

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2017.01.005

矽尘对实验小鼠肺组织 TOLL 样受体 2、4、9 mRNA 表达的影响*

张兆强¹ 张鲁华² 林立¹ 张春芝¹

(¹ 济宁医学院公共卫生学院, 济宁 272067; ² 济宁医学院附属济宁市第一人民医院, 济宁 272011)

摘要 **目的** 探讨矽尘对实验小鼠肺组织 TOLL 样受体 2、4、9 (TLR2、4、9) mRNA 表达的影响。**方法** 将 40 只小鼠随机分成对照组 (不染尘)、2h 组 (每天染尘 2 h)、4h 组 (每天染尘 4 h) 和 8h 组 (每天染尘 8 h), 每组 10 只。20 d 后, 处死动物, 取肺组织, 提取总 RNA, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测不同暴露时间组 TLR2、4、9 mRNA 的相对含量。**结果** 对照组与 3 个暴露时间组 TLR2 mRNA 的相对含量分别为: (0.98 ± 0.69) 、 (1.18 ± 0.85) 、 (2.56 ± 0.54) 、 (3.22 ± 0.77) , 4 组间的差异有统计学意义 ($F = 13.70, P = 0.00$); 与对照组相比, 4h、8h 组的表达升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组与 3 个暴露时间组 TLR4 mRNA 的相对含量分别为: (0.93 ± 0.32) 、 (1.16 ± 1.23) 、 (4.80 ± 5.31) 、 (7.00 ± 6.22) , 4 组间的差异有统计学意义 ($F = 5.06, P = 0.00$); 与对照组相比, 4h、8h 组 TLR4 mRNA 的表达升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组与 3 个暴露时间组 TLR9 mRNA 的相对含量分别为: (1.04 ± 0.25) 、 (1.29 ± 0.30) 、 (1.26 ± 0.41) 、 (2.21 ± 0.33) , 4 组间的差异有统计学意义 ($F = 15.82, P = 0.00$); 与对照组相比, 仅 8h 组的 TLR9 mRNA 表达升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 染矽尘后, 小鼠肺组织 TLR2、4、9 mRNA 的表达上调, 这可能是启动肺纤维化的信号转导的起始步骤。

关键词 矽尘; 肺纤维化; TLR2; TLR4; TLR9

中图分类号: R135.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2017)02-021-04

Effects of silica dust on expression of TLR2, 4, 9 mRNA in lung tissue of mice

ZHANG Zhaoqiang¹, ZHANG Luhua², LIN Li¹, ZHANG Chunzhi¹

(¹ School of Public Health, Jining Medical University, Jining 272067; ² Jining No. 1 People's Hospital & the Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272113, China)

Abstract: Objective To study the expression of TLR2, 4, 9 mRNA of lung in mice exposed to silica dust. **Methods** 40 mice were randomly divided into 4 groups including control group, 2h group (exposed to silica dust for 2 h every day), 4h group (exposed to silica dust for 4 h every day) and 8h group (exposed to silica dust for 8 h every day). 20 days later, all the lung of mice were taken to measure the expression of TLR2, 4, 9 mRNA by Realtime fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) technology. **Results** The relative contents of TLR2 mRNA of the control, 2h, 4h and 8h groups were (0.98 ± 0.69) , (1.18 ± 0.85) , (2.56 ± 0.54) and (3.22 ± 0.77) . There were significantly difference among them ($F = 13.70, P = 0.00$). Compared with the control group, the expression of TLR2 mRNA of the 4h and 8h groups were significantly higher ($P < 0.05$). The relative contents of TLR4 mRNA of the control, 2h, 4h and 8h groups were (0.93 ± 0.32) , (1.16 ± 1.23) , (4.80 ± 5.31) and (7.00 ± 6.22) . There were significantly difference among the 4 groups ($F = 5.06, P = 0.00$). Compared with the control group, the expression of TLR4 mRNA in the 4h and 8h groups were higher ($P < 0.05$). The relative contents of TLR9 mRNA of the control, 2h, 4h and 8h groups were (1.04 ± 0.25) , (1.29 ± 0.30) , (1.26 ± 0.41) and (2.21 ± 0.33) . There were significantly difference among them ($F = 15.82, P = 0.00$). Compared with the control group, only the expression of TLR9 mRNA of the 8h groups were higher ($P < 0.05$).

