

TLR4 与 MyD88 蛋白在慢性肾功能不全组织中的表达研究*

吴景华¹, 郭佳培¹, 王志刚², 王海欣³ (1. 华北理工大学附属医院检验科, 河北唐山 063000);
2. 唐山丰润区第二人民医院检验科, 河北唐山 063000);
3. 唐山市中医医院口腔科, 河北唐山 063000)

摘要:目的 通过研究 Toll 受体 4(TLR4)及髓样细胞分化因子 88(MyD88)在慢性肾功能不全组织中的表达,探讨 TLR4/MyD88 蛋白在慢性肾功能不全发生发展中的作用。方法 选取 2011.07~2014.05 华北理工大学附属医院确诊的 40 例肾功能不全的患者为观察对象,40 例肾癌切除患者未被浸润的肾组织为对照,通过免疫组化方法检测慢性肾功能不全患者肾脏组织中 TLR4 及 MyD88 的表达情况,通过腺嘌呤(200mg/kg)连续灌胃制备大鼠模型,定时逆转录 PCR(RT-PCR)及 Western blot 检测 TLR4 及 MyD88 的表达,同时将大鼠模型分为 TLR4 组、未阻断组和 IgG 对照组分别检测外周血中尿素氮(BUN)及肌酐(RE)的浓度。结果 慢性肾功能不全患者肾脏组织中 TLR4 及 MyD88 的表达明显高于正常对照组;腺嘌呤制备的大鼠模型中的 TLR4 及 MyD88 的基因及蛋白的表达明显高于正常大鼠;TLR4 阻断组尿素氮(15.65 ± 3.97 mmol/L)明显低于未阻断组(23.33 ± 7.62 mmol/L)及 IgG 对照组(26.33 ± 6.77 mmol/L) ($t=2.887, P=0.045$);肌酐(523.89 ± 52.67 μ mol/L)也明显低于未阻断组(789.51 ± 98.17 μ mol/L)及 IgG 对照组(809.51 ± 94.19 μ mol/L) ($t=4.125, P=0.015$)。结论 TLR4 及 MyD88 蛋白在慢性肾功能不全中表达增加,并且显著促进疾病的发展过程。

关键词:慢性肾功能不全;Toll 样受体 4/髓样细胞分化因子 88 蛋白;肌酐;尿素氮

中图分类号:R692;R392.11 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2016)03-062-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2016.03.017

Study on Effect of TLR4/MyD88 Protein on Chronic Renal Failure

WU Jing-hua¹, GUO Jia-pei¹, WANG Zhi-gang², WANG Hai-xin³

(1. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Hebei Tangshan 063000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, the Second People's Hospital in Fengrun District, Hebei Tangshan 063000, China; 3. Department of Stomatology, Tangshan City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hebei Tangshan 063000, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression of TLR4 and MyD88 in chronic renal failure and its role in the development of chronic renal failure. **Methods** 40 cases of patients diagnosed chronic renal failure during 2011.07~2014.05 were selected as observation subjects, and renal tissues without invasion of 40 cases patients with renal carcinoma resection were chosen as control. The expression of TLR4 and MyD88 in chronic renal failure was detected by IMH. The mice model was stabled establish through gavage of adenine (200 mg/kg). And the TLR4 and MyD88 expression was detected by RT-PCR and Western blot. The models was divided into three groups: TLR4 blocking group, TLR4 non-blocking and control group. And the BUN and CRE were detected by biochemical analyzer in three groups. **Results** The expression of TLR4 and MyD88 were higher in chronic renal failure than in normals. The TLR4 and MyD88 were also higher in chronic renal failure model mice. The levels of BUN (15.65 ± 3.97 mmol/L) in TLR4 blocking group were lower than which in TLR4 non-blocking group (23.33 ± 7.62 mmol/L) and which in IgG group (26.33 ± 6.77 mmol/L) ($t=2.887, P=0.045$). The CRE levels were the lowest in TLR4 -blocking group (523.89 ± 52.67 μ mol/L) compared with the TLR4 non-blocking group (789.51 ± 98.17 μ mol/L) and the IgG group (809.51 ± 94.19 μ mol/L) ($t=4.125, P=0.015$). **Conclusion** The increased expression of TLR4 and MyD88 in chronic renal failure significantly would promote the development of chronic renal failure.

