论著

文章编号:1000-5404(2006)02-0140-04

脂多糖结合蛋白多抗对大鼠肺泡巨噬细胞内毒素耐受性及Toll样受体4表达的影响

张德明[1],邓青南[2],李永旺[1],毛宝龄[1],钱桂生[1] ([1]第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037;[2]广州军区广州总医院老年呼吸内科,广州 510010)

提 要: 目的 观察脂多糖结合蛋白(lipopolysaccharide binding protein, LBP)多抗对大鼠肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, ΦAM)内毒素(lipopolysaccharide, LPS)耐受性与Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)表达的影响,研究二者之间的联系。**方法** 将从32只Wistar雄性大鼠分离所得ΦAM,按随机数字法等分为正常对照组(A)、LPS单次刺激组(B)、LPS二次重复刺激组(C)和LPS二次重复刺激+LBP多抗组。运用ELISA和RT-PCR方法分别检测各组大鼠ΦAM分泌肿瘤坏死因子-α(TNF-α)及TLR4 mRNA表达的变化,Western blot检测TLR4蛋白表达的变化。**结果** 大鼠ΦAM TNF-α分泌和TLR4 mRNA表达及TLR4的蛋白表达水平,A组分别为:(0.45 ± 0.01),(0.77 ±0.06),(51.03 ±1.19) μg/L,B组分别为:(0.76 ± 0.03),(1.55 ±0.25),(122.72 ±1.75) μg/L,B组与A组比较显著增加,$P<0.01$;C组分别为:(0.49 ± 0.05),(1.13 ±0.07),(85.35 ±0.68) μg/L,C组与B组比较,明显减少,$P<0.05$。D组分别为:(0.28 ± 0.07),(0.78 ±0.17),(61.06 ±1.36) μg/L,D组与C、B组比较,明显减少($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** LPS重复刺激可使大鼠ΦAM对LPS产生耐受性;LPS耐受性的产生与TLR4表达下降相关;LBP多抗通过降低TLR4表达,提高大鼠ΦAM对LPS耐受性,此乃LBP抗体可用于治疗LPS所致急性肺损伤的部分分子生物学理论基础。

关键词: 脂多糖结合蛋白多抗;肺泡巨噬细胞; 内毒素, 耐受性 ; Toll样受体4

中图法分类号: R322.35;R392.11;R392.12 **文献标识码**: A

Effects of polyclonal lipopolysaccharide binding protein antibody on the expression of Toll-like receptor 4 and tolerance to lipopolysaccharide in alveolar macrophages of rats

ZHANG De-ming[1], DENG Qing-nan[2], LI Yong-wang[1], MAO Bao-ling[1], QIAN Gui-sheng[1] ([1]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, [2]Department of Gerontological Respiratory Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command Area, Guangzhou 510010, China)

Abstract: Objective To explore the effects of polyclonal lipopolysaccharide binding protein (LBP) antibody on the expression changes of Toll-like receptor 4 (TLR4) and the tolerance to lipopolysaccharide (LPS) in alveolar macrophages (ΦAM) of rats. **Methods** The ΦAM obtained from 32 Wistar male rats were randomly divided into control group (A), LPS single stimulating group (B), LPS re-stimulating group (C) and LPS re-stimulating plus polyclonal LBP antibody group (D). TNF-α concentration and TLR4 mRNA expression were measured by ELISA and semi-quantitive reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) respectively in ΦAM of each group. The expression of TLR4 protein was measured by Western blotting. **Results** The TNF-α concentration and TLR4 expression in the ΦAM stimulated with single dose LPS (100 ng/ml) were highly increased compared with the control group, but significantly decreased after re-stimulated with two dose of LPS (100 ng/ml and 500 ng/ml) and the reduction was more overt in group D. **Conclusion** The tolerance to LPS in ΦAM can be induced by re-stimulation with LPS. The down-regulated expression of TLR4 is related to

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39730210)

Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (39730210)

作者简介:张德明(1964-),男,湖南省沅江市人,博士,副主任医师,主要从事急性肺损伤方面的研究,现在广州军区广州总医院老年呼吸内科。电话:(020)36653349

通讯作者:毛宝龄,电话:(023)68774820

收稿日期:2005-02-20;**修回日期**:2005-05-17

the tolerance to LPS. Poly-clonal LBP antibody can enhance ΦAM tolerance to LPS by decreasing TLR4 expression and the antibody is presumably eligible on the basis of molecular biology for the treatment of acute lung injury induced by LPS.

