

文章编号:1005-6947(2005)02-0114-04

· 实验研究 ·

小鼠肝缺血再灌注后 Toll 样受体 2 在缺血肝组织中的激活及其意义

张进祥¹, 吴河水¹, 王慧², 汪洋¹, 田元³, 郑启昌³

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 1. 急诊科 3. 普外科, 湖北 武汉 430022; 2. 华中科技大学同济医学院 遗传教研室, 湖北 武汉 430030;)

摘要:目的 探索小鼠肝缺血再灌注后缺血肝组织中 Toll 样受体 2 (TLR2) 的激活及其与肝功能损伤之间的关系。方法 缺血再灌注损伤组 (I/R 组), 假手术对照组 (S 组) 均采用实时荧光定量多聚酶链反应检测肝组织中 TLR2 mRNA 及 TLR2 蛋白的表达, 同时检测门静脉血浆丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 及门静脉血清内毒素 (endotoxin, EN) 水平。结果 肝脏部分缺血 1 h 再灌注 4 h 后, I/R 组与 S 组小鼠缺血肝组织 TLR2 mRNA 的表达 (Δ Ct 值) 分别为 1.06 ± 0.91 和 5.08 ± 1.32 , 两组间差异有显著性 ($P < 0.01$), I/R 组缺血肝组织 TLR2 蛋白的表达 (OD 值) (433.91 ± 25.53) 水平较 S 组 (102.86 ± 13.58) 显著升高 ($P < 0.01$)。I/R 组门静脉血清 TNF- α [(112.52 ± 14.41) pg/mL] 较 S 组 [(5.96 ± 4.43) pg/mL] 显著升高 ($P < 0.01$); I/R 组 ALT [(848.33 ± 271.37) U/L] 较 S 组 [(42.39 ± 14.75) U/L] 显著升高 ($P < 0.01$); 而门静脉血清内毒素水平组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。结论 TLR2 mRNA 及蛋白在肝脏缺血再灌注过程中缺血肝组织的表达增强, 此变化伴有 TNF- α 的升高及肝功能的损伤。

关键词: 肝缺血再灌注损伤; Toll 样受体 2; 肝功能

中图分类号: R619.9; R657.32

文献标识码: A

Significance of TLR2 expression in ischemic liver tissue after liver ischemia/reperfusion in mice

ZHANG Jin-xiang¹, WU He-shui¹, WANG Hui², WANG Yang¹, TIAN Yuan³, ZHENG Qi-chang³

(1. Department of Emergency Surgery, 3. Department of General Surgery, Affiliated Union Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 2. Department of Hereditary, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China;)

Abstract: **Objective** To explore Toll-like receptor-2 (TLR2) expression after partial liver ischemia/reperfusion (I/R) in BALB/c mice and its relationship with liver function impairment. **Methods** All the animals were randomly divided into ischemia/reperfusion injury (I/R) and sham operation (S) groups. Total RNA was extracted from the liver samples and the expression of TLR2 mRNA was analyzed quantitatively by real-time PCR method. Membrane protein was extracted, and the expression of TLR2 protein was detected by western blot method. Portal vein serum and plasma were taken for further detection of the levels of alanine aminotransferase (ALT), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and endotoxin. **Results** After 1 h of partial liver ischemia and 4 h of reperfusion, the expression of TLR2 mRNA and TLR2 protein were both remarkably upregulated in tissues of ischemic liver lobes in I/R group compared with that in S group (value of TLR2 mRNA: 1.06 ± 0.91 vs 5.08 ± 1.32 , $P < 0.01$; value of OD: 433.91 ± 25.53 vs 102.86 ± 13.58 , $P < 0.01$), as well as the levels of portal vein TNF- α and ALT (level of TNF- α : 112.52 ± 14.41 pg/ml vs 5.96 ± 4.43 pg/ml, $P < 0.01$; level of ALT: 848.33 ± 271.37 U/L vs $42.39 \pm$

