

文章编号:1005-6947(2006)06-0438-04

· 基础研究 ·

# 急性出血坏死性胰腺炎肝损伤中TLR2/4mRNA的表达及氯喹的干预效应

黄鹏, 吴河水, 张磊, 王春友

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 胰腺外科, 湖北 武汉 430022)

**摘要:**目的 研究急性出血坏死性胰腺炎(AHNP)肝损伤中Toll-样受体(TLR)2/4mRNA表达的变化及氯喹的干预效应。方法 采用逆行胰胆管牛磺胆酸钠(TAC)注射造成大鼠AHNP肝损伤动物模型。动物分为假手术组(S组)、胰腺炎组和氯喹(CQ)治疗组。后2组于术后3, 6, 12 h分批剖杀, S组于术后6 h剖杀。观察血清淀粉酶、ALT和AST及肝组织NO和TNF- $\alpha$ 的变化, RT-PCR方法检测各组不同时段肝组织TLR2和TLR4mRNA的表达。结果 相对于S组, 胰腺炎组大鼠3 h肝组织TLR2和TLR4mRNA表达开始增高, 术后6~12 h肝组织TLR2和TLR4mRNA表达迅速达到峰值( $P < 0.05$ ), 肝损伤加重, 血清淀粉酶升高, 肝组织TNF- $\alpha$ 浓度升高, NO浓度逐渐降低( $P < 0.05$ ); 相对胰腺炎组, CQ治疗组TLR2/4mRNA表达降低( $P < 0.05$ ), 肝损伤程度减轻, 血清淀粉酶降低, 肝组织TNF- $\alpha$ 浓度降低, NO浓度显著升高( $P < 0.05$ )。结论 AHNP大鼠肝组织内TLR2和TLR4的基因表达上调; 其表达增高可能在AHNP肝损伤的发生、发展中起重要作用。氯喹对大鼠AHNP过程中肝损伤可能有保护作用。

**关键词:** 胰腺炎, 急性坏死性; 肝细胞/代谢; 氯喹/治疗应用; Toll-样受体

**中图分类号:** R657.51 **文献标识码:** A

## Toll-like receptor 2 and 4 gene expression in acute injury liver tissue of acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis rats and the efficacy of intervention with Chloroquine

HUANG Peng, WU He-shui, ZHANG Lei, WANG Chun-you

(Department of Pancreatic Surgery, Union 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 acute injury liver tissue of acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis (AHNP) rats and the efficacy of intervention with chloroquine (CQ). **Methods** Seventy SD male rats were randomly divided into Sham-operated group ( $n = 10$ ), AHNP group ( $n = 30$ ) and Chloroquine-treated group ( $n = 30$ ). Levels of serum amylase, ALT, AST, NO and TNF- $\alpha$  were detected. TLR2/4mRNA expression in the livers were measured by RT-PCR. **Results** Comparing to sham-operated group, TLR2/4mRNA was markedly increased at 3 hours in liver tissues in AHNP group, peaking at 6~12 hours ( $P < 0.05$ ). As liver injuries were aggravated, the levels of serum amylase, ALT, AST and TNF- $\alpha$  were increased and the level of NO in livers was decreased ( $P < 0.05$ ). Treatment with CQ could effectively inhibit TLR2/4mRNA expression ( $P < 0.05$ ), and the degree of liver injuries was decreased, and the levels of serum amylase, ALT, AST and TNF- $\alpha$  were decreased and the levels of NO were also markedly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The expression of TLR2/4mRNA is increased in livers in AHNP. Up-regulation of TLR2/4mRNA expression in livers may

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30200272)。

**收稿日期:**2006-04-22; **修订日期:**2006-05-09。

**作者简介:**黄鹏,男,湖北咸宁人,华中科技大学同济医学院附属协和医院主治医师,主要从事胰腺疾病外科治疗方面的研究。

**通讯作者:**黄鹏 E-mail:hpeng2003@sina.com。

be importantly involved in the pathogenesis and development of acute liver injury in AHNP rats. CQ may have protective effect against liver injuries induced by AHNP.

