

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.20.010

急性出血坏死性胰腺炎肝损伤中 TLR2、4mRNA 和蛋白的表达

席锐¹ 王丽娟¹ 李晓涛¹ 王璐¹ 宋博¹ 涂艳阳²

(1 陕西省汉中市中心医院肝胆外科 陕西 汉中 723000; 2 第四军医大学唐都医院实验外科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:观察急性出血坏死性胰腺炎肝损伤中 TLR-2、TLR4 的表达水平,分析 TLR2 和 TLR4 在 AHNP 肝损伤中的表达意义。**方法:**48 只成年 Wistar 大鼠作为实验动物,随机分为对照组和造模组各 24 只,造模组利用牛磺胆酸钠建立 AHNP 模型,在造模后 3 h、12 h 以及 24 h 时,每组分各取 8 只大鼠,应用 RT-PCR 法检测 TLR2、TLR4mRNA 表达水平,应用 Western blot 检测肝脏组织中 TLR2、TLR4 蛋白表达水平。**结果:**造模后,造模组 TLR2mRNA、TLR4mRNA、TLR2 蛋白、TLR4 蛋白显著升高,且在造模后 12 h 出现峰值,与同时段对照组相比差异显著($P<0.01$)。**结论:**急性出血坏死性胰腺炎肝损伤组织中 TLR2、TLR4mRNA 和蛋白表达水平异常升高,TLR2、TLR4 可能参与了急性出血坏死性胰腺炎肝损伤发生发展过程。

关键词:急性胰腺炎;肝损伤;TLR2;TLR4

中图分类号:R-33; R657.51 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)20-3846-04

Study on the Expressions of TLR2, 4 mRNA and Protein in Liver Injury of Acute Hemorrhagic Necrotic Pancreatitis

XI Rui¹, WANG Li-juan¹, LI Xiao-tao¹, WANG Lu¹, SONG Bo¹, TU Yan-yang²

(1 Department of hepatobiliary surgery, Hanzhong Central Hospital, Hanzhong, Shaanxi, 723000, China;

2 Department of experimental surgery, Tangdu Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China)

ABSTRACT Objective: To observe the expression levels of TLR-2 and TLR4 in the liver injury of acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis, and to analyze the significance of TLR2 and TLR4 in the liver injury of AHNP. **Methods:** 48 adult Wistar rats were selected as experimental animal. They were randomly divided into control group and model group. There were 24 rats in each group. In model group, AHNP model was established by sodium taurocholate. After modeling for 3 h, 12h and 24 h, each group 8 rats were selected in each group. The expression levels of TLR2 and TLR4mRNA were detected by RT-PCR method, the expression levels of TLR2 and TLR4 in liver tissue were detected by Western blot. **Results:** After the modeling, the model TLR2mRNA, TLR4mRNA, TLR2 protein and TLR4 protein were significantly increased, and the peak value was found at 12 h after modeling, when compared with the control group, the difference was significant ($P<0.01$). **Conclusion:** TLR2, TLR4mRNA and protein expression levels in the liver injury of acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis are increased significant. TLR2 and TLR4 may be involved in the development of acute hemorrhagic necrotic pancreatitis.

Key words: Acute pancreatitis; Liver injury; TLR2; TLR4

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R657.51 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)20-3846-04

前言

急性胰腺炎为常见的胰腺急性炎性疾病,属于外科常见急腹症之一,具有起病急、恶化快、并发症重、病情凶险的特点,而急性出血坏死性胰腺炎(acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis, 即 AHNP)作为急性胰腺炎的重症类型,不及时治疗能够诱发多器官功能衰竭、休克、腹腔重度感染等重度并发症,具有极高的病死率^[1,2]。Toll 样受体(Toll like receptor, 即 TLRs)作为体内固有免疫蛋白分子,属于固有免疫与适应免疫之间衔接的桥梁,目前有研究显示^[3-5]TLR2、TLR4 作为 TLRs 家族代表性成员,参与了肝脏疾病的发生发展过程,对肝损伤有重要影响。本

实验通过观察 TLR2、TLR4 在 AHNP 大鼠肝组织中的表达情况,旨在初步分析 TLR2、TLR4 在 AHNP 肝损伤中的作用,现报道如下:

1 材料与方法

1.1 材料

Wistar 大鼠(山西医科大学实验动物中心,粤检证第 SCXK2008 0002 号);逆转录试剂盒(美国 ABI Applied Biosystems 公司);流式细胞仪和 Real-time PCR 仪(美国 bio-rad 公司);5%牛磺胆酸钠(美国 Sigma 公司);戊巴比妥钠溶液(上海生化试剂厂);中性福尔马林溶液(山西医科大学第二临床医院);二抗(美国 eBioscience 公司);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 48 只 Wistar 大鼠均为成年健康鼠,体质量

作者简介:席锐(1975-),男,肝胆外科副主任,硕士,副主任医师,研究方向:肝胆外科临床研究,E-mail: 344291852@qq.com,电话:13772800221

(收稿日期:2016-11-28 接受日期:2016-12-25)

在 200-260 g 之间,平均为(220± 20)g,其中雌雄均为 24 只,所有大鼠在 37℃ 恒温、45%湿度条件下适应性饲养 7 d,在此期间所有 Wistar 大鼠均自由进食和水,并且接受光暗比例均为 1:1。适应性喂养结束后,按照数字随机原则均分成 2 组,即对照组和模型组各 24 只,两组在雌雄、体质量等方面均无显著差异($P>0.05$)。

1.2.2 建模方法 参照文献报道^[9]利用牛磺胆酸钠进行 AHPN 肝损伤模型,具体方法为:严格禁食、自由饮水超过 12 h 后常规进行开腹手术,麻醉方式为腹腔内注射 10%水合氯醛麻醉,注射剂量标准为 4 mL/kg,待麻醉起效后,在腹部正中作一切口,切开皮肤、皮下组织以常规进腹,探查腹腔找到胆总管,利用无损伤动脉夹对近肝门处的胆总管进行夹毕,之后将浓度为 4.5%的牛磺胆酸钠溶液以匀速推注到胆总管中,推注速度为 0.1 mL/min。对照组仅接受开腹手术,而不推注牛磺胆酸钠。

1.2.3 标本采集 在造模前、造模后 3 h、12 h 以及 24 h 时,每组各取 8 只 Wistar 大鼠进行剖杀,无菌留取新鲜肝脏组织,添加液氮冷冻,放置到 -70℃ 冰箱中保存并统一检测。

1.2.4 RT-PCR 检测 取将无菌留取的肝脏组织添加裂解液完成细胞裂解之后,应用 Trizol 试剂进行肝组织总 RNA 提取,利用分光光度计检测提取程度 (OD260/280 介于 1.95-2.00 之间)。提取 1.0 μ gRNA,添加合成引物(引物合成为北京博迈德公司完成)在特定条件下进行逆转录,其中 TLR2 退火温度为 59.6℃,片段长度为 285 bp;TLR4 退火温度为 61.5℃,片段长度为 100 bp, β -actin 退火温度为 54.7℃,片段长度为 85bp。留取逆转录产物(即 cDNA)2.0 μ L 作为 PCR 扩增的模板,在 PCR 扩增产物中随机取 2 μ L 作为检测样品,完成 2.0%琼脂糖凝胶电泳并拍照后,常规进行切胶、纯化 DNA,将 β -actin 作为内参照,勾画标准曲线,利用 TLR2、TLR4 与 β -actin 间的比值作为检测结果。

1.2.5 Western blot 检测 取肝组织 100 mg,添加蛋白裂解液

并利用超声完成匀浆后,在 4℃ 环境下离心 10 min 获取上层清液,添加等体积 SDS buffer 缓冲液,在 95℃ 水浴中煮 5 min 后立即冰浴,取出再次离心 10 min 并集取上清液进行 SDS-PAGE 电泳 (即在 80 V 恒压于 5%浓缩胶中 45min 后,再在 120 V 恒压于 12%分离胶中 180 min),将电泳产物放置到聚偏二氯乙烯膜上进行活化 (甲醇泡 2 min 后用蒸馏水泡 1 min,在放置到缓冲液中泡 3 min)后通过转移仪完成转膜(条件为 200 mA 恒流下作用 120 min),添加牛血清白蛋白溶液,放置到 4℃ 环境中封闭过夜。第二日取出分别添加一抗(即 TLR2 和 TLR4),在 4℃ 下过夜孵育,对照品使用鼠源 β -actin 抗体,一抗稀释比例为 1:1 000,所用溶液是洗膜缓冲液。取出后添加二抗在室温下孵育(稀释比例为 1:10 000)120 min,添加电化学发光底物进行显色显影、定影和拍照,将图像上传至 Photoshop7.0 分析系统中,对蛋白条带灰度值进行分析。

