维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)06－0711－04

大鼠肝移植缺血再灌注后 Kupffer 细胞 Toll 样受体 4 及其伴侣分子 MD－2 的表达

彭　勇，龚建平，刘长安，刘海忠，李旭宏，李寿柏

(重庆医科大学第二临床学院肝胆外科，重庆　400010)

【摘　要】目的：研究大鼠肝移植缺血再灌注后 Kupffer 细胞 Toll 样受体 4(TLR4)及 MD－2 的表达，并探讨其在再灌注损伤中的作用。方法：分离培养大鼠肝移植缺血再灌注后 0(对照组)、2、12、24h(再灌注组)的 Kupffer 细胞，检测 TLR4/MD－2 mRNA、蛋白以及上清 TNF－α 的表达，并在培养液中加入抗 TLR4 抗体(抗 TLR4 组)，观察 TLR4 抗体对 TNF－α 分泌的影响。结果：再灌注后 Kupffer 细胞 TLR4/MD－2mRNA、蛋白以及 TNF－α 表达较对照组明显升高($P<0.01$)，应用抗 TLR4 抗体后，TNF－α 量较再灌注组明显降低($P<0.01$)。结论：TLR4 及其伴侣分子 MD－2 在介导 Kupffer 细胞激活和肝移植缺血再灌注损伤中可能起重要作用。

【关键词】肝移植；缺血再灌注损伤；Toll 样受体 4；Kupffer 细胞

【中国图书分类法分类号】R657.3　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2004－03－15

Expression of Toll like receptor 4 and MD－2 gene and protein in Kupffer cells following ischemia－reperfusion injury in rat liver transplant

PENG Yong, et al

(*Department of Hepatobiliary Surgery, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expression of Toll like receptor 4(TLR4) and MD－2 gene and protein in Kupffer cells and its role in ischemia－reperfusion injury (IRI) on rat liver graft. *Methods*: The Kupffer cells were isolated at 0(control group), 2, 12, 24h (IR group) following IR. The mRNA and protein expressions of TLR4 and MD－2 were detected by RT－PCR and flow cytometry (FCM), respectively. The TNF－α level in supernatant was measured by ELISA. Then the isolated KCs were incubated with anti－TLR4 polyclonal antibody (anti－TLR4 group), and the TNF－α level were measured again. *Results*: The mRNA and protein expressions of TLR4/MD－2 and the level of TNF－α in IR group increased significantly following IR compared with those in control group($P<0.01$). The TNF－α production was greatly inhibted after anti－TLR4 antibody treatment (compared with IR group, $P<0.01$). *Conclusion*: TLR4 and its partner molecule MD－2 may take an important part in the Kupffer cell activation and IRI.

【Key words】Liver transplantation; Ischemia－reperfusion injury; Toll like receptor 4; Kupffer cell

Toll 样受体 4(Toll like receptor 4, TLR4)是存在于单核－巨噬细胞表面的一种跨膜蛋白，主要功能是识别内毒素(LPS)或 LPS－CD14 复合物，它在介导 LPS 引起的单核－巨噬细胞的活化和释放多种前炎症因子中起重要作用[1]。MD－2 是与 TLR4 胞外区相连的一种分泌蛋白，可以促进 LPS 与 TLR4 相结合，强化细胞对 LPS 的反应[2]。Kupffer 细胞(KCs)是体内最大的固定巨噬细胞群，也是肝移植缺血再灌注损伤(ischemia－reperfusion injury, IRI)的主要参与者[3]。因此，研究缺血再灌注后 Kupffer 细胞 TLR4 及其伴侣分子 MD－2 的表达，对于阐明参与 IRI 细胞因子的来源尤其重要。本研究通过分离培养肝移植缺血再灌注(IR)后的 Kupffer 细胞，初步研究 TLR4/MD－2mRNA 和蛋白的表达、以及细胞因子的分泌，探讨 TLR4/MD－2 在 IRI 中作用和地位。

作者介绍：彭　勇(1976－　)，男，博士生，主要研究方向：器官移植

基金项目：国家自然科学基金资助项目(No. 30200278；39970719；30300337)

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

1.1 主要试剂

Ⅳ型胶原酶(Sigma 公司),Percoll(Pharmacia 公司),Trizol 试剂盒(life Technologies 公司),抗 TLR4 多克隆抗体(Santa Cruz 公司)。

