

## · 论著 ·

## 性别差异对脓毒症大鼠肺组织 Toll 样受体 4 及髓样分化蛋白-2 基因表达的影响

杜晓辉 姚咏明 李荣 申传安 尹会男

**【摘要】目的** 探讨性别差异对脓毒症大鼠肺组织 Toll 样受体 4(TLR4)、髓样分化蛋白-2(MD-2)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )基因表达的影响。**方法** 脂多糖(LPS)刺激前后留取雌性和雄性大鼠肺组织标本,提取总 RNA,采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定 TLR4、MD-2 和 TNF- $\alpha$  的基因表达情况,采用放射免疫测定法检测大鼠血浆雌二醇(E<sub>2</sub>)含量。**结果** 正常雌性和雄性大鼠肺组织均可表达少量 TLR4、MD-2 和 TNF- $\alpha$  基因,性别间差异均无显著性( $P$ 均 $>0.05$ ),但脓毒症雌性大鼠各项指标表达均明显弱于雄性( $P$ 均 $<0.01$ )。相关分析表明,雌性和雄性脓毒症大鼠肺组织 TLR4、TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达与血浆 E<sub>2</sub> 含量均呈显著负相关( $P$ 均 $<0.05$ )。**结论** LPS 诱导的肺组织 TLR4 信号转导通路活化存在性别差异,内源性雌激素作用可能导致雌性脓毒症大鼠对 LPS 的反应性弱于雄性。

**【关键词】** Toll 样受体 4; 髓样分化蛋白-2; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 脂多糖; 脓毒症; 性别差异

**Influence of sexual difference on expression of Toll-like receptor 4 and myeloid differential protein-2 mRNA in the lung in septic rats** DU Xiao-hui, YAO Yong-ming, LI Rong, SHEN Chuan-an, YIN Hui-nan. Department of General Surgery, The General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

**【Abstract】Objective** To investigate the influence of gender on the gene expression of Toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differential protein-2 (MD-2) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the lung in septic rats. **Methods** The total RNA from normal and lipopolysaccharide (LPS)-challenged rats was extracted by Trizol reagent. The gene expressions of TLR4, MD-2 and TNF- $\alpha$  mRNA were measured by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Plasma estradiol (E<sub>2</sub>) content was determined by radioimmunoassay. **Results** The gene of TLR4, MD-2 and TNF- $\alpha$  were expressed in the lungs in normal rats, and there was no significant difference between male and female rats ( $P>0.05$ ). After LPS challenge, the gene expression were markedly up-regulated at 2 hours, and the gene expressions of TLR4, MD-2 and TNF- $\alpha$  were significantly lower in female group than those in male group (all  $P<0.01$ ). **Conclusion** There are marked difference in activation of TLR4 signal transduction in the lung when stimulated by LPS between male group and female group. The response to LPS is lower in female septic rats than in male septic rats, which might be associated to the effect of endogenous estrogen.

**【Key words】** Toll-like receptor 4; myeloid differential protein-2; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; lipopolysaccharide; sepsis; sexual difference

在脓毒症的基础与临床研究中,有报道认为,雄性个体死亡率(或病死率)明显高于雌性<sup>[1]</sup>。究其原因,有人认为是由于血浆中抗炎细胞因子白细胞介素-10(IL-10)浓度在雄性明显低于雌性<sup>[2]</sup>;也有资料提示是由于雌性个体体循环中各种免疫球蛋白含量高于雄性<sup>[3]</sup>。但从细胞信号转导角度探讨这一问题目前尚未见相关报道。本研究中拟重点以脓毒症大鼠肺脏为研究对象,探讨性别差异对 Toll 样受

体 4/核转录因子- $\kappa$ B(TLR4/NF- $\kappa$ B)信号转导通路中跨膜受体复合物——TLR4/髓样分化蛋白-2(MD-2)的基因表达及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) mRNA 表达的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 动物分组及模型制备:**40 只清洁级 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重 180~220 g。称重后按随机数字表法将大鼠分为雌性对照组、雌性内毒素组、雄性对照组和雄性内毒素组,每组 10 只。雄性和雌性内毒素组均尾静脉注射 5 mg/kg 脂多糖(LPS, E. coli. O55:B5, Sigma 公司),2 h 后处死大鼠,经腹主动脉抽血离心后留取血清,待测 TNF- $\alpha$ ;无菌留取肺组织标本,-70℃保存待测。

