

TLR7信号通路在狼疮性肾炎发病机制中的作用

骆锦倩¹, 夏云¹, 刘小燕¹, 黎瑜¹, 杨京新², 王静^{1,2*}

¹深圳市罗湖中医院肾病科, 广东 深圳

²深圳市罗湖人民医院(深圳大学第三附属医院)肾病科, 广东 深圳

收稿日期: 2022年12月6日; 录用日期: 2023年1月20日; 发布日期: 2023年1月31日

摘要

目的: 探讨TRL7信号通路对MRL-lpr狼疮性肾炎(Lupus nephritis, LN)模型小鼠相关细胞因子、蛋白表达的作用。方法: 流式细胞术检测各组小鼠脾脏组织总B细胞、浆细胞和DC细胞表达; ELISA法检测各组小鼠血清IL-10、IL-21、抗C1q抗体、抗r-RNP抗体(RRNP)及B细胞激活因子(BAFF)蛋白表达。结果: 流式细胞术检测结果显示: 与正常对照组相比, MRL-lpr模型组小鼠总B细胞及DC细胞数量无显著变化, 浆细胞数量显著升高, 差异具有统计学意义($P < 0.001$), 在MRL-lpr模型组小鼠, 与溶剂对照组相比, TRL7抑制剂组总B细胞、浆细胞及DC细胞数量均未见明显变化, 差异无统计学意义($P > 0.05$); ELISA检测结果显示: 与Naive小鼠相比, MRL/lpr模型组小鼠IL-10和C1q表达显著降低, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); IL-21和BAFF蛋白表达升高, 差异具有统计学意义(分别是 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$); RRNP表达未发生明显变化。在MRL-lpr模型组小鼠, 与溶剂对照组相比, TRL7抑制剂可显著逆转IL-21和BAFF的升高(分别是 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)及C1q的降低($P < 0.05$); 而未显著改变IL-10和RRNP的表达(均为 $P > 0.05$)。结论: LN小鼠体内存在细胞免疫功能紊乱, TLR7信号通路可能通过影响免疫细胞释放IL-21、C1q和BAFF等, 调控LN发病进程。

关键词

狼疮性肾炎, TLR7信号通路, 免疫细胞, 细胞因子

The Role of TLR7 Signaling Pathway in the Pathogenesis of Lupus Nephritis

Jinqian Luo¹, Yun Xia¹, Xiaoyan Liu¹, Yu Li¹, Jingxin Yang², Jing Wang^{1,2*}

*通讯作者。

文章引用: 骆锦倩, 夏云, 刘小燕, 黎瑜, 杨京新, 王静. TLR7 信号通路在狼疮性肾炎发病机制中的作用[J]. 生物医学, 2023, 13(1): 103-109. DOI: 10.12677/hjbm.2023.131011

¹Nephrology Department, Shenzhen Luohu Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen Guangdong

²Nephrology Department, Shenzhen Luohu People's Hospital (The Third Affiliated Hospital of Shenzhen University), Shenzhen Guangdong

