polymorphrism and DNA sequencing[J]. Arch Dermatol, 1998, 134(8): 963-967.
[2] Andriessen M P, Niessen F B, Van De Kerkhof P C, *et al*. Hypertrophic scarring is associated with epidermal abnormalities: an immunohistochemical study[J]. J Pathol, 1998, 186(2): 192-200.
[3] Sherr C J, Roberts J M. Inhibition of mammlian G_1 cyclin-dependent kinase [J]. Genes Dev, 1995, 9(10): 1149-1163.
[4] Polyak K, Lee M H, Erdjument B H, *et al*. Cloning $p27^{kip}$, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signal[J]. Cell, 1994, 78(1): 59-66.
[5] Polyak K, Kato J Y, Solomon M J, *et al*. $p27^{kip}$, a cyclin-dependent kinase inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest[J]. Genes Dev, 1994, 8(1): 9-22.
[6] Nakayama K, Ishide N, Shirane M, *et al*. Mice Lacking $p27^{kip}$ display increased body size, mutiple organ hypertplasia, retinal dysplasia and pituitary tumors[J]. Cell, 1996, 85(5): 707-720.
[7] Deng C, Zhang P, Harper J W, *et al*. Mice lacking $p21^{cip}$ undergo normal development, but are defective in G_1 checkpoint control[J]. Cell, 1995, 82(4): 675-684.
[8] Wang X, Gorospe M, Huang Y, *et al*. $p27^{kipl}$ overexpression causes apoptotic death of mammalian cells[J]. Oncogene, 1997, 15(24): 2991-2997.
[9] Desmouliere A, Redard M, Darby I, *et al*. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar [J]. Am J Pathol, 1995, 146(1): 56-66.
[10] Ophacharoensuk V, Fero M L, Huges J, *et al*. The cyclin-dependent kinase inhibitor $p27^{kipl}$ safeguards against inflammatory injury[J]. Nat Med, 1998, 4(5): 575-580.
[11] Tanner F C, Yang Z Y, Duckers E, *et al*. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in vascular disease[J]. Circ Res, 1998, 82(3): 396-403.
[12] Albretch J H, Poon Randy Y C, Ahnen C L, *et al*. Involvement of p21 and p27 in regulation of CDK activity and cell cycle progression in the regenerating liver[J]. Oncogene, 1998, 16(16): 2141-2150.
[13] Rodriguez-Puebla M L, Robles A I, Johnson D G, *et al*. Synchronized proliferation induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate treatment of mouse skin: an *in vivo* model for cell cycle regulation[J]. Cell Growth Differ, 1998, 9(1): 31-39.
[14] Kato A, Takahashi H, Takahashi Y, *et al*. Inactivation of the Cyclin D-dependent kinase in the rat fibroblast cell line, 3Y1, induced by contact inhibition[J]. J Biol Chem, 1997, 272(2): 8065-8070.
[15] Smith E, Frenkel B, Maclarchlan T K, *et al*. Post-proliferative cyclin E-associated kinase activity in differentiated osteoblasts: inhibition by proliferating osteoblasts and osteosarcoma cells[J]. J Cell Biochem, 1997, 66(2): 141-152.
[16] Lauricella M, Giuliano M, Emanuele S, *et al*. Increased cyclin E level in retiroblastoma cells during programmed cell death[J]. Cell Mol Biol, 1998, 44(8): 1229-1235.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)05-0380-02

大鼠肺巨噬细胞内毒素耐受性与 TLR4 mRNA 表达的变化

Tolerance of lipopolysaccharide related to the expression changes of TLR4 mRNA

张德明, 李永旺, 毛宝龄, 钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所, 重庆 400037)

G^-菌感染致急性肺损伤, 主要是由于内毒素(Lipopolysaccharide, LPS)活化炎性细胞释放大量炎症因子。不同个体感染G^-菌后临床表现轻重不一, 说明个体对 LPS 的反应性有相差, 即对 LPS 耐受性(Tolerance)存在差异。研究表明 LPS 耐受性与其靶细胞信号转导的跨膜受体 TLR4 (Toll-like receptor 4)的结构与功能及表达量有关[1,2], 但尚存争议[3]。我们通过观察大鼠肺巨噬细胞 LPS 耐受性及 TLR4mRNA 表达的变化, 以说明 LPS 耐受性与 TLR4 表达量相关的可能性。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

