

论著 · 实验研究

胆红素对新生儿脐血单核细胞表面分子 Toll 样受体 4 的影响

刘会领 陈昌辉 陈敏 吴青 李茂军

(四川省医学科学院/四川省人民医院儿科,四川 成都 610072)

[摘要] 目的 探讨不同浓度胆红素对新生儿脐血单核细胞(CBMC)表面分子 Toll 样受体 4(TLR4)的影响。方法 采用纤维连接蛋白结合法分离得到 CBMC,将其加入含不同浓度胆红素(0~307.8 μmol/L)的牛血清白蛋白溶液中孵育 1 h,再加入脂多糖(LPS,1 μg/mL)刺激 24 h。收集 CBMC,采用间接免疫荧光技术检测细胞表面分子 TLR4 的表达。结果 胆红素浓度为 102.6、153.9、220.6 和 307.8 μmol/L 时,CBMC 表面分子 TLR4 的表达率均明显降低,随着胆红素浓度的升高,这种降低趋势越明显。结论 胆红素抑制 CBMC 表面分子 TLR4 的表达,随着胆红素浓度的升高,抑制作用越明显。 [中国当代儿科杂志,2011,13(2):153-156]

[关键词] 胆红素; Toll 样受体 4; 脐血; 单核细胞
[中图分类号] R722.1 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2011)02-0153-04

Effect of bilirubin on expression of toll-like receptor 4 in cord blood monocytes

LIU Hui-Ling, CHEN Chang-Hui, CHEN Min, WU Qing, LI Mao-Jun. Department of Pediatrics, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China (Chen C-H, Email: chen966888@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the effect of different concentrations of bilirubin on expression of toll-like receptor 4 (TLR4) in cord blood monocytes (CBMC). **Methods** Under the sterile condition, umbilical vein blood samples were obtained from normal full-term newborns, and the monocytes were *in vitro* separated by the method of gelatin/plasma coated flasks. The monocytes were preincubated with various concentrations (0-307.8 μmol/L) of bilirubin dissolved in bovine albumin solution for 1 hr. Bilirubin-treated CBMC were further cultured with LPS (1 μg/mL) to induce cellular activation for 24 hrs, and then the CBMC were collected. The expression of TLR4 in monocytes was measured by indirect immunofluorescence method. **Results** Bilirubin at the concentrations of 102.6, 153.9, 220.6 and 307.8 μmol/L inhibited the expression of TLR4 of CBMC. The inhibition effect increased with the increasing concentration of bilirubin. **Conclusions** Bilirubin can inhibit the TLR4 expression of CBMC in a dose-dependent manner.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (2):153-156]

Key words: Bilirubin; Toll-like receptor 4; Cord blood; Monocyte

研究发现,血清胆红素对新生儿免疫系统的许多方面都有影响,如抑制 T、B 淋巴细胞、红细胞的免疫功能和人粒细胞的杀菌能力,影响免疫球蛋白及补体的生成等^[1-2]。Toll 样受体(TLRs)是机体重要的天然免疫受体分子之一,主要表达于单核巨噬细胞,可识别革兰阴性细菌细胞壁成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),启动信号传导,介导天然免疫,并最终激活获得性免疫,在机体中发挥免疫防御

作用,还参与细胞的存活及增殖^[3]。本课题组前期研究结果显示,高浓度胆红素可破坏单核细胞形态结构^[4],抑制单核细胞的吞噬功能^[5],抑制细胞因子分泌^[6]。由于 TLRs 在单核细胞免疫功能中具有重要地位,本研究拟通过观察经胆红素孵育后脐血单核细胞(cord blood monocytes, CBMC)表面分子 TLR4 的表达,探讨胆红素对单核细胞免疫功能的影响。

[收稿日期]2010-02-21;[修回日期]2010-08-11
[基金项目]四川省科技厅科研基金资助项目(05JY029-054-2;07SG004-005)。
[作者简介]刘会领,女,硕士,住院医师。现工作单位:河北省沧州市人民医院新生儿科,邮编:061000。
[通信作者]陈昌辉,主任医师。

