

脓毒症大鼠心肌组织 Toll 样受体 4 和肿瘤坏死因子- α 表达及细胞凋亡研究*

贵州医科大学 石成玉* 徐艳霞¹ 周茉¹ 唐熔¹ 凌萍¹ 方艺¹, 贵阳 550004

摘要 目的:检测脂多糖(LPS)诱导的脓毒症大鼠心肌组织中 Toll 样受体 4(TLR4)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达和心肌细胞凋亡情况。方法:取 72 只大鼠随机分为 3 组,每组 24 只。实验 1 组、实验 2 组分别按 10、12 mg/kg 腹腔注射 LPS 建立脓毒症大鼠模型,对照组按 10 mL/kg 腹腔注射生理盐水。3 组分别在注射后 1、6、24 h,各取 8 只大鼠处死,处死前眼眶静脉丛采血,检测血清 TNF- α 水平,处死后取心脏组织,检测心肌组织中 TNF- α 阳性细胞率,TLR4、TNF- α mRNA 表达水平及心肌细胞凋亡指数(AI)。结果:2 个实验组血清 TNF- α 水平、心肌组织 TNF- α 阳性细胞率及 TLR4、TNF- α mRNA 相对表达量随时间均呈显著上升趋势($P < 0.05$),2 个实验组上述指标均高于对照组,且实验 2 组显著高于实验 1 组($P < 0.05$);2 个实验组心肌细胞 AI 随时间呈显著上升趋势($P < 0.05$),且心肌细胞各时间段 AI 均显著高于对照组($P < 0.05$),实验 2 组 AI 水平显著高于实验 1 组($P < 0.05$)。结论:LPS 诱导的脓毒症大鼠心肌细胞凋亡水平随病情发展显著增加,心肌损害随病情程度逐渐加重,推测与 TLR4、TNF- α 在血清及心肌组织内的异常高表达有关。

关键词 脓毒症; Toll 样受体 4; 肿瘤坏死因子- α ; 细胞凋亡; 心肌组织

中图分类号 R459.7 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20180621

Expression of toll-like receptor 4 and tumor necrosis factor- α in myocardial tissues and apoptosis in rats with sepsis
SHI Cheng-yu*, XU Yan-xia¹, ZHOU Mo¹, TANG Rong¹, LING Ping¹, FANG Yi. Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

Abstract Objective: To detect the expression of toll-like receptor 4 (TLR4) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in myocardial tissues and myocytes apoptosis in rats with sepsis induced by lipopolysaccharide (LPS). Methods: Seventy-two rats were randomly divided into 3 groups, 24 each. The animals in experimental groups 1 and 2 were intra-abdominally injected with 10 and 12 mg/kg LPS, respectively. The control group was injected with 10 mL/kg of normal saline. Eight rats in each group were sacrificed 1, 6 and 24 h after injection. The blood samples were taken via the orbital vein before execution, and the levels of serum TNF- α were determined. The heart tissue was collected after execution, and the TNF- α positive rate, mRNA expression levels of TLR4 and TNF- α in myocardial tissues and the apoptosis index (AI) of myocytes were detected. Results: The serum level of TNF- α , the positive rate of TNF- α , the mRNA expression levels of TLR4 and TNF- α in myocardial tissues increased significantly with time ($P < 0.05$). Besides, the above indicators in two experimental groups were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$), and those in the experimental group 2 were significantly higher than in the experimental group 1 ($P < 0.05$). The AI of myocytes in the 2 experimental groups increased significantly with time ($P < 0.05$), and that at each time point in the experimental groups was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). The AI in the experimental group 2 was significantly higher than that in the experimental group 1 ($P < 0.05$). Conclusion: The cardiomyocyte apoptosis level in LPS-induced septic rats increases significantly with the development of the disease, and the myocardial damage gradually increases with the severity of the disease, which is presumed to be related to the abnormally high expression of TLR4 and TNF- α in serum and myocardial tissue.

