

文章编号:1005-6947(2006)12-0920-03

· 基础研究 ·

小鼠全肝缺血再灌注时肺泡巨噬细胞 TLR2 的激活与肺损伤的机制

谷元廷^{1,2}, 吴河水¹, 徐建波¹, 王琳³, 田元¹, 王春友¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 普通外科, 湖北 武汉 430022; 2. 郑州大学第一附属医院 外科, 河南 郑州 450052; 3. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 儿科, 湖北 武汉 430022)

摘要: **目的** 探讨肺泡巨噬细胞 Toll 样受体 2 (TLR2) 的激活机制及其在肝脏缺血再灌注 (HIR) 中肺损伤的意义。**方法** 用野生型小鼠 C3h/Heouj 和 TLR4 缺失小鼠 C3h/Hej 建立 HIR 动物模型。于再灌注 1, 6, 12h 后经支气管肺泡灌洗液获取肺泡巨噬细胞, 采用荧光定量 PCR 方法检测 TLR2/4 mRNA 的表达。同时检测支气管肺泡灌洗液中内毒素及肿瘤坏死因子 (TNF) 的水平, 肺组织湿干重比值, 肺组织髓过氧化物酶的浓度, 并进行肺组织学评分。**结果** C3h/Heouj 组 HIR 缺血再灌后各时间点肺泡巨噬细胞 TLR2/4 mRNA 表达升高, TLR2 mRNA 表达持续升高, TLR4 mRNA 6h 达到最高值。同时 C3h/Heouj 组 HIR 后支气管肺泡灌洗液中 TNF 水平明显升高, 肺损伤加重, 肺组织湿干重比值持续升高, 肺组织髓过氧化物酶持续增加 ($P < 0.05$)。C3h/Hej 组 HIR 后 TLR2 mRNA 表达仅轻度升高, 且支气管肺泡灌洗液中 TNF 水平低于 C3h/Heouj 组 ($P < 0.05$), 肺损伤轻于 C3h/Heouj 组 ($P < 0.05$)。**结论** HIR 可致肺泡巨噬细胞表面 TLR4 的激活, 可上调 TLR2 的表达, 从而可加重 HIR 时的肺损伤。

关键词: 受体, Toll; 肝, 再灌注损伤; 肺损伤; 巨噬细胞, 肺泡

中图分类号: R657.3; R602 **文献标识码:** A

The mechanism of TLR2 activation and lung injury during the process of total hepatic ischemia/reperfusion in mice

GU Yuan-ting^{1,2}, WU He-shui¹, XU Jian-bo¹, WANG Lin³, TIAN Yuan¹,
WANG Chun-you¹

(1. Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 2. Department of Surgery, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 3. Department of Pediatrics, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of the activation of Toll-like receptor 2 in alveolar macrophage and its significances in hepatic ischemia/reperfusion (HIR) associated lung injury in mice. **Methods** Wild type mice (C3h/Heouj) and TLR4-deficient mice (C3h/Hej) were used in a model of hepatic ischemia/reperfusion. Alveolar macrophages were collected at the time point of 1h, 6h and 12h after HIR by means of bronchoalveolar lavage (BAL), and the expression of TLR2/4 mRNA was detected with Real-Time PCR. The level of endotoxin and TNF- α in BAL fluid were measured. The concentration of MPO, the ratio of wet/dry weight of lung tissue, and lung histological scores were used to assess the degrees of lung injuries. **Results** The expressions of TLR2/4 mRNA in HIR group of C3h/Heouj mice were up-regulated at the all three time points after HIR. The level of TLR2 mRNA was increased sustainedly and TLR4 markedly increased at 6h ($P < 0.01$). At the same time TNF- α concentrations in BALF were increased ($P < 0.01$) and lung injuries were aggravated which was indicated by the level of MPO, the ratio of wet/dry weight of lung and lung histological scores. But in TLR4-deficient (C3h/Hej) animals, the activations

