

实时荧光定量 PCR 分析海水浸泡伤大鼠小肠组织 NF- κ B 及上游受体 TLR4 mRNA 的表达

Real-time PCR in analysis of TLR4, NF- κ B and I κ B gene expression in small intestine of rats with open abdominal injury after seawater immersion

韩志海¹, 虞积耀^{2*}, 胡明², 王宇¹, 王大鹏², 姜涛²

1. 海军总医院呼吸内科, 北京 100048

2. 海军总医院病理科, 北京 100048

[关键词] 腹部开放伤; 海水浸泡; Toll 样受体 4; NF- κ B; I- κ B

[中图分类号] R 649.3

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2011)06-0688-04

腹部外伤海水浸泡后急性炎症反应综合征的基本病理生理变化是机体内促炎与抗炎因子失衡所致的过度炎症反应^[1]。核因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 是创伤后调节细胞炎症反应的许多基因的转录活化所必需的细胞因子。同时, 作为 NF- κ B 上游受体的 Toll 样受体 4 (TLR4), 在炎症反应过程中能够激活以 NF- κ B 为核心的信号转导途径, 诱导炎症反应, 促进抗原提呈细胞的活化^[2]。本研究旨在应用 SYBR Green 实时定量 PCR 技术, 检测海水浸泡伤大鼠小肠组织 NF- κ B、NF- κ B 抑制蛋白 I κ B- α 及其上游受体 TLR4 mRNA 表达水平, 探讨以 NF- κ B 为核心的炎症反应体系在海水浸泡腹部伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 试剂及仪器 总 RNA 抽提试剂盒 (离心柱型, 天根生化科技有限公司)、oligo-(dT) 15 (TaKaRa, D510)、Ribonuclease Inhibitor (TaKaRa, D2310A)、M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, M170A)、BioEasy SYBR Green Real Time PCR Kit Manual (杭州博日科技有限公司)。

Line-gene 荧光定量 PCR 检测系统 (杭州博日科技有限公司)、TGL-16 台式高速冷冻离心机 (湖南湘仪)、DYY-7C 型电泳仪、DYCP-31D 型水平式电泳槽、紫外分析仪、UV-2000 紫外分光光度计均由北京六一仪器厂生产。

1.2 动物分组 雄性 Wistar 大鼠 63 只, 随机分组。空白对照组 7 只; 常规喂养, 仅做对照, 观察指标, 不做任何处理; 创伤组 28 只: 单纯腹部开放伤, 制作腹部开放伤模型, 分为伤后 12、24、48、72 h 共 4 个亚组, 每亚组有效检测与活杀取材的大鼠均为 7 只; 海水浸泡+创伤组 28 只: 腹部开放伤合并海水浸泡组, 分为伤后 12、24、48、72 h 4 个亚组, 每亚组有效

检测与活杀取材的大鼠均为 7 只。

1.3 动物模型制备 为消除生物节律对实验结果的影响, 实验均于上午 8:00 开始。Wistar 大鼠在实验动物中心饲养 1 周左右后开始实验。造模前禁食 24 h, 自由饮水, 实验前 1 h 禁水。

创伤组: 大鼠经 3% 戊巴比妥钠麻醉后取仰卧位, 将其固定于自制的鼠板上。用眼科剪刀沿中下腹部正中切开约 3 cm 进腹, 用自制硬质铁网片撑开并固定以防止内脏的脱出, 造成人为的腹部开放性伤; 将大鼠直立暴露于 22℃ 恒温箱中 1 h。

海水浸泡+创伤组: 本实验采用低温海水浸泡腹腔开放伤动物模型。麻醉及致伤方法同上。腹部开放伤致伤成功后将大鼠直立浸泡于 22℃ 海水中, 水面平齐剑突处, 浸泡时间为 1 h。大鼠活杀后取回盲部上溯 15 cm 处小肠组织作为检测标本。

