

严重烧伤早期大鼠脾脏 Toll 样受体 4 的表达及意义

傅颖珺¹, 谢 勇^{2*}, 石俊强¹, 郭光华³

(1. 南昌大学医学院药理教研室, 南昌 330006; 2. 南昌大学第一附属医院消化研究所, 南昌 330006; 3. 南昌大学第一附属医院烧伤科, 南昌 330006)

[摘要] **目的:**探讨 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)在严重烧伤早期炎症过程中的作用。**方法:**建立大鼠 30%体表面积Ⅲ度烧伤模型,在烧伤前及烧伤后 2、5、8、12、24、48、72 h 等不同时间点留取脾脏组织和外周血,采用 RT-PCR 方法检测脾脏 TLR4、TNF- α mRNA 表达,Western 印迹法检测脾脏 TLR4 蛋白表达,鲎试剂法测定血浆内毒素(ET)含量。**结果:**与正常对照组比较,严重烧伤可明显上调 TLR4、TNF- α 的表达及 ET 水平($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。TLR4 mRNA、蛋白及 ET 均在烧伤后 8 h 达高峰,TNF- α 表达高峰在烧伤后 12 h($P < 0.01$)。伤后 TLR4 mRNA 的表达与 ET 和 TNF- α mRNA 之间均呈正相关($r = 0.811, 0.462$)。**结论:**严重烧伤可导致血中 ET 升高,并上调脾脏组织 TLR4 的基因以及早期炎症因子 TNF- α 的基因表达,TLR4 的上调可能参与了严重烧伤后失控性炎症反应的病理生理过程。

[关键词] 烧伤;Toll 样受体 4;内毒素类;肿瘤坏死因子 α

[中图分类号] R 644 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)04-0412-04

Expression of TLR4 in splenocytes at early phase of severely burned rats and its implication

FU Ying-jun¹, XIE Yong^{2*}, SHI Jun-qiang¹, GUO Guang-hua³ (1. Department of Pharmacology, Medical College, Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. Institute of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006; 3. Department of Burns, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate a potential role of Toll-like receptor 4(TLR4), a pathogen pattern recognition receptor, in the early phase of severely burned rats. **Methods:** Rats burn model(30% of total body surface area[TBSA], III grade) were established with vapor at 108°C for 8 seconds. Rats were sacrificed before and 2, 5, 12, 24, 48 and 72 h after burning, and the spleen specimens and peripheral blood samples were harvested. TLR4 mRNA and TNF- α mRNA expression in splenocyte was measured by reverse-transcription PCR(RT-PCR); the expression of TLR4 protein were measured by Western blotting; the endothelial toxicity concentration in plasma was detected by limulus lysate test. **Results:** It was found that the expression of TLR4 mRNA, TNF- α mRNA, TLR4 protein, and the level of ET were significantly increased in burned group compared with normal control group. The expression of TLR4 mRNA and protein peaked at 8 h after burning, the expression of TNF- α mRNA peaked at 12 h, and the level of ET peaked at 8 h after burning; the peak values of them were (3.66 \pm 0.51), (2.27 \pm 0.19), (1.65 \pm 0.23), and (11.68 \pm 2.63) Eu/ml, respectively, all significantly higher than those of the control group($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The expression of TLR4 mRNA showed a positive correlation with that of ET and TNF- α mRNA($r = 0.811, 0.462, P < 0.01$). **Conclusion:** Severe burn can cause endotoxemia and upregulate the expression of TLR4 and TNF- α in splenocytes. The up-regulation of TLR4 might participate in the pathological procedure of excessive inflammation.

[KEY WORDS] burns; Toll-like receptor 4; endotoxins; tumor necrosis factor-alpha

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(4): 412-415]

烧伤早期因肠黏膜屏障功能受损, 促发肠道细菌和内毒素移位进入体循环, 激活单核-巨噬细胞系统, 通过一系列连锁反应导致失控性炎症介质病。因此严重烧伤极易发展成全身性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)、多器官衰竭(multiple organ failure, MOF)甚至死亡。近年研究认为存在于单核-巨噬细胞表面的 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)是 LPS 胞内信号转导的重要途

径^[1]。目前对它的研究主要集中在感染和免疫方面, TLR4 作为一种重要的跨膜信号转导受体参与了内毒素诱发炎症的病理过程, 同时在免疫系统对入侵病原体的早期识别过程中即抗感染免疫中扮演举足轻重的角色。因此, 对 TLR4 调控机制的研究

[基金项目] 江西省教育厅资助项目(赣教技字 76 号)。Supported by Grant of the Education Department of Jiangxi Province(No. 76).