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30200272)。

收稿日期: 2004-05-13; **修订日期:** 2004-10-01。

作者简介: 张进祥 (1973-), 男, 湖北武汉人, 华中科技大学同济医学院附属协和医院主治医师, 主要从事腹部外科急诊及创伤方面的研究。

通讯作者: 张进祥 电话: 027-62707120; E-mail: camelzjx@yahoo.com.cn。

14.75 U/L, $P < 0.01$)。The levels of endotoxin in portal vein remained constantly below the normal level, and the difference between both groups was not significant ($P > 0.05$)。)

Conclusions TLR2 mRNA and TLR2 protein expression were upregulated in tissues of ischemic liver lobes after partial I/R injury in mice, and were associated with increased levels of portal vein ALT and TNF- α , and impairment of liver function.

Key words: LIVER ISCHEMIA REPERFUSION INJURY; TLR2; LIVER FUNCTION

CLC number: R619.9; R657.32

Document code: A

肝脏的缺血再灌注损伤常见于肝脏移植、低容量性休克、创伤、烧伤等多种临床情况,其发生机制十分复杂,且尚未完全明确。目前已知与氧自由基、钙超载、一氧化氮、细胞黏附子等有关,NF- κ B的活化和炎症因子的瀑链式释放是其过程中的重要环节^[1]。本研究将探讨在小鼠肝脏部分缺血再灌注情况下,Toll 样受体 2 (Toll like receptor-2, TLR2) 在肝脏中的表达和变化,以进一步阐明 TLR2 的激活机制及其信号系统在肝脏缺血再灌注损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型的复制及分组

BALB/c 品系小鼠购于华中科技大学同济医学院实验动物中心,6~8 周龄,重 20~25 g,雄性。所有动物均于实验前禁食 12h,自由饮水。动物随机分为缺血再灌注(I/R)组及假手术对照(S)组 2 组。制作小鼠肝脏部分缺血再灌注模型:1%戊巴比妥钠溶液(60mg/kg 体重)腹腔注射麻醉,置小鼠于清洁手术台上,固定后,腹部正中上 1/3 经腹白线进腹,充分显露肝门区,分离支配肝脏中叶、左叶的门静脉及肝动脉,置无创血管夹阻断血流。补液 0.2 mL,缝合关闭腹腔;1h 后再次开腹,取血管夹,恢复小鼠中叶、左叶的血供,再次缝合关闭腹腔。对照组完成同样手术,但不夹闭相应血管。

1.2 样本的采集与处理

于再灌注 4h 时取缺血肝叶组织 100mg,置 0.5 mL TRIzol 溶液中充分匀浆;按 TRIzol 试剂盒说明书操作步骤抽提肝组织总 RNA,光密度值(OD)值定量后,置 -20℃ 保存备测。另取缺血肝叶组织 100mg 液氮中保存备测。同时取门静脉血清(浆),分装 -80℃ 冻存,备测 ALT, TNF- α 及内毒素。

1.3 检测项目

1.3.1 材料 TRIzol reagent (Promega 公司), TLR2 引物:上游 5'-GCCACCATTCCACGGACT-3',下

游 5'-GGCTTCCTCTTGGCCTGG-3' (Invitrogen Hongkong), 探针序列:5' (FAM) -TGGTACCTGAGAATGATGTGGGCGTG-(TAMRA) 3' (上海申友公司)。内参照 β -actin 引物:上游 5'-GCTACAGCTTCACCACCACAG-3', 下游 5'-GGTCTTTACGGATGTCACGTC-3', 探针:5' (FAM) -ATGACCTGGCCGT-CAGGCAGC-(TAMRA) 3' (上海申友公司)。另有 TLR2 多克隆抗体 (Santa Cruz Biotech. Co.)、鲎试剂定量检测试剂盒 (上海伊华临床医学科技公司)、TNF- α 酶联免疫检测 (ELISA) 试剂盒 (晶美生物工程公司)。

