脂多糖对类风湿关节炎患者外周血单核细胞 TLR2、TLR4 mRNA 及其蛋白表达的影响*

蔡 辉，张群燕，姚茹冰
（南京军区南京总医院，江苏 南京 210002）

［摘 要］**目的：**探讨类风湿关节炎（RA）患者外周血单核细胞（PBMCs）Toll 样受体（TLR）2、4mRNA 和蛋白的表达及脂多糖（LPS）对其表达的影响。**方法：**收集已确诊的 RA 患者 5 例（DAS28≥2.6），健康自愿者 5 例；体外分别分离培养受试者 PBMCs 作为 RA 组和健康组，下设空白组与 LPS 组，其中 LPS 组给予 100 μg/L LPS 进行刺激，细胞培养 24 h 后，FQ-RT PCR 检测单核细胞 *TLR*2、*TLR*4 mRNA 表达；Western blot 检测单核细胞 TLR2、TLR4 蛋白表达。**结果：**给予 LPS 刺激后，RA 组与健康组 PBMCs TLR2、TLR4 mRNA 及其蛋白的表达均高于相应组刺激前（$P<0.001$）；给予 LPS 刺激前和刺激后 RA 组 PBMCs TLR2、TLR4 mRNA 及其蛋白的表达水平均明显高于健康组（$P<0.001$）。**结论：**LPS 可刺激 RA 患者 PBMCs 已高表达 TLR2、TLR4 的表达水平更高，可能与机体的炎症反应有关。

［关键词］脂多糖；类风湿关节炎；Toll 样受体；单核细胞；基因表达；细胞培养
［中图分类号］R593.22 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707（2017）01-0068-03
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.01.015

The Effects of Lipopolysaccharide on TLR2, TLR4 mRNA and Protein Expression in Peripheral Blood Mononuclear of Rheumatoid Arthritis Patients

CAI Hui, ZHANG Qunyan, YAO Rubing
(*Nanjing General Hospital of Nanjing Military Area, Nanjing 210002, Jiangsu, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To explore the effects of lipopolysaccharide (LPS) on Toll-like receptor (TLR) 2, 4 mRNA and protein expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). **Method**: Five RA patients (DAS28≥2.6) and 5 healthy volunteers were recruited, PBMCs were isolated and cultured *in vitro* as RA group and healthy group, under the two group, there were control group and LPS group, LPS group was given 100 μg/L LPS for stimulation, the cells were cultured for 24 h, FQ-RT PCR was employed to detect *TLR*2, *TLR*4 mRNA expression; Western blot was used to detect of TLR2, TLR4 protein expression. **Results**: Compared with the healthy group, TLR2, TLR4 mRNA and protein expression levels in PBMCs of RA group were significantly increased ($P<0.001$); after administration of LPS, compared with the control group, TLR2, TLR4 mRNA and protein expression in PBMCs of LPS group were increased, and the change of RA group was more significant ($P<0.001$). **Conclusion**: LPS can stimulate higher expression of TLR2, TLR4 expression levels in PBMCs of RA patients higher whose TLR2, TLR4 expressions are already at high level, which may relate to inflammatory response.

［**Key words**］lipoplysaccharide; rheumatoid arthritis; Toll-like receptor; mononuclear cells; gene expression; cell culture

*［基金项目］国家自然科学基金青年科学基金项目（81303124）
网络出版时间：2016－06－16 网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.r.20160616.1618.006.html

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是一种慢性全身炎症性自身免疫性疾病。其确切发病机制尚不完全明确,目前免疫紊乱被认为是 RA 的主要发病机制。其中,Toll 样受体(toll like receptors,TLRs)是参与非特异性免疫的一类重要蛋白质分子,也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁,在慢性免疫性炎症疾病如 RA 发病中扮演重要角色[1]。脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)是一种炎症因子,是 TLR2、TLR4 共同的配体,当 LPS 与 TLR2 和 TLR4 结合后,激活 TLR 信号转导通路,参与机体的免疫调节功能[2]。本研究通过测定 LPS 刺激 RA 患者外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMCs)后的 TLR2、TLR4 表达水平,探讨 LPS 在 RA 发病机制中的作用。

