论著

文章编号:1000-5404(2007)10-0948-03

人尿路上皮细胞TLR2和TLR4分布情况研究

徐华超[1],卢根生[1]张庆华[2] ([1]第三军医大学西南医院全军泌尿外科中心,重庆 400038;[2]解放军150医院泌尿外科,洛阳 471000)

提 要:目的 探讨Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)2和4在人尿路上皮细胞中的表达情况。**方法** 体外培养人肾小管、肾盂、输尿管和膀胱上皮细胞,提取总RNA,采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定不同部位的含量。**结果** 肾小管、肾盂、输尿管和膀胱上皮细胞TLR2的相对表达量分别为0.326、0.589、0.602、0.735,而TLR4的相对表达量分别为0.223、0.327、0.379、0.365,所有部位尿路上皮细胞中TLR2含量显著高于TLR4($P<0.05$),肾小管上皮细胞TLR2、TLR4含量显著低于其余各组($P<0.05$)。**结论** 人尿路上皮细胞中TLR2和TLR4均有表达,尿路感染致病菌分布量可能与TLR亚型表达情况有关。

关键词: 上皮细胞;Toll样受体;尿路感染

中图法分类号: R322.6;R345;R691.3 **文献标识码:** A

Distribution of Toll-like receptor 2 and 4 in human urinary tract

XU Hua-chao[1], LU Gen-sheng[1], ZHANG Qing-hua[2] ([1]Urinary Surgery Research Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Urinary Surgery, No. 150 Hospital of PLA, Luoyang 471000, China)

Abstract: Objective To study the mRNA expression of Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 in human urinary tract epithelium. Methods The epithelial cells of nephric tubule, pelvis, ureter and bladder were cultured *in vitro*, and their mRNA expressions of TLR2 and TLR4 were measured by RT-PCR. Results The mRNA expression of TLR2 in nephric tubule, pelvis, ureter and bladder was 0.326, 0.589, 0.602 and 0.735, and that of TLR4 was 0.223, 0.327, 0.379, 0.365, respectively. The mean TLR2 mRNA copy was significantly higher than TLR4 in each tissue ($P<0.05$). The expression of TLR2 and TLR4 in nephric tubule was significantly lower than other tissues ($P<0.05$). Conclusion That TLR2 and TLR4 both expressed in human urinary tract epithelium is probably associated with the distribution of uropathogenic bacteria.

Key words: epithelium; toll-like receptor; urinary tract infection

尿路感染是泌尿外科最常见的疾病之一,Maskell估计约50%的女性有过尿路感染。当今抗菌药物研究迅猛发展,品种不断更新换代,泌尿道感染的发病率仍居高不下,其中一重要原因就是尿路感染的发病机制仍不十分清楚,尤其是宿主对病原体的识别及信号传导机制不清。最新研究显示Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)不仅与致病菌的识别有关,而且与天然免疫激活有密切关系[1]。TLR通过不同的亚型来识别不同的病原体,并通过MyD88等途径激活机体的免疫系统清除病原体[2]。本研究就人尿路上皮细胞的TLR2和TLR4分布进行探讨。

作者简介: 徐华超(1980-),男,湖北省襄樊市人,硕士研究生,助教,主要从事泌尿道感染方面的研究。电话:(023)68765841

通讯作者: 卢根生,电话:(023)68765841

收稿日期: 2006-12-18;**修回日期:** 2007-01-26

1 材料与方法

1.1 尿路上皮细胞的获取

1.1.1 肾小管上皮细胞的分离 取因肾肿瘤行肾全切术后非病变部位肾皮质1 cm×1 cm×1 cm,浸入4 ℃无血清DMEM/F12培养基中于1 h内送入实验室,除去肾外包膜,用含青、链霉素的无血清培养基漂洗3次,置于培养皿上(25 ℃),分离、剪碎肾皮质,然后放入80目不锈钢网筛上研磨并用无血清培养基充分冲洗过滤,滤液于100目不锈钢网筛收集,将收集物置于离心管内,充分吹打后离心(1 000 r/min, 10 min)[3]。离心后弃上清液,加入0.5 mg/ml的Ⅰ型胶原酶,37 ℃作用15~30 min,离心(1 500 r/min,5 min)备用。

