

抑制 TLR4 对急性呼吸窘迫综合征小鼠的保护作用及机制研究

姜 芸 郭 红

摘要 **目的** 探究抑制 TLR4 对脂多糖诱导的小鼠急性呼吸窘迫综合征的保护作用及机制。**方法** 45 只 BALB/c 小鼠随机分为对照组、ARDS 组及 TLR4 抑制剂 TAK242 组,ARDS 小鼠模型采用脂多糖(LPS)构建,试验组用 TAK242 进行干预。各组小鼠行血气分析;ELISA 检测血清炎症因子 TNF- α 、IL-6 水平;HE 染色检测各组小鼠肺组织病理变化,免疫组化检测肺组织 TNF- α 、IL-6 表达水平;Western blot 法检测肺组织 TLR4、NF- κ B 蛋白表达。**结果** 与对照组比较,ARDS 组小鼠 PaO₂/FiO₂ 值显著降低($P < 0.05$),血清炎症因子 TNF- α 、IL-6 水平显著增加($P < 0.05$),TLR4、NF- κ B 表达水平均显著升高($P < 0.05$)。与 ARDS 组比较,TAK242 组小鼠 PaO₂/FiO₂ 值显著增加($P < 0.05$),血清炎症因子 TNF- α 、IL-6 水平显著降低($P < 0.05$)。TLR4、NF- κ B 表达水平均显著降低($P < 0.05$)。病理切片结果显示,ARDS 组小鼠肺组织结构损伤严重,TNF- α 、IL-6 表达增加($P < 0.05$);TAK242 组小鼠肺组织损伤显著缓解($P < 0.05$),TNF- α 、IL-6 表达降低($P < 0.05$)。**结论** 抑制 TLR4 可以抑制下游 NF- κ B 信号通路进而减轻 LPS 诱导的小鼠肺组织的炎症反应。

关键词 TLR4 急性呼吸窘迫综合征 炎症反应

中图分类号 R5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.01.017

Study on the Protective Effects and Mechanism of Inhibiting Toll-like Receptor 4 on ARDS in Mice. Jiang Yun, Guo Hong. *Oncocardiology Department, Xinjiang Medical University Affiliated Tumor Hospital, Xinjiang 830011, China*

Abstract Objective To explore the protective effects and mechanism of inhibiting Toll-like receptor 4 (TLR4) on acute respiratory distress syndrome (ARDS) in mice. **Methods** Forty five BALB/c mice were randomly divided into control group, ARDS group and TLR4 inhibitor TAK242 group. Lipopolysaccharide was used to induce ARDS model in mice and TAK242 was intervened in the TAK242 group. Blood gas analysis were performed on mice; ELISA was used to detect serum TNF- α and IL-6 levels. HE staining was used to detect the pathological changes in lung tissue of mice in each group. Immunohistochemistry was used to detect lung TNF- α and IL-6 expression levels. The expression of TLR4 and NF- κ B proteins in lung tissue were detected by Western blot. **Results** Compared with the control group, the PaO₂/FiO₂ value in the ARDS group was significantly reduced ($P < 0.05$), the contents of serum TNF- α and IL-6 were significantly increased ($P < 0.05$), and the expression levels of TLR4 and NF- κ B were significantly increased ($P < 0.05$). When compared with mice in the ARDS group, PaO₂/FiO₂ value in the TAK242 group significantly was increased ($P < 0.05$), and the contents of serum TNF- α and IL-6 were significantly decreased ($P < 0.05$), while the expression levels of TLR4 and NF- κ B were significantly reduced ($P < 0.05$). HE staining showed that the lung tissue was severely damaged in ARDS group and the expression of TNF- α and IL-6 was increased ($P < 0.05$). The lung tissue in TAK242 group was significantly alleviated and the expressions of TNF- α and IL-6 were decreased when compared with the ARDS group ($P < 0.05$). **Conclusion** TAK242 alleviate ARDS by blocking TLR4 and inhibiting the downstream NF- κ B signaling pathway, which suppresses the inflammatory response in mice.

