DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.10.008
第26卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 10
2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

文章编号:1000-5404(2004)10-0863-04

论著

TLR4在内毒素激活肺泡Ⅱ型上皮细胞过程中的表达及可能作用机制

李永旺,张德明,钱桂生,毛宝龄,麻 莉 (第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037)

提 要:目的 探讨TLR4(toll like receptor 4)在内毒素(LPS)激活肺泡Ⅱ型上皮细胞(ATⅡcells)中的表达及可能作用机制。方法 通过RT-PCR的方法检测TLR4 mRNA在ATⅡcells的表达;电泳迁移率改变法检测LPS刺激后的ATⅡcells NF-κB活性的变化;ELISA检测ATⅡcells培养上清中TNF-α和IL-6的含量变化。结果 正常ATⅡcells表达有TLR4 mRNA,LPS刺激后表达增强;其表达在1~10^3 ng/ml LPS范围内呈浓度依赖性增强。LPS刺激后,ATⅡcells NF-κB活性及TNF-α和IL-6的生成均呈浓度依赖性的增强。结论 TLR4在活化的ATⅡcells中的表达呈LPS浓度依赖性并向细胞内传递LPS炎症信号。

关键词:内毒素;Toll样受体4;急性肺损伤;肺泡Ⅱ型上皮细胞
中图法分类号:R322.35;R392.11;R996 文献标识码:A

TLR4 expression in the activation of alveolar type Ⅱ cells induced by lipopolysaccharide

LI Yong-wang, ZHANG De-ming, QIAN Gui-sheng, MAO Bao-ling, MA Li (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of TLR4 (toll like receptor 4) and its roles in the activation of alveolar type Ⅱ epithelial cells (AT Ⅱ cells) induced by lipopolysaccharide (LPS). Methods The expression of TLR4 mRNA in AT Ⅱ cells was detected by semi-quantitative RT-PCR. The activity of NF-κB in AT Ⅱ cells was measured by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The concentration changes of TNF-α and IL-6 in the supernatant of cultured AT Ⅱ cells were detected by ELISA. Results The expression of TLR4 mRNA was detected in normal AT Ⅱ cells. After stimulation with LPS, the expression increased in a dose-dependent manner in the range of 1—10^3 ng/mL LPS. In AT Ⅱ cells after stimulation with LPS, the NF-κB activity and the production of TNF-α and IL-6 increased in a dose-dependent manner. Conclusion TLR4 is expressed in AT Ⅱ cells in a dose-dependent manner, and also conducts inflammatory signal of LPS into cells.

Key words: lipopolysaccharide; toll like receptor 4; acute lung injury; alveolar type Ⅱ epithelial cell

在内毒素(lipopolysaccharide, LPS)所致肺急性炎症反应的研究中,既往多注重肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages, AM)和多形核白细胞(polymorphonuclear leukocyte, PMN)在诱发和调节肺炎症反应中的作用[1]。而对肺泡Ⅱ型上皮细胞(alveolar type Ⅱ epithelial cells, AT Ⅱ cells)的研究却较少。事实上,象AM和PMN一样,AT Ⅱ cells也能被LPS激活,释放大量炎症介质如TNF-α、IL-8、NO、H_2O_2、巨噬细胞炎症蛋白-2(macrophage inflammatory protein-2, MIP-2)、单核细胞趋化蛋白(monocyte chemotactic protein, MCP)和前列腺素等,对急性肺损伤的发生、发展同样起着不可忽视的作用[2~5]。一系列的研究证实,LPS炎症信号是通过TLR4(toll like receptor4)向细胞内传导[6,7]。那么,Ⅱ型细胞是否表达TLR4,LPS激活Ⅱ型细胞是否通过TLR4来介导,有待证实。我们假设分离培养的肺泡Ⅱ型上皮细胞表达有TLR4受体,并通过实验进行验证。同时观察NF-κB活性的变化及细胞因子的生成。

1 材料和方法

1.1 主要材料

LPS(*E. coli* serotype 055: B5)购自Sigma公司、p50、p65单克隆抗体购自SantaCruz公司、[γ-^{32}P] ATP购自北京福瑞公司、TNF-α和IL-6 ELISA检测试剂盒购自晶美生物、RT-PCR试剂盒

