

文章编号:1005-6947(2005)11-0838-04

· 实验研究 ·

Toll-样受体2,4mRNA在急性出血坏死性胰腺炎肺损伤中的表达变化

张磊¹, 吴河水¹, 于鑫², 陈燕³, 郭兴军¹, 王琳¹, 王春友¹, 张景辉¹, 田元¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 胰腺外科中心, 湖北 武汉 430022; 2. 山东省泰安市中心医院, 山东 泰安 271000; 3. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 外科, 湖北 武汉 430030)

摘要:目的 研究急性出血坏死性胰腺炎(AHNP)肺损伤中 Toll-样受体(TLR)2/4mRNA 表达的变化规律。方法 建立 AHNP 肺损伤动物模型。动物分为假手术组(S组)、胰腺炎组(P组)。计算各组肺组织学评分和肺损伤指数以评价肺损伤的程度; RT-PCR 方法检测不同时间点肺组织 TLR2 和 TLR4mRNA 表达的变化。结果 肺组织 TLR2 和 TLR4mRNA 在 S 组仅有低表达, 在 P 组 3h 表达开始增高, 伤后 6~12h 该两指标表达达到峰值($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 S 组变化不明显。结论 AHNP 时, 肺组织内该两种基因的表达上调; 肺组织内 TLR2 和 TLR4 的基因表达增高可能在 AHNP 肺损伤的发生、发展中起作用。

关键词:急性胰腺炎/并发症; 肺疾病/病因学; 肺/病理学; 受体, Toll; 疫病模型, 动物

中图分类号: R576; R563

文献标识码: A

Changes of Toll-like receptor 2 and 4 gene expression in lungs with acute injury induced by acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis in rats

ZHANG Lei¹, WU He-shui¹, YU Xin², CHEN Yan³, GUO Xing-jun¹, WANG Lin¹, WANG Chun-you¹, ZHANG Jing-hui¹, TIAN Yuan¹

(1. Pancreatic Surgical Center, Affiliated Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China; 2. Central Hospital of Taian City, Taian, Shandong, 271000, China; 3. Department of Surgery, Affiliated Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430022, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of Toll-like receptor 2 and 4 gene expression in lungs with acute injury induced by acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis (AHNP) in rats. **Methods** Forty SD male rats were randomly divided into sham-operated group ($n = 10$), and AHNP group ($n = 30$). Of all the rats, the lungs were dissected for lung histological scores and bronchoalveolar lavages were harvested for lung injury index. TLR2, 4mRNA expression in the lungs was measured by RT-PCR at different time points.

Results TLR2, 4mRNA could be detected in lungs with low values in sham-operated group; but they were markedly increased at 3 hours in AHNP group, peaking at 6~12 hours ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

Conclusions These data suggest that expression of TLR2/4mRNA is increased in lung tissue in AHNP rats, and up-regulation of TLR2, 4mRNA expression in lung tissue may be involved in the development of acute lung injury induced by AHNP.

Key words: Acute Pancreatitis/compl; Lung Diseases/etiol; Lung/pathol; Receptor, Toll;

Disease Models, Animal

CLC number: R576; R563

Document code: A

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200272)。

收稿日期:2005-06-17; **修订日期:**2005-10-25。

作者简介:张磊(1978-),男,山东泰安人,华中科技大学同济医学院附属协和医院住院医师,主要从事胰腺疾病的诊治和基础研究方面的研究。

通讯作者:张磊 电话:027-63321986; E-mail:XL32001@yahoo.com.cn。

急性出血坏死性胰腺炎(AHNP)是一种严重的全身性疾病,发病急骤,病情严重,病死率高。主要由于在AHNP早期即可引起心、肺、肾、肝等多器官功能不全,进而发展到多器官失功能综合征(MODS)。其中以急性肺损伤(ALI)最多见。许多研究提示可能多种促炎症细胞因子[包括肿瘤坏死因子(TNF)、白介素-6(IL-6)、诱导型一氧化氮合成酶(iNOs)等]介导的全身炎症反应综合征(SIRS)在MODS发生中起重要作用^[1]。近年来发现某些因素激活TLR-2,4后,通过一系列信号传导,产生炎症放大效应^[2,3]。本文通过观察AHNP大鼠模型肺中Toll受体(TLRs)的表达变化,了解TLRs在AHNP肺损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

