文章编号:1000-5404(2009)15-1421-04

论著

创伤感染时巨噬细胞表面模式识别受体表达、相互作用及其与炎症反应发生的关系

杨 策,陈永华,黄 宏,王海燕,谢国旗,蒋建新 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室,全军交通医学研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

摘 要:目的 从免疫细胞表面模式识别受体水平揭示创伤感染条件下炎症反应的发生机制,为探寻有效调控炎症反应的措施提供新思路。**方法** 选择小鼠内毒素血症、盲肠结扎穿孔、肺泡巨噬细胞免疫刺激模型,以免疫组织化学法和RT-PCR法检测主要模式识别受体的表达;利用细胞转染模型研究CD14、TLR4、MD-2相互作用及其与跨膜信号转导的关系。**结果** 免疫细胞清道夫受体和CD14、TLR4、MD-2,分别呈现下调和上调表达,且转染CD14、TLR4和MD-2 3种表达质粒的HEK293细胞株对FITC-LPS结合率最强($P<0.05$),在内毒素刺激后NF-κB活性、TNF-α分泌最显著($P<0.05$)。**结论** 免疫细胞表面防御性受体下调和效应性受体上调参与炎症反应失控过程,调控模式识别受体表达对减轻机体炎性损伤有重要意义。

关键词: 模式识别受体; 内毒素; 创伤和损伤
中图法分类号: R392.12; R392.3; R63 **文献标识码:** A

Expression of pattern recognition receptors on macrophages, their interaction and relationship with development of inflammatory response in traumatic infection

YANG Ce, CHEN Yong-hua, HUANG Hong, WANG Hai-yan, XIE Guo-qi, JIANG Jian-xin (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department 4, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the possible mechanisms of traumatic infection-related inflammation via the pattern recognition receptors (PRRs) in innate immunocytes and provide the new idea for the measures in modulation of the excessive inflammatory responses. Methods The models of endotoxemic mice, cecal ligation and puncture, and immmunostimulated alveolar macrophages were used for the assay of PRRs by immunohistochemistry and reverse transcription PCR method. HEK293 cells co-transfected plasmids expressing CD14, TLR4 and MD-2 or two of them were stimulated with lipopolysaccharide (LPS) at the dose of 100 ng/ml for the determination of NF-κB and tumor necrosis factor (TNF)-α. Results SR was up-regulated while the expressions of CD14, TLR4 and MD-2 were down-regulated in innate immunocytes. The HEK293 cells co-transfected three types of plasmids enhanced the sensitivity to LPS binding and stimulation as compared with HEK293 cells co-transfected two of them ($P<0.05$), followed with the significant translocation of NF-κB and TNF-α secretion ($P<0.05$). Conclusion Our data strongly indicate that the significant correlation between uncontrolled inflammatory responses and the imbalance between defensive receptors and effector receptors. The strategy of moderate regulation of PRRs can be a promising strategy in immunomodulation of inflammatory injuries.

Key words: pattern recognition receptors; endotoxin, innate immune; trauma and injury

---

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2005CB522602,1999054203),全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G080)
Supported by the National Basic Research Program (973 Program, 2005CB522602, 1999054203), and the Tackling Program of the "Eleventh Five-Year Plan" of PLA (06G080)

作者简介: 杨 策,男,山西省大同市人,博士,助理研究员,主要从事创伤基础方面的研究。E-mail:yangce@mail.tmmu.com.cn
通信作者: 蒋建新,E-mail:jiangjx@cta.cq.cn

收稿日期: 2008-11-07;**修回日期:** 2008-11-19

模式识别受体是宿主天然免疫系统识别病原菌相关模式分子(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)、清除病原菌及其毒素以及天然免疫细胞活化的首要环节。机体对细菌细胞壁成分的炎症反应主要由模式识别受体清道夫受体(scavenger receptor,SR)、白细胞分化抗原14(cluster of differentiation 14, CD14)、Toll样受体(Toll-like receptor 4, TLR4)等介导。SR和CD14分别在灭活、清除内毒素和巨噬细胞激活中发挥重要作用[1-3],TLR4-MD-2复合物能介导CD14传递的细胞膜信号,并将信号进一步传递给接头分子MyD88[4]。因此,免疫细胞PRRs的数量及其相互作用对于损伤后宿主防御细菌感染非常关键。本研究通过观察创伤及感染因素刺激后免疫细胞表面PRRs受体的表达变化及其相互作用,探讨从PRRs角度调控机体炎症反应,旨在深入揭示创伤感染早期机体天然免疫功能变化规律,以期为防治创伤后感染、促进创伤患者康复提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

