

• 论 著 •

TRIF 在血栓闭塞性脉管炎患者血管组织中的表达水平及临床意义*

尹江燕¹, 郭 轶^{2△}

1. 重庆医科大学附属第一医院超声科, 重庆 400016; 2. 重庆大学附属中心医院/
重庆市急救医疗中心普外科, 重庆 400014

摘 要:目的 探讨 β 干扰素 Toll 样受体结构域衔接蛋白 (TRIF) 在血栓闭塞性脉管炎 (TAO) 患者血管组织中的表达水平及临床意义。方法 取因 TAO 行截肢手术的 26 例患者 (TAO 组) 和因非血管疾病行截肢手术的 18 例患者 (对照组) 的血管组织, 采用反转录 PCR (RT-PCR) 及 Western blot 检测两组患者血管组织中的 TRIF 表达水平并进行组间比较。进一步采用免疫荧光共聚焦技术观察 TRIF 在 TAO 患者血管组织中的表达特点。结果 TAO 患者血管组织中 TRIF 的 mRNA 和蛋白表达水平明显高于对照组 ($P < 0.05$)。并且, 在 TAO 患者中, TRIF 主要表达于血管平滑肌细胞。结论 TRIF 的表达与 TAO 的起病关系密切, TRIF 信号通路诱导的炎性反应可能是 TAO 发病的重要因素之一。

关键词: β 干扰素 Toll 样受体结构域衔接蛋白; 血栓闭塞性脉管炎; 炎性反应

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.17.010 **中图法分类号:** R446.8

文章编号: 1673-4130(2021)17-2090-04 **文献标志码:** A

The expression and clinical significance of TRIF in the vascular tissues of patients with thromboangiitis obliterans*

YIN Jiangyan¹, GUO Yi^{2△}

1. Department of Ultrasonic, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of General Surgery, Affiliated Central Hospital of Chongqing University/Chongqing Emergency Medical Center, Chongqing 400014, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of Toll/IL-1 receptor domain containing adaptor inducing beta-interferon (TRIF) in vascular tissues of patients with thromboangiitis obliterans (TAO) and its clinical significance. **Methods** The vascular tissues of 26 patients who underwent amputation due to TAO (TAO group) and 18 patients who underwent amputation due to non-vascular disease (control group) were collected, and the two groups were detected by using RT-PCR and Western blot. The expression levels of TRIF in patients' vascular tissues were compared between the two groups. The immunofluorescence confocal technique was further used to observe the expression characteristics of TRIF in the vascular tissues of TAO patients. **Results** In patients with TAO, the mRNA and protein expressions of TRIF were much higher than that of in patients without vascular diseases ($P < 0.05$), and the expression of TRIF was mainly in smooth muscle cells of blood vessel. **Conclusion** The expression of TRIF is closely related to the development of TAO, and the inflammatory response induced by the TRIF signal pathway may be one of the important factors in the onset of TAO.

Key words: Toll/IL-1 receptor domain containing adaptor inducing beta-interferon; thromboangiitis obliterans; inflammatory response

血栓闭塞性脉管炎 (TAO) 是一种病因尚不明确的主要累及中、小型动静脉的节段性、炎症性和闭塞性疾病^[1]。近期许多研究发现, 过度自身免疫反应诱发靶器官炎症进而导致的血管痉挛、炎性闭塞和血栓

形成与 TAO 的起病及进展密切相关^[2-4]。 β 干扰素 Toll 样受体结构域衔接蛋白 (TRIF) 信号通路是 Toll 样受体家族重要的下游通路, 其被证实与多种自身免疫性疾病密切相关^[5-6], 本课题组前期研究发现 TRIF

* 基金项目: 重庆市科技局自然科学基金面上项目 (cstc2020jcyj-msxm3181)。

作者简介: 尹江燕, 女, 主治医师, 主要从事胃肠和血管疾病的基础及超声诊断的研究。△ 通信作者, E-mail: guoyi429@163.com。

本文引用格式: 尹江燕, 郭轶. TRIF 在血栓闭塞性脉管炎患者血管组织中的表达水平及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(17):