* [基金项目] 山东省卫生与计划生育委员会 (2014WS0510); 济宁医学院科研计划项目 (JY2015KJ003)

05). **Conclusion** The expression of TLR2,4,9 mRNA of the lung tissue of mice exposed to silica dust were up-regulated, which might be the initial step of the signal pathway leading to lung fibrosis.

Keywords: Silica dust; Lung fibrosis; TLR2; TLR4; TLR9

长期吸入大量的游离二氧化硅粉尘可造成肺纤维化的发生^[1-2]。肺纤维化是尘肺类职业病最主要的表现之一,具有渐进性和不可逆性的特点,最终导致呼吸衰竭,给患者和社会带来极大的危害。其发生机制目前尚未完全阐明,一般认为肺巨噬细胞在其中发挥着重要作用^[3]。作为机体主要的免疫细胞,巨噬细胞可通过表面受体的识别,对矽尘产生吞噬和清除作用,并通过释放多种细胞因子和血管活性物质,介导了肺纤维化的形成^[4]。故可认为巨噬细胞表面受体对毒物的识别是肺纤维化的起始步骤。TOLL 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是哺乳动物体内一类重要的识别受体,该受体在有 10 多种,其中 TLR2、4、9 与巨噬细胞关系最为密切^[5-6]。目前对这 3 个受体的研究主要集中于巨噬细胞对病原微生物及其产物的抗性方面,尚未见矽尘对其影响的实验报道。本文拟采用分子生物学手段,观察染矽尘小鼠肺组织内 TLR2、4、9 mRNA 表达的变化,揭示肺纤维化初始过程中的分子事件,为矽肺防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明种小鼠,体重(20±2)g,共 40 只,雌雄各半,由济宁医学院实验动物中心提供,常规饲养。动物合格许可证号:SCXK(晋)2009-0001。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 DYY-4C 电泳仪(北京六一仪器厂);微量荧光紫外分光光度计(美国 Quawell 公司);TGL-20M 台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);Arktik5020 多功能 PCR 仪(美国 Thermo 科技公司);Alphalmager MINI 凝胶

成像系统(美国 Protein Simple 公司);CFX 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2.2 主要试剂 SiO₂ 粉尘(天津市北联精细化学品开发有限公司);Trizol 试剂、M-MuLv first strand cDNA Synthesis kit 反转录试剂盒、2×SG Fast qPCR Master Mix、引物及内参设计及合成[均购自生工生物工程(上海)有限责任公司]。

1.3 方法

1.3.1 实验小鼠的染尘与分组 将实验动物随机分为对照组和 3 个暴露时间组。将各暴露时间组小鼠置于染尘柜中,用鼓风机将粉尘吹浮在染尘柜中,粉尘浓度保持在 125mg/m³^[7]。焦磷酸法测得粉尘中游离 SiO₂ > 95%,滤膜法测得直径 < 5μm 的占 95%。3 个暴露时间组依据每天的染尘时间分为 2h 组、4h 组、8h 组。对照组除不染尘,其他实验条件与暴露时间组完全相同。共染尘 20 d。

1.3.2 肺组织总 RNA 提取 染毒结束,处死小鼠取肺组织。Trizol 法提取总 RNA,微量紫外分光光度计测其纯度和浓度,凝胶电泳法监测 RNA 质量。

1.3.3 反转录反应 按试剂盒说明对获取的总 RNA 反转录生成 cDNA,冰上操作。反应条件:42℃ 反转录 45min;然后 70℃ 加热 10min 使反转录酶失活。4℃ 保存备用。

1.3.4 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 目的基因 TLR2、4、9 及内参 GAPDH 的引物见表 1;按 2×SG Fast qPCR Master Mix 试剂盒操作,RT-qPCR 反应条件:95℃ 预变性 3min,95℃ 变性 1S,60℃ 延伸 20S,共 40 个循环。添加溶解曲线,温度为 60~95℃,每升高 0.5℃,进行一次荧光摄取。每个样本设 3 个复孔和一个阴性对照,反应结束后,以对照组任一个样本为基准值,计算各样本相对含量。

