

脂多糖刺激前后小鼠肺肝脾组织中 Toll 样等受体基因表达情况

万幸 王培训 周联 向群

【摘要】目的 了解脂多糖(LPS)对肺、肝、脾组织中与 LPS 信号转导有关的受体的基因表达情况的影响。**方法** LPS 刺激前后取小鼠肺、肝、脾组织总 RNA,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)半定量测定脂多糖结合蛋白(LBP)、CD₁₄、Toll 样受体 2(TLR2)、TLR4 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等基因的表达情况。**结果** 正常组织中,肺有 TLR2 的表达,肝有 TLR2、CD₁₄、LBP 的表达,脾有 TLR2 的表达;注射 LPS 后的 5 h 内,肺组织 TLR2、TLR4、CD₁₄和 TNF- α ,肝组织 TLR2、CD₁₄、LBP 和 TNF- α ,脾组织 TLR2、TLR4、CD₁₄和 TNF- α 的基因表达均呈逐渐增加趋势。**结论** 正常情况下 TLR2 等基因在不同组织中的表达有差异,LPS 刺激 5 h 内各基因的表达提高,从而提高机体对 LPS 等病原体模式识别分子的反应性。

【关键词】 脂多糖; Toll 样受体; CD₁₄; 脂多糖结合蛋白; 肿瘤坏死因子- α ; 基因表达,小鼠
中图分类号: Q786;R363.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-0603(2004)02-0073-05

Gene expression of Toll-like receptors in the liver, lungs and spleen in mice after endotoxin challenge

WAN Xing*, WANG Pei-xun, ZHOU Lian, XIANG Qun. * Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong, China

【Abstract】Objective To investigate the gene expression of some lipopolysaccharide(LPS) receptors after LPS stimulation. **Methods** The total RNA from normal and LPS-challenged mice was extracted by Trizol reagent and the gene expression of Toll-like receptor 2(TLR2), TLR4, CD₁₄, LPS-binding protein (LBP) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were measured by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results** The gene of TLR2 was expressed in normal lungs and spleen tissues, and TLR2, CD₁₄, LBP in liver. After challenged by LPS, the expressions of TLR2, TLR4, and TNF- α in lungs, TLR2, CD₁₄, LBP and TNF- α in liver, TLR2, TLR4, CD₁₄, and TNF- α in spleen were increased at 1, 3, and 5 hours. **Conclusion** LPS might alert the ability against pathogen-associated molecules by inducing or enhancing the expression of genes that involved in the LPS signal transduction.

【Key words】 lipopolysaccharide; Toll-like receptor; CD₁₄; lipopolysaccharide-binding protein; tumor necrosis factor- α ; gene expression; mice

CLC number: Q786;R363.22 **Document code:** A **Article ID:** 1003-0603(2004)02-0073-05

脂多糖(LPS)信号的转导在全身炎症反应综合征(SIRS)的病理过程中起重要作用,其间涉及的有关受体的表达情况在一定程度上决定了 SIRS 的发生和发展转归^[1]。因此,了解 LPS 刺激对这些基因表达情况的影响,对于正确理解 SIRS 的进程有非常重要的意义^[2]。本实验中研究分析 LPS 刺激前后小鼠肺、肝、脾等组织中与 LPS 信号转导有关的受体脂多糖结合蛋白(LPS-binding protein, LBP)、CD₁₄、Toll 样受体 2(TLR2)、TLR4 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等的基因表达情况。

1 材料与方法

1.1 实验动物:SPF 级 NIH 小鼠,雄性,2 周龄,体

质量 18~20 g,由本校实验动物中心提供。

1.2 实验材料:脂多糖(LPS, E. coli. O111:B4, Sigma 产品),分装配成 0.5 mg/ml。小鼠称重后,按 5 mg/kg 尾静脉注射 LPS。分别于注射后的 1、3 和 5 h 处死小鼠,取肝、肺、脾组织。

