

TLR4 对脑缺血再灌注小鼠海马 IRF-3 和 IFN- β 表达的影响

陈燕飞 周 丽 高 音

摘 要 目的 探讨 Toll 样受体 4 (TLR4) 对脑缺血再灌注小鼠海马 IRF-3 和 IFN- β 表达的影响。方法 采用 TLR4 抗体封闭阻断 TLR4, Western blot 检测海马 TLR4、IRF-3 和 IFN- β 表达变化。小鼠随机分为 3 组:假手术组(S 组)、缺血再灌注组(I 组)、TLR4 阻断组(T 组),各组又分 1 天、2 天、3 天、4 天 4 个时间点组。结果 缺血再灌注组 TLR4、IRF-3 和 IFN- β 表达水平明显高于假手术组表达水平($P < 0.05$),而 TLR4 阻断组表达水平明显少于缺血再灌注组($P < 0.05$)。结论 缺血再灌注可激活 TLR4,并引起 IRF-3 和 IFN- β 表达量增加,而采用 TLR4 抗体封闭阻断 TLR4 后,IRF-3 和 IFN- β 表达量减少。提示 TLR4 通过上调 IRF-3 和 IFN- β 表达参与脑缺血再灌注的反应机制。

关键词 脑缺血再灌注 TLR4 TLR4 阻断 IRF-3 IFN- β

The Effect of Toll-like Receptor 4 (TLR4) on Expression of IRF-3 and IFN- β During Cerebral Ischemia Reperfusion in Hippocampus in Mice. Chen Yanfei, Zhou Li, Gao Yin. Basic Medicine School, Qiqihar Medical University, Heilongjiang 161006, China

Abstract Objective To study the effect of Toll-like receptor 4 (TLR4) on expression of IRF-3 and IFN- β during the inflammatory reaction induced by cerebral ischemia reperfusion in mice. **Methods** After blockade of TLR4 by TLR4 antibody, expression of TLR4, IRF-3 and IFN- β at the protein level in hippocampus was examined by Western blot, respectively. Mice were randomly divided into sham group, ischemia reperfusion group and TLR4 blocking group in different time points (1, 2, 3 and 4 day). **Results** In the right cortex, the expression of TLR4, IRF-3 and IFN- β of I group was distinctly higher than that of S and T group ($P < 0.05$). **Conclusion** Our results indicate that TLR4 is activated by cerebral ischemia reperfusion in hippocampus in mice, while expression of IRF-3 and IFN- β was decreased after TLR4 was blocked by TLR4 antibody which means that TLR4 participates in cerebral ischemia reperfusion through upregulating expression of IRF-3 and IFN- β .

Key words Cerebral ischemia reperfusion; TLR4; TLR4-blocked; IRF-3; IFN- β

干扰素调节因子-3 (IFN-regulated factor-3, IRF-3) 作为一个重要的转录调节因子,在 TLR4 (toll-like receptor 4, TLR4) 介导的髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 非依赖信号转导通路 (TIR-domain containing adaptor inducing interferon- β , TRIF 信号途径) 抵抗病原体入侵的免疫应答的启动过程中起着重要作用,IRF-3 活化后形成同源二聚体转位入核,诱导干扰素 β (interferon β , IFN- β) 基因表达^[1,2]。目前,对 TLR4 介导的 TRIF 依赖信号通路中 IRF-3 的研究主要集中在抗感染免疫反应中^[3,4],在脑缺血再灌注过程中 IRF-3 是否发挥作用还没有相关报道。本研究采用 TLR4

抗体封闭阻断 TLR4, Western blot 检测海马 TLR4、IRF-3 和 IFN- β 蛋白表达量,旨在观察脑缺血再灌注损伤是否激活 TLR4 及采用 TLR4 抗体阻断 TLR4 后,IRF-3 和 IFN- β 的表达变化,探讨 TLR4 参与脑缺血再灌注的反应机制。

材料与方法

1. 主要试剂:兔抗 TLR4 单克隆抗体(sc-16240)、辣根过氧化物酶标记羊抗兔、羊抗羊 IgG 二抗、 β -actin 抗体、兔抗 IRF-3 单克隆抗体(sc-9082)、山羊抗 IFN- β 单克隆抗体 IgG(sc-17569)(美国 Santa Cruz 公司)。

