Toll 样受体 4 介导内毒素对内皮细胞 NF-κB 的激活*

杨清武** 朱佩芳 王正国 蒋建新

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所, 重庆 400042)

摘要 为探讨 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 在内毒素 (LPS) 对内皮细胞 NF-κB 激活中的作用, 以 LPS 刺激培养的 ECV-304 细胞为模型, 运用 RT-PCR 和蛋白质印迹技术检测了内皮细胞 TLR4 的表达及 LPS 对其表达的影响. 同时利用基因转染和抗体阻断方法进一步观察了 TLR4 在 LPS 对内皮细胞 NF-κB 激活中的作用. 研究发现, LPS 能明显上调内皮细胞 TLR4 的表达, 呈一定的时间和剂量依赖性. 转染 TLR4 的功能突变体和运用抗 TLR4 单抗能明显抑制 LPS 对内皮细胞 NF-κB 的激活. 提示 TLR4 介导了 LPS 对内皮细胞 NF-κB 激活, 可能在 LPS 对内皮细胞激活/损伤效应中具有重要的地位.

关键词 Toll 样受体 4 (TLR4), 内毒素, 内皮细胞, 核因子 κB (NF-κB)

学科分类号 R392

内毒素或 LPS 是革兰阴性菌外膜的主要成分, 是引起脓毒症休克的主要原因. 业已表明, 内毒素 (LPS) 与 LPS 结合蛋白 (LBP) 和 CD14 相互作用后, 细胞则被激活[1,2]. 内皮细胞作为主要炎症反应细胞, 在 LPS 引起的内毒素休克等病理过程中具有重要的作用[3]. 但是, 内皮细胞不表达膜 CD14 (mCD14), LPS 对它的激活需要可溶性 CD14 (sCD14) 的参与, 同时 CD14 是一种细胞表面 GPI 锚定蛋白, 缺乏跨膜和胞内区, 不能直接将胞外信号转导至胞内, 提示在内皮细胞上肯定存在 LPS 信号转导的"共受体". Toll 样受体 4 (TLR4) 的发现和研究给该领域带来了新的机遇. 研究表明: TLR4 是哺乳动物 LPS 的受体和信号转导分子, 在介导 LPS 的病理生理效应中具有重要作用[4~6]. 那么, 内皮细胞是否表达 TLR4, 如果表达, 其是否介导了 LPS 对内皮细胞的激活? 因此, 本研究对上述问题进行了初步研究, 为进一步研究 LPS 对内皮细胞激活/损伤机理奠定基础, 也为揭示 LPS 的膜信号转导机制和脓毒症休克的防治提供新思路.

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

人脐静脉内皮细胞株 ECV-304, 购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所. 10% 小牛血清的 RPMI-1640 购自美国 Hyclone 公司; 抗人 TLR4 单克隆抗体由本室自制 (以 TLR4 的 B 细胞优势表位, 即胞外区第 189~ 202 的肽段为免疫原, 免疫 Balb/c 鼠后, 经细胞融合、克隆筛选, 获得一株能分泌抗 TLR4 单抗的杂交瘤细胞株: B4), 经多种方法证实其特异性和阻断效应 (另文发表). RT-PCR 试剂盒为 Roche 公司产品; 质粒抽提试剂盒购自 Waston 公司; Furegene 6 转染试剂和 β-半乳糖苷酶 ELISA 检测试剂盒购自 Roche 公司; NF-κB 活性 ELISA 测定试剂盒购自美国 Active Motif 公司.

1.2 质粒与菌株

pCMV-β-半乳糖苷酶质粒购自 Gene 公司, C3H/HeJ 和 C3H/HeN (前者对 LPS 高度耐受, 其 TLR4 胞内区第 712 位氨基酸发生突变, 后者对 LPS 效应呈正常反应) 鼠 TLR4 cDNA 质粒由美国 Scripps 研究所 Beutler 教授提供. 人 TLR4 胞外区缺失突变体质粒 (TLR4⁻, 其 C 端 155 位氨基酸发生缺失突变而失去传递 LPS 信号的功能)、人 TLR4 cDNA 质粒由意大利 Mario Neg 研究所 Muzio 教授提供. 大肠杆菌 DH5α 由本室保存.

