

慢性间歇性缺氧大鼠脂肪组织中 TLR4、JNK 和血中 TNF- α 、Leptin 的变化

龙冠晗 陈梅晞 成俊

摘要 目的 探讨 Toll 样受体 4 (TLR4)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、瘦素 (Leptin) 与慢性间歇性缺氧 (CIH) 的关系。方法 将 24 只 SD 大鼠随机分成 3 组: 对照组、CIH 6 周组、CIH 8 周组, 每组 8 只。造模成功后, 采用无创血压分析仪观察大鼠血压变化, HE 染色观察肾脏病理学改变, 采用 ELISA 法检测血清 TNF- α 、Leptin 的含量, 利用实时荧光定量 PCR 技术检测大鼠脂肪组织中 TLR4、JNK mRNA 表达水平。结果 模型组大鼠血压明显高于对照组 ($P < 0.01$), 且模型组大鼠肾脏病理变化较对照组显著加重; CIH 6 周组和 CIH 8 周组的血清 TNF- α 、Leptin 的含量与对照组比较显著增加 ($P < 0.01$), 且 TNF- α 、Leptin 的含量随缺氧天数的增加而显著增加 ($P < 0.01$); CIH 6 周组和 CIH 8 周组的 TLR4、JNK mRNA 水平比对照组显著增加 ($P < 0.01$), 且 TLR4、JNK mRNA 水平随缺氧天数的增加而显著增加 ($P < 0.01$)。结论 TLR4、JNK、TNF- α 、Leptin 可能参与了 CIH 大鼠的炎症反应。

关键词 慢性间歇性缺氧; Toll 样受体 4; c-Jun 氨基末端激酶; 肿瘤坏死因子- α ; 瘦素

中图分类号 R 56

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)02-0168-05

阻塞性睡眠呼吸暂停综合征 (obstructive sleep apnea syndrome, OSAS) 是由于睡眠时反复发生上气道塌陷、气流受阻引起的具有特征性的呼吸暂停和低通气, 从而导致机体发生一系列病理生理改变的临床综合征^[1]。已知 OSAS 与慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、哮喘等呼吸系统疾病一样具有系统性炎症成分^[2]。Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是最重要的天然免疫受体, 其 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 生物学作用广泛, 参与多种炎症过程^[3], c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 是 TLRs 信号通路的下游受体。另外, 作为最重要的炎症细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF-

α)、瘦素 (Leptin) 与 OSAS 密切相关。该研究观察 OSAS 大鼠模型血清 TNF- α 、Leptin 水平的变化, 旨在进一步认识其炎症机制, 并与脂肪组织 TLR4、JNK 表达值的相关性进行对比研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 雄性 SPF 级 SD 大鼠 24 只, 200 ~ 250 g, 由桂林医学院实验动物中心提供, 动物饲养于无毒塑料笼中。将大鼠随机分成 3 组, 每组 8 只。对照组: 置于相同规格舱内, 无缺氧, 6 周; 慢性间歇性缺氧 (chronic intermittent hypoxia, CIH) 6 周组 (CIH 6 周组), 每天置于低氧舱内 8 h, 共 6 周; CIH 8 周组每天置于低氧舱内 8 h, 共 8 周。

1.2 主要仪器与试剂 JXOC-12 型低压氧舱全自动控制仪 (南京新飞分析仪器制造有限公司); ALC-NIBP 型大鼠尾动脉血压测量仪 (上海奥尔科特生物科技有限公司); MLDEL680 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); Leptin 大鼠专用 ELISA 试剂盒 (武汉华美公司); TNF- α 大鼠专用 ELISA 试剂盒 (深圳达科为生物技术公司); QPCR 仪 (美国 Life Technologies 公司)。

