

· 基础研究 ·

Toll 样受体 4 在内毒素血症小鼠心肌 TNF- α 表达中的作用初探

程姝娟 薛桥 王士雯

【摘要】 目的 内毒素引起的心肌功能损害与内毒素诱导心肌局部肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor alpha, TNF- α)的产生密切相关,然而其信号转导机制尚未完全阐明。Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)是新近发现的内毒素受体。本实验旨在探讨 TLR4 受体在心肌的表达情况及其在内毒素血症小鼠心肌 TNF- α 表达中的作用。方法 以 Toll 样受体 4 基因突变型小鼠 C3H/HeJ 及野生型小鼠 BALB/C 为实验对象,给以腹腔内注射内毒素(1mg/kg)或生理盐水。注射生理盐水的小鼠作为对照。用 RT-PCR 方法,对两组小鼠心肌 TLR4 及注射内毒素前后小鼠心肌 TNF- α mRNA 表达进行检测。结果 心肌表面存在 TLR4 表达。内毒素刺激后,野生型小鼠心肌 TNF- α mRNA 表达明显增加,而突变型小鼠心肌未检测到 TNF- α 的表达。结论 TLR4 介导了内毒素血症时小鼠心肌局部 TNF- α 的表达。

【关键词】 心脏;Toll 样受体 4;肿瘤坏死因子;内毒素

Role of TLR4 in TNF- α expression in hearts of mice with LPS induced endotoxemia

CHENG Shujuan, Xue Qiao, WANG Shiwen

Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, 100853 Beijing, China

【Abstract】 Objective Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) from cardiomyocytes plays an important role in LPS-induced myocardial dysfunction. However, the signaling mechanism of LPS-induced TNF- α secretion from heart remains to be defined. TLR4 (Toll-like receptor 4) is a newly found protein responsible for LPS recognition. The present study is to investigate the role of TLR4 in LPS-induced expression of TNF- α in the hearts of mice. Methods C3H/HeJ (TLR4 mutant-type) mice and BALB/C (TLR4 wild-type) mice were challenged with same amount(1mg/kg) of LPS respectively. Their hearts were harvested at the indicated time points ($n=3$) after the challenge for the observation of TLR4 and TNF- α gene expression by reverse transcription (RT)-PCR. Mice challenged with saline served as control. Results Mutation of C3H/HeJ mice was proved by sequence analysis. TLR4 gene expression was detectable in hearts of both C3H/HeJ and BALB/C mice. Rapid and significant increase in myocardial TNF- α mRNA was observed in BALB/C mice after LPS exposure, while such response was not detected in C3H/HeJ mice. Conclusion TLR4 plays an important role in TNF- α expression in the hearts of mice with endotoxemia.

【Key words】 cardiomyocyte; Toll-like receptor 4; tumor necrosis factor; lipopolysaccharide

内毒素(endotoxin 又称脂多糖 lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌的主要致病成分,常常引起全身炎症反应并可导致多器官功能衰竭,其中心脏是最常受累器官之一^[1]。心肌功能的损害与心肌局部产生的炎症因子如 TNF- α 密切相关^[2,3]。研究证明

心肌局部炎症因子的产生,需要多种蛋白或受体参与,其中脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide-binding protein, LBP)及 CD14 的作用已有广泛论述^[4]。然而由于 CD14 是 GPI(glycosylphosphatidylinositol)连接蛋白,不具有信号转导功能^[4],因此确切的信号转导机制尚未完全阐明。TLR4 是新近发现的跨膜蛋白,与机体对内毒素的识别密切相关^[5,6]。作为重要的跨膜信号蛋白,TLR4 是否在心肌表达,与心肌局部 TNF- α 的产生是否相关,是本研究的主要内容。

收稿日期:2003-08-07

基金项目:本课题受国家 973 项目部分资助(No. G2000057004)

