

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.09.006
文章编号: 1005-8982 (2023) 09-0032-09

实验研究·论著

基于TLR4/MyD88/NF- κ B通路探讨金双歧 对慢性肾脏病大鼠肠黏膜屏障的影响*

黄梅¹, 陈鸿禧², 谭玲玲³, 马欣²

(1. 西南医科大学附属医院 临床技能中心, 四川 泸州 646000; 2. 成都医学院第一附属医院 肾脏病科, 四川 成都 610500; 3. 达州市中心医院 肾病内科, 四川 达州 635000)

摘要: **目的** 探讨金双歧对慢性肾脏病大鼠肠黏膜屏障的作用及机制。**方法** 30只大鼠随机分为对照组、模型组和金双歧组, 每组10只。模型组和金双歧组以阿霉素、腺嘌呤复制慢性肾脏病模型。模型复制成功后, 金双歧组采用金双歧治疗4周。测定各组大鼠的24 h尿蛋白及血肌酐、尿素氮、D-乳酸、内毒素、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平。HE染色观察各组大鼠的肾脏、结肠病理变化, Masson染色观察各组大鼠肾脏纤维化改变, 透射电镜观察各组大鼠结肠黏膜超微结构, 免疫荧光法检测各组大鼠结肠 Occludin 蛋白表达, Western blotting 检测各组大鼠结肠 Toll 样受体 4 (TLR4)、髓样分化因子 88 (MyD88)、核因子 κ B P65 (NF- κ B P65) 蛋白表达, 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测各组大鼠结肠 TLR4、MyD88、NF- κ B P65 mRNA 表达。**结果** 与对照组比较, 模型组、金双歧组大鼠的肌酐、尿素氮、24 h 尿蛋白、肾间质损伤评分均升高 ($P < 0.05$), 肾间质纤维化相对面积增加 ($P < 0.05$); 模型组与金双歧组大鼠的上述指标比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组比较, 模型组、金双歧组大鼠的结肠黏膜病理损伤评分升高 ($P < 0.05$), 金双歧组结肠黏膜病理损伤评分低于模型组 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 模型组、金双歧组大鼠结肠黏膜超微结构损害明显、Occludin 蛋白表达减少, 金双歧组较模型组超微结构有所恢复, Occludin 蛋白表达增加。与对照组比较, 模型组、金双歧组大鼠血清 D-乳酸、内毒素、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平均升高 ($P < 0.05$), 金双歧组较模型组均降低 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 模型组、金双歧组结肠 TLR4、MyD88、NF- κ B P65 蛋白及 mRNA 表达均升高 ($P < 0.05$), 金双歧组较模型组均下降 ($P < 0.05$)。**结论** 金双歧对病理损伤重的肾脏无明显保护作用, 金双歧可能通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路活化, 改善慢性肾脏病所致肠黏膜屏障结构及功能障碍, 减轻系统炎症反应。

关键词: 慢性肾脏病; 金双歧; 肠黏膜屏障; TLR4/MyD88/NF- κ B 通路

中图分类号: R692.5; R574.4

文献标识码: A

Effects of golden bifid on intestinal mucosal barrier of rats with chronic kidney disease based on TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway*

Huang Mei¹, Chen Hong-xi², Tan Ling-ling³, Ma Xin²

(1. Clinical Skills Training Center, The Affiliated Stomatology Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610500, China; 3. Department of Nephrology, Dazhou Central Hospital, Dazhou, Sichuan 635000, China)

收稿日期: 2022-09-22

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 82200823); 四川省科技厅科研项目 (No: 2021YFS0035); 四川省自然科学基金 (No: 2023NSFSC1528); 西南医科大学校级科研课题 (No: 2020ZRQN019)

[通信作者] 马欣, E-mail: xinma1989@163.com

Abstract: Objective To explore the effects of Golden bifid on the intestinal mucosal barrier of rats with chronic kidney disease and the mechanism. **Methods** Thirty rats were randomly divided into normal control group (NOR), model group (CKD), and golden bifid group (JSQ). Besides NOR group, the other rats were treated with doxorubicin and adenine to establish chronic kidney disease model. The rats in JSQ group were received respectively golden bifid preparations for four weeks. The determination of 24-hours urinary protein level, serum creatinine, blood urea nitrogen, endotoxin, D-lactic acid, IL-6, IL-1 β , and TNF- α were measured. Kidney and colon tissues were harvested for HE. Ultrastructure of colon tissue was observed transmission electron microscopy. The expression and location of TJ protein Occludin in the epithelium were investigated by immunofluorescence microscopy. The expression of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway protein were measured by western blot. The expression of TLR4, MyD88, NF- κ B P65 mRNA were measured by qRT-PCR. **Results** The serum creatinine, blood urea nitrogen, 24-hours urinary protein level, pathological scoring of renal injury, renal interstitial fibrosis relative area ratio in CKD and JSQ group were significantly higher than Nor group ($P < 0.05$). But there is no obvious difference between CKD and JSQ group. Compared with the NOR group, the CKD group had severe pathological damage of intestinal mucosa, significant damage of colonic ultrastructure, and significantly decreased expression of Occludin protein, but the JSQ group recovered partly. Compared with NOR group, The concentration of D-lactic acid, endotoxin, IL-6, IL-1 β , TNF- α in CKD group were all significantly higher ($P < 0.05$), but the JSQ group recovered partly. Compared with NOR group, the protein and mRNA expressions of TLR4, MyD88, and NF- κ B P65 in the colon of the CKD group were significantly increased, but the JSQ group was decreased partly. **Conclusion** Gold bifid has no obvious protective effect on the kidney with severe pathological damage. Gold bifid may improve the structure and function of intestinal mucosal barrier caused by chronic kidney disease and reduce systemic inflammation by inhibiting the activation of TLR4/MyD88/NF- κ B pathway.