在 TAO 患者的腰交感神经节中有高表达,其通过诱发神经节炎症间接地导致血管痉挛,可能参与 TAO 的发病过程^[7]。但在 TAO 患者受损最严重的靶器官外周血管组织中 TRIF 的表达情况及其意义却少见报道,因此本课题组对 TAO 患者血管组织中 TRIF 的表达水平进行了检测,并分析了其在血管组织中的表达特点,旨在进一步阐明 TRIF 信号通路 with TAO 发病的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 1 月至 2019 年 12 月重庆医科大学附属第一医院和重庆市急救医疗中心临床诊断为 TAO 并行下肢截肢的患者(在术后病理诊断确诊为 TAO,排除术后病理无法诊断及确诊为其他疾病的患者)作为 TAO 组,共纳入 26 例,其中男 26 例、女 0 例,年龄 36~52 岁(中位年龄 42.2 岁)。选取同期重庆医科大学附属第一医院和重庆市急救医疗中心无血管相关疾病病史因其他疾病行下肢截肢的患者(术后病理检查均排除血管相关疾病)作为对照组,共纳入 18 例,其中男 11 例、女 7 例,年龄 26~55 岁(中位年龄 44.5 岁)。

1.2 仪器与试剂 TRIF、CD31、SAM 抗体购自 Sigma 公司,生物素化二抗(博士德,武汉),辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(中杉,北京),RNA 提取和扩增试剂盒(TaKaRa),蛋白质裂解试剂盒,BCA 蛋白浓度试剂盒,配胶试剂盒,ECL 显影试剂盒(碧云天,江苏),荧光采集处理与分析系统(Leicaqwin,德国)。

1.3 反转录 PCR(RT-PCR)检测 取上述纳入研究者血管组织标本(均为下肢),先用 Trizol 法进行总 RNA 的提取,每 50~100 mg 组织标本碾碎后加入 1 mL Trizol 试剂行组织裂解,取裂解液加入 0.2 mL 氯仿,振荡后室温放置 5 min,4 ℃离心 10 min(12 000 r/min),转移水相后加入异丙醇再次离心,弃上清液后加入预冷的 75%乙醇洗涤、离心并检测 RNA 浓度。然后按照 PCR 试剂盒说明书进行 RNA 的反转录和目的基因扩增。PCR 扩增引物(由上海英骏生物有限公司合成),TRIF 上游引物:5'-AAACCAG-CACCAACTACCCA-3';下游引物:5'-CTTC-CAAACCTTCACGCTCT-3';扩增片段为 293 bp。GAPDH 上游引物:5'-AGTCCACTGGCGTCTTCA-3';下游引物:5'-AGTCCTTCCACGATACCAA-3';扩增片段为 232 bp。扩增条件为 94 ℃预变性 2 min;随后 94 ℃ 30 s,72 ℃延伸 30 s,共 35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。最后运用 Gene 凝胶图像仪进行图像采集、分析、测量、统计分析。

1.4 Western blot 检测 取少许新鲜血管组织放入预先加入 1 mL 蛋白提取缓冲液和蛋白酶抑制剂的匀浆器中,冰上研磨后吸取研磨液,冰上孵育 10 min,4 ℃离心 10 min(12 000 r/min)。吸取上清液用 BCA 蛋白定量试剂盒测量蛋白浓度后分装。按照 1:5

的比例加入上样缓冲液后置于 100 ℃沸水中 3 min 进行蛋白变性。10%SDS 聚丙烯酰胺凝胶中,每孔上样量 30 μ L,60 V、30 min,再用 100 V、1 h,PVDF 膜 100 mA 转膜 1 h,5%脱脂奶粉封闭 2 h,加入按 1:1 000 稀释的 TRIF 一抗,4 ℃孵育过夜。加入二抗,37 ℃孵育 2 h,TBST 清洗后用 ECL 发光试剂盒进行曝光。选用 GAPDH 为内参对照。用 ECL 发光试剂盒进行检测,Image Lab 凝胶成像分析软件进行图像扫描与分析。

1.5 免疫荧光共聚焦检测 取冰冻临床手术标本组织,用 4%多聚甲醛缓冲液固定 24 h 后,用 15%和 30%蔗糖梯度脱水,沉底后进行切片。加入 5%山羊血清 37 ℃,20 min。去血清后加入一抗 TRIF 抗体(1:100),并分别加入 CD31 和 SAM 抗体(1:250),4 ℃过夜。次日加入二抗,37 ℃,50 min,加入 DAPI,37 ℃,6 min。封片后在激光共聚焦显微镜下进行观察和采图。

1.6 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较行独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TRIF mRNA 和蛋白在 TAO 组和对照组患者血管组织中表达 RT-PCR 结果显示,TRIF 和内参 GAPDH 的 PCR 扩增片段分别为 293、232 bp;TAO 组 TRIF mRNA 的吸光度值为 0.831 ± 0.033 ,明显高于对照组 TRIF mRNA 的吸光度值(0.192 ± 0.008),差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。同时 Western blot 结果显示,TRIF 和内参 GAPDH 的蛋白相对分子质量大小分别为 66×10^3 、 37×10^3 ;TAO 组 TRIF 蛋白的吸光度值为 0.806 ± 0.015 ,明显高于对照组 TRIF 蛋白的吸光度值(0.162 ± 0.017),组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 2。

