

[文章编号] 1000-4718(2008)01-0116-03

# 人参二醇组皂苷对 LPS 致休克大鼠肝脏 TLR2、TLR9 mRNA 表达的影响\*

王志<sup>1</sup>, 李洪岩<sup>1</sup>, 吕文伟<sup>2</sup>, 刘姗姗<sup>3</sup>, 穆桂芳<sup>1</sup>, 李扬<sup>1</sup>, 孙连坤<sup>1△</sup>

(吉林大学基础医学院<sup>1</sup>病理生理学教研室,<sup>2</sup>药理学教研室,<sup>3</sup>吉林大学2002级临床医学,吉林 长春 130021)

**[摘要]** 目的: 观察人参二醇组皂苷(PDS)对TLR2和TLR9 mRNA表达的影响,探讨PDS抗休克的分子生物学机制。方法: 大鼠随机分为对照(control)组、LPS休克(LPS)组、人参二醇组皂苷小剂量(LPS+PDSL)组和人参二醇组皂苷中剂量(LPS+PDSM)组。大鼠舌下静脉注射LPS(4 mg/kg)4 h后测定血清中NOS活性、NO含量,肝组织中LPO含量、SOD活性以及TLR2、TLR4 mRNA的表达。结果: LPS+PDSL组和LPS+PDSM组NOS活性、NO含量和LPO含量明显低于LPS组,SOD活性明显高于LPS组( $P < 0.05$ );LPS+PDSL组和LPS+PDSM组TLR2 mRNA表达明显低于LPS组,TLR9 mRNA表达无变化。结论: PDS通过下调肝组织中TLR2 mRNA表达,降低NOS活性、NO含量,对肝脏有保护作用。

**[关键词]** 脂多糖类; 人参; 受体, Toll样

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

## Effects of panaxadiol saponin on TLR2 and TLR9 mRNA expression in LPS induced shock rats

WANG Zhi<sup>1</sup>, LI Hong-yan<sup>1</sup>, LÜ Wen-wei<sup>2</sup>, LIU Shan-shan<sup>3</sup>, MU Gui-fang<sup>1</sup>, LI Yang<sup>1</sup>, SUN Lian-kun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathophysiology, <sup>2</sup>Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, <sup>3</sup>Grade 2002 of Clinical Medicine Department, Jilin University, Changchun 130021, China. E-mail: sunlk@jlu.edu.cn)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To explore the molecular mechanism of panaxadiol saponin (PDS) by observing Toll like receptor (TLR) 2 and TLR9 mRNA expression induced by lipopolysaccharide (LPS). **METHODS:** Rats were divided into LPS, LPS + PDSL, LPS + PDSM and control group, respectively. Nitric oxide synthase (NOS) activity, nitric oxide (NO) content, LPO content, SOD activity and TLR2 and TLR9 mRNA expression were assayed 4 h after intravenous injection of LPS. **RESULTS:** NOS activity, NO content, LPO content of LPS + PDSL group and LPS + PDSM group were significantly lower than those in LPS group. TLR2 mRNA expression in the liver tissue of LPS + PDSL group and LPS + PDSM group was decreased compared with LPS group. **CONCLUSION:** PDS has a protective effect on liver tissues by triggering the down-regulation of TLR2 expression, reducing NOS activity, and NO content.

**[KEY WORDS]** Lipopolysaccharides; Ginseng; Receptor, Toll-like

内毒素(endotoxin, ET)存在于革兰阴性细菌(G<sup>-</sup>)细胞壁外膜中,主要成分是脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),具有广泛的生物活性。目前认为内毒素是革兰阴性细菌败血症所致休克和多器官功能衰竭综合征(MODS)的主要因素<sup>[1]</sup>。Toll样受体(toll-like receptors, TLRs)是一类天然免疫受体,它们可以通过广泛地特异性地识别病原微生物,偶联信号转导途径,并激活天然免疫细胞,最终导致一系列的免疫炎症反应,是LPS激活过程中的重要环节<sup>[2]</sup>。本研究探讨在LPS攻击时肝组织中TLR2和

