基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0857-03

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

李曼丽,甘 华
(重庆医科大学附属第一医院肾内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:通过研究高糖对肾小管上皮细胞 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4,TLR4)表达及其信号通路的影响,初步探讨 TLR4 与高糖促进肾脏细胞分泌炎症因子的关系。方法:小鼠近曲肾小管上皮细胞(MCT 细胞)在高糖环境下培养后,用 Western Blot 分析 TLR4 蛋白的表达,Western Blot 和免疫沉淀法分析 TLR4 与髓样细胞分化因子 88 (Myeloid differentiation factor 88, MyD88)的相互作用,以了解 TLR4 信号通路是否被激活。结果:高糖可使 MCT 细胞 TLR4 蛋白的表达上调,高糖环境下 MyD88 依赖的 TLR4 信号通路被激活。结论:TLR4 与高糖促进肾脏细胞分泌炎症因子有关,TLR4 参与糖尿病肾病的发病。

【关键词】Toll 样受体 4;高葡萄糖;肾小管上皮细胞
【中国图书分类法分类号】R587.24 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-12

Effect of high glucose on the expression of Toll-like receptor 4 and the signal pathway in renal tubular epithelial cells

LI Man-li, et al
(*Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the role of Toll-like receptor 4 in the production of inflammatory factors in renal innate cells stimulated with high glucose by studying the effect of high glucose on the expression of TLR4 and its signal pathway. *Methods*: Western Blot analysis was taken to measure the expression of TLR4, and the combination of Western Blot and immunoprecipitation was used to analyze the correlation of TLR4 with MyD88. *Results*: High glucose upregulated the expression of TLR4 protein and activated MyD88-dependent pathyway in MCT cells. *Conclusion*: TLR4 is involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy by playing a role in the production of inflammatory factors in renal innate cells stimulated with high glucose.

【Key words】Toll-like receptor 4; High glucose; Proximal tubular epithelial cell

Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4,TLR4)是发现最早,研究最多的 Toll 样受体。作为模式识别受体(Pattern recognition receptor,PRR),TLR4 识别的主要病原相关分子模式(Pathogen associated molecular pattern,PAMP)为脂多糖(Lipopolysaccharides,LPS),还能识别内源性配体如热休克蛋白[1,2](Heat shock protein,HSP),硫酸乙酰肝素[3],纤连蛋白额外域 A[4](Extra domain A,EDA)等,其信号通路激活后能启动 CRP,TNF-α,MCP-1 等多种炎症因子的转录和合成,与炎症因子的产生密切相关。

TLR4 有两条信号通路:髓样细胞分化因子 88(Myeloid differentiation factor 88,MyD88)依赖的信号通路及非 MyD88 依赖的信号通路。在 MyD88 依赖的信号通路中,TLR4 识别并结合 PAMP 后,通过其 TIR 区(Toll/IL-1 receptor domain)与 MyD88 结合,依次激活白介素 -1 受体相关激酶(IRAK),肿瘤坏死因子受体相关因子 6(TRAF6),复合膜蛋白转化生长因子相关激酶 1(TAK1),IκB 激酶(IKK)等一系列蛋白酶,导致 NF-κB 转位至细胞核,启动炎症因子的基因表达。TLR4 与 MyD88 结合是 MyD88 依赖的信号通路被激活过程中最早发生的事件。

糖尿病肾病的发病机制复杂,至今尚未阐明。高血糖是导致糖尿病肾病发生的重要的起始因素。许多研究证实[5,6]高糖能促进系膜细胞分泌炎症介质,FY Chow 的研究发现[7],高糖增加 TNR52E 肾小管上皮细胞分泌 MCP-1,丁涵露等[8]报道高糖促进人肾小球内皮细胞表达 MCP-1。目前高糖促进炎症因子表达与 TLR4 及其信号通路关系的研究国内外均未见报道。

本文通过研究高糖环境下肾小管上皮细胞 TLR4 的表达情况及其信号通路有无激活,初步探讨 TLR4 与高糖促进肾脏细胞分泌炎症因子的关系,了解 TLR4 与糖尿病肾病的关系。

作者介绍:李曼丽(1973-),女,博士,主治医师,
研究方向:糖尿病肾病。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

SV-40 永生系小鼠近曲肾小管上皮细胞（MCT），在含 10%FBS 的 DMEM 培养基培养。该培养基中含 5 mmol/L 的葡萄糖，100 U/ml 的青霉素，100 μg/ml 的链霉素。MCT 细胞表达近曲肾小管上皮细胞在体内的性质。细胞生长密度为 80% 时，用无血清 DMEM 培养基培养 16~18 h，之后细胞分为 6 组：(1)对照组：葡萄糖浓度为 5 mmol/L，设立：①对照 1 h 组；②对照 6 h 组；(2)高糖组：葡萄糖浓度为 30 mmol/L，设立③高糖 1 h 组；④高糖 2 h 组；⑤高糖 4 h 组；⑥高糖 6 h 组。处理相应时间后用冷的 PBS 液清洗，-80℃冻存。