Keywords: chronic kidney disease; golden bifid; intestinal mucosal barrier; TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)发病人数逐年增多,已成为备受公众关注的全球性健康问题之一。2019年的一项流行病学调查表明全球CKD患病率约为13.4%,其中490.2~708.3万人发展为终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)^[1]。探索延缓CKD进展的治疗方法对减轻患者痛苦和社会经济负担具有重要意义。近年来,CKD所致肠道结构及功能障碍逐渐成为临床研究热点。随着CKD的进展,患者肠黏膜屏障逐渐被破坏,肠道菌群失调,导致致病菌及其产物、各种有毒大分子、肠源性尿毒症毒素等吸收入血液,加重全身炎症反应及肾功能恶化,从而形成肠-肾间的恶性循环^[2-3]。既往研究表明,口服益生菌可降低CKD患者血清促炎因子、内毒素水平,促进抗炎因子的生成,保护残余肾功能^[4]。但也有研究发现单独使用益生菌不能降低血肌酐和尿素氮水平,对肾病无确切治疗效果^[5]。CKD能导致肠道损伤,但其损伤机制尚不明确。Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)/髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)/核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)通路广泛参与调节机体炎症反应,其与炎症性肠病、肠易激综

合征、胃肠道肿瘤等疾病密切相关^[6-8],但目前尚无研究证明其是否与CKD所致肠黏膜屏障损伤有关。

目前临床对益生菌治疗CKD疗效的认识尚未统一。本研究拟通过动物实验探讨益生菌金双歧对CKD大鼠肾脏、肠道结构和功能的影响,研究CKD所致肠黏膜损伤是否与TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路失衡有关,进一步探索益生菌可否通过调节该通路改善肠黏膜屏障功能,减轻系统炎症反应。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂与仪器

SPF级健康雄性大鼠30只,体重250~300 g,由西南医科大学动物实验中心提供[实验动物生产许可证号:SCXK(川)2018-17,实验动物使用许可证号:SYXK(川)2018-065]。阿霉素(浙江海正药业股份有限公司,国药准字:H20041318,规格:5 mL:10 mg),腺嘌呤(美国Sigma公司,货号:V900471,规格:25 g/瓶),金双歧(双歧杆菌、保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌三联活菌片)(内蒙古双奇药业股份有限公司,国药准字:S19980004,0.5 g/片),白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿

瘤坏死因子- α (TNF- α) 试剂盒均购自英国 Abcam 公司, D-乳酸试剂盒购自上海恒健生物技术有限公司, 内毒素试剂盒购自厦门市鲎试剂实验厂有限公司, 总 RNA 提取试剂盒购自北京天根科技生化有限公司, 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, Occludin 抗体购自美国 ProSci 公司, GAPDH 抗体购自美国 Sigma 公司, NF- κ B P65 及 p-NF- κ B P65 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, TLR4 及 MyD88 抗体购自英国 Abcam 公司。高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司), 倒置相差显微镜 (日本 Nikon 公司), 自动生化分析仪 (美国 Beckman 公司), 激光共聚焦显微镜 (德国蔡司公司), 吸收光酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司), 荧光定量 PCR 仪 (瑞士罗氏公司), 透射电子显微镜 (日本 Hitachi 公司)。

1.2 方法

1.2.1 复制 CKD 大鼠模型 以 5 mL 无菌生理盐水溶解 10 mg 阿霉素、80 mL 无菌生理盐水溶解 2 g 腺嘌呤配置模型复制所需药液; 金双歧片研磨成粉末, 以 25 mL 无菌生理盐水溶解 5 g 药粉, 配置成 0.2 g/mL 混悬液, 4℃ 避光保存。30 只健康 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组、模型组及金双歧组, 每组 10 只。第 1 天模型组和金双歧组大鼠一次性尾静脉注射阿霉素 4 mg/kg, 后连续用腺嘌呤 200 mg/(kg·d) 灌胃 2 周, 再隔日用腺嘌呤 200 mg/(kg·d) 灌胃 2 周。模型复制成功后, 参照《药理实验方法学》^[9] 的人与大鼠用药剂量换算方法, 给予金双歧组大鼠金双歧混悬液 1 mL/(100 g·d) 灌胃 4 周, 同时以等体积的生理盐水灌胃对照组和模型组。

1.2.2 观察各组大鼠的生理特征 实验期间观察各组大鼠的食欲、大小便、皮毛、行为、体型等整体状况, 每周称重。

1.2.3 检测各组大鼠的 24 h 尿蛋白 各组大鼠放置于代谢笼中收集 24 h 尿液, 记录总量, 加入防腐剂, 摇匀后立即送西南医科大学附属中医医院检验科检测 24 h 尿蛋白。