健康昆明小鼠102只,雌雄不拘,体质量18~22 g。由本院实验动物中心提供。分为空白对照组(4只)、创伤组、创伤+内毒素组、盲肠结扎穿孔(CLP)组和假手术组(4只)。创伤组(2、4、6、9、13 h)、创伤+内毒素组(2、4、6、9、13 h)和盲肠结扎穿孔组(8、12、24 h)各时间点4只动物。细胞因子刺激实验分为空白对照组(3只),细胞因子刺激量效和时效组。TNF-α(Sigma, 美国)、IL-6(Sigma, 美国)、IL-10(Sigma, 美国)量效实验有0.01、0.1、1、10、100、1 000 ng/ml组;时效实验有2、4、6、8、12、16、24 h组,各剂量组和时间点3只动物。

1.2 动物模型建立

1.2.1 创伤及合并内毒素血症模型 麻醉小鼠行单侧股骨中段闭合性骨折,经尾静脉按5 mg/kg注入LPS(*E. coli* 026:B6, DIFCO, 美国),复制创伤合并内毒素血症模型,空白对照组注入等量生理盐水。

1.2.2 盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)模型 参照文献[5]方法行CLP术,模拟小鼠脓毒症。假手术组除未行CLP外操作同CLP组。

1.3 创伤感染时组织巨噬细胞SR、CD14、TLR4检测

伤后相应时间点,麻醉小鼠,以全身灌注法[2]初步固定肝、肺组织,按常规取肝、肺组织标本,固定、脱水后制备蜡块,切片后行免疫组织化学染色。以TECBIAS 6803真彩色生物医学图像分析系统分析,以积分吸光度(IOD)平均值表示蛋白表达的相对强度。

1.4 肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages, AM)表面SR、CD14和TLR4检测

参照文献[6]方法,分离小鼠AM,Gimesa染色显示AM纯度>90%,台盼蓝染色鉴定细胞活力≥95%。将AM接种于预置玻片的24孔培养板,于37 ℃,5% CO_2 孵箱培养12 h。以细胞因子刺激后,行S-P法染色[6],同法半定量分析蛋白表达。

1.5 肺组织和肺泡巨噬细胞SR mRNA、CD14 mRNA和TLR4 mRNA检测

mRNA以半定量逆转录PCR检测。总RNA按RNA提取试剂盒(Omega, 美国)说明提取。引物(表1)自上海申能博采公司合成。二步法逆转录反应参照试剂盒(TaKaRa, 日本)方法进行。按94 ℃预变性2 min,94 ℃变性60 s,57 ℃退火30 s,72延伸8 min,循环33次。扩增产物电泳后以Quantity One软件计算光密度值。

表1 模式识别受体基因PCR引物

基因	序列	长度(bp)
SR	上游:5′- CCAAGTCCTTGCAGAGTCTG -3′	307
	下游:5′- GTCTGAGGTCGTTGGTGATG -3′	
CD14	上游:5′- CGCTCAATCTGTCTTTCAC -3′	384
	下游:5′- GACTGCCTTTCTTTCCTTAC -3′	
TLR4	上游:5′- CCGGAAGGTTATTGTGGTAGTGTC -3′	300
	下游:5′- AGGGCATTTTTAAGTCTTCTCCAG -3′	
GAPDH	上游:5′- CGGTGCTGAGTATGTCGT -3′	613
	下游:5′- GGTGGAAGAGTGGGAGTT -3′	

