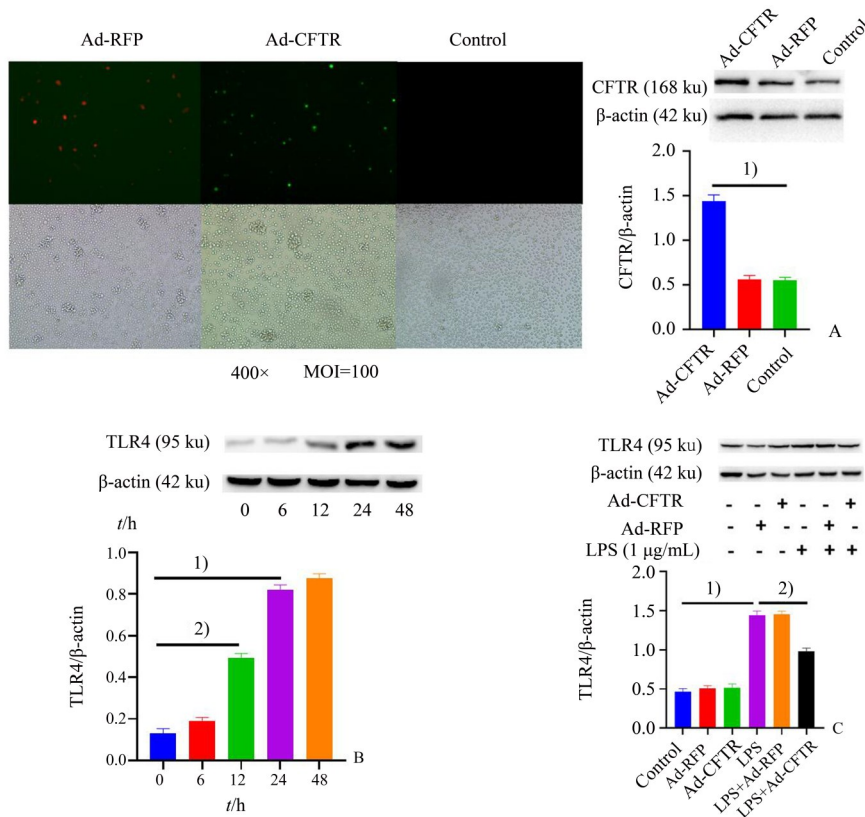
### 2.5 Ad-CFTR对LPS诱导的MEG-01细胞上炎症因子mRNA表达的调节

我们在MEG-01细胞应用Ad-CFTR,观察过表达CFTR cDNA对LPS诱导的MEG-01细胞炎症因子mRNA表达的影响。如图6所示,LPS刺激引起MEG-01细胞促炎症因子包括*IL-6*、*IL-1β*、*CRP*、

*TNF-α*表达增加,但降低抗炎因子*IL-10*的表达;Ad-CFTR可显著下调促炎症因子*IL-6* ( $F=372$ ,  $P<0.0001$ )、*IL-1β* ( $F=346.9$ ,  $P<0.0001$ )、*CRP* ( $F=493.2$ ,  $P<0.0001$ )、*TNF-α* ( $F=401.6$ ,  $P<0.0001$ )的水平(图6 A, B, C, D),而上调*IL-10* ( $F=135.9$ ,  $P<0.0001$ )的表达(图6 E)。

## 3 讨论

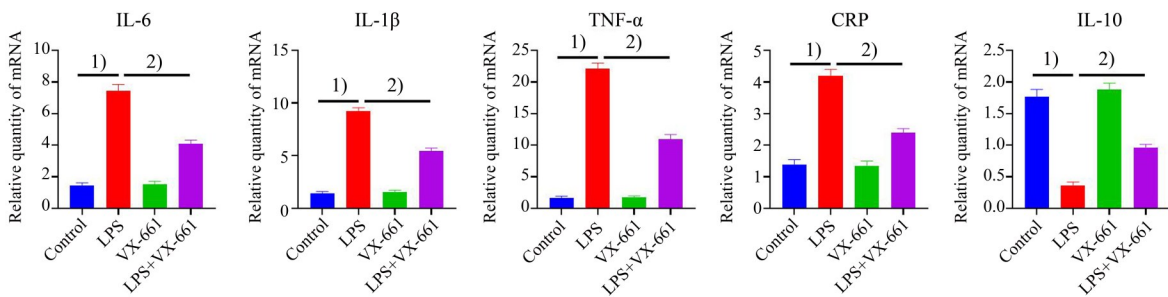
研究表明:CFTR是血小板活化的重要调控因子。本文应用*Cfrt*<sup>-/-</sup>小鼠,发现CFTR基因敲除加重了LPS诱导的内毒素血症小鼠模型外周血血小板的显著激活、血小板数量减少和血小板介导的炎症因子生成。LPS刺激可引起小鼠血小板TLR4蛋白表达和促炎症因子mRNA水平升高,引起抗炎因子如*IL-10*表达的降低。这提示CFTR可通过调控血小板TLR4介导的炎症信号通路,从而影响血小板介导的炎症反应。我们继而应用LPS刺激MEG-01人巨核细胞体外模型和腺病毒过表达CFTR cDNA实验验证了上述发现,并进一步应用CFTR矫



