下调 PALM3 表达抑制脂多糖诱导的巨噬细胞炎性反应

陈旭昕　宋立成　孟激光　韩志海

摘　要　目的　探讨抑制 paralemmin－3(PALM3)表达对脂多糖(LPS)诱导的大鼠肺泡巨噬细胞系(NR8383)炎性反应的影响。**方法**　将 NR8383 细胞并接种至 6 孔板中,待融合度达 70%,加入 0.5μg/ml LPS 刺激 12h,用免疫荧光检测细胞 PALM3 表达及亚定位;用 0.5μg/ml LPS 刺激 NR8383 细胞并在 0、3、6、12、24 和 48h 收集细胞提取总 RNA,用 RT－PCR 法检测 PALM3 mRNA;同前接种细胞至 24 孔板,待融合度达 70%,将 PALM3 小干扰核糖核苷酸(siRNA)转染 NR8383 细胞(PALM3 siRNA 转染组),同时设立正常 NR8383 细胞组和对照转染组(转染 control siRNA),转染 48h 后,提细胞总蛋白用 Western blot 法检测 PALM3 蛋白水平;3 组细胞给予 LPS 刺激 12h,收集培养上清和核蛋白,用 ELISA 法检测培养上清中 IL－8、IL－6 的水平及核转录因子(NF－κB)转录活性。**结果**　PALM3 分子在 NR8383 细胞中有表达,LPS 可诱导 PALM3 表达;PALM3 siRNA 转染后成功下调 PALM3 蛋白表达,予 LPS 刺激后,与正常细胞及对照转染组比较,PALM3 siRNA 转染组培养上清中白介素－8(IL－8)和 IL－6 含量减少,PALM3 siRNA 转染组细胞中 NF－κB 转录活性亦被抑制。**结论**　NR8383 细胞中有 PALM3 表达,LPS 可诱导 NR8383 细胞中 PALM3 的蛋白表达,下调 PALM3 表达可抑制 LPS 诱导的炎性反应。

关键词　Paralemmin－3　脂多糖　巨噬细胞　炎症

中图分类号　R563　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2018.12.007

Downregulation of Paralemmin－3 Expression Inhibits the Inflammatory Reaction Induced by LPS in Alveolar Macrophages.　*Chen Xuxin, Song Licheng, Meng Jiguang, et al. Department of Respiratory Medicine, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100048, China*

Abstract　Objective　To investigate the effect of downregulation of paralemmin－3 (PALM3) expression on the LPS－induced inflammatory reaction in rat alveolar macrophages (NR8383 cells). **Methods**　NR8383 cells were conventionally cultured and seeded in 6－well plates. After the cell growth reached 70% confluence, NR8383 cells were treated with 0.5μg/ml for 12h. The expression and localization of PALM3 in NR8383 cells was determined by confocal immunofluorescence. And, the mRNA level of PALM3 were detected by RT－PCR at 0, 3, 6, 12, 24 and 48h post LPS－stimulation. Another NR8383 cells were seeded in 24－well plates. When the cell growth reached 70% confluence, the cells were transfected by PALM3 siRNA. Meanwhile, an empty vector was used as a negative control group and non－transfection NR8383 cells was used as a normal control group. At 48h after transfection, the protein expression of PALM3 in NR8383 cells was determined by Western blot analysis. LPS was administered into the cell culture medium at 48h post－transfection. The culture supernatant and nucleoprotein were collected at 12h after LPS－stimulation. The concentrations of interleukin－8 (IL－8) and IL－6 and the activity of nuclear transcrition factor－κB (NF－κB) were measured by ELISA. **Results**　PALM3 was expressed in NR8383 cells and LPS could upregulate the PALM3 expression in a time－dependent manner. PALM3 siRNA could suppress the expression of PALM3 in NR8383 cells effectively. Downregulation of PALM3 expression could significantly inhibit the production of IL－8 and IL－6 and the activation of NF－κB induced by LPS in NR8383 cells. **Conclusion**　PALM3 are expressed in rat alveolar macrophages (NR8383 cells) and LPS can cause PALM3－induced expression. Downregulation of PALM3 expression can ameliorate the inflammatory reactions to LPS in NR8383 cells.

