

文章编号:1005-6947(2008)04-0360-04

· 基础研究 ·

# TLR4 表达在大鼠小肠缺血再灌注损伤中的改变及意义

王鹏程<sup>1</sup>, 陈道瑾<sup>1</sup>, 李小荣<sup>1</sup>, 吴君辉<sup>1</sup>, 钱立元<sup>1</sup>, 李茂玉<sup>2</sup>

(1. 中南大学湘雅三医院 普通外科, 湖南 长沙 410013; 2. 卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 湖南 长沙 410008)

**摘要:**目的 观察大鼠小肠缺血再灌注(I/R)损伤后小肠组织TLR4的表达及其与炎症因子水平变化的关系。方法 雄性SD大鼠90只,随机分为正常对照(N)组、假手术(S)组、小肠部分缺血/再灌注损伤(肠I/R)组。分别于缺血再灌注后6,12,24,48 h检测各组小肠组织TLR4 mRNA的表达,门静脉血清中TNF- $\alpha$ 和IL-6水平,并进行相关性分析。用免疫组化法观察TLR4在小肠组织中的表达和分布。结果 (1)肠I/R组TLR4 mRNA表达上调,于I/R12 h最强,阳性细胞主要是小肠黏膜细胞;(2)I/R组门静脉血清中IL-6及TNF- $\alpha$ 浓度与N组相比各时点均明显增高( $P < 0.01$ );在I/R24 h后达到峰值,与S组比较差异亦有显著性( $P < 0.01$ );(3)肠I/R组门静脉IL-6及TNF- $\alpha$ 浓度的增高与小肠TLR4 mRNA表达的上调呈正相关( $r = 0.752, r = 0.812$ ;均 $P < 0.01$ );(4)免疫组化法显示小肠黏膜细胞表面TLR4表达明显增强。结论 大鼠小肠I/R损伤后,小肠组织TLR4的表达上调可能是导致肠黏膜免疫屏障功能下降的机制之一,也可能是系统性炎症反应的始动环节。

[中国普通外科杂志,2008,17(4):360-363]

**关键词:** 小肠;缺血再灌注损伤;TLR4;肠黏膜屏障

**中图分类号:** R 656.7 **文献标识码:** A

## Changes and significance of Toll-like receptor 4 expression in ileum ischemia / reperfusion injury in rats

WANG Pengcheng<sup>1</sup>, CHEN Daojin<sup>1</sup>, LI Xiaorong<sup>1</sup>, WU Junhui<sup>1</sup>, QIAN Liyuan<sup>1</sup>,  
LI Maoyu<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery, the Third XiangYa Hospital, Central-South University, Changsha 410013, China; 2. Key Laboratory of Proteomics of Health Ministry, Changsha 410008, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the changes of TLR4 expression in ileum of the rat after ischemia/reperfusion (I/R) injury, and the relationship between TLR4 gene expression and TNF- $\alpha$ , IL-6 level in blood of portal vein. **Methods** A total of 90 adult male SD rats were randomized into 3 groups: normal control group ( $n = 10$ ), sham-operated group ( $n = 40$ ) and ileum ischemia / reperfusion group ( $n = 40$ ). Animals were sacrificed after undergoing ileum ischemia/reperfusion injury for 6, 12, 24 and 48 h, and expression of TLR4 mRNA was determined by RT-PCR. Meanwhile, blood in portal vein was obtained to assay TNF- $\alpha$  and IL-6 concentration in plasma. Correlation analysis between TLR4 mRNA and TNF- $\alpha$ , IL-6 levels was made. Expression of TLR4 in ileum was evaluated with immunohistochemistry. **Results** The expression of TLR4 mRNA in ileum and TNF- $\alpha$  and IL-6 level in portal vein plasma was significantly higher in experimental group, compared with sham group ( $P < 0.05$ ). TLR4 mRNA expression peaked at 12 h after I/R injury, and TNF- $\alpha$  and IL-6 concentration peaked at 24 h. TLR4 mRNA expression and TNF- $\alpha$  and IL-6 level showed significant relativity ( $r = 0.812$  and  $0.752$ ). Immunohistochemical exam showed TLR4

