



不同鼠龄小鼠甲型流感病毒 H1N1/FM1 株感染 TLR4-NF- κ B 信号通路改变比较研究

董 丹, 王雪峰, 南春红, 岳志军

(辽宁中医药大学附属医院儿科, 沈阳 110032)

【摘要】 目的 比较不同鼠龄小鼠感染流感病毒后 TLR4-NF- κ B P65 信号通路的改变情况。**方法** 采用免疫组化和 RT-PCR 技术检测不同鼠龄鼠肺组织中 TLR4 和 NF- κ B P65 的蛋白及 mRNA 的表达, 比较不同鼠龄感染流感病毒后信号通路的改变情况。**结果** (1) 肺组织 TLR4 蛋白表达: 幼龄模型组 TLR4 蛋白表达最强, 与正常组和成龄模型组比较, 差异均具有显著性 ($P < 0.05$)。 (2) 肺组织 NF- κ B P65 蛋白表达: 幼龄模型组表达最强, 且随着时间变化表达逐渐增强, 每一时间点与前一时间点比较差异具有显著性 ($P < 0.05$)。 (3) 肺组织 TLR4 mRNA 表达: 幼龄模型组表达最强, 明显高于正常组和成龄模型组, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。 (4) 肺组织 NF- κ B P65 mRNA 表达: 幼龄模型组表达最强, 随着病程进展表达逐渐增强; 与正常组和成龄模型组比较, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。**结论** TLR4-NF- κ B P65 信号通路的过度活化, 可能是幼龄鼠肺脏免疫病理损伤严重的机制之一。

【关键词】 流感病毒; 鼠龄; Toll 样受体; TLR4; NF- κ B P65

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 12-0015-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2015.12.004

Comparison of the changes in TLR4-NF- κ B signaling pathway in infant and adult mice infected with influenza virus

DONG Dan, WANG Xue-feng, NAN Chun-hong, YUE Zhi-jun

(The First Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

【Abstract】 Objective To compare the changes in TLR4-NF- κ B signaling pathway in infant and adult mice infected with influenza virus, and to provide experimental evidence for the study of immunopathological mechanism in pediatric respiratory virus susceptibility. **Methods** Immunohistochemistry and RT-PCR were applied to detect the expressions of lung TLR4 and NF- κ B P65 mRNA and proteins in the infant and adult mice, and to compare the changes in TLR4-NF- κ B P65 signaling pathway after infection with influenza virus. **Results** (1) The infant model group showed the strongest expression of TLR4 protein in the lung tissue, compared with that in the normal group and adult model group showing significant differences ($P < 0.05$). (2) The expression of NF- κ B P65 protein in the lung tissue was strongest in the infant model group, and it was gradually increased over time, showing a significant difference between each time point and the next time point ($P < 0.05$). (3) The infant model group showed the strongest expression of TLR4 mRNA in lung tissue, significantly higher than that in the normal and adult model groups ($P < 0.05$). (4) The expression of NF- κ B P65 mRNA in the lung tissue was highest in the infant model group, and significantly higher than that in the normal and the

[作者简介] 董丹(1976-), 女, 研究方向: 小儿呼吸系统疾病中西医防治。E-mail: dong_dan76@163.com。

[通讯作者] 王雪峰(1957-), 女, 研究方向: 小儿病毒性疾病。Email: lnzywxf@163.com。

adult model groups ($P < 0.05$), and it was gradually increased with the time. **Conclusions** The over-activation of TLR4-NF- κ B P65 signaling pathway may be one of the immunopathological mechanisms of serious injury in the lung tissue in infant rats.

