基础研究 文章编号：0253-3626（2011）05-0557-03

TLR4和NF-κBp50在肾缺血再灌注损伤中的表达及意义

余晓东，邓显忠，姜 果，廖 波，朱平宇，鲁栋梁，唐铁龙，杨雪松，陈双全，程树林
（川北医学院附属医院泌尿外科，南充 637000）

【摘 要】目的：观察大鼠肾缺血再灌注后 Toll 样受体 4（Toll-like receptors 4，TLR4）和细胞核因子 kappa B（Nuclear factor kappa B，NF-κB）p50 蛋白的表达情况，探讨它们参与肾缺血再灌注损伤的作用机理。方法：SD 雄性大鼠 48 只随机分为对照组（Control 组，简称 C 组）、缺血再灌注组（Ischemia-reperfusion 组，简称 Ir 组）2 个实验组，每组各 4 个时相（6、12、24、72 h）。采用切除右肾，夹闭左肾动脉 45 min 后恢复灌流建立肾缺血再灌注损伤模型。免疫组化二步法检测大鼠肾组织中 TLR4 和 NF-κBp50 蛋白的表达情况，测定髓过氧化物酶（Myeloperoxidase，Mpo）活性及血清肌酐（Serum creatinine，Scr）水平以反映中性粒细胞活化及肾功能损害的程度。结果：TLR4 和 NF-κBp50 蛋白在 C 组中几乎无表达，Ir 组中表达明显增强（$P<0.01$）。与 C 组比较，Ir 组 Scr 水平明显升高，Mpo 活性显著增加（$P<0.01$）。结论：肾缺血再灌注损伤的发生可能与 TLR4 活化 NF-κB 诱导的炎症反应有关。

【关键词】Toll 样受体；Toll 样受体 4；细胞核因子 kappa B；缺血再灌注损伤
【中国图书分类法分类号】R691.5 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-10-27

Expression of TLR4 and NF-κBp50 in renal ischemia-reperfusion injury and their significance

YU Xiao-dong, DENG Xian-zhong, JIANG Guo, LIAO Bo, ZHU Ping-yu, LU Dong-liang, TANG Tie-long, YANG Xue-song, CHEN Shuang-quan, CHENG Shu-lin
(*Department of Urology, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of TLR4 protein and NF-κBp50 protein after renal ischemia-reperfusion and study their significance in renal ischemia-reperfusion injury. *Methods*: 48 normal male Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: control group (C group) and ischemia-reperfusion group (Ir group). The renal ischemia-reperfusion injury model was established by clamping the left renal artery for 45 min and reperfusion for 6, 12, 24 h and 72 h, then the right kidneys were removed before clamping left renal vessels. Two-step immunohistochemical methods were used to detect the changes in the expression of TLR4 protein and NF-κBp50 protein. Myeloperoxidase (Mpo) activity and serum creatinine (Scr) levels were determined, which reflected neutrophil activation and kidney dysfunction. *Results*: The Mpo activity and the Scr levels were increased remarkably in Ir group, as compared with C group ($P<0.01$). The expression of TLR4 protein and NF-κBp50 protein were gradually increased with the progress of ischemia-reperfusion ($P<0.01$). *Conclusion*: The occurrence of renal ischemia-reperfusion injury may correlate with the inflammatory response induced by TLR4 activating NF-κB.

【Key words】 Toll-like receptors; Toll-like receptor 4; nuclear factor kappa B; ischemia-reperfusion injury

Toll样受体（Toll-like receptors，TLRs）是先天性免疫系统中的细胞跨膜受体及病原模式识别受体之一，在急性炎症反应的调节和细胞信号传导及细胞凋亡中起重要作用[1]。Toll样受体 4（Toll-like receptor 4，TLR4）是发现最早，研究最多的 Toll 样受体，其信号通路激活后能启动多种炎症因子的转录和合成，与炎症因子的产生密切相关[2]。而细胞核因子kappa B（Nuclear factor kappa B，NF-κB）广泛存在于多种细胞和病毒中，在免疫、应激反应、炎症和细胞凋亡等方面同样具有重要作用[3]。本文研究缺血再灌注后 TLR4 和 NF-κBp50 蛋白的表达情况及相互关系，探讨它们参与肾缺血再灌注损伤的作用机理。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

