

# 拮抗Toll样受体4的表达对内毒素血症小鼠肾脏损伤的保护作用

冯莉芳 王鲁文 张海月 龚作炯

**【摘要】目的** 观察拮抗Toll样受体4 (TLR4) 的表达对内毒素血症小鼠肾脏损伤的保护作用以及对细胞核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65的影响。**方法** 采用内毒素 (LPS) 诱导的小鼠急性肾功能衰竭模型, 并应用TLR4单克隆抗体进行干预, 观察TLR4单克隆抗体对内毒素血症小鼠的肾脏组织学、血清肌酐 (Cr)、尿素氮 (BUN)、胱抑素C、白细胞介素 (IL)-1 $\beta$ 、IL-6水平以及肾组织中TLR4及NF- $\kappa$ B水平的影响。**结果** 与模型组比较, TLR4单克隆抗体能够明显改善内毒素血症小鼠肾脏组织病理学损害; 降低血清中Cr、BUN、胱抑素C、IL-1 $\beta$ 和IL-6水平 ( $t = 7.20、7.86、9.99、8.79、3.92$ ,  $P$ 均 $< 0.05$ ), 并且降低肾组织中TLR4及NF- $\kappa$ B p65水平 ( $t = 20.94、11.21$ ,  $P$ 均 $< 0.05$ )。**结论** TLR4单克隆抗体能够保护内毒素血症小鼠肾脏组织损伤, 其作用机制可能与调节TLR4/NF- $\kappa$ B信号转导通路有关。

**【关键词】** Toll样受体4; 单克隆抗体; 内毒素血症; 急性肾功能衰竭; 胱抑素C; 细胞核因子- $\kappa$ B

**Protective effect of antagonism of toll-like receptor 4 expression on renal injury in LPS-induced sepsis mice** Feng Lifang, Wang Luwen, Zhang Haiyue, Gong Zuojiong. Department of Infectious Diseases, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China  
Corresponding author: Gong Zuojiong, Email: zjgong@163.com

**【Abstract】Objective** To investigate the protective effect of antagonism of toll-like receptor 4 (TLR4) expression on renal injury in LPS (lipopolysaccharide)-induced sepsis mice, and its influence on nuclear factor (NF)- $\kappa$ B p65. **Methods** Acute kidney injury was induced by LPS. Anti-TLR4 monoclonal antibody was applied to treat the mice. The effects of TLR4 monoclonal antibody on renal histology, serum creatinine (Cr), blood urea nitrogen (BUN), cystatin C, interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6 levels, and TLR4 and NF- $\kappa$ B protein levels in renal tissue of mice with endotoxemia were analyzed. **Results** The pathological changes of renal tissue were improved by blockade of TLR4 compared with model group. The serum levels of Cr, BUN, cystatin C, IL-1 $\beta$  and IL-6 were decreased by treatment of TLR4 monoclonal antibody compared with model group ( $t = 7.20, 7.86, 9.99, 8.79$  and  $3.92$ , respectively; all  $P < 0.05$ ). The TLR4 and NF- $\kappa$ B protein levels in renal tissue were also decreased by blockade of TLR4 ( $t = 20.94, 11.21$ , respectively; both  $P < 0.05$ ). **Conclusions** Blockade of TLR4 could protect renal injury in LPS-induced sepsis mice. The mechanism may be related to the regulation of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**【Key words】** Anti-TLR4 antibody; Endotoxemia; Acute kidney failure; Cystatin C; NF- $\kappa$ B

严重感染导致的脓毒血症可诱发全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 已成为临床上患者主要的死亡原因之一<sup>[1-2]</sup>。脓毒症严重威胁人类健康, 尽

管目前临床上采用多种抗菌药物和器官支持疗法有助于减少脓毒症患者的死亡, 但病死率仍约为25%<sup>[3]</sup>。内毒素是脓毒症发生发展最重要的启动因子, 可引起炎症介质的合成、释放, 导致多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS)<sup>[4-6]</sup>。其中, 肾脏是脓毒症中最易受累的器官之一, 在危重患者中极易导致急

