

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000408

乳铁蛋白对脂多糖激活的 U937 细胞 TLR4 信号通路
相关膜分子表达的影响

沈名扬, 韦 红, 杜维霞, 艾 青

(重庆医科大学附属儿童医院新生儿诊治中心、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、
重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:研究重组人乳铁蛋白(recombinant human lactoferrin, rhLF)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)激活的 U937 细胞 Toll 样受体 4(toll-like receptors 4, TLR4)信号通路相关膜分子 TLR4、CD14、MD2 表达的影响。**方法:**经佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)诱导成熟的 U937 细胞随机分为 6 组:对照组、LPS 组(给予 100 ng/ml LPS)、LPS+50 μ g/ml rhLF 组、LPS+100 μ g/ml rhLF 组、LPS+200 μ g/ml rhLF 组、LPS+500 μ g/ml rhLF 组,采用 RT-PCR 和 Western blot 检测各组细胞 TLR4、CD14、MD2 mRNA 和蛋白的表达,ELISA 检测各组细胞上清液中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的含量。**结果:**LPS 组 U937 细胞 TLR4、CD14、MD2 mRNA 和蛋白的表达均明显高于对照组($P<0.05$),LPS+50 μ g/ml rhLF 组三者 mRNA 和蛋白的表达与 LPS 组差异不明显($P>0.05$),LPS+100 μ g/ml rhLF 组、LPS+200 μ g/ml rhLF 组、LPS+500 μ g/ml rhLF 组均明显降低了 LPS 诱导的 TLR4、CD14、MD2 mRNA 和蛋白的表达($P<0.05$);LPS 组 TNF- α 的含量明显高于对照组($P<0.05$),LPS+50

μ g/ml rhLF 组、LPS+100 μ g/ml rhLF 组、LPS+200 μ g/ml rhLF 组、LPS+500 μ g/ml rhLF 组均明显降低了 LPS 诱导的 TNF- α 的产生($P<0.05$)。**结论:**rhLF 通过抑制 TLR4 介导的 LPS 跨膜信号转导和炎症因子 TNF- α 的分泌,对 LPS 所致的脓毒血症具有潜在的治疗作用。

作者简介:沈名扬, Email: 664150720@qq.com,

研究方向:新生儿感染。

通信作者:韦 红, Email: wachong@sina.com。

基金项目:国家级临床重点专科建设项目经费资助(编号:2010-53)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20150415.2227.004.html
(2014-10-30)

结果。到目前为止,miR-210 在宫颈癌中的调节机制尚不清楚,因此迫切需要更进一步研究,建一个理想的细胞模型来寻找特异的 miR-210 在癌症发生发展中可能的潜质,为肿瘤的早期发现及治疗提供新的思路及可能。

参 考 文 献

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Adam MF, Gabalski EC, Bloch DA, et al. Tissue oxygen distribution in head and neck cancer patients[J]. Head & neck, 1999, 21(2): 146-153.
- [3] Nakamura M, Bodily JM, Beglin M, et al. Hypoxia-specific stabilization of HIF-1 α by human papillomaviruses[J]. Virology, 2009, 387(2): 442-448.
- [4] Ivan M, Kondo K, Yang H, et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing[J]. Science, 2001, 292(5516): 464-468.
- [5] Puissegur MP, Mazure NM, Bertero T, et al. miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity[J]. Cell Death &

Differentiation, 2010, 18(3): 465-478.

