

# TLR4的表达与急性胆道梗阻时内毒素致小鼠肝脏损伤的关系

李敏<sup>1,2</sup>, 殷莉波<sup>1,2</sup>, 刘平果<sup>2</sup>, 赵文秀<sup>2</sup>, 王效民<sup>2</sup>, 尹震宇<sup>2</sup>, 高翔<sup>3</sup>

**【摘要】** 目的 探讨急性胆道梗阻时内毒素损伤小鼠肝脏的机制及其与TLR4表达的关系。方法 雄性C57BL/10J(WT)小鼠42只,随机分为生理盐水组(NS组,  $n=21$ )、内毒素处理组1(LPS1组,  $n=21$ )、C57BL/10ScnJ(TLR4<sup>-/-</sup>)小鼠21只,为内毒素处理组2(LPS2组)。3组均行胆总管结扎术, LPS1、LPS2组小鼠于胆总管注射LPS(8 ng/μL, 10 ng/g体重), NS组注射同等剂量的生理盐水, 术后6、12、24 h采集标本, RT-PCR检测肝脏组织TLR4 mRNA的表达情况, 全自动生化分析仪检测血清ALT、TBIL、DBIL水平, ELISA法检测血清TNF-α、IL-6的水平。病理观察肝脏损伤情况, 免疫组织化学染色观察肝脏NF-κB的表达。结果 LPS1组与NS组比较肝脏组织TLR4 mRNA在6 h时表达已有升高, 于24 h达高峰, ALT、TBIL各时点均明显升高( $P<0.01$ ), TNF-α、IL-6表达亦增高( $P<0.01$ ), LPS1病理损伤程度较NS组重, 免疫组化显示术后24小时NF-κB在LPS1组可见肝细胞明显的核表达。LPS2组与LPS1组比较各血清学指标均明显下降, 病理损伤减轻, 24 h时肝细胞NF-κB核表达较少。结论 在急性胆道梗阻时LPS可以加重肝脏组织损伤和机体炎症反应, 可能与TLR4的表达增高及NF-κB的表达有关。阻断LPS-TLR4信号通路可以减轻LPS引起的机体损伤。

**【关键词】** 胆道梗阻; LPS; Toll-like receptor 4

**【中图分类号】** R 657.4<sup>+</sup>3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1006-4761(2010)03-0224-04

**LPS increases the liver injury via TLR4-dependent manner in mice with acute obstructive jaundice** (LIM *in*<sup>1,2</sup>, YIN *Li-bo*<sup>1,2</sup>, LIU *Ping-guo*<sup>2</sup>, et al. 1. Medical college of Xiamen University Xiamen 361005, China; 2. Department of hepatobiliary surgery, Affiliated Xiamen Zhongshan hospital of Xiamen University, Xiamen 361004, China; 3. Model Animal Research Center, Nanjing University, 12 Xufu Road, Pukou district Nanjing 210061, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate whether LPS increase the liver injury and involved mechanism in mice with obstructive jaundice. **Methods** 42 of C57BL/10J(WT) male mice were randomly divided into NS group ( $n=21$ ) and LPS1 group ( $n=21$ ), and LPS2 group as C57BL/10ScnJ(TLR4<sup>-/-</sup>) male mice ( $n=21$ ). All mice were subjected to common bile duct ligation (CBDL), then the LPS1 and LPS2 groups were injected with LPS (8 ng/μL, 10 ng/g body weight) via common bile duct after CBDL operation. The NS group was injected with equal amount of saline. The blood samples and liver tissues were collected at 6, 12, 24 h ( $n=7$ ) after treatment and prepared for further analysis. The concentrations of serum ALT, TBIL, DBIL were measured by automatic biochemistry analyzer, the levels of serum TNF-α and IL-6 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay, the expressions of TLR4 mRNA in the liver tissue were detected by RT-PCR. histological analysis showed the injury of the liver tissue and the distribution of NF-κB were detected by immunohistochemical staining. **Results** Liver tissue injury was more severe in the LPS1 group compared with the NS and LPS2 groups. mRNA level of TLR4 in liver tissues was increased 6 hours after CBDL and LPS injection in LPS1 group, and peaked at 24 hours. No detection of TLR4 mRNA in LPS2 group. TNF-α and IL-6 secretions were significantly increased ( $P<0.01$ ) in LPS1 group. NF-κB was obviously expressed in the nucleus of hepatic cells in the LPS1 group at 24 hours after surgery, and slightly expressed in the NS group and LPS2 group. **Conclusion** LPS increased the liver injury after mice were subjected to CBDL. The activation of NF-κB and release of TNF-α and IL-6 were correlated with the higher expression of TLR4 in the liver and might be involved in this process.

