

· 论 著 ·

# 外周血单核细胞 Toll 样受体 2 及 Toll 样受体 4 表达与糖尿病肾病的相关性

陈松锦

(广东省东莞市人民医院内分泌科 523000)

**摘要:**目的 检测糖尿病慢性肾病中外周血单核细胞 Toll 样受体 2(TLR2)及 Toll 样受体 4(TLR4)的表达水平,探讨 TLR2、TLR4 与糖尿病肾病的相关性。方法 选取内分泌科住院的 2 型糖尿病患者 152 例,将患者分为单纯糖尿病组、早期糖尿病肾病组、临床糖尿病肾病组,另选取体检科健康体检者 36 例作为对照组。采用流式细胞仪检测 TLR2 和 TLR4 的蛋白表达。采用 RT-PCR 检测 TLR2 和 TLR4 mRNA 的表达,采用 ELISA 检测血清 MCP-1、hs-CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-18 水平。结果 单纯糖尿病组、早期糖尿病肾病组 TLR4 mRNA、TLR4 蛋白、TLR2 mRNA 和 TLR2 蛋白水平均低于临床糖尿病肾病组( $P < 0.01$ );单纯糖尿病组、早期糖尿病肾病组 MCP-1、hs-CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-18 水平均低于临床糖尿病肾病组( $P < 0.01$ );TLR2 水平与 UAE 呈正相关( $Y = 0.013X + 1.2956, R^2 = 0.8955$ ),TLR4 水平与 UAE 呈正相关( $Y = 0.006X + 1.6500, R^2 = 0.8026$ )。结论 TLR4 和 TLR2 水平可以反映糖尿病肾病发展程度,TLR4 和 TLR2 可作为糖尿病肾病的检测指标。

**关键词:**糖尿病肾病; Toll 样受体 2; Toll 样受体 4; 单核细胞

**DOI:**10.3969/j.issn.1672-9455.2017.12.023 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)12-1747-03

## Correlation between Toll like receptor 2 and toll like receptor 4 expressions in peripheral blood mononuclear cells with diabetic nephropathy

CHEN Songjin

(Department of Endocrinology, Dongguan Municipal People's Hospital, Dongguan, Guangdong 523000, China)

**Abstract:** Objective To detect the expression levels of Toll like receptor 2(TLR2) and Toll like receptor 4(TLR4) in peripheral blood mononuclear cells in diabetic nephropathy, and to investigate the correlation between TLR2 and TLR4 with chronic nephropathy. Methods One hundred and fifty-two inpatients with T2DM in the endocrinology department of our hospital were selected and divided into the simple diabetes mellitus group(SDM), early diabetic nephropathy group(EDN) and clinical diabetic kidney disease group(DKD). Other 36 individuals undergoing the physical examination were selected as the control group. The flow cytometry was used to detect the protein expression of TLR2 and TLR4. The expression of TLR2 and TLR4 mRNA was detected by RT-PCR, and the serum levels of MCP-1, hs-CRP, TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-18 were detected by ELISA. Results The levels of TLR4 mRNA, TLR4 protein, TLR2 mRNA and TLR2 protein in the SDM group and EDN group were significantly lower than those in the DKD group ( $P < 0.01$ ); the levels of MCP-1, hs-CRP, TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-18 in the SDM group and EDN group were significantly lower than those in the DKD group ( $P < 0.01$ ); TLR2 and UAE showed a positive correlation ( $Y = 0.013X + 1.2956, R^2 = 0.8955$ ), TLR4 was positively correlated with UAE ( $Y = 0.006X + 1.6500, R^2 = 0.8026$ ). Conclusion TLR4 and TLR2 levels can reflect the development degree of diabetic nephropathy, so TLR4 and TLR2 can be used as the detection indexes of diabetic nephropathy.