A: Immunofluorescence and western blot images showing the efficiency of adenovirus-mediated overexpression of CFTR cDNA (Ad-CFTR) in MEG-01 cells; B: LPS(1 µg/mL) reduces CFTR protein expression in a time-dependent manner; <sup>1)</sup>  $P < 0.001$  and <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  vs. 0 h group by *t*-test; C: Ad-CFTR significantly inhibited LPS-induced increase of TLR4 protein expression in MEG-01 cells. <sup>1)</sup>  $P < 0.001$  vs. control group and <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  vs. LPS group by *t*-test;  $n = 5$ .

图3 腺病毒介导CFTR过表达抑制LPS诱导的MEG-01细胞上TLR4表达升高

Fig. 3 LPS-induced increase of TLR4 protein expression in MEG-01 cells inhibited by Ad-CFTR



The qRT-PCR analysis shows that VX-661 inhibits LPS-induced mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in MEG-01 cells. <sup>1)</sup>  $P < 0.001$  vs. control group and <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  vs. LPS group by *t*-test;  $n = 6$ .

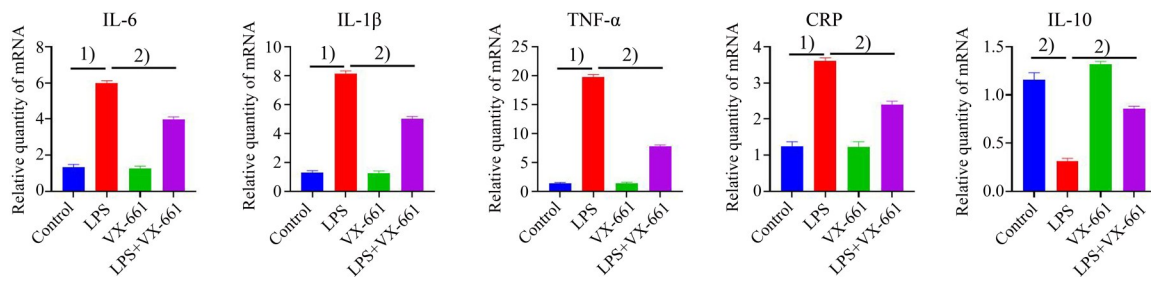
图4 VX-661抑制LPS诱导的MEG-01细胞炎症因子mRNA表达水平

Fig. 4 LPS-induced mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in MEG-01 cells inhibited by VX-661

