

内毒素血症小鼠骨骼 Toll 样受体 4 基因的变化

赵子瑜 杨京 苏楠 雷子贤 陈锚锚 金旻 李福兵 谢杨丽 陈林

【摘要】 目的 通过检测内毒素血症模型动物骨骼相关基因表达变化,进一步明确内毒素对机体的损害机制,为下一步研究骨骼变化对脏器产生何种影响奠定基础。方法 腹腔注射内毒素脂多糖(LPS)制作内毒素血症小鼠模型。将 48 只小鼠随机分为正常组和 LPS 处理 4、6、8、12、24、48 和 72 h 组,每组 6 只。采尾血计数全血白细胞;取眼眶血检测肝、肾功能;用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测骨骼中 TLR4 mRNA 表达;苏木素-伊红(HE)染色,镜下观察骨骼病理学变化。结果 与正常组比较,LPS 4 h 组白细胞计数显著下降($P < 0.01$),之后逐渐升高,于 72 h 时显著高于正常组($P < 0.05$);LPS 4 h 和 6 h 组丙氨酸转氨酶(ALT)水平显著升高($P < 0.05$),于 8 h 降至正常水平($P > 0.05$);LPS 6 h 组血尿素氮(BUN)水平逐渐升高($P < 0.05$),于 8 h 达峰值($P < 0.05$),然后下降,12 h 趋于正常($P > 0.05$);LPS 6 h 组 TLR4 mRNA 表达增加($P < 0.01$),24 h 达峰值($P < 0.01$),然后逐渐下降,72 h 仍处在较高水平($P < 0.05$)。LPS 作用于骨骼后,HE 染色显示骨骼无明显改变。结论 内毒素血症中骨骼 TLR4 mRNA 表达量显著增加。

【关键词】 内毒素; 脂多糖; 骨骼; Toll 样受体 4

The change in Toll-like receptor 4 gene expression in skeleton of endotoxemia mice ZHAO Zi-yu, YANG Jing, SU Nan, LEI Zi-xian, CHEN Mao-mao, JIN Min, LI Fu-bing, XIE Yang-li, CHEN Lin. State Key Laboratory of Trauma, Burns, and Combined Injury, Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China
Corresponding author: CHEN Lin, Email: linchen70@163.com

【Abstract】 Objective To explore the changes in gene expression of bone in endotoxemia in mice. Methods Lipopolysaccharide (LPS) was injected intraperitoneally to reproduce an endotoxemia model in mice. Forty-eight mice were randomly divided into eight groups: normal group, 4, 6, 8, 12, 24, 48 and 72 hours after LPS injection groups, with 6 mice in each group. To evaluate endotoxemia whole blood was collected for leukocytic count, eye sockets blood was obtained for liver and renal functions tests. mRNA expression level of Toll-like receptor 4 (TLR4) in bone was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. The pathological changes of bone and tissue slides were prepared with hematoxylin and eosin (HE) staining for observing under microscope. Results Compared with normal group, leukocyte count of 4-hour LPS-treated group was significantly decreased ($P < 0.01$). However, after 4 hours, leukocyte count became higher gradually and remained at high level at 72 hours compared with that of normal group ($P < 0.05$). Compared with normal group, alanine aminotransferase (ALT) level reached to a high level in LPS-treated groups at 4 hours and 6 hours (both $P < 0.05$), and then decreased gradually showing a tendency to return to normal level after 8 hours ($P > 0.05$). Blood urea nitrogen (BUN) was increased at 6 hours ($P < 0.05$), reaching to the highest level at 8 hours ($P < 0.05$) and tended to become normal level after 12 hours ($P > 0.05$). Six hours after LPS treatment, the expression of TLR4 mRNA was enhanced ($P < 0.01$) and reached the peak at 24 hours ($P < 0.01$), and it remained at a high level at 72 hours ($P < 0.05$). However, there were no significant pathological changes in bone structure after LPS treatment. Conclusion Expression level of TLR4 mRNA in bone is significantly increased in endotoxemia mice.

