

网络出版时间:2023-07-13 17:23:03 网络出版地址:<https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.r.20230713.1437.024.html>

早期抑制 TLR4 对新生大鼠 HIBD 后青春期 脑海马免疫功能的影响

黄晓丽¹, 欧阳志翠¹, 吴祥宏², 李燕², 黄贊², 刘国琼², 陆诗微², 唐振¹

摘要 目的 探讨 Toll 样受体 4(TLR4)早期抑制在调节新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)后青春期脑海马免疫功能中的作用。**方法** 生后 7 d 新生大鼠随机分为 Control 组、缺氧缺血(HI)组及 HI + TLR4 抑制剂 TAK-242 组(TAK-242 组)。HI 后 3 d 免疫组化检测大鼠脑海马 TLR4 表达;HI 后 21 d 免疫荧光检测大鼠脑海马 CA1 区 Iba-1⁺、GFAP⁺、CD161⁺、MPO⁺ 及 CD3⁺细胞的数量变化;免疫组化检测大鼠脑海马 CA1 区黏附因子 ICAM-1、补体 C3a 表达;Western blot 检测大鼠脑海马 IL-1β、TNF-α、IL-10 表达。**结果** HI 后 3 d 大鼠脑海马 CA1、CA3 及 DG 区 TLR4 表达,HI 组较 Control 组升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),而 TAK-242 组较 HI 组降低($P < 0.05$)。HI 后 21 d 大鼠脑海马 CA1 区 GFAP⁺ 细胞数量,TAK-242 组较 HI 组降低($P < 0.05$);CD3⁺ T 淋巴细胞数量,HI 组较 Control 组增加($P < 0.05$),而 TAK-242 组较 HI 组差异无统计学意义;HI 后 21 d 各组大鼠脑海马 CA1 区 Iba-1⁺、MPO⁺、CD161⁺ 细胞数量,ICAM-1、C3a 因子表达及海马组织 TNF-α、IL-1β 及 IL-10 表达差异无统计学意义。**结论** 早期抑制 TLR4 可通过减轻新生儿 HIBD 后脑海马星形胶质细胞增加而改善其青春期神经免疫紊乱。

关键词 缺氧缺血性脑损伤;海马;TLR4;大鼠;神经免疫

中图分类号 R 722.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1317-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.012

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)是新生儿期严重的神经损伤性疾病,存活者可遗患脑瘫、癫痫等远期神经功能障碍。HIBD 发病机制复杂,涉及能量衰竭、自由基产生、离子失衡、兴奋性神经递质累积、氧化应激反应等多个方面^[1]。神经免疫功能紊乱是参与 HIBD 发病的重要机制之一,各种免疫细胞激活及免疫因子

2023-06-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82160301);桂林市科技局创新平台和人才计划项目(编号:20210218-5);2021 年广西区级大学生创新创业训练计划项目(编号:S202110601051)

作者单位:¹ 桂林医学院附属医院新生儿科,桂林 541001

² 桂林医学院 2019 级临床医学儿科班,桂林 541001

作者简介:黄晓丽,女,硕士,主治医师;

唐振,男,博士,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:tangzhen19840525@126.com

异常释放参与 HIBD 急性神经细胞死亡及远期神经功能损伤。Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)是一种广泛分布于神经细胞膜表面的重要模式识别受体,脑组织发生缺血、创伤等损伤后,TLR4 表达上调并通过多条信号通路放大神经炎症联级,介导急慢性脑损伤的形成^[2-3]。前期研究^[4]表明缺氧缺血(hypoxic-ischemia, HI)后 24 h, 脑海马 TLR4 表达升高,早期抑制 TLR4 表达能减轻新生大鼠 HI 后脑海马神经元缺失,并从行为学上改善大鼠青春期脑损伤预后,然而 TLR4 介导何种神经免疫机制参与 HIBD 目前并不清楚。