1 材料与方法

1.1 标本采集

选择在成都市妇产科医院剖宫产分娩、胎龄37~42周、出生体重2500~4000 g、Apgar评分正常的健康新生儿10例作为研究对象,并取得家长知情同意,其母孕期无特殊疾病和血液制品及免疫调节剂应用史。无菌采集新生儿脐血80~150 mL,在4 h内分离细胞。

1.2 主要实验试剂

淋巴细胞分离液由天津灏洋生物制品科技有限公司提供,RPMI-1640基础培养基为Gibco公司产品,LPS为Solarbio公司产品,胆红素为Fluka公司产品,白蛋白和明胶为Sigma公司产品,FITC标记的鼠抗人CD14单克隆抗体为Caltag公司产品,同型阴性对照FITC标记的IgG2b为Biolegend公司产品,FITC标记的羊抗鼠多克隆抗体为北京中杉公司产品,鼠抗人TLR4单克隆抗体为Biolegend公司产品。

1.3 脐血单核细胞的分离与鉴定

先用密度梯度离心法分离得到脐血单个核细胞(cord blood mononuclear cell, CB-MNC),用含20%小牛血清的RPMI-1640完全培养基把单个核细胞配制成浓度为 $(2 \sim 5) \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液。再参照Freundlich等^[7]的方法,将细胞悬液接种于2%明胶和自体血浆包被过的塑料培养瓶中孵育1 h,贴壁细胞即为CBMC。洗去未贴壁细胞,加入5 mM的EDTA溶液消化得到贴壁细胞。台盼兰检测其活性,流式细胞仪分析其纯度。用RPMI-1640完全培养基调整活细胞数为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 备用。

1.4 胆红素和脂多糖孵育单核细胞

将分离得到的CBMC接种于24孔塑料培养板中,每例分为8个组:空白对照组、LPS对照组、102.6 $\mu\text{mol/L}$ (6 mg/dL)胆红素对照组及5个不同浓度的胆红素干预组,即42.8 $\mu\text{mol/L}$ (2.5 mg/dL)胆红素+LPS、102.6 $\mu\text{mol/L}$ (6 mg/dL)胆红素+LPS、153.9 $\mu\text{mol/L}$ (9 mg/dL)胆红素+LPS、220.6 $\mu\text{mol/L}$ (12.9 mg/dL)胆红素+LPS和307.8 $\mu\text{mol/L}$ (18 mg/dL)胆红素+LPS。各组细胞先经不同浓度胆红素(反应体系为1 mL,内含有牛血清白蛋白30 g/L)避光孵育1 h,弃掉含胆红素的孵育液,加入LPS溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),其中空白对照组和胆红素对照组加入完全培养基2 mL,其余组均加入1.98 mL完全培养基和0.02 mL LPS溶液(反

应体系为2 mL,LPS终浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[8]),混匀。在37℃、5% CO_2 条件下培养24 h。

1.5 间接免疫荧光法检测细胞表面分子TLR4的表达

收集培养后的CBMC用PBS溶液洗涤2次(1000 rpm $\times$ 5 min),计数后调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。将细胞均匀涂于防脱载玻片上,干燥后加入4%多聚甲醛溶液,4℃下固定细胞25 min,用新鲜配置的PBS溶液漂洗(5 min $\times$ 3次),吸掉多余的水分。加入3%的牛血清白蛋白,37℃下湿盒中封闭30 min,PBS溶液漂洗后加入50 μL 一抗溶液,4℃下湿盒中孵育过夜,PBS溶液漂洗。再加入50 μL 二抗溶液,37℃下湿盒中孵育2 h,PBS溶液漂洗后封片,荧光显微镜照相。阴性对照只加PBS溶液和/或二抗。

1.6 结果判定

高倍镜下观察,阳性细胞呈绿色或黄绿色。随机选择5~10个高倍视野并计数200个细胞,记录TLR4阳性细胞数,计算TLR4阳性细胞率=(阳性细胞数/200) $\times$ 100%,每张标本重复3遍,计算平均值。

1.7 统计学分析

应用PEMS 3.0 for Windows软件进行分析。数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,经方差齐性检验,各组方差齐,采用 q' 检验;各组方差不齐,则采用秩和检验。两变量间相关分析采用Spearman法检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 单核细胞的鉴定及活性检测

