

论著·实验研究

## 肠三叶因子对内毒素血症幼鼠肠组织 Toll样受体2和4表达的影响

荆科<sup>1</sup> 孙梅<sup>2</sup>

(1. 中国医科大学附属第四医院儿科, 辽宁 沈阳 110032;

2. 中国医科大学盛京医院儿科, 辽宁 沈阳 110004)

**【摘要】目的** 探讨肠三叶因子对内毒素血症幼鼠肠组织 Toll 样受体(TLR)2、4 表达的调节及对肠组织损伤的影响。**方法** 24 只 10 日龄 Wistar 幼鼠随机分为正常对照组(NS 组,  $n=8$ , 生理盐水 1 mL/kg 腹腔注射); 内毒素血症组(LPS 组,  $n=8$ , LPS 5 mg/kg 腹腔注射); 肠三叶因子组(ITF 组,  $n=8$ , 重组肠三叶因子 0.1 mL/只 + LPS 5 mg/kg 腹腔注射)。于腹腔注射后 3 h 处死, 留取远端回肠组织观察肠组织病理改变, RT-PCR 检测肠组织 TLR2、4 mRNA 的表达。**结果** 光镜下 NS 组肠组织结构正常, ITF 组和 LPS 组均可见间质和上皮细胞水肿, ITF 组较 LPS 组病变明显减轻。ITF 组肠组织 TLR2 mRNA 表达较 NS 组、LPS 组明显增高( $P<0.01$ ); 而 TLR4 mRNA 表达较 NS 组和 LPS 组明显下降( $P<0.01$ )。**结论** 肠三叶因子可减轻内毒素血症幼鼠肠组织损伤, 这种保护作用可能与其下调 TLR4 mRNA 的表达相关。

[中国当代儿科杂志, 2011, 13(12):985-988]

**【关键词】** 肠三叶因子; TLR; 肠组织; 大鼠

[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2011)12-0985-04

### Effects of intestinal trefoil factor on Toll-like receptors 2 and 4 expression in intestinal tissue in young rats with endotoxemia

JING Ke, SUN Mei. Department of Pediatrics, Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, China (Email: jingke3185@sina.com)

**Abstract: Objective** To study the effects of intestinal trefoil factor (ITF) on Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 expression in intestinal tissue and on intestinal injury in young rats with endotoxemia. **Methods** A total of 24 10-day-old Wistar rat pups were equally randomly divided into three groups: a control group, intraperitoneally injected with normal saline 1 mL/kg; an endotoxemia group, intraperitoneally injected with lipopolysaccharide (LPS) 5 mg/kg and an ITF group, intraperitoneally injected with rITF 0.1 mL/each plus LPS 5 mg/kg. Rats were sacrificed 3 h after injection. A segment of distal ileum was dissected for pathologic examinations under an optical microscope (hematoxylin-eosin staining). The mRNA expressions of TLR2 and TLR4 were detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The structure of the small intestine remained normal in the control group. Edema of interstitial substance and epithelium were observed in both LPS and ITF groups, whereas such changes were significantly lower in the ITF group than in the LPS group. The ITF group had significantly higher TLR2 mRNA expression than the NS and LPS groups ( $P<0.01$ ), whereas the mRNA expression of TLR4 in the ITF group was significantly lower than in the NS and LPS groups (both  $P<0.01$ ). **Conclusions** ITF can alleviate intestinal injury in young rats with endotoxemia, which may be related to the down-regulation of TLR4 mRNA expression.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(12):985-988]

**Key words:** Intestinal trefoil factor; Toll-like receptor; Intestinal tissue; Rats

肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)是三叶肽家族成员之一,由肠黏膜上皮杯状细胞分泌,广泛存在于胃肠道,具有特征性的三叶结构,被认为是具有抗凋亡特性的内源性肽类物质,在肠道的自我保护和损伤后修复中占有重要地位<sup>[1-2]</sup>。Toll 样受体

(Toll-like receptor, TLR)是一种跨膜蛋白,能识别病原微生物或细胞壁成分,通过信号转导激发天然免疫反应,引起细胞因子,炎症介质的释放,导致组织损伤<sup>[3-6]</sup>。外源性 ITF 对 TLR2、4 的表达是否有抑制作用,尚无报道。本研究拟应用外源性基因重组

