

失血性休克鼠肺组织 Toll 样受体基因的表达

吕镗烽 宋勇 施教 杭涛 于宝军 印洪林

【摘要】目的 探讨单纯性失血性休克(无复苏)对肺组织中 Toll 样受体(TLR)mRNA 表达的影响及意义。**方法** C57BL/6 小鼠 45 只,随机分为失血组、脂多糖(LPS)组(阳性对照组,尾静脉注射 LPS 5 mg/kg)、假手术组(阴性对照组),每组 15 只。心脏穿刺复制失血性休克模型,在不同时间点取出肺组织,提取总 RNA,通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)半定量方法检测肺组织 TLR2 mRNA 和 TLR4 mRNA 的表达水平。**结果** 在失血性休克和 LPS 刺激后肺出现明显的中性粒细胞浸润、红细胞渗出。正常肺组织中有 TLR2 mRNA、TLR4 mRNA 表达;在失血性休克和 LPS 刺激后 0、1、2、4 和 6 h 肺组织 TLR2 mRNA、TLR4 mRNA 表达均逐渐增加;而假手术组未发生明显改变。**结论** 失血性休克后肺组织 TLR2 mRNA、TLR4 mRNA 表达增加与急性肺损伤(ALI)的发生有密切关系,除增强了机体非特异性免疫能力外,同时增加了宿主对随后各种刺激的易感性。过度表达的 TLR2、TLR4 可能造成组织、器官结构和功能损害。

【关键词】 休克,失血性; Toll 样受体; 基因; 表达

Expression of Toll-like receptor mRNA in lung tissue in mice with hemorrhagic shock LÜ Tang-feng, SONG Yong, SHI Yi, HANG Tao, YU Bao-jun, YIN Hong-lin. Department of Respiratory Diseases, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing University Clinical School of Medicine, Nanjing 210002, Jiangsu, China

【Abstract】Objective To investigate the influence and its significance of expression of Toll-like receptor mRNA in lung tissue of mice with hemorrhagic shock without resuscitation. **Methods** Forty-five C57BL/6 mice were randomly divided into hemorrhagic shock group, lipopolysaccharide (LPS) group (positive control, 5 mg/kg LPS was injected into caudal vein), and sham-operation group (negative control), with 15 mice in each group. The hemorrhagic shock model was reproduced by heart puncture. The total RNA from lung tissue of mice in each group was extracted by Tripure reagent and the expression of Toll-like receptor2 (TLR2) and TLR4 mRNA were measured by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. **Results** Hemorrhagic shock and LPS challenge increased lung neutrophil infiltration and erythrocyte diapedesis. The expression of TLR2 mRNA and TLR4 mRNA could be found in normal lung tissues, but they were increased at 0, 1, 2, 4, and 6 hours after hemorrhagic shock and LPS challenge. There was no change in the sham-operation group. **Conclusion** The increased expression of TLR2 and TLR4 gene in lung tissue after hemorrhagic shock is closely correlated with the onset of acute lung injury. Through the innate immunity is enhanced, the animals are more susceptible to subsequent irritations. Over-expression of TLR2 and TLR4 may induce structural and functional damage to organs.

【Key words】 hemorrhagic shock; Toll-like receptor; gene; expression

失血性休克是临床常见的急症,容易导致急性肺损伤(ALI)^[1],甚至可以引起多器官功能障碍综合征(MODS)。Toll 样受体(TLRs)是新近发现的机体天然免疫中细胞跨膜受体及病原模式识别受体(PRRs),可能与失血性休克的发生、发展及转归有一定的关系^[2,3]。我们通过复制失血性休克动物模型,观察 TLR2 mRNA 和 TLR4 mRNA 在肺组织中的表达情况,探讨两者变化与 ALI 之间的联系。

1 材料与方法

1.1 实验动物:健康成年清洁型近交系 C57BL/6

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(BK2004096)

