

# 茄病镰刀菌对体外培养小鼠角膜基质细胞 TLR4 表达的影响

黄礼彬 韩晓丽 胡建章 徐国兴

## Effect of *Fusarium solani* on expression of Toll like receptor 4 in cultured mouse keratocytes in vitro

Huang Libin, Han Xiaoli, Hu Jianzhang, Xu Guoxing. Department of Ophthalmology, Affiliated First Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China

**Abstract Objective** Fungal keratitis is one of the most important factors of blinding eye disease. Present study was to detect the expression of Toll like receptor 4 (TLR4) in cultured mouse keratocytes in vitro stimulated by *Fusarium solani* suspension and investigate its role to fungal infection of cornea. **Methods** Forty health Balb/c mice were used in this study following the Standard of Association for Research in Vision and Ophthalmology. The keratocytes of mice were digested using collagenase II and trypsinase and cultured in vitro in DMEM/F12 containing 10% fetal bovine serum. The third generation of cells were stimulated with *Fusarium solani* suspension (Spore density was  $1 \times 10^6$  CFU/mL). Expression of TLR4 protein and mRNA in cultured mouse keratocytes were detected using immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) at 0, 3, 6, 12 hours after stimulation. TNF- $\alpha$  in the cells supernatant was detected by ELISA at above-mentioned time points. **Results** Cultured cells fused and showed the vortex arrangement in the first week after incubation. The cells presented the red fluorescence for vimentin. The immunohistochemistry and RT-PCR technique determined that expression of TLR4 on cultured keratocytes was weak before stimulation and was gradually stronger after stimulation of *Fusarium solani* with the strongest expression in 6 hours. The result showed that expression level of TLR4 protein and mRNA was significantly increased at 3 hours, peaked at 6 hours and declined at 12 hours, showing a statistically significant difference between 3, 6, 12 and 0 hour (protein:  $t_{3h} = 0.031, t_{6h} = 0.097, t_{12h} = 0.069, P < 0.05$ ; mRNA:  $t_{3h} = 0.367, t_{6h} = 0.422, t_{12h} = 0.078, P < 0.05$ ). Secretion of TNF- $\alpha$  followed the same pattern to TLR4 ( $t_{3h} = 21.152, t_{6h} = 40.854, t_{12h} = 27.713, P < 0.05$ ). The positive correlation was found between expression of TLR4 mRNA and protein with IFN- $\gamma$  secretion ( $r = 0.729, r = 0.751, P < 0.05$ ). **Conclusion** TLR4 may play a critical role in recognizing fungi and mediating inflammatory response of cornea.

**Key words** TLR4; keratocyte; *Fusarium solani*; fungal keratitis

**摘要 目的** 通过检测茄病镰刀菌刺激小鼠角膜基质细胞后 Toll 样受体 4 (TLR4) 的表达分布, 探讨 TLR4 在角膜真菌感染中的作用。 **方法** 体外培养小鼠角膜基质细胞, 采用茄病镰刀菌液 (孢子密度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL) 来刺激传 3 代的小鼠角膜基质细胞, 于刺激 0 h (即未刺激) 以及 3、6、12 h 后应用免疫细胞化学染色、RT-PCR 法测定各组细胞 TLR4 蛋白及 mRNA 的表达, ELISA 法测定各组细胞上清液中肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的分泌水平。 **结果** 培养的角膜基质细胞 1 周后融合, 波形蛋白荧光染色阳性。 TLR4 蛋白及 mRNA 在未刺激角膜基质细胞呈微弱表达, 3 h 较前明显升高, 6 h 达到高峰, 12 h 开始减弱, 但与 0 h 相比, 差异均有统计学意义 (蛋白:  $t_{3h} = 0.031, t_{6h} = 0.097, t_{12h} = 0.069, P < 0.05$ ; mRNA:  $t_{3h} = 0.367, t_{6h} = 0.422, t_{12h} = 0.078, P < 0.05$ )。 TNF- $\alpha$  分泌量随着刺激时间的延长呈上升趋势, 6 h 达到高峰, 然后逐渐下降, 3、6、12 h 组与 0 h 组比较差异均有统计学意义 ( $t_{3h} = 21.152, t_{6h} = 40.854, t_{12h} = 27.713, P < 0.05$ )。 TLR4 mRNA 及蛋白的表达与 TNF- $\alpha$  的分泌间均呈正相关 ( $r = 0.729, 0.751, P < 0.05$ )。 **结论** TLR4 可能在角膜识别真菌感染、介导炎症防御反应过程中起到重要的作用。