Wistar 雄性大鼠 30 只(第三军医大学实验动物中心提供), 体重 200~250 g, 随机分成正常对照组(A), LPS 单次刺激组(B), LPS 二次重复刺激组(C)。

1.2 细胞培养

参照 Wang 等[4] 方法略加改进, 各组大鼠氯胺酮(100 mg/kg)腹腔麻醉后即行气管插管, 冰 D-Hanks 液(Hyclone 公司)20 ml 分次灌洗双肺, 回收灌洗液 15 ml, 即 4 000 r/min× 10 min× 4 ℃离心, 沉淀用生理盐水 3 ml 重悬、再离心。反复洗涤 3 次, 然后用 RPMI1640(Hyclone 公司)培养液 5 ml 重悬置 6 孔培养皿中, 于孵箱中 37 ℃、5% CO_2 孵育 2 h 后, 轻轻吸出上清, 以去除非贴壁细胞, 参照 Li 等[5] 方法, A 组细胞再用含有 10% FCS、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 μg/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素的 RPMI1640 液 5 ml 重悬, 置孵箱 37 ℃、5% CO_2 孵育 12 h。B 组细胞在 A 组培养液的基础上加入终浓度为 100 ng/ml LPS (Sigma, E. C. B4:111)孵育 12 h。C 组细胞在 B 细胞基础上加终浓度 500 ng/ml LPS 后再孵育 12 h。

1.3 RT-PCR

肺泡巨噬细胞总 RNA 按照罗氏公司试剂盒进行抽提与纯化。RT-PCR 按照 Takara 公司试剂盒进行。TLR4 引物设计及 PCR 反应条件如下: 从 GenBank 中查到大鼠 TLR4 mRNA 序列号

(下转 384 页)

基金项目: 国家自然科学基金资助重点项目(39730210)
作者简介: 张德明(1964-), 男, 湖南省沅江市人, 博士, 主治医师, 主要从事急性肺损伤方面的研究, 发表论文 6 篇。电话: (023)68755320
收稿日期: 2002-03-21; 修回日期: 2002-06-30

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

活性有明显影响，用药后显示这两种酶的活性明显减低。因此，我们认为双氢青蒿素对Pc虫体膜系统上G-6-Pase与ATPase两种酶的抑制或破坏可能是影响Pc细胞代谢的功能，最终抑制其增殖的原因之一。

参考文献：

[1] 倪小毅，陈雅棠. 青蒿素衍生物抗卡氏肺孢子虫体外作用的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志，2001，24(3)：164－167.

[2] 倪小毅，陈雅棠. 改良卡氏肺孢子虫肺炎动物模型的建立[J]. 重庆医科大学学报，2000，25(4)：382－384.

[3] 方福德，周 吕，丁 濂，等. 现代医学实验技巧全书[M]. 北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1995. 263－264

[4] 贲长恩. 实用酶组织化学[M]. 长沙：湖南省科学技术出版社，1996. 96－97.

[5] 梁志慧，徐麟鹤. 弓形虫的酶细胞化学及蒿甲醚对其影响的研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志，1995，13(3)：182

（编辑 郭建秀）

（上接380页）

为(#AF057025)，用Gene Toll软件设计TLR4上游引物为：GCCGGAAAGTTATTGTGGTGGT（2442-2463），下游引物为：ATGGGTTTTAGGCGCAGAGTTT(2776-2795)，PCR反应条件为变性94 ℃×45 s，淬火52 ℃×60 s，延伸72 ℃×90 s，35个循环后72 ℃延伸10 min，PCR产物为356 bp。各组样本同时扩增β-actin(587 bp)作为内参照。

1.4 ELISA

细胞培养液上清中TNF-α浓度按照Genzyme公司ELISA试剂盒进行检测。

1.5 PCR产物的电泳鉴定

取各样本PCR产物10 μl和1 μl上样缓冲液加于2%琼脂糖凝胶电泳槽齿孔中，50 V恒压电泳30 min，取胶置凝胶成像系统中拍照，结果扫入电脑备处理。

1.6 数据处理

电泳条带密度值以灰度×面积/参照物的该值表示。所有数据以$\bar{x}\pm s$表示，运用F检验进行统计分析。所有数据用SPSS软件统计处理。

2 结果

各组细胞上清TNF-α浓度变化：从表1可看出，B组细胞分泌的TNF-α显著高于正常对照A组，而C组细胞分泌的TNF-α明显减少，显著低于B组，而略高于A组。

各组细胞TLR4 mRNA表达的变化：从表1可知，B组细胞TLR4 mRNA表达显著高于正常A组，而C组细胞TLR4 mRNA表达明显减少，显著低于B组，稍高于A组。

