

阻断 toll 样受体对脂多糖致急性肺损伤的保护作用^{*}

姚亚奔¹, 黄继义², 刘才文², 林建东³, 叶先龙², 洪朝基⁴, 周 荣⁵ (厦门大学附属第一医院同民分院:

1. 急诊科; 2. 内科, 福建厦门 361000; 3. 福建医科大学附属第一医院 ICU, 福州 350000;

4. 厦门医科所内科, 福建厦门 361000; 5. 厦门大学附属第一医院急诊科, 福建厦门 361000)

【摘要】 目的 本文旨在探讨阻断 toll 样受体 (TRL4) 对脂多糖 (LPS) 致急性肺损伤 (ALI) 的保护作用。**方法** 将 60 只健康雄性清洁级 SD 大鼠分为正常组、损伤组和阻断组, 每组 20 只。损伤组大鼠采用尾静脉注射 LPS (6 mg/kg) 复制 ALI 模型; 阻断组同时注射 TLR4 抗体 (10 mg/mL); 正常组给予等容积生理盐水。3 h 后处死大鼠, 采用凝胶滞留法检测核因子- κ B (NF- κ B) 活性; Western blot 印记分析法检测抑制蛋白 (I κ B- α) 水平; 检测肺组织匀浆肿瘤坏死因子 α 细胞因子 (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和白细胞介素-10 (IL-10) 水平。**结果** 与正常组相比, 损伤组和阻断组肺组织湿质量/干质量比值增高, NF- κ B 活性升高, I κ B- α 、TNF- α 、IL-1 β 水平升高 ($P < 0.05$), 而 IL-10 水平降低 ($P < 0.05$)。而比较损伤组与阻断组发现, 阻断组肺组织湿质量/干质量比值降低, NF- κ B 活性降低, I κ B- α 、TNF- α 、IL-1 β 水平明显低于损伤组 ($P < 0.05$), IL-10 水平高于损伤组 ($P < 0.05$)。**结论** 采用抗 TLR4 单克隆抗体阻断 TLR4 介导的信号传导可明显降低 NF- κ B 活性和 I κ B- α 、TNF- α 、IL-1 β 水平, 同时提高 IL-10 水平阻断 TLR4, 对 LPS 致 ALI 有一定的保护作用。

【关键词】 急性肺损伤; Toll 样受体; 单克隆抗体; 信号传导

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2014.09.008 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2014)09-1171-02

Protective effect of blocking TLR4 in lipopolysaccharide induced acute lung injury^{*} YAO Ya-ben¹, HUANG Ji-yi², LIU Cai-wen², LIN Jian-dong³, YE Xian-long², HONG Chao-ji⁴, ZHOU Rong⁵ (1. Emergency Department; 2. Internal Medicine Department, Tongmin Branch of the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, Fujian 361000, China; 3. Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, Fujian 350000, China; 4. Internal Medicine Department, Xiamen Institution of Medical Science, Xiamen, Fujian 361000, China; 5. Emergency Department, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen, Fujian 350000, China)

【Abstract】 Objective To explore the protective effect of blocking TLR4 in lipopolysaccharide (LPS) induced acute lung injury (ALI). **Methods** A total of 60 SD mice were randomly divided into control group, ALI group and ALI+TLR4 blocking group, with 20 mice for each group. ALI model were constructed by 6 intravenous injection of LPS (6 mg/kg). Mice in ALI+TLR4 blocking group were treated with anti-TLR4 antibody (10 mg/mL) at the same time. Mice in control group were treated with normal saline for the same volume as the other 2 groups. All mice were executed 3 hours after treatment and then the activity of nuclear factor (NF)- κ B, and levels of inhibition protein κ B- α (I κ B- α), tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β and IL-10 were detected. **Results** Compared with control group, ratio of wet weight to dry weight of lung tissues, activity of NF- κ B and the expression levels of I κ B- α , TNF- α and IL-1 β were significantly increased in the other two groups ($P < 0.05$), but levels of IL-10 decreased ($P < 0.05$). Compared with ALI group, ratio of wet weight to dry weight of lung tissues, activity of NF- κ B and the expression levels of I κ B- α , TNF- α and IL-1 β of ALI+TLR4 blocking group were decreased ($P < 0.05$), while levels of IL-10 was increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Application of monoclonal antibody to block signal pathway of TLR4 could significantly decrease the activity of NF- κ B and the expression levels of I κ B- α , TNF- α and IL-1 β , and increase the level of IL-10. The blockage of TLR4 might have protective effect on LPS induced ALI.