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39730210);全军医学科研"十五"计划重点课题(01Z074)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (39730210) and the Key Research Project of Medicine and Health of the "Tenth Five-year Plan" of PLA (01Z074)
作者简介:李永旺(1971—),男,河南省确山县人,博士,主治医师,主要从事急性肺损伤方面的研究。电话:(023)68755320
通信作者:钱桂生,电话:(023)68755603
收稿日期:2004-02-24;修回日期:2004-04-02

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

购自大连宝生物、RNA 提取试剂(Tripue)购自罗氏公司、凝胶电泳迁移分析系统(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)检测试剂盒购自 Promega 公司。

1.2 细胞培养及实验分组

取引产胎儿肺组织, 参照文献[8]方法培养肺泡Ⅱ型上皮细胞。细胞培养 24 h 后, 转为无血清 DMEM 培养, 按以下方法进行分组: ①加入 1 μg/ml LPS, 对照组不加 LPS, 分别于 1、2、4、8、12、24 h 提取细胞总 RNA 和细胞核蛋白, 检测 TLR4 mRNA 表达, 同时检测 NF-κB 活性变化。细胞培养上清-70℃存放, 待测 TNF-α 和 IL-6 含量。②分别加入 1、10、10^2、10^3、10^4、10^5 ng/ml LPS, 对照组不加 LPS, 继续培养 2 h 后, 提取细胞总 RNA 和细胞核蛋白, 检测 TLR4 mRNA 表达, 同时检测 NF-κB 活性变化。细胞培养上清-70 ℃存放, 待测 TNF-α 和 IL-6 含量。

1.3 检测 TLR4 和 MD2 mRNA 的表达

细胞总 RNA 的提取按照 Tripue 试剂说明书进行。TLR4 (ACCESSION NM-138554)上游引物为 5′-AGCCCTGGGAGC-CTTTTCTGG-3′, 下游引物为 5′-CAAATTGCACAGGCCCTCTAG-3′, 扩增产物 499 bp, Tm: 57 ℃; 按照 RT-PCR 试剂盒说明书进行扩增。各组样品同时扩增 GAPDH(294 bp)作为内参照。扩增完毕, 取各样本 PCR 产物 10 μl 与 2 μl 上样缓冲液混匀后, 加入凝胶梳孔内, 行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。取 DNA maker 同时电泳, 作为标准分子量参照。55~60 V 恒压下电泳 40 min 后, 凝胶放入凝胶分析仪暗箱中, 紫外线投射成像, CCD 摄入计算机分析。

1.4 NF-κB 活性检测

细胞核蛋白的提取参照文献[9]进行。含通用 κB 序列的双链寡核苷酸探针(5′-TTGTTACAAGGGACTTTC CGCTGGGGACTTTCCAGGGAGGC-3′ 和 3′-AACAATGTTCCCTGAAAGGCGACC- CCTGAAAGGTCCCTCCG-5′)在 T4 激酶催化下, 用[γ-^{32}P] ATP 标记探针 5′端并纯化。寡核苷酸探针与细胞核蛋白的结合反应: ①各组取核提取物 3 μg 与标记探针 1 μl (1 ngDNA) 及 20 μl 结合缓冲液混合; ②1 μg LPS 刺激 2 h 组核提取物 3 μg 与 20 μl 结合缓冲液混合, 并分别加入 200 倍的未标记探针和小鼠抗人 P50 及 P65 单克隆抗体用作抗体竞争及超迁试验, 先冰浴 30 min, 再加入标记探针 1 μl。上述①和②混和物分别于 37 ℃孵育 1 h 后, 经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳毕将凝胶置干燥仪中烘烤, -70 ℃放射自显影 24 h 以上。将显影结果经扫描仪扫入计算机中, 用 Image Tool 系统进行分析, 以积分灰度值表示 NF-κB 的活性变化。

1.5 ELISA 测定细胞培养上清中 TNF-α 和 IL-6 含量

按照试剂盒说明书进行。

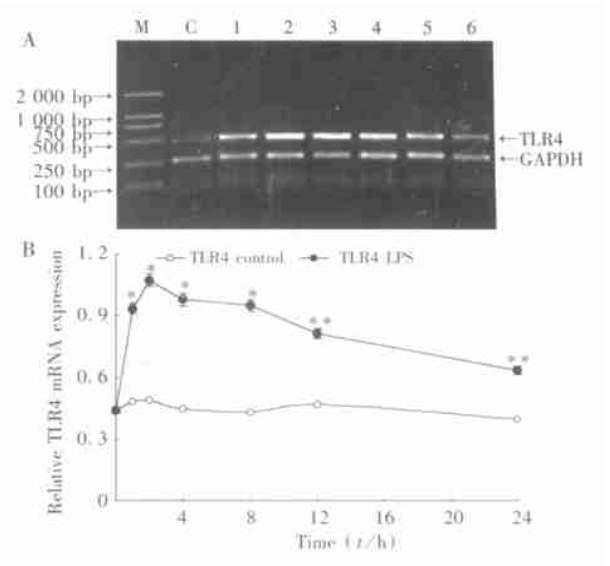
1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用单因素方差分析及均数间多重比较。