Keywords: chronic renal failure; TLR4/MyD88 protein; BUN; CRE

慢性肾功能不全是一组由各种慢性肾脏疾病所导致的肾功能损害,机体不能维持生物体内环境的稳定状况而出现的一系列临床综合征。近年研究表明,肾脏疾病患者 Toll 受体 4/髓样细胞分化

因子 88(TLR4/MyD88 信号传递系统的异常表达,可能在慢性肾功能衰竭的形成及发展方面起着重要的作用^[1]。Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)是 TLRs 家族中的一员,为 I 型跨膜蛋

* 作者简介:吴景华(1976-),男,医学博士,副教授,专业:分子免疫学,E-mail:tsuwjing hua@163.com。

白,组织分布广泛,可识别病原相关的分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)及某些内源性配体,引起细胞内信号传导机制从而导致炎症反应的发生。髓样细胞分化因子88(myeloid differentiation factor88, MyD88)作为一种含 TIK(Toll/IL-1 receptor)结构域的接头蛋白,在 TLR4 信号通路中具有关键性的作用^[2]。然而目前关于 TLR4 与慢性肾功能不全关系的直接研究较少,因此本研究以确诊的慢性肾功能不全患者为研究对象,并设立对照组,应用免疫组化技术及构建大鼠模型研究 TLR4/MyD88 在慢性肾功能不全中的表达和作用机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取 2011.07~2014.05 期间于华北理工大学附属医院经肾功能及尿蛋白检测确诊为慢性肾功能不全的 40 例患者为观察组,其中男性 20 例,女性 20 例,年龄为 29~54 岁,平均年龄 43.43 ± 9.38 岁。另选同期于我院行肾癌根治术的患者 40 例,男性 11 例,女性 9 例,34~59 岁,平均年龄 48.13 ± 7.64 岁,取其切除肾脏中经病理检查未被浸润的部分为对照组。两组患者性别年龄具有可比性。

1.2 仪器和试剂

1.2.1 主要仪器:ABI7300 RT-PCR 仪器(美国);蛋白电泳仪(伯乐公司,美国);全自动生化分析仪(Beckman 5800,美国)。

1.2.2 主要试剂:Wister 大鼠(南京实验动物中心);总 RNA 提取液 Trizol(Invitrogen 公司,美国);逆转录 PCR 试剂盒(博大泰克,北京);SYBR green Primix Ex Taq 酶(TaKaRa 公司,日本);anti-TLR4(eBioscience 公司);anti-MyD88(Sigma 公司);IgG 对照抗体(abcam 公司);所有引物序列均由上海生工公司合成。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学方法(IMH)检测 TLR4 及 MyD88 的表达:慢性肾功能不全患者,行经皮肾活检穿刺;肾癌根治术患者取切除肾脏中远离肿瘤组织经病理检查未被浸润的部分。所取标本用 10 ml/dl 中性甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋制片。加 TLR4, MyD88 一抗及生物素标记的二抗进行固定,显微镜观察。

1.3.2 大鼠造模后检测 TLR4 及 MyD88 的表达:选取 Wister 大鼠 20 只,雌性,体重 200~250g,随机分为两组:空白对照组、慢性肾功能不全模型组。其中模型组大鼠以腺嘌呤 200mg/kg 连续灌胃 30 天后,检测尿素氮、肌酐及尿蛋白进行筛选。造模成功后,处死大鼠,分离肾脏组织,一部分进行实时定量 PCR(RT-PCR)检测 TLR4 及 MyD88mRNA 的表达,一部分进行 Western Blot 进行 TLR4 及 MyD88 蛋白的检测。

1.3.3 行 TLR4 阻断检测 BUN, CRE 的浓度:选取制备好的慢性肾功能不全模型大鼠 10 只,随机分为 3 组:TLR4 未阻断组、TLR4 阻断组和 IgG 对照组。其中 TLR4 阻断组进行腹腔注射 TLR4 阻断剂($10 \mu\text{g/kg}$),隔日注射一次,持续 20 天。IgG 对照组进行腹腔注射 IgG 对照抗体($10 \mu\text{g/kg}$),隔日注射一次,持续 20 天。TLR4 未阻断组进行腹腔注射生理盐水。三组大鼠进行眼眶取血,3 000 r/min 离心 15 min 分离血清后,应用 Beckman 5800 全自动生化分析仪检测 BUN 和 CRE 的浓度。