**【Key words】** obstructive jaundice; LPS; toll-like receptor 4

胆道梗阻时容易继发细菌感染, 从而导致急性胆管炎的发生, 如果梗阻未被解除, 感染未被控制, 则疾病有可能进展为病情更加凶险的急性化脓性胆管炎。在急性胆管炎时, 致病菌主要是革兰氏阴性细菌, 其中以大肠杆菌、克雷伯菌常见。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性细菌胞壁

外层的组成成分, 被认为是革兰氏阴性细菌刺激机体免疫系统最强的刺激物, 主要通过 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 途径进行信号传导<sup>[1]</sup>。LPS 在脓毒血症方面的作用国内外已有广泛的研究, 但是它在小鼠急性胆道梗阻时对肝脏的影响国内仍少见报道。因此我们对 LPS 在小鼠急性胆道梗阻时的作用进行研究, 并应用 TLR4 基因缺失小鼠进一步阻断其作用, 以期减轻急性胆道梗阻时机体对内毒素的敏感性炎症反应。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物模型

**【作者单位】** 1. 厦门大学医学院, 福建 361005

2. 厦门大学附属中山医院

3. 南京大学动物模式研究所

**【通讯作者】** 刘平果。

C57BL/10J(WT)、C57BL/10ScnJ(TLR4<sup>-/-</sup>)小鼠, 雄性, 体重 20 g ± 2 g 购自南京大学动物模式研究所, 饲养并繁殖于厦门大学医学院实验动物中心(SPF级)。C57BL/10ScnJ小鼠系缺失等位基因 Tlr4<sup>ps-de1</sup>, 导致 TLR4 mRNA 和蛋白的缺失。C57BL/10J小鼠随机分为生理盐水组(NS, n = 21)、LPS处理组1(LPS1, n = 21); C57BL/10ScnJ为LPS处理组2(LPS2, n = 21); 参考 Liu Z<sup>[2]</sup>方法建立急性胆总管梗阻模型, 小鼠用乙醚麻醉, 开腹后游离部分胆总管, 结扎远端, 从胆总管近端注射 8 ng/μL 的 LPS(10 ng/g体重), 双重结扎胆总管近端并剪断。分别于术后 6、12、24 h 采集血液及肝脏标本进行分析, 每时间点各 7 只。NS组手术操作同前, 注射同等剂量的生理盐水。

### 1.2 血标本及肝脏组织的采集和处理

各组动物在相关时间点麻醉后眼球采血 0.8~1 ml, 分离血清约 300 μL 于 -80℃ 低温冰箱保存, 同时取肝脏右上叶于 3.7% 福尔马林中固定, 余肝叶用生理盐水洗净, 剪碎并分装并于冻存管 -80℃ 低温冰箱保存, 备检。

### 1.3 肝脏组织 TLR4 mRNA 表达水平的检测

肝脏组织总 RNA 提取及 cDNA 合成: 采用 Trizol(英韦科技有限公司)提取肝脏组织标本总 RNA; Fermentas 逆转录试剂盒逆转录为互补 DNA。PCR 反应: 以 β-actin 作为内参。TLR4 及 β-actin 引物由英韦科技广州分部合成。β-actin 上游引物为 5'-TGA CGT GGA CAT CCG CAA AG-3', 下游引物为 5'-CTG GAA GGT GGA CAG CGA GG-3'; TLR4 上游引物为 5'-CCA TTG CTT GGC GAA TGT TTC-3' 下游引物为 5'-GAC CCA TGA AAT TGG CAC TCA-3', 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物, Goldview 染色, Gel Doc 凝胶成像系统观察电泳条带并储存图像。以系统的 Quantity One 软件分别测量并计算 TLR4 mRNA 和 β-actin mRNA 的扩增条带的光密度比值(RI)。