Key words　Paralemmin－3; Lipopolysaccharide; Alveolar macrophages; Inflammation

肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)是“肺微环境”中为数最多的炎性细胞,作为固有免疫系统中的“第一道防线”在急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的发病机制中发挥着重要作用[1~3]。研究表明,肺泡巨噬细胞不仅参与了急性肺损伤中的炎性反应进展,还参与了炎症消散及组织修复[4]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),又称内毒素,是脂质和多糖的

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81300050);北京市自然科学基金资助项目(7182163);中国人民解放军海军总医院创新培养基金资助项目(CXPY201417)

作者单位:100048　北京,中国人民解放军海军总医院呼吸内科

通讯作者:韩志海,电子信箱:zhihaihandoctor@163.com

复合物,也是革兰阴性菌细胞壁中的重要成分,可通过 Toll 样受体 4(Toll - like receptor 4, TLR4)而激活肺泡巨噬细胞,肺泡巨噬细胞活化后可产生多种促炎因子参与炎性反应[4,5]。paralemmin - 3(PALM3)属于 paralemmin - 3 蛋白家族,笔者以往研究表明,抑制 PALM3 在小鼠肺内的表达可以减轻内毒素诱导的肺损伤的程度,从而改善肺损伤小鼠的预后,进一步抑制 PALM3 在肺泡上皮细胞中的表达则可显著抑制脂多糖诱导的炎性反应[6~9]。但 PALM3 在肺泡巨噬细胞中是否有表达,下调 PALM3 的表达是否具有上述类似效应需进一步探究证实。因此,本研究拟采用免疫荧光法检测 PALM3 在大鼠肺泡巨噬细胞系(NR8383 细胞)中的表达及定位,并检测 LPS 刺激后 PALM3 mRNA 动态变化情况,同时利用小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)下调 PALM3 在 NR8383 细胞中的表达,观察抑制 PALM3 表达后对 LPS 诱导的炎性反应是否存在影响,以期为巨噬细胞相关的炎性疾病如 ALI 等提供更多实验室依据。

材料与方法

1. 材料与试剂:大鼠肺泡巨噬细胞系 NR8383 细胞来源于美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)。control siRNA 和 PALM3 siRNA 均购于美国 Santacruz 公司。Lipofectamine 2000 和 Opt - MEM 无血清培养基来源于美国 Invitrogen 公司。LPS(Ecoil 0111: B4)购于美国 Sigma 公司。Ham′s F12 培养基和胎牛血清均为 Gibco 公司产品。大鼠 IL - 8、IL - 6 ELISA 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司。抗大鼠 PALM3 多克隆抗体为美国 Santacruz 公司产品。DAPI、细胞总蛋白提取试剂盒、FITC 标记的相应二抗及 HRP 标记的相应二抗购自碧云天生物技术公司产品。Trizol、反转录试剂盒及 PCR 试剂购于大连 TaKaRa 公司。细胞核蛋白提取试剂盒及 TransAM™ NF - κB Transcription Factor 检测试剂盒购于美国 ActiveMotif 公司产品。其他生化试剂均为进口或国产分析纯。

2. 细胞培养:在 37.0℃、5% CO_2 及 95% 湿度条件下,将 NR8383 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 Ham′s F12 培养基中,每隔 1 天换液 1 次,2 ~ 3 天传代 1 次。实验用细胞均处于对数生长期。

3. 免疫荧光检测 PALM3 的表达与定位:将 NR8383 细胞以 3×10^6/孔接种至铺有载玻片的 6 孔板中,待细胞融合为 70% 时给予 0.5μg/ml LPS 或等体积的 PBS 处理 12h 后终止培养,加入含 4% 多聚甲醛的 PBS 室温固定 20min;再用含 100mmol/L 甘氨酸的 PBS 清洗,加入含 0.3% Triton X - 100 的 PBS 处理细胞 20min;用 PBST 润洗细胞 3 次,室温下封闭 30min;加入1∶100稀释的相应一抗(抗大鼠 PALM3),充分洗脱后再向载玻片上滴加 FITC 标记的二抗,避光孵育 2h,DAPI 染核;PBST 润洗 3 次;防荧光猝灭剂滴加后,将盖玻片盖上并封片,荧光显微镜下观察并拍照。

