

# TLR<sub>4</sub> 和 CD<sub>14</sub> 在体外培养的晶状体上皮细胞有表达

黄秀榕<sup>1</sup>, 祁明信<sup>2</sup>, 王 军<sup>1</sup>

基金项目: 中国福建省中医药重点项目 (No. Wzzb0602)

作者单位:<sup>1</sup> (350003) 中国福建省福州市, 福建中医药大学病理生理研究中心;<sup>2</sup> (350003) 中国福建省福州市, 福建中医药大学附属第二人民医院眼科

作者简介: 黄秀榕, 女, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 白内障的基础与临床研究。

通讯作者: 祁明信, 男, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 白内障的基础与临床研究。qihuang@netease.com

收稿日期: 2010-01-07 修回日期: 2010-03-04

## Expression of TLR<sub>4</sub> and CD<sub>14</sub> in lens epithelial cell *in vitro*

Xiu-Rong Huang<sup>1</sup>, Ming-Xin Qi<sup>2</sup>, Jun Wang<sup>1</sup>

Foundation item: Fujian Key Project of Chinese Medicine, China (No. Wzzb0602)

<sup>1</sup>Research Centre of Pathophysiology, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China; <sup>2</sup>Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China

Correspondence to: Ming-Xin Qi. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, Fujian Province, China. qihuang@netease.com

Received: 2010-01-07 Accepted: 2010-03-04

### Abstract

• AIM: To study the expressions of toll-like receptor 4 (TLR<sub>4</sub>) and CD<sub>14</sub> in lens epithelial cell (LEC).

• METHODS: The expressions of TLR<sub>4</sub> mRNA and CD<sub>14</sub> mRNA were detected by one-step polymerase chain reaction (PCR) with reverse transcription (RT-PCR) in cultured LEC.

• RESULTS: The amplified clear bands of 451bp and 348bp were obtained respectively via RT-PCR, which were confirmed to be TLR<sub>4</sub> mRNA and CD<sub>14</sub> mRNA by means of gene sequence analysis.

• CONCLUSION: There are expressions of TLR<sub>4</sub> and CD<sub>14</sub> in LEC.

• KEYWORDS: Toll-like receptor 4; CD<sub>14</sub>; expression; lens epithelial cell

Huang XR, Qi MX, Wang J. Expression of TLR<sub>4</sub> and CD<sub>14</sub> in lens epithelial cell *in vitro*. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2010; 10(4):630-632

### 摘要

目的: 探讨 Toll 样受体 4 (toll-like receptor 4, TLR<sub>4</sub>) 和 CD<sub>14</sub>

在晶状体上皮细胞 (lens epithelial cell, LEC) 的表达。

方法: 采用一步法反转录多聚酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测 LEC 中 TLR<sub>4</sub> mRNA 和 CD<sub>14</sub> mRNA 的表达。

结果: 用 RT-PCR 检测分别获得 451bp 和 348bp 的清晰扩增条带, 经基因测序证实为 TLR<sub>4</sub> mRNA 和 CD<sub>14</sub> mRNA。

结论: 晶状体上皮细胞可表达 TLR<sub>4</sub> 和 CD<sub>14</sub>。

关键词: Toll 样受体 4; CD<sub>14</sub>; 表达; 晶状体上皮细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.04.006

黄秀榕, 祁明信, 王军. TLR<sub>4</sub> 和 CD<sub>14</sub> 在体外培养的晶状体上皮细胞有表达. 国际眼科杂志 2010; 10(4): 630-632

### 0 引言

Toll 样受体 (toll-like receptor, TLR) 对机体免疫特别是感染性免疫具有十分重要的意义。迄今在人细胞膜上已发现 11 种 TLR (TLR<sub>1</sub> - TLR<sub>11</sub>), 其中 TLR<sub>4</sub> 是研究最多的一种 Toll 样受体蛋白。有关 TLR<sub>4</sub> 的研究被《Science Watch》杂志列为 2001 年十大生物科学重要进展之一<sup>[1]</sup>。TLR<sub>4</sub> 能识别 G 外膜的主要成分脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 并介导 LPS 引起的炎症反应。LPS 激活 TLR<sub>4</sub> 的信号途径需要 CD<sub>14</sub> 的参与, CD<sub>14</sub> 能促进 TLR<sub>4</sub> 对 LPS 的应答。已有研究表明, TLR<sub>4</sub> 在许多细胞均有表达<sup>[2]</sup>。但至今尚不知在晶状体上皮细胞 (lens epithelial cell, LEC) 是否表达 TLR<sub>4</sub>, 也不知 LEC 是否表达 CD<sub>14</sub>。白内障是当今世界的主要致盲性眼病, 超声乳化白内障囊外摘除联合人工晶状体植入手术是目前的主要复明手段。但研究表明术后眼内发生了炎症反应<sup>[3-5]</sup>。白内障术中及术后炎症介质释放、补体激活、血房水屏障破坏等均刺激 LEC 的增殖并向后囊膜移行, 促使后囊膜混浊 (posterior capsular opacification, PCO) 的发生, 因此炎症反应在促进后发性白内障 (after cataract) 的形成中起重要作用<sup>[6]</sup>。我们采用 RT-PCR 法检测体外培养的 LEC 的 TLR<sub>4</sub> mRNA 和 CD<sub>14</sub> mRNA 表达, 为探讨 TLR<sub>4</sub> 在白内障术后炎症反应和后发性白内障发病中的作用提供科学依据。