1.3.2 TLR2 mRNA 表达的定量检测 以 oligodT 为引物将提取的总 RNA 反转录,然后采用 25 μ l 反应体系,运用降落多聚酶链反应 (PCR) 方法对 TLR2 及内参照 β -actin 分别同时进行实时荧光定量 PCR 扩增。扩增结果采用 FTC2000 荧光 PCR 仪 (上海枫岭生物工程有限公司) 自带的实时荧光定量 PCR 分析程序分析 Ct 值,然后计算其相应 Δ Ct 值 (目的基因 TLR2 Ct 值减去内参照 β -actin Ct 值即为 Δ Ct, Δ Ct 值越小说明基因拷贝数越多)。

1.3.3 TLR2 蛋白的检测 抽提缺血肝叶肝组织 (100mg) 膜蛋白 [1 \times PBS, 1% NP40, 0.5% 去氧胆酸钠, 0.1% SDS, 临用前加入 10mg/mL PMSF, aprotinin (30 μ L/mL), 1 mol/L sodium orthovanadate (10 μ L/mL)]。定量后,样品煮沸,点样于 8.5% SDS 聚丙烯酰胺变性胶电泳分离,电转移至硝酸纤维素膜,与一抗 (TLR2 多克隆抗体, 1:200) 二抗反应后用 NBT/BCIP 显色,扫描后用凝胶分析系统定量,计算 OD。

1.3.4 其他生化检测项目 (1) 采用 Hitachi 临床生化分析仪检测门静脉 ALT 活性;(2) 血清 TNF- α 按 ELISA 提供的说明书检测;(3) 门静脉血清内毒素浓度按鲎试剂定量内毒素检测试剂盒提供的说明书操作。

1.4 统计分析

数字型结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SSPS10.0 统计

软件对实验组与对照组之间的差异进行独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 示有统计学意义。

2 结果

2.1 I/R 组中缺血肝叶 TLR2 mRNA 的表达

I/R 组与 S 组缺血肝组织中 TLR2 mRNA 的表达水平 (ΔCt 值) 分别为 1.06 ± 0.91 和 5.08 ± 1.32 ($P < 0.01$)。由于 ΔCt 值越小基因表达水平越高, 说明 I/R 组缺血肝叶 TLR2 mRNA 的表达水平明显较 S 组明显升高。

2.2 I/R 组中缺血肝叶 TLR2 蛋白的表达变化

I/R 组与 S 组缺血肝组织中 TLR2 的表达量 (OD 值) 分别为 433.91 ± 25.53 和 102.86 ± 13.58 , 两组差异显著 ($P < 0.01$) (附图)。

1: I/R 组; 2: SH 组

附图 两组缺血肝组织中 TLR2 蛋白的表达

2.3 门静脉血清内毒素, TNF- α 及 ALT 水平

I/R 组与 S 组门静脉血清内毒素水平差异无显著性 [分别为 (4.06 ± 1.35) EU/mL 和 (3.85 ± 1.45) EU/mL, $P > 0.05$], I/R 组 TNF- α 水平 [(113.52 ± 14.41) pg/mL] 较 S 组 [(5.96 ± 4.43) pg/mL] 显著升高 ($P < 0.01$)。I/R 组门静脉 ALT 水平 [(848.33 ± 271.37) U/L] 较 S 组 [(42.39 ± 14.75) U/L] 显著升高 ($P < 0.01$) (附表)。

附表 门静脉血清内毒素, TNF- α 及 ALT 水平

组别	n	内毒素 ($\times 10^{-2}$) (EU/mL)	TNF- α (pg/mL)	ALT (U/L)
I/R 组	6	4.06 ± 1.35	113.52 ± 14.41	848.33 ± 271.37
S 组	6	3.85 ± 1.45	5.96 ± 4.43	42.39 ± 14.75
t		0.26	17.48	7.26
P		>0.05	<0.01	<0.01