1.1.2 肾盂、输尿管、膀胱上皮细胞的分离 取因肾、膀胱肿瘤术后的肾盂、输尿管和膀胱非病变上皮组织,浸入4 ℃无血清DMEM/F12培养基中于1 h内送入实验室,用含青、链霉素的无血清培养基漂洗3次,再将组织块上皮层贴于培养皿上(25 ℃),加入0.5 mg/ml的Ⅰ型胶原酶,37 ℃作用15~

30 min，用手术刀片轻轻刮下上皮细胞，收集细胞悬液离心（1 500 r/min，5 min）备用。

1.2　主要培养用液的配制

1.2.1　培养基的配制　　以 DMEM/F12（1∶1）为基础培养基（Hyclone 公司），添加 10% 的优质胎牛血清（Hyclone 公司），100 U/ml 青霉素，100 μg/ml 链霉素，0.22 μm 滤膜过滤除菌，pH 调至 7.2～7.4。

1.2.2　胶原酶的配制　　50 mg Ⅰ型胶原酶（Sigma 公司）溶入 100 ml 上述培养基中，磁力搅拌器搅拌 30 min，0.22 μm 滤膜过滤除菌，pH 调至 7.2～7.4。

1.3　培养与观察

离心收集的细胞弃上清后加入含 10% 胎牛血清的培养基 5 ml 充分吹打混匀后计数，按 10^5～10^6/ml 接种培养瓶，放入 37 ℃、5% CO_2 的孵箱内培养。

1.4　培养细胞的鉴定

用免疫组化法进行鉴定。一抗用小鼠抗人角蛋白 PCK（博士德公司），二抗用羊抗鼠（晶美公司），用 SABC 法进行染色鉴定，同时取 1 组不加一抗进行对照，免疫染色后用苏木精进行核复染。

1.5　提取总 RNA

取第 3 代上皮细胞用 TRNzol 提取出总 RNA（Promega 公司），再用 MMV 进行逆转录出 cDNA，采用半定量逆转录-聚合酶链反应（RT-PCR）测定 TLR2 和 TLR4 的 mRNA 的表达，以 β-action 作为内参对照（以上 RT-PCR 试剂均采用天为时代公司产品）。引物设计如表 1 所示，扩增产物经质量分数为 1.6% 的琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像仪（Gel Dos 2000™）上照相，用 Quantity One 凝胶图像扫描分析软件进行密度扫描，测定 TLR2、TLR4 与 β-action 基因扩增产物的灰度值比值（A 值）表示 mRNA 的相对含量。

表 1　RT-PCR 引物设计

基因	上游引物	下游引物	片段长度
β-action	5′-CGTGGACATCCGCAAAGA-3′	5′-CTCGCTCCAACCGACTGCT-3′	455 bp
TLR2	5′-TGTCTTCATAAGCGGGACTTCATT-3′	5′-CTCCAGGTAGGTCTTGGTGTTCATT-3′	273 bp
TLR4	5′-AGAGCCGCTGGTGTATCTTTGA-3′	5′-TGGGTTCCTTGACTGAGTTGGTT-3′	534 bp

1.6　统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　细胞原代培养

原代细胞培养 24 h 后发现细胞开始贴壁生长，48 h 后可见细胞呈“岛”状生长，细胞形态呈多边鹅卵石样，体积较大，镜下透明度及折光性强，各细胞互相紧密衔接，第 12～14 天细胞完全铺满瓶底，可顺次传代，收集第 3 代细胞进行实验。