### 1 材料和方法

1.1 材料 Trizol 系 MBI 公司产品。一步法 RT-PCR 试剂盒系日本 TaKaRa 公司产品。琼脂糖系西班牙 Condas 进口分装试剂。溴化乙锭、Tris 碱、溴酚兰、蔗糖、甲醛、RNA Sample Loading Buffer (编号 L003-001) 均购自上海博亚公司。100bp DNA Marker, EDTA Na<sub>2</sub> 购自北京天为时代科技有限公司。胰蛋白酶、硼酸和焦碳酸二乙酯 (DEPC) 系美国 Amresco 公司产品。DMEM 培养基干粉系美国 Gibco 公司产品。乙二胺四乙酸 (EDTA) 系美国 Augus 公司产品。引物由 Invitrogen 上海英骏生物技术公司合成。蛋白核酸测定仪 (德国 Eppendorf AG 22331 Hamburg)、PCR 扩增仪 (德国 Eppendorf 5331 型)、电泳仪、凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad)。取健康新鲜小牛眼的晶状体前囊膜, 用胰蛋白酶消化后加入 DMEM 培养液, 放入 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。用倒置显微镜观察原代 LEC 生长情况。经 7 ~

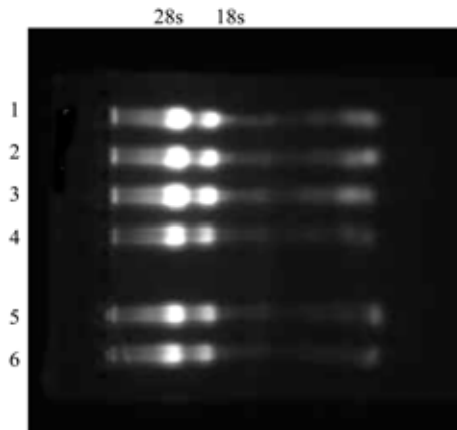


图 1 琼脂糖凝胶电泳分析 LEC 中总 RNA 1~6:RNA;28S/18S =2:1。

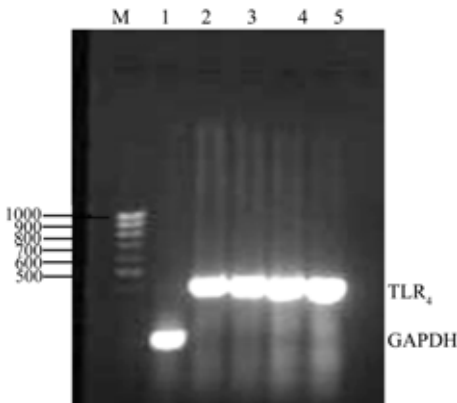


图 2 用 RT-PCR 检测 LEC 中 TLR<sub>4</sub> mRNA M: Marker; 1: GAPDH;2-5:TLR<sub>4</sub>。

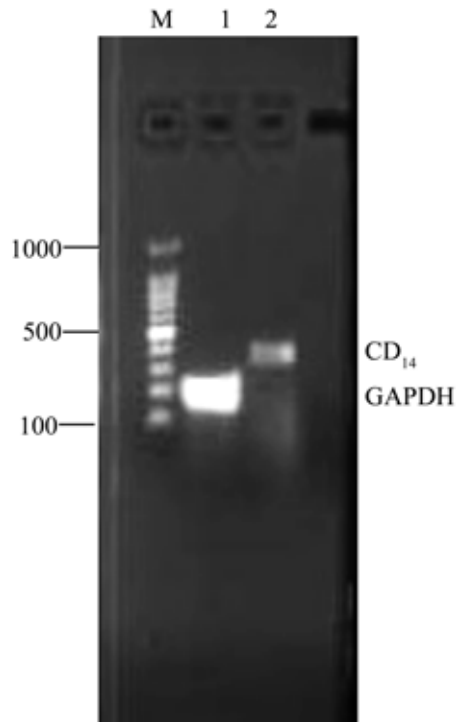


图 3 用 RT-PCR 检测 LEC 中 CD<sub>14</sub> mRNA M: Marker; 1: GAPDH;2:CD<sub>14</sub>。