[作者简介] 傅颖珺, 博士生, 副教授。

E-mail: fuyingjun123@126.com

* Corresponding author. E-mail: xieyong-med@tom.com

日益受到重视并成为研究热点,但对于 TLR4 的表达在严重烧伤早期大鼠损伤中的作用和意义鲜有报道。本研究通过观察烧伤后大鼠脾脏 TLR4、TNF- α mRNA 的表达变化及外周血内毒素的变化规律,探讨 TLR4 可能的作用及免疫学机制,为严重烧伤早期的发病机制和治疗提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器 TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司, M-MLV 逆转录酶、Oligo(dT)₁₅ 和 RNasin 均购自 Promega 公司, 2× Mixmaster (Taq 酶, dNTP, MgCl₂) 购自北京天为时代公司, PCR 引物由捷瑞生物工程有限公司合成; PMSF 购自 Sigma 公司, 羊抗 TLR4 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司, 兔抗羊 IgG-HRP 抗体购自北京中山生物技术有限公司, NC 膜购自 Sigma 公司; 增强化学荧光试剂 ECL 浙江大学医学院分子生物学实验室提供; 鲎试剂盒购自湛江经济技术开发区海洋生物制品厂。“控时控温控压式蒸气烫伤实验仪”由南昌大学烧伤研究所提供。PCR 扩增仪为美国 PE 公司产品。垂直电泳-转膜装置为美国 BIO-RAD 公司产品。

1.2 动物分组及模型制备

1.2.1 动物分组 雄性 SD 大鼠, 体质量 150~200 g, 购自南昌大学医学院动科部。64 只 SD 大鼠, 随机分成正常对照组(8 只)和严重烧伤组(56 只), 根据观察时间的不同, 严重烧伤组再分为伤后 2、5、8、12、24、48、72 h 组, 各时相点均为 8 只动物。

1.2.2 模型制备 大鼠购来后饲养 1 周以上, 实验前禁食过夜, 自由饮水。清醒状态下, 以 20% 硫化钠背部脱毛, 用“控时控温控压蒸汽烫伤仪”造成大鼠 30% 总体表面积(TBSA) III 度烧伤, 烫伤仪控制参数: 压力 3 mPa、温度 108℃、时间 8 s; 伤后即刻腹腔注射林格液 40 ml/kg 抗休克, 于不同的时相点取血, 然后无菌取脾脏组织, 迅速在液氮中冷冻后, 于 -80℃ 保存。

1.3 半定量 RT-PCR 技术测定脾脏 TLR4 及 TNF- α mRNA 表达 取 100 mg 脾脏组织提取总 RNA, 以紫外分光光度计测定 260 和 280 nm 处光密度(D)值, 结果 D_{260}/D_{280} 比值在 1.6~2.0, -80℃ 保存。以 β -actin 作为内参照。TLR4 基因上游引物: 5'-CAG CTT CAA TGG TGC CAT CA-3', 下游引物: 5'-CTG CAA TCA AGA GTG CTG AG-3', 产物 438 bp; TNF- α 基因上游引物: 5'-GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C-3', 下游引物: 5'-ACA TTC GAG GCT CCA GTG

AAT TCG G-3', 产物 300 bp; β -actin 基因上游引物: 5'-GAC GAT ATC GCT GCG CTG-3', 下游引物: 5'-GTA CGA CCA GAG GCA TAC AGG-3', 产物 348 bp。总反应体系 25 μ l, 扩增参数如下: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 荧光核酸染料 SYBR Green I 染色显示后成像, 通过 Image tool 图像分析软件读取目的电泳条带的斑点密度扫描值, 以各组 β -actin 条带的扫描值标化其相应组的 TLR4 及 TNF- α 的 mRNA 表达量。

1.4 Western 印迹法检测脾脏 TLR4 蛋白的表达

1.4.1 组织蛋白提取及定量 将组织在裂解缓冲液中裂解, -20℃ 保存。蛋白含量测定采用 Lowry 法。

1.4.2 SDS-PAGE 制备 12% 分离胶及 5% 积层胶, 取待测样品各 20 μ g 及蛋白质分子量标准上样电泳。采用半干式电转移法, 将蛋白质转移到 NC 膜上。NC 膜先后与一抗、辣根过氧化物酶标记的二抗及 ECL 孵育显色。拍照显色条带, 用 Image tool 图像分析软件分析蛋白显色条带灰度值, 并进行比较。