作者单位:100853 北京市,解放军总医院老年心血管病研究所

作者简介:程姝娟,女,1967 年 5 月生,山西省太原市人,在读医学博士,副主任医师。Tel:010-66936293

1 材料与方法

1.1 材料 用于实验器材无 RNA 酶处理的 DEPC 购于 Sigma 公司, Trizol (lot # 15596-026) 购于 Invitrogen 公司, AMV 反转录酶、Oligo (dT)₁₅ (lot # M5101) 均购于 Promega 公司, 核酸酶抑制剂 (lot # D2310A) 及 Taq 酶 (lot # DR001A) 购于宝生物工程 (上海) 有限公司。其余试剂为国产试剂。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。低温高速离心机为 Biofuge 28S 型 (Heraeus, UK), 组织机械匀浆机为 Heidolph DIAX 900 型 (Germany), 紫外分光光度计为 UV300 UV-Visible Spectrometer (Unicam 公司, 英国), 凝胶成像及分析系统为 ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech)。

1.2 方法

1.2.1 动物实验 参考国外文献报道^[7], 以近交系 BALB/C 及 C3H/HeJ 小鼠为实验对象。BALB/C 小鼠对内毒素高度敏感, 由北京维通利华实验动物研究中心提供。C3H/HeJ 小鼠, 由中国科学院上海实验动物研究所提供, 其 TLR4 基因存在点突变, 对内毒素天然耐受^[6]。72 只雌性 BALB/C 和 C3H/HeJ 小鼠, 14~16 周龄, 体重 22~25 g, 平均 (23±1.6) g, 饲养于清洁环境中, 自由饮水, 12 h 光照。各均分 2 个小组, 一组给以腹腔内注射 LPS^[9] (1 mg/kg), 来源于大肠埃希菌 0111:B4 菌株 (Sigma 公司) 200 μl, 另一组注射等量无菌生理盐水作为对照。每组再分 6 个时间点, 分别为注射 LPS 后 0、1/2、2、6、12、24 h, 每个时间点 3 只小鼠。在上述时间点, 给以腹腔内注射过量的戊巴比妥钠 (80 mg/kg) 处死小鼠, 快速低温剪取心肌组织, 用于 RNA 的提取以及随后 TLR4 及 TNF-α mRNA 的表达检测。

1.2.2 心肌组织总 RNA 的提取 小鼠处死后, 立即剪取心肌组织 50~100 mg, 按照 Trizol 说明书的操作步骤提取总 RNA。以适量无核酸酶水将 RNA 彻底溶解后, 在紫外分光光度计上检测 D_{260} 及 D_{280} , 并进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 分析 RNA 样品的纯度及浓度。上述实验中用到的所有耗材均经过无 RNA 酶以及无 RNA 酶的 DNA 酶处理。

1.2.3 TLR4 mRNA 及 TNF-α mRNA 表达的测定 心肌中 TLR4 及 TNF-α mRNA 的表达检测采用 RT-PCR 法。按照试剂使用说明, 先以心肌总 RNA 为模板, 逆转录合成 cDNA 第一链。取上述逆转录产物 2 μl 进行 PCR 反应, 反应体系为 50 μl, 包括 1.25 μl 的 Taq 酶, 终浓度为 0.4 μmol/L 的 5' 和 3' 引物。以

GAPDH (201 bp^[8]) 作为内参照, 其引物序列为: 正义链: 5'-CTCATGACCACAGTCCATGC-3', 反义链: 5'-CATTCGGGGTAGGAACAC-3'。TLR4 (540 bp^[9]) 的引物序列为: 正义链 5'-GGTCAAGGAA-CAGAAGCAGTTCTTG-3'; 反义链 5'-TCAAGCACAAT-CAAGATGACGCCAG-3'。反应条件为 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 30 s, 57℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 循环后, 72℃ 补充延伸 5 min。TNF-α (692 bp) 的引物序列为: 正义链 5'-ATGAGCACAGAAAG-CATGATCCGC-3'; 反义链 5'-CCAAAGTAGACCT-GCCCGGACTC-3'。反应条件为 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 30 s, 59℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 循环后, 72℃ 补充延伸 5 min。TLR4 及 TNF-α 的 PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 片段大小经核酸分子量标准证实。