1.6 转染CD14、TLR4和MD-2质粒的HEK293细胞对LPS结合率变化

将处于对数生长期的HEK293细胞消化后,以DMEM(Roche,美国)完全培养基调整细胞浓度至5×10^4/ml,接种于24孔培养板,每孔细胞数为5×10^4,培养至60%的汇合率。细胞分7组:①转染CD14质粒组(pcDNA3/HCD14, 本室保存);②转染TLR4质粒组(pFLAG-CMV-1-TLR4, Muzio教授惠赠, Mario Neg研究所, 意大利);③转染MD-2质粒组(pEFBOS-MD-2, Kensuka教授惠赠,日本);④共转染CD14、TLR4质粒组;⑤共转染CD14、MD-2质粒组;⑥共转染TLR4、MD-2质粒组;⑦共转染CD14、TLR4、MD-2质粒组。D-Hanks漂洗后,先加1 ml DMEM无血清培养基,随后各组分别加入含相应质粒、转染剂Fugene 6(Roche, 美国)的转染液,继续培养36 h。最后再加入现配的终浓度为1 μg/ml的FITC-LPS(Sigma, 美国),37 ℃孵育2 h。以胰蛋白酶消化细胞,收集并漂洗后,流式细胞仪检测细胞对FITC-LPS的结合率。

1.7 转染NF-κB反应性d2EGFP的HEK293细胞荧光蛋白表达

含有NF-κB结合位点的不稳定型绿色荧光蛋白报告质粒p4κb-d2EGFP(本所王付龙硕士惠赠)同法转入HEK293细胞。以含600 μg/ml G418的选择性培养基筛选7~10 d。挑取阳性克隆涂板扩增,并以200 μg/ml G418继续筛选28 d。随后按上法转染各种组合质粒。转染后36 h,再以终浓度为100 ng/ml LPS刺激。流式细胞仪检测阳性细胞率。

1.8 TNF-α测定

在LPS刺激转染不同质粒的HEK293细胞3 h后,收集上清。严格按ELISA试剂盒(Bendor公司, 美国)说明书操作,

TNF-α 按表示其稀释浓度范围的标准曲线予以定量,以样品吸光度值求得 TNF-α 浓度。

1.9　统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 11.0 进行单因素方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　创伤感染时巨噬细胞表面模式识别受体表达变化与局部炎症反应的关系

结果显示,内毒素血症、创伤合并内毒素血症时动物肝、肺组织 SR mRNA 及其蛋白表达呈进行性下调,CD14、TLR4 mRNA 及其蛋白表达呈进行性上调,其中以创伤合并内毒素血症 13 h 受体表达变化最明显[肝 SR:实验组(17.23 ± 2.12),对照组(39.15 ± 4.24),$P < 0.01$;肝 CD14:实验组(37.31 ± 5.28),对照组(17.14 ± 1.69),$P < 0.01$;肺 SR:实验组(17.48 ± 1.75),对照组(33.29 ± 2.40),$P < 0.01$;肺 CD14:实验组(39.17 ± 5.06),对照组(14.49 ± 1.93),$P < 0.01$]。CLP 后 12 h,SR 呈下调变化[SR mRNA:实验组(0.22 ± 0.03),对照组(0.65 ± 0.04),$P < 0.01$]。肺组织 CD14、TLR4 呈不同程度上调表达[CD14 mRNA:实验组(1.31 ± 0.11),对照组(0.50 ± 0.06),$P < 0.01$;TLR4 mRNA:实验组(0.91 ± 0.06),对照组(0.45 ± 0.05),$P < 0.05$]。体外实验结果显示,随着 LPS 剂量增加,小鼠肺泡巨噬细胞 SR mRNA 呈明显的下调表达,LPS 刺激可使小鼠细胞内 CD14、TLR4 mRNA 均呈不同程度的上调表达[CD14 mRNA:实验组(1.69 ± 0.09) ~ (1.00 ± 0.16),对照组(0.35 ± 0.09);TLR4 mRNA:实验组(0.65 ± 0.16) ~ (0.21 ± 0.03),对照组(0.41 ± 0.10)]。