**Key words:** Pancreatitis, Acute Necrotizing; Hepatocytes/metab; Chloroquine/ther use; TLR

**CLC number:** R657.51

**Document code:** A

急性出血坏死性胰腺炎(AHNP)的具体发病机制目前尚未明了。研究提示多种促炎症细胞因子,包括肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素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)可能在其发生中起重要作用<sup>[1]</sup>。近年来发现某种刺激激活 Toll-样受体(TLR)2,4 基因表达后,通过一系列信号传导,产生炎症放大效应<sup>[2]</sup>,从而在其发病中可能也起一定的作用。本文通过观察 AHNP 大鼠肝组织中 TLR2/4mRNA 表达的变化及氯喹(CQ)的干预作用,了解 TLR2/4mRNA 在 AHNP 中对肝损伤的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

SD 大鼠 70 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。动物随机分为 3 组:假手术组(S 组)10 只;胰腺炎术后 3,6,12h 时点各 10 只;CQ 治疗组术后 3,6,12h 时点各 10 只。

### 1.2 动物模型的制备

实验前大鼠禁食 12h,自由进水。胰腺炎组和 CQ 治疗组均采用逆行胰胆管牛磺胆酸钠(TAC, Sigma 公司,美国)注射制造动物模型,剂量为 5% TAC 0.1 mL/100g。CQ 治疗组在 TAC 逆行注射前 30min 经腹腔注射 CQ (Sigma 公司),剂量为 50mg/kg。S 组动物开腹后翻动肠管后关腹。胰腺炎组和 CQ 治疗组于术后 3,6,12 h 剖杀动物,S 组于术后 6 h 剖杀动物,留取静脉血和肝组织标本待测。

### 1.3 检测指标与方法

1.3.1 血清淀粉酶、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)的测定 血清淀粉酶采用碘-淀粉比色法测定(南京建成生物工程研究所);ALT 及 AST 由全自动生化分析仪测定。

1.3.2 肝组织一氧化氮(NO)和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的测定 采用硝酸还原酶比色法测定 NO (南京建成生物工程研究所);用双抗体夹心 ELISA 法测定 TNF- $\alpha$  (Enzyme 公司,美国)。具体方法按试

剂盒内说明书操作。

1.3.3 肝组织 TLR2/4mRNA 和 TNF- $\alpha$ mRNA 表达的检测 无菌留取肝组织各约 50mg,以 Trizol 一步法提取细胞总 RNA (Protégé 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'-CGCTTCCTGAACTTGTC-3'(正义链),5'-GGTTGTCACCTGCTTCCA-3'(反义链),扩增片段约为 200bp;荧光探针序列为 5'-ACTAAGAGGCGGAGCGGA-3'。TLR4 引物序列:5'-ATCATGGCATTGTTCTTTTCT-3'(正义链),5'-CTGAGAT TCTGATCCATGCATTG-3'(反义链),扩增片段约为 100bp;荧光探针的序列为 5'-TCGGTAACGACGGTTGTAG-3'。TNF- $\alpha$  引物序列:5'-CCCCTCGGAACAGGGAAGT-3'(正义链),5'-GGGTGTCCTTAGGGCAAG-3'(反义链),扩增片段约为 100bp;荧光探针的序列为 5'-CGAGGAGGCGAACCACCAA-3'。内参照  $\beta$ -actin 引物序列:5'-GAACGGTGAAGGTGACAG-3'(正义链),下游引物序列为 5'-TAGAGAG AGTGGGGTGG-3'(反义链);荧光探针的序列为 5'-ACCACAGCACCTGCGGGAT-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 SPSS12.0 统计软件包进行 *t* 检验、方差分析。