SD大鼠40只(购于华中科技大学同济医学院实验动物中心,雄性,体重约为180~200g)。将动物随机分为2组:假手术组(S组)10只、胰腺炎组(P组)30只。

1.2 动物模型的制备

实验前大鼠禁食12h,自由进水。P组采用逆行胰胆管牛磺胆酸钠(TAC, Sigma公司)注射建立动物模型^[4],剂量为5% TAC 0.1 mL/100g。S组动物开腹仅翻动肠管后关腹。P组在术后3,6,12h剖杀动物,S组在术后6h剖杀动物,留取静脉血和肺组织标本待测。

1.3 观察指标与方法

1.3.1 血清淀粉酶的测定 采用碘-淀粉比色法测定(南京建成生物工程研究所)。

1.3.2 肺组织学检查 各时间点动物处死后取损伤明显的肺组织,常规10%中性多聚甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m切片,HE染色后置光镜下观察。肺脏组织学评分按Osman等的标准计算^[5]。

1.3.3 肺损伤指数 大鼠处死后解剖胸腔,充分暴露肺叶,自主支气管注入无菌生理盐水,每次10mL,共4次,收集灌洗液,以灌洗液蛋白含量/血清总蛋白含量计算。

1.3.4 肺组织NO和TNF- α 的测定 NO采用硝酸还原酶比色法测定(南京建成生物工程研究所);TNF- α 测定用双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)法(Genzyme公司,美国),具体方法按试

剂盒内说明书操作。

1.3.5 组织TLR2 mRNA,TLR4 mRNA的表达 无菌留取肺组织各约50mg,以Trizol一步法提取细胞总RNA(Promega公司,香港)。采用荧光实时定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术对逆转录-扩增产物进行定量分析。TLR2引物序列:5'-CGCTTCCTGAACCTGTGTC-3'(正义链),5'-GGTTGT-CACCTGCTTCCA-3'(反义链),扩增片段约为200bp。TLR4引物序列:5'-ATCATGGCATTGTTCTTTCCT-3'(正义链),5'-CTGAGATTCTGATCCATG-CATTG-3'(反义链),扩增片段约为100bp。用 β -actin作内参照。上游引物序列为:5'-GAACGGT-GAAGGTG ACAG-3',下游引物序列为5'-TAGAGAGAAGTGGGGTGG-3'。TLR2荧光探针的序列为5'-ACTAAGAGCGGAGCGGA-3';TLR4荧光探针的序列为5'-TCG GTAACGACGGTTGTAG-3'; β -actin荧光探针的序列:5'-ACCACAGC ACCTGCGGGAT-3'。在延伸的过程中搜集荧光信号于每次扩增的同时设置无cDNA的阴性对照。结果由FTC-2000型实时荧光定量PCR仪(上海枫岭生物技术有限公司)自带分析软件进行分析。

1.4 统计学处理

数据以均数 \pm 标准误($\bar{x} \pm s$)表示。采用SPSS10.0统计软件包进行t检验和方差分析等。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 胰腺、肺组织的病理学改变

2.1.1 大体观察 P组大鼠3h时可见胰腺明显充血水肿,局部有红色出血坏死灶,肺脏有充血;至6h可见胰腺组织为暗黑色,无光泽,肺脏充血水肿明显,并有点片状出血灶;至12h可见胰腺明显坏死,肺脏病理改变加重。

2.1.2 光镜下观察 胰腺组织出血坏死,间质充血水肿,有大量炎症细胞浸润。肺组织随时间延长而出现不同程度的间质充血水肿,炎性细胞浸润,肺泡腔红细胞渗出,点片状出血和肺不张。S组则无明显变化。

2.2 肺损伤指数

与S组相比,P组各时间点的肺损伤指数明显高于S组($P < 0.01$)(表1)。

表1 各组的肺损伤评分及肺损伤指数

分组	标本数(只)	肺组织学评分	肺损伤指数
S组	10	0	0.0086 ± 1.05E-4
P组(3h)	10	0.6 ± 0.234 [†]	0.0424 ± 5.47E-4 [†]
P组(6h)	10	1.7 ± 0.221 [†]	0.0730 ± 8.24E-4 [†]
P组(12h)	10	2.4 ± 0.255 [†]	0.0732 ± 6.34E-4 [†]

