维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)04－0444－04

实验性酒精性肝病时 Kupffer 细胞 Toll 样受体 4 的表达

左国庆[1]，龚建平[2]，何　松[1]，刘长安[2]

(1.重庆医科大学第二临床学院消化内科,2.肝胆外科,重庆　400010)

【摘　要】目的:观察酒精性肝病大鼠 Kupffer 细胞(KCs)Toll 样受体(TLR)4 蛋白合成和基因表达及其在肝损害中的作用。方法:28 只 Wistar 大鼠随机分为乙醇喂养组(E 组)和葡萄糖喂养组(C 组)。用激光共聚焦显微镜测定 KCs 膜上 TLR4 蛋白的合成;用逆转录多聚酶联反应(RT－PCR)测定 KCs 中 TLR4 mRNA 的表达;用鲎试剂基质偶氮显色法测定门静脉血中内毒素含量,并观察肝脏形态学变化。结果:E 组 KCs 膜 TLR4 蛋白表达较 C 组显著增强;E 组 TLR4 mRNA 的表达也显著高于 C 组($P<0.01$);E 组血浆内毒素浓度明显高于 C 组($P<0.01$);E 组肝组织发生显著的病理变化。结论:乙醇能诱导大鼠肝脏 KCs 合成 TLR4 蛋白及表达 TLR4 基因,TLR4 在乙醇所致的肝损害中可能起作用。

【关键词】Toll 样受体;酒精性肝病; Kupffer 细胞

【中国图书分类法分类号】R575　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－09－05

Expression of Toll－like receptor 4 in kupffer cells in experimental alcohol－induced liver disease

ZUO Guoqing, et al

(*Department of Digestive Disease, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To observe the synthesis of Toll－like receptor (TLR)4 protein and its mRNA expression in Kupffer cells (KCs) and evaluate the role of TLR 4 in the liver injury in the rats with alcohol－induced liver disease (ALD). *Methods*: Twenty eight Wistar rats were divided into two groups: ethanol－fed group(group E) and control group (group C). Group E were fed with ethanol (dose of 5～12g/kg/d) and group C received dextrose instead of ethanol. Rats of the two groups were sacrificed at 4 wk and 8 wk. KCs were isolated and incubated. TLR 4 protein in KCs was determined by laser scanning confocal microscopy (LSCM). TLR 4 mRNA in KCs was determined by the reverse transcription polymerase chain reaction (RT－PCR). Plasma endotoxin levels were measured using the Limulus Amebocyte Lysate test kit. The liver pathology was observed under light and electronic microscopy. *Results*: The fluorescence intensity of TLR 4 protein in KCs by LSCM was stronger in group E than those in group C. Ethanol administration led to a significant increase in TLR 4 mRNA expression compared with group C ($P<0.01$). Plasma endotoxin levels increased significantly in group E (129±21)ng/L and (187±35)ng/L at than in control rats (48±9)ng/L and (53±11)ng/L, respectively at 4 wk and 8 wk ($P<0.01$). In liver section from group E, there was marked pathological changes including steatosis, cell infiltration and necrosis. None of the rats in group C developed marked pathological changes in liver. Conclusion: Ethanol administration can markedly lead to the synthesis of TLR 4 protein and its gene expression in KCs, and TLR 4 may play a role in the development of alcohol－induced liver injury.

【Key words】 Toll－like receptor; Alcohol－induced liver disease; Kupffer cells

以前的研究显示血浆内毒素、肝组织中脂多糖(LPS)结合蛋白(LBP)及其受体 CD14 在酒精性肝病(ALD)所致的肝损害中起重要作用[1]。最近的研究发现,Kupffer 细胞表面存在一种膜蛋白,被称为 Toll 样受体(Toll－like receptor,TLR)4,它是一种跨膜蛋白,与 IL－1 受体具有相同的胞浆结构域,在 LPS 介导单核－巨噬细胞激活中起重要作用[2],LPS 介导 KCs 的激活也需要 TLR4 的参与[3]。但是,ALD 时 KCs 是否合成 TLR 4 蛋白及表达 TLR 4 基因仍不清楚。本研究用乙醇喂养大鼠建立 ALD 动物模型,观察肝 KCs 是否合成 TLR 4 的蛋白及表

作者介绍:左国庆(1963－　),男,硕士,副教授,
主要研究方向:酒精性肝病和原发性肝癌。

基金项目:国家自然科学基金(批准号:30170919)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

达 TLR 4 基因，探讨 TLR4 在大鼠 ALD 肝脏损害中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物及处理