【Key words】 Influenza virus; Toll-like receptors; TLR4; NF- κ B P65; Respiratory infection; Infant rats; Adult rats

流感病毒是一类具有高发病率和高死亡率的传染性病毒。流感病毒反复暴发流行,并在人群中引起急性呼吸系统疾病。据报道,流感病毒引发的急性呼吸道传染病每年的发病率为 10% ~ 30%^[1]。在所有年龄段人群当中,儿童是甲型流感发病的最重要人群,儿童甲型流感的感染率是成人的 1.5 ~ 3 倍,甲型流感病毒是儿童上呼吸道感染和儿童非细菌性下呼吸道感染的主要病原^[2]。从免疫学角度来看,流感病毒致病不仅与病毒本身密切相关,而且与机体的免疫反应有关,是病毒与机体两个复杂生物系统相互作用的结果。

Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)作为非特异性免疫系统中重要的模式识别受体,是炎症信号传递的门户蛋白,在免疫防御反应中起重要作用^[3,4],参与了病毒感染初期的非特异性免疫应答的启动过程和抗病毒特异性免疫的调控。TLRs 能够特异性地识别病原体,通过跨膜结构将病原相关分子刺激信号转导入细胞内,产生复杂的级联信号反应,导致核转录因子 NF- κ B、IFN 诱导因子等转录因子活化,刺激细胞因子的产生,从而启动机体的天然和获得性免疫反应^[5]。本研究拟采用甲型 IV 鼠肺适应株感染小鼠,应用免疫组织化学和 RT-PCR 技术检测小鼠肺组织中 TLR4 和 NF- κ B P65 的蛋白及 mRNA 在不同时间点的表达,比较不同鼠龄小鼠感染流感病毒后 TLR4-NF- κ B P65 信号通路的改变情况,从而为小儿呼吸道病毒易感性免疫机制研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 病毒

甲型流感病毒鼠肺适应株 A/FM1/47 (H1N1),中国预防医学科学院病毒研究所提供,冻存于辽宁中医药大学病毒室。解冻后经 9 日龄尼克白种鸡胚(SPF 级,购买于辽宁益康生物制品厂)的尿囊腔接种培养传代。微量血凝试验滴定效价,血凝效价 1:1280 者供实验用。

1.2 实验动物

昆明小鼠,清洁级,雌雄各半,鼠龄各半,幼龄

鼠选 3 ~ 4 周龄、体重 12 ~ 14 g、成龄鼠选 8 ~ 12 周龄、体重 20 ~ 28 g。由辽宁中医药大学实验动物中心提供,生产合格证号:SCXK(辽)2003-008,使用合格证号:SYXK(辽)20090002。

1.3 仪器与试剂

1.3.1 主要仪器及设备:II 级生物安全柜(美国 Baker 公司,型号:SG403 TXCE);精密转轮切片机(RM2135,德国,Leica);倒置荧光显微镜(Olympus BX50);系统生物显微镜(BX50F4,日本, Olympus);漂烘处理仪(ZMN-6802,常州市华利电子有限公司);AR2140 电子分析天平(上海奥豪斯公司);电热恒温干燥箱(GZX-DH.400-S-II,上海跃进医疗仪器厂);电热鼓风干燥箱(101-0A,天津泰斯特仪器有限公司);超纯水机(Milli-Q,美国 Millipore);低温冰箱(MDF-382E,日本 Sanyo);低温高速离心机(德国 Heraeus, Biofuge 28RS);电动玻璃匀浆机(DY89-I,宁波新芝科器研究所);超声波细胞粉碎机(JY92-II,宁波新芝科器研究所);蛋白-核酸分析仪(DU-600,美国 Beckman);PCR 仪(PE-9600,美国 Perkin Elmer);电泳仪(EPS-300,上海天能)。

1.3.2 免疫组化试剂:一抗、二抗试剂盒、DAB 显色试剂盒:(武汉博士德生物工程有限公司,生产批号:2009 年 5 月);PBS 缓冲液、蒸馏水、中性树胶、苏木素、枸橼酸缓冲液等。

1.3.3 RT-PCR 试剂:Trizol 总 RNA 提取试剂(批号:1203406, Invitrogen 公司);RT-PCR 试剂盒(批号:Bk2701)、DEPC(批号:BB10916S03)、DNA-marker DL2000(批号:CB3301),IV、GAPDH、TLR4、NF- κ B P65 引物均由宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)生产。

