

LTA 对 BALB/c 幼鼠肠黏膜 TLR4 表达的影响

周昌宁¹, 曹海宁²

(1. 南华大学附属第一医院烧伤整形外科, 湖南 衡阳 421001; 2. 湖南省环境生物学院生物化学教研室)

摘要: **目的** 探讨脂磷壁酸(LTA)对 BALB/c 幼鼠肠黏膜 Toll 样受体 4(TLR4)表达的影响。 **方法** 将 30 只 1 周龄 BALB/c 幼鼠随机分为正常组、溶媒组和 LTA 组,分别给予 NS、DMSO 和 LTA 各 0.1 mL 一次性灌胃处理,并于处理后第 1 周、第 2 周和第 4 周分别取幼鼠回肠末端、回盲部及结肠组织,HE 染色观察各段组织病理学变化,免疫组化检测 TLR4 蛋白表达情况。 **结果** HE 染色显示与正常组相比,溶媒组和 LTA 组幼鼠肠黏膜组织均有炎性浸润尤以经 LTA 处理后第 1 周的回肠末端最明显;其黏膜结构完整性受损,黏膜间隙增宽,炎性细胞浸润,大量细胞气球样变性甚至坏死。免疫组化结果表明各组不同组织不同时间段均表达 TLR4;LTA 组表达量最高,与正常组和溶媒组相比差异均有显著性($P < 0.05$);各组同一组织 TLR4 表达随时间延迟表达量增多以第 4 周最高,与第 1 周和第 2 周相比差异有显著性($P < 0.05$);相同组织在不同组别以结肠表达最高并随时间延长而增加($P < 0.05$);第 4 周 LTA 组结肠组织表达量最高,差异均有显著性($P < 0.05$)。 **结论** LTA 能上调肠黏膜 TLR4 表达并随着时间延长而增加,其对 LTA 识别和反应部位可能主要位于结肠。

关键词: 脂磷壁酸; 肠黏膜; 二甲基亚砷; TLR4

中图分类号:R392

文献标识码:A

Changes of Expression of TLR4 Induced by LTA in Intestinal Mucosa of BALB/c Mice Pups

ZHOU Changning, CAO Haining

(Department of Burns and Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital,
University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To observe the expression of TLR4 in intestinal mucosa of BALB/c mice pups. **Method** 30 BALB/c mice postnatal one week were randomly divided into normal group, solvent group and LTA group, and were administrated with NS, DMSO or LTA 0.1ml one time, respectively. The pups intestine were taken out at the first, second and fourth week and the terminal ileum, cecum and colon were separated. The pathological change of the tissues were analyzed by HE staining and the expression of the TLR4 were detected by immunohistochemistry (IHC). **Result** Histological examination showed that inflammatory infiltration was observed in solvent control group and LTA group. The integrity of mucosal structure was injured, the gap of the mucosa was widened and inflammatory cell infiltration or ballooning degeneration even necrosis was observed, especially in the terminal ileum of the LTA group at first week. The results of the immunohistochemistry indicated that the expression of TLR4 were detected in different tissues at different time period in three groups; the expression level of TLR4 in LTA group was the highest, compared with normal group and solvent group ($P < 0.05$); The expression of TLR4 in the same tissues of different groups were increased over time and the level of TLR4 at the fourth week were higher when compared with which at the first or second week ($P < 0.05$); the expression of TLR4 in colon were the highest and increased over time and the level of TLR4 in colon at the 4th week was the highest ($P < 0.05$). **Conclusion** LTA can up-regulate the expression of TLR4 in the intestinal mucosa, and the site of the LTA recognition and reaction may be mainly located in the colon.