2. 实验动物的分组:健康昆明种小鼠 144 只,雌雄兼用,体重 18~22g,由中国医科大学实验动物中心提供,随机分为 3 组:①假手术组(S 组, $n = 48$);②缺血再灌注组(I 组, $n = 48$);③TLR4 阻断组(T 组, $n = 48$)。各组又分 1 天、2 天、3 天、4 天 4 个时间点组($n = 6$)。

3. 小鼠脑缺血再灌注模型的制备:手术在室温 25℃、湿度 50% 的条件下进行。用 2% 的戊巴比妥钠腹腔注射(40mg/kg),络合碘消毒,行颈部正中切口,分离两侧颈总动脉(com-

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(D2007-93)

作者单位:161006 黑龙江省齐齐哈尔医学院基础医学院

通讯作者:高音,电子邮箱:gyqjf.329@163.com

mon carotid arteries, CCA), 用动脉夹夹闭小鼠双侧颈总动脉血流, 阻断 12min 后, 松开动脉夹实现再灌注。在阻断双侧颈总动脉血流后, 出现心跳加快、呼吸幅度加深、频率先加快、后减慢典型生理变化过程的小鼠, 作为缺血成功样本入选。TLR4 阻断组小鼠缺血 10min 时在右侧颈总动脉内注入 TLR4 抗体 (10 μ g/ml) 0.1ml, 注射为缓慢注射, 用微量注射泵在 2min 内注射完毕, 缝合切口。缺血再灌注组注射等量生理盐水, 假手术组只分离双侧颈总动脉, 其余步骤同上。术中用白炽灯保持小鼠肛温在 37 $\pm$ 0.5 $^{\circ}$ C。术后置清洁饲养笼中观察。

4. Western blot 检测 TLR4、IRF-3 和 IFN- β 表达: 各组动物分别于再灌注 1 天、2 天、3 天、4 天时间点 ($n=6$) 立即冰上断头取右侧海马, 加入适量的细胞裂解液 150 μ l [0.1mmol/L NaCl, 0.01mmol/L Tris-HCl (pH7.6), 0.001mmol/L EDTA (pH8.0) 1 μ g/ml Aprotinin, 100 μ g/ml PMSF], 超声粉碎, 离心。用 lowry 法测定蛋白浓度。取总蛋白 30 μ g 经 120g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。转印, 杂交, 暗室内 ECL 反应, X 线片显影、定影。扫描蛋白印迹条带。

5. 图像分析及统计学处理: 蛋白条带用自动凝胶成像系统 Chemi Imager 5500 V2.03 软件进行扫描, 用 Fluor Chen 2.0 软件进行分析测得 IDV (integrated density value) 值。所得数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 用 SPSS13.0 统计软件做统计分析, 样本均数间比较用方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. TLR4 表达结果: 为观察脑缺血再灌注后是否激活 TLR4 过表达及 TLR4 抗体对细胞膜上 TLR4 受体的封闭效果, 采用 Western blot 方法检测各组小鼠右侧海马 TLR4 蛋白表达水平。Western blot 分析显示缺血再灌注组 TLR4 蛋白表达水平明显高于 TLR4 阻断组和假手术组表达水平 (图 1A)。缺血再灌注组 TLR4 表达条带的 IDV 值在 1 天、2 天、3 天和 4 天分别高于 TLR4 阻断组 IDV 值 ($P<0.05$) (图 1B)。该结果显示了缺血再灌注组 TLR4 蛋白的大量表达和再灌注之前 TLR4 抗体已有效阻断了 TLR4 受体。

2. IRF-3 表达结果: 为验证皮质 IRF-3 表达情况, 采用 Western blot 方法检测各组小鼠在各灌注时间点右侧海马 IRF-3 表达。Western blot 分析显示缺血再灌注 IRF-3 蛋白表达水平明显高于 TLR4 阻断组和假手术组表达水平 (图 2A)。缺血再灌注 IRF-3 表达条带的 IDV 值在 1 天、2 天、3 天和 4 天分别高于 TLR4 阻断组 IDV 值 ($P<0.05$) (图 2B)。

3. IFN- β 表达结果: 采用 Western blot 方法检测各组小鼠右侧海马 IFN- β 蛋白表达水平。Western blot 分析显示缺血再灌注组 IFN- β 蛋白表达水平明显高于 TLR4 阻断组和假手术组表达水平 (图 3A)。缺血再灌注组 IFN- β 蛋白在再灌注 1 天开始表达,