正剂 VX661 发现上调 CFTR 氯通道功能可通过降低 TLR4 表达,从而有效地抑制血小板促炎因子 mRNA 水平。

血小板活化是血小板介导的免疫炎症早期关键环节,在内毒素血症、动脉粥样硬化、糖尿病和肿瘤的病理生理过程中均已确证。最近的研究<sup>[15-18]</sup>

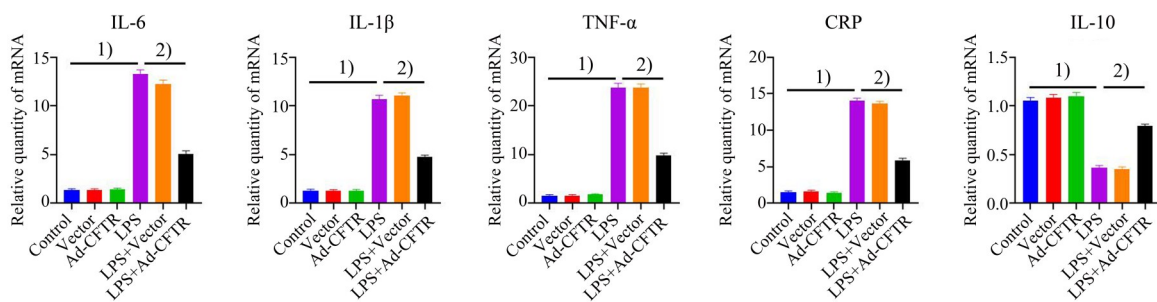
发现,应用血小板 CFTR 基因特异性敲除小鼠制备 LPS 诱导的肺损伤模型,CFTR 敲除可加重 LPS 诱导的血小板活化<sup>[19-20]</sup>,这与本研究的实验结果是一致的。LPS 刺激后血小板膜表面 P-selectin 表达增加,P-selectin 可与淋巴细胞和单核细胞上 P-selectin 的配体 P-选择素糖蛋白配体 1(P-selectin glyco-



The qRT-PCR analysis shows that VX-661 down-regulates the mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in platelets from LPS-induced endotoxemic mice. <sup>1)</sup>  $P < 0.001$  vs. control group and <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  vs. LPS group by  $t$ -test;  $n=6$ .

图5 VX-661抑制LPS诱导的小鼠血小板炎症因子mRNA表达水平

Fig. 5 LPS-induced mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in platelets from mice inhibited by VX-661



The mRNA level of *IL-6*, *IL-1β*, *IL-10* and *CRP* was analyzed by qRT-PCR in MEG-01 cells infected with Ad-CFTR, which were treated with LPS for another 24 h. <sup>1)</sup>  $P < 0.001$  vs. control group and <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  vs. LPS group by  $t$ -test.  $n=6$ .

图6 CFTR过表达对LPS诱导的MEG-01细胞上炎症因子mRNA表达的调节

Fig. 6 LPS-induced mRNA expression of inflammatory cytokines in MEG-01 cells regulated by Ad-CFTR

protein ligand 1, PSGL-1)相结合,从而形成血小板-单核细胞聚集体或者是血小板-淋巴细胞聚集体,这是血小板介导炎症因子生成过程中的重要环节。最近多项研究已证实CFTR可通过调控中性粒细胞凋亡、中性粒细胞胞外捕获网形成以及促炎症的因子释放而参与炎症过程<sup>[13-14]</sup>。MEG-01细胞过表达CFTR显著抑制LPS诱导的促炎症因子生成。这些研究结果表明:CFTR可直接通过调控血小板活化影响血小板介导的炎症因子生成,进而调控内毒素血症的炎症反应。

我们应用腺病毒过表达CFTR的研究发现,过表达CFTR可显著抑制LPS诱导的MEG-01细胞TLR4蛋白表达。TLR4是LPS的内源性配体,两者结合触发了TLR4介导的免疫炎症反应。研究报告,LPS诱导的血小板活化主要是通过激活TLR2或TLR4,进而活化下游的NF-κB炎症信号通路,并促进血小板炎性细胞因子如IL-1β和sCD40L等的释放,从而诱发和加重血小板炎症反应<sup>[16]</sup>。本研究在体和体外实验结果均表明CFTR基因干预可能通过调控血小板TLR4介导的炎症信号通路,进而

影响血小板炎症因子生成,但CFTR如何调控TLR4的具体分子机制还需要进一步探讨。

由于CFTR单基因突变是引起CF临床症状的分子基础,自2012年第一个治疗药物Kalydeco (ivacaftor)被FDA批准上市,至今已有数种针对CFTR基因突变的治疗药物在国外上市,包括本研究所应用的VX661(商品名:Tezacaftor)。这些药物可明显改善CF患者的临床症状,使CF患者的预期寿命明显延长,生活质量明显改善。CFTR与炎症的密切关系在多种炎症细胞上已多有报道<sup>[21-22]</sup>,但CFTR在血小板介导炎症过程中的作用则少有研究。VX661可促进细胞内正常的CFTR氯通道向细胞膜的转运,从而增强跨细胞膜CFTR氯通道介导的氯离子转运<sup>[7,9]</sup>。我们发现VX661可显著改善MEG-01细胞和LPS诱导的小鼠血小板炎症因子mRNA的表达,如降低LPS诱导的血小板活化、TLR4表达增加和血小板促炎症因子mRNA表达。腺病毒过表达CFTR的实验结果进一步提供了细胞特异性和基因特异性的证据。我们的研究结果提示:血小板CFTR氯通道有可能是一个新的、潜