1.5 血浆内毒素含量的测定 采用改良过氯酸法预处理血浆, 偶氮显色鲎试验定量测定法。

1.6 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 13.0 统计软件进行 q 检验、方差分析、相关性分析等统计学处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 严重烧伤大鼠脾脏组织 TLR4 的表达 TLR4 mRNA 在正常对照组大鼠脾脏组织内有一定量的表达, 严重烧伤后 2 h 开始上调, 但无统计学意义; 5 h 开始显著上调 ($P < 0.01$), 以伤后 8 h 表达最高, 12 h 开始有所下降, 但仍显著高于对照组 ($P < 0.01$); 72 h 有再度升高趋势。TLR4 蛋白在正常脾脏组织中有固有表达, 伤后其表达变化与 TLR4 mRNA 相似(图 1)。

2.2 烧伤大鼠脾脏组织 TNF- α mRNA 的表达 TNF- α mRNA 在正常对照组大鼠脾脏组织内有少量表达, 严重烧伤后 8 h 明显升高 ($P < 0.01$), 12 h 达高峰, 为刺激前的 2.5 倍 ($P < 0.01$), 48 h 基本降至正常水平。与 TLR4 基因表达相比, 达峰时间往后推迟(图 2)。

2.3 烧伤大鼠血浆内毒素水平的动态变化 如图 3 所示, 烧伤后 2 h, 血浆内毒素水平即开始升高, 8

h 达高峰 ($P < 0.01$), 之后逐渐下降, 72 h 再次升高, 升高幅度远小于 8 h。

0.462, $P < 0.01$); TLR4 mRNA 表达与内毒素水平呈明显正相关 ($r = 0.811, P < 0.01$)。

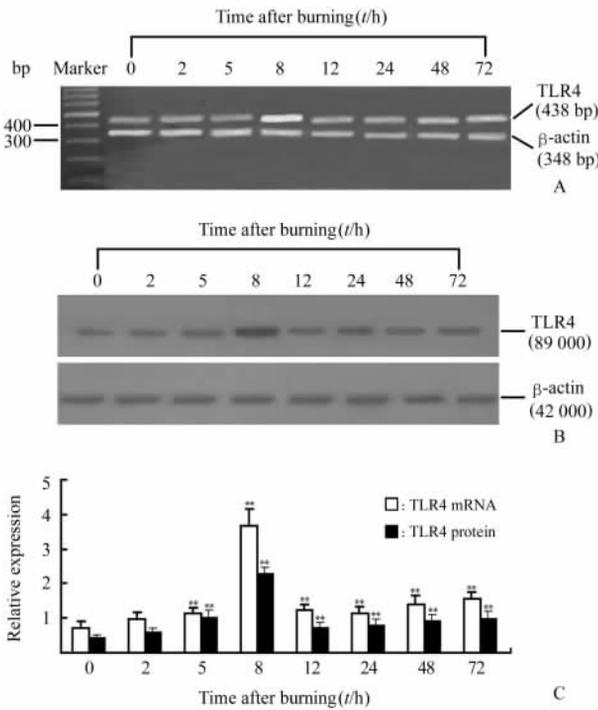


图 1 烧伤前后大鼠脾脏 TLR4 mRNA 及蛋白表达的变化

Fig 1 Changes of TLR4 mRNA and protein expression in splenocytes of rats before and after severe burns

A: RT-PCR results; B: Western blot results; C: The relative expression level. ** $P < 0.01$ vs 0 h after burn group; $n = 8; \bar{x} \pm s$

