

肺与大肠 LPS 信号通路相关性的实验研究

刘 絮 刘晓燕 郭霞珍

(北京中医药大学,北京,100029)

摘要 目的:研究肺与大肠 LPS 信号通路变化的相关性。方法:将实验大鼠随机分为生理组、高氧组、低氧组、限食组和限水组,通过测定肺与大肠中 TLR4、MD2 和 CD14 的变化观察肺与大肠 LPS 信号通路的相关性。结果:高氧组和低氧组中肺部 TLR4 和 MD2 增高时,肠部也有所增高($P < 0.05$),限食组和限水组中肠部 TLR4 和 MD2 增高时,肺部亦有增高($P < 0.05$)。结论:可以认为肺与大肠在 LPS 信号通路 TLR4 和 MD2 中有相关的协同识别。

关键词 肺与大肠;LPS;TLR4;MD2;CD14

The Experimental Study on LPS Signal Path Correlation of Lung and Large Intestine

Liu Xu, Liu Xiaoyan, Guo Xiazhen

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To study LPS signal path changes of lung and large intestine. **Methods:** Mice were randomly divided into physiological group, hyperoxia group, hypoxia group, diet restriction group, water restriction group. The LPS signal path's correlation of lung and large intestine was observed detecting changes of variation of TLR4, MD2 and CD14 in lung and large intestine. **Results:** When TLR4 and MD2 in the lungs of hyperoxia group and hypoxia group increased, they also increased in the large intestines. When TLR4 and MD2 in the large intestines of diet restriction group and water restriction group increased, they also increased in the lungs. **Conclusion:** Lung and large intestine can be thought to have related synergy identification in TLR4 and MD2 of LPS signal path.

Key Words Lung and large intestine;LPS;TLR4;MD2;CD14

中图分类号:R221;R256.1;R332 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.04.007

细菌内毒素脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性菌细胞外膜的主要成分,也是免疫和炎症反应细胞的强大激活剂,是革兰氏阴性细菌主要的致病成分,可刺激几乎所有的真核细胞发生形态、代谢和基因表达变化,导致宿主细胞因子失控性表达,介导严重感染,多脏器损伤,败血症休克等多种疾病的发生发展^[1]。因此,LPS介导的信号转导机制已成为一个广泛注意的研究领域,近年来已取得实质性的进展。

本实验主要是研究肺与大肠 LPS 信号通路变化的相关性,肺与大肠是否具有相同的 LPS 的受体识别模式:ToU 样受体 4(ToU Like Receptor, TLR4)、髓样分化蛋白-2(Myeloid Differential Protein-2, MD2)和 CD14 协同识别。

1 材料与方法

1.1 材料 材料健康雌性 SD 大鼠,体重 180~200 g,共 50 只,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。代谢笼式可变氧饲养箱,自主设计,由凌云博际(北京)科技有限公司代为加工生产。测氧仪:数字式测氧仪,北京精微恒氧技术开发中心。天平:DT 系列

电子天平,北京天平物华医疗仪器有限责任公司。实验用气体:40 L 瓶装氧气与氮气,北京朝红平气体有限公司提供。TLR4、MD2 和 CD14 试剂盒由北京瑞格博科技发展有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 生理组大鼠模型 生理组大鼠不做任何处理,正常于代谢笼中喂养。7 日后取材。

1.2.2 高氧组大鼠模型 随机选取 9 只雌性 SD 大鼠放置于可变氧饲养箱中喂养,以 10 L/min 输入氧气,当氧气浓度达到 40% 后,持续输入氮气 1~2 L/min 使氧浓度维持在(40% ± 3)%,用数字式测氧仪监测箱内氧浓度。每天给予 8 h 高氧刺激。温度保持在 25℃,湿度 40%~60%,大鼠自由摄取食物和水。7 日后取材。

1.2.3 低氧组大鼠模型 随机选取 9 只雌性 SD 大鼠置于可变氧饲养箱中,以 10 L/min 输入氧气,当氧浓度达到 10% 后,持续输入氮气 1~2 L/min,使氧浓度维持在(10% ± 1%),用测氧仪监测箱内氧浓度。每天给予 8 h 低氧刺激。温度保持在 25℃,湿度 40%~

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(编号:2009CB522706)