1 对象与方法

1.1 对象、试剂和仪器

选取 2014 年 4 月 ~2015 年 1 月就诊的 RA 患者(DAS28 ≥2.6)5 例,均符合 2010 年 ACR/EULAR 分类标准[3]。5 例 RA 患者中男 1 例,女 4 例,25 ~79 岁,平均(52.2 ±19.5)岁。同时选取 5 例健康自愿者为对照组,其中男 2 例,女 3 例,29 ~40 岁,平均(34.2 ±4.0)岁,所有研究对象均排除其他自身免疫性疾病,排除血液系统、心脑血管系统及其他系统疾病。人外周血淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物有限公司,RPMI-1640 培养基、PBS 缓冲液购自美国 HYCLONE 公司,LPS 试剂购自美国 Sigma 公司,0.25% EDTA 胰酶购自美国 GIBCO 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司;青霉素、链霉素购自美国 GIBCO 公司,二氧化碳孵箱购自美国 Revco 公司,超净无菌操作台购自苏州安泰公司,Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,cDNA 第一链合成试剂盒购自美国 Thermo Fisher K1622,引物由南京金斯瑞科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 实验标本 所有被检者均于清晨空腹时抽取 7 ~8 mL 静脉血,肝素抗凝,混匀,400 r/min 离心10 min,分离血浆。收集至 2.0 mL 冻存管中,置于 -70 ℃ 冰箱低温保存备用。利用密度梯度离心法分离人 PBMCs 后,将分离的 PBMCs 调整细胞数为 5×10^9 个/L,接种于 24 孔细胞培养板,每孔 1 mL,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 4 h。弃细胞留上清培养,将 37 ℃预热 PBS 轻洗细胞培养板 2 遍,洗脱未贴壁的细胞,获得贴壁的单核细胞。RPMI-1640 完全培养基重悬(含 100 000 U/L 青霉素,100 g/L 链霉素,10% 胎牛血清)细胞并加入 LPS 干预,根据参考文献[4 -5]设置 LPS 的浓度,健康自愿者 PBMCs 作为健康组,RA 患者 PBMCs 作为 RA 组,均下设空白组和 LPS 组,空白组不给予任何药物干预,LPS 组给予终浓度为 100 μg/L LPS 干预,置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后收获细胞及上清液。

1.2.2 TLR2、TLR 4 mRNA 的表达 细胞培养24 h 后,弃去细胞培养上清,Trizol 提取总 RNA,调整总 RNA 量至一致后,进行逆转录,取等量逆转录产物进行 PCR 扩增。Homo-GAPDH primer (115 bp) 引物序列 Sense primer 为 5′-CATCTTCTTTTGCGTCGCCA-3′, Antisense primer 为 5′-TTAAAAGCAGCCCTGGTGACC-3′;Homo-TLR2 primer (136 bp) 引物序列 Sense primer 为 5′-CCATGGCCTGTGGTATATGA-3′, Antisense primer 为 5′-GTTCTCCACCCAGTAGGCAT-3′;Homo-TLR4 primer (137 bp) 引物序列 Sense primer 为 5′-ACTTGGACCTTTCCAGCAAC-3′, Antisense primer 为 5′-TTTAAATGCACCTGGTTGGA-3′。

1.2.3 TLR2 及 TLR4 蛋白的表达 取上述细胞进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转移到 NC 膜上,加入抗体,摇床震荡孵育,漂洗滤膜 4 次;加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温下摇荡孵育 2 h,TBST 洗膜洗涤 4 次,每次 10 min;将显影液置于 NC 膜上,凝胶成像仪成像。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件处理数据,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数比较用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

与健康组比较,RA 组 PBMCsTLR2、TLR4 mRNA 和蛋白表达水平明显升高($P < 0.001$),给予 LPS 干预刺激后,与空白组比较,LPS 组 PBMCs 中 TLR2、TLR4mRNA 和蛋白表达均有升高,RA 组升高更明显($P < 0.001$)。见表 1、表 2。

3 讨论

RA是一种常见的慢性关节炎症性疾病,主要

表 1　被检者 PBMCS 中 *TLR*2、*TLR*4 mRNA 相对表达量($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1　Relative expression levels of *TLR*2, *TLR*4 mRNA in PBMCS of the objects

组别	*TLR*2	*TLR*4
健康空白组	1.089 2 ±0.106 16	0.926 4 ±0.089 12
健康 LPS 组	7.860 4 ±0.555 68$^{(1)}$	8.230 4 ±0.467 68$^{(1)}$
RA 空白组	2.321 8 ±0.310 48$^{(1)}$	1.982 8 ±0.049 44$^{(1)}$
RA LPS 组	11.316 ±0.725 2$^{(2)(3)}$	10.355 4 ±0.613 12$^{(2)(3)}$

$^{(1)}$与健康空白组比较,$P<0.001$;$^{(2)}$与 RA 空白组比较,$P<0.001$;$^{(3)}$与健康 LPS 组比较,$P<0.001$

表 2　被检者 PBMCS 中 TLR2、TLR4 蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2　Relative expression levels of TLR2, TLR4 protein in PBMCS of the objects

