

本文引用:朱小娟,韩玫瑰,张芳敏,等. Toll 样受体 3 和 Toll 样受体 4 在原发性 IgA 肾病患者肾组织中的表达及意义[J]. 新乡医学院学报,2021,38(8):738-741. DOI:10.7683/xyxyxb.2021.08.008.

【临床研究】

# Toll 样受体 3 和 Toll 样受体 4 在原发性 IgA 肾病患者肾组织中的表达及意义

朱小娟, 韩玫瑰, 张芳敏, 黄 倩, 赵德安, 王凌超, 韩子明  
(新乡医学院第一附属医院儿科,河南 卫辉 453100)

**摘要:** **目的** 探讨 Toll 样受体(Toll-like receptor,TLR)3 和 TLR4 在原发性 IgA 肾病患者肾组织中的表达及意义。**方法** 选择 2014 年 7 月至 2019 年 6 月新乡医学院第一附属医院收治的 64 例原发性 IgA 肾病患者为研究对象,所有患儿于超声引导下定位穿刺获取肾组织标本行病理学检查,根据牛津分类法将患儿分为 M0 组(10 例)和 M1 组(54 例)。另选择同期行肾脏切除的 7 例肾肿瘤患者为对照组,取距离肿瘤组织 2 cm 以上的正常肾组织的肾皮质。采用免疫组织化学法检测所有患儿肾组织中 TLR3 和 TLR4 的表达。**结果** 对照组患儿肾小管上皮细胞及肾小球系膜细胞中可见少许 TLR3 表达,M0 组和 M1 组患儿肾小管上皮细胞和肾小球系膜细胞中 TLR3 表达升高。对照组患儿肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞中 TLR4 无明显表达;M0、M1 组肾小管上皮细胞中 TLR4 表达明显升高,而肾小球系膜细胞中有少量表达。M0 组、M1 组和对照组患儿肾组织中 TLR3 阳性表达率分别为(65.49±7.00)%、(70.68±6.80)%和(9.97±1.41)%;M0 组、M1 组和对照组患儿肾组织中 TLR4 相对表达量分别为 0.029±0.008、0.059±0.015 和 0.003±0.001;M1 组患儿肾组织中 TLR3 阳性表达率和 TLR4 相对表达量显著高于 M0 组和对照组( $P<0.05$ ),M0 组患儿肾组织中 TLR3 阳性表达率和 TLR4 相对表达量显著高于对照组( $P<0.05$ )。**结论** TLR3 和 TLR4 在原发性 IgA 肾病患者肾组织中表达上调,且其表达水平可能与系膜增生程度有关。

**关键词:** Toll 样受体 3;Toll 样受体 4;原发性 IgA 肾病;肾组织

**中图分类号:** R726.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2021)08-0738-04

## Significance of the expression of Toll-like receptor 3 and Toll-like receptor 4 in renal tissues of children with primary IgA nephropathy

ZHU Xiaojuan,HAN Meigui,ZHANG Fangmin,HUANG Qian,ZHAO Dean,WANG Lingchao,HAN Ziming  
(Department of Pediatrics,the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University,Weihui 453100,Henan Province,China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the significance of the expression of Toll-like receptors (TLR) 3 and TLR4 in renal tissues of children with primary IgA nephropathy. **Methods** Sixty-four children with primary IgA nephropathy admitted to the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University from July 2014 to June 2019 were selected as the research subjects. All children underwent ultrasound-guided puncture to obtain renal tissue samples for pathological examination, and the children were divided into M0 group ( $n=10$ ) and M1 group ( $n=54$ ) according to the Oxford classification. In addition, 7 patients with renal tumors who underwent nephrectomy at the same time were selected as the control group, and the renal cortex of normal renal tissue more than 2 cm away from the tumor tissue was selected. The expression of TLR3 and TLR4 in renal tissues was detected by immunohistochemistry. **Results** There was a little expression of TLR3 in the renal tubular epithelial cells and glomerular mesangial cells of children in the control group, while the expression of TLR3 in the renal tubular epithelial cells and glomerular mesangial cells of children in the M0 and M1 groups was significantly increased. There was no significant expression of TLR4 in glomerular mesangial cells and renal tubular epithelial cells of children in the control group. The expression of TLR4 in renal tubular epithelial cells of children in the M0 and M1 groups was significantly increased, while there was a little expression of TLR4 in glomerular mesangial cells. The positive expression rate of TLR3 in renal tissues of children in the M0 group, M1 group and control group was (65.49±7.00)%, (70.68±6.80)% and (9.97±1.41)%, respectively. The relative expression of TLR4 in renal tissues of children in the M0 group, M1 group and control group was 0.029±0.008, 0.059±0.015 and 0.003±0.001, respectively. The positive expression rate of TLR3 and the relative expression