作者单位:210002 南京大学医学院临床学院,南京军区南京总医院呼吸科

作者简介:吕镗烽(1973-),男(汉族),江西省九江市人,医学硕士,主治医师。

小鼠(由南京军区南京总医院实验动物中心提供)45 只,2~3 周龄,体重 18~20 g。采用单纯随机设计的方法分为 3 组,每组 15 只:单纯失血性休克组,脂多糖(LPS)组,假手术组;每组再分为 0、1、2、4 和 6 h 5 个亚组,每个亚组 3 只动物。

1.2 实验材料及试剂:1 ml 的无菌皮试空针。体积分数为 100%的异氟醚(Rhone-Poulenc Chemicals 公司产品)。LPS(E. coli. O111:B4, Sigma 公司产品),分装成 0.5 g/L 的规格;Tripure 试剂(Roche 公司产品);逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(Promega 公司产品);焦碳酸二乙酯(DEPC, Amresco 公司产品);100 bp DNA 标志物(Marker)为南京生兴生物技术有限公司生产;氯仿、无水乙醇、异丙醇均为扬州三九公司生产。

1.3 实验仪器:D-37520 Osterode 型台式高速低温离心机(Kendro 公司);IF-1 紫外透射反射分析仪(上海);PCR 基因扩增仪(Bio-rad 公司);电泳仪为 DY-1 电泳系统(上海);EDAS120 数码凝胶 GIS 成像系统;组织匀浆器。实验用品用体积分数为 0.1% 的 DEPC 纯水浸泡 48 h, 高压蒸汽灭菌。

1.4 动物模型复制及 RNA 提取:小鼠失血性休克模型参照文献[2]方法略加以改进。小鼠称重后,异氟醚按 100 ml/kg 吸入麻醉 1 min,待小鼠四肢完全松弛后,用肝素抗凝的皮试针通过心脏穿刺,在 60 s 内采取 30% 全血容量,使平均动脉压从 80 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa)降至 40 mm Hg,并能维持 2 h 以上,且死亡率 < 10%。LPS 按 5 mg/kg 尾静脉注射,假手术组仅给予心脏穿刺。动物按 0、1、2、4 和 6 h 时间点处死并采集标本,置于小离心管(EP 管)中放入深低温冰箱保存,尽快完成总 RNA 提取,提取方法:称取组织块约 80 mg (50 ~ 100 mg),提取时在无匀浆器中加入 1 ml Tripure,充分研磨匀浆,按照 Tripure 试剂盒说明书要求进行操作。

1.5 实验引物合成:实验所用引物均为本实验室自行设计,委托上海博亚公司合成。TLR2 上游引物:5'-CACTCGCTCCGTACGAAGTT-3',下游引物:5'-GGCTGTGGTACCTGAGAATG-3'。TLR4 上游引物:5'-CTGCAATCAAGAGTGTCTGAG-3',下游引物:5'-TTCCTGGCTTGACCAGTCTC-3'。内参照物 β -肌动蛋白(β -actin)上游引物:5'-ACTGCCGATCCTCTTCCTC-3',下游引物:5'-AAGCACTTGGCGGTGCACGA-3'。扩增后的片段长度分别为 295 bp、256 bp、410 bp。按博亚公司说明书提供的吸光度,用 DEPC 水稀释,配制浓度为 100 pmol/ μ l 的溶液, -20 °C 冰箱保存。

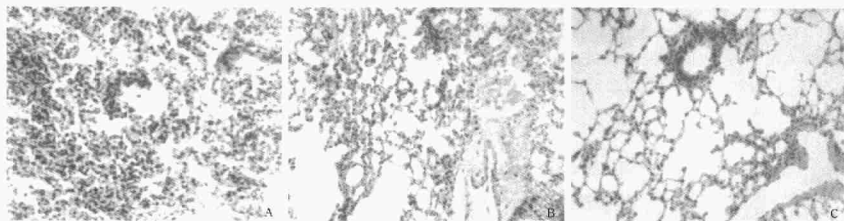
1.6 RT-PCR:严格按试剂盒说明书进行操作,采取两步法。先进行逆转录。① cDNA 第一链合成:总