TLR9 mRNA表达的变化以及人参二醇组皂苷(panaxadiol saponin, PDS)对其的影响,进一步阐明LPS攻击时肝损伤的分子机制。

### 材 料 和 方 法

#### 1 材料

人参二醇组皂苷(由吉林大学基础医学院化学教研室提供);大肠杆菌脂多糖(LPS)(Sigma);血清型O111:B4、NOS、NO和LPO、SOD检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);PCR试剂(TaKaRa)。

[收稿日期] 2006-06-15 [修回日期] 2006-09-26

\* [基金项目] 吉林省中医药管理局中医药科学技术研究基金(No. 2004-080)

△通讯作者 Tel:0431-5619485; E-mail:sunlk@jlu.edu.cn

## 2 实验动物分组与处理

健康 Wistar 大鼠(由吉林大学基础医学院动物室提供,体重 250 g ± 10 g,雌雄不拘)24 只,随机分为 4 组(每组 6 只):对照(control)组;脂多糖(LPS)组;脂多糖加人参二醇小剂量(LPS + PDSL)组;脂多糖加人参二醇组皂苷中剂量(LPS + PDSM)组。用水合氯醛(350 mg/kg, ip)麻醉大鼠,分离一侧股动脉插动脉插管,通过压力传感器连接 RM - 6000 型四导生理记录仪(日本光电)记录血压;分离一侧股静脉备给试剂用。待血压平稳后记录正常的心率、血压。实验前 control 组和 LPS 组大鼠静注 5% 葡萄糖溶液 5 mL/kg; LPS + PDSL 组和 LPS + PDSM 组静注 5% 葡萄糖溶液 5 mL/kg,分别含小剂量(22.5 mg/kg)和中剂量(45 mg/kg)的人参二醇组皂苷。10 min 后除 control 组外均静脉注射 LPS 4 mg/kg, control 组静脉注射等量的葡萄糖溶液。以血压降到实验前基础血压的 2/3 时判断为休克状态<sup>[3]</sup>。4h 后处死动物,取血并分离血清,无菌采集肝脏组织,生理盐水冲洗干净,迅速放入液氮中冻存。

## 3 肝组织 LPO 含量、SOD 活性测定

称取 100 mg 肝组织,加生理盐水 0.9 mL,匀浆,离心,取上清,严格按说明书操作。用 722S 分光光度计(上海仪器厂)测定 LPO 含量、SOD 活性。

## 4 血清 NOS 活性和 NO 含量测定

取血清,严格按 NOS 活性、NO 含量检测试剂盒说明书操作。用 722S 分光光度计(上海仪器厂)测定血清中 NOS 活性、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 含量。

## 5 肝组织 TLR2、TLR9 mRNA 表达的检测

肝脏总 RNA 提取参照 Ultraspec<sup>TM</sup> - II RNA Isolation System (Biotech Laboratories, INC)说明书进行,逆转录成 cDNA,进行 PCR 反应。TLR2 引物序列为:正义 5' - ACAGCTACCTGTGTGATTCTCCGCC - 3',反义 5' - GGTCTTAGTGTTCATTATCTTGCGC - 3',PCR 循环条件为变性 94 °C 2 min,58 °C 1 min,72 °C 1 min,35 个循环,PCR 产物为 577 bp。TLR9 引物序列为:正义 5' - CCGCAAGACTCTGTTGTGCTGG - 3',反义 5' - TGTCCCTAGT-CAGGGCTGTACTCAG - 3',PCR 循环条件为变性 94 °C 2 min,56 °C 1 min,72 °C 1 min,35 个循环,PCR 产物为 259bp;GAPDH 引物序列为:正义 5' - GGGTGATGCTGGTGCTGAGTATGT - 3',反义 5' - AAGAATGGGTGTTGCTGTTGAAGTC - 3',PCR 循环条件为变性 94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 60 s,25 个循环,PCR 产物为 700 bp。