[收稿日期]2011-07-24; [修回日期]2011-09-26

[作者简介]荆科,男,博士,副主任医师。

ITF(rITF)作用于内毒素血症幼鼠,观察ITF对TLR表达的调节作用,及这种调节作用是否与ITF对肠损伤的保护作用相关。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

清洁级Wistar健康10日龄幼鼠,雌雄不限,体重15~25g,由中国医科大学医学动物实验中心提供。许可证号:SCX K(辽)2003-0009。

### 1.2 实验试剂

大肠杆菌内毒素(LPS,Escherichia coli O<sub>55</sub>:B<sub>5</sub>)购于Sigma公司(美国),用生理盐水配制成5mg/mL。Trizol总RNA提取试剂购自美国Promega公司。RT-PCR试剂盒、反转录和PCR扩增所需要的酶及其他试剂购于大连宝生物工程公司。PCR引物根据Medline数据库自行设计,由上海英骏生物公司合成。rITF由北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室提供,配制浓度为5mg/mL。

### 1.3 方法

1.3.1 动物分组与标本制备 以LPS 5mg/kg腹腔注射的方法制备Wistar幼鼠内毒素血症的模型<sup>[7]</sup>。将24只幼鼠随机分为对照组(NS组,腹腔注射生理盐水1mL/kg)、内毒素血症组(LPS组,腹腔注射LPS 5mg/kg)、肠三叶因子组(ITF组,腹腔注射LPS 5mg/kg+rITF 0.1mL/只),每组8只<sup>[8]</sup>。于腹腔注射后3h处死,留取距回盲端0.5~1cm左右回肠组织,于液氮中速冻,并转-70℃保存,另取肠组织行甲醛固定、石蜡包埋、5μm组织切片、苏木精-伊红(HE)染色。

1.3.2 RT-PCR检测TLR mRNA表达 按Trizol总RNA提取试剂说明书进行操作提取总RNA,并经紫外分光光度计测定,计算提取物总RNA浓度,然后经逆转录扩增cDNA。RT-PCR检测TLR mRNA

表达取cDNA 3μL(1μg),10×buffer 2μL,MgCl<sub>2</sub> 4μL,10mmol/L dNTPs 2μL,引物100ng(0.1μL),Taq DNA多聚酶0.2μL(5U/μL)。总体积20μL。循环条件:94℃预变性3min;94℃变性40s,退火1min(TLR2 51.5℃,TLR4 53.5℃,β-actin 55℃),72℃延伸(TLR2、4 60s,β-actin 90s),共35个循环;72℃延伸7min。取PCR扩增产物行2%琼脂糖凝胶电泳,采用凝胶成像系统及分析系统进行条带分析,β-actin作为内参照标准化各组TLR2、4 mRNA含量。TLR和β-actin引物序列见表1。

表1 TLR2、4和β-actin引物序列及扩增条件

引物名称	扩增片断(bp)
TLR2	
F:5'-CGCTTCCTGAACTGTGCC-3'	286
R:5'-GGTTGTCACCTGCCTCCA-3'	
TLR4	
F:5'-CCAGAGCCGTTGCTGTAT-3'	419
R:5'-GCCCTGTGAGGTCGTTGA-3'	
β-actin	
F:5'-CACCTGTGCTGCTCACCGAGGCC-3'	690
R:5'-CCACACAGATGACTTGCCCTCAGG-3'	

### 1.4 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件包,所有数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA)及LSD法检验,P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肠组织病理改变

光镜下见NS组肠绒毛完整,肠上皮细胞排列整齐,杯状细胞少见,无明显异常改变。LPS组给予LPS后3h肠组织绒毛间质出现充血,少许炎性细胞浸润,水肿明显,肠上皮细胞排列紊乱,细胞水肿。ITF组肠绒毛间质轻度充血,同细胞水肿程度一样,较LPS组均明显减轻,杯状细胞明显增加。见图1。

