维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)05-0669-04

脓毒症小鼠急性肾损害与 TLR2 受体基因表达的关系

朱方强，江　军，黄　宏

（第三军医大学大坪医院泌尿外科，重庆　400042）

【摘　要】目的：探讨 TLR2 受体(Toll-like receptor 2)基因表达与严重感染所致急性肾损害的关系。方法：采用盲肠结扎穿孔术（cecal ligation puncture，CLP）复制小鼠脓毒症急性肾功能损害模型。将 30 只小鼠随机分为假手术组(对照组)和脓毒症组（实验组），通过逆转录酶联反应（Reverse transcription and polymerase chain reaction，RT-PCR）检测肾组织 TLR2mRNA 表达，采用 Western blot 检测 TLR2 蛋白表达。采用 ELISA 法检测肾组织内肿瘤坏死因子 α（TNFα）水平，同时测定血浆中肌酐（Cr）水平。结果：CLP 术后 8、12、24hTLR2mRNA 表达均明显高于假手术组，TLR2 蛋白表达与 TLR2mRNA 表达的变化规律相一致，均是 12h 达峰值，持续至伤后 24h；肾组织 TNFα 水平和血清 Cr 水平于术后 8h 即显著升高达峰值，至 24h，TNFα 水平与假手术组无差异，而血清 Cr 仍维持高水平。并且 TLR2 mRNA 表达与肾组织 TNFα 和血清 Cr 水平呈显著正相关。结论：脓毒症时肾脏组织 TLR2mRNA 表达上调与急性肾损害密切相关。

【关键词】脓毒症；TLR2；急性肾损害；TNFα

【中国图书分类号】R631+.2　　【文献标记码】A　　【收稿日期】2006-04-16

The relationship between gene expression of Toll-like receptor 2 and acute kidney lesion in mice with sepsis

Zhu fangqiang, et al

(*Department of Urinary Surgery, Daping Hospital, the Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective:* To observe the relationship of the expression of Toll-like 2 receptor (TLR2) with kidney injury in abdominal infection-induced sepsis.*Methods*: 30 mice were randomly divided into 2 groups as follows: cecal ligation puncture group (CLP group, n=15) and sham operation group (control group, *n* =15). To adopt cecal ligation puncture(CLP) to establish the mice sepsis model, and the expression of TLR2 mRNA and TLR2 protein in kidney tissue were detected by reverse respectively. transcription and polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western blo.The TNF α level in the kidney tissue and the creatinine (Cr) in the serum were also measured.*Results*: The expression of TLR2 mRNA in kidney tissues was markedly upregulated at 6h after CLP, peaked at 12h and kept in high level up to 24h, and the expression change of TLR2 protein was identical with the TLR2 mRNA expression. The expression of TLR2 mRNA was significantly correlated with TNF α and Cr levels.*Conclusion*: Severe infection could lead to marked up-regulation of TLR2mRNA and its protein expression in kidney tissue. There is a marked correlation between the changes of TLR2 expression and the actue kidney lesion.

【Key words】Sepsis; TLR2; Acute kidney lesion; Tumor necrosis factor α (TNF α)

脓毒症是严重创伤、烧伤、休克、大手术后常见的并发症，进一步发展可导致脓毒性休克、多器官功能障碍综合症（MODS），其病死率高达 30%~50%，其中肾脏是容易发生 MODS 的重要脏器之一[1]。研究证实，细菌内毒素（lipopolysaccharide，LPS）是脓毒症主要的致病因子，TLR4 作为 LPS 的特异性受体，介导了 LPS 的细胞信号跨膜转导过程，而 TLR2 主要介导革兰氏阳性细菌（G^+）胞壁成分的信号转导。大量实验表明 TLR2 的配体较 TLR4 更为多样[2]，能与细菌多种成分特异性结合，如细菌脂蛋白、磷壁酸、肽聚糖等，而且在多种组织中可诱导性表达上调[3-6]，可能在感染诱发的脓毒症的脏器损害中发挥了重要作用，是促进全身炎症反应加剧和脏器损害的重要因素。因此，我们采用盲肠结扎穿孔术（CLP）复制革兰阴性菌腹腔感染脓毒症模型，探讨 TLR2 受体表达变化与肾损害的关系。

