

• 论 著 •

HMGB1、TLR4、STAT3 在抗肾小球基底膜型肾小球肾炎小鼠模型中的表达及意义

钱阳晶

(湖北省武汉市江夏区人民医院肾内科, 武汉 430200)

摘要:目的 探讨高迁移率族蛋白 1(HMGB1)、Toll 样受体-4(TLR4)、信号转导和转录激活因子 3(STAT3)在抗肾小球基底膜型肾小球肾炎小鼠模型中的表达及意义。方法 收集 30 只小鼠,随机分为正常小鼠组(对照组)、抗肾小球基底膜型肾小球肾炎建模组(试验组),每组 15 只。采用对氨基水杨酸(PAS)染色观察肾小球基底膜变化,实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)法检测肾组织中的 HMGB1、p-STAT3 mRNA,采用 Western blot 法检测肾组织中的 HMGB1、TLR4、STAT3、p-STAT3。结果 与对照组比较,试验组小鼠肾小球基底膜明显增厚,小鼠肾组织中 HMGB1、TLR4、STAT3、p-STAT3 及 HMGB1 mRNA、p-STAT3 mRNA 的相对表达量均明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。试验组小鼠肾组织中 HMGB1 与 TLR4、TLR4 与 p-STAT3、HMGB1 与 p-STAT3、HMGB1 mRNA 与 p-STAT3 mRNA 的表达水平之间呈正相关($r = 0.401, P = 0.005; r = 0.399, P = 0.005; r = 0.412, P = 0.004; r = 0.398, P = 0.005$)。结论 HMGB1 在抗肾小球基底膜型肾小球肾炎小鼠中的致炎作用,可以通过结合其受体 TLR4 而激活 STAT3,从而实现抗肾小球基底膜型肾小球肾炎发生。

关键词:抗肾小球基底膜型肾小球肾炎; 高迁移率族蛋白 1; Toll 样受体-4; 信号转导和转录激活因子 3

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.17.029

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)17-2416-03

The expression and significance of HMGB1, TLR4 and STAT3 in mouse model of anti glomerular basement membrane glomerulonephritis

QIAN Yangjing

(Department of Nephrology, the Wuhan City Jiangxia District People's Hospital, Wuhan, Hubei 430200, China)

Abstract:Objective To study the expression and significance of HMGB1, TLR4 and STAT3 in the mouse model of anti glomerular basement membrane glomerulonephritis. **Methods** Totally 30 mice were randomly divided into normal group (control group), anti GBM glomerulonephritis model group (experimental group), PAS staining was used to observe the changes of glomerular basement membrane, HMGB1, p-STAT3 mRNA in renal tissue were detected by RT-PCR, HMGB1, TLR4, STAT3, p-STAT3 in renal tissue was detected by Western blot method. **Results** Compared with the control group, the experimental group of mice glomerular basement membrane thickening; the relative expression of HMGB1, TLR4, STAT3, p-STAT3 and HMGB1 mRNA, p-STAT3 mRNA in the kidney tissue of experimental group were significantly higher than the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression level of HMGB1 and TLR4, TLR4 and p-STAT3, HMGB1 and p-STAT3, HMGB1 mRNA and p-STAT3 mRNA in renal tissues of mice in experimental group, there were a positive correlation ($r = 0.401, P = 0.005; r = 0.399, P = 0.005; r = 0.412, P = 0.004; r = 0.398, P = 0.005$). **Conclusion** The inflammatory effect of HMGB1 in mice with anti glomerular basement membrane glomerulonephritis can activate STAT3 by binding to its receptor TLR4, so as to achieve anti glomerular basement membrane glomerulonephritis.