1.4 SYBR Green 实时定量 PCR 方法的建立 用 Primer premier 5 及 oligo 6 等生物软件设计引物。 β -actin: 150 bp, 上游: 5'-CCC ATC TAT GAG GGT TAC GC-3'; 下游: 5'-TTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'。TLR4: 206 bp, 上游: 5'-TGC TCA GAC ATG GCA GTT TC-3'; 下游: 5'-TCA AGG CTT TTC CAT CCA AC-3'。NF- κ B: 163 bp, 上游: 5'-AAC ACT GCC GAG CTC AAG AT-3'; 下游: 5'-CAT CGG CTT GAG AAA AGG AG-3'。I κ B- α : 199 bp, 上游: 5'-CCT CAC CCT TCC CCA ATA AT-3; 下游: 5'-GTG TGA ATG GTG CCT GTG AC-3'。

总 RNA 提取: (1) 样品处理: 将组织在液氮中磨碎。每 50~100 mg 组织加 1 ml 裂解液, 用匀浆仪进行匀浆处理。(2) 将匀浆样品在 15~30℃ 放置 5 min, 使得核酸蛋白复合物

[收稿日期] 2011-01-10

[接受日期] 2011-05-12

[基金项目] 中国人民解放军总后勤部医药卫生科研计划课题 (06D004)。Supported by Medical and Health Research Programs of the PLA General Logistics Department (06D004)。

[作者简介] 韩志海, 博士, 副主任医师。E-mail: hanzhihai@sohu.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 010-66958176, E-mail: yujiyao0701@yahoo.com.cn

完全分离。(3)加入 0.2 ml 氯仿,盖好管盖,剧烈振荡 15 s,室温放置 3 min。(4)4℃、11 269.44×g 离心 10 min,将最上层转移到新管中。(5)缓慢加入 0.5 倍体积无水乙醇,混匀。将得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱中,4℃、11 269.44×g 离心 30 s。(6)向吸附柱中加入 0.5 ml 去蛋白液,4℃、11 269.44×g 离心 30 s,倒掉收集管中的废液,将吸附柱放回收集管中。(7)向吸附柱中加入 0.7 ml 漂洗液。室温静置 2 min,4℃、11 269.44×g 离心 30 s,倒掉收集管中的废液。(8)向吸附柱中加入 0.5 ml 漂洗液,室温静置 2 min,4℃、11 269.44×g 离心 30 s,倒掉收集管中的废液。(9)将吸附柱放入 2 ml 收集管中,4℃、11 269.44×g 离心 30 s,倒掉收集管中的废液。(10)将吸附柱转入新的离心管中,加 30~50 μ l RNase-free ddH₂O,放置 2 min,4℃、11 269.44×g 离心 2 min。(11)用 1%的琼脂糖,90 V 电压跑 30 min 检测条带的完整性。

cDNA 第一条链合成:(1) Microtube 管中配制模板 RNA/引物混合液,全量<15 μ l。(2)70℃保温 5 min 后迅速在冰上急冷 2 min 以上。(3)离心数秒使模板 RNA/引物的变性溶液聚集于 Microtube 管底部。(4)在 Microtube 管中配制反转录反应液 42℃保温 1 h。(5)70℃保温 15 min 后冰上冷却,得到 cDNA 溶液。实时定量 PCR:如表 1、表 2 所示,建立实时定量 PCR 反应体系并测定小肠组织 NF- κ B、I κ B- α 、TLR-4 mRNA 表达水平。

表 1 实时定量 PCR 反应体系

反应缓冲液	体积 V/ μ l
2×SYBR 混合物(含 4 mmol/L Mg ²⁺)	25
PCR 上游引物 (10 μ mol/L)	1
PCR 下游引物 (10 μ mol/L)	1
Taq 酶	0.3
ddH ₂ O	20.7
cDNA	2
合计	50

表 2 实时定量 PCR 反应程序

过程	温度 θ /℃	时间 t/s	循环次数	荧光定量反应程序
预变性	95	120	1	结束
扩增	95	20	45	延伸
	58	25		
	72	30		
熔解	65	0	1	退火
	95	20(0.5℃/s)		