4. RT - PCR 检测 PALM3 mRNA 表达变化:同前处理细胞,分别在 0、3、6、12、24 和 48h 时相点收集细胞。弃去原培养液,PBS 充分冲洗细胞后,加入 Trizol 裂解液提取总 RNA,反转录反应按照 TaKaRa prime script RT regent Kit 试剂盒说明书进行,设计目的基因及内参基因 β - actin 的引物。引物序列如下:PALM3:正义链 5′ - TTCCGAGTCTCCTTCTGAT - 3′,反义链 5′ - AACCACTTCTTCCACCTTAG - 3′;β - actin:正义链 5′ - CCATTGAACACGGCATTG - 3′,反义链 5′TACGACCAGAGGCATACA - 3′。反应条件为 95℃预变性 5min;95℃变性 30s、60℃退火 30s、72℃延伸 1min 共 40 个循环;72℃后延伸 10min。取 5μl PCR 产物与 6 × Loading Buffer 1μl 混匀上样,10V/cm 进行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳 30min,用 AlphaImager2200 凝胶成像系统摄像。以 β - actin 为内参照,计算各条带灰度值。

5. 细胞转染:同前接种细胞至 24 孔板中。按照美国 Santa Cruz 公司的说明书,分别稀释 control siRNA 和 PALM3 siRNA,然后按照美国 Invitrogen 公司 Lipofectamin2000 试剂说明操作转染细胞,用 50μl Opti - MEM 减血清培养基稀释 20 pmol siRNA 及 1μl Lipofectamin2000,再将两者均匀混合,共同孵育 20min;然后将混合液加入 1 个孔中,在 37℃,5% CO_2 及 95% 湿度条件下,孵育 6h 后;更换为含 10% 胎牛血清的 Ham′s F12 培养基继续培养 48h,备用后续实验。

6. Western blot 法检测 PALM3 蛋白表达:按上述方法接种转染细胞,共分为 3 组,分别为:正常细胞组、对照转染组(转染 control siRNA)和 PALM3 siRNA 转染组,转染 48h 后,用 Western blot 法检测 PALM3 蛋白水平。分别收集并提前各组细胞总蛋白,采用 Bradford 法测定各组细胞总蛋白浓度,取等量总蛋白行 SDS - PAGE 电泳,半干电转至 PVDF 膜上,然后封膜,一抗、二抗孵育,再用增强型 ECL 发光试剂盒显影曝光,AlphaImager2200 成像系统扫描,用

LeicaQwin 图像分析软件进行灰度值分析。

7. ELISA 法检测细胞培养上清中 IL－8 和 IL－6 水平：同前接种及转染细胞，共分为 3 组，转染 48h 后，同前加入 LPS 刺激 12h 后终止培养，收集 3 组细胞培养上清，用武汉华美生物工程有限公司 ELISA 试剂盒分别检测 IL－8、IL－6 含量，具体操作参照说明书进行。每个样本设置 3 个复孔，检测结果取平均值。

8. 核转录因子（nuclear transcrition factor－κB，NF－κB）活性检测：同前接种及转染细胞，共分 3 组，转染 48h 后，加入 LPS 刺激，12h 后终止培养，收集并提前 3 组细胞的核蛋白，同前采用 Bradford 法测定蛋白浓度。NF－κB p65 DNA 结合力测定采用 Active-Motif 公司 Trans^{AM} NF－κB Transcription Factor 试剂盒进行操作。

9. 统计学方法：采用 SPSS16.0 统计学软件进行统计分析，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间均数比较采用单因素方差分析，组间的两两比较采用 *SNK* 检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. PALM3 在 NR8383 细胞中的表达与定位：免疫荧光检测结果提示，未给予 LPS 刺激时，PALM3 主要分布于 NR8383 细胞胞膜，表达丰度低（图 1 中 A～C）；予以 LPS 刺激后，PALM3 表达上调，除在细胞膜上可检测到 PALM3 表达外，在细胞质中亦可检测到 PALM3 表达，均匀分布于细胞膜及细胞质中（图 1 中 D～F）。

