

失血性休克小鼠心肌 Toll 样受体的表达

杭涛¹ 江时森¹ 宫剑滨¹ 吕锺锋¹ 宋勇¹ 诸葛海鸿¹

摘要 目的:探讨小鼠失血性休克(无复苏)对心肌 Toll 样受体(toll-like receptor,TLR)表达变化的影响及其可能的意义。**方法:**45只 C57BL/6 的小鼠随机分为3组:失血组、假手术组、脂多糖(LPS)组(尾静脉注射 LPS 5mg/kg),每组15只小鼠,采用心脏穿刺法建立小鼠失血性休克模型;心肌 TLR-2 mRNA 和 TLR-4 mRNA 的表达利用 RT-PCR 的方法进行分析;左室收缩功能以测定的左室收缩末压(left ventricular end-systolic pressure,LVESP)作为指标。**结果:**①与假手术组比较,失血性休克及 LPS 刺激后小鼠的动脉血压出现下降;②与假手术组比较,失血性休克及 LPS 刺激后均可导致左室收缩功能障碍;③失血性休克及 LPS 刺激后 TLR2 和 TLR4 基因的表达水平均出现不同程度的上调,而假手术组在各时间点未见明显改变。**结论:**①失血性休克及 LPS 刺激后心肌 TLR2 及 TLR4 基因表达的上调与心功能障碍存在密切联系,但这两种病理状态下的信号转导通路可能存在差异;②失血性休克和 LPS 刺激后 TLR2、TLR4 升高增强了机体的天然免疫能力,提高了机体对急性炎症的应激能力,对机体具有保护作用,但其过度表达也可能对组织、器官功能产生损害。

关键词 Toll 样受体;心肌;失血性休克;脂多糖;小鼠

中图分类号:R493,R542.2, R541.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2006)-05-0415-04

Expression of Toll-like receptor in myocardium in mice with hemorrhagic shock/HANG Tao, JIANG Shisen, GONG Jianbin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2006,21(5): 415-418

Abstract Objective: To investigate the effect and significance of hemorrhagic shock without resuscitation on expression of toll-like receptor (TLR) in myocardium.**Method:**Forty-five C57BL/6 mice were randomly divided into three groups: hemorrhage group, sham-operated group, lipopolysaccharide (LPS) group, and there were fifteen mice in each group. The hemorrhagic shock mouse model was developed by heart puncture. Expression levels for TLR2 mRNA and TLR4 mRNA were detected by RT-PCR. Left ventricular end-systolic pressure (LVESP) was determined and adopted as an index of left ventricle contractile function.**Result:**①Both hemorrhagic shock and LPS challenge could lead to a reduction of arterial pressure in mice when compared with that of sham-operated group. ②Both hemorrhagic shock and LPS challenge could result in left ventricle contractile dysfunction when compared with that of sham-operated group. ③Expression levels for TLR2 and TLR4 genes were upregulated in myocardium at a different extent after hemorrhagic shock and LPS challenge, in contrast, the changes for that of in sham-operated group was absent.**Conclusion:**①The upregulation of TLR2 and TLR4 is closely connected with hemorrhagic shock and LPS-induced left ventricle contractile dysfunction, and there may exist difference in signal transduction pathway between the two pathological conditions. ②The host ability of innate immune response may be reinforced by the upregulation of TLR2 and TLR4, whereas, overexpression of them may also impair the function of tissues or organs.

Author's address Dept. of Cardiology, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Clinical School of Nanjing University Medical School, Nanjing, 210002

Key words toll-like receptor; myocardium; hemorrhagic shock; lipopolysaccharide; mice

失血性休克是临床常见的急症之一,病因多为外伤引起的出血、消化性溃疡出血、食管静脉曲张破裂及妇产科疾病所引起的出血等,并易导致心功能受损,甚至引起多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome,MODS)^[1]。虽然近年来致死率及致残率有所下降,但其确切的发病机制仍未完全明了。以往在失血性休克致心功能损害的研究中,某些细胞因子,如核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等的作用得到了支持^[2-3]。Toll 样受体(toll-

like receptor,TLR)是新近发现的天然免疫中的细胞跨膜受体及病原模式识别受体,在介导上述的细胞因子活化的信号传导通路中扮演了重要的角色^[4]。有研究指出,它与失血性休克的发生、发展及转归有一定的相关性^[5]。但是,关于 TLR 在失血性休克心肌中的动态表达目前尚未见报道,为此,我们通过建立小