该研究通过早期抑制 TLR4 探讨其调控新生大鼠 HIBD 模型脑海马内各种免疫细胞活化及免疫因子表达情况,以揭示 TLR4 介导 HIBD 脑海马损伤的神经免疫机制,为开发 HIBD 免疫调节治疗方法提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型建立 本研究经桂林医学院伦理委员会批准(NO:GLMC202103095)。生后 7 d 体质量在 13~19 g 的 Sprague Dawley 大鼠按照 Rice 方法建立 HIBD 模型^[5],新生大鼠经七氟烷(4% 诱导,2% 维持)吸入麻醉后固定,触摸左颈总动脉波动位置,切开皮肤,显微镜下分离肌肉及神经,暴露左颈总动脉,5-0 缝合线双结扎后中间处离断颈总动脉,缝合皮肤,麻醉时间不超过 5 min。待幼仔麻醉苏醒后放回母鼠窝内,1 h 后将幼仔放入恒温 37.0 ℃水浴缺氧箱(自制)中,接 8% O₂/92% N₂ 混合气体 1.5 L/min,维持氧浓度(8.0% ± 0.1%),无水氯化钙吸收动物呼出 CO₂,缺氧 2 h 后放入母鼠处。Control 组大鼠仅给予切开皮肤分离并暴露颈总动脉,既不给予结扎,也不给予缺氧。

1.2 分组与给药 新生大鼠按体质量随机区组分成:对照(Control)组、HI 组、HI + TLR4 抑制剂 TAK-242 组(TAK-242 组)。TAK-242 用 1% 二甲基亚砜(DMSO)溶解,终浓度为 0.1 mg/ml。结合课题组预实验确定 TAK-242 用药剂量为 0.5 mg/kg,于缺氧缺

血前 30 min 腹腔内单次注射。Control 组和 HI 组相同时间腹腔注射等体积生理盐水。

1.3 主要试剂 TAK-242 购自美国 MCE 公司; 兔抗大鼠 TLR4 抗体(1:200)、兔抗大鼠 ICAM-1 抗体(1:200)、兔抗大鼠 Iba-1 抗体(1:200)、兔抗大鼠 GFAP 抗体(1:200)、兔抗大鼠 MPO 抗体(1:200)、兔抗大鼠 CD3 抗体(1:200)、兔抗大鼠 IL-1 β 抗体(1:1 000)、兔抗大鼠 IL-10 抗体(1:1 000)及兔抗大鼠 β -actin 抗体(1:5 000)购自英国 Abcam 公司; 兔抗大鼠 TNF- α 抗体(1:1 000)购自美国 Santa Cruz 公司; 兔抗大鼠 C3a 抗体(1:200)购自武汉 ABclonal 公司; 兔抗大鼠 CD161 抗体(1:200)购自英国 Serotec 公司。

1.4 免疫组化及免疫荧光 大鼠戊巴比妥(40 mg/kg)腹腔注射麻醉, 心脏灌注后留取脑组织 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋后切取 5 μ m 切片先后浸入二甲苯和乙醇梯度中脱蜡水化, 然后放入煮沸的柠檬酸(pH 6.0)抗原修复 20 min 后 3% H₂O₂ 中浸泡 10 min, 5% 山羊血清室温封闭 30 min, 特异性一抗 4 °C 孵育过夜, 次日取出玻片, PBS 洗涤后相应二抗室温孵育 30 min。二氨基联苯胺(DAB)显色后光学显微镜下观察并采集图片, Image Pro Plus 6.0 系统分析阳性区域的百分比。

用于免疫荧光检测的 5 μ m 切片经抗原修复后浸入 0.5% Triton X-100 中 30 min, PBS 洗涤后 5% BSA 封闭 30 min。加入特异性一抗并在 4 °C 下孵育过夜。次日取出切片洗涤后加入相应的荧光二抗避光室温孵育 60 min。DAPI 复染后抗荧光猝灭剂和中性树脂封片。暗室中荧光显微镜观察并采图。Image Pro Plus 6.0 系统计数海马 CA1 区阳性细胞

