

## • 基础研究 •

## TLR4 基因表达及 TNF- $\alpha$ 在老年大鼠多器官功能障碍综合征中作用的研究

吴国明 王兴胜 钱桂生 徐智 陈维中 李淑平 薛桥 王士雯

**【摘要】** 目的 探讨 Toll 样受体 4 基因(TLR4)与 TNF- $\alpha$  在老年大鼠多器官功能障碍综合征(MODSE)发病机制中的作用。方法 20 月龄和 3 月龄 SD 大鼠各 40 只,分别设为老年组及青年组,予油酸(OA)0.25ml/kg 和脂多糖(LPS)3.5mg/kg 分次静脉注射(间隔 4h),建立二次打击 MODSE 和青年多器官功能障碍综合征(MODSY)模型。观察对照组及伤后 2、6、24h 肺、心、肝、肾的病理改变及功能变化,检测肺、心、肝和肾组织中 TLR4 mRNA 表达及 TNF- $\alpha$  含量。结果 OA/LPS 二次致伤能够导致青年及老年鼠 MODS,其中肺脏损害出现最早最重,在同一时相点,老年鼠脏器损害重于青年鼠( $P < 0.05 \sim 0.01$ )。致伤后肺、心、肝和肾组织中 TLR4 mRNA 表达均显著升高( $P < 0.05 \sim 0.01$ ),以肺组织中表达最高,2h 达峰值,心、肝、肾组织中于 6h 达峰值;各组织中 TNF- $\alpha$  含量均显著升高( $P < 0.05 \sim 0.01$ ),以肺组织中升幅最大。在相同时相点老年鼠各组织中 TLR4 mRNA 表达及 TNF- $\alpha$  含量高于青年鼠( $P < 0.05 \sim 0.01$ )。结论 OA/LPS 致伤后老年鼠肺组织中 TLR4 mRNA 表达及 TNF- $\alpha$  水平迅速升高,在 MODS 发病机制中起重要作用,有可能是 MODSE 过程中肺损伤出现最早最重的重要原因。

**【关键词】** 多器官功能障碍综合征;老年大鼠;油酸;脂多糖;Toll 样受体 4;肿瘤坏死因子

## Role of toll-like receptor 4 gene expression and TNF- $\alpha$ in multiple organ dysfunction syndrome in elderly rats

WU Guoming, WANG Xingsheng, QIAN Guisheng, et al  
The Institute of Respiratory Disease of PLA, Xinqiao Hospital,  
Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

**【Abstract】** Objective To explore the role of expression of toll-like receptor 4 (TLR4) gene and tumor necrosis factor alpha(TNF- $\alpha$ ) in model of multiple organ dysfunction syndrome in the elderly rats (MODSE). Methods Models of MODSE and models of multiple organ dysfunction syndromes in the young (MODSY) were established by injection of oleic acid(OA) (0.25ml/kg) and LPS (3.5mg/kg) to SD rats (4 hours interval). Forty three-month-old SD rats and 40 twenty-month-old SD rats were randomly divided into four groups: control group, 2h, 6h, and 24h groups ( $n=10$  for each group). The changes of pathomorphology and function of lung, heart, liver and kidney were observed. Semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction was used to measure TLR4 mRNA levels in lung, heart, liver and kidney tissues. The TNF- $\alpha$  concentrations in those tissues were determined with enzyme linked immunosorbent assay. Results Injection of OA and LPS could lead to MODSE and MODSY. The lung injury emerged first and was most serious. Dysfunction of organs was more serious in elderly groups than in young groups at the same time points ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ). The TLR4 mRNA levels in lung, heart, liver and kidney tissues increased significantly after injection of OA and LPS ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ). The expression of TLR4 mRNA increased

收稿日期:2005-05-10

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G2000057004)

作者单位:400037 重庆市,第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所(吴国明、王兴胜、钱桂生、徐智、陈维中、李淑平);100853 北京市,北京解放军总医院老年心血管病研究所(薛桥、王士雯)

作者简介:吴国明,男,1961年11月生,湖南省浏阳市人,医学博士,教授,主任医师,新桥医院全军呼吸内科研究所副所长。Tel:023-68774603

通讯作者:王兴胜,现在第三军医大学大坪医院呼吸科工作。Tel:023-68757245

most markedly and reached peak level in lung in 2h group and in other organs in 6h group. The concentrations of TNF- $\alpha$  in all tissues increased significantly after injection of OA and LPS ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ). The TLR4 mRNA levels and TNF- $\alpha$  concentrations in tissues were higher in elderly groups than in young groups at the same time points ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ). **Conclusions** The TLR4 mRNA levels and TNF- $\alpha$  concentrations increase immediately in the lung of elderly rats after injection of OA and LPS, which may explain why the lung injury emerged first and was most serious in MODSE.