RNA 2 μ g, Oligo dT 1 μ g 加 DEPC 水至 13.5 μ l, 70 °C 水浴 5 min, 置于冰上迅速冷却 5 min, 然后依次加入莫洛尼鼠白血病病毒(M-MLV)反转录酶 3 μ l, 10 \times 缓冲液(buffer)5 μ l, 10 mmol/L dNTP 混合物(dNTP Mix)2.5 μ l, RNA 酶抑制剂(RNase Inhibitor)1 μ l, 总体积 25 μ l, 混匀, 42 °C 60 min, cDNA 产物保存于 -20 °C。② PCR 扩增:cDNA 模板 5 μ l, MgCl₂ 1.5 μ l, dNTP Mix 1 μ l, 上、下游引物各 0.5 μ l, Taq 多聚酶 0.2 μ l, 10 \times buffer 2.5 μ l 加去离子水至 50 μ l。TLR2 和 β -actin 的 PCR 反应条件为:95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 1 min, 61 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 40 s, 最后 72 °C 延伸 7 min, 共 28 个循环。TLR4 的 PCR 反应条件是:95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 1 min, 59 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 40 s, 最后 72 °C 延伸 7 min, 共 28 个循环。常规配制 10 \times Tris-硼酸盐-乙二胺四乙酸(TBE)电泳缓冲液制备质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶。取 RT-PCR 产物 10 μ l 加样, 溴化乙锭染色, 40 V 条件下电泳约 1 h。地理信息系统(GIS)凝胶成像仪拍照, 使用 GIS 凝胶分析软件对电泳条带进行分析, 根据 Marker 确认目标基因扩增片段的条带, 用内参照测定待测物基因电泳条带的平均吸光度(A 值)进行标准校正, 分析各目标基因的表达情况。

1.7 统计学处理:数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS10.0 软件进行分析, 各组间 TLR2、TLR4 mRNA 与 β -actin 比值进行 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 失血性休克和 LPS 刺激后肺组织病理变化:失血性休克 6 h 后动物肺组织出现明显的中性粒细胞浸润、红细胞渗出(图 1A); LPS 刺激 6 h 后肺组织也出现明显的中性粒细胞浸润、红细胞渗出尤为明显(图 1B); 假手术组肺病理无明显变化(图 1C)。

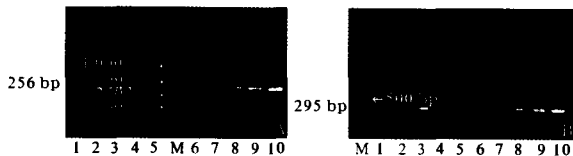


A: 失血性休克 6 h; B: LPS 刺激 6 h; C: 假手术组

图 1 失血性休克、LPS 刺激 6 h 和假手术组小鼠肺组织病理变化(HE, $\times 20$)

Figure 1 Pathologic changes of lung tissues in rats of 6-hour hemorrhagic shock, 6-hour LPS model group and control(HE, $\times 20$)

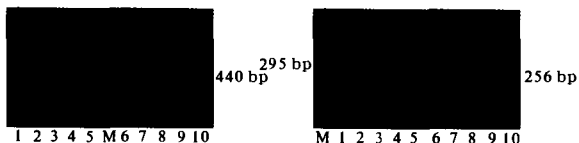
2.2 失血性休克和 LPS 刺激后 TLR2 mRNA 和 TLR4 mRNA 表达变化(图 2A, 2B); TLR2、TLR4 基因表达产物通过 RT-PCR 方法所得的特异性 DNA 片段长度分别为 295 bp 和 256 bp。失血性休克和 LPS 刺激后 0、1、2、4 和 6 h 肺 TLR2、TLR4 mRNA 表达均逐渐增加, 各组间差异无显著性。