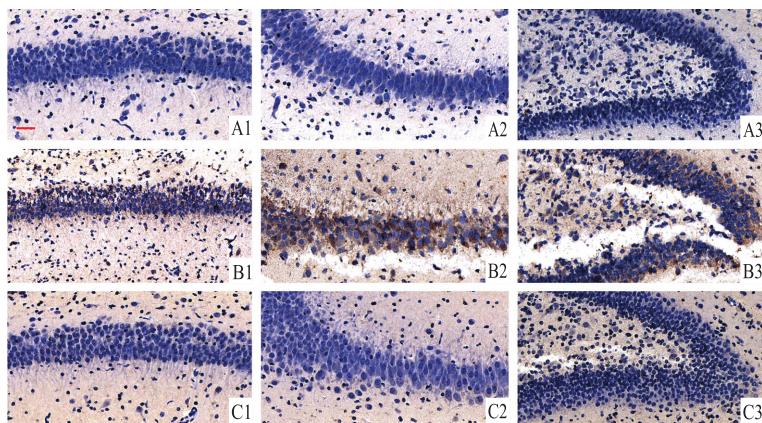


图 1 HI 后 3 d 各组大鼠海马不同区域 TLR4 免疫组化图 $\times 400$

A: Control 组; B: HI 组; C: TAK-242 组; 1: CA1 区; 2: CA3 区; 3: DG 区; D: HI 后 3 d 各组大鼠海马 TLR4 相对表达直方图($n=3$) ;与 Control 组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 HI 组比较: # $P<0.05$

数量。

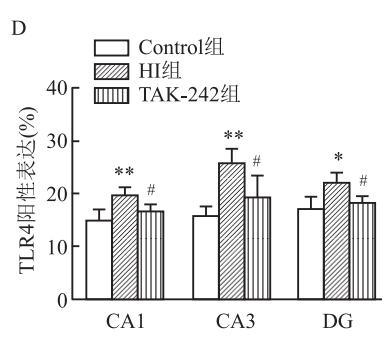
1.5 Western blot 实验 BCA 蛋白质分析试剂盒测定脑海马蛋白质浓度, 制备 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶, 每孔加入蛋白质(30 μ g), 80 V 恒压分离 20~30 min 后 110 V 继续电泳 60~90 min, 恒流转膜 1 h 将蛋白移到 PVDF 膜上。封闭后将膜与特异性一抗体 4 °C 孵育过夜。次日 PBS 洗涤后, 相应二抗室温下孵育 1 h, ECL 化学发光显影后 ChemStudio 成像系统读取胶片并采集图片。Image J 软件读取图片吸光度值。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析。计量资料以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 单因素方差分析比较各组间差异, LSD-t 检验进行多重比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TAK-242 早期处理对 HIBD 后脑海马区 TLR4 表达影响 免疫组化显示 HI 后 3 d 各组大鼠脑海马组织中 TLR4 呈黄褐色阳性表达, 主要定位表达在神经细胞胞膜; HI 组左侧脑海马 CA1、CA3 及 DG 区 TLR4 表达较 Control 组升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 而 TAK-242 组左侧海马 CA1、CA3 及 DG 区 TLR4 表达较 HI 组降低($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 早期抑制 TLR4 对 HIBD 后新生大鼠青春期脑海马 Iba-1⁺ 小胶质细胞及 GFAP⁺ 星形胶质细胞的影响 HI 后 21 d HI 组左侧脑海马 CA1 区 GFAP⁺ 细胞数量较 Control 组增多($P < 0.01$), TAK-242 组左侧脑海马 CA1 区 GFAP⁺ 细胞数量较 HI 组减低($P < 0.05$)然而各组左侧脑海马 CA1 区 Iba-1⁺ 细胞数量差异无统计学意义($F = 1.301, P = 0.331$)。



见图2。

2.3 早期抑制 TLR4 对 HIBD 后新生大鼠青春期脑海马 CA1 区 MPO⁺ 中性粒细胞、CD161⁺ 自然杀伤细胞及 CD3⁺ T 细胞的影响 HI 后 21 d HI 组左侧脑海马 CA1 区 CD3⁺ T 细胞数量较 Control 组增多 ($P < 0.05$)；尽管 TAK-242 组左侧脑海马 CA1 区 CD3⁺ T 细胞数量较 HI 组减低，但差异无统计学意义；各组大鼠左侧脑海马 CA1 区 MPO⁺ 中性粒细胞数量及 CD161⁺ 自然杀伤细胞数量差异无统计学意义 ($F_{MPO+ \text{细胞}} = 1.279, P = 0.336; F_{CD161+ \text{细胞}} = 1.612, P = 0.266$)。见图3。