**Key words:** Toll like receptor 2; Toll like receptor 4; diabetic chronic kidney disease; mononuclear cell

糖尿病是多种原因导致血糖超过正常范围的一种疾病。WHO 调查显示全球已有接近两千万的人患此终身难以治愈的代谢性疾病<sup>[1]</sup>。糖尿病患者大多会合并微血管并发症,其中以糖尿病肾病最为常见<sup>[2]</sup>。近年来研究表明,糖尿病肾病可认为是一种代谢紊乱所触发的炎症性疾病。Toll 样受体(TLRs)是介导慢性炎症性疾病的重要因素,其可通过与衔接蛋白(MyD88)结合,激活转录因子(如 NF- $\kappa$ B),从而促使大量细胞活性因子、黏附分子和炎症因子合成及转录表达,最终影响免疫与炎症反应<sup>[3]</sup>。而 Toll 样受体 2(TLR2)及 Toll 样受体 4(TLR4)在糖尿病肾病中扮演了如何的作用,本文针对该问题进行了研究,现报道如下。

### 1 资料和方法

**1.1 一般资料** 选取 2014 年 1 月至 2016 年 1 月于本院内分泌科住院的 2 型糖尿病患者 152 例,所有患者均符合 1999 年 WHO 糖尿病诊断标准,其中男 78 例,女 74 例;年龄 47~75 岁,平均(55.9 $\pm$ 6.8)岁;病程 2~17 年,平均病程(9.3 $\pm$ 2.8)

年。依据 Mogensen 分期<sup>[4]</sup>,将所有患者分为单纯糖尿病组[尿清蛋白排泄率(UAE) $<$ 30 mg/24 h],早期糖尿病肾病组(UAE 为 30~300 mg/24 h),临床糖尿病肾病组(UAE $>$ 300 mg/24 h)。单纯糖尿病组 47 例,早期糖尿病肾病组 59 例,临床糖尿病肾病组 46 例。另选取同期本院体检科健康体检者 36 例作为对照组,其中男 18 例,女 18 例,平均年龄(48.9 $\pm$ 8.3)岁,UAE 为 11.26 mg/24 h。各组研究对象一般资料差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。所有患者均签署了知情同意书,对试验内容了解。本研究获得本院伦理委员会批准。

**1.2 主要试剂与仪器** T Gradient 型聚合酶链反应(PCR)仪(Biometra 公司),GIS 凝胶成像分析系统(上海天能科技有限公司),冷冻高速离心机(德国 Eppendor),琼脂糖水平电泳槽(北京六一仪器厂),超低温冰箱(日本三洋),PCR 扩增试剂盒(Fermentas 公司),PCR 引物(上海生物工程有限公司),Trizol(Invitrogen 公司),流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)。酶联免疫检测仪(美国 Bio-Rad);单核细胞趋化蛋白-1(MCP-

1)、超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-6 和 IL-18 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测试剂盒(南京建成)。

**1.3 方法** 各组研究对象均于清晨空腹取血,肝素抗凝,400  $\times$ g 分离获得血浆, -80  $^{\circ}$ C 保存待测。利用密度梯度离心法分离外周血单核细胞,调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  /mL,接种于 24 孔板,细胞培养 4 h 后,洗脱未贴壁的细胞,获得贴壁的单核细胞。置于 37  $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后收获细胞。采用流式细胞仪检测 TLR2 和 TLR4 的蛋白表达。采用 TRIzol 一步法提取总 mRNA,反转录成 cDNA,采用 RT-PCR 检测 TLR2 和 TLR4 mRNA 的表达,试验结果采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  的统计学方法分析基因的相对表达。3 000 r/min 离心分离获得血清,采用 ELISA 检测血清 MCP-1、hs-CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-18,酶标仪检测。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件处理数据,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组比较用 *t* 检验。TLR2、TLR4 水平与 UAE

相关性分析采用直线回归分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 各组 TLR4 和 TLR6 mRNA 和蛋白表达水平比较** 单纯糖尿病组、早期糖尿病肾病组和临床糖尿病肾病组 TLR4 mRNA、TLR4 蛋白、TLR2 mRNA 和 TLR2 蛋白水平明显高于对照组 ( $P < 0.01$ );单纯糖尿病组、早期糖尿病组 TLR4 mRNA、TLR4 蛋白、TLR2 mRNA 和 TLR2 蛋白水平明显低于临床糖尿病肾病组 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