Key words Sepsis; Toll-like receptor 4; Tumor necrosis factor- α ; Apoptosis; Myocardial tissue

*基金项目:贵州省科技厅科技计划项目(黔科合 LH[2014]7296 号)

¹贵阳市妇幼保健院

*通信作者:石成玉, E-mail:1165438489@qq.com

脓毒症是由于机体感染造成的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),脓症患者大多合并心肌损害,但关于心肌损伤机制尚未阐明^[1]。Toll 样受体 4 (Toll-like

receptors, TLR4) 是一种识别病原相关分子模式的受体, TLR4 被识别后, 引发下游信号级联反应, 诱导产生肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素 6、白介素 12 等炎症因子进行防御, TLR4 在炎症及其相关性肿瘤的信号传导和病理生理发展过程中具有重要作用^[2]。本研究通过 LPS 诱导建立脓毒症及脓毒症休克大鼠模型, 检测大鼠心肌组织中 TLR4、TNF- α 的表达及心肌细胞凋亡情况, 初步探讨 TLR4、TNF- α 参与脓毒症发生发展的机制。

材料与方法

试验动物 无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级雄性斯泼累格·多雷 (sprague dawley, SD) 大鼠, 3 月龄, 体质量 180 ~ 220 g, 由贵州医科大学实验动物中心提供 [动物合格证号: SCXK (黔) 2017-0008]。

主要试剂 脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS), 从 *Escherichia coli* O111: B4 菌株中提取, TNF- α ELISA 试剂盒、原位杂交试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒 TUNEL (瑞士 Roche 公司), 兔抗鼠 TNF- α 免疫组化试剂盒 (百奥莱博公司), 试剂盒中原位杂交探针序列: TNF- α : 5'-ACGAG TAATA AGACG CTACG GAGCA GCTAA-3'。TLR4: 5'-ACCGG TTCCT GG-TAGCACGA TCGCT AATGA GGTCA-3'。

方法

1. 动物分组及造模 SPF 级 SD 雄性大鼠共 72 只, 随机分为 3 组: 实验 1 组、实验 2 组和对照组, 每组 24 只。实验前适应性饲养 1 周, 实验 1 组按 10 mg/kg 腹腔注射 LPS 建立脓毒症大鼠模型, 实验 2 组按 12 mg/kg 腹腔注射 LPS 建立脓毒性休克大鼠模型, 对照组大鼠常规腹腔注射 10 mL/kg 生理盐水。各组自由饮水进食。

2. 血清 TNF- α 水平检测 各组分别在注射后 1、6、24 h 各取 8 只大鼠, 眼眶静脉采血 2 mL, 离心后取上层血清, 采用双抗体夹心 ELISA 测定各组血清 TNF- α 水平。严格按照试剂盒说明书, 测定光密度 (optical density, OD) 值, 计算血清 TNF- α 水平。

3. 心肌组织中 TLR4 阳性细胞率测定 各组分别在注射后 1、6、24 h 各取 8 只大鼠, 处死后取心脏组织制作石蜡切片, 经脱蜡、水化、热修复后, 将切片放入 3% 过氧化氢溶液, 室温孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次后封闭液封闭, 每张切片分别加入 50 μ L 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗涤后加入二抗孵育 1.5 h, DAB 显色, 中性树脂胶封片。显微镜下观察, 细胞染色为棕

黄色或棕色判定为阳性细胞, 采用图像分析软件 Image-pro Plus 5.0, 每张切片取 5 个不同视野, 测定阳性细胞数, 并计算阳性细胞率。

4. 心肌组织中 TNF- α 、TLR4 mRNA 相对表达量检测 心肌组织石蜡切片, 经脱蜡、水化、热修复后, 3% 过氧化氢室温处理切片 30 min, 加复合消化工作液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10 ~ 30 min, 按每张切片 30 μ L 加预杂交液, 将硅化盖玻片盖在组织载玻片上, 恒温箱 37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育 2 h。按每张切片 20 μ L 滴加杂交探针工作液, 恒温箱 37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育杂交过夜, 杂交后洗涤。滴加小鼠抗地高辛生物素标记的抗体工作液, 37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育 45 min。滴加高敏过氧化氢酶链亲和素工作液, 37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育 45 min 后。DAB 显色, 苏木精复染, 酒精脱水, 二甲苯透明, 封片。以细胞膜或细胞质中出现棕黄色物质者为 TNF- α 、TLR4 阳性细胞, 不加探针为空白对照, 以排除非特异染色。利用医学图像分析系统 (medicine image analysis system, MIRS) 测定阳性细胞的平均 OD 值, 在 400 倍视野下每张切片选择 5 处阳性细胞, 测定其平均 OD 值, 以 OD 值表示目的基因相对表达量。