Key words TLR4; Acute respiratory distress syndrome; Inflammatory reaction

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是一种危及生命的呼吸系统疾病,是危重症医学中最具有挑战性的临床疾病之一。它

是由创伤、炎症、脓毒血症等各种肺内、外致病因素所引发的急性呼吸衰竭^[1]。ARDS 引起的病死率高达 40%~60%^[2,3]。目前,ARDS 发病机制尚不明确,但是已有研究表明,其病理过程与炎症反应密切相关,肺组织出现严重的炎症反应,TNF- α 、IL-6 等炎症因子大量释放,并且伴随炎症细胞在肺部的大量聚集而进一步加重肺组织损伤。已有研究表明,抑制炎症因子的释放能够有效缓解 ARDS^[4,5]。Toll 样受体 4

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2017D01C391)

作者简介:830011 乌鲁木齐,新疆医科大学附属肿瘤医院肿瘤心脏病科(姜芸);830000 乌鲁木齐,新疆军区总医院保健一区(郭红)

(Toll-like receptor 4, TLR4)是一类与炎症反应密切相关的细胞膜受体,当其LPS等配体结合后可激活下游NF-κB信号通路,进而促进炎症因子的释放,TAK242作为TLR4抑制剂,能够抑制TLR4的表达^[6]。本研究通过使用TAK242抑制TLR4观察对脂多糖(LPS)诱导的小鼠急性呼吸窘迫综合征的影响及机制,旨在为ARDS临床治疗和研究提供帮助。

材料与方 法

1. 材料:6周龄雄性BALB/c小鼠45只,体质量20~25g,购自新疆医科大学动物实验中心,饲养及实验取材过程中严格遵守实验动物伦理保护等相关规定;LPS购自美国Sigma公司;TAK242购自美国Med-ChemExpress公司;TLR4、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-6(IL-6)、NF-κB一抗购自沈阳万类生物科技有限公司;辣根酶标记山羊抗小鼠IgG购自福麦斯生物技术有限公司;TNF-α、IL-6 ELISA试剂盒购自乌鲁木齐熬锐东源生物科技有限公司;血气分析仪ABL90购自丹麦Radiometer公司。

2. 动物分组及造模:45只BALB/c小鼠随机分为3组,分别为对照组、模型组(ARDS组)和TLR4抑制剂TAK242组(TAK242组)。ARDS组和TAK242组小鼠分别尾静脉注射5ng/g的LPS诱导小鼠产生脓毒血症,制备脓毒血症性急性肺损伤模型,对照组小鼠注射等体积的0.9%氯化钠注射液,TAK242组小鼠造模的同时给予5ng/g TAK242。

3. 行动脉血气分析:给药治疗结束后,各组小鼠麻醉成功后,暴露腹主动脉,用经肝素润洗的1ml一次性注射器抽出动脉血约0.3ml,使用血气分析仪行血气分析,比较PaO₂/FiO₂。

4. ELISA检测血清炎症因子TNF-α、IL-6水平:给药结束后,各组小鼠麻醉后,开胸取腹主动脉300μl全血,室温静置4h后,3500r/min、4℃离心15min,分离上层血清,按照ELISA试剂盒检测方法分别测定血清TNF-α、IL-6含量。

5. HE染色:实验完成后,各组小鼠解剖取肺组织于组织固定液中固定,制作肺组织石蜡切片进行染色,于光学显微镜下观察,并拍照记录。

6. 免疫组化:实验结束后,各组小鼠解剖取肺组织于组织固定液中固定24h,石蜡包埋后制备石蜡切片,然后置于二甲苯中脱蜡,依次经乙醇和蒸馏水中复水;使用柠檬酸缓冲液进行抗原修复,经BSA封闭后一抗孵育过夜,清洗后二抗孵育,然后切片用苏木精复染,使用中性树脂封片后于显微镜下观察。应用

IPP图像分析软件测定小鼠肺组织各蛋白表达的平均吸光密度值来进行分析。

7. Western blot法检测TLR4、NF-κB蛋白表达:取各组小鼠肺组织50mg,加入100ml RIPA蛋白裂解液,使用匀浆机于冰上匀浆,匀浆液12000r/min离心15min,取上清即为组织总蛋白;BCA蛋白定量后样品煮沸变性;然后进行SDS-PAGE凝胶电泳,转膜,用5%的脱脂牛奶对PVDF膜封闭2h,然后以1:1000比例稀释后的TLR4、NF-κB一抗4℃孵育过夜, TBST洗膜后二抗室温孵育1h,再用TBST洗膜后按照ECL试剂盒说明书配置发光液,并将PVDF膜浸入发光液中反应30s,曝光并拍照,用Image J软件对曝光结果进行定量分析。