2.2　免疫组化鉴定

培养细胞角蛋白染色阳性，细胞质呈棕黄色，细胞核复染呈蓝色，对照组细胞质不着色（图 1）。

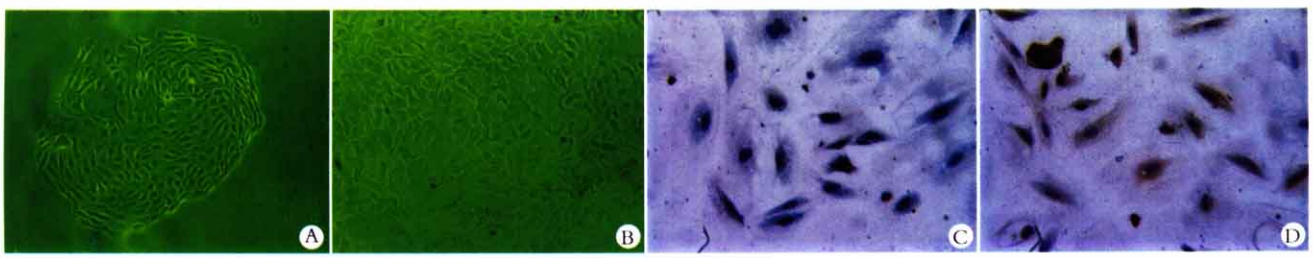
2.3　TLR2 和 TLR4 mRNA 的表达情况

肾小管、肾盂、输尿管和膀胱上皮细胞中 TLR2 和 TLR4 均有表达，且 TLR2 比 TLR4 基因表达量高（表 2，图 2）。

表 2　尿路上皮细胞 mRNA 表达结果分析

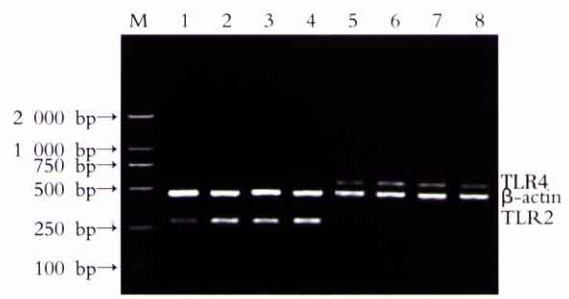
	组数	TLR2/β-actin（A 值）	TLR4/β-actin（A 值）
肾小管	5	0.326 ± 0.052[a]	0.223 ± 0.061
肾盂	5	0.589 ± 0.068[ab]	0.327 ± 0.056[b]
输尿管	5	0.602 ± 0.088[ab]	0.379 ± 0.043[b]
膀胱	5	0.735 ± 0.047[ab]	0.365 ± 0.051[b]

a：$P<0.05$，与 TLR4 组比较；b：$P<0.05$，与肾小管组比较



A：肾小管上皮细胞（倒置显微镜 ×100）；B：膀胱上皮细胞（倒置显微镜 ×100）；C：肾小管上皮细胞免疫组化对照组（未加一抗）（SABC × 250）；D：肾小管上皮细胞免疫组化实验组（SABC ×250）

图 1　尿路上皮细胞培养及鉴定



M：标准；1，5：肾小管组；2，6：肾盂组；3，7：输尿管组；4，8：膀胱组

图 2　尿路上皮细胞 RT-PCR 电泳图

3　讨论

Toll 受体最早是在研究果蝇时发现的，它能识别入侵的病原菌并能促使果蝇分泌相应的多肽抗生素 drosomycin 以清除病原体。由于果蝇不具备获得性免疫的能力，故 Toll 受体介导的先天性免疫显得尤为重要。1997 年 Medzhitov 等首次发现了存在于人细胞表面的与果蝇同源的 Toll 样蛋白，称为 Toll 样受体，并发现它对机体免疫，特别是感染性免疫有着重要意义。

随着研究的深入，人们陆续发现 TLR 的 11 种亚型[4]，分别为 TLR1～11，形成了 TLR 家族。

临床上，尿路感染的高发病率及复杂性尿路感染的疗效差一直困扰着泌尿外科医生。研究显示不同类型的 TLR 可以识别不同的病原体，激活机体的防御机制，从而启动特异性免疫反应，抵抗病菌入侵，它既是天然免疫的门控蛋白，也是联系天然免疫和获得性免疫的桥梁。在 TLR 家族中，TLR2 和 TLR4 分别对 G^+ 和 G^- 菌所致机体感染的天然免疫有重要作用[5,6]，TLR2 分布在细胞表面，通过激活不同的信号传导通路，识别 G^+ 菌的肽聚糖、脂多肽（lipopeptides）和脂蛋白。TLR4 是脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）受体复合物的一个非常重要的成分，是对 G^- 菌的一个重要的“侦察”部分。在 TLR 识别病原体后，通过 TIR 区域（Toll/IL-1 receptor）向胞内传递信号，激活 c-Jun N-端蛋白激酶（JNK）和核转录因子 κB（NF-κB）等转录因子，引起多种炎性细胞因子和化学因子的释放，如 IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-18 和 TNF-α，而 IL-1、IL-6 和 IL-8 能激活并驱使单核/巨噬细胞、中性粒细胞、NK 细胞到达炎症部位，从而消灭病原体。