性肾功能损伤 (acute kidney injury, AKI) [7-8]。研究证实, AKI是脓毒症患者预后不良的独立危险因素, 一旦脓毒症患者合并AKI, 其病死率是单纯脓毒症患者的2倍<sup>[9-10]</sup>。因此, 若能有效保护脓毒症患者的肾功能将有助于降低病死率, 改善患者预后。然而, 目前临床上能有效防治脓毒症诱发AKI的措施非常有限<sup>[11-12]</sup>。Toll样受体 (Toll-like receptor, TLR) 是体内一种常见的病原相关模式识别受体, 广泛分布于固有免疫细胞。细菌、病毒和真菌等病原微生物可通过激活TLR, 启动体内的固有免疫<sup>[13]</sup>。研究证实, TLR4作为TLR家族的重要成员, 是体内内毒素最重要的识别受体, 在内毒素诱发的炎症反应过程中起关键作用<sup>[14-15]</sup>。为此, 本研究采用内毒素诱导的小鼠急性肾功能衰竭模型, 并应用TLR4单克隆抗体进行干预, 探讨其对内毒素血症小鼠的肾脏保护作用以及相关机制, 现报道如下。

## 材料和方法

### 一、实验动物及主要试剂

36只SPF级C57BL/6小鼠, 体重20~25 g, 购于湖北省动物实验中心 (实验动物质量合格证号No. 430047000220401)。内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 购于Sigma-Aldrich公司。兔抗鼠TLR4单克隆抗体和兔抗鼠IgG购于Abcam公司。

### 二、动物模型制备及分组

36只小鼠随机分为正常组、模型组及TLR4单克隆抗体组。正常组小鼠无腹腔注射; 模型组小鼠腹腔注射兔抗鼠IgG, 剂量为100  $\mu$ g/kg; TLR4单克隆抗体组小鼠腹腔注射兔抗鼠TLR4单克隆抗体, 剂量为100  $\mu$ g/kg。2 h后, 模型组及TLR4单克隆抗体组小鼠均腹腔注射大剂量LPS (20 mg/kg), 诱

导小鼠急性肾功能衰竭模型。给予干预剂24 h后处死所有大鼠, 并收集大鼠肾脏、血液等标本备检。

### 三、肾脏组织病理学检测

取部分肾脏组织 (约0.4 cm<sup>2</sup>), 固定于4%多聚甲醛溶液中, 经石蜡常规包埋, 切片后行HE染色, 光镜下观察肾脏组织病理学改变。

### 四、肾脏功能及细胞因子检测

血清肌酐 (Cr) 和尿素氮 (BUN) 采用全自动生化分析仪检测; 血清胱抑素C、IL-1 $\beta$ 和IL-6采用ELISA检测; 操作流程均按照试剂盒说明书进行。

### 五、肾脏组织中TLR4及NF- $\kappa$ B p65蛋白水平检测

采用Western blot方法, 取肾组织进行匀浆, 提取总蛋白, BCA法测蛋白浓度, 按40  $\mu$ g/孔加样, 行10% SDS-PAGE电泳后转膜, 于5%脱脂奶粉37  $^{\circ}$ C摇床封闭1 h; 加入一抗于4  $^{\circ}$ C摇床过夜, 洗膜; 加入IRDye 800远红外标记二抗, 室温下孵育1 h, 洗膜; Odyssey系统扫描分析。