大鼠小肠组织 NF- κ B、I κ B、TLR4 mRNA 表达水平的检测: Δ Ct 值=检测出的不同时间点各组 Ct 值-同组 β -actin Ct 值。以 2^{- Δ Ct} 比较各组间 mRNA 实时定量 PCR 拷贝数的差异。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析。实验数据计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对 PCR 2^{- Δ CT} 值采用重复测量资料的方差分析,若有差异,则采用 SNK-*q* 法进行两两比较。采用单因素方差分析判断组间差异,组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结 果

2.1 TLR4、NF- κ B、I κ B- α 扩增曲线和熔解曲线 TLR4、NF- κ B、I κ B α 扩增曲线显示荧光强度和初始拷贝数呈良好的线性关系。熔解曲线峰值单一,没有杂峰,表明实时 PCR 产物纯度较高,反应具有良好的特异性(图 1)。

2.2 大鼠小肠组织 NF- κ B mRNA 表达水平的检测 如表 3 所示,与空白对照组及单纯创伤组相比,海水+创伤组大鼠小肠组织 NF- κ B mRNA 在 72 h 后出现表达水平上调($P<0.01$)。

2.3 大鼠小肠组织 I κ B- α mRNA 表达水平的检测 如图 2 所示,与空白对照组相比,创伤组和海水+创伤组大鼠小肠组织 I κ B- α mRNA 在 48 h 后表达水平上调($P<0.01$),但海水+创伤组在 72 h I κ B- α mRNA 表达上调更为显著($P<0.01$)。

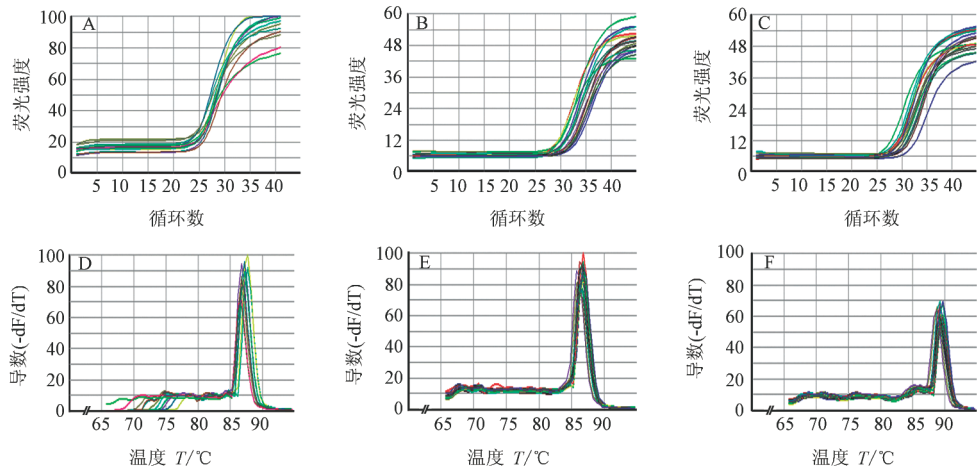


图 1 TLR4、NF- κ B、I κ B- α 的扩增曲线(A、B、C)和熔解曲线(D、E、F)
A、D: TLR4; B、E: NF- κ B; C、F: I κ B- α

表 3 各组不同时间点 NF-κB mRNA 实时 PCR 2^{-ΔCt} 值

(n=7, $\bar{x}\pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h	72 h
空白组	0.74±0.10	0.74±0.10	0.74±0.10	0.74±0.10
创伤组	0.39±0.06	1.02±0.23	0.92±0.17	0.88±0.19
海水+创伤组	0.49±0.13	0.98±0.25	1.06±0.15	61.72±10.08**

