osteogenic differentiation[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89025.
[8] Nishimura R, Hata K, Matsubara T, *et al*. Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors[J]. J Biochem, 2012, 151(3): 247-254.
[9] Jain A, Kebaish K M, Sponseller P D. Factors associated with use of bone morphogenetic protein during pediatric spinal fusion surgery: an analysis of 4817 patients[J]. J Bone Joint Surg Am, 2013, 95(14): 1265-1270.
[10] Iwai T, Murai J, Yoshikawa H, *et al*. Smad7 inhibits chondrocyte differentiation at multiple steps during endochondral bone formation and down-regulates p38 MAPK pathways[J]. J Biol Chem, 2008, 283(40): 27154-27164.
[11] Mi M, Jin H, Wang B, *et al*. Chondrocyte BMP2 signaling plays an essential role in bone fracture healing[J]. Gene, 2013, 512(2): 211-218.
[12] Wang M, Shen J, Jin H, *et al*. Recent progress in understanding molecular mechanisms of cartilage degeneration during osteoarthritis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2011, 1240: 61-69.
[13] Johansson N Saarialho-Kere U, Airola K, *et al*. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development[J]. Dev Dyn, 1997, 208(3): 387-397.

(**收稿**:2014-08-21;**修回**:2014-09-20)
(编辑 龙 亮)

个案与短篇

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201408079

非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝脏 TLR4 的表达

冯新富,范 伟,柳 杨,龚 毅,侯 炬 (550002 贵阳,贵州省人民医院肝胆外科)

[**关键词**] 非酒精性脂肪性肝炎;TLR4;大鼠
[**中图法分类号**] R575.5 [**文献标志码**] B

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease,NAFLD)是代谢综合征累及肝脏的表现。随着现代生活水平的提高,非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis,NASH)的发病率增高,由其引起的肝纤维化和肝硬化发病率也有上升趋势。但因其发病机制复杂,迄今为止未找到有效的治疗药物[1-2],探讨其发病机制是当前研究的热点问题。本研究通过观察Toll样受体4(Toll-like receptor 4,TLR4)在非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝组织的表达,探讨其发病可能机制。

1 资料与方法

1.1 动物模型建立

20只雄性SD大鼠由军事医学科学院实验动物中心提供,体质量140~160 g。分为正常饮食组(对照组,饲料中碳水化合物、脂肪、蛋白质分别占65.5%、10.3%、24.2%)、高脂饮食组[3](模型组,饲料中88%普通饲料+10%猪油+2%胆固醇,碳水化合物、脂肪、蛋白质分别占总热量的53.0%、27.4%、19.6%),每组10只。模型组给予高脂饲料喂养16周诱发脂肪性肝炎,大鼠自由饮水和进食,分笼(每笼5只)饲养于(20±2)℃明暗各12 h的动物实验室内。于16周给大鼠腹腔注射水合氯醛3 mL/kg,从下腔静脉采血后处死。

1.2 肝组织标本的制备和观察

用多聚甲醛固定肝组织后,制备石蜡切片,HE染色,光学显微镜下观察肝细胞脂肪变性程度、炎症活动度团。根据肝细胞脂肪变性占所获肝组织标本量的范围分为4度(F0~F4):肝细胞脂肪变性<5%为F0;肝细胞脂肪变性在5%~30%为F1;肝细胞脂肪变性在>30%~50%为F2;肝细胞脂肪变性在>50%~75%为F3;肝细胞脂肪变性>75%为F4。所有切片由有经验的病理科医师进行评分,每张切片选取8个高倍视野。

1.3 TLR4 mRNA表达检测

所用PCR引物由威斯腾生物技术公司合成。*Taq*酶、DNase Ⅰ(RNase free)购自TaKaRa公司,RNA提取试剂Tripure reagent购自Roche公司,M-Mulv Reverse Transcriptase购自Promega公司,其余均为国产分析纯试剂。

(下转115页)

[**基金项目**] 贵州省省长基金[黔科教办(2007)04];贵州省科技厅基金[黔科合J(2008)2301]
[**通信作者**] 范 伟,E-mail:zhuyufanwei@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141204.1624.002.html(2014-12-04)

[9] 杨学军. 留置导尿管致尿路感染的菌群分布及药敏结果分析[J]. 中国误诊学杂志, 2002, 2(9): 1347-1348.
[10] Kaplan J B. Antibiotic-induced biofilm formation [J]. Int J Artif Organs, 2011, 34(9): 737-751.
[11] Fajardo A, Martinez J L. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses [J]. Curr Opin Microbiol, 2008, 11(2): 161-167.
[12] Skindersoe M E, Alhede M, Phipps R, *et al*. Effects of antibiotics on quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(10): 3648-3663.
[13] 邱春华, 王静, 刘玉敏. 330株铜绿假单胞菌耐药情况分析[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(15): 1613, 1618.