1.3 RT-PCR 分析

ECV304 细胞与不同浓度的 LPS 孵育相应时间后, 按 Tripure RNA 提取试剂盒说明书在无 RNA 酶的环境下提取细胞总 RNA 后, 各样品取 5 μg RNA, 用逆转录酶和 oligo (dT) 按试剂盒说明书

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G1999054203) 和全军医药卫生科研基金资助项目 (01Q105).

** 通讯联系人.

Tel: 023-68757444, 023-68757431

E-mail: Yangqwml@mail.china.com

收稿日期: 2001-12-09, 接受日期: 2002-01-23

进行 cDNA 合成. 于后各取 2 μl 逆转录产物进行 PCR 扩增, 反应条件为: 95 ℃, 45 s、54 ℃, 45 s、72 ℃, 1 min, 共 32 个循环, 最后 72 ℃ 延长 10 min. 反应体系用 β-肌动蛋白作为内参照. PCR 引物的序列分别如下. TLR4 正义链: 5′-TGGATACGTTTCCTTATAAG-3′; TLR4 反义链: 5′-GAAATGGAGGCA CCCCTTC-3′. β-肌动蛋白引物为 CLONTECH 公司产品. 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察, 并用 Bio-Rad2000 图象分析系统进行扫描分析.

1.4 蛋白质印迹分析

按常规方法进行. 一抗为抗 TLR4 单抗, 稀释度为 1∶2 000, 二抗为山羊抗小鼠抗体, 采用 1∶2 000稀释度. 最后用增强型化学发光检测试剂盒显影. 结果用 Bio-Rad 2000 成像系统进行分析处理, 结果以目的条带的平均光密度值 (ODu/mm^2) 表示.

1.5 内皮细胞转染

当 ECV-304 细胞于 6 孔培养板生长呈单层时, 按 FuGene 6 转染试剂盒说明转染以下质粒: pCMV-β-半乳糖苷酶质粒 (0.05 μg) 和 pCMV 空载体质粒 (0.5 μg) 及 C3H/HeJ (0.05、0.1、0.5、1.0 μg) TLR4 或 C3H/HeN TLR4 (1 μg) 或人 TLR4 胞外区缺失突变体质粒 (TLR4$^-$, 0.05、0.1、0.5、1 μg) 或人 TLR4 (1 μg). 共转染 36 h 后, 用相应浓度的内毒素 (LPS) 刺激6 h. 用 ELISA 法测定 β-半乳糖苷酶活性, 以平衡转染效率.

1.6 NF-κB 活性测定

按 NF-κB 活性 ELISA 测定试剂盒说明书进行. 具体如下: 用预冷的 PBS 轻洗不同方法处理的 ECV304 细胞 3 次, 按常规方法提取细胞核蛋白, 经蛋白质定量后, 按 2.5 μg 每孔加入预先处理的 96 孔酶联板 (已包被 NF-κB 特异结合序列的 DNA), 37 ℃孵育 1 h; 用 200 μl/孔清洗液洗涤 3 次后, 加入 100 μl/孔 1∶1 000 的抗 NF-κB p65 抗体, 37 ℃孵育 1 h; 用清洗液洗涤 3 次后, 再加入 100 μl/孔的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗, 37 ℃孵育 1 h 后; 加入 100 μl/孔显色液 10 min 后, 再加入 100 μl/孔终止液, 于 450 nm 检测 A 值. 其活性用 NF-κB 相对活性 (relative NF-κB activity) 表示: A (NF-κB) 值与 A (β-半乳糖苷酶) 的百分比.

1.7 β-半乳糖苷酶 ELISA 检测

按 β-半乳糖苷酶 ELISA 检测试剂盒说明书进行. 其测定结果用于 **1.6** 节中NF-κB相对活性的计算, 以平衡转染效率.

1.8 统计分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 6.0 统计处理软件进行统计分析.

2 结 果

2.1 LPS 上调内皮细胞 TLR4 的表达

RT-PCR 检测和蛋白质印迹分析显示: 内皮细胞有 TLR4 表达; 当 LPS 刺激后, 其表达水平明显增强, 并有一定的时间和剂量依赖关系 (图 1、图 2 和表 1).