1　材料与方法

1.1　实验动物及模型

雄性 SPF 级昆明种小鼠，体重 25~30 克，购自第三军医大学大坪医院动物所。术前禁食 12h，可自由饮水。动物随机

作者介绍：朱方强（1965-　），主治医师，在读硕士，主要研究方向：肾移植免疫与感染。

维普资讯 http://www.cqvip.com

分为 2 组：脓毒症组（CLP 组，n=15），假手术组（对照组，n=15）。CLP 组小鼠参照文献[1]行盲肠结扎穿孔术复制脓毒症模型。假手术组动物除不行盲肠结扎穿孔外，其余处理同 CLP 组。动物分别于术后 8、12、24h 取肾组织和血清，立即置液氮或 -70℃保存（每个时相点 3 只动物），供相关指标测定。

1.2 实验仪器及试剂

主要试剂：山羊抗小鼠 TLR2 多克隆抗体购自美国 Santa cruz biotechnology，小鼠 TNFα ELISA 检测试剂盒购自美国 Hyclone 公司，RT-PCR 试剂盒、RNA 提取试剂盒、RPIA 蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白检测试剂盒、引物合成购自上海申能博采公司。

主要仪器：7172 型自动生化分析仪，PCR 仪（Eppendorf, 德国），电泳槽（BIO-RAD 美国），凝胶成像系统(BIO-RAD VersaDOC 3000 美国)，紫外分光光度仪(Du-640, Beckman, 美国)，全自动连续波长酶标仪(BIO - RAD, Model 405 美国)，微量可调移液器(Eppendorf, 德国)。

1.3 实验内容及方法

1.3.1 肾组织 TLR2 mRNA 表达水平 采用异硫氰酸胍一步分离法提取肾组织总 RNA。采用半定量逆转录多聚酶链反应（RT-PCR）技术测定 TLR2 mRNA 表达水平，三磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）作为内参对照。应用软件 Primer Premier 5.0 设计各模式识别受体的扩增引物。TLR2 序列为：引物 1 为 5'-CTG CTT TTC GTT CAT CTC TGG AG-3'，引物 2 5'-CAA ATG TTC AAG ACT GCC CAG AG-3' 扩增片段为 393bp；GAPDH 序列为：引物 1 为 5'-CGG TGC TGA GTA TGT CGT-3'，引物 2 为 5'-GGT GGA AGA GTG GGA GTT-3'，扩增片段为 613bp。扩增产物经 1.7% 琼脂糖凝胶电泳后，用凝胶扫描仪观察并扫描。实验结果以检测条带与 GAPDH 条带的总灰度值的比值作为检测目的片段的相对值。

1.3.2 肾组织 TLR2 蛋白表达水平 采用 Western blot 方法检测。

1.3.3 血清肌酐（Cr）水平 使用 7172 型自动生化分析仪测定。

1.3.4 肿瘤坏死因子（TNFα）的检测 采用 ELISA 法检测。将肾组织从液氮中取出，称重后置于匀浆器中，加入 3 倍体积磷酸缓冲液（0.01mol/L，pH7.2），冰浴匀浆。离心（14000r/min，20min，4℃）后取上清液测定 TNF-α 的含量。检测步骤按说明书进行，将样品光密度值代入标准曲线并乘以相应的稀释倍数，计算出样品 TNFα 浓度。同时，采用 BCA 蛋白检测试剂盒测定上清液内总蛋白含量。计算公式为：

组织 TNFα 含量(pg/mg 蛋白)= 组织匀浆液 TNF-α 浓度(pg/ml)/ 组织匀浆液蛋白含量(mg/ml)

1.4 统计学处理

所有数据均以平均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用 SPSS11.0 统计分析软件，分别用方差分析、t 检验和相关回归分析等方法进行统计学处理，P<0.05 表示差异显著，P<0.01 表示差异非常显著。