1.3 试剂:Trizol 试剂,Invitrogen, Life Technologies, Cat. No. 15596-026, Lot. No. 1106263。逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒, TaKaRa RNA PCR kit(AMV), Ver. 2.1, lot BK2201, 宝生物工程(Takara)产品。焦碳酸二乙酯(DEPC),上海生工生物工程服务有限公司进口分装。DNAMarker SD004 为北京鼎国生物技术发展中心产品,可标示 100、300、500、700、900、1 200 bp。氯仿、无水乙醇、异丙醇为国产 AR 试剂。

1.4 实验用引物:根据文献确定实验用引物核酸顺序(见表 1),引物委托上海生工生物工程服务有限

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271651)

作者单位:510405,广州中医药大学

作者简介:万幸(1964-),男(汉族),河南省人,医学博士,副教授,主要从事中西医结合基础与中药免疫药理方面的研究。

公司合成。按引物标签提供的吸光度 A 值,用 DEPC 水配成 20 pmol/μl,分装,-30℃备用。

表 1 实验用各目标基因引物序列

Tab. 1 Sequences of primers for target genes

名称	产物长度	序列	参考文献
TLR2	508 bp	5'-CCT GTT GAT CTT GCT CGT AGG TGC C(2 113-2 137) 3'-GAT GGA CCT CAC CGG GAA CCT ACT T(2 596-2 620)	[3]
TLR4	410 bp	5'-TGA CAC CCT CCA TAG ACT TC(1 563-1 582) 3'-ACA TCG TAA AGA CTA TAT GG(1 072-1 091)	[3]
CD14	413 bp	5'-GGA AGC CAG AGA ACA CCA TCG(644) 5'-GCA GGG CTC CGA ATA GAA TCC(1 130)	[4]
LBP	1 100 bp	5'-GGC TCT GCA GAG AGA GCT GTA CAA-3' 5'-TAG TTA AGG AAT GCC TGG AAC AGG-3'	[5]
TNF-α	254 bp	5'-GAT CTC AAA GAC AAC CAA CTA GTG(1 555-1 578) 5'-CTC CAG CTG GAA GAC TCC TCC CAG(1 786-1 809)	[6]
GAPDH	1 035 bp	5'-TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC(57-76) 3'-CGT TCC TGT GAC TCG TTC TC(1 072-1 091)	[3]

1.5 仪器:Beckman CS-15R 型台式高速低温离心机;PCR 基因扩增仪(美国 PE 公司的 GeneAmp PCR system 2400);Pharmacia 4000 型微量紫外分光光度计;电泳仪为 LKB 电泳系统;北京东方仪器厂 DF-II 型电泳系统;UVP 凝胶成像分析系统;组织匀浆器、实验用离心管、吸头等用含体积分数为 0.1% 的 DEPC 纯水浸泡过夜,高压蒸气灭菌。

1.6 实验方法:提取组织总 RNA:小鼠眼球放血后,迅速拉颈处死,投入冷的含体积分数为 75% 的乙醇的烧杯中消毒,无菌条件下剪开胸腹腔,剪取肝、肺、脾脏组织。称取组织块 80 mg 左右(50~100 mg),迅速放入在冰水中预冷的匀浆器中,加入 Trizol 试剂 1 ml,充分研磨匀浆。以下步骤按照 Trizol 试剂要求进行。

1.6.1 RT-PCR:严格按试剂盒操作说明进行操作,cDNA 合成的引物选用 Random 9mers。反转录反应条件是:30℃,10 min→55℃,30 min→99℃,5 min→5℃,5 min。PCR 反应条件为:94℃、2 min 预变性,94℃、30 s 变性,60℃、30 s 退火,72℃、90 s 延伸,4℃下循环 30 次,结束。反应结束后,扩增产物-30℃冷冻保存,备以后分析使用。

1.6.2 电泳及凝胶分析:常规配制电泳缓冲液和 1.5 g/ml 的琼脂糖凝胶。取 10 μl RT-PCR 产物加样,5 V/cm 电泳约 2 h。溴乙锭染色,UVP 凝胶成像仪拍照,使用 UVP 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,测定各个目标基因产物的条带的平均吸光度(Ave A),与同时测定的内对照物三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的条带吸光度比较,以其比值表示目标基因 mRNA 的量,分析各目标基因的表达情况。