DOI:10.7683/xyxyxb.2021.08.008

收稿日期:2020-02-14

基金项目:河南省医学科技攻关项目(编号:201702126);河南省卫生科技创新型人才工程专项经费资助项目。

作者简介:朱小娟(1988-),女,河南漯河人,硕士,主治医师,研究方向:小儿肾脏疾病。

通信作者:韩玫瑰(1978-),女,河南商丘人,硕士,副主任医师,研究方向:小儿肾脏疾病;E-mail:rose.44@163.com。

of TLR4 in renal tissues of children in the M1 group were significantly higher than those in the M0 group and control group ( $P < 0.05$ ), and the positive expression rate of TLR3 and the relative expression of TLR4 in renal tissues of children in the M0 group were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of TLR3 and TLR4 are up-regulated in renal tissues of children with primary IgA nephropathy, and their expression levels may be related to the degree of mesangial hyperplasia.

**Key words:** Toll-like receptor 3;Toll-like receptor 4;primary IgA nephropathy;renal tissue

原发性 IgA 肾病是以血尿为主要临床表现的最常见的原发性肾小球疾病之一,其典型的病理表现为光镜下系膜细胞增生和基质增多,以局灶节段性系膜增生最为常见,少数呈弥漫性增生性肾小球肾炎伴灶性新月体形成,免疫荧光检查显示肾小球系膜区 IgA 沉积或以 IgA 为主的免疫球蛋白沉积,电镜检查显示不同程度的系膜细胞和基质增生致系膜区扩大、系膜区或系膜旁区电子致密物沉积。原发性 IgA 肾病临床表现形式多样,呈慢性进展,部分患儿进展至终末期肾脏病<sup>[1]</sup>。近年来研究发现,Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 参与 IgA 肾病的发生与发展<sup>[2]</sup>,TLR3、TLR4 在 IgA 肾病患者肾组织及外周血单个核细胞中表达上调<sup>[3]</sup>。贾妮旦等<sup>[4]</sup>研究显示,TLR1、TLR3 和 TLR9 mRNA 在原发性肾病综合征患儿外周血单个核细胞中表达显著增高,且与病情活动有相关性。张芳敏等<sup>[5]</sup>研究显示,TLR4 和 TLR7 在原发性肾病综合征患者肾组织中表达升高,且其表达与病理类型有关。本研究旨在探讨原发性 IgA 肾病患者肾组织中 TLR3、TLR4 的表达及其与病理类型的关系。

1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2014 年 7 月至 2019 年 6 月新乡医学院第一附属医院儿内科收治的原发性 IgA 肾病患者为研究对象。病例纳入标准:(1)符合原发性 IgA 肾病诊断标准<sup>[1]</sup>,并在超声引导下肾穿刺术获得肾组织经病理学检查确诊;(2)年龄 < 18 岁;(3)处于疾病活动期;(4)未使用过糖皮质激素等免疫抑制剂;(5)病历资料完整。排除标准:(1)合并遗传性肾病或家族性肾病等;(2)合并其他严重疾病。本研究共纳入原发性 IgA 肾病 64 例,根据牛津分类法<sup>[6-7]</sup>将患儿分为 M0 组和 M1 组。M0 组 10 例,男 7 例,女 3 例;年龄 2.9 ~ 16.0 (9.23 ± 4.48) 岁;镜下血尿 3 例,肉眼血尿 7 例;尿蛋白水平:阴性 2 例, < 25 mg · kg<sup>-1</sup> 3 例, 25 ~ 50 mg · kg<sup>-1</sup> 2 例, > 50 mg · kg<sup>-1</sup> 3 例。M1 组 54 例,男 41 例,女 13 例;年龄 3.2 ~ 17.0 (9.45 ± 3.17) 岁;镜下血尿 21 例,肉眼血尿 33 例;尿蛋白水平:阴性 5 例, < 25 mg · kg<sup>-1</sup> 10 例, 25 ~ 50 mg · kg<sup>-1</sup> 7 例, > 50 mg · kg<sup>-1</sup> 32 例。2 组患儿的性别、年龄、血尿情况及尿蛋白水平比较差异均无统计学意义 ( $P >$