Received: Dec. 6th, 2022; accepted: Jan. 20th, 2023; published: Jan. 31st, 2023

Abstract

Objective: To investigate the effect of TLR7 signaling pathway on the expression of cytokines and proteins related to MRL-lpr lupus nephritis (LN) model mice. **Methods:** Flow cytometry was performed to detect the expression of total B cells, plasma cells and DC cells in the spleen tissue of each group of mice; ELISA was performed to detect the expression of serum IL-10, IL-21, anti-C1q antibody, anti-r-RNP antibody (RRNP) and B-cell activating factor (BAFF) protein in each group of mice. **Results:** The results of flow cytometric assay showed that compared with the normal control group, there was no significant change in the number of total B cells and DC cells in the MRL-lpr model group mice, and the number of plasma cells was significantly higher, and the difference was statistically significant ($P < 0.001$). In the MRL-lpr model group mice, compared with the solvent control group, the number of total B cells, plasma cells and DC cells in the TLR7 inhibitor group did not show significant changes, and the differences were not statistically significant ($P > 0.05$); ELISA results showed that compared with Naive mice, IL-10 and C1q expressions were significantly lower in the MRL/lpr model group mice, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$); IL-21 and BAFF protein expressions were elevated, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$ and $P < 0.01$); RRNP expression did not change significantly. In MRL-lpr model mice, TLR7 inhibitor significantly reversed the elevation of IL-21 and BAFF ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively) and the decrease of C1q ($P < 0.05$) compared with solvent controls; while it did not significantly alter the expression of IL-10 and RRNP (both $P > 0.05$). **Conclusion:** Cellular immune dysfunction exists in LN mice, and TLR7 signaling pathway may regulate the pathogenesis of LN by affecting the release of IL-21, C1q and BAFF from immune cells.

Keywords

Lupus Nephritis, TLR7 Signaling Pathway, Immune Cells, Cytokines

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

狼疮性肾炎(Lupus nephritis, LN)是系统性红斑狼疮的常见并发症, 临床表现多为肾功能减退及不同程度的蛋白尿、血尿等, 是导致系统性红斑狼疮患者死亡的主要原因[1]。狼疮性肾炎会出现肾小球硬化及肾间质纤维化, 这些多由于系膜细胞与细胞外基质(ECM)如 IV 型胶原及基质蛋白(如 FN)含量增加、炎性细胞(中性粒细胞、单核细胞、T 淋巴细胞等)浸润、毛细血管增生、肾小球免疫复合物沉积(肾小球系膜区、毛细血管祥内皮下及上皮内侧)等多种免疫活动引发[2]。研究发现, Toll 样受体 7 (TLR7)与狼疮性肾炎中肾小球硬化密切相关[3]。因此, 本研究采用 MRL-lpr 狼疮性肾炎模型小鼠, 运用流式细胞检测、ELISA 检测等技术方法, 探讨狼疮性肾炎疾病发展过程中 TLR7 信号通路与 B 淋巴细胞、DC 细

胞及相关细胞因子表达之间的关系,为进一步阐明狼疮性肾炎的发生发展及未来药物作用提供科学资料支撑。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 实验动物

SPF级MRL-lpr模型鼠10只及C7BL/6J小鼠5只,4~5周龄,雄性,购于上海斯莱克实验动物有限公司,合格证号:SCXK(沪)2017-0005。小鼠常规饲养于SPF级隔离设施内,自由进食饮水,食用普通饲料(由斯莱康公司提供)。实验环境温度20℃~25℃,湿度40%~60%。在符合动物福利的条件下进行实验,实验开展前获得医院的动物伦理委员会批准(20220228-057)。

2.1.2. 主要试剂和仪器

TLR7抑制剂:E6446(货号:HY-12756A),由MedChemExpress公司提供;ELISA试剂盒:IL-10(proteintech,KE10008)、IL-21(proteintech,KE10012)、抗C1q抗体(proteintech,11602-1-AP)、抗r-RNP抗体(RRNP)(江莱生物,JL39567)及B细胞激活因子(BAFF)(proteintech,KE10026);流式细胞仪由BD公司生产,型号:FACSVerse。

2.2. 方法

2.2.1. 模型建立及处理

MRL-lpr模型鼠共10只,随机取5只为TRL7抑制剂组,其余5只为溶剂对照组,另取C57BL/6J小鼠5只为正常对照组,正常对照组不做处理。TRL7抑制剂E6446(20 mg/kg)及对照溶剂行腹腔注射,1次/d,连续注射5天。

2.2.2. 观察指标

于实验第6天,1%戊巴比妥钠麻醉小鼠(50 mg/kg),尾静脉取血,离心取上清,采用ELISA试剂盒检测血清中IL-10、IL-21、抗C1q抗体、抗r-RNP抗体(RRNP)及B细胞激活因子(BAFF)的水平;另取新鲜小鼠脾脏,制备脾细胞悬液,应用流式细胞仪检测总B细胞、浆细胞和DC细胞的量。

