

## 基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.05.013

## 脂多糖预处理对大鼠急性胰腺炎 IRAK-4 表达的影响

任毅,甄林林,韩学东,于昆

(南京医科大学附属淮安市第一人民医院普外科,淮安 223300)

**【摘要】**目的:观察脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)预处理后白细胞介素-1受体相关激酶-4(Interleukin-1 receptor-associated kinase 4, IRAK-4)表达在大鼠急性胰腺炎(Acute pancreatitis, AP)早期的变化,探讨LPS预处理减轻AP的可能机制。方法:雄性SD大鼠63只,随机分为3组:假手术组(Sham组)、急性胰腺炎(AP组)和LPS预处理组(LPS组),LPS组经腹腔注射LPS,其余两组均给予等体积生理盐水。Sham组造模后3 h取材,其余两组分别于造模后3、6、12、24 h取材。HE染色显微镜下观察各组病理改变,Western blot及RT-PCR法测定胰腺组织IRAK-4蛋白和mRNA表达,免疫组化法检测胰腺组织NF-κB表达,ELISA法检测血浆中TNF-α含量。结果:病理损伤AP组>LPS组>Sham组。AP组IRAK-4 mRNA及蛋白的表达于12 h达到高峰,随后降低,而LPS预处理后其表达明显低于AP组( $P < 0.01$ ),且随时间的延长无明显改变( $P > 0.05$ )。LPS组各时间点NF-κB及血液TNF-α表达明显低于AP组( $P < 0.01$ ),两组均于12 h达到高峰( $P < 0.01$ )。结论:抑制IRAK-4表达,进而抑制NF-κB及TNF-α等的表达,可能是脂多糖预处理对AP保护作用的重要机制之一。

**【关键词】**白细胞介素-1受体相关激酶-4;急性胰腺炎;脂多糖

【中国图书分类法分类号】R576

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-11-18

## Effects of lipopolysaccharide pretreatment on the expressions of IRAK-4 in acute pancreatitis rats

REN Yi, ZHEN Linlin, HAN Xuedong, YU Kun

(Department of General Surgery, the First People's Hospital in Huai'an Affiliated to Nanjing Medical University)

**【Abstract】**Objective: To discuss the possible mechanism of lipopolysaccharide(LPS) pretreatment in alleviating acute pancreatitis (AP) in rats by detecting the changes in expressions of interleukin-1 receptor associated kinase 4 (IRAK-4) in the pancreas. Methods: Sixty three male Sprague-Dawley rats were divided randomly into three groups: sham group, acute pancreatitis group (AP group) and LPS pretreatment group (LPS group). LPS was injected intraperitoneally to the rats in LPS group while equal amount of normal saline was injected to the rats in the other two groups. Samples were achieved at 3 h after the model was built in sham group while at 3, 6, 12 h and 24 h after modeling in the other two groups. The morphology of pancreatic tissue was analyzed by light microscopy respectively. The expressions of IRAK-4 gene and protein level of pancreas were determined by reverse RT-PCR and western blot, the activities of NF-κB were detected by immunohistochemical method and the serum TNF-α level was estimated by ELISA. Results: The pathological damage was most serious in AP group, followed by LPS group and sham group. The expressions of IRAK-4 mRNA and protein in AP group reached the peak at 12 h then decreased. The expressions of IRAK-4 mRNA and protein were obviously lower in LPS group and were maintained a lower level ( $P > 0.05$ ) compared with those in AP group after the pretreatment ( $P < 0.01$ ). The activities of NF-κB and the level of serum TNF-α were obviously lower in LPS group compared with those in AP group at all time periods ( $P < 0.01$ ), both group reaching the peak simultaneously at 12 h ( $P < 0.01$ ). Conclusion: Down-regulating the expression of IRAK-4, NF-κB and TNF-α may be one of the protective mechanisms of LPS pretreatment for AP.