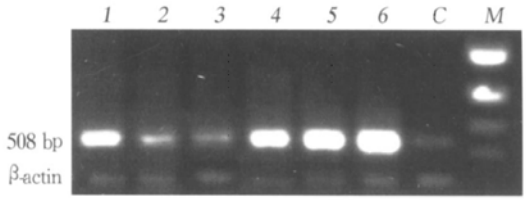

Fig. 1 Effect of LPS on the expression of TLR4 in ECV304 cells with RT-PCR assay

1, *2*, *3*: 100 μg/L LPS for 12 h, 6 h, 3 h; *4*, *5*, *6*: 10, 100, 1 000μg/L LPS for 6 h respectively; *C*: control; *M*: PCR marker.

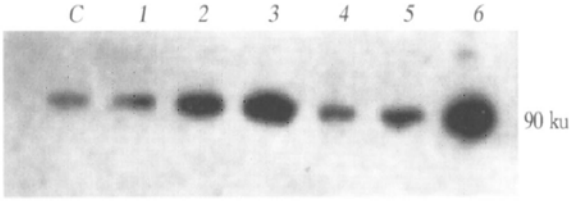

Fig. 2 Effect of LPS on the expression of TLR4 in ECV304 cells with Western blot analysis

C: control; *1*, *2*, *3*: 10, 100, 1 000 μg/L LPS for 6 h respectively; *4*, *5*, *6*: 100 μg/L LPS for 3 h, 6 h, 12 h respectively.

Table 1 Effect of LPS on the expression of TLR4 in ECV304 cells with Western blot analysis

Groups	TLR4 (ODu × mm^2)
Control	2.13 ± 0.16
10 μg/L LPS, 6 h	3.86 ± 0.31[1)]
100 μg/L LPS, 6 h	11.45 ± 1.57[1)]
1 000 μg/L LPS, 6 h	18.38 ± 1.86[1)]
100 μg/L LPS, 3 h	4.24 ± 0.32[1)]
100 μg/L LPS, 6 h	7.65 ± 0.14[1)]
100 μg/L LPS, 12 h	23.16 ± 2.05[1)]

[1)] means $P < 0.01$ vs control, ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$).

2.2 TLR4 介导 LPS 对内皮细胞 NF-κB 的激活

运用基因转染 TLR4 的功能突变体转染内皮细胞及单抗阻断方法，观察了 LPS 作用细胞后 NF-κB 活性的变化．结果表明：C3H/HJ TLR4cDNA 和 TLR4 胞外区缺失突变体质粒（TLR4⁻）转染细胞后，NF-κB 活性明显降低，呈剂量依赖性，而转染 C3H/HN 和 TLR4cDNA，NF-κB 活性无明显改变．同时，运用单克隆抗体后，NF-κB 活性也明显降低（图 3~ 5）．

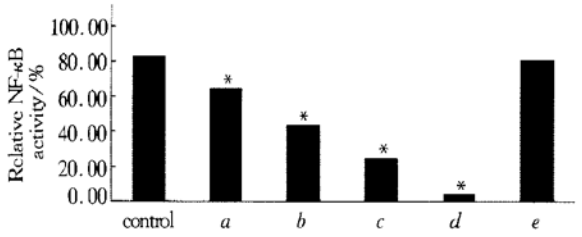

Fig. 3 The changes of NF-κB activity in ECV304 cells after transfection of C3H/HJ or C3H/HN TLR4cDNA

Control: normal cell (transfection of pCMV vector); *a*~ *d*: ECV-304 cells transfection of C3H/HJ TLR4cDNA 0.05, 0.1, 0.5, 1 μg respectively; *e*: ECV-304 cells transfection of C3H/HN TLR4cDNA 1 μg . The cell stimulated by 1 000 μg/L LPS for 6 h . * means $P < 0.01$ vs. control group.

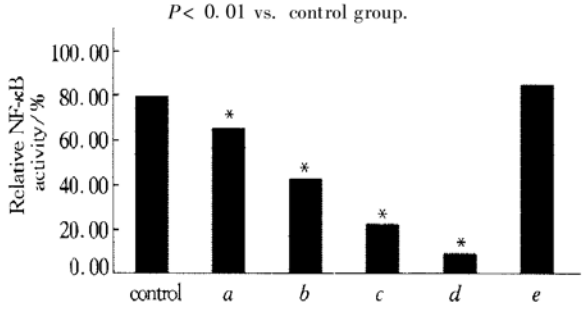

Fig. 4 The changes of NF-κB activity in ECV304 cells after transfection of TLR4⁻

a deletion in the intracellular domain, lacking the 155 C-terminal amino-acid of the wild type human TLR4, and TLR4cDNA. Control: normal cell (transfection of pCMV vector); *a*~ *d*: ECV-304 cells transfection of TLR4⁻ cDNA 0.05, 0.1, 0.5, 1 μg respectively; *e*: ECV-304 cells transfection of TLR 4 cDNA 1 μg . The cell stimulated by 1 000 μg/L LPS for 6 h. * means $P < 0.01$ vs. control group.