1.2.4 PCR 产物测序 将 C3H/HeJ 和 BALB/C 小鼠 TLR4 的 PCR 产物进行测序 (上海博亚生物工程公司), 证明本实验所用 C3H/HeJ 小鼠是 TLR4 的突变型。

2 结果

2.1 小鼠心肌 TLR4 mRNA 的表达 用 RT-PCR 法对两组小鼠心肌 TLR4 mRNA 的表达进行检测。如图 1 所示, 两种小鼠心肌均检测到 TLR4 的表达, 二者无明显差别。结果与文献报道一致^[10]。

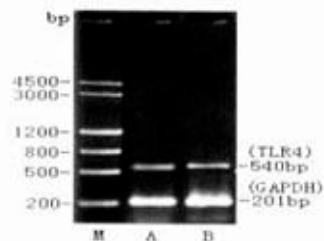


图 1 C3H/HeJ 及 BALB/C 小鼠心肌 TLR4 mRNA 表达 两种小鼠心肌均有 TLR4 mRNA 的表达, 且相互间无明显差异。A. C3H/HeJ 小鼠; B. BALB/C 小鼠; M. DNA 分子量标准

2.2 TLR4 扩增片段的测序 对 C3H/HeJ 小鼠包含突变点的 TLR4 的扩增产物和用相同引物扩增的 BALB/C 小鼠的 TLR4 PCR 产物进行测序, 并与 C3H/HeN 小鼠的序列 (GeneBank accession no. AF 110133) 比较。结果显示 C3H/HeJ 小鼠 TLR4 存在一个碱基由 C 变成 A 的突变 (图 2)。

2.3 TLR4 介导 LPS 诱导的心肌 TNF-α 的表达 对 TLR4 突变型 C3H/HeJ 小鼠及野生型 BALB/C 小鼠心

肌 TNF- α 的表达进行检测并进行比较,结果发现,腹腔内注射小剂量(1 mg/kg) LPS 后, BALB/C 小鼠心脏 TNF- α mRNA 表达迅速增加,于 30 min 达到最高,此后表达逐渐减少,12 h 后检测不到。注射 LPS 前和注射生理盐水的 BALB/C 小鼠心肌 TNF- α mRNA 无表达,而 C3H/HeJ 小鼠心肌未检测到 TNF- α mRNA 的表达(图 3A)。利用凝胶分析系统对此作进一步半定量分析,观察不同时间点 TNF- α 与 GAPDH 的比值,结果显示了类似的表达变化(图 3B)。