1.3 统计学分析

将实验所获得的全部数据资料以双输入形式建立电子数据集,将电子数据输入到 SPSS.22.0 统计分析系统中,实验结果中计量资料表达形式为(均数± 标准差),组间对比为两样本独立 t 检验,组内重复测量数据使用重复测量方差分析,以 $P<0.05$ 为差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠肝组织 TLR2、TLR4 mRNA 表达水平比较

造模后,对照组肝组织 TLR2mRNA 和 TLR4mRNA 未见明显波动,仍为低表达,但是造模组肝组织中 TLR2mRNA 和 TLR4mRNA 显著升高,与同时段对照组相比,差异显著($P<0.01$);造模组 TLR2mRNA 和 TLR4mRNA 表达在造模后 12h 时达到峰值,在造模相同时间点,造模组 TLR2mRNA 和 TLR4mRNA 表达量显著高于对照组($P<0.01$)。见表 1。

表 1 两组大鼠肝组织 TLR2mRNA、TLR4mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of the TLR2 mRNA and TLR4 mRNA expression levels in the liver tissues between two groups ($\bar{x}\pm s$)

Time	TLR2		TLR4	
	Control group	Model group	Control group	Model group
3h	0.027± 0.013	0.978± 0.326	0.811± 0.254	1.703± 0.459
12h	0.026± 0.012	1.401± 0.551	0.813± 0.263	2.637± 0.658
24h	0.028± 0.014	1.258± 0.415	0.812± 0.261	2.085± 0.593
P	>0.05	<0.01	>0.05	<0.01

2.2 两组大鼠肝组织 TLR2、TLR4 蛋白表达比较

造模组在成功造模后 TLR2 蛋白、TLR4 蛋白表达量均显著升高,与对照组相比差异($P<0.01$);在实验观察期间,对照组 TLR2 蛋白、TLR4 蛋白未见明显改变,一直为低表达,在造模后相同检测点,造模组 TLR2 蛋白量、TLR4 蛋白量均明显高于对照组($P<0.01$)。详细数据见表 2,western blot 结果见图 1。

2.3 两组大鼠肝组织的病理学观察和转氨酶浓度比较

造模后,对照组各时段大鼠肝脏中肝小叶结构明显,肝索排列整齐,肝细胞结构无异常变化,视野中观察不到出血情况;



图 1 两组大鼠肝组织 TLR2、TLR4 蛋白表达情况比较

Fig. 1 The expression of TLR2 and TLR4 protein in liver tissue of rats in the two groups

表 2 两组大鼠肝组织 TLR2、TLR4 蛋白表达情况比较(%, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the TLR2 and TLR4 protein expression levels in the liver tissues between two groups (%, $\bar{x} \pm s$)

Time	TLR2		TLR4	
	Control group	Model group	Control group	Model group
3h	0.022± 0.015	0.716± 0.085	0.961± 0.254	1.209± 0.145
12h	0.023± 0.011	1.268± 0.094	0.961± 0.263	1.681± 0.157
24h	0.023± 0.011	1.067± 0.083	0.958± 0.261	1.484± 0.124
P	>0.05	<0.01	>0.05	<0.01

转氨酶浓度与造模前相比无显著差异,且处于正常范围之内($P>0.05$)。造模组大鼠肝脏细胞出现明显的损伤情况。造模后 3 小时,肝细胞结构发生变化,肝小叶结构不明显,且肝细胞直接界限模糊;造模后 12 小时,视野中出现炎性细胞,在肝细胞中可以看出明显的凋亡小体;造模后 24 小时,肝细胞出现出血情况,肝细胞大量坏死。造模组大鼠肝细胞转氨酶浓度随着时间成正比增加。以上数据说明本模型建立成功,造模组大鼠肝组织出现严重损伤。具体数据如下。