Key words: lipopolysaccharide binding protein antibody; alveolar macrophage; lipopolysaccharide, tolerance; Toll-like receptor 4

内毒素(lipopolysaccharide, LPS)耐受性与其靶细胞信号转导的跨膜受体——Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)的结构与功能及表达量有关[1,2],但尚存争议[3]。我们既往研究表明TLR4表达下降是LPS耐受性产生的重要原因[4]。降低TLR4的表达从而提高对LPS的耐受性,有望增强机体对LPS的抵抗力。我们用LPS二次重复刺激大鼠肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, ΦAM)的方法,诱导大鼠ΦAM对LPS耐受性的产生,运用ELISA、RT-PCR与Western blot的方法,分别检测其分泌肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、TLR4 mRNA与蛋白表达水平的变化,并观察LBP多抗对它们的影响。企以说明LBP多抗通过降低TLR4表达效能,增加大鼠肺泡巨噬细胞对LPS的耐受性,提高机体对G^-菌感染的抵抗力。为LBP多抗治疗LPS所致的急性肺损伤提供部分新的理论依据。

1　材料与方法

1.1　动物与试剂

Wistar雄性大鼠32只(第三军医大学实验动物中心提供),体质量200~250 g。LPS(*E. Coli.* O111:B4):Sigma公司;谷氨酰胺、小牛血清FCS、D-Hanks液、RPMI1640:Hyclone公司;RNA抽提剂Tripure:Roche公司;DNA聚合酶*Taq* DNA Polymerse,逆转录酶AMV Reverse Transcriptase, dNTP, Rnase inhibitor, 购于Takara公司;Oligo dT18:上海Sangon;PCR Maker:华美公司;肿瘤坏死因子-α(TNF-α)ELISA试剂盒:Genzyme公司;LBP多抗为本所制备[5];其他试剂均为国产分析纯。

1.2　肺泡巨噬细胞的分离与培养及分组处理

参照Wang等[6]方法略加改进,大鼠氯胺酮(100 mg/kg)腹腔麻醉后即行气管插管,冰D-Hanks液100 ml分次灌洗双肺,回收灌洗液即4 000 r/min×10 min,4 ℃离心,沉淀用生理盐水3 ml重悬、再离心,反复洗涤3次,然后用RPMI1640培养液4 ml重悬置6孔培养皿中,于孵箱中37 ℃、5% CO_2孵育2 h后,轻轻吸出上清,去除非贴壁细胞。将从32只大鼠分离、培养的肺泡巨噬细胞随机数字法分为4组,A组为正常对照组,B组为LPS单次刺激组,C组为LPS二次重复刺激组,D组为LPS二次重复刺激+LBP多抗组。参照Li等[7]方法,A组细胞用含有10% FCS 2 mmol/L谷氨酰胺100 U/ml青霉素100 μg/ml链霉素的RPMI1640液4 ml重悬,置孵箱37 ℃、5% CO_2孵育12 h。B组细胞在A组培养液的基础上加入终浓度为100 ng/ml LPS孵育12 h。C组细胞在B细胞处理基础上加终浓度500 ng/ml LPS后再孵育12 h,D组细胞在B细胞处理基础上加终浓度500 ng/ml LPS和100 ng/ml LBP多抗后再孵育12 h。

