

文章编号 1006-8147(2018)06-0492-04

论著

TLR4 在脓毒症中对调节性 T 细胞功能活性的影响

黄颖,曹超,王军,寿松涛

(天津医科大学总医院急诊科,天津 300052)

摘要 目的:探讨脓毒症中 TLR4 (TLR4)对调节性 T 细胞功能及活性的影响,并探讨其作用机制。方法:SPF 级 C57/BL6 雄性小鼠(wild type,WT)40 只,C57BL/10ScNJN(JU) (TLR4^{-/-})小鼠 40 只,随机均分为 4 组,WTSham 组,WTCLP 组,TLR4^{-/-}Sham 组和 TLR4^{-/-}CLP。CLP 组用盲肠结扎穿孔法制备脓毒症模型。造模后 24 h,FCM 检测脾脏 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg 细胞数量、凋亡率及 Foxp3 和 TLR4 表达情况,RT-PCR 检测 Foxp3 mRNA 和 TLR4 mRNA 的表达,Western Blot 检测 Treg 细胞内 NF- κ B、p-NF- κ B 蛋白表达情况。结果:(1) TLR4^{-/-}CLP 组 Treg 细胞凋亡率较 WTCLP 组明显增多,而细胞数量显著降低($P<0.05$)。(2) WT CLP 组 Treg 中 Foxp3 mRNA 及蛋白表达、TLR4 mRNA 及蛋白水平显著升高($P<0.05$),而在 TLR4^{-/-}CLP 组中该表达较 WT CLP 组均显著降低($P<0.05$)。(3) WT CLP 组 Treg 细胞 NF- κ B、p-NF- κ B 的表达水平明显升高($P<0.05$),而 TLR4^{-/-}CLP 组较 WT CLP 组明显降低($P<0.05$)。结论:在脓毒症中 TLR4 可显著影响 Treg 的功能及其活性,这可能通过 TLR4/NF- κ B 信号通路介导有关。

关键词 Toll 样受体 4;调节性 T 细胞;脓毒症;信号通路

中图分类号 R631

文献标志码 A

The effects of TLR4 on regulating the function of Tregs in sepsis

HUANG Ying, CAO Chao, WANG Jun, SHOU Song-tao

(Department of Emergency Medicine, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract Objective: To study the effects of TLR4 on regulating the function of Tregs in sepsis. **Methods:** Forty healthy male C57/BL mice (wild type, WT) and forty healthy male TLR4 knockout mice (TLR4^{-/-}) were divided into Sham operation group (WT Sham group, $n=20$), WTCLP group ($n=20$), and TLR4^{-/-}Sham group ($n=20$), TLR4^{-/-}CLP group ($n=20$) by random number table method. In CLP group, the mice were given cecal ligation puncture (CLP), and in Sham group, the mice were given Sham-operation. Twenty-four hours after CLP, Treg number, Treg apoptosis rate, the expression of Foxp3, TLR4 at mRNA and protein level, the protein expression of NF- κ B and p-NF- κ B were determined. **Results:** (1) The apoptosis of Treg cells in TLR4^{-/-}CLP group was higher than that in WTCLP group ($P<0.05$). (2) The levels of Foxp3 mRNA and Foxp3 protein, TLR4 mRNA and TLR4 protein in TLR4^{-/-}CLP group were significantly lower than those in WTCLP group ($P<0.05$). (3) The expression of NF- κ B and p-NF- κ B in splenic Tregs was significantly increased in WT CLP mice in comparison to TLR4^{-/-}CLP mice ($P<0.05$). **Conclusion:** TLR4 in experimental sepsis closely aligns with the function of Tregs, and this effect may be related to TLR4/NF- κ B signaling.

