

· 实验研究 ·

TLR3 基因敲除通过改善线粒体生物学特性减轻肺缺血-再灌注肺损伤

张喜洋 陈婵 牧杰 张亚兵 刘斌

【摘要】目的 探讨 Toll 样受体 3 (toll-like receptor 3, TLR3) 对小鼠肺缺血-再灌注 (ischemia reperfusion, IR) 后线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 和琥珀酸脱氢酶 (succinate dehydrogenase, SDHA) 表达的影响。**方法** 选取 C57BL/6J 野生型 (WT) 和 TLR3 基因敲除 (TLR3^{-/-}) 成年小鼠各 16 只, 体重 18~22 g, 随机分为四组 ($n=8$): WT 小鼠 IR 组 (WIR 组) 和 WT 小鼠假手术组 (WS 组)、TLR3^{-/-} 小鼠 IR 组 (TIR 组) 和 TLR3^{-/-} 小鼠假手术组 (TS 组)。WIR 组和 TIR 组采用夹闭左侧肺门 1 h, 再灌注 2 h 的方法制备小鼠肺 IR 损伤模型, WS 和 TS 组仅开胸不夹闭左侧肺门。再灌注 2 h 后行动脉血气分析、检测湿干重比值、观察肺组织病理学变化; TUNEL 法测定细胞凋亡并计算相应的凋亡指数; Western blot 和 RT-PCR 方法检测肺组织中 TFAM 和 SDHA 蛋白含量和 mRNA 的表达水平。**结果** 与 WS 组比较, WIR 组细胞凋亡指数明显升高 ($P < 0.05$), TFAM 和 SDHA 蛋白含量和 mRNA 表达量明显降低; 与 WIR 组比较, TIR 组细胞凋亡指数明显降低 ($P < 0.05$), TFAM 和 SDHA 蛋白含量和 mRNA 的表达量明显增加 ($P < 0.05$)。**结论** TLR3 基因敲除可通过上调 TFAM 和 SDHA 的表达, 改善线粒体功能, 抑制小鼠肺 IR 时细胞凋亡从而减轻肺损伤。

【关键词】 Toll 样受体 3; 线粒体转录因子 A; 琥珀酸脱氢酶; 肺缺血-再灌注损伤

TLR3 gene knockout can alleviate lung ischemia-reperfusion injury by improving mitochondrial biological characteristics ZHANG Xiyang, CHEN Chan, MU jie, ZHANG Yabing, LIU Bin. Department of Anesthesiology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China
Corresponding author: LIU Bin, Email: liubinxxy@163.com

【Abstract】Objective To evaluate the effect of TLR3 on the expressions of mitochondrial transcription factor A (TFAM) and succinate dehydrogenase (SDHA) during lung ischemia-reperfusion (IR) in mice. **Methods** A total of 16 TLR3^{-/-} mice and 16 WT mice, weight between 18 and 22 g, were divided into four groups ($n = 8$): WT mice in IR group (group WIR) and sham group (group WS), TLR3^{-/-} mice in IR group (group TIR) and sham group (group TS). In groups WIR and TIR, the left pulmonary hilum was occluded by a noninvasive microvascular clip for 1 h, then the lung regained ventilation and reperfusion for 2 h; Mice in the groups WS and TS experienced the same procedure, but there was no process of clipping. After IR, the mice were sacrificed, arterial blood gas (ABG) levels were immediately measured, and left lungs were isolated for weigh wet/dry, examination the changes of histology, determination of cell apoptosis (by TUNEL) and TFAM and SDHA expressions (by Western blot and real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction). The apoptosis index was calculated. **Results** Compared with the group WS, the protein content and mRNA expression of TFAM and SDHA markedly decreased ($P < 0.05$), and substantially increased the apoptosis index in group WIR ($P < 0.05$); In addition, compared with group WIR, TLR3 deficiency significantly increased protein content and mRNA expression of TFAM and SDHA ($P < 0.05$), and dramatically decreased the apoptosis index in group TIR ($P < 0.05$). **Conclusion** TLR3 deficiency can inhibit cell apoptosis then attenuate lung IR injury in mice, the mechanism may be related to up-regulating the expression of TFAM and SDHA.