流式细胞仪分析结果显示,CD14阳性细胞率为 $(94.0 \pm 2.5)\%$;0.4%台盼兰检测细胞活性为 $(93.9 \pm 1.8)\%$,表明经纤维连接蛋白结合法分离得到的单核细胞纯度及活性均可满足实验需要。

2.2 CBMB表面分子TLR4表达率的变化

LPS对照组与空白对照组TLR4表达率的差异无统计学意义,表明可排除LPS对实验结果的干扰;其余各组TLR4表达率均明显低于空白对照组($P < 0.01$)和LPS对照组($P < 0.05$)。与胆红素对照组比较,LPS+胆红素42.8 $\mu\text{mol/L}$ 和102.6 $\mu\text{mol/L}$ 组TLR4表达率升高($P < 0.05$),其余各胆红素干预组的TLR4表达率降低($P < 0.05$)。5个胆红素干预组的两两比较结果显示,胆红素可抑制细胞表面分子TLR4的表达,当胆红素浓度为102.6 $\mu\text{mol/L}$ 时这种

抑制已经发生,且随着胆红素浓度的升高,抑制作用越明显。

表1 不同浓度胆红素及 LPS 作用后 CBMC 表面分子 TLR4 表达率的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	TLR4 表达率(%)
空白对照	10	58.7 ± 12.5
LPS 对照	10	63.9 ± 14.9
胆红素对照	10	32.8 ± 8.6 ^{a,b}
LPS + 胆红素 42.8 μmol/L	10	49.7 ± 2.2 ^{a,b,c}
LPS + 胆红素 102.6 μmol/L	10	37.7 ± 8.6 ^{a,b,c}
LPS + 胆红素 153.9 μmol/L	10	28.0 ± 10.9 ^{a,b,c,d}
LPS + 胆红素 220.6 μmol/L	10	17.0 ± 5.7 ^{a,b,c,d,e}
LPS + 胆红素 307.8 μmol/L	10	10.9 ± 3.6 ^{a,b,c,d,e,f}

a: 与空白对照组比较, $P < 0.01$; b: 与 LPS 对照组比较, $P < 0.05$; c: 与胆红素对照组比较, $P < 0.05$; d: 与 LPS + 胆红素 42.8 μmol/L 组比较, $P < 0.05$; e: 与 LPS + 胆红素 102.6 μmol/L 组比较, $P < 0.05$; f: 与 LPS + 胆红素 153.9 μmol/L 组比较, $P < 0.05$

2.3 CBMC 表面分子 TLR4 表达率与胆红素浓度的等级相关分析

TLR4 表达率与胆红素浓度之间呈负相关 ($r = -0.907, P < 0.01$)。即随胆红素浓度的升高,细胞表面分子 TLR4 的表达率随之降低。

3 讨论

TLRs 是新近发现的一类天然免疫受体,其分布广泛,在识别和抵御各种病原微生物及其产物中发挥重要作用^[9]。由于其在免疫中的重要地位,引起了人们的广泛关注与深入研究。现已发现的人类 TLR 家族至少包括 11 种,即 TLR1 ~ 11。TLR4 主要表达于单核巨噬细胞,通过识别细菌 LPS 及一些具有保守类脂 A 结构的衍生物,介导天然免疫和炎症反应。研究显示,新生袋鼠早期 CD14/TLR 的表达可保护其抵抗外界病原微生物,是其能够存活的原因之一^[10]。同成人相比,新生儿/早产儿免疫功能低下易并发革兰阴性细菌感染,与单核细胞 TLR4 表达不足、细胞因子分泌减少有一定关系^[11-12]。王琳等^[13]认为,TLR4/2 水平低下,可能是新生儿天然免疫能力低下,容易患败血症等严重感染性疾病的重要原因之一。Marodi^[14]报道,大肠杆菌易引发新生儿暴发性感染,与 TLR4 介导的巨噬细胞免疫反应受损有关。Wynn 等^[15]发现,新生鼠天然免疫功能缺陷易发生脓毒症,而选择性 TLR 激活剂可恢复其免疫功能。母乳可减少肠道感染及慢性病的发生,其对新生儿的免疫保护作用亦与 TLR4 介导的