【Key words】 acute lung injury; Toll like receptor 4; monoclonal antibody; signal transduction

急性肺损伤 (ALI) 为临床上常见的急危重症之一, 主要表现为低氧血症和肺微血管通透性增加, 常由各种肺内外致病因素引起肺部失控性炎症所致。是以肺泡毛细血管损伤为基本病理特点的急性呼吸衰竭, 是急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的早期阶段^[1]。炎症反应是导致 ALI 的根本原因^[2], 而脂多糖 (LPS) 在 ALI 的发生及发展至 ARDS、多脏器功能障碍综合征 (MODS) 中起了重要作用。LPS 过度激活防御性炎症反应是致病机制之一, toll 样受体 (TRL4) 是天然免疫系统识别病原微生物的主要受体^[3]。大量研究显示 TLR4 是介导机体炎

症和免疫的桥梁, 在天然免疫反应中有着重要的作用^[4]。本文旨在探讨阻断 TLR4 对 LPS 致 ALI 的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 本研究采用的 60 只雄性清洁级 SD 大鼠均购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 体质量 20~30 g。分为正常组、损伤组和阻断组 3 个组, 每组 20 只。3 个组大鼠的年龄、体质量等一般资料差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

1.2 仪器及材料 LPS 购自美国 Sigma 公司, 产品编码为

^{*} 基金项目: 福建省厦门市翔安区科技局资助项目 (350213X)。

作者简介: 姚亚奔, 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事急诊医学研究工作。

L5543;TLR4 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,产品编码为 MTS510;大鼠肺瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,产品编码为 KRC3012;大鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β)ELISA 试剂盒和白细胞介素-10(IL-10) ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司,产品编码分别为 SR1000 和 PR1000。

1.3 实验方法 将所有大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥(40 mg/kg)对大鼠进行麻醉,起效后损伤组通过尾静脉注射 LPS(7 mg/kg)复制 ALI 模型^[5];阻断组大鼠在注射等量 LPS 的同时注射 TLR4 抗体(10 mg/mL);正常组给予等容积生理盐水。3 h 后处死大鼠。

1.4 观察指标 处死大鼠后称取大鼠肺组织湿质量,之后放进烘干机彻底烘干并计算大鼠肺组织湿质量/干质量比值。采用凝胶滞留法检测细胞核因子 κ B(NF- κ B)活性;Western blot 印记分析法检测抑制蛋白(I κ B- α)水平;检测肺组织匀浆 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 水平。

1.5 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件对结果进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用配对 t 检验,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 个组实验处理后肺组织干质量/湿质量比值比较 比较各组大鼠肺组织湿质量/干质量值发现,与正常组(3.96 ± 0.87)相比,损伤组(6.74 ± 0.92)和阻断组(4.75 ± 1.03)明显升高,且差异具有统计学意义($P < 0.05$);而与损伤组相比,阻断组比值降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 NF- κ B 活性和 I κ B- α 表达 以正常组的 NF- κ B 活性增高倍数 1.00 ± 0.13 和 I κ B- α 表达量 1.00 ± 0.25 为标准进行比较,发现损伤组和阻断组 NF- κ B 活性增高倍数分别为 3.7 ± 1.2 和 1.9 ± 0.7 ;损伤组和阻断组 I κ B- α 表达量同样存在不同程度升高,升高倍数分别为 2.6 ± 0.9 和 1.7 ± 0.8 ,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 肺组织匀浆 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 水平 损伤组和阻断组大鼠肺组织匀浆 TNF- α 和 IL-1 β 水平均较正常组存在不同程度升高($P < 0.05$);IL-10 水平在损伤组和阻断组均较正常组大鼠水平下降,但损伤组下降程度明显高于阻断组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 3 个组大鼠肺组织匀浆 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-10 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	TNF- α (ng/L)	IL-1 β (ng/L)	IL-10(μ g/L)
正常组	20	56.3 $\pm$ 9.17	8.9 $\pm$ 3.2	45.7 $\pm$ 5.9
损伤组	20	487.6 $\pm$ 86.3	34.5 $\pm$ 5.9	23.4 $\pm$ 7.8
阻断组	20	387.2 $\pm$ 75.6	23.1 $\pm$ 7.4	38.1 $\pm$ 4.6