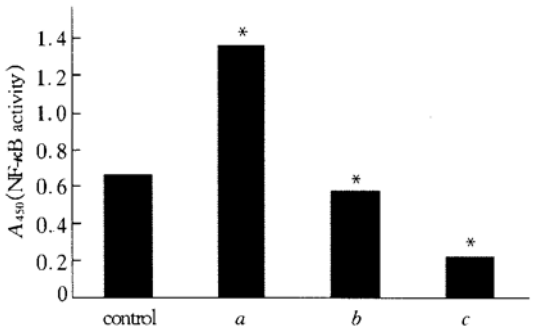

Fig. 5 The changes of NF-κB activity in ECV-304 cells after LPS stimulation pretreated with monoclonal antibody of TLR4

Control: normal cells; *a*: LPS 1 000 μg/L for 6 h; *b*, *c*: LPS 1 000 μg/L, 25 mg/L and 50 mg/L antibody of TLR4 respectively. * means $P < 0.01$ vs. control group.

3 讨 论

3.1 NF-κB 的活性测定

精确测定细胞、组织 NF-κB 活性在信号转导与药物开发等诸多领域研究中具有重要的地位．目前主要有三种检测方法：蛋白质印迹分析、凝胶迁移阻滞检测（EMSA）和报告基因分析．上述方法均不同程度地存在耗时多、不适合做高通量的检测或有放射性污染等缺陷；报告基因虽克服了耗时、高通量等缺陷，但受基因转染效率高低的限制．我们运用 Active Motif 公司生产的 ELISA 检测试剂盒，主要采取专利技术将 NF-κB 的特异结合序列包被在酶联板上，通过标准的 ELISA 检测程序，不仅利用了 ELISA 敏感性高、省时（一般只需 4 h）的特点，而且特别适合高通量的检测．同时我们也发现该方法需检测样本的蛋白量比一般方法少，敏感度更高．特别适合信号转导研究和高通量的药物筛选[7]．

3.2 TLR4 在 LPS 对内皮细胞激活效应中的作用

内皮细胞 LPS 信号受体的寻找和鉴定一直是该领域研究的热点问题[3]．但至今尚不明了．进一步深入研究，对阐明 LPS 对内皮细胞激活/损伤机理，和寻找拮抗的靶点有重要意义．研究表明 TLR4 是 LPS 的受体或信号转导分子，在介导 LPS 的信号转导中具有重要作用[4~6]．有关 TLR4 在 LPS 对内皮细胞激活效应/损伤中的作用研究，Fature 等[8] 对人皮肤微血管内皮细胞 TLR4、TLR2 的表达及其在 LPS 对细胞激活中的作用进行了初步研究，认为 TLR4 在 LPS 对该细胞激活中具有重要作用，而 TLR2 的作用不明显．但对于 LPS 对内皮细胞激活的受体机制还远未阐明．本研究结果显示 LPS 能明显上调内皮细胞 TLR4 表达，并呈一定的剂量依赖性．初步表明 TLR4 与 LPS 对内皮细胞的激活有一定联系．因 C3H/HJ TLR4 胞内区第 712 位氨基酸发生突变，由组氨酸代替了脯氨酸，造成了该鼠对 LPS 高度耐受[9,10]；同时 TLR4⁻ 是人 TLR4 胞外区的缺失突变体，由于其 C 端 155 位氨基酸发生缺失突变而失去传递 LPS 信号的功能[8]，本研究运用基因瞬时转染该突变体后，LPS 对内皮细胞 NF-κB 的活化明显降低，并呈剂量依赖性，表明 TLR4 在 LPS 对内皮细胞 NF-κB 激活中具有重要的作用．抗人 TLR4 单克隆

抗体也明显抑制 LPS 对内皮细胞的激活，进一步证实了上述的结论. 因内皮细胞 NF-κB 活化会进一步导致相关基因的表达增强，如 IL-1，IL-6 等细胞因子或黏附分子，后者引起内皮细胞激活/损伤，因此，由此推论 TLR4 介导了 LPS 对内皮细胞的激活，在该效应中可能具有重要的地位. 至于抗 TLR4 单抗或转染功能突变体能否引起内皮细胞相应细胞因子分泌减少，相关研究正在进行之中. 本研究也进一步提示 TLR4 可望成为拮抗 LPS 对内皮细胞激活/损伤和脓毒症休克防治的一个新的靶点，而将引起广大研究者的关注.