1.2.4 检测各组大鼠血清的肌酐、尿素氮、内毒素、D-乳酸、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平 各组大鼠腹腔注射 2% 的戊巴妥钠溶液 1 mL/kg 进行麻醉, 行腹主动脉采血, 3 000 r/min 离心 15 min 后取上清液, 部分立即检测血清的肌酐及尿素氮水平, 部分 -20℃ 冰箱保存备用。采用终点法检测内毒素水平, 酶

联免疫吸附试验 (ELISA) 测定 D-乳酸、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平, 严格按照试剂盒说明书操作。

1.2.5 观察各组大鼠肾脏及肠道组织的病理特征 麻醉后断颈处死各组大鼠。速取肾脏组织, 切成 1 cm 左右的小块后放入 10% 中性甲醛溶液中固定; 取结肠组织约 6 cm, 生理盐水轻轻冲净, 剪成 1 cm 左右的小块后部分立即放入 10% 中性甲醛溶液中固定, 部分放入 2.5% 戊二醛固定液中固定后送入华西医学中心电镜室行透射电镜检查。按照常规方法将肾脏组织及结肠组织石蜡包埋, 依次洗涤、脱水、透明、浸蜡, 使用全自动切片机连续切片 5 μ m 厚后进行 HE 染色。按照文献[10]的方法对肾间质损伤 (蛋白管型和肾小管扩张、肾间质纤维化、肾间质炎细胞浸润) 程度评分, 评分标准: 0 分, 无病理损伤; 1 分, 轻度病理损伤; 2 分, 中度病理损伤; 3 分, 重度病理损伤。同时将肾脏组织 Masson 染色, 任意选取病理图片高倍镜下 8 个视野, 以 IPP 分析软件计算阳性区域所占肾间质的相对面积。按照文献[11]对结肠黏膜病理损伤评分, 评分标准: 0 分, 正常黏膜绒毛结构; 1 分, 肠黏膜绒毛顶端上皮下间隙增宽, 伴毛细血管充血; 2 分, 绒毛尖端上皮抬高, 绒毛上皮下间隙进一步扩张, 与固有膜中度剥离; 3 分, 绒毛大量倒伏, 大量的固有膜分离, 部分绒毛顶端脱落; 4 分, 绒毛破损伴随固有层毛细血管暴露, 可观察到固有膜的细胞成分增多; 5 分, 固有膜破坏和不完整、出血或溃疡形成。另将大鼠结肠蜡块切片 4 μ m 厚, 脱蜡后放入微波炉进行抗原热修复 (pH=6.0), 自然冷却至室温后以 PBS 洗涤, 封闭液封闭 30 min 后加入 Occludin 一抗, 4℃ 条件下孵育过夜, 以 PBS 洗涤后加荧光标记的二抗, 室温下孵育 60 min, 再次洗涤并滴入 DAPI 染核 10 min, PBS 洗涤后封片, 激光共聚焦显微镜下观察紧密连接蛋白 Occludin 表达。

1.2.6 Western blotting 法测定 TLR4、MyD88、NF- κ B P65、p-NF- κ B P65 蛋白表达 将大鼠结肠组织、裂解液及磁珠加入匀浆管中并置于匀浆机中预冷匀浆, 完全裂解后 4℃、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。以 8% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白溶液, 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 再将 PVDF 膜置于 5% 脱脂牛奶溶液中封闭 1 h 后取出, 4℃ 下与一抗孵育过夜, TBST 洗涤后与二抗在室温下孵育 1 h, 再次洗涤后以 ECL

发光液进行显影。用Gel-Pro软件分析条带的灰度值,GAPDH为内参,计算TLR4、MyD88、NF-κB P65、p-NF-κB P65蛋白相对表达量。

1.2.7 qRT-PCR 测定结肠组织 TLR4、MyD88、NF-κB P65 mRNA 表达 将大鼠结肠组织以匀浆机研磨后采用TRIzol法提取总RNA,用紫外分光光度计测量样本OD260、OD280值并根据OD260/OD280比值估测RNA质量,比值为1.8~2.0符合实验要求。以逆转录试剂盒将RNA逆转录为cDNA,反应条件:37℃15min、98℃5min,以SYBR Green法进行扩增,扩增条件:95℃预变性10min、95℃变性30s、60℃退火30s,共40个循环。以β-actin为内参,用2^{-ΔΔCt}法计算TLR4、MyD88、NF-κB P65 mRNA相对表达量。PCR引物序列见表1。

表1 引物序列

基因	引物序列	长度/ bp
β-actin	正向: 5'-CACGATGGAGGGCCGACTCATC-3'	260
	反向: 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT-3'	
TLR4	正向: 5'-ATGGCATGGCTTACACCACC-3'	154
	反向: 5'-ACACCTCTGTTTTAACCGGA-3'	
MyD88	正向: 5'-TTCGACGCCTTCATCTGCTA-3'	182
	反向: 5'-CATGCGACGACACCTTTTCT-3'	
NF-κB P65	正向: 5'-AGGCTTCTGGGCCTTATGTG-3'	246
	反向: 5'-CATAAGGACCGCTCTCTTCG-3'	