## 6 统计学处理

所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,并采用 ANOVA 进行统

计分析。

## 结 果

### 1 PDS 对血清 NOS 活性和 NO 含量的影响

LPS + PDSL 组和 LPS + PDSM 组 NOS 活性和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 含量明显少于 LPS 组,而 LPS + PDSL 组和 LPS + PDSM 组间无显著差异。

表 1 PDS 对 LPS 致休克大鼠血清 NOS 活性和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 含量的影响

Tab 1 Changes of NOS activity and NO content in LPS induced shock rats( $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

	Control	LPS	LPS + PDSL	LPS + PDSM
NOS (mmol · min <sup>-1</sup> · g <sup>-1</sup> )	27.35 ± 8.45	44.78 ± 9.77	33.56 ± 12.36 *	30.52 ± 11.23 *
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (μg/g)	37.26 ± 13.55	65.77 ± 16.32	46.77 ± 14.33 *	41.23 ± 12.93 *

\* P < 0.05 vs LPS group.

### 2 PDS 对肝组织 LPO 含量和 SOD 活性的影响

LPS + PDSL 组和 LPS + PDSM 组 LPO 含量明显少于 LPS 组,SOD 活性明显高于 LPS 组,而 LPS + PDSL 组和 LPS + PDSM 组间无显著差异。

表 2 PDS 对 LPS 致休克大鼠肝组织 LPO 含量和 SOD 活性的影响

Tab 2 Changes of LPO content and SOD activity in LPS induced shock rats( $\bar{x} \pm s$ , n = 6)

	Control	LPS	LPS + PDSL	LPS + PDSM
LPO(μmol/g protein.)	272.48 ± 19.73	381.52 ± 27.15	349.14 ± 25.79 *	290.02 ± 20.92 *
SOD(10 <sup>3</sup> U/g protein.)	79.56 ± 19.87	60.54 ± 21.19	89.55 ± 28.62 *	93.65 ± 27.18 *

\* P < 0.05 vs LPS group.

### 3 PDS 对肝组织 TLR2 和 TLR9 mRNA 表达的影响

TLR2 和 TLR9 在正常肝脏组织仅有微量表达,而 LPS 组表达量显著增高;LPS + PDSL 组和 LPS + PDSM 组 TLR2 表达少于 LPS 组,而 TLR9 表达无显著差异,见图 1。

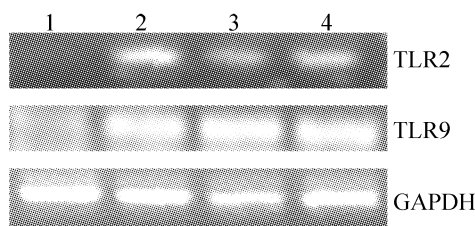


Fig 1 Expression of TLR2, TLR9 mRNA in liver tissues. 1: control; 2: LPS; 3: LPS + PDSL; 4: LPS + PDSM.

图 1 肝组织中 TLR2、TLR9 mRNA 表达

## 讨 论

TLRs 属于 I 型跨膜蛋白,其胞外区结构由富含亮氨酸的重复序列组成,不同 TLR 之间的胞外区同源性较差,提示不同成员可能与不同配体结合。TLR 胞内区结构与白细胞介素 1 受体的胞内区高度同源,控制信号的转导。目前已发现的 TLR 家族成员至少有 10 种,分别命名为 TLR1-10,均参与机体的固有免疫反应。内毒素发挥生物学效应的先决条件就是与各种效应细胞膜上的受体结合。现已明了,TLR4 是 LPS 的主要受体,LPS 通过与此受体结合而激活 NF- $\kappa$ B 途径,产生一系列效应<sup>[4,5]</sup>。TLR2 主要识别 G<sup>+</sup> 菌的肽聚糖(PGN)、脂磷壁酸(LTA)、分枝杆菌和疏密螺旋体的脂蛋白与脂肽、酵母菌和支原体的某些成分等;TLR9 主要识别细菌的 CpG,它是细菌 DNA 中以未甲基化的 CpG 二核苷酸为核心的特定寡核苷酸序列。有报道小鼠在接受 LPS 刺激后,TLR2<sup>[6]</sup> 和 TLR9<sup>[7]</sup> 的表达均上调;但也有报道 LPS 刺激后 TLR2 表达无明显变化<sup>[8]</sup>。目前 TLR2 和 TLR9 对 LPS 的识别仍存在争议<sup>[9]</sup>。