- [6] Zhang Z, Sun H, Dai H, et al. MicroRNA miR-210 modulates cellular response to hypoxia through the MYC antagonist MNT[J]. Cell cycle, 2009, 8(17): 2756-2768.
- [7] Gee HE, Camps C, Buffa FM, et al. Hsa-miR-210 is a marker of tumor hypoxia and a prognostic factor in head and neck cancer[J]. Cancer, 2010, 116(9): 2148-2158.
- [8] Camps C, Buffa FM, Colella S, et al. hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2008, 14(5): 1340-1348.
- [9] Greither T, Grochola LF, Udelnow A, et al. Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival[J]. International Journal of Cancer, 2010, 126(1): 73-80.
- [10] Greither T, Würl P, Grochola L, et al. Expression of microRNA 210 associates with poor survival and age of tumor onset of soft-tissue sarcoma patients[J]. International Journal of Cancer, 2012, 130(5): 1230-1235.
- [11] Cai H, Lin L, Cai H, et al. Prognostic evaluation of microRNA-210 expression in pediatric osteosarcoma[J]. Medical Oncology, 2013, 30(2): 1-6.
- [12] Huang X, Le QT, Giaccia AJ. MiR-210-micromanage of the hypoxia pathway[J]. Trends in molecular medicine, 2010, 16(5): 230-237.

(责任编辑:关蕴良)

【关键词】乳铁蛋白;脂多糖;U937 细胞;Toll 样受体 4;肿瘤坏死因子- α

【中图分类号】R722.13

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-06-09

Effects of lactoferrin on the expression of TLR4 signaling pathway-associated membrane molecule in LPS-activated U937 macrophages

Shen Mingyang, Wei Hong, Du Weixia, Ai Qing

(Neonatal Diagnosis and Treatment Center, the Children's Hospital, Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing, Chongqing International Science and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders)

【Abstract】**Objective:** To investigate the effects of recombinant human lactoferrin (rhLF) on the expression of toll-like receptors 4 (TLR4) signaling pathway-associated membrane molecule (TLR4, CD14 and MD2) in lipopolysaccharide (LPS)-activated U937 macrophages. **Methods:** U937 was induced to maturation by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and then divided into six groups: control group, LPS group (100 ng/ml LPS), LPS+50 μ g/ml rhLF group, LPS+100 μ g/ml rhLF group, LPS+200 μ g/ml rhLF group and LPS+500 μ g/ml rhLF group. The mRNA and protein expressions of TLR4, CD14 and MD2 were determined by RT-PCR and Western blot. The concentration of tumor necrosis factor- α (TNF- α) was detected by ELISA. **Results:** The mRNA and protein expression of TLR4, CD14 and MD2 increased significantly in LPS group than in control group ($P < 0.05$). The mRNA and protein expression of TLR4, CD14 and MD2 had no significant change in LPS+50 μ g/ml rhLF group ($P > 0.05$), but reduced significantly in LPS+100 μ g/ml rhLF group, LPS+200 μ g/ml rhLF group and LPS+500 μ g/ml rhLF group than in LPS group ($P < 0.05$). The concentration of TNF- α increased significantly in the LPS group than in the control group ($P < 0.05$). The levels of TNF- α reduced significantly in LPS+50 μ g/ml rhLF group, LPS+100 μ g/ml rhLF group, LPS+200 μ g/ml rhLF group and LPS+500 μ g/ml rhLF group than in LPS group ($P < 0.05$). **Conclusion:** rhLF might have a potential protective effect on LPS induced sepsis through suppressing TLR4 transmembrane signal transduction pathway and reducing the secretion of TNF- α .

【Key words】lactoferrin; lipopolysaccharide; U937 cells; toll-like receptors 4; tumor necrosis factor- α

新生儿脓毒症是新生儿期发生的由感染引起的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory responsible syndrome, SIRS)。其发病机制复杂,临床表现差异大,治疗困难,病死率高,成为新生儿学研究的热点。新生儿极易受革兰阴性(gram negative, G⁻)菌感染, G⁻菌外膜上脂多糖(li-popolysaccharide, LPS)是其主要致病因子,可被 Toll 样受体 4(toll-like receptors 4, TLR4)特异性识别,并通过与细胞膜受体 CD14 及 MD2 协同进行跨膜信号转导,诱发系统性炎症反应,参与脓毒症的发生发展^[1]。乳铁蛋白(lactoferrin, LF)是哺乳动物乳汁中含量第二的天然蛋白,具有抗微生物、抗炎、调节免疫和肠道微生物等多种生物活性^[2]。近年,LF 对新生儿感染疾病的保护作用越来越受到学者的重视,已有临床试验证实 LF 可降低脓毒症患者病死率^[3-4]。然而 LF 治疗脓毒症的机制是否与 TLR4 信号通路相关膜分子的表达有关,国内少见报道。为此,本研究检测了不同浓度重组人乳铁蛋白(recombinant human lactoferrin, rhLF)对 LPS 激活的 U937 细胞 TLR4、CD14、MD2 表