TLR4 兔抗大鼠多克隆抗体（武汉博士德，BA1717）；兔抗大鼠 NF-κBp50 多克隆抗体（SC-114）（SANTA CRUZ BIOTECH-

作者介绍：余晓东（1975-），男，讲师，硕士，研究方向：器官移植。
通信作者：邓显忠，男，副主任医师，Email：dengxz63@sina.com。

NOLOGY);PV6001 二步法免疫组化试剂盒(北京中杉);Mpo 试剂盒(南京建成)。

1.2 实验动物与分组

选用健康雄性 SD 大鼠 48 只,体重 220~260 g。随机分成对照组(C 组)、缺血再灌注组(Ir 组)2 组,每组 24 只动物,每组又按时相不同随机分为 6、12、24、72 h 4 个亚组,每个亚组 6 只动物。

1.3 动物模型建立与标本采集

参照文献[4,5]建立动物模型,3%的水合氯醛(10 ml/kg)腹腔注射麻醉,作腹部正中切口,切除右肾,分离左肾动脉,用无创动脉夹夹闭 45 min 后恢复灌流,肾脏由暗红色变为鲜红色,表明再灌注成功。C 组开腹后切除右肾,分离左肾动脉,但不夹闭左肾动脉。于再灌注后 6、12、24、72 h 处死动物,处死前下腔静脉采血 2 ml,切除左肾,取约 2 mm 厚肾组织于 4%多聚甲醛中保存,剩余组织冻存于 -70℃冰箱中。

1.4 方法

静脉采血检测血清肌酐(Serum creatinine,Scr)水平反映肾功能损害程度;取左侧肾脏皮髓质各 100 mg,配成 10%的组织匀浆,然后按照髓过氧化物酶(Myeloperoxidase,Mpo)检测试剂盒说明书进行操作,检测肾组织中 Mpo 活性反映中性粒细胞活化程度;取上述石蜡切片,常规二甲苯脱腊,梯度酒精入水后,采用免疫组化 PV6001 二步法检测大鼠肾脏组织中 TLR4 和 NF-κBp50 蛋白表达情况,每张切片在 10×40 倍光镜下随机选取 10 个视野,用图像采集系统将图像输入计算机,应用 Olympus BX14 型生物医学图像分析系统进行人工分析,不计染色强度,对每个高倍镜视野分别进行阳性细胞计数并计算阳性细胞数的平均值以反映阳性表达的强度。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行结果分析，所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数比较采用单因素方差分析或秩和检验,两两比较采用 *SNK-q* 检验或 t' 检验,相关性采用 Pearson 相关分析,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 肾缺血再灌注后 2 组各时相 Scr 水平的变化

与 C 组比较,Ir 组 Scr 水平于再灌注后 6 h 开始升高,24 h 达到峰值,72 h 后已下降($P<0.01$),结果见表 1。

2.2 肾缺血再灌注后 2 组各时相肾组织中 Mpo 活性的变化

与 C 组比较,Ir 组随再灌注时间延长,肾组织 Mpo 活性逐渐增强,24 h 达高峰,以后降低($P<0.01$),结果见表 2。

2.3 肾缺血再灌注后 2 组各时相肾组织中 TLR4 蛋白的表达

C 组中 TLR4 蛋白几乎无表达;Ir 组中 TLR4 蛋白再灌注后 6 h 表达明显增强,24 h 达到峰值,与 C 组比较差异具有统计学意义($P<0.01$),结果见表 3。

2.4 肾缺血再灌注后 2 组各时相肾组织中 NF-κBp50 蛋白的表达

C 组中 NF-κBp50 蛋白几乎无表达;Ir 组中 NF-κBp50 蛋白再灌注后 6 h 表达明显增强,24 h 达到峰值,与 C 组比较差异具有统计学意义($P<0.01$),结果见表 4。

2.5 缺血再灌注组 TLR4 蛋白表达水平、NF-κBp50 蛋白表达水平、Mpo 活性、Scr 水平的相关性分析

TLR4 蛋白表达水平与 NF-κBp50 蛋白表达水平、Scr 水平和 Mpo 活性呈显著性正相关关系($r=0.865$,$P<0.01$;$r=0.828$,$P<0.01$;$r=0.684$,$P<0.01$);NF-κBp50 蛋白表达水平与 Scr 水平和 Mpo 活性呈显著性正相关关系($r=0.836$,$P<0.01$;$r=0.655$,$P<0.01$);Mpo 活性与 Scr 水平呈显著性正相关关系($r=0.652$,$P<0.01$)。