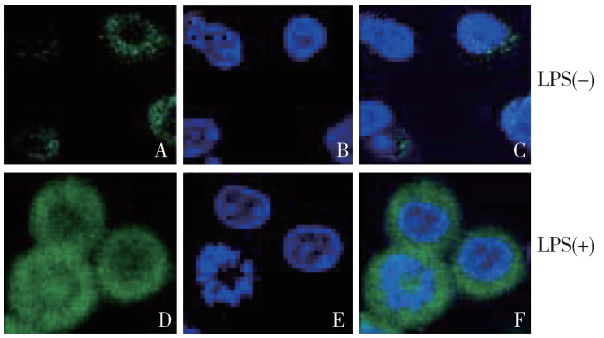


图 1　大鼠肺泡巨噬细胞系 NR8383 细胞中 PALM3 的免疫荧光检测（×100）

A、D. PALM3 的荧光检测（绿色荧光）；B、E. DAPI 染核；C、F. 融合图像

2. LPS 刺激后 PALM3 mRNA 动态变化：采用 RT－PCR 法对 NR8383 细胞内 PALM3 的 mRNA 水平进行检测，结果显示，正常 NR8383 细胞中存在 PALM3 表达，LPS 刺激后，随作用的时间 PALM3 mRNA 水平逐渐升高，各时间点与 0h 时间点比较，差异均有统计学意义（$P<0.05$，图 2），但 24h 时间点与 48h 时间点比较，差异无统计学意义（$P>0.05$，图 2）。

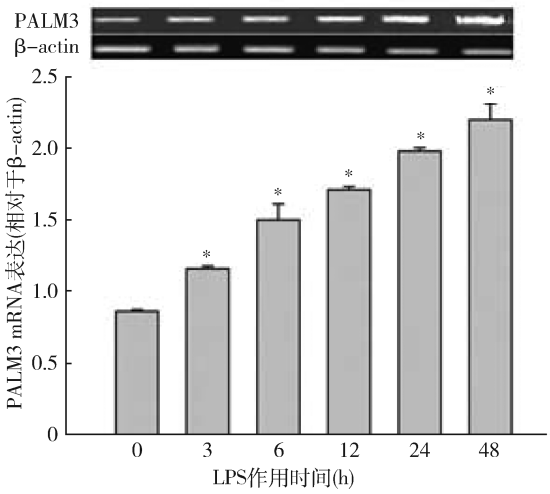


图 2　LPS 刺激后大鼠肺泡巨噬细胞系 NR8383 细胞中 PALM3 mRNA 动态变化

与 0h 比较，* $P<0.05$

3. 各组细胞中 PALM3 蛋白水平检测：采用 Western blot 法检测各组细胞中 PALM3 的蛋白水平，结果显示，与正常细胞组及对照转染组比较，PALM3 siRNA 转染组 PALM3 蛋白表达水平显著下降，差异有统计学意义（$P<0.05$，图 3）。