1 南京大学医学院临床学院,南京军区南京总医院心脏内科,江苏南京,210002

作者简介:杭涛,男,博士

收稿日期:2005-11-28

鼠失血性休克模型,观察心肌 TLR2 mRNA 及 TLR4 mRNA 的表达变化,并初步探讨其与心功能损害的联系。

1 材料与方法

1.1 实验材料及试剂

无菌 1ml 皮试空针。脂多糖(LPS,E.coli.O111:B4,Sigma 公司产品),分装成 0.5mg/ml。Tripure 试剂(Roche 公司产品)。RT-PCR 的有关试剂购自美国 Promega 生物有限公司。

1.2 动物模型的建立

健康成年清洁级近交系 C57BL/6 小鼠(南京军区南京总医院实验动物中心提供)45只,2—3周龄,体重 18—20g,戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(60mg/kg)后,在立体分离显微镜(SMZ-1B,NIKON)下,把 PE-50 聚乙烯管(Clay Adama, Piscataway, NT)插入一侧颈总动脉,用 4 道生理记录仪监视和记录血压,并随机分为 3 组:①失血性休克组:失血性休克模型参照文献进行^[9],并略加以改进。具体方法为:用肝素抗凝的 0.45×16 型号的皮试针通过心腔穿刺在 60s 时采取 30%全血容量,使平均动脉压从 80mmHg 降至 40mmHg,并能维持 2h 以上,且死亡率<10%。②LPS 组(阳性对照组):LPS 按 5mg/kg 尾静脉注射。③假手术组(阴性对照组):除不给予放血外,其余处理同失血性休克组。各组观察时间点分别为处理后 0(即刻)、1、2、4 和 6h。实验过程中,大鼠生活和手术环境温度均控制在 20±2℃。

1.3 取样方法

小鼠在预定时间记录血压,得到收缩压(systolic blood pressure, SBP)和舒张压(diastolic blood pressure, DBP),并计算平均动脉压(mean aortic pressure, MAP),计算公式为:MAP=DBP+1/3(SBP-DBP),随后按照文献报道的肋骨下穿刺法进行心脏穿刺^[9],并利用 SIMENS SIRCUST 960 生理记录仪(西门子公司,德国)记录左室收缩末压(left ventricular end-systolic pressure, LVESP),随后开胸取出心脏,4℃预冷生理盐水冲洗,将左、右心房及右心室去除,留取左心室心肌约 50mg,保存于-80℃液氮中,用于总 RNA 的抽提。

1.4 组织总 RNA 的抽提

按照 Roche 公司总 RNA 抽提试剂盒(Tripure™ Isolation Reagent)的操作步骤,从 50mg 新鲜小鼠的心肌组织中提取并纯化总 RNA 约 50μg,其 A260/A280 为 1.9 左右。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析,18S,28S 条带清晰,总 RNA 片段完整未降解。

1.5 PCR 引物的设计及 RT-PCR 的操作步骤

TLR2,TLR4,β-actin 的 PCR 引物参考 Gene bank 所报道的各自的 cDNA 序列(Gene Bank Index:31981332,10946593,6671508),计算机辅助设计引物(所用软件为 DNA Club)后,由上海博亚公司合成。各目的基因的引物序列见表 1。

表 1 TLR2、TLR4、β-actin 引物序列

| 名称 | 类型 | 引物序列 | PCR 产物长度 |
|---------|-----|----------------------------|----------|
| TLR2 | 正义链 | 5'-CACTCGCTCCGTACGAAGT-3' | 295bp |
| | 反义链 | 5'-GGCTGTGGTACCTGAGAATG-3' | |
| TLR4 | 正义链 | 5'-CTGCAATCAAGAGTGTCTGA-3' | 256bp |
| | 反义链 | 5'-TTCTTGGCTTGACCAGTCTC-3' | |
| β-actin | 正义链 | 5'-ACTGCCGATCCTCTTCTC-3' | 440bp |
| | 反义链 | 5'-AAGCACTTGGCGTGCACGA-3' | |