28 只雌性 Wistar 大鼠，体重 180～220g，随机分为乙醇喂养组(E 组)和葡萄糖喂养对照组(C 组)。E 组第 1 周乙醇用量为 5g/kg/d 加入饮水中喂养(用灌胃方式喂养)，以后每周乙醇浓度递增，第 8 周时达 12g/kg/d，每日饮食为新鲜配制。C 组饮水中加入等量的葡萄糖，其它条件完全相同，两组大鼠分别于 4 周和 8 周后活杀取材，每组每时相点 7 只动物。主要取材方法为 1% 的戊巴比妥(30mg/kg)腹腔内注射麻醉后，经尾静脉抽取血标本存放于 −70℃ 保存待测。大鼠酒精性肝病的病理学指标与文献报道一致[4]。

1.2 KCs 的分离和培养

按照 Gong 等[5] 介绍的原位胶原酶灌注法进行分离。主要步骤为：门静脉灌注 Hanks′ 平衡液后切取肝脏，用 0.5 g/L 的Ⅳ型胶原酶溶液(Sigma)进行灌注消化，然后彻底冲洗，放入装有含 5 ml/L 胎牛血清(FCS)的 RPMI 培养基的塑料培养皿中。37℃ 下，在 O_2 和 CO_2(0.95/0.05)中孵育 3h 后，用吸管清除悬浮细胞后得 KCs，经酸性磷酸酶组织化学染色鉴定，光镜下观察其纯度大于 90%，用台盼兰染色测定其活力大于 92%。

1.3 KCs 膜 TLR 4 蛋白合成

用激光共聚焦显微镜测定。主要步骤为：分离的 KCs 用抗 TLR4 抗体(Santa Cruz 公司产品)(0.1 mg/L)4℃ 下孵育 60min，清洗后，再用 FITC－山羊抗兔 IgG 4℃ 下孵育 30 min，再次清洗，然后用激光共聚焦显微镜(Leica TCS NT 160195，德国)测定 KCs 中 FITC 阳性细胞数及其荧光强度的变化。

1.4 KCs 中 TLR 4 的测定

1.4.1 KCs 中 RNA 的提取和 cDNA 的合成

用 TRIZOL 试剂盒(Life Technologies，USA)提取 KCs 中总 RNA，具体方法按试剂说明书进行。取 0.5ml RNA 用 RT－PCR 试剂盒(Roche，USA)将其逆转录为互补的 DNA (cDNA)，并于 −70℃ 保存待测。

1.4.2 KCs 中 TLR 4 mRNA 表达

用逆转录－多聚酶链聚合物反应(RT－PCR)测定，以 β－Actin 作为内参对照。TLR 4 和 β－Actin 的 mRNA 引物由上海生工生物工程公司合成。TLR 4 的序列为：上游(5′－GTCCATCGGTTGATCTTGGA－3′)，下游(5′－TTAAAAATGGCTGGCAATTCT－3′)；β－actin 的序列为：上游(5′－ACCACAGCTGAGAGGGAAATCG－3′)，下游(5′－AGAGGTCTTTACGGATGTCAACG－3′)。TLR 4 和 β－actin 扩增的 PCR 产物大小分别为 681bp 和 281bp。扩增条件：93℃ 变性 1min，57℃ 退火 2min，72℃ 扩增 1min，共 30 个循环。用 20g/L 琼脂糖电泳 PCR 扩增产物，EB 染色，凝胶成像系统观察、照相，计算 PCR 产物的相对表达量，结果即 PCR 产物量以相对光密度(ROD)表示。

1.5 血浆内毒素含量的测定

血浆内毒素含量按左国庆等[1] 介绍的方法进行测定。主要步骤为：无热原条件下收集门静脉血标本，4℃ 200g 离心 8 min，取血浆并在 −70℃ 下保存，并在 1 周内用鲎试剂基质偶氮显色法进行测定(鲎试剂盒从上海生化所购买)。

1.6 肝脏形态学观察

大鼠活杀时取左肝叶肝组织。供光镜观察的标本固定于 100 ml·L^{-1} 中性甲醛溶液，常规石蜡包埋，HE 染色；供电镜观察的标本固定于 25g·L^{-1} 戊二醛磷酸盐缓冲溶液中，环氧树脂 618 包埋，超薄切片，醋酸铀和柠檬酸铅电子染色，日立－2000 型透射电镜观察。

1.7 统计学处理

实验所得数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，用 t 检验方法进行统计，以 $P<0.01$ 表示差异显著。