1.4 方法

1.4.1 甲型流感病毒 FM1 株对小鼠半数致死量(LD₅₀)的测定^[6]:将 H1N1 增毒后的新鲜尿囊液(血凝滴度 1:1280)10 倍系列稀释 6 个浓度(10^{-1} ~ 10^{-6}),将 30 只幼龄昆明种小鼠随机分 6 组,每组 5 只。在乙醚麻醉下经鼻腔接种甲型流感病毒 FM1 株,每组接种同一个浓度(0.05 mL/只);连续观察

14 d,记录小鼠死亡情况,并进行死亡百分率统计,计算 IV 小鼠半数致死量。

1.4.2 分组:依据随机数字表法,将 160 只昆明种小鼠分随机为 4 组,分别为:幼龄模型组 40 只、成龄模型组 40 只、幼龄正常对照组 40 只、成龄正常对照组 40 只。

1.4.3 模型复制:除正常对照组外,各组均造模。依照文献[6],取 200 mL 烧杯,杯中放脱脂干棉团,将干棉团倒入无水乙醚至浸湿程度,将小鼠扣入带棉团的烧杯中。见小鼠极度兴奋后,明显呈无力样,躺倒片刻,马上取出,将小鼠腹部朝上,头仰起,用注射器每鼻孔 15LD₅₀ IV 液 0.05 mL,建立 IV 感染小鼠模型。正常组在同等条件下接种等量不含病毒的生理盐水。

1.4.4 标本取材:各组模型分别于造模后第 1、3、5、7 天,处死动物取材,每组各取 10 只。观察并记录肺组织病变程度,称肺重;取左侧肺叶用于 RT-PCR 检测;右侧肺叶用于病理、免疫组织化学检测。

1.4.5 SABC 免疫组织化学染色法检测肺组织 TLR4、NF-κB P65 蛋白表达:TLR4、NF-κB P65 免疫组织化学检测操作按照试剂盒说明进行,采用北航图象采集分析系统对染色结果进行分析。阳性结果判断:以病变部位细胞上出现棕黄色颗粒为阳性表达。阳性强度判断:每个切片取 10 个高倍镜视

野,测量肺组织中阳性细胞的积分光密度值,取其均值为该片的测量结果。

1.4.6 RT-PCR 法检测肺组织的 TLR4、NF-κB P65mRNA 表达:总 RNA 提取:总 RNA 经蛋白核酸分析仪测定 A₂₆₀和 A₂₈₀值,计算总 RNA 含量。

逆转录 cDNA:取总 RNA1 μL 加入 20 μL 的反转录体系 TLR4、NF-κB P65、GAPDH 引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,序列见表 1。

电泳:RT-PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳、电压条件为 5V/cm,溴化乙锭染色后紫外灯下观察特异光带。

结果分析:应用天能凝胶分析系统摄像、分析电泳结果,以内参照为标准进行半定量分析。计算公式:TLR4 或 NF-κB P65 相对量 = TLR4 或 NF-κB P65 产物电泳条带强度/内参电泳条带强度。

1.4.7 统计学方法:采用 SPSS 11.5 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲型 IV 株对小鼠半数致死量(LD₅₀)的测定

各组小鼠接种 IV 后,连续观察 14 d,小鼠死亡情况见表 2。

表 1 引物序列

Tab.1 Sequences of the primers

检测指标 Test index	引物序列 Primer sequences			扩增片段长度 Amplified fragment length
GAPDH	上游 5′	ACC ACC ATG GAG AAG GCT GG	3′	计 528 bp
	下游 5′	CTC AGT GTA GCC CAG GAT GC	3′	
TLR4	上游 5′	GCACTGTTCTTCTCCTGCC	3′	计 293 bp
	下游 5′	GTTTCCTGTCAGTATCAAG	3′	
NF-κB P65	上游 5′	ATGTGCATCGGCAAGTGG	3′	计 294 bp
	下游 5′	CAGAACTTGACTTTCGGGTAG	3′	