** P<0.01 与创伤组或空白组相比

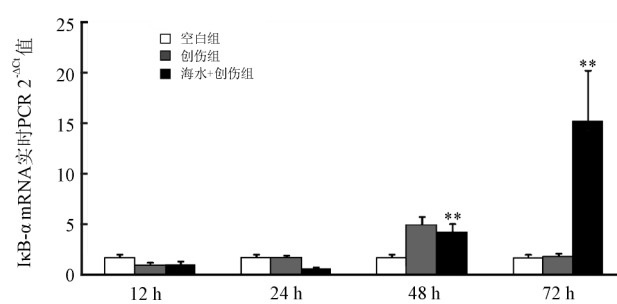


图 2 各组不同时间点 IκB-α mRNA 实时 PCR 2^{-ΔCt} 值

** P<0.01 与创伤组或空白组相比; n=7, $\bar{x}\pm s$

在伤后 48 h 开始出现 TLR4 mRNA 表达的上调,72 h 上调更加显著,NF-κB mRNA 在 72 h 后出现表达水平上调,单纯创伤组和海水浸泡伤组大鼠小肠组织 IκB-α mRNA 在 48 h 后都出现表达水平上调,但海水浸泡伤组在 72 h IκB-α mRNA 表达上调更为显著。

TLR4 表达于所有细胞,在单核细胞中表达尤多。TLR4 在天然免疫系统中革兰阴性菌等细菌菌体成分脂多糖(LPS)的信号转导途径中起重要作用。革兰阴性菌释放 LPS,在血流中与血清因子 LPS 结合蛋白(LBP)形成复合物,然后与单核细胞和巨噬细胞表面的膜性 CD14 相互作用,从而激活 TLR4 信号转导途径,继而触发 NF-κB 表达活性增强,调控相关基因,引起一系列病理变化^[6]。

本研究结果表明,在海水浸泡伤情况下,实验动物出现有肠功能屏障障碍,细菌或内毒素经多途径发生移位,造成肠道菌群移位(bacterial translocation, BT)和肠源性内毒素血症(gut origion endotoxaemia),释放 LPS,激活 TLR4 信号转导途径。

TLR4 被激活后二聚化,并通过其 TIR 区域传递信号和激发下游效应: TIR 结构域与 MyD88 羧基端的 TIR 结构域相互作用,活化后的 MyD88 通过其氨基端的死亡域与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 4(IRAK4)的氨基端死亡域相互作用,将 IRAK4 招募到 TLR 信号复合物中,促使 IRAK 发生自身磷酸化,然后与肿瘤坏死因子受体相关因子-6 相互作用,活化后的 TRAF6 与转化生长因子-β 活化激酶(TGF-β associated kinase, TAK1)及 TAK1 的结合蛋白(TAB)形成复合物激活 NF-κB 诱导激酶(NIK),NIK 被活化后进一步磷酸化 IκB 酶复合物,活化的 IκB 酶复合物作用于 NF-κB 的抑制物 IκB,使 IκB 的 2 个丝氨酸位点被磷酸化,导致 IκB 泛素化而降解,而使转录因子 NF-κB 从 IκB/NF-κB 的复合物中释放出来迁移到细胞核内,最终导致 NF-κB mRNA 的转录,促进 NF-κB 合成不断增加,引起炎症因子的释放,导致全身炎症反应及甚至脏器功能不全和多脏器功能障碍综合征(MODS)的发生^[6-7]。

在急性创伤过程中,NF-κB 参与巨噬细胞及白细胞的活化,并控制着许多促炎因子的基因表达;这一调节环节的失控将引起炎症反应的放大乃至组织损伤。本实验结果从分子生物学角度证实,海水浸泡腹部伤中 NF-κB 被激活,除与创伤、应激等因素有关外,肠道菌群的移位可能也是重要原因。在海水浸泡伤时,LPS 激活 TLR4 信号转导途径后,TLR4 可能又参与了激活 NF-κB 炎症反应过程,这一途径可

2.4 大鼠小肠组织 TLR4 mRNA 表达水平的检测 如图 3 所示,海水+创伤组大鼠小肠组织 TLR4 mRNA 在 72 h 后出现表达水平上调(P<0.01)。