达和炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)分泌的影响,以阐明 LF 对 LPS 信号传导通路影响的部分机制,为 LF 治疗新生儿脓毒症提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人单核巨噬细胞株 U937 由重庆医科大学附属儿童医院儿研所组织细胞培养室提供。RPMI 1640 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司,佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、LPS (E.coli 055:B5)及 rhLF 均购自美国 Sigma 公司,总 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒、DL1000 DNA Marker 为 TaKaRa 公司产品,TLR4、CD14、MD2 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥公司, TNF- α ELISA 试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司。

1.2 细胞培养与分组

U937 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 2~3 d 传代 1 次,选用对数生长期细胞予以 PMA (10 ng/ml)诱导分化。分化成熟的 U937 细

胞随机分为 6 组: (1) 对照组; (2) LPS 组: 给予 100 ng/ml LPS; (3) LPS+50 μ g/ml rhLF 组: 给予 100 ng/ml LPS 后 30 min 给予 50 μ g/ml rhLF; (4) LPS+100 μ g/ml rhLF 组: 给予 100 ng/ml LPS 后 30 min 给予 100 μ g/ml rhLF; (5) LPS+200 μ g/ml rhLF 组: 给予 100 ng/ml LPS 后 30 min 给予 200 μ g/ml rhLF; (6) LPS+500 μ g/ml rhLF 组: 给予 100 ng/ml LPS 后 30 min 给予 500 μ g/ml rhLF。各实验组设 3 复孔。

1.3 RT-PCR 检测 TLR4、CD14、MD2 mRNA 的表达

加入 rhLF 2 h 后按照 TaKaRa 公司 RNAiso Plus 试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 按 PrimeScriptTM RT-PCR Kit 试剂盒进行逆转录及 PCR 扩增。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 各目的基因引物序列见表 1。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环。PCR 产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳, 分析各组条带光密度值, 并以 GAPDH 为参照, 计算各组 TLR4、CD14、MD2 mRNA 的相对表达量。

表 1 RT-PCR 引物序列
Tab.1 RT-PCR primer sequences

基因名称	引物序列	扩增长度 (bp)
TLR4	上游: 5'-TGGATACGTTTCCTTATAAG-3'	507
	下游: 5'-GAAATGGAGGCACCCCTTC-3'	
CD14	上游: 5'-CTGCAACTTCTCCGAACCTC-3'	274
	下游: 5'-TAGGTCTCTCGAGCGTCAGTT-3'	
MD2	上游: 5'-GAAGCTCAGAAGCAGTATTGGGTC-3'	422
	下游: 5'-GGTTGCTGTAGGATGACAACTCC-3'	
GAPDH	上游: 5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTC-3'	353
	下游: 5'-CATCACCATCTTCCAGGAGCG-3'	

1.4 Western blot 检测 TLR4、CD14、MD2 蛋白的表达

凯基全蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白后, 采用 BCA 法测定蛋白含量并将各组蛋白浓度调为一致。经 SDS-PAGE 电泳, 半干法电转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后分别孵育一抗 TLR4、CD14 和 MD2 (1:400), β -actin (1:2 000) 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次, 孵育二抗山羊抗兔 IgG (1:5 000) 室温 1 h, TBST 洗膜 10 min $\times$ 3 次, Millipore ECL 试剂盒显色、成像。分析各组蛋白条带灰度值, 以 β -actin 为参照, 计算 TLR4、CD14、MD2 蛋白的相对表达。