**1.2 肺组织 TLR4、MD-2 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达:**取肺组织约 50 mg,以异硫氰酸胍一步法提取

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371390);国家重点基础研究发展规划资助项目(G1999054203,2005CB522602)

作者单位:100853 北京,解放军总医院普通外科(杜晓辉,李荣);解放军总医院第三〇四临床部烧伤研究所(姚咏明,申传安,尹会男)

作者简介:杜晓辉(1971-),男(汉族),北京市人,医学博士,主治医师,主要从事胃肠道肿瘤的早期诊断及综合治疗以及脓毒症的基础与临床研究,已发表论文 10 余篇。

总 RNA(美国 Promega 公司)。采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定 TLR4、MD-2 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达,以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参对照。TLR4 序列为:5'-TAT CAG AAA TGC TAC AGT GGC TAC C-3' (上游), 5'-GAC CTC AGC TTC AAT GGT GC-3' (下游), 扩增片段为 742 bp; MD-2 序列为: 5'-CGG CAA TTC TAT GGA GTT GAT A-3' (上游), 5'-CCT CCG ATG CAA TTA TTT CCT A-3' (下游), 扩增片段为 182 bp; TNF- $\alpha$  序列为: 5'-GTA GCC CAC GTC GTA GCA AA-3' (上游), 5'-CCC TCC AGC TGG AAG AC-3' (下游), 扩增片段为 415 bp; GAPDH 序列为: 5'-TCC CTC AAG ATT GTA AGC AA-3' (上游), 5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3' (下游), 扩增片段为 309 bp。扩增产物经质量分数为 1.6% 的琼脂糖凝胶电泳后拍照, 底片冲洗后采用 UVP GDS800(英国)图像分析处理系统进行分析, 以目的基因和内参对照的积分吸光度值(A 值)表示 mRNA 的相对表达量。

**1.3 血浆雌二醇(E<sub>2</sub>)测定:**采用放射免疫(双抗)法测定。

**1.4 统计学处理:**数据均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 *t* 检验和相关分析等,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 雌性和雄性大鼠肺组织 TLR4 及 MD-2 的 mRNA 表达(表 1, 图 1):**雌性对照组和雄性对照组大鼠肺组织中均有 TLR4、MD-2 的 mRNA 微量表达; LPS 注射后 2 h, 雌性和雄性大鼠 TLR4、MD-2 的 mRNA 表达均明显增强, 但雌性较雄性弱( $P$  均  $< 0.01$ )。

**表 1 雌性和雄性大鼠肺组织 TLR4、MD-2 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达( $\bar{x} \pm s$ )**

**Table 1 Expression of TLR4 mRNA, MD-2 mRNA and TNF- $\alpha$  mRNA in the lungs in female and male septic rats ( $\bar{x} \pm s$ )**

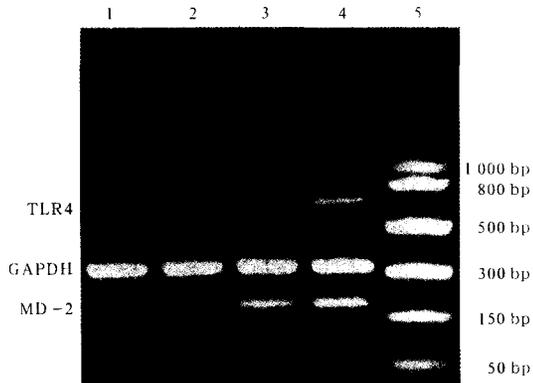
组别	动物数(只)	TLR4 mRNA	MD-2 mRNA	TNF- $\alpha$ mRNA
雌性对照组	10	0.451±0.092	0.470±0.104	0.135±0.071
雄性对照组	10	0.421±0.066	0.512±0.092	0.162±0.054
雌性内毒素组	10	0.983±0.106*	1.377±0.157*	0.673±0.175*
雄性内毒素组	10	1.492±0.217 <sup>△</sup> #	1.989±0.274 <sup>△</sup> #	1.023±0.215 <sup>△</sup> #

注:与雌性对照组比较; \*  $P < 0.01$ ; 与雄性对照组比较;