8. 统计学方法:采用SPSS 19.0统计学软件对数据进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用t检验,不同组间比较采用单因素方差分析,所有实验均采用3次重复实验取均值后进行数据分析,以P<0.05为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组小鼠行血气分析检测结果:与对照组比较,ARDS组小鼠PaO₂/FiO₂值显著降低(452.00 ± 9.54 vs 263.30 ± 21.63, P<0.05);与ARDS组比较, TAK242组小鼠PaO₂/FiO₂值显著增加(263.30 ± 21.63 vs 308.12 ± 13.53, P<0.05)。

2. 血清炎症因子TNF-α、IL-6水平:与对照组比较,ARDS组小鼠血清TNF-α、IL-6水平显著升高(P<0.05);与ARDS组比较,TAK242组小鼠血清TNF-α、IL-6水平显著降低(P<0.05,表1)。

表 1 各组小鼠血清 TNF-α、IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	TNF-α	IL-6
对照组	180.6 ± 9.97	159.9 ± 9.06
ARDS组	247.5 ± 19.89*	214.0 ± 9.29*
TAK242组	200.1 ± 11.63*#	189.6 ± 8.30*#

与对照组比较,*P<0.05;与ARDS组比较,#P<0.05

3. 小鼠肺组织病变:HE染色检测结果显示,对照组小鼠肺组织肺泡结构完整,组织细胞排列整齐,没有出现出血以及炎症细胞的浸润,没有病理损伤;ARDS组小鼠肺组织出现弥散性肺损伤,肺泡壁损伤严重,肺间质严重增宽,出现红细胞露出,炎症细胞浸润明显,肺组织损伤严重,说明ARDS造模成功;TAK242组小鼠肺组织损伤程度较弱,肺泡结构相对完整,炎症浸润较ARDS组显著减少,提示TAK242

能够缓解 ARDS 小鼠肺组织损伤(图 1)。

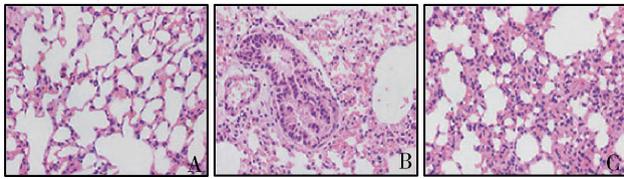


图 1 各组小鼠肺组织 HE 检测结果(×200)

A. 对照组; B. ARDS 组; C. TAK242 组

4. 免疫组化检测各组小鼠肺组织 TNF- α 、IL-6 表达: ARDS 组小鼠肺组织 TNF- α 、IL-6 表达高于对照组, 而 TAK242 组小鼠肺组织 TNF- α 、IL-6 表达低于 ARDS 组(图 2, 表 2)。

5. Western blot 法检测各组小鼠肺组织 TLR4、NF- κ B 蛋白表达: 与对照组比较, ARDS 组小鼠肺组织 TLR4、NF- κ B 表达水平均显著升高($P < 0.05$)。与 ARDS 组比较, TAK242 治疗组小鼠 TLR4、NF- κ B 表达水平均显著下调($P < 0.05$, 图 3)。

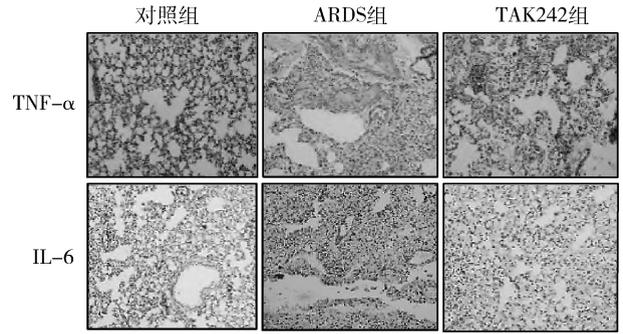


图 2 免疫组化检测各组小鼠 TNF- α 、IL-6 表达结果(×200)

表 2 各组小鼠肺组织 TNF- α 、IL-6 表达的平均光密度统计($\bar{x} \pm s$)

组别	TNG- α	IL-6
对照组	0.29 \pm 0.03	0.30 \pm 0.01
ARDS 组	0.47 \pm 0.02 *	0.65 \pm 0.02 *
TAK242 组	0.33 \pm 0.01 **	0.49 \pm 0.01 **

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 ARDS 组比较, # $P < 0.05$

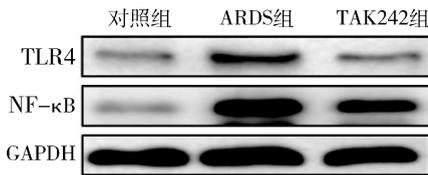
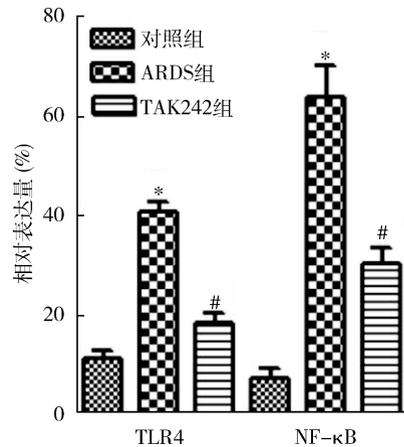


图 3 各组小鼠肺组织 TLR4、NF- κ B 蛋白表达水平

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 ARDS 组比较, # $P < 0.05$



讨 论

研究表明, ARDS 的主要病理特征为肺组织中蛋白质类液体累积, 炎症反应暴发浸润肺部, 威胁患者的生命^[7]。现阶段临床常采用机械通气治疗以及非机械治疗, 但治疗效果并不理想。因此, 控制炎症反应、探究新型有效的抗炎治疗药物对于 ARDS 的临床治疗亦至关重要^[8-10]。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)是参与非特异性免疫(天然免疫)的一类重要蛋白质分子, 也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁。TLR 可以识别来源于微生物的具有保守结构的分子并激活机体产生免疫细胞应答, 对病原微

生物感染早期的特异性识别及介导炎症反应具有十分重要的意义^[11,12]。

另一方面, LPS 是由免疫活性宿主中的细菌所产生的, 可以在体内外引起强烈的炎症级联反应, 并且在体内可诱发感染, 进而引起肺组织严重的炎症反应^[13]。TLR4 可以通过识别宿主坏死细胞释放的热休克蛋白(heat-shock proteins, HSP)等促进内源性酶的级联活化反应, 激活下游 NF- κ B 信号通路, 促进 TNF- α 、IL-1 β 、IL-2、IL-6、趋化因子、黏附分子、集落刺激因子等细胞因子的释放, 介导体内炎症暴发^[14]。本研究通过 LPS 诱导了小鼠急性呼吸窘迫

综合征模型,旨在探究 TAK242 作为 TLR4 的选择性的信号转导抑制剂对 ARDS 小鼠的治疗作用及机制。结果表明, TAK242 能够显著增加 ARDS 小鼠氧合指数,改善 ARDS 小鼠血氧水平,并且降低血清炎症因子 TNF- α 、IL-6 水平,缓解体内炎症反应。病理切片检测结果显示, TAK242 能够显著改善 ARDS 小鼠肺组织损伤,以及肺组织 TNF- α 、IL-6 表达水平,并且抑制 ARDS 小鼠肺组织 TLR4 及 NF- κ B 表达,说明 TAK242 抑制 TLR4 表达而抑制 NF- κ B 信号通路进而缓解小鼠 ARDS。

综上所述, TAK242 能够通过阻断 TLR4 抑制小鼠 ARDS 炎症因子表达,进而抑制下游 NF- κ B 信号通路及炎症反应,发挥对 ARDS 小鼠的治疗作用。

参考文献

- 1 Price LC, Wort SJ. Pulmonary hypertension in ARDS: inflammation matters[J]. Thorax, 2017, 72(5): 396-397
- 2 陈志琴, 李继鹏. 血液灌流联合高容量血液滤过对急性呼吸窘迫综合征患者动脉血气分析指标及血清炎症介质的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2017, 18(6): 524-526
- 3 Silversides JA, Major E, Ferguson AJ, et al. Conservative fluid management or deresuscitation for patients with sepsis or acute respiratory distress syndrome following the resuscitation phase of critical illness: a systematic review and Meta-analysis [J]. Intensive Care Med, 2017, 43(2): 155-170
- 4 郑海崇, 曾勉. 核因子 κ B 与 NO 在脓毒症 ARDS 的关系及 Ghrelin 干预机制的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2017, 37(10): 784-787
- 14 Yang YP, Xu XH, Bo XW, et al. Comparison of Virtual Touch Tissue Imaging & Quantification (VTIQ) and Virtual Touch Tissue Quantification (VTQ) for diagnosis of thyroid nodules[J]. Clin Hemorheol Microcircul, 2017, 65(2): 137-149
- 15 Chen YP, Han T, Wu R, et al. Comparison of virtual touch tissue quantification and virtual touch tissue imaging quantification for diagnosis of solid breast tumors of different sizes[J]. Clin Hemorheol Microcircul, 2016, 64(2): 235-244
- 16 Matsuzuka T, Suzuki M, Saijo S, et al. Stiffness of salivary gland and tumor measured by new ultrasonic techniques: virtual touch quantification and IQ[J]. Auris Nasus Larynx, 2015, 42(2): 128-133

- 5 杜晓华, 代泽兰, 杨为民. 炎症标记物在 ALI/ARDS 中的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2018, 38(11): 860-865
- 6 Jiang W, Luo F, Lu Q, et al. The protective effect of Trillin LPS-induced acute lung injury by the regulations of inflammation and oxidative state[J]. Chemo-Biol Interact, 2016, 243: 127-134
- 7 王玉红, 张明磊, 毛琪, 等. 肺炎支原体感染对 BALB/c 小鼠 TLR4/NF- κ B 信号通路表达的影响[J]. 解剖科学进展, 2017, 3: 242-244
- 8 Amin Z, Rahmawati FN. Recent insight into potential acute respiratory distress syndrome[J]. Saudi Med J, 2017, 38(4): 344-349
- 9 McCormack V, Tolhurst-Cleaver S. Acute respiratory distress syndrome[J]. Eur Respirat Rev, 2017, 17(5): 161-165
- 10 Zhao W, An H, Zhou J, et al. Hyperthermia differentially regulates TLR4 and TLR2-mediated innate immune response[J]. Chin J Clin Oncol Rehab, 2016, 108(2): 137-142
- 11 Ng WL, Marinov GK, Liau ES, et al. Inducible RasGEF1B circular RNA is a positive regulator of ICAM-1 in the TLR4/LPS pathway [J]. Rna Biol, 2016, 13(9): 861-871
- 12 Behnia S Lashkari, Dilly O C Anumba. Estradiol alters the immune-responsiveness of cervical epithelial cells stimulated with ligands of Toll-like receptors 2 and 4 [J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173646
- 13 Lee KY. Pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and early immune-modulator therapy [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2): 388-41
- 14 Wall AA, Luo L, Hung Y, et al. Rab8a recruited PI3K γ regulates signaling and cytokine outputs from endosomal Toll-like receptors [J]. J Biol Chem, 2017, 292(11): 4411-4422

(收稿日期: 2020-06-26)

(修回日期: 2020-08-02)

(接第 131 页)

- 17 Li SX, Zhang Y, Sun M, et al. Ultrasonic diagnosis of biliary atresia: a retrospective analysis of 20 patients [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(22): 3579-3582
- 18 Ikeda S, Sera Y, Ohshiro H, et al. Gallbladder contraction in biliary atresia: a pitfall of ultrasound diagnosis[J]. Pediatr Radiol, 1998, 28(6): 451-453
- 19 Visrutaratna P, Wongsawasdi L, Lerttumnongtum P, et al. Triangular cord sign and ultrasound features of the gall bladder in infants with biliary atresia[J]. Australasian Radiol, 2003, 47(3): 252-256

(收稿日期: 2019-12-11)

(修回日期: 2020-09-15)