Key words: anti glomerular basement membrane glomerulonephritis; high mobility group box 1 protein; toll like receptor-4; signal transducers and activators of transcription 3

抗肾小球基底膜型肾小球肾炎是由于循环中存在抗Ⅳ型胶原的 $\alpha 3$ 链的非胶原区的自身抗体所引起一种主要累及肺脏和肾脏的疾病。临床多表现为急性肾炎综合征,病情重笃,进展快,如不及时诊治,大部分患者会发展为慢性肾功能不全、尿毒症^[1-2]。对其发病机制没有明确的说法,因而对其肾组织中的一些表达蛋白分析,从而可为分析该病的发病机制起到一定作用。高迁移率族蛋白 1(HMGB1)在多种疾病中具有高表达,但是关于 HMGB1、Toll 样受体-4(TLR4)、信号转导和转录激活因子 3(STAT3)在抗肾小球基底膜型肾小球肾炎小鼠中的表达未见相关报道,而且大量的研究显示 HMGB1 的高表达会提示疾病的发生^[3]。因此,本研究对 HMGB1、TLR4、STAT3 在抗肾小球基底膜型肾小球肾炎小鼠中的表达进行研究,从而确定抗肾小球基底膜型肾小球肾炎发病的可能机制。

1 材料与与方法

1.1 材料 选取 2012 年 12 月至 2013 年 6 月的 11 周雌性小

鼠,体质量为(20.2±8.9)g,随机分为正常小鼠组(对照组)、抗肾小球基底膜型肾小球肾炎建模组(试验组),每组 15 只。喂食到 16 周后进行试验;购于第三军医大学实验动物中心。免疫组化检测试剂盒(上海研卉生物科技有限公司生产),植物总 RNA 提取试剂盒(DP432),动物组织总 RNA 提取试剂盒(上海研卉生物科技有限公司生产),目的基因引物和实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(上海研卉生物科技有限公司提供),兔抗小鼠 TLR4 多克隆抗体(上海嵘崑达实业有限公司提供),Phospho-兔抗小鼠 STAT3 多克隆抗体(上海嵘崑达实业有限公司提供),兔抗小鼠 HMGB1 多克隆抗体(上海嵘崑达实业有限公司提供)。

1.2 方法

1.2.1 抗肾小球基底膜型肾小球肾炎小鼠模型建立 参考文献[4]制备抗肾小球基底膜型肾小球肾炎抗原,然后取雄性小鼠,将正常兔子的 IgG 与弗氏不完全佐剂充分乳化,制成油包

水,以 10 mg/kg 注入小鼠腹腔,第 5 天经耳缘静脉注入肾毒血清(25 mg/kg)。

1.2.2 标本采集 两组小鼠建模后均在 16 周后进行眼眶取血,取血后进行离心并分离血清,然后将小鼠处死;将处死小鼠的双侧肾脏皮质进行切取后分别用 4%多聚甲醛和 2.5%戊二醛进行双侧肾脏的固定,另取部分肾组织进行 RNA 的提取并进行转录蛋白的测定。

1.2.3 肾小球基底膜的对氨基水杨酸(PAS)染色法^[5] 取 2 μm 的制备好的石蜡切片,对切片进行常规脱蜡处理,然后加入高碘酸氧化液反应 15 min,接着采用 Schiff 液进行染色 10 min,染色结束后用流水进行冲洗 5 min,然后采用苏木素液染核进行染色 2~3 min,染色结束后进行盐酸乙醇的分化,氨水返蓝后再采用不同浓度的乙醇溶液进行梯度脱水,至二甲苯的颜色为透明为止,然后使用中性的树脂进行封片,最后在光学显微镜下进行观察。如果观察到肾小球毛细血管基膜呈紫红色为阳性。

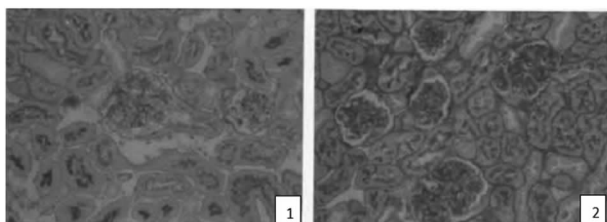
1.2.4 Western blot 检测 HMGB1、TLR4、STAT3、p-STAT3 蛋白的表达^[6] 采集血液经过处理后,采用 HMGB1、TLR4、STAT3、p-STAT3 抗体,37 °C 孵育 24 h,弃去培养液,用 PBS 冲洗 3 次,然后用蛋白裂解液将获得的细胞进行裂解,放在冰上 5 min,收集细胞裂解液并进行煮沸(时间为 25 min),用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行电泳,并将其转膜到硝酸纤维素(NC)膜上。对抗体孵育处理,经化学发光法曝光后观察结果。