1.3 方法

1.3.1 CIH 模型的建立 模型组大鼠予适应性饲养 1 周后, 给予低氧干涉。将氮气快速充入低氧舱使氧浓度降到 8%, 维持 60 s, 然后快速充入纯氧使氧浓度上升到 21%, 维持 30 s。每次循环为 120 s, 氧浓度维持在 8% ~ 21% 之间, 每天 8 h (9:00 ~ 17:00)。实验期间禁食、禁水, 对照组每天置相同规格有机玻璃舱内, 空气输入。

1.3.2 大鼠尾动脉压的测定 利用大鼠尾动脉无创血压测量仪测定大鼠尾动脉血压, 方法如下: 实验前将大鼠放入固定舱内适应 30 min, 7 d 后测量血压, 在安静环境下, 固定大鼠, 用压脉套套住大鼠尾部近心端, 调节恒温毯至 37 ~ 39 °C, 换能器表面对准鼠尾腹面, 待计算机上显示等幅规律摆动的脉搏波动, 点击编辑窗内的自动充放气, 测量结束后, 记录此时收缩压。每只大鼠自动测量 5 次, 取平均值。

1.3.3 HE 染色 造模结束后, 各组大鼠脱颈处

2013-09-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81060009); 广西卫生厅重点科研项目 (编号: 重 2010047)

作者单位: 桂林医学院 桂林 541001

作者简介: 龙冠晗 男 硕士研究生;

陈梅晞 女 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: chenmx@gmcc.edu.cn

死,迅速取出大鼠肾动脉,用4%多聚甲醛约6 ml固定过夜,梯度乙醇常规脱水、石蜡包埋,切片经染色处理后,中性树胶封片,光学显微镜下观察模型大鼠肾动脉组织学变化。

1.3.4 大鼠血浆中 TNF- α 、Leptin 的检测 实验结束次日上午9时,处死大鼠后立即心脏取血,采用ELISA法按照说明书步骤进行检测。

1.3.5 实时荧光定量 PCR 方法的建立 ACTB 上游引物序列(187 bp): 5'-CATTGTCACCAACTGG-GACGATA-3'; 下游引物: 5'-GGATGGCTACGTA-CATGGCTG-3'; JNK 上游引物序列(186 bp): 5'-ACTCGAGCCAGAATGAGGAC-3'; 下游引物: 5'-GAAGCCTTCCTGGATGATGT-3'; TLR4 上游引物序列(142 bp): 5'-TGACGCCTTACGTGCTAACT-3'; 下游引物: 5'-GGTGTTCGAGCTGTTCAAT-3'。采用 TRIzol 法提取总 RNA: 将研磨后的脂肪组织粉末转移至 2 ml EP 管内,加入 1 ml TRIzol,置于冰浴上,静置 10 min,加 200 μ l 氯仿震荡混匀,冰浴上静置 5 min,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min,将上清液移至新的 EP 管中,加入等体积的异丙醇,静置 15 min,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min,可见到管底部白色沉淀,弃上清液,向沉淀中缓慢加入 1 ml 75% 乙醇溶液,轻轻上下颠倒洗涤管壁及管底沉淀,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min,小心去除乙醇保留沉淀,室温下晾干离心管,加入 30 μ l DEPC 水溶解沉淀。用紫外分光光度计检测 RNA 浓度及纯度。建立实时定量 PCR 反应体系,见表 1。实时荧光定量 PCR 扩增反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 70 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环。测定脂肪组织 β -actin(基因名为 ACTB)、JNK、TLR4 mRNA 表达水平。大鼠脂肪组织 ACTB、JNK、TLR4 mRNA 表达水平的检测: $\Delta\Delta CT$ 值 = 样本 CT 值 - 内参 CT 值,以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 比较各组间 mRNA 实时荧光定量 PCR 拷贝数的差异。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析检测组间的总差异,两两比较采用 q 检验,相对定量的结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行处理。

2 结果

2.1 大鼠肾动脉病理学变化 与对照组比较,CIH 6 周组和 CIH 8 周组肾动脉管壁明显增厚,但是 CIH 8 周组比 CIH 6 周组动脉管壁增厚更明显,官腔狭窄更明显。见图 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 反应体系

