

TLR2 和 NOD2 在金黄色葡萄球菌肺炎小鼠中的表达

温顺航 吴沪军 郭书真 刘 榴 林罗娜 林 立 李昌崇

摘要 目的 观察小鼠肺部感染金黄色葡萄球菌后肺组织模式识别受体 TLR2 及 NOD2 的表达,探讨其在金黄色葡萄球菌肺炎中的作用。**方法** 30 只 C57BL/6J 小鼠,随机分为两组,对照组小鼠滴鼻接种无菌磷酸缓冲盐溶液,金黄色葡萄球菌肺炎组小鼠滴鼻接种 5×10^8 CFU/50 μ l。滴鼻接种 72h 后,获取肺组织标本,HE 染色观察病理形态学改变,免疫组化和 Western blot 法检测 TLR2 及 NOD2 蛋白的表达变化,QRT-PCR 法检测 TLR2 和 NOD2 mRNA 的表达。**结果** 金黄色葡萄球菌滴鼻接种 72h 后,小鼠肺组织 TLR2 和 NOD2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$),并且上调 TLR2 和 NOD2 mRNA 表达 ($P < 0.01$)。**结论** 金黄色葡萄球菌感染能上调小鼠肺组织 TLR2 和 NOD2 的 mRNA 及蛋白表达。

关键词 金黄色葡萄球菌 肺炎 Toll 样受体 2 核苷酸结合寡聚化结构域 2

中图分类号 R563 **文献标识码** A **DOI** 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.03.020

Expression of TLR2 and NOD2 in Pulmonary Tissue of Mice with *Staphylococcus aureus* Pneumonia. Wen Shunhang, Wu Hujun, Guo Shuzhen, et al. Department of Respiratory Medicine, Yuying Children's Hospital of Affiliated to Wenzhou Medical University, Zhejiang 325027, China

Abstract Objective To investigate the expression of TLR2 and NOD2 in pulmonary tissue and its significance in mice with *S. aureus* pneumonia. **Methods** Thirty C57BL/6J mice were randomly divided into normal control and *S. aureus* pneumonia groups. Mice of the control group inoculated intranasally with sterile phosphate-buffered saline, and mice of the *S. aureus* pneumonia group inoculated intranasally with 5×10^8 CFU/50 μ l. Pulmonary tissues were collected at 72h after nasal inoculation. Changes in pulmonary histopathology were observed with HE staining, and the expression of TLR2 and NOD2 was analysed by immunohistochemistry and Western blot. QRT-PCR was used to detect TLR2 mRNA and NOD2 mRNA. **Results** At 72h after *S. aureus* inoculated, the expression of TLR2 and NOD2 protein in pulmonary tissues of mice were significantly increased ($P < 0.05$, respectively), and the expression of TLR2 mRNA and NOD2 mRNA were elevated ($P < 0.01$, respectively). **Conclusion** *S. aureus* infection can elevate the expression of TLR2 and NOD2 in mice pulmonary tissues.

Key words *Staphylococcus aureus*; Pneumonia; TLR2; NOD2

金黄色葡萄球菌是肺炎的主要病原菌之一,常引起坏死性肺炎、肺脓肿、胸腔积液等严重的后果。天然免疫系统是机体抵抗细菌致病的第一道防线。Toll 样受体 2 (Toll-like receptor 2, TLR2) 与核苷酸结合寡聚化结构域 2 (nucleotide-binding oligomerisation domain-like receptor 2, NOD2) 蛋白是哺乳动物体内两类主要的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs), 为宿主免疫的重要参与者和发起者。研究发现,位于细胞膜表面的 TLR2 可识别金黄色葡萄

球菌细胞壁上的肽聚糖和磷脂壁酸,引起一系列炎性细胞因子等的合成和分泌,发挥免疫保护作用^[1, 2]。金黄色葡萄球菌通常被认为是细胞外病原体,然而有研究证实其也可侵入宿主细胞,内化并在胞内存活。近年研究表明,胞内 NOD2 受体可识别细菌表面分子胞壁酰二肽 (muramyl dipeptide, MDP),在介导免疫防御中扮演着重要角色^[3]。于是,TLR2 及 NOD2 受体的表达水平是宿主固有免疫应答的主要影响因素之一。本实验研究 TLR2 和 NOD2 受体在金黄色葡萄球菌感染小鼠肺组织中的表达,以探讨两者在肺部抗金黄色葡萄球菌感染中的作用。