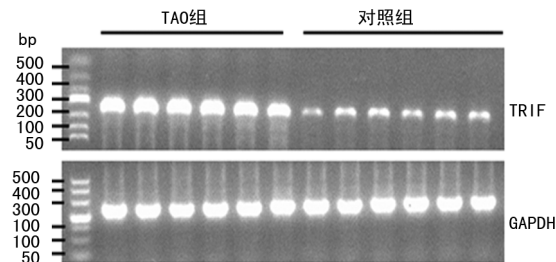


图 1 TRIF mRNA RT-PCR 检测的电泳图

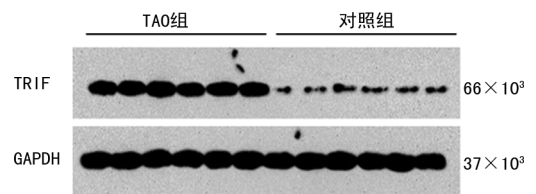
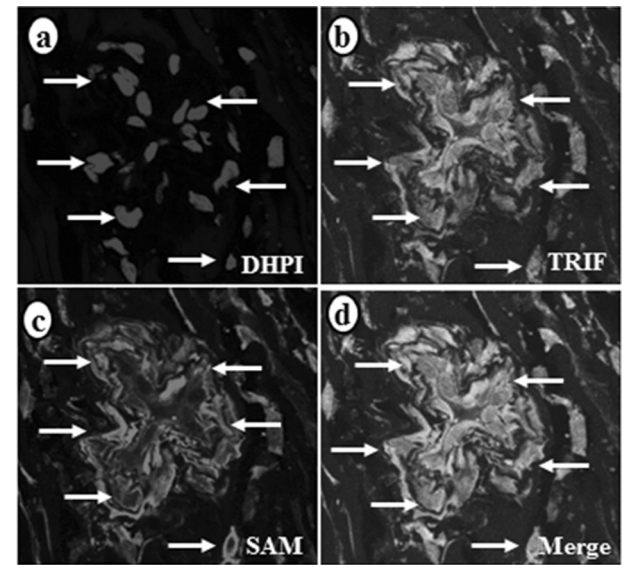


图 2 TRIF 蛋白表达水平检测的 Western blot 图

2.2 TRIF 在 TAO 患者血管组织细胞中的表达特点 免疫荧光组织染色显示,在 TAO 患者血管组织

中在可以见到 TRIF 的高表达,以 SAM 染色代表平滑肌,可观察到两者共表达,见图 3。TAO 患者血管中膜的平滑肌细胞可以分泌 TRIF 蛋白,并且 TRIF 主要在细胞质和细胞膜上表达。



注:a 表示细胞核染色;b 为血管组织中 TRIF 的表达;c 为平滑肌的 SAM 染色;d 表示 SAM 和 TRIF 的共表达情况。

图 3 TRIF 在 TAO 患者血管组织中的表达特点(×400)

3 讨 论

TAO 又称 Buerger's 病,于 1908 年被首次报道。虽经过了一个多世纪的探索和研究,TAO 的发病机制仍未阐明,其治疗效果亟待提高,截肢仍是绝大多数 TAO 患者的最终结局^[3,8]。近期许多研究发现 TAO 的起病与烟草、细菌感染及寒冷刺激诱发的自身免疫性炎症密切相关^[9];TAO 患者的病理生理改变主要为血管痉挛、血管组织炎性损伤及继发血栓形成,但其具体机制尚不明确^[4,10]。因此,自身免疫性炎症损伤与 TAO 发病的相关性逐渐成为 TAO 的研究热点之一。自身免疫性炎症是复杂的分子生物过程,多种免疫相关信号通路参与其中^[11],Toll 样受体(TLRs)通路是机体最重要的非特异性固有免疫应答途径,其可通过激活一系列下游信号通路进而调节机体免疫应答和自身免疫性炎症反应^[12];近期许多研究也发现 TLRs 通路等多种自身免疫性疾病密切相关^[13]。TRIF 信号通路是 TLRs 最重要的下游通路之一,其主要与 TLR4 结合参与多种炎症疾病及自身免疫性疾病的发病过程^[14],但 TRIF 通路的相关性的相关研究仍较少。本试验检测 TRIF 在 TAO 患者血管组织中的表达情况,初步探讨 TRIF 通路的相关性。