1.5 ELISA 检测 TNF- α 的含量

收集各组细胞上清液, 离心后储存于 -70 $^{\circ}$ C 待测。按 ELISA 试剂盒说明书分别检测各组细胞上清液中 TNF- α 的含量, 标准品及样品均作双孔检测, 依次加入待测标本、生物素化抗体、酶结合物、显色底物、终止液后, 在酶标仪 450 nm 波长处读取相应吸光度值, 绘制标准曲线并计算出待测标本浓度。

1.6 统计学分析

用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析。所有数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间差异比较采用单因素方差

分析, 组内两两比较采用 SNK- q 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组细胞 TLR4、CD14、MD2 mRNA 表达水平的变化

RT-PCR 结果显示: 经 PMA 诱导的对照组 U937 细胞仅有少量的 TLR4、CD14、MD2 mRNA 表达; 给予 LPS 刺激后三者 mRNA 表达均明显上调 ($P<0.05$); LPS+50 μ g/ml rhLF 组 TLR4、CD14、MD2 mRNA 的表达虽低于 LPS 组, 但与 LPS 组差异不显著 ($P>0.05$); LPS+100 μ g/ml rhLF 组、LPS+200 μ g/ml rhLF 组、LPS+500 μ g/ml rhLF 组呈浓度依赖性地抑制了 TLR4、CD14、MD2 mRNA 的表达 ($P<0.05$), 但不能使其降至对照组水平 ($P<0.05$); 见图 1, 表 2。

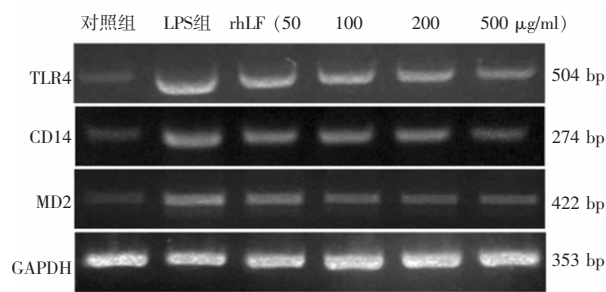


图 1 RT-PCR 检测各组细胞 TLR4、CD14、MD2 mRNA 的表达
Fig.1 Expression of TLR4, CD14 and MD2 mRNA determined by RT-PCR

2.2 各组细胞 TLR4、CD14、MD2 蛋白表达水平的变化

Western blot 结果显示: 经 PMA 诱导的对照组 U937 细胞仅有少量的 TLR4、CD14、MD2 蛋白表达; 给予 LPS 刺激后三者蛋白表达均明显上调 ($P<0.05$); LPS+50 μ g/ml rhLF 组 TLR4、CD14、MD2 蛋白的表达虽低于 LPS 组, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$); LPS+100 μ g/ml rhLF 组、LPS+200 μ g/ml rhLF 组、LPS+500 μ g/ml rhLF 组呈浓度依赖性地抑制了 TLR4、CD14、MD2 蛋白的表达 ($P<0.05$), 但不能使其降至对照组水平 ($P<0.05$); TLR4、CD14、MD2 蛋白表达水平变化趋势与 mRNA 一致; 见图 2, 表 3。

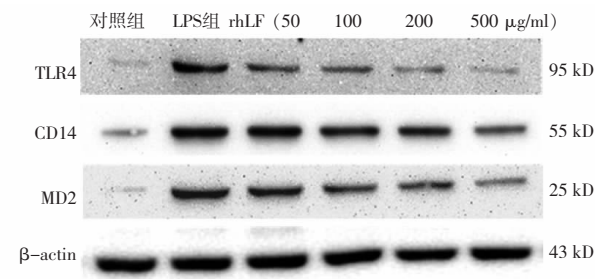


图 2 Western blot 检测各组细胞 TLR4、CD14、MD2 蛋白的表达
Fig.2 Expression of TLR4, CD14 and MD2 protein determined by Western blot