$\Delta P < 0.01$ ; 与雌性内毒素组比较; #  $P < 0.01$

**2.2 雌性和雄性大鼠肺组织 TNF- $\alpha$  mRNA 表达**

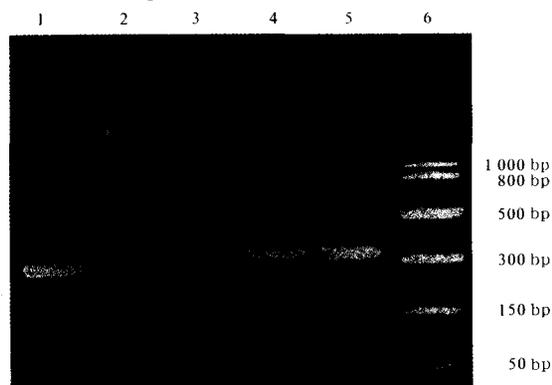
(表 1, 图 2); 雌性和雄对照组性大鼠肺组织均有 TNF- $\alpha$  mRNA 的微量表达; LPS 注射后 2 h, 雌性和雄性大鼠 TNF- $\alpha$  mRNA 表达均有明显增强, 但雌性较雄性弱( $P < 0.01$ )。



1~5 分别代表雌性对照、雄性对照、雌性内毒素、雄性内毒素和 Marker

**图 1 雌性和雄性大鼠肺组织 TLR4、MD-2 的 mRNA 表达**

**Figure 1 Expression of TLR4 and MD-2 mRNA in the lungs in female and male septic rats**



1~6 分别代表 GAPDH、雌性对照、雄性对照、雌性脓毒症、雄性内毒素、Marker

**图 2 雌性和雄性大鼠肺组织 TNF- $\alpha$  mRNA 表达**

**Figure 2 Expression of TNF- $\alpha$  mRNA in the lungs in female and male septic rats**

**2.3 雌性和雄性大鼠血浆 E<sub>2</sub> 含量(表 2):**正常雌性大鼠血浆中 E<sub>2</sub> 含量明显高于雄性大鼠, 差异有显著性( $P < 0.01$ ); 雌性脓毒症组大鼠 E<sub>2</sub> 明显高于雄性脓毒症组, 差异也有显著性( $P < 0.01$ )。

**表 2 雌性和雄性大鼠血浆 E<sub>2</sub> 含量( $\bar{x} \pm s$ )**

**Table 2 Changes in serum estradiol concentrations in septic rats ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	动物数(只)	E <sub>2</sub> (ng/L)
雌性对照组	10	5.943±1.031
雄性对照组	10	0.925±0.297*
雌性内毒素组	10	6.312±1.307
雄性内毒素组	10	1.064±0.256#

注:与雌性对照组比较; \*  $P < 0.01$ ; 与雌性内毒素组比较;

#  $P < 0.01$

2.4 雌性和雄性大鼠肺组织 TLR4 及 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达与血浆 E<sub>2</sub> 含量的相关性分析(表 3): 相关分析结果表明, 雌性和雄性大鼠 TLR4、TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达与血浆 E<sub>2</sub> 含量均呈显著的负相关性 ( $P$  均  $< 0.05$ )。

表 3 雌性和雄性大鼠肺组织 TLR4、TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达与血浆 E<sub>2</sub> 含量相关分析

Table 3 Correlation between TLR4 mRNA, TNF- $\alpha$  mRNA and serum E<sub>2</sub> levels

指标	r 值	P 值
雌性肺组织 TLR4 mRNA/血浆 E <sub>2</sub>	-0.886 5	0.019
雌性肺组织 TNF- $\alpha$ mRNA/血浆 E <sub>2</sub>	-0.918 7	0.010
雄性肺组织 TLR4 mRNA/血浆 E <sub>2</sub>	-0.898 3	0.015
雄性肺组织 TNF- $\alpha$ mRNA/血浆 E <sub>2</sub>	-0.842 5	0.035