## 2 结果

### 2.1 血清淀粉酶,ALT 和 AST 水平的变化

胰腺炎组血清淀粉酶明显高于 S 组( $P < 0.01$ ),但组内各时点之间差异无统计学意义。胰腺炎组 ALT 和 AST 均明显高于 S 组( $P < 0.01$ ),且组内各特点随时间的延长而升高( $P < 0.05$ )。CQ 治疗组较之胰腺炎组,血清淀粉酶、ALT 和 AST 降低,但高于 S 组,均有统计学意义( $P < 0.05$ ) (表 1)。

表1 各组术后血清淀粉酶和 ALT, AST 水平变化 (U/L,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	例数(只)	血清淀粉酶	ALT	AST
S组(6h)	10	985 ± 159.3	66.8 ± 12.4	159.6 ± 15.4 胰腺炎组
3h	10	6790.0 ± 601.2 <sup>2)</sup>	89.5 ± 16.3 <sup>1)</sup>	357.8 ± 26.2 <sup>1)</sup>
6h	10	9564.0 ± 1923.4 <sup>2)</sup>	222.3 ± 41.5 <sup>2)</sup>	1083.7 ± 98.6 <sup>2)</sup>
12h	10	12975.0 ± 2956.3 <sup>2)</sup>	689.4 ± 112.6 <sup>2)</sup>	1465.3 ± 123.5 <sup>2)</sup>
CQ治疗组				
3h	10	3125.0 ± 662.3 <sup>1),3)</sup>	77.1 ± 13.7 <sup>1),3)</sup>	225.8 ± 21.3 <sup>1),3)</sup>
6h	10	4785.0 ± 928.1 <sup>1),3)</sup>	178.3 ± 23.5 <sup>1),3)</sup>	541.9 ± 42.3 <sup>1),3)</sup>
12h	10	5901.0 ± 1187.5 <sup>1),3)</sup>	454.2 ± 86.4 <sup>1),3)</sup>	1087.3 ± 98.5 <sup>1),3)</sup>

注:与S组比较,1)  $P < 0.05$ ,2)  $P < 0.01$ ;与胰腺炎组同一时间点比较,3)  $P < 0.05$

## 2.2 肝组织中 NO 及 TNF- $\alpha$ 浓度变化

胰腺炎组肝组织内 TNF- $\alpha$  浓度于 3 h 时点明显高于 S 组,后逐渐降低,但仍高于 S 组 ( $P < 0.01$ );而 NO 的浓度明显低于 S 组,并随时间的延长而明显降低 ( $P < 0.05$ )。CQ 治疗组肝组织 TNF- $\alpha$  明显低于胰腺炎组,但明显高于 S 组 ( $P < 0.05$ );肝组织 NO 浓度明显高于胰腺炎组 ( $P < 0.01$ ),组内随时间的延长逐渐降低 ( $P < 0.01$ ),但明显高于 S 组 ( $P < 0.01$ ) (表 2)。

表2 各组术后肝组织中 NO 及 TNF- $\alpha$  浓度变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	例数(只)	肝组织 NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	肝组织 TNF- $\alpha$ (pg/mL)
S组(6h)	10	23.41 ± 1.54	0.004 ± 0.953
胰腺炎组			
3h	10	18.42 ± 1.80 <sup>1)</sup>	7.454 ± 0.688 <sup>2)</sup>
6h	10	13.58 ± 1.37 <sup>1)</sup>	5.387 ± 0.740 <sup>2)</sup>
12h	10	6.27 ± 0.62 <sup>1)</sup>	1.002 ± 0.117 <sup>2)</sup>
CQ治疗组			
3h	10	114.44 ± 3.99 <sup>2),4)</sup>	5.186 ± 0.529 <sup>1),3)</sup>
6h	10	89.26 ± 3.85 <sup>2),4)</sup>	0.338 ± 5.628E-2 <sup>1),3)</sup>
12h	10	48.84 ± 6.31 <sup>2),4)</sup>	0.028 ± 0.307E-2 <sup>1),3)</sup>

注:与S组比较,1)  $P < 0.05$ ,2)  $P < 0.01$ ;与胰腺炎组同一时间点比较,3)  $P < 0.05$ ,4)  $P < 0.01$