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30200272)。

收稿日期: 2006-07-24; **修订日期:** 2006-10-31。

作者简介: 谷元廷, 男, 河南郑州人, 华中科技大学同济医学院附属协和医院主任医师, 主要从事肝脏缺血灌注方面的研究。

通讯作者: 谷元廷 E-mail: gu-yuanting@sohu.com。

of TLR2 after HIR were only slight increased. TNF- α levels were significantly decreased compared to wild type mice at three time points after reperfusion ($P < 0.01$), and lung injuries were milder than that in wild type mice ($P < 0.05$). **Conclusions** Toll-like receptor 2 on alveolar macrophage can up-regulate TLR4 expression after HIR, which can aggravated the injury of the lung.

Key words: Receptors, Toll; Liver, Reperfusion Injury; Lung Injury; Macrophages, Alveolar

CLC number: R657.3; R602

Document code: A

肝脏缺血再灌注 (hepatic ischemia/reperfusion, HIR) 是临床上常见的病理生理过程。当 HIR 发生时,大量氧自由基生成、补体激活、白细胞黏附浸润等,以致引起局部或全身炎症反应,甚者发展为多器官功能障碍综合征 (MODS)。此过程肺损伤常见,但机制不甚明了^[1-2]。本文应用野生型小鼠 HIR 模型,观察 HIR 时肺泡巨噬细胞 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 2/4 的表达;以 TLR4 缺失小鼠为模型观察 TLR2 的表达,探讨肺泡巨噬细胞表面 TLR 的表达在肺损伤过程中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

TLR4 缺失小鼠 (C3h/Hej) 和野生型小鼠 (C3h/Heouj) 购自上海中科院动物中心;酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒购自深圳晶美生物公司;TRIzol 试剂盒购自 Promega 公司;髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 试剂盒购自南京建成生物所。

1.2 HIR 模型的建立和分组

C3h/Hej 小鼠和 C3h/Heouj 小鼠各 24 只,6~8 周龄,重 20~25 g,雄性。实验前禁食 12 h,自由饮水。将小鼠随机分入以下各组:(1)HIR 组,C3h/Hej 和 C3h/Heouj 小鼠各 18 只。麻醉成功后,开腹,解剖肝门,置无创血管夹,阻断入肝血流,20 min 后去除血管夹,恢复肝脏灌注。1,6,12 h 后于各时点分别取 C3h/Hej 和 C3h/Heouj 小鼠各 6 只处死进行相关检测。(2)假手术组 (SH 组,对照组),C3h/Hej 和 C3h/Heouj 小鼠各 6 只。手术同上,但

不夹闭血管,术后 20 min 处死进行检测。

1.3 检测项目及方法

1.3.1 肺泡巨噬细胞的分离及肺泡灌洗液的收集检测 取相应时点处死的小鼠,以 7 号头皮针穿刺其环甲膜,2 mL 注射器抽取 1 mL DMEM 培养液,缓慢冲洗肺泡腔 10 次,收集液体进行离心。上清液用 ELISA 试剂盒检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的含量。沉淀用 10% Gbico 新生小牛血清的 DMEM 培养液重悬后,计数;并采用差速贴壁纯化法获得肺泡巨噬细胞。

1.3.2 肺泡巨噬细胞表面 TLR2/4 mRNA 的表达 提取 0.5 mL TRIzol 溶液中的肺泡巨噬细胞总 RNA,以 oligodT 为引物将总 RNA 反转录,然后对 TLR2/4 分别同时进行实时荧光定量多聚酶链反应 (PCR) 扩增,分析目的基因 Ct 值,计算相应 Δ Ct 值。

1.3.3 肺损伤的检测 对于再灌注相应时点处死的小鼠,取其左肺检测湿干重比值,称取右肺组织 200 mg 检测其髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 的活性。余组织制成 HE 切片进行组织学评分。