1.2 肝移植缺血再灌注模型的建立

以雄性 Wistar 大鼠作为供、受体,体重 210～250g(重庆医科大学实验动物中心提供)。参照 PENG 等[4] 介绍的改良 Kamada 袖套法,建立大鼠原位肝移植动物模型。(1)获取供肝:游离门静脉,肝动脉,肝下下腔静脉及胆管,灌洗供肝后,连同上述血管一起切取供肝。在水浴中完成门静脉、肝下下腔静脉袖套准备,胆管内支架插管;(2)移植供肝:切除原肝,原位植入供肝,先完成肝上下腔静脉连续缝合,门静脉袖套吻合,结束无肝期,以此时作为再灌注开始。完成肝下下腔静脉袖套吻合,肝动脉显微缝合,胆管内支架插管完成胆道重建。

1.3 Kupffer 细胞分离和培养

再灌注后 0、2、12、24h,参照 Gong 等[5] 介绍的胶原酶原位肝脏灌注法分离 Kupffer 细胞。经门静脉插管,先灌注无 Ca^{2+} 的 Hanks 液洗尽肝内血液,待肝脏变苍白后,改用 0.05% Ⅳ型胶原酶以 5ml/min 速度循环灌注消化肝脏,待肝脏变软疏松后取下肝脏,剪去肝包膜,经 100 目滤筛过滤,除去未消化的纤维结缔组织。细胞混悬液经 100×g 离心 5min,得非实质性细胞悬液和肝细胞沉淀。非实质性细胞悬液经不连续 Percoll 密度梯度离心分离 Kupffer 细胞,用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液,37℃,5%CO_2 培养 6h 后,洗去未贴壁细胞,重悬贴壁细胞,调整细胞浓度为 1×10^6/ml 待用。过氧化物酶染色测其纯度大于 90%,台盼兰染色测其活力大于 95%。将 0h 设为对照组,2、12、24h 为再灌注(IR)组。

1.4 Kupffer 细胞 TLR4/MD-2mRNA 检测

1.4.1 KCs 总 RNA 提取及 cDNA 合成 采用 Trizol 试剂盒提取 KCs 总 RNA,取 0.5μg RNA 提取物,用 RT-PCR 试剂盒(Roche 公司)将其逆转录为互补 DNA(cDNA)

1.4.2 PCR 反应 以 β-actin 作为内参对照,TLR4、MD-2 以及 β-actin 引物由上海生工合成,序列见表 1。PCR 循环条件为:94℃ 1min,58℃ 1min,72℃ 1min,30 个循环,72℃ 延长 7min。EB 染色,1.5% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物,凝胶成像系统和图像分析系统观察并半定量计算 PCR 产物的相对表达量,结果以目的基因/β-actin mRNA 的灰度比值表示。

表 1 RT-PCR 引物设计

	引物序列	长度(bp)
TLR4	5'TGGATACGTTTCCTTATAAG3'	311
	5'GAAATGGAGGCACCCCTTC3'	
MD-2	5'ATGGTCTTCCTGCTCGAGTTT3'	332
	5'CCATGGCACAGAACTTCCTT3'	
β-actin	5'ATCATGTTTGAGACCTTCAACA3'	300
	5'CATCTCTTGCTCGAAGTCCA3'	

1.5 KCs 膜 TLR4/MD-2 蛋白的检测

采用流式细胞仪(FCM)检测 Kupffer 细胞 TLR4/MD-2 蛋白的表达:加入 FITC 标记的抗 TLR4 和 PE 标记的抗 MD-2 单抗(Santa Cruz 公司)各 20μl,与 KCs 在 4℃ 下共孵育 30min,PBS 液冲洗 3 次,用 FCM(Coulter,美国)检测每份标本 10^5 个细胞中阳性细胞数,及其平均荧光强度(MFI)

1.6 抗 TLR4 抗体对 TNF-α 分泌的影响

将上述再灌注后各时点的 KCs 接种于 24 孔培养板内,每孔 1ml(1×10^6/ml),将细胞分为两组:IR 组,不加处理因素;抗 TLR4 组,加入 TLR4 抗体 0.2ml(1:100)。在 37℃ 孵育 30min 后获取培养上清,采用 TNF-α ELISA 检测试剂盒(Sigma 公司)测定 TNF-α 含量(具体步骤参照说明书进行)

1.7 统计学分析

实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 10.0 进行统计分析,以 $P<0.05$ 为差别有显著性,$P<0.01$ 为差别有极显著意义。

2 结 果

2.1 Kupffer 细胞 TLR4/MD-2 mRNA 表达

对照组有微量 TLR4/MD—2mRNA 表达,再灌注后 2h,TLR4/MD-2mRNA 表达明显升高(为对照的 4 倍),12h 达到峰值(为对照 9 倍),24h 轻度降低(为对照 7 倍),但都明显高于对照组(与对照组相比,$P<0.01$)(图 1)。