【Key words】 Toll-like receptor 3; Mitochondrial transcription factor A; Succinate dehydrogenase; Lung ischemia reperfusion injury

肺缺血-再灌注 (ischemia reperfusion, IR) 损伤是导致原发性移植肺功能障碍的主要原因^[1]。此外,

肺 IR 损伤也是导致体外循环下心脏手术、休克以及心肺复苏等患者发病率和死亡率居高不下的重要原因之一^[2]。因此,肺 IR 损伤的机制研究是近年来的热点问题之一,越来越多的证据表明,Toll 样受体 3 (toll-like receptor 3, TLR3) 不仅在机体免疫调控中扮演重要的角色,而且在重要脏器的 IR 损伤中发挥一定的作用^[3-5]。本实验通过建立小鼠肺 IR 损伤模型,探

DOI: 10.12089/jca.2020.01.016

基金项目:国家自然科学基金(81801962);广东省医学科学研究基金(A2018243)

作者单位:510515 广州市,南方医科大学南方医院麻醉科(张喜洋、牧杰);四川大学华西医院麻醉科(陈婵、张亚兵、刘斌)

通信作者:刘斌,Email: liubinxxy@163.com

讨 TLR3 基因敲除对小鼠肺 IR 后线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 和琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, SDHA) 表达的影响。

材料与方 法

实验试剂与仪器 小动物呼吸机, 血气分析仪, PCR 反应扩增仪, TaKaRa SybrGreen PCR Master Mix (2X), 盐酸氯胺酮注射液, 盐酸甲苯噻嗪, TUNEL 凋亡试剂盒, 苏木精及伊红、二甲苯。

动物与分组 将入选的 C57BL/6J 野生型 (WT) (成都达硕实验动物有限公司, 中国) 和 TLR3 基因敲除 (TLR3^{-/-}) (Jackson 实验室, 美国) 小鼠分别随机各分两组 ($n = 8$): 野生型 WT 小鼠 IR 组 (WIR 组) 和 WT 小鼠假手术组 (WS 组)、TLR3^{-/-} 小鼠 IR 组 (TIR 组) 和 TLR3^{-/-} 小鼠假手术组 (TS 组), 所有动物饲养和处置过程均符合规范。WIR 和 TIR 组缺血-再灌注 3 h 后麻醉取材; WS 和 TS 组仅暴露左侧肺门而不夹闭, 其余处理同 WIR 和 TIR 组。

模型制作 参照 Xu 等^[6] 的方法, 采用侧俯卧位左后背区开胸制备小鼠肺 IR 损伤模型。通过腹腔注射的方式, 用配制好的氯胺酮 (120 mg/kg) 和甲苯噻嗪 (4 mg/kg) 的混合液麻醉小鼠, 气管插管成功后连接小动物呼吸机行机械通气。采用左侧后背区小切口开胸的方法, 平腋窝约第 3 肋间打开胸腔, 暴露左肺组织, 用显微动脉夹从上往下顺势阻断左侧肺门 60 min, 然后松开显微动脉夹再灌注 120 min, 假手术组只打开胸腔暴露而不夹闭左侧肺门。

动脉血氧合指数的测定 肺 IR 结束时从左心室抽取动脉血 0.3 ml 行血气分析, 测定动脉血 PaO₂、PaCO₂、pH 值。本实验在机械通气时 FiO₂ 为 40%, 根据 PaO₂/FiO₂ 计算氧合指数 (OI)。

肺组织湿/干重比 (W/D) 的测定 所有小鼠肺灌注结束后, 取左肺上叶肺组织, 称其湿重后置于 70 °C 烘箱烘烤 72 h 后称其干重, 计算湿干重比值。

肺组织形态学观察 取一部分左下肺组织, 用 4% 的甲醛溶液固定 24 h 后, 常规石蜡包埋与切片, HE 染色, 400 倍光学显微镜下观察肺组织的形态学改变, 并拍照留底。

细胞凋亡测定 取部分肺组织切片, 按照 TUNEL 检测试剂盒说明书进行操作, 400 倍荧光镜下进行观察, 胞核呈绿色荧光点为凋亡细胞, 选择 5 个高倍视野, 计数凋亡细胞和总细胞, 计算细胞凋亡指数 = 凋亡细胞计数 ÷ 总细胞计数 × 100%, 取 5 个视野的平均值。

肺组织 TFAM 和 SDHA 蛋白含量检测 将实验样本研磨后置于装有 1 000 μl 组织裂解液的离心管中, 匀浆并静置 30 min, 4 °C 下 15 000 r/min 离心 15 min 得到蛋白溶液。将等量蛋白样品经 10% SDS-PAGE 分离后转移至硝酸纤维素膜。5% 脱脂奶中封闭 2 h, 加入相应的一抗 (抗 β-actin、抗 TFAM 抗体和抗 SDHA 抗体, 1 : 1 000 稀释) 4 °C 孵育过夜。膜漂洗后, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 2 h, 酶法显色扫描。采用 Image J 图像分析系统进行分析, 以目的蛋白条带灰度值与 β-actin 条带灰度值的比值反映 TFAM 和 SDHA 蛋白相对含量。