**关键词** TLR4; 角膜基质细胞; 茄病镰刀菌; 真菌性角膜炎

**分类号** R 772.2 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)09-0747-04

本课题为福建省科技厅青年人才项目(2008F3041)、福建医科大学教授发展基金项目(JS06033)资助

作者单位: 350005 福州, 福建医科大学附属第一医院眼科

通讯作者: 韩晓丽 (Email: hxlflyk@163.com)

真菌性角膜炎是严重的致盲性眼病之一, 多发生在植物性角膜外伤后, 致病菌主要为镰刀菌属和曲霉属<sup>[1]</sup>。Toll 样受体 (Toll like receptors, TLRs) 是一类

跨膜受体家族,其主要功能是识别入侵的微生物,参与机体的免疫应答,现已发现 TLR1 ~ TLR13,共 13 个 TLRs<sup>[2]</sup>。本研究通过检测茄病镰刀菌刺激后 TLR4 在小鼠角膜基质细胞上表达和分布,旨在探讨 TLR4 在角膜真菌感染中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 清洁级健康 Balb/c 小鼠 40 只(上海斯莱克实验动物有限公司),4~6 周,体重 18~20 g,雌雄不限,排除眼部各种疾病。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 茄病镰刀菌标准株(编号:3.1829)(中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心提供);胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(杭州四季青生物公司);DMEM/F12 培养基、胰蛋白酶-EDTA(美国 Gibco 公司);II 型胶原酶、羊抗波形蛋白多克隆抗体、兔抗羊 Cy3 二抗(美国 Sigma 公司);大鼠抗小鼠 TLR4 单克隆抗体(美国 Biolegend 公司);PV-6004 试剂盒(北京中杉公司);TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(深圳晶美公司);Trizol、逆转录、PCR 试剂盒(立陶宛 Fermentas 公司);PCR 相应引物(上海生工科技有限公司)。细胞培养箱(美国 Thermo Forma 公司);超净工作台(苏州高新净化工程公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);HPIAS-2000 彩色病理图文报告系统(同济千屏影像公司);紫外分光分析仪 DU-800(美国 Beckman coulter 公司);Gene Amp9700 型 PCR 扩增仪(美国 Applied Biosystems 公司);Gel Doc2000 凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司);JY3000 型电泳仪(北京君意公司);酶标仪(上海科华公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 角膜基质细胞的培养及鉴定** 颈椎脱臼法处死小鼠,无菌条件下摘除眼球,解剖显微镜下沿角膜缘内 1 mm 处剪下角膜(不含角巩膜缘),用无菌刀片刮除角膜上皮层,用显微镊撕掉角膜后弹力层及内皮层。眼科剪将角膜基质剪碎,加入 II 型胶原酶和胰蛋白酶,37℃ 消化 5 min,加入含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液终止消化,100 目筛网过滤,1 000 r/min 离心 8 min,加入培养液,接种于 25 mm<sup>2</sup> 的培养瓶内培养。在细胞生长至 80% 融合时,以 1:3 传代。实验所用细胞为第 3 代细胞。将第 3 代角膜基质细胞种板于 6 孔板,4% 多聚甲醛固定 30 min,用含 10% 羊血清、0.3% Triton-100 的 PBS,于 37℃ 封闭 10 min,加入羊抗小鼠波形蛋白多克隆抗体工作液,于 37℃ 孵育 2 h,平衡盐液(PBS)冲洗 3 次。加入 CY3 标记的发红色荧光的羊抗

兔 IgG 二抗,于 37℃ 孵育 2 h, PBS 漂洗,于荧光显微镜下,以绿色荧光为激发光,观察并拍照。PBS 代替一抗作为阴性对照。

**1.2.2 制备茄病镰刀菌液** 标准茄病镰刀菌接种于 Sabouroud 培养基,28℃ 温箱培育 5~7 d,用 1~2 mL 无菌 PBS 冲洗菌面,收集含有真菌孢子及菌丝成分的混悬液,充分震荡混匀,涂片镜检,然后以无菌 PBS 稀释,血细胞计数板行孢子计数并调整接种密度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL。