2.4 早期抑制 TLR4 对 HIBD 后新生大鼠青春期脑海马 CA1 区黏附因子 ICAM-1 及补体 C3a 表达的影响 HI 后 21 d HI 组左侧脑海马 CA1 区 ICAM-1 表达平均吸光度值较 Control 组增高 ($P < 0.05$)，但 TAK-242 不能降低 HI 后左侧脑海马 CA1 区 ICAM-1 表达水平增加 ($P > 0.05$)。各组大鼠左侧脑海马 CA1 区 C3a 表达平均吸光度值差异并无统计学意义 ($F = 1.274, P = 0.337$) (图4A、B)。

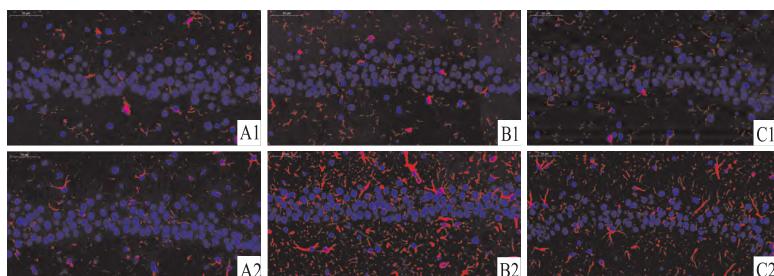


图2 HI后21 d各组大鼠海马CA1区Iba-1⁺细胞及GFAP⁺细胞免疫荧光图×400

A: Control 组; B: HI 组; C: TAK-242 组; 1: Iba-1⁺ 细胞; 2: GFAP⁺ 细胞; D: 各组大鼠海马 CA1 区 Iba-1⁺ 细胞数量及 GFAP⁺ 细胞数量比较; $n = 3 \sim 4$; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$; 与 HI 组比较: # $P < 0.05$

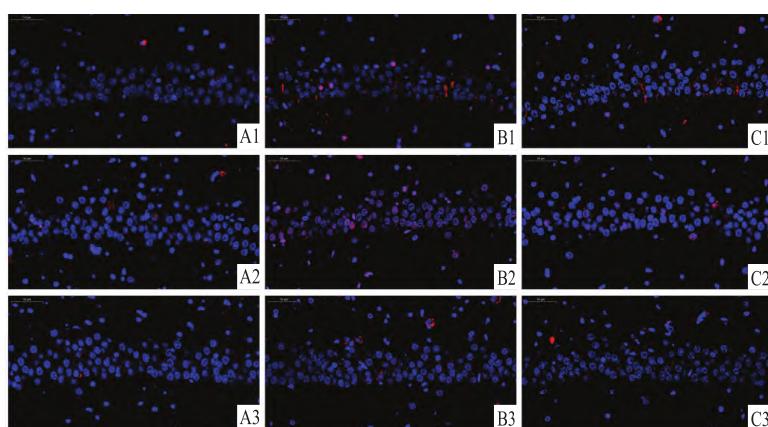


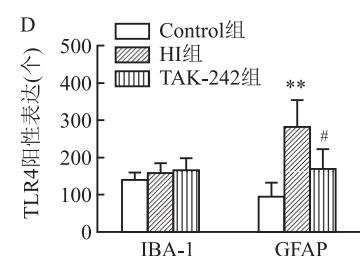
图3 HI后21 d各组大鼠海马CA1区MPO⁺细胞、CD161⁺细胞及CD3⁺细胞免疫荧光图及其直方图×400

A: Control 组; B: HI 组; C: TAK-242 组; 1: MPO; 2: CD161; 3: CD3; D: 各组大鼠海马 CA1 区 MPO⁺、CD161⁺ 及 CD3⁺ 细胞数量比较; $n = 3 \sim 4$; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$

2.5 早期抑制 TLR4 对 HIBD 后新生大鼠青春期脑海马 TNF-α、IL-1β 及 IL-10 表达的影响 HI 后 21 d HI 组左侧脑海马 TNF-α 及 IL-1β 表达较 Control 组增高，TAK-242 组 TNF-α 及 IL-1β 表达较 HI 组降低，但差异无统计学意义；HI 后 21 d HI 组左侧脑海马 IL-10 表达较 Control 组降低，TAK-242 组 IL-10 表达较 HI 组上升，但差异无统计学意义。见图 5。