1.2 免疫印迹

RIPA 细胞裂解液混合蛋白酶抑制剂后，加入细胞培养皿，离心后获得细胞裂解液。用 BIO-RAD 方法测定细胞裂解液中蛋白质的浓度。电泳前在细胞裂解液中加入加样缓冲液，并在沸水中加热 8 min 使蛋白质变性。取 25 μg 裂解液蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳，转膜后将硝酸纤维素膜置于 5%牛白蛋白/TBST 液 20 min，用 TBST 清洗后，加入一抗（兔抗小鼠-TLR4，Santa Cruz，USA），4℃过夜。TBST 洗 10 min 后，加入荧光素标记的羊抗兔二抗（Rockland，USA），避光室温反应 15 min，TBST 清洗后用 Odyssey 红内线成像系统显影。

1.3 免疫沉淀

取 500 μg 裂解细胞的蛋白质，加入 RIPA 液使最后体积为 500 μl。加入 5 μl 兔抗小鼠 MyD88 抗体，摇盘 4℃，过夜。第 2 d 加入 20 μl 蛋白 G-磁珠，4℃摇盘 1 h。快速离心 15 s，弃上清，用 RIPA 液 400 μl 洗 3 次，PBS 液洗 2 次。最后加入 20 μl 6×加样缓冲液，在沸水中加热 5 min，冷却后离心取上清液 10 μl 做免疫印迹。

1.4 统计学分析

用单因素方差分析比较多个组间的区别，3 次不同的实验结果所得值用均数 ± 标准差表示，全部数据用 SPSS10.0 软件处理。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 高糖对 MCT 细胞 TLR4 蛋白表达的影响

本实验结果显示，高糖刺激下，MCT 细胞 TLR4 表达在 2 h 开始增加，与 1 h 比较，差异具有显著性（$P<0.05$）；在 4 h，MCT 细胞 TLR4 的表达达最高峰，但与 2 h 比较差异无显著性（$P>0.05$）。在 4 h 以后，TLR4 表达逐渐下降，而在 6 h 时，MCT 细胞 TLR4 表达比 2、4 h 的表达明显降低（$P<0.05$）；高糖环境下培养 1 h，MCT 细胞 TLR4 的表达同对照组比较，差异无显著性（$P>0.05$）。同样，高糖环境下培养 6 h，MCT 细胞 TLR4 的表达同对照组比较，差异无显著性（$P>0.05$）。见图 1。

2.2 高糖环境对 MCT 细胞 TLR4 信号通路的影响

MCT 细胞的免疫沉淀和免疫印迹结果表明，高糖刺激 2 h，在经 MyD88 抗体沉淀下来的 MyD88 相互作用蛋白复合物中，检测到 TLR4 蛋白的表达，提示高糖刺激下，TLR4 信号通路被激活。而在高糖刺激 1、4、6 h 组，未能检测到 TLR4 蛋白的表达。对照组也未能检测到 TLR4 蛋白的表达。见图 2。另外两次重复实验结果与此一致。

3 讨 论

有研究报道[9]，高糖刺激使 1 型糖尿病 NOD 鼠骨髓来源的巨噬细胞 TLR4 mRNA 水平表达增加。体内研究发现[10]，糖尿病大鼠肾组织 TLR4 的表达较对照组显著增加。而我们的研究第一次发现，高糖刺激 2 h 及 4 h，MCT 细胞 TLR4 蛋白的表达增加，即高糖环境上调肾小管上皮细胞 TLR4 蛋白的表达。

许多研究表明，TLR4 表达上调后，再用 LPS 刺激，炎症因子的产生进一步增加。2003 年，Monick MM 报道[11]，呼吸道

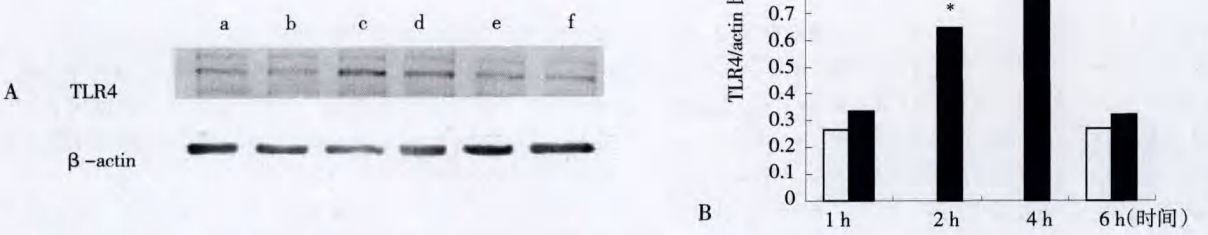
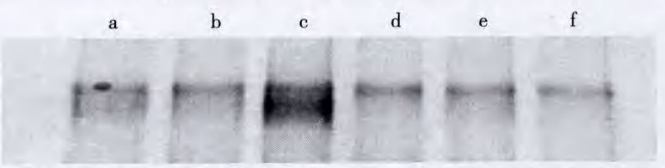