2 结 果

2.1 KCs 膜上 TLR 4 蛋白的合成

为了确定 KCs 是否合成 TLR 4 蛋白，用激光共聚焦显微镜测定两组 KCs 上 TLR 4 蛋白的表达情况，发现 C 组无明显 FITC－TLR 4 阳性细胞；E 组 FITC－TLR 4 阳性细胞数明显增多，其荧光强度也显著增强(图 1)。

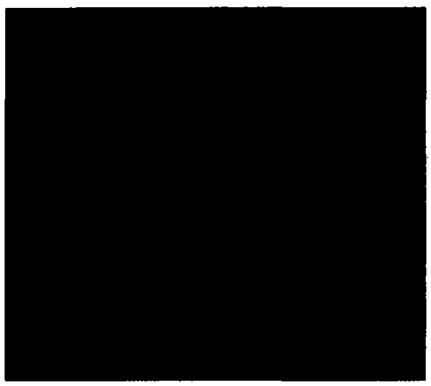


图 1 E 组激光共聚焦显微镜示明显的 FITC－TLR 4 阳性细胞

2.2 KCs 中 TLR 4 mRNA 的表达

C 组大鼠 4 周和 8 周时 KCs 中 TLR 4mRNA 的表达均不明显。E 组 KCs 中 TLR 4mRNA 在 4 周时已明显表达(ROD 值为 7.6 ± 0.5)，8 周时其表达进一步增加(ROD 值为 8.7 ± 0.7)，与 C 组相比差异显著(C 组 ROD 值 4 周和 8 周分别为 1.8 ± 0.2

维普资讯 http://www.cqvip.com

和 2.0±0.3, $P<0.01$)(图 2)。

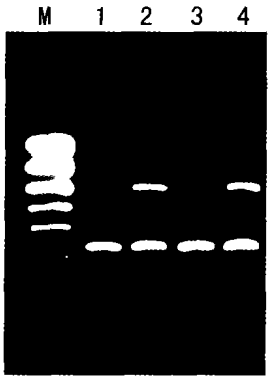


图 2 RT－PCR 显示 TLR 4 mRNA 表达结果

M. 标准对照;1 和 3 为 C 组 4 周和 8 周;2 和 4 为 E 组 4 周和 8 周



图 3 E 组 8 周时肝组织中有较多吞噬细胞(KCs),其胞内溶酶体增多,吞噬活跃。肝细胞胞浆空泡样变性及髓鞘样结构形成(TEM×4000)

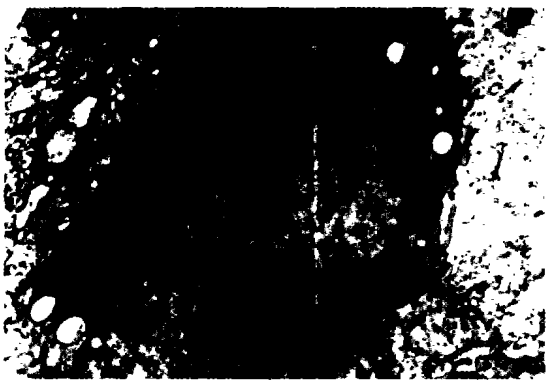


图 4 E 组 8 周时 KCs 吞噬体增多、线粒体空化(TEM×20000)

2.3 血浆中内毒素含量变化

E 组大鼠在 4 周和 8 周时血浆内毒素浓度分别(129±21)ng·L^{-1}和(187±35)ng·L^{-1},明显高于 C 组的(48±9)ng·L^{-1}和(53±11)ng·L^{-1}($P<0.01$)。

2.4 肝脏病理学变化

E 组乙醇喂养 4 周时光镜下见肝细胞内出现大小不等的空泡样脂肪变性,肝窦内有较多白细胞,但未见明显的炎性细胞浸润和坏死病灶形成;8 周后,肝细胞脂肪变性更加明显,并有较多的炎性细胞浸润及坏死灶出现。电镜下 E 组肝细胞内有较多局灶性的胞浆变性及髓鞘样结构形式,线粒体空化;KCs 数量增多,吞噬活跃。C 组大鼠光、电镜下肝组织无明显的病理学变化(图 3 和图 4)。

3 讨 论

已证明,ALD 时肝脏损害的程度与乙醇的剂量和作用时间呈正相关[6],乙醇对肝脏的毒性作用与血浆中内毒素的水平密切相关,内毒素对肝脏的损害主要是通过 CD14 的作用而实现的[7]。TLR 4 是近年发现的一种细胞膜受体,与 CD14 共同作用促使细胞对多种病原微生物特别是 LPS 发生反应[2]。通过这类受体触发信号传导,引起 NF－kB 的核转移,促发炎症反应,导致 TNF－α、白介素类、前列腺素及其它细胞因子释放,引起肝细胞损害。所以 LPS 与 KCs 膜上 TLR 结合可能是 ALD 发病机制中的关键步骤[8]。