## 2.3 肝组织中 TLR2/4 mRNA 的表达

TLR2/4 mRNA 在 S 组有少量表达,胰腺炎组较 S 组 3 h 时有明显升高 ( $P < 0.05$ ),6 ~ 12 h 继续升高,12 h 达到峰值;CQ 治疗组较胰腺炎组各时点明显减低 ( $P < 0.05$ ),其中以 TLR4 mRNA 表达降低最显著(表 3)。

表3 肝组织 TLR2/4 mRNA 表达的变化 ( $\Delta\text{Ct}$  值,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	例数(只)	TLR2	TLR4
S组(6h)	10	0.016 ± 0.210E-2	1.003 ± 2.274E-2
胰腺炎组			
3h	10	0.787 ± 0.751E-2 <sup>1)</sup>	1.512 ± 1.794 E-2 <sup>1)</sup>
6h	10	1.086 ± 1.738E-2 <sup>2)</sup>	2.067 ± 1.902 E-2 <sup>2)</sup>
12h	10	1.113 ± 3.141E-2 <sup>2)</sup>	2.957 ± 2.620 E-2 <sup>2)</sup>
CQ治疗组			
3h	10	0.313 ± 5.491E-2 <sup>1),3)</sup>	0.005 ± 1.419E-3 <sup>1),3)</sup>
6h	10	0.488 ± 7.442E-2 <sup>1),3)</sup>	0.010 ± 1.518 E-3 <sup>1),3)</sup>
12h	10	0.883 ± 8.911E-2 <sup>1),3)</sup>	0.024 ± 2.760 E-3 <sup>1),3)</sup>

注:与S组比较,1)  $P < 0.05$ ,2)  $P < 0.01$ ;与胰腺炎组同一时间点比较,3)  $P < 0.05$

## 3 讨论

自 Medzhitov 和 Poltorak 相继发现人类 Toll 蛋白<sup>[3]</sup>和 Toll 样受体及其生物学作用以来<sup>[4]</sup>,TLR 研究开始成为热点。TLR 是宿主细胞识别各种微生物致病成分的受体,属型跨膜受体家族,其结构特点是具有富含亮氨酸重复序列的胞外区和与 IL-1 受体同源的胞内区。TRLs 能特异性地识别病原相关分子结构(又称 TRL 的配体),通过跨膜结构将病原相关分子刺激信号转导入细胞内,产生复杂的级联信号反应,导致核转录因子- $\text{kB}$ ,干扰素诱导因子等转录因子的活化,介导了 IL-1,6,8,干扰素  $\beta$  以及 TNF- $\alpha$  等炎性介质基因的表达,引起相应炎性介质的合成和释放,进一步趋化和激活中性粒细胞,活化淋巴细胞,启动针对病原微生物的先天和获得性免疫<sup>[5-6]</sup>。因此,TRL 的缺乏

可引起有关致病微生物的识别障碍和易感,同时介导的信号还可以诱导宿主的炎症,引起炎症部位的组织损伤。其中 TLR2/4 在细菌感染中效应最显著,TLR2 可以识别革兰阳性菌的病原相关分子模式 (pathogen associated molecular pattern, PAMP),如肽聚糖、脂膜酸等;TLR4 则可以识别革兰阴性菌和白色念珠菌的 PAMP,如脂多糖 (LPS) 和热休克蛋白 (HSP) 等,从而在感染的发生发展中发挥作用<sup>[7]</sup>。通过对 TLR2 或 TLR4 基因缺失的小鼠的研究发现,TLR2 或 TLR4 基因缺失可导致机体对病原微生物易感性增强<sup>[8-9]</sup>。