5. 心肌细胞凋亡水平检测 心脏组织切片脱蜡, 依次放入不同浓度梯度乙醇溶液中进行水化。洗涤后将载玻片擦干, 滴加蛋白酶 K 孵育, 3% 的过氧化氢孵育阻断内源性过氧化物活性。滴加 50 μ L 原位末端 1 转移酶标记 (TDT-mediated dUTP biotin nick ending labeling, TUNEL) 反应液, 37 $^{\circ}$ C 避光 60 min, PBS 液洗涤, 滴加 50 μ L Streptavidin-HRP 工作液 37 $^{\circ}$ C 避光反应并 PBS 洗涤。滴加 DAB 稀释液进行显色, 400 倍光镜下观察和控制反应时间。显色成功后用双蒸水终止反应, 苏木精核染 2 min, 碳酸锂返蓝 20 s, 标本自然晾干后中性树脂封片保存。显微镜下观察实验结果, 每张切片随机选择 5 个视野, 分别计算凋亡指数 (apoptosis index, AI), 后取平均值作为本切片的凋亡指数。

统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件, 计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 *t* 检验; 重复计量资料采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

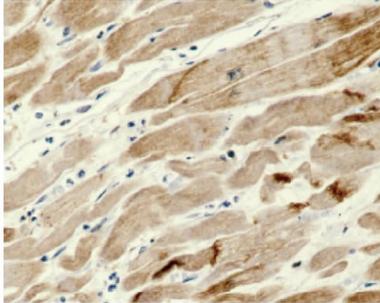
结果

血清 TNF- α 水平 实验 1 组、实验 2 组血清 TNF- α 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且实验 2 组显著高于实验 1 组 ($P < 0.05$); 实验 1 组、实验 2 组在 6、24 h 时血清 TNF- α 水平显著高于 1 h ($P < 0.05$), 24 h 水平显著高于 6 h ($P < 0.05$), 见表 1。

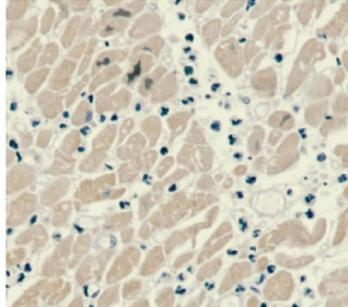
表1 3组血清 TNF-α 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	只	1 h	6 h	24 h
对照组	24	4.9 ± 0.3	5.2 ± 0.8	5.1 ± 1.3
实验1组	24	6.0 ± 0.9*	10.1 ± 1.3*#	15.5 ± 2.5*##
实验2组	24	11.3 ± 2.0* [△]	21.5 ± 3.5* ^{△#}	34.2 ± 3.5* ^{△##}

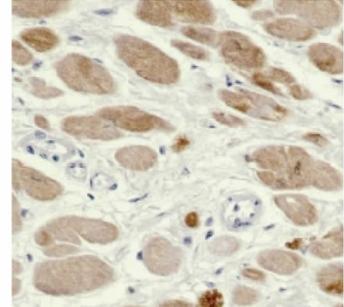
注:与对照组比较,*P<0.05;与实验1组比较,[△]P<0.05;与本组1h比较,#P<0.05;与本组6h比较,[▲]P<0.05



实验1组



实验2组



对照组

图1 造模后24h3组心肌组织 TNF-α 染色

表2 3组心肌组织 TNF-α 阳性细胞率 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	只	1 h	6 h	24 h
对照组	24	7.2 ± 1.0	7.2 ± 1.0	7.2 ± 1.2
实验1组	24	30.1 ± 4.8*	48.2 ± 5.4*#	75.1 ± 6.4*##
实验2组	24	49.0 ± 5.8* [△]	62.1 ± 6.6* ^{△#}	86.2 ± 6.0* ^{△##}

注:与对照组比较,*P<0.05;与实验1组比较,[△]P<0.05;与本组1h比较,#P<0.05;与本组6h比较,[▲]P<0.05

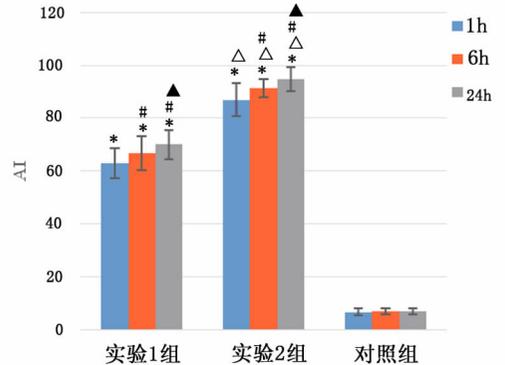
心肌组织 TLR4、TNF-α mRNA 相对表达量 实验1组、实验2组心肌组织 TLR4、TNF-α mRNA 表达水平显著高于对照组,且实验2组显著高于实验1组(均P<0.05);实验1组和实验2组心肌组织24、6h时 TLR4、TNF-α mRNA 表达水平显著高于1h,且24h显著高于6h(均P<0.05),见表3。