表1 各组大鼠肺巨噬细胞**TLR4 mRNA**表达及**TNF**-α浓度

组别	n	TLR4 Density	TNF-α($\rho_{TNF-\alpha}$/ng·ml^{-1})
A	10	0.43±0.07	0.45±0.01
B	10	0.78±0.02**	0.76±0.03**
C	10	0.54±0.02#	0.49±0.05#

**：$P<0.01$与A组比较；#：$P<0.05$与B组比较

3 讨论

LPS耐受性是指机体或细胞经低剂量LPS刺激后，对LPS的再次刺激呈低反应性或无反应状态。它与机体的免疫力、LPS的内化、LPS信号转导效率等综合因素有关。既往研究表明，LPS胞外的信号转导是通过脂多糖结合蛋白LBP呈递给CD^+14来实现，而胞内则是通过IL-1受体相关激酶(IL-1 receptor association kinase，IRAK)、TNF-α受体相关激酶6(TNF-α receptor association kinase 6，TRAK-6)使IκB激活，活化的IκB再使NF-κB磷酸化后转位，炎症因子开始转录、翻译和表达[6]。LPS信号由胞外向胞内的转导即跨膜转导一直尚不明确，近年TLR4的发现提供了新的线索，它作为LPS靶细胞膜上的跨膜受体蛋白，其胞外的亮氨酸重复序列可以识别和结合LPS，而胞内与IL-1β同源的尾状结构，为将LPS信号呈递给IL-1β提供了可能性，且得到部分实验的证实[7,8]。故TLR4结构与功能的完好及必要的表达量是保证LPS信号转导完成的关键，反之则降低LPS信号转导的效率，使炎症因子释放减少，反应性随之下降，因而产生耐受的可能。我们的实验结果表明，LPS刺激大鼠肺巨噬细胞TNF-α的分泌和TLR4 mRNA的表达；低剂量LPS(100 ng/ml)刺激大鼠肺巨噬细胞12 h后，再用较大剂量LPS(500 ng/ml)刺激，其分泌的TNF-α明显减少，TLR4 mRNA表达亦显著下降。此证明：①LPS重复刺激可使大鼠肺巨噬细胞对其产生耐受性；②LPS信号很可能由TLR4完成其跨膜转导；③LPS耐受性产生与TLR4 mRNA表达下降相关，TLR4表达量与功能下调是LPS耐受性产生的重要原因之一。

关键词：肺泡巨噬细胞；内毒素耐受性；Toll样受体4
中图法分类号：R392.12 文献标识码：B

参考文献：

[1] Qureshi S T，Lariviere L，Leveque G，*et al*. Endotoxin-tolerance mice have mutation in Toll-like receptor 4 (TLR4)[J]. J Exp Med，1999，189(4)：625－625.

[2] Arbour N C，Lorenz E，Schutte B C，*et al*. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans[J]. Nat Genet，2000，25(2)：187－191.

[3] Medvedev A E，Henneke P，Schromm A，*et al*. Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4[J]. J Immunol，2001，167(4)：2257－2267.

[4] Wang M J，Jeng K C G，Shih P C，*et al*. Differential expression and regulation of marophage inflammatory protein (MIP)-1α and MIP-2 gene by alveolar and peritoneal macrophages in LPS-hyporesponsive C3H/HeJ mice[J]. Cell Immunol，2000，204(1)：88－95.

[5] LI L W，Cousart S，Hu J，*et al*. Characteriztion of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells[J]. J Biol Chem，2000，275(30)：23340－23345.

[6] Aderem A，Ulevitch R J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response[J]. Nature，2000，406(17)：782－787.

[7] Su G L，Klein R D，Aminlari A，*et al*. Kupffer cell activation by lipopolysaccharide in rats：role for lipopolysacccharide binding protein and Toll-like receptor 4[J]. Hepatol，2000，31(4)：932－936.

[8] Yang H，young D W，Gusovsky D，*et al*. Cellular events mediated by lipopolysaccharide-stimulated Toll-like receptor 4[J]. J Biol Chem，2000，275(27)：20861－20866.

（编辑 张大春）

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