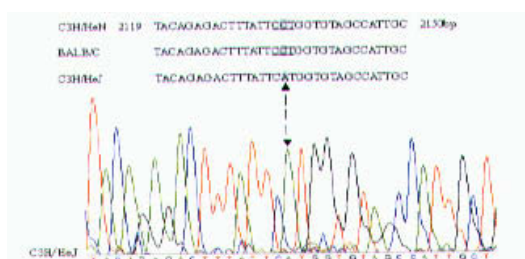


图 2 C3H/HeJ 小鼠 TLR4 基因的点突变

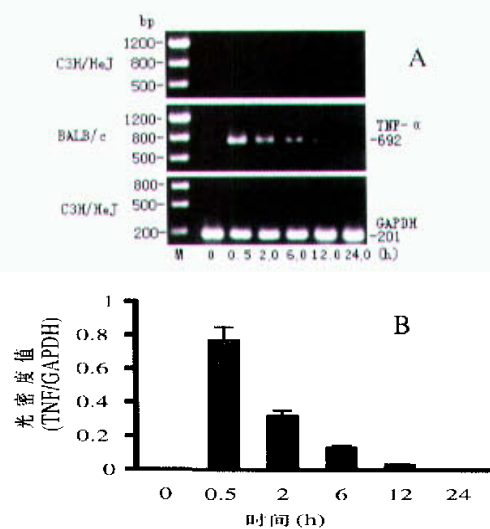


图 3 C3H/HeJ 小鼠与 BALB/c 小鼠心肌 TNF- α mRNA 表达的比较

A. 腹腔注射内毒素前后, C3H/HeJ 及 BALB/C 小鼠心肌 TNF- α mRNA 表达; M: marker, 即 DNA 分子质量标准; B. 凝胶分析系统的半定量检测结果

3 讨论

Toll 样受体是近年来发现的跨膜信号转导受体家族,与机体对病原微生物的识别以及机体的天然免疫和特异性免疫反应均密切相关。TLR4 作为其成员之一,与机体对内毒素的识别有关。研究证实

两种近交系小鼠 C3H/HeJ 和 C57BL/10ScCr 对内毒素的天然耐受是由于 TLR4 基因缺失和突变^[5],而人工敲除 Tlr4 基因使正常小鼠也对内毒素产生抵抗^[6],从而证明 TLR4 在机体对内毒素的识别中起着必不可少的作用。

BALB/C 及 C3H/HeJ 小鼠曾被国外不少学者用于 Toll 受体的研究^[7]。本研究利用该可靠的动物模型,用简单的实验方法证明在内毒素血症小鼠心肌局部 TNF- α 的产生过程中, TLR4 起着重要作用。首先,用 RT-PCR 方法,证明了 TLR4 在两种小鼠的心肌中均有表达。进一步的功能研究结果显示,内毒素刺激后 TLR4 突变小鼠心肌中 TNF- α 的表达较野生型小鼠明显减少。这些初步研究结果,即两种不同 TLR4 基因型的小鼠对内毒素刺激的不同反应以及心肌 TNF- α mRNA 的表达差异,揭示了 TLR4 与内毒素及心肌炎症因子 TNF- α 基因表达之间的内在联系。值得一提的是,本研究证明了本实验所用小鼠 C3H/HeJ 确系 TLR4 基因突变小鼠。C3H/HeJ 小鼠对 LPS 刺激天然耐受。文献报道 C3H/HeJ 的突变自然发生^[12],其位于 TLR4 编码区的点突变导致第 712 位密码子由高度保守的脯氨酸为组氨酸所替代,并由此导致了蛋白功能的改变^[5]。本实验测序结果证明了 C3H/HeJ 小鼠 TLR4 编码基因的碱基突变,与文献报道一致^[5]。这些工作作为本研究必备的背景材料,为实验结果的可信度提供了保证。

在内毒素导致的多器官功能衰竭死亡率仍居高不下的今天,本实验结果可能具有重要的临床意义。内毒素引起器官功能障碍时,心脏往往受累而且影响患者预后。约有 40% 的脓毒症患者会出现左、右心室功能障碍^[1]。一旦出现心脏并发症,患者病情急剧恶化,死亡率即由 20% 上升到 70% ~ 90%^[1]。最新的流行病学调查资料分析了 1979 ~ 2000 年间美国的脓毒症患者病例,结果表明器官衰竭将大大增加死亡率^[11]。如何减轻内毒素对脏器造成的损害,降低死亡率是临床亟待解决的问题。随着一些针对炎症因子本身治疗措施的大型临床试验的失败^[12],探索新的有效治疗途径显得尤为必要。本研究初步探讨了 TLR4 在内毒素诱导炎症因子产生乃至器官功能衰竭过程中的重要性,为寻找临床有效治疗手段提供了一种新的研究思路。另外,近期研究显示, TLR4 存在随龄变化,而且可能与机体对感染的易感性有关^[8]。由此可见,随着对 TLR4 受体的深入研究,对改善老年人群较高的感染率和减少多器官功能衰竭的发生也会产生积极作用。