2 结 果

2.1 肾组织 TLR2 mRNA 表达

由图 1 可见，正常肾组织 TLR2 mRNA 呈低表达，于术后 8h，肾组织内 TLR2 mRNA 表达开始明显升高，12h 达峰值，至 24h 仍明显高于假手术组（P<0.01）。CLP 组各时相点分别较假手术组升高 2.0、2.5、1.9 倍。

2.2 肾组织 TLR2 蛋白表达

由图 2 可见，肾组织 TLR2 蛋白表达变化规律与 TLR2 mRNA 表达变化相一致。伤后 8h 至 24h 均显著高于假手术组，12h 达峰值。

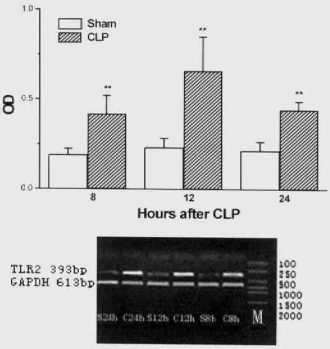


图 1 脓毒症小鼠肾组织内 TLR2 mRNA 表达变化。与假手术组比：**P<0.01。

2.3 肾组织 TNF-α 蛋白水平(pg/mg)、Cr(μmol/L)含量

肾组织内 TNFα 含量在 CLP 后 8、12h，明显高于假手术组（P<0.05），但至 24h，肾组织内 TNFα 水平已明显降低，与假手术组无显著差异（P>0.05）。



维普资讯 http://www.cqvip.com

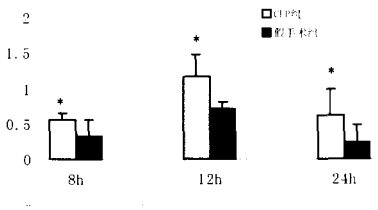


图 2　脓毒症小鼠肾组织内 TLR2 蛋白表达变化。与假手术组比：*P<0.05。

术后 8 h 血清 Cr 即显著升高达峰值（P<0.01）

2.4　肾组织 TLR2 基因表达与 TNFα 和 Cr 的相关分析

相关分析表明，CLP 后肾组织 TLR2 mRNA 表达与 TNFα（r=0.531，P=0.045，回归方程：Y=0.0611X+0.275）和 Cr（r=0.632，P=0.037，回归方程：Y=0.0395X+0.3932）水平呈显著正相关（P<0.05）。

表 1　肾组织 TNFα 蛋白水平（pg/mg）、及 Cr 含量变化

	组别	8 h	12 h	24 h
TNFα	CLP组	4.38 ± 0.21**	2.19 ± 0.48*	0.65 ± 0.13
（pg/mg）	假手术组	0.61 ± 0.27	0.74 ± 0.13	0.54 ± 0.10
Cr (umol/L)	CLP组	127.84 ± 11.81**	95.46 ± 15.31*	83.83 ± 12.75*
	假手术组	51.02 ± 13.386	54.17 ± 20.77	53.21 ± 18.64

与假手术组比较：* P<0.05，** P<0.01

3　讨　论

细菌内毒素（lipoplysaccharide，LPS）不仅是 G－细菌细胞壁外膜上的主要结构成分，也是细菌致病的主要致病毒素。然而，近年来研究进一步发现 G－细菌的其它成分如细菌外膜上的脂蛋白、磷壁酸、肽聚糖和细菌 DNA 等也具有很强的免疫原性和致炎效应，具有一定的致病作用[2,7,8]。由于病原菌上这些结构分子往往是微生物间共有的高度保守的分子，为此，Janeway[9]将它们统称为病原菌相关模式分子（pathogen associated molecular patterns，PAMPs）。自从 90 年代初发现细菌脂多糖结合蛋白以来，已先后在主要炎症效应细胞－巨噬细胞表面发现了多种膜蛋白，与细菌 LPS 和其它细菌毒素作用有关。目前把这些与病原微生物作用有关的膜蛋白，统称为模式识别受体（pattern recognition receptor，PRR）[9]。与细菌 LPS 作用有关的 PRR 有 CD14、TLR4 和清道夫受体（scavenger receptor，SR）[10,11]。与细菌脂蛋白作用相关的 PRR 为 TLR2[2,12]，与细菌 DNA 作用相关的 PRR 为 TLR9[2,7]。业已研究显示，TLRs 受体是一种跨膜蛋白，是天然免疫系统中最为重要的 PRRS，参与了免疫反应的信号传导，通过对抗原的识别，活化胞内信号转导通路，激活炎症反应的相关基因[13]。因此，TLRs 的表达过度上调，不仅为 PAMPs 过度刺激效应细胞提供了基础，同时也为感染情况下多种细菌成分的协同促炎作用提供了基础，导致了感染情况下的脓毒症状态（即全身过度炎症反应）和多器官损害[14]。