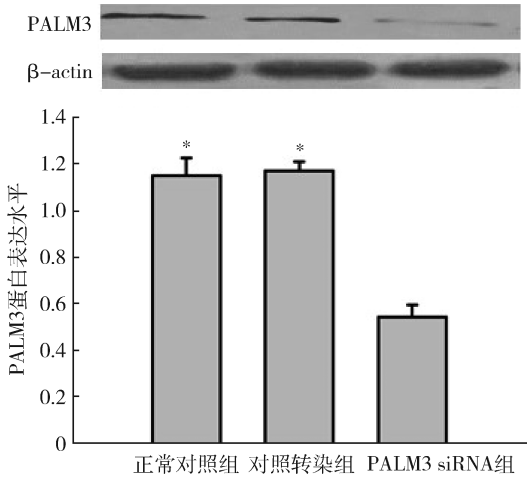


图 3　各组细胞内 PALM3 的蛋白表达水平

与 PALM3 siRNA 组比较，* $P<0.05$

4. 各组细胞培养上清中 IL－8 和 IL－6 含量：采用 ELISA 法检测各组细胞培养上清中炎性因子含量，结果显示，与正常细胞组及对照转染组比较，

PALM3 siRNA 转染组培养上清中细胞因子 IL－8 和 IL－6 水平下降，差异有统计学意义（$P<0.05$，图 4）。

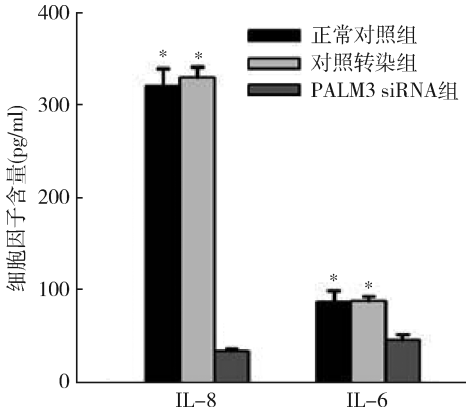


图 4 LPS 刺激后各组细胞培养上清中 IL－8 和 IL－6 水平

与 PALM3 siRNA 组比较，$^{*}P<0.05$

5. 各组细胞中 NF－κB 活性水平：采用 ELSIA 法检测各组细胞中 NF－κB p65 的 DNA 结合活性，ELISA 结果显示，与正常细胞组及对照转染组比较，PALM3 siRNA 转染组细胞内 NF－κB p65 DNA 结合活性显著受抑，差异有统计学意义（$P<0.05$，图 5）。

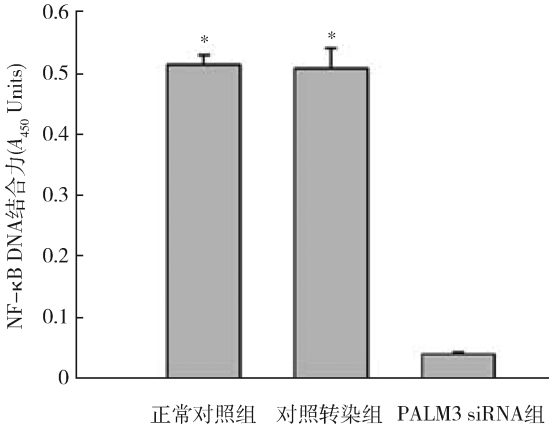


图 5 LPS 刺激后各组细胞中 NF－κB 的活性

与 PALM3 siRNA 组比较，$^{*}P<0.05$

讨 论

肺泡巨噬细胞是 ALI 中重要的效应细胞，激活后可产生多种炎性因子，这些炎性因子参与了 ALI 发生、发展过程，其中一些炎性因子同时具有强大的趋化作用，可进一步吸引、趋化其他炎性细胞迁移至炎症局部而促进炎性反应的持续[2,10]。LPS 可激活肺泡巨噬细胞并可诱导其向 M1 方向极化诱发炎症进展[11]。因此调控巨噬细胞的活化状态及极化方向可能减轻炎性反应，而改善 ALI 等炎症失控疾病的预后。本研究发现 PALM3 分子在肺泡巨噬细胞系 NR8383 细胞中有表达，且 LPS 可上调 PALM3 的表达，而抑制 PALM3 在 NR8383 细胞中的表达后可减少 LPS 诱导的炎性因子 IL－8 和 IL－6 的释放以及转录因子 NF－κB 的转录活性。

PALM3 属于 Paralemmin 蛋白家族之一，该家族共包括 PALM1、PALM2、PALM3 及 palmdelphin（PALMD）4 个蛋白分子，主要表达于脑、肾脏、肾上腺、乳腺及乳腺癌组织中[12]。既往文献显示，PALM1 主要与细胞形状的控制、质膜的动力学、细胞的运动性、肿瘤细胞的侵袭和转移能力以及肿瘤淋巴管生成有关[13]。而相比较于 PALM1，PALM 家族的其他成员分子的生物学功能目前知之甚少。笔者以往研究发现，PALM3 可能作为“桥梁”在 LPS－TLR4 信号通路中起到连接“接头分子”的作用，下调 PALM3 的表达可以减轻 LPS 诱导的肺泡上皮细胞的炎性反应以及改善内毒性急性肺损伤大鼠的预后[9,14]。Li 等[15]研究也显示，在小鼠肺内沉默 PALM3 的表达可减轻内毒素诱导的急性肺损伤程度。这可能与 PALM3 的表达下调后干扰了其在 LPS－TLR4 信号通路中的“桥梁”作用有关[7,14]。