在 TAO 的发病及进展过程中,血管痉挛是最早和最主要的临床表现之一,而且血管痉挛贯穿 TAO 的整个病程^[15]。绝大多数 TAO 患者起病初期以血管痉挛为主要表现,血管痉挛与交感神经功能紊乱密切相关,因此,早期的 TAO 患者行腰交感神经切除术

或用药物阻断缺血患肢的周围交感神经可明显改善下肢血管痉挛进而减轻缺血症状^[15-16],但诱发及促进 TAO 患者血管痉挛的机制尚未明确。有研究发现,TAO 患者血管外膜神经分布异常和儿茶酚胺的缺乏可能是导致其血管痉挛的重要因素^[17]。支配四肢小血管舒缩功能的神经纤维来自交感神经节,主要是交感缩血管神经纤维,若神经节发生病变,可导致神经递质释放异常,进而引发神经炎症性血管痉挛^[18],但其具体机制有待进一步阐明。本课题组前期研究发现 TRIF 在 TAO 患者腰交感神经节中高表达,该通路可能参与神经功能异常诱发 TAO 患者血管痉挛的发病过程^[7]。

但随着 TAO 的进展,血管痉挛会进行性加重,而且行腰交感神经切除术或用药物阻断患肢的周围交感神经无法缓解血管痉挛。这种现象提示随着 TAO 的进展,血管痉挛可能存在多因素的联合作用。血管平滑肌在血管的收缩中也起重要作用,血管痉挛和血管平滑肌的功能也存在密切相关^[19]。研究发现,血管平滑肌的炎症或者功能异常均可导致血管痉挛^[20];同时有研究发现 TRL4 信号通路可以参与脑血管痉挛的病理生理过程,其作用机制可能与 TRL4 通过 TRIF 通路激活下游的 NF-κB 通路进而诱发的平滑肌炎症有关^[21]。因此,结合本课题组前期研究,笔者推测 TRIF 通路也可能通过诱发 TAO 患者血管壁平滑肌的炎性反应进而加重血管痉挛的发生。本研究通过检测 TAO 患者血管组织标本中 TRIF 的 mRNA、蛋白发现其 TAO 患者血管组织中的表达远高于对照组。同时荧光共聚焦显示 TRIF 主要在 TAO 患者血管肌层的平滑肌细胞的细胞质和细胞膜表达,在血管内膜的内皮细胞未见明显表达。这些结果证实 TRIF 通路可能也可以诱发血管平滑肌的炎症进而加重 TAO 患者的血管痉挛,导致疾病的进展。其具体机制可能是 TRIF 通路激活其下游的 NF-κB 通路进而活化一系列炎症反应。首先 NF-κB 通路可以诱导激活物蛋白 1(AP-1)直接导致平滑肌细胞的损伤,导致平滑肌细胞失去弹性并保持僵硬状态诱发持续性血管痉挛^[22];同时,NF-κB 通路还可以诱导白细胞分泌大量炎症介质如白细胞介素(IL)家族(IL-1、IL-2、IL-8 等),这些炎症介质可以诱发平滑肌炎性反应,引起平滑肌细胞收缩进而导致血管痉挛^[23];最后,NF-κB 通路还可以促进血管内皮细胞分泌内皮细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞间黏附分子-1(VCAM-1)等炎症介质进而诱发血管壁平滑肌细胞间的炎性黏附导致血管痉挛^[24]。但是各种炎症介质诱发的炎症反应导致平滑肌细胞强烈收缩的机制仍需进一步研究。

综上所述,TRIF 在 TAO 患者血管组织的高表达与 TAO 的发病和进展密切相关。其可能的机制是 TRIF 激活下游的 NF-κB 通路诱发血管平滑肌细胞

发生一系列严重的炎性反应,进而引导持续性的血管痉挛导致 TAO 的发病及进展,但是其具体的作用机制仍有待进一步的研究。同时针对 TRIF 的靶向治疗可能成为 TAO 治疗的新方法。