尽管 TLR2 不是 LPS 的特异性受体，但 TLR2 作为一种重要的跨膜信号转导受体参与了内毒素诱发的炎症反应的病理生理过程；TLR2 是一种识别谱广泛的模式识别受体，它不仅能识别一些特殊类型的 LPS，更主要的是识别革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、分支杆菌、酵母、支原体、肽聚糖、阿拉伯甘露糖脂、磷壁酸、脂蛋白等多种细菌及其胞壁成分[2]。通过建立 CLP 模型是经典的脓毒症模型，观察发现 TLR2 表达上调参与了脓毒症及组织损害的病理生理过程，但其机制尚不清楚。

本研究结果显示，CLP 后 8h，肾组织内 TLR2 mRNA 表达即明显上调，12h 达峰值，至 24h 虽有一定下降，但仍显著高于假手术组，Western Blot 检测显示 TLR2 蛋白表达与基因表达变化相一致。相关分析显示，肾组织 TLR2 mRNA 表达虽与肾组织内 TNFα 蛋白水平和血清 Cr 水平呈显著正相关。上述研究结果表明 TLR2 mRNA 表达可能与脓毒症时急性肾功能损害密切相关。此外，有实验证实，LPS 攻击可导致小鼠心、肺、肝、脾、脑、肾的实质细胞以及内皮细胞、脂肪细胞等 TLR2 mRNA 表达均明显上调[4,5,6,15]，提示 TLR2 参与了 LPS 导致的病理生理改变和肾脏的损害。

有关脓毒症引起组织 TLR2 mRNA 表达上调的机制是非常复杂的，但 LPS 刺激和脓毒症衍生的促炎细胞因子（TNFα、IL-6、IL-15、IL-1 和 IFN）可能是主要的调节因子[3]。体外实验亦显示，LPS 诱导的单核细胞、中性粒细胞及内皮细胞 TLR2 基因表达上调，与细胞内 NF-κB 的活化和 TNFα、IL-6 等炎症介质的产生相伴行；而 TLR2 的特异性抗体则能、明显抑制上述炎症介质的生成，从而进一步证实了 TLR2 在机体炎症反应中的作用[16]。Liu 等[17]在动物实验中观察到，虽然单独以 LPS 攻击大鼠时，可导致其肝脏内 TLR2 基因表达明显上调，但如果在 LPS 攻击的同时给予 IL-1 或 TNFα、IL-6 受体拮抗剂进行干预，可有效抑制

维普资讯 http://www.cqvip.com

TLR2基因表达的上调，表明 IL-1 和 / 或 TNFα、IL-6 参与了 TLR2 基因表达的调控。反之，IL-10、IL-4 等抗炎介质则可明显抑制 LPS 等诱导 TLR2 表达上调。

TLRs 受体介导了炎症介质的合成，机体炎症反应失控所致的促炎介质产生过度以及抗炎介质生成不足是造成多器官损害的根本原因，而这一改变又可能导致了细胞表面 TLR2 过度表达。由此，在受体和炎症介质的基因表达之间可能形成“正反馈”环，使炎症反应不断放大，最终导致脓毒症的发生或多脏器功能损害。因此，对于 TLR2 基因表达进行适当调节可能为防治严重感染后脓毒症的发生与发展提供新的思路。