Key words Toll-like receptor 4; Treg; Sepsis; Signaling

脓毒症指“机体对感染反应失调所引起的危及生命的器官功能障碍”^[1]。研究显示,脓毒症具有高发病率及高致死率的特点^[2],已成为现代危重病急救医学面临的世界性难题。脓毒症发病机制非常复杂,免疫功能紊乱贯穿于脓毒症病理过程的始终,宿主的免疫功能状态在很大程度上决定着炎症反应的预后。Toll 样受体 4 (Toll-like receptors 4, TLR4) 可特异性识别革兰氏阴性菌表面的内毒素 (lipopolysaccharide, LPS),而 LPS 是诱发脓毒症感染

主要的致病原。调节性 T 细胞是一类具有负向免疫调控作用的 T 细胞亚群,其功能及活性变化影响着脓毒症免疫功能紊乱的预后^[3-4],但其作用机制尚不明确。本实验通过盲肠结扎穿孔术这一经典术式复制脓毒症模型,结合 Treg 在免疫功能障碍中的作用,探讨 TLR4 在脓毒症中对 Treg 功能及活性的影响,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 雄性健康 SPF 级 C57/BL6 小鼠 40 只, C57BL/10ScNJN (TLR4^{-/-}) 小鼠 40 只, 6~8 周龄,体质量约 (20 \pm 2)g,均购于南京大学模式动物研究所,合格证号:scxk(苏)2010-001。小鼠饲养于天津医科大学总医院动物实验室,室温 20~25℃,相对湿度 40%~50%,正常日光灯照射 12 h 维持昼

基金项目 天津市应用基础与前沿技术计划项目(13JCYBJC37500); 睿 E(睿医)急诊医学研究专项基金项目(R2015026); 天普研究基金项目(UF201315); 天津医科大学总医院青年孵育基金项目(ZYYFY2015010)

作者简介 黄颖(1992-),女,硕士在读,研究方向:脓毒症;通信作者:寿松涛, E-mail:stshou66@sina.com。

夜循环,实验开始前适应性饲养1周,无菌饲料喂养,正常进食,自由饮水。各组别用随机数字表法将小鼠分为Sham组、CLP组、TLR4^{-/-}Sham组、TLR4^{-/-}CLP夜循环,实验开始前适应性饲养1周,无菌饲料喂养,正常进食,自由饮水。各组别用随机数字表法将小鼠分为Sham组、CLP组、TLR4^{-/-}Sham组、TLR4^{-/-}CLP组,各组别20只。

1.2 研究方法

1.2.1 造模 采用盲肠结扎穿孔(cecal ligation puncture, CLP)建立脓毒症模型。腹腔注射1%戊巴比妥钠80 mg/kg麻醉,取腹正中做1 cm切口,切开皮肤、腹肌、腹膜进腹,找到盲肠,将其轻轻拉出腹腔外,在盲肠中部结扎(结扎长度约1~1.5 cm),18G注射器针头贯穿结扎远端,挤出少量肠内容物,以确保穿孔,将处理后的盲肠还纳腹腔,逐层缝合腹壁切口,术后于皮下注射1 mL生理盐水液体复苏,Sham小鼠手术不予环形结扎及针刺穿孔,余与CLP组相同。

1.2.2 检测Treg计数与凋亡率 术后24 h,分离小鼠脾淋巴细胞,加入10 μ L Biotin抗体,混匀,4 $^{\circ}$ C预冷孵育10 min,然后加入20 μ L抗-Biotin抗体、10 μ L CD25-PE抗体混匀,离心洗涤。PBS缓冲液重悬后,加10 μ L抗-PE磁珠混匀,4 $^{\circ}$ C避光预冷经分选,收集流出CD4⁺CD25⁻Treg细胞,在含有5%CO₂ 37 $^{\circ}$ C的孵育箱中孵育24 h后计数,加入Foxp3-FITC抗体(Bioscience)标记,避光孵育30 min,流式细胞仪检测CD4⁺CD25⁻Treg凋亡。