3 讨论

虽然目前相关研究显示 AHNP 肝损伤的发生与解剖学结构(肠道内毒素通过胰腺血液回流到肝门静脉而造成肝损

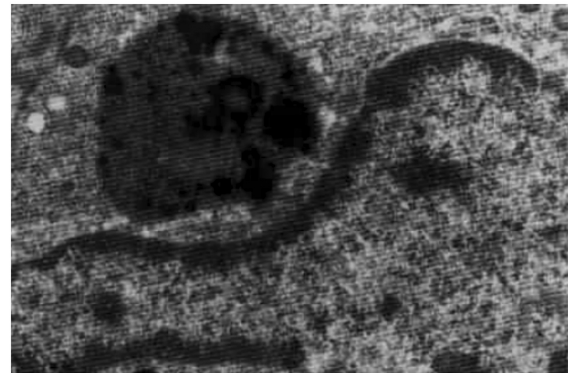


图 2 造模 24 小时后大鼠肝组织吞噬细胞中的凋亡小体
Fig. 2 Apoptotic bodies in the phagocytic cells of rat liver after 24 hours

表 3 两组大鼠不同时段肝组织转氨酶浓度比较(U/mg prot)

Table 3 Comparison of hepatic tissue transaminase concentrations in different periods of the two groups

Time	Control group	Model group 3H	Model group 12H	Model group 24H
转氨酶浓度	119.78± 20.02	130.98± 19.47	140.37± 18.35	169.33± 20.43
P	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

伤、炎症因子、炎性介质利用肝脏韧带直接蔓延侵袭全肝)、胰酶因素(AHNP 患者的胰蛋白酶原、脂肪酶等酶类错综激活后经门脉系统侵袭肝脏)等诸多因素有关,但是其具体的发生机制仍未十分明确,因此,积极进行 AHNP 相关性研究,降低肝脏损伤,防治 AHNP 并发症对于改善 AHNP 肝损伤预后极为重要。目前国内外相关研究^[7-9]发现炎症反应在 AHNP 发生发展中具有重要影响,而 TLRs 作为在肝、肾、心等重要脏器组织中广泛分布的一类蛋白分析,能够通过促进炎症产生、放大炎症效应而导致病情不断恶化。TLRs 作为 I 型跨膜蛋白,最早被发现于果蝇体内,之后在动物、人体内被广泛分布,随着研究的进展,目前已经确定 TLRs 包括胞膜外区、胞质区以及跨膜区。TLRs 作为首个分子识别模式蛋白^[10-13],能够在一定程度上识别机体危险信号,并将可识别信号通过活化转录因子促进 TNF- α (tumor necrosis factor- α , 肿瘤坏死因子- α)、IL-1 (Interleukin-1, 白介素-1)等炎症细胞因子从而对应激性损害、病原体等产生抵御反应,因此,TLRs 被认为^[14]是固有免疫系统的重要作用因子。TLR2 作为膜表面受体,不仅能够对 N-乙酰脂蛋白、肽聚糖以及磷脂壁酸等革兰氏阳性菌胞壁成分进行识别,而且对于 HA (hyaluronic acid, 多糖透明质酸)、HMGB1 (High mobility group box1, 高迁移率族蛋白 1)同样能够进行识别,国外研究发现^[15-16]TLR2 对于肝纤维化基因表达具有调节作用,能够通过多