肺组织 TFAM 和 SDHA mRNA 的表达 取 100 mg 肺组织, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 采用逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA。引物由上海生工生物工程有限公司合成, TFAM 上游为 5'-GCAGATGGCT-GAAGTTGGACGAAGTG-3', 下游为 5'-GCATGGACACTCTCCGTTCCAGTTCT-3'; SDHA 上游为 5'-GACAGGGGAATGGTTTGG-3', 下游为 5'-CAGC-CCGCAC TTTGTAATC-3', 扩增片段长度 420 bp。采用荧光实时 PCR 仪进行扩增。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 充分延伸 30 s, 共 40 个循环, 72 °C 终止延伸 10 min。使用 Sequence Detection 1.2.3 软件分析 PCR 过程各检测样本的 CT (Threshold cycle) 值, 以 2^{-ΔΔCT} 计算检测样本的相对 mRNA 表达。

统计分析 采用 SPSS 19.0 和 Graphpad Prism 5.0 进行统计分析和作图。正态分布计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用双因素方差分析, 组间多重比较采用 Bonferroni 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

与 WS 组比较, WIR 组小鼠 W/D 比值明显增加 ($P < 0.05$), OI 明显降低 ($P < 0.05$); 与 WIR 组比较, TIR 组 W/D 比值明显降低 ($P < 0.05$), OI 明显升高 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 四组小鼠肺组织 W/D 和 OI 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	肺组织 W/D	OI
WS 组	8	4.0 ± 0.7	377.9 ± 43.7
TS 组	8	3.8 ± 0.6	390.3 ± 38.6
WIR 组	8	7.6 ± 1.3 ^a	236.7 ± 36.9 ^a
TIR 组	8	5.5 ± 0.7 ^b	326.5 ± 46.5 ^b

注: 与 WS 组比较, ^aP < 0.05; 与 WIR 组比较, ^bP < 0.05

WS 和 TS 组均未见明显的肺泡水肿及结构破坏,未见炎性细胞浸润和毛细血管充血等;WIR 组可见肺泡广泛水肿、结构破坏并融合,大量的炎性细胞聚集、浸润,并伴有红细胞的渗出等;TIR 组肺泡及肺间质轻度水肿,偶见炎性细胞浸润,未见肺出血等(图 1)。

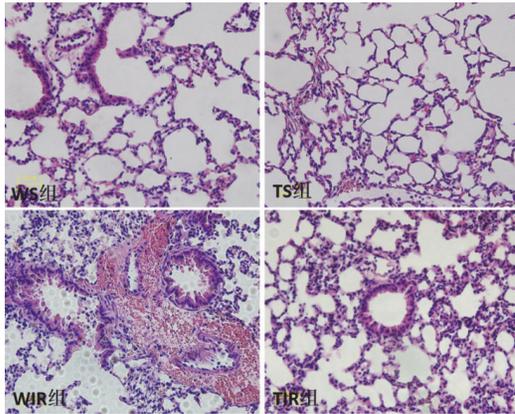
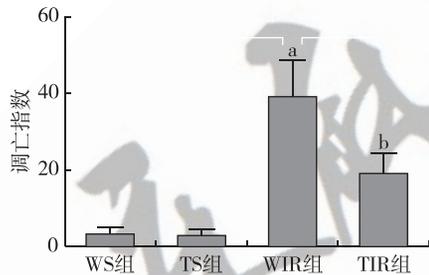


图 1 四组小鼠肺组织形态学改变的比较 (HE, ×400)

与 WS 组比较, WIR 组细胞凋亡指数明显升高 ($P < 0.05$), 肺组织 TFAM 和 SDHA 蛋白含量和 mRNA 表达量明显降低 ($P < 0.05$); 与 WIR 组比较, TIR 组细胞凋亡指数明显下降 ($P < 0.05$), 肺组织 TFAM 和 SDHA 蛋白含量和 mRNA 表达量明显增加 ($P < 0.05$) (图 2—6)。