(收稿:2014-09-15;修回:2014-10-13)
(编辑 张 维)

(上接100页)

分别快速取肝脏组织、每组样品的组织约25 mg,按说明书操作提取RNA后。所用引物TLR4:上游5′-TCTGCCCTGCCACCATTTACA-3′,下游5′-CAGGTCTAAAGAGAGATTGAC-3′,长度697 bp;β-actin:5′-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3′,5′-CCCATACCCACCATCACACC-3′,长度207 bp;PCR反应条件94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 50 s,35个循环;72 ℃延伸10 min;4 ℃保存。PCR反应条件94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35个循环;72 ℃延伸10 min;4 ℃保存。标准是TaKaRa的DL2000,取PCR扩增产物8 μL,在1.0%琼脂糖上进行凝胶电泳。应用凝胶成像系统摄取各样品电泳图。

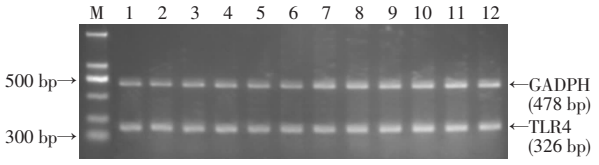
按酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒说明检测大鼠肝脏组织TLR4浓度。采用全自动生物化学分析仪检测血清ALT、AST水平,采用放射免疫分析法检测血清TNF-α水平。

1.4 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.5统计软件,行单因素方差分析,SNK(q检验)进行两两比较。

2 结果

模型组大鼠造模均成功,根据肝细胞脂肪变性占所获肝组织标本量的范围分为4度(F0~F4),其中模型组大鼠肝细胞脂肪变性程度达F3、F4的分别有2、8只。模型组的TLR4 mRNA的表达明显高于对照组(图1)。对照组血清ALT[(38.21±8.90) U/L]、AST[(147.23±42.03) U/L]、TNF-α[(1.32±0.63) μg/L]、TLR4[(10.24±1.01) ng/mL]浓度明显低于模型组[分别为(109.32±18.50) U/L、(257.35±56.10) U/L、(3.62±0.93) μg/L、(43.45±6.57) ng/mL,$P<0.05$]。



M:标准(DL2000);1~6:对照组;7~12:模型组

图1 不同组别肝脏TLR4 mRNA的表达情况

3 讨论

TLR4是新近才发现的脂多糖受体,被脂多糖激活后,可以通过其胞内Toll/IL-1R(TIR)结构域招募一系列信号分子,活化NF-κB,引起以TNF-α等促炎因子为核心的炎症因子级联反应,形成第二次打击[4]。已发现Toll样家族成员有10余种,其中TLR2和TLR4为主要成员,TLR4介导细菌内毒素所致的炎症反应,TLR2介导细菌外毒素所致的炎症反应。在其信号通路中TNF-α起至关重要的作用,高浓度的TNF-α可减少外周组织脂肪分解,并促进肝细胞甘油三酯的合成和聚集,而富余脂质尤其是甘油三酯在肝脏的沉积是NAFLD形成发展的先决条件。血清中TNF-α与血清内毒素水平升高呈显著正相关[5]。

本研究结果显示,经过持续16周的高脂饮食喂养,大鼠体质量、肝指数明显升高,病理形态形成NASH,对照组血清ALT、AST、TNF-α、TLR4明显低于模型组。

综上所述,TRL4介导的炎症反应可能是导致大鼠非酒精性脂肪性肝炎、肝功能损伤的原因之一。

参考文献:

[1] 周汝霞, 陈瑛, 李莉. 脂肪肝治疗研究进展[J]. 医药导报. 2003, 22(9): 609-610.
[2] 钟岚, 范建高, 王国良, 等. 肥胖、高脂血症性脂肪性肝炎模型的建立[J]. 实验动物科学与管理, 2000, 17(2): 16-20.
[3] 刘庆生, 陈芝芸, 严茂样, 等. 金仁方对非酒精性脂肪肝大鼠作用的实验研究[J]. 中医药学刊, 2006, 24(7): 1242-1244.
[4] Shen X D, Ke B, Zhai Y, *et al*. Toll-like receptor and heme oxygenase-1 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. Am J Transplant, 2005, 5(8): 1793-1800.
[5] Wigg A J, Roberts-Thomson I C, Dymock R B, *et al*. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis[J]. Gut, 2001, 48(2): 206-211.

(收稿:2014-08-05;修回:2014-10-09)
(编辑 栾 嘉)