**1.2.3 小鼠角膜基质细胞的分组** 小鼠角膜基质细胞以  $1 \times 10^5$ /mL 接种于 6 孔板中,每孔加入真菌混悬液 1 mL(真菌孢子:角膜基质细胞 = 10:1),分为 4 组,每组 6 孔,分别刺激 0(即未刺激组)、3、6、12 h。

**1.2.4 免疫细胞化学染色测定各组角膜基质细胞 TLR4 的表达** 取出各组细胞爬片,按 PV-6004 试剂盒说明书步骤进行免疫细胞化学染色,大鼠抗小鼠 TLR4 单克隆抗体为一抗(1:100),PBS 代替一抗作为阴性对照。光镜下观察,采用 HPIAS-2000 彩色病理图文报告系统进行半定量分析,每个标本选取 5 个不重叠的视野( $\times 400$ ),测定阳性细胞的光密度(OD),以每 5 个视野的平均值作为该例的 OD 值。

**1.2.5 RT-PCR 测定各组角膜基质细胞 TLR4 mRNA 的表达** Trizol 一步法提取各组细胞总 RNA,每管取出 1  $\mu$ L 用紫外分光光度计测定其浓度及纯度;取出 2  $\mu$ L 用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。Primer Premier 5.0 设计引物:TLR4(249 bp):正向链:5'-CTGGGTGAGAAATGAGCTGG-3',反向链:5'-GATACAATCCACCTGCTGCC-3'; $\beta$ -actin(324 bp):正向链:5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3',反向链:5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'。取总 RNA 2  $\mu$ L,根据试剂盒提供的方法逆转录合成模板 cDNA。PCR 的反应条件:94℃ 预变性 5 min,扩增 94℃ 30 s、60℃ 30 s、72℃ 30 s 进行 35 个循环,最终 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物以 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,采用凝胶成像分析系统进行灰度扫描,Quantity One 4.4.1 软件对 TLR4 和  $\beta$ -actin 的条带进行 OD 值分析。以特异性 TLR4 扩增带 OD 值与  $\beta$ -actin 扩增带 OD 值之比半定量代表 TLR4 mRNA 的表达水平。

**1.2.6 ELISA 检测茄病镰刀菌对角膜基质细胞分泌 TNF- $\alpha$  的影响** 分组同上。于刺激培养 0、3、6、12 h 时分别取每孔培养液上清 100  $\mu$ L,按照试剂盒说明进行 TNF- $\alpha$  的双抗体夹心 ELISA 检测。每个标准品和标本的 OD 值应减去 0 pg/mL 标准品孔的 OD 值,然后将标准品 OD 值和质量浓度输入自编程序,形成拟合标

准曲线,代入样品 OD 值得出样品 TNF- $\alpha$  的质量浓度。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件对数据进行统计学分析。计量资料数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,各时间组 TLR4 蛋白和 mRNA 表达的比较及茄病镰刀菌刺激后各时间组 TNF- $\alpha$  分泌量的比较采用单因素方差分析,茄病镰刀菌刺激后各时间点与刺激即刻 TLR4 表达和 TNF- $\alpha$  分泌的比较采用 Dunnett  $t$  检验。TLR4 mRNA 及蛋白的表达与 TNF- $\alpha$  的分泌之间的关系采用 Pearson 直线相关分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体外培养小鼠角膜基质细胞的特点

细胞悬液接种于培养瓶内 1~2 d 后,见少量散在细胞贴壁生长,细胞呈长梭形、三角形,核椭圆,居中。1 周后细胞完全汇合,可呈漩涡状排列。培养的细胞经波形蛋白免疫荧光染色,在荧光显微镜下出现红色荧光,阴性对照组不发出荧光。结合组织来源、细胞形态生长特点以及免疫荧光染色结果,可鉴定其为角膜基质细胞。

### 2.2 免疫细胞化学染色检测结果

在茄病镰刀菌液刺激 0 h (即未刺激组)的角膜基质细胞,其胞膜及胞浆呈现浅黄色(图 1A),3 h 时 TLR4 表达开始增强,6 h 时胞膜及胞浆呈现明显的棕褐色(图 1B),12 h 时表达较前有所减弱,阴性对照组胞膜及胞浆不显色,各时间组间的差异均有统计学意义( $F = 461.478, P < 0.05$ );3、6、12 h 组与 0 h 组比较差异均有统计学意义( $t_{3h} = 0.031, t_{6h} = 0.097, t_{12h} = 0.069, P < 0.05$ )(表 1)。