图 A 中，a. 对照 1 h 组；b. 高糖 1 h 组；c. 高糖 2 h 组；d. 高糖 4 h 组；e. 高糖 6 h 组；f. 对照 6 h 组

图 B 中，* 表示与其他无 * 标记组比较 $P<0.05$；■：高糖组；□：对照组

图 1 MCT 细胞在高糖刺激下 TLR4 蛋白的表达



a.对照 1 h 组；b.高糖 1 h 组；c. 高糖 2 h 组；d.高糖 4 h 组；e. 高糖 6 h 组；f. 对照 6 h 组

图 2 免疫沉淀和免疫印迹检测高糖刺激 MCT 细胞 TLR4 和 MyD88 的相互作用

合胞病毒通过上调 TLR4 的基因和蛋白的表达,能诱导气道上皮细胞对 LPS 的炎症反应,TNF-α 和 IL-8 的产生增加。同年 Tamandl D 报道[12],IL-6 上调人单核细胞 TLR4 的表达,再用 LPS 刺激,NF-κB 的转位增加。2005 年,Yumoto H 报道[13],LPS 直接刺激并不显著增加人主动脉内皮细胞 MCP-1 的分泌。侵袭性 P. gingivalis 细菌上调人主动脉内皮细胞 TLR4 的表达,感染该菌的细胞,再予大肠杆菌 LPS 刺激,MCP-1 的产生显著性增加。但若用抗 TLR4 抗体处理后再予大肠杆菌 LPS 刺激,MCP-1 的产生受到抑制。说明 TLR4 的上调能够使细胞对 LPS 的炎症反应增加,产生更多的炎症因子。众多研究显示,TLR4 的表达影响炎症因子的产生。我们的研究提示,高糖环境下肾小管上皮细胞 TLR4 蛋白的表达上调,其信号通路激活时将产生更多的炎症因子。

本实验用免疫沉淀和 Western Blot 结合的方法研究 TRL4 与 MyD88 的相互作用。3 次重复实验均表明,在高糖刺激 2 h 时,在经 MyD88 抗体沉淀下来的 MyD88 相互作用蛋白复合物中,检测到 TLR4 的表达,表明 TLR4 信号通路被激活,且被激活的信号通路为 MyD88 依赖的 TLR4 信号通路。由于 MyD88 是 TLR4 激活后结合的第一个接头分子,故两者的结合是 TLR4 信号通路被激活发生的最早事件,特异性的表明该信号通路被激活。以往 TLR4 与糖尿病肾病炎症的研究[10,14-15]均以 NF-κB 活化作为 TLR4 信号途径激活的表现,并不具特异性。

FY Chow 的研究发现[7],高糖增加近曲小管上皮细胞(TNR52E)分泌 MCP-1,表明糖尿病肾脏小管 MCP-1 的产生可能源于高糖的直接作用,但未就高糖促进 MCP-1 分泌的机制进一步研究。我们的实验提示,高糖环境下,TLR4 信号通路被激活,TLR4 信号通路激活将促进 MCP-1 等炎症因子的表达,故高糖增加小管细胞 MCP-1 的产生可能与 TLR4 信号通路有关。

研究报道,TLR4 参与动脉粥样硬化的发生,发展[16-18],与慢性移植物肾病[19-21],药物如环孢霉素[22],顺铂[23]所致的肾损害等多种非感染性炎症性疾病有关。TLR4 与糖尿病肾病相关的研究罕见报道。我们的研究发现,高糖环境下近曲肾小管上皮细胞 TLR4 蛋白的表达上调,同时 MyD88 依赖的 TLR4 信号通路被激活,提示 TLR4 可能通过炎症机制参与糖尿病肾病的发病,TLR4 与糖尿病肾病发生有关。

在本研究中,高糖刺激 MCT 细胞 TLR4 表达增加的时间与 TLR4 信号通路激活的时间一致,MyD88 依赖的 TLR4 信号通路的激活可能与 MCT 细胞 TLR4 蛋白的表达有关,有待进一步的研究。

(致谢:本研究在美国得克萨斯大学圣安东尼奥卫生研究中心(University of Texas Health Science Center at San Antonio)Dr. Kasinath 的帮助与支持下完成。在此衷心感谢 Dr. Kasinath 及所在实验室全体成员的帮助与支持!)