2 结果

肺、肝、脾组织中各基因表达情况见表 2。

表 2 肺、肝、脾组织中各基因表达情况

Tab. 2 Comparisons of target gene expressions in the tissues of lung, liver and spleen

基因	泳道	时间 (h)	平均 A 值			与 GAPDH 比较		
			肺	肝	脾	肺	肝	脾
TLR2	1	0	116.54	122.66	100.38	0.87	0.73	1.20
	2	1	138.35	127.48	130.41	0.99	0.84	1.30
	3	3	156.68	147.04	137.79	1.16	0.99	1.35
	4	5	143.36	163.35	137.29	1.06	1.18	1.57
TLR4	5	0						
	6	1	154.32		160.41	1.10		1.51
	7	3	164.88		150.74	1.22		1.48
	8	5	166.28		171.73	1.24		1.96
CD14	9	0		179.61			1.06	
	10	1	174.46	167.37	166.56	1.25	1.99	1.56
	11	3	166.50	177.58	163.12	1.23	1.20	1.59
	12	5	182.61	175.77	153.11	1.35	1.26	1.75
LBP	13	0		143.70			0.85	
	14	1		147.85			0.97	
	15	3		145.83			0.98	
	16	5		152.62			0.91	
TNF-α	17	0	0					
	18	1	145.44	171.52	155.08	1.04	1.13	1.46
	19	3	175.82	175.74	138.21	1.30	1.18	1.36
	20	5	179.63	170.09	142.79	1.33	1.23	1.63
GAPDH	21	0	133.91	168.75	120.00			
	22	1	140.10	152.35	106.54			
	23	3	135.30	148.39	102.00			
	24	5	134.56	138.56	87.52			

2.1 目标基因在肺组织的表达情况:各基因在正常肺组织中的表达及注射 LPS 后 1、3 和 5 h 的表达情况见凝胶电泳图像(插页,图 1a)。凝胶电泳分析显示,在正常肺组织中只有少量 TLR2 表达;注射 LPS 后可诱导 TLR4、CD14 和 TNF-α 的表达。肺组织中,TLR2、TLR4、CD14 和 TNF-α 在注射 LPS 后的 1、3 和 5 h 内基本呈逐渐增加的趋势。

2.2 目标基因在肝组织的表达情况:各基因在正常肝组织中的表达及注射 LPS 后 1、3 和 5 h 的表达情况见凝胶电泳图像(插页,图 1b)。凝胶电泳分析结果显示,在正常肝组织中有 TLR2、CD14 和 LBP 的表达;注射 LPS 后可诱导 TNF-α 的表达;正常肝组织、经 LPS 作用前后肝组织均无 TLR4 的表达。肝组织中,TLR2、CD14、LBP 和 TNF-α 在注射 LPS 后的 1、3 和 5 h 内呈逐渐增加的趋势。

2.3 目标基因在脾组织的表达情况(插页,图 1c):凝胶电泳分析结果显示,在正常脾组织中只有少量 TLR2 表达;注射 LPS 后可诱导 TLR4、CD14 和 TNF-α 的表达;脾组织中始终没有观察到 CD14 的

表达。脾组织中,TLR2、TLR4、CD₁₄和TNF- α 在注射LPS后的1、3和5h内呈逐渐增加的趋势。

3 讨论

内毒素是革兰阴性细菌细胞壁的重要成分,多在细菌裂解后释放,其主要化学成分为LPS,类脂A和 α -酮基-3脱氧辛酸是LPS的毒性部分,尤其类脂A是LPS的关键毒性部位。LPS进入血液循环后首先与血液中的LBP结合,LPS通过分子中类脂A与LBP相结合,形成LPS-LBP复合物,再结合到靶细胞的CD₁₄上,然后再与细胞膜上的TLR4相结合从而激活细胞。其中,LBP/CD₁₄是体内增敏细胞效应的重要系统,是机体识别和调控内毒素作用的关键机制之一^[7,8]。LPS的信号主要通过TLR4实现跨膜转导。TLRs分子作为重要的模式识别受体(pattern recognition receptor,PRRs),对多种病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns,PAMPs)进行识别^[9-11],其它类型的TLRs如TLR2主要识别革兰阳性菌、肽聚糖、磷壁酸、酵母多糖、分支杆菌、卡介苗细胞壁、脂阿拉伯甘露糖、螺旋体等,TLR3识别病毒双股RNA(聚肌胞)等,TLR5识别有鞭毛的细菌、鞭毛蛋白,TLR9识别细菌DNA、CpG DNA等^[12,13]。