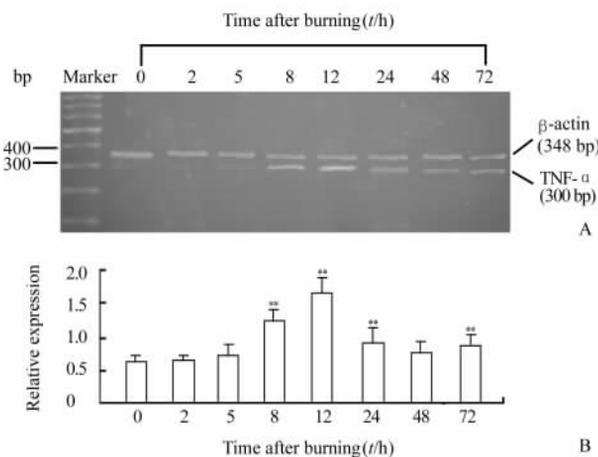


图 2 严重烧伤大鼠脾脏 TNF- α mRNA 的表达
Fig 2 Expression of TNF- α mRNA in spleen of severely burned rats

** $P < 0.01$ vs 0 h after burn group; $n = 8; \bar{x} \pm s$

2.4 严重烧伤大鼠脾脏 TLR4 mRNA 与 TNF- α mRNA、血浆内毒素的相关性 相关性分析表明, TLR4 mRNA 与 TNF- α mRNA 表达呈正相关 ($r =$

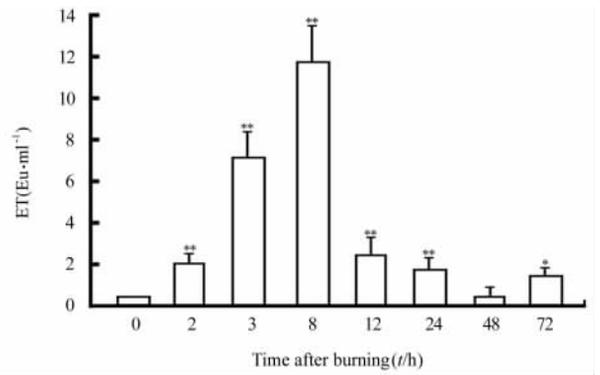


图 3 血浆内毒素水平的动态变化

Fig 3 Dynamic change of the plasma ET levels

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 h after burn group; $n = 8; \bar{x} \pm s$

3 讨论

新近发现的 Toll 样受体 (TLRs) 是一类重要的模式识别受体, 能识别众多微生物和机体的内源性抗原成分, 通过信号转导途径, 活化 NF- κ B, 促进 TNF- α 等炎症细胞因子、趋化因子及 IFN- β 等的释放, 诱发机体的天然免疫, 参与抗感染的炎症过程, 同时能上调抗原提呈细胞 (APC) 表面共刺激分子 CD80 和 CD86 的表达, 启动获得性免疫反应。因此, TLRs 在免疫防疫反应中起着十分重要的作用, 是天然免疫病原体识别和获得性免疫之间的桥梁^[2]。到目前为止已确认的 TLRs 共有 13 个成员^[3], 其中 TLR4 广泛表达于非特异性免疫细胞 (如巨噬细胞、中性粒细胞和肥大细胞) 和介导特异性免疫反应的 T、B 淋巴细胞的表面, 在脾和外周血白细胞中表达最强。TLR4 是革兰阴性菌脂多糖 (LPS) 的跨膜受体。TLR4 适度表达可启动机体防御功能, 而过度表达则可导致炎症性疾病^[4]。

本研究结果显示, 烧伤后 8 h 大鼠血浆中 ET 水平达最高峰, 随后下降, 72 h 再度升高, 严重烧伤早期内毒素血症主要是由肠源性感染引起的, 而此后则是由创面感染引起的, 这与众多文献报道一致。Ikushima 等^[5]认为机体是一个复杂的调控系统, TLRs 的表达受多种因素的影响, 如某些细胞因子: IFN- γ 、IL-2、IL-4 等, 同时还受神经内分泌调控, 如儿茶酚胺和类固醇等。本研究发现 TLR4 mRNA 和蛋白表达的变化与内毒素基本一致, 且相关分析表明内毒素和 TLR4 mRNA 显著正相关。然而, 过度的 TLR4 免疫应答将引起大量的炎症介质产生、炎症反应失衡, 造成组织器官的损害, 是感染和创伤

所致的 MODS、MOF 重要发病机制之一^[6]。本研究中烧伤早期及 72 h 后 TLR4 的大量表达,提示 LPS-TLR4 信号通路可能与严重烧伤所致的 MODS、MOF 发生发展有关。