1.2.5 RT-PCR 法检测肾组织中的 HMGB1、p-STAT3 mRNA 以正常大鼠来源的组织 RNA 为对照,来计算相对基因表达。引物序列:HMGB1 的上游为 5'-TGG TAC ATA TCG GGC TAG AAG-3',下游为 5'-CCA TAC TGT ACC AGG CAA GGT-3',扩增范围 399 bp;p-STAT3 的上游为 5'-CCT ACC TGG GGA TCA AT-3',下游为 5'-GCT CCA GGT CGA TTC GTC TCA C-3',扩增范围 457 bp;GAPDH 的上游为 5'-TAT CCC ACC CGT GCT TAC-3',下游为 5'-CTG TCC CCT AGA ACT TCC-3',扩增范围 140 bp。用 RNAprep pure RNA 提取试剂盒提取两组小鼠的肾皮质总 RNA,经过逆转录后合成 cDNA,再经 PCR 进行扩增合成目的 DNA。把目的基因与内参照 GAPDH 一起进行 PCR 扩增^[7]。PCR 反应条件^[8]:取 5 μL PCR 产物,然后分别加入 1 μL 剂量的 6 倍溴酚蓝缓冲液进行混合后,上样于 2%琼脂糖凝胶上进行稳压(电压设定为 7 V/cm)电泳,持续 45 min 后,采用凝胶成像分析系统对电泳条带进行观察、拍摄图像。

1.3 统计学处理 所有数据均由 SPSS26.0 软件进行统计分析,正态分布数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, HMGB1、TLR4、STAT3、p-STAT3 蛋白水平, HMGB1、p-STAT3 mRNA 表达量进行 *t* 检验, Pearson 相关进行相关性分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组小鼠的肾小球基底膜 PAS 染色结果 与对照组比较, 试验组小鼠肾小球基底膜明显增厚, 具体见图 1。



注:1 为对照组;2 为试验组。

图 1 两组小鼠的肾小球基底膜 PAS 染色

2.2 两组小鼠的 Western blot 法检测 HMGB1、TLR4、STAT3、p-STAT3 蛋白的表达结果 经 *t* 检验统计分析, 试验组的 HMGB1、TLR4、STAT3、p-STAT3 蛋白的表达水平明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 两组小鼠的 Western blot 法检测 HMGB1、TLR4、STAT3、p-STAT3 蛋白的表达结果($\bar{x} \pm s, \text{mg/mL}$)

组别	n	HMGB1	TLR4	STAT3	p-STAT3
试验组	15	26.3±5.6	29.6±8.9	21.6±5.8	40.3±12.6
对照组	15	12.3±2.6	18.9±2.7	10.6±2.9	19.8±5.8
<i>t</i>		8.782	4.456	6.570	5.724
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

2.3 两组小鼠的 RT-PCR 法检测肾组织中的 HMGB1、p-STAT3 mRNA 结果 经 *t* 检验统计分析, 试验组的 HMGB1、p-STAT3 mRNA 表达水平明显高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组小鼠的 RT-PCR 法检测肾组织中的 HMGB1、p-STAT3 mRNA 结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HMGB1 mRNA	p-STAT3 mRNA
试验组	15	1.21±0.12	1.19±0.11
对照组	15	0.82±0.10	0.78±0.13
<i>t</i>		9.670	9.324
<i>P</i>		<0.05	<0.05

2.4 试验组小鼠的 HMGB1、TLR4、STAT3、p-STAT3 间的关系 经 Pearson 相关进行相关性分析, 试验组小鼠肾组织中 HMGB1 与 TLR4, TLR4 与 p-STAT3, HMGB1 与 p-STAT3, HMGB1 mRNA 与 p-STAT3 mRNA 的表达水平之间呈正相关($r = 0.401, P = 0.005; r = 0.399, P = 0.005; r = 0.412, P = 0.004; r = 0.398, P = 0.005$)。

3 讨 论

抗肾小球基底膜型肾小球肾炎小鼠模型中的雄性小鼠可以携带 Y 染色体进行连锁的自身免疫增强基因,而在小鼠发育到第 11 周龄时,小鼠就开始发生自发性自身免疫性疾病,主要为以炎症为主的肾小球疾病,而且早期会伴有明显的肾小球系膜细胞增殖^[9-10]。本研究发现,16 周时, PAS 染色观察肾小球基底膜变化,试验组的肾小球基底膜明显增加,说明了抗肾小球基底膜型肾小球肾炎小鼠的肾组织发生病变。

