

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00087

Toll 作用蛋白 (Tollip) 在急性阑尾炎时的表达

徐发良*

重庆市肿瘤医院腹部外科,重庆市肿瘤研究所,重庆 400030

[摘要] **目的** 分析 Toll 作用蛋白(Toll-interacting protein, Tollip)在阑尾组织的表达及其在急性炎症中的意义。**方法** 选择急性阑尾炎 33 例,以无炎症阑尾 6 例作对照(阑尾组织无炎性病理改变);阑尾切除术前 1 h 检测脉搏、体温(BT)、白细胞(WBC)计数和中性粒细胞(NEUT)计数;阑尾标本经 H-E 染色和病理检查确诊后分为 4 组(A 组无炎症, B 组单纯性炎症、C 组化脓性炎症、D 组坏疽性炎症),采用免疫组化染色和数字图像分析法对 Tollip 的蛋白表达进行定性、定位和半定量分析,并统计分析 Tollip 与脉搏、BT、WBC 及 NEUT 的相关性。**结果** 按照病理类型分组,组间 BT、WBC 和 NEUT 存在显著差异($P < 0.05$);中性粒细胞低表达或不表达 Tollip, Tollip 主要表达于阑尾黏膜上皮和腺上皮细胞;阑尾从无炎症状态到发生单纯性炎症、化脓性炎症以及坏疽性炎症的过程中, Tollip 的表达逐步升高,并与 WBC 显著相关($P < 0.05$)。**结论** 在急性阑尾炎发生和发展过程中,阑尾组织局部的 Tollip 表达上调并与 WBC 升高等炎症全身反应密切相关。

[关键词] 阑尾炎; Tollip; 基因表达; 炎症反应; 免疫组织化学

[中图分类号] R 574.61 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)01-0087-04

Expression of Toll-interacting protein (Tollip) in appendix during acute appendicitis

XU Fa-liang*

Department of Abdominal Surgery, Cancer Hospital of Chongqing, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400030, China

[Abstract] **Objective** To observe the expression of Toll-interacting protein (Tollip) in appendix and analyze its significance during acute inflammation. **Methods** Thirty-three patients with acute appendicitis were included in the present study and 6 subjects with non-inflammatory appendixes were taken as controls (without inflammatory changes). The pulse rate, body temperature (BT), white blood cell (WBC) count and neutrophil (NEUT) count were observed one hour before appendectomy. Based on H-E staining and pathological examination, the appendix samples were divided into four groups; non-inflammatory appendix (A), simple appendicitis (B), suppurative appendicitis (C) and gangrenous appendicitis (D). The expression of Tollip protein (the localization, qualitative and semiquantitative analysis) was analyzed using immunohistochemistry and digital image analysis. The correlation of Tollip with pulse rate, BT, WBC and NEUT was also analyzed. **Results** Significant differences in BT, WBC and NEUT were found between different pathological groups ($P < 0.05$). Tollip protein was mainly expressed in the epithelium mucosa and glandular epithelium of appendix, but was not detected in the neutrophils. During the development of appendiceal inflammation (non-inflammatory appendix to simple appendicitis, to suppurative appendicitis, then to gangrenous appendicitis), the expression of Tollip protein gradually increased and was significantly correlated with WBC ($P < 0.05$). **Conclusion** During the development and progression of acute appendicitis, Tollip expression is up-regulated in appendix tissues and is closely correlated with systemic responses of inflammation, such as the increase of WBC.

[Key words] appendicitis; Tollip; gene expression; inflammatory response; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(1): 87-90]

炎症反应是重要的防御形式,但也具有潜在致损伤能力。Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)是天然免疫系统介导炎症反应的重要受体,在炎症调控中具有重要功能^[1]。Toll 作用蛋白(Toll-interacting protein, Tollip)作为 TLR 信号转导的负调节因子,通过下调 TLR 信号转导而抑制细胞活化和炎

症反应,从而在炎症反应的负调控中具有重要作用^[2]。鉴于急性阑尾炎被认为是研究人类急性炎症的良好模型^[3],本研究以急性阑尾炎临床病例为模型、采用单因素 4 水平计量资料设计和免疫组织化学染色半定量分析技术,初步分析阑尾急性炎症发生发展过程中 Tollip 的表达变化及其临床意义。