2.2　细胞因子对模式识别受体表达的调控作用

2.2.1　TNF-α 对 SR、CD14、TLR4 表达的影响　　肺泡巨噬细胞 SR mRNA 表达逐步减少,并在刺激后 6 h 已明显低于对照水平[实验组(1.09 ± 0.09),对照组(1.35 ± 0.11),$P < 0.05$]。TNF-α 刺激 2 h,CD14 mRNA 表达明显增多[实验组(0.49 ± 0.02),对照组(0.37 ± 0.07),$P < 0.05$],并随刺激时间延长,CD14 mRNA 表达呈增多趋势,TLR4 mRNA 表达无明显变化。TNF-α 刺激后,肺泡巨噬细胞内 SR、CD14、TLR4 蛋白表达与 mRNA 表达变化一致[SR:实验组(21.50 ± 4.50),对照组(38.50 ± 3.90),$P < 0.05$;CD14:实验组(41.30 ± 3.90),对照组(20.5 ± 4.00),$P < 0.01$]。

2.2.2　IL-6 对 SR、CD14 表达的影响　　SR 和 CD14 mRNA 表达与 IL-6 也呈明显的时效和量效关系。SR mRNA 表达在 IL-6 刺激 8 h 明显降低,至 12 h 最低[实验组(0.28 ± 0.07),对照组(0.64 ± 0.07),$P < 0.01$]。IL-6 刺激后 4 h,CD14 mRNA 表达明显增多,至 12 h 达峰值[实验组(0.58 ± 0.04),对照组(0.38 ± 0.04),$P < 0.05$]。在 0.01 ~ 100 ng/ml 之间,SR 和 CD14 mRNA 表达随 IL-6 浓度增加分别呈不断下降或上升变化。SR 蛋白表达则随 IL-6 刺激时间延长而逐渐降低,至 16 h 最弱[实验组(24.60 ± 4.00),对照组(42.20 ± 3.10),$P < 0.01$]。IL-6 刺激 2 h,CD14 蛋白表达增强,至 16 h 最明显[实验组(39.40 ± 3.80),对照组(24.4 ± 2.60),$P < 0.01$],至 24 h 仍高于正常对照。量效实验显示,SR 表达随着 IL-6 剂量的增加而逐渐降低,至 100 ng/ml 最低[实验组(25.80 ± 4.30),对照组(42.70 ± 4.20),$P < 0.01$]。细胞表面 CD14 表达随着 IL-6 刺激剂量增加逐渐增强,至 100 ng/ml 表达最强[实验组(41.5 ± 4.60),对照组(25.7 ± 3.30),$P < 0.01$]。

2.2.3　IL-10 对 SR、CD14 表达的影响　　胞内 CD14 和 SR mRNA 表达与 IL-10 呈明显的时效和量效关系,即随 IL-10 刺激时间延长或刺激浓度增加,CD14 mRNA 表达呈进行性下降[实验组(0.48 ± 0.06) ~ (0.25 ± 0.08),对照组(0.49 ± 0.05)],SR mRNA 表达则进行性增加[实验组(0.72 ± 0.05) ~ (1.22 ± 0.06),对照组(0.67 ± 0.05)]。随 IL-10 刺激时间延长,CD14 蛋白表达未见明显变化,SR 蛋白表达则随着 IL-10 刺激时间延长而逐渐增多,至 16 h 达峰值[实验组(50.10 ± 3.60),对照组(37.30 ± 2.10),$P < 0.05$]。量效实验显示,随着 IL-10 浓度的增加,CD14 蛋白表达无明显变化,SR 蛋白表达则逐渐增多,至 10 ng/ml 达峰值[实验组(52.70 ± 3.90),对照组(39.20 ± 2.50),$P < 0.05$]。

