

• 论著 •

失血性休克小鼠心肌 Toll 样受体 2/4 mRNA 的表达

杭涛 江时森 宫剑滨 吕镗锋 宋勇 诸葛海鸿

【摘要】 目的 探讨无复苏对失血性休克小鼠心肌 Toll 样受体(TLR)表达变化的影响及其意义。方法 将 45 只 C57BL/6 小鼠随机分为失血性休克模型组、假手术组、脂多糖(LPS)组(由尾静脉注射 LPS 5 mg/kg), 每组 15 只;采用心脏穿刺法建立小鼠失血性休克模型。心肌 TLR2 mRNA 和 TLR4 mRNA 表达采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法进行分析;测定左室收缩末压(LVESP)以反映左室收缩功能。结果 ①与假手术组比较,失血性休克及 LPS 刺激后小鼠的动脉血压出现下降,均可导致左室收缩功能障碍;②失血性休克及 LPS 刺激后 TLR2 和 TLR4 的 mRNA 表达水平均出现不同程度上调,而假手术组在各时间点未见明显改变。结论 ①失血性休克及 LPS 刺激后心肌 TLR2 及 TLR4 的 mRNA 表达上调与心功能障碍存在密切联系,但这两种病理状态下的信号转导通路可能存在差异;②失血性休克和 LPS 刺激后 TLR2、TLR4 的 mRNA 升高增强了机体的天然免疫功能,提高了机体对急性炎症的应激能力,对机体具有保护作用,但其过度表达也可能对组织、器官功能产生损害。

【关键词】 Toll 样受体; 心肌; 休克,失血性; 脂多糖; 小鼠

Expression of Toll-like receptor 2/4 mRNA in myocardium in mice with hemorrhagic shock HANG Tao*, JIANG Shi-sen, GONG Jian-bin, LÜ Tang-feng, SONG Yong, ZHUGE Hai-hong. * Department of Cardiology, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002, Jiangsu, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of hemorrhagic shock without resuscitation on expression of Toll-like receptor (TLR) in myocardium of rats and its significance. **Methods** Forty-five C57BL/6 mice were randomly divided into 3 groups: hemorrhagic group, sham operation group and lipopolysaccharide (LPS) group, with 15 mice in each group. The hemorrhagic shock mouse model was reproduced by heart puncture. Expression levels of TLR2 mRNA and TLR4 mRNA were determined by reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR). Left ventricular end-systolic pressure (LVESP) was determined and adopted as an index of left ventricle contractile function. **Results** ①Both hemorrhagic shock and LPS challenge led to a reduction in arterial blood pressure in mice when compared with sham operation group. Both hemorrhagic shock and LPS challenge could result in left ventricle contractile dysfunction when compared with sham operation group. ②Expression levels for TLR2 and TLR4 genes were upregulated in myocardium to various extents after hemorrhagic shock and LPS challenge, while in contrast the changes were absent in sham operation group. **Conclusion** ①The up-regulation of TLR2 and TLR4 genes is closely related with hemorrhagic shock and LPS-induced left ventricle contractile dysfunction, and there may exist a difference in signal transduction pathway between the two pathological conditions. ②The host ability of innate immune response may be reinforced by the up-regulation of TLR2 and TLR4, whereas overexpression of them may also impair the function of tissues or organs.

【Key words】 Toll-like receptor; myocardium; hemorrhagic shock; lipopolysaccharide; mouse

失血性休克是临床常见的急症之一,病因多为外伤、消化性溃疡、食管静脉曲张破裂及妇产科疾病所引起的大出血等,并易导致心功能受损,甚至引起多器官功能障碍综合征(MODS)^[1]。虽然近年来致死率及致残率有所下降,但其确切的发病机制仍未完全阐明。以往在失血性休克致心功能损害的研究中,关于某些细胞因子,如核转录因子- κ B(NF- κ B)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等的作用得到了

有关研究的支持^[2,3]。Toll 样受体(TLR)是新近发现的细胞跨膜受体及病原模式识别受体,在介导上述细胞因子活化的信号转导通路中扮演了重要的角色^[4]。有研究指出,它与失血性休克的发生、发展及转归有一定的相关性^[5]。关于 TLR 在失血性休克心肌中的动态表达目前尚未见报道。本研究通过建立小鼠失血性休克模型,观察心肌组织 TLR2 mRNA 及 TLR4 mRNA 的表达变化,并初步探讨其与心功能损害的联系。