### 1.4 血清 ALT、TBIL 测定

用全自动生化分析仪(厦门大学附属中山医院检验科)测定血清谷丙转氨酶(ALT)、总胆红素(TBIL)水平。

### 1.5 血清 TNF-α、IL-6 检测

小鼠 TNF-α、IL-6 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒均购自联科生物科技有限公司。按试剂盒说明检测小鼠血清 TNF-α 及 IL-6 浓度。

### 1.6 病理学变化

肝组织常规石蜡包埋, 4 μm 切片, HE 染色, 光学显微镜

下观察组织损伤情况。

### 1.7 NF-κB 免疫组化检测

免疫组化 NF-κB 一抗购自美国 Neomaker 公司, 免疫组化试剂盒(抗兔)购自迈鑫(Kit 5004)。按试剂盒说明书进行检测。

### 1.8 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 所有数据应用 SPSS 13.0 软件进行分析。样本均数比较采用 t 检验分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肝脏组织 TLR4 mRNA 表达的变化

C57BL/10J 小鼠 NS 组肝脏组织 TLR4 mRNA 表达均较低, 与 NS 组比较 LPS1 组各时间点 TLR4 mRNA 表达均明显升高, 以 24 h 升高最明显, 进行光密度测量比值, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), C57BL/10ScnJ 各时间点肝脏组织均未见 TLR4 mRNA 表达(图 1)。

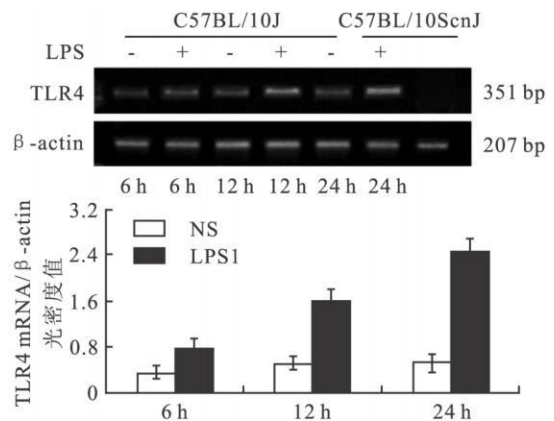


图 1 各时间点肝脏组织 TLR4 mRNA 的表达

### 2.2 血清 ALT、TBIL 的变化

LPS1 组与 NS 组比较血浆 ALT、TBIL、DBIL 水平各时间点均明显升高, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。ALT、TBIL 于 24 h 达高峰, 其中 TBIL 以结合胆红素为主, 未结合胆红素基本正常。LPS2 组与 LPS1 组比较 ALT、TBIL、DBIL 均明显下降( $P < 0.01$ ) (表 1)。

### 2.3 血清 TNF-α、IL-6 浓度的变化

与 NS 组比较, LPS1 组小鼠血浆 TNF-α、IL-6 浓度 3 个时间点均显著升高, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 且 TNF-α、

表 1 各组不同时间点血清 ALT、TBIL 水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	分组	6 h	12 h	24 h
ALT (U/L)	NS	355.6 ± 106.0 <sup>a</sup>	777.1 ± 149.6	1541.0 ± 356.8 <sup>b</sup>
	LPS1	598.8 ± 154.0	1445.4 ± 272.3	2735.9 ± 484.6
	LPS2	369.2 ± 62.2 <sup>Δ</sup>	997.1 ± 104.9 <sup>Δ</sup>	2108.3 ± 348.6 <sup>Δ</sup>
TBIL (μmol/L)	NS	30.2 ± 5.5	62.6 ± 10.6	111.6 ± 16.4 <sup>b</sup>
	LPS1	59.3 ± 19.7	116.0 ± 14.1	183.7 ± 24.0
	LPS2	30.0 ± 4.1 <sup>Δ</sup>	72.5 ± 7.7 <sup>Δ</sup>	110.3 ± 30.4 <sup>Δ</sup>