材料与方法

1. 动物及材料:30 只 SPF 级 6~8 周 C57BL/6J 小鼠购自上海史莱克实验动物有限公司,体重 16~20g,随机分为对照组和金黄色葡萄球菌肺炎组,每组 15 只。兔抗小鼠 TLR2 抗体 (ab24192) 和大鼠抗小鼠 NOD2 抗体 (ab124348) 购自英国

基金项目:浙江省自然科学基金重点项目 (LZ13H010001);浙江省研究生创新科研项目 (YK2011083)

作者单位:325027 温州医科大学附属第二医院、育英儿童医院、国家卫生和计划生育委员会国家临床重点专科 (儿童呼吸)、浙江省小儿呼吸诊疗研究中心

通讯作者:李昌崇,博士生导师,教授,电子邮箱:wzlichc@21cn.com

Abcam 公司。动物实验方案经温州医科大学实验动物伦理委员会审核并同意实施(伦理审核编号:wydw2013-0017)。

2. 细菌及菌液制备:金黄色葡萄球菌(ATCC25904)菌株购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC),划线接种至胰蛋白大豆琼脂(tryptic soy agar, TSA)平板,并在 37.0℃ 条件下培养过夜,挑取典型菌落接种到脑心浸液肉汤培养 6h。离心菌液,不含内毒素的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤金黄色葡萄球菌两次并重悬,用麦氏比浊仪测定金黄色葡萄球菌菌液浓度,调整浓度至 1×10^{10} CFU/ml。将该菌液倍比稀释后,取 3 个连续梯度稀释菌液 20 μ l 划至 TSA 平板培养 24h,确定菌液活菌浓度。

3. 小鼠肺炎模型:异氟醚气体麻醉小鼠,将金黄色葡萄球菌菌液 50 μ l (约含 5×10^8 CFU),接种于小鼠鼻尖处,而对照组为无菌 PBS 50 μ l 滴鼻,小鼠本能性吸入,将其直立放置 1min,以利于细菌迁移到肺部。

4. 组织病理学观察:滴鼻造模 72h 后,麻醉处死小鼠,左肺固定于 4% 多聚甲醛溶液,常规脱水、透明、包埋,制作 4 μ m 连续切片,苏木精-伊红(HE)染色后于显微镜下观察。

5. 免疫组化分析 TLR2 和 NOD2 蛋白表达情况:石蜡包埋的小鼠肺组织制作切片,加 3% 过氧化氢于玻片上 10min,枸橼酸盐缓冲液修复抗原,山羊血清封闭后,加入稀释配好的一抗分别为 TLR2 抗体(1:1000)和 NOD2(1:500),在 4℃ 下孵育过夜。加入二抗孵育 2h, DAB 显色,封片,拍照。

6. Western blot 法分析 TLR2 和 NOD2 蛋白表达情况:解冻小鼠肺组织,用含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液裂解,BCA 试剂盒检测蛋白浓度,加入上样缓冲液(5 \times),将蛋白上样量调整至 40 μ g,煮沸 5min 后进行 SDS-PAGE 电泳。蛋白样品经电泳分离后,将凝胶条带电转至 PVDF 膜上(购自 Millipore 公司)。转膜结束,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2h 后,1:1000 稀释的兔抗小鼠 TLR2 抗体、大鼠抗小鼠 NOD2 抗体和兔抗小鼠 β -actin 抗体 4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜后,分别加入 1:2000 稀释的山羊抗兔或山羊抗大鼠二抗室温孵育 2h,加 TBST 洗膜后,ECL 试剂盒显色。AlphaEaseFC 分析软件处理实验结果。

7. QRT-PCR 法分析 TLR2 和 NOD2 mRNA 表达情况:按 TRIzol 试剂说明书提取小鼠肺组织总 RNA,定量后用反转录合成 cDNA(购自 Thermo 公司)。TLR2、NOD2 及内参照 β -actin 引物参照 GenBank 基因序列自行设计,由上海 Invitrogen