收稿日期:2007-04-09; 修订日期:2007-11-13。

作者简介:王鹏程,男,中南大学湘雅三医院博士研究生,主要从事胃肠外科方面的研究。

通讯作者:陈道瑾 E-mail:pcw86@hotmail.com

was mainly expressed in ileum mucous membrane. **Conclusions** Expression of TLR4 in ileum was up-regulated after I/R injury in rat, and that could be one of the mechanisms of intestinal mucosal barrier function injury, as well as the trigger for initiation of systemic inflammatory response syndrome (SIRS).

[ Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17 (4): 360 - 363 ]

**Key words:** Intestine; Ischemia Reperfusion Injury; TLR4; Intestinal Mucosal Barrier

**CLC number:** R 656.7

**Document code:** A

肠缺血再灌注(I/R)损伤是严重创伤、烧伤休克、绞窄性肠梗阻等许多外科疾病的常见病理生理过程,其病程后期患者常出现系统性炎症反应综合征(SIRS)甚至多器官功能不全,为手术失败和患者最终死亡的原因之一。作为天然免疫系统的Toll样受体(Toll-like receptors,TLRs)在肠I/R损伤中的作用罕见文献报道。本文通过检测大鼠小肠部分I/R损伤后小肠组织TLR4mRNA的表达和病理学改变,以及门静脉血中炎症因子肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白介素6(IL-6)的改变,旨在研究TLR4在大鼠小肠I/R损伤中的作用及意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物和分组

清洁级SD大鼠90只,雄性,体重200~220g,由中南大学实验动物学部提供,实验前均禁食12h。大鼠随机分为正常对照(N)组(10只)、假手术(S)组(40只)和小肠部分I/R损伤组(实验组,肠I/R组40只)。N组不做特殊处理。S组腹腔注射25%乌拉坦(4mL/kg)麻醉后,取正中切口,逐层进腹,提出小肠及盲肠,湿盐水纱布覆盖置于体外30min后还纳腹腔并逐层缝合腹壁切口。肠I/R组开腹提出小肠肠管,展开肠系膜,暴露肠系膜血管并游离根部,以无创血管夹夹闭30min后,松开血管夹,还纳肠管并逐层缝合腹壁切口。S组和肠I/R组又分术后6,12,24,48h4组,每组各10只,于相应时间点宰杀后取组织标本。

### 1.2 血标本及小肠组织的采集和处理

各组动物在相关时点麻醉后,作腹正中切口(N组)或打开腹中原切口(S组和肠I/R组)。沿肠系膜上静脉于第一肝门处找到门静脉,采血2~3mL(置入离心机,800r/min离心3min,取上层血浆约1mL于-80℃低温冰箱保存),然后沿肠管边缘剪开末段小肠系膜约4cm(远端达回盲部),截取末段约4cm小肠组织,平分2份,即各2cm的小肠;生理盐水充分冲洗净肠内容物,分装并于-80℃低温冰箱保存,备检。

### 1.3 检测指标及方法

1.3.1 小肠组织TLR4mRNA的表达 液氮冷冻后研磨小肠组织,用Trizol试剂提取细胞总RNA,常规方法建立逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)反应体系和反应条件。目的基因TLR4引物序列:上游5'-GAG CCG GAA AGT TAT TGT GG-3',下游5'-TAA GAA GGC GAT ACA ATT CGA C-3',扩增片段长度为182bp(上海生物工程技术服务有限公司合成)。内参照 $\beta$ -actin引物序列 upper 5'-CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C-3', lower 5'-AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C-3',扩增片段长度512bp(上海生物工程技术服务有限公司合成)。反应条件95℃5min,(94℃30s,56℃30s,72℃30s)×36个循环,72℃退火7min,4℃保存。琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。GeneSnap6.00.26软件分析结果。以目的基因与内参对照的积分吸光度比值(TLR4mRNA/ $\beta$ -actin ratio)表示mRNA相对表达量。