3 讨论

小胶质细胞及星形胶质细胞是中枢神经系统常驻的免疫细胞，它们的数量和功能状态代表脑内神经免疫应答状态。脑损伤发生可诱导小胶质细胞持续活化，Loane et al^[6]在小鼠脑创伤模型中发现，脑损伤 1 年后皮质中仍能观察到持续的小胶质细胞激活，并伴有炎症因子和氧化应激的标志物升高，这些与病灶扩张、海马神经退行性变和髓鞘丧失相关。尽管本研究并未在统计学上发现 HIBD 后 21 d 各组大鼠脑海马 CA1 区小胶质细胞有差异，但 HI 组小



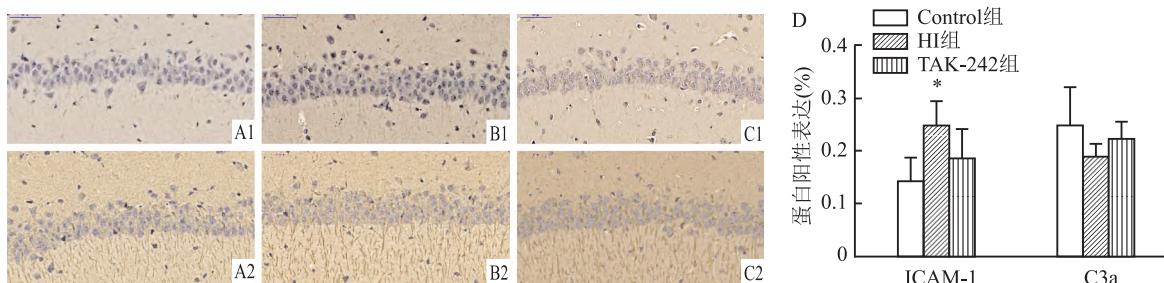


图4 HI后21 d各组大鼠海马CA1区黏附因子ICAM-1及C3a表达免疫组化图 ×400

A: Control组; B: HI组; C: TAK-242组; 1: ICAM-1; 2: C3a; D: 各组大鼠海马CA1区ICAM-1及C3a表达平均吸光度值比较; $n=3 \sim 4$; 与Control组比较: * $P < 0.05$

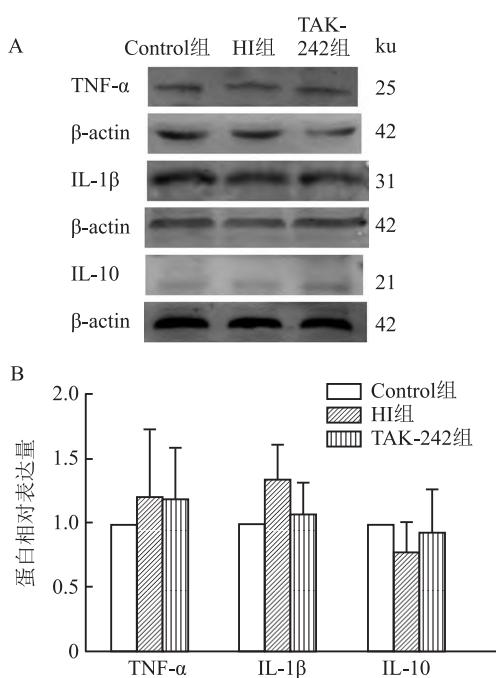


图5 HI后21 d各组大鼠海马TNF-α、IL-1β及IL-10表达情况

A: 表达免疫印迹图; B: 直方图比较; $n=4 \sim 5$

胶质细胞数量较Control组高[(161.3 ± 22.7)/field vs (143.3 ± 17.7)/field];反应性星形胶质细胞形成是HI诱导星形胶质细胞活化的重要形式,40% HIBD婴儿脑白质内存在反应性星形胶质细胞^[7],本研究亦显示HI后21 d HI组脑海马星形胶质细胞数量仍高于对照组。TLR4定位表达于星形胶质细胞表面,并在其活化过程中发挥重要作用。LPS诱导的P14小鼠癫痫模型中发现,星形胶质细胞表面TLR4被激活并介导神经突触改变而诱发小鼠持续癫痫,TLR4阻断后星形胶质细胞活化下降,脑损伤减轻^[8]。本研究证实抑制TLR4能够降低新生儿脑海马HIBD后21 d星形胶质细胞激活,这可能是改善新生儿HIBD神经损伤的一种方法。