公司合成。引物序列为小鼠 TLR2,正义链:5'-CAAACCT-CAGGATAGGAAATGTAG-3',反义链:5'-TAAGT-GAAGAGTCAGGTGATGGATG-3'; NOD2,正义链:5'-GGTTTCTGAGCCAGTACGAGTGTG-3',反义链:5'-GG-TAGTTCCTGACGTGCTGTAGA-3'。 β -actin:正义链:5'-GAGAGGGAAATCGTGCTGACA-3',反义链:5'-ACCCAA-GAAGGAAGGCTGGAAA-3'。在 LightCycler480 实时荧光定量 PCR 仪(Roche)上进行 PCR 扩增,SYBR 反应体系 10 μ l,反应条件:95℃ 5min,1 个循环;95℃ 10s,60℃ 10s,70℃ 10s,45 个循环。每个标本设 2 个复孔,每次实验最后通过观察 PCR 产物的融解曲线确定扩增产物的特异性。

8. 统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计软件包进行统计分析,计量资料如符合正态分布且方差齐,两组间均数比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. HE 染色病理:对照组小鼠支气管腔、肺泡腔内无炎性细胞浸润,肺泡结构完整(图 1A)。而滴鼻接种金黄色葡萄球菌 72h 后,小鼠肺组织切片 HE 染色显示肺泡腔有以嗜中性粒细胞为主的大量炎性细胞浸润和红细胞渗出,支气管管腔狭窄,充满炎性渗出物,肺泡壁充血增厚(图 1B)。

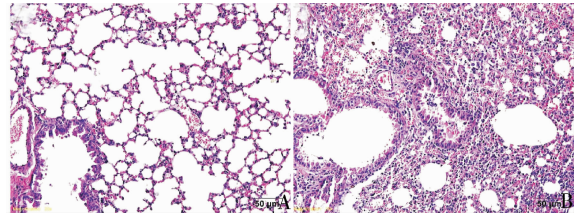


图 1 小鼠肺组织的病理学改变(HE 染色, $\times 200$)

A. 对照组; B. 金黄色葡萄球菌肺炎组

2. 免疫组化检测 TLR2 和 NOD2 表达结果:对照组小鼠 TLR2 和 NOD2 受体主要表达于气管、支气管和少量肺泡上皮细胞;而金黄色葡萄球菌肺炎组小鼠可见大量的 TLR2 和 NOD2 阳性炎性细胞浸润肺组织,气管、支气管上皮细胞和部分肺泡上皮细胞表达 TLR2 和 NOD2 受体(图 2)。

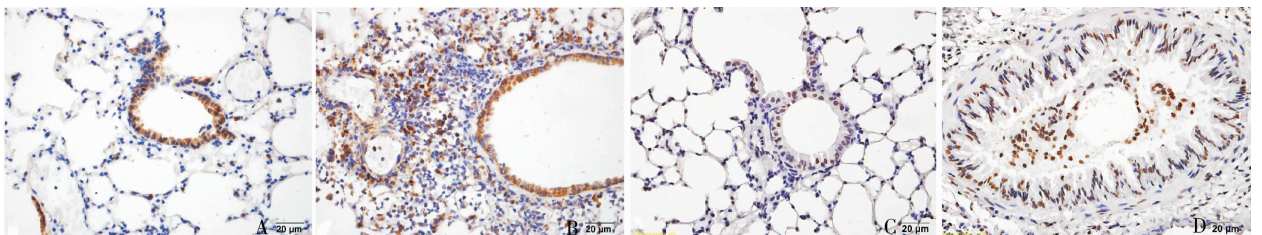


图 2 小鼠肺组织 TLR2 和 NOD2 的免疫组化结果($\times 400$)

A. 对照组 TLR2 表达; B. 金黄色葡萄球菌肺炎组 TLR2 表达; C. 对照组 NOD2 表达; D. 金黄色葡萄球菌肺炎组 NOD2 表达

3. Western blot 法检测 TLR2 和 NOD2 表达结果: 经 AlphaEaseFC 软件计算条带灰度, 并分别计算 TLR2/ β -actin 和 NOD2/ β -actin 比值, 结果表明金

黄色葡萄球菌肺炎小鼠比正常小鼠相比, 肺组织 TLR2 和 NOD2 表达升高, 且差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3)。