2.2 KCs TLR4/MD-2 蛋白表达

对照组 TLR4、MD-2 阳性细胞所占百分比分别为 7.9% 和 6.5%。再灌注后 Kupffer 细胞膜 TLR4/MD-2 蛋白表达与 mRNA 成正相关:2h 表达明显增强,表现为 FITC、PE 阳性细胞所占的比例较对照显著增多(分别为 45.7%、38.6%),平均荧光强度也显著增强,12h 达峰值(分别为 78.4%、74.1%),24h 略有下降(分别为 61.7%、58.4%)(与对照组相比,$P<0.01$)(图 2)。

2.3 再灌注后各时点 IR 组与抗 TLR4 组 TNF-α 水平比较

再灌注后 TNF-α 量逐步增高,0、2、12、24h 分别为 35.7±4.8、265.4±24.1、529.3±34.1、329.7±26.9 pg/ml;用抗 TLR4 抗体后,各时点的表达量都较相同时点 IR 组明显降低,分别为 102.5±13.2、207.6±21.4、185.2±16.5pg/ml(与 IR 组相比,$P<0.01$)(图 3)。

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 1 再灌注后 Kupffer 细胞 TLR4/MD-2mRNA 表达情况($\bar{x} \pm s$)

A 表示凝胶电泳 PCR 产物结果;B 表示目的基因/β-actin mRNA 的灰度比值,* 与对照组相比,$P<0.01$

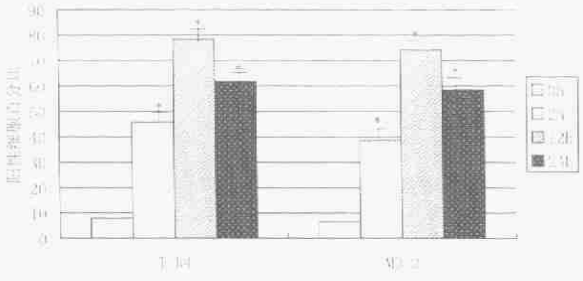


图 2 再灌注后 FITC、PE 标记阳性细胞比例($\bar{x} \pm s$),

* 与对照组相比,$P<0.01$

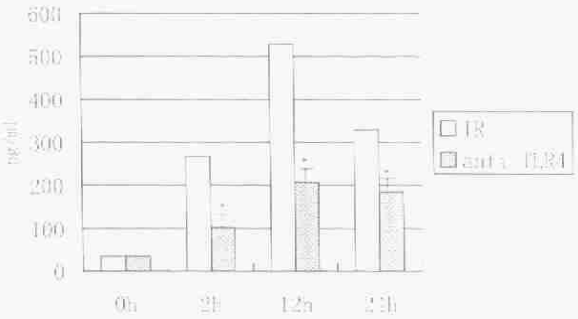


图 3 两组 KCs 培养上清中 TNF-α 分泌量比较($\bar{x} \pm s$),

* 与 IR 组相比,$P<0.01$

3 讨 论

Toll 类蛋白是首先在果蝇胚胎发育时发现的一类跨膜受体,在抗微生物的免疫反应中起重要作用[1,6]。1996 年,Janeway 等首先发现第一个存在于人类细胞表面的 Toll 样蛋白,称为 Toll 受体[7]。近年来,在哺乳动物相继发现了 10 个 Toll 样受体家族成员。其中与内毒素(LPS)信号转导相关的主要是 Toll 样受体 4(TLR4)[8]。

现已基本阐明内毒素的信号转导途径:LPS 进入血液后,首先与 LBP(脂多糖结合蛋白)结合,形成 LPS-LBP 复合体,然后再与单核巨噬细胞膜上的 TLR4 结合,由此胞外信号经 TLR4 跨膜传递至胞内,通过多步酶促级联反应,活化 NF-κB,最终引起 TNF-α 等有害细胞因子大量释放。但 LPS 激活细胞还必需有另一种重要调节分子存在—MD-2[9]。MD-2 是内毒素跨膜信号转导的重要调节蛋白,它与 TLR4 的胞外区相连,形成 TLR4/MD-2 复合物,增强 LPS 的信号转导。

Kupffer 细胞作为体内最大的固定单核巨噬细胞群体,主要分布于肝血窦内,当肝移植无肝期结束、再灌注开始后,大量内毒素随门静脉入肝,首先与 KCs 相互接触。因此研究 KCs 上 TLR4/MD-2 的表达,对于阐明引起再灌注损伤的细胞因子来源以及 IRI 的发生机制意义重大。