1.2.3 检测Foxp3mRNA及TLR4mRNA的表达水平 MiniMACS免疫磁性分离系统分选各组CD4⁺CD25⁻Treg细胞,按Trizol试剂盒(美国Promega公司)操作说明,采用Trizol法提取总RNA并扩增,反转录(美国Promega公司)合成cDNA。采用荧光定量PCR仪进行PCR扩增。PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性1 min,95 $^{\circ}$ C变性15 s,60 $^{\circ}$ C退火/延伸40 s,共40个循环。Foxp3上游引物:5'-CAGCTGCCTACAGTGCCCTAG-3';下游引物:5'-CATTTGCCAGCAGTGGGTAG-3';TLR4上游引物:5'-TTTCACCTCTGCTTCACTA-3';下游引物:5'-AGATACACCAACGGCTCTGAAT-3'。分光光度仪检测Foxp3mRNA及TLR4mRNA的表达水平。PCR引物购于伯研合众(天津)生物医药科技有限公司。

1.2.4 检测Treg细胞的Foxp3、TLR4蛋白活性的表达 分离各组小鼠Treg,收集细胞,用预冷的PBS洗涤细胞,100 μ L PBS重悬细胞,加入Anti-MouseCD152/CTLA-4-FITC 10 μ L,4 $^{\circ}$ C避光孵育后

流式细胞仪检测;用同样的方法收集、洗涤、重悬Treg细胞。按Foxp3试剂盒操作说明将细胞破膜剂稀释4倍,每10⁶细胞加入固定/穿透工作溶液1 mL重悬,4 $^{\circ}$ C避光孵育2 h。破膜缓冲液洗1~2次,之后将细胞悬浮于200 μ L PBS中通过流式细胞仪检测。

1.2.5 Western Blot检测Treg细胞内NF- κ B、p-NF- κ B的水平 分离各组小鼠Treg,收集细胞,用预冷的PBS洗涤细胞,按照操作说明(Well-bio,上海)提取蛋白,转膜后用5%脱脂牛奶封闭,按说明书推荐比例稀释抗体NF- κ B、p-NF- κ B,在4 $^{\circ}$ C下过夜。用TBST洗膜后用辣根过氧化物酶孵育抗体(1:6 000, Bio-Rad, 美国)。用增强化学发光(ECL)(日本Millipore)对膜上的带密度进行了扫描和分析。

1.3 统计学方法 采用SPSS22.0统计学软件进行数据分析,各组标准化的样本数值用 $\bar{x} \pm s$,两组间比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Treg计数及凋亡率变化 由表1可见,与Sham组相比,WT CLP组及TLR4^{-/-}CLP组Treg数量均增多($P < 0.05$),但两组中WT CLP组增多更明显($P < 0.05$)。与Sham组相比,WTCLP组Treg细胞凋亡率明显下降($P < 0.05$),而TLR4^{-/-}CLP组较WTCLP组Treg凋亡率升高($P < 0.05$)。

表1 各组小鼠脾脏Treg计数及凋亡率

Tab 1 Treg count and apoptosis rate in each group

分组	存活细胞/死亡细胞/%	凋亡率/%
WT Sham	75.57 \pm 4.05	77.57 \pm 5.47
WT CLP	53.26 \pm 3.64 ^a	36.49 \pm 4.35 ^a
TLR4 ^{-/-} Sham	73.60 \pm 4.47	77.63 \pm 4.62
TLR4 ^{-/-} CLP	64.07 \pm 5.03 ^{b,c}	49.86 \pm 4.87 ^{b,c}

与WT Sham组相比,^a $P < 0.01$;与TLR4^{-/-}Sham组相比,^b $P < 0.01$;与WT CLP组相比,^c $P < 0.01$

2.2 Foxp3mRNA及TLR4mRNA的表达水平 由图1可见,与WT Sham组相比,WT CLP组小鼠Treg细胞内Foxp3mRNA及TLR4mRNA表达水平明显升高($P < 0.05$)。与TLR4^{-/-}Sham组相比,TLR4^{-/-}CLP组Foxp3mRNA及TLR4mRNA表达水平无明显变化($P > 0.05$)。与WTCLP组相比,TLR4^{-/-}CLP组小鼠Foxp3mRNA及TLR4mRNA水平则显著降低($P < 0.05$)。