损伤激活的外周免疫细胞通过破坏的血脑屏障进入脑内,与常驻免疫细胞一起参与脑损伤形成。中性粒细胞参与成人脑卒中后损伤形成,且与脑卒中后行为障碍相关。HI暴露的新生儿大脑中性粒细胞亦可迅速在脑组织中累积,参与HI所致神经损伤^[9]。不同于中性粒细胞,新生儿HI后3~7 d T淋巴细胞才出现在损伤部位,并可长时间持续存在^[10]。本研究亦发现HI后21 d CD3⁺T淋巴细胞在脑海马内明显升高,这些结果提示T淋巴细胞更可能参与HI后的慢性免疫炎症反应;成年脑缺血模型中发现HI后脑组织内有NK细胞浸润,且独立于T细胞参与脑损伤形成,尽管新生儿外周NK细胞功能不成熟,神经毒性作用弱,然而早期脾脏切除降低外周NK细胞水平仍对HIBD有神经保护作用^[11]。TLR4是炎症细胞激活的重要受体,在脑卒中及脓毒血症发病过程中通过激活中性粒细胞、T淋巴细胞及NK细胞诱导脑损伤^[12],课题组前期研究^[13]亦发现早期抑制TLR4能够抑制HIBD后24 h及7 d时间点中性粒细胞、T淋巴细胞及NK细胞激活,然而本研究并未发现早期抑制TLR4能改善新生大鼠HIBD后青春期脑海马组织中性粒细胞、T淋巴细胞及NK细胞数量改变,提示TLR4可能未参与新生儿HIBD远期脑损伤后中性粒细胞、T淋巴细胞及NK细胞激活。

TNF-α、IL-1β是两种重要的促炎细胞因子,脑损伤后短期内表达水平增加,与脑损伤的严重程度呈正相关,同时损伤诱导脑组织中免疫细胞的激活可影响抑炎因子如IL-10分泌。本研究并未发现新生大鼠HIBD后21 d脑海马区TNF-α、IL-1β及IL-10表达异常,需进一步动态观察免疫因子变化以明确其在HIBD中的作用。脑缺血或出血后,内皮细胞被激活并表达ICAM-1,形成黏附表面以降低免疫细胞运动并使其聚集在脑损伤部位。病毒性脑炎模型

中,TLR4^{mut}小鼠较TLR4^{WT}小鼠表达更低水平ICAM-1,同时血脑屏障功能障碍得到改善^[14]。本研究结果显示HIBD后21 d海马CA1区ICAM-1表达仍有升高,提示ICAM-1可能参与HIBD慢性损伤,TLR4早期干预并不能改善新生大鼠HIBD后青春期脑海马ICAM-1表达。补体C3是血清中含量最高的补体成分,在补体经典激活途径和旁路激活途径中均发挥重要作用。Jarlestedt et al^[15]研究表明C3a基因缺陷小鼠HIBD较对照组严重,而早期给予外源性C3a治疗可以降低HIBD损伤。本研究结果未显示HI后21 d脑海马CA1区C3a表达异常,提示补体C3a并未参与TLR4通路介导的新生大鼠HIBD远期损伤。

该研究揭示TLR4能够介导新生大鼠HIBD后青春期脑海马星形胶质细胞激活,这为改善新生儿HIBD慢性损伤提供了一种免疫治疗的理论基础;然而TLR4介导HIBD后星形胶质细胞激活机制并不清楚,同时是否存在其他免疫机制参与HIBD远期脑损伤,这些有待进一步研究。