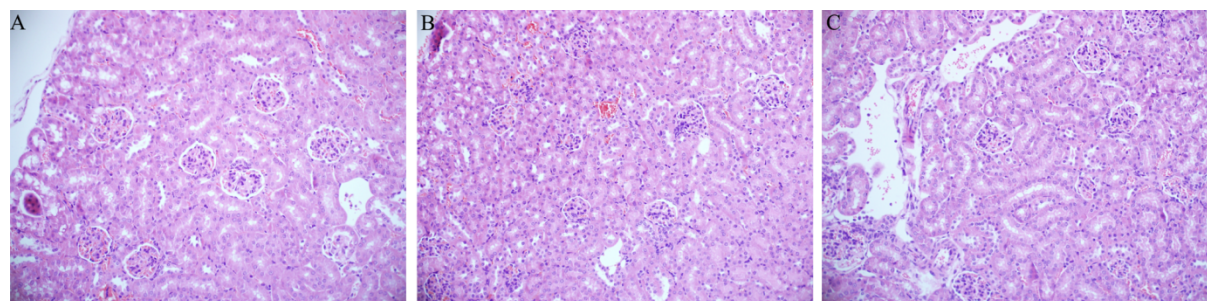
### 六、统计学处理

采用SPSS 19.0软件进行统计分析。实验数据 (血清Cr、BUN、胱抑素C、IL-1 $\beta$ 、IL-6水平以及肾组织中TLR4、NF- $\kappa$ B水平) 为计量资料且呈正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组比较采用成组设计资料的 $t$ 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、TLR4单克隆抗体可以改善肾脏组织的病理损害

HE染色显示对照组肾脏组织结构完整, 未见组织细胞水肿及坏死现象; 模型组可见肾小管水肿, 肾小球毛细血管扩张、充血, 肾间质内血管扩



注: A: 正常组; B: 模型组; C: TLR4单克隆抗体组

图1 肾脏组织HE染色 (200 $\times$ )

张、充血水肿, 炎性细胞浸润; 与模型组相比, TLR4单克隆抗体组小鼠肾小球及肾小管充血水肿及炎性细胞浸润显著减轻, 见图1。

## 二、TLR4单克隆抗体可以改善肾脏功能

模型组小鼠血清Cr、BUN和胱抑素C水平显著高于对照组 ( $t = 11.04、13.43、27.07$ ,  $P$ 均 $< 0.001$ ) ; 与模型组相比, TLR4单克隆抗体组小鼠血清Cr、BUN和胱抑素C水平明显降低 ( $t = 7.20, 7.86、9.99$ ,  $P$ 均 $< 0.001$ ) 见图2。

## 三、TLR4单克隆抗体可以降低血清中炎症因子水平

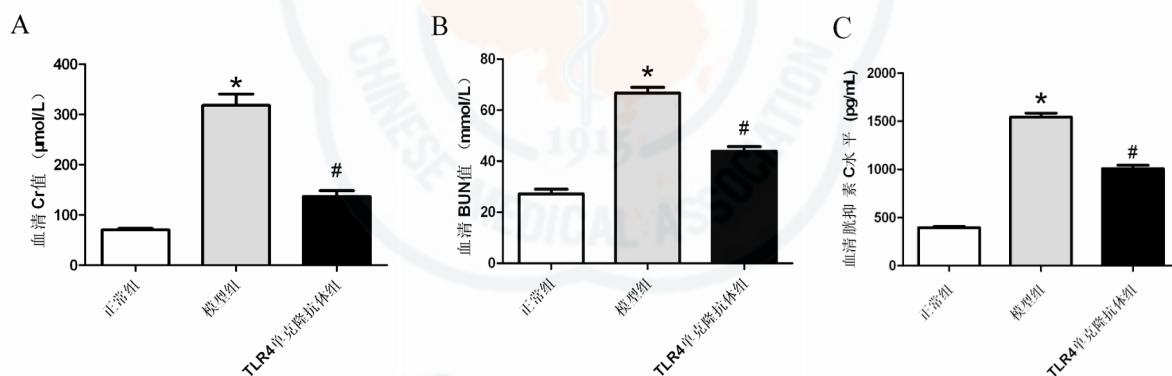
血清中IL-1 $\beta$ 和IL-6水平检测, 结果显示模型组小鼠血清中IL-1 $\beta$ 和IL-6水平较正常组显著升高 ( $t = 19.99、7.05$ ,  $P$ 均 $< 0.001$ ) ; 与模型组相比, TLR4单克隆抗体组小鼠血清中IL-1 $\beta$ 和IL-6水平显著降低 ( $t = 8.79、3.92$ ,  $P$ 均 $< 0.001$ ) , 见图3。