3. 统计学处理

应用Graphpad Prism8统计软件进行数据统计与分析,数值以“均数±标准误”(x±SEM)表示,采用单因素方差分析结合Tukey's组间比较,以P<0.05为差异有统计学意义。

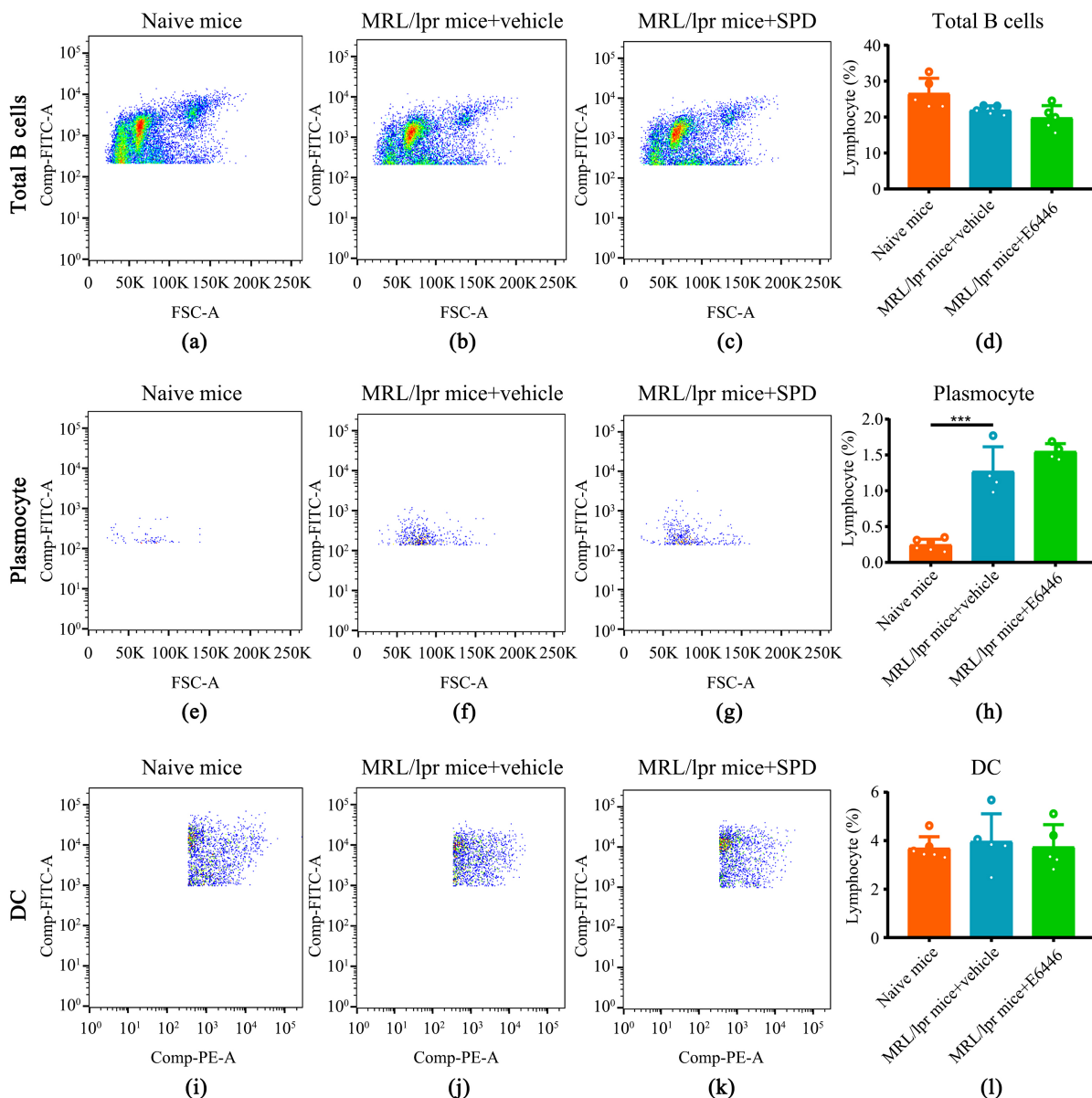
4. 结果

4.1. MRL-Lpr 模型造模结果

实验过程中无小鼠死亡。

4.2. TLR7 抑制剂对脾脏组织总 B 细胞、浆细胞和 DC 细胞表达的作用

小鼠脾脏单细胞悬液流式细胞分析结果显示:与正常小鼠相比,MRL/lpr模型组小鼠总B细胞和DC细胞数