1.3 统计学方法

数据分析采用SPSS 22.0统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠的基本生理特征

对照组大鼠食欲较好,皮毛润泽,活动灵活,尿量正常,大便成形。模型组大鼠食欲明显下降,后期枯瘦如柴,皮毛干枯,精神萎靡,尿量从模型复制开始时增多到后期逐渐减少,部分大鼠出现腹泻。金双歧组大鼠食欲、体重、精神状态较模型组好,无明显腹泻,但有尿量减少等情况。

对照组、模型组、金双歧组大鼠灌胃前后的体重比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的体重无差异(*F*=2.365,*P*=0.081);②各组的体重有差异(*F*=1 023.559,*P*=0.000),模型组、金双歧组大鼠各时间点的体重均低于对照组(*P*<0.05),模型组与金双歧组大鼠各时间点的体重比较,差异无统计学意义(*P*>0.05);③各组体重的变化趋势有差异(*F*=5.527,*P*=0.000)。见表2。

表2 各组大鼠灌胃前后的体重比较 (*n*=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	灌胃前	灌胃第1周	灌胃第2周	灌胃第3周	灌胃第4周
对照组	339.92±9.28	352.72±16.32	368.02±17.56	392.37±16.68	414.37±19.08
模型组	298.88±15.57 [†]	283.24±15.43 [†]	270.47±17.14 [†]	254.17±17.92 [†]	235.83±13.94 [†]
金双歧组	303.46±15.90 [†]	292.40±14.96 [†]	280.90±18.77 [†]	268.62±15.46 [†]	259.21±15.85 [†]

注:†与对照组比较,*P*<0.05。

2.2 各组大鼠的肌酐、尿素氮及24 h尿蛋白比较

对照组、模型组、金双歧组大鼠的肌酐、尿素氮及24 h尿蛋白比较,经方差分析,差异有统计学意义(*P*<0.05)。进一步两两比较,模型组、金双歧组大鼠的肌酐、尿素氮及24 h尿蛋白较对照组均升高(*P*<0.05);模型组与金双歧组大鼠的肌酐、尿素氮及24 h尿蛋白比较,差异无统计学意义(*P*>0.05)。见表3。

2.3 各组大鼠肾脏组织的病理变化

各组大鼠肾脏组织HE染色病理结果显示,对

表3 各组大鼠的肌酐、尿素氮及24 h尿蛋白比较

(*n*=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	肌酐/ μmol/L	尿素氮/ mmol/L	24小时尿蛋白/ (mg/24 h)
对照组	53.39±9.47	5.44±1.41	4.97±1.41
模型组	174.08±16.50 [†]	25.25±5.81 [†]	91.56±8.15 [†]
金双歧组	164.47±15.12 [†]	22.64±3.90 [†]	86.41±7.37 [†]
<i>F</i> 值	225.151	70.507	576.618
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注:†与对照组比较,*P*<0.05。

照组肾脏组织染色均匀,肾小球、肾小管、肾间质等结构形态规整。模型组及金双歧组皮髓质变薄,肾小球数量减少,萎缩硬化,肾小管扩张明显,上皮细胞变性、坏死,部分管内可见颗粒结晶沉积,严重者呈片状萎缩。肾间质炎症细胞浸润明显,且有颗粒管型及蛋白管型,大面积纤维化。对照组、模型组、金双歧组大鼠的肾间质损伤

评分分别为 (0.64 ± 0.27) 、 (7.97 ± 1.33) 、 (8.15 ± 0.95) 分,3组比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$);进一步两两比较,模型组、金双歧组大鼠的肾间质损伤评分较对照组升高($P < 0.05$),模型组与金双歧组肾间质损伤评分比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图1。

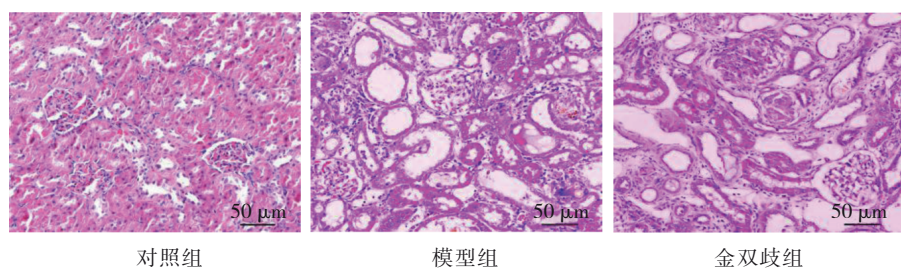


图1 各组大鼠肾脏组织HE染色病理切片 ($\times 200$)

各组大鼠肾脏组织Masson染色病理结果显示,对照组肾组织结构清晰、排列整齐,肾小球及小管结构正常,肾小球系膜、小管基底膜及脉管区可见少量蓝色线状表达。模型组、金双歧组肾小管扩张明显,上皮细胞变性、坏死,肾间质可见大量炎症细胞浸润及蓝色胶原染色,肾小管基底膜纤维组织增生明显。对照组、模型组、金双歧

组大鼠肾间质纤维化相对面积分别为 (3.81 ± 1.10) 、 (62.74 ± 6.75) 、 (64.43 ± 7.52) ,3组比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$);进一步两两比较,模型组、金双歧组大鼠的肾间质纤维化相对面积较对照组增加($P < 0.05$),模型组与金双歧组肾间质纤维化相对面积比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图2。