抗肾小球基底膜型肾小球肾炎发病过程中肾组织固有的细胞能够合成和分泌 HMGB1,而 HMGB1 表达的升高与肾小球固有细胞增生有关^[11]。HMGB1 作为一种疾病晚期的炎症介质,经常与如 IL-1、IL-6、IL-8 等细胞因子发生相互诱导、相互促进作用,就会使疾病发生的程度不断增加。STAT3 与 p-STAT3 经酪氨酸激酶(JAKs)活化后转移到细胞核内,可以启动机体内的相关基因表达,调节机体的天然免疫及获得性免疫应答反应^[12]。本研究的结果显示,试验组的 HMGB1、STAT3 和 p-STAT3 表达水平和 HMGB1 和 p-STAT3 mRNA 表达量均明显高于对照组,而且 HMGB1 与 p-STAT3 呈正相关,而且 HMGB1 和 p-STAT3 mRNA 呈正相关,因此, HMGB1 与 p-STAT3 结合后而引发免疫应答,从而介导抗肾小球基底膜型肾小球肾炎的发生。

HMGB1 的受体 TLR 具有识别外来微生物的危险信号受体,对免疫表达具有重要的意义^[13]。TLR4 是机体与 LPS 反应中的主要信号转导分子^[14]。本研究的结果显示通过分析检测两组小鼠的 TLR4 的表达情况,试验组小鼠肾组织中 TLR4 的表达量明显高于对照组小鼠,而且 HMGB1 与 TLR4 的表达

呈明显正相关。因此,可以认为 HMGB1 与 TLR4 结合后而引发机体的免疫应答,从而介导抗肾小球基底膜型肾小球肾炎的发生。本研究结果显示 HMGB1 在抗肾小球基底膜型肾小球肾炎小鼠的肾脏中表达处于升高状态,而且 HMGB1 的表达与 TLR4、p-STAT3 表达水平呈现明显正相关,会随着 HMGB1 的表达的增加而增加。这个结果提示 HMGB1 能促进抗肾小球基底膜型肾小球肾炎的发生,而且 HMGB1 在抗肾小球基底膜型肾小球肾炎中的致炎作用中发生重要作用,可以结合其受体 TLR4,并激活机体内的 STAT3,从而实现抗肾小球基底膜型肾小球肾炎的发生,这和其他学者的研究结果基本一致^[15]。

综上所述, HMGB1 在抗肾小球基底膜型肾小球肾炎小鼠中的致炎作用,可以通过结合其受体 TLR4 而激活 STAT3,从而实现抗肾小球基底膜型肾小球肾炎发生。

参考文献

[1] 薛鲁,杨晓倩,朱峰华,等. 抗肾小球基底膜抗体肾炎动物模型的建立及应用研究[J]. 上海中医药大学学报, 2015, 29(4):58-62.

[2] 刘琳,牟利军,文煜冰,等. 钙调神经蛋白在抗肾小球基底膜病肾小球内的表达增强[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(4):400-405.

[3] 刘伟. 肾功能正常的抗肾小球基底膜病临床分析[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2014, 10(10):2594-2596.

[4] 谢鸿玉,梁炎春,姚书忠. HMGB1 调节 Treg 细胞参与子宫内膜异位症发病的免疫机制[J]. 国际生殖健康计划生育杂志, 2016, 35(2):160-164.

[5] Qing C, Xiao G, Xiao Z, et al. The role of high mobility group box 1(HMGB1) in the pathogenesis of kidney diseases[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2016, 6(3):183-188.

[6] 王晓天,李向阳,秦苏萍,等. p38MAPK 介导的 Fas/FasL 凋亡信号通路在大鼠抗 GBM 肾炎中的作用[J]. 中国免

疫学杂志, 2012, 28(11):979-985.

[7] Li M, Fan L, Ying W, et al. The HMGB1 signaling pathway activates the inflammatory response in Schwann cells [J]. Neural Regen Res, 2015, 10(10):1706-1712.

[8] 张玉军,刘淑霞,杨敏,等. 狼疮性肾炎小鼠肾组织中 HMGB1、TLR4、STAT3、PCNA 的表达及意义[J]. 山东医药, 2013, 53(8):26-30.