**【Key words】** multiple organ dysfunction syndrome; elderly rat; oleic acid; lipopolysaccharide; toll-like receptor 4; tumor necrosis factor

研究表明,革兰阴性菌内毒素核心成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可激活核因子(nuclear factor, NF)- $\kappa$ B,释放大量炎症因子,导致全身炎症反应综合征及多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)。由 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)介导的 LPS 跨膜信号转导及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )在这一过程中的作用备受重视。老年 MODS(multiple organ dysfunction syndrome in the elderly, MODSE)往往继发于呼吸系统感染等疾病,其机制尚不清楚。本研究通过油酸/脂多糖(OA/LPS)两次致伤大鼠复制 MODSE 及青年 MODS(multiple organ dysfunction syndrome in the young, MODSY)模型,观察主要脏器病理及功能变化,检测肺、心、肝、肾组织中 TLR4 mRNA 表达及 TNF- $\alpha$  含量变化,探讨 TLR4 基因表达及 TNF- $\alpha$  在 MODSE 发生和发展中的作用。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** 清洁级 SD 大鼠 80 只,雌雄不拘。老年组 40 只,20 月龄,体重(396 $\pm$ 48)g,青年组 40 只,3 月龄,体重为(225 $\pm$ 26)g。由第三军医大学野战外科研究所动物中心提供。

**1.2 主要试剂** LPS:血清型 O111:B4, Sigma, USA。油酸(OA):苏州正兴化工研究所;TNF- $\alpha$  检测试剂盒:北京晶美生物工程有限公司;Tripure:Roche 公司,德国;RT-PCR 试剂盒:Takara 公司,日本。

**1.3 实验方法** (1) OA/LPS 二次致伤 MODS 模型的建立:①实验分组:老年组随机分为:生理盐水(NS)对照组(E-NSC),OA+LPS 2h 组(E-2h),6h 组(E-6h),24h 组(E-24h);青年组随机分为:NS 对照组(Y-NSC),OA+LPS 2h 组(Y-2h),6h 组(Y-6h),24h 组(Y-24h)。每组各 10 只。②模型制作用盐酸氯胺酮溶液(50mg/kg)腹腔麻醉大鼠,分次

经颈外静脉缓慢注射 OA 0.25ml/kg 和 LPS 3.5mg/kg,间隔 4h,对照组分别注入等体积 NS。在规定时相点经颈总动脉取血测动脉血气后放血处死大鼠,并取血 5ml 用于检测各种生化指标(死亡大鼠未进行指标检测)。取肺、心、肝、肾组织 0.4g,加入 NS 制成 10%匀浆液,4 $^{\circ}$ C 1800 $\times$ g 离心 8min,留取上清,-20 $^{\circ}$ C 保存。另取部分肺、心、肝、肾组织液氮中冻存备用。