**【Key words】**interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK-4); acute pancreatitis; lipopolysaccharide (LPS)

急性胰腺炎(Acute pancreatitis, AP)是临床常见的急腹症,并发症多,尤其是急性坏死性胰腺炎病死率高达30%<sup>[1]</sup>。脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)能

作者介绍:任毅(1981-),男,主治医师,博士,

研究方向:胰腺疾病。

通信作者:韩学东,男,副主任医师,Email:zhenlinlin196@163.com。

与单核-巨噬细胞表面的Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)相结合,激活核因子-κB(Nuclear factor kappa B, NF-κB),启动促炎症因子的表达。人们在研究LPS时中发现,小剂量LPS预处理后,机体或培养的单核巨噬细胞再次受到LPS刺激时,炎症反应明显减弱,这一现象被称为内毒素耐受(Endotoxin

tolerance, ET)。白细胞介素-1 受体相关激酶-4 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 4, IRAK-4) 是目前发现的调控 LPS 信号转导的关键因子, 抑制 IRAK-4 的表达来阻断 LPS 信号转导通路, 是 ET 形成的关键原因之一<sup>[2]</sup>。因此, 本实验以大鼠为研究对象, 建立 AP 模型, 研究 LPS 预处理对 AP 保护作用, 并探讨可能的分子生物学机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

雄性 SD 大鼠 63 只, 体重  $(250 \pm 20)$  g, 徐州医学院实验动物中心提供。牛磺胆酸钠、LPS (Sigma 公司), IRAK-4 多抗 (Cell Signaling 公司), NF-κB p65 多抗、SP 免疫组化试剂盒 (北京中杉公司), RT-PCR 试剂盒 (Promega 公司),  $\beta$ -actin、PCR 引物 (Invitrogen 公司), ELISA 试剂盒 (博士德公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 SD 大鼠 63 只, 随机分为 3 组。急性胰腺炎组 (AP 组,  $n = 28$ ): 分 4 个亚组, 每组 7 只。分别于第 1、2 天经腹腔给予等体积 0.5 ml 无菌生理盐水 (NS), 第 5 天制作 AP 模型, 于造模后 3、6、12、24 h 取材。LPS 预处理组 (LPS 组,  $n = 28$ ): 分 4 个亚组, 每组 7 只。首次经腹腔注射 LPS 0.25 mg/kg, 第 2 天再经腹腔注射 LPS 0.5 mg/kg, 上述均用 NS 稀释为 0.5 ml。第 5 天制作 AP 模型, 于造模后 3、6、12、24 h 取材。对照组 (Sham 组,  $n = 7$ ): 手术操作同 AP 组, 但不向胆管内注入牛磺胆酸钠, 3 h 后取材。

1.2.2 动物模型制备 大鼠实验前禁食 12 h, 10% 水合氯醛腹腔注射 (3 ml/kg) 麻醉, 取上腹正中切口, 用 1 ml 注射器针头穿过十二指肠系膜缘, 经乳头逆行插入主胰管, 将 5% 牛磺胆酸钠溶液 (1 ml/kg) 沿胰胆管逆行注射造模。5 min 后见胰管周围组织出现水肿、出血, 表明造模成功。

1.2.3 标本采集 大鼠处死后, 腹主动脉采血 5 ml, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱。取大鼠胰头部组织 1~2 块, 液氮冷冻保存备用; 另取 1~2 块置于 10% 甲醛溶液中, 固定 24~48 h。

1.2.4 检测指标 (1) 病理形态学观察: 对大鼠胰腺组织石蜡包埋、切片, 苏木精-伊红染色, 显微镜下观察病理改变。(2) IRAK-4 mRNA 的表达: 采用 RT-PCR 法。IRAK-4 上游引物: 5'-GTCATGACCAGCCGAATCGTG-3', 下游引物: 5'-CAGACACTGGTCAGCAGCAGA-3', 产物大小 597 bp;  $\beta$ -actin 上游引物: 5'-CATGTGATGGACTCCGGAG-3', 下游引物: 5'-ATAGTGATGACCTGGCCGTC-3', 产物大小 402 bp。(3) IRAK-4 蛋白的表达: 采用 Western blot 法。提取的蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 电转移到硝酸纤维素滤膜, 分别加入 IRAK-4 多克隆抗体及羊抗兔 IgG 孵育, 化学发光法显影定影。结果用图像处理仪扫描, Image J 软件进行半定量分析。(4) NF-κB 活性: 应用免疫组织化学染色法。一抗: NF-κB 多

