

曲霉菌预处理前后大鼠角膜上皮 TLR4 受体的表达

李 翠, 车成业, 李 娜, 贾文妍, 王晓雪, 刘筱楠, 刘 静, 王 青, 赵桂秋

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81170825); 青岛市科技发展计划资助项目 [No. 11-2-3-1-(5)-nsh; 10-3-3-3-10-nsh]
作者单位: (266003) 中国山东省青岛市, 青岛大学医学院附属医院眼科

作者简介: 李翠, 女, 硕士, 研究方向: 角膜病与白内障。
通讯作者: 赵桂秋, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 角膜病、白内障与眼科病理。zhaoguiqiu@tom.com

收稿日期: 2012-03-19 修回日期: 2012-04-09

Expression of TLR4 in rats' corneal epithelium with pretreatment of Aspergillus

Cui Li, Cheng-Ye Che, Na Li, Wen-Yan Jia, Xiao-Xue Wang, Xiao-Nan Liu, Jing Liu, Qing Wang, Gui-Qiu Zhao

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 81170825); Qingdao Municipal Science and Technology Development Program [No. 11-2-3-1-(5)-nsh; 10-3-3-3-10-nsh]
Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Gui-Qiu Zhao. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China. zhaoguiqiu@tom.com
Received: 2012-03-19 Accepted: 2012-04-09

Abstract

• **AIM:** To detect the expression of TLR4 in rats' corneal epithelium with pretreatment of Aspergillus.

• **METHODS:** Healthy Wistar rats were randomly divided into four groups of A, B, C and D. Group A was the blank control group. Rats' corneal epithelium was stimulated by Aspergillus for 4 hours in group B, C and D. Rats' corneal epithelium was scraped immediately in the completion of the stimulation in group B. The epithelium was scraped after 96 hours in group C. The epithelium was stimulated again by Aspergillus after 96 hours in group D, and was scraped immediately. Real-time PCR was used to assay the mRNA expression of TLR4 receptor in the epithelial tissue.

• **RESULTS:** The expression of TLR4 was significantly increased by the stimulation of Aspergillus, and it became normal after 96 hours. The expression of TLR4 was no significant difference after twice stimulations.

• **CONCLUSION:** The expression of TLR4 can be increased

by the stimulation of Aspergillus, but the basic expression level has no significant change.

• **KEYWORDS:** corneal epithelium; TLR4; Aspergillus; rat

Li C, Che CY, Li N, *et al.* Expression of TLR4 in rats' corneal epithelium with pretreatment of Aspergillus. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(6):1051-1053

摘要

目的: 检测曲霉菌预处理前后大鼠角膜上皮 TLR4 受体的表达变化。

方法: 健康 Wistar 大鼠 24 只随机分为 A、B、C、D 共 4 组, A 组不予特殊处理, B、C、D 三组以罩杯法刺激大鼠角膜 4h 建立曲霉菌刺激模型。B 组在完成刺激后立即取角膜上皮, C 组在 96h 后取角膜上皮, D 组在 96h 后重复刺激, 其后取角膜上皮, 采用 Real-time PCR 法检测所取上皮组织中 TLR4 受体 mRNA 的表达。

结果: 罩杯法建立大鼠角膜曲霉菌刺激模型后 TLR4 受体 mRNA 的表达明显上升, 但 96h 后已趋于正常, 再次刺激后受体 mRNA 的表达变化与初次刺激差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

结论: 罩杯刺激法可以使 TLR4 受体 mRNA 表达上升, 但受体并未因曲霉菌刺激而产生基础表达量的变化, 重复刺激后受体表达亦无明显差异。

关键词: 角膜上皮; TLR4; 曲霉菌; 大鼠

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.06.11

李翠, 车成业, 李娜, 等. 曲霉菌预处理前后大鼠角膜上皮 TLR4 受体的表达. 国际眼科杂志 2012;12(6):1051-1053

0 引言

我国真菌性角膜炎致病菌种以镰刀菌属和曲霉菌属为主^[1], 其发病率因角膜外伤机会增多等多种因素而逐年上升。固有免疫是人体对抗真菌感染的第一道防线, 模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 则是该防线的始动枢纽^[2]。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 是已知与真菌感染关系密切的模式识别受体, 能够非特异性地识别真菌, 启动机体的固有免疫反应, 随后提呈抗原引起特异性免疫应答^[3]。但是目前尚缺乏该受体在真菌多次刺激后的表达变化的报道。据此, 本实验拟采用罩杯法给予大鼠角膜重复的曲霉菌刺激, 运用 Real-time PCR 法检测 TLR4 受体的表达, 期望通过本次实验进一步加深角膜上皮 TLR4 受体在抗真菌感染中作用的认识。

表1 GAPDH 和 TLR4 的 PCR 引物和探针的核苷酸序列

		核苷酸序列(5'→3')	基因库
GAPDH	Sense	CCCCCAATGTATCCGTTGTG	
	Antisense	GTAGCCAGGATGCCCTTTAGT	NM_017008
	Probe	TCTGACATGCCGCTGGAGAAAC	
TLR4	Sense	CTTGGTGAATGTTGAACA	
	Antisense	AGTGGTATATCAGAAATGCTA	NM_019178
	Probe	CACAAGCACACTGACCACCG	