**1.4 观察指标** MODS 诊断及评分标准参照文献<sup>[1]</sup>。(1)症状、体征及病理观察:观察各时相点大鼠生理状态、刺激反应、活动度及死亡率等。每组随机选取 4 只大鼠取少许肺、心、肝、肾组织,观察病理改变。(2)动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>):处死前自右颈总动脉采血,用 IL1620 型自动血气分析仪(美国)测定。(3)生化指标:用自动生化分析仪检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(TB)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、肌酸磷酸激酶(CPK)。(4)肺、心、肝、肾组织 TNF- $\alpha$  含量:用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定,按试剂盒说明书进行。(5)TLR4 mRNA 表达检测:用 RT-PCR 方法,各取肺、心、肝、肾组织 50mg,按照 Roche 公司试剂盒说明书进行抽提与纯化总 RNA。RT-PCR 按照 Takara 公司试剂盒说明书进行。cDNA 合成的引物选用 Random9mers,RT 条件是:30 $^{\circ}$ C $\times$ 10min,42 $^{\circ}$ C $\times$ 30min,99 $^{\circ}$ C $\times$ 5min,5 $^{\circ}$ C $\times$ 5min。PCR 反应条件:变性 94 $^{\circ}$ C $\times$ 45s,淬火 52 $^{\circ}$ C $\times$ 60s,延伸 72 $^{\circ}$ C $\times$ 90s,35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。各组样本同时扩增 GAPDH 作为内参照。TLR4<sup>[2]</sup>及 GAPDH 引物序列见表 1,由上海博亚生物技术有限公司合成。PCR 产物电泳鉴定:取各样本目的基因 PCR 产物 5 $\mu$ l、GAPDH 5 $\mu$ l 和上样缓冲液 2 $\mu$ l 经 2%琼脂糖凝胶,50V 恒压电泳 30~50min,凝胶成像系统拍照,结果扫入电脑处理。以目的基因与内参对照的积分吸光度比值(TLR4/GAPDH ratio)表示 mRNA 相对表达量。

表1 TLR4及GAPDH引物核苷酸序列

名称	序列	产物长度
TLR4	上游:5'-GCCGAAAGTTATGTGGTGGT-3'	356bp
	下游:5'-ATGGGTTTTAGGGCAGAGTTT-3'	
GAPDH	上游:5'-CCATCGAGAAGGCTGGGG-3'	195bp
	下游:5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'	

1.5 统计分析 计量资料以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,数据作单因素方差分析,计数资料采用 $\chi^2$ 检验。数据应用SPSS10.0统计软件处理。

## 2 结果

2.1 症状、体征及病理变化 注入OA后大鼠即刻出现呼吸急促,然后稍有缓解,注入LPS后呼吸窘迫进一步加重,于2h程度最重,有紫绀,部分可见血性泡沫样液体从鼻腔溢出,随时间延长,表现为精神萎靡、懒动、对刺激反应差,多数出现稀便,部分有血尿。老年组症状、体征普遍较青年组严重,NS组无明显变化。老年组死亡率40%(12/30)显著高于青年组16.7%(5/30,  $P < 0.05$ )。病理学观察,2h即可见肺组织充血、水肿,光镜下可见灶状出血、内皮受损、间质水肿、肺泡壁显著增厚,大量红、白细胞浸润和部分肺泡萎缩。而此时心、肝、肾组织仅有轻微充血及炎细胞浸润,6h出现较明显病理改变:心脏表现为小血管周围炎细胞浸润,血管扩张充血,心肌间质水肿,局部心肌纤维变性、断裂,结构不清或空泡变性;肝脏可见肝细胞浊肿及胞浆疏松变性,肝窦充血,枯否细胞增生,多量中性粒细胞、淋巴细胞与大单核细胞浸润,汇管区炎细胞浸润,点灶状肝细胞坏死;肾脏见肾小球充血或缺血,炎细胞浸润,肾小管上皮轻度浊肿,间质水肿;上皮空泡变性等。在同

一时相点老年鼠病理改变均较青年鼠严重。老年鼠E-NSC、2h、24h组肺组织病理改变见图1~3。

2.2  $\text{PaO}_2$  的变化 青年鼠和老年鼠NSC组 $\text{PaO}_2$ 分别为(100±11), (98±9)mmHg ( $P > 0.05$ ),两次致伤后显著降低,达到急性肺损伤(acute lung injury, ALI)或急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)标准,2h组 $\text{PaO}_2$ 降幅最大,分别为(68±9), (59±7)mmHg ( $P < 0.01$ ),并保持在较低水平,显著低于各自NSC组 ( $P < 0.01$ );而在同一时相点老年组较青年组降低更明显( $P < 0.05$ )。