逆转录反应以提取的总 RNA 10μg 为模板, Oligo (dT)15primer 为逆转录引物,70℃水浴 5min 后快速冰块降温,再依次加入 RNAsin,dNTP mix,M-MLV 5×Buffer,DEPC 处理的双蒸水,最后按 100U/μg mRNA 加入 M-MLV 逆转录酶,反应总体积为 50μl,42℃水浴 2h,合成第一条 cDNA 链。PCR 反应以逆转录产物 10μl 为模板,目的基因及内参 β-actin 引物 200nmol/L,加入 Taq DNA 聚合酶 2.5U,总反应体积为 25μl,PCR 条件为 92℃ 变性 45s,58℃退火 50s,72℃ 延伸 70s,30 个循环,最后 72℃ 延伸 7min。

1.6 凝胶成像分析系统检测各目基因表达水平

PCR 产物 10μl 于 2%的琼脂糖凝胶上电泳,50V,电泳 1.5h,KODAK EDAS290 凝胶成像分析系统成像,图像分析使用 KODAK 1D 图像分析软件,分别得到目的基因及内参 β-actin 的灰度值,随后计算目的基因的相对表达水平。

目的基因相对表达水平=目的基因灰度值/β-actin 的灰度值。

1.7 统计学分析

本实验所有涉及数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,各组间及组内的数据采用单因素方差分析检验方法进行比较, $P < 0.05$ 认为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 失血性休克及 LPS 刺激后小鼠平均动脉压(MAP)的变化

见图 1。①失血性休克后 2h MAP 维持在 40mmHg 左右,4—6h 略有下降。②与对照组比较,LPS 刺激后即刻(0h)MAP 即开始降低(100±6.5 vs. 128±9, $P < 0.05$),至 6h 达最低值(38±5.5 vs. 119±8.5, $P < 0.05$)。③假手术组各时间点 MAP 差异无显

著性意义。

2.2 失血性休克及 LPS 刺激后心功能的改变

见图 2。失血性休克及 LPS 刺激后 2h 小鼠左心收缩功能仍维持于假手术组水平,但在失血及 LPS 刺激后 4h 失血组与 LPS 组小鼠的心功能与假手术组比较均有显著改变(40 ± 2.8 vs. 60 ± 3.5 , $P < 0.05$,失血组; 42 ± 3 vs. 60 ± 3.5 , $P < 0.05$, LPS 组),而小鼠左室收缩功能在失血组与 LPS 组间差异无显著性意义。

2.3 失血性休克及 LPS 刺激后心肌 TLR2,TLR4 mRNA 的表达水平的变化

见图 3。①与假手术组比较,失血性休克后 1h 小鼠心肌 TLR2 mRNA 的表达水平增高 (1.13 ± 0.08 vs. 0.78 ± 0.11 , $P < 0.05$),2h 达峰值水平 (1.46 ± 0.07 vs. 0.82 ± 0.08 , $P < 0.05$),4—6h 开始下降,但仍高于同时时间点假手术组水平。LPS 刺激后 1h 小鼠心肌 TLR2 mRNA 的表达水平上调(1.59 ± 0.07 vs. 0.78 ± 0.11 , $P < 0.05$),在 4h 达峰值水平 (1.96 ± 0.06 vs. 0.88 ± 0.09 , $P < 0.05$),6h 有所降低,但与同时时间点假手术组比较仍有显著差异。②失血组与 LPS 组小鼠心肌 TLR2 mRNA 的表达水平在处理 1—6h 均有显著差异。

见图 4。①与假手术组比较,失血性休克后 1h 小鼠心肌 TLR4 mRNA 的表达水平增高 (1.02 ± 0.03 vs. 0.77 ± 0.06 , $P < 0.05$),2h 达峰值水平 (1.18 ± 0.07 vs. 0.80 ± 0.07 , $P < 0.05$),4—6h 开始下降,但仍高于同时时间点假手术组水平。LPS 刺激后 1h 小鼠心肌 TLR4 mRNA 的表达水平上调(1.27 ± 0.04 vs. 0.77 ± 0.06 , $P < 0.05$),在 4h 达峰值水平 (1.53 ± 0.06 vs. 0.75 ± 0.09 , $P < 0.05$),6h 有所降低,但与同时时间点假手术组比较仍有显著差异。②失血组与 LPS 组小鼠心肌 TLR4 mRNA 的表达水平在处理 1h 至 6h 均有显著差异。