1.3　RT-PCR检测肺泡巨噬细胞TLR4 mRNA表达水平的变化

1.3.1　肺泡巨噬细胞总RNA抽提与纯化　从孵箱取出6孔培养皿,倒出培养液,用生理盐水反复清洗3次,去除非贴壁细胞。每孔加入Tripure 1 ml,用吸管反复吹打混匀至粘稠状,室温静置5 min,以确保完全分离核蛋白复合物。再按如下步骤抽提与纯化RNA:将上述液体移入EP离心管中,加入氯仿0.2 ml,振荡15 s,室温静置15 min,12 000 r/min×15 min,4 ℃离心,取上清加入异丙醇0.5 ml混匀,室温静置5~10 min,12 000 r/min×10 min,4 ℃离心,弃上清,加入70%乙醇1 ml,反复滚动EP管约1 min,轻轻吸出上清,室温垂直放置20~30 min凉干。加入DEPC水20 μl溶解。留取1 μl待测RNA浓度。

1.3.2　逆转录(RT合成第1条链cDNA)　在PCR管中建立如下反应体系:总RNA 1 μg、Oligo$(dT)_{18}$(0.5 μg) 1 μl、Rnasin (40 U/μl) 1 μl、DEPC水9 μl,短暂离心→振荡混匀→短暂离心;在PCR仪中70 ℃变性10 min,立即冰浴5 min,依次加入如下试剂:5×RT-buffer 4 μl、dNTP (10 mmol/L) 1μl、AMV (10 U/μl) 1 μl。短暂离心→振荡混匀→短暂离心;在PCR仪中,42 ℃反应60 min,95 ℃变性10 min,立即冰浴,-20 ℃保存。

1.3.3　聚合酶链式反应(PCR) TLR4引物的设计　从GenBank中查到大鼠TLR4 mRNA序列号分别为AF057025,用Gene Toll软件设计引物为:TLR4:上游引物F:5′-GCCGGAAAGTTATTGTGGTGGT-3′,下游引物R:5′- ATGGGTTTTAGGCGCAGAGTTT -3′,扩增产物为356 bp;内参照β-actin引物序列如下:F:5′-CAAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3′,R:5′-AGGGTACATGGTGGTGCCGCCAGAC-3′,扩增产物为587 bp。PCR反应条件:预变性95 ℃ 2 min后,变性94 ℃ 45 s,退火52 ℃ 60 s,延伸72 ℃ 90 s;35个循环后,最后延伸72 ℃ 10 min。

1.3.4　PCR产物的电泳鉴定　取各样本PCR产物10 μl和1 μl上样缓冲液混匀后,加于2%琼脂糖凝胶电泳槽齿孔中,取PCR标准同时电泳,作为标准分子量参照。1×TBE 50V恒压电泳40~60 min,取胶置凝胶成像系统中,紫外光下拍照,结果扫入电脑备处理。

1.4　Western blot检测TLR4蛋白表达水平

蛋白提取和定量后,即行7.5%聚丙烯酰胺凝胶变性电泳(SDS-PAGE),随后将胶放于半干电转仪上,按20 V×400 mA×8 W,1 h进行转膜。杂交按博士得公司试剂盒说明书进行。TLR4一抗(由第三军医大学野战外科研究所杨清武博士馈赠)按1:500稀释,二抗按1:400稀释,结果扫入成像系统电脑,并

计算各曲线下的光密度值。

1.5 TNF-α 浓度的测定

各组细胞培养液上清中 TNF-α 浓度按照 Genzyme 公司 ELISA 试剂盒说明书进行检测。

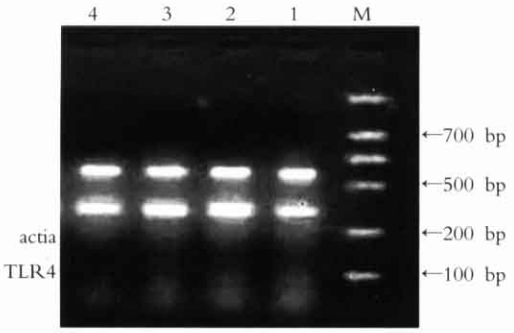
1.6 统计学处理

电泳条带密度值以灰度×面积/参照物的该值表示。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，运用 SPSS 10.0 软件进行 F 检验。