致谢 美国 Scripps 研究所 Beutler 教授提供了 C3H/HeJ 和 C3H/HeN 鼠 TLR4 cDNA 质粒及有益的讨论. 意大利 Mario Neg 研究所 Muzio 教授提供人 TLR4 胞外区缺失突变体质粒 (TLR4⁻)、TLR4 cDNA 质粒. 本所吕凤林博士在抗体制备和鉴定上给予了帮助. 徐祥硕士和王伏龙硕士在实验中的友好帮助. 在此表示衷心感谢.

参 考 文 献

1 Wenzel R P, Pinsky M R, Ulevitch R J, *et al*. Current understanding of sepsis. Clin Infect Dis, 1996, **22** (3): 407~412

2 Rietschel E T, Brade H, Holst O, *et al*. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. Curr Top Microbiol Immunol, 1996, **216** (1): 39~81

3 姜勇. 内毒素激活内皮细胞的信号机制的研究进展. 中华医学杂志, 1999, **79** (1): 76~78
Jiang Y. Natl Med J China, 1999, **79** (1): 76~78

4 Aderem A, Ulevitch R J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature, 2000, **406** (6797): 782~787

5 龚小卫, 姜勇. TLR4 在哺乳动物对脂多糖反应中的作用. 生物化学与生物物理进展, 2001, **28** (3): 299~303
Gong X W, Jiang Y. Prog Biochem Biophys, 2001, **28** (3): 299~303

6 Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. Curr Opini Immun, 2000, **12**: 20~26

7 Renard P, Ernest I, Houbion A, *et al*. Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB. Nucleic Acids Res, 2001, **29** (4): E21

8 Fature E, Equils Q, Sileling P A, *et al*. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-κB through Toll like receptor 4 (TLR-4) in cutured human dermal endothelial cells, different expression of TLR-4 and TLR-2 in the endothelial cells. J Biol Chem, 2000, **275** (15): 11058~11063

9 Poltorak A, He X, Smirnova I, *et al*. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science, 1998, **282** (5396): 2085~2088

10 Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, *et al*. Toll-like receptor 4 (TLR4) -deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. J Immunol, 1999, **162** (7): 3749~3752

Toll-like Receptor 4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Cell Activation in Human Endothelial Cells*

YANG Qing-Wu**, ZHU Pei-Fang, WANG Zheng-Guo, JIANG Jian-Xin
(Research Institute of Surgery, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract In order to investigate the role of Toll-like recepter 4 (TLR4) in lipopolysaccharide (LPS) -induced NF-κB activation in human endothelial cells, LPS-stimulated ECV-304 cells were used as experimental model and the expression of TLR4 and effect of LPS on the expression were analysed with RT-PCR and Western blot assay. Moreover, the role of TLR4 in LPS-induced NF-κB activation in endothelial cells was explored with gene transfection of non-signaling mutant forms of TLR4 and anti-TLR4 monoclonal antibody. The results showed that LPS could upregulat the expression of TLR4 in time and dose-depentent manner and that transfection of non-signaling mutant forms of TLR4 and anti-TLR4 monoclonal antibody inhibited LPS-induced NF-κB activation in human endothelial cells obviously. These data indicated that TLR4 mediates LPS-induced NF-κB activation in human endothelial cells and it may play important role in endothelial cell activation and injury induced by LPS.

Key words Toll-like recepter 4 (TLR4), endotoxin, endothelial cell, nuclear factor kappa B (NF-κB)

* This work was supported by the Special Funds for Major State Basic Research of China (G1999054203) and Medical Scientific Research Fund of PLA (01Q105).

** Corresponding author. Tel: 86-23-68757444, E-mail: yangqwml@mail.china.com

Received: December 9, 2001 Accepted: January 23, 2002