M 为 Marker, 从下到上为 100、250、500、750、1 000 和 2 000 bp, A: 1~5 为 LPS 刺激后 0、1、2、4 和 6 h 的 TLR4, 6~10 为失血性休克后 0、1、2、4 和 6 h 的 TLR4; B: 1~5 为 LPS 刺激后 0、1、2、4 和 6 h 的 TLR2, 6~10 为失血性休克后 0、1、2、4 和 6 h 的 TLR2

图 2 失血性休克组和 LPS 组肺 TLR2 和 TLR4 mRNA 表达变化
Figure 2 Expression of TLR2 and TLR4 mRNA in hemorrhagic shock and LPS groups

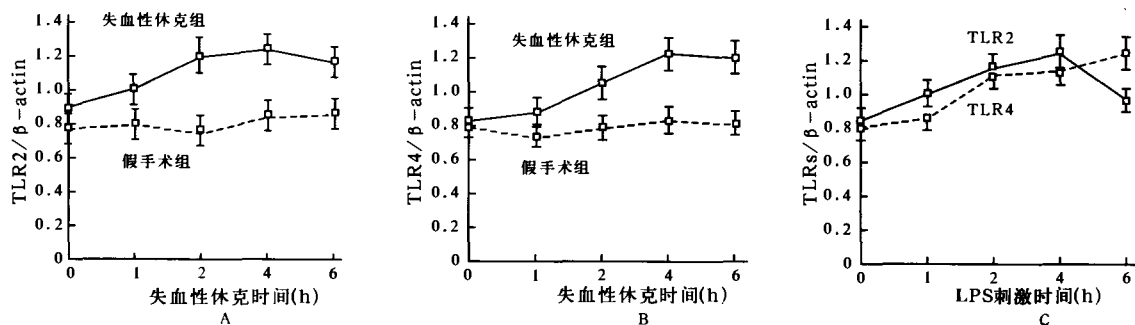
2.3 失血性休克和 LPS 刺激后 β -actin 及假手术组 TLR2、TLR4 mRNA 表达(图 3A, 3B); β -actin 基因表达产物通过 RT-PCR 方法所得的特异性 DNA 片段长度为 440 bp。假手术组 0、1、2、4 和 6 h 肺 TLR2、TLR4 mRNA 表达无明显变化; 失血性休克和 LPS 刺激后 0、1、2、4 和 6 h 肺 β -actin 表达亦无明显改变, 各组间差异无显著性(P 均 > 0.05)。



M 为 Marker, 从下到上为 100、250、500、750、1 000 和 2 000 bp, A: 1~5 为 LPS 刺激后 0、1、2、4 和 6 h 的 β -actin, 6~10 为失血性休克后 0、1、2、4 和 6 h 的 β -actin; B: 1~5 为假手术 0、1、2、4 和 6 h 的 TLR2, 6~10 为假手术组 0、1、2、4 和 6 h 的 TLR4

图 3 失血性休克和 LPS 刺激后 β -actin 及假手术组肺 TLR2、TLR4 mRNA 表达变化

Figure 3 Expression of β -actin after hemorrhagic shock and LPS stimulation as well as TLR2 and TLR4 mRNA expression in sham-operation group



注: 以 TLR2、TLR4/ β -actin A 值比值代表 TLR2、TLR4 相对表达量

图 4 失血性休克组、LPS 组和假手术组 TLR2 mRNA、TLR4 mRNA 表达时相变化

Figure 4 Expression of TLR2 and TLR4 mRNA in hemorrhagic shock LPS stimulation and sham-operation groups follow time changed

2.4 图 4A~C 示:失血性休克后 0、1、2 和 4 h 肺 TLR2、TLR4 表达逐渐增加, 6 h 均有所下降, 仍高于假手术组。LPS 刺激后 TLR2 逐渐增加, 6 h 明显下降, 仍高于假手术组; LPS 刺激后肺 TLR4 逐步升高, 6 h 达峰值。假手术组各时间点无明显变化。