## 四、TLR4单克隆抗体可以降低血清及肾脏组织中TLR4及NF- $\kappa$ B p65蛋白水平

模型组小鼠肾组织中TLR4及NF- $\kappa$ B p65蛋白水平较正常组显著升高 ( $t = 38.99、18.91$ ,  $P$ 均 $< 0.001$ ) ; 而TLR4单克隆抗体组小鼠肾组织中TLR4及NF- $\kappa$ B p65蛋白水平显著低于模型组 ( $t = 20.94、11.21$ ,  $P$ 均 $< 0.001$ ) , 见图4。

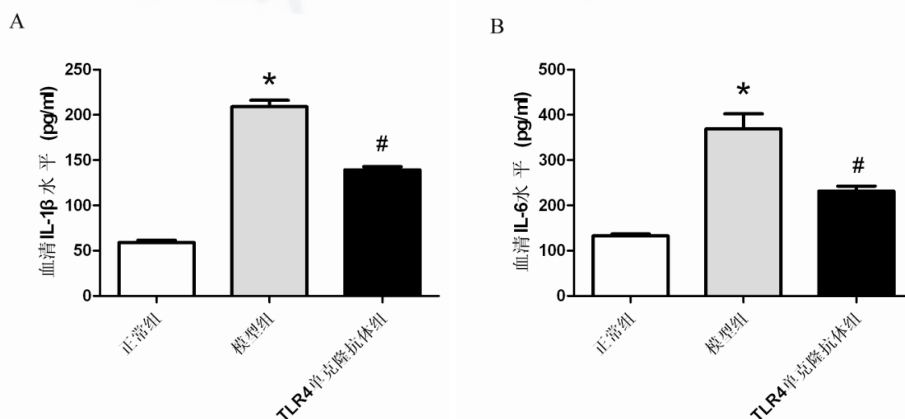
## 讨 论

严重创伤、烧伤、休克、重症感染等应激状态下极易导致脓毒症的发生。感染部位产生的内毒素(LPS)大量进入体内, 诱发炎症因子大量合成及释放, 从而导致细胞变性和坏死, 最终表现为组织的病理学损害和器官功能衰竭。脓毒症引发的多器官系统功能障碍是重症患者死亡的重要原因。而肾脏是最常见的受累器官, 可导致AKI, 其发



注: 与正常组相比, \* $P < 0.05$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$

图2 各组小鼠血清Cr、BUN和胱抑素C的水平



注: 与正常组相比, \* $P < 0.05$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$

图3 各组小鼠血清IL-1 $\beta$ 和IL-6水平

生率为20%~35%<sup>[3]</sup>。尽管AKI经临床治疗后,部分患者可逆转,但仍然有可能进一步发展为肾功能衰竭或终末期肾功能衰竭。因此,AKI可增加脓毒症患者的病死率,严重影响患者的预后<sup>[9-10]</sup>。

由革兰阴性菌引发的脓毒血症占50%~60%,其发病机制与革兰阴性菌产生的内毒素密切相关。内毒素能诱发各种炎症因子释放,包括IL-1、TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6和IL-8等。其中,TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 能引发自由基、NO和类花生酸类物质的释放刺激多种血管活性物质生成,诱发肾组织细胞凋亡、降低肾小球血流和肾小球滤过率<sup>[16-17]</sup>。因此,TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 被认为是脓毒血症病情发展的重要介质<sup>[18]</sup>。本研究应用TLR4单克隆抗体作为干预剂,观察其对内毒素血症小鼠肾脏的保护作用以及对炎症因子的影响。