在我国，引起尿路感染最常见的致病菌为尿路致病性大肠杆菌（uropathogenic *Escherichia coli*，UPEC），其次为变形杆菌、克雷白杆菌、葡萄球菌等，其中，G^- 引起的约占 70%，而 G^+ 引起的只有 20% 左右[7]。研究显示 TLR2 和 TLR4 对这些致病菌的监控与免疫启动有着重要的作用，Tsuboi 等[8]发现从 TLR4 基因突变小鼠体内分离的肾小管上皮细胞，在受到 *E. coli.* 的 LPS 刺激后，缺失细胞因子 CC 的表达，对病原体的反应性降低。在肾盂肾炎时，研究者通过 TLR4 突变鼠和野生鼠之间骨髓交叉移植制造了一新动物模型[9]，发现在 UPEC 感染后，缺乏功能性 TLR4 小鼠的肾实质细胞不能募集中性粒细胞。这些小鼠中，不易形成肾脓肿，但在肾内有很多 UPEC 菌团。类似的研究说明了下尿路感染中膀胱上皮细胞 TLR4 也有此作用[10]。以上说明机体中功能性 TLR 的表达对防御病原体的入侵具有重要作用。本研究表明尿路上皮层中 TLR4 的含量显著低于 TLR2，在一定程度上使得 G^- 更容易侵入并引起尿路感染，而肾小管上皮细胞中 TLR2 和 TLR4 的表达显著低于其余各组，这也使得细菌更容易侵袭并滞留于肾组织，对肾脏造成更大的损害。

TLR2 和 TLR4 在尿路感染方面的研究主要集中在动物实验水平上，但是动物与人 TLR 的同源性和分布都有较明显差异，例如人和小鼠的 TLR4 胞质区 83% 相同，而胞外区仅有 53% 相同。并且基因突变也会使 TLR 的生物学效应发生变化，如 Arbour 等[11]研究发现在人呼吸道上 TLR4 基因突变使得人体对吸入的 LPS 反应性明显降低。

目前尚没有 TLR 在人尿路上皮分布情况的报道，也没有 TLR 在人体抗尿路感染机制中的作用研究。本研究显示在整个尿路上皮均表达了 TLR2 和 TLR4，但它们的表达量有显著差异，TLR2 表达量显著高于 TLR4 表达量，这是否与尿路感染致病菌中 G^- 显著多于 G^+ 有关，我们将继续进行研究。

参考文献：

[1] Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity [J]. Microbes Infect, 2004, 6(15): 1382－1387.

[2] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors [J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 335－376.

[3] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养[M]. 西安：世界图书出版公司，2004：143－144.

[4] Zhang D, Zhang G, Hayden M S, *et al*. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria [J]. Science, 2004, 303(5663): 1522－1526.

[5] Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, *et al*. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2 [J]. J Biol Chem, 1999, 274(25): 17406－17409.

[6] Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, *et al*. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components [J]. Immunity, 1999, 11(4): 443－451.

[7] 吴阶平. 吴阶平泌尿外科学[M]. 济南：山东科学技术出版社，2004：551－563.

[8] Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, *et al*. Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells [J]. J Immunol, 2002, 169(4): 2026－2033.

[9] Patole P S, Schubert S, Hildinger K, *et al*. Toll-like receptor-4: renal cells and bone marrow cells signal for neutrophil recruitment during pyelonephritis [J]. Kidney Int, 2005, 68(6): 2582－2587.

[10] Schilling J D, Martin S M, Hung C S, *et al*. Toll-like receptor 4 on stromal and hematopoietic cells mediates innate resistance to uropathogenic *Escherichia coli*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(7): 4203－4208.

[11] Arbour N C, Lorenz E, Schutte B C, *et al*. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans [J]. Nat Genet, 2000, 25(2): 187－191.

（编辑 张大春）