【Key words】 endotoxin; lipopolysaccharide; skeleton; Toll-like receptor 4

通常认为骨骼是一个坚硬的、静止不变的负重器官。其实骨骼系统一直处于骨基质分泌和吸收的动态平衡中,同时骨细胞与免疫祖细胞、干细胞间有非常复杂的相互调节作用^[1]。多数器官的损害及修复均涉及免疫细胞和干细胞,提示骨骼在全身内环

境的稳定中有重要作用。Toll 样受体(TLRs)是脂多糖(LPS)靶细胞膜上的一种跨膜受体,主要介导 LPS 信号的跨膜转导^[2],是病原微生物跨膜信号转导的重要受体,主要参与机体抗感染的先天免疫,尤其是 TLR4 的作用尤为显著。有研究显示,在肠黏膜或肺部炎症情况下 TLR4 启动胞内信号转导,激活核转录因子- κ B(NF- κ B),导致肠黏膜细胞或肺内巨噬细胞产生免疫炎症细胞因子,扩大非特异性防御反应或诱发特异性免疫反应^[3-4]。TLR4 在成骨细胞及破骨细胞中均有表达^[5-6],骨 TLR4 表达水平的

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.01.004

基金项目:军队“十一五”攻关课题(06G081)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所全军创伤中心,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通信作者:陈林,Email:linchen70@163.com

变化可以直接影响骨骼,进而影响全身重要部位组织内皮功能。本研究中以内毒素血症小鼠为模型,探讨骨骼中 TLR4 基因表达的改变与内毒素血症的关系,进一步从骨髓动员角度来研究内毒素血症的致病机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备及分组:雄性 C57 小鼠 48 只,体重 18~24 g(由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供)。腹腔注射 LPS(E. coli O111:B4,美国 Sigma 公司)15 mg/kg 制备内毒素血症小鼠模型^[7],按随机数字表法分为 8 组,正常组, LPS 处理 4、6、8、12、24、48 和 72 h 组,每组 6 只。每组取 3 只小鼠,采血,检测全血白细胞计数、肝、肾功能并观察脏器损伤程度,以评价炎症程度。余 3 只小鼠取胫骨以检测 TLR4 mRNA 表达;并观察骨骼病理学变化。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 白细胞计数:LPS 注射前后经鼠尾采血 20 μl 加入 380 μl 白细胞稀释液中,充分混匀后取 10 μl 滴入细胞计数池,显微镜下计数白细胞。

1.2.2 肝、肾功能检测:取小鼠眼眶血约 0.5 ml,室温放置后离心取血清,用全自动生化分析仪检测尿素氮(BUN)、丙氨酸转氨酶(ALT)的变化。

1.2.3 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 TLR4 mRNA 表达:用 TRIzol 法提取骨骼总 RNA,紫外分光光度仪测定波长 260 nm 和 280 nm 处的吸光度(A)值,按 A_{260}/A_{280} 判定总 RNA 纯度。以 1 μg 总 RNA 反转录(PrimeScript™ Reverse Transcriptase,日本 TaKaRa 公司)后取 1 μl cDNA 进行 PCR。反应体系为 25 μl,以环孢素 A 结合蛋白(cyclophilinA)为内参对照,引物序列为上游引物:5'-CGA GCT CTG AGC ACT GGA GA -3',下游引物:5'- TGG CGT GTA AAG TCA CCA CC-3'; TLR4 引物序列为上游引物:5'-AAGGCATGG CATGGCTTACAC-3',下游引物:5'-GGCCAATT TTGTCTCCACAGC-3'。操作参照 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司)说明,经过 94 °C 30 s 变性、58 °C 30 s 复性、72 °C 1 min 延伸,共 30 个循环然后取 PCR 产物 25 μl,经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳后进行图像分析,结果以灰度值比值(以野生型小鼠的 TLR4 灰度值/cyclophilinA 灰度值为 1)作为该基因在骨骼中表达指数。