2 结果

2.1 肺泡巨噬细胞 TLR2/4 的表达

C3h/Heouj 小鼠于 HIR 后 TLR2/4 mRNA 表达升高,于 6 h TLR4 mRNA 升高至峰值,TLR2 mRNA 表达相对量持续升高;C3h/Hej 小鼠于再灌注后 TLR2 mRNA 表达轻度升高,但各时点均低于 C3h/Heouj 小鼠的表达水平 (表 1)。

表 1 肺泡巨噬细胞 TLR2/4 的表达 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

组别	检测物	SH 组	HIR1h 点	HIR6h 点	HIR12h 点
C3h/Heouj 组	TLR2 (Δ Ct)	7.53 \pm 2.10	4.56 \pm 1.52 ^{1),2)}	3.50 \pm 1.20 ¹⁾	1.76 \pm 0.46 ^{1),2)}
	TLR4 (Δ Ct)	6.54 \pm 1.86	3.73 \pm 1.75 ¹⁾	0.76 \pm 0.54 ^{1),2)}	1.86 \pm 0.80 ^{1),2)}
C3h/Hej 组	TLR2 (Δ Ct)	8.44 \pm 1.52	5.92 \pm 0.78 ^{1),3)}	4.55 \pm 1.02 ^{1),3)}	3.04 \pm 0.98 ^{1),2),3)}
	TLR4 (Δ Ct)	-	-	-	-

注:1)与 SH 组比较, $P < 0.01$; 2)组内比较, $P < 0.01$; 3)与 C3h/Heouj 组相应时点比较, $P < 0.01$

2.2 肺泡灌洗液 TNF- α 的水平

C3h/Heouj 组 HIR 后肺泡灌洗液中 TNF- α 水平明显升高,6h 达最高;而 C3h/Hej 组肺泡灌洗液中 TNF- α 水平仅轻度升高,且各时点明显低于 C3h/Heouj 组(表 2)。

2.3 肺组织湿干重(W/D)比值,MPO 活性及肺组织学评分

C3h/Heouj 组肺湿干重比值及 MPO 含量与对照组比较,各时间点有随时间升高的趋势,肺组织学评分增加。C3h/Hej 组肺湿干重比值、MPO 含量及肺组织学评分肺升高,但明显低于对应的 C3h/Heouj 组(表 2)。

表 2 肺湿干重(W/D)比值,MPO 活性,肺泡灌洗液 TNF- α 水平及肺组织学评分($\bar{x} \pm s$)

组别	n	湿干重比值(W/D)	MPO 活性(U/g)	肺泡灌洗液 TNF- α (pg/mL)	肺组织学评分	
C3h/Heouj	SH 组	6	1.41 \pm 1.02	1.18 \pm 0.25	55.8 \pm 25.7	0.63 \pm 0.37
	HIR 组					
	1h	6	2.46 \pm 1.47 ¹⁾	2.64 \pm 0.44 ¹⁾	251.5 \pm 40.2 ¹⁾	1.00 \pm 0.64 ¹⁾
	6h	6	3.50 \pm 1.50 ¹⁾	3.15 \pm 0.42 ¹⁾	422.3 \pm 68.2 ^{1),2)}	1.67 \pm 0.75 ¹⁾
C3h/Hej	SH 组	6	1.47 \pm 0.68	0.96 \pm 0.15	43.9 \pm 22.7	0.431 \pm 0.51
	HIR 组					
	1h	6	1.97 \pm 0.76 ^{1),3)}	1.38 \pm 0.32 ^{1),3)}	89.8 \pm 16.4 ^{1),3)}	0.733 \pm 0.38 ^{1),3)}
	6h	6	2.25 \pm 1.15 ^{1),3)}	1.56 \pm 0.27 ^{1),3)}	140.4 \pm 11.9 ^{1),3)}	1.250 \pm 0.65 ^{1),3)}
	12h	6	2.45 \pm 1.03 ^{1),2),3)}	2.36 \pm 0.45 ^{1),2),3)}	200.0 \pm 24.5 ^{1),2),3)}	1.335 \pm 0.85 ^{1),2),3)}