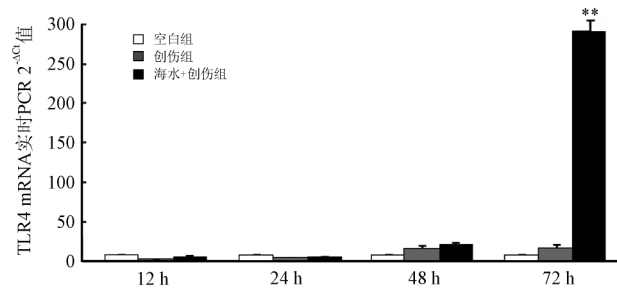


图 3 各组不同时间点 TLR4 mRNA 实时 PCR 2^{-ΔCt} 值

** P<0.01 与创伤组或空白组相比; n=7, $\bar{x}\pm s$

3 讨论

海战伤是远较同等程度陆战伤更为复杂的急性创伤^[3]。刘刚等^[4]的研究结果表明,腹部创伤海水浸泡后可引起机体严重的代谢及血流动力学紊乱。在这一过程中,肠道屏障作用破坏,细菌及内毒素大量进入机体循环,触发并引起机体炎性细胞因子大量释放引起炎症反应。虞积耀等^[5]应用蛋白质印迹法从蛋白水平证实炎症介质 NF-κB 迅速而持续地参与并在这一炎症反应过程处于核心地位,引起 TNF-α、血管内皮黏附因子-1 等炎症因子产生增加,导致炎症反应过程不断放大乃至组织损伤。那么,腹部创伤海水浸泡后是如何激发 NF-κB 合成不断增加并导致过度炎症反应的呢?

本实验通过 SYBR Green 实时定量 PCR 技术成功检测了海水浸泡伤大鼠小肠组织 NF-κB mRNA、IκB-α mRNA、TLR4 mRNA 的表达。结果显示:海水浸泡伤大鼠小肠组织

能迅速而持续地参与了海水浸泡伤大鼠的后续炎症反应过程。海水浸泡伤较同等程度单纯创伤 NF- κ B 活化更为迅速、持久,在海水浸泡伤中存在过度表达,并可能引起 TNF- α 等细胞因子过度释放导致“瀑布效应”^[10],从而进一步引起全身炎症反应甚至脏器功能不全和多脏器功能障碍综合征,导致伤情更为严重^[7]。

[参 考 文 献]

[1] 王育红,杨兴东,虞积耀,姜福亭,何远翔,王大鹏,等. 犬肠管破裂伤合并海水浸泡后血流动力学及病理学变化[J]. 解放军医学杂志,2004,29:1023-1024.

[2] Johnston D S,Nusslein-volhard C. The origin of pattern and polarity in the drosophila embryo[J]. Cell,1992,68:201-219.

[3] 虞积耀,赖西南. 海战伤合并海水浸泡的伤情特点及救治技术研究进展[J]. 解放军医学杂志,2004,29:1017-1019.

[4] 刘 刚,王育红,虞积耀,孟宇宏,周丽君,张 炎. 腹部开放伤后海水浸泡对大鼠肠屏障和传输功能的影响[J]. 实用医学杂志,2009,25:1371-1373.

[5] 虞积耀,韩志海,王 宇. 海水浸泡对大鼠小肠组织 NF- κ B, I κ B

表达的影响[J]. 中华航海医学与高气压医学杂志,2009,16:75-81.

[6] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity [J]. Nat Immunol,2001,1:135-145.

[7] Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer binding protein NF- κ B by a osttranslational mechanism [J]. Cell,1986,47:921-928.

[8] Lin L,Spoor M S,Gerth A J,Brody S L,Peng S L. Modulation of Th1 activation and inflammation by the NF-kappaB repressor Foxj1[J]. Science,2004,303:1017-1020.

[9] Chen G,Shi J,Qi M,Yin H,Hang C. Glutamine decreases intestinal nuclear factor kappaB activity and pro-inflammatory cytokine expression after traumatic brain injury in rats[J]. Inflamm Res,2008,57:57-64.

[10] Ramakrishnan P,Wang W,Wallach D. Receptor specific signaling for both the alternative and the canonical NF-kappaB activation pathways by NF-kappaB induced kinase[J]. Immunity, 2004,21:477-489.

[本文编辑] 尹 茶