克隆抗体, 二抗: 生物素标记的 IgG, 显微镜下观察组织中 NF-κB 表达, PBS 代替一抗作为阴性对照。NF-κB 的阳性表达为细胞核内和/或细胞浆内呈现棕黄色颗粒。切片在高倍镜下拍照, 采用 Leica QWin 图像处理与分析系统进行图像分析, 每张切片选 8 个视野, 以灰度值表示阳性表达率。(5) 血清 TNF-α 含量: 按 ELISA 试剂盒说明, 检测血清中 TNF-α 含量。

### 1.3 统计学处理

实验数据用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS13.0 软件对数据进行单因素方差分析, 多组间两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验,  $P \leq 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 胰腺组织学检查

Sham 组胰腺小叶结构完整, 间质轻度水肿, 少量炎性细胞浸润; AP 组小叶结构破坏, 大量炎症细胞浸润, 间质明显水肿、出血, 随时间的延长出血、坏死加重, 偶有大片状出血、坏死; LPS 预处理后病理改变减轻, 间质轻度水肿, 少量出血、坏死, 且随时间的延长炎症病变加重不明显。见图 1。

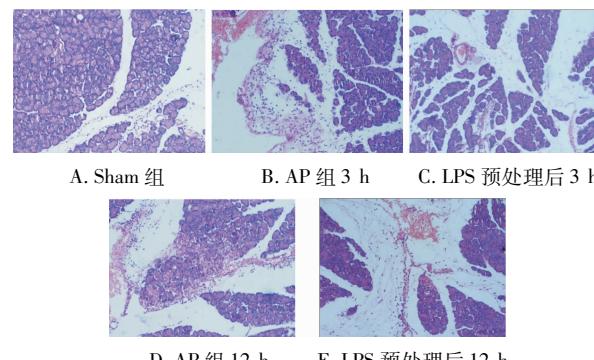


图 1 各组大鼠胰腺组织 HE 染色结果 (100×)

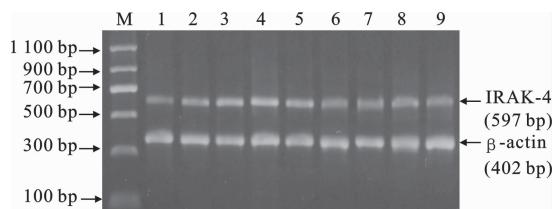
Fig. 1 Results of HE staining in the pancreas in each group (100×)

### 2.2 胰腺组织中 IRAK-4 mRNA 的表达

LPS 组与 AP 组各时点 IRAK-4 mRNA 表达均明显高于 Sham 组 ( $P < 0.01$ ); 随时间延长, AP 组 IRAK-4 mRNA 表达水平迅速升高, 并于 12 h 达到高峰 ( $P < 0.01$ ), 24 h 明显下降 ( $P < 0.01$ ), 且 AP 组各时点的表达均明显高于同时点的 LPS 组 ( $P < 0.01$ ); LPS 组 IRAK-4 mRNA 表达数值上以 12 h 最高, 但各时点之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1、图 2。

### 2.3 胰腺组织中 IRAK-4 蛋白的表达

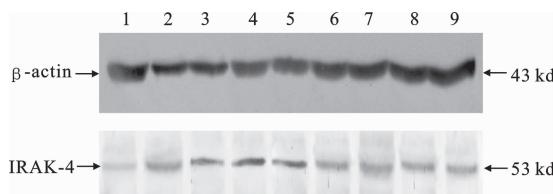
与 Sham 组比, LPS 组与 AP 组各时点 IRAK-4 蛋白表达水平均明显升高 ( $P < 0.01$ ); LPS 组各时间点 IRAK-4 蛋白表达无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 而 AP 组的 IRAK-4 蛋白的表达随时间延长逐渐升高, 并于 12 h 达到峰值 ( $P < 0.01$ ), 24 h 时已明显降低 ( $P < 0.01$ ), 并且 AP 组该蛋白的表达均明显高于同时点的 LPS 组。见图 3、表 2。



M 为 marker; 1 为 sham 组; 2~5 分别为 AP 组 3、6、12 h 和 24 h; 6~9 分别为 LPS 组 3、6、12 h 和 24 h

图 2 各组大鼠胰腺组织 IRAK-4 mRNA RT-PCR 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of IRAK-4 mRNA  
in the pancreas in each group