\*  $P < 0.01$  (LPS1 与 NS 相比); <sup>Δ</sup>  $P < 0.01$  (LPS1 与 LPS2 相比) ( $n = 7$ )。

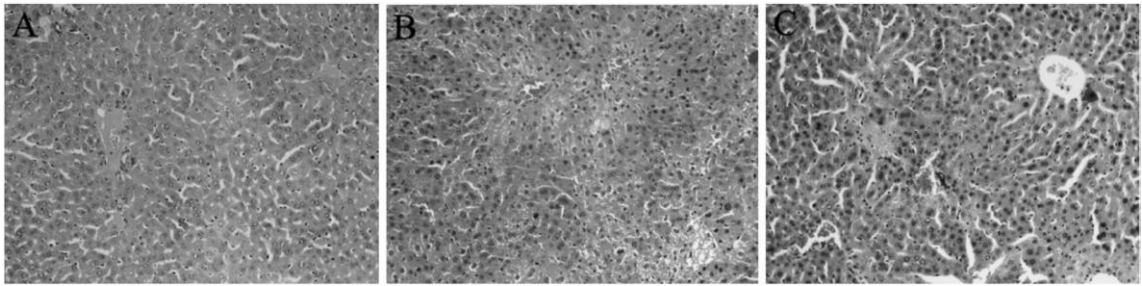


图 2 小鼠 CBDL 术后 24 h 肝脏病理改变 A: NS 组; B: LPS1 组; C: LPS2 组 ( $\times 200$ )

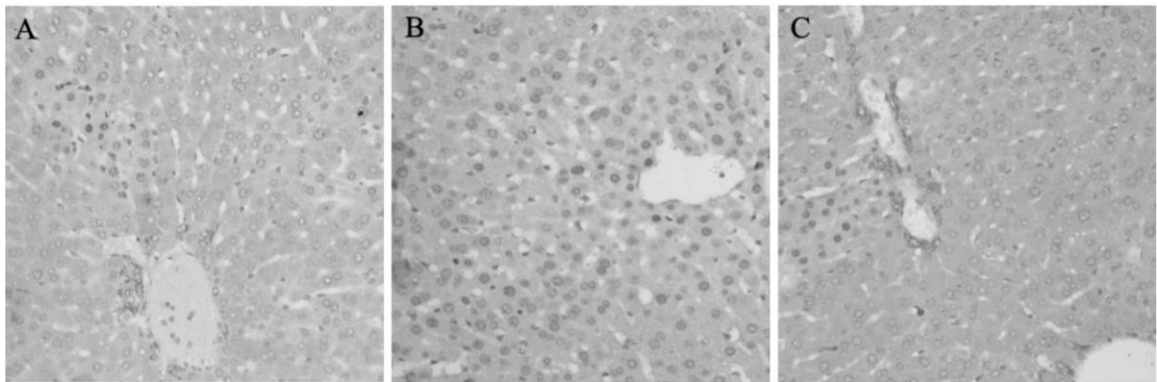


图 3 小鼠 CBDL 术后 24 h 肝脏组织 NF- $\kappa$ B 免疫组化染色 A: NS 组; B: LPS1 组; C: LPS2 组 ( $\times 200$ )

表 2 各组不同时间点血清 TNF- $\alpha$  及 IL-6 的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

指标	分组	6 h	12 h	24 h
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	NS	86.8 $\pm$ 19.3 <sup>*</sup>	229.1 $\pm$ 44.5	333.3 $\pm$ 58.4 <sup>*</sup>
	LPS1	485.5 $\pm$ 107.6	1066.0 $\pm$ 229.1	1370.0 $\pm$ 188.1
	LPS2	79.7 $\pm$ 15.9 <sup><math>\Delta</math></sup>	227.0 $\pm$ 80.2 <sup><math>\Delta</math></sup>	394.9 $\pm$ 86.5 <sup><math>\Delta</math></sup>
IL-6 (pg/ml)	NS	100.1 $\pm$ 17.0 <sup>*</sup>	576.8 $\pm$ 117.3	1057.8 $\pm$ 229.8 <sup>*</sup>
	LPS1	484.6 $\pm$ 104.6	1339.6 $\pm$ 268.6	2674.3 $\pm$ 492.3
	LPS2	106.4 $\pm$ 12.6 <sup><math>\Delta</math></sup>	664.2 $\pm$ 88.8 <sup><math>\Delta</math></sup>	1228.4 $\pm$ 276.3 <sup><math>\Delta</math></sup>