作者简介:刘絮(1989—),女,山东济宁人,在读硕士研究生,中医基础理论。E-mail:liuxu039@sina.com

通信作者:郭霞珍(1950—),女,浙江杭州人,教授,主任医师,研究方向:四时五脏阴阳

60%,大鼠自由摄取食物和水。7 日后取材。

1.2.4 限食组大鼠模型 随机选取 9 只雌性 SD 大鼠置于代谢笼中单笼饲养,连续 7 天测量正常的进食量和进水量,之后按日平均进食量的 50% 给予喂养,饮水量不变。温度保持在 25℃,湿度 40% ~ 60%。7 d 后取材。

1.2.5 限水组大鼠模型 随机选取 9 只雌性 SD 大鼠置于代谢笼中单笼饲养,连续 7 天测量正常的进食量和进水量,之后按日平均进水量的 50% 给予喂养,进食量不变。温度保持在 25℃,湿度 40% ~ 60%。7 d 后取材。

1.2.6 指标测定 大鼠造模 7 日后取材,腹主动脉取血后,迅速剪取肺、空肠、回肠、结肠组织,生理盐水洗涤后,置于液氮罐中,后放置于 -40℃ 冰箱保存。TLR4、MD2 和 CD14 均用试剂盒进行检测。

1.2.7 统计学方法 应用 SPSS 17.0 进行统计学处理,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

(见表 1、表 2、表 3)。

2.1 生理现象 生理组和高氧组:大鼠在造模及取材过程中状态良好,没有显著变化。低氧组:在造模过程中发现大鼠体重逐渐减轻,嗜睡,反应迟钝。限食组:在造模过程中大鼠身体逐渐消瘦,造模三四日后易激惹。限水组:取材时发现大鼠结肠中粪便较多,便质坚硬。

2.2 CD14 肺和回肠:与生理组比较,其他各组组织上 CD14 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。空肠:高氧组组织上 CD14 较生理组增高,其他各组均下降($P < 0.05$)。结肠:与生理组比较,其他各组组织上 CD14 均下降($P < 0.05$)。可以认为肺与大肠 CD14 各组之间无比较意义。

2.3 TLR4 回肠:与生理组比较,其他各组组织上 TLR4 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结肠:限食组组织上 TLR4 较生理组降低($P < 0.05$),其他各组与生理组比较均无统计学意义($P > 0.05$)。空肠:与生理组比较,其他各组组织上 TLR4 均有增高($P < 0.05$),按其大小排序,限水组 > 高氧组 > 低氧组 > 限食组。肺:与生理组比较,其他各组组织上 TLR4 均有增高($P < 0.05$),按其大小排序,限水组 > 高氧组 > 限食组 > 低氧组。

2.4 MD2 回肠:与生理组比较,其他各组组织上 MD2 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。空肠:与生理组比较,各组组织上 MD2 均有变化($P < 0.05$),除限水组其他各组均有增高。结肠:与生理组比较,各组组

织上 MD2 均降低($P < 0.05$)。肺:与生理组比较,各组组织上 MD2 均有变化($P < 0.05$),除高氧组和低氧组之外其他各组均有增高。

表 1 各组大鼠肺、空肠、回肠、结肠组织上 CD14 的变化 (ng/mL,数据统计均用 $\bar{x} \pm s$ 表示)

组别	例数	肺	空肠	回肠	结肠
生理组	9	38.59 ± 2.78	3.31 ± 0.64	15.17 ± 5.10	26.72 ± 4.01
高氧组	9	41.32 ± 5.28	5.10 ± 4.08*	16.12 ± 3.44	17.40 ± 4.57*
低氧组	9	41.80 ± 5.09	3.13 ± 0.46*	17.84 ± 3.01	18.96 ± 4.84*
限食组	9	41.01 ± 3.57	3.12 ± 0.78*	13.03 ± 6.06	21.36 ± 5.45*
限水组	9	39.17 ± 3.71	3.12 ± 0.78*	16.31 ± 1.86	18.97 ± 6.08*

注:与生理组相比,* $P < 0.05$ 具有统计学意义。

表 2 各组大鼠肺、空肠、回肠、结肠组织上 TLR4 的变化 (ng/mL,数据统计均用 $\bar{x} \pm s$ 表示)