量无显著性变化(P>0.05),浆细胞数量明显升高,差异具有统计学意义(P<0.001);在MRL-lpr模型小鼠,与溶剂对照组相比,TRL7抑制剂组小鼠总B细胞、浆细胞、DC细胞数量均未见明显变化,差异无统计学意义(P>0.05)(统计分析结果见图1)。



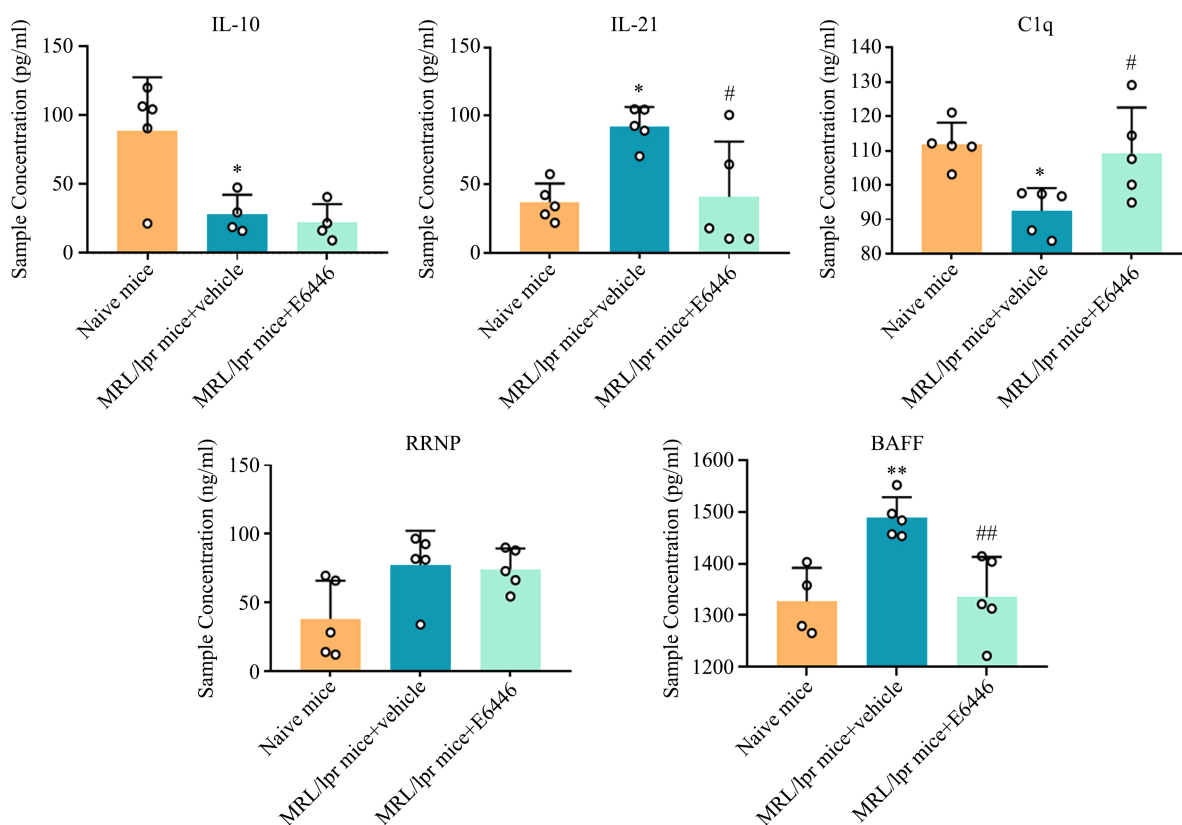
(Note: Data are shown as $\bar{x} \pm \text{SEM}$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