表 1 大鼠肾缺血再灌注后 2 组各时相 Scr 水平的变化(μmol/L)

组别	6 h	12 h	24 h	72 h
C组	40.33 ± 8.76	42.50 ± 7.42	40.67 ± 6.35	38.83 ± 3.54
Ir组	106.33 ± 12.74#①	165.33 ± 19.19#②	201.33 ± 21.52#③	90.17 ± 15.87#④

注:#,与 C 组对应时间点比较,$P<0.01$;①与④比较 $P>0.05$,其余时间亚组间比较,$P<0.01$

表 2 大鼠肾缺血再灌注后 2 组各时相肾组织中 Mpo 活性的变化(单位/g 湿片)

组别	6 h	12 h	24 h	72 h
C组	0.331 ± 0.067	0.329 ± 0.045	0.327 ± 0.053	0.321 ± 0.058
Ir组	0.539 ± 0.081#①	0.646 ± 0.092#②	0.767 ± 0.102#③	0.528 ± 0.072#④

注:#,与 C 组对应时间点比较,$P<0.01$;①与④比较 $P>0.05$,其余时间亚组间比较,$P<0.05$

表 3 TLR4 蛋白表达强度变化统计表(阳性细胞数)

组别	6 h	12 h	24 h	72 h
C组	0.88 ± 0.40	1.00 ± 0.33	1.17 ± 0.61	1.00 ± 0.29
Ir组	88.28 ± 25.28#①	142.45 ± 27.59#②	185.95 ± 27.38#③	50.02 ± 12.00#④

注:#,与 C 组对应时间点比较,$P<0.01$;各时间亚组间比较,$P<0.05$

表 4 NF-κBp50 蛋白表达强度变化统计表(阳性细胞数)

组别	6 h	12 h	24 h	72 h
C组	1.17 ± 0.56	1.25 ± 0.65	1.30 ± 0.66	1.23 ± 0.83
Ir组	79.45 ± 15.72#①	132.77 ± 35.39#②	180.42 ± 42.49#③	43.35 ± 12.31#④

注:#,与 C 组对应时间点比较,$P<0.01$;各时间亚组间比较,$P<0.05$

3 讨 论

缺血再灌注损伤的发生机制目前尚未完全阐明，根据大量实验与临床研究发现，虽然再灌注损伤主要与氧自由基损伤及钙超载有关，但是炎症因子链式释放和中性粒细胞活化在发病过程中可能起重要的作用。本实验发现，Ir 组中，反映中性粒细胞活化程度的 Mpo 活性明显增强，与升高的 Scr 水平呈显著性正相关关系（$r=0.652$，$P<0.01$）。表明中性粒细胞活化程度与肾功能变化密切相关，中性粒细胞活化可能对肾功能损害具有促进作用。有学者认为，中性粒细胞对肾组织灌注呈负性影响，增加肾血管阻力，降低肾小球滤过率，甚至可能引起无复流现象，使肾组织进一步缺血。同时中性粒细胞本身也被激活，引起代谢爆发，氧耗量突增，产生大量的氧自由基，使膜的流动性降低和完整性受到破坏，导致组织进一步损伤[6-8]。

有研究表明多种炎症因子介导缺血再灌注后中性粒细胞的活化，而这些炎症因子可受转录因子 NF-κB 的调节[9-11]。本实验发现，C 组中 NF-κBp50 蛋白几乎无表达，Ir 组中 NF-κBp50 蛋白表达于再灌注后 6 h 明显增强，24 h 达到峰值，与 C 组比较差异具有统计学意义（$P<0.01$）。在 Ir 组中，NF-κBp50 蛋白表达水平与 Mpo 活性呈显著性正相关关系（$r=0.655$，$P<0.01$）。缺血再灌注使 NF-κB 活化，进而激活炎症因子和中性粒细胞，造成组织器官的炎症反应[12-14]。因此，NF-κB 间接介导的中性粒细胞活化、浸润是缺血再灌注损伤的关键一步。