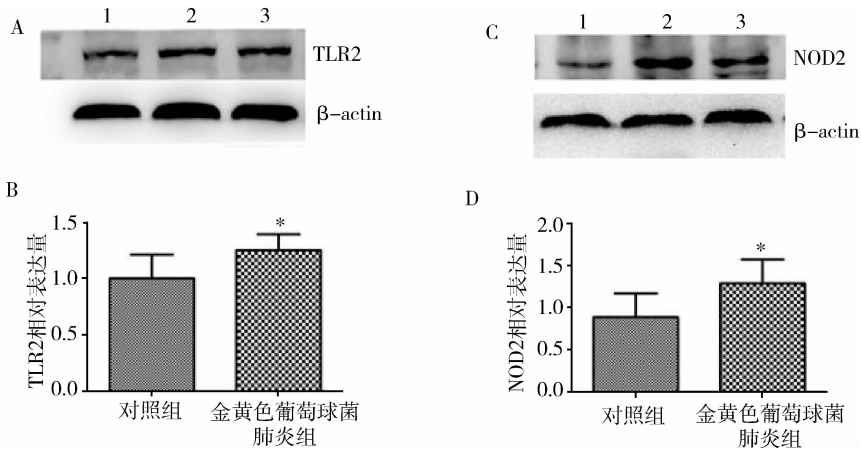


图 3 Western blot 法检测金黄色葡萄球菌感染对小鼠肺组织 TLR2、NOD2 表达的影响

A. 各组小鼠肺组织 TLR2 和 β -actin 表达条带; B. 两组小鼠肺组织 TLR2/ β -actin 电泳条带相对吸光度分析; C. 各组小鼠肺组织 NOD2 和 β -actin 表达条带; D. 两组小鼠肺组织 NOD2/ β -actin 电泳条带相对吸光度分析。

条带 1. 正常小鼠, 条带 2 和条带 3. 金黄色葡萄球菌肺炎小鼠表达条带; 与对照组比较, * $P < 0.05$

4. 实时定量 RT-PCR 分析 TLR2 mRNA 和 NOD2 mRNA 表达结果: 小鼠肺组织有 TLR2 mRNA 和 NOD2 mRNA 的基础表达, 在金黄色葡萄球菌感染后, TLR2 mRNA 和 NOD2 mRNA 表达均增强, 两者差异具有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 4)。

TLR2 和 NOD2 表达有无变化, 国内外文献报道较少。本实验选择的金黄色葡萄球菌接种量可以保证建立稳定的小鼠肺炎模型, 对接种 72h 后小鼠肺组织 TLR2 和 NOD2 的表达情况进行研究, 结果显示, 金黄色葡萄球菌感染可显著增强肺组织 TLR2 mRNA 和 NOD2 mRNA 表达, 并上调 TLR2 和 NOD2 蛋白表达。

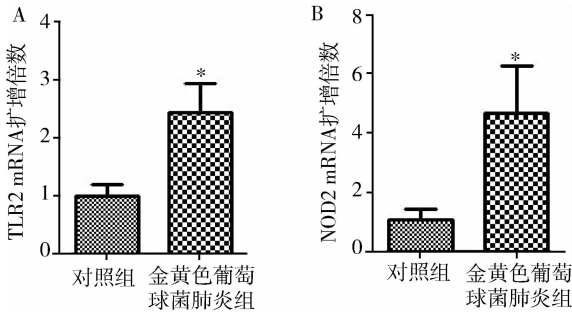


图 4 金黄色葡萄球菌感染对小鼠肺组织 TLR2 mRNA 和 NOD2 mRNA 的表达影响

A. TLR2/ β -actin mRNA 表达量; B. NOD2/ β -actin mRNA 表达量。与对照组比较, * $P < 0.01$

讨 论

金黄色葡萄球菌的病原相关模式分子 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 主要包括: 肽聚糖、脂蛋白和脂磷壁酸等, 经宿主细胞的 PRRs 识别后, 可激活天然免疫和获得性免疫反应。有报道显示, 病原体的 PAMPs, 不仅可以激活 TLRs 和 NODs 信号通路, 而且可以参与 TLRs 和 NODs 的表达调控^[4-6]。在金黄色葡萄球菌肺部感染过程中, 肺组织