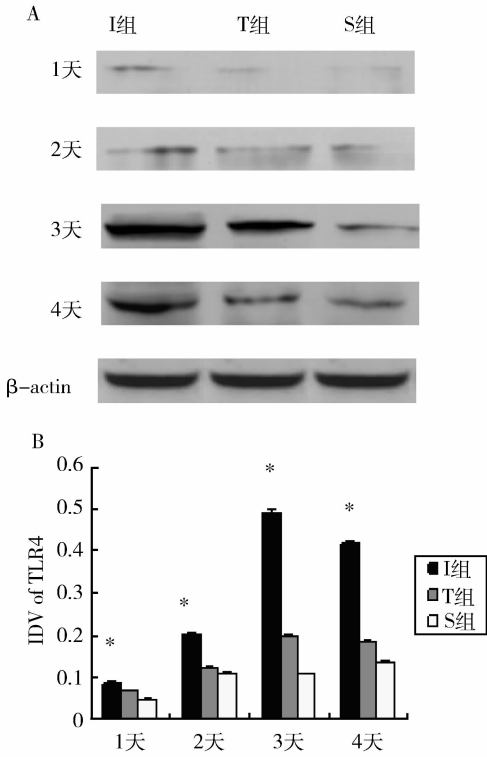


图 1 TLR4 小鼠右侧海马表达

A. TLR4 在不同组各灌注时间点小鼠右侧海马表达, Western blot;

B. TLR4 在不同组各灌注时间点小鼠右侧海马表达的 IDV 值

* : 与 S 组或 T 组相比, $P<0.05$

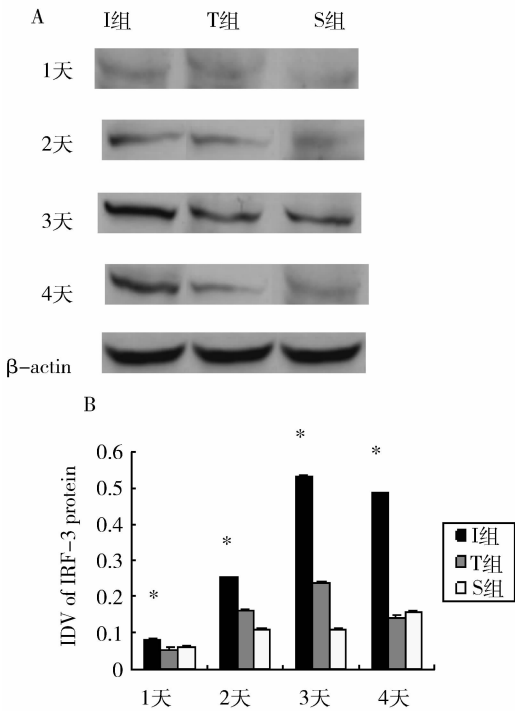


图 2 IRF-3 小鼠右侧海马表达

A. IRF-3 在不同组各灌注时间点小鼠右侧海马表达, Western blot;

B. IRF-3 在不同组各灌注时间点小鼠右侧海马表达的 IDV 值

* : 与 S 组或 T 组相比, $P<0.05$

3 天达到高峰,4 天开始下降(图 3 A)。缺血再灌注组 IFN- β 表达条带的 IDV 值在 1 天、2 天、3 天和 4 天分别高于 TLR4 阻断组 IDV 值($P < 0.05$)(图 3B)。