2.3 Treg细胞Foxp3、TLR4蛋白表达水平 如图2所示,与WT Sham组相比,WTCLP组Treg细胞Foxp3及TLR4表达量明显增加($P < 0.05$)。与TLR4^{-/-}Sham组相比,TLR4^{-/-}CLP组Foxp3及TLR4的表达无明显差异($P > 0.05$)。与WTCLP组相比,TLR4^{-/-}CLP组Foxp3及TLR4表达量显著减少($P < 0.05$)。

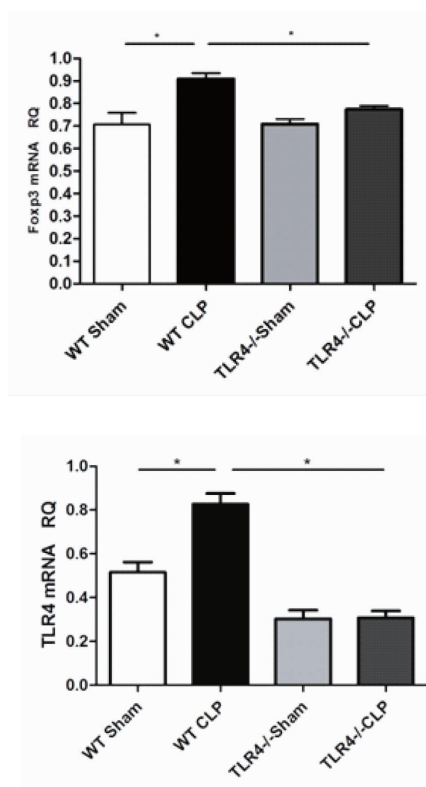
* $P < 0.05$

图 1 各组小鼠 Treg 细胞内 Foxp3mRNA 及 TLR4mRNA 的表达水平

Fig1 The expression of Foxp3mRNA and TLR4mRNA in Treg of each group

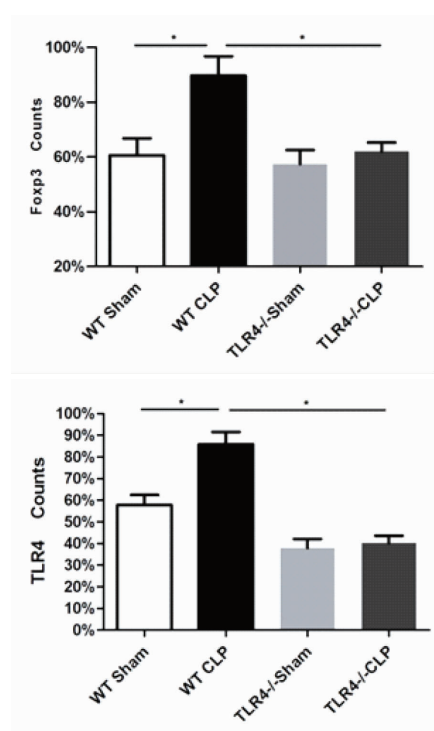
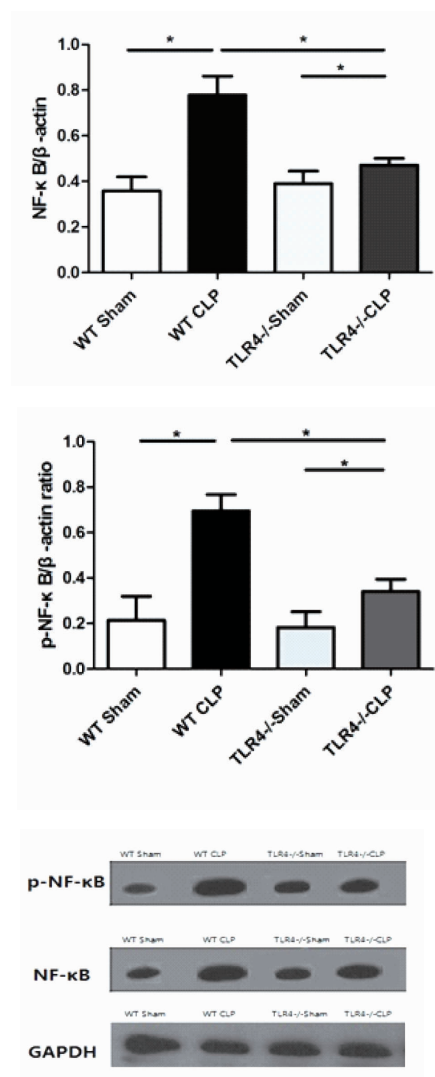