1 为 sham 组; 2~5 分别为 AP 组 3、6、12 h 和 24 h;  
6~9 分别为 LPS 组 3、6、12 h 和 24 h

图 3 各组大鼠胰腺组织 IRAK-4 蛋白电泳图  
Fig. 3 Electrophoretogram of IRAK-4 protein expression  
in the pancreas in each group

表 1 各组大鼠胰腺组织 IRAK-4 mRNA 相对表达量 ( $n = 7, \bar{x} \pm s$ )  
Tab. 1 Relative expression of IRAK-4 mRNA in the pancreas in each group ( $n = 7, \bar{x} \pm s$ )

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
Sham	0.197 ± 0.053	—	—	—
AP	0.436 ± 0.078▲	0.608 ± 0.098▲	0.763 ± 0.096▲★	0.472 ± 0.055▲
LPS	0.304 ± 0.060▲#	0.305 ± 0.074▲#	0.330 ± 0.077▲#	0.310 ± 0.065▲#

注:▲, 与 Sham 组比,  $P < 0.01$ ; ★, 与 AP 组 3、6、24 h 比,  $P < 0.01$ ; #, 与相同时段 AP 组比,  $P < 0.01$

表 2 各组大鼠胰腺组织 IRAK-4 蛋白的表达 [ $n = 7, \bar{x} \pm s, O.D. (folds vs. sham)$ ]

Tab. 2 Expression of IRAK-4 protein in the pancreas in each group [ $n = 7, \bar{x} \pm s, O.D. (folds vs. sham)$ ]

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
Sham	1.000 ± 0.065	—	—	—
AP	1.788 ± 0.111▲	2.823 ± 0.182▲	3.457 ± 0.165▲★	2.436 ± 0.147▲
LPS	1.436 ± 0.069▲#	1.447 ± 0.093▲#	1.504 ± 0.106▲#	1.449 ± 0.088▲#

注:▲, 与 Sham 组比,  $P < 0.01$ ; ★, 与 AP 组 1、3、6 h 比,  $P < 0.01$ ; #, 与相同时段 AP 组比,  $P < 0.01$

表 3 各组大鼠胰腺组织 NF-κB 表达 ( $n = 7, \bar{x} \pm s$ , 灰度值)

Tab. 3 Expression of NF-κB in the pancreas in each group ( $n = 7, \bar{x} \pm s$ , Gary value)

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
Sham	195.66 ± 29.11	—	—	—
AP	359.72 ± 56.26▲	502.97 ± 83.42▲	712.56 ± 93.37▲★	440.06 ± 87.34▲
LPS	254.28 ± 44.14▲#	363.94 ± 65.98▲#	457.10 ± 61.42▲#●	303.40 ± 54.09▲#

注:▲, 与 Sham 组比,  $P < 0.01$ ; ★, 与 AP 组 3、6、24 h 比,  $P < 0.01$ ; ●, 与 LPS 组 3、6、24 h 比,  $P < 0.01$ ; #, 与相同时段 AP 组比,  $P < 0.01$

表 4 各组大鼠血清 TNF-α 含量 ( $n = 7, \bar{x} \pm s, pg/ml$ )

Tab. 4 Content of TNF-α in the serum in each group ( $n = 7, \bar{x} \pm s, pg/ml$ )

组别	3 h	6 h	12 h	24 h
Sham	122.54 ± 20.25	—	—	—
AP	230.17 ± 35.19▲	298.40 ± 38.09▲	413.19 ± 52.42▲★	283.07 ± 42.91▲
LPS	175.91 ± 32.25▲#	218.92 ± 44.26▲#	300.17 ± 43.68▲#●	199.25 ± 34.02▲#

注:▲, 与 Sham 组比,  $P < 0.01$ ; ★, 与 AP 组 3、6、24 h 比,  $P < 0.01$ ; ●, 与 LPS 组 3、6、24 h 比,  $P < 0.01$ ; #, 与相同时段 AP 组比,  $P < 0.01$

#### 2.4 胰腺组织中 NF-κB 的表达

LPS 组与 AP 组各时间点 NF-κB 阳性表达率均明显高于 Sham 组 ( $P < 0.05$ ); AP 组的 NF-κB 表达随时间的延长逐渐升高, 12 h 达到高峰 ( $P < 0.01$ ), 24 h 时已明显降低 ( $P < 0.01$ ), 但仍保持较高水平, 且均明显高于同时点的 LPS 组 ( $P < 0.01$ ); LPS 组的 NF-κB 表达于 12 h 也明显升高达到高峰 ( $P < 0.05$ ), 但 24 h 时已迅速下降 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