1.3.2 血浆TNF- $\alpha$ ,IL-6检测 大鼠TNF- $\alpha$ ,IL-6酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒均购自晶美生物工程有限公司。按试剂盒说明检测大鼠血浆TNF- $\alpha$ 及IL-6浓度。

1.3.3 小肠组织TLR4的免疫组化检测 大鼠TLR4一抗购自博士德生物工程有限公司(进口分装),免疫组化试剂盒(抗兔)购自晶美生物工程有限公司。按试剂盒说明进行检测。

### 1.4 数据统计

采用SPSS12.0软件进行统计。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。均值差异的显著性采用方差分析;相关性采用Pearson相关分析。

## 2 结 果

### 2.1 小肠TLR4mRNA表达的变化

N组及S组小肠组织TLR4mRNA表达均较低,两组差异无显著性( $P > 0.05$ )。肠I/R组小肠组织TLR4mRNA表达增多,且I/R后12h达峰值,并持续至48h;与N组及S组比较差异有显著性( $P < 0.05$ )(表1)(图1)。

表1 小肠 I/R 组大鼠小肠 TLR4mRNA 表达的变化(积分吸光度比值,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间			
	6h	12h	24h	48h
N	0.104 ± 0.034			
S	0.19 ± 0.045 <sup>1)</sup>	0.17 ± 0.022	0.13 ± 0.041	0.12 ± 0.029
肠 I/R	0.42 ± 0.076 <sup>1),3)</sup>	1.32 ± 0.218 <sup>2),4)</sup>	0.91 ± 0.111 <sup>2),4)</sup>	0.84 ± 0.082 <sup>2),4)</sup>

注:与 N 组比较, 1)  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$ ; 与 S 组比较; 3)  $P < 0.05$ ; 4)  $P < 0.01$

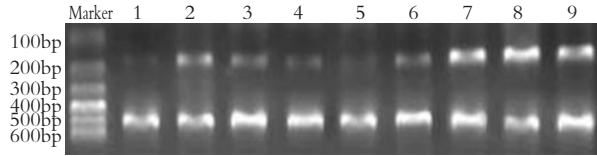


图1 大鼠小肠组织 TLR4mRNA 表达的动态变化 1: N 组, 2~5: S 组(6~48h), 6~9: 肠 I/E 组(6~48h)

## 2.2 门静脉血浆 TNF- $\alpha$ 和 IL-6 浓度的变化

与 N 组和 S 组比较, 肠 I/R 组门静脉血浆 TNF- $\alpha$  和 IL-6 浓度各时点均显著升高, 均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。且 I/R 24 h 后达高峰, 其中以 IL-6 增高更明显。N 组和 S 组两组间差异无显著性(表 2)。

表2 各组于不同时相血清 TNF- $\alpha$  及 IL-6 的表达(pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	TNF- $\alpha$				IL-6			
		6h	12h	24h	48h	6h	12h	24h	48h
N	10		25.13 ± 7.76				36.43 ± 5.08		
S	10	27.07 ± 5.87	29.11 ± 3.94	34.08 ± 3.98	31.16 ± 3.87	35.75 ± 5.37	39.32 ± 3.95	44.123 ± 6.57	41.10 ± 3.82
肠 I/R	10	26.61 ± 3.92	34.28 ± 3.41	92.63 ± 9.84 <sup>1),2)</sup>	65.33 ± 5.32 <sup>1),2)</sup>	68.78 ± 7.68 <sup>1),2)</sup>	225.3 ± 22.53 <sup>1),2)</sup>	653.22 ± 118.30 <sup>1),2)</sup>	446.71 ± 60.19 <sup>1),2)</sup>