2.3　模式识别受体对免疫细胞的调控作用及其跨膜信号转导模式

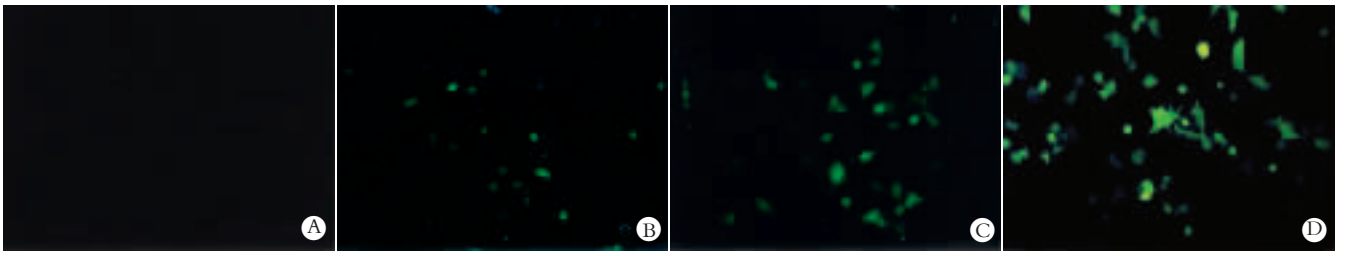
通过 PRRs 基因转染,发现单个基因转染时,CD14 与 LPS 结合率最强,其次为 MD-2,TLR4 与 LPS 结合率很弱。在两两联合转染时,CD14 + TLR4 组细胞与 LPS 结合率与 CD14 组相近,CD14 + MD-2 组细胞与 LPS 结合率强于 CD14 组和 MD-2 组($P < 0.05$),TLR4 + MD-2 组细胞与 LPS 结合率强于 TLR4 组和 MD-2 组($P < 0.01$)。3 种联合转染时,细胞对 FITC-LPS 结合率最强,明显高于两两或单个基因转染组(表 2)($P < 0.01$)。

表 2　转染携带不同模式识别受体基因的质粒后 HEK293 细胞与 FITC-LPS 结合率及 LPS 刺激后 TNF-α 水平($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	阳性细胞百分率(%)	TNF-α(pg/ml)
空白对照组	3.72 ± 0.96^{e}	68.22 ± 13.95^{e}
CD14 组	19.63 ± 3.02^{be}	79.29 ± 13.15^{e}
TLR4 组	3.28 ± 0.74^{e}	74.32 ± 8.70^{e}
MD-2 组	10.86 ± 2.67^{ae}	65.58 ± 8.13^{e}
CD14 + TLR4 组	20.19 ± 3.94^{be}	79.45 ± 21.97^{e}
CD14 + MD-2 组	26.60 ± 3.92^{bce}	72.43 ± 3.14^{e}
TLR4 + MD-2 组	30.78 ± 9.22^{bde}	123.75 ± 16.39^{ae}
CD14 + TLR4 + MD-2 组	55.44 ± 2.07^{b}	488.26 ± 54.41^{b}

a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与空白对照组比较;c:$P < 0.05$,与 CD14 和 MD-2 组比较;d:$P < 0.01$,与 TLR4 和 MD-2 组比较;e:$P < 0.01$,与 CD14 + TLR4 + MD-2 组比较

进而发现,单个基因转染的细胞对 LPS 刺激反应均很弱。CD14-MD-2 共转染时细胞对 LPS 刺激反应较单个基因转染无明显变化,CD14-TLR4 或 TLR4-MD-2 共转染时细胞对 LPS 的刺激反应较单个基因转染均有所增强。在三者共转染时效应最强,表现为 NF-κB 结合位点的不稳定型绿色荧光蛋白表达最强(图 1)和 TNF-α 分泌水平最高(488.26 ± 54.41)pg/ml,见表 2。



A:空白对照组;B:CD14 + TLR4 转染组 CD;C:TLR4 + MD-2 转染组;D:CD14 + TLR4 + MD-2 转染组

图1 转染携带不同模式识别受体基因的质粒后 HEK293 细胞在 100 ng/ml LPS 刺激时 NF-κB 结合位点的不稳定型绿色荧光蛋白表达 (荧光显微镜 ×200)

3 讨论

体内、外实验表明,内毒素血症、创伤合并内毒素血症及 CLP 时,组织巨噬细胞表面呈现 SR 表达下调,CD14、TLR4 表达上调的变化规律。与此同时,内毒素血症时肝、肺组织内 TNF-α、IL-6、IL-4、IL-10 释放增加,LPS 刺激培养肺泡巨噬细胞产生 TNF-α、IL-6、IL-10 增加与组织内 CD14 表达增加呈显著正相关,与 SR 表达下降呈显著负相关。而且,内毒素血症时血浆 ALT、TB 水平、肝组织内 MDA 水平、肺体指数的增加也分别与肝、肺内 SR 表达下调、CD14 表达上调呈显著的相关性。CLP 脓毒症时肺内各 PRRs 的表达变化分别与肺脏组织内髓过氧化物酶(MPO)、TNF-α 水平增加也呈一定的相关关系[2,3,6,7]。因此,感染或创伤合并感染时以上受体的表达变化可能是导致局部和全身炎症反应失控的重要机制。此外,除 PAMPs 直接作用,感染过程中释放的促炎因子(TNF-α、IL-6)和抗炎因子(IL-10)能反馈调节效应细胞 PRRs 表达,且二者调节作用相反。抗炎因子可能通过对 PRRs 表达调控抑制促炎因子释放、对抗炎症反应。