TLR2 主要表达于中性粒细胞、单核-吞噬细胞、内皮细胞及上皮细胞等细胞表面, 是病原微生物跨膜信号转导的重要受体。活化 TLR2 介导的 NF- κ B 和 MAPK 信号通路, 募集中性粒细胞和巨噬细胞对清除金黄色葡萄球菌起着至关重要的作用, 而细胞表达 TLR2 是前提条件。宿主 TLRs 的表达水平是其免疫能力高低的重要影响因素。Hauber 等^[7] 研究发现肺囊性纤维化患者的支气管上皮细胞 TLR2 和 TLR4 表达水平明显低于健康人, 提示免疫受体表达下降可能是肺囊性纤维化患者易发生金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和结核分枝杆菌等病原感染的部分原因。

Tang 等^[8] 对 40 例老年肺炎患者外周血单核细胞的 TLR2 和 TLR4 表达水平与健康志愿者进行比较研究, 发现肺炎患者的 TLR2 和 TLR4 表达明显高于健康志愿者, 说明病原感染可直接上调 TLRs 的表达。TLR2 表达上调在大肠杆菌肺炎家兔模型中也得到证实^[9]。

病原感染又是如何调控 TLRs 表达的呢? Regueiro 等^[10] 研究发现肺炎克雷伯菌通过激活 NF- κ B 和 MAPK 信号通路, 上调人肺泡 II 型上皮细胞表

达 TLR2 和 TLR4。最近, Hilmi 等^[11]报道金黄色葡萄球菌的不同临床菌株对人胚肾细胞(HEK293) TLR2 的表达有不同上调作用, 蛋白 A 和细胞壁的裂解产物可以刺激 TLR2 表达, 而荚膜则可抑制 TLR2 表达。于是, 病原成分和宿主细胞通路共同调节 TLR2 表达。Li 等^[12]发现青蒿脂能下调巨噬细胞表达 TLR2 和 NOD2, 减少 NF- κ B 通路活化及 TNF- α 表达, 对金黄色葡萄球菌败血症小鼠有保护作用。以 TLR2 表达为靶点的药物可为感染性疾病及炎症性疾病的治疗提供新方法。

NOD2 主要存在于人单核-吞噬细胞、肠上皮细胞、内皮细胞和呼吸道上皮细胞的胞质, 其表达受到炎症因子和 PAMPs 的调节。谢旭华等^[13]研究发现金黄色葡萄球菌感染巨噬细胞可增强细胞内 NOD2 受体表达。NOD2 在不同疾病模型中起到不同作用, 其在金黄色葡萄球菌肺炎中的作用仍有争议。Deshmukh 等^[3]在金黄色葡萄球菌脓毒症小鼠模型研究中发现, NOD2 基因敲除小鼠(NOD2-/-)的金黄色葡萄球菌清除能力明显下降, 而细胞因子 TNF- α 、IFN- γ 和 IL-2 显著升高, 提示 NOD2 受体在金黄色葡萄球菌肺部清除及炎症调节中发挥着重要作用。但是, Kapetanovic 等^[14]研究发现, NOD2-/- 小鼠金黄色葡萄球菌肺炎炎症反应较野生型小鼠轻, 并且不影响金黄色葡萄球菌的清除能力。NOD2 受体在金黄色葡萄球菌肺炎中的作用仍有待未来研究明确。TLR2 信号通路和 NOD2 信号通路间存在互串联系。研究发现, 金黄色葡萄球菌肽聚糖裂解物能激活树突状细胞的 NOD2 信号通路, 协同 TLR2 途径参与免疫反应。

Keller 等^[6]利用 TLR2 的激动剂脂磷壁酸(lipo-teichoic acid, LTA)和 Pam2CSK4 处理成牙本质细胞, 发现可引起 NOD2 的 mRNA 和蛋白表达升高, 并证实该上调作用被抗 TLR2 抗体阻断, 说明 TLR2 途径激活有促进 NOD2 表达作用。王玉刚等^[15]通过肺内注射 1×10^6 CFU 金黄色葡萄球菌制作小鼠肺炎模型, 注射 12h 后检测发现小鼠肺组织 NOD2 mRNA 上调, 而 TLR2 mRNA 无明显变化, 黄芩总黄酮能下调 NOD2 mRNA 表达。该研究通过肺内注射制作肺炎模型为有创性操作, 造模后 12h 检测 TLR2 和 NOD2 mRNA 表达, 时间较短, 并不能完全反应指标的变化情况。本研究通过滴鼻接种法造模, 模型更为接近人体的自然感染途径, 滴鼻接种 72h 是肺炎炎症反应的高峰期, 此时检测 TLR2 和 NOD2 的 mRNA 及蛋白表达, 能更准确地获取金黄色葡萄球菌肺部感染对