笔者的研究还显示，LPS 刺激后 NR8383 细胞中 PALM3 表达呈上升趋势，而在 LPS 刺激之前干扰 PALM3 表达则可显著减少 LPS 诱导的炎性因子（IL－8 和 IL－6）的释放。这与之前的研究类似[7,9]。NF－κB 是炎性反应中最关键的转录因子之一，NF－κB 活化后可导致多种前炎性因子的释放，而前炎性因子的释放可进一步加重细胞和组织的损伤[16]。NF－κB 活化程度可以用 NF－κB p65 DNA 结合能力来反应。本研究显示，下调 PALM3 在 NR8383 细胞中的表达可以抑制 LPS 诱导的 NF－κB p65 DNA 的结合力，这与笔者之前在肺泡上皮细胞中的结果类似[8]。结合既往文献与现有结果，笔者推测在肺泡巨噬细胞系 NR8383 细胞中下调 PALM3 表达所获得的有利生物学效应，可能与阻碍了 LPS－TLR4 信号转导有关，但其中的分子生物学机制有待进一步研究证实。

此外，本研究结果显示，在正常 NR8383 细胞中 PALM3 主要表达于胞膜上，而且表达丰度不高，给予 LPS 刺激后 PALM3 在细胞膜及细胞质中均有表达，表达丰度随着作用时间延长逐渐提高，这一表达模式类似于 TLR4 信号通路中的其他“接头分子”[7,17]。同时，免疫荧光结果还显示，予以 LPS 刺激后可促进

PALM3 由胞膜向胞质转移，这一现象是类似于 TLR4[4,18]。上述结果进一步证实笔者对于 PALM3 可能在 LPS－TLR4 信号转导中起着“桥梁”作用的推测。

总之，本实验发现 LPS 可诱导大鼠肺泡巨噬细胞系 NR8383 细胞 PALM3 的表达上调，下调 PALM3 表达可减轻 NR8383 细胞对 LPS 诱导的炎性反应，主要表现在炎性因子 IL－8 和 IL－6 的释放减少以及 NF－κB 的转录活性的抑制，具体的分子生物学机制以及下调 PALM3 表达如何阻碍 LPS－TLR4 信号的转导尚需进一步探索研究。

参考文献

1 Han J, Li C, Liu H, *et al*. Inhibition of lipopolysaccharide－mediated rat alveolar macrophage activation in vitro by antiflammin－1[J]. Cell Biol Int, 2008, 32(9): 1108－1115

2 Wu DD, Pan PH, Liu B, *et al*. Inhibition of alveolar macrophage pyroptosis reduces lipopolysaccharide－induced acute lung injury in mice [J]. Chin Med J, 2015, 128(19): 2638－2645

3 Johnston LK, Rims CR, Gill SE, *et al*. Pulmonary macrophage subpopulations in the induction and resolution of acute lung injury[J]. Ame J Resp Cell Mol Biol, 2012, 47(4): 417－426

4 Chen XX, Tang L, Fu YM, *et al*. Paralemmin－3 contributes to lipopolysaccharide－induced inflammatory response and is involved in lipopolysaccharide－Toll－like receptor－4 signaling in alveolar macrophages[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(6): 1921－1931

5 Dagvadorj J, Shimada K, Chen S, *et al*. Lipopolysaccharide induces alveolar macrophage necrosis via CD14 and the P2X7 receptor leading to interleukin－1α release[J]. Immunity, 2015, 42(4): 640－653

6 陈旭昕，孟激光，张燕，等. 干扰 PALM3 表达对小鼠内毒素性急性肺损伤的影响[J]. 广东医学, 2015, 20: 3101－3104

7 Chen X, Wu X, Zhao Y, *et al*. A novel binding protein of single immunoglobulin IL－1 receptor－related molecule: Paralemmin－3[J]. Biochemi Biophy Res Commun, 2011, 404(4): 1029－1033

8 陈旭昕，孟激光，刘振千，等. 下调 paralemmin－3 表达对脂多糖诱导的肺泡上皮细胞核转录因子－κB 活性的影响[J]. 广东医学, 2014, 35(19): 2969－2971

9 陈旭昕，孟激光，韩志海，等. 干扰 paralemmin－3 表达抑制脂多糖诱导的肺泡上皮细胞的炎性反应[J]. 西部医学, 2015, 27(7): 964－966,970