表 2 rhLF 对 LPS 激活的 U937 细胞 TLR4、CD14、MD2 mRNA 表达的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)Tab.2 Effects of rhLF on the LPS-induced TLR4, CD14 and MD2 mRNA expression in U937 macrophages ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	TLR4/GAPDH	CD14/GAPDH	MD2/GAPDH
对照组	0.073 ± 0.018 ^a	0.082 ± 0.008 ^a	0.076 ± 0.006 ^a
LPS组	0.763 ± 0.045	0.741 ± 0.057	0.744 ± 0.036
LPS+50 μg/ml rhLF 组	0.745 ± 0.036	0.718 ± 0.052	0.734 ± 0.029
LPS+100 μg/ml rhLF 组	0.630 ± 0.030 ^a	0.630 ± 0.043 ^a	0.628 ± 0.038 ^a
LPS+200 μg/ml rhLF 组	0.547 ± 0.040 ^a	0.591 ± 0.036 ^a	0.565 ± 0.021 ^a
LPS+500 μg/ml rhLF 组	0.293 ± 0.076 ^{ab}	0.231 ± 0.047 ^{ab}	0.226 ± 0.030 ^{ab}
<i>F</i> 值	112.633	119.671	283.250
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注: a, 与 LPS 组比较 $P<0.05$; b, 与对照组比较 $P<0.05$ 表 3 rhLF 对 LPS 激活的 U937 细胞 TLR4、CD14、MD2 蛋白表达的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)Tab.3 Effects of rhLF on the LPS-induced TLR4, CD14 and MD2 protein expression in U937 macrophages ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	TLR4/β-actin	CD14/β-actin	MD2/β-actin
对照组	0.154 ± 0.169 ^a	0.275 ± 0.051 ^a	0.149 ± 0.025 ^a
LPS组	0.872 ± 0.442	0.914 ± 0.023	0.812 ± 0.041
LPS+50 μg/ml rhLF 组	0.837 ± 0.047	0.896 ± 0.007	0.790 ± 0.034
LPS+100 μg/ml rhLF 组	0.732 ± 0.043 ^a	0.794 ± 0.013 ^a	0.706 ± 0.013 ^a
LPS+200 μg/ml rhLF 组	0.597 ± 0.075 ^a	0.745 ± 0.035 ^a	0.649 ± 0.019 ^a
LPS+500 μg/ml rhLF 组	0.288 ± 0.028 ^{ab}	0.412 ± 0.034 ^{ab}	0.384 ± 0.044 ^{ab}
<i>F</i> 值	125.562	212.805	195.063
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注: a, 与 LPS 组比较 $P<0.05$; b, 与对照组比较 $P<0.05$

2.3 各组细胞上清液中 TNF-α 含量的变化

ELISA 结果显示: LPS 组 TNF-α 的含量明显高于对照组 ($P<0.05$); LPS+50 μg/ml rhLF 组、LPS+100 μg/ml rhLF 组、LPS+200 μg/ml rhLF 组、LPS+500 μg/ml rhLF 组呈浓度依赖性的降低了 LPS 诱导的 TNF-α 的分泌 ($P<0.05$), 但仍高于对照组 ($P<0.05$); 见表 4。

表 4 rhLF 对 LPS 激活的 U937 细胞分泌 TNF-α 的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)Tab.4 Effects of rhLF on the LPS-induced TNF-α secretion in U937 macrophages ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α
对照组	60.651 ± 5.134 ^a
LPS组	156.758 ± 6.332
LPS+50 μg/ml rhLF 组	130.226 ± 1.215 ^a
LPS+100 μg/ml rhLF 组	116.383 ± 5.549 ^a
LPS+200 μg/ml rhLF 组	100.617 ± 0.933 ^a
LPS+500 μg/ml rhLF 组	72.396 ± 3.093 ^{ab}
<i>F</i> 值	213.901
<i>P</i> 值	0.000