### 2.3 RT-PCR 检测结果

用紫外分光光度计检测抽提的总 RNA 在 260 nm 和 280 nm 波长下的读数(A 值),测定  $A_{260nm}/A_{280nm}$  值为 1.8~2.0,表明抽提的总 RNA 没有蛋白质和其他杂质污染,纯度较高,可以用作逆转录的模板。琼脂糖凝胶

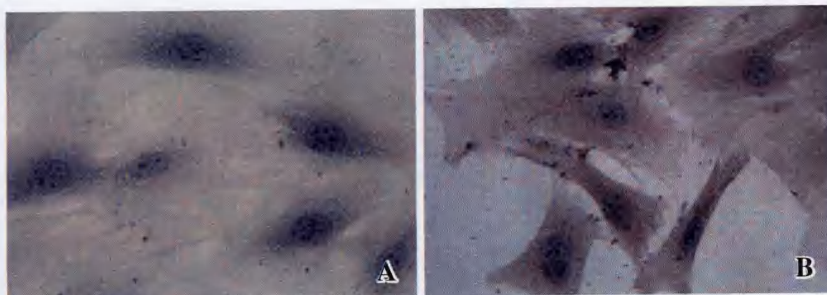


图 1 TLR4 在小鼠角膜基质细胞的表达( $\times 400$ ) A:0 h B:6 h

Fig. 1 Expression of TLR4 protein in cultured mouse keratocytes( $\times 400$ ) A:0 hour B:6 hours

电泳鉴定结果可见 28S 和 18S 清晰条带,28S/18S 比值约为 2:1,提示抽提的 RNA 较完整,未见明显降解。茄病镰刀菌液刺激 0 h 组 TLR4 mRNA 仅有微量的表达,3 h 较前明显升高,6 h 达到高峰,12 h 开始减弱(图 2),各时间组间的差异有统计学意义( $F = 255.678, P < 0.05$ );3、6、12 h 组与 0 h 组比较差异均有统计学意义( $t_{3h} = 0.367, t_{6h} = 0.422, t_{12h} = 0.078, P < 0.05$ )(表 1)。

表 1 茄病镰刀菌液刺激后小鼠角膜基质细胞 TLR4 的表达和 TNF- $\alpha$  的分泌( $\bar{x} \pm s, OD$ )

Table 1 Expression of TLR4 and secretion of TNF- $\alpha$  in the cultured mouse keratocytes stimulated by *Fusarium solani* supernatant ( $\bar{x} \pm s, OD$  value)

Incubation time(h)	Expression of TLR4		TNF- $\alpha$ (pg/mL)
	Protein	mRNA(TLR4/ $\beta$ -actin)	
0	0.087 $\pm$ 0.011	0.530 $\pm$ 0.021	18.149 $\pm$ 1.207
3	0.118 $\pm$ 0.028 <sup>b</sup>	0.891 $\pm$ 0.012 <sup>b</sup>	24.051 $\pm$ 2.046 <sup>b</sup>
6	0.164 $\pm$ 0.035 <sup>b</sup>	0.946 $\pm$ 0.008 <sup>b</sup>	45.946 $\pm$ 1.421 <sup>b</sup>
12	0.157 $\pm$ 0.014 <sup>b</sup>	0.601 $\pm$ 0.026 <sup>b</sup>	40.692 $\pm$ 1.657 <sup>b</sup>
F	461.478	255.678	75.063
P	0.000	0.000	0.002

<sup>b</sup> $P < 0.05$  vs respective 0 h (One-way ANOVA, Dunnett  $t$  test)