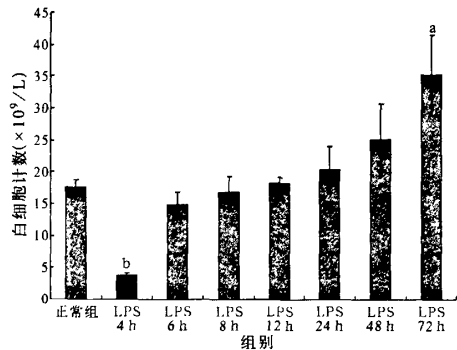
1.2.4 骨骼病理学观察:取下肢骨骼,用多聚甲醛水溶液固定,乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙,用磷酸盐

缓冲液(PBS)浸泡过夜。梯度乙醇脱水处理、二甲苯透明、石蜡包埋、切片,常规苏木素-伊红(HE)染色,显微镜下观察结果。

1.3 统计学处理:数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 软件进行方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

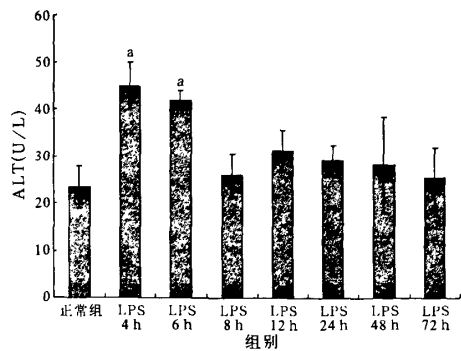
2.1 内毒素血症小鼠白细胞计数的变化(图 1):与正常组比较,LPS 注射后 4 h 白细胞计数明显减少($P < 0.01$),于 6 h 后恢复($P > 0.05$),并逐渐上升,至 72 h 处在较高水平,与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注:与正常组比较,* $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

图 1 各组小鼠血白细胞计数的比较

2.2 内毒素血症小鼠血 ALT 的变化(图 2):与正常组比较,LPS 注射后 4 h ALT 升高($P < 0.05$),6 h 仍在较高水平($P < 0.05$),于 8 h 恢复正常水平($P > 0.05$)。

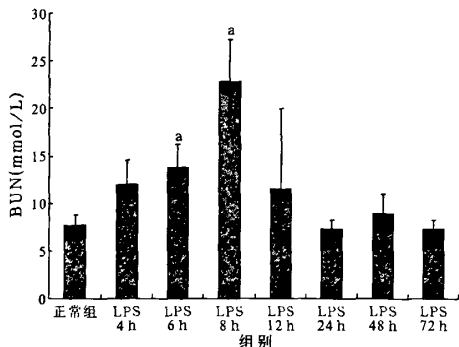


注:与正常组比较,* $P < 0.05$

图 2 各组小鼠血 ALT 的比较

2.3 内毒素血症小鼠血 BUN 的变化(图 3):LPS 注射后 6 h 血 BUN 水平逐渐升高($P < 0.05$),于 8 h 达峰值($P < 0.05$),然后下降,于 12 h 趋于正常

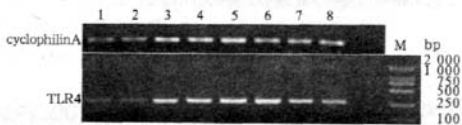
水平($P > 0.05$)。



注:与正常组比较,* $P < 0.05$

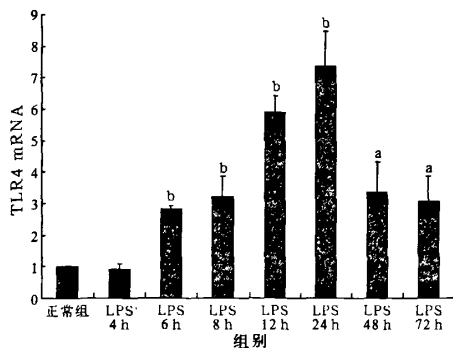
图 3 各组小鼠血 BUN 的比较

2.4 内毒素血症小鼠骨骼 TLR4 mRNA 表达变化(图 4~5):与正常组比较,骨骼 TLR4 mRNA 在 LPS 注射后 6 h 明显升高($P < 0.01$),至 24 h 达峰值($P < 0.01$),然后逐渐下降,72 h 仍处在较高水平($P < 0.05$)。