注: a, 与 LPS 组比较 $P<0.05$; b, 与对照组比较 $P<0.05$

3 讨 论

新生儿特别是早产儿, 特异性和非特异性免疫

功能均不成熟, 感染后易扩散造成脓毒血症, 并迅速进展成脓毒性休克、暴发型多器官功能障碍或衰竭, 病死率高^[5]。TLR4 作为机体重要的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRR) 之一, 能特异性识别 G-菌外膜 LPS, 并通过与 LPS 结合蛋白 (lipopolysaccharide binding protein, LBP) 结合, 传递给细胞膜 CD14 受体, 进而与 TLR4-MD2 相互作用将跨膜信号转入胞内, 激活单核巨噬细胞为主的效应细胞, 诱导 TNF-α、IL-1、IL-6 等多种炎症因子分泌, 触发炎症级联反应, 致脓毒症发生^[6]。TNF-α 是机体炎症反应时产生最早的炎症介质, 能进一步触发加重炎症反应, 与 SIRS 的发生及病情严重程度密切相关, 有研究表明 TNF-α 在 LPS 刺激后 1~2 h 达高峰^[7]。

本研究结果显示: LPS 刺激后 U937 细胞 TLR4、CD14、MD2 的表达及早期炎症因子 TNF-α 的分泌均明显高于对照组。这一结果与 Kruzel 等研究结果相似^[8]。临床研究证实外周血单核细胞 TLR4、CD14、MD2 的表达在脓毒症新生儿, 特别是 G-菌脓毒症中明显增高, 其下游 TNF-α 等炎症因子的表达也明显上调^[9-10]。Levy 等^[11]还发现脓毒症新生儿 TLR4、CD14 的表达水平明显高于成人感染后的表达水平。此外, 研究还发现转染 TLR4、MD2 反义基因的

肺泡细胞,经 LPS 刺激后 TLR4、MD2 的表达、NF- κ B 活性及 TNF- α 、IL-6 的含量明显降低^[12]。因此,下调 TLR4、CD14、MD2 的表达可能是抑制 LPS 诱导的 TLR4 信号通路过度激活的有效途径之一。

乳铁蛋白是机体防御反应的重要因子。陈翠芳等^[13]检测到新生儿细菌感染急性期血 LF 伴随炎症因子明显升高,恢复期下降。意大利一项多中心研究显示,补充 LF 可降低 VLBW 患儿晚发型败血症的发病率和脓毒症患者病死率^[4]。美国一项成人的二期临床试验也显示,重组塔乳铁蛋白显著降低了严重脓毒症患者 28 d 内的死亡率^[14]。但 LF 对脓毒症的防治机制尚不清楚。既往研究显示,LF 可通过对 LPS 中脂质 A 的高亲和性,与 LBP 竞争性结合 LPS,阻断 LPS 向单核巨噬细胞膜上 CD14 的传递,干扰 TLR4 信号通路的激活,抑制 TLR4 信号通路下游 NF- κ B 等活化,下调 TNF- α 等炎症因子的释放,减轻 LPS 的损伤效应^[15]。研究表明,在 LPS 作用 15~30 min 后加入 LF,对炎症因子的释放抑制作用最强^[16]。

目前,LF 对 TLR4 信号通路相关膜分子的表达影响研究报道较少。本研究在 LPS 刺激后 30 min 加入 rhLF,结果显示 rhLF 呈一定浓度依赖性地下调 LPS 刺激引起的 TLR4、CD14、MD2 mRNA 和蛋白的表达,并抑制了 U937 单核巨噬细胞早期炎症因子 TNF- α 的分泌。詹雪灵等^[17]和 Drago-Serrano 等^[18]证实 LF 可降低 LPS 激发的 TLR4 表达,对炎症起一定的抑制作用,与本研究结果一致^[17-18]。Ando 等^[19]也发现 LF 可通过干扰 LPS 诱导的 TLR4 激活抑制内毒素血症,LF 单独刺激还可以适度激活 TLR4 介导的固有免疫反应,增强机体防御功能。

综上,本研究采用 rhLF 干预 LPS 激活的 U937 细胞,发现 rhLF 呈一定浓度依赖性地抑制了 TLR4 信号通路相关膜分子 TLR4、CD14、MD2 的表达及 TNF- α 的分泌,推测乳铁蛋白可能通过下调 TLR4 信号通路相关膜分子的表达,参与抑制 LPS 信号跨膜转导及下游的炎症信号传递,减少炎症介质的合成分泌,抑制内毒素的炎症损害。这是对 LF 有效抑制脓毒症引起的过度炎症反应机制的进一步补充,也为 LF 在治疗新生儿脓毒症中的应用提供新的理论基础。

参 考 文 献

[1] O'Hare FM,William Watson R,Molloy EJ.Toll-like receptors in neonatal sepsis[J].Acta Paediatr,2013,102(6):572-578.