种途径对肝纤维化过程进行干预。TLR4 作为研究最为广泛的 TLRs 家族亚型,在内皮细胞、中性粒细胞、单核巨噬细胞等细胞中均有分布,其被认为是细胞感染疾病中抵御效应最显著的因子。目前,研究已经证实^[17,18]TLR4 作为内毒素特异性受体和细菌胞内信号转导受体,不仅能够对内毒素进行识别,而且能够对炎症反应发挥启动子效应,其能够通过 LPS (lipopolysaccharides, 脂多糖)-LBP (Lipopolysaccharide binding protein, 脂多糖结合蛋白)-CD14-MD-2 (Myeloid differentiation factor 骨髓分化因子-2)通路对 IRAK (Interleukin receptor associated kinase, 白细胞介素受体相关激酶)家族活性进行激活,从而完成核因子活化诱导。此外,相关研究还发现^[19,20]TLR4 能够通过干预靶基因转录过程而参与肝细胞损伤过程,因此,在肝损伤的每一个环节中,TLR2、TLR4 均能够发挥一定影响力。由于国内关于 TLRs 研究仍刚刚起步,关于 AHNP 肝损伤中 TLRs 作用机制的研究极为少见,空白之处较多,基于此,实验择选了具有代表性效应的 TLR2 和 TLR4 作为观察指标,以初步分析 TLRs 在 AHNP 中的表达特点和意义。本实验中,在建模前,两组大鼠的 TLR2、TLR4mRNA 和蛋白表达均为低水平,说明,在正常情况下,体内可以存在少量 TLRs 分布。在手术造模之后,对照组 TLR2、TLR4mRNA 和蛋白无明显波动,而造模组 TLR2、TLR4mRNA 和蛋白显著升高,说明手术对于 TLR2、TLR4 表达

量的影响极为轻微,TLR2、TLR4mRNA 和蛋白表达主要与肝损伤情况具有密切关联。进一步对于造模组 TLR2、TLR4mRNA 和蛋白情况进行分析,发现在造模后 12hTLR2、TLR4mRNA 和蛋白达到最高峰,综合现有研究结果进行分析,我们可以发现,在造模后肝损伤者的炎症因子、HMGB1 等指标虽然同样显著升高,但是达峰时间略晚于 TLR2、TLR4,考虑可能与 TLR2、TLR4 作为炎症反应门户指标,不仅能够于下游靶受体结合,而且对于炎症因子释放、HMGB1 形成具有介导促进作用有关。由于实验研究有限,对与 TLR2、TLR4 具体作用机制尚未能完全阐述,且实验观察指标较为局限,仍有待临床对 TLRs 作用机制进行补充和完善。

综上所述,AHNP 肝损伤中 TLR2、TLR4mRNA 和蛋白表达水平均明显上调,考虑 TLR2、TLR4 表达对肝损伤程度、炎症反应轻重具有至关重要的影响。

参考文献(References)