3 讨论

TLRs 属于 I 类跨膜受体, 其胞外区识别病原相关分子模式 (pathogen associated molecular pattern, PAMP), 而胞内则是称为 Toll/IL-1R (TIR) 的结构域, 负责刺激信号的传导。TLR2 广泛分布于单核-巨噬细胞系统、内皮细胞、树突细胞、部分消化道上皮等^[2], 多种 PAMP 如肽聚糖 (PGN)、脂磷壁酸 (LTA) 和脂蛋白以及氧应激, 氧自由基等均可激活 TLR2, 激活的 TLR2 招募胞内髓样分化蛋白 88 (myeloid differentiation protein 88, MyD88), 随后将信号传至 NF- κ B, 最终引起 TNF- α , ILs 等前炎症因子的激活, 导致多种炎症因子的瀑链式释放而产生生物学效应^[3,4]。本实验证明在小鼠肝脏缺血再灌注病理过程中, TLR2 mRNA 及蛋白在缺血肝组织中表达增加, 可能参与肝脏缺血再灌注的病理过程。

TLR2 可被脂多糖 (LPS) 激活^[5]。但是在小鼠肝脏的部分肝叶缺血再灌注损伤模型中, 由于保留肝脏右叶及尾状叶的动脉血供和门静脉回流, 可防止内毒素血症的发生^[6], 从而避免内毒素诱发的强烈炎症反应, 尤其控制了内毒素的主要成分 LPS 对 TLR2 的激活^[5]。故笔者选择在非内毒素血症状态下研究缺血再灌注损伤的机制, 以避免内毒素的干扰。本组小鼠门静脉血清内毒素水平各组间差异均无显著性, 且低于正常血清内毒素水平^[6], 此结果亦可证实这一观点。在缺血 1h 再灌注 4h 的情况下, TLR2 mRNA 及膜蛋白的表达明显增高, 表明在肝脏缺血再灌注损伤病理过程中 TLR2 被激活^[7], 正如心肌细胞 TLR2 可以被氧化刺激激活那样^[8]。尽管门静脉血清 TNF- α 及 ALT 水平 (代表肝功能损伤的程度) 亦明显升高, 但由于未进行 TLR2 基因敲除小鼠的研究 (正在进行中), 目前尚不清楚 TLR2 的激活与肝脏损伤间的因果关系。

关于 TLRs 在肝脏缺血再灌注损伤病理过程中的作用及其意义的研究尚不多见。吴河水等^[9] 从对 TLR4 先天缺失品系小鼠 C3H/HeJ 及其野生型 C3H/HeouJ 进行对照研究时发现, TLR4 参与了小鼠肝脏部分缺血再灌注损伤的病理过程, 而且小鼠枯否细胞表面 TLR2 在肝脏 I/R 中表达增加^[10], 由于 TNF- α 等炎症因子在缺血再灌注损伤中扮演着重要角色^[11], 而 Toll 样受体是控制机体固有免疫的重要触发点, 其激活可以引起包括

TNF- α 在内的剧烈的炎症因子释放。因此,对 Toll 样受体在肝脏缺血再灌注损伤中的作用机制的进一步研究将有助于阐明固有免疫的启动与机体基本应激反应性损伤之间的联系,并可能从炎症反应起点控制的角度揭开炎症因子参与缺血再灌注损伤发生发展的机制。

参考文献:

- [1] Nakamitsu A, Hiyama E, Imamura Y, *et al.* Kupffer cell function in ischemic and nonischemic livers after hepatic partial ischemia/reperfusion [J]. *Surg Today*, 2001, 31(2): 140-148.
- [2] Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, *et al.* Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors [J]. *J Immunol*, 2000, 164(2): 966-972.
- [3] Yang RB, Mark MR, Gray A, *et al.* Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling [J]. *Nature*, 1998, 395(6699): 284-288.
- [4] Funaki H, Shimizu K, Harada S, *et al.* Essential role for nuclear factor kappaB in ischemic preconditioning for ischemia-reperfusion injury of the mouse liver [J]. *Transplantation*, 2002, 74(4): 551-556.
- [5] Matsuguchi T, Musikacharoen T, Ogawa T, *et al.* Gene expression of toll-like receptor 2, but not toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages [J]. *J Immunol*, 2000, 165(10): 5767-5772.
- [6] Suzuki S, Nakamura S, Sakaguchi T, *et al.* Pathophysiological appraisal of a rat model of total hepatic ischemia with an extracorporeal portosystemic shunt [J]. *J Surg Res*, 1998, 80(1): 22-27.
- [7] Zhang Jinxiang, Wu Heshui, Wang Lin, *et al.* TLR2 mRNA upregulation in ischemic lobes in mouse partial hepatic ischemia/reperfusion injury model [J]. *J HUST (Med Sci)*, 2004, 24(2): 144-146.
- [8] Frantz S, Kelly AR, Bourcier T. Role of TLR2 in the activation of nuclear factor- κ B by oxidative stress in cardiac myocytes [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(7): 5197-5203.
- [9] 吴河水,王琳,田元,等. Toll 受体参与肝脏缺血再灌注损伤 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11(7): 424-426.
- [10] 吴河水,王峰,王琳,等. 小鼠肝缺血/再灌注损伤时肝脏 Kupffer 细胞中 TLR2 的表达 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(8): 591-593.
- [11] Colletti LM, Remick GD, Burch SL, *et al.* Role of tumor necrosis factor- α in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat [J]. *J Clin Invest*, 1990, 85(6): 1936-1943.