1 材料与与方法

1.1 材料及试剂:脂多糖(LPS, E. coli. O111:B4, Sigma 公司产品)0.5 g/L, Tripure 试剂(Roche 公司

作者单位:210002 江苏南京,南京军区南京总医院心脏内科(杭涛,江时森,宫剑滨,诸葛海鸿),呼吸内科(吕镗锋,宋勇)

作者简介:杭涛(1976-),男(汉族),江苏姜堰人,医学博士,主要研究方向为心血管病理生理学(E-mail:njht1976@yahoo.com.cn)。

产品), 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自美国 Promega 生物有限公司。

1.2 动物模型的制备:选择健康成年清洁型近交系 C57BL/6 小鼠(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, 戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 在立体分离显微镜(SMZ-1B, NIKON)下把 PE-50 聚乙烯管(Clay Adama, Piscataway, NT)插入一侧颈总动脉, 用 4 道生理记录仪监视并记录血压, 并按随机数字表法分为 3 组: ①失血性休克模型组(模型组): 失血性休克模型参照文献[6]制备, 并略加以改进。具体操作方法为: 用肝素抗凝的 0.45×16 型号皮试针通过心腔穿刺, 在 60 s 采 30% 的全血容量, 使平均动脉压(MAP)从 80 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa) 降至 40 mm Hg, 并能维持 2 h 以上, 且使死亡率 < 10%。②LPS 组(阳性对照): LPS 按 5 mg/kg 尾静脉注射。③假手术组(阴性对照): 除不给予放血外, 其余处理同模型组。各组观察时间点分别为处理后即刻(0)、1、2、4 和 6 h。实验过程中, 大鼠生活和手术环境温度均控制在(20±2)℃。

1.3 取样方法:小鼠在预定时间点记录血压, 得到收缩压(SBP)和舒张压(DBP), 并计算 MAP, 计算公式为: $MAP = DBP + 1/3(SBP - DBP)$ 。随后按照文献[6]报道的肋骨下穿刺法进行心脏穿刺, 并利用 SIMENS SIRCUST 960 生理记录仪(西门子公司, 德国)记录左室收缩末压(LVESP), 随后开胸取出心脏, 4℃预冷生理盐水冲洗, 将左、右心房及右心室去除, 留取左心室心肌约 50 mg, 保存于 -80℃液氮中, 用于总 RNA 的抽提。

1.4 组织总 RNA 抽提:按照 Roche 公司提供的总 RNA 抽提试剂盒(Tripure™ Isolation Reagent)操作步骤完成。从 50 mg 新鲜小鼠的心肌组织中提取并且纯化总 RNA 约 50 μg, 其在 260/280 nm 处的吸光度(A)值(A_{260}/A_{280})为 1.9 左右。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析, 18S、28S 条带清晰, 总 RNA 片段完整未降解。

1.5 PCR 引物设计以及 RT-PCR 的操作步骤:TLR2、TLR4 和 β-actin 的 PCR 引物参考 Gene Bank 所报道的各自 cDNA 序列(Gene Bank Index: 31981332、10946593、6671508), 经过计算机辅助设计引物(所用软件为 DNA Club)后, 由上海博亚公司合成。各目的基因引物序列见表 1。

逆转录反应以提取的总 RNA 10 μg 为模板, Oligo(dT)15 primer 为逆转录引物, 70℃下水浴

5 min 后快速冰块降温, 再依次加入 RNAsin、dNTP mix、莫洛尼鼠白血病病毒反转录酶(M-MLV)5×缓冲液(Buffer)和焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的双蒸水, 最后按 100 kU/mg mRNA 加 M-MLV 逆转录酶(购自美国 Promega 公司), 反应总体积为 50 μl, 42℃下水浴 2 h, 合成第 1 条 cDNA 链。PCR 反应以逆转录产物 10 μl 为模板, 目的基因及内参 β-actin 引物 200 nmol/L, 加入 Taq DNA 聚合酶 2.5 U, 总反应体积为 25 μl, PCR 条件为 92℃变性 45 s, 58℃退火 50 s, 72℃延伸 70 s, 30 个循环, 最后 72℃延伸 7 min。