2 结果

2.1 LPS 刺激后不同时相点 TLR4 mRNA 表达水平的改变

正常未刺激细胞即可见 TLR4 mRNA 表达。LPS 刺激后 1 h, TLR4 mRNA 表达明显增强, 2 h 达到高峰, 此后持续升高至 8 h 后逐渐下降(图 1)。



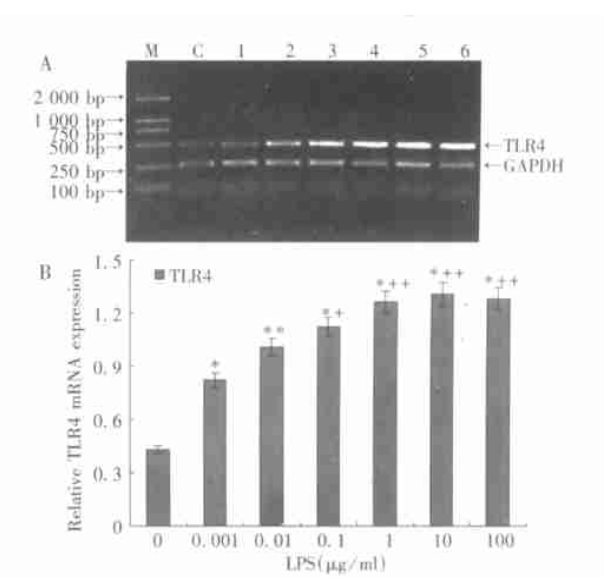
A: TLR4 mRNA expression in AT Ⅱ cells; M: DNA marker; C: Control; 1-6: 1, 2, 4, 8, 12, 24 h. B: The densitometric analysis for TLR4 mRNA after normalization with GAPDH (n=6); *: $P<0.01$, *vs* control; +: $P<0.05$, *vs* 2 h

图 1 LPS 在不同时相点对 TLR4 mRNA 表达的影响

Fig 1 Effects of LPS on TLR4 mRNA expression at different time points

2.2 不同浓度 LPS 刺激对 TLR4 mRNA 表达水平的改变

1 ng 浓度的 LPS 即可引起 TLR4 mRNA 表达显著增高, 此后随着 LPS 浓度的增高, 表达继续增强, 当 LPS 浓度达到 10^3 ng/ml 以上时, 继续增加 LPS 浓度, TLR4 mRNA 表达虽仍有增多, 但无显著变化(图 2)。



A: TLR4 mRNA expression in AT Ⅱ cells; M: DNA marker; C: Control; 1-6: 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μg/ml; B: Densitometric analysis for TLR4 mRNA after normalization with GAPDH (n=6); *: $P<0.01$, *vs* LPS 0; **: $P<0.01$, *vs* LPS 0.001; +: $P<0.01$, *vs* LPS 0.01; ++: $P<0.01$, *vs* LPS 0.1