1.4 统计学分析 采用 SPSS17.0 软件进行统计学处理。资料经检验均服从正态分布,用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用独立样本 t 检验进行统计分析。所有结果以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢性肾功能不全患者 TLR4 及 MyD88 的表达情况 TLR4 及 MyD88 在正常肾脏组织中表达水平极低,在慢性肾功能不全患者肾脏组织中表达明显增强,表现为颗粒状或弥漫的棕黄色,见图 1。

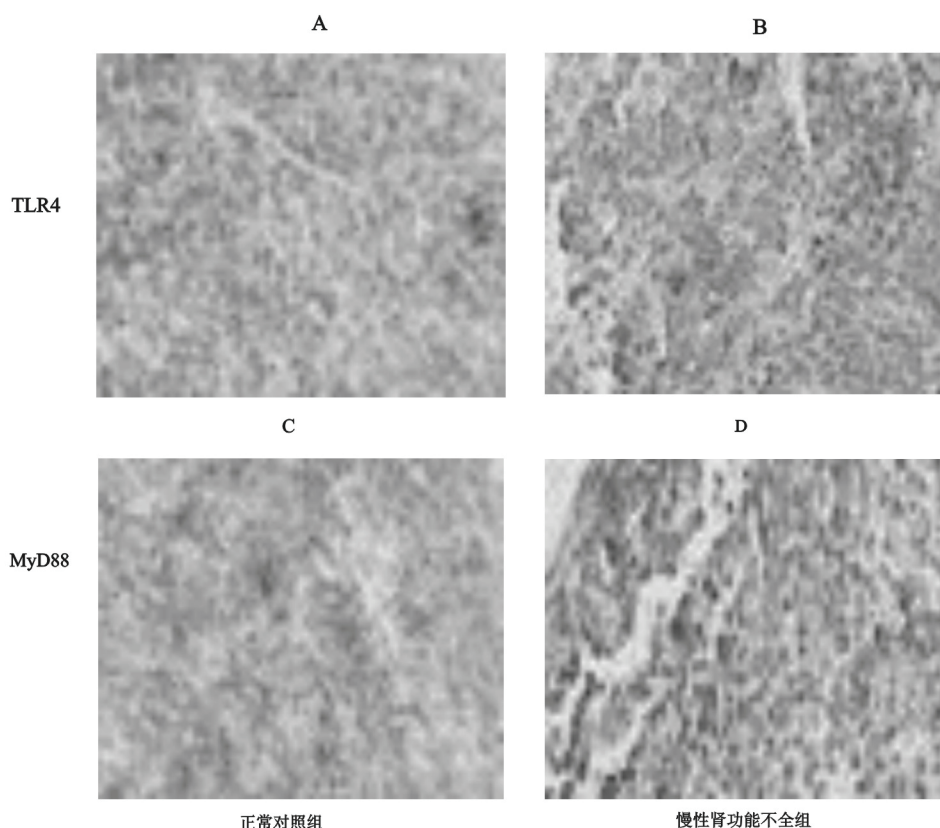
2.2 大鼠模型中 TLR4 及 MyD88 的表达情况 处死慢性肾功能不全大鼠,分离肾脏组织提取 RNA, RT-PCR 结果显示,TLR4 及 MyD88 的 mRNA 表达明显高于正常对照组;Western Blot 结果显示肾脏中 TLR4 及 MyD88 的蛋白表达量同样高于正常对照组(图 2),差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 BUN, CRE 的浓度检测结果 见表 1。经 Beckman 全自动生化分析仪检测大鼠血清后发现,TLR4 阻断组 BUN 及 CRE 浓度较 TLR4 未阻断组均有明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 大鼠血清中尿素及肌酐的表达情况($\bar{x} \pm s$)

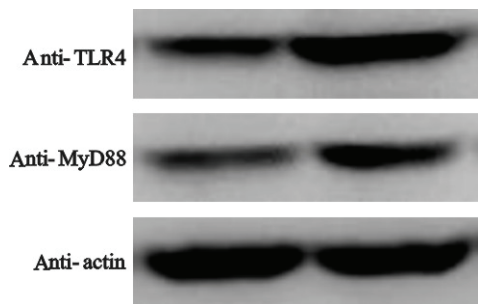
项 目	IgG 对照	TLR4 未阻断组	TLR4 阻断组	t	P
血尿素氮(mol/L)	26.33 ± 3.77	23.33 ± 4.62	$15.65 \pm 1.97^*$	2.887	0.045
血肌酐($\mu\text{mol/L}$)	809.51 ± 94.19	789.51 ± 98.17	$523.89 \pm 52.67^*$	4.125	0.015