表 1 各基因 PCR 引物序列

基因名称	上游引物	下游引物	引物长度 bp
TLR2	GTGCTGGAGTCTGCTGTGC	GCTTTCTTGGGCTTCCTCTT	131
TLR4	TCAGAGCCGTGGGTATCTT	CCTCAGCAGGACTTCTCAA	115
TLR9	CCTTATGATGCCCTTCGTGGT	ATCTCGGTCTCCAGACACA	132
GAPDH	AGCAGTCCCGTACACTGGCAAAC	TCTGTGGTGATGTAATGCTCTCT	179

1.4 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计学软件进行分析。

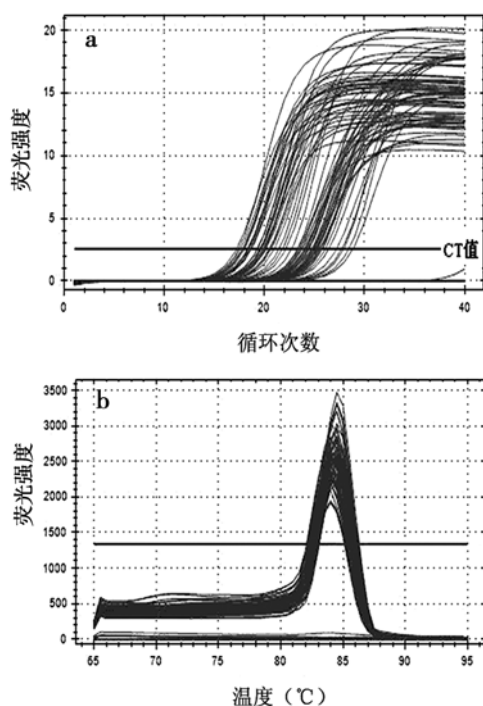
2 结果

2.1 各组小鼠的一般情况

染尘 20 d 后,实验组小鼠摄食量明显减少,体重减轻,精神萎靡;对照组小鼠无明显变化。

2.2 小鼠 TLRs mRNA 的 RT-q PCR 扩增曲线与溶解曲线

小鼠 TLRs mRNA 的 RT-qPCR 扩增曲线平滑,荧光快速增长期分布合理,达到预期的扩增效果。见图 1a。各样本溶解曲线只有 1 个峰,说明在 RT-q PCR 反应中只有目标基因扩增,反应特异性强。见图 1b。



a TLRs mRNA 的 RT-q PCR 扩增曲线;

b TLRs mRNA 的 RT-q PCR 扩增曲线与溶解曲线

图 1 TLRs mRNA 的 RT-qPCR 扩增曲线和溶解曲线

2.3 各暴露时间组实验小鼠 TLR2、4、9 mRNA 的表达

与对照组比,4h、8h 组小鼠的 TLR2 和 TLR4 mRNA 的表达升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),2h 组未见统计学差异 ($P > 0.05$)。与对照组比,仅 8h 组小鼠 TLR9 mRNA 的表达上升,差异统计学意义 ($P < 0.05$),2h、4h 组 TLR9 mRNA 的表达无统计学差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组小鼠 TLR2、4、9 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TLR2	TLR4	TLR9
对照组	10	0.98 ± 0.69	0.93 ± 0.32	1.04 ± 0.25
2h 组	10	1.18 ± 0.85	1.16 ± 1.23	1.29 ± 0.30
4h 组	10	2.56 ± 0.54 *	4.80 ± 5.31 *	1.26 ± 0.41
8h 组	10	3.22 ± 0.77 *	7.00 ± 6.22 *	2.21 ± 0.33 *
F 值	-	13.70	5.06	15.82
P	-	0.00	0.00	0.00