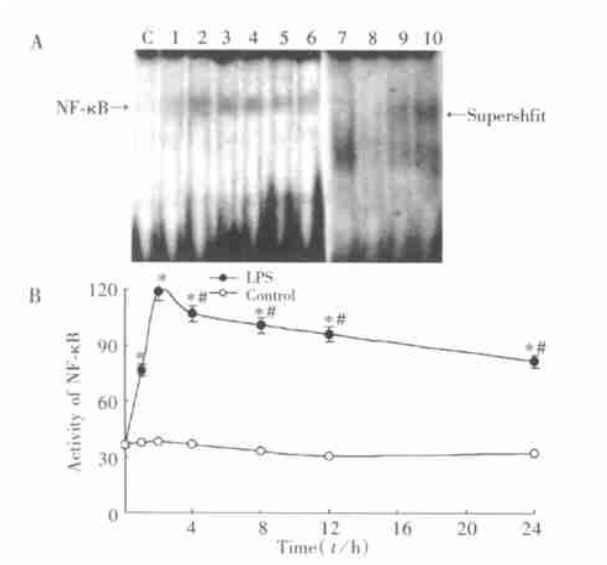
图 2 不同浓度 LPS 对 TLR4 mRNA 表达的影响

Fig 2 Effects of LPS at different concentrations on TLR4 mRNA expression

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3　Ⅱ型细胞 NF-κB 活性变化

2.3.1　LPS 刺激后不同时相点 NF-κB 活性的变化　　LPS 刺激后的各组细胞 NF-κB 活性与对照组相比均显著升高($P<0.001$), LPS 刺激后的 2～4 h NF-κB 活性达到峰值, 随后逐渐减弱。NF-κB 活性的特异性检测: 未标记探针的浓度达标记探针的 200 倍时, 竞争结合反应明显, 滞后带基本消失。抗体超迁移试验: 加入抗 P50 及 P65 单克隆抗体后, 电泳滞后带变淡且更为滞后(图 3)。



A: Result of an EMSA obtained from nuclear extracts; C: Control; 1—6: 1, 2, 4, 8, 12, 24 h; 7—10: Nuclear extracts from cells collected 2 h after 1 μg/ml LPS administration; 8: 200-fold excess unlabled probe; 9: Antibodies to p50; 10: Antibodies to p65; B: Analysis of the result of EMSA ($n=6$); *: $P<0.01$, *vs* control; +: $P<0.05$, *vs* 2 h; ++: $P<0.05$, *vs* 4 h; +++: $P<0.05$, *vs* 8 h

图 3　LPS 在不同时相点对 NF-κB 活性的影响

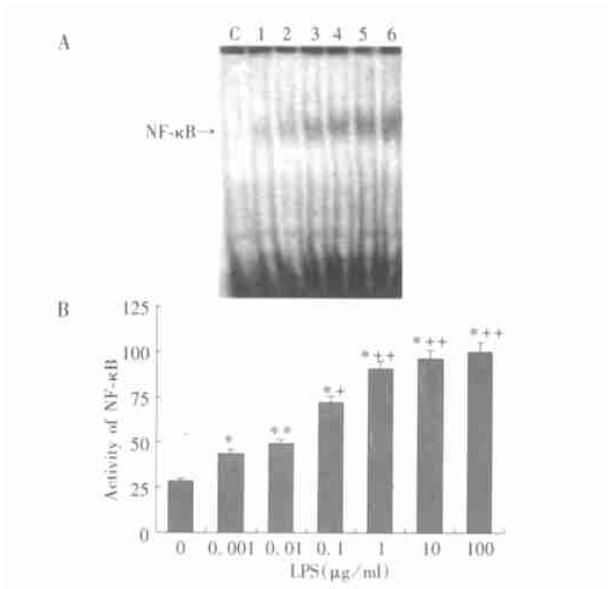
Fig 3　Effects of LPS on the activation of NF-κB in ATⅡ cells at different time points

2.3.2　不同浓度 LPS 刺激对 NF-κB 活化的影响　　LPS 刺激后的各组细胞 NF-κB 活性与对照组相比均显著升高($P<0.001$), 而且随着 LPS 浓度的加大, NF-κB 活性呈浓度依赖性的增强增强(图 4)。

2.4　细胞培养上清 TNF-α 及 IL-6 含量的变化

2.4.1　LPS 刺激后不同时相点 TNF-α 及 IL-6 含量的变化　　LPS 刺激后的各组细胞培养上清中 TNF-α 和 IL-6 的含量均显著高于正常对照组($P<0.01$); 但两者的变化又不尽相同, TNF-α 在 LPS 刺激后的 1 h 内即迅速升高, 2 h 左右达到高峰($P<0.05$), 随后迅速下降, 但仍显著高于对照组; LPS 刺激后的各组细胞 IL-6 的含量缓慢升高, 4 h 后迅速升高, 8 h 左右达到高峰, 随后缓慢下降(图 5)。