注:*表示 TLR4 阻断组与未阻断组及 IgG 对照组相比 $P < 0.05$ 。



A. TLR4 在正常肾脏组织中的表达($\times 400$); B. TLR4 在慢性肾功能不全患者肾脏组织中的表达($\times 400$); C. MyD88 在正常肾脏组织中的表达($\times 400$); D. MyD88 在慢性肾功能不全患者肾脏组织中的表达($\times 400$)

图1 TLR4 及 MyD88 在慢性肾功能不全患者肾脏组织中的表达情况



* 与正常对照组比较, $P < 0.05$ 。

图2 Western Blot 检测 TLR4 及 MyD88 蛋白的表达情况

3 讨论 TLR4 是 TLRs 家族中重要的一员, 是免疫反应重要的调节因子。TLR4 的组织分布较广泛, 主要分布于单核细胞、中性粒细胞、树突状细胞、心肌细胞及内皮细胞等。另外, 在肾脏中 TLR4 的表达也非常丰富^[3]。与 TLR4 结合的配体除了主要配体, 即革兰阴性细菌脂多糖以外, 其他分子如 HSP60、氧化性低密度脂蛋白等都可以与 TLRs 结合。越来越多的证据证明 TLR4 不仅在感染中引起免疫反应而且在一些非感染性炎症疾病(如: 动脉粥样硬化、炎性肠病等)中起重要作用^[4]。TLR4 信号转导通路是重要的炎症通路之一, 与多种疾病的发生发展密切相关。TLR4 介导胞内信号传递涉及不同的蛋白分子, 主要由

MyD88, TRAF6, NF- κ B 等, 最终导致炎症因子的表达与释放。而下游炎症信号的级联式反应常导致疾病转归不良, 因此阻断或抑制 TLR4 信号通路各个节点也是目前临床应用研究的热点。已知的与 TLR4 密切相关的疾病主要有脓毒症、动脉粥样硬化、缺血性再灌注损伤。而肾脏和心血管有着重要的相互协调作用, 慢性肾功能不全通常会因代谢废物的滞留和贫血等因素而引起心功能的损伤^[5], 那么 TLR4 在慢性肾功能不全中会发挥什么作用呢?

TLR4 介导的信号通路主要包括 MyD88 依赖性途径和 MyD88 非依赖性途径。其中, TLR4/MyD88 信号途径及相关蛋白在肾功能不全的发病过程中起着重要的作用。对缺陷型 MyD88 模型鼠进行捆扎盲肠并使其盲肠穿孔的研究中表明, 经过处理的模型鼠并没有发生急性肾衰竭^[6]。因此, 我们推断 TLR4/MyD88 信号系统蛋白在肾功能衰竭的发生发展中可能发挥着重要作用。本研究通过选取临床慢性肾功能不全患者肾脏组织, 并进行免疫组化分析发现 TLR4 及 MyD88 蛋白的表达明显升高。由此分析, 在肾脏损伤过程中, 死亡的肾细胞释放细胞内的分子, 刺激免 (下转 68 页)