SR 是介导 LPS 清除的防御性受体,本身不直接介导 LPS 的细胞激活效应。CD14 是一种 GPI 锚定膜蛋白。利用抗 CD14 抗体,37 ℃、30 min,阻断 CD14,随后用磷脂酶 C 预处理肺泡巨噬细胞,使膜结合 CD14 从细胞膜上脱落,或用抗 CD14 单克隆抗体封闭细胞膜上 CD14,均能明显抑制低剂量 LPS 对细胞的激活效应。用 SR 配体-氧化性低密度脂蛋白(ox-LDL)预处理肺泡巨噬细胞,可增强 LPS 刺激肺泡巨噬细胞释放 TNF-α 的作用。抗 CD14 抗体则可完全抑制 ox-LDL 增强 LPS 的作用[3]。因此,防御性受体 SR 和兴奋性受体 CD14 存在一定的功能联系。

目前认为,巨噬细胞表面至少存在 CD14、TLR4 和 MD-2 介导 LPS 激活细胞。为揭示 3 种受体是否都能结合 LPS,以单独或协同方式介导 LPS 跨膜信号,通过不同组合的 PRRs 基因转染研究表明,单个 PRR 不能独立完成 LPS 跨膜信号转导,需要相互间的协同作用。天然免疫细胞识别 LPS 可能需 3 种受体共同参与,且三者共转染时对 PAMPs 的刺激反应最强,表现为 NF-κB 的显著激活与核转位,以及 TNF-α 的高水平分泌。结果提示巨噬细胞识别 LPS 及 LPS 激活细胞至少需要 3 种受体共同参与,即 CD14 结合 LPS,TLR4 将 LPS 刺激信号传入细胞内,MD-2 可能协同 TLR4 结合 LPS 并转导 LPS 信号。

因此,创伤感染时,免疫细胞表面防御性受体下调、效应性受体上调参与炎症反应失控过程,CD14、TLR4 和 MD-2 对免疫细胞识别病原分子具有协同作用,合理调控模式识别受体表达对于增强机体免疫,防御感染具有重要意义。

参考文献:

[1] 蒋建新,姚咏明,郑 江. 细菌内毒素基础与临床[M]. 北京:人民军医出版社, 2004:90.

[2] Jiang J, Xie G, Chen Y, *et al*. Intra-hepatic expression of scavenger receptor and CD14 and their relationship with local inflammatory responses in endotoxemia in mice[J]. Shock, 2001, 164(1): 75 - 80.

[3] Jiang J, Chen Y H, Xie G Q, *et al*. Intrapulmonary expression of scavenger receptor and CD14 and their relation to local inflammatory responses to endotoxemia in mice[J]. World J Surg, 2003, 27(1): 1 - 9.

[4] Schnabl B, Brandl K, Fink M, *et al*. A TLR4/MD2 fusion protein inhibits LPS-induced pro-inflammatory signaling in hepatic stellate cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 375(2): 210 - 214.

[5] Baker C C, Chaudry I H, Gaines H O, *et al*. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model[J]. Surgery, 1983, 94(2): 331 - 335.

[6] 陈永华,蒋建新,谢国旗,等. 内毒素血症时小鼠肺泡巨噬细胞 CD14 和清道夫受体的表达[J]. 第三军医大学学报,2000, 22(7): 615 - 618.

[7] 谢国旗,蒋建新,朱佩芳,等. 库普弗细胞 SR 表达变化与内毒素肝损伤的关系[J]. 中华肝脏病杂志,2001, 9(2): 117 - 119.

(编辑 吴培红)