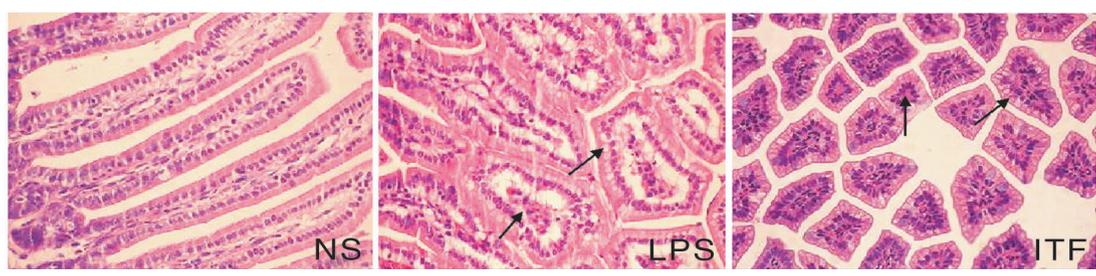


图1 各组肠组织的病理改变(HE×400) NS组肠绒毛完整,结构清晰;LPS组肠绒毛间质充血,炎性细胞浸润;ITF组肠绒毛间质充血较LPS组明显减轻。箭头所指为间质充血与细胞水肿。

## 2.2 RT-PCR 检测肠组织 TLR2、4 mRNA 的表达

三组间 TLR2 mRNA 表达的差异有统计学意义 ( $F = 64.930, P < 0.001$ ) (表 2), 其中 LPS 组 TLR2 mRNA 表达较 NS 组明显增高 ( $P < 0.01$ ), ITF 组较 NS 组、LPS 组均明显增高 ( $P < 0.01$ ), 见图 1 ~ 2。三组 TLR4 mRNA 表达差异也有统计学意义 ( $F = 248.747, P < 0.001$ ) (表 2), 其中 LPS 组肠组织 TLR4 mRNA 表达较 NS 组明显增高 ( $P < 0.01$ ), ITF 组 TLR4 mRNA 表达较 LPS 组明显降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见图 3 ~ 4。

表 2 肠组织 TLR2、4 mRNA/ $\beta$ -actin 光密度值 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	TLR2	TLR4
NS 组	1.39 $\pm$ 0.03	9.91 $\pm$ 0.33
LPS 组	3.07 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	16.71 $\pm$ 1.28 <sup>a</sup>
ITF 组	7.45 $\pm$ 1.90 <sup>a,b</sup>	5.37 $\pm$ 1.18 <sup>a,b</sup>
F 值	64.930	248.747
P 值	< 0.001	< 0.001

a: 与 NS 组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与 LPS 组比较,  $P < 0.01$

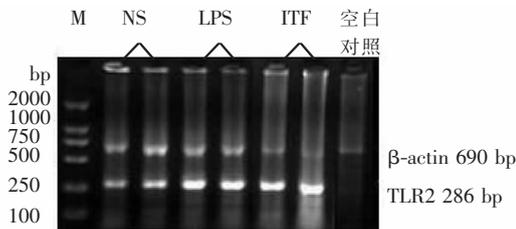


图 1 肠组织 TLR2 mRNA 表达扩增产物电泳图 ( $n = 8$ )

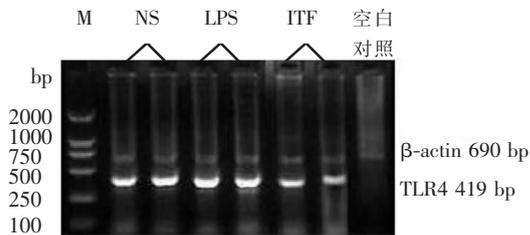


图 3 肠组织 TLR4 mRNA 表达扩增产物电泳图 ( $n = 8$ )

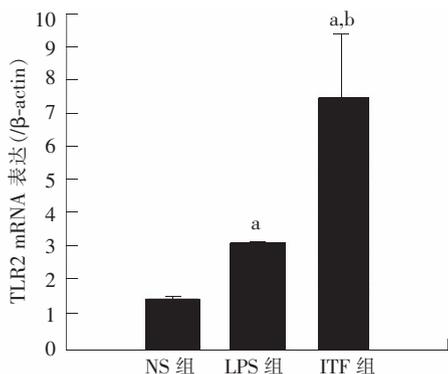


图 2 肠组织 TLR2 mRNA 表达 ( $n = 8$ )  
a: 与 NS 组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与 LPS 组比较,  $P < 0.01$