10d 细胞基本融合后进行细胞传代。取第 3 代细胞用于以下实验。

1.2 方法 收集 LEC 细胞,用 Trizol 试剂提取总 RNA 并鉴定,分别取 TLR<sub>4</sub> 和 CD<sub>14</sub> 样品总 RNA 0.5mg,总反应体积为

25μL,用 TaKaRa 公司一步法 RT-PCR 试剂盒反转录为 cDNA。以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照进行 PCR 扩增。上下游引物由 Invitrogen 上海英骏生物技术公司合成。GAPDH 上游引物,5'-ATCGTCGCCATCAATGAC-CC-3',下游引物,5'-ATACTCAGCACCAGCATCACC-3',扩增产物为 220bp。TLR<sub>4</sub> 上游引物,5'-ACCACCTCTCCACCT-TGATAC-3',下游引物,5'-CCAGCCAG ACCTTGAATACAG-3',扩增产物为 451bp。CD<sub>14</sub> 上游引物,5'-CCGAAGCCT-GACTGGTCTAG-3',下游引物,5'-ACCTCCTGTTGTC-CACGATAC-3',扩增产物为 348bp。TLR<sub>4</sub> 和 CD<sub>14</sub> 的反应条件:50℃ 预变性 30min,94℃ 2min;PCR 扩增 94℃ 45s,53℃(57℃为 CD<sub>14</sub> 的退火温度)30s,72℃ 1min,共 28 次循环;最后 72℃ 延伸 3min。PCR 产物以 15g/L 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统做条带灰度扫描并拍照,将扩增结果与 GeneBank 的基因序列比较。

## 2 结果

采用 Trizol 一步法提取 LEC 总 RNA,A260/A280 均介于 1.8~2.0 之间,表明 RNA 纯度高。凝胶电泳结果(图 1),可见 28S 和 18S 条带边缘清晰,无拖尾,28S 比 18S 约为 2:1,表明 RNA 样品结构完整、无降解,可进行 RT-PCR 扩增。以 LEC 总 RNA 为模板,用一步法 RT-PCR 技术,分别扩增 TLR<sub>4</sub> 和 CD<sub>14</sub>,经 15g/L 琼脂糖凝胶电泳(图 2,3)显示分别获得 451bp 和 348bp 的清晰扩增条带,与预计扩增片段的大小相符。PCR 扩增完毕后,将 TLR<sub>4</sub> 和 CD<sub>14</sub> 分别于 15g/L 的琼脂糖凝胶进行电泳,回收、纯化后,ABI-PRISM377 自动测序仪进行 RT-PCR 产物核苷酸序列测定,结果与 GeneBank 中的基因序列一致,证明为 TLR<sub>4</sub> 和 CD<sub>14</sub>。

## 3 讨论

TLR<sub>4</sub> 在眼内多种组织中也有分布。2001 年 Song 等<sup>[7]</sup> 研究发现 HCEC 能表达 TLR<sub>4</sub> mRNA,且当 LPS 与 HCEC 共同孵育后能引起 TLR<sub>4</sub> mRNA 表达上调。他还发现人角膜基质细胞和角膜内皮细胞也能表达 TLR<sub>4</sub> mRNA 和 CD<sub>14</sub> mRNA<sup>[8]</sup>。2004 年 Ueta 等<sup>[9]</sup> 报道 HCEC 能表达 TLR<sub>2</sub> mRNA 和 TLR<sub>4</sub> mRNA 及其相应蛋白。2004 年 Brito 等<sup>[10]</sup> 报道人睫状体不含色素的上皮细胞能高表达内毒素受体蛋白 TLR<sub>4</sub> 和 CD<sub>14</sub>。2004 年 Kumar 等<sup>[8]</sup> 报道人视网膜色素上皮细胞能表达 TLR<sub>1</sub> 至 TLR<sub>7</sub>,TLR<sub>9</sub>,TLR<sub>10</sub> 的 mRNA,其中 TLR<sub>1</sub> mRNA 和 TLR<sub>3</sub> mRNA 的含量最丰富。Chang 等<sup>[11]</sup> 采用 RT-PCR 和免疫组化方法检测发现正常人眼葡萄膜、视网膜、巩膜和结膜均能表达 TLR<sub>4</sub> 和 CD<sub>14</sub> 的 mRNA。经广泛查阅国内外文献,均未见 TLR<sub>4</sub> 能否在 LEC 表达的报道。我们利用一步法 RT-PCR 检测,首次发现体外培养的牛晶状体上皮细胞能表达 TLR<sub>4</sub> mRNA 和 CD<sub>14</sub> mRNA。