[收稿日期] 2009-08-28 **[接受日期]** 2009-11-13

[作者简介] 徐发良,博士,主治医师。

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 023-65310836, E-mail: flxu88@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 主要材料 阑尾组织石蜡包埋标本共 39 例(无炎症阑尾 6 例,急性阑尾炎 33 例)。所有标本均经病理 H-E 染色和病理检查确诊。按病理类型分为:A 组,阑尾无炎症 6(男 4,女 2)例,年龄 18~33 岁,平均(24.3±5.4)岁;B 组,急性单纯性阑尾炎 13(男 9,女 4)例,年龄 17~35 岁,平均(21.5±7.2)岁;C 组,急性化脓性阑尾炎 13(男 10,女 3)例,年龄 16~31 岁,平均(22.5±7.4)岁;D 组,急性坏疽性阑尾炎 7(男 5,女 2)例,年龄 12~39 岁,平均(25.7±10.6)岁。各组在年龄、性别构成上无显著差异。自身免疫性疾病、脾切除术后、合并其他部位感染、接受免疫抑制治疗及糖尿病诊断明确等情况,排除在入选标准之外。

1.2 主要试剂 兔抗人 Tollip 多克隆抗体购自美国 ABGENT 公司;SP 免疫组化试剂盒、生物素标记羊抗兔 IgG、内源性过氧化物酶阻断剂、封闭用正常羊血清工作液、辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液和 DAB 显色剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;H-E 染色采用常规国产试剂。

1.3 炎症全身反应指标的检测 手术前 1 h 测体温(BT)和脉搏;采集外周静脉血 3 ml,用全自动血液细胞分析仪进行白细胞(WBC)计数和中性粒细胞(NEUT)分类计数,作为评价炎症反应全身性改变的参考指标。

1.4 免疫组织化学染色 Tollip 半定量分析 阑尾组织 Tollip 免疫组化染色按 SP 试剂盒说明书采用三步法进行。标本经 40 g/L 甲醛固定,石蜡包埋,5 μm 连续切片,脱蜡,30 ml/L H₂O₂ 室温孵育 15

min;蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min 后 0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液 95℃水浴 15 min、室温 40 min 以修复抗原。山羊血清封闭 20 min,加兔抗人 Tollip 多克隆抗体(1:50)4℃过夜。PBS 冲洗后,加生物素标记羊抗兔 IgG 室温反应 30 min,PBS 冲洗,加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素 37℃孵育 30 min,PBS 冲洗,DAB 显色剂 1~3 min,复染、脱水、透明、封片。以空白试验和替代试验作阴性对照,确保实验特异性和可靠性。全片在光学显微镜下观察,细胞膜或细胞质出现棕黄色颗粒为阳性染色。用 MetaMorph/DP10/BX5 彩色显微图像分析仪进行半定量分析。随机选取每张 DAB 染色切片炎症中心 5 个视野,测定阳性染色积分光密度值(IOD,代表 Tollip 相对含量),取 5 个视野的平均值作为该切片的 IOD 值。IOD 值越高表明组织内 Tollip 含量越高。

1.5 统计学处理 数据用 SPSS 11.0 软件进行单因素方差分析和相关性分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阑尾组织病理分型及炎症全身反应指标 经 H-E 染色病理检查确定诊断的 39 个阑尾标本按炎症病理类型分 4 组,组间炎症全身反应指标比较的结果见表 1。各组脉搏比较差异无统计学意义($P > 0.05$),D 组 BT 显著升高($P < 0.05$),D 和 C 组 WBC 和 NEUT 显著升高($P < 0.05$)。提示按阑尾病理类型分组,可以在一定程度上反映阑尾局部炎症及炎症全身反应的情况。

表 1 阑尾组织炎症病理分型及全身反应指标

Tab 1 Pathologic stages of acute appendicitis and systemic indices for inflammatory response

Group	n	Pulse f/min^{-1}	BT $\theta/^\circ C$	WBC($\times 10^9 \cdot L^{-1}$)	NEUT
A	6	80.8±9.1	37.20±0.57	7.80±2.31	0.71±0.07
B	13	79.9±4.9	36.95±0.65	9.05±3.33	0.67±0.11
C	13	80.2±8.4	37.50±0.70	13.20±4.64*△	0.79±0.11*△
D	7	86.0±10.0	37.93±1.22*	13.31±4.82*△	0.84±0.07*△▲

* $P < 0.05$ vs group A; △ $P < 0.05$ vs group B; ▲ $P < 0.05$ vs group C. A: Non-inflammatory appendix group; B: Acute simple appendicitis group; C: Acute suppurative appendicitis group; D: Acute gangrenous appendicitis group. BT: Body temperature; WBC: White blood cell; NEUT: Neutrophil

2.2 Tollip 在阑尾组织中的表达 免疫组化染色显示,阑尾腔内渗出的中性粒细胞内几乎不能检出 Tollip 蛋白的表达(图 1A),提示炎症病灶内中性粒细胞可能低表达或不表达 Tollip。在各种病理类型

的阑尾急性炎症组织中,Tollip 主要表达于阑尾黏膜上皮细胞(图 1B)和肠腺上皮细胞(图 1C),呈颗粒状分布于上皮细胞胞质内的腺腔面。

2.3 Tollip 表达与阑尾局部炎症的关系 免疫组化半

定量分析显示, Tollip 组成性低表达于阑尾组织; 当阑尾组织发生急性炎症时 Tollip 表达显著升高 ($P < 0.05$); 发生化脓性和坏疽性阑尾炎时 Tollip 表达量进一步升高 ($P < 0.05$)。提示阑尾组织 Tollip 表达量与