TNF- α 是一种具有多种生物学效应的细胞因子,主要参与炎症反应的级联过程,在炎症早期 TNF- α 可以募集并扩增更多的免疫细胞参与对入侵病原微生物的反应^[7]。本研究显示 TNF- α mRNA 表达的峰值在时相上滞后于内毒素和 TLR4, TLR4 和 TNF- α 表达呈现一定的正相关,说明 TLR4 基因表达上调在某种程度上能促进 LPS 刺激脾脏组织合成、释放早期促炎细胞因子 TNF- α ,从而证实经典的 LPS \rightarrow TLR4 \rightarrow NF- κ B \rightarrow 细胞因子(TNF- α)途径在严重烧伤早期大鼠体内可能存在,并可能共同参与了机体失控性炎症反应的病理生理过程,同时也提示 TNF- α 产生还可能存在着其他的调控机制。Alexander 等^[8]研究发现烧伤后机体单核-巨噬细胞活化引起 TNF- α 大量持续释放可能与应激状态下前列腺素 E2 的产生有关。也有研究^[9]表明可能和 iNOS 的产生有关。

总之,TLR4 在介导病原体识别、信号转导、免疫反应的激活中起关键作用,在炎症活化过程中也起十分重要的作用,作为内毒素信号转导上游的关键分子,可能是有效干预炎症反应的重要环节。通过改变 TLR4,如拮抗 TLR4、阻断或抑制 LPS-TLR4 信号转导通路、对 TLR4 基因表达进行适当调节等,对防止严重烧伤早期 MODS 的发生和发展会有一定的治疗意义。

[参考文献]

- [1] Abreu M T, Arditi M. Innate immunity and toll-like receptors: clinical implications of basic science research[J]. J Pediatr, 2004, 144: 421-429.
 - [2] Equils O, Salehi K K, Cornataeanu R, et al. Repeated lipopolysaccharide (LPS) exposure inhibits HIV replication in primary human macrophages[J]. Microbes Infect, 2006, 8(9-10): 1-8.
 - [3] Wang R F, Peng G Y, Wang H Y. Regulatory T cells and Toll-like receptors in tumor immunity[J]. Semin Immunol, 2006, 18: 136-142.
 - [4] Martin M U, Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1992: 265-280.
 - [5] Ikushima H, Nishida T, Takeda K, et al. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 is downregulated after operation[J]. Surgery, 2004, 135: 376-385.
 - [6] Mc Cartney-Francis N, Jin W, Wahl S M. Aberrant Toll receptor expression and endotoxin hypersensitivity in mice lacking a functional TGF-beta 1 signaling pathway[J]. J Immunol, 2004, 172: 3814-3821.
 - [7] Boehmer E D, Meehan M J, Cutro B T, et al. Aging negatively skews macrophage TLR2- and TLR4-mediated pro-inflammatory responses without affecting the IL-2-stimulated pathway[J]. Mech Ageing Dev, 2005, 126: 1305-1313.
 - [8] Alexander M, Chaudry I H, Schwacha M G. Relationships between burn size, immunosuppression, and macrophage hyperactivity in a murine model of thermal injury[J]. Cell Immunol, 2002, 220: 63-69.
 - [9] Kalf J C, Turler A, Schwarz N T, et al. Intra-abdominal activation of a local inflammatory response within the human muscularis externa during laparotomy[J]. Ann Surg, 2003, 237: 301-315.
- [收稿日期] 2006-11-15 [修回日期] 2007-03-08
[本文编辑] 孙岩

• 书 讯 •

《检验与临床诊断急诊医学分册》已出版

本书由崔娴维,邱广斌主编,人民军医出版社出版,ISBN号 978-7-5091-0557-3,大 32 开,平装,429 页,35.1 万字,定价 38.00 元。

本书由沈阳军区医学检验中心 10 余位临床与检验专家共同编写。共分 13 章,简单介绍了各系统急症、传染病急症、妇科和儿科临床急症的病因、发病机制和临床表现,重点阐述每一种急症应选择检验的项目,并对检验结果进行详细解读,附录部分包括常用临床急症检验正常值等,方便读者核查。本书内容丰富,查对方便,便于临床医生在急诊救治中及时准确地选择适当的检验项目,了解其检验数据的临床价值,适合急诊科和检验科医生阅读。

本书由人民军医出版社市场部发行。

通讯地址:北京市 100036 信箱 188 分箱,邮编:100036

电话:010-51927252;010-51927300-8168。E-mail: wanglan@pmmp.com.cn