心肌细胞 AI 实验1组和实验2组心肌细胞 AI 在1、6、24h显著高于对照组,且实验2组显著高于实验1组(均P<0.05),不同时间点两两比较,差异均有统计学意义(均P<0.05),见图2。

讨论

TLR4 属于一种跨膜蛋白,能有效识别“非己”,TLR4 通过诱导抗原递呈细胞、辅助性 T 细胞的增殖

心肌组织 TNF-α 染色及阳性细胞率 实验1组、实验2组心肌组织中 TNF-α 阳性细胞率显著高于对照组,且实验2组显著高于实验1组(均P<0.05);实验1组、实验2组在6、24h时心肌组织中 TNF-α 阳性细胞率显著高于1h,且24h显著高于6h(均P<0.05),见图1、表2。



注:与对照组比较,*P<0.05;与实验1组比较,[△]P<0.05;与本组1h比较,#P<0.05;与本组6h比较,[▲]P<0.05

图2 心肌细胞凋亡指数

分化,参与机体特异性免疫^[3,4]。TLR4 是革兰阴性菌外膜中广泛存在的特异性病原相关分子模式(PAMP),与相应受体特异性结合后,可激活 TLR4 信号传导系统,调节免疫反应。TNF-α 过度释放可导致更多细胞因子产生,引发微循环及细胞功能障碍,脓毒症病情加重^[5]。

本研究中,2个实验组血清 TNF-α 水平、阳性细胞率、TLR4、TNF-α、mRNA 相对表达量显著高于对

表3 TLR4 及 TNF-α mRNA 在心肌组织中的表达水平

($\bar{x} \pm s$)

组别	例	TLR4			TNF-α mRNA/β-actin mRNA		
		1 h	6 h	24 h	1 h	6 h	24 h
对照组	24	0.18 ± 0.03	0.17 ± 0.04	0.18 ± 0.02	0.09 ± 0.05	0.10 ± 0.03	0.09 ± 0.04
实验1组	24	0.22 ± 0.02*	0.24 ± 0.03*#	0.27 ± 0.03*##	0.20 ± 0.01*	0.24 ± 0.02*#	0.27 ± 0.04*##
实验2组	24	0.28 ± 0.03* [△]	0.31 ± 0.02* ^{△#}	0.33 ± 0.04* ^{△##}	0.31 ± 0.02* [△]	0.33 ± 0.01* ^{△#}	0.35 ± 0.01* ^{△##}

注:与对照组比较,*P<0.05;与实验1组比较,[△]P<0.05;与本组1h比较,#P<0.05;与本组6h比较,[▲]P<0.05 (下转第509页)

CT检查中偶然发现的,应同时完善心电图及心脏超声以评估对心脏电生理及功能的影响。

参考文献

- 1 成人暴发性心肌炎诊断与治疗中国专家共识[J]. 内科急危重症杂志,2017,23(6):443-453.
- 2 苗琨,陈琛,崔广林,等.成人暴发性心肌炎不同治疗方案差异分析[J]. 内科急危重症杂志,2017,23(6):465-468.
- 3 Gore I, Arons W. Calcification of the myocardium; a pathologic study of 13 cases[J]. Arch Pathol (Chic), 1949, 48(1):1-12.
- 4 Wada A, Nakata T, Tsuchihashi K, et al. Massive myocardial calcification of right and left ventricles following acute myocarditis complicated with rhabdomyolysis-induced acute renal failure [J]. Jpn Circ J, 1993, 57(6):567-572.
- 5 Itoh E, Saitoh H, Miida T, et al. An autopsied case of acute myocarditis

with myocardial calcification[J]. Jpn Circ J, 1997, 61(9):798-802.