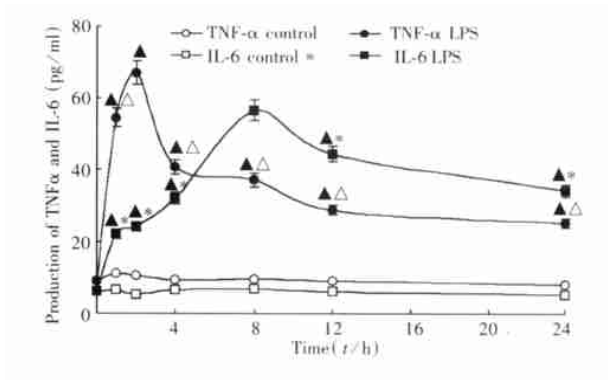
2.4.2　不同浓度 LPS 对 TNF-α 及 IL-6 生成的影响　　经不同浓度 LPS 刺激后 2 h, 各组细胞培养上清中 TNF-α 和 IL-6 的含量均显著高于正常对照组($P<0.01$), 但 IL-6 升高的幅度要低于 TNF-α; LPS 引起的 TNF-α 和 IL-6 的生成均呈浓度依赖性的增加(图 6)。



A: Result of an EMSA obtained from nuclear extracts; C: Control; 1—6: 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 ng/ml LPS; B: Analysis of the result of EMSA ($n=6$); *: $P<0.01$, *vs* LPS 0; **: $P<0.01$, *vs* LPS 0.001; +: $P<0.01$, *vs* LPS 0.01; ++: $P<0.01$, *vs* LPS 0.1

图 4　不同浓度 LPS 对 NF-κB 活性的影响

Fig 4　Effects of LPS at different concentrations on the activation of NF-κB in ATⅡ cells

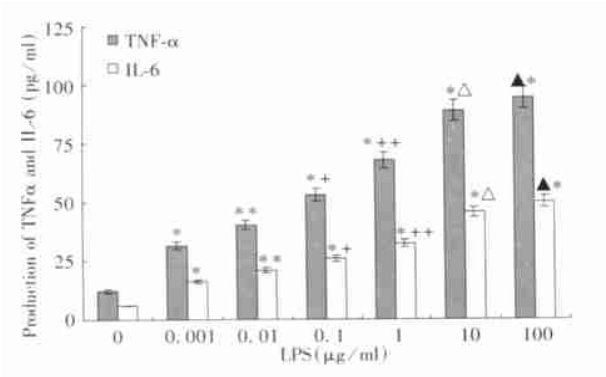


*: $P<0.01$, *vs* control; +: $P<0.05$, *vs* 2 h; ++: $P<0.01$, *vs* 2 h; ▲: $P<0.01$, *vs* 8 h; △: $P<0.05$, *vs* 8 h

图 5　LPS 在不同时相点对 TNF-α 和 IL-6 生成的影响

Fig 5　Effects of LPS on biosynthesis of TNF-α and IL-6 of ATⅡ cells at different time points ($n=6$)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



*：$P<0.01$，*vs* LPS 0；**：$P<0.05$，*vs* LPS 0.001；＋：$P<0.05$，*vs* LPS 0.01；＋＋：$P<0.05$，*vs* LPS 0.1；△：$P<0.05$，*vs* LPS 1；▲：$P<0.05$，*vs* LPS 10

图 6 不同浓度的 LPS 对 TNF-α 和 IL-6 生成的影响

Fig 6 Effect of LPS in different concentration on the production of TNF-α and IL-6 ($n=6$)

3 讨论

人们每天通过呼吸道吸入大量的气体，这其中含有大量的细菌包括革兰阴性菌和内毒素(LPS)，气道及肺泡上皮细胞长期暴露于内毒素和革兰阴性菌的环境中，因此革兰阴性菌及其胞壁成分内毒素是诱发急性肺炎症反应的主要因素。研究证实，II型细胞不仅分泌表面活性物资，还参与肺的炎症反应，能被 LPS 强烈激活产生炎症介质[2~5]。LPS 炎症信号是通过跨膜受体蛋白 TLR4 来向细胞内传导的。最近有证实呼吸道上皮细胞和II型上皮样细胞株 A549 表达有 TOLL 样受体[10]，我们通过 RT-PCR 技术，证实分离培养的II型细胞表达有 TLR4 mRNA，且受 LPS 刺激后表达增强，呈一定的浓度依赖性。这说明TLR4 有可能参与了 LPS 诱导的II型细胞的活化。为进一步研究 TLR4 在 LPS 激活II型细胞中的作用，我们观察了 NF-κB 活性的变化及细胞因子的生成情况。结果显示 NF-κB 的活性变化以及 TNF-α 和 IL-6 的生成与 TLR4 的表达变化相一致，随着 LPS 浓度的增高，TLR4 的表达亦增多，NF-κB 的活性随之增强；TNF-α 和 IL-6 的生成也增多。这进一步说明 TLR4 可能介导了 LPS 诱导的II型细胞的活化。