免疫应答有一定关系^[16]。

黄疸是新生儿期常见的临床现象。虽然大多数黄疸患儿呈良性经过,但胆红素浓度过高则表现出明显的细胞毒性,早产儿更易发生高胆红素血症及胆红素脑病^[17]。胆红素不仅有神经毒性,对免疫系统亦有明显的抑制作用。早在 20 世纪 70 ~ 80 年代,国外已有研究证实,胆红素抑制 T、B 淋巴细胞的免疫功能、抑制人粒细胞的杀菌能力^[18]、抑制鼠粒细胞、单核细胞及吞噬细胞的吞噬活性,还影响补体的生成^[19]。最近的研究显示,胆红素抑制单核细胞表面分子 CD14、CD86 和 HLA-DR 的表达,抑制其吞噬功能^[5],导致细胞凋亡、细胞因子分泌减少^[6],对单核细胞有明显的毒性作用。

本实验结果显示,胆红素对 CBMC 表面分子 TLR4 的表达有明显抑制作用。正常情况下,CBMC 表达一定量的 TLR4 分子,经不同浓度胆红素作用后,细胞表面分子 TLR4 的表达显著降低。胆红素的这种抑制作用在 102.6 μmol/L 时已经发生,随着胆红素浓度的升高,抑制作用越明显。LPS 对照组与空白对照组 TLR4 表达率的差异无统计学意义,表明 LPS 单独作用对单核细胞 TLR4 的表达无明显影响。然而,102.6 μmol/L 胆红素对照组与 102.6 μmol/L 胆红素 + LPS 组之间 TLR4 表达率的差异有统计学意义,是因为 102.6 μmol/L 胆红素对细胞已有毒性作用,表现为细胞形态及超微结构轻度受损^[4],经此浓度胆红素作用后再加入 LPS,TLR4 表达率有所增加,说明 LPS 对功能部分受损的单核细胞有一定的激活作用,但其激活作用仍弱于胆红素的抑制作用。可以看出,胆红素对单核细胞有明显的抑制作用,浓度越高抑制作用越强;胆红素对 TLR4 的显著抑制则可能影响黄疸患儿的免疫功能,导致其免疫力低下易并发感染。提示临床对严重高胆红素血症患儿应早期进行干预,早产儿更易发生胆红素毒性损伤,治疗更应积极。

胆红素的毒性源于其结构及理化性质。胆红素抑制 TLR4 表达的可能机制是:①胆红素损伤细胞膜,导致 TLR4 受体结构破坏、数量减少和功能丧失。未结合胆红素具有亲脂性和脂活性,能以阴离子作用的形式在细胞膜外叶沉积,导致细胞的质膜脆性增加,继而磷脂从膜中失去,脂质双层崩解,使细胞膜结构发生破坏^[20]。②胆红素破坏线粒体,抑制细胞氧化磷酸化过程,干扰能量代谢,抑制氨基酸合成蛋白质。③胆红素破坏细胞核,影响 TLR4 的转录与合成。电镜下,胆红素孵育的单核细胞变为黄色锯齿状,细胞内细胞器肿胀,形成空泡,引起核

浓缩、核碎裂、核溶解等细胞坏死性改变^[4]。④胆红素导致细胞凋亡和坏死^[21]。据报道,幼稚鼠皮层神经元与非结合胆红素孵育后细胞凋亡坏死增加^[22]。

综上所述,胆红素对新生儿 CBMC 免疫功能有明显的抑制作用,其机制复杂,有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] Liu Y, Li P, Lu J, Xiong W, Oger J, Tetzlaff W, et al. Bilirubin possesses powerful immuno-modulatory activity and suppresses experimental auto-immune encephalomyelitis[J]. J Immunol, 2008, 181(3): 1887-1897.

[2] 林丽星,余唯琪,张晓燕,李玉梅,陶仲宾. 高胆红素血症新生儿红细胞免疫功能的变化及其影响因素[J]. 实用儿科临床杂志,2007,22(6):414-415.

[3] 张宇,孙瑞利,胡锦跃. Toll 样受体 4 信号转导研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志,2009,29(1):32-36.