试剂	体积(μ l)
H ₂ O	12.3
10 $\times$ PCR Buffer	2.0
Mg ²⁺ (25 mmol/L)	2.0
dNTPs (25 mmol/L)	0.5
Forward Primer (10 μ mol/L)	0.5
SYBR (20 $\times$)	1.0
Reverse Primer (10 μ mol/L)	0.5
PLATINUM Taq POLYMERASE	0.2
Template DNA	1.0
总计	20.0

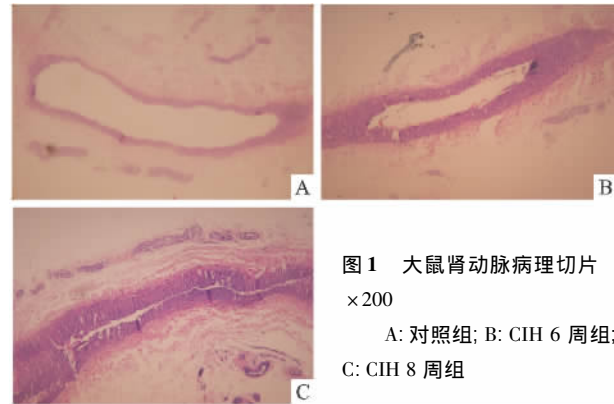


图 1 大鼠肾动脉病理切片
 $\times 200$
A: 对照组; B: CIH 6 周组;
C: CIH 8 周组

2.2 大鼠尾动脉血压 各组大鼠实验前鼠尾动脉收缩压差异无统计学意义($F = 1.06$, $P > 0.05$); 实验后,CIH 6 周组、CIH 8 周组大鼠血压明显高于对照组($F = 1.083$, $P < 0.01$),对照组大鼠尾动脉收缩压与实验前比较差异无统计学意义。见表 2。

表 2 实验前后大鼠尾动脉血压($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	实验前血压(kPa)	实验后血压(kPa)
对照	14.23 $\pm$ 0.17	14.46 $\pm$ 0.13
CIH 6 周	14.37 $\pm$ 0.24	18.35 $\pm$ 0.17*
CIH 8 周	14.25 $\pm$ 0.20	19.44 $\pm$ 0.30**

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 各组大鼠血清 TNF- α 、Leptin 含量的变化 CIH 6 周组和 CIH 8 周组血清 TNF- α 、Leptin 的含量显著高于对照组($F = 545.489$, $P < 0.01$); CIH 8 周组的 TNF- α 、leptin 含量明显高于 CIH 6 周组($P < 0.01$),TNF- α 、Leptin 的含量随缺氧天数的增加而显著增加。见表 3。

表 3 各组大鼠血清 TNF- α 、Leptin 表达水平($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α (μ g/L)	Leptin(μ g/L)
对照	0.23 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.03
CIH 6 周	0.65 $\pm$ 0.04**	0.51 $\pm$ 0.05**
CIH 8 周	1.10 $\pm$ 0.08***	0.89 $\pm$ 0.05***

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 CIH 6 周组比较: *** $P < 0.01$

2.4 TLR4、JNK 扩增曲线和熔解曲线 ACTB、TLR4、JNK 扩增曲线显示荧光强度和初始拷贝数呈良好的线性关系。熔解曲线峰值单一,没有杂峰,表明实时 PCR 产物纯度较高,反应具有良好的特异性,见图 2。

2.5 大鼠脂肪组织 TLR4、JNK mRNA 表达水平的检测 与对照组比较,CIH 6 周组和 CIH 8 周组的 TLR4、JNK mRNA 表达水平显著增加($F = 529$ 、 539 $P < 0.01$); CIH 8 周组的 TLR4、JNK mRNA 表达水平明显高于 CIH 6 周组($P < 0.01$),TLR4、JNK mRNA 表达水平随缺氧天数的增加而显著增加。见表 4。