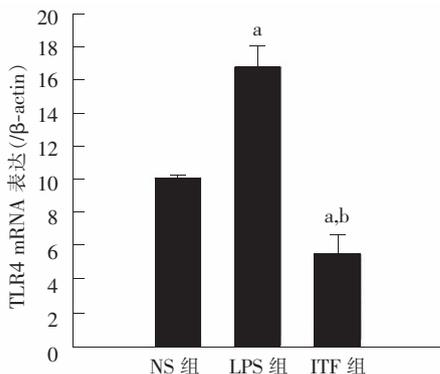


图 4 肠组织 TLR4 mRNA 表达 ( $n = 8$ )  
a: 与 NS 组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与 LPS 组比较,  $P < 0.01$

## 3 讨论

内毒素血症可通过缺氧、炎症介质释放、自由基增多使肠黏膜屏障受损, 大量细菌移位, 最终造成多器官功能衰竭, 甚至死亡<sup>[9-10]</sup>。肠黏膜屏障在阻止肠腔中细菌、毒素进入机体并维持机体内环境稳定上起重要作用。

ITF 是三叶肽家族成员之一, 由肠黏膜上皮杯状细胞分泌, 广泛存在于胃肠道, 对黏膜的保护作用为增强受损黏膜周围完好的上皮细胞向黏膜损伤表面迁移覆盖, 并与黏液中糖蛋白结合, 形成稳定的凝

胶复合物, 抵抗黏膜表面有害物质的损伤, 从而增强了胃肠道黏膜屏障的防御能力<sup>[1,11]</sup>, 在肠道的自我保护和损伤后修复中占有重要地位。动物研究表明杯状细胞合成和分泌 ITF, 能够维持肠黏膜上皮细胞的完整性并于炎症时发挥其黏膜修复作用<sup>[12-14]</sup>。敲除 ITF 基因后, 饮用硫酸葡聚糖钠溶液小鼠一半死于结肠炎, 当给予口服重组 ITF 后, 肠黏膜损伤明显减轻<sup>[15]</sup>。

以往研究, ITF 的保护作用主要集中在肠黏膜上皮细胞的增殖和修复方面。本研究中, 给予外源性 rITF 明显下调了 LPS 所致 TLR4 mRNA 的表达, 肠黏膜损伤减轻。提示 ITF 可能抑制了 TLR4 表

达,使促炎介质释放减少。LPS 介导的细胞激活需细胞表面能够与内毒素结合的蛋白包括 LPS 结合蛋白(LPS binding protein, LBP)和 CD14 参与。这些蛋白并没有跨膜转导信号的功能<sup>[16-17]</sup>。研究表明 TLR4 和 CD14 在与 LPS 反应中的功能是紧密相连的,两者在肠道的分布也是密切相关的,而在肠道的表达也有相似的模式<sup>[18]</sup>。TLR 既是免疫识别受体,又是跨膜信号转导分子。TLR2、4 均可识别 LPS。而 TLR4 是主要的识别受体<sup>[6,19-20]</sup>。研究表明 TLR4 与 LPS 的亲合力较低,而当 LPS 形成 LPS-LBP-CD14 复合物后与 TLR4 的亲合力明显增强,并使 TLR4 激活,通过信号转导作用,NF- $\kappa$ B 激活并向核内移位,促进促炎介质合成和释放,使得肠黏膜结构破坏和屏障功能降低,最终导致肠源性内毒素血症<sup>[20-21]</sup>。本研究中,ITF 抑制了 TLR4 mRNA 的表达,可能是阻抑了 LPS-LBP 与 CD14 或 LPS-LBP-CD14 与 TLR4 的结合,使 LPS 的信号不能转导至细胞内,NF- $\kappa$ B 无法被激活,从而使促炎介质 TNF- $\alpha$  的释放不能增加,因而减轻了肠组织的损伤。