1:正常组;2~8:LPS 处理 4、6、8、12、24、48、72 h 组;M:Marker

图 4 RT-PCR 检测各组小鼠骨骼 TLR4 mRNA 表达



注:与正常组比较,* $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

图 5 各组小鼠骨骼 TLR4 mRNA 表达比较

2.5 内毒素血症小鼠骨骼的病理学变化(彩色插图 6):与正常组比较,经 LPS 处理后 HE 染色显示骨骼无明显改变,说明内毒素血症小鼠骨骼在短期内没有明显的变化。

3 讨论

骨骼系统与免疫系统在空间上关系密切,骨骼内的骨髓是体内多种干细胞及免疫细胞等的重要来

源。炎症反应时成骨细胞在多种炎症因子的刺激下产生白细胞介素-6(IL-6),同时表达肿瘤坏死因子相关激活诱导因子(TRANCE)和 γ -干扰素(INF- γ) 激活 T 细胞,从而表现出与巨噬细胞相似的表型,参与免疫反应^[8]。成骨细胞和破骨细胞在炎症情况下均可以表达高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)。HMGB1 是一种有效的免疫调节细胞因子,可以调节树突细胞和 T 细胞产生免疫应答^[9]。另外骨骼还通过骨保护素/NF- κ B 受体活化因子配基/NF- κ B 受体活化因子(OPG/RANKL/RANK)系统^[10]与免疫系统相互调节,并且在干细胞分化、动员入血中起重要作用,提示骨骼在全身内环境的稳定中有重要作用。因此,在内毒素血症情况下骨骼的变化可能对机体的预后和转归有重要作用。本研究显示,内毒素能上调骨骼组织中 TLR4 基因表达,且呈时间依赖性。目前认为,LPS 进入血液后与内毒素结合蛋白(LBP)、可溶性 CD14(sCD14)结合并形成由三者构成的复合物,复合物中的 LPS 再传递给膜结合型 CD14(mCD14),由 mCD14 把 LPS 传递给 TLR4,在髓样分化蛋白-2 的协助下,LPS 激活 TLR4 并触发信号转导。TLR4 通过 MyD88 依赖性和非依赖性两条途径启动的胞内信号转导^[11],经过 MyD88 依赖性途径最终激活 NF- κ B 和 c-Jun,而 NF- κ B 和 c-Jun 是诱导单核/巨噬细胞产生炎症细胞因子、共刺激分子 B7 及黏附分子的重要转录因子,从而参与机体的炎症反应。

LPS 可以通过 TLR 诱导实验小鼠成骨细胞表达 RANKL,TLR4 在其中起到了关键的作用^[5]。而 RANKL 可刺激破骨细胞的功能增强、增殖、分化。同时,TLR4 表达的增加也可以直接激活已经成熟的破骨细胞,使破骨细胞功能增强^[12],促进破骨细胞分泌蛋白水解酶[如组织蛋白酶 K、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)等],降解骨骼成分,并使成骨细胞表面的细胞衍生因子 1(SDF-1)、骨桥蛋白(OPN)、干细胞因子(SCF)减少,这些因子与干细胞动员有密切的联系,使周围的细胞外基质与干细胞的结合减弱,从而促进成熟和未成熟的造血干细胞动员入循环系统^[13],参与机体炎症反应及修复,对机体的预后产生重要影响。

在本实验中,注射 LPS 后小鼠白细胞先明显减少然后逐渐升高,肝、肾功能均有损伤。在内毒素作用下骨骼 TLR4 mRNA 表达明显增强,这对于机体来说是一把双刃剑,一方面说明骨骼细胞也可能是 LPS 的靶细胞,导致骨骼细胞炎症因子的释放增

加,同时破骨细胞的激活也会使骨髓内的干细胞动员入循环,参加机体的防御反应和器官修复;另一方面直接激活破骨细胞和促进成骨细胞分泌、释放 RANKL,间接导致破骨细胞功能增强,虽然短期内对骨骼的影响不明显,但长期破骨细胞功能增强会导致骨骼损伤。因此,内毒素血症时 TLR4 表达量的增加会对骨骼产生影响,而骨骼的变化也可能对内毒素血症机体预后及转归产生重要影响,这值得我们进一步深入研究。

参考文献

[1] Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(4): 292-304.