我们还观察了 LPS 刺激后不同时相点 TLR4 mRNA 表达的变化，NF-κB 活性的变化、TNF-α 及 IL-6 含量的变化。结果显示正常未刺激细胞即可见 TLR4 mRNA 表达。LPS 刺激后 1 h，TLR4 mRNA 表达明显增强，2 h 达到高峰，此后持续升高至 8 h 后逐渐下降。NF-κB活性变化与 TLR4 mRNA 的表达基本一致，LPS 刺激后的 2~4 h NF-κB活性达到峰值，随后逐渐减弱。受 LPS 刺激后，AT II cells 培养上清中 TNF-α 含量迅速上升，2 h 左右达到高峰，IL-6 含量缓慢升高，4 h 后迅速升高，8 h 左右达到高峰。两者变化的不同可能由于 TNF-α 是早期表达的致炎因子，而 IL-6 是继发致炎因子的缘故[11,12]。

以上结果表明，LPS 能够激活肺泡 II 型上皮细胞，导致 TNF-α 和 IL-6 的大量释放。这一过程可能是通过 TLR4→NF-κB→炎症介质这一信号转导通路实现的。肺泡 II 型细胞对于维持肺泡的结构和功能的完整性具有重要作用，它的活化有利于机体清除外来病原，但过度活化也可能造成 II 型细胞的破坏，促进肺损伤的发生。这一发现使我们对急性肺损伤的发生机制有了进一步的认识。

参考文献：

[1] Aldridge A J. Role of the neutrophil in septic shock and the adult respiratory distress syndrome[J]. Eur J Surg, 2002, 168(4): 204—214.

[2] Sunil V R, Connor A J, Guo Y, *et al*. Activation of type II alveolar epithelial cells during acute endotoxemia[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 282(4): L872—880.

[3] Giraud O, Molliex S, Rolland C, *et al*. Halogenated anesthetics reduce interleukin-1beta-induced cytokine secretion by rat alveolar type II cells in primary culture[J]. Anesthesiology, 2003, 98(1): 74—81.

[4] Rose F, Guthmann B, Tenenbaum T, *et al*. Apical, but not basolateral, endotoxin preincubation protects alveolar epithelial cells against hydrogen peroxide-induced loss of barrier function: the role of nitric oxide synthesis [J]. J Immunol, 2002, 169(3): 1474—1481.

[5] Rose F, Dahlem G, Guthmann B, *et al*. Mediator generation and signaling events in alveolar epithelial cells attacked by S. aureus alpha-toxin[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 282(2): L207—214.

[6] Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster[J]. Trends Immunol, 2002, 23(6): 301—304.

[7] 李永旺，麻 莉，毛宝龄，等. 内毒素诱导的TLR4-MD2 信号传导通路[J]. 中国药理学通报，2002，18(2)：121—124.

[8] 李永旺，杨天德，刘桥义. 异氟醚对原代培养的肺泡II型上皮细胞合成表面活性物质的影响[J]. 中国药理学通报，2000，16(5)：516—518.

[9] Haddad J J, Garabedian B S, Saade N E, *et al*. Inhibition of glutathione-related enzymes augments LPS-mediated cytokine biosynthesis: involvement of an IκB/NF-κB-sensitive pathway in the alveolar epithelium[J]. Int Immunopharmacol, 2002, 2(11): 1567—1583.

[10] Schulz C, Farkas L, Wolf K, *et al*. Dif-ferences in LPS-induced activation of bronchial epithelial cells (BEAS-2B) and type II-like pneumocytes (A-549)[J]. Scand J Immunol, 2002, 56(3): 294—302.

[11] 张 青，徐剑铖，毛宝龄，等. 内毒素致伤大鼠肺组织 TNF-α、IL6 的mRNA 表达及 NFIL-6 活化研究[J]. 中国危重病急救医学，2001，13(9)：523—526.

[12] 候一峰，毛宝龄，钱桂生，等. LBP 对 LPS 诱导大鼠肺巨噬细胞 TNF-α、IL-10 mRNA 表达的调节作用[J]. 第三军医大学学报，2001，23(8)：960—962.

（编辑 王 红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net