本研究的主要目的是观察乙醇喂养大鼠 KCs 中能否合成 TLR 4 蛋白及表达 TLR 4 基因,以及 TLR4 在大鼠 ALD 肝脏损害中的作用。结果发现 E 组大鼠 KCs 显著表达 TLR 4 蛋白和 TLR 4 基因,血浆中内毒素水平明显高于对照组,肝脏内出现脂肪变性、坏死及炎性反应,而对照组肝脏无明显的形态学改变,提示 TLR 4 在乙醇所致的肝损害中可能起作用。我们以前的研究显示,ALD 时肝脏出现严重损害,同时伴有肝组织中 LBP 和 CD14 蛋白及其基因的表达明显增高,血浆转氨酶明显增高,增高的 LBP 和 CD14 与肝脏发生炎症反应和损害的程度密切相关[1]。Yin 等[9]也报道乙醇能增加血浆中内毒素含量和肝组织中 CD14 mRNA 的水平,大鼠肝脏对乙醇所致的损伤的敏感性与肝组织中 CD14 的表达直接相关。ALD 时肝脏能产生 TNF－α、IL 类、前列腺素及其它可溶性细胞介质,在早期肝脏损害中起重要作用"[10]。

最近有研究发现乙醇喂养缺乏 TLR 2 或 TLR 4 基因的小鼠,其酒精性肝损害的程度明显低于正常表达 TLR 基因的小鼠,提示 TLR 4 能介导 LPS

维普资讯 http://www.cqvip.com

的信号传导。Uesugi 等[3]报道小鼠 TLR 4 基因功能变异能预防乙醇早期所致的肝损害,阻止 LPS 信号的传导,减少细胞因子 TNF－α 的产生。我们的结果也证实肝 KCs 膜上 TLR 4 蛋白在 ALD 所致肝脏损害中可能起作用。KCs 中 TLR 4 mRNA 表达明显增强进一步显示 KCs 中 TLR 4 蛋白合成的增多,可能引起肝组织或肝细胞对内毒素的敏感性增加,导致核转录因子 NF－kB 的激活和前炎症性细胞因子的产生和释放,最终诱导肝脏细胞损害[11]。

参 考 文 献

[1] 左国庆,何 松,刘长安,等.实验性酒精性肝病时脂多糖结合蛋白和脂多糖受体 CD14 的表达[J].中华肝脏病杂志,2002;10(3):207－210.

[2] Li M, Carpio DF, Zheng Y, et al. An Essential role of the NF－kB/Toll－like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue－repair gene expression by necrotic cells [J]. J Immunol, 2001; 166 (12): 7128－7135.

[3] Uesugi T, Froh M, Arteel GE, et al. Toll－like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol－induced liver injury in mice[J]. Hepatology, 2001; 34(1):101－108.

[4] 林 红,吕 淼,张义侠,等.酒精性肝病大鼠模型的建立[J].世界华人消化杂志,2001;9(1):24－28.

[5] Gong JP, Wu CX, Liu Ca, et al. Intestinal damage mediated by Kupffer cells in rats with endotoxemia [J]. World J Gastroenterol, 2002; 8 (5): 467－470.

[6] Gordon H. Detection of alcoholic liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2001;7(3): 297－302.

[7] Kono H, Wheeler MD, Rusyn I, et al. Gender differences in early alcohol－induced liver injury: role of CD14, NF－kB, and TNF－α[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2000; 278 (4): G652－G661.

[8] Liu Y, Wang Y, Yamakuchi M, et al. Upregulation of Toll－like receptor 2 gene expression in macrophage response to peptidoglycan and high concentration of lipopolysaccharide is involved in NF－kB activation[J]. Infect Immun, 2001; 69(5): 2788－2796.

[9] Yin M, Ikejima K, Wheeler MD, et al. Estrogen is involved in early alcohol－induced liver injury in a rat enteral feeding model[J]. Hepatology , 2000; 31 (1): 117－123.

[10] Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery[J]. Surgery, 2000; 127 (2): 117－126.

[11] Bautista AP. Impact of alcohol on the ability of Kupffer cells to produce chemokines and its role in alcoholic liver disease [J]. J Gastroenterol Hepatol,2000;15(4): 349－355.