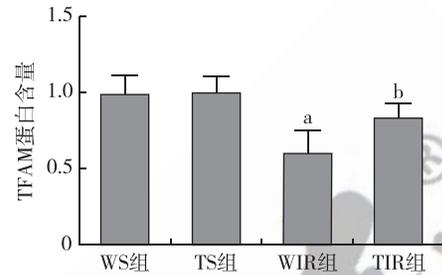
注:与 WS 组比较,^a $P < 0.05$; 与 WIR 组比较,^b $P < 0.05$

图 2 四组小鼠肺组织细胞凋亡的比较

讨 论

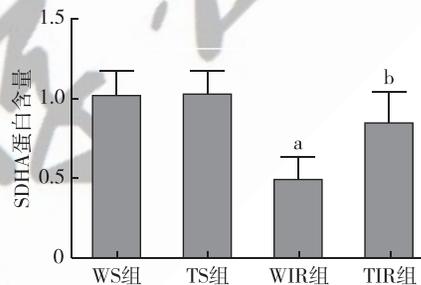
本研究结果表明, WT 小鼠肺 IR 后肺组织病理学损伤、湿干重比值均显著的增加, 动脉血氧合指数明显的下降, 提示动物造模成功。同时, IR 显著的降低了 WT 小鼠肺组织 TFAM 和 SDHA 的表达水平, 而 TLR3 基因敲除可以明显的增加肺组织 TFAM 和 SDHA 的表达, 减轻肺 IR 损伤。

研究表明^[7], 肠 IR 后肠组织 TFAM 和 SDHA 的蛋白含量和 mRNA 表达量显著降低, 线粒体功能受



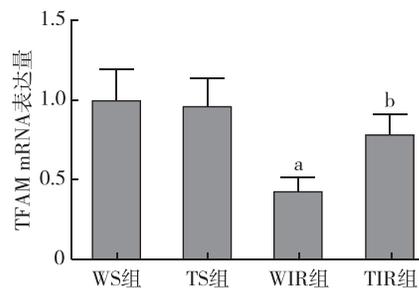
注:与 WS 组比较,^a $P < 0.05$; 与 WIR 组比较,^b $P < 0.05$

图 3 四组小鼠肺组织 TFAM 蛋白含量的比较



注:与 WS 组比较,^a $P < 0.05$; 与 WIR 组比较,^b $P < 0.05$

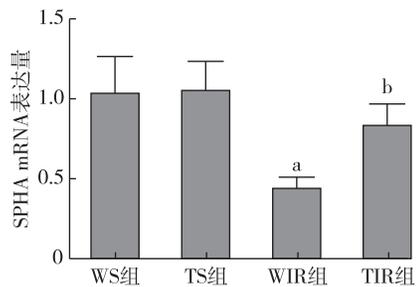
图 4 四组小鼠肺组织 SDHA 蛋白含量的比较



注:与 WS 组比较,^a $P < 0.05$; 与 WIR 组比较,^b $P < 0.05$

图 5 四组小鼠肺组织 TFAM mRNA 表达量的比较

损,进而导致肠及肺组织凋亡的发生。TFAM 和 SDHA 是反映线粒体生物学特性的两项敏感指标,前者是反映线粒体生物合成的标志物,后者是反映线粒体质量的重要指标,二者的表达水平在一定程度上代表线粒体的功能状态,因此本研究选取二者作为反映线粒体损伤的评价指标。和文献报道一