组别	例数	肺	空肠	回肠	结肠
生理组	9	2.06 ± 0.13	0.16 ± 0.03	0.87 ± 0.26	1.03 ± 0.15
高氧组	9	2.23 ± 0.24*	0.27 ± 0.20*	1.02 ± 0.23	0.84 ± 0.19
低氧组	9	2.08 ± 0.16*	0.18 ± 0.04*	1.00 ± 0.33	0.93 ± 0.14
限食组	9	2.19 ± 0.19*	0.17 ± 0.18*	0.77 ± 0.35	0.93 ± 0.17*
限水组	9	2.29 ± 0.16*	0.97 ± 0.22*	1.05 ± 0.21	0.97 ± 0.22

注:与生理组相比,* $P < 0.05$ 具有统计学意义。

表 3 各组大鼠肺、空肠、回肠、结肠组织上 MD2 的变化 (ng/mL,数据统计均用 $\bar{x} \pm s$ 表示)

组别	例数	肺	空肠	回肠	结肠
生理组	9	2.28 ± 0.41	0.13 ± 0.04	0.60 ± 0.25	1.04 ± 0.18
高氧组	9	2.23 ± 0.19*	0.21 ± 0.13*	0.85 ± 0.30	0.60 ± 0.14*
低氧组	9	2.20 ± 0.33*	0.15 ± 0.03*	0.77 ± 0.29	0.67 ± 0.15*
限食组	9	2.47 ± 0.21*	0.14 ± 0.04*	0.61 ± 0.52	0.59 ± 0.22*
限水组	9	2.70 ± 0.15*	0.10 ± 0.05*	0.77 ± 0.26	0.77 ± 0.27*

注:与生理组相比,* $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 讨论

LPS 诱导的炎症反应信号传导通路:脂多糖结合蛋白(LPS Binding Protein, LBP)将 LPS 传递给 CD14 分子,由 CD14 介导 LPS 细胞内传导而使 NF- κ B 激活,诱导促炎细胞因子 TNF、白介素、黏附分子等的表达。LPS 与血清中 sCD14 结合,再与细胞膜上的受体结合将信号转导到细胞内。CD14 与多种传递信号的跨膜信号受体不同,CD14 分子缺乏胞浆区段,因此 CD14 不能直接和细胞内进行信号交流,尚需其他分子起信号传导作用。研究发现 Toll 样受体是 LPS 信号向细胞内传导的门户蛋白。作为 LPS 的低亲和力受体的 TLR4 可以转导刺激信号。二者结合即可形成具备高亲和力结合和信号转导功能的受体复合体,将信号转导到细胞内^[2]。而 MD2 是协助 TLR4 完成 LPS 信号转导通路的必不可少的因素。研究^[3]发现 MD2 不仅能增强 TLR4 对 LPS 的反应性,还能拓宽 TLR4 对 LPS

(下接第 426 页)

2.3 资料整理工具及方法 频度统计采用 SPSS 19.0 的频度描述统计方法,关联规则挖掘则采用 SPSS Clementine11.1 关联规则中 Carma、Apriori 的算法。在所采集医案中截取病位,症状两者的相关信息并进行统计分析。如《王孟英医案·卷一·喘嗽》:“赵菊斋外孙华颖官,易患痰嗽。幼科治之。渐至发热,口渴便泻,汗多烦哭。以为将成慢惊,参入温补,日以加剧。孟英视之曰:肺热也。投葶苈汤,加滑石、黄芩、枇杷叶、桑叶、地骨皮,旬日而愈。”

表 2 临床医案病位与症状的关联分析

病位	症状	支持度%	置信度%
脾	饮食少 脉数 咳嗽	6.341	53.846
脾	脉细 泄泻便溏 咳嗽	7.31	53.333
脾	饮食少 气喘	11.22	52.174
脾	便血	11.707	50.0
脾	饮食少 泄泻便溏	13.659	50.0
脾	饮食少 咳嗽	15.61	50.0
脾	脉细 泄泻便溏	9.268	47.368
脾	便血 咳嗽	6.341	46.154
脾	气喘 泄泻便溏	20.488	45.238
脾	气喘 泄泻便溏 咳嗽	13.659	42.857
脾	泄泻便溏 咳嗽	56.098	42.609
肾	大便涩燥 咳嗽	5.366	36.364
脾肺肾	发热 泄泻便溏 咳嗽	6.829	35.714
肝	脉弦 泄泻便溏 咳嗽	7.805	31.25
胃	脉滑 咳嗽	6.341	30.769
肺	大便涩燥 咳嗽	12.162	44.444
肺	腹胀痛 泄泻便溏 咳嗽	9.459	42.857
肺	发热 泄泻便溏	11.486	41.176
肺	气喘 泄泻便溏	12.838	36.842
肺	咽干口渴 泄泻便溏 咳嗽	12.838	36.842