注:†与S组比较, $P < 0.01$

2.3 血清淀粉酶和肺组织中 NO 及 TNF- α 浓度变化

P组各时点血清淀粉酶明显高于S组($P < 0.01$),且P组内随时间延长而升高($P < 0.05$)。肺组织内 TNF- α 浓度3hP组明显高于S组,后逐渐降低,但仍高于S组($P < 0.05$)。NO的浓度P组明显低于S组,并随时间延长而明显降低($P < 0.01$)(表2)。

表2 各组血清淀粉酶和肺组织中 NO 及 TNF- α 浓度变化

分组	标本数(只)	血清淀粉酶(U/L)	肺组织 NO ($\mu\text{mol/gprot}$)	肺组织 TNF- α (pg/mg)
S组	10	1366 ± 79	23.15 ± 0.13	1.42 ± 0.04
P组(3h)	10	3990 ± 201 ¹⁾	18.32 ± 0.47 ¹⁾	5.81 ± 0.12 ¹⁾
P组(6h)	10	4306 ± 99 ¹⁾	14.45 ± 0.34 ¹⁾	3.72 ± 0.19 ^{1),2)}
P组(12h)	10	5050 ± 52 ¹⁾	6.05 ± 0.14 ¹⁾	3.61 ± 1.59 ¹⁾

注:1)与S组比较, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$; 2)与12hP组比较, $P > 0.05$

2.4 肺组织中 TLR2/4 mRNA 的表达

TLR2 mRNA 在S组有少量表达,3hP组较S组有明显升高,6~12h继续升高,12h达到峰值(均 $P < 0.01$); TLR4 mRNA 在S组有少量表达,3hP组较S组有明显升高,6~12h继续升高,12h达到峰值(均 $P < 0.01$)(表3)。TLR2/4 cDNA 扩增曲线见附图。

表3 肺组织 TLR2 mRNA, TLR4 mRNA 的表达变化

分组	标本数(只)	TLR	TLR4
S组	10	0.017 ± 0.47E-2	1.007 ± 0.01
P组(3h)	10	0.787 ± 1.18E-2 [†]	1.496 ± 0.01 [†]
P组(6h)	10	1.086 ± 3.97E-2 [†]	2.055 ± 0.02 [†]
P组(12h)	10	1.113 ± 2.58E-2 [†]	2.940 ± 0.03 [†]

注:†与S组比较, $P < 0.01$

1,2:阴性对照;3,6,7,9:分别为肺组织S组和P组3,6,12h TLR2 mRNA 的表达情况;4,5,8,10:分别为肺组织S组和P组3,6,12h TLR4 mRNA 的表达情况

附图 肺组织 TLR2,4 荧光实时定量 PCR 结果

3 讨论

AHNP 继发 ALI 率高达 60% ~ 70%, 终致继发急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 达 20% 左右, 并成为 AHNP 的主要死亡原因之一^[6]。ALI 的严重程度已作为判断 AHNP 病情的指标之一。ALI 被认为是早期的 ARDS, 是 ARDS 连续的病理过程^[7]。但其具体机制尚不清楚。TLRs 通过识别保守的细菌结构, 即病原相关分子模式 (PAMP), 而在天然免疫反应中发挥着重要作用。同时 TLR 与 PAMP 结合可激活抗原提呈细胞 (APC), 使之表达多种共刺激分子和细胞因子, 从而参与特异性免疫应答的启动。其中 TLR2/4 在细菌感染中效应最显著, 如 TLR2 可识别细菌的脂蛋白、肽聚糖、脂膜酸和酵母聚糖; TLR4 可识别脂多糖 (LPS) 和热休克蛋白 (HSP); 它们在感染的发生发展中可能起核心作用。通过对 TLR2 或 TLR4 基因缺失的小鼠的研究发现 TLR2 或 TLR4 基因缺失会导致机体对病原微生物易感性增强^[8~11]。本研究通过观察 AHNP 肺损伤中 TLR2 mRNA, TLR4 mRNA 表达的变化规律, 旨在了解 TLR2, 4 在 AHNP 肺损伤中的意义。

本实验结果显示:假手术组的大鼠肺组织中均有少量 TLR2 mRNA, TLR4 mRNA 表达。但 AHNP 模型制备后 3h, 大鼠模型肺组织 TLR2 mRNA, TLR4 mRNA 表达开始增高, 6~12h 肺组织表达迅