研究发现,正常处于静息状态的 KCs 表面有少量 TLR4/MD-2 基因及蛋白的表达,这可能对于维持 KCs 功能,使之处于应激状态是必需的。但在肝移植再灌注后,随着大量 LPS 与 KCs 接触,触发了 LPS 的信号转导,引起 KCs 对 LPS 的应激和敏感度增加,导致 TLR4/MD-2 基因和蛋白表达迅速增强,并在再灌注后 12h 达到峰值,随之引起 TNF-α 等有害细胞因子的分泌增多。为了确切地说明 TLR4/MD-2 与下游细胞因子表达的关系,通过应用抗 TLR4 抗体阻断 TLR4 的结合功能后,发现下游 TNF-α 的分泌大大减少,这一结果证明 KCs 表面 TLR4/MD-2 蛋白表达对于下游细胞因子的分泌是必需的。

综上所述,研究表明 Kupffer 表面有 TLR4/MD-2 基因以及膜蛋白的表达,缺血再灌注后,TLR4/

维普资讯 http://www.cqvip.com

MD－2 表达增强，内毒素通过与 TLR4/MD－2 的结合，启动 Kupffer 细胞激活的信号转导，引起 TNF－α 等细胞因子的分泌，最终造成对移植物的攻击和损害。但尚需进一步研究 TLR4/MD－2－NF－κB—细胞因子之间的信号转导过程，才能准确阐明 TLR4/MD－2 参与缺血再灌注损伤的整个信号转导通路。

（致谢：本研究是在重庆市肝胆外科重点实验室完成，在此感谢！）

参 考 文 献

[1] Nakaya TA, Kita M, Kuriyama H, et al. Panax ginseng Induces Production of Proinflammatory Cytokines via Toll－like Receptor[J]. J Interferon Cytokine Res, 2004; 24: 93－100.

[2] Kim L, Butcher BA, Denkers EY. Toxoplasma gondii interferes with lipopolysaccharide－induced mitogen－activated protein kinase activation by mechanisms distinct from endotoxin tolerance[J]. J Immunol, 2004; 172: 3003－3010.

[3] Giakoustidis DE, Iliadis S, Tsanfilas D, et al. Blockade of Kupffer cells bygadolinium chloride reduces lipid peroxidation and protects liver from ischemia/reperfusion injury[J]. Hepatogastroenterology, 2003; 50: 1587－1592.

[4] PENG Y, GONG JP, YAN LN, et al. Improved two－cuff technique for orthotopic liver transplantation in rat[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2004; 3: 33－37.

[5] Gong JP, Wu CX, Liu CA, et al. Intestinal damage mediated by Kupffer cells in rats with endotoxemia[J]. World J Gastroenterol, 2002; 15: 923－927.

[6] Palliser D, Huang Q, Hacohen N, et al. A role for toil－like receptor 4 in dendritic cell activation and cytolytic CD8＋ T cell differentiation in response to a recombinant heat shock fusion protein[J]. J Immunol, 2004; 172: 2885－2888.

[7] Branger J, Leemans JC, Florquin S, et al. Toil－like receptor 4 plays a protective role in pulmonary tuberculosis in mice [J]. Int Immunol, 2004; 16: 509－516.

[8] Yan SR, Qing G, Byers DM, et al. Role of MyD88 in Diminished Tumor Necrosis Factor Alpha Production by Newborn Mononuclear Cells in Response to Lipopolysaccharide[J]. Infect Immun, 2004; 72: 1223－1229.

[9] Mann PB, Kennett MJ, Harvill ET. Toil－Like Receptor 4 Is Critical to Innate Host Defense in a Murine Model of Bordetellosis[J]. J Infect Dis, 2004; 189: 833－836.

（上接第 710 页）

[6] Ma D, Cook DN, Alberti M, et al. Molecular cloning and characterization of acrA and acreE genes of Escherichia coli[J]. J. Bacteriol, 1993; 175: 6299－6313.

[7] Parkhill J., DouganG., James K, et al. Complete genome sequence of a multiple drug resistant Salmonella enterica serovar Typhi cT18[J]. Nature, 2001; 413(6858): 848－852.

[8] Ma D, Alberti M, Lynch C, et al. The local repressor AcrR plays amodulating role in the regulation of acrAB genes of Escherichia coli by global stress signals[J]. Mol Microbiol, 1996; 19(1): 101－112.

[9] Wang H, Joann L, DZink－Fox, et al. Genetic Characterization of Highly Fluoroquinolone－Reststant Clinical Escherichia coli Strains from China: Role of acrR Mutations[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001: 45(5): 1515－1521.

[10] Webber MA, PiddockL JV. Absence of Mutations in marRAB or soxRS in acrB－Overexpressing Fluoroquinolone－Resistant Clinical and Veterinary Isolates of Escherichia coli[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001; 45(5): 1550－1552.

[11] Ma D, Cook DN, Alberti M, et al. Genes acrAand acrB encode a Stress－induced efflux system of Escherichia coli[J]. Mol Microbiol, 1995; 16(1): 45－55.