3 讨论

失血性休克是临床常见的危重症, 容易产生 ALI 等并发症。虽然近年来病死率有所下降, 但其确切的发病机制迄今尚未完全明确。有研究 TLRs 与失血性休克发生发展与预后密切相关^[4]。TLRs 是一族具有信号转导功能的跨膜蛋白, 是细菌共有抗原成分的 PRRs, 在生物体的抗感染等天然免疫中发挥着重要作用。本实验结果显示失血性休克 1 h 后肺出现中性粒细胞浸润、红细胞渗出, 2 h 进一步加重, 4 h 伴有纤维蛋白的漏出, 6 h 出现急性肺水肿表现。失血性休克 1 h 后肺 TLR2 mRNA、TLR4 mRNA 开始升高, 2 h 和 4 h 继续升高, 并于 4 h 达到峰值, 6 h 略有下降, 但仍高于假手术组; LPS 刺激后肺 TLR2 mRNA 逐渐增高, 但在 6 h 时出现明显下降, 仍略高于假手术组; TLR4 mRNA 在 2 h 出现明显的上升, 4 h 达到峰值, 6 h 略有下降。假手术组 TLR2、TLR4 基因的表达无明显改变。失血性休克和 LPS 刺激后 TLR2、TLR4 表达在相应的时间点差异无显著性。表示失血性休克后可迅速上调肺 TLR2/TLR4 基因的表达, Rajnik 等^[4]报道失血性休克后 TLR2、TLR4 表达变化与本结果相类似。从本结果还可以看出, 失血性休克和 LPS 刺激后, TLR2、TLR4 在相应时间点的上调水平并不完全一致, 提示两者在信号转导通路上可能存在差异。失血性休克和 LPS 刺激后, TLR2 mRNA 和 TLR4 mRNA 都在 1 h 后逐渐开始上升, 4 h 达到峰值, 6 h 开始出现下降, 但肺部炎症仍有进一步发展的趋势, 提示 TLR2、TLR4 转录开始下降后, 但转录后启动

的一系列生物效应并未停止(包括蛋白翻译及随后的炎症反应),直至产生肺损伤,这说明 ALI 发病是一个逐渐产生的过程。

失血性休克和 LPS 刺激后的小鼠模型都能诱导 ALI 产生^[5],但两者发病机制有所不同。Fan 等^[6]报道 LPS 刺激小鼠后,TLR4 mRNA 表达与对照组相比下降 69%。虽然 LPS 刺激后肺 TLR4 mRNA 转录增加,但由于 TLR4 mRNA 稳定性明显降低,TLR4 mRNA 表达反而下降,而失血性休克后未出现类似的情况。但有报道 TLR2 对 TLR4 识别 LPS 有辅助作用,同时 LPS 诱导 TLR2 mRNA 增加呈 TLR4 依赖的方式,提示 TLR2、TLR4 可作为一个复合物而发挥作用^[7,8]。本结果显示 LPS 刺激后肺 TLR4 mRNA 表达仅在 6 h 出现下降,失血性休克和 LPS 刺激后 TLR2、TLR4 表达都上调,是否提示两者作为一个复合物而发挥作用,有待进一步证实。

C57BL/6 小鼠对 LPS 的耐受性比较强,尾静脉注射 5 mg/kg LPS 后无一死亡,但出现明显的毛发蓬乱、腹泻、少动现象,与腹腔注射 24 h 后相类似^[9]。我们只观察了失血性休克 6 h 内肺 TLR2、TLR4 表达变化,但不清楚更长时间点后两者变化的规律。单纯性失血性休克和 LPS 刺激后 TLR2、TLR4 升高增强了机体的天然免疫能力,提高了机体对急性炎症的应激能力,对机体具有保护作用;但过度表达的 TLR2、TLR4 可能导致组织、器官结构和功能损害,适度的表达 TLR2、TLR4 才可能对机体防御炎症等损伤有积极的意义。有报道证实小鼠对相同致病因素(如 LPS 刺激)后 TLR2、TLR4 表达并未完全一致,甚至产生完全不同的生物效应,提示 TLRs 基因多态性与 ALI 易感性之间可能存在密切联系^[10]。这些是否提示 TLR2、TLR4 可以作为