2.3 心、肝、肾功能生化指标的变化 二次致伤后老年鼠血清ALT、TB、CPK、BUN、Cr水平均较对照组显著升高,于6h升幅最大,分别为(102.2±32.86) vs (37.25±10.44) IU/L, (3.32±1.39) vs (1.05±0.89)  $\mu\text{mol/L}$ , (3100.2±1423.6) vs (420.5±287.6) IU/L (均  $P < 0.01$ ), (14.06±5.16) vs (9.23±1.97) mmol/L, (41.38±12.83) vs (29.03±11.2)  $\mu\text{mol/L}$  (均  $P < 0.05$ ),达到动物MODS诊断评分标准<sup>[1]</sup>。在6h时相点老年组ALT、TB、CPK和Cr 4项指标均显著高于青年组 ( $P < 0.05$ )。在24h时相点ALT、TB、CPK已明显下降,而BUN和Cr降低趋势不明显。

2.4 肺、心、肝、肾组织中TNF- $\alpha$ 含量的变化 对照组大鼠各脏器组织中均有一定的基础含量。二次致伤后各组织中TNF- $\alpha$ 均明显升高 ( $P < 0.05 \sim 0.01$ ),且老年组较青年组升高显著 ( $P < 0.05 \sim 0.01$ );以肺组织中升高幅度最大,且最早于2h达峰值,青年鼠和老年鼠分别为各自对照组的3.2倍和3.9倍(表2)。

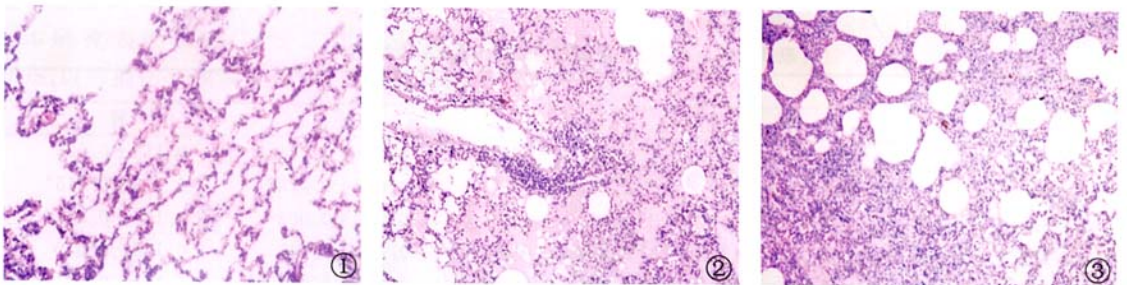


图1 E-NSC组肺组织结构完整,肺泡腔清晰,无水肿充血(HE, ×200)

图2 E-2h组肺组织弥漫性肺水肿,间质大量炎细胞浸润(HE, ×200)

图3 E-24h组肺泡壁增厚,炎细胞浸润,部分肺泡萎陷(HE, ×200)

表 2 肺、心、肝、肾组织中 TNF-α 含量的变化

组别	n	TNF-α(ng/L)			
		肺	心	肝	肾
Y-NSC	10	246.21±28.32	587.66±51.41	1191.27±148.54	884.33±110.57
Y-2h	9	788.35±60.17 <sup>△</sup>	634.33±58.62*	1463.51±167.32*	1356.83±125.69*
Y-6h	8	295.5 ±24.64	607.66±76.38	1253.58±190.46	1231.67±158.76*
Y-24h	8	246.92±21.59	662.66±53.45*	1701.83±145.77*	1415.17±123.48*
E-NSC	10	247.64±24.84	669.33±74.67	1485.17±203.92	856.64 ±150.49
E-2h	7	974.78±100.26 <sup>△#</sup>	757.67±82.76*#	1857.66±224.83*#	1608.54±211.67*#
E-6h	6	362.64±42.34*#	741.36±60.22#	1856.83±197.54*#	1974.3333±258.31 <sup>△#</sup>
E-24h	5	267.64±23.60	773.50±95.13*#	1627.67±173.58	1602.67±199.25*#