\*  $P < 0.01$  (LPS1 与 NS 相比);  $\Delta P < 0.01$  (LPS1 与 LPS2 相比) ( $n = 7$ )

IL-6 都于 24 h 达高峰。而 LPS2 与 LPS1 组比较各时间点血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 均明显下降 ( $P < 0.01$ ) (表 2)。

#### 2.4 病理学改变

NS 组: 中央静脉及小叶间静脉淤血, 肝细胞轻度水肿, 偶见肝细胞灶状坏死伴少许淋巴细胞浸润。LPS1 组: 中央静脉淤血, 周围肝细胞轻度水肿伴脂肪变性, 肝窦缺血性改变, 小叶中央周围或汇管区见多发片状坏死伴淋巴细胞浸润。LPS2 组病理学改变与 NS 组相仿 (图 2)。

#### 2.5 NF- $\kappa$ B 的核表达情况

以细胞核被染成棕黄色者为阳性细胞, 术后 24 h 时 LPS1 组可见肝细胞明显的 NF- $\kappa$ B 核表达, 而 NS 组和 LPS2 组肝细胞 NF- $\kappa$ B 核表达较 LPS1 组少 (图 3)。

### 3 讨论

TLR4 是第一个被发现的哺乳动物的 Toll 样受体, 它属于 IV 类跨膜蛋白质, 组织分布较广泛, 其 mRNA 可见于血管内皮细胞、单核细胞、中性粒细胞、树突状细胞<sup>[3]</sup>、小肠上皮细胞、肝细胞<sup>[4]</sup>等。目前发现的 TLR4 的最主要配体是

LPS<sup>[5]</sup>。LPS 在血液中与肝脏产生的急性期蛋白 LBP 结合, 形成 LPS-LBP 复合物, 再由 LBP 将 LPS 转移到细胞膜表面的 CD14 上, 在分泌蛋白髓样细胞分化蛋白-2 的作用下与 TLR4 结合, TLR4 形成同源二聚体使得信号传导到细胞内, 主要通过 MyD88 依赖的信号通路最终增强 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白激酶 (I $\kappa$ B kinase, IKK) 活性, 导致了 I $\kappa$ B 的磷酸化和降解, 解除对 NF- $\kappa$ B 的抑制, NF- $\kappa$ B 遂发生转位而进入细胞核, 指导靶基因的转录, 表达一系列的细胞因子、趋化因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12 等<sup>[6]</sup>。

我们的研究示 LPS1 组术后 6 h 后 TLR4 mRNA 表达升高, 于 24 h 达峰值, 而 NS 组 TLR4 mRNA 表达都较低, 表明 LPS 可以刺激肝脏组织表达 TLR4。LPS 再激活 TLR4 下游信号途径, 使 NF- $\kappa$ B 激活进入细胞核, 指导靶基因的转录, 表达 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等炎症因子, 加剧肝脏组织炎症细胞浸润并使肝细胞变性、坏死。因此 LPS1 组血清 ALT、TBIL 均明显升高, HE 染色显示肝脏损伤较 NS 组重。LPS2 组 C57BL/10ScnJ 小鼠缺失等位基因 Tlr4<sup>lps-del</sup>, 导致 TLR4 mRNA 和

蛋白的缺失,因此 LPS无法通过 TLR4 途径激活下游信号通路,从而减少炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6的释放,减轻了组织对内毒素的反应。LPS2组肝脏损伤程度故而与 NS组相仿。另外,胆总管梗阻使胆红素反流入血也可加重肝脏损伤,P. Sheth等<sup>[7]</sup>的研究发现 LPS可以通过 TLR4等途径破坏胆管上皮细胞间的紧密连接,从而胆红素更容易反流,这可能也是 LPS1组肝脏损伤较重的一个原因。