表 4 各组大鼠脂肪组织 TLR4、JNK mRNA 实时 PCR $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值($n=8$ $\bar{x} \pm s$)

组别	TLR4	JNK
对照	$1.62 \times 10^{-2} \pm 0.05 \times 10^{-2}$	$8.92 \times 10^{-3} \pm 0.34 \times 10^{-3}$
CIH 6 周	$2.21 \times 10^{-2} \pm 0.06 \times 10^{-2}^{**}$	$1.30 \times 10^{-2} \pm 0.05 \times 10^{-2}^{**}$
CIH 8 周	$2.49 \times 10^{-2} \pm 0.05 \times 10^{-2}^{**\#\#}$	$1.81 \times 10^{-2} \pm 0.07 \times 10^{-2}^{**\#\#}$

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 CIH 6 周组比较: $\#\#P < 0.01$

3 讨论

OSAS 患者广泛存在脂肪代谢紊乱,脂肪组织过度堆积会导致脂肪因子分泌紊乱,这些炎性介质的大量释放,引发局部和系统性炎症反应^[4]。OSAS 患者夜间睡眠中反复发生低氧,缺氧一再氧合循环生成一系列活性氧基团(ROS)从而促进氧化应激反应^[5]。

本研究中 CIH 能使模型组 SD 大鼠尾动脉压显著高于对照组;通过大鼠肾动脉 HE 染色结果显示: CIH 6 周组和 CIH 8 周组肾动脉管壁比对照组明显增厚,且 CIH 8 周组比 CIH 6 周组动脉管壁增厚更明显,宫腔狭窄更明显。本研究结果提示 OSAS 大鼠模型复制成功。

TNF- α 是炎症因子免疫调节环节中的核心因子,是脂质代谢紊乱、低氧等造成的组织脏器损伤中最重要的损伤启动因子^[6]。Leptin 是由脂肪细胞分泌的肽类激素。研究^[7]表明血清 Leptin 水平