2 结果

2.1 各组细胞 TLR4 mRNA 表达的变化

从表 1 与图 1 可知，B 组细胞 TLR4 mRNA 表达显著高于正常 A 组，C、D 组细胞表达显著低于 B 组，而 D 组表达又显著低于 C 组。



1：A 组；2：B 组；3：C 组；4：D 组；M：标准

图 1 各组大鼠肺泡巨噬细胞 TLR4 mRNA 表达结果 （RT-PCR）

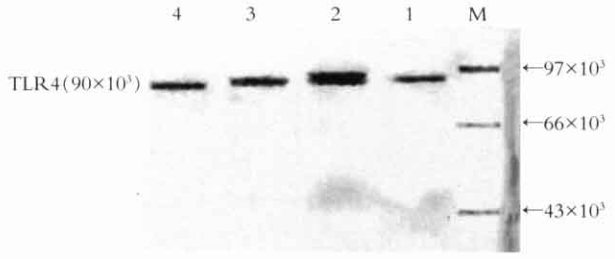
2.2 各组细胞 TLR4 蛋白表达变化

如表 1 和图 2 所示，B 组 TLR4 蛋白表达显著高于正常 A（$P < 0.01$）组，C、D 组细胞表达显著低于 B 组（$P < 0.05$），而 D 组表达又显著低于 C 组（$P < 0.05$）。

表 1 各组大鼠肺泡巨噬细胞 TLR4 mRNA 与蛋白表达和肿瘤坏死因子-α 浓度变化（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	TLR4 mRNA	TLR4 蛋白	TNF-α（ρ_B/μg·L^{-1}）
A	8	0.77 ± 0.06	51.03 ± 1.19	0.45 ± 0.01
B	8	1.55 ± 0.25[a]	122.72 ± 1.75[a]	0.76 ± 0.03[a]
C	8	1.13 ± 0.07[b]	85.35 ± 0.68[b]	0.49 ± 0.05[b]
D	8	0.78 ± 0.17[cd]	61.06 ± 1.36[cd]	0.28 ± 0.07[cd]

a：$P < 0.01$，与 A 组比较；b：$P < 0.05$，c：$P < 0.01$，与 B 组比较；d：$P < 0.05$，与 C 组比较



1：A 组；2：B 组；3：C 组；4：D 组；M：标准

图 2 各组大鼠肺泡巨噬细胞 TLR4 蛋白表达结果 （Western blot）

2.3 各组细胞上清 TNF-α 浓度变化

从表 1 可看出，B 组细胞分泌的 TNF-α 显著高于正常对照 A 组，C、D 组细胞分泌的 TNF-α 显著低于 B 组。而 D 组表达又显著低于 C 组。

3 讨论

不同个体感染 G$^-$ 菌后临床表现轻重不一，说明个体对 LPS 的反应性不同，即对 LPS 耐受性（tolerance）存在差异。LPS 耐受性是指细胞或机体经低剂量 LPS 刺激后，对 LPS 的再次刺激呈低反应性或无反应状态[8]。LPS 耐受性机制还不完全清楚，它与机体的免疫力、LPS 的内化、LPS 信号转导效率等综合因素有关。其中 LPS 靶细胞膜上的跨膜受体 TLR4 的结构与功能及其介导的信号通路，与 LPS 耐受性关系尤其密切。

既往研究表明，LPS 胞外的信号转导是通过脂多糖结合蛋白 LBP 呈递给 CD14 来实现，而胞内则是通过 IL-1 受体相关激酶（IL-1 receptor associated kinase，IRAK）、TNF-α 受体相关激酶 6（TNF-α receptor associated kinase 6，TRAK-6）使 IκB 激活，活化的 IκB 再使 NF-κB 磷酸化后转位，炎症因子开始转录、翻译和表达。LPS 信号由胞外向胞内的转导即跨膜转导一直尚不明确，近年 TLR4 的发现提供了新的线索，它作为 LPS 靶细胞膜上的跨膜受体蛋白（90×10^3），其胞外的亮氨酸重复序列可以识别和结合 LPS，而胞内与 IL-1β 同源的尾状结构域，为将 LPS 信号呈递给 IL-1β 提供了可能性，且得到部分实验的证实[9]。故 TLR4 结构与功能的完好及必要的表达量是保证 LPS 信号转导完成的关键。