Figure 1. The effects of TLR7 inhibitor E6446 on three cell types (the total B cells, the plasma cells and DC cells) in MRL/lpr lupus nephritis mice

图 1. TLR7 抑制剂 E6446 对 MRL/lpr 狼疮肾炎小鼠三种细胞类型(总 B 细胞、浆细胞和 DC 细胞)的作用

4.3. TLR7 抑制剂对 IL-10、IL-21、抗 C1q 抗体、抗 r-RNP 抗体(RRNP)及 B 细胞激活因子(BAFF)表达的作用

各组小鼠血清 IL-10、IL-21、抗 C1q 抗体、抗 r-RNP 抗体(RRNP)及 B 细胞激活因子(BAFF)蛋白表达 ELISA 检测结果显示: 与正常小鼠相比, MRL/lpr 模型组小鼠 IL-10 和抗 C1q 抗体表达降低, 差异具有统计学意义(均为 $P < 0.05$), IL-21 和 BAFF 蛋白表达升高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 在 MRL-lpr 模型组小鼠, 与溶剂对照组相比, TLR7 抑制剂显著降低了 IL-21 和 BAFF 蛋白的表达, 差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且显著增加了 C1q 的表达, 差异具有统计学意义($P < 0.05$) (统计分析结果见图 2)。



(Note: Data are shown as $\bar{x} \pm \text{SEM}$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; Naïve vs. vehicle; # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$, vehicle vs. E6446).

Figure 2. The effect of TLR7 inhibitor E6446 on protein expression associated with lupus nephritis.

图 2. TLR7 抑制剂 E6446 对狼疮肾炎相关蛋白表达的作用

5. 讨论

狼疮性肾炎是系统性红斑狼疮主要的并发症和致死因素之一，作为一种累及多脏器的自身免疫性疾病，肾脏是 LN 发病过程中最易受累的器官。迄今，LN 的发病机制尚未明确，病因复杂多样。随着研究不断进展，多种信号通路、生物学标志物不断被发现。其发病原因多与 B 细胞功能亢进、自身抗体增加有关，此外，多种组织中有抗 DNA 抗体，损害多系统脏器，同时伴随炎症物质积聚等多种自身免疫功能受损等表现[1]。

在 LN 发病过程中，DC 细胞是免疫异常的关键因素，部分淋巴来源的 DC 称之为浆细胞样树突细胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDCs)，在狼疮性肾炎的发病过程中起重要作用[2] [3]。B 淋巴细胞既参与系统性损害的发生，也参与肾脏疾病的自身免疫发病过程，在自身抗体产生和免疫复合物在肾脏沉积、激活补体导致肾脏损害过程中起到了关键作用。由于 LN 发病的重要机制之一是免疫系统紊乱，其中 B 细胞的异常活化及分化为记忆或浆细胞是其主要的免疫特征[4]，相关 B 细胞刺激因子(IL-10、IL-6 等)在活动期 LN 患者体内表达较正常人增高，进一步刺激 B 细胞生长、分化、成熟，抑制 B 细胞凋亡[5]。此外，跨膜激活剂及钙调素配基相互作用因子(Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor, TACI)可通过传递相关上游 B 细胞活化因子(B-cell activating factor, BAFF)信号促进浆细胞成熟、延长浆细胞寿命，抑制过度增强的 TACI 信号可能在治疗 LN 中发挥作用。BAFF 对 B 细胞的异常活化以及自身抗体的产生均有重要调控功能，促进浆细胞及其他免疫细胞的表达，与多种自身免疫