本研究中 ITF 对 TLR2 mRNA 的表达无明显抑制作用,而且 TLR2 mRNA 表达明显上调,但 TLR2 mRNA 表达的上调并没有加重肠组织损伤。提示 ITF 减轻肠损伤的作用主要是通过抑制了 TLR4 的表达而实现的,这也说明 TLR4 在 LPS 的信号转导和介导炎症反应中起主要作用。TLR2 在肠道中的作用还有待进一步研究。

### [参 考 文 献]

- [1] 陈美娅,张靖,任建林. 三叶因子3研究进展[J]. 世界华人消化杂志,2008, 16(20): 2267-2273.
- [2] Li J, Zhou R, He WC, Xia B. Effects of recombinant human intestinal trefoil factor on trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats[J]. Mol Biol Rep, 2011 38(7):4787-4792.
- [3] Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity[J]. J Mol Med, 2006, 84(9): 712-725.
- [4] Peterson CY, Costantini TW, Loomis WH, Putnam JG, Wolf P, Bansal V, et al. Toll-like receptor-4 mediates intestinal barrier breakdown after thermal injury [J]. Surg Infect (Larchmt), 2010, 11(2): 137-144.
- [5] de Fonesca A, Kaunitz JD. Gastrointestinal mucosal defense[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2010, 26(6): 604-610.
- [6] Lorenz E. TLR2 and TLR4 expression during bacterial infections [J]. Curr Pharm Des, 2006, 12(32): 4185-4193.
- [7] 吴秀清,王虹,孙梅,吕庆杰,周卓. 幼年大鼠内毒素血症时小肠上皮细胞凋亡及 Caspase-3 的表达[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(2): 167-170.
- [8] 李军,许玲芬,孙梅,李强,高红,姜卫国. 肠三叶因子在内毒素致幼鼠肠损伤中的作用及意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(5):425-428.
- [9] John LJ, Fromm M, Schulzke JD. Epithelial barriers in intestinal inflammation[J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(5):1255-1270.
- [10] 李刚,李幼生,黎介寿. 肠功能障碍的新概念:急性肠损伤与急性肠伤害综合征[J]. 肠外与肠内营养, 2010,17(5),302-305.
- [11] 孙勇,彭曦. 肠三叶因子研究进展[J]. 肠外与肠内营养, 2006,13(4):243-246.
- [12] 周雅芮,张丙宏,严彩霞,张海霞,赵日红. 肠三叶因子对新生大鼠坏死性小肠结肠炎模型 Caspase29 表达的影响[J]. 实用儿科临床杂志,2009, 24(19):1490-1495.
- [13] 滕旭,许玲芬,孙梅,吴捷,刘璐. 肠三叶因子对炎症性肠病小鼠细胞凋亡的调节机制[J]. 实用儿科临床杂志,2010,26(13):1028-1031.
- [14] 付春花,张丙宏,严彩霞,陈丽萍,麦根荣. 肠三叶因子对新生大鼠坏死性小肠结肠炎的保护作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(1):20-24.
- [15] Renes IB, Verburg M, Van Nispen DJ, Büller HA, Dekker J, Einerhand AW. Distinct epithelial responses in experimental colitis; implications for ion uptake mucosal protection [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 283(1):G169-G179.
- [16] Duzendorfer S, Lee HK, Soldau K, Tobias PS. Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells; roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses [J]. FASEB J, 2004, 18(10): 1117-1119.
- [17] Ohnishi T, Muroi M, Tanamoto K. The lipopolysaccharide-recognition mechanism in cells expressing TLR4 and CD14 but lacking MD-2 [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2007, 51(1): 84-91.
- [18] Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, Kawashima K, Ishimura N, Kazumori H, et al. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut [J]. J Immunol, 2003, 170(8): 3977-3985.
- [19] Uematsu S, Fujimoto K. The innate immune system in the intestine [J]. Microbiol Immunol. 2010,54(11):645-657.
- [20] Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2; unique roles for MD-2 [J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3(1): 119-128.
- [21] Miyake K. Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2 [J]. Semin Immunol, 2004, 16(1): 11-16.

(本文编辑:王庆红)