表 1 TLR2、TLR4 和 β-actin 引物序列

Table 1 Primers for TLR2, TLR4 and β-actin

名称	类型	引物序列	PCR 产物长度
TLR2	正义链	5'-CACTCGCTCCGTACGAAGTT-3'	295 bp
	反义链	5'-GGCTGTGGTACCTGAGAATG-3'	
TLR4	正义链	5'-CTGCAATCAAGAGTGCTGA-3'	256 bp
	反义链	5'-TTCTTGGCTTGACCAGTCTC-3'	
β-actin	正义链	5'-ACTGCCGCATCCTCTTCCTC-3'	440 bp
	反义链	5'-AAGCACTTGCCGTGCACGA-3'	

1.6 凝胶成像分析系统检测各目的基因的表达式水平:PCR 产物 10 μl 于质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶上电泳(50 V, 电泳 1.5 h), KODAK EDAS290 凝胶成像分析系统成像, 图像分析使用 KODAK 1D 图像分析软件, 分别得到目的基因及内参 β-actin 的灰度值, 随后计算目的基因的相对表达水平。计算公式为: 目的基因相对表达水平 = 目的基因灰度值/β-actin 的灰度值。

1.7 统计学分析:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, 组间及组内数据采用 One-Way ANOVA 检验方法进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

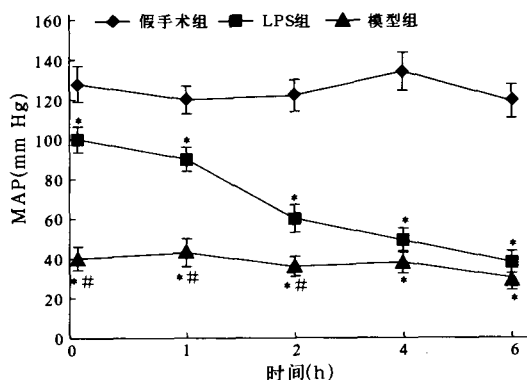
2 结果

2.1 失血性休克及 LPS 刺激后小鼠 MAP 的变化(图 1):失血性休克后 2 h MAP 维持于 40 mm Hg 左右, 4~6 h 略有下降。给予 LPS 刺激后 0 h MAP 即开始降低, 至 6 h 达到最低值, 与假手术组比较, 模型组和 LPS 组各时间点 MAP 均显著下降(P 均 < 0.05)。假手术组各时间点 MAP 差异无显著性。

2.2 失血性休克及 LPS 刺激后 LVESP 的改变(图 2):2 h 模型组和 LPS 组小鼠 LVESP 仍维持在假手术组水平, 但 4 h 模型组与 LPS 组 LVESP 与假手术组比较均有显著下降(P 均 < 0.05), 而 LVESP 在模型组与 LPS 组之间差异无显著性。

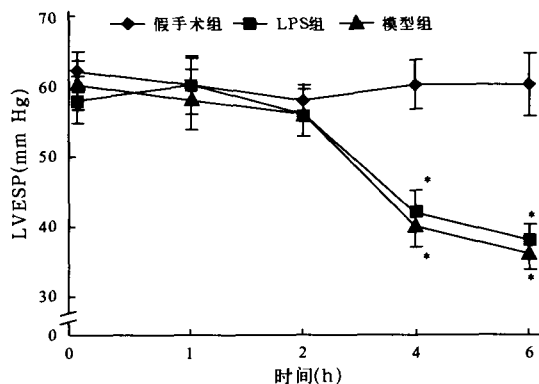
2.3 失血性休克及 LPS 刺激后心肌 TLR2 和

TLR4 的 mRNA 表达变化(图 3,图 4):与假手术组比较,失血性休克后 1 h 小鼠心肌 TLR2 mRNA 表达水平增高 ($P < 0.05$), 2 h 达峰值 ($P < 0.05$), 4~6 h 下降,但仍高于同时间点假手术组水平。LPS 刺激后 1 h 小鼠心肌 TLR2 mRNA 表达水平上调 ($P < 0.05$), 在 4 h 达峰值 ($P < 0.05$), 6 h 有降低,但与同时间点假手术组比较差异仍有显著性。模型组与 LPS 组小鼠心肌 TLR2 mRNA 表达水平在 1~6 h 差异均有显著性。与假手术组比较,失血性休克后 1 h 小鼠心肌 TLR4 mRNA 表达水平增高 ($P < 0.05$), 2 h 达峰值 ($P < 0.05$), 4~6 h 开始下降,但仍高于同时间点假手术组。LPS 刺激后 1 h, 小鼠心肌 TLR4 mRNA 表达水平上调 ($P < 0.05$), 在 4 h 达峰值 ($P < 0.05$), 6 h 有所降低,但与同时间点假手术组比较差异仍有显著性。1~6 h 模型组与 LPS 组小鼠心肌 TLR4 mRNA 的表达差异均有显著性。