3 讨论

研究发现,与假手术组比较,失血性休克及 LPS

图 1 失血性休克及 LPS 刺激后小鼠平均动脉压的变化
与假手术组比较① $P < 0.05$;与 LPS 组比较② $P < 0.05$

图 2 失血性休克及 LPS 刺激后小鼠左室收缩功能的改变
①与假手术组比较 $P < 0.05$

图 3 失血性休克及 LPS 刺激后小鼠心肌 TLR2 mRNA 表达水平的变化
①与假手术组比较 $P < 0.05$; ②与 LPS 组比较 $P < 0.05$

图 4 失血性休克及 LPS 刺激后小鼠心肌 TLR4 mRNA 表达水平的变化
①与假手术组比较 $P < 0.05$; ②与 LPS 组比较 $P < 0.05$

刺激后小鼠 MAP 均出现不同程度的降低,失血组及 LPS 组小鼠左心收缩功能在处理 2h 仍维持正常,但在 4—6h 左心收缩功能下降。McDonough 等^[7]报道,失血性休克小鼠的心肌功能在失血后 2h 仍维持正常,至 3h 左室功能出现异常改变;而 Meng 等^[8]也发现心肌收缩功能在小鼠失血性休克 4h 后受到损害;同时,有报道 LPS 刺激后小鼠左心收缩功能在 4h 方受到抑制^[9],以上发现与我们的结果相似,并且提示:失血性休克和 LPS 导致动脉血压降低,心肌灌注减少可能是引起心功能障碍的原因之一,而一系列的代偿性反应,如对冠状动脉流量的生理性调节等,在短时间内维持了心功能的稳定,当这种平衡被打破后,必然导致心功能的损害。但在本研究中,

血压的变化与心功能损害程度似乎并无直接的相关性,且有研究发现,犬失血性休克给予林格氏液(Ringer's solution)补液后,虽然血压恢复至对照组水平,心功能的损害却并没有得到改善^[10]。上述发现提示:尽管不能排除低血压作为失血性休克及LPS刺激致心功能损害的一个因素,但其他的机制可能起了更为重要的作用。

有研究指出,失血性休克及LPS致组织器官结构功能损伤的信号转导通路中,TLR4和/或TLR2是重要的信号转导受体^[6,8,11-13],此外,作为TLR激活后下游的主要效应分子,心肌细胞NF- κ B及TNF- α 已被证实与失血性休克及LPS刺激后的心功能损害存在密切联系^[2-3],以上发现提示失血性休克及LPS可能是通过同一信号转导通路导致心功能受损。但在本研究中,与假手术组比较,尽管失血性休克及LPS均上调了心肌TLR2及TLR4的转录水平,但上调的水平在两组间存在显著的差异,此外,Raeburn等^[9]报道在由LPS引起的小鼠心功能受损中,心肌中性粒细胞数目较对照组明显增多,而Song等^[14]在小鼠失血性休克的研究中发现,心肌中性粒细胞的数目与对照组比较无明显差异。因此,虽然失血性休克及LPS刺激均上调了TLR2和TLR4基因的表达水平,并导致心功能受损,但在这两种病理状态下的信号转导通路可能存在差异。有报道TLR2对TLR4识别LPS有辅助作用,且LPS诱导TLR2 mRNA增加呈TLR4依赖的方式,同时,有研究发现TLR2可以与其他TLR家族成员形成异二聚体从而拓宽其识别功能^[15-16],结合本研究中TLR2和TLR4表达的变化,提示TLR2、TLR4可能作为一个复合物而发挥作用,但尚需证实。