局部炎症反应的严重程度密切相关。阑尾从无炎症到发生单纯性炎症、化脓性炎症以及坏疽性炎症的过程中, Tollip 的表达呈逐渐升高的趋势, 随着炎症发展, Tollip 表达量的上升趋势逐渐减慢(图 2、图 3)。

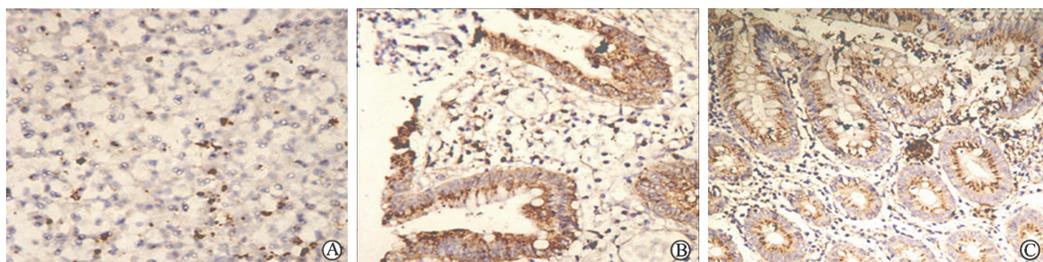


图 1 Tollip 在阑尾组织的表达

Fig 1 Tollip protein expression in appendix tissue(SP)

A: Tollip was not detected in neutrophils; B: Tollip expressed in epithelium mucosa of appendix; C: Tollip expressed in intestinal glandular epithelium of appendix. Tollip mainly expressed on the cavosurface of epithelial cells. Original magnification: $\times 100$ (A), $\times 200$ (B,C)

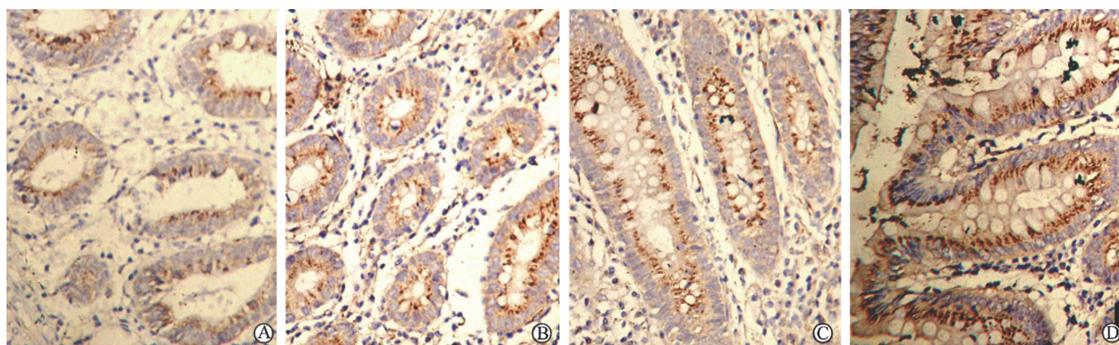


图 2 Tollip 在不同病理类型阑尾组织的表达

Fig 2 Tollip protein expression in appendix tissues of different pathologic types(SP)

A: Non-inflammatory appendix (without inflammatory change) group; B: Acute simple appendicitis group; C: Acute suppurative appendicitis group; D: Acute gangrenous appendicitis group. Original magnification: $\times 200$

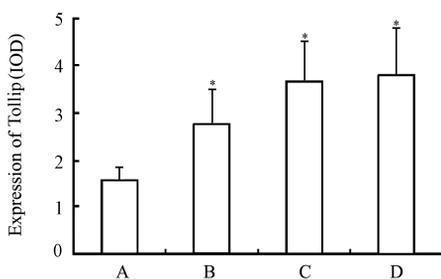


图 3 Tollip 在不同病理类型阑尾组织表达的定量分析

Fig 3 Quantitative analysis of Tollip protein expression in appendix tissues of different pathologic types

A: Non-inflammatory appendix (without inflammatory pathologic change) group ($n=6$); B: Acute simple appendicitis group ($n=13$); C: Acute suppurative appendicitis group ($n=13$); D: Acute gangrenous appendicitis group ($n=7$); * $P < 0.05$ vs group A; $\bar{x} \pm s$