曾有研究报道白内障手术人工晶状体植入术后发生前房渗出、房水中 IL-2 和 TNF 增多、嗜中性白细胞和单核/巨噬细胞增多,说明人工晶状体植入术后眼内发生了炎症反应<sup>[3-5]</sup>。术中及术后血-房水屏障破坏、炎症介质释放、补体激活等炎症反应,使手术残留的 LEC 发生增殖,并向后囊膜移行、纤维化而导致后囊膜混浊,使白内障患者手术后视力再度下降,发生后发性白内障。已有报道 TLR<sub>4</sub> 能识别 LPS,并介导 LPS 引起的炎症反应。且 LPS 激活 TLR<sub>4</sub> 的信号途径需要 CD<sub>14</sub> 参与,CD<sub>14</sub> 能促进 TLR<sub>4</sub> 对

LPS的应答,表明TLR<sub>4</sub>与CD<sub>14</sub>间存在着相互作用。我们发现晶状体上皮细胞表达TLR<sub>4</sub>和CD<sub>14</sub>,提示TLR<sub>4</sub>和CD<sub>14</sub>可能在白内障术后引起的眼内炎症反应和后发性白内障的发生发展中起重要的作用。

#### 参考文献

- 1 Krutzik SR, Sieling PA, Modlin RL. The role of Toll-like receptors in host defense against microbial infection. *Curr Opin Immunol* 2001;13:104-108
- 2 王军,黄秀榕,祁明信. Toll样受体在眼部各组织中的表达及其作用. *眼科研究* 2006;24(2):222-224
- 3 黄秀榕,祁明信,沈世仁,等. 一氧化氮在人工晶状体植入术后眼内炎症反应中的作用. *中国病理生理杂志* 2000;16(3):258-261
- 4 黄秀榕,祁明信,沈世仁,等. 人工晶状体植入术后房水白介素-2和肿瘤坏死因子- $\alpha$ 水平及其与一氧化氮的关系. *中国病理生理杂志* 2001;17(12):1196-1198
- 5 祁明信,黄秀榕,沈世仁,等. 兔晶状体摘除和人工晶状体植入术后房水细胞因子水平和一氧化氮含量与眼内炎性反应的关系. *中华眼科杂志* 2003;39(1):41-43

- 6 Odrich MG, Hall SJ, Worgul BV, et al. Posterior capsule opacification: experimental analyses. *Ophthalmic Res* 1985;17(2):75-84
- 7 Song PI, Abraham TA, Park Y, et al. The expression of functional LPS receptor proteins CD14 and toll-like receptor 4 in human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42(12):2867-2877
- 8 Kumar MV, Nagineni CN, Chin MS, et al. Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells. *J Neuroimmunol* 2004;153(1-2):7-15
- 9 Ueta M, Nochi T, Jang MH, et al. Intracellularly expressed TLR2s and TLR4s contribution to an immunosilent environment at the ocular mucosal epithelium. *J Immunol* 2004;173(5):3337-3347
- 10 Brito BE, Zamora DO, Bonnah RA, et al. Toll-like receptor 4 and CD14 expression in human ciliary body and TLR-4 in human iris endothelial cells. *Exp Eye Res* 2004;79(2):203-208
- 11 Chang JH, McCluskey P, Wakefield D. Expression of toll-like receptor 4 and its associated lipopolysaccharide receptor complex by resident antigen-presenting cells in the human uvea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(6):1871-1878

### · 短篇报道 ·

## 外伤性泪小管断裂吻合术的体会

张轶峰, 邹博, 朱建勋

作者单位:(113008)中国辽宁省抚顺眼病医院眼外伤科  
作者简介:张轶峰,男,毕业于中国医科大学,本科,主治医师,研究方向:眼外伤、白内障。  
通讯作者:张轶峰. zyf495276@yahoo.com.cn  
收稿日期:2010-03-01 修回日期:2010-03-28