Key words: Lipoteichoic acid; intestinal mucosa; Dimethyl sulfoxide; TLR4

肠道是人体最大的免疫器官^[1],在机体防御和清除外来抗原中起着重要作用。肠道免疫系统的主要组成部分是肠黏膜免疫^[2],现已逐渐发展成一门独立的学科,其研究领域含盖先天性免疫和获得性免疫等方面。肠道细菌总数达 10^{14} 以上,远远超过体细胞数量 10^{13} ,这些肠道细菌通过表达病原体相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMP)来被先天性免疫系统中的模式识别受体(Pattern recognition receptors, PRRs)所识别^[3]。新生儿肠道是无菌的,肠黏膜免疫系统尚未发育,随着肠道菌群的定植,肠道黏膜免疫系统逐步发育完善,因而肠道菌群被认为是肠黏膜免疫系统发育和成熟的始动因素。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)是先天性免疫系统的一类重要的 PRRs,TLRs 通过与 PAMP 结合启动肠黏膜免疫^[4],激活细胞内信号转导通路,分泌各种趋化因子和细胞因子来发挥抗感染免疫作用,因而被认为是连接天然免疫和获得性免疫的桥梁。在肠黏膜免疫中一般认为 TLRs 家族中 TLR4 与共生菌定植、抵抗病原微生物入侵以及肠道共生菌的耐受相关。目前对肠黏膜免疫的研究主要集中于革兰氏阴性细菌及其细胞壁成分脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)^[5],而对革兰氏阳性细菌及其细胞壁成分 LTA 在黏膜免疫中的作用报道较少。

1 材料与方法

1.1 实验材料

葡萄球菌脂磷壁酸(LTA 5 mg/支)购自 Sigma 公司,用 DMSO 配成 0.1 mg/mL 溶液。DMSO 由南华大学免疫与微生物教研室惠赠。免疫组化相关试剂:TLR4 单克隆抗体鼠购自 Abgent 公司,SP 免疫组化试剂盒 DBA 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验方法

将 30 只 1 周龄 BALB/c 幼鼠随机分为三组:正常组、溶媒组和 LTA 组,每组 10 只,分别给予 NS(阴性对照)、DMSO(溶媒对照)和 LTA 0.1 mL 一次性灌胃处理并于处理后第 1 周、第 2 周、第 4 周取出幼鼠回肠末端、回盲部、结肠,HE 染色观察各段组织病理学变化,免疫组化检测 TLR4 蛋白表达情况。在每张免疫组化切片中随机选取 5 个不连续的视野($\times 200$),采用 Image-Pro Plus 5.0 图像分析软件进

行图像分析,分析同时相点各个视野 TLR4 阳性细胞表达的积分光密度值(integral optical density, IOD)。

1.3 统计分析

采用 SPSS 13.0 软件对实验数据进行统计分析,定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用多个样本均数两两比较的 Q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 回肠末端黏膜组织学变化

正常组 BALB/c 幼鼠回肠末端可见绒毛结构且绒毛细而短,可见杯状细胞、柱状细胞;回盲部可见淋巴滤泡、淋巴小结及弥散淋巴组织;结肠内未见绒毛但在固有层内可见散在的结肠腺。溶媒组 BALB/c 幼鼠回肠末端肠黏膜较完整,且肠黏膜稍水肿,细胞间隙略增宽甚至可见少量炎性细胞浸润,第 1 周改变最明显,第 2 周后炎性反应消失;回盲部可见淋巴滤泡反应性增生,结肠固有层内可见散在的结肠腺。LTA 组 BALB/c 幼鼠回肠末端黏膜结构完整性破坏,黏膜面可见大量细胞呈气球样变性甚至发生坏死,细胞间隙明显增宽,尤以 LTA 处理后的第 1 周改变最显著(图 1);回盲部可见大量淋巴结和淋巴滤泡反应性增生;结肠固有层反应性增生,肠腺偶见变性水肿及炎性细胞浸润。第 2 周后炎性反应开始逐渐消失。

2.2 TLR4 免疫组化及图象分析

三组各个部位肠黏膜不同时间段均表达 TLR4,见图 2。各组 TLR4 阳性细胞积分光密度值(integral optical density, IOD):LTA 组表达量最高,与正常组和溶媒组相比差异均有显著性($P < 0.05$);各组同一组织 TLR4 表达随时间延迟表达量逐渐增多以第 4 周最高,与第 1 周和第 2 周相比差异均有显著性($P < 0.05$);相同组织在不同组别以结肠表达最高并随时间延长而增加,差异均有显著性($P < 0.05$);第 4 周 LTA 组结肠组织表达量最高($P < 0.05$,表 1)。