2.4 Tollip 表达与炎症全身反应的关系 相关性分析显示 BT、WBC 和 NEUT 等炎症全身反应指标之

间存在显著的相关性 ($P < 0.05$), 提示所采纳的病例资料的 BT、WBC 和 NEUT 互为佐证。阑尾发生急性炎症、进而发展成坏疽性阑尾炎的过程中, 尽管 Tollip 的表达与 BT 或 NEUT 间并无显著差异, 但却与 WBC 之间存在显著相关性 ($P < 0.05$), 提示 Tollip 表达可能与炎症导致的全身反应(如 WBC 升高)有关(表 2)。

表 2 Tollip 表达量与炎症全身反应指标的相关性分析

Tab 2 Correlation analysis of Tollip expression and systemic indices of inflammatory responses

Items	r	P
BT/WBC	0.423	0.004*
BT/NEUT	0.560	<0.001*
WBC/NEUT	0.726	<0.001*
Tollip/BT	0.103	0.288
Tollip/NEUT	0.258	0.077
Tollip/WBC	0.349	0.025*

* $P < 0.05$ indicated significant correlation between the two items

3 讨论

已证实,炎症反应的发生发展与 TLR 介导的信号转导密切相关^[1]。TLR 在配体作用下通过激活白细胞介素-1 受体相关激酶-1(interleukin-1 receptor associated kinase,IRAK-1)而上调转录因子 AP-1 和核因子- κ B(NF- κ B)的活性,进而介导炎症反应。Tollip 对 TLR 信号转导的负调控主要是基于对 IRAK-1和 TLR4/TLR2 的结合而实现的^[2,4]。生理状态下人体脑心肾肝脾、骨骼肌、小肠以及多种腺体组织都组成性表达 TLR 和 Tollip^[5]。

研究表明,肠上皮细胞通过高表达 Tollip、低表达 TLR 和降低 IRAK-1 磷酸化而对肠道细菌产物表现出低反应性,从而避免肠道内细菌源性的 TLR 配体诱导过度炎症反应^[6]。但 Tollip 在阑尾急性炎症发生发展过程中的表达情况及意义尚不清楚。本研究以急性阑尾炎为模型,发现 Tollip 表达于阑尾黏膜上皮细胞和肠腺上皮细胞,阑尾组织组成性表达 Tollip;阑尾组织发生急性炎症反应时,Tollip 的表达上调;随着炎症的进一步发展,阑尾局部的 Tollip 表达进一步增强。就急性阑尾炎的全身反应而言,Tollip 的表达与 WBC 的升高呈显著相关性,提示 Tollip 表达可能与炎症的全身反应有关。有研究发现,在脂多糖(LPS)作用下 Tollip 表达上调,通过抑制 NF- κ B 而抑制 TLR 信号转导及炎症反应^[7];另一方面,Tollip 缺陷细胞在 LPS 作用下释放的促炎因子却较野生细胞少^[8],这表明 Tollip 对炎症信号转导具有双向性调控作用,而非简单的抑制效应,因此,阑尾组织 Tollip 的表达可能不但与阑尾局部炎症反应程度密切相关,而且与炎症的全身反应相关;阑尾炎症发生发展过程中阑尾局部的 Tollip 本

身具有炎症抑制作用,从而避免炎症过度发展。

鉴于人体多种组织都组成性表达 Tollip^[5],而黏膜上皮细胞和肠腺上皮细胞具有分泌功能,我们似乎有理由假设 Tollip 可能通过上述细胞被分泌或释放到胞外、甚或进入组织液,进而产生远程抗炎效应。因此,对细胞外可能存在的 Tollip 进行定性、定位和定量分析,或许具有潜在的研究和应用价值。

[参考文献]

- [1] Han J, Ulevitch R J. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity[J]. *Nat Immunol*, 2005, 6: 1198-1205.
- [2] Zhang G, Ghosh S. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 7059-7065.
- [3] Bittinger F, Brochhausen C, Köhler H, Lehr H A, Otto M, Skarke C, et al. Differential expression of cell adhesion molecules in inflamed appendix: correlation with clinical stage [J]. *J Pathol*, 1998, 186: 422-428.
- [4] Burns K, Clatworthy J, Martin L, Martinon F, Plumpton C, Maschera B, et al. Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: 346-351.
- [5] Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes[J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28: 886-892.
- [6] Otte J M, Cario E, Podolsky D K. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells[J]. *Gastroenterology*, 2004, 126: 1054-1070.
- [7] Li T, Hu J, Li L. Characterization of Tollip protein upon lipopolysaccharide challenge[J]. *Mol Immunol*, 2004, 41: 85-92.
- [8] Didierlaurent A, Brissoni B, Velin D, Aebi N, Tardivel A, Käslin E, et al. Tollip regulates proinflammatory responses to interleukin-1 and lipopolysaccharide[J]. *Mol Cell Biol*, 2006, 26: 735-742.

[本文编辑] 陈波