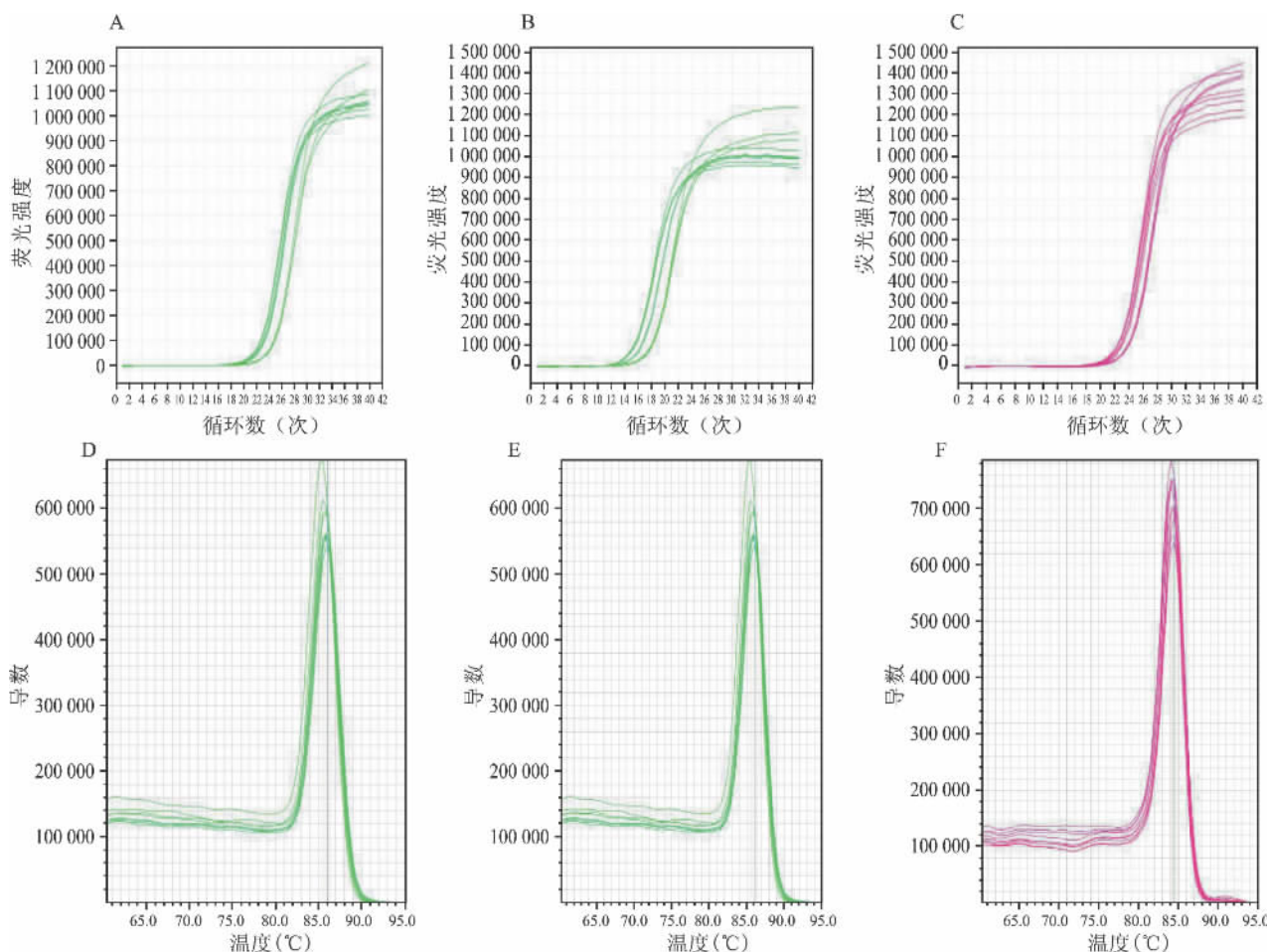


图 2 ACTB、TLR4、JNK 的扩增曲线和熔解曲线

A、B、C: 扩增曲线; D、E、F: 熔解曲线; A、D: ACTB; B、E: TLR4; C、F: JNK

与呼吸暂停低通气指数及体重指数呈正相关。本研究通过检测不同间歇缺氧周数的 OSAS 大鼠血清中的 TNF- α 、Leptin 的含量,发现 CIH 6 周组和 CIH 8 周组大鼠血清 TNF- α 、Leptin 的含量比对照组明显增加,且在本研究时间范围内,大鼠血清 TNF- α 、Leptin 的含量呈一定的时间依赖性。由此推测 TNF- α 、Leptin 作为重要的细胞因子参与了 OSAS 的病理过程。TLRs 是重要的细胞膜受体,是炎症信号传递门户蛋白。TLR4 介导的信号通路与细胞间通讯在 OSAS 发病机制中发挥重要作用^[8]。JNK 信号通路可被细胞因子、应激等多种因素激活,许多实验证实 JNK 与许多疾病有密切联系^[9]。本研究通过检测不同间歇缺氧周数的 OSAS 大鼠脂肪组织中的 TLR4、JNK mRNA 表达,发现 CIH 6 周组大鼠脂肪组织中的 TLR4、JNK mRNA 表达即出现上调,并随间歇缺氧时间延长表达增加,且血清 TNF- α 、Leptin 的含量与各组大鼠脂肪组织中 TLR4、JNK mRNA 表达水平一致。研究^[10]显示 TLR4 通过其 TIR 结构域进行胞内信号转导,TLR4 可通过 JNK、ERK、P38MAPK 等 MAPK 激酶与 PI-3K 激酶被激活,进而活化核内转录激活因子(activating protein-1, AP-1)等转录因子,从而调节 TNF- α 、IL-1、IL-6 等细胞因子、黏附分子和炎症因子的转录表达,进而影响免疫与炎症反应。