3 讨 论

自上个世纪的 50 年代后期 Burnet 提出克隆选择学说以来对获得性免疫系统的研究取得了突飞猛进的进展,甚至曾一度独占免疫学舞台。直至 90 年代后期多种天然免疫识别分子的结构、功能及分子

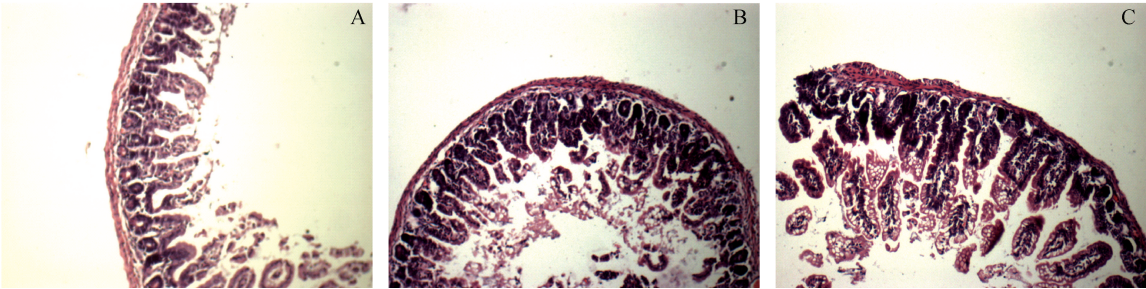


图 1 各组第一周回肠末段组织切片 (HE ×200) A:正常组;B:溶媒组;C:LTA 组

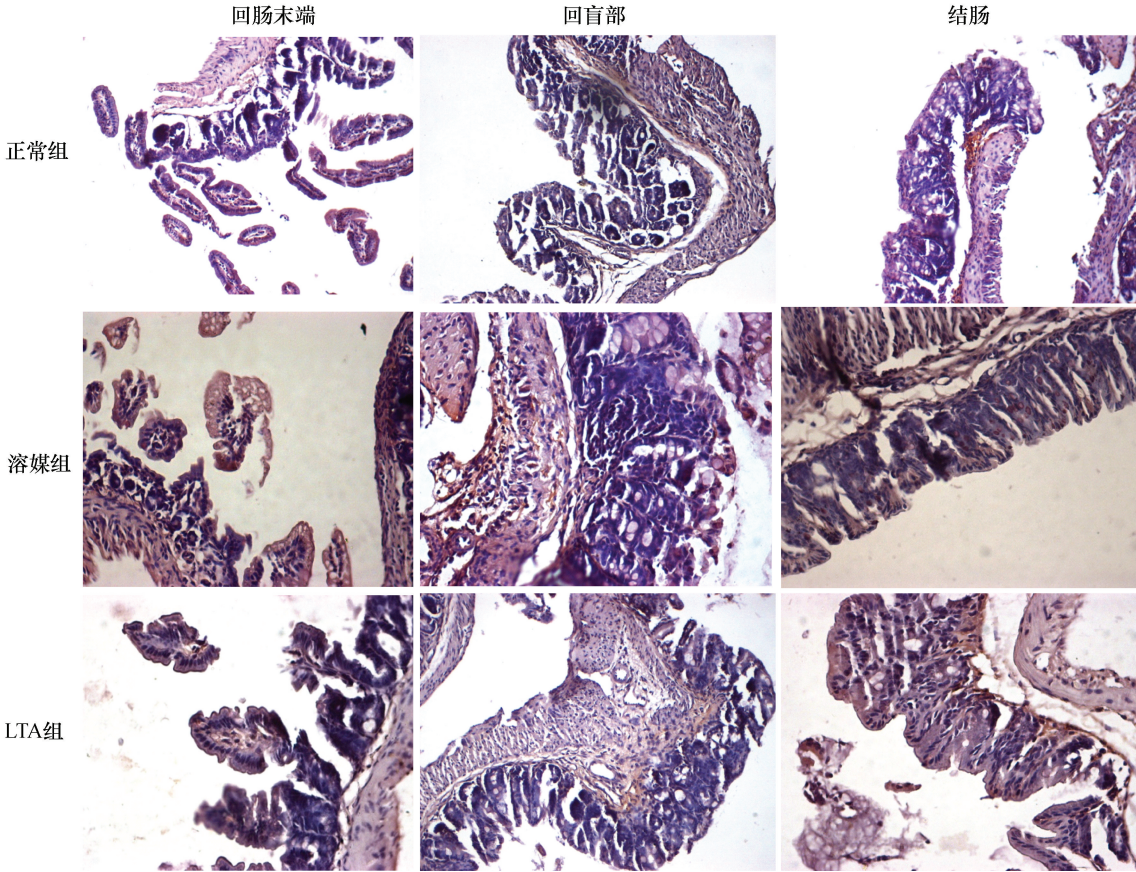


图 2 各组各部位免疫组化 TLR4 的表达情况 (HE ×200)

表 1 BALB/c 幼鼠各组肠道各段在不同时间点 TLR4 的 IOD 表达情况 (n = 5)

时间	正常组			溶媒组			LTA 组		
	回肠末端	回盲部	结肠	回肠末端	回盲部	结肠	回肠末端	回盲部	结肠
第 1 周	12.2 ± 1.9 ^{abcd}	47.0 ± 2.9 ^{abcd}	103.2 ± 4.8 ^{abc}	96.4 ± 2.7 ^{abcd}	128.6 ± 8.5 ^{abcd}	150.2 ± 6.7 ^{abc}	200.6 ± 12.1 ^{bed}	261.0 ± 12.7 ^{bed}	591.4 ± 11.7 ^{bc}
第 2 周	28.8 ± 2.8 ^{abcd}	57.0 ± 2.6 ^{abcd}	148.6 ± 6.2 ^{abc}	129.6 ± 11.9 ^{abcd}	149.8 ± 4.2 ^{abcd}	198.6 ± 5.8 ^{abc}	276.6 ± 9.2 ^{bed}	411.4 ± 12.1 ^{bed}	608.2 ± 10.8 ^{bc}
第 4 周	60.2 ± 2.6 ^{acd}	93.6 ± 2.3 ^{acd}	215.2 ± 9.7 ^{ac}	155.6 ± 6.9 ^{acd}	246.0 ± 10.2 ^{acd}	388.4 ± 8.1 ^{abc}	313.8 ± 13.2 ^{cd}	463.4 ± 10.0 ^{cd}	767.8 ± 15.6