1 材料和方法

1.1 材料 健康 Wistar 大鼠 24 只,体质量 200~250g,购于山东省青岛市药检所,雌雄不限,经裂隙灯检查双眼角膜无明显异常。实验动物及实验条件均符合国家科学技术委员会《实验动物管理条件》规定要求。标准烟曲霉菌株(*Aspergillus fumigatus* 3.0772)由中国普通微生物菌种保藏管理中心提供;盐酸奥布卡因滴眼液及左氧氟沙星滴眼液购自参天制药(中国)有限公司;0.5g/L 安尔碘洗液购自上海利康消毒高科技有限公司;Total RNA 提取试剂 RNAiso Plus 及 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser(Perfect Real-time 100 次量)试剂盒购自大连宝生物工程股份有限公司;引物和探针的设计及合成由大连宝生物工程股份有限公司完成;荧光定量 PCR 仪为德国 Eppendorf 公司的 Mastercycler ep realplex 4 荧光定量 PCR 仪。

1.2 方法

1.2.1 曲霉菌培养 标准菌株真空冷冻干燥菌种开封后,用无菌吸管吸取 0.3~0.5mL 无菌生理盐水,溶解冻干菌体呈悬浮状,吸取全部菌体悬浮液,接种于 Sabouroud 低糖琼脂斜面培养基,28℃ 温箱培育 7d,观察菌种生长良好后 4℃ 冰箱冷藏保存。实验前 1wk 取出保藏菌种,28℃ 温箱培育 2d 后,将菌种接种于 Sabouroud 培养基,28℃ 温箱培育 5~7d,用接种环收集含有真菌孢子及菌丝成分,接种于液体培养基,置于 37℃ 摇床培养 2d,收集曲霉菌菌丝,用研磨棒研磨为 20~40μm 大小的菌丝片段,以红细胞计数板行曲霉菌菌丝片段计数并调整浓度为 1×10^8 个/mL。配好的菌液仅限于当天使用。

1.2.2 角膜真菌刺激模型 大鼠 24 只随机分为 A、B、C、D 共 4 组,每组 6 只,均以右眼为实验眼,实验前 3d 给予左氧氟沙星滴眼液每日 3 次。采用 100g/L 水合氯醛(3mL/kg) ip 麻醉联合盐酸奥布卡因滴眼液表面麻醉。给予安尔碘清洗结膜囊,常规消毒、铺巾。使用下表面直径为 5mm 的圆锥卡环,令其紧密接触大鼠角膜外缘并维系其虹吸作用,将浓度为 1×10^8 个/mL 的烟曲霉菌液加入环内,刺激持续 4h。取环并用生理盐水冲洗结膜囊后,刮取角膜上皮置于 RNAiso 提取用裂解液中供提取 RNA 使用。A 组不予刺激即取角膜上皮,B 组在完成刺激后立即取角膜上皮,C 组在完成刺激 96h 后取角膜上皮,D 组在完成刺激 96h 后重复刺激 4h,其后取角膜上皮。

1.2.3 RT-PCR 检测 TLR4mRNA 的表达 提取角膜上皮组织总 RNA,反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板,用特异性引物和 FAM 及 Eclipse 标记的 Taqman 探针,检测 TLR4 基因表达情况,GAPDH 为内参,引物和探针序列见表 1。按

以下 20μL 反应体系进行:cDNA 模板 1μL,上、下游引物及探针各 0.5μL,10×PCR Buffer II 2μL,dNTP Mixture (10mmol/L)0.4μL,Taq 酶 0.2μL,RNase Free H₂O 14.9μL。每个样本设 3 个复孔。反应条件:95℃ 15s,95℃ 5s,60℃ 45s 执行 40 个循环。反应完成后采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较目的基因的相对表达量。

统计学分析:数据采用 SPSS 17.0 软件进行处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组之间基因表达差异的比较采用单因素方差分析,处理组两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 作为差异有统计学意义。

2 结果

使用 RT-PCR 检测各组大鼠角膜上皮 TLR4 基因的表达,各组大鼠角膜上皮中均表达 TLR4mRNA,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算数据,各组大鼠角膜上皮 TLR4 受体 mRNA 的表达分别为:A 组 0.9475 ± 0.1790 ,B 组 1.5885 ± 0.3045 ,C 组 0.8997 ± 0.1202 ,D 组 1.8221 ± 0.1960 ,各组 TLR4 受体 mRNA 表达差异有统计学意义($F = 28.798, P = 0.000$)。

进一步两两比较:罩杯法建立大鼠角膜曲霉菌刺激模型后 TLR4 受体 mRNA 的表达较 A 组上调($P = 0.000$);初次刺激完成 96h 后 TLR4 受体 mRNA 的表达与 A 组表达相比差异无统计学意义($P = 0.699$),而与其它两组间比较差异有统计学意义($P = 0.000$);初次刺激 96h 后再次刺激 TLR4 受体 mRNA 的表达较 A 组上调($P = 0.000$),但与初次刺激后表达的变化相比差异无统计学意义($P = 0.069$)。