- 6 Rossi MA, Santos CS. Sepsis-related microvascular myocardial damage with giant cell inflammation and calcification [J]. Virchows Archiv, 2003, 443(1):87-92.
- 7 Torfs M, Salgado R, Van HP, et al. A curious case of acute myocardial calcifications[J]. Circulation, 2016, 133(10):e426-e427.
- 8 Chrysohoou C, Henry T, Stillman A, et al. Myocardial fibrosis detected with gadolinium delayed enhancement in cardiac magnetic resonance imaging is related with arterioventricular coupling alterations in patients with acute myocarditis [J]. Hellenic J Cardiol, 2016, 57(6):449-454.
- 9 Wittekind SG, Allen CC, Jefferies JL, et al. Neonatal enterovirus myocarditis with severe dystrophic calcification: novel treatment with pocapavir[J]. J Investig Med High Impact Case Rep, 2017, 5(3):2324709617729393.

(2018-09-14 收稿 2018-11-26 修回)

(上接第506页)

对照组($P < 0.05$), 2个实验组内上述指标均随时间呈显著升高趋势,且实验2组显著高于实验1组($P < 0.05$)。提示LPS致大鼠脓毒症发生时, TNF- α 、TLR4过表达,参与脓毒症病程发展。本研究发现造模初期TNF- α 表达处于活跃状态,而脓毒症休克大鼠炎症反应更剧烈,这与炎症发生早期体内致炎因子大量释放有关^[6]。本研究中LPS诱导脓毒症大鼠发病期间,大鼠血清及心肌组织内TLR4急速增加,这与机体发生免疫功能失衡有关。TLR4作为细胞表面特异性PAMP,与多种受体结合后激活免疫效应。

此外,本研究显示,2个实验组心肌细胞AI逐渐升高($P < 0.05$),心肌细胞各时间段AI均显著高于对照组,且实验2组显著高于实验1组($P < 0.05$),说明随脓毒症病程延长,心肌细胞凋亡水平显著升高。脓毒症导致多器官功能障碍综合征时心肌损害标志物显著升高,严重影响患者心脏功能^[7]。脓毒症心肌细胞损害与细胞发生低氧、线粒体损伤相关外,还与细胞凋亡相关,心肌细胞凋亡过程涉及多条信号通路,TLR4和TNF- α 是心肌细胞凋亡信号通路中关键调节因子,参与凋亡发生^[8]。动物实验已证实抗TLR4抗体的疗效显著,临床中应用集束化治疗脓毒症患者的临床症状的改善也已经得到证实^[9]。随病程发展机体损伤严重,合理有效的治疗方案的制定,可有效提高患者生存率,改善患者预后。

综上所述,LPS诱导大鼠脓毒症发生期间可造成心

肌损害,可能与TLR4、TNF- α 在血清及心肌组织内异常高表达有关,提示在临床中对此类患者治疗时应积极控制TLR4、TNF- α 含量,还需要做好心肌组织的保护措施。

参考文献

- 1 汪宗显,李宏亮,么改琦,等.脓毒症心肌抑制对脓毒性休克患者血流动力学和器官功能及预后的影响[J].中华危重病急救医学,2015,44(3):180-184.
- 2 张晓铮,张天舒,崔凤超,等.靶向Toll样受体4的小分子调节剂[J].应用化学,2016,33(8):876-886.
- 3 唐骏,李罗清.容积CT灌注成像与Toll样受体4检测在急性脑梗死早期诊断中的应用[J].内科急危重症杂志,2018,24(1):67-77.
- 4 Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Pillars Article: Cutting Edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the LPS gene product. [J]. J Immunol, 2016, 197(7):256-273.
- 5 Minchan G, Kyu KY, Hong S B, et al. Naringin decreases TNF- α and HMGB1 release from LPS-stimulated macrophages and improves survival in a CLP-induced sepsis mice. [J]. Plos One, 2016, 11(10):164-186.
- 6 喻秋平,杨慧文,叶兴文,等.小剂量糖皮质激素对严重脓毒症患者血CRP、CD64指数和HLA-DR水平的影响[J].内科急危重症杂志,2017,23(4):312-314.
- 7 邓鲁敏,闵玲.脓毒症患者心肌损伤标志物的水平分析[J].中国微生物学杂志,2017,29(6):680-683.
- 8 Vaez H, Rameshrad M, Najafi M, et al. Cardioprotective effect of metformin in lipopolysaccharide-induced sepsis via suppression of toll-like receptor 4 (TLR4) in heart. [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 7(72):115-123.
- 9 Lima CX, Souza DG, Amaral FA, et al. Therapeutic effects of treatment with anti-TLR2 and anti-TLR4 monoclonal antibodies in polymicrobial sepsis. [J]. Plos One, 2015, 10(7):345-347.

(2017-10-23 收稿 2018-06-25 修回)