### 3 讨论

业已明确, LPS 信号转导在全身炎症反应综合征(SIRS)的病理过程中起重要作用。LPS 信号主要通过 TLR4/MD-2 复合受体实现跨膜转导, 最终导致 TNF- $\alpha$  的释放, TNF- $\alpha$  是最早释放且起关键作用的炎症介质之一, 它可从不同环节并以不同方式参与体内炎症反应和组织损伤过程<sup>[3]</sup>。TLRs 分子作为重要的模式识别受体, 对多种病原相关分子模式进行识别, 在动、植物及昆虫的抗感染天然免疫中发挥着重要作用<sup>[4]</sup>。TLR4 是典型的模式识别受体, 主要表达于单核/巨噬细胞, 识别内外源性致炎因子, 介导肺部炎症反应<sup>[5]</sup>。体内外实验显示, TLR4 基因上即使仅出现一个碱基的突变, 都会导致宿主对革兰阳性(G<sup>+</sup>)菌和革兰阴性(G<sup>-</sup>)菌的反应能力严重丧失, 破坏宿主防御细菌入侵的天然免疫屏障, 进而导致机体对病原微生物的易感性增强<sup>[6]</sup>。在 SIRS 出现失控而导致多器官功能障碍综合征(MODS)发生的病理生理过程中, 肺脏是最易受损伤的首位靶器官。本实验中探讨了性别差异及内源性雌激素对脓毒症状态下肺组织细胞信号转导通路活化的影响, 旨在为脓毒症时肺脏损伤的防治提供新的思路。

实验表明, 作为 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号转导通路的重要组成部分, 正常情况下, 雌性和雄性大鼠肺组织 TLR4、MD-2 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达差异均无显著性, 然而在 LPS 刺激后, 雌性和雄性大鼠肺组织 TLR4、MD-2 和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达均明显升高, 与文献[7, 8]报道一致。但是雌性大鼠各项指标均明显弱于雄性, 导致肺组织的炎症反应及损伤亦弱于雄性, 说明正是由于细胞信号转导通路活

化的减弱, 导致了临床上出现脓毒症状态下雌性个体预后优于雄性个体的现象。进一步进行的相关分析表明, 脓毒症状态下雌性大鼠肺组织 TLR4、TNF- $\alpha$  的 mRNA 表达与血浆 E<sub>2</sub> 水平均呈显著负相关性, 说明内源性雌激素可能通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号转导通路的活化参与对脓毒症大鼠肺组织的保护作用。有报道, 外源性雌激素对呼吸功能有易化作用; 免疫组化技术提示, 脑内杏仁核、蓝斑核、面神经核及三叉神经核等与呼吸功能密切相关的部位均有雌激素受体的分布<sup>[9]</sup>, 这更进一步肯定了雌激素在呼吸调节中的作用。研究表明, 高浓度的雌激素能消除活性自由基的毒性作用, 增加有益因子的水平, 降低有害因子(TNF- $\alpha$ 、IL-6 等)的水平, 减轻炎症反应对机体的损害<sup>[10, 11]</sup>。结合本实验结果我们认为, 可将雌激素用于脓毒症时以作为保护肺脏等重要脏器组织免受或减轻内毒素损伤的干预措施。

### 参考文献:

- Schroder J, Kahlke V, Staubach K H, et al. Gender differences in human sepsis[J]. Arch Surg, 1998, 133: 1200-1205.
- Asai K, Hiki N, Mimura Y, et al. Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells; role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine in an ex vivo septic model[J]. Shock, 2001, 16: 340-343.
- 姚咏明, 盛志勇. 我国创伤脓毒症基础研究新进展[J]. 中华创伤杂志, 2003, 19: 9-12.
- Medzhitov R, Janeway C A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system[J]. Science, 2002, 296: 298-300.
- Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family[J]. Immunol Lett, 2003, 85: 85-95.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors[J]. Ann Rev Immunol, 2003, 21: 335-376.
- 姚咏明, 鄢小建, 姚风华, 等. 严重腹腔感染大鼠组织 Toll 样受体 2/4 基因表达及其调节机制[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 646-650.
- 万幸, 王培训, 周联, 等. 脂多糖刺激前后小鼠肺肝脾组织中 Toll 样受体基因表达情况[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 73-76.
- 王凤斌, 王鲁娟, 李宁, 等. 雌激素替代疗法对去卵巢大鼠呼吸的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2004, 10: 477-479.
- Simpkins J W. Effects of age and ovarian steroids on responses to opiates in the female rat[J]. Neurobiol Aging, 1994, 15: 545-552.
- Knoferl M W, Diodato M D, Angele M K, et al. Do female sex steroids adversely or beneficially affect the depressed immune responses in males after trauma-hemorrhage[J]? Arch Surg, 2000, 135: 425-433.

(收稿日期: 2005-07-26 修回日期: 2005-11-20)

(本文编辑: 李银平)