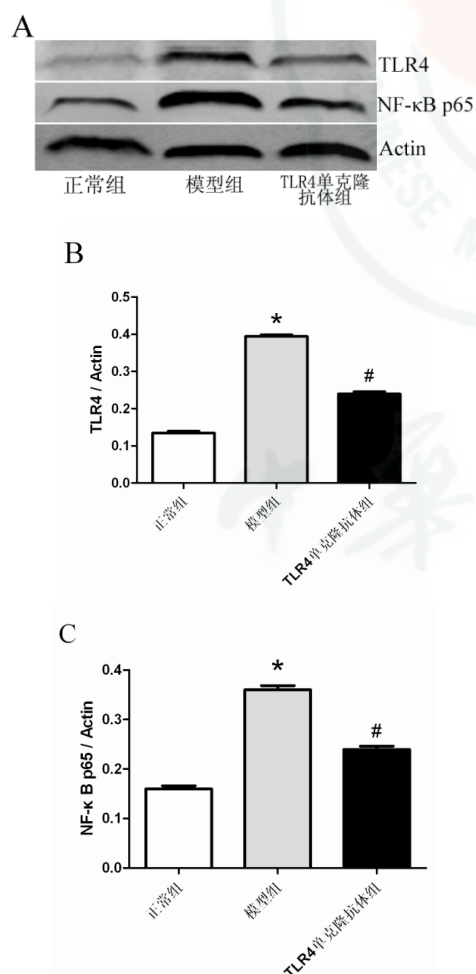
血清胱抑素C(cystatin C)是13 kDa的小分子蛋白,人体所有有核细胞都能产生。研究证实,血

液循环中的胱抑素C可经肾小球几乎完全滤过,接着被近曲小管重吸收而完全代谢。因此,胱抑素C的血液浓度只受肾小球滤过率(glomerular filtration rate, GFR)的影响,而不受年龄、性别、饮食、炎症、药物、肝脏疾病等因素影响。血清中胱抑素C水平在肾小球轻微损伤时即可升高,并随肾小球损伤的加重而明显增高,与GFR呈显著的负相关。因此,胱抑素C是一种理想的反映GFR变化及肾功能损害的评价指标<sup>[19-20]</sup>。本研究观察小鼠肾脏组织病理学改变,以及血清中Cr、BUN和胱抑素C水平变化发现,应用TLR4单克隆抗体拮抗TLR4表达,能够明显改善小鼠肾脏组织的病理损伤,减轻肾小球及肾小管充血水肿及炎性细胞浸润,降低肾功能的损害程度。本研究进一步检测血清中细胞因子水平发现,模型组小鼠血清中细胞因子IL-1 $\beta$ 和IL-6水平显著升高,而治疗组中TLR4单克隆抗体可显著降低小鼠血清中IL-1 $\beta$ 和IL-6水平。提示TLR4信号转导途径在LPS导致的脓毒血症过程中发挥重要作用,拮抗TLR4表达能够有效保护内毒素血症小鼠的肾脏功能和降低炎症因子水平。

本研究进一步检测肾脏组织中TLR4及NF- $\kappa$ B p65的水平变化,发现模型组小鼠肾组织中TLR4及NF- $\kappa$ B p65水平较正常组显著升高,而TLR4单克隆抗体组小鼠肾组织中TLR4及NF- $\kappa$ B p65水平较模型组显著降低。提示TLR4单克隆抗体保护内毒素血症小鼠肾脏组织损伤的作用机制可能与调节TLR4/NF- $\kappa$ B信号转导通路有关。TLR4信号转导途径可作为今后治疗脓毒症的一个潜在靶点。

## 参 考 文 献

- [1] Rhee C, Klompas M. New sepsis and septic shock definitions: clinical implications and controversies[J]. Infect Dis Clin North Am, 2017, 31(3):397-413.
- [2] Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis[J]. Semin Immunopathol, 2017, 39(5):517-528.
- [3] Shankar-Hari M, Ambler M, Mahalingasivam V, et al. Evidence for a causal link between sepsis and long-term mortality: a systematic review of epidemiologic studies[J]. Crit Care, 2016, 20(1):1-13.
- [4] Lin JC, Spinella PC, Fitzgerald JC, et al. New or progressive multiple organ dysfunction syndrome in pediatric severe sepsis: A sepsis phenotype with higher morbidity and mortality[J]. Pediatr Crit Care Med, 2017, 18(1):8-16.
- [5] Wei Y, Yang J, Wang J, et al. Successful treatment with fecal microbiota transplantation in patients with multiple organ dysfunction syndrome and diarrhea following severe sepsis[J]. Crit Care, 2016, 20(1):332-340.