组别	TLR2	TLR4
健康空白组	0.115 2 ±0.035 84	0.021 2 ±0.005 04
健康 LPS 组	0.758 6 ±0.037 52$^{(1)}$	0.719 6 ±0.323 2$^{(1)}$
RA 空白组	0.331 ±0.056 8$^{(1)}$	0.182 4 ±0.003 92$^{(1)}$
RA LPS 组	1.468 8 ±0.184 64$^{(2)(3)}$	1.029 6 ±0.004 72$^{(2)(3)}$

$^{(1)}$与健康空白组比较,$P<0.001$;$^{(2)}$与 RA 空白组比较,$P<0.001$;$^{(3)}$与健康 LPS 组比较,$P<0.001$

特征表现为滑膜炎症及其导致的滑膜增生,软骨退化和骨质破坏。免疫紊乱是 RA 主要的发病机制,TLRs 是固有免疫系统中具有重要作用的跨膜受体家族,主要通过选择性的识别病原体中某些内源性配体如 LPS、鞭毛蛋白和微生物核酸等,触发 MyD88 依赖性和非依赖性途径,激活天然免疫,诱发局部炎症。越来越多的研究发现,TLRs 尤其是 TLR2、TLR4 在 RA 发病中具有重要作用[6-7]。钱雷等[8]研究发现,RA 早期患者 PBMC 中 TLR2 表达增加、TLR4 表达下降,TLR4 对其配体刺激有较高的反应性,产生更多的细胞因子。本研究结果显示,与健康空白组比较,RA 患者 PBMCsTLR2、TLR4 mRNA 及其蛋白的表达明显升高($P<0.001$)说明 RA 患者 PBMCs 处于活化状态,其发病可能通过 TLR 受体启动机体的炎症反应,合成和释放炎症因子,最终导致关节组织和骨组织的破坏。

LPS 是革兰氏阴性菌主要细胞表面抗原和激发宿主对细菌感染发生反应的主要生物效应器,属病原体相关分子模式(PAMP),免疫刺激作用较强[9]。现已明确,LPS 可以与各种细胞表面的 TLR4 结合[10],当 TLR4 识别 LPS 后,即可激活受体相关激酶和 NF-κB,后者转位入核内诱导促炎症性细胞因子产生[11]。本研究发现,给予 LPS 干预刺激后,与健康空白组比较,健康 LPS 组 PBMCs 中 TLR2、TLR4mRNA 及其蛋白表达均有升高;与 RA 空白组比较,RA LPS 组 PBMCs 中 TLR2、TLR4mRNA 表达也明显升高($P<0.001$)。表明 RA 患者对 LPS 的刺激敏感性增加,LPS 可能在诱发 RA 发生过程中有重要作用。

4　参考文献

[1] Huang Q, Pope RM. Toll-like receptor signaling: A potential link among rheumatoid arthritis, systemic lupus, and atherosclerosis [J]. J Leukoc Biol, 2010(2):253 - 262.

[2] Gierut A, Perlman H, Pope RM. Innate immunity and rheumatoid arthritis [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2010(2):271 - 296.

[3] 蔡辉, 姚茹冰. 新编类风湿关节炎手册 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2013:80 - 81.

[4] 杨孟雪,甘华,沈清. 脂多糖对 2 型糖尿病肾病患者单核细胞 TLR4 水平及 NF-κB, NotchlA 表达的影响[J]. 中南大学学报:医学版, 2012(6): 578 - 586.

[5] 董微,张兵,蔡美英. 脂多糖刺激树突状细胞前后 TLR2、3、4 基因表达的检测 [J]. 航天医学与医学工程, 2005(3): 216 - 218.

[6] Roelofs MF, Wenink MH, Brentano F, et al. Type i interferons might form the link between toll-like receptor (tlr) 3/7 and tlr4-mediated synovial inflammation in rheumatoid arthritis [J]. Ann Rheum Dis, 2009(10): 1486 - 1493.

[7] Ultaigh SN, Saber TP, McCormick J, et al. Blockade of Toll-like receptor 2 prevents spontaneous cytokine release from rheumatoid arthtitis ex vivo synovial explant cultures [J]. Arthritis Res Ther, 2011(1): 33 - 40.

[8] 钱雷, 汪晓莺, 吕丽君, 等. 类风湿性关节炎患者早期外周血单个核细胞 Toll 样受体 2、4 表达及意义[J]. 检验医学, 2012(8): 665 - 669.

[9] Jerala R. Structural biology of the LPS recognition[J]. Int J Med Microbiol, 2007(5):353 - 363.

[10] Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity[J]. Int Immunol, 2005(1):1 - 14.

[11] Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors [J]. Nat Immunol, 2010(5):373 - 384.

(2016-09-25 收稿,2016-11-28 修回)

中文编辑: 刘　平; 英文编辑: 周　凌