理想的治疗靶位,在治疗 ALI 中可能有一定意义。如何调节 TLR2 或 TLR4 使之适度表达,对于研究 ALI 的病理生理及制定与之相对应的策略具有相当重要的意义。

参考文献:

- 1 Song Y, Ao L, Raeburn C D, et al. A low level of TNF- α mediates hemorrhage-induced acute lung injury via p55 TNF receptor[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 281: L677-L684.
- 2 Ayala A, Chung C S, Lomas J L, et al. Shock-induced neutrophil mediated priming for acute lung injury in mice; divergent effects of TLR-4 and TLR-4/FasL deficiency[J]. *Am J Pathol*, 2002, 161: 2283-2294.
- 3 Song Y, Ao L, Calkins C M, et al. Differential cardiopulmonary recruitment of neutrophils during hemorrhagic shock; a role for ICAM-1[J]. *Shock*, 2001, 16: 444-448.
- 4 Rajnik M, Salkowski C A, Thomas K E, et al. Induction of early inflammatory gene expression in a murine model of nonresuscitated, fixed-volume hemorrhage[J]. *Shock*, 2002, 17: 322-328.
- 5 Calkins C M, Heimbach J K, Bensard D D, et al. TNF receptor I mediates chemokine production and neutrophil accumulation in the lung following systemic lipopolysaccharide[J]. *J Surg Res*, 2001, 101: 232-237.
- 6 Fan J, Kapus A, Marsden P A, et al. Regulation of Toll-like receptor 4 expression in the lung following hemorrhagic shock and lipopolysaccharide[J]. *J Immunol*, 2002, 168: 5252-5259.
- 7 Fan J, Frey R S, Malik A B. TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112: 1234-1243.
- 8 Zhang G, Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity[J]. *J Clin Invest*, 2001, 107: 13-19.
- 9 刘小伟,游宁,卢放根,等. LPS 信号转导分子 TLR4 表达与小鼠肝损伤的关系[J]. *湖南医科大学学报*, 2003, 28: 217-220.
- 10 Qureshi S T, Lariviere L, Leveque G, et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (TLR4)[J]. *J Exp Med*, 1999, 189: 615-625.

(收稿日期:2005-02-22 修回日期:2005-07-23)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

阻断组织因子与凝血因子 X 结合能减轻脓毒症诱发的肺和肾功能衰竭

脓毒症中组织因子(TF)的表达能诱发肺内凝血而引起肺组织炎症和纤维蛋白沉积。美国科研人员研究了阻断凝血因子 X 与组织因子和凝血因子 VIIa 复合物(TF-VIIa)结合对预防脓毒症引起的器官损伤的作用。研究者给 15 只成年猕猴体内注入灭活大肠杆菌(1×10^9 cfu/kg), 12 h 后再注入活的大肠杆菌(1×10^{10} cfu/kg)使动物产生急性肺损伤。注入活菌 2 h 后,将动物分成单纯抗生素组和抗生素加 TF 单抗(单抗,以阻断 TF 与因子 X 的结合)组进行治疗。结果显示,应用 TF 单抗可减轻气体交换和肺顺应性的异常,保护肾功能,减少中性粒细胞浸润和改善肠组织水肿。TF 单抗治疗还能减少纤维蛋白原的消耗和抑制促炎细胞因子白细胞介素-6(IL-6)、IL-8 的产生。研究人员认为,阻断凝血因子 X 与 TF-VIIa 复合物的结合能减轻脓毒症时肺及其他器官的损伤,其机制为抑制中性粒细胞的活化和阻断炎症反应。

杨国兴,周国勇,编译自《*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*》,2005-08-12(电子版);胡森,审校