注:1)与 SH 组比较, $P < 0.05$ 或 0.01; 2)HIR 组内比较, $P < 0.01$ 或 0.05; 3)与 C3h/Heouj 组同一时点比较, $P < 0.01$ 或 0.05

3 讨论

HIR 是在休克复苏、肝叶切除以及肝移植等过程中常见的病理生理过程^[3]。其再灌注过程中过度的炎症反应是造成机体损伤的重要因素。缺血时腹腔脏器严重淤血,肠道黏膜通透性升高,再灌注时不可避免地发生内毒素血症。IR 时炎症因子的大量释放、肠道细菌和内毒素移位的发生,都可引起远隔器官的损伤,其中肺损伤较为常见。

TLR4 主要介导 G-杆菌感染时细菌脂多糖(LPS)的信号转导;TLR2 可能是细胞 LPS 受体的组成部分,在内毒素炎症损伤中起协同作用^[4-5]。此外,TLR2 还参与非感染因素所致细胞坏死的识别和炎症反应。TLR2/4 的激活能引起一系列下游分子的活化,导致多种炎症因子的瀑链式释放。TLR 被认为是炎症瀑链式反应的“闸门”^[6-7]。

本实验所见,HIR 发生后 TLR2/4 蛋白的高表达,可能是代谢物和内毒素激活 TLR2/4 的结果。TLR4 的活化又可导致 NF- κ B 的激活,使得 TNF- α 升高,本实验结果符合这一规律。升高的 TNF- α 即可启动炎症级联反应,放大炎症信号^[8],加重肺损伤。本实验发现,肺湿干重比值、MPO 含量和肺组织学评分,HIR 组均较假手术组对照明显升高,说明 HIR 发生时肺损伤也逐渐出现。从本实验结果可推断,肺泡巨噬细胞表面早期激活的 TLR4 可以上调 TLR2 的表达,以放大炎症信号,加重肺损伤。提示早期肺泡巨噬细胞表面 TLR 的激活在中性粒

细胞的聚集和随后发生的肺损伤中发挥着重要作用。

参考文献:

- [1] Zuckerbraun BS, McCloskey CA, Gallo D, *et al.* Carbon monoxide prevents multiple organ injury in a model of hemorrhagic shock and resuscitation [J]. *Shock*, 2005, 23(6):527-532.
- [2] Gray KD, MacMillan-Crow LA, Simovic MO, *et al.* Pulmonary MnSOD is nitrated following hepatic ischemia-reperfusion [J]. *Surg Infect (Larchmt)*, 2004, 5(2):166-173.
- [3] Vali L, Taba G, Szentmihalyi K, *et al.* Reduced antioxidant level and increased oxidative damage in intact liver lobes during ischemia-reperfusion [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(7):1086-1091.
- [4] 吴河水,王峰,王琳,等.小鼠肝缺血/再灌注损伤时肝脏 Kupffer 细胞中 TLR2 的表达 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(8):591-593.
- [5] 张进祥,吴河水,王慧,等.小鼠肝缺血再灌注后 Toll 受体 2 在缺血肝组织中的激活及其意义 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(2):114-117.
- [6] Zhang JX, Wu HS, Wang H, *et al.* Protection against hepatic ischemia/reperfusion injury via downregulation of toll-like receptor 2 expression by inhibition of Kupffer cell function [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(28):4423-4426.
- [7] Shen XD, Ke B, Zhai Y, *et al.* Toll-like receptor and heme oxygenase-1 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. *Am J Transplant*, 2005, 5(8):1793-1800.
- [8] Kupiec-Weglinski JW, Busuttill RW. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2005, 37(4):1653-1656.