TLRs的信号转导的胞内过程涉及多种信号蛋白质的激活,由于TLRs胞内区域与白细胞介素-1受体(IL-1R)的胞内区域同源性较高,并且有特征性的Toll/IL-1受体同源区(TIR),所以它们的信号传递链基本相同,胞内信号转导的基本途径是MyD88 $\rightarrow$ IRAK $\rightarrow$ TRAF6 $\rightarrow$ NIK $\rightarrow$ IKK,使得核因子- κ B(NF- κ B)复合物中的抑制成分I- κ B磷酸化,从复合物上脱离,释放NF- κ B迁移至核内,在核内诱导特异基因的表达。

不同实验动物对内毒素的敏感性差别较大,本实验中使用的NIH小鼠对内毒素具有较强的耐受性。根据文献报道,建立SIRS模型所使用的内毒素的种类和剂量也存在较大差别^[14,15]。李琦等^[16]使用大鼠尾静脉注射LPS致伤,不同致伤剂量的LPS(E.coli.O111:B4,Sigma;2、4、6和8mg/kg)可以导致大鼠SIRS-肺损伤发生,随着LPS剂量的增加(>6mg/kg),可以导致SIRS失控,发生急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。本研究在复制LPS诱导的SIRS模型时,采用5mg/kg剂量LPS尾静脉注射,可以诱导SIRS。

本实验中观察的肺、肝、脾组织是机体的主要单核-吞噬细胞系统,在对LPS等病原性分子的识别

和反应中起非常重要的作用。参考国内外文献,本实验中设计合成了6对引物,其中LBP、CD₁₄、TLR2、TLR4、TNF- α 等5个目标基因,基本能够反映机体对LPS的识别、结合、信号转导及产生炎症细胞因子的主要环节。结果显示,TLR2等基因在正常小鼠的肺、肝、脾组织中均有表达,但不同组织中的表达情况有差异,表明这些分子的细胞及组织分布有特异性,与相关报道基本一致^[17-19]。经LPS刺激后原有相关基因的表达增强,并诱导其它基因的表达,各基因的表达基本随时间呈现逐渐增加的趋势。因为本实验中观察的几个目标基因中,LBP、CD₁₄、TLR2、TLR4等均属于模式识别受体,可以认为,LPS刺激早期可以增强机体对病原体相关模式分子的识别能力,增强机体的非特异性免疫能力,这对于及时清楚了解病原体具有重要意义。但这种刺激信号的持续增强势必增加炎症因子和介质的产生增加,使得促炎细胞因子和炎症抑制细胞因子之间的平衡破坏,导致SIRS和多器官功能障碍综合征(MODS)的发生。其他研究者也有类似结果^[20,21]。进一步研究这些基因的表达情况对于深入阐明SIRS的病理过程以及寻找SIRS/MODS新的药物作用靶点具有重要意义。

参考文献:

- 1 Sherwood R. Current concepts of the inflammatory response[J]. ASA Refr Courses Anesthesiol, 2002, 30(1): 169-184.
- 2 Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis[J]. Nature, 2002, 420(6917): 885-891.
- 3 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(10): 915-921.
- 4 Yamamoto M, Yoshizaki K, Kishimoto T, et al. IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis[J]. J Immunol, 2000, 164(9): 4878-4882.
- 5 Wurfel M M, Monks B G, Ingalls R R, et al. Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein gene leads to profound suppression of LPS responses ex vivo, whereas in vivo responses remain intact[J]. J Exp Med, 1997, 186(12): 2051-2056.
- 6 Gazzinelli R T, Eltoum I, Wynn T A, et al. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF- α and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation[J]. J Immunol, 1993, 151(7): 3672-3681.
- 7 王颖, 张淑文. LBP/CD₁₄增敏系统在内毒素血症中的作用[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(5): 310-312.
- 8 姚咏明. 多器官功能障碍综合征发病机制研究新进展[J]. 中华急诊医学杂志, 2001, 10(1): 63-64.
- 9 Medzhitov R, Janeway C A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system[J]. Science, 2002, 296:

298 - 300.