[2] Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 2000, 406 (6797): 782-787.

[3] 王有虎, 哈小琴, 张诚. Toll 样受体 4 介导的信号转导与肠黏膜损伤. *中国危重病急救医学*, 2007, 19(8): 510-512.

[4] 张伟, 蒋耀光, 谢志坚. 急性肺损伤肺间质巨噬细胞 TLR4 的表达及意义. *中国危重病急救医学*, 2004, 16(10): 622-625.

[5] Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, et al. Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J Immunol*, 2001, 166(5): 3574-3579.

[6] Itoh K, Udagawa N, Kobayashi K, et al. Lipopolysaccharide promotes the survival of osteoclasts via Toll-like receptor 4, but cytokine production of osteoclasts in response to lipopolysaccharide is different from that of macrophages. *J Immunol*, 2003, 170(7): 3688-3695.

[7] Lotter K, Höcherl K, Bucher M, et al. In vivo efficacy of telithromycin on cytokine and nitric oxide formation in lipopolysaccharide-induced acute systemic inflammation in mice. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 58(3): 615-621.

[8] Maruyama K, Sano G, Matsuo K, et al. Murine osteoblasts respond to LPS and IFN-gamma similarly to macrophages. *J Bone Miner Metab*, 2006, 24(6): 454-460.

[9] Charoonpatrong K, Shah R, Robling AG, et al. HMGB1 expression and release by bone cells. *J Cell Physiol*, 2006, 207(2): 480-490.

[10] Walsh MC, Kim N, Kadono Y, et al. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol*, 2006, 24: 33-63.

[11] 李志杰, 刘靖华, 姜勇. Toll 样受体的发现及其研究进展. *中国危重病急救医学*, 2003, 15(11): 694-697.

[12] Bar-Shavit Z. Taking a toll on the bones: regulation of bone metabolism by innate immune regulators. *Autoimmunity*, 2008, 41(3): 195-203.

[13] Kollet O, Dar A, Shvitiel S, et al. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med*, 2006, 12(6): 657-664.

(收稿日期: 2008-09-12 修回日期: 2008-10-23)
(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

多黏菌素 B 血液纤维灌流对感染性休克患者尿肝型脂肪酸结合蛋白的影响

最近日本科学家研究了多黏菌素 B 固化纤维血液净化治疗(PMX-F)对感染性休克或严重脓毒症患者尿肝型脂肪酸结合蛋白(L-FABP)水平的影响。研究纳入 50 例感染性休克患者(40 例采用 PMX-F 治疗 2 次, 10 例仅采用常规治疗)、20 例严重脓毒症未发生休克患者、20 例急性肾功能衰竭(ARF)患者(平均血清肌酐为 247.52 μmol/L)、30 例健康志愿者。感染性休克或严重脓毒症的诊断采用美国胸科医师协会/危重病医学会制定的标准;感染性休克有明确传染源和(或)血培养阳性患者被纳入研究范围,心源性休克、失血性休克患者予以排除。采用酶联免疫吸附法测定尿及血清中 L-FABP 水平。结果显示,感染性休克组血浆内毒素水平高于严重脓毒症组($P < 0.05$)、ARF 组($P < 0.001$)、健康对照组($P < 0.001$);感染性休克组尿 L-FABP 水平高于严重脓毒症($P < 0.001$)、ARF 组($P < 0.001$)、健康对照组($P < 0.001$),但各组血清 L-FABP 水平没有差异;尿 L-FABP 水平与血 L-FABP 水平不相关。40 例感染性休克患者中 12 例死亡, 28 例存活。PMX-F 治疗能降低血清内毒素及尿 L-FABP 水平(P 均 < 0.01)。10 例感染性休克常规治疗者 7 d 后尿 L-FABP 水平仍然很高($P = 0.12$)。研究者认为,感染性休克患者尿 L-FABP 水平升高, PMX-F 治疗可以有效降低尿 L-FABP 水平。