**2.2 各组 MCP-1、hs-CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-18 水平比较** 单纯糖尿病组、早期糖尿病肾病组和临床糖尿病肾病组 MCP-1、hs-CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-18 水平高于对照组 ( $P < 0.01$ );单纯糖尿病组、早期糖尿病肾病组 MCP-1、hs-CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-18 水平明显低于临床糖尿病肾病组 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 1 各组 TLR4 和 TLR6 mRNA 和蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	TLR4 mRNA	TLR4 蛋白	TLR2 mRNA	TLR2 蛋白
单纯糖尿病组	47	1.59 $\pm$ 0.54* <sup>#</sup>	2.47 $\pm$ 0.36* <sup>#</sup>	1.98 $\pm$ 0.36* <sup>#</sup>	1.85 $\pm$ 0.24* <sup>#</sup>
早期糖尿病肾病组	59	3.49 $\pm$ 0.92* <sup>#</sup>	3.56 $\pm$ 1.05* <sup>#</sup>	3.64 $\pm$ 0.82* <sup>#</sup>	5.99 $\pm$ 1.57* <sup>#</sup>
临床糖尿病肾病组	46	4.78 $\pm$ 0.13*	4.58 $\pm$ 0.73*	6.48 $\pm$ 1.29*	7.44 $\pm$ 1.59*
对照组	36	0.99 $\pm$ 0.13	0.80 $\pm$ 0.12	0.58 $\pm$ 0.11	0.39 $\pm$ 0.05

注:与对照组比较,\*  $P < 0.01$ ;与临床糖尿病肾病组比较,<sup>#</sup>  $P < 0.01$ 。

表 2 各组 MCP-1、hs-CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-18 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	MCP-1(pg/mL)	hs-CRP(mg/L)	TNF- $\alpha$ (ng/mL)	IL-6(ng/mL)	IL-18(ng/mL)
单纯糖尿病组	47	52.28 $\pm$ 15.89* <sup>#</sup>	5.21 $\pm$ 0.83* <sup>#</sup>	10.25 $\pm$ 1.53* <sup>#</sup>	34.55 $\pm$ 4.17* <sup>#</sup>	41.27 $\pm$ 4.44* <sup>#</sup>
早期糖尿病肾病组	59	158.48 $\pm$ 23.58* <sup>#</sup>	10.26 $\pm$ 1.58* <sup>#</sup>	13.55 $\pm$ 2.15* <sup>#</sup>	78.94 $\pm$ 10.25* <sup>#</sup>	65.20 $\pm$ 8.49* <sup>#</sup>
临床糖尿病肾病组	46	278.36 $\pm$ 34.48*	20.03 $\pm$ 2.79*	20.34 $\pm$ 3.35*	124.43 $\pm$ 19.35*	108.39 $\pm$ 14.52*
对照组	36	23.57 $\pm$ 3.55	1.13 $\pm$ 0.15	6.33 $\pm$ 0.58	18.88 $\pm$ 2.77	21.43 $\pm$ 3.26

注:与对照组比较,\*  $P < 0.01$ ;与临床糖尿病肾病组比较,<sup>#</sup>  $P < 0.01$ 。

**2.3 不同 TLR2、TLR4 水平与 UAE 相关性分析** 直线回归分析显示,TLR2 水平与 UAE 呈正相关, $Y = 0.013X + 1.2956, R^2 = 0.8955$ ;TLR4 水平与 UAE 呈正相关, $Y = 0.006X + 1.650, R^2 = 0.8026$ 。见图 1。

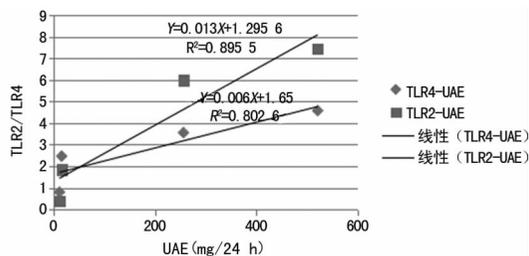


图 1 不同 TLR2、TLR4 水平与 UAE 相关性分析

**3 讨 论**

糖尿病肾病是常见的糖尿病慢性微血管并发症之一,通常指由于糖尿病引起的肾小球基底膜增厚,系膜扩张以及胞外基质增生,导致肾小球的高滤过和蛋白尿,糖尿病肾病引发的终末期肾病已经成为威胁糖尿病患者生命的主要原因,约半数患者死于肾衰竭<sup>[5]</sup>。糖尿病肾病的发病机制十分复杂,目前尚未完全阐明,但众多研究指炎症通路是糖尿病肾病进展的中心环节,持续的微炎症导致的细胞外基质增生从而促发糖尿病肾病的进展<sup>[6]</sup>。通过对糖尿病肾病中微炎症的研究有助于开发新的治疗靶标和检测指标。