10 Fernandez－Bustamante A, Agazio A, Wilson P, *et al*. Brief glutamine pretreatment increases alveolar macrophage CD163/heme oxygenase－1/p38－MAPK dephosphorylation pathway and decreases capillary damage but not neutrophil recruitment in IL－1/LPS－insufflated rats[J]. PloS one, 2015, 10(7): e0130764

11 Byrne AJ, Mathie SA, Gregory LG, *et al*. Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways[J]. Thorax, 2015, 70(12): 1189－1196

12 Hu B, Petrasch－Parwez E, Laue MM, *et al*. Molecular characterization and immunohistochemical localization of palmdelphin, a cytosolic isoform of the paralemmin protein family implicated in membrane dynamics[J]. Eur J Cell Biol, 2005, 84(11): 853－866

13 Albrecht I, Bieri R, Leu A, *et al*. Paralemmin－1 is expressed in lymphatic endothelial cells and modulates cell migration, cell maturation and tumor lymphangiogenesis[J]. Angiogenesis, 2013, 16(4): 795－807

14 Chen X, Tang L, Feng J, *et al*. Downregulation of paralemmin－3 Ameliorates lipopolysaccharide－induced acute lung injury in rats by regulating inflammatory response and inhibiting formation of TLR4/MyD88 and TLR4/TRIF complexes[J]. Inflammation, 2017, 40(6): 1983－1999

15 Li S, Guo L, Zhao Y, *et al*. Silencing of Paralemmin－3 Protects Mice from lipopolysaccharide－induced acute lung injury[J]. Peptides, 2016, 76: 65－72

16 Rao R, Nagarkatti P, Nagarkatti M. Role of miRNA in the regulation of inflammatory genes in staphylococcal enterotoxin B－induced acute inflammatory lung injury and mortality[J]. Toxicol Sci, 2015, 144(2): 284－297

17 Van Linthout S, Spillmann F, Graiani G, *et al*. Down－regulation of endothelial TLR4 signalling after apo A－I gene transfer contributes to improved survival in an experimental model of lipopolysaccharide－induced inflammation[J]. J Mol Med, 2011, 89(2): 151－160

18 Molteni M, Gemma S, Rossetti C. The role of Toll－like receptor 4 in infectious and noninfectious inflammation[J]. Mediat Inflam, 2016, 2016: 6978936

（收稿日期：2018－02－08）
（修回日期：2018－03－03）

（接第 26 页）

16 张瑾怀，李永宏. 胫腓骨骨折内固定术后并发肺脂肪栓塞死亡 1 例[J]. 法医学杂志, 2013, 29(6): 482

17 Law HL, Wong SL, Tan S. Computed tomographic findings of cerebral fat embolism following multiple bone fractures[J]. Singapore Med J, 2013, 54(2): 28－33

18 Jarmer J, Ampanozi G, Thali MJ, *et al*. Role of survival time and injury severity in fatal pulmonary fat embolism[J]. Am J Forensic Med Pathol, 2017, 38(1): 74－77

19 Stein L, Herold R, Austin A, *et al*. Fat emboli syndrome in a child with duchenne muscular dystrophy after minor trauma[J]. J Emerg Med, 2016, 50(5): 223－226

20 Ebina M, Inoue A, Atsumi T, *et al*. Concomitant fat embolism syndrome and pulmonary embolism in a patient with a femoral shaft fracture[J]. Acute Med Surg, 2015, 3(2): 135－138

21 Tsitsikas DA, Gallinella G, Patel S, *et al*. Bone marrow necrosis and fat embolism syndrome in sickle cell disease: increased susceptibility of patients with non－SS genotypes and a possible association with human parvovirus B19 infection[J]. Blood Rev, 2014, 28(1): 23－30

22 Nandi R, Venkategowda PM, Mutkule D, *et al*. Fat embolism syndrome: Case report of a clinical conundrum[J]. J Anaesthesiol Clin Pharmacol., 2014, 30(3): 412－414

23 Piolanti M, Dalpiaz G, Scaglione M, *et al*. Fat embolism syndrome: lung computed tomography findings in 18 patients[J]. J Comput Assist Tomogr, 2016, 40(3): 335－339

24 窦国宴，范钦和. 老年人外伤死亡与肺脂肪栓塞病理学分级的关系[J]. 实用老年医学, 2017, 31(7): 643－645

（收稿日期：2018－01－24）
（修回日期：2018－03－09）