注：与 Y-NSC 或 E-NSC 比较，\* P<0.05, <sup>△</sup><0.01；与青年组同一时相点比较，# P<0.05

2.5 肺、心、肝、肾组织 TLR4 mRNA 表达变化(图 4、表 3) 对照组大鼠肺组织中 TLR4 mRNA 表达最多、心和肝组织中次之，肾组织中表达最弱，二次致伤后 2~6h 各组织中 TLR4 mRNA 表达均明显升高(P<0.05~0.01)，以肺组织升高幅度最大，老年组和青年组 2h 点分别为各自对照组的 3.0 倍和 4.1 倍。且各组织中老年组较青年组升高显著(P<0.05~0.01)。24h TLR4 mRNA 表达回落至趋于正常水平。

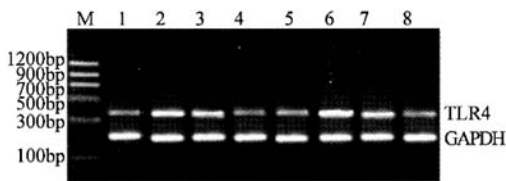


图 4 MODS 大鼠肺组织 TLR4 mRNA 表达变化

M: PCR marker (从上到下依次为 1200、900、700、500、300、100bp)；1~4: 分别为青年对照组、2、6、24h 组，5~8: 分别为老年对照组、2、6、24h 组；TLR4(356bp)，GAPDH(195bp)

2.6 相关分析 相关分析表明，肺、心、肝、肾组织中 TLR4 mRNA 表达水平与 TNF-α 含量呈显著正

相关( $r=0.889, 0.229, 0.354, 0.674, P<0.01$ )，肺组织 TLR4 mRNA 表达水平及 TNF-α 含量分别与 PaO<sub>2</sub> 呈显著负相关( $r = -0.621, -0.591, P<0.01$ )，心、肝、肾组织中 TLR4 mRNA 表达水平与相应脏器功能指标 CPK、ALT、Cr 呈显著正相关( $r=0.504, 0.764, 0.649, P<0.01$ )，心、肝、肾组织中 TNF-α 含量与相应脏器功能指标 CPK、ALT、Cr 也呈显著正相关( $r = 0.119, 0.643, 0.628, P<0.01$ )。

### 3 讨论

创伤和感染是临床上引起 SIRS 及 MODS 的两个最常见的诱发因素<sup>[3]</sup>。MODS 往往起因于呼吸系统感染等疾病，内毒素血症在其发病过程中占有重要地位。

新近研究揭示，一族 TLR 分子参与了细菌致病因子的信号转导过程<sup>[4]</sup>，TLR4 是 LPS 跨膜信号转导的重要受体<sup>[5,6]</sup>。本实验中，青年和老年大鼠 TLR4 mRNA 表达以肺组织中最强，肝、心组织中次之，肾组织中仅有微弱表达。OA/LPS 致伤后 2~6h 肺、心、肝及肾组织 TLR4 mRNA 表达均明显升高，以肺组织中表达强度与升高幅度最大，分别为

表 3 肺、心、肝、肾组织中 TLR4 mRNA 表达变化

组别	n	TLR4 mRNA			
		肺	心	肝	肾
Y-NSC	10	0.325±0.028	0.256±0.022	0.283±0.034	0.118±0.024
Y-2h	9	0.978±0.103 <sup>△</sup>	0.536±0.045 <sup>△</sup>	0.698±0.078 <sup>△</sup>	0.175±0.015*
Y-6h	8	0.440±0.048*	0.541±0.049 <sup>△</sup>	0.712±0.062 <sup>△</sup>	0.184±0.021*
Y-24h	8	0.373±0.042	0.287±0.036	0.329±0.041	0.146±0.012
E-NSC	10	0.349±0.037	0.271±0.031	0.314±0.032	0.144±0.027
E-2h	7	1.431±0.135 <sup>△*</sup>	0.579±0.071 <sup>△*</sup>	0.768±0.084 <sup>△*</sup>	0.227±0.018*
E-6h	6	0.496±0.044*#	0.587±0.067 <sup>△*</sup>	0.776±0.054 <sup>△*</sup>	0.238±0.026*#
E-24h	5	0.424±0.036	0.302±0.023	0.374±0.040	0.151±0.025*

注：与 Y-NSC 或 E-NSC 比较，\* P<0.05, <sup>△</sup>P<0.01，与青年组同一时相点比较，# P<0.05, \* P<0.01