综上所述,本研究结果初步显示 TLR4 介导的 JNK 信号通路可能参与了 OSAS 大鼠的炎症反应,并对 OSAS 大鼠血清 TNF- α 、Leptin 的含量可能有重要影响。

参考文献

- [1] 时 鹏,王文静. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者轻度认知功能障碍的评估[J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(5): 718-20.
- [2] Jelic S, Le Jemtel T H. Inflammation, oxidative stress, and the vascular endothelium in obstructive sleep apnea [J]. Trends Cardiovasc Med, 2008, 18(7): 253-60.
- [3] Parker L C, Prince L R, Sabroe I. Translational Mini review series on toll-like receptors: net works regulated by toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity [J]. Clin Exp Immunol, 2007, 147(2): 199-207.
- [4] Espinola-Klein C, Gori T, Blankenberg S, et al. Inflammatory markers and cardiovascular risk in the metabolic syndrome [J]. Front Biosci, 2011, 16: 1663-74.
- [5] Bahammam A. Obstructive sleep apnea: from simple upper airway obstruction to systemic inflammation [J]. Ann Saudi Med, 2011, 31(1): 1-2.
- [6] Kim K I, Lee J H, Chang H J, et al. Association between blood pressure variability and inflammatory marker in hypertensive patients [J]. Circ J, 2008, 72(2): 293-8.
- [7] Zirlik S, Hauck T, Fuchs F S, et al. Leptin, obestatin and apelin levels in patients with obstructive sleep apnoea syndrome [J]. Med Sci Monit, 2011, 17(3): CR159-64.
- [8] Kim S Y, Choi Y J, Joung S M, et al. Hypoxic stress up-regulates the expression of Toll-like receptor 4 in macrophages via hypoxia-inducible factor [J]. Immunology, 2010, 129(4): 516-24.
- [9] Johnson G L, Nakamura K. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1773(8): 1341-8.
- [10] Ahmad-Nejad P, Häcker H, Rutz M, et al. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments [J]. Eur J Immunol, 2002, 32(7): 1958-68.

Correlation between Toll-like receptor 4, C-Jun N-terminal kinase, tumor necrosis factor- α , Leptin changes and chronic intermittent hypoxia of rats

Long Guanhan, Chen Meixi, Cheng Jun
(Guilin Medical College, Guilin 541001)

Abstract Objective To investigate the association between TLR4, C-Jun N-terminal kinase, tumor necrosis factor- α (TNF- α), Leptin changes and chronic intermittent hypoxia (CIH). **Methods** Twenty-four SD rats were divided into 3 groups ($n=8$): control group, CIH 6 weeks group, CIH 8 weeks group. After the modeling, the change of blood pressure and renal artery were observed by the use of non-invasive blood pressure analyzer and HE staining. ELISA was employed to determine the production of TNF- α and Leptin in sera of these animals. The expressions of TLR4 and JNK mRNA were detected by real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (QRT-PCR) method in the adipose tissue. **Results** The blood pressure in intermittent hypoxia group was significantly higher than those in control group ($P<0.01$), and the renal artery pathological changes in intermittent hy-