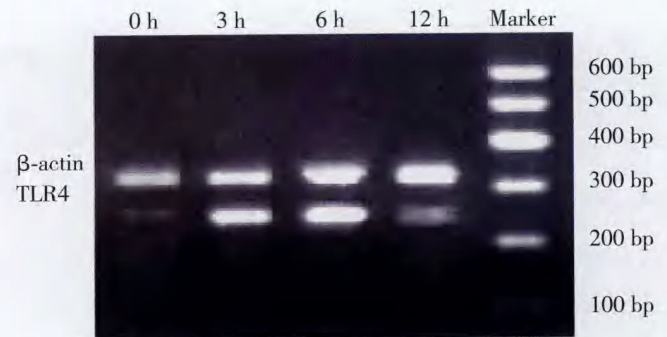


图 2 TLR4 mRNA 在小鼠角膜基质细胞的表达

Fig. 2 Expression of TLR4 mRNA in the cultured mouse keratocytes

### 2.4 TNF- $\alpha$ 的 ELISA 检测结果

TNF- $\alpha$  的水平随着刺激时间的延长呈上升趋势,6 h 达到高峰,然后逐渐下降(图 3),各时间组间的差异均有统计学意义( $F = 75.063, P < 0.05$ );3、6、12 h 组与 0 h 组比较差异均有统计学意义( $t_{3h} = 21.152, t_{6h} = 40.854, t_{12h} = 27.713, P < 0.05$ )(表 1)。经直线相关分析,TLR4 mRNA 及蛋白的表达与 TNF- $\alpha$  的分泌之间呈正相关( $r = 0.729, r = 0.751, P < 0.05$ )(图 4)。

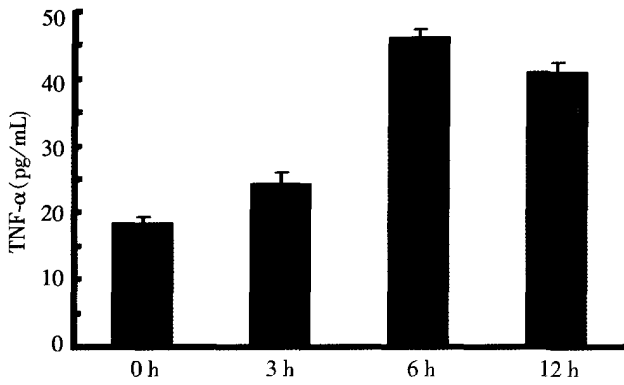


图3 茄病镰刀菌液刺激后小鼠角膜基质细胞 TNF-α 的质量浓度  
Fig. 3 Secretion of TNF-α in cultured mouse keratocytes stimulated by *Fusarium solani* supernatant

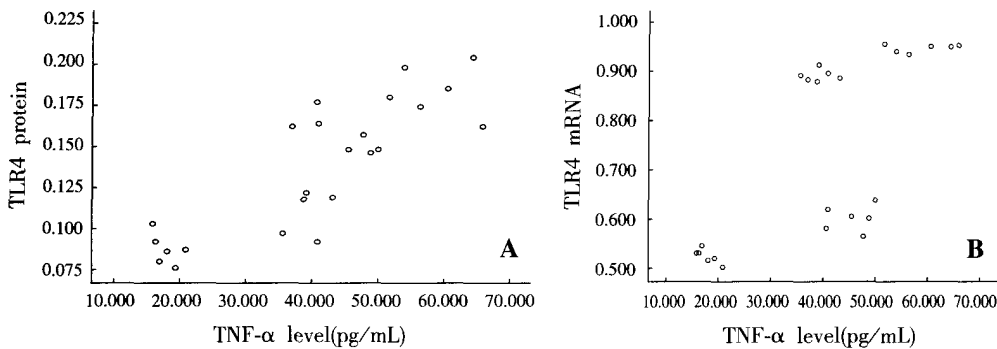


图4 TLR4 蛋白及 mRNA 表达与 TNF-α 分泌之间的关系散点图 A: TLR4 蛋白与 TNF-α 分泌 ( $r = 0.729, P < 0.05$ ) B: TLR4 mRNA 与 TNF-α 分泌 ( $r = 0.751, P < 0.05$ )

Fig. 4 Scatter plot of correlation between expressions of TLR4 protein and mRNA with TNF-α secretion A: TLR4 protein and TNF-α secretion ( $r = 0.751, P < 0.05$ ) B: TLR4 mRNA and TNF-α secretion ( $r = 0.729, P < 0.05$ )