与 LTA 组同时时间比较,a: $P < 0.05$;与同一组织第 4 周表达比较,b: $P < 0.05$;与 LTA 组第 4 周结肠比较,c: $P < 0.05$;与同组结肠表达比较,d: $P < 0.05$

机制被发现导致了天然免疫的迅速崛起。Nature2001 年第 410 卷有文献报道:天然免疫这个“灰姑娘”将在 21 世纪登上免疫学舞台的中心。肠道不仅是消化器官而且是最大的免疫器官,肠道细菌

总数达 10^{14} , 种类超过了 1 000 种^[6-7]。如何保持这些细菌正常地发挥功能非常重要, 尤其对于婴幼儿处于免疫系统发育的关键时期, 可以影响到婴幼儿生长发育甚至是远期健康状况。婴幼儿肠道共生菌群含大量需氧菌, 这些需氧菌在革兰氏阴性细菌以大肠杆菌为代表, 在革兰氏阳性细菌以金黄色葡萄球菌为代表, 它们在体内代谢可以释放其细胞壁成分 LPS、LTA 等, 能持续作用于肠黏膜。TLRs 是先天性免疫系统的一类重要的 PRRs, 目前至少已报道了 13 种 TLR^[8], 在肠黏膜免疫方面普遍认为 TLR4 与肠道共生菌定植、抵抗病原微生物入侵以及肠道共生菌的耐受密切相关。在静息状态下 TLR4 表达于细胞表面就可以更好的识别细菌细胞壁上的抗原性成分 LPS、LTA。TLR4 在识别这些细菌的 PAMP 后被活化并诱导相关基因的表达^[9]。哺乳动物肠道共生菌的定植是出生后逐步建立形成的, 婴幼儿时期肠道菌群的密度及种类在不同个体或同一个体的不同部位是有差异的, 但相对于个体而言其肠道细菌在一定时期内同一部位相对恒定^[10]。可见探讨出生后经胃肠道荷载 LTA 对肠道不同部位 TLR4 表达变化对深入了解肠黏膜免疫作用机制有着重要的意义。