速达到峰值。同时肺组织中 TNF- α 明显升高, NO 明显降低。提示 AHNP 时, 肺组织 TLR2, 4 基因的表达明显上调, 诱导各种促炎症细胞因子的合成与释放和参与各种促炎症细胞因子的过量合成和释放, 参与机体失控性炎症反应和多器官衰竭。NO 在低浓度时具有抗炎作用^[12]。本实验结果显示肺组织的 NO 显著降低, 提示 TLR2, 4 基因的表达可能还可抑制抗炎因子的合成释放, 加重机体的失控性炎症反应。TLR2, 4 基因的表达在 AHNP 肺损伤中可能起着十分重要的作用。

TLR2 mRNA, TLR4 mRNA 在 AHNP 肺损伤中的具体激活机制尚不清楚。有文献报道, 胰弹力蛋白酶诱导的促炎症反应是通过 TLR4 和 NF- κ B 途径介导的^[13], 提示胰腺细胞破坏后释放入血的酶类可能可以激活肺组织中的 TLRs; 在急性胰腺炎中内毒素血症引起的组织损害也通过 TLR4 途径介导^[14], 提示内毒素可能也可以激活肺组织中的 TLRs。另有文献报道, 细菌的多种组分对组织的损害系通过 TLR2, 4 途径介导^[8~11], 提示 TLR2 可能也可以在急性胰腺炎中起作用。TLR2, 4 mRNA 在 AHNP 肺损伤中的激活因素有 3 种可能: (1) 肠道屏障损害后肠道吸收内毒素; (2) 胰腺细胞释放入血的各种胰酶; (3) AHNP 引起的各种炎症因子释放, 炎症因子的刺激。三者间是否存在协同作用, TLRs 的表达在 AHNP 肺损伤中是否是一种始动因素, 笔者对此将进行后续研究。

参考文献:

- [1] Li M, Carpio DF, Zheng Y, *et al.* An essential role of the NF- κ B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells [J]. *J Immunol*, 2001, 166(12): 7128 - 7135.
- [2] Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR-2 in the activation of NF-kappaB by oxidative stress in the cardiac myocytes [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(7): 5197 - 5203.
- [3] 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.
- [4] 罗昆仑, 何振平, 杨放霖, 等. 急性出血性坏死性胰腺炎并发急性肺损伤的实验研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11(3): 146 - 148.
- [5] Osman MO, Kristensen JU, Jacobsen NO, *et al.* A monoclonal anti-interleukin 8 antibody (WS-4) inhibits cytokine response and acute lung injury in experimental severe acute necrotising pancreatitis in rabbits [J]. *Gut*, 1998, 43(2): 232 - 239.
- [6] 陈平, 詹乐恒, 王世文, 等. MMP-9 及其抑制剂对实验性重症急性胰腺炎继发肺损伤的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(6): 415 - 418.
- [7] 刘亚光, 潘建军, 牛力春, 等. 重症急性胰腺炎并发急性肺损害 18 例报告 [J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11(3): 182 - 184.
- [8] Echchannaoui H, Frei K, Schnell C, *et al.* Toll-like receptor 2-deficient mice are highly susceptible to *Streptococcus pneumoniae* meningitis because of reduced bacterial clearing and enhanced inflammation [J]. *J Infect Dis*, 2002, 186(6): 798 - 806.
- [9] Koedel U, Angele B, Rupprecht T, *et al.* Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis [J]. *J Immunol*, 2003, 170(1): 438 - 444.
- [10] Woods JP, Frelinger JA, Warrack G, *et al.* Mouse genetic locus LPS influences susceptibility to *Neisseria meningitidis* infection [J]. *Infect Immun*, 1988, 56(8): 1950 - 1955.
- [11] Shahin RD, Engberg I, Hagberg L, *et al.* Neutrophil recruitment and bacterial clearance correlated with LPS responsiveness in local Gram-negative infection [J]. *J Immunol*, 1987, 138(10): 3475 - 3480.
- [12] 陈祥建, 张启瑜, 陈必成, 等. 早期应用 L-精氨酸治疗急性出血坏死性胰腺炎的实验研究 [J]. *肝胆胰外科杂志*, 2002, 14(4): 220 - 222.
- [13] Hietaranta A, Mustonen H, Puolakkainen P, *et al.* Proinflammatory effects of pancreatic elastase are mediated through TLR4 and NF-kappaB [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323(1): 192 - 196.
- [14] Pastor CM, Pugin J, Kwak B, *et al.* Role of Toll-like receptor 4 on pancreatic and pulmonary injury in a mice model of acute pancreatitis associated with endotoxemia [J]. *Crit Care Med*, 2004, 32(8): 1759 - 1763.