0.05),具有可比性。另选择同期于新乡医学院第一附属医院儿外科行肾脏切除的 7 例肾肿瘤患儿作为对照组(取距离肿瘤组织 2 cm 以上的正常组织的肾皮质),男 6 例,女 1 例;年龄 1.2 ~ 14.0 (6.66 ± 5.00) 岁。3 组患儿的性别、年龄比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),具有可比性。本研究通过医院医学伦理委员会批准,所有受试者家属签订知情同意书。

**1.2 试剂与仪器** 柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS)、二氨基联苯胺购自福州迈新生物技术开发有限公司, Anti-TLR3 抗体、Anti-TLR4 抗体购自美国 Abcam 公司, GTVisionTM III 抗兔/鼠通用型免疫组织化学检测试剂盒购自基因科技(上海)股份有限公司, Nikon ECLIPSE50i 显微成像系统购自日本 Nikon 公司, TS-12A 生物组织自动脱水机购自孝感奥华医疗科技有限公司, LEICA SM2400 推拉式切片机、LEICA 1210 摊片机购自德国 Leica 公司。

**1.3 免疫组织化学法检测肾组织中 TLR3 和 TLR4 表达** 采用免疫组织化学二步法检测肾组织中 TLR3 和 TLR4 的表达,具体步骤如下:肾组织常规烤片,脱蜡至水;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;柠檬酸盐缓冲液中行抗原修复,高火 5 min,中火 5 min,冷却至常温;PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;过氧化氢清除内源性过氧化物酶 15 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;滴加山羊封闭血清 10 min,倾去血清,加入一抗(滴度 1 : 100),于湿盒内 4 ℃ 过夜;复温 30 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;加入适量二抗,置湿盒内 37 ℃ 孵育 30 min, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;二氨基联苯胺显色,苏木素复染 40 s,流动水冲洗 1 min,脱水,封片,光学显微镜下观察。使用正常山羊血清代替一抗进行阴性对照,以 PBS 液代替一抗作为空白对照。

**1.4 免疫组织化学结果判定** TLR3 阳性表达为细胞核着色,TLR4 阳性表达为细胞质着色,TLR3 和 TLR4 阳性表达呈棕黄色或棕褐色。在固定光源亮度和曝光条件下,每张切片随机采集 10 个高倍镜 (×400) 视野,采用 Nikon ECLIPSE50i 显微镜及成像系统(日本 Nikon 公司)拍照;计数每个高倍视野中 TLR3 阳性细胞数,并计算 TLR3 阳性表达率;应用 Image-Pro Plus 图像分析软件分析图像的吸光度值,以吸光度值表示 TLR4 的相对表达量。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS 19.0 进行数据统计与分析。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验;计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验; $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

3 组患儿肾组织中 TLR3 和 TLR4 的表达结果见图 1 和表 1。对照组患儿肾小管上皮细胞及肾小球系膜细胞中可见少许 TLR3 表达,M0 组和 M1 组患儿肾小管上皮细胞和肾小球系膜细胞中 TLR3 表达明显升高。对照组患儿肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞中 TLR4 无明显表达;M0、M1 组肾小管上皮细胞中 TLR4 表达明显升高,而肾小球系膜细胞中有少量表达。M1 组患儿肾组织中 TLR3 阳性表达率和 TLR4 相对表达量显著高于 M0 组和对照组,M0 组患儿肾组织中 TLR3 阳性表达率和 TLR4 相对表达量显著高于对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