表 2 小鼠接种 IV 后的死亡情况

Tab.2 The number of mice died after type IV influenza virus vaccination

病毒稀释度 Virus concentration	接种鼠数 Number of vaccinated mice	活鼠 Number of Surviving mice	死鼠 Number of Dead mice	积累总计 Cumulative total		死亡比 Mortality	死亡率 (%) Mortality rate
				活鼠 ↓ Surviving mice	死鼠 ↑ Dead mice		
10 ⁻¹	5	0	5	0	19	19/19	100
10 ⁻²	5	0	5	0	14	14/14	100
10 ⁻³	5	0	5	0	9	9/9	100
10 ⁻⁴	5	2	3	2	4	4/6	66.7
10 ⁻⁵	5	4	1	6	1	1/7	14.3
10 ⁻⁶	5	5	0	11	0	0/11	0

应用 Reed 和 Muench 公式计算 LD₅₀。距离比例 = 高于 50% 的死亡百分数 - 50 / 高于 50% 的死亡百分数 - 低于 50% 的死亡百分数 = (66.7 - 50) / (66.7 - 14.3) = 0.32; LD₅₀ = 高于 50% 的死亡的病毒最高稀释度的对数 + 距离比例 = 4 + 0.32 = 4.32。

2.2 免疫组化法检测不同时点各组小鼠肺组织 TLR4、NF-κB P65 蛋白表达

2.2.1 不同时点各组小鼠肺组织 TLR4 蛋白表达: 幼龄正常组和成龄正常组均可以检测到少量的 TLR4 蛋白表达, 且各个时点比较, 蛋白表达差异无显著性 ($P > 0.05$)。幼龄模型组 TLR4 蛋白表达最强, 且随着时间推移表达逐渐增强, 在第 5 天达到峰值; 幼龄模型组与正常组和成龄模型组比较, 差异均具有显著性 ($P < 0.05$)。成龄模型组 TLR4 蛋白表达高于各正常组, 但低于幼龄模型组 (与正常组和幼龄模型组比较, $P < 0.05$) (表 3)。

2.2.2 不同时点各组小鼠肺组织 NF-κB P65 蛋白表达: 幼龄正常组和成龄正常组均可以检测到少量的 NF-κB P65 蛋白表达, 且各个时点比较, 蛋白表达差异无显著性 ($P > 0.05$)。幼龄模型组 NF-κB P65

蛋白表达最强, 且随着时间变化表达逐渐增强, 每一时间点与前一时间点比较具有显著性差异 ($P < 0.05$); 幼龄模型组与正常组和成龄模型组比较, 蛋白表达均具差异有显著性 ($P < 0.05$)。成龄模型组 NF-κB P65 蛋白表达高于各正常组, 但低于幼龄模型组 (与正常组和幼龄模型组比较, $P < 0.05$), 成龄模型组蛋白表达各个时间点无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 4)。

2.3 RT-PCR 法检测不同时点各组小鼠肺组织的 TLR4、NF-κB P65 mRNA 表达

2.3.1 不同时点各组小鼠肺组织 TLR4 mRNA 表达: 幼龄正常组和成龄正常组肺组织均可以检测到少量的 TLR4 mRNA 表达, 且各个时点比较, mRNA 表达无显著性差异 ($P > 0.05$)。幼龄模型组 TLR4 mRNA 表达最强, 且随着病程进展表达逐渐增强, 在第 5 天达到峰值, TLR4 mRNA 含量检测强度与内参比值达到 1.8351 ± 0.0110 ; 幼龄模型组 TLR4 mRNA 明显高于正常组和成龄模型组, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。成龄模型组 TLR4 mRNA 表达高于各正常组, 但低于幼龄模型组 (与正常组和幼龄模型组比较, $P < 0.05$)。(结果见表 5)