TLRs 是炎症通路中的重要一环。目前发现的 TLRs 共

有 11 个,TLRs 是主要分布于巨噬细胞和树突状细胞表面的高度保守的 I 型跨膜蛋白,由胞膜外区、跨膜区以及胞内区 3 个主要区组成,能够识别病原体中与病原相关性分子模式(PMAs),引起免疫细胞活化<sup>[7]</sup>。有实验证明 TLR2 和 TLR4 在糖尿病肾组织中表达增加<sup>[8]</sup>。TLR2 在天然免疫中起到非常重要的作用,能识别多种病原体。TLR2 可以介导产生抗感染、抗肿瘤等对人体有益的作用,但是同时也能诱导产生对人体不利的炎症和过敏反应<sup>[9]</sup>。TLR4 是脂多糖(LPS)的受体,也可与热休克蛋白、纤维蛋白原等内源性配体结合,激活 NF- $\kappa$ B,启动下游炎症因子<sup>[10]</sup>。TLRs 信号通路在糖尿病以及其相关并发症的发生、发展中起到的作用已得到肯定。本研究调查了 TLR2 和 TLR4 在不同程度的糖尿病肾损伤患者中表达差异,结果显示随着肾损伤的加深,TLR2、TLR4 在蛋白和基因水平均逐步增加。而通过相关性分析显示,TLR2、TLR4 均与 UAE 呈正相关。上述研究结果证实了 TLR2、TLR4 与糖尿病肾病发生、发展存在正关联,而 TLR2、TLR4 如何影响糖尿病肾病的发生、发展呢? TLR2 的信号传导通路是 MyD88 依赖途径,而 TLR4 具有依赖 MyD88 和不依赖 MyD88 途径,TLR2 和 TLR4 均可通过激活 NF- $\kappa$ B 启动基因转录,分泌相应的炎症因子,如 MCP-1、hs-CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-18 等<sup>[11]</sup>。而本研究结果,随着肾损伤增加,MCP-1、hs-CRP、TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-18 表达水平逐步增加。因此,笔者推断,在糖尿病肾病的发病中,TLR2、TLR4 表达上调,激活了下游的 NF- $\kappa$ B 通路,介导了糖尿病肾病中的炎症反应,导致了糖尿病(下转第 1751 页)

方式达到更好的治疗效果呢? 本项目的研究是在常规降压药物联合叶酸治疗老年 H 型高血压的基础上, 通过患者进行适量的日光浴来研究其对患者是否有更显著的降压及降 Hcy 效果, 以期对老年 H 型高血压的预防及治疗带来帮助。

紫外线是日光中对人体作用最强的一种光谱, 它可以通过对机体血液和淋巴循环的影响来促进物质代谢。人体的皮肤经过紫外线光谱照射后, 会将 7-羟胆固醇转化为维生素 D, 而血清维生素 D 的水平与血清 Hcy 水平呈显著的负相关<sup>[7]</sup>。同时维生素 D 加速对钙离子的吸收, 而在补钙的干预动物模型研究中, 钙对血管平滑肌有松弛效果, 达到降压作用。紫外线对机体的另一作用是使皮肤产生一氧化氮, 而一氧化氮释放入人体血液中, 能使血管扩张, 降低血压。除紫外线外, 日光中的另一光谱——红外线可以渗入到机体深部组织, 使接受日光照射的部位温度提高而使血管扩张, 而血管的扩张使血流量增加, 使得血液循环状况得到改善, 其他部位的血流量降低则会减少血容量, 从而达到降压效果。本研究的结果显示, 在服用降压药物降压和叶酸降血清 Hcy 的基础上, 适量进行日光照射, 会达到更加显著降压及降 Hcy 的效果, 而日光浴不仅没有药物治疗带来的不良反应, 而且不会增加患者的经济负担, 同时给患者身心带来舒适享受, 为临床上防治老年 H 型高血压提供了新思路。

总之, 在药物治疗 H 型高血压的基础上进行适量的日光浴, 能显著增加患者降压降 Hcy 的临床效果, 是一项简单、更实惠的防控 H 型高血压的手段, 而且对机体的其他功能调节也有积极作用。然而, 过度的日照也会增加患皮肤癌的风险, 本研究的受试对象也局限于中、轻度老年 H 型高血压患者, 针对重度老年 H 型高血压患者的研究以及日光浴量化参考范围的确立, 有待大范围前瞻性的研究来解决。

(上接第 1748 页)

肾病的恶化发展。

综上所述, TLR2 和 TLR4 在糖尿病肾病的发生、发展中扮演了重要的作用。TLR2 和 TLR4 有望成为糖尿病肾病新的潜在治疗靶点和新的临床检查指标。在进一步的研究中, 应加强对 TLR2 和 TLR4 介导的信号通路的深入研究。

参考文献

[1] Mudaliar H, Pollock C, Ma J, et al. The role of TLR2 and 4-mediated inflammatory pathways in endothelial cells exposed to high glucose [J]. PLoS One, 2014, 9 (10): e108844.