参考文献

- [1] Li B, Concepcion K, Meng X, et al. Brain-immune interactions in perinatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Prog Neurobiol*, 2017,159:50–68.
- [2] Feng Y, Cui C, Liu X, et al. Protective role of apocynin via suppression of neuronal autophagy and TLR4/NF-κB signaling pathway in a rat model of traumatic brain injury [J]. *Neurochem Res*, 2017,42(11):3296–309.
- [3] Zhao H, Chen Z, Xie L J, et al. Suppression of TLR4/NF-κB signaling pathway improves cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Mol Neurobiol*, 2018,55(5):4311–9.
- [4] Tang Z, Cheng S, Sun Y, et al. Early TLR4 inhibition reduces hippocampal injury at puberty in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain damage [J]. *Neuroscience*, 2019,400:116–26.
- [5] Rice J R, Vannucci R C, Brierley J B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. *Ann Neurol*, 1981,9(2):131–41.
- [6] Loane D J, Kumar A, Stoica B A, et al. Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: association with chronic microglial activation [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2014,73(1):14–29.
- [7] Jay T R, von Saucken V E, Landreth G E. TREM2 in neurodegenerative diseases [J]. *Mol Neurodegener*, 2017,12(1):56.
- [8] Shen Y, Qin H, Chen J, et al. Postnatal activation of TLR4 in astrocytes promotes excitatory synaptogenesis in hippocampal neurons [J]. *J Cell Biol*, 2016,215(5):719–34..
- [9] Mulling K, Fischer A J, Siakaeva E, et al. Neutrophil dynamics, plasticity and function in acute neurodegeneration following neonatal hypoxia-ischemia [J]. *Brain Behav Immun*, 2021,92:234–44.
- [10] Winerdal M, Winerdal M E, Kinn J, et al. Long lasting local and systemic inflammation after cerebral hypoxic ischemia in newborn mice [J]. *PLoS One*, 2012,7(5):e36422.
- [11] Nazmi A, Albertsson A M, Rocha-Ferreira E, et al. Lymphocytes contribute to the pathophysiology of neonatal brain injury [J]. *Front Neurol*, 2018,9:159.
- [12] Fathali N, Ostrowski R P, Hasegawa Y, et al. Splenic immune cells in experimental neonatal hypoxia-ischemia [J]. *Transl Stroke Res*, 2013,4(2):208–19.
- [13] Xing Z, Zhen T, Jie F, et al. Early Toll-like receptor 4 inhibition improves immune dysfunction in the hippocampus after hypoxic-ischemic brain damage [J]. *Int J Med Sci*, 2022,19(1):142–51.
- [14] Hollidge B S, Cohen C A, Akuoku F J, et al. Toll-like receptor 4 mediates blood-brain barrier permeability and disease in C3H mice during Venezuelan equine encephalitis virus infection [J]. *Virulence*, 2021,12(1):430–43.
- [15] Jarlestedt K, Rousset C I, Stahlberg A, et al. Receptor for complement peptide C3a: a therapeutic target for neonatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. *FASEB J*, 2013,27(9):3797–804.

Effect of early inhibition of TLR4 on hippocampal immune function to adolescence after neonatal HIBD

Huang Xiaoli¹, Ouyang Zhicui¹, Wu Xianghong², Li Yan², Huang Yun², Liu Guoqiong², Lu Shiwei², Tang Zhen¹

(¹*Dept of Neonatology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001;*

²*Class of 2019 Clinical Medicine Pediatrics, Guilin Medical University, Guilin 541001)*

Abstract Objective To investigate the role of early inhibition of Toll-like receptor 4 (TLR4) in regulating hippocampal neuroimmune response to adolescent rats after neonatal hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Postnatal day 7 rats were randomized into control group, hypoxic ischemia (HI) group, and HI + TAK-242 (the specific inhibitor of TLR4) (TAK-242) group. The expression of TLR4 in rat hippocampus was detected by immunohistochemistry at 3 days after HI. Immunofluorescence was used to determine the number of Iba-1⁺, GFAP⁺,

网络出版时间:2023-07-13 17:23:46 网络出版地址:<https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.r.20230713.1438.026.html>

肌肽对链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠肾脏铁死亡和炎症的影响

张 嵘,刘雪琪,姜 玲,吴永贵

摘要 目的 探讨肌肽(CAR)对链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病小鼠肾脏铁死亡和炎症的影响。**方法** 以STZ诱导C57小鼠构建1型糖尿病小鼠模型(STZ模型),以正常C57小鼠作为正常对照。小鼠分为5组(每组6~8只):正常对照(NC)组、肌肽(CAR)组、STZ模型(STZ)组、STZ模型+肌肽(STZ+CAR)组、STZ模型+铁死亡抑制剂(STZ+Fer-1)组。喂养小鼠16周后,收集小鼠血清检测血肌酐(CRE)和尿素氮(BUN)水平,尿液检测小鼠24 h尿白蛋白水平。HE染色、PAS染色观察肾脏病理损伤程度。透射电镜观察肾脏线粒体的形态。PCR检测小鼠肾脏组织炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达。免疫荧光法检测小鼠肾脏活性氧(ROS)的表达。Western blot法检测