本研究显示,TLR2 和 TLR9 在正常肝脏组织中有微量表达,给予 LPS 刺激后,表达量显著增高,表明 TLR2 和 TLR9 均介导了 LPS 的信号转导,它们可能作为 TLR4 的辅助分子参与了机体对 LPS 的反应。与 TLR4 一样,TLR2 的激活将引起下游一系列信号分子活化,最终使 NF- $\kappa$ B 激活,从而引起白细胞介素、NOS、NO 等的大量释放,导致机体损伤。本研究中 LPS 组 NOS 活性、NO 含量明显增加,亦可能与 TLR2 的过度激活有关。LPS 刺激后,TLR9 的表达也增加,可能与 TLR 的共协同作用有关<sup>[10]</sup>,通过此作用,TLR 可扩大对配体的识别范围。

LPS + PDS 组 TLR2 表达明显低于 LPS 组,而 TLR9 无明显变化。提示 PDS 通过抑制 TLR2 的表达,而不通过影响 TLR9 的表达,减轻了 LPS 的炎症反应,使 NOS 活性、NO 含量减少;或提高肝组织 SOD 活性,降低 LPO 含量,通过抗脂质过氧化途径。此外,本实验室已证实 PDS 可下调脑组织中 TLR4 mRNA 表达,降低 NOS 活性及 NO 含量,对脑组织具有保护作用<sup>[11]</sup>。在本实验中则证明 PDS 通过下调肝组织中 TLR2 mRNA 表达,降低 NOS 活性和 NO 含

量,对肝组织有保护作用。因而,PDS 可能通过 TLR4 mRNA 和 TLR2 mRNA 2 者表达的下调,发挥其抗 LPS 休克的作用。

### [参 考 文 献]

- [1] 刘云海,林剑国,雷 婷. 板蓝根有效部位对脂多糖致小鼠血清中 TNF- $\alpha$  和 NO 的影响[J]. 中草药,2003, 34(2): 152-154.
- [2] Brandl K, Gluck T, Huber C, et al. TLR-4 surface display on human monocytes is increased in septic patients [J]. Eur J Med Res, 2005, 10(8): 319-324.
- [3] Jones SB, Romano FD. Plasma catecholamines in the conscious rat during endotoxemia [J]. Circ Shock, 1984, 14(3): 189-201.
- [4] Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity [J]. Acta Odontol Scand, 2001, 59(3): 124-130.
- [5] 袁兆新,刘 潇,季东平,等. “失血加 LPS”大鼠肺脏 I $\kappa$ B $\alpha$  和 TLR4 基因表达及参麦的肺脏保护作用[J]. 中国病理生理杂志,2006, 22(4): 730-733.
- [6] Matsumura T, Ito A, Takii T, et al. Endotoxin and cytokine regulation of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 gene expression in murine liver and hepatocytes [J]. J Interferon Cytokine Res, 2000, 20(10): 915-921.
- [7] Hong Z, Jiang Z, Liang XW, et al. Chloroquine protects mice from challenge with CpG ODN and LPS by decreasing proinflammatory cytokine release [J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4(2): 223-234.
- [8] 陈 虹,钟 琦,薛 峰,等. 地塞米松对小鼠脾脏巨噬细胞内 TLR4 和 TLR2 表达的影响[J]. 现代免疫学, 2003, 23(2): 91-94.
- [9] Lien E, Seiji TJ, Yoshimura A, et al. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products [J]. J Biol Chem, 1999, 274(47): 33419-33425.
- [10] Homung V, Rothenfusser S, Britsch S, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides [J]. J Immunol, 2002, 168(9): 4531-4537.
- [11] 王健春,孙晓霞,王 志,等. 人参二醇组皂苷对内毒素休克大鼠脑皮质 TLR4 mRNA 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志,2005, 21(12): 2431-2433.