### 3 讨论

真菌性角膜炎的治疗相当棘手。最新研究表明,角膜在抗细菌、病毒、寄生虫等感染中通过 TLRs 模式识别和介导胞内信号传导,激活免疫细胞<sup>[3]</sup>,从而在抗感染免疫中发挥重要作用。TLR4 可能是介导人角膜上皮细胞对烟曲霉菌菌丝体识别的主要受体<sup>[4-5]</sup>。

在角膜的固有细胞中,角膜基质细胞是化学因子的主要来源,能导致淋巴细胞自角膜缘向无血管的角膜选择性地募集,角膜基质的免疫状态往往决定某些病变的进展,角膜基质细胞能否通过 TLR4 介导对真菌的识别,启动炎症反应,关系到真菌性角膜炎的发生发展<sup>[6-7]</sup>。但是关于 TLR4、角膜基质细胞与真菌之间关系的相关研究却鲜有报道。

本研究发现,体外培养的正常小鼠角膜基质细胞可在 mRNA 及蛋白水平表达 TLR4,这与 Rodriguez-Martinez 等<sup>[8]</sup>的观点一致。本研究通过体外模拟角膜真菌感染过程中茄病镰刀菌与角膜基质细胞的相互作用,发现随着真菌刺激时间的延长,角膜基质细胞表面的 TLR4 表达也明显升高,在刺激 6 h 时达到高峰,随

后逐渐下降。目前已知,角膜基质细胞能合成和分泌 TNF-α,后者在角膜炎症反应过程中起到重要的调节作用<sup>[9]</sup>。本研究发现,TNF-α 的分泌随着刺激时间的延长呈上升趋势,6 h 亦达到高峰,其与 TLR4 的表达呈明显的正相关。上述结果提示,角膜基质细胞可能通过胞膜上的 TLR4 感受茄病镰刀菌的刺激,经细胞内髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 依赖途径或非 MyD88 依赖途径<sup>[10]</sup>,最终由进入胞核内活化的 NF-κB 启动核内相关基因,合成 TNF-α、IL-8、IL-6 等促炎性细胞因子并释放到细胞外,形成复杂的细胞因子网络,介导免疫调节和炎症反应。同时,细胞因子又可作为 TLR4 的激动剂,协助激活

TLR4 及其信号通路,从而形成一个正反馈循环。

总之,角膜可能通过 TLR4 识别真菌感染,介导炎症防御反应。但 TLR4 确切的作用机制、具体的信号传导通路、与其他 TLRs 是否有协同作用等问题尚待进一步研究。

### 参考文献

- 1 王丽娅,王刚生. 中国三地区真菌性角膜病致病菌种的调查[J]. 中华眼科杂志,2000, 36(2): 138-140
- 2 Takeda K, Akira S. TLR signaling pathway[J]. Semin Immunol, 2004, 16: 3-9
- 3 Chang JH, McCluskey PJ, Wakefield D. Toll-like receptors in ocular immunity and the immunopathogenesis of inflammatory eye disease[J]. Br J Ophthalmol, 2006, 90(1): 103-108
- 4 高建鲁,吴欣怡. 人角膜上皮细胞 Toll 样受体介导的炎性细胞因子的表达[J]. 中华眼科杂志, 2006, 42(7): 628-633
- 5 Zhao J, Wu XY. Triggering of toll-like receptors 2 and 4 by *Aspergillus fumigatus* conidia in immortalized human corneal epithelial cells to induce inflammatory cytokines[J]. Chin Med J (English), 2008, 121: 450-454
- 6 Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity[J]. J Mol Med, 2006, 84(9): 712-725
- 7 Hensley SE, Amalfitano A. Toll-like receptors impact on safety and efficacy of gene transfer vectors[J]. Mol Ther, 2007, 15(8): 1417-1422
- 8 Rodriguez-Martinez S, Cancino-Diaz ME, Cancino-Diaz JC. Expression of CRAMP via PGN-TLR-2 and of α-defensin-3 via CpG-ODN-TLR-9 in corneal fibroblasts[J]. Br J Ophthalmol, 2006, 90: 378-382
- 9 Hong JW, Liu-JJ, Lee JS, et al. Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001, 42(12): 2795-2803
- 10 Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptor signaling pathways[J]. Science, 2003, 300(5625): 1524-1525

(收稿:2008-10-04 修回:2009-07-06)

(本文编辑:尹卫靖)