病位:肺症状:咳嗽、发热、口渴、便泻、汗多。

所得 354 例古代临床文献中,病位频数分布见

表 1。

表中可以清晰看到,在同时出现肺肠症状的古代临床病案中,病位出现频率较高的依次是肺肠、脾、肺、肝。

所收集临床医案病位与症状的关联分析见表 2。

由表 2 可以看出,当病位在脾,肺,肾,肝时都可以关联到肺肠的相关症状。其中又以病邪侵袭于脾和肺时所关联症状居多。

3 结果与讨论

通过以上的论述及对于所收集古代临床医案的统计观察,可以发现,当肺肠相关症状同时出现的时,疾病的主要矛盾往往并不是聚集在肺肠。以病位在脾时为例,由于脾为中央土,化生水谷精微以充养全身,脾为肺母,因此,当脾失健运,在上则母病及子,殃及于肺,表现为肺的相关疾病征象,在下则由于饮食水谷的运化失常,出现糟粕的异常,通过大肠的传导作用予以反应。此时,肺与大肠之间就体现出一种对于人体内病理变化的信息的同步反应。因此肺与大肠之间的共振,是基于经脉的紧密络属,以同气相求为理论核心。同时由于肺肠一上一下特殊的生理位置及相应的生理功能,使得肺肠共振不仅仅只体现肺肠二者之间的信息共享与感应,而是全身生理病理信号在同一时间的一个传递,这在古代临床医案的统计分析中也得以证实。

参考文献

[1]张挺,李其中.“同气相求”的理论内涵及其对中医的影响[J].上海中医药大学学报,2008,22(2):23-25.
 [2]张俊龙.《易》“同气相求”与中医理论[J].中医药研究,1997,13(6):1-3.

(2014-03-11 收稿 责任编辑:洪志强)

(上接第 423 页)

结构的识别范围。MD2 可能帮助 TLR4 识别 LPS/LBP/CD14 复合物,并将 LPS 锁定在结合位点上^[4]。MD2 在 TLR4 介导的 LPS 信号通路中具有重要作用。

TLR4 在细胞表面与 MD2 及 CD14 协同,形成 TLR4/MD2/CD14 聚合体,共同识别革兰氏阴性菌的脂多糖(LPS)、内源性配体如热休克蛋白(Hsp60、Hsp70)等配体,将其信号传导到细胞内,引起下游信号途径的激活^[5]。

在本实验中,通过数据分析可以知道肺病模型中肺部 TLR4 和 MD2 增高时,肠部也有所增高,肠病模型中肠部 TLR4 和 MD2 增高时,肺部亦有增高。TLR4 和 MD2 的表达在肺与大肠之间是呈正相关关系的,表明肺与大肠在炎症形成及防治中存在紧密的内在联系。

可以认为肺与大肠在 LPS 信号通路是有相关性的,在 TLR4 和 MD2 有相关的协同识别,可以为临床实践提供相应的实验数据。

参考文献

[1]杨一新,李桂源.LPS 所介导的信号转导通路研究进展[J].中南大学学报:医学版,2006,31(1):141.
 [2]胡承香,杨清武,吕凤林,等.CD14 与 TLR4 相互作用的实验研究[J].第三军医大学学报,2004,26(10):882.
 [3]李永旺,麻莉.内毒素诱导的 TLR4-MD2 信号转导通路[J].中国药理学通报,2002,18(2):121.
 [4]钟田雨,刘靖华,蒋勇.髓样分化蛋白-2 在识别和转导内毒素信号中的作用[J].生物化学与生物物理进展,2007,34(5):460-464.
 [5]Carvalho L, Lopes-Carvalho T, Ostler D, et al. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide[J]. J Exp Med,2003,197(4):403-411.

(2014-03-11 收稿 责任编辑:洪志强)