- [2] Brock JH.Lactoferrin-50 years on[J].Biochem Cell Biol,2012,90(3):245-251.
- [3] Manzoni P,Mostert M,Stronati M.Lactoferrin for prevention of neonatal infections[J].Curr Opin Infect Dis,2011,24(3):177-182.
- [4] Manzoni Rinaldi M,Cattani S,et al.Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates[J].JAMA,2009,302(13):1421-1428.
- [5] 余加林,李 芳.新生儿脓毒血症的治疗[J].中国实用儿科杂志,2011,26(1):8-11.
- [6] Ohto U,Fukase K,Miyake K,et al.Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2[J].Proc Natl Acad Sci USA,2012,109(19):7421-7426.
- [7] 赵擎宇,张春玲,黄子通,等.重症败血症患者炎症介质水平对预后的影响[J].中国危重病急救医学,2001,13(11):671-674.
- [8] Kruzel ML,Harari Y,Mailman D,et al.Differential effects of prophylactic,concurrent and therapeutic lactoferrin treatment on LPS-induced inflammatory responses in mice[J].Clin Exp Immunol,2002,130(1):25-31.
- [9] 黄惠君,杨 军,王国兵,等.Toll 样受体信号与新生儿脓毒症炎症反应机制初探[J].中国小儿急救医学,2013,20(2):131-134.
- [10] Zhang JP,Yang Y,Levy O,et al.Human neonatal peripheral blood leukocytes demonstrate pathogen-specific coordinate expression of TLR2,TLR4/MD2,and MyD88 during bacterial infection in vivo[J].Pediatr Res,2010,68(6):479-483.
- [11] Levy E,Xanthou G,Petrakou E,et al.Distinct roles of TLR4 and CD14 in LPS-induced inflammatory responses of neonates[J].Pediatr Res,2009,66(2):179-184.
- [12] 李永旺,麻 莉,张德明,等.TLR4 及 MD2 反义基因对内毒素诱导的肺泡 II 型细胞活化的影响[J].第三军医大学学报,2010,32(12):1271-1274.
- [13] 陈翠芳,吴新梅,李开为,等.新生儿细菌感染血乳铁蛋白,IL-6 与 IL-8 的测定及临床意义[J].华中医学杂志,2009,33(2):90-91.
- [14] Guntupalli K,Dean N,Morris PE,et al.A phase 2 randomized, double-blind,placebo-controlled study of the safety and efficacy of talactoferrin in patients with severe sepsis[J].Crit Care Med,2013,41(3):706-716.
- [15] Haversen L,Ohlsson BG,Hahn-Zoric M,et al.Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF- κ B[J].Cell Immunol,2002,220(2):83-95.
- [16] Mattsby-Baltzer I,Roseanu A,Motas C,et al.Lactoferrin or a fragment thereof inhibits the endotoxin-induced interleukin-6 response in human monocytic cells[J].Pediatr Res,1996,40(2):257-262.
- [17] 詹雪灵,高 杰,刘 影,等.乳铁蛋白下调脂多糖激发的人牙周膜细胞 Toll 样受体 4 表达的研究[J].华西口腔医学杂志,2014,32(2):166-170.
- [18] Drago-Serrano ME,de la Garza-Amaya M,Luna JS,et al.Lactoferrin-lipopolysaccharide(LPS) binding as key to antibacterial and antientotoxic effects[J].Int Immunopharmacol,2012,12(1):1-9.
- [19] Ando K,Hasegawa K,Shindo K,et al.Human lactoferrin activates NF-kappaB through the Toll-like receptor 4 pathway while it interferes with the lipopolysaccharide-stimulated TLR4 signaling[J].FEBS J,2010,277(9):2051-2066.

(责任编辑:冉明会)