#### 2.5 血清中 TNF-α 含量

LPS 组与 AP 组各时间点的 TNF-α 含量均高于 Sham 组 ( $P < 0.01$ ); 与同时点 AP 组比, LPS 组各时间点 TNF-α 在血清中含量均明显降低 ( $P < 0.01$ ), 且两组 TNF-α 表达均随时间的延长逐渐升高, 12 h 最高 ( $P < 0.01$ ), 随后降低。见表 4。

### 3 讨 论

AP 时单核-巨噬细胞被大量激活, 导致大量促炎细胞因子释放, 如 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8, 进而粒细胞在这些细胞因子的作用下过度活化, 释放大量炎性因子, 诱发全身炎症反应综合征, 加重全身组织器官的损害, 引起多器官功能障碍综合征。

LPS 主要通过与单核-巨噬细胞的 LPS 膜受体 CD14 及跨膜蛋白 TLR4 等相结合而诱导相应的生物效应<sup>[3]</sup>。LPS 与细胞膜表面的跨膜蛋白 TLR4 结合后,引起 TLR4 胞内段构象改变。进而 IRAK-1 与 IRAK-4 募集到 MyD88 的 N 末端并紧密结合,引起 IRAK-1 磷酸化解离,解离的 IRAK-1 与 TNF 受体相关因子 6 结合并使其激活,最终激活 NF-κB 等。活化的 NF-κB 由胞浆转移到细胞核内,启动 TNF-α、IL-1、IL-6 等基因的转录、翻译,最终导致炎症因子大量释放,从而导致组织损伤。

ET 并非应答耗竭,而是通过下调 NF-κB、TNF-α、IL-6 和 ICAM-1 等的表达,体现了一种重要的调节机制<sup>[4]</sup>。显然,ET 的形成与 TLR4 下游的信号转导蛋白的变化有关。目前 ET 形成过程中 IRAK 家族功能的改变成为研究的焦点<sup>[5,6]</sup>。IRAK 是一家族分子,至少包括 IRAK-1、IRAK-2、IRAK-M 和 IRAK-4 这 4 种成员。IRAK-2、IRAK-M 主要为 IRAK-1 活性的负性调节因子,IRAK-4 是 IRAK-1 的活性调控蛋白。有研究证明,IRAK-1<sup>-/-</sup>小鼠 LPS 仍能在一定程度上激活巨噬细胞,引发炎症反应;而 IRAK-4<sup>-/-</sup>小鼠几乎完全抑制 LPS 诱导的任何生物效应,这说明相对于 IRAK-1,IRAK-4 分子在 TLR4 信号通路中的作用更为关键,是不可或缺的。尽管其机制不详,但作为 ET 形成的关键原因之一,IRAK-4 目前已被证实是调控脂多糖细胞内信号转导的关键因子<sup>[7,8]</sup>。近年来对肠源性内毒素血症及细菌移位在 AP 发生中的作用较为关注,TLR4 信号传导通路使很多细胞因子过度释放,造成胰腺及全身脏器的损伤。因此,在 AP 发生发展中,作为已知的 TLR4 信号通路的关键调控因子,IRAK-4 可能起重要作用。

本研究结果显示,大鼠诱导 AP 后 3、6、12、24 h,组织形态学显示有明显的胰腺损伤,而且损伤程度时间的延长而加重,而 LPS 预处理后病理学改变均较 AP 组减轻。与此同时,AP 组和 LPS 组较 Sham 组大鼠胰腺组织中 IRAK-4 表达明显升高,具体表现在 RT-PCR 提示 IRAK-4 mRNA 表达明显增加,Western blot 检测 IRAK-4 蛋白表达亦显著上升,以 12 h 表达量最高,显然这与胰腺炎诱导 LPS 胞内信号转导通路的相关蛋白表达增强有关。而 LPS 组各时间点 IRAK-4 表达明显低于同时间的 AP 组,且随着时间的延长表达无明显改变( $P > 0.05$ ),并没有表现出 AP 组那种随时间延长而逐渐升高的趋势,这表明小剂量 LPS 的长期刺激可抑制 IRAK-4 的表达,其对 TLR4 信号通路的反馈抑制可能是 LPS 组的 IRAK-4 表达水平低于 AP 组的重要原因之一。NF-κB 与 TNF-α 是一种普遍存在的转录调控因子与促炎症因子,AP 时能够诱导这些信号转导通路的激