图 2 各组小鼠 Treg 细胞 Foxp3、TLR4 蛋白活性的表达水平

Fig 2 The expression of Foxp3 and TLR4 protein in Treg of each group

2.4 Treg 细胞内 NF- κ B、p-NF- κ B 水平 如图 3 所示,与 WT Sham 相比,WT CLP 组小鼠脾脏的

Treg 细胞内 NF- κ B 和 p-NF- κ B 表达量显著升高 ($P < 0.05$),与 TLR4^{-/-}Sham 组,TLR4^{-/-}CLP 组 NF- κ B 和 p-NF- κ B 表达量较稍升高 ($P < 0.05$)。而 TLR4^{-/-}CLP 组与 WT CLP 组比较,Treg 细胞内 NF- κ B 和 p-NF- κ B 表达量明显降低 ($P < 0.05$)。

* $P < 0.05$ 图 3 各组小鼠 Treg 细胞内 p-NF- κ B、NF- κ B 蛋白的表达水平Fig 3 The expression of p-NF- κ B and NF- κ B protein in Treg of each group

3 讨论

脓毒症是严重创伤、烧伤、休克、大手术和感染后的严重并发症之一,其病情进展可诱发脓毒症休克和多器官功能衰竭,是 ICU 常见的致死原因^[5-6]。在脓毒症发病机制中,早期常表现为过度炎症反应,随即机体进入持续的免疫抑制状态,过度的炎症反应促使机体出现严重的免疫功能障碍,甚至出现免疫麻痹^[7],而因免疫麻痹导致的感染并发症成为脓毒症患者临床死亡的主要原因^[8-9]。本实验采用

盲肠结扎穿孔复制脓毒症模型,与人类脓毒症特点相似,具有较高的相关性^[10]。

TLR4 属于 Toll 样受体家族,在多种类型的细胞均可得到表达,是天然免疫系统识别病原微生物的主要受体,不仅可特异性识别革兰氏阴性菌表面的内毒素(lipopolysaccharide,LPS),还能识别类脂A、热休克蛋白 60 (HSP60)、真菌表面的多聚体(GXM)。我们在研究中发现,CLP 术后 24 h,野生型小鼠脾 Treg 细胞中 TLR4 表达显著升高,且 TregFoxp3mRNA 及其蛋白表达亦明显升高,但 Treg 自身凋亡率显著减少,提示此时 Treg 功能及活性显著增强。而 TLR4^{-/-}鼠中,Treg 自身凋亡率及 Foxp3 表达(mRNA 和蛋白)未见显著变化,这表明脓毒症状态下 Treg 功能及活性的变化与 TLR4 表达密切相关,这与 Yang^[11]及 Huss^[12]等的研究结果一致。

本研究进一步对作用机制进行了初步探讨。TLR4 作为 LPS 的受体,在脓毒症时两者结合,通过 MyD88 依赖途径和 MyD88 非依赖途径通过激活 NF- κ B^[13-19]。NF- κ B 在几乎所有类型细胞中均存在表达。有研究表明,在脓毒症时,阻断 TLR4/NF- κ B 信号通路炎症因子水平下降^[20-21]。结果表明,CLP 后 24 h,在野生型鼠中 Treg 细胞中 NF- κ B 和 p-NF- κ B 表达显著升高,而 TLR4^{-/-}时蛋白表达未见显著变化,这提示脓毒症时 Treg 细胞功能及活性的变化与 TLR4/NF- κ B 信号通路密切相关,但具体分子机制仍有待于进一步研究。在我们的实验结果中还发现,TLR4^{-/-}CLP 组 Treg 细胞 NF- κ B、p-NF- κ B 蛋白表达量较 TLR4^{-/-}Sham 组轻度增加,此结果可能与脓毒症病理过程复杂,多条信号通路参与其发生发展过程有关,拟下一步对该结果进行研究分析。