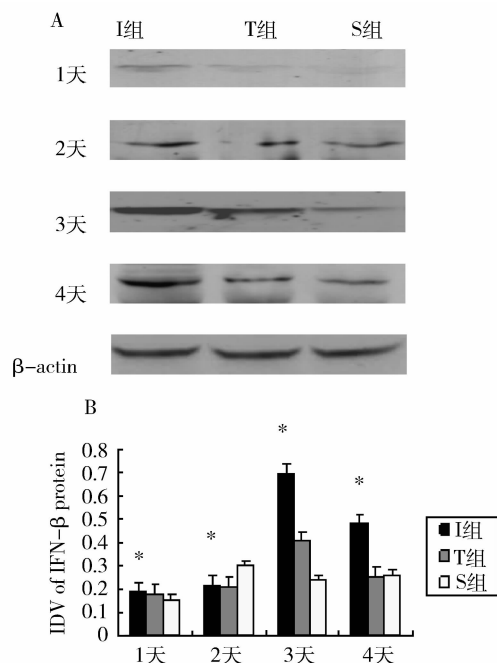


图 3 IFN- β 小鼠右侧海马表达

A. IFN- β 在不同组各灌注时间点小鼠右侧海马表达, Western blot;

B. IFN- β 在不同组各灌注时间点小鼠右侧海马表达的 IDV 值

*: 与 S 组或 T 组相比, $P < 0.05$

讨 论

TLR4 是一种跨膜蛋白受体, TLR4 被激活后, 其信号经由 2 条信号通路由胞外向胞内传导: MyD88 依赖性途径和 MyD88 非依赖性途径, MyD88 非依赖性途径又称 TRIF 依赖性, TRIF 可激活 TBK1 [TRAF family - member - associated NF- κ B activator (TANK) binding kinase 1], TBK1 由一个可诱导的 I- κ B kinase (IKK- α) 家族组成^[5]。TBK1/IKK- α 直接使 IRF-3 (interferon response factor 3) 和 IRF-7 (interferon response factor 7) 磷酸化^[6], 磷酸化的 IRF-3 和 IRF-7 形成同源二聚体, 转移到细胞核, 导致 IFN- β 和一系列 IFN 诱导的基因表达^[7]。目前, TLR4 介导的 TRIF 信号通路的研究主要集中在对抗微生物感染的免疫反应中^[8,9], 在脑缺血再灌注损伤中该通路是否介入尚未见报道。

由于 IRF-3 是 TLR4 信号传导通路的一个关键分子, 本研究在脑缺血再灌注损伤激活 TLR4 后, 观察了 IRF-3 及其诱导的 IFN- β 在小鼠海马的表

达。本实验结果显示: 在小鼠海马, 缺血再灌注组 IRF-3 蛋白表达水平明显高于 TLR4 阻断组和假手术组表达水平($P < 0.05$), 说明 TLR4 被激活后, 引起 IRF-3 表达量增加, 而采用 TLR4 抗体阻断后, IRF-3 表达量减少。本研究结果提示 IRF-3 参与了脑缺血再灌注 TLR4 激活后的信号传导路径。由于磷酸化的 IRF-3 转位入核后, 可导致 IFN- β 和一系列 IFN 诱导的基因表达, 本实验观察了 IFN- β 表达的变化。Western blot 分析结果显示: 缺血再灌注组小鼠的海马在 TLR4 被激活并引起 IRF-3 的过表达后, IFN- β 表达量显著高于 TLR4 阻断组和假手术组水平($P < 0.05$); 而采用 TLR4 抗体封闭 TLR4 阻断后, TLR4 阻断组的 IFN- β 表达量明显低于缺血再灌注组($P < 0.05$), 提示在脑缺血再灌注的病理发展过程中, TLR4-IRF-3-IFN- β 信号通路可能被激活; 阻断 TLR4 后, IRF-3 和 IFN- β 表达量明显减少。目前, 直接针对 TLR4-IRF-3-IFN- β 信号通路的研究较少, 这一途径在脑缺血再灌注中所发挥的作用还有待于进一步广泛、深入的研究。

参考文献

- Katherine AF, Sarah MM, Kerrie LF, *et al.* IKK epsilon and TBK1 are essential components of the IRF-3 signaling pathway. *Nat Immunol*, 2003, 4: 491-496
- Sharma S., Tenoexer BR, Grandvaux N, *et al.* Triggering the interferon antiviral response through an ikk-related pathway. *Science*, 2003, 300: 1148-1151
- Barton GM. Viral recognition by Toll-like receptors. *Seminars in Immunology*, 2007, 32:113-121
- Menzies M, Ingham A. Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 109: 23-30
- Oganesyan G, Saha SK, Guo B, *et al.* Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature*, 2006, 439:208-211
- Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, *et al.* LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med*, 2003, 198:1043-1055
- Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*, 2006, 13:816-825
- Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, *et al.* IKK and TBK1 are essential components of the IRF-3 signaling pathway. *Nature Immunol*, 2003, 4:491-496
- Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, *et al.* Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J*, 1998, 17: 1087-1095

(收稿:2009-12-30)