[9] 陈芙蓉,姜溪,岳南,等. 固肾 1 号治疗大鼠抗肾小球基底膜肾炎及其机制研究[J]. 现代药物与临床, 2015, 30(2):126-131.

[10] 华胜妮,肖芦山,吴德华. HMGB1 对人鼻咽癌细胞株 C666-1 体外增殖的影响[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(11):1540-1545.

[11] 魏晓萍,惠起源. HMGB1 与肿瘤的相关性[J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(7):1639-1642.

[12] Jone M, Park MH, Kollipara PS, et al. Anti-cancer effect of bee venom toxin and melittin in ovarian cancer cells through induction of death receptors and inhibition of JAK2/STAT 3 pathway[J]. Oxicol Appl Pharmacol, 2012, 258(1):72-81.

[13] 赵华俊,林昂,韩秋菊,等. TLR4 通路对 polyI:C 诱导肝癌细胞凋亡的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(1):30-33.

[14] Lehtimki S, Lahesmaa R. Regulatory T Cells Control Immune Responses through Their Non-Redundant Tissue Specific Features[J]. Front Immunol, 2013, 4(5):294-300.

[15] Nikolaou K, Sarris M, Talianidis I. Molecular pathways: The complex roles of inflammation pathways in the development and treatment of liver cancer [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(11):2810-2816.

(收稿日期:2017-02-09 修回日期:2017-04-09)

(上接第 2415 页)

者术后感染的临床研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(9):2072-2073.

[2] Gurjar M. Colistin for lung infection; an update[J]. J Int Care, 2015, 3(1):3-15.

[3] 徐翠萍,张波. 支气管肺泡灌洗在免疫抑制患者肺部感染中的诊断价值[J]. 国际呼吸杂志, 2014, 34(6):455-460.

[4] Liu D, Su LX, Guan W, et al. Prognostic value of procalcitonin in pneumonia: A systematic review and meta-analysis[J]. Respirology, 2016, 21(2):280-288.

[5] Hutton C, Yan E, Yawno T, et al. Injury of the developing cerebellum; a brief review of the effects of endotoxin and asphyxial challenges in the late gestation sheep fetus[J]. Cerebellum, 2014, 13(6):777-786.

[6] 中华医学会呼吸病学分会. 医院获得性肺炎诊断和治疗指南(草案)[J]. 现代实用医学, 2002, 14(3):160-161.

[7] 赵山红,高劲谋,胡平,等. 521 例腹部创伤的救治分析[J]. 重庆医学, 2015, 44(6):769-771.

[8] 时红云,鲁燕飞. 损伤控制性手术在严重腹部创伤治疗中的效果观察[J]. 现代诊断与治疗, 2016, 27(2):340-342.

[9] 赵剑. 损伤控制手术在肝胆外科中的应用[J]. 现代临床医学, 2015, 41(1):59-60.

[10] 王焱,段绍斌,张增峰,等. 腹部外伤剖腹探查后再次手术 22 例分析[J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(6):688-690.

[11] Karagiannis K, Girio C, Nakouti T. Procalcitonin; a new biomarker for medullary thyroid cancer [J]. Anticancer Res, 2016, 36(8):3803-3810.

[12] Liu H, Guo B, Geng Y, et al. Procalcitonin: present and future[J]. Ir J Med Sci, 2015, 184(3):597-605.

[13] Bolden S, Warburton E, Phelan R, et al. Endotoxin recovery using limulus ameocyte lysate(LAL) assay[J]. Biologicals, 2016, 44(5):434-440.

[14] 王瑞霞,安培华,薛德冬,等. 医院门诊处方抗菌药物临床使用分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(15):3580-3581.

[15] 施永新,宋卫青,李化会. 血清降钙素原与内毒素对医院获得性肺炎病原诊断和疗效的判断价值[J]. 中国感染控制杂志, 2016, 15(1):41-44.

[16] Hara M, Tsuchiya K, Nitta K, et al. Measurements of procalcitonin facilitate targeting of endotoxin adsorption treatment in febrile neutropenic patients suffering from shock[J]. Clin Nephrol, 2014, 81(1):67-70.

(收稿日期:2017-03-02 修回日期:2017-05-05)