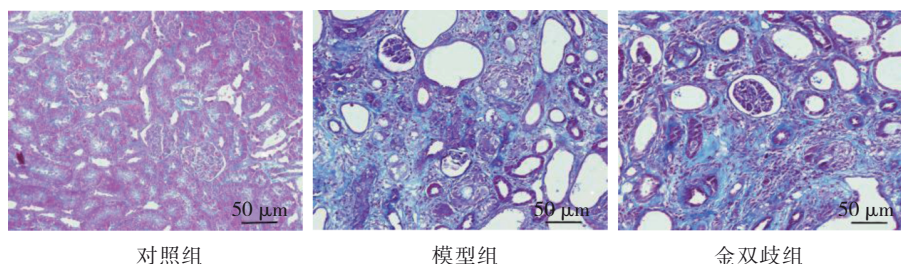


图2 各组大鼠肾脏组织Masson染色病理切片 ($\times 200$)

2.4 各组大鼠结肠黏膜屏障结构与功能变化

各组大鼠结肠黏膜超微结构变化,透射电镜结果显示,对照组可见大量排列整齐、形态规则的微绒毛,紧密连接及桥粒清晰可见;模型组微绒毛脱落缺如,排列不齐,部分倒伏且形态不规则,紧密连接及桥粒结构模糊;金双歧组结肠黏膜微绒毛增多,形态规则,排列整齐,紧密连接及桥粒结构较模型组有所恢复。见图3。

各组大鼠结肠HE染色病理结果显示,正常组结肠黏膜连续且完整,肠绒毛排列整齐;模型组

结肠黏膜糜烂,上皮脱落,绒毛明显减少,高度缩短,刷状缘不连续;金双歧组结肠黏膜绒毛密度及高度增加,刷状缘连续性恢复。对照组、模型组、金双歧组大鼠结肠黏膜病理损伤评分分别为 (0.53 ± 0.12) 、 (3.20 ± 0.48) 、 (2.16 ± 0.34) 分,3组比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$)。进一步两两比较,模型组、金双歧组的结肠黏膜病理损伤评分较对照组升高($P < 0.05$),金双歧组结肠黏膜病理损伤评分较模型组降低($P < 0.05$)。见图4。

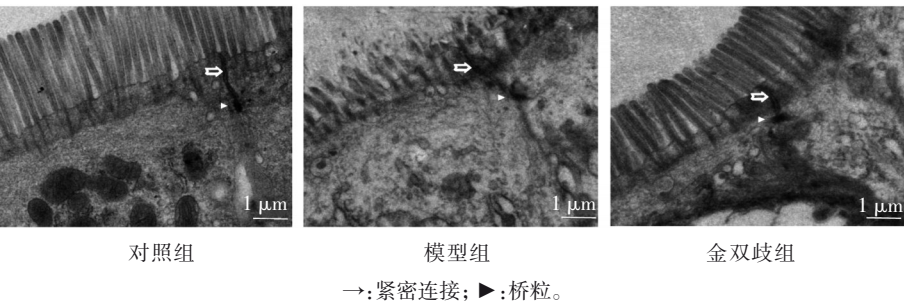


图3 各组大鼠结肠黏膜上皮超微结构 (透射电镜×4 000)

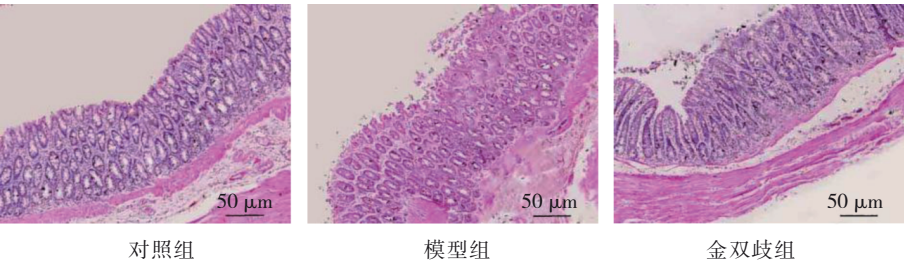


图4 各组大鼠结肠病理切片 (HE染色×200)

各组大鼠免疫荧光结果显示, 对照组结肠黏膜表面及隐窝处可见大量紧密连接蛋白Occludin表达, 整个上皮的蛋白表达连续且致密; 模型组结肠黏膜Occludin蛋白表达明显减少, 分散不连续; 金双歧组Occludin蛋白显著增多, 且连续性也有明显恢复。见图5。

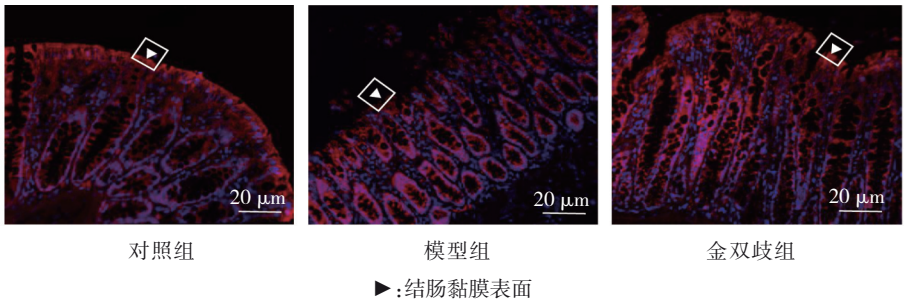


图5 各组大鼠结肠黏膜Occludin蛋白的表达 (免疫荧光×400)