AHNP 时所发生的肠道细菌和内毒素移位,则是引起 AHNP 重型化的重要一环。肠道细菌和内毒素移位致使细菌和内毒素入血,首先要经门静脉进入肝脏,在肝脏的解毒免疫作用下灭活。但当肝功能受损或进入肝脏的细菌和内毒素量超过肝的承受能力时,细菌和内毒素即可进入血液循环造成脓毒症,进一步加重组织损伤。有研究发现,严重腹腔感染中全身主要脏器的 TLRs 表达与内毒素的直接刺激密切相关<sup>[10]</sup>。AHNP 则可引起肝功能不全,甚至衰竭,所以肝脏在 AHNP 中可能扮演着重要角色。有文献<sup>[11]</sup>报道,CQ 可以抑制 TLR4,9 mRNA 的表达,从而减轻脂多糖 (LPS) 和寡脱氧核苷酸 (CpG ODN) 的损害作用。本实验应用 CQ 作为 TLRs 的阻断剂,通过观察 AHNP 肝损伤中 TLR2/4 mRNA 表达的变化规律,有助于了解其在 AHNP 肝损伤中的意义。

本实验结果显示:S 组大鼠肝组织中均有少量的 TLR2/4 mRNA 表达。胰腺炎组 3 h 时点肝组织 TLR2/TLR4 mRNA 表达开始增高,6~12 h 继续升高,TLR2 mRNA 表达 12 h 达到峰值 ( $P > 0.05$ ); TLR4 mRNA 表达也于 12 h 达到峰值 ( $P < 0.05$ )。同时肝组织中 TNF- $\alpha$  明显升高,NO 明显降低 ( $P < 0.05$ )。应用 CQ 阻断肝组织 TLR2/4 mRNA 的表达,肝组织损伤减轻,TNF- $\alpha$  浓度明显降低,NO 显著升高 ( $P < 0.05$ )。肝损伤的程度与 TLR2 mRNA 的表达及 TNF- $\alpha$  水平成正相关<sup>[12]</sup>。与由此推测:AHNP 时,肝组织 TLR2/4 基因的表达明显上调,诱导各种促炎症细胞因子的过量合成与释放,参与机体失控性炎症反应和多器官衰竭。当抑制其表达后,肝组织内促炎症细胞因子的合

成与释放降低而使肝损伤程度减轻。NO 在低浓度时具有抗炎作用<sup>[13]</sup>。本实验结果显示胰腺炎组肝组织的 NO 显著降低,抑制 TLR2/4 基因的表达后,肝组织 NO 浓度显著升高。提示 TLR2/4 基因的表达可能还抑制抗炎症因子的合成释放,加重机体失控性炎症反应。TLR2/4 基因的表达在 AHNP 肝损伤中可能起着十分重要的作用。

#### 参考文献:

- [1] Li M, Cardio DF, Zhen Y, *et al.* An essential role of the NF- $\kappa$ B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells [J]. *J Immune*, 2001,166(12):7128-7135.
- [2] Frantz S, Kelly RA, Bouncier T. Role of TLR-2 in the activation of NF- $\kappa$ B by oxidative stress in the cardiac myocytes [J]. *J Biol Chem*, 2001,276(7):5197-5203.
- [3] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. *Nature*, 1997, 388(6640):394-397.
- [4] Poltorak A, He X, Smirnova I, *et al.* Defective LPS signaling in C3H/He J and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene [J]. *Science*, 1998, 282(5396):2085-2088.
- [5] Takeda K, Akira S. TLR signaling pathway [J]. *Sem Immunol*, 2004,16(1):3-9.
- [6] Zhang D, Zhang G, Matthew S, *et al.* A Toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria [J]. *Science*, 2004,303(5663):1522-1526.
- [7] Netea MG, Van der Meer JW, Kullberg BJ, *et al.* Toll-like receptors as an escape mechanism from the host defense [J]. *Trends Microbiol*, 2004, 12(11):484-489.
- [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] 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.
- [11] Hong Z, Jiang Z, Langxi W, *et al.* Chloroquine protects mice from challenge with CpG ODN and LPS by decreasing proinflammatory cytokine release [J]. *Inter Immunopharmacol*, 2004, 4(2):223-234.
- [12] 张进祥, 吴河水, 王慧, 等. 小鼠肝缺血再灌注后样受体 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.
- [13] 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.