注: * 与对照组比较, $P < 0.05$

3 讨论

TLRs 是广泛分布于免疫细胞表面的一类重要蛋白质,当微生物突破机体的物理屏障时,TLRs 可以识别它们,并激活机体产生免疫细胞应答。目前已在哺乳类动物中发现 10 多种 TLRs,其中巨噬细胞表面上的 TLR2、4、9 研究较为广泛^[5]。这些受体针对不同的配体刺激做出反应:TLR2 可以识别的配体较为广泛,主要识别对象为脂蛋白和甘露聚糖类^[8]。TLR4 可以识别脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS),还可识别宿主坏死细胞释放的热休克蛋白 (heat shock proteins, HSP) 及体内类肝素硫酸盐和透明质酸盐降解的多糖部分,局部的内源性酶的级联活化反应也可激活 TLR4^[6]。TLR9 识别配体均较单一,主要为 DNA 中非甲基化 CpG^[5]。目前对 TLRs 的研究主要集中在生物性因素及其代谢物方面,粉尘侵入机体后是否也能为 TLRs 受体识别,尚未进行深入研究。

本文结果显示:4h、8h 组 TLR2 和 TLR4 mRNA 的表达均比对照组高,而 2h 组无统计学差异;TLR9 mRNA 的表达,8h 组比对照组高,而 2h、4h 组的差异则无统计学意义,表明染矽尘后,小鼠肺组织 TLR2、4、9 mRNA 的表达均出现一定程度的上调。有学者认为,矽尘的 Si-OH 结构可与肺脏内的水分子结合形成结晶体。该结晶体结构类似于细菌 LPS,并有可能被巨噬细胞上的 TLR2 和 TLR4 的 N 端 (富含亮氨酸重复序列的功能区域) 特异性识别^[9]。该类受体接受刺激后,将信息传递给下游的信使,通过一系列信号转导,生成相应的细胞因子,表现出相应的生物学效应。随着矽尘量的增加,巨噬细胞上原有的 TLR2 和 TLR4 已不能满足配子的需求,于是机体激活相应的 DNA,转录出更多的 TLR2 和 TLR4 mRNA,合成更多的 TLR2 和 TLR4 蛋白。这与许多学者发现的机体暴露于毒素,可导致 TLR2、TLR4 升高是一致的^[10-11]。在此

过程中,肺的组织细胞发生改变,出现凋亡和坏死^[12]。凋亡或坏死的组织细胞对于机体而言,成为可致病的终毒物,其 DNA 中所含的非甲基化 CpG,成为 TLR9 受体的配子^[5]。同理,自体组织细胞异化的 DNA 片段中的 CpG 诱发了 TLR9 mRNA 的过量表达,形成更多的 TLR9 受体。由于 TLR9 受体的变化是继发于肺组织细胞的凋亡坏死之后的破碎的 DNA 片段,故其 mRNA 的表达迟于 TLR2、TLR4 mRNA 的表达。本文结果显示,4h 组 TLR2、TLR4 mRNA 的表达就已高于对照组,而 TLR9 mRNA 的表达仅在 8h 组时才出现升高,也说明了这一点。

矽肺的发生是一个漫长进程,肺巨噬细胞分泌的与肺纤维化有关的细胞因子对矽肺的发生至关重要^[13]。本文作为较短时间的染尘实验,虽然证明了在矽尘致肺纤维化过程中出现了 TLR2、4、9 mRNA 表达水平的上调,但其在实际矽肺发生发展中作用的大小及受体激活后到肺纤维化相关细胞因子生成之间的具体信号转导途径,尚有待于进一步研究。本文 2h 组 TLR2、4、9 mRNA 的表达与对照组相比,差异均无统计学意义,可能与肺脏强大的代偿能力有关。

参考文献:

- [1] 王辉,陈雪芬,魏路清. 肺纤维化发病机制新进展[J]. 武警后勤学院学报(医学版),2013,22(1):69-73. DOI:10.3969/j.issn.2095-3720.2013.01.029.
- [2] 潘有禄,黄文海,沈正荣,等. 肺纤维化发生机制及治疗研究进展[J]. 中国药理学杂志,2012,47(23):1873-1876.
- [3] Luna-Gomes T, Santana PT, Coutinho-Silva R. Silica-induced inflammasome activation in macrophages: role of ATP and P2X7 receptor[J]. Immunobiology, 2015, 220(9):1101-1106. DOI:10.1016/j.imbio.2015.05.004.
- [4] 余杰,毛丽君,赵金垣. 二氧化硅通过肺泡巨噬细胞的识别反应启动肺内炎症损伤的机制[J]. 中国工业医学杂志,2015,28(4):265-269.
- [5] 杨玉荣,余锐萍,梁宏德. Toll-NF- κ B 信号途径及其介导的功能[J]. 细胞生物学杂志,2007,29(4):483-486. DOI:10.3969/j.issn.1674-7666.2007.04.006.
- [6] 何维. Toll 样受体和天然免疫[J]. 第二军医大学学报,2002,23(10):1054-1056. DOI:10.3321/j.issn:0258-879X.2002.10.004.
- [7] 张兆强,夏秀杰,赵星辉,等. 石雕作业工人职业危害知晓度及防护行为调查[J]. 济宁医学院学报,2014,37(1):41-43. DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2014.01.013.
- [8] Zhang N, Zhang J, Cao Z, et al. Effect of pulse high-volume hemofiltration on Toll-like receptor in patients with severe sepsis[J]. Exp Ther Med, 2016, 12(3):1377-1382. DOI:10.3892/etm.2016.3473.
- [9] Ansari AR, Ge XH, Huang HB, et al. Effects of lipopolysaccharide on the histomorphology and expression of toll-like receptor 4 in the chicken trachea and lung[J]. Avian Pathol, 2016, 45(5):530-537. DOI:10.1080/03079457.2016.1168923.
- [10] 吴丹,滕伟禹. 大鼠实验性脑出血后脑组织 TLR2、NF-B/p65 及 caspase-3 表达变化的研究[J]. 中风与神经疾病杂志,2010,27(6):484-488.
- [11] Zhang Y, Karki R, Igwe OJ. Toll-like receptor 4 signaling: A common pathway for interactions between prooxidants and extracellular disulfide high mobility group box 1 (HMGB1) protein-coupled activation[J]. Biochem Pharmacol, 2015, 98(1):132-143. DOI:10.1016/j.bcp.2015.08.109.
- [12] 金玉兰,袁聚祥,姚三巧,等. 矽肺患者肺灌洗液巨噬细胞自噬与凋亡分析[J]. 环境与职业医学,2012,29(12):757-759.
- [13] 高衍新,王瑞. 矽尘致肺纤维化机制及细胞因子在矽肺纤维化中的作用[J]. 中国工业医学杂志,2008,21(1):31-35. DOI:10.3969/j.issn.1002-221X.2008.01.013.
- [14] 余杰,毛丽君,赵金垣. 二氧化硅通过肺泡巨噬细胞的识别反应启动肺内炎症损伤的机制[J]. 中国工业医学杂志,2015,28(4):265-269.
- [15] 杨玉荣,余锐萍,梁宏德. Toll-NF- κ B 信号途径及其介导的功能[J]. 细胞生物学杂志,2007,29(4):483-486. DOI:10.3969/j.issn.1674-7666.2007.04.006.
- [16] Salimath A S, Phelps E A, Boopathy A V, et al. Dual delivery of hepatocyte and vascular endothelial growth factors via a protease-degradable hydrogel improves cardiac function in rats[J]. PLoS One, 2012, 7(11):e50980. DOI:10.1371/journal.pone.0050980.
- [17] Zhang H, Yuan YL, Wang Z, et al. Sequential, timely and controlled expression of hVEGF165 and Ang-1 effectively improves functional angiogenesis and cardiac function in vivo[J]. Gene Ther, 2013, 20(9):893-900. DOI:10.1038/gt.2013.12.
- [18] Kupatt C, Hinkel R, Vachenaue R, et al. VEGF165 transfection decreases postischemic NF-kappa B-dependent myocardial reperfusion injury in vivo: role of eNOS phosphorylation[J]. FASEB J, 2003, 17(6):705-707. DOI:10.1096/fj.02-0673fje.

(收稿日期 2016-8-09)

(责任编辑:石俊强)

(上接第 20 页)

- [16] Salimath A S, Phelps E A, Boopathy A V, et al. Dual delivery of hepatocyte and vascular endothelial growth factors via a protease-degradable hydrogel improves cardiac function in rats[J]. PLoS One, 2012, 7(11):e50980. DOI:10.1371/journal.pone.0050980.
- [17] Zhang H, Yuan YL, Wang Z, et al. Sequential, timely and controlled expression of hVEGF165 and Ang-1 effectively improves functional angiogenesis and cardiac function

(收稿日期 2016-11-02)

(责任编辑:石俊强)