- 2015,23(5):452-456.
- [5] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2013年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2014, 88(7): 26-89.
- Diabetes branch of the Chinese Medical Association. Chinese type 2 diabetes prevention and control guide (2013 Edition) [J]. Chinese Journal of Diabetes, 2014, 88(7): 26-89.
- [6] 郑姜钦, 马 坤, 吕绍光. 2型糖尿病中医辨证与胰岛素抵抗的关系[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(8): 1318-1320.
- Zheng JQ, Ma K, Lü SG. Relationship between TCM syndrome differentiation and insulin resistance of type 2 diabetes [J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2010, 25(8): 1318-1320.
- [7] 郭 玫, 李红梅, 刘 瑛. 对新诊断2型糖尿病患者合并脂代谢异常及非酒精性脂肪肝的探讨[J]. 中国糖尿病杂志 2013, 21(3): 229-231.
- Guo M, Li HM, Lui Y. Study on the newly T2DM patients with lipometabolism disturbance and fatty liver [J]. Chinese Journal of Diabetes, 2013, 21(3): 229-231.
- [8] Toro R, Segura E, Nunez-Cortes JM, et al. Relationship between lipoprotein(a) and micro/macro complications in type 2 diabetes mellitus: a forgotten target [J]. Journal of Genetric Cardiology, 2015, 12(2): 93-99.
- [9] Zhang Y, Li S, Xu RX, et al. Systemic inflammatory markers are closely associated with atherogenic lipoprotein subfractions in patients undergoing coronary angiography [J]. Mediators Inflamm, 2015 (2015): 235742.
- [10] Bellentani S, Marino M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. Ann Hepatol, 2009, 8(suppl 1): S4-S8.
- [11] Kaur S, Singh P, Indu V, et al. Fibrinogen, Lp(a), microalbuminuria and left ventricular mass index: cardiovascular disease risk factors in diabetes [J]. Indian J Clin Biochem, 2012, 27(1): 94-96.
- [12] 王 莹, 王 懿, 李卓成. 糖尿病肾病患者BNP, HCY和cTnI的变化与其发生心血管疾病的关系 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(5): 555-559.
- Wang Y, Wang Y, Li ZC. The relationship between the changes of BNP, HCY and cTnI in patients with diabetic nephropathy and their cardiovascular diseases [J]. Internations Journal of Laboratory Medicine, 2011, 32(5): 555-559.

收稿日期: 2015-12-18

修回日期: 2016-03-14

(上接64页)免疫细胞分泌促炎细胞因子, 进一步激活TLR4/MyD88信号, 从而加重肾脏炎症的发生。接下来, 通过制备慢性肾功能衰竭的大鼠模型进一步验证, 发现肾功能不全的大鼠, 肾脏组织中TLR4和MyD88表达确有增高, 并且阻断大鼠TLR4/MyD88信号通路后发现, 血清中的尿素氮和肌酐明显降低。由此证明, TLR4/MyD88蛋白在慢性肾功能衰竭的发展过程中起着重要作用, 加速了疾病的进展。

综合以上分析, 慢性肾功能衰竭患者高表达的TLR4/MyD88分子进一步加重了肾损伤, 此研究将为有效抑制组织损伤后的免疫病理过程奠定基础。

参考文献:

- [1] 周 颖, 张建荣. TLR4信号转导途径在大鼠系膜增生性肾小球肾炎的作用机制探讨[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(6): 117-120.
- Zhou Y, Zhang JR. The significance of Toll-like receptor 4 signaling pathway during rat mesangial proliferative glomerulonephritis [J]. Chinese Journal of Clinicians (Electronic Edition), 2013, 7(6): 117-120.
- [2] 孙凤杰, 董文斌. TLR4/MyD88信号通路与肾脏疾病相关性的研究进展[J]. 泸州医学院学报, 2010, 33(1): 100-102.
- Sun FJ, Dong WB. The progression of correlation of TLR4/MyD88 signal pathway and kidney disease [J]. Journal of Luzhou Medical College, 2010, 33(1): 100-102.
- [3] 李 静, 王爱忠. Toll样受体4信号通路与非感染性炎症疾病的关系[J]. 医学综述, 2014, 20(20): 3686-3688.
- Li J, Wang AZ. Relationship between Toll-like receptor 4 signaling path and non-infectious inflammation diseases [J]. Medical Recapitulate, 2014, 20(20): 3686-3688.
- [4] 余晓东, 邓显忠, 姜 果, 等. TLR4和NF- κ B p50在肾缺血再灌注损伤中的表达及意义[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(5): 557-559.
- Yu XD, Deng XZ, Jiang G, et al. Expression of TLR4 and NF- κ Bp50 in renal ischemia-reperfusion injury and their significance [J]. Journal of Chongqing Medical University, 2011, 36(5): 557-559.
- [5] 刘远智, 李卓成, 黄春秀, 等. 慢性肾功能不全与B型钠尿肽的相关性分析[J]. 海南医学, 2011, 22(1): 99-100.
- Liu YZ, Li ZC, Huang CX, et al. Correlation between chronic renal failure and BNP [J]. Hainan Medicine Journal, 2011, 22(1): 99-100.
- [6] Dear JW, Yasuda H, Hu X, et al. Sepsis-induced organ failure is mediated by different pathways in the kidney and liver: acute renal failure is dependent on MyD88 but not renal cell apoptosis [J]. Kidney Int, 2006, 69(5): 832-836.

收稿日期: 2015-08-16

修回日期: 2016-01-27