NF-κB 的激活是 TLRs 激活的下游事件，而且 TLRs 所激活的细胞内信号正是控制着各种效应基因表达的转录因子 NF-κB[15]。本实验发现，C 组中 TLR4 蛋白几乎无表达，Ir 组中 TLR4 蛋白表达于再灌注后 6 h 明显增强，24 h 达到峰值，与 C 组比较差异具有统计学意义（$P<0.01$）。在 Ir 组中，TLR4 蛋白表达水平与 NF-κBp50 蛋白表达水平呈显著性正相关关系（$r=0.865$，$P<0.01$）。说明 TLR4 蛋白活化对NF-κBp50 蛋白表达可能具有正性影响。Li 和 Coworker 指出缺血再灌注诱导成纤维细胞、巨噬细胞、树状突细胞里 NF-κB 和中性白细胞特异性化学因子基因 KC 和巨噬细胞炎症蛋白 2 的激活，这些效应是通过 TLRs/MyD88-TRAF6 信号途径介导的[16]。活化的 TLRs 细胞内 TIR 区域与衔接蛋白 MyD88 结合，从而激活肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TRAF6)，使有丝分裂原结合蛋白激酶家族活化，促进 NF-κB 转位到细胞核，其活性二聚体启动细胞因子（如 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12 等）和辅助刺激分子 CD80 和 CD86 基因的转录。这是 TLRs 介导活化 NF-κB 所公认的信号通路[17]。

综上，肾缺血再灌注损伤的发生可能与 TLR4 活化 NF-κB 诱导的炎症反应有关，但 TLRs 信号通路错综复杂，其机制有待进一步研究与探索。

参 考 文 献

[1] 周爱民，冯 捷，马慧群，等.Toll 样受体 4 在人体角质形成细胞中的表达[J].中华皮肤科杂志，2004，37（1）：55.

[2] 李曼丽，甘 华.高糖对肾小管上皮细胞 Toll 样受体 4 表达及其信号通路的影响[J].重庆医科大学学报，2010，35（6）：857-859.

[3] Ghosh S，Baltimore D，Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B[J].Nature，1990，344(6267)：678-682.

[4] Nitescu N，Grimberq E，Ricksten S E，et al.Effects of N-acetyl-L-cysteine on renal haemodynamics and function in early ischaemia-reperfusion injury in rats[J].Clin Exp Pharmacol Physiol，2006，33(1-2)：53-57.

[5] Sabbatini M，Santillo M，Pisani A，et al.Inhibition of Ras/ERK1/2 signaling protects against postischemic renal injury[J].Am J Physiol Renal Physiol，2006，290（6）：1408-1415.

[6] Braide M.Leukocyte effects on the vascular resistance and glomerular filtration of the isolate rat kidney at normal and low flow state[J].Cir Shock，1986，20（1）：71-80.

[7] Schmid-Schonbein G M.Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation[J].Federation Proc，1987，46（7）：2397-2401.

[8] Southern P A.Free radical in medicine[J].Mayo Clin Proc，1988，63（4）：390-408.

[9] Sun Z，Andersson R.NF-kappaB activation and inhibition:a review[J].Shock，2002，18（2）：99-106.

[10] Orfila C，Lepert J C，Alric L，et al.Immunohistochemical distribution of activated nuclear factor kappa B and peroxisomeproliferator-activated receptors in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats[J].Histochem Cell Biol，2005，123（6）：585-593.

[11] Karin M.How NF-kappaB is activated:the role of the IkappaB kinase（IKK）complex[J].Oncogene，1999，18（49）：6867-6874.

[12] KarinM.The beginning of the end:I kappaB kinase（IKK）and NF-kappaB activation[J].J Biol Chem，1999，274（39）：27339-27342.

[13] Karin M，Delhase M.The I kappa B kinase（IKK）and NF-kappa B:key elements of proinflammatory signaling[J].Semin Immunol，2000，12（1）：85-98.

[14] Souza D G，Vieira A T，Pinho V，et al.NF-kappaB plays a major role during the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury[J].Br J Pharmacol，2005，145（2）：246-254.

[15] Janeway C A J R.Presidential address to the American Association of Immunologists.The road less traveled by:the role of innate immunity in the adaptive immune response[J].J Immunol，1998，161（2）：539-544.

[16] Li M，Carpio D F，Zheng Y，et al.An essential role of the NF-kappa B/Toll-like receptor pathway in induction of inflammatory and tissue-repair gene expression by necrotic cells[J].J Immunol，2001，166（12）：7128-7135.

[17] Li L，Cousart S，Hu J，et al.Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells[J].J Biol Chem，2000，275（30）：23340-23345.

（责任编辑：冉明会）