注: 1) 与 N 组比较,  $P < 0.01$ ; 2) 与 S 组比较,  $P < 0.01$

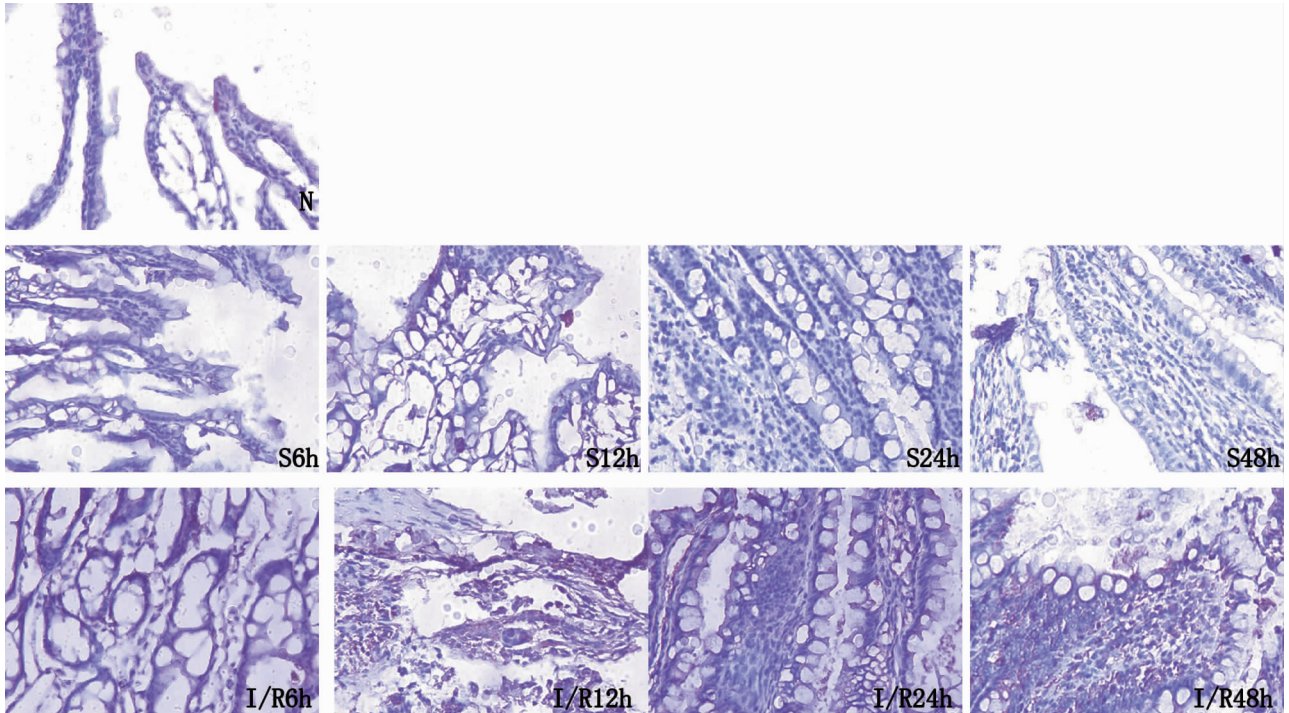


图2 小肠黏膜 TLR4 表达

### 2.3 相关分析结果

相关分析提示,I/R组6~24h的TLR4 mRNA表达量与I/R组12~48h肝门静脉血浆TNF- $\alpha$ 和IL-6水平呈正相关,其相关系数分别为0.812和0.752(均 $P < 0.01$ )。