[2] 章超群, 武晓旭, 吴永贵, 等. 白芍总苷对糖尿病大鼠肾组织 Toll 样受体信号通路调节的研究[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(3): 354-359.

[3] Mansour M, Salam RF, Rashed L, et al. Role of toll receptors in diabetic nephropathy[J]. J Diabetes Mellitus, 2014, 4(1): 26-32.

[4] Ma J, Chadban SJ, Zhao CY, et al. TLR4 activation promotes podocyte injury and interstitial fibrosis in diabetic nephropathy. [J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97985.

[5] Suga H, Sugaya M, Fujita H, et al. TLR4, rather than TLR2, regulates wound healing through TGF-β and CCL5 expression[J]. J Dermatol Sci, 2014, 73 (2): 117-124.

[6] Luan H, Zhang Q, Wang L, et al. OM85-BV induced the

参考文献

[1] 徐敏. 叶酸干预治疗对 H 型老年高血压患者 Hcy 水平和心血管事件的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34 (17): 4799-4801.

[2] 王东霞, 吴俊. 叶酸对老年 H 型高血压患者同型半胱氨酸水平和动脉粥样硬化的影响[J]. 中华老年心血管病杂志, 2014, 16(2): 205-206.

[3] Clarke R, Bennett DA, Parish S, et al. Homocysteine and coronary heart disease: meta-analysis of MTHFR case-control studies, avoiding publication bias[J]. PLoS Med, 2012, 9(2): e1001177.

[4] 张栋武, 陈立新, 区大刚, 等. 维生素 D 与高血压关系的临床研究[J]. 中国基层医药, 2015, 22(1): 51-53.

[5] Babaei M, Dashti N, Lamei N, et al. Evaluation of plasma concentrations of homocysteine, IL-6, TNF-alpha, hs-CRP, and total antioxidant capacity in patients with end-stage renal failure[J]. Acta Med Iran, 2014, 52(12): 893-898.

[6] Bizheh N, Jaafari M. The Effect of a single bout circuit resistance exercise on homocysteine, hs-CRP and fibrinogen in sedentary middle aged men[J]. Iran J Basic Med Sci, 2011, 14(6): 568-573.

[7] 刘丛, 毛旭东, 盛宏光. 2 型糖尿病人群中血清维生素 D 水平对同型半胱氨酸的影响[J]. 河北医学, 2015, 21(6): 901-905.

(收稿日期: 2017-01-04 修回日期: 2017-03-20)

productions of IL-1β, IL-6, and TNF-α via TLR4-and TLR2-mediated ERK1/2/NF-κB pathway in RAW264. 7 cells[J]. J Interferon Cytokine Res, 2014, 34(7): 526-536.

[7] 王栋栋, 魏彤, 何素梅, 等. 西格列汀延缓或阻止 2 型糖尿病肾病进展的实验研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(1): 45-47.

[8] Zeljic K, Supic G, Jovic N, et al. Association of TLR2, TLR3, TLR4 and CD14 genes polymorphisms with oral cancer risk and survival[J]. Oral Diseases, 2014, 20 (4): 416-424.

[9] Mudaliar H, Pollock C, Panchapakesan U. Role of Toll-like receptors in diabetic nephropathy. [J]. Clin Sci, 2014, 126(10): 685-694.

[10] Adjobimey T, Satoguina J, Oldenburg J, et al. Co-activation through TLR4 and TLR9 but not TLR2 skews Treg-mediated modulation of Igs and induces IL-17 secretion in Treg: B cell co-cultures. [J]. Innate Immun, 2014, 20(1): 12-23.

[11] Schnetzke U, Spies-Weisschart B, Yomade O, et al. Polymorphisms of Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) are associated with the risk of infectious complications in acute myeloid leukemia[J]. Genes Immun, 2015, 16(1): 83-88.

(收稿日期: 2017-02-08 修回日期: 2017-04-11)