2.5 各组大鼠结肠TLR4/MyD88/NF-κB蛋白相对表达量比较

对照组、模型组、金双歧组大鼠结肠TLR4、MyD88、NF-κB P65、p-NF-κB P65蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义($P<0.05$); 进一步两两比较, 模型组、金双歧组大鼠结肠TLR4、MyD88、NF-κB P65、p-NF-κB P65蛋白相对表达量较对照组均升高($P<0.05$), 金双歧组大鼠结肠TLR4、MyD88、NF-κB P65、p-NF-κB P65蛋白相对表达量较模型组降低($P<0.05$)。见图6和表4。

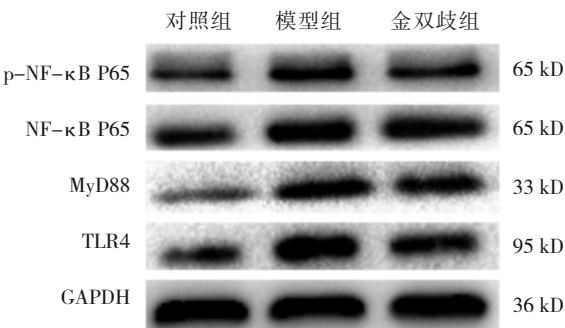


图6 各组大鼠结肠TLR4、MyD88、NF-κB P65、p-NF-κB P65蛋白表达

表 4 各组大鼠结肠 TLR4、MyD88、NF-κB P65、p-NF-κB P65 蛋白相对表达量比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	TLR4 蛋白	MyD88 蛋白	NF-κB P65 蛋白	p-NF-κB P65 蛋白
对照组	0.17 ± 0.06	0.11 ± 0.04	0.32 ± 0.08	0.19 ± 0.05
模型组	0.92 ± 0.21 ^①	0.75 ± 0.15 ^①	0.83 ± 0.20 ^①	0.67 ± 0.16 ^①
金双歧组	0.44 ± 0.09 ^{①②}	0.47 ± 0.11 ^{①②}	0.68 ± 0.15 ^{①②}	0.46 ± 0.14 ^{①②}
F 值	76.702	89.218	30.540	39.527
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注：①与对照组比较, P<0.05; ②与模型组比较, P<0.05。

2.6 各组大鼠结肠 TLR4/MyD88/NF-κB mRNA 相对表达量比较

对照组、模型组、金双歧组大鼠结肠 TLR4、MyD88、NF-κB P65 mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 (P<0.05); 进一步两两比较, 模型组、金双歧组大鼠结肠 TLR4、MyD88、NF-κB P65 mRNA 相对表达量较对照组均升高 (P<0.05), 金双歧组大鼠结肠 TLR4、MyD88、NF-κB P65 mRNA 相对表达量较模型组降低 (P<0.05)。见表 5。

表 5 各组大鼠结肠 TLR4、MyD88、NF-κB P65 mRNA 相对表达量比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	TLR4 mRNA	MyD88 mRNA	NF-κB P65 mRNA
对照组	1.48 ± 0.43	1.42 ± 0.39	1.79 ± 0.52
模型组	4.85 ± 1.16 ^①	3.77 ± 0.95 ^①	5.39 ± 1.24 ^①
金双歧组	3.02 ± 0.90 ^{①②}	2.75 ± 0.75 ^{①②}	4.00 ± 1.11 ^{①②}
F 值	36.711	25.826	32.567
P 值	0.000	0.000	0.000

注：①与对照组比较, P<0.05; ②与模型组比较, P<0.05。

2.7 各组大鼠 D-乳酸、内毒素水平比较

对照组、模型组、金双歧组大鼠血清 D-乳酸、内毒素水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 (P<0.05)。进一步两两比较, 模型组、金双歧组大鼠血清 D-乳酸、内毒素水平较对照组升高 (P<0.05), 金双歧组大鼠血清 D-乳酸、内毒素水平较模型组降低 (P<0.05)。见表 6。

2.8 各组大鼠血清炎症因子水平比较

对照组、模型组、金双歧组大鼠血清炎症因子 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平比较, 经方差分析,

表 6 各组大鼠 D-乳酸水平比较 (n=10, mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	D-乳酸	内毒素
对照组	0.328 ± 0.025	0.015 ± 0.003
模型组	0.927 ± 0.043 ^①	0.054 ± 0.006 ^①
金双歧组	0.819 ± 0.048 ^{①②}	0.044 ± 0.007 ^{①②}
F 值	650.992	118.197
P 值	0.000	0.000

注：①与对照组比较, P<0.05; ②与模型组比较, P<0.05。

差异有统计学意义 (P<0.05); 进一步两两比较, 模型组、金双歧组血清 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平较对照组均升高 (P<0.05), 金双歧组血清 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平较模型组降低 (P<0.05)。见表 7。