硫化氢对糖尿病大鼠心肌损伤保护作用及其抗凋亡机制

贾 强^{1,2} 杨 锐² 马善峰² 刘小粉² 吴继锋¹

摘要 目的 观察硫化氢(H_2S)对糖尿病大鼠心肌损伤的保护作用及其抗凋亡机制。方法 雄性SD大鼠随机分为正常对照组(NC组)、糖尿病对照组(DM组)、硫化钠(NaHS)治疗组(NaHS+DM组)和NaHS对照组(NaHS组)。采用链脲佐菌素(STZ) 55 mg/kg 腹腔注射诱导糖尿病大鼠模型,造模成功8周后行离体心脏灌流,测定左心室动力学指标;电镜观察心肌细胞超微结构改变;采用分光光度法检测心肌组织Caspase-3的活性;RT-PCR检测左心室心尖组织Bcl-2、Bax mRNA的表达。结果 与NC组相比,NaHS组各项指标差异均无统计学意义($P > 0.05$),而DM组左心室发展压(LVDP)、左心室内压最大上升速率和下降速率($\pm dp/dt_{max}$)均明显降低($P < 0.01$);左心室舒张末压(LVEDP)明显增大($P < 0.01$);心肌纤维断裂,线粒体肿胀,嵴断裂消失;心肌组织Caspase-3的活性明显增加($P < 0.01$);Bcl-2/Bax mRNA比值降低($P < 0.01$)。与DM组相比,NaHS+DM组LVDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),LVEDP明显降低($P < 0.05$),心肌超微结构损伤明显改善,Caspase-3活性明显降低($P < 0.01$),Bcl-2/Bax mRNA比值升高($P < 0.01$)。结论 H_2S 对糖尿病大鼠心肌损伤具有保护作用,其机制可能与抗心肌细胞凋亡途径有关。

关键词 硫化氢; 心肌损伤; 糖尿病; 凋亡

中图分类号 R 363.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)02-0172-05

2013-09-09 接收

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金项目(编号: KJ2007B111、KJ2013B146); 蚌埠医学院科研项目(编号: BY0907、BYKY1312)

作者单位: ¹安徽医科大学病理学教研室, 合肥 230032

²蚌埠医学院生理学教研室, 蚌埠 233030

作者简介: 贾 强, 男, 硕士研究生;

吴继锋, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: aydwj@126.com

糖尿病心肌病是糖尿病最严重的并发症之一,其病理改变主要表现为心肌肥厚和间质纤维化,临床早期表现为心脏舒张功能不全,晚期表现为心脏收缩功能不全,常见的并发症为心力衰竭及心律失常^[1]。心肌细胞的凋亡在糖尿病心肌病的发展过程中起重要的作用^[2-3]。硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)是继一氧化氮(nitric oxide, NO)和一氧化碳(carbon monoxide, CO)之后的第3种新型气体信号分子^[4]。研究^[5]表明,内源性 H_2S 参与了许多心血管系统的生理与病理生理过程,有抑制心肌细胞凋亡的作用^[6]。但是, H_2S 对大鼠糖尿病心肌病的作用,尤其是抗凋亡作用尚未见报道。该文通过建立糖尿病大鼠心肌损伤动物模型,研究 H_2S 对糖尿病心肌病大鼠的心脏功能、心肌细胞凋亡相关蛋白活性和基因表达的影响,探讨 H_2S 对糖尿病大鼠心肌损伤的保护作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性SD大鼠32只,清洁级,体质量180~220 g,由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)和硫化钠(sodium hydrosulfide, NaHS)均购自Sigma公司;RNAiso Plus试剂和RT-PCR逆转录试剂盒均购自TaKaRa公司;Caspase-3活性检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;PCR引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.3 动物模型制备与分组 雄性SD大鼠32只,适应性饲养1周后随机分为正常组16只和糖尿病组16只。糖尿病组大鼠空腹12 h后,一次性腹腔

poxia group were significantly heavier than those in control group; the content of TNF- α and Leptin in intermittent hypoxia was significantly higher than those in control group($P < 0.01$), and the content of TNF- α and Leptin was significantly increased with the days of hypoxia; the expression of TLR4 and JNK at mRNA levels in intermittent hypoxia was significantly higher than those in control group($P < 0.01$), and the expression of TLR4 and JNK at mRNA levels was significantly increased with the days of hypoxia. **Conclusion** TLR4, JNK, TNF- α , Leptin may be involved in the inflammatory response of chronic intermittent hypoxia in rats.

Key words chronic intermittent hypoxia; Toll-like receptor 4; C-Jun N-terminal kinase; tumor necrosis factor- α ; Leptin