由于 TLR2 特异性配体的多样性、组织表达的广泛性以及表达的可诱导性（与 LPS 的特异性受体 TLR4 相比）[2-6]，决定了其在炎症反应中作用的重要性。TLR2 是脂蛋白的特异性受体，脂蛋白是所有 G+ 和 G- 菌胞壁含量最为丰富的成分。因此，感染情况下，TLR2 表达的上调必然增强对炎症细胞的激活，导致更大量的细胞因子合成与释放，引发 SIRS 及器官的实质性损害，促进炎症级联反应扩大，甚至失控。有作者 TLR2 称为 “死亡受体”[6]。TLR2 可能是促使免疫防御型细胞转化为致炎效应型细胞的关键受体。

脓毒症所致急性肾衰时，发生的肾小管上皮细胞凋亡也可能与 TLR2 表达上调密切相关，因 TLR2 表达上调能诱发细胞凋亡发生，其途径是通过激活 NF-κB [10,11]。肾组织内 TLR2 mRNA 表达定位 TLR2 mRNA 的表达上调是否是诱导肾小管上皮细胞凋亡的主要原因有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Opal SM, Cohen J. Clinical gram-positive sepsis: Does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis [J].Crit Care Med, 1999; 27: 1608-1616.

[2] Lien E, Robin RI.Toll-like receptors[J].Crit Care Med, 2000; 30(S): S1-11.

[3] Matsugchi T, Musikacharoen T, Ogawa T, et al.Gene expression of Toll-like recepter 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokine in mouse macrophages [J].J Immunol, 2000; 165(10): 5767-5772.

[4] Matsumure T, Ito A, Takii T, et al. Endotoxin and cytokine regulation of toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 gene expression in murine liver and hepatocytes[J].J Interferon Cytokine Res, 2000; 20(10): 915-921.

[5] 鄢小建，姚永明，董 宁，等. 腹腔感染所致多器官损害与 TOLL 样受体 2 基因表达的关系[J].华实验外科杂志，2003; 20(1): 36-38.

[6] Emmanuelle F, L Thomas, H Xu, et al. Bacterial lipopolysaccharide and IFN-γ induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-κB activation[J].J. Immunol, 2001; 166: 2018-2024.

[7] Sparwasse T, Miethke T, Lipford G, et al. Bacterial DNA causes septic shock[J].Nature, 1997; 386(6623): 336-337.

[8] Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, et al. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma [J].Proc Natl Acad Sci USA, 1996; 93 (7): 2879-2883.

[9] Janeway CA.The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self[J].Immunol Today, 1992; 13(8): 11-16.

[10] Hampton RY, Golenbock DT, Penman M, et al.Recognition and plasma clearance of endotoxin hy scavenger receptors [J].Nature, 1991; 352 (6333): 342-344.

[11] Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product [J].J Immunol, 1999; 162 (12): 3749-3752.

[12] Antonios OA, Ruey-Bing Yang, Melanie R, et al.Cell activation and apoptpsis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2 [J].Science, 1999; 285(120): 736-739.

[13] Williams DL, Ha T, Li C, et al. Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality[J].Crit Care Med, 2003; 31(6): 1808-1818.

[14] 黄 宏，蒋建新，朱佩芳，等. 细菌 LPS、脂蛋白、DNA 对肺泡巨噬细胞的协同激活作用[J].中华医学杂志，2005; 85(21): 1468 - 1472.

[15] Ying Ling, Hyangkyu Lee, Anders H Berg, et al .The lipopolysaccharide-activated Toll-like receptor (TLR)-4induces synthesis of the closely related receptor TLR2 in adipocytes [J].J Biological Chmistry, 2000; 275(32): 24255-24263.

[16] Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, et al.Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products [J].J Biol Chem, 1999; 274(48): 33419-33425.

[17] Liu S, Salyaponges AN, Geller DA, et al.Hepatocyte toll-like receptor 2 expression in vivo and in vitro: role of cytokines in induction of rat TLR2 gene expression by lipopolysaccharide[J].Shock, 2000; 14(5): 361-365.

[18] Liprantis AO, Yang RB, Weiss DS, et al.The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2 [J]. EMBO, 2000; 19 (13): 3325-3336.

[19] Antonios OA, Ruey BY, Melanie RM, et al.Cell activation and apoptpsis by bacterial lipoproteins through Toll-like receptor-2[J].Science, 1999; 285: 736-739.