维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0518-03

小鼠呼吸道合胞病毒感染肺 TLR4 表达与气道高反应性

李 睿,刘恩梅,杨锡强,王莉佳

(重庆医科大学附属儿童医院免疫室,重庆 400014)

【摘 要】目的:研究小鼠呼吸道合胞病毒(RSV)感染对肺 TLR4 表达与气道高反应性的影响。方法:生后 6 周 16 只清洁级 BALB/c小鼠被同等分成 RSV 感染组和对照组,感染后 1 周两组经吸入相同递增浓度乙酰甲胆碱检测气道高反应性,使用 RT-PCR方法测定肺组织 TLR4mRNA 表达,并对二者的相关性进行了分析。结果:在吸入乙酰甲胆碱浓度为 3.2g/L 时两组气道阻力差异有显著性($P<0.01$)。TLR4/β-actin 的值分别为对照组 0.239±0.055,RSV 感染组 0.361±0.102,两组间有显著性差异($P<0.05$);TLR4 mRNA 表达与吸入 3.2g/L 乙酰甲胆碱时的气道反应性呈正相关,相关系数为 0.721($P<0.05$)。结论:小鼠 RSV 感染后肺 TLR4 表达增强并呈气道高反应性,二者之间有显著正相关。

【关键词】呼吸道合胞病毒;TLR4;气道高反应性

【中国图书分类法分类号】R392 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-03-07

Lung tissue expression of TLR4 and airway hyperresponsiveness in the mice infected by respiratory syncytial virus

LI Rui, et al

(*Department of Clinical Immunology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective:* To study the lung tissue TLR4 expression and airway hyperresponsiveness(AHR) in the mice infected by respiratory syncytial virus(RSV). *Methods*: 16 clean, 6 weeks old BALB/c mice were divided into two groups equally(RSV group and control). One week after RSV infection, AHR was detected by inhaling the increased concentration of methacholine, TLR4 mRNA expression was measured by RT-PCR methods, and the correlation between AHR and TLR4 expression was also analyzed. *Results*: An important difference was detected in two groups' airway resistance when the inhaled concentration of methacholine was 3.2g/L($P<0.01$). The TLR4/β-actin was 0.361±0.102 and 0.239±0.055 respectively in RSV group and control group and there was a statistically significance($P<0.05$). The expression of TLR4 mRNA was positively correlated with the airway hyperresponsiveness when the inhaled methacholine concentration reached 3.2g/L($r=0.721$, $P<0.05$). *Conclusion*: The lung tissue expression of TLR4 mRNA and AHR were increased in the mice infected by RSV and they were positively correlated.

【Key words】RSV;TLR4;AHR

呼吸道合胞病毒(RSV)是婴幼儿急性下呼吸道感染的最主要病毒病原之一,流行病学研究显示,RSV 感染引起的毛细支气管炎和小儿反复喘息、哮喘间有着密切的关系。Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4,TLR4)属于信号传导型识别受体(pattern-recognition receptor, PRR)成员之一,表达在各种免疫活性细胞和气道、肺泡上皮细胞,其信号传递能够活化炎症转录因子 NF-κB,使炎症性细胞因子表达上调。我们应用小鼠模型研究了 RSV 感染对 TLR4 表达与气道高反应性的影响。

1 材料与方法

1.1 病毒培养

呼吸道合胞病毒 A2 标准株接种于 Hep2 细胞株,33℃条件下培养于含 2%胎牛血清的 DMEM 细胞培养液中,细胞出现 80%以上病变时收获上清,空斑形成实验进行病毒滴度滴定,病毒液液氮冻存备用。未接种病毒的含 2%胎牛血清的 DMEM 细胞培养液作为病毒对照液。

1.2 动物分组及处理

清洁级 BALB/c 小鼠购于重庆医科大学实验动物中心,饲养于专用消毒饲养盒内,恒定室温,过滤空气,饲料、水皆

作者介绍:李 睿(1970-),男,主治医师,博士生,主要研究方向:儿童临床免疫。

基金项目:由重庆市卫生局重点课题资助(04-1-005)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

经消毒处理，更换饲料等操作在超净台内进行。生后 6 周的雌性小鼠随机分 2 组，每组 8 只，0.3%戊巴比妥钠轻度麻醉后 RSV 感染组给以病毒对照液 50μl（含 5×10^6PFU）滴鼻，对照组给以 50μl 病毒对照液滴鼻。感染后第 7 天进行气道高反应性检测，并取肺组织检测 TLR4 的表达。

1.3 气道反应性测定

采用 AniRes 实验动物肺功能检测分析系统（北京航天新概念软件有限公司）进行小鼠气道反应性测定。20%乌拉坦（Urethane）0.2ml 腹腔注射麻醉小鼠，仰卧位固定体位后分离颈部皮肤暴露气管，插入留置针后扎线固定，连接 1 个 5ml 注射器针筒，依次雾化吸入 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2g/L 的乙酰甲胆碱(Acetyl-β-methacholine)，每一浓度吸 1.5min，吸入前后接气道压力传感器，放入并密闭体描箱后进行气道压力、肺容积变化、吸气气道阻力、呼气气道阻力的测量。通气时呼吸频率为 120 次/min，潮气量为 0.2ml。以呼气气道阻力表示气道反应性。