3 讨论

我国作为发展中国家,从事工农业生产的人口居多,工农业性外伤特别是植物性外伤多见,为真菌感染角膜提供了机会,而其中又以镰刀菌和烟曲霉菌致病率最高。目前由于临床上缺乏广谱、低毒、高效的抗真菌药物,而手术治疗又受到角膜供体来源匮乏以及术后复发等因素的限制,致使真菌性角膜炎的治疗比较棘手,导致许多患者最终丧失视力,甚至摘除眼球,成为致盲率很高的角膜疾病^[4]。由此该病受到了国内外很多学者的高度重视,成为感染性角膜炎研究的焦点之一。

近来对真菌性角膜炎的研究主要集中在治疗上,如抗真菌药、羊膜移植、角膜移植等,而对于真菌性角膜炎发生和发展的机制以及独特的免疫学特征了解不够深入。目前随着免疫学和分子生物学技术的不断发展以及相关学科的研究,人们开始关注免疫机制在真菌感染角膜中的作用,而固有免疫作为机体防御微生物感染的第一道防线,利用其免疫细胞,通过相应的机制,抑制真菌在宿主体内

繁殖和侵袭,构成了角膜抵抗真菌感染的重要组份,在真菌感染相关免疫机制的研究中越来越受到重视^[5]。固有免疫应答的策略在于能够通过固有免疫细胞表达的 PRR 识别病原微生物中普遍存在的高度保守的共有结构,即病原相关分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)而激活、启动机体免疫防御反应,识别和清除病原体^[6]。研究发现,与真菌相关的模式识别受体有 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)、核苷酸结合寡聚域样受体、C 型凝集素受体等^[2,3]。真菌感染后,通过这些受体介导对真菌的黏附、摄取和杀灭,激起和(或)调节机体的固有免疫反应。TLRs 是目前了解最清楚的模式识别受体,这其中又以 TLR4 受体与真菌感染关系最为密切。有研究表明^[7],角膜上皮细胞在烟曲霉菌的刺激下 TLR2 和 TLR4 表达上调,活化的 TLR2 和 TLR4 通过 NF- κ B 启动促炎症细胞因子 IL-1 β 和 IL-10 的合成释放,同时角膜上皮细胞还通过 TLR2 和 TLR4 识别烟曲霉菌启动固有免疫防御,调节炎症因子的产生抵御真菌感染,在角膜固有免疫中发挥重要作用。

角膜上皮细胞的 TLR4 受体不仅可以作为模式识别受体启动相关炎症因子,还通过自身表达的变化参与抗真菌感染。本研究首先设计卡环法真菌刺激实验,使大鼠角膜上皮在一定时间内接受真菌的刺激,导致 TLR4 受体 mRNA 的表达上调,这一结果与黄礼彬等^[8]的实验结论相同。完成刺激 96h 后,TLR4 受体 mRNA 的表达恢复接近正常。此后再次给予真菌刺激,受体表达亦再次上调,该

上调与初次刺激后的程度相近。本实验结果提示单杯刺激法能够启动 TLR4 受体 mRNA 表达上调,但受体并未因曲霉菌刺激而产生基础表达量的变化,重复刺激也不影响其表达上调的程度。表达量的变化仅仅是 TLR4 受体参与角膜抗真菌感染的一个方面,重复刺激对该受体在真菌性角膜炎固有免疫阶段中作用的影响尚需通过进一步的受体功能实验深入分析。

参考文献

- 1 白海青,金梅玲,赵桂秋,等. 镰刀菌和曲霉菌性角膜溃疡的组织病理学特点. 中华眼科杂志 2004;40(5):341-343
- 2 Che CY, Jia WY, Xu Q, et al. The roles of surfactant protein D during *Aspergillus fumigatus* infection in human corneal epithelial cells. *Int J Ophthalmol* 2012;5(1):13-17
- 3 Leal SM Jr, Cowden S, Hsia YC, et al. Distinct roles for Dectin-1 and TLR4 in the pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* keratitis. *PLoS Pathog* 2010;6(7):e1000976
- 4 王青,赵桂秋,王传富,等. 羊膜在真菌性角膜炎手术治疗中的应用观察. 中华眼外伤职业眼病杂志 2007;29(9):693-695
- 5 Li Na, Che CY, Hu LT, et al. Effects of COX-2 inhibitor NS-398 on IL-10 expression in rat fungal keratitis. *Int J Ophthalmol* 2011;4(2):116-120
- 6 Karthikeyan RS, Leal SM Jr, Prajna NV, et al. Expression of innate and adaptive immune mediators in human corneal tissue infected with *Aspergillus* or *fusarium*. *J Infect Dis* 2011;204(6):942-950
- 7 Zhao J, Wu XY, Yu FS. Activation of Toll-like receptors 2 and 4 in *Aspergillus fumigatus* keratitis. *Innate Immun* 2009;15(3):155-168
- 8 黄礼彬,韩晓丽,胡建章,等. 茄病镰刀菌对体外培养小鼠角膜基质细胞 TLR4 表达的影响. 眼科研究 2009;27(9):747-750