本实验经胃肠道荷载 LTA 于 BALB/c 幼鼠, 观察肠组织各段改变为研究肠黏膜免疫提供实验依据, 通过免疫组化观察 TLR4 表达的变化了解 TLR4 在肠黏膜免疫中的作用提供一定的理论依据。从实验结果来看无论是通过 NS、DMSO 还是 LTA 处理, TLR4 在 BALB/c 幼鼠回肠末端、回盲部到结肠都是有表达的。从表达部位来看: 回肠末端表达最低, 回盲部次之而结肠表达最高; 从处理因素来看: 正常组表达最低, 溶媒组次之, LTA 组最高, 说明 LTA 在实验计量条件下可以刺激肠道发生炎症反应但随着肠道黏膜免疫发育成熟炎症反应逐渐减弱甚至消失。DMSO 也具有一定的消化道毒性, 可以诱导先天免疫应答; 从表达时间来看: 第 4 周表达最高, 第 1 周表达最低, 可能与此期小鼠肠黏膜免疫系统已发育成熟有关。虽然 DMSO 具有一定的消化道毒性可以诱导先天免疫应答, 但 LTA 更能明显上调 TLR4 的表达, 且表达强度明显高于 DMSO, 表达水平与

LTA 作用时间相关, 说明 LTA 能明显增强 TLR4 表达, 且其表达水平与 LTA 作用时间有密切相关。总之, TLR4 在 BALB/c 幼鼠回肠末端、回盲部到结肠都有基础性的表达, 经胃肠道荷载实验计量条件下, DMSO、LTA 可以诱发肠道炎症反应尤以 LTA 明显, 且结肠部位 TLR4 表达明显高于回肠末端和回盲部, 提示肠道对 LTA 识别和反应的部位主要发生于结肠。

参考文献:

- [1] Swiatczak B, Rescigno M. How the interplay between antigen presenting cells and microbiota tunes host immune responses in the gut [J]. *Semin Immunol*, 2012, 24 (1): 43-49.
- [2] 徐凯进, 李兰娟. 肠道正常菌群与肠道免疫[J]. *国外医学 (流行病学: 传染病学分册)*, 2005, 32 (3): 181-183.
- [3] 王莉莉, 王虹艳, 曲鹏. 模式识别受体在动脉粥样硬化中的作用及相互关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20 (10): 951-955.
- [4] Wells JM. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli [J]. *Micro cell Fact*, 2011, (10 suppl 1): S17.
- [5] Vamadevan AS, Fukata M, Arnold ET, et al. Regulation of Toll-like receptor 4-associated MD-2 in intestinal epithelial cells: a comprehensive analysis [J]. *Innate Immun*, 2010, 1 (2): 93-103.
- [6] Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome [J]. *Science*, 2006, 312 (5778): 1355-1359.
- [7] Qin J, Li R, Rase J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. *Nature*, 2010, 464 (7285): 59-65.
- [8] Hana M, Hana VM. Toll-like receptor and their dual role in periodontitis: a review [J]. *Oral Sci*, 2011, 53 (3): 263-271.
- [9] Guo J, Friedman SL. Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis [J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2010, 3 (21): 1-19.
- [10] Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, et al. Development of the human infant intestinal microbiota [J]. *PLoS Biol*, 2007, 5 (7): e 177.

(此文编辑: 蒋湘莲)