性疾病有关[6]。BAFF-R 作为 BAFF 特异性受体,从未成熟 B 细胞阶段就开始表达,在 B 细胞的各个阶段(除浆细胞外)均有表达,参与 B 细胞从未成熟阶段向过渡阶段、成熟阶段、以及记忆 B 细胞发育阶段的多种过程。BAFF/BAFF-R 通路活化在 SLE 发病中具有重要作用[7][8]。国外临床研究显示,SLE 患者血清 BAFF 水平显著增加,且其在肾脏组织的受体密度也显著提高,认为血清 BAFF 水平可以反映狼疮性疾病活动度,也是病情的监测以及预测复发较好的重要指标[9]。本研究发现,MRL/lpr 模型鼠中总 B 细胞数量未发生显著变化,但浆细胞数量明显增加,BAFF 表达显著增加,TRL7 抑制剂干预可显著降低 BAFF 表达。提示 TRL7 信号通路可能通过调控 BAFF 释放,继而调控 B 细胞活化及相关因子的表达,从而影响病情进展。

IL-10、IL-21 作为 LN 相关细胞因子,在 B 细胞的增殖、分化过程中扮演了重要作用[10]。IL-21 是 2000 年发现的 I 型细胞因子家族成员,与 IL-21 受体结合并启动相关信号通路,促进 B 细胞分化为分泌免疫球蛋白的自身反应性浆细胞[10]。同时 IL-21、BAFF 可共同作用,促进 B 细胞生发中心形成,分泌自身抗体[11]。研究发现,LN 患者肾组织 IL-21 的检测可判断病变严重程度及临床活动情况,其升高预示着肾脏受累的风险[12]。研究发现,pDCs 可特异性表达 TLR7,促进炎症介质的分泌[3],同时 pDCs 活化后可激活 B 细胞分泌大量抗体,一方面破坏细胞的功能,另一方面与补体相互作用,介导细胞毒性作用,释放炎症介质,诱导 LN 小鼠局部炎症反应细胞浸润,机体出现肌酐、尿蛋白增加等肾损伤的表现,加重狼疮鼠的肾损害[12][13][14][15]。本研究发现,在 MRL/lpr 模型鼠中,IL-10 表达降低,IL-21 表达增加,TLR7 抑制剂 E6446 干预后,IL-10 表达无变化,但显著逆转 IL-21 的表达增加,推测 TRL7 信号通路可能通过抑制 IL-21 的分泌,抑制 B 细胞分化为分泌免疫球蛋白的浆细胞从而缓解 LN。临床常用补体 C1q、RRNP 等指标作为评估 LN 活动期的标志物。本实验研究发现,狼疮肾炎小鼠 RRNP 表达有增高趋势,但无统计学差异,而 C1q 表达显著减低,推测狼疮肾炎不同阶段两者的表达可能有一定的差异性。

综上所述,狼疮性肾炎小鼠体内存在细胞免疫功能紊乱 TRL7 信号通路可调控 B 细胞功能从而影响多种细胞因子的表达而影响 LN 发病进程,但其具体机制尚需深入研究。本研究亦有一定局限性,比如实验样本量较小,可能对实验结果产生一定偏倚影响,后期可通过增加样本量进一步明确研究发现。后续将继续明确 TRL7 信号通路激活后如何调控 B 细胞功能从而参与 LN 发生,以期能够为 LN 的机制研究及临床治疗提供理论依据及支持。