注:与正常组相比,\* $P < 0.05$ ;与模型组相比,# $P < 0.05$

图4 各组小鼠血清及肾脏组织中TLR4和NF- $\kappa$ B p65的水平

- [6] Wang B, Chen G, Zhang J, et al. Increased neutrophil gelatinase-associated lipocalin is associated with mortality and multiple organ dysfunction syndrome in severe sepsis and septic shock[J]. Shock, 2015, 44(3): 234-238.
- [7] Gómez H, Kellum JA, Ronco C. Metabolic reprogramming and tolerance during sepsis-induced AKI[J]. Nat Rev Nephrol, 2017, 13(3): 143-151.
- [8] Burger D, Erdbrügger U, Burns KD. Re: Microparticles: markers and mediators of sepsis-induced microvascular dysfunction, immunosuppression, and AKI[J]. Kidney Int, 2015, 88(4): 915-916.
- [9] Emlet DR, Shaw AD, Kellum JA. Sepsis-associated AKI: epithelial cell dysfunction[J]. Semin Nephrol, 2015, 35(1): 85-95.
- [10] Godin M, Murray P, Mehta RL. Clinical approach to the patient with AKI and sepsis[J]. Semin Nephrol, 2015, 35(1): 12-22.
- [11] Shao Y, Fan Y, Xie Y, et al. Effect of continuous renal replacement therapy on kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients with septic acute kidney injury[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(6): 3594-3602.
- [12] Ueno T. The roles of continuous renal replacement therapy in septic acute kidney injury[J]. Artif Organs, 2017, 41(7): 667-672.
- [13] Leifer CA, Medvedev AE. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling[J]. J Leukoc Biol, 2016, 100(5): 927-941.
- [14] Sestito SE, Facchini FA, Morbioli I, et al. Amphiphilic guanidinocalixarenes inhibit lipopolysaccharide (LPS)- and lectin-stimulated Toll-like receptor 4 (TLR4) signaling[J]. J Med Chem, 2017, 60(12): 4882-4892.
- [15] Li N, Zhang X, Dong H, et al. Lithium ameliorates LPS-induced astrocytes activation partly via inhibition of Toll-Like receptor 4 expression[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38(2): 714-725.
- [16] Lang Y, Jiang Y, Gao M, et al. Interleukin-1 receptor 2: A new biomarker for sepsis diagnosis and Gram-negative/Gram-positive bacterial differentiation[J]. Shock, 2017, 47(1): 119-124.
- [17] Kurt AN, Aygun AD, Godekmerdan A, et al. Serum IL-1-beta, IL-6, IL-8, and TNF-alpha levels in early diagnosis and management of neonatal sepsis[J]. Mediators Inflamm, 2007, 2007: 31397.
- [18] Johnson DW, Kalil AC. Is interleukin-1 receptor blockade ready for prime time in patients with severe sepsis and macrophage activation syndrome? [J]. Crit Care Med, 2016, 44(2): 443-444.
- [19] Yang SK, Liu J, Zhang XM, et al. Diagnostic accuracy of serum cystatin C for the evaluation of renal dysfunction in diabetic patients: A Meta-analysis[J]. Ther Apher Dial, 2016, 20(6): 579-587.
- [20] Leem AY, Park MS, Park BH, et al. Value of serum cystatin C measurement in the diagnosis of sepsis-induced kidney injury and prediction of renal function recovery[J]. Yonsei Med J, 2017, 58(3): 604-612.

(收稿日期: 2017-08-08)

(本文编辑: 孙荣华)

冯莉芳, 王鲁文, 张海月, 等. 拮抗Toll样受体4的表达对内毒素血症小鼠肾脏损伤的保护作用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2018, 12(2): 204-208.