脓毒症病理机制极其复杂,涉及多条信号通路及多种作用机制,本研究仅探讨其中一条信号通路,且对象为动物模型,尚需进一步研究探索后应用于临床治疗,本研究旨在为临床治疗脓毒症提供新的方向与理论依据。

参考文献:

- [1] Singer M,Deutschman C S,Seymour C W, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)[J]. JAMA, 2016, 315(8):801
- [2] Cheng B, Xie G, Yao S, et al. Epidemiology of severe sepsis in critically ill surgical patients in ten university hospitals in China[J]. Crit Care Med, 2007, 35(11): 2538
- [3] Okwor I,Onyilagha C,Kuriakose S, et al. Regulatory T cells enhance susceptibility to experimental Trypanosoma congolense infection Independent of mouse genetic background[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2012, 6(7):1761
- [4] Nascimento D C, Alves-Filho J C, Sônego F, et al. Role of regulatory T cells in long-term immune dysfunction associated with severe sepsis[J]. Crit Care Med, 2010, 38(8):1718
- [5] Dellinger R P, Levy M M, Carlet J M, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008[J]. Intensive Care Med, 2008, 34(1):17
- [6] Deutschman C S, Tracey K J. Sepsis: current dogma and new perspectives[J]. Immunity, 2014, 40(4):463
- [7] Bernard A M, Bernard G R. The immune response: targets for the treatment of severe sepsis[J]. Int J Inflam, 2012:697592
- [8] Fernandez R, Nardocci G, Navarro C, et al. Neural reflex regulation of systemic inflammation: potential new targets for sepsis therapy[J]. Front Physiol, 2014, 5:489
- [9] Markwart R, Condotta S A, Requardt R P, et al. Immunosuppression after sepsis: systemic inflammation and sepsis induce a loss of naïve T-cells but no enduring cell-autonomous defects in T-cell function[J]. PLoS One, 2014, 9(12):e115094
- [10] Rittirsch D, Huber-Lang M S, Flierl M A, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture[J]. Nat Protoc, 2009, 4(1):31
- [11] Yang J, Zhang J X, Wang H, et al. Hepatocellular carcinoma and macrophage interaction induced tumor immunosuppression via Treg requires TLR4 signaling[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(23): 2938-2947.
- [12] Huss D J, Pellerin A F, Collette B P, et al. Anti-CD25 monoclonal antibody Fc variants differentially impact Treg cells and immune homeostasis[J]. Immunology, 2016.
- [13] Doyle SL, O'Neil LA. Toll-like receptors: From the discovery of NF- κ B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(9):1102
- [14] Li T, Hu J, Thomas J A, et al. Differential induction of apoptosis by LPS and taxol in monocytic cells[J]. Mol Immunol, 2005, 42(9):1049
- [15] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(7):499
- [16] Zou L, Feng Y, Li Y, et al. Complement factor B is the downstream effector of TLRs and plays an important role in a mouse model of severe sepsis[J]. J Immunol, 2013, 191(11):5625
- [17] Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution[J]. Nat Immunol, 2002, 3(7):667
- [18] Muroi M, Ohnishi T, Tanamoto K I. Regions of the mouse CD14 molecule required for toll-like receptor 2- and 4-mediated activation of NF- κ B[J]. J Biol Chem, 2002, 277(44):42372
- [19] Sharma S, Tenover B R, Grandvaux N, et al. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway[J]. Science, 2003, 300(5622):1148
- [20] 申鹏霄, 王建生. 雷米普利对阿霉素肾病大鼠肾脏 Toll 样受体 4, 核因子- κ B, 白细胞介素-8 表达的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2010, 24(3):250
- [21] 司徒超, 黄卫东, 付秀丽, 等. 脓毒症患者白细胞介素-6、血小板动态测定的临床意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2009, 23(12):1202

(2018-04-08 收稿)