基金项目

深圳市科技计划项目 - 基础研究(JCY20180302153701406)项目支持。

参考文献

- [1] Musa, R., Brent, L.H. and Qurie, A. (2022) Lupus Nephritis. StatPearls, Treasure Island.
- [2] Santer, D.M., Wiedeman, A.E., Teal, T.H., Ghosh, P. and Elkon, K.B. (2012) Plasmacytoid Dendritic Cells and C1q Differentially Regulate Inflammatory Gene Induction by Lupus Immune Complexes. *The Journal of Immunology*, **188**, 902-915. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102797>
- [3] Llanos, C., Carreño, L.J., Gutierrez, M.A., et al. (2011) Genetic and Pharmacological Modulation of Dendritic Cell-T Cell Interactions as a Therapeutic Strategy for Systemic Lupus Erythematosus. *Current Gene Therapy*, **11**, 544-553. <https://doi.org/10.2174/156652311798192806>
- [4] Ge, F.M., Wang, F.F., Yan, X.Q., Li, Z. and Wang, X.B. (2017) Association of BAFF with PI3K/Akt/mTOR Signaling in Lupus Nephritis. *Molecular Medicine Reports*, **16**, 5793-5798. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7367>
- [5] 郑京, 郑春盛, 刘芳, 等. B 淋巴细胞活化及凋亡和 BlyS、IL-10、IL-6 对狼疮性肾炎的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(7): 613-615.
- [6] Lamagna, C., Hu, Y.M., Defranco, A.L. and Lowell, C.A. (2014) B Cell-Specific Loss of Lyn Kinase Leads to Au-

- toimmunity. *The Journal of Immunology*, **192**, 919-928. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301979>
- [7] Smulski, C.R. and Eibel, H. (2018) BAFF and BAFF-Receptor in B Cell Selection and Survival. *Frontiers in Immunology*, **9**, Article 2285. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02285>
- [8] 王尚, 项丽, 许国双. B 淋巴细胞在狼疮性肾炎中的作用研究进展[J]. 中华肾病研究电子杂志, 2020, 9(4): 181-185.
- [9] Schwarting, A., Relle, M., Meineck, M., *et al.* (2018) Renal Tubular Epithelial Cell-Derived BAFF Expression Mediates Kidney Damage and Correlates with Activity of Proliferative Lupus Nephritis in Mouse and Men. *Lupus*, **27**, 243-256. <https://doi.org/10.1177/0961203317717083>
- [10] Wang, S., Wang, J., Kumar, V., *et al.* (2018) IL-21 Drives Expansion and Plasma Cell Differentiation of Autoreactive CD11c^{hi}T-bet⁺ B Cells in SLE. *Nature Communications*, **9**, Article No. 1758. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03750-7>
- [11] Chan, O.T., Madaio, M.P. and Shlomchik, M.J. (1999) B Cells Are Required for Lupus Nephritis in the Polygenic, Fas-Intact MRL Model of Systemic Autoimmunity. *The Journal of Immunology*, **163**, 3592-3596. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.163.7.3592>
- [12] Karlsson, L., Sun, S., Rao, N.L., Venable, J. and Thurmond, R. (2007) TLR7/9 Antagonists as Therapeutics for Immune-Mediated Inflammatory Disorders. *Inflammation & Allergy-Drug Targets*, **6**, 223-235. <https://doi.org/10.2174/187152807783334300>
- [13] Rissoan, M.-C., Soumelis, V., Kadowaki, N., *et al.* (1999) Reciprocal Control of T Helper Cell and Dendritic Cell Differentiation. *Science*, **283**, 1183-1186. <https://doi.org/10.1126/science.283.5405.1183>
- [14] Wang, Y.G., Ito, S., Chino, Y., *et al.* (2008) Use of Laser Microdissection in the Analysis of Renal-Infiltrating T Cells in MRL/lpr Mice. *Modern Rheumatology*, **18**, 385-393. <https://doi.org/10.1007/s10165-008-0074-8>
- [15] 崔晓, 刘冠贤, 董光富, 等. Toll 样受体 7,9 在狼疮肾炎发病机制中作用的研究[J]. 吉林医学, 2011, 32(6): 1086-1087.