院士荐书:《普通外科肿瘤学》

自维也纳外科医生 C. A. Theodor Billroth 首先打开腹腔至 20 世纪末,普通外科已形成理论与实践并重,基础与临床结合,深邃宽广,自成体系的一门应用科学,其内涵也已远远超出手术的范围,涉及理论的更新,技术的突破,特别是某些传统观念的变革。随着人们对自身疾病认识的深入,以传统疾病分科的传统模式遭遇到挑战,疾病专科的归属正在进行重新组合。从传统的普通外科已陆续分出肝脏外科、胆道外科、胰腺外科、肛肠外科、血管外科、移植外科等分支,林林总总,争奇斗艳。生根发芽于普通外科领地的肿瘤外科,形成于外科学“枝繁”之时,成长于肿瘤学壮大之际,经历一个多世纪的演进,仍显现出与传统普通外科的血脉相通。

与外科休克、感染、创伤一样,传统普通外科有着阐述外科治疗肿瘤的经典理论。早在 1890 年美国外科医生 William Stewart Halsted 就首先提出——乳癌手术时将乳腺连同覆盖其上的皮肤、乳头、胸肌以及腋窝内容一并“整块”切除的根治术,建立了恶性肿瘤根治的概念。随后的三四十年里,普通外科范畴的脏器肿瘤由多位外科医生描述了相应的根治术,如 Crile 的颈淋巴结清扫术、Miles 的直肠癌根治术、Whipple 的胰十二指肠切除术等。这些记载传统的普通外科走向鼎盛的一座座里程碑,也为肿瘤外科的分支奠定了基础。

回顾近二百年间的每位外科学巨匠,如 Billroth、Kocher、Halsted 等作为普通外科医生都曾为“根除”肿瘤投入了巨大的心血,建立了肿瘤的外科治疗原则,确立了外科手术在肿瘤治疗中的地位。到了 20 世纪,传统外科的手术技术已经成熟,限制着外科发展的已不是手术技巧本身而是围绕着外科的“软件”,深部 X 线机的研制和氮芥治疗淋巴瘤开辟了肿瘤治疗的新战场,单纯追求外科手术的治疗也受到挑战。近 50 年来,肿瘤的外科治疗也从单纯外科扩大手术,演变为改良手术,并结合综合治疗达到提高生存率及生存质量等疗效,“最大限度切除肿瘤,尽最大努力保护机体及器官功能,达到提高生存率及生存质量的目的”成为新的准则。

传统普通外科范畴的肿瘤是到知识更新的时候了。石景森教授是我国有造诣的普通外科学专家,对普通外科肿瘤的诊疗具有丰富的经验,他精心组织全国 30 余位专家教授,结成一百余万字的硕果在人民军医出版社出版,冠以《普通外科肿瘤学》,用意深远,开九州之先河;笔锋如刀,刻画出普通外科肿瘤的一片天地。本书为广大普通外科医生增添了一部很好的参考书,也成为我国普通外科学与肿瘤学之间学术交流的见证,必将促进外科肿瘤学的前进与发展。

中国工程院院士 黄志强

2005 年 1 月