10 何维. Toll 样受体和天然免疫[J]. 第二军医大学学报, 2002, 23 (10): 1054 - 1056.

11 Hallman M, Ramet M, Ezekowitz R A. Toll - like receptors as sensors of pathogens [J]. Pediatrics Research, 2001, 50 (3): 315 - 321.

12 Egil L, Robin R I. Toll - like receptors [J]. Crit Care Med, 2002, 30 (suppl): S1 - S11.

13 Lakhani S, Bogue C. Toll - like receptor signaling in sepsis [J]. Curr Opin Pediatr, 2003, 15 (3): 278 - 282.

14 魏育林, 李亚俊, 罗乃丹, 等. 脂多糖致小鼠 SIRS 和 MODS 的研究 [J]. 急诊医学, 2000, 9 (6): 370 - 373.

15 胡森, 盛志勇, 周宝桐. MODS 动物模型研究进展 [J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11 (8): 504 - 507.

16 李琦, 钱桂生, 张青, 等. 全身炎症反应综合征——肺损伤大鼠肺组织 IL - 10 mRNA 表达及 AP - 1 活性变化的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18 (8): 918 - 922.

17 Ochoa M T, Legaspi J, Hatziris Z, et al. Distribution of Toll - like receptor 1 and Toll - like receptor 2 in human lymphoid tissue [J]. Immunology, 2003, 108 (1): 10 - 15.

18 Applequist E, Wallin P A, Ljunggren H, et al. Variable expression of Toll - like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines [J]. International Immunology, 2002, 14 (9): 1065 - 1074.

19 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 (11): 646 - 650.

20 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 (4): 322 - 328.

21 Williams D L, Ha T, Li C, et al. Modulation of tissue Toll - like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality [J]. Crit Care Med, 2003, 31 (6): 1808 - 1818.

(收稿日期: 2003 - 06 - 17 修回日期: 2003 - 08 - 11)
(本文编辑: 李银平)

• 启事 •

2002 年度中国科技论文统计结果: 医药类期刊排名榜

国家科技部中国科技信息研究所 2003 年 12 月 9 日公布了中国科技论文统计结果, 其中医学科技期刊的排名如下:

2002 年度医学类各学科影响因子较高的 3 种期刊

学科	排名	期刊	影响因子
预防医学	1	中华传染病杂志	1. 416
	2	中华结核和呼吸杂志	1. 239
	3	营养学报	0. 749
药 学	1	中国新药与临床杂志	0. 537
	2	中国海洋药物	0. 528
	3	药学学报	0. 508
临床医学	1	WORLD J GASTROENTEROLOGY	2. 579
	2	世界华人消化杂志	1. 926
	3	中华肝脏病杂志	1. 858
基础医学综合类	1	中华医院管理杂志	1. 708
	2	中华医院感染杂志	1. 349
	3	中国危重病急救医学	0. 845
中医中药学	1	骨与关节损伤杂志	0. 720
	2	中国中西医结合急救杂志	0. 533
	3	中草药	0. 478
军事医学与特种医学	1	中国内镜杂志	0. 992
	2	中华放射学杂志	0. 975
	3	中华超声影像学杂志	0. 499

第二届中国百种杰出学术期刊(医学类)

《中华医学杂志》,《中国危重病急救医学》,《中国药理学报》,《中国中西医结合杂志》,《中华儿科杂志》,《中华耳鼻喉科杂志》,《中华放射学杂志》,《中华骨科杂志》,《中华护理杂志》,《中华检验医学杂志》,《中华结核和呼吸杂志》,《中华口腔医学杂志》,《中华皮肤科杂志》,《中华神经外科杂志》,《中华外科杂志》,《中华肿瘤杂志》,《药学学报》,《营养学报》,《WORLD J OF GASTROENTEROLOG》.