TLR4 表达的下调导致 LPS 耐受性的产生，且 LPS 耐受程度与 TLR4 表达下调量之间呈正相关。Nomura 等[10]用不同剂量 LPS 二次重复刺激小鼠腹腔巨噬细胞，发现炎症因子的分泌与 LPS 的剂量和 LPS 处理后的时间呈依赖性的减少，同时 TLR4 的表面表达（surface expression）在 1 h 内即开始呈持续性梯度下降，并保持达 24 h，炎症因子与 TLR4 下调呈很好的正相关，这可能是 LPS 耐受程度与 TLR4 的下调呈正相关的机制。并相继得到许多学者的支持[3,6]。

LPS 耐受性的产生还与 LPS 的刺激剂量有关。小剂量 LPS（≤100 ng/ml）重复刺激不但无法诱导 LPS 耐受性的产生，反而可能有碍 LPS 耐受性的形成。因为小剂量 LPS 刺激细胞产生的干扰素与粒细胞刺激集落因子，抑制 IRAK 的降解与强化 MyD88 的表达，促进 NF-κB 的活化、炎症因子分泌增多[11,12]。

我们的实验结果表明，LPS 刺激大鼠肺泡巨噬细胞 TNF-α 的分泌和 TLR4 mRNA 和蛋白的表达，低剂量 LPS（100 ng/ml）刺激大鼠肺泡巨噬细胞 12 h 后，再

用较大剂量 LPS（500 ng/ml）刺激，上述表达显著下降，TNF-α 的分泌减少。LBP 多抗进一步降低以上表达水平，减少 TNF-α 的分泌。此显示：① LPS 重复刺激可使大鼠肺泡巨噬细胞对其产生耐受性；② LPS 耐受性产生与 TLR4 介导的 LPS 信号转导效能下降相关，TLR4 表达量与功能下调是 LPS 耐受性产生的重要原因之一。③ LBP 多抗通过降低 TLR4 介导的 LPS 信号转导效能，增加大鼠肺泡巨噬细胞对 LPS 的耐受性，提高机体对 G^- 菌感染的抵抗力，此乃 LBP 多抗治疗 LPS 所致的急性肺损伤可能的部分理论依据。

参考文献：

[1] QURESHI S T, LARIVIERE L, LEVEQUE G, *et al*. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (TLR4) [J]. J Exp Med, 1999, 189(4): 625 - 625.

[2] ARBOUR N C, LORENZ E, SCHUTTE B C, *et al*. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans [J]. Nat Genet, 2000, 25(2): 187 - 191.

[3] MEDVEDEV A E, HENNEKE P, SCHROMM A, *et al*. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4 [J]. J Immunol, 2001, 167(4): 2257 - 2267.

[4] 张德明，李永旺，毛宝龄，等. 大鼠肺巨噬细胞内毒素耐受性与 TLR4 mRNA 表达的变化[J]. 第三军医大学学报，2003，25(5)：380，384.

[5] 李永旺，张德明，麻　莉，等. 脂多糖结合蛋白的分离、纯化及其多抗的制备[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2002，18(6)：608 - 610.

[6] WANG M J, JENG K C, SHIH P C, *et al*. Differential expression and regulation of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-2 genes by alveolar and peritoneal macrophages in LPS-hyporesponsive C3H/HeJ mice [J]. Cell Immunol, 2000, 204(2): 88 - 95.

[7] LI L, COUSART S, HU J, *et al*. Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells [J]. J Bio Chem, 2000, 275(30): 23340 - 23345.