白慧颖, 编译自《Shock》, 2008-10-06(电子版); 胡森, 审校

严重脓毒症中诱导 bim 和 bid 基因表达可加速凋亡过程

已有研究报道,在转基因动物脓毒症模型中 Bcl-2 蛋白家族成员能调节淋巴细胞凋亡,并决定脓毒症动物的存活率。最近德国科研人员进行了早期严重脓症患者促凋亡和抗凋亡的 Bcl-2 蛋白家族成员基因表达的调节研究。共纳入 16 例严重脓症患者,并以 10 例重症非脓症患者和 11 例健康志愿者作为对照。为证实凋亡加速的存在,采用流式细胞仪检测 CD4⁺、CD8⁺、CD19⁺ 淋巴细胞亚群中天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)的活化,用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)定量检测全血中特定 Bcl-2 家族成员的 mRNA 表达。结果显示,脓症患者所有淋巴细胞群 caspase-3 活化增强,磷脂酰丝氨酸活化程度增加,而淋巴细胞计数相应减少。严重脓症患者 CD4⁺T 细胞和 B 细胞中 Bcl-2 蛋白明显减少。严重脓症患者 BH3 bim 基因表达较重症非脓症患者显著上调,较健康志愿者上调 51.6 倍; Bid 基因表达较重症非脓症患者高 12.9 倍;作为线粒体凋亡诱导物的 bak 表达上调 5.6 倍;而 bax 表达没有显著差异。严重脓症患者中抗凋亡成员 bcl-2 和 bcl-xL 均显著下调。因此研究者认为,严重脓症早期外周血细胞及促凋亡 Bcl-2 家族成员 bim、bid 和 bak 上调,抗凋亡 bcl-2 和 bcl-xL 蛋白下调,从而导致脓毒症时细胞对凋亡的高度敏感性并发生复杂的免疫功能障碍。

李响, 周国勇, 编译自《Crit Care》, 2008-10-16(电子版); 胡森, 审校

核转录因子- κ B对过氧化物酶增殖体激活受体 γ 调控作用的体外研究

(正文见3页)

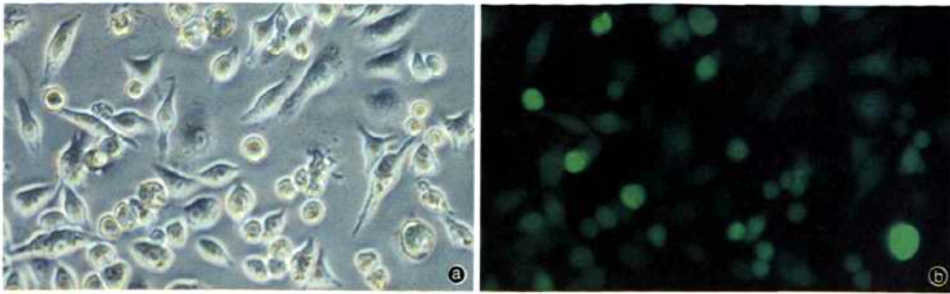


图4 光镜下(a)小鼠Ana-1细胞多呈圆形,部分贴壁伸展呈梭形;荧光显微镜下(b)所转染的小鼠Ana-1细胞呈绿色荧光 $\times 100$

内毒素血症小鼠骨骼 Toll 样受体 4 基因的变化

(正文见13页)