颅脑伤合并吸入性肺损伤患者肺组织细胞凋亡的研究 (正文见 97 页)



图1 NAILI 患者肺泡结构正常(HE, ×40)
Fig.1 Normal alveolar struture in NAILI patients(HE, ×40)

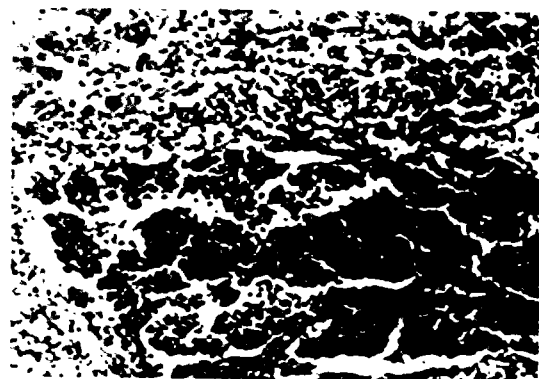


图2 AILI 患者肺组织炎症变化(HE, ×100)
Fig.2 Inflammatory changes of lung tissue in AILI patients(HE, ×100)

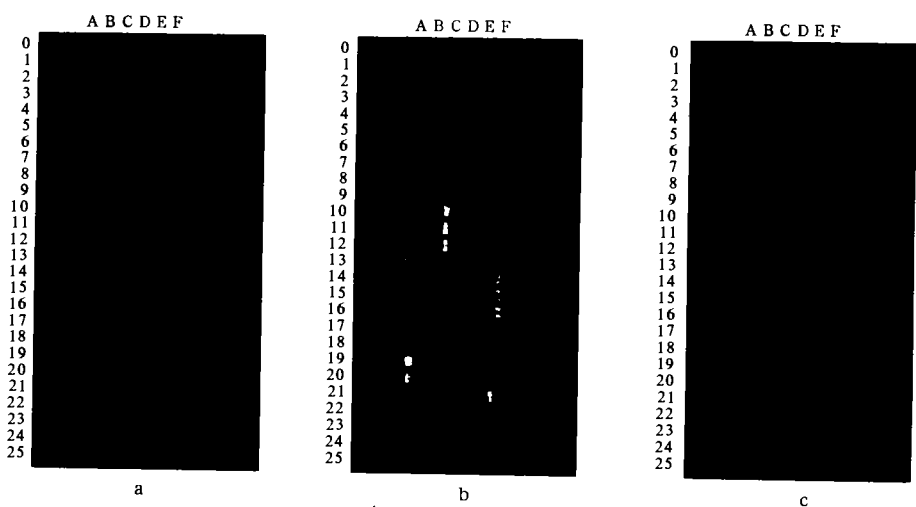


图3 NAILI 患者肺组织凋亡细胞(TUNEL, ×200)
Fig.3 Apoptosis cells of lung tissue in NAILI patients(TUNEL, ×200)



图4 AILI 患者肺组织凋亡细胞(TUNEL, ×400)
Fig.4 Apoptosis cells of lung tissue in AILI patients(TUNEL, ×400)

脂多糖刺激前后小鼠肺肝脾组织中Toll样等受体基因表达情况 (正文见 73 页)



注：0、25为Marker，1~4依次是LPS注射前和注射后1、3、5 h的TLR2，5~8依次是LPS注射前和注射后1、3、5 h的TLR4，9~12依次是LPS注射前和注射后1、3、5 h的CD₁₄，13~16依次是LPS注射前和注射后1、3、5 h的LBP，17~20依次是LPS注射前和注射后1、3、5 h的TNF-α，21~24依次是LPS注射前和注射后1、3、5 h的GAPDH，A、B、C、D、E、F分别为100 bp、300 bp、500 bp、700 bp、900 bp、1 200 bp

图1 正常及注射LPS后的肺组织 (a, L-030121a3)、肝组织 (b, H-030121c2) 和脾组织 (c, S-030122a3) 基因表达情况

Fig.1 Target gene expressions in lung, liver and spleen tissue challenged by LPS