表 3 各组小鼠肺组织 TLR4 积分光密度 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.3 Integral optical density of TLR4 in the lung tissue of each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	1 d 1 day	3 d 3 days	5 d 5 days	7 d 7 days
幼龄正常组 Infant normal group	1.0899 ± 0.0302	1.0896 ± 0.0310□	1.0884 ± 0.0016□	1.0888 ± 0.0543□
成龄正常组 Adult normal group	1.0921 ± 0.0456	1.0913 ± 0.0338□	1.0899 ± 0.0264□	1.0909 ± 0.1245□
幼龄模型组 Infant model group	1.9737 ± 0.1021★▼	1.9832 ± 0.0057★▼□	2.0371 ± 0.2334★▼■	1.9907 ± 0.0125★▼■
成龄模型组 Adult model group	1.2123 ± 0.0364●▼	1.3349 ± 0.0543●▼□	1.5307 ± 0.1106●▼■	1.4012 ± 0.0382●▼□

注: 与正常组比较: □ 无显著差异, $P > 0.05$; ▼ 有显著差异, $P < 0.05$ 。与幼龄模型组比较: ○ 差异无显著, $P > 0.05$; ● 差异有显著性, $P < 0.05$ 。与成龄模型组比较: ☆ 差异无显著, $P > 0.05$; ★ 差异有显著性, $P < 0.05$ 。与前一时间点比较: □ 差异无显著性, $P > 0.05$, ■ 差异有显著性, $P < 0.05$, 下同。

Note. Compared with the normal group: ▼ $P < 0.05$, significant difference; Compared with the infant model group, ○ $P > 0.05$, non-significant difference, ● $P < 0.05$, significant difference. Compared with the adult model group: ☆ $P > 0.05$, non-significant difference, ★ $P < 0.05$, significant difference. Compared with the previous time point: □ $P > 0.05$, non-significant difference, ■ $P < 0.05$, significant difference. The same as below.

表 4 各组小鼠肺组织 NF-κB P65 积分光密度 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.4 Integral optical density of NF-κB P65 in the lung tissue of each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	1 d 1 day	3 d 3 days	5 d 5 days	7 d 7 days
幼龄正常组 Infant normal group	1.7232 ± 0.0562	1.7497 ± 0.0320□	1.7486 ± 0.0823□	1.7470 ± 0.0045□
成龄正常组 Adult normal group	1.7906 ± 0.0534	1.7884 ± 0.0571□	1.7889 ± 0.0078□	1.7901 ± 0.0324□
幼龄模型组 Infant model group	2.3784 ± 0.1112★▼	2.7743 ± 0.0127★▼■	2.9456 ± 0.1210★▼■	3.2201 ± 0.0213★▼■
成龄模型组 Adult model group	1.9231 ± 0.0267●▼	1.9499 ± 0.0913●▼□	1.9407 ± 0.3506●▼□	1.9423 ± 0.0759●▼□

表 5 各组小鼠肺组织 TLR4 mRNA 表达 (TLR4/内参, $n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Expression of TLR4 mRNA in the lung tissue of each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	1 d 1 day	3 d 3 days	5 d 5 days	7 d 7 days
幼龄正常组 Infant normal group	0. 5723 $\pm$ 0. 0661	0. 5699 $\pm$ 0. 0479□	0. 5810 $\pm$ 0. 1003□	0. 5743 $\pm$ 0. 0528□
成龄正常组 Adult normal group	0. 5902 $\pm$ 0. 0424	0. 5844 $\pm$ 0. 0231□	0. 5866 $\pm$ 0. 1028□	0. 5901 $\pm$ 0. 0477□
幼龄模型组 Infant model group	1. 6564 $\pm$ 0. 0157★▼	1. 7874 $\pm$ 0. 0227★▼■	1. 8351 $\pm$ 0. 0110★▼■	1. 8323 $\pm$ 0. 0685★▼□
成龄模型组 Adult model group	0. 7145 $\pm$ 0. 0578●▼	0. 7539 $\pm$ 0. 1453●▼□	0. 7887 $\pm$ 0. 0136●▼□	0. 7890 $\pm$ 0. 0279●▼□