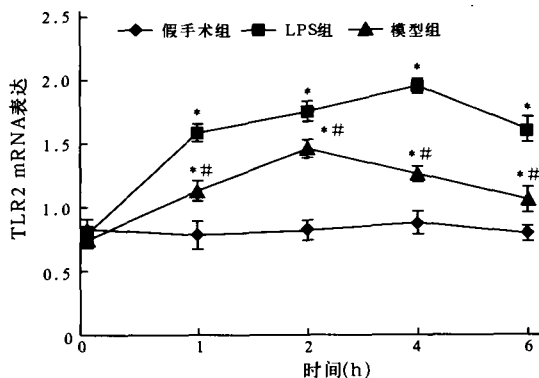
注:与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$

图 1 失血性休克及 LPS 刺激后小鼠 MAP 的变化
Figure 1 Changes of MAP in mice after hemorrhagic shock and LPS stimulation



注:与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$

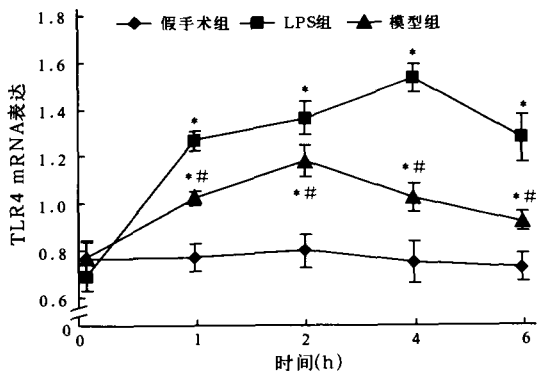
图 2 失血性休克及 LPS 刺激后小鼠 LVESP 的改变
Figure 2 Changes of LVESP in mice after hemorrhagic shock and LPS stimulation



注:与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$

图 3 失血性休克及 LPS 刺激后小鼠心肌 TLR2 mRNA 表达的变化

Figure 3 Expressions of TLR2 mRNA in myocardium in mice after hemorrhagic shock and LPS stimulation



注:与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$

图 4 失血性休克及 LPS 刺激后小鼠心肌 TLR4 mRNA 表达的变化
Figure 4 Expressions of TLR4 mRNA in myocardium in mice after hemorrhagic shock and LPS stimulation

3 讨论

McDonough 等^[7]报道,失血性休克小鼠的心肌功能在失血后 2 h 仍维持正常,至 3 h LVESP 出现异常改变;而 Meng 等^[8]也发现在小鼠失血性休克 4 h 后心肌收缩功能受到损害;同时,有报道认为 LPS 刺激 4 h 后小鼠左心室收缩功能才受到抑制^[9]。以上发现与我们的结果相似,并且提示:失血性休克和 LPS 导致动脉血压降低、心肌灌注减少可能是引起心功能障碍的原因之一,而一系列的代偿性反应,如对冠状动脉流量的生理性调节等,在短时间内维持了心功能的稳定,当这种平衡被打破后,必然导致心功能损害。但在本研究中,血压的变化与心功能损害程度似乎并无直接的相关性,且有研究发现,给失血性休克犬林格液后,虽然血压恢复至对照组水平,心功能的损害却并没有得到改善^[10]。上述发现提示:尽管不能排除低血压作为失血性休克及 LPS 刺激致心功能损害的一个因素,但其他的机制

可能起了更为重要的作用。

有研究指出,失血性休克及 LPS 致组织器官结构功能损伤的信号转导通路中,TLR4 和(或)TLR2 是重要的信号转导受体^[6,8,11-13],此外,作为 TLR 激活后下游的主要效应分子,心肌细胞 NF- κ B 及 TNF- α 已被证实与失血性休克及 LPS 刺激后的心功能损害存在密切联系^[2,3]。以上发现提示,失血性休克及 LPS 可能是通过同一信号转导通路导致心功能受损。但在本研究中,与假手术组比较,尽管失血性休克及 LPS 均上调了心肌 TLR2 及 TLR4 的转录水平,但上调的水平在两组间差异存在显著性。此外,Raeburn 等^[9]报道,由 LPS 引起的心功能受损小鼠心肌中性粒细胞数目较对照组明显增多;而 Song 等^[14]在小鼠失血性休克的研究中发现,心肌中性粒细胞的数目与对照组相比较差异无显著性。因此,虽然失血性休克及 LPS 刺激均上调了 TLR2 和 TLR4 基因的表达水平,并导致心功能受损,但在这两种病理状态下的信号转导通路可能存在差异。有报道 TLR2 对 TLR4 识别 LPS 有辅助作用,且 LPS 诱导 TLR2 mRNA 表达增加呈 TLR4 依赖的方式;同时研究还发现,TLR2 可以与其他 TLR 家族成员形成异二聚体,从而拓宽了其识别功能^[15,16]。结合本研究中 TLR2 和 TLR4 表达的变化,提示 TLR2、TLR4 可能作为一个复合物而发挥作用,但是否如此还需进一步的研究证实。