本研究中,失血后1h心肌TLR2及TLR4基因的表达水平增高,2h达峰值,4h后开始下降;LPS刺激后1h心肌TLR2及TLR4转录水平上调,4h达峰值,6h开始降低,但失血组及LPS组小鼠的心功能损害在4—6h才发生,提示TLR2、TLR4转录开始下降后,但转录后启动的一系列生物效应并未停止,直至产生心功能抑制。此外,单纯失血性休克和LPS刺激后TLR2、TLR4升高增强了机体的天然免疫能力,提高了机体对急性炎症的应激能力,对机体具有保护作用,但其过度表达可能对组织器官产生损害。

由于我们仅观察了失血性休克后短时间内(6h)心肌TLR2及TLR4基因的表达变化,因此,对更长时间段上述二者表达的变化缺乏了解。而研究的结果提示失血性休克后心肌TLR2及TLR4基因表达的增加与心功能障碍存在密切联系,对二者更深入

的研究可能有助于进一步阐明失血性休克及其所导致的心功能损害的发病机制,并为制订更为合理的干预措施提供进一步的理论支持。

参考文献

- [1] Peitzman AB, Billiar TR, Harbrecht BG, et al. Hemorrhagic shock[J]. *Curr Probl Surg*, 1995, 32 (11): 925—1002.
- [2] Shahani R, Marshall JG, Rubin BB, et al. Role of TNF- α in myocardial dysfunction after hemorrhagic shock and lower-torso ischemia[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 278 (3): 942—950.
- [3] McDonald MC, Mota-Filipe H, Paul A, et al. Calpain inhibitor I reduces the activation of nuclear factor- κ B and organ injury/dysfunction in hemorrhagic shock [J]. *FASEB J*, 2001, 15 (1): 171—186.
- [4] O'Neill LA. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for inflammatory and infectious diseases [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2003, 3(4): 396—403.
- [5] Fan J, Kapus A, Marsden PA, et al. Regulation of Toll-like receptor 4 expression in the lung following hemorrhagic shock and lipopolysaccharide [J]. *J Immunol*, 2002, 168 (10): 5252—5259.
- [6] Asehnoune K, Moine P, Fitting C, et al. Differential modulation of TLR2 and TLR4-induced TNF production by murin hemorrhagic shock[J]. *Ann Fr Anesth Reanim*, 2005, 24(3): 255—259.
- [7] McDonough KH, Giaimo M, Quinn M, et al. Intrinsic myocardial function in hemorrhagic shock [J]. *Shock*, 1999, 11(3): 205—210.
- [8] Meng X, Ao L, Song Y, et al. Signaling for myocardial depression in hemorrhagic shock: roles of Toll-like receptor 4 and p55 TNF- α receptor [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 288(3): 600—606.
- [9] Raeburn CD, Calkins CM, Zimmerman MA, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 expression is obligatory for endotoxin-induced myocardial neutrophil accumulation and contractile dysfunction[J]. *Surgery*, 2001, 130(2): 319—325.
- [10] Kien ND, Reitan JA, White DA, et al. Cardiac contractility and blood flow distribution following resuscitation with 7.5% hypertonic saline in anesthetized dogs[J]. *Circ Shock*, 1991, 35 (2): 109—116.
- [11] Nemoto S, Vallejo JG, Knuefermann P, et al. Escherichia coli LPS-induced LV dysfunction: role of toll-like receptor-4 in the adult heart [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 282 (6): 2316—2323.
- [12] Rajnik M, Salkowski CA, Thomas KE, et al. Induction of early inflammatory gene expression in a murine model of nonre-suscitated, fixed-volume hemorrhage [J]. *Shock*, 2002, 17(4): 322—328.
- [13] Matsumura T, Ito A, Takii T, et al. Endotoxin and cytokine regulation of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 gene expression in murine liver and hepatocytes [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2000, 20(10): 915—921.
- [14] Song Y, Ao L, Calkins CM, et al. Differential cardiopulmonary recruitment of neutrophils during hemorrhagic shock: a role for ICAM-1[J]? *Shock*, 2001, 16(6): 444—448.
- [15] Fan J, Frey RS, Malik AB. TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(8): 1234—1243.
- [16] Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, et al. The receptor for pattern recognition of pathogens by innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97 (25): 13766—13771.