### 2.4 TLR4表达

12~48h点N组和S组小肠组织TLR4表达均明显低于肠I/R组( $P < 0.05$ )。其主要表达部位在肠黏膜细胞的细胞膜(图2)。

## 3 讨论

肠黏膜对缺氧的耐受力大大低于其他组织,小肠I/R损伤是许多疾病共同的病理生理机制。本实验结果显示,在N组中,TLR4 mRNA的表达较低;在肠I/R损伤后6h,TLR4 mRNA的表达即开始上调,至12h达高峰,较N组增高12.7倍。小肠组织的免疫组化检查显示,N组及S组,小肠组织TLR4表达呈阴性,而肠I/R组肠黏膜的细胞膜TLR4阳性表达明显增多,与小肠组织中TLR4 mRNA的表达变化一致。肠道TLR4的低表达保证了生理状态下肠道对细菌的“绝缘”,可视作肠黏膜屏障功能的组成部分之一<sup>[1]</sup>。本实验结果还显示,门静脉血中炎症因子TNF- $\alpha$ 和IL-6的水平从I/R后12h开始升高,至24h达高峰;其升高幅度与小肠组织TLR4 mRNA的表达变化呈正相关。已知TNF- $\alpha$ 水平的高低与肠黏膜的损害直接相关;而IL-6是另一个重要的致炎因子,与多器官功能不全综合征(MODS)的严重程度和致死率密切相关。提示TLR4的表达增强可能是激发全身炎症反应的始动环节,与肠道是诱发系统性炎症反应综合征(SIRS)的中心器官的肠源性学说是一致的<sup>[2-4]</sup>。Cario<sup>[5]</sup>报道TLR4在炎症性肠病(IBD)中的表达增高;Miyaso<sup>[6]</sup>发现,胆道梗阻大鼠其小肠TLR4表达上调,且给胆道梗阻大鼠以脂多糖(LPS)刺激,能提高外周血中的TNF- $\alpha$ 和IL-6水平。本实验与上述研究的结果相似。

早期TLR4的表达能短期加强肠道黏膜的屏障功能,这是由于肠道TLR4的激活能促进环氧酶2(COX-2)的表达<sup>[7]</sup>,而COX-2能促进细胞

增殖。然而,TLR4表达的持续增强,可能导致肠黏膜对细菌,尤其是革兰阴性细菌内毒素的敏感性提高,从而最终诱发机体的全身炎症反应综合征(SIRS)。本实验结果显示,门静脉血浆中TNF- $\alpha$ 的升高较小肠TLR4 mRNA表达增强延迟6~12h,这可能正是由于LPS对TLR4持续刺激的结果。然而,本实验还显示IL-6水平的增高较TNF- $\alpha$ 早,其升高幅度也大得多。这说明IL-6在炎症反应中的重要作用。

本实验基于肠道特殊的多细菌环境,研究LPS受体TLR4在肠I/R损伤中的表达变化,发现肠I/R损伤后TLR4的表达上调,并继发门静脉血中炎症因子水平的升高,提示肠黏膜TLR4表达上调可能是SIRS的始动环节。但TLR4表达与炎症因子升高的关联机制尚待深入研究。随着I/R损伤致肠源性炎症反应研究的深入,可望为治疗SIRS和MODS提供新的更有效的途径。

### 参考文献:

- [1] Abreu MT, Arnold ET, Thomas LS, *et al.* TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(23):20431-20437.
- [2] Stefanutti G, Pierro A, Vinardi S, *et al.* Moderate hypothermia protects against systemic oxidative stress in a rat model of intestinal ischemia and reperfusion injury [J]. *Shock*, 2005, 24(2):159-164.
- [3] Ammori BJ. Role of the gut in the course of severe acute pancreatitis [J]. *Pancreas*, 2003, 26(1):122-129.
- [4] Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury [J]. *BrMed Bull*, 2004, 70(1):71-86.
- [5] Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease [J]. *Infect Immun*, 2000, 68(12):7010-7017.
- [6] Miyaso H, Morimoto Y, Ozaki M, *et al.* Obstructive jaundice increases sensitivity to lipopolysaccharide via TLR4 upregulation: possible involvement in gut-derived hepatocyte growth factor-protection of hepatocytes [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2005, 20(12):1859-1866.
- [7] Fukata M, Chen A, Klepper A, *et al.* Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine [J]. *Gastroenterology*, 2006, 131(3):862-877.