[8] LEHNER M D, MORATH S, MICHELSEN K S, *et al*. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators [J]. J Immunol, 2001, 166(8): 5161 - 5167.

[9] 张德明，毛宝龄. 内毒素耐受性与 TLR4 信号通路[J]. 生理科学进展，2003，34(3)：277 - 279.

[10] NOMURA F, AKASHI S, SAKAO Y, *et al*. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression [J]. J Immunol, 2000, 164(7): 3476 - 3479.

[11] REDDY R C, CHEN G H, NEWSTEAD M W, *et al*. Alveolar macrophage deactivation in murine septic peritonitis: role of interleukin 10 [J]. Infect Immun, 2001, 69(3): 1394 - 1401.

[12] 张德明，李永旺，毛宝龄，等. LBP 多抗对内毒素急性肺损伤大鼠肺泡巨噬细胞 IL-10、IL-18 基因表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2004，26(10)：867 - 870.

（编辑　龙　亮）

（上接 139 页）

3　讨论

颅内动脉狭窄的支架置入术是颅内动脉狭窄治疗的一种新的有效的方法。目前颅内动脉狭窄支架治疗还没有统一的、被大家广泛接受的适应证。结合各家的报道，颅内动脉狭窄支架成形术指征：①症状性，反复发作性，药物难以控制的低血流量性 TIA。②颅内动脉狭窄的部位与病人的 TIA 症状有明确的关系。③造影证实的动脉狭窄，狭窄率 > 50%，病变形态学分型为 A、B 型病变，C 型病变应当慎重之。④其他检查提示狭窄相应区域有明显的血流动力学异常或缺血，如 TCD 检查显示该狭窄段有明显的血流速度增高；或有关的血流灌注检查显示相应区域缺血或 Diamox 激发试验异常[2,3]。

在手术操作中必须考虑以下几点因素：①要安全地将支架输送至病变部位。本例患者治疗主要困难在于支架通过颅内动脉虹吸段。有国外的学者认为选择年轻的、虹吸段成角较小的患者可以提高手术的成功率[4]。该例成功实施支架置入，与术前将支架稍加塑形（注意不能过度塑形，以防支架的断裂）有关。②支架的植入是否会影响 M1 段发出的穿支纹动脉。③选择合适的支架：支架要求具有足够的柔韧性和超弹性，支架外径与动脉内径之比在（1 ~ 1.2）：1 之间[5]。④置入支架后的 30 min 内，密切观察病人反应并即时做血管造影了解支架位置，如发现支架上有或疑有血栓形成则立即给予溶栓治疗以免支架闭塞。⑤术后给予有效的抗凝和抗感染治疗。

关键词：血管内支架形成术；动脉狭窄；脑缺血
中图法分类号：R741.05　　文献标识码：B

参考文献：

[1] HARTMANN M, JANSEN O. Angioplasty and stenting of intracranial stenosis [J]. Curr Opin Neurol, 2005, 18(1): 39 - 45.

[2] SCHUMACHER H C, KHAW A V, MEYERS P M, *et al*. Intracranial angioplasty and stent placement for cerebral atherosclerosis [J]. J Vasc Interv Radiol, 2004, 15(1 Pt 2): S123 - S132.

[3] JIANG W J, WANG Y J, DU B, *et al*. Stenting of symptomatic M1 stenosis of middle cerebral artery: an initial experience of 40 patients [J]. Stroke, 2004, 35(6): 1375 - 1380.

[4] ELAD L, MICHAEL H, TUDOR J, *et al*. Successful management of post - tumor resection middle cerebral artery thrombosis with stent-assisted angioplasty and thrombolytic therapy: case report [J]. Neurosurgery, 2004, 55(3): 713.

[5] The SSYLVIA Study Investigators. Stenting of symptomatic atherosclerotic lesions in the vertebral or intracranial arteries (SSYLVIA): study results [J]. Stroke, 2004, 35(6): 1388 - 1392.

（编辑　陈聪连）