应用 LPS拮抗剂或者阻断 TLR4信号通路有望成为将来临床上治疗急性胆管炎的一个新策略。目前,已有研究<sup>[8]</sup>表明用 TLR4MD-2单克隆抗体阻断 LPS的信号传导,可明显的降低了脓毒症动物死亡率。TLR4拮抗剂新药的开发亦一直是个热点,目前研究出的 TLR4拮抗剂主要有 CRX-526、E5531和 E5564<sup>[9]</sup>,其中 E5564已经作为治疗败血症的一种新药进入临床评价阶段。相信在不远的将来新的 TLR4拮抗剂将应用于临床,抑制机体过度的炎症反应,减轻免疫损伤,为临床上非手术治疗胆道梗阻继发的感染提供新的选择。

#### 参考文献:

- 1 Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005, 17: 1-14
- 2 Liu Z, Sakamoto T, Ezure T et al. Interleukin-6, hepatocyte growth factor, and their receptors in biliary epithelial cells during a type I ductular reaction in mice: interactions between the periductal inflammatory and stromal cells and the biliary epithelium. *Hepatology* 1998, 28: 1260-1268

- 3 Kokkinopoulos J, Jordan W, J Ritter MA. Toll-like receptor mRNA expression patterns in human dendritic cells and monocytes. *Mol Immunol* 2005, 42: 957-968
- 4 Miyaso H, Morimoto Y, Ozaki M, et al. Obstructive jaundice increases sensitivity to lipopolysaccharide via TLR4 upregulation: possible involvement in gut-derived hepatocyte growth factor-protection of hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol* 2005, 20: 1859-1866
- 5 O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007, 7: 353-364
- 6 Daubeuf B, Mathison J, Spiller S et al. TLR4MD-2 monoclonal antibody therapy affords protection in experimental models of septic shock. *J Immunol* 2007, 179: 6107-6101
- 7 Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005, 5: 446-458
- 8 Sheth P, Delos Santos N, Seth A. Lipopolysaccharide disrupts tight junctions in cholangiocyte monolayers by a c-Src, TLR4, and LBP-dependent mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, 293: G308-318
- 9 Leon CG, Tory R, Jia J et al. Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases. *Pharm Res* 2008, 25: 1751-1761

(本文编辑 朱立新)

• 国外医学文摘 •

## 胆道恶性肿瘤患者 CA 19-9升高提示术后预后不良

/ Ioannis Hatzaras... / *HPB*, 2010, 12: 134-138

**摘要:** **背景** 胆道系统恶性肿瘤包括胆管癌和胆囊癌,虽可行外科切除,但其仍为高病死率的侵袭性肿瘤。我们研究的目标是寻找预测术后生存率的指标。**方法** 回顾性分析所有进行了根治性切除的胆道系统恶性肿瘤的患者。收集患者影像、CA 19-9升高( $> 35 \text{ U/ml}$ )、治疗方法及治疗结果等资料,根据肿瘤位置不同进行比较分析。建立 Kaplan-Meier生存曲线,采用 log-rank检验,运用 Cox比例风险回归进行多因素分析。**结果** 1992年至 2007年间共 91名胆道恶性肿瘤患者进行了外科手术切除。其中 46名(50.5%)为肝外胆管癌(EHC),23名(25.2%)为肝内胆管癌(HC),22名(24.2%)为胆囊癌(GBC)。中位年龄为 64岁(24~92岁)。其中 CA 19-9升高患者数为 45名(55%)(52% HC,

63% EHC, 41% GBC)。总体中位生存时间为 22.5(0.3~153.3)月。三组均具类似年龄、性别、术前 CA 19-9水平、切除彻底性和肿瘤病理组织学特征构成。中位数存活期最短为 GBC(14.3月),其次为 EHC(24.8月),HC(30.4月),然而其并不具统计学意义( $P = 0.971$ )。通过单变量分析(15.1月, $P = 0.003$ )和多因素分析(67.4月, $P = 0.047$ )提示只有术前升高的 CA 19-9水平( $> 35 \text{ U/ml}$ )预测不良的中位生存时间。**结论** 术前 CA 19-9水平升高是胆道恶性肿瘤患者术后较差生存的独立危险因素。因此我们建议术前常规检测 CA 19-9水平。

(戴欣摘译 赵义军审核)