表 6 各组小鼠肺组织 NF-κB P65 mRNA 表达 (NF-κB P65/内参, $n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 6 Expression of NF-κB P65mRNA in the lung tissue of each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Groups	1 d 1 day	3 d 3 days	5 d 5 dasy	7 d 7 days
幼龄正常组 Infant normal group	0. 7467 $\pm$ 0. 0135	0. 7516 $\pm$ 0. 0438□	0. 7523 $\pm$ 0. 1012□	0. 7504 $\pm$ 0. 0698□
成龄正常组 Adult normal group	0. 7506 $\pm$ 0. 0012	0. 7532 $\pm$ 0. 0569□	0. 7521 $\pm$ 0. 2346□	0. 7518 $\pm$ 0. 0787□
幼龄模型组 Infant model group	2. 1325 $\pm$ 0. 0031★▼	2. 2456 $\pm$ 0. 0357★▼■	2. 4162 $\pm$ 0. 0080★▼■	2. 4172 $\pm$ 0. 0176★▼□
成龄模型组 Adult model group	0. 8914 $\pm$ 0. 0358●▼	0. 9147 $\pm$ 0. 0316●▼□	0. 9139 $\pm$ 0. 0136●▼□	0. 9161 $\pm$ 0. 1345●▼□

2. 3. 2 不同时点各组小鼠肺组织 NF-κB P65 mRNA 表达:幼龄正常组和成龄正常组肺组织均可以检测到少量的 NF-κB P65 mRNA 表达,在观察第 1、3、5、7 天各个时点比较,mRNA 表达差异无显著性 ($P > 0. 05$)。幼龄模型组 NF-κB P65 mRNA 表达最强,且随着病程进展表达逐渐增强;幼龄模型组 NF-κB P65 mRNA 明显高于正常组和成龄模型组,差异具有显著性 ($P < 0. 05$)。成龄模型组 NF-κB P65 mRNA 表达高于各正常组,但低于幼龄模型组 (与正常组和幼龄模型组比较, $P < 0. 05$) (表 6)。

3 讨论

甲型流感病毒的致病性取决于宿主与病毒之间的关系。流感病毒感染宿主后,启动一连串的免疫反应,以激活各部分免疫防御系统。Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是一类病原分子识别受体,最早由 Medzhitov 于 1997 年在果蝇体内发现^[8]。TLRs 能够识别病原体,介导信号转导途径,刺激细胞因子的产生,从而启动机体的天然和获得性免疫反应^[9]。研究表明,TLRs 与其相应的配体结合后激活信号转导通路,诱导宿主防御功能基因的活化表达,包括促炎性细胞因子、抗炎性细胞因子、趋化因

子、抗原提呈分子和共刺激分子等,从而发挥相应的清除病原微生物以及炎症免疫反应^[10-13]。但 TLRs 过度激活引起的炎性因子大量释放,则使生物体的自身免疫稳态失衡。

TLR4 是最早鉴定的人类 Toll 样受体,也是迄今为止研究最多、研究最清楚的样受体。有研究表明^[14],TLR4 在呼吸道变态反应中有着重要的作用。在急性肺损伤中,TLR4 在中性粒细胞和内皮细胞都有表达,其与相关病原微生物抗原和内源性抗原识别后,诱导了多种细胞因子、化学因子的生成和释放,最终引起以中性粒细胞浸润和肺微血管损伤为中心的炎性反应失控。核转录因子 NF-κB 是 TLR4 下游信号因子之一,是由 Rel 蛋白家族中两个亚单位构成的二聚体复合物;其中由 P65 和 P50 组成的异源二聚体最具有代表性。TLR4 识别多种病毒抗原,多个 TLR 协同活化,通过髓样分化因子 88 (MyD88)依赖的信号通路和非 MyD88 依赖的信号通路诱导 NF-κB 产生。

本研究用甲型 IV 鼠肺适应株分别感染幼龄鼠和成龄鼠,应用免疫组织化学技术和 RT-PCR 技术检测不同时点小鼠肺组织中 TLR4 和 NF-κB P65 的蛋白、mRNA 的表达情况。免疫组化结果显示:幼龄正常组和成龄正常组均可以检测到少