TLR2 和 NOD2 的表达影响。综上所述, 本研究证实金黄色葡萄球菌感染能上调小鼠肺组织 TLR2 和 NOD2 的 mRNA 和蛋白表达, 但表达激活的确切机制有待于今后更深入的体内外研究。

参考文献

- 1 Yimin, Kohanawa M, Zhao S, *et al.* Contribution of toll-like receptor 2 to the innate response against staphylococcus aureus infection in mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74287
- 2 Oliveira - Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The role of TLR2 in infection and immunity [J]. *Front Immunol*, 2012, 18(3): 79
- 3 Deshmukh HS, Hamburger JB, Ahn SH, *et al.* Critical role of NOD2 in regulating the immune response to staphylococcus aureus [J]. *Infect Immun*, 2009, 77(4): 1376 - 1382
- 4 Shin HS, Lee JH, Paek SH, *et al.* Pseudomonas aeruginosa - dependent upregulation of TLR2 influences host responses to a secondary Staphylococcus aureus infection [J]. *Pathog Dis*, 2013, 69(2): 149 - 156
- 5 Thorley AJ, Grandolfo D, Lim E, *et al.* Innate immune responses to bacterial ligands in the peripheral human lung - role of alveolar epithelial TLR expression and signalling [J]. *PLoS One*, 2011, 6(7): e21827
- 6 Keller JF, Carrouel F, Staquet MJ, *et al.* Expression of NOD2 is increased in inflamed human dental pulps and lipoteichoic acid - stimulated odontoblast-like cells [J]. *Innate Immun*, 2011, 17(1): 29 - 34
- 7 Hauber HP, Tulic MK, Tscopoulos A, *et al.* Toll-like receptors 4 and 2 expression in the bronchial mucosa of patients with cystic fibrosis [J]. *Can Respir J*, 2005, 12(1): 13 - 18
- 8 Tang L, Li Q, Bai J, *et al.* Severe pneumonia mortality in elderly patients is associated with downregulation of toll-like receptors 2 and 4 on monocytes [J]. *Am J Med Sci*, 2014, 347(1): 34 - 41
- 9 Kajikawa O, Frevert CW, Lin SM, *et al.* Gene expression of Toll-like receptor - 2, Toll-like receptor - 4, and MD2 is differentially regulated in rabbits with Escherichia coli pneumonia [J]. *Gene*, 2005, 344: 193 - 202
- 10 Regueiro V, Moranta D, Campos MA, *et al.* Klebsiella pneumoniae increases the levels of Toll-like receptors 2 and 4 in human airway epithelial cells [J]. *Infect Immun*, 2009, 77(2): 714 - 724
- 11 Hilmi D, Parcina M, Stollewerk D, *et al.* Heterogeneity of host TLR2 stimulation by staphylococcus aureus isolates [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96416
- 12 Li B, Li J, Pan X, *et al.* Artesunate protects sepsis model mice challenged with staphylococcus aureus by decreasing tnf-alpha release via inhibition TLR2 and NOD2 mrna expressions and transcription factor nf-kappab activation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(3): 344 - 350
- 13 谢旭华, 王丽丽, 龚风云, 等. NOD2 在巨噬细胞对金黄色葡萄球菌的炎症反应中的作用研究 [J]. *中华微生物和免疫学杂志*, 2011, 31(3): 193 - 200
- 14 Kapetanovic R, Jouvion G, Fitting C, *et al.* Contribution of NOD2 to lung inflammation during staphylococcus aureus - induced pneumonia [J]. *Microbes Infect*, 2010, 12(10): 759 - 767
- 15 王玉刚, 吴昊, 孟甄, 等. 黄芩总黄酮对金黄色葡萄球菌肺炎感染模式识别受体 TLR2/Nod2 及其相关炎症因子表达的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(7): 866 - 870

(收稿日期: 2014 - 08 - 07)

(修回日期: 2014 - 09 - 09)