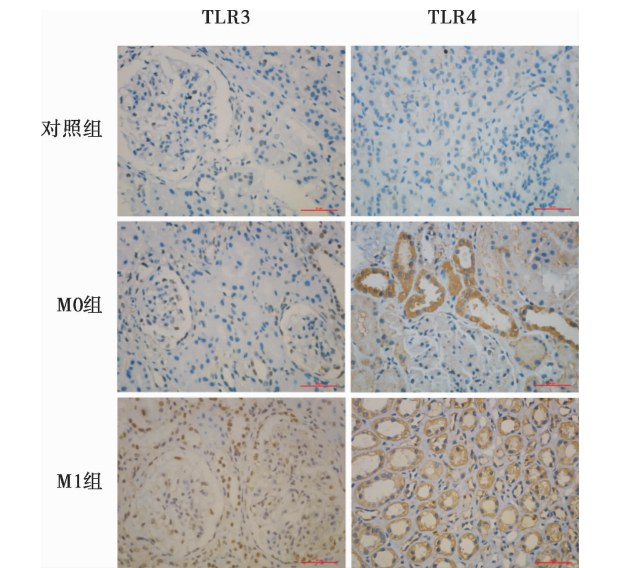


图 1 3 组患儿肾组织中 TLR3 和 TLR4 的表达  
Fig.1 Expression of TLR3 and TLR4 in renal tissues of children in the three groups

表 1 3 组患儿肾组织中 TLR3 和 TLR4 表达比较  
Tab.1 Comparison of the expression of TLR3 and TLR4 in renal tissues of children among the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	TLR3 阳性表达率/%	TLR4 相对表达量
对照组	7	9.97 ± 1.41	0.003 ± 0.001
M0 组	10	65.49 ± 7.00 <sup>a</sup>	0.029 ± 0.008 <sup>a</sup>
M1 组	54	70.68 ± 6.80 <sup>ab</sup>	0.059 ± 0.015 <sup>ab</sup>
<i>F</i>		268.714	69.599
<i>P</i>		<0.05	<0.05

注:与对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 M0 组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

3 讨论

IgA 肾病是儿童常见的原发性肾小球疾病,临床表现多样,目前,IgA 肾病的病因和发病机制尚不

完全清楚,近年来,越来越多的研究集中在其免疫发病机制方面;然而,先天性免疫细胞,如树突状细胞、巨噬细胞、自然杀伤细胞和一些先天性淋巴细胞对于肾脏免疫稳态是必不可少的,先天性免疫反应提供了由几类模式识别受体引发的宿主防御的第一道防线,如细胞膜结合的 TLR 等<sup>[8]</sup>,TLR 在免疫应答和炎症反应中起重要作用,而 IgA 肾病发病前常伴有细菌或病毒感染,细菌或病毒感染之后出现血尿或病情反复。

本研究结果显示,TLR3 和 TLR4 在原发性 IgA 肾病患者肾组织中的表达明显增多,且 M1 组患儿肾组织中 TLR3 阳性表达率和 TLR4 相对表达量显著高于 M0 组,结合前期研究发现 TLR3 和 TLR4 在 IgA 肾病外周血单个核细胞中表达增加<sup>[3]</sup>,提示 TLR 与 IgA 肾病的发生和发展有关。有研究显示,TLR4 途径可能通过诱导转录因子如核转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 而参与 IgA 肾病的进展<sup>[9]</sup>。对 IgA 肾病大鼠的研究发现,过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$  激动剂可通过抑制 TLR4 的表达和活性而发挥抗炎作用<sup>[10]</sup>。王纓等<sup>[11]</sup> 研究发现,IgA 肾病大鼠肾组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 蛋白及 mRNA 的表达均明显上调,同时 TLR4 表达与 MyD88、NF- $\kappa$ B 的表达呈正相关。本研究结果显示,TLR4 主要表达于肾小管,M1 组患儿肾组织中 TLR4 相对表达量显著高于 M0 组,提示肾组织中 TLR4 的表达与系膜增生有关。