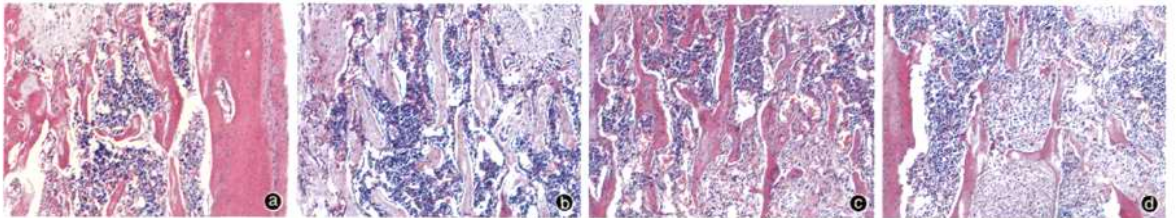


图6 光镜下正常组(a)小鼠骨骼正常,与正常组比较,LPS处理24、48、72 h组(b-d)小鼠骨骼均无明显变化 HE $\times 100$

多器官功能障碍综合征小鼠脾脏高迁移率族蛋白B1

及免疫细胞功能变化的研究

(正文见25页)

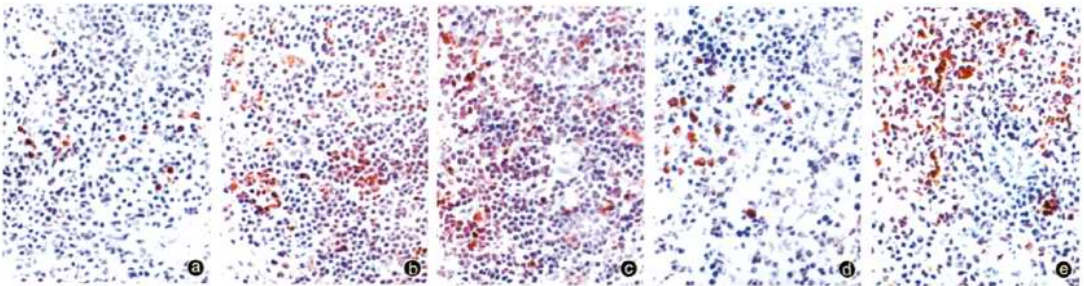


图4 TUNEL染色阳性细胞呈深棕色,正常对照组(a)小鼠脾脏白髓和红髓可见少量单个散在分布的阳性细胞;伤后12 h(b)可见散在分布的小片状阳性细胞;伤后24 h(c)阳性细胞较正常对照组明显增多,呈大片状或巢状分布;伤后5 d(d)阳性细胞明显减少,略多于正常对照组;伤后10~12 d(e)阳性细胞再次增加,大量阳性细胞呈片状分布 TUNEL $\times 400$

脓毒症早期大鼠肾上腺皮质功能变化及地塞米松的干预作用

(正文见40页)

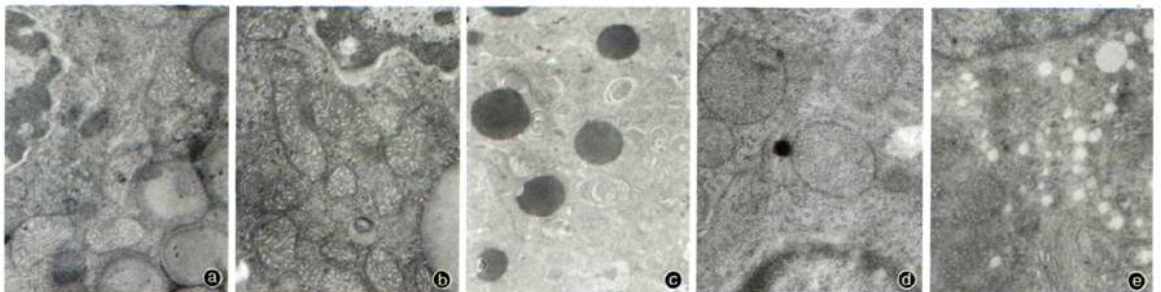


图2 正常对照组(a)、假手术组(b)大鼠肾上腺皮质束状带超微结构正常,模型组(c)、激素预处理组(d)和激素治疗组(e)大鼠肾上腺皮质束状带细胞均出现脂质耗减、髓鞘样小体以及管泡状嵴的线粒体嵴和膜部分或全部溶解消失,其中以模型组为重 铀-铅双染 a、b、d、e均 $\times 20\ 000$ c $\times 6\ 000$