1.4 RT-PCR

Trizol 提取肺脏总 RNA，定量后取 1μg RNA，逆转录后取 cDNA 产物 5μl 进行 PCR。TLR4 的引物正义链为 5′-CAAGAACATAGATCTGAGCTTCAACCC-3′，反义链为 5′-GCTGTCCAATAGGGAAGCTTTCTAGAG-3′，产物长度 278bp，退火温度为 62℃；内参照 β-actin 的引物正义链为 5′-ACCAACTGGGACGACATGGAGAAGATC-3′，反义链为 5′-TAGCCACGCTCGGTCAGGATCTTCAT-3′，产物长度 366bp，退火温度为 59℃。所有 PCR 反应条件均为 94℃变性 30s，退火 30s，72℃延伸 30s，30 个循环。产物 2%琼脂糖电泳，凝胶成像系统扫描。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS11.0 统计软件进行数据分析，两组间比较采用 t 检验，相关性分析应用 Spearman's 分析。

2 结 果

2.1 气道反应性

测定小鼠感染 RSV 后第 7 天时的气道反应性，吸入乙酰甲胆碱后两组小鼠气道阻力都有所升高，但感染 RSV 组升高更明显，在乙酰甲胆碱浓度为 3.2g/L 时两组气道阻力差异有显著性（$P<0.01$）（图 1）。

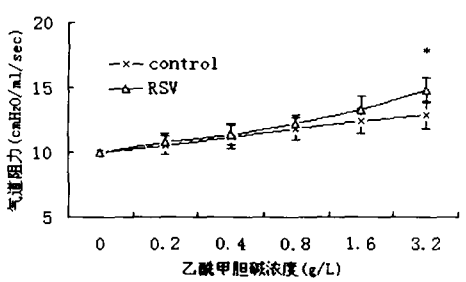


图 1 两组小鼠气道高反应性比较 每组 n=8，*P<0.01

2.2 TLR4 mRNA 在小鼠肺脏的表达

以 β-actin 为内参照，检测 TLR4mRNA 表达量(图 2)。TlR4/β-actin 的值分别为对照组 0.239±0.055，RSV 感染组 0.361±0.102，两组比较 t=2.981，P<0.05。表明 RSV 感染使肺部 TLR4mRNA 表达增强。

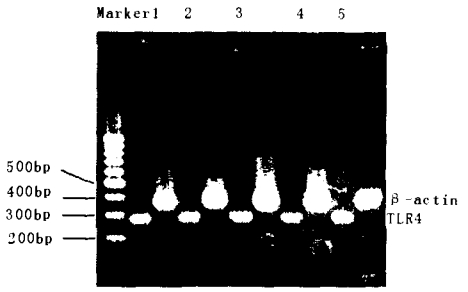


图 2 其中 5 只小鼠 TLR4 和 β-actin 的表达
1，3，5 为 RSV 感染组，2，4 为对照组

2.3 TLR4 mRNA 表达与气道反应性的相关性

我们对 TLR4 mRNA 表达与气道反应性的相关性进行了分析，发现 TLR4 mRNA 表达与吸入 3.2g/L 乙酰甲胆碱时的气道反应性呈正相关，相关系数为 0.721，P<0.05（图 3）。

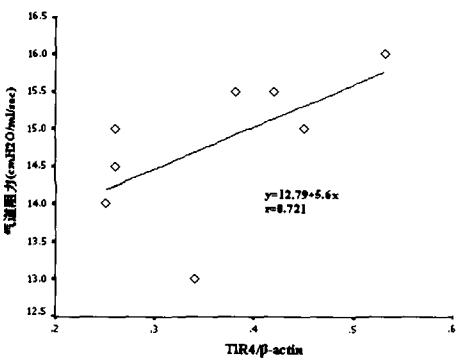


图 3 TLR4mRNA 表达与气道反应性的相关性吸入乙酰甲胆碱浓度为 3.2g/L，相关系数为 0.721，P<0.05

3 讨 论

RSV 是婴幼儿下呼吸道感染的主要病原体之一，与儿童哮喘的发生密切相关，但 RSV 促发儿童哮喘的机制尚不清楚。已有研究表明 RSV 下呼吸道感染与反复喘息、反应性气道疾病和肺功能异常有关[1,2]。气道高反应性是支气管哮喘的特征之一，也是气道炎症变化的间接证据，临床工作中在支气管哮喘的诊断、疗效评价上得到广泛的应用。本研究中 RSV 感染后第 7 天(在无免疫缺陷的小鼠此时绝