张轶峰,邹博,朱建勋. 外伤性泪小管断裂吻合术的体会. *国际眼科杂志* 2010;10(4):632

### 0 引言

泪小管断裂常见于眼睑外伤,如治疗不及时或处理方法不当则造成患者终生溢泪。我院对30例泪小管断裂患者及时进行了泪小管吻合术,效果尚较满意,报告如下。

### 1 临床资料

选择2006-02/2008-05外伤所致的下泪小管断裂30例,受伤时间均在1~8h。其中男20例,女10例。年龄16~55岁。撕裂伤12例,挫伤18例。手术方法:患者均为成人,在局部麻醉下手术。常规消毒,铺巾,检查泪小管断裂情况。20g/L利多卡因+少量7.5g/L布比卡因进行滑车神经及眶下神经阻滞麻醉。泪小管断裂时,泪小管颞侧断端容易找到,鼻侧泪小管断端难找。寻找方法:在显微镜直视下仔细分层寻找,根据解剖位置,一般均能找到。断端常回缩于创面凹处,断面是小圆球形,色稍淡,呈现一粉红色凹陷,试用泪道探针插入,可达泪囊。然后用硬膜外麻醉导管自下泪点插入,经泪小管两侧断端而至泪囊,冲洗以证实在泪小管及泪囊内。用6-0无损伤缝线进行断端吻合,缝合泪小管4针,再于泪小管周围加固缝合3针。皮肤缝合后将支撑管以缝线固定于下眼睑。术后处理:抗生素药物应用左氧氟沙星滴眼液,预防伤口

感染和减少组织肉芽样增生。术后7d拆除皮肤缝线。2~3mo拔出导管,拔管后冲洗泪道,隔日1次,连续3~5次。硫酸新霉素滴眼液滴眼2wk。结果:2~3mo后拔管,23眼无溢泪,冲洗泪道通畅(治愈);7例冲洗有阻力,自上泪点冲洗时,生理盐水自下泪点溢出。隔1d冲洗1次,连续4~6次,左氧氟沙星滴眼液及硫酸新霉素滴眼液滴眼2wk后4例通畅,3例仍冲洗不畅。

### 2 讨论

泪小管断裂常因为各种外伤所致,外伤的程度和部位不相同。大部分病例由于眼睑皮肤及周围组织撕裂严重,以致造成寻找鼻侧断端十分困难<sup>[1]</sup>。我们采用筛前神经及滑车神经阻滞麻醉,减少局部浸润麻醉造成组织水肿,减少了术中寻找断端的困难。手术在显微镜下进行,也有利于寻找泪小管鼻侧断端。用硬膜外麻醉导管作支撑物,硬度适中,操作容易,取材方便,无毒,无刺激性,可长期留置体内而无反应,减少了吻合的纤维组织增生及瘢痕形成<sup>[2]</sup>。术中吻合泪小管断裂时用6-0无损伤缝线缝线,直接在断裂端缝合泪小管4针。注意不缝合到泪小管的黏膜,以防止损伤内皮,瘢痕收缩,导致吻合口狭窄使泪道不畅。寻找泪小管鼻侧断端的方法很多<sup>[3]</sup>,最常用的仍然是在直视下直接分层寻找。用适当压迫泪囊至上泪点冲洗法,用冲洗针头至上泪点进入冲洗泪道,检查鼻泪管是否通畅,如通畅再用手压迫泪囊部,继续冲洗,使创面有水外溢,用敷料吸干创面,再快速冲洗,发现出血点,即泪小管鼻侧断端。亦可应用探针自上泪管逆行寻找<sup>[4]</sup>。泪小管置入管应保留时间长,约2~3mo,适当活动置入管可减少吻合口狭窄,拔管后应坚持冲洗泪道,以左氧氟沙星滴眼液和硫酸新霉素滴眼液滴眼2wk以上。

### 参考文献

- 1 李凤鸣. 眼科全书(下册). 北京:人民卫生出版社1996:3213
- 2 王长虹,毋海燕. 泪小管断离吻合手术不同支撑物的效果分析. *眼外伤职业眼病杂志* 2005;27(6):441-442
- 3 李利,杨进献. 下泪小管断裂I期修复术三种术式的比较. *眼外伤职业眼病杂志* 2003;25(2):123-124
- 4 康刚进,乔一平,郭梦翔,等. 带管芯硬膜管在下泪小管断离吻合术中的应用. *眼外伤职业眼病杂志* 2003;25(6):415