量的 TLR4、NF- κ B P65 蛋白表达,且各个时点比较,蛋白表达差异无显著性($P > 0.05$)。幼龄模型组蛋白表达最强,且随着时间变化表达逐渐增强;成龄模型组 TLR4 和 NF- κ B P65 蛋白表达高于各正常组,但低于幼龄模型组,在各个时间点差异无显著性($P > 0.05$)。RT-PCR 检测结果显示:幼龄正常组和成龄正常组肺组织均可以检测到少量的 TLR4、NF- κ B P65 mRNA 表达,在观察第 1、3、5、7 天各个时点比较,mRNA 表达无显著性差异($P > 0.05$)。幼龄模型组 TLR4、NF- κ B P65 mRNA 表达最强,明显高于正常组和成龄模型组,且随着病程进展表达逐渐增强;成龄模型组 TLR4、NF- κ B P65 mRNA 表达高于各正常组,但低于幼龄模型组。

研究结果表明,正常小鼠肺组织中仅可以检测到少量的 TLR4 和 NF- κ B P65 表达。用流感病毒感染小鼠后,TLR4-NF- κ B P65 信号通路表达明显上调,并且随着病程进展表达量呈现逐渐增加的趋势,说明流感病毒感染和 TLR4 介导的信号转导途径有关。进一步对不同鼠龄进行研究发现,不同鼠龄小鼠 TLR4-NF- κ B P65 信号通路活化程度不同。幼龄鼠感染病毒后出现肺组织 TLR4、NF- κ B P65 表达显著升高,而成龄鼠则只出现轻度升高。可以推测,在同样的病毒量攻击下,幼龄鼠由于免疫系统发育不完善、稳定性较差易产生 TLR4 的过度激活,导致 NF- κ B P65 等过度活化,从而引起炎症因子大量释放,使其自身免疫稳态失衡,造成肺脏免疫病理损伤比成龄鼠严重。因此,本研究在 TLR4-NF- κ B P65 信号通路上为小儿流感病毒易感性的免疫学机制提供了一定的实验验证。当然,由于 Toll 样受体调控的信号通路所涉及炎症因子众多,组成了错综复杂的信息网络,其中更复杂的机制还需要今后开展更深入和细致的研究。

参考文献:

- [1] 毛晓健,钱新华,曾其毅. 儿童甲型流行性感研究进展[J]. 实用医学杂志,2008, 24(3): 332-333.
- [2] Watkins JW. Influenza: burden of disease in childhood [c]. Int Congress Series, 1263, 2004: 263-266.
- [3] 曾星,王镓,蔡萃,等. TLR 介导 BCG 和猪苓多糖激活巨噬细胞株 J774 NF- κ B 的表达[J]. 免疫学杂志, 2006, 22(5): 515-518.
- [4] 杨玉荣,余锐萍,梁宏德. Toll-NF- κ B 信号途径及其介导的功能[J]. 细胞生物学杂志, 2007, 29(4): 483-485.
- [5] Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity [J]. Int immunol, 2005, 17(1): 1-14.
- [6] 郭元吉. 流行性感冒病毒及实验技术 [M]. 北京:中国三峡出版社, 1997:110-112, 91.
- [7] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr, et al. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. Nature, 1997, 388 (6640): 394-397.
- [8] Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity [J]. Int Immunol, 2005, 17(1): 1-14.
- [9] Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors [J]. Curr Opin Immunol, 2003, 15 (4): 396-401.
- [10] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors [J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 335-376.
- [11] Vasselon T, Detmers PA. Toll receptors: a central element in innate immune responses [J]. Infect Immun. 2002, 70 (3): 1033-1041.
- [12] Sabroe I, Read RC, Whyte MK, et al. Toll-like receptors in health and disease: complex questions remain [J]. J Immunol. 2003, 171(4): 1630-1635.
- [13] Yamashita M, Nakayama T. Progress in allergy signal research on mast cells regulation of allergic airway in inflammation through toll-like receptor 4 mediated modification of mast cell function [J]. J Pharmacol Sci. 2008, 106(3): 332-335.

[修回日期]2015-11-10