有研究显示,TLR3 与肾小球肾炎的发展有关,应用人工合成的双链 RNA 类似物聚肌胞苷酸诱导培养人正常的肾小球系膜细胞,发现人肾小球系膜细胞表达中性粒细胞趋化因子[ chemokine (C-X-C motif) ligand 1 protein,CXCL1 ],而干扰素- $\beta$  有助于 CXCL1 表达,该过程中有 TLR3、NF- $\kappa$ B 和干扰素调节因子 3 的参与,同时,IgA 肾病肾组织中也发现少量 CXCL1 表达,提示 TLR3 信号通路参与了人肾小球系膜细胞表达 CXCL1<sup>[12]</sup>。本研究结果显示,TLR3 在 IgA 肾病患者肾组织的肾小球系膜细胞及肾小管上皮细胞中表达,且 M1 组患儿肾组织中 TLR3 阳性表达率显著高于 M0 组,提示肾组织中 TLR3 的表达与系膜增殖有关。聚肌胞苷酸通过 TLR3/ B 细胞活化因子 (B cell-activating factor, BAFF) 信号通路,促进 IgA 肾病患者 IgA 分泌、IgA 类别转换和 IgA 肾小球沉积,而 TLR3 和 BAFF 小干扰 RNA 可使分泌型 IgA 过度表达现象减弱<sup>[13]</sup>。SAITO 等<sup>[14]</sup> 研究显示,IgA 肾病患者外周血单个核细胞中 TLR3 表达量显著高于薄基底膜肾病患者,同时,TLR3 mRNA 表达水平与 IgA 肾病患者尿蛋白排泄量相关。

综上所述,TLR3 和 TLR4 在原发性 IgA 肾病患者肾脏组织中表达明显增多,且 M1 组患者肾脏组织中 TLR3 和 TLR4 表达明显高于 M0 组,提示 TLR3 和 TLR4 可能与 IgA 肾病系膜增殖程度相关。本研究只观察了 TLR3 和 TLR4 与系膜增殖情况的关系,未进一步观察 TLR3 和 TLR4 与毛细血管内增生性病变、节段性硬化粘连、间质纤维化及小管萎缩等的关系,有待更大样本量的进一步研究。

参考文献:

[1] 中华医学会儿科学分会肾脏学组. 原发性 IgA 肾病诊治循证指南(2016)[J]. 中华儿科杂志,2017,55(9):643-646.

[2] 王云,徐达良,董杨. Toll 样受体与 IgA 肾病发病机制的研究进展[J]. 国际儿科学杂志,2014,41(6):577-580.

[3] 朱小娟,韩玫瑰,赵德安,等. Toll 样受体 3 和 4 在原发性 IgA 肾病患者肾脏组织及外周血单个核细胞中表达的意义[J]. 中华实用儿科临床杂志,2017,32(17):1309-1312.

[4] 贾妮旦,赵德安,刘海玉,等. Toll 样受体-1、-3、-9 在原发性肾病综合征患儿外周血单个核细胞中的表达[J]. 中华实用儿科临床杂志,2018,33(17):1323-1326.

[5] 张芳敏,韩子明,赵德安. Toll 样受体 4 和 Toll 样受体 7 在儿童原发性肾病综合征患儿肾脏组织中的表达及意义[J]. 临床儿科杂志,2014,32(6):512-516.

[6] WORKING GROUP OF THE INTERNATIONAL IGA NEPHROPATHY NETWORK AND THE RENAL PATHOLOGY SOCIETY. The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility [J]. *Kidney Int*, 2009, 76 ( 5 ) : 546-556.

[7] WORKING GROUP OF THE INTERNATIONAL IGA NEPHROPATHY NETWORK AND THE RENAL PATHOLOGY SOCIETY. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification [J]. *Kidney Int*, 2009, 76 ( 5 ) : 534-545.

[8] WANG Y H, ZHANG Y G. Kidney and innate immunity [J]. *Immunol Lett*, 2017, 183 : 73-78.