参 考 文 献

[1] Ohashi K, Burkart V, Flohé S, et al.Cutting edge:heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex[J].J immunol,2000,164(2):558-561.

[2] Vabulas R M, Ahmad-Nejad P, Ghose S, et al. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway[J]. J Biol Chem,2002,277(17):15107-15112.

[3] Johnson G B, Brunn G J, Kodaira Y, et al. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4 [J]. J Immunol,2002,168(10):5233 -5239.

[4] Okamura Y, Watari M, Jerud ES, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4[J]. J Biol Chem,2001, 276(13): 10229 -10233.

[5] Ihm CG, Park JK, Hong SP, et al.A high glucose concentration stimulates the expression of monocyte chemotactic peptide 1 in human mesangial cells [J]. Nephron,1998, 79(1):33-37.

[6] Park C W, Kim J H, Lee J H, et al. High glucose-induced intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) expression through an osmotic effect in rat mesangial cells is PKC-NF-kappa B-dependent[J].Diabetologia,2000,43(12):1544-1553.

[7] FY Chow, DJ Nikolic-Paterson, E Ozols, et al.Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice[J].Kidney International,2006,69(1):73-80.

[8] 丁涵露,张建国,朱妙珍,等.高浓度的糖刺激人肾小球内皮细胞表达单核细胞趋化蛋白 1 的影响[J].细胞与分子免疫学杂志,2004,20(4):450-453.

[9] Mohammad MK, Michael Morran, Brandon Slotterbeck, et al. Dysregulated toll-like receptor expression and signaling in bone marrow-derived macrophages at the onset of diabetes in the non-obese diabetic mouse[J].International immunology,2006,18(7):1101-1113.

[10] 李贞琼,刘建社,全正莉.氯沙坦对实验性糖尿病大鼠肾脏的炎症抑制作用[J].中国中西医结合肾病杂志,2007,8(10):569-571.

[11] Monick M M, Yarovinsky T O, Powers L S, et al. Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin[J].J Biol Chem,2003,278(52):53035-53044.

[12] Tamandl D, Bahrami M, Wessner B, et al.Modulation of toll-like receptor 4 expression on human monocytes by tumor necrosis factor and interleukin-6: tumor necrosis factor evokes lipopolysaccharide hyporesponsiveness, whereas interleukin-6 enhances lipopolysaccharide activity[J]. Shock,2003,20(3):224-229.

[13] Yumoto H, Chou HH, Takahashi Y, et al. Sensitization of human aortic endothelial cells to lipopolysaccharide via regulation of Toll-like receptor 4 by bacterial fimbria-dependent invasion[J]. Infect Immun,2005,73(12):8050-8059.

[14] Wolf G, Bohlender J, Bondeva T, et al.Angiotensin Ⅱ upregulates toll-like receptor 4 on mesangial cells[J].J Am Soc Nephrol,2006,17(6):1585-1593.

[15] Bondeva T, Roger T, Wolf G.Differential regulation of Toll-like receptor 4 gene expression in renal cells by angiotensin Ⅱ :dependency on AP1 and PU.1 transcriptional sites[J]. Am J Nephrol,2007,27(3):308-314.

[16] Michelsen K S, Doherty T M, Shah P K, et al.Tlr signaling:an emerging bridge from innate immunity to atherogenesis[J].J immunol,2004,173(10):5901-5907.

[17] 王虹艳,曲 鹏.Toll 样受体 4 与动脉粥样硬化[J].心血管病学进展,2005,26(S1):17-20.

[18] Vink A, Schoneveld A H, van der Meer J J, et al. In vivo eveidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesion[J]. J Circulation,2002,106(15):1985-1992.

[19] Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, et al.Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation[J].Kidney Int,2005,67(6):2454-2461.

[20] Fekete A, Viklick O, Hubácek J A, et al. Association between heat shock protein 70 s and toll-like receptor polymorphisms with long-term renal allograft survival[J]. Transpl Int,2006,19(3):190-196.

[21] Palmer S M, Burch L H, Mir S, et al.Donor polymorphisms in Toll-like receptor-4 influence the development of rejection after renal transplantation[J]. Clin Transplant, 2006, 20(1):30-36.

[22] Sun Woo Lim, Can Li, Kyung Ohk Ahn, et al. Cyclosporine-Induced Renal Injury Induces Toll-like Receptor and Maturation of Dendritic cells[J].Transplantation, 2005,80(5):691-699.

[23] Cenedeze M A, Gonalves G M, Feitoza C Q, et al.The role of toll-like receptor 4 in cisplatin-induced renal injury[J].Transplant Proc,2007,39(2):409-411.

(责任编辑:关蕴良)