3 讨 论

ALI 是以中性粒细胞的浸润和肺微血管损伤为主的失控性炎症反应,继发的 ARDS 常常导致较高的病死率^[6]。TRL4 是近年来发现的病原识别受体和跨膜信号传递受体,几乎在所有细胞系都有表达并参与介导多种细胞反应和多种疾病发生^[7]。细菌分泌的 LPS 能够与 TLR4 结合并激活人体固有免疫反应^[8-9],LPS 可激活 TLR4 通路从而导致 NF- κ B 的转位与相应免疫基因的活化转录,释放前炎症因子及辅助刺激分子^[10],因此 LPS 是 TLR4 信号转导作用的炎症反应、血管发生和细胞凋亡的决定因子。有文章报道 TLR4 抗体能特异性封闭阻断 TLR4^[11-13]。TNF- α 是一种由活化单核、巨噬细胞产生、作用广泛的细胞因子,是急性炎症反应的始动因子和枢纽

因子。IL-10 是一种主要由 TH2 细胞产生的酸性蛋白,是细胞因子合成抑制因子,对机体具有保护性作用^[14-16]。

本文通过应用 LPS 建立大鼠 ALT 模型并应用特异性 TLR4 单克隆抗体阻断 TLR4 介导的信号传导发现特异性阻断 TLR4 受体能够减轻大鼠肺水肿,降低 NF- κ B 活性、I κ B- α 蛋白表达、肺组织 TNF- α 和 IL-1 β 水平,并能维持 IL-10 在一定水平。因此通过使用 TLR4 特异性抗体阻断 LPS 激活的 TLR4 介导的信号传导对大鼠 ALT 有一定的保护作用。

参考文献

[1] 秦开秀,王勇,简华刚. 内毒素性急性肺损伤小鼠肺组织中 P38MAPK 的表达[J]. 重庆医学,2013,42(12):1362-1364.

[2] Akira S. Toll like receptor signaling[J]. J Biol Chem, 2003,278(40):38105-38108.

[3] 燕锦. TLR4/MyD88 信号通路与结直肠癌相关性的研究进展[J]. 肿瘤预防与治疗,2013,26(2):112-115.

[4] 刘妍,王海英,刘文莉,等. 硫化氢对油酸诱导急性肺损伤大鼠细胞外基质的调节作用[J]. 中国急救医学,2011,31(9):826-830.

[5] 叶先龙. 硫化氢对脂多糖诱导的急性肺损伤的保护作用[J]. 中国急救医学,2012,32(10):907-909.

[6] 刘晓聪,沈关心,朱慧芬,等. TLR4 基因多态性与疾病易感性的研究进展[J]. 农垦医学,2012,34(3):258-262.

[7] Doyle SL, O'neill LA. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity[J]. Biochem Pharmacol, 2006,72(9):1102-1113.

[8] Chakravarty S, Herkenham M. Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, Independent of systemic cytokines [J]. J Neurosci, 2005,25(7):1788-1796.

[9] 王磊,刘懿. TLR4 介导的信号转导通路的相关阻断研究与炎症性肠病[J]. 国际消化病杂志,2008,28(3):220-223.

[10] 陈燕飞,周丽,高音. TLR4 对脑缺血再灌注小鼠海马 IRF-3 和 IFN- β 表达的影响[J]. 医学研究杂志,2010,39(5):58-60.

[11] 孙贺,高音. TLR4 对脑缺血再灌注小鼠海马 TRIF 表达的影响[J]. 中国现代医学杂志,2010,20(4):485-489.

[12] 高音,王玉,张翠香,等. TLR4 与 TNF- α 在脑缺血再灌注小鼠海马 CA1 区神经元中的表达[J]. 神经解剖学杂志,2010,26(2):175-180.

[13] 李广军,姜银松,王占青,等. 百草枯中毒大鼠 TNF- α 、IL-10 的表达及大黄保护作用的研究[J]. 现代生物医学进展,2012,12(4):649-651.

[14] 曹树臣,张树军,房铭辉,等. 控制性肺膨胀对急性肺损伤患者的影响[J]. 河北医学,2009,15(2):200-202.

[15] 罗礼容,汤军,李丽,等. 复方丹参注射液对家兔油酸性急性肺损伤的防治作用[J]. 临床和实验医学杂志,2008,7(4):48-49.

[16] 黄永鹏,徐小彭,王孝杰,等. 肺保护性机械通气联合乌司他丁治疗急性肺损伤的临床观察[J]. 河北医学,2010,16(7):783-786.