在的治疗内毒素血症血小板介导的炎症因子生成的治疗靶点。这也为未来应用更多感染疾病的动物模型以深入研究血小板CFTR氯通道在免疫和炎症反应中的作用指出了方向。

综上所述,本研究揭示了CFTR可通过调控血小

板活化和血小板TLR4表达,从而调控LPS诱导的内毒素血症过程中血小板介导的促炎症因子生成。本研究提示CFTR可能是一个新的、潜在的干预内毒素血症血小板功能及其介导的炎症因子生成的靶点。

#### 参考文献

- [1] Faix JD. Biomarkers of sepsis [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2013, 50(1): 23-36.
- [2] Merx MW, Weber C. Sepsis and the heart [J]. *Circulation*, 2007, 116(7): 793-802.
- [3] Płóciennikowska A, Hromada A, Borzecka K, et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(3): 557-581.
- [4] Rieber N, Hector A, Carevic M, et al. Current concepts of immune dysregulation in cystic fibrosis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 52: 108-112.
- [5] Bakogiannis C, Sachse M, Stamatelopoulou K, et al. Platelet-derived chemokines in inflammation and atherosclerosis [J]. *Cytokine*, 2019, 122: 154-157.
- [6] Hottz ED, Azevedo Q, Isaclaudia G, et al. Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19 [J]. *Blood*, 2020, 136(11): 1330-1341.
- [7] Zhang S, LIU Y, Wang X, et al. SARS-CoV-2 binds platelet ACE2 to enhance thrombosis in COVID-19 [J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1): 120
- [8] Massip MM, Santa TA. Extracellular pH and lung infections in cystic fibrosis [J]. *Eur J Cell Biol*, 2018, 97(6): 402-410.
- [9] Cantin AM, Hartl D, Konstan M, et al. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy [J]. *J Cyst Fibros*, 2015, 14(4): 419-430.
- [10] Rathinam V, Zhao Y, Shao F, et al. Innate immunity to intracellular LPS [J]. *Nat Immunol*, 2019, 20(5): 527-533.
- [11] Paterson SL, Barry PJ, Horsley AR, et al. Tezacaftor and ivacaftor for the treatment of cystic fibrosis [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2020, 14(1): 15-30.
- [12] Dickson K, Lehmann C. Inflammatory response to different toxins in experimental sepsis models [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 41-43.
- [13] Salomão R, Ferreira BL, Salomão MC, et al. Sepsis: evolving concepts and challenges [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2019, 52(4): e8595.
- [14] Ciesielska AM, Matyjek, Kwiatkowska K, et al. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2021, 78(4): 1233-1261.
- [15] Zarbock A, Polanowska G, Ley K, et al. Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation [J]. *Blood Rev*, 2007, 21(2): 99-111.
- [16] Hotin N, Boulaftali BY, Camerer E, et al. Platelets and vascular integrity: how platelets prevent bleeding in inflammation [J]. *Blood*, 2018, 131(3): 277-288.
- [17] Roy A, Srivastava M, Saqib U, et al. Potential therapeutic targets for inflammation in toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 40: 79-89.
- [18] Rossaint J, Margraf A, Zarbock A, et al. Role of platelets in leukocyte recruitment and resolution of inflammation [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 2712.
- [19] Ortiz G, Yu MA, Looney MR, et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction in platelets drives lung hyperinflammation [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(4): 2041-2053.
- [20] Lucas K, Maes M. Role of the Toll Like Receptor (TLR) Radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway [J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 48(1): 190-204.
- [21] 王冠蕾. 囊性纤维化跨膜转导调节因子(CFTR)氯通道对心血管功能影响的研究进展 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2017, 38(2): 189-195. Wang GL. CFTR in cardiovascular functions [J]. *J SUN Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2017, 38(2): 189-195.
- [22] 李俊, 杨涵滢, 韩慧, 等. CFTR通过调控二磷酸腺苷受体P2Y<sub>12</sub>影响血小板活化 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2021, 42(4): 521-527. Li J, Yang HY, Han H, et al. CFTR regulates platelet activation via the p2y<sub>12</sub>-mediated signaling pathway [J]. *J SUN Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2021, 42(4): 521-527.