表 7 各组大鼠血清 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平比较 (n=10, pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-6	IL-1β	TNF-α
对照组	13.76 ± 3.68	15.41 ± 4.18	20.92 ± 4.83
模型组	136.61 ± 17.00 ^①	116.67 ± 15.69 ^①	127.82 ± 20.07 ^①
金双歧组	114.67 ± 14.96 ^{①②}	89.55 ± 14.44 ^{①②}	108.70 ± 17.54 ^{①②}
F 值	244.609	174.536	132.848
P 值	0.000	0.000	0.000

注：①与对照组比较, P<0.05; ②与模型组比较, P<0.05。

3 讨论

肠黏膜作为重要的保护屏障, 将机体内环境与外界分隔开, 防止病原微生物及其产物、其他有害物质等吸收入血, 保证机体正常生命活动。肠黏膜屏障的完整性与上皮细胞及细胞间的紧密连接、桥粒及肠道菌群等因素密切相关。本研究表明, CKD 大鼠出现腹泻等消化道症状, 且结肠黏膜病理损伤明显, 上皮糜烂, 微绒毛脱落缺如, 紧密连接及桥粒结构模糊, 紧密连接蛋白 Occludin 表达明显减少且不连续, 直接反映肠黏膜结构及功能受损的指标 D-乳酸水平也明显升高。其次, CKD 大鼠血清内毒素水平显著升高, 很可能来自于受损的肠道; 血清炎症因子 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平也明显升高, 可能与肠道的吸收增加及机体免疫系统受刺激后引发的系统炎症反应相关。CKD 所致的肠道结构及功能障碍可能与以下因素相关: ①CKD 致肾脏排泄功能下降, 尿素在体内堆积并

大量进入胃肠道,直接损害肠上皮细胞紧密连接蛋白ZO-1、Occludin、Claudin-1^[12]。②尿素被肠道微生物分泌的脲酶水解形成大量氨,再转换为氢氧化铵,氢氧化铵对紧密连接蛋白具有直接溶解作用^[13]。③肠道菌群失调所致内毒素水平升高,直接接触破坏紧密连接蛋白,也可通过干扰磷酸化和去磷酸化过程,间接损伤肠道结构的完整性^[14]。④炎症因子可通过抑制紧密连接蛋白表达、改变紧密连接蛋白构象等机制损伤肠黏膜完整性^[15]。⑤CKD患者容量超负荷所致胃肠道水肿,以及血液透析时短暂缺血再灌注损伤。

CKD可导致机体肠道菌群结构、数量、分布等出现明显变化,即肠道菌群失衡,主要表现为肠球菌、厌氧菌、产气荚膜梭菌等明显增加,但双歧杆菌等益生菌的数量大量减少。肠道菌群失衡可引起内毒素、趋化因子、炎症因子等水平升高并吸收入血液,导致局部及全身的慢性炎症及氧化应激,加速CKD进展。其次,肠道滞留的大量含氮衍生物被条件致病菌酵解,生成硫酸吲哚酚、对甲酚硫酸等肠源性尿毒症毒素,其与肾功能恶化、心血管并发症的发生及死亡关系密切^[16]。由于CKD与肠道菌群失衡相互影响,益生菌干预就成为当前治疗的新策略之一。既往研究显示,CKD 3、4期患者在接受乳酸杆菌治疗2个月后血清尿素水平明显下降^[5];也有实验表明鼠李糖乳酸杆菌能够明显降低CKD小鼠的肌酐水平,减轻肾纤维化程度^[17]。本研究结果显示,金双歧组大鼠的肌酐、尿素氮及24 h尿蛋白与模型组比较,差异无统计学意义,这表明金双歧无法降低CKD大鼠的肌酐、尿素氮及24 h尿蛋白,也不能改善肾脏病理损伤。可能是因为CKD大鼠肾脏病理损伤重,后期单独使用益生菌治疗无法有效延缓肾功能恶化,故该药对早期CKD的干预效果及其他益生菌对肾脏的治疗作用仍需进一步探索。但是,金双歧对CKD所致肠黏膜损伤具有明确保护作用,可改善大鼠腹泻等消化道症状,恢复肠黏膜屏障的完整性,同时也能降低其血液中内毒素、血清IL-6、IL-1β、TNF-α水平,减轻机体炎症反应,这与WANG等^[4]研究结果相似。

TLR4属细胞表面信号转导跨膜受体,广泛参与机体炎症反应。MyD88是TLR4信号通路中的重

要链接分子,是胞外信号向下游转导的重要节点^[18],可激活胞内转录调控因子NF-κB,启动炎症级联反应。静息状态下,NF-κB处于无活性状态,当细胞受到刺激时,活化形成p-NF-κB,从胞浆移至胞核,发挥转录调控作用,促进各种炎症因子释放^[19]。TLR4/MyD88/NF-κB通路广泛参与机体炎症反应,与多种胃肠道疾病发生、发展密切相关。既往研究结果显示,肠易激综合征、溃疡性结肠炎、结肠癌动物模型中TLR4、MyD88、NF-κB蛋白表达明显增加,血清IL-1β、IL-6、TNF-α等炎症因子明显升高^[6-8]。本研究结果显示,CKD大鼠结肠组织中TLR4、MyD88、NF-κB P65及p-NF-κB P65蛋白表达皆有明显增加,TLR4、MyD88、NF-κB P65 mRNA表达明显上调,血清内毒素及炎症因子IL-6、IL-1β、TNF-α水平显著升高,经金双歧治疗后,结肠组织TLR4/MyD88/NF-κB通路相关蛋白表达、mRNA表达及血液内毒素、炎症因子水平降低。由此推测,CKD所致的肠黏膜损伤及系统炎症反应可能与TLR4/MyD88/NF-κB信号通路激活有关,而益生菌金双歧可能通过抑制该信号通路的活化,减轻肠道损伤,改善全身炎症反应。