参考文献

- 1 Parrillo JE, Parker MM, Natanson C. Septic shock in humans: advances in the understanding of prognosis, cardiovascular dysfunction and therapy. *Ann Intern Med*, 1990, 113: 227-242.
- 2 Kumar A, Thota V, Dee L, et al. Tumor necrosis factor α and interleukin 1β are responsible for *in vitro* myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med*, 1996, 183:949-958.
- 3 Comstock KL, Krown KA, Page MT, et al. LPS-induced TNF- α release from and apoptosis in rat cardiomyocytes: obligatory role for CD14 in mediating the LPS response. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, 30:2761-2775.
- 4 Triantafyllou M, Triantafyllou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol*, 2002, 23:301-304.
- 5 Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 1998, 282:2085-2088.
- 6 Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J Immunol*, 1999, 162:3749-3752.
- 7 Vink A, Schoneveld AH, Van Der Meer JJ, et al. *In vivo* evidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation*, 2002, 106:1985-1990.
- 8 Renshaw M, Rockwell J, Engleman C, et al. Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J Immunol*, 2002, 169:4697-4701.
- 9 Yamamoto K, Shimokawa T, Yi H, et al. Aging accelerates endotoxin-induced thrombosis: increased responses of plasminogen activator inhibitor-1 and lipopolysaccharide with aging. *Am J Pathol*, 2002, 161:1805-1814.
- 10 Baumgarten G, Knuefermann P, Nozaki N, et al. *In vivo* expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: the role of Toll-like receptor 4. *J Infect Dis*, 2001, 183:1617-1624.
- 11 Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 2003, 348:1546-1554.
- 12 Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, et al. Double-blind randomized controlled trial of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT Study II Group. *Lancet*, 1998, 351:929-933.

· 消 息 ·

第十五届长城国际心脏病学大会 & ACC2004 心脏病学进展论坛
老年心脏病学分会(征文通知)

第十五届长城国际心脏病学大会 & ACC2004 心脏病学进展论坛定于 2004 年 10 月 15 ~ 19 日在北京中国大饭店召开。老年心脏病学分会暨第三届老年心脏病学论坛将于 10 月 18 ~ 19 日举行。该分会由美国心脏病学院、中华医学会继续教育部、中国人民解放军总医院老年心血管病研究所、《中华老年多器官疾病杂志》编委会、《Journal of Geriatric Cardiology》杂志编委会及长城国际心脏病学会议组委会主办。国内外著名专家将在会议上做报告,内容有“老年心血管病研究进展”,“老年心血管相关性疾病研究进展”,“老年多病因心衰综合防治”,及“老年人多器官功能衰竭的诊治”。此外还有老年心血管介入手术演示等。

欢迎就老年心脏病学及其相关学科的基础研究、临床防治、护理康复、介入手术及上述专题投稿,优秀稿件将在《Clinical Cardiology》(美国)、《中华老年多器官疾病杂志》及《Journal of Geriatric Cardiology》上优先发表。其它稿件将编入长城心脏病会议论文汇编老年心脏病学专题中。

参加老年心脏病学分会的代表不收取注册费用,食宿自理,老年心脏病学分会将提供代表证及相应的资料。参会代表还将被授予国家医学继续教育一类学分。

征文要求:稿件采用中文或英文摘要形式,800 ~ 1000 字以内,字号为中文五号,英文 11 ~ 12 号。稿中写明作者的联系方式。请您将文章电子版以纯文本或 word 97/2000 格式发送或寄至老年心脏病学分会组委会,并在邮件主题或信封上注明“GW - ICC 老年分会投稿”字样。请自留底稿,不退稿。

征文截止日期:2004 年 8 月 10 日(以邮戳为准);稿件寄至:北京市复兴路 28 号解放军总医院老年心血管病研究所 张文莉收;联系电话:010-66936762,010-68244952,010-68244940;会议网站:<http://www.gw-icc.org>;电子邮件:zhangela@263.net。