维普资讯 http://www.cqvip.com

大多数病毒已被清除) 所测的气道反应性明显高于对照组，说明单独 RSV 感染可以使气道反应性增高，这与 Jafri 等[3]的研究结果相一致。

呼吸道上皮细胞是 RSV 的主要感染细胞，除病毒本身对气道上皮的直接损伤免疫反应也在 RSV 感染后炎症中扮演重要作用[4]。Toll 样受体是固有免疫防御系统的重要成分，目前已发现 TLR1~TLR10，它们可表达于各类免疫细胞，其中 TLR4 在正常呼吸道上皮细胞有低水平表达。已知 TLR4 是细菌脂多糖(LPS)的配体，其信号传递能够活化炎症转录因子 NF-κB，使炎症性细胞因子表达上调[5]。本研究中 RSV 感染使小鼠肺组织 TLR4 表达水平明显升高，后者可能在 RSV 感染后炎症发生发展中起到重要作用。

TLR4 表达与气道反应性的相关性分析表明 TLR4 表达与吸入 3.2g/L 乙酰甲胆碱时的气道反应性呈正相关，提示 TLR4 在 RSV 感染导致的气道反应性增高中可能发挥一定作用。其机制可能为 RSV 感染通过上调 TLR4 的表达增强了气道局部的免疫性炎症，进而加重了气道上皮的损伤。Haeberle 等[6]发现 RSV 感染对炎症性转录因子 NF-κB 的早期活化是依赖于 TLR4 的，这为上述机制的推测提供了一定的依据。总之，TLR4 在 RSV 感染后气道炎症、气道高反应性的形成中可能起到一定作用，有待进行更深入的研究。

参 考 文 献

[1] Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, et al. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7[J].Am J respir Crit Care Med,2000;161(5):1501-1507.

[2] Stein RT,Sherrill D,Morgan WJ, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years[J].Lancet,1999;354(9178):541-545.

[3] Jafri SH, Chavez-Bueno S, Mejias A, et al. Respiratory syncytial virus induces pneumonia,cytokine response,airway obstruction,and chronic inflammatory infiltrates associated with long-term airway hyperresponsiveness in mice[J].J Infect Dis,2004;189:1856-1865.

[4] Sheeran P,Jafri H,Carubelli C, et al. Elevated cytokine concentrations in the nasopharyngeal and tracheal secretions of children with respiratory syncytial virus disease[J]. Pediatr Infect Dis J,1999;18:115-122.

[5] Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors[J]. Crit Care Med,2002;30(1):s1-s11.

[6] Haeberle HA, Takizawa R, Casola A, et al. Respiratory syncytial virus-induced activation of nuclear factor-kappaB in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways [J]. J Infect Dis, 2002;186(9):1199-1206.

(上接第 497 页)

本实验通过多个时段的取材，了解采用 CZF-II 型超声治疗仪，在 5W×5s 和 5W×10s 的 HIFU 剂量作用下所造成脑组织损伤灶的病理变化过程。在此过程中，早期大体和光镜下观察未见明显不同，而电镜下两者差异明显；晚期则分别表现为胶质瘢痕形成和损伤完全修复。因此，用适当 HIFU 剂量治疗脑肿瘤是安全和可行的。这为将来应用 HIFU 临床治疗脑肿瘤提供了实验依据。

参 考 文 献

[1] Connor CW, Hynynen K. Patterns of thermal deposition in the skull during transcranial focused ultrasound surgery [J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2004;51(10):1693-1706.

[2] Hynynen K, Clement GT, McDannold N, et al. 500-element ultrasound phased array system for noninvasive focal surgery of the brain: a preliminary rabbit study with ex vivo human skulls [J]. Magn Reson Med, 2004;52(1):100-107.

[3] McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz FA, et al. MRI investigation of the threshold for thermally induced blood-brain barrier disruption and brain tissue damage in the rabbit brain[J]. Magn Reson Med, 2004;51(5):913-923.

[4] McDannold N, King RL, Hynynen K. MRI monitoring of heating produced by ultrasound absorption in the skull: in vivo study in pigs [J]. Magn Reson Med, 2004;51(5):1061-1065.

[5] Chen L, Bouley DM, Harris BT,et al. MRI study of immediate cell viability in focused ultrasound lesions in the rabbit brain[J]. J Magn Reson Imaging, 2001;13(1):23-30.

[6] Poliachik SL, Chandler WL, Ollos RJ,et al. The relation between cavitation and platelet aggregation during exposure to high-intensity focused ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol, 2004;30(2):261-269.

[7] Mesiwala AH, Farrell L, Wenzel HJ,et al. High-intensity focused ultrasound selectively disrupts the blood-brain barrier in vivo [J]. Ultrasound Med Biol, 2002;28(3):389-400.

[8] Hynynen K, McDannold N, Sheikov NA,et al. Local and reversible blood-brain barrier disruption by noninvasive focused ultrasound at frequencies suitable for trans-skull sonications[J]. Neuroimage, 2005;24(1):12-20.