综上所述,金双歧对病理损伤重的肾脏无明显保护作用,CKD所致的肠黏膜屏障损伤及系统炎症反应可能与TLR4/MyD88/NF-κB信号通路激活有关,而金双歧可能通过抑制该信号通路活化,减轻结肠组织病理损伤,恢复肠黏膜的完整性,降低其通透性,同时改善机体系统炎症反应。

参 考 文 献:

- [1] LV J C, ZHANG L X. Prevalence and disease burden of chronic kidney disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 3-15.
- [2] FENG Z, WANG T, DONG S, et al. Association between gut dysbiosis and chronic kidney disease: a narrative review of the literature[J]. *J Int Med Res*, 2021, 49(10): 3000605211053276.
- [3] HOBBS G P, KARADUTA O, DUSIO G F, et al. Chronic kidney disease and the gut microbiome[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 316(6): F1211-F1217.
- [4] WANG I K, WU Y Y, YANG Y F, et al. The effect of probiotics on serum levels of cytokine and endotoxin in peritoneal dialysis patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Benef Microbes*, 2015, 6(4): 423-430.
- [5] MIRANDA ALATRISTE P V, URBINA ARRONTE R, GÓMEZ ESPINOSA C O, et al. Effect of probiotics on human blood urea levels in patients with chronic renal failure[J]. *Nutr Hosp*, 2014,

- 29(3): 582-590.
- [6] 储浩然, 王宇, 仝理, 等. 艾灸对腹泻型肠易激综合征大鼠结肠 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 针刺研究, 2020, 45(8): 633-639.
- [7] ZHANG Y F, HAN D D, YU S, et al. Protective effect of iridoid glycosides of the leaves of *Syringa oblata Lindl.* on dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis by inhibition of the TLR2/4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 7650123.
- [8] GAO Y H, HAN T, HAN C L, et al. Propofol regulates the TLR4/NF- κ B pathway through miRNA-155 to protect colorectal cancer intestinal barrier[J]. Inflammation, 2021, 44(5): 2078-2090.
- [9] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 69-72.
- [10] TAAL M W, ZANDI-NEJAD K, WEENING B, et al. Proinflammatory gene expression and macrophage recruitment in the rat remnant kidney[J]. Kidney Int, 2000, 58(4): 1664-1676.
- [11] CHIU C J, MCARDLE A H, BROWN R, et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal[J]. Arch Surg, 1970, 101(4): 478-483.
- [12] VAZIRI N D, YUAN J, NORRIS K. Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease[J]. Am J Nephrol, 2013, 37(1): 1-6.
- [13] LAU W L, VAZIRI N D. Urea, a true uremic toxin: the empire strikes back[J]. Clin Sci (Lond), 2017, 131(1): 3-12.
- [14] STEPHENS M, von der WEID P Y. Lipopolysaccharides modulate intestinal epithelial permeability and inflammation in a species-specific manner[J]. Gut Microbes, 2020, 11(3): 421-432.
- [15] WANG F, LIU J, HU X F, et al. The influence on oxidative stress markers, inflammatory factors and intestinal injury-related molecules in Wuhui pigeon induced by lipopolysaccharide[J]. PLoS One, 2021, 16(5): e0251462.
- [16] EVENEPOEL P, POESEN R, MEIJERS B. The gut-kidney axis[J]. Pediatr Nephrol, 2017, 32(11): 2005-2014.
- [17] TUNGSANGA S, KATAVETIN P, PANPETCH W, et al. *Lactobacillus rhamnosus* L34 attenuates chronic kidney disease progression in a 5/6 nephrectomy mouse model through the excretion of anti-inflammatory molecules[J]. Nephrol Dial Transplant, 2022, 37(8): 1429-1442.
- [18] JIANG Z S, ZHANG J R. Mesenchymal stem cell-derived exosomes containing miR-145-5p reduce inflammation in spinal cord injury by regulating the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. Cell Cycle, 2021, 20(10): 993-1009.
- [19] MULERO M C, HUXFORD T, GHOSH G. NF- κ B, I κ B, and IKK: integral components of immune system signaling[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1172: 207-226.
- (张蕾 编辑)
- 本文引用格式:** 黄梅, 陈鸿禧, 谭玲玲, 等. 基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路探讨金双歧对慢性肾脏病大鼠肠黏膜屏障的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(9): 32-40.
- Cite this article as:** HUANG M, CHEN H X, TAN L L, et al. Effects of golden bifid on intestinal mucosal barrier of rats with chronic kidney disease based on TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. China Journal of Modern Medicine, 2023, 33(9): 32-40.