对照组的3倍和4.1倍,肝、心组织中亦有较大增强,而肾组织中表达较弱,且老年组各组织中表达显著高于青年组。表明TLR4 mRNA表达存在明显的组织差异性和年龄差异性,MODS病理过程中老年鼠肺组织TLR4对LPS刺激具有明显易感性。

另外,本实验的结果还显示,各组织中TLR4 mRNA表达分别与相应脏器组织中细胞因子反应和功能指标呈现一致的改变。OA/LPS致伤后,青年和老年大鼠肺组织中TLR4 mRNA表达上调的同时TNF- $\alpha$ 水平也显著升高,其峰值出现于伤后2h,分别为对照组的3.2和3.9倍。同时动脉血PaO<sub>2</sub>显著降低至最低值。心、肝、肾组织中TNF- $\alpha$ 水平亦升高,但幅度较小,心、肝、肾脏器功能损伤的指标于6h达峰值。在同一时相点老年鼠的各指标变化幅度均大于青年鼠。另外,本研究显示肺、心、肝、肾组织中TLR4 mRNA表达水平与TNF- $\alpha$ 含量显著相关,以肺组织相关性最高,TLR4 mRNA表达水平及TNF- $\alpha$ 含量与脏器损伤指标明显相关。由此推测大鼠在OA/LPS致伤后脏器组织中TLR4 mRNA高表达及TNF- $\alpha$ 含量迅速升高是造成脏器损伤的重要环节。

我们的前期实验表明,单用小剂量的OA或LPS通常不会导致肺、心、肝、肾等多器官功能明显损害<sup>[7]</sup>。根据结果分析,两次致伤后肺组织中TLR4 mRNA表达上调,经过LPS信号转导系统,巨噬细胞、单核细胞等炎症效应细胞被激活,产生大量TNF- $\alpha$ 等前炎症因子而参与了早期ALI和ARDS的发生<sup>[8,9]</sup>;随着肺部炎症反应加重,大量炎症介质进入血液循环,刺激肺外组织中炎症细胞产生更多的炎症因子,发展为全身炎症反应,并最终导致MODS的发生。有研究<sup>[10]</sup>报道ARDS肺部炎症反应激活,可进一步激活肺外器官炎症反应。表明肺脏可能在MODS发生中起着启动器官的作用。

本研究表明,OA/LPS二次打击所致大鼠MODS,以肺损伤出现最早,在相同致伤条件下,老

年鼠较青年鼠脏器受损更严重,死亡率更高。这可能与TLR4 mRNA表达存在组织差异性和年龄差异性有关。老年大鼠肺组织中TLR4 mRNA高表达及其跨膜转导作用加强,TNF- $\alpha$ 水平迅速升高,肺部炎症启动早、反应重在MODS发病机制中起重要作用。

#### 参考文献

- 1 盛志勇,胡森,主编.多器官功能障碍综合征.北京:北京科学技术出版社,1999.186-187.
- 2 张德明,李永旺,毛宝龄,等.内毒素血症大鼠心肌TLR4与IL18 mRNA表达的变化.心肺血管病杂志,2003,22:109-110.
- 3 Baue AE. Multiple organ failure, multiple organ dysfunction syndrome and systemic inflammatory response syndrome. Arch Surg, 1997, 132: 703-707.
- 4 Andrem UJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature, 2000, 406: 782-787.
- 5 Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 335-376.
- 6 Laflamme N, Rivest S. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. FASEB J, 2001, 15: 155-163.
- 7 徐智,吴国明,钱桂生,等.油酸-内毒素序贯致伤致老年鼠MODS模型的建立.第三军医大学学报,2004,26: 852-855.
- 8 Hristova M, Yordanov M, Ivanovska N. Effect of fangchinoline in murine models of multiple organ dysfunction syndrome and septic shock. Inflamm Res, 2003, 52: 1-7.
- 9 Headley S, Tolley E, Meduri GU. Infections and the inflammatory response in acute respiratory distress syndrome. Chest, 1997, 111: 1306-1321.
- 10 燕艳丽,邱海波,杨毅,等.急性呼吸窘迫综合征家兔肺部及肺外器官炎症反应的变化.中国呼吸与危重监护杂志,2004,3: 147-151.