活,导致 LPS 组和 AP 组的 NF-κB 与 TNF-α 表达的水平均高于 Sham 组。作为 IRAK-4 下游的 NF-κB 与 TNF-α,其表达受 IRAK-4 调控。本实验结果显示,AP 时 LPS 组 IRAK-4 表达无明显变化,而 AP 组的表达明显高于 LPS 组,且上升迅速,从而造成 NF-κB 与 TNF-α 在胰腺组织中的表达升高并明显高于 LPS 组。现已证明,TNF-α 是 AP 时最早升高并起着重要作用的细胞因子,是与胰腺炎的严重性相关并可作为 AP 预后的指标之一<sup>[9]</sup>。较高浓度的 TNF-α 不但具有直接损伤机体细胞的作用,还能够诱发和调控多种炎性细胞因子如 IL-1、IL-6、IL-8 等的释放,导致组织损伤。由此可见,抑制 IRAK-4 表达可能是脂多糖预处理诱导对 AP 交叉耐受的原因之一。

目前,LPS 对 AP 的作用及其机制尚不十分清楚。本研究结果表明 LPS 预处理能够通过下调 IRAK-4、NF-κB 与 TNF-α 的表达来显著抑制 AP 炎症反应,为以 ET 为基础的 AP 的治疗找到潜在的治疗靶点。

## 参 考 文 献

- [1] Algil H, Tando Y, Schneider G, et al. Acute experimental pancreatitis and NF-kappaB/Rel activation [J]. Pancreatology, 2002, 2 (6): 503-509.
- [2] Hatao F, Yamamoto M, Muroi M, et al. MyD88-induced downregulation of IRAK-4 and its structural requirements [J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2008, 53 (2): 260-264.
- [3] Lye E, Mirtsos C, Suzuki N, et al. The role of IRAK-4 kinase activity in IRAK-4 mediated signaling [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (39): 40653-40658.
- [4] Lin W J, Yeh W C. Implication of toll-like receptor and tumor necrosis factor-alpha signaling in septic shock [J]. Shock, 2005, 24 (3): 206-209.
- [5] 郭文琼,伊红亮,郭亮,等. TO901317 对脂多糖 LPS 致小鼠中脑内炎症反应的调节作用 [J]. 免疫学杂志,2011,27(4):312-315.
- [6] Guo W Q, Yi H L, Guo L, et al. The regulatory role of TO901317 in the inflammatory response in the midbrain of mice reduced by LPS [J]. Immunological Journal, 2011, 27 (4): 312-315.
- [7] Song K W, Talamas F X, Suttmann R T, et al. The kinase activities of interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK)-1 and 4 are redundant in the control of inflammatory cytokine expression in human cells [J]. Molecular Immunology, 2009, 46 (7): 1458-1466.
- [8] Cheng H, Addona T, Keshishian H, et al. Regulation of IRAK-4 kinase activity via autophosphorylation within its activation loop [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2007, 352 (3): 609-616.
- [9] 刘作金,刘长安,龚建平,等. IRAK-4;TLR/IL-1R 家族共同信号转导系统中的关键因子 [J]. 生理科学进展,2005,36(3): 276-279.
- [10] Liu Z J, Liu C A, Gong J P, et al. IRAK-4; the key molecule of TLR/IL-1R common signal transduction system [J]. Progress in Physiological Sciences, 2005, 36 (3): 276-279.
- [11] 程石,杨彬,闫文貌,等. 抗 TNF-α 治疗对重症急性胰腺炎肺损伤 NF-κB 信号通路的影响 [J]. 中国普通外科杂志,2008,17(3):219-223.
- [12] Cheng S, Yang B, Yan W M, et al. The effect of anti tumor necrosis factor  $\alpha$  treatment on NF-κB signaling in lung injury in severe acute pancreatitis in rats [J]. Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17 (3): 219-223.

(责任编辑:关蕴良)