本研究显示,失血后 1 h 心肌 TLR2 及 TLR4 基因表达水平增高,2 h 达峰值,4 h 后开始下降;LPS 刺激后 1 h 心肌 TLR2 及 TLR4 转录水平上调,4 h 达峰值,6 h 开始降低,但模型组及 LPS 组小鼠心功能损害在 4~6 h 才发生,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,直至产生心功能抑制。此外,单纯失血性休克和 LPS 刺激后 TLR2、TLR4 升高增强了机体的天然免疫功能,提高机体对急性炎症的应激能力,对机体具有保护作用,但其过度表达也可能对组织、器官功能产生损害。

由于我们仅观察了失血性休克后短时间内(6 h)心肌 TLR2 及 TLR4 基因的表达变化,因此,对更长时间段上述二者表达的变化缺乏了解。而本研究结果提示,失血性休克后心肌 TLR2 及 TLR4 基因表达的增加与心功能障碍存在密切联系,对二者更深入的研究可能有助于进一步阐明失血性休克及其所导致的心功能损害发生机制,并为制定更为合

理的干预措施提供进一步的理论支持。

参考文献:

- 1 Peitzman A B, Billiar T R, Harbrecht B G, et al. Hemorrhagic shock[J]. *Curr Probl Surg*, 1995, 32: 925 - 1002.
- 2 Shahani R, Marshall J G, Rubin B B, et al. Role of TNF- α in myocardial dysfunction after hemorrhagic shock and lower-torso ischemia[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 278: H942 - 950.
- 3 McDonald M C, Mota-Filipe H, Paul A, et al. Calpain inhibitor I reduces the activation of nuclear factor- κ B and organ injury/dysfunction in hemorrhagic shock [J]. *FASEB J*, 2001, 15: 171 - 186.
- 4 O'Neill L A. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for inflammatory and infectious diseases [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2003, 3: 396 - 403.
- 5 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.
- 6 Asehnoune K, Moine P, Fitting C, et al. Differential modulation of TLR2 and TLR4-induced TNF production by murin hemorrhagic shock[J]. *Ann Fr Anesth Reanim*, 2005, 24: 255 - 259.
- 7 McDonough K H, Giaimo M, Quinn M, et al. Intrinsic myocardial function in hemorrhagic shock[J]. *Shock*, 1999, 11: 205 - 210.
- 8 Meng X, Ao L, Song Y, et al. Signaling for myocardial depression in hemorrhagic shock: roles of Toll-like receptor 4 and p55 TNF- α receptor [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 288: R600 - 606.
- 9 Raeburn C D, Calkins C M, Zimmerman M A, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 expression is obligatory for endotoxin-induced myocardial neutrophil accumulation and contractile dysfunction[J]. *Surgery*, 2001, 130: 319 - 325.
- 10 Kien N D, Reitan J A, White D A, et al. Cardiac contractility and blood flow distribution following resuscitation with 7.5% hypertonic saline in anesthetized dogs[J]. *Circ Shock*, 1991, 35: 109 - 116.
- 11 Nemoto S, Vallejo J G, Knuefermann P, et al. Escherichia coli LPS-induced LV dysfunction: role of Toll-like receptor - 4 in the adult heart[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 282: H2316 - 2323.
- 12 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.
- 13 Matsumura T, Ito A, Takii T, et al. Endotoxin and cytokine regulation of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 gene expression in murine liver and hepatocytes [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2000, 20: 915 - 921.
- 14 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.
- 15 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.
- 16 Ozinsky A, Underhill D M, Fontenot J D, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97: 13766 - 13771.

(收稿日期:2006-02-02 修回日期:2006-07-28)

(本文编辑:李银平)