[9] CIFERSKA H, HONSOVA E, LODEREROVA A, *et al*. Does the renal expression of Toll-like receptors play a role in patients with IgA nephropathy? [J]. *J Nephrol*, 2020, 33 ( 2 ) : 307-316.

[10] ZOU J N, XIAO J, HU S S, *et al*. Toll-like receptor 4 signaling pathway in the protective effect of pioglitazone on experimental immunoglobulin a nephropathy [J]. *Chin Med J ( Engl )*, 2017, 130 ( 8 ) : 906-913.

[11] 王纓,汪国平,李弼民. IgA 肾病大鼠肾脏组织中 Toll 样受体 4 的表达及意义[J]. 广东医学,2015,36(20):3123-3126.

[12] IMAIZUMI T, AIZAWA T, SEGAWA C, *et al*. Toll-like receptor 3 signaling contributes to the expression of a neutrophil chemoattractant, CXCL1 in human mesangial cells [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2015, 19 ( 5 ) : 761-770.

[13] HE L Y, PENG X F, WAN J Y, *et al*. Synthetic double-stranded RNA poly ( I : C ) aggravates IgA nephropathy by triggering IgA class switching recombination through the TLR3-BAFF axis [J]. *Am J Nephrol*, 2015, 42 ( 3 ) : 185-197.

[14] SAITO A, KOMATSUDA A, KAGA H, *et al*. Different expression patterns of Toll-like receptor mRNAs in blood mononuclear cells of IgA nephropathy and IgA vasculitis with nephritis [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2016, 240 ( 3 ) : 199-208.

( 本文编辑:徐自超 )

( 上接第 737 页 )

[16] WESLEY U V, BHUTE V J, HATCHER J F, *et al*. Local and systemic metabolic alterations in brain, plasma, and liver of rats in response to aging and ischemic stroke, as detected by nuclear magnetic resonance ( NMR ) spectroscopy [J]. *Neurochem Int*, 2019, 127 : 113-124.

[17] ORBAN A, GARG G, SAMMI M K, *et al*. Effect of high-intensity exercise on multiple sclerosis function and phosphorous magnetic resonance spectroscopy outcomes [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2019, 51 ( 7 ) : 1380-1386.

[18] SAILASUTA N, ANANWORANICH J, LERDLUM S, *et al*. Neuronal-glia markers by magnetic resonance spectroscopy in HIV before and after combination antiretroviral therapy [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2016, 71 ( 1 ) : 24-30.

[19] BOBAN J, KOZIC D, TURKULOV V, *et al*. HIV-associated neurodegeneration and neuroimmunity: multivoxel MR spectroscopy study in drug-naïve and treated patients [J]. *Eur Radiol*, 2017, 27 ( 10 ) : 4218-4236.

[20] SARAC H, OZRETIC D, HENIGSBERG N, *et al*. Proton magnetic

resonance spectroscopy in huntington's disease accompanying neuroborreliosis [J]. *Psychiatr Danub*, 2017, 29 ( 2 ) : 226-230.

[21] SHEN Z, LEI J, LI X, *et al*. Multifaceted assessment of the APP/PS1 mouse model for Alzheimer's disease: applying MR-S, DTI, and ASL [J]. *Brain Res*, 2018, 1698 : 114-120.

[22] BURMANN B M, GEREZ J A, MATECKO-BURMANN I, *et al*. Regulation of  $\alpha$ -synuclein by chaperones in mammalian cells [J]. *Nature*, 2020, 577 ( 7788 ) : 127-132.

[23] CHAUDHARY S, KUMARAN S S, GOYAL V, *et al*. Frontal lobe metabolic alterations characterizing Parkinson's disease cognitive impairment [J]. *Neurol Sci*, 2021, 42 ( 3 ) : 1053-1064.

[24] 庄蓉,张辉,职璞,等. 磁共振波谱在强迫障碍中的研究进展 [J]. 国际精神病学杂志,2020,47(2):227-229,246.

[25] WANG W, SUN H, SU X, *et al*. Increased right amygdala metabolite concentrations in the absence of atrophy in children and adolescents with PTSD [J]. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 2019, 28 ( 6 ) : 807-817.

( 本文编辑:孟 月 )