注:与 WS 组比较,^a $P < 0.05$; 与 WIR 组比较,^b $P < 0.05$

图 6 四组小鼠肺组织 SDHA mRNA 表达量的比较

致,本研究结果显示 WT 小鼠肺 IR 后肺组织 SDHA 和 TFAM 的 mRNA 表达量明显降低,初步表明线粒体的功能在肺 IR 后明显受损。

近年来,越来越多的证据表明线粒体调控的凋亡机制在脏器 IR 损伤中扮演重要的角色^[8]。Tian 等^[9]证实,腹腔注射美蓝可通过抑制线粒体渗透性转换孔的开放,一定程度上保留线粒体的膜电位,减轻线粒体的损伤,对离体小鼠肺缺血-再灌注导致的凋亡有明显的抑制作用。此外, Cloonan 等^[10-11]研究线粒体是 TLRs 信号通路的感受器和调控者,当人的肝细胞暴露于 TLR3 的配体 Poly I:C 后发现线粒体的功能发生紊乱,提示 TLR3 可能调控人类肝细胞中线粒体的生物学特性。Liang 等^[12]研究表明,单细胞来源的巨噬细胞通过增加 TLR3 的表达可介导线粒体活性氧物质的产生,进而诱导机体的炎症反应,在小柳原田病的发病过程中发挥重要的作用。Chuang 等^[13]发现双链 RNA 可以调控肿瘤细胞 TLR3 的表达,而线粒体在调控 TLR3 介导的肿瘤细胞凋亡过程中扮演重要的角色。Kang 等^[14]进一步证实,TLR3 结合双链 RNA 后通过介导线粒体 TRIF/RIPK1/FADD 信号通路调控细胞凋亡和炎症反应,敲除 TLR3 下游 RIPK1 基因可显著减轻凋亡和炎症反应。本研究同样发现,肺 IR 后肺组织细胞凋亡指数明显升高,而 TLR3 基因敲除可以明显的增加肺组织 TFAM 和 SDHA 的表达,降低肺组织 TUNEL 阳性细胞数,提示线粒体在 TLR3 基因敲除减轻肺 IR 损伤中可能发挥重要的作用。

综上所述,本实验对 TLR3 介导的凋亡机制在肺 IR 损伤中的作用进行了初步探讨,研究表明 TLR3 基因敲除可通过抑制细胞凋亡减轻小鼠肺 IR 肺损伤,其机制可能与上调肺组织 TFAM 和 SDHA 的表达,改善线粒体的生物学特性相关。然而,TLR3 本身是如何被激活,以及 TLR3 和线粒体之间

确切的作用机制还有待离体细胞实验进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Shah RJ, Diamond JM. Primary graft dysfunction (PGD) following lung transplantation. *Semin Respir Crit Care Med*, 2018, 39(2): 148-154.
- [2] 李梦倩,李彬,董铁立. 右美托咪定对大鼠离体肺缺血-再灌注损伤时 ERK1/2 和 Akt 激活的影响. *临床麻醉学杂志*, 2018, 34(4): 376-380.
- [3] Chen C, Feng Y, Zou L, et al. Role of extracellular RNA and TLR3-Trif signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Am Heart Assoc*, 2014, 3(1): e000683.
- [4] Kang JW, Koh EJ, Lee SM. Melatonin protects liver against ischemia and reperfusion injury through inhibition of toll-like receptor signaling pathway. *J Pineal Res*, 2011, 50(4): 403-411.
- [5] Paulus P, Rupperecht K, Baer P, et al. The early activation of toll-like receptor (TLR)-3 initiates kidney injury after ischemia and reperfusion. *PLoS One*, 2014, 9(4): e94366.
- [6] Xu KY, Wu CY, Tong S, et al. The selective Nlrp3 inflammasome inhibitor Mcc950 attenuates lung ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 3031-3037.
- [7] Hansen LW, Khader A, Yang WL, et al. Sirtuin 1 activator srt1720 protects against organ injury induced by intestinal ischemia-reperfusion. *Shock*, 2016, 45(4): 359-366.
- [8] Li Y, Liu X. Novel insights into the role of mitochondrial fusion and fission in cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia/reperfusion. *J Cell Physiol*, 2018, 233(8): 5589-5597.
- [9] Tian WF, Zeng S, Sheng Q, et al. Methylene blue protects the isolated rat lungs from ischemia-reperfusion injury by attenuating mitochondrial oxidative damage. *Lung*, 2018, 196(1): 73-82.
- [10] Cloonan SM, Choi AM. Mitochondria: sensors and mediators of innate immune receptor signaling. *Curr Opin Microbiol*, 2013, 16(3): 327-338.
- [11] Djafarzadeh S, Vuda M, Takala J, et al. Toll-like receptor-3-induced mitochondrial dysfunction in cultured human hepatocytes. *Mitochondrion*, 2011, 11(1): 83-88.
- [12] Liang L, Tan X, Zhou Q, et al. TLR3 and TLR4 but not TLR2 are involved in Vogt-Koyanagi-Harada disease by triggering proinflammatory cytokines production through promoting the production of mitochondrial reactive oxygen species. *Curr Mol Med*, 2015, 15(6): 529-542.
- [13] Chuang JH, Lin TK, Tai MH, et al. Preferential involvement of mitochondria in Toll-like receptor 3 agonist-induced neuroblastoma cell apoptosis, but not in inhibition of cell growth. *Apoptosis*, 2012, 17(4): 335-348.
- [14] Kang S, Fernandes-Alnemri T, Rogers C, et al. Caspase-8 scaffolding function and MLKL regulate NLRP3 inflammasome activation downstream of TLR3. *Nat Commun*, 2015, 6: 7515.

(收稿日期:2019-02-20)