参考文献

- [1] PIAZZA G, CREAGER M A. Thromboangiitis obliterans [J]. *Circulation*, 2010, 121(16):1858-1861.
- [2] AKAR A R, INAN M B, CAGDS B. Thromboangiitis obliterans [J]. *Curr Treatm Opt Rheumatol*, 2016, 2(2):178-195.
- [3] SEEBALD J, GRITTERS L. Thromboangiitis obliterans (Buerger disease) [J]. *Radiol Case Rep*, 2015, 10(3):9-11.
- [4] MOUSAZADEH B, SHAREBIANI H, TAHERI H, et al. Unexpected inflammation in the sympathetic ganglia in thromboangiitis obliterans; more likely sterile or infectious induced inflammation [J]. *Clin Mol Allergy*, 2019, 17(1):1-9.
- [5] AH-YEON K, HYUN-JIN S, YEON K S, et al. Differential regulation of MyD88-and TRIF-dependent signaling pathways of Toll-like receptors by cardamomin [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 64(23):1-9.
- [6] EUN-HA H, TAE-HYOUN K, SANG-MUK O, et al. Toll/IL-1 domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF) mediates innate immune responses in murine peritoneal mesothelial cells through TLR3 and TLR4 stimulation [J]. *Cytokine*, 2016, 77(1):127-134.
- [7] 刘佳, 代远斌, 郭轶. TRIF 在 Buerger's 病患者腰交感神经节中的表达及其意义 [J]. *免疫学杂志*, 2014, 30(4):314-318.
- [8] MALECKI R, KLUZ J, PRZEZDZIECKADOLYK J, et al. The pathogenesis and diagnosis of thromboangiitis obliterans: is it still a mystery [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2015, 24(6):1085-1097.
- [9] OLIN J W. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) [J]. *N England J Med*, 2000, 343(112):864-869.
- [10] CHOI B, JANG S Y, KIM S K, et al. The incidence, prevalence, and survival rate of thromboangiitis obliterans in Korea: a retrospective population-based study [J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2020, 10(5):1238-1244.
- [11] DINY N L, ROSE N R, DANIELA C. Eosinophils in autoimmune diseases [J]. *Front Immunol*, 2017, 8(1):55-66.
- [12] VIDYA M K, KUMAR V G, SEJIAN V, et al. Toll-like receptors: significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals [J]. *Int Rev Immunol*, 2017, 37(1):1-17.
- [13] ODA K, KITANO H. A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network [J]. *Mol Syst Biol*, 2006, 18(1):26-34.

- [14] ZENKE K, MUROI M, TANAMOTO K I. AKT1 distinctively suppresses MyD88-depenedent and TRIF-dependent Toll-like receptor signaling in a kinase activity-independent manner [J]. *Cell Signal*, 2018, 43(12):32-39.
- [15] DAVID J G, CRISTINA A P, CINTIA A A, et al. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) with high-potency vasodilators [J]. *Dermatol Ther*, 2015, 28(3):135-139.
- [16] KOCAC B, USTUN E D. Vasa nervorum as the source of corkscrew collaterals in thromboangiitis obliterans (Buerger's Disease) [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2016, 52(4):508-515.
- [17] LI M D, WANG Y F, YANG M W, et al. Risk factors, mechanisms and treatments of thromboangiitis obliterans: an overview of recent research [J]. *Curr Med Chem*, 2020, 27(35):6057-6083.
- [18] NESARGIKAR P N, AJIT M K, EYERS P S, et al. Lumbar chemical sympathectomy in peripheral vascular disease: does it still have a role [J]. *Int J Surg*, 2009, 7(2):145-149.
- [19] HONGZHOU D, JIAYONG Z, LIANG L, et al. Effect of simvastatin on proliferation of vascular smooth muscle cells during delayed cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage [J]. *Turk Neurosurg*, 2016, 26(4):538-544.
- [20] LIN C, ZHAO Y, WAN G, et al. Effects of simvastatin and taurine on delayed cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage in rabbits [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(4):1355-1360.
- [21] HANAFY K A. The role of microglia and the TLR4 pathway in neuronal apoptosis and vasospasm after subarachnoid hemorrhage [J]. *J Neuroinflammation*, 2013, 10(1):868-877.
- [22] CHENG G, WEI L, XIURONG W, et al. IL-17 stimulates migration of carotid artery vascular smooth muscle cells in an MMP-9 dependent manner via p38 MAPK and ERK1/2-dependent NF- κ B and AP-1 activation [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2009, 29(8):1161-1168.
- [23] BABIUCH K, KUNIERZ-CABALA B, KSEK B, et al. Evaluation of proinflammatory, NF-kappaB dependent cytokines; IL-1 α , IL-6, IL-8, and TNF- α in tissue specimens and saliva of patients with oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(3):867-870.
- [24] PADILLA J, CARPENTER A, DAS N D, et al. TRAF3IP2 mediates high glucose-induced endothelin-1 production as well as endothelin-1-induced inflammation in endothelial cells [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 314(1):H52-H64.