- [1] 储霞.急性出血坏死性胰腺炎患者护理干预体会[J].中国保健营养(中旬刊),2014,24(4):2196
Chu Xia. Nursing intervention on patients with acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis [J]. Chinese health and nutrition, 2014, 24 (4): 2196
- [2] 詹媛,唐国都,梁志海,等.肾上腺髓质素在急性坏死性胰腺炎并肝损伤大鼠肝组织中的表达[J].中华胰腺病杂志,2014,14(3):154-157
Zhan Yuan, Tang Guo-du, Liang Zhi-hai et al. The expression of adrenomedullin in the liver tissue of rats with acute necrotizing pancreatitis with liver injury [J]. Chinese Journal of pancreatic diseases, 2014, 14 (3): 154-157
- [3] Kouichi, Miura, Hirohide, et al. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease [J]. World Journal of Gastroenterology, 2014, 20(23): 7381-7391
- [4] Vivek K, Odin J A. Toll-like receptors and liver disease [J]. Liver International Official Journal of the International Association for the Study of the Liver, 2014, 34(2): 184-96
- [5] Sawada K, Ohtake T, Hasebe T, et al. Augmented hepatic Toll-like receptors by fatty acids trigger the pro-inflammatory state of non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. Hepatology Research, 2014, 44(8): 920-934
- [6] 樊恒,宋甫春,包俊伟,等.Survivin 蛋白在大鼠急性出血坏死性胰腺炎中的表达及作用 [J]. 中华临床医师杂志(电子版),2012,6(16): 4912-4914
Fan Heng, Song Fu-chun, Bao Jun-wei, et al. The expression and function of survivin protein in rats with acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis [J]. Chinese Journal of clinicians (electronic version), 2012, 6(16): 4912-4914
- [7] 刘静,黄丽,胡晓松,等.姜黄素对大鼠重症急性胰腺炎防治作用及其机制[J].中国普通外科杂志,2012,21(3): 283-289
Liu Jing, Huang Li, Hu Xiao-song, et al. The effect and mechanism of curcumin on the prevention and treatment of severe acute pancreatitis in rats[J]. Chinese Journal of general surgery, 2012, 21(3): 283-289
- [8] 刘娟,谭锋,欧阳明.氯喹对 AHNP 肝损伤 Toll 样受体 2/4 表达的影响及作用机制研究[J].中南药学,2014,12(4): 350-353
Liu Juan, Tan Feng, Ouyang Ming. Effect and mechanism of chloroquine on the of AHNP in liver injury of Toll receptor 2/4 expression[J]. Zhongnan pharmacy, 2014, 12 (4): 350-353
- [9] Rasputin P, Abiola S, Isaeva NV. The dynamics of inflammatory response syndrome (SIRS) in rats with acute necrotizing pancreatitis (ANP) and a way of its correction [J]. Pancreatology, 2016, 16(3): S37-S37
- [10] Rauta P R, Samanta M, Dash H R, et al. Toll-like receptors (TLRs) in aquatic animals: Signaling pathways, expressions and immune responses[J]. Immunology Letters, 2014, 158(1-2): 14-24
- [11] Klawitter M, Hakozaiki M, Kobayashi H, et al. Expression and regulation of toll-like receptors (TLRs) in human intervertebral disc cells[J]. European Spine Journal, 2014, 23(9): 1878-1891
- [12] Prajapati B, Jena P K, Rajput P, et al. Understanding and modulating the Toll like Receptors (TLRs) and NOD like Receptors (NLRs) cross talk in type 2 diabetes [J]. Current Diabetes Reviews, 2014, 10(3): 190-200
- [13] 陶子洪,罗秋红.Toll 样受体与肾脏疾病研究进展[J].实用儿科临床杂志,2012,27(17): 1362-1365
Tao Yu-hong, Luo Qiu-hong. The disease study progression on Toll receptor and kidney [J]. Journal of Practical Pediatrics, 2012, 27 (17): 1362-1365
- [14] Richard G, Belta C, Julius A A, et al. Controlling the outcome of the Toll-like receptor signaling pathways[J]. Plos One, 2012, 7(2): e31341
- [15] Hartmann P, Haimerl M, Mazagova M, et al. Toll-like receptor 2-mediated intestinal injury and enteric tumor necrosis factor receptor 1 contribute to liver fibrosis in mice [J]. Gastroenterology, 2012, 143 (5): 1330-1340
- [16] Tu CT, Yao Q Y, Xu B L, et al. Protective effects of curcumin against hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride: Modulation of high-mobility group box 1, Toll-like receptor 4 and 2 expression[J]. Food Chemical Toxicology, 2012, 50(9): 3343-3351
- [17] Lee JJ, Wang PW, Yang IH, et al. High-fat diet induces toll-like receptor 4-dependent macrophage/microglial cell activation and retinal impairment[J]. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2015, 56(5): 3041-3050
- [18] 孙万日,赵永福,王庆元,等.急性出血坏死性胰腺炎肝损伤中 Toll 样受体 2、Toll 样受体 4mRNA 和蛋白的表达[J].中华实验外科杂志,2015,32(9): 2185-2186
Sun Wan-ri, Zhao Yong-fu, Wang Qing-yuan, et al. Toll receptor 2 and Toll receptor 4mRNA and protein expression in liver injury of necrotizing pancreatitis with acute hemorrhage [J]. Chinese Journal of experimental surgery, 2015, 32(9): 2185-2186
- [19] 陈青,张国梁,王勇强,等.TLR4 对肝脏缺血再灌注损伤大鼠肝组织 Th17 细胞相关细胞因子表达的影响 [J]. 山东医药,2013,53(39): 15-18
Chen Qing, Zhang Guo-liang, Wang Yong-qiang, et al. Effects of TLR4 on the expression of Th17 cell related cytokines in liver tissues of rats with hepatic ischemia reperfusion injury [J]. Shandong Medicine, 2013, 53(39): 15-18
- [20] 徐正婕,李楠,何崇信,等.模拟代谢性内毒素血症对肝损伤大鼠肝组织 TLR4 信号通路的影响 [J]. 实用肝脏病杂志,2014,17(6): 615-618
Xu Zheng-jie, Li Nan, He Chong-xin, et al. The effect of metabolic syndrome on TLR4 signaling pathway in liver tissues of mice with liver injury[J]. Practical Liver Diseases Journal, 2014, 17(6): 615-618