[4] 裴雪梅,陈昌辉,牛会琴,吴青,李茂军. 不同浓度胆红素对新生儿脐血单核细胞形态结构的影响[J]. 医学研究生学报,2009,22(5):496-499.

[5] 牛会琴,陈昌辉,裴雪梅,吴青,李茂军. 胆红素对新生儿脐血单核细胞吞噬功能的影响[J]. 中国新生儿科杂志,2009,24(2):115-117.

[6] 裴雪梅,陈昌辉,牛会琴,吴青,李茂军. 不同浓度胆红素对新生儿脐血单核细胞白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 分泌的影响[J]. 实用儿科临床杂志,2009,24(2):102-103.

[7] Freundlich B, Avdalovic N. Use of gelatin/plasma coated flasks for isolating human peripheral blood monocytes [J]. Immunol Methods, 1983, 62(1):31-37.

[8] 江志雄,金益人,洪文澜,尚世强,孙眉月. 新生儿脐血单核细胞在脂多糖刺激下分泌 IL-6 及出现 IL-6mRNA 表达的实验研究[J]. 中国免疫学杂志,2002,18:862-865.

[9] 何凤莲,张妍蓓. Toll 样受体的研究进展[J]. 国际呼吸杂志,2006,26(9):655-659.

[10] Daly KA, Lefevre C, Nicholas K, Deane E, Williamson P. CD14 and TLR4 are expressed early in tammar (Macropus eugenii) neonate development[J]. J Exp Biol, 2008, 211(8): 1344-1351.

[11] Forster Waldl E, Sadeghi K, Tamandl D, Gerhold B, Hallwirth U, Rohmeister K, et al. Monocyte toll-like receptor 4 expression and LPS-induced cytokine production increase during gestational aging[J]. Pediatr Res, 2005, 58(1): 121-124.

[12] Yan SR, Qing G, Byers DM, Stadnyk AW, Alhertani W, Bortolussi R, et al. Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide[J]. Infect Immun, 2004, 72(3): 1223-1229.

[13] 王琳,徐建波,田元,刘亚兰,吴河水. 新生儿脐血 Toll 样受体变化及其意义[J]. 中华儿科杂志,2007,45(5):365-368.

[14] Marodi L. Neonatal innate immunity to infectious agents[J]. Infect Immun, 2006, 74(4): 1999-2006.

[15] Wynn JL, Scumpia PO, Winfield RD, Delano MJ, Kelly-Scumpia K, Barker T, et al. Defective innate immunity predisposes murine neonates to poor sepsis outcome but is reversed by TLR agonists [J]. Blood, 2008, 112(5): 1750-1758.

[16] LeBouder E, Rey-Nores JE, Raby AC, Affolter M, Vidal K, Thornton CA, et al. Modulation of neonatal microbial recognition: TLR-mediated innate immune responses are specifically and differentially modulated by human milk [J]. J Immunol, 2006, 176(6): 3742-3752.

[17] Watchko JF. Hyperbilirubinemia and bilirubin toxicity in the late preterm infant[J]. Clin Perinatol, 2006, 33(4): 839-852.

[18] Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance [J]. Science, 1987, 235(4792): 1043-1046.

[19] Miler I, Sima P, Vetvicka V, Indrova M, Slavikova M. The potential immunosuppressive effect of bilirubin[J]. Allerg Immunol (Leipz), 1988, 34(3): 177-184.

[20] Brito MA, Silva RF, Brites D. Bilirubin toxicity to human erythrocytes: a review[J]. Clin Chim Acta, 2006, 374(1-2): 46-56.

[21] Ostrow JD, Tiribelli C. Bilirubin, a curse and a boon[J]. Gut, 2003, 52(12): 1668-1670.

[22] Falcao AS, Silva RF, Pancadas S, Fernandes A, Brito MA, Brites D. Apoptosis and impairment of neurite network by short exposure of immature rat cortical neurons to unconjugated bilirubin increase with cell differentiation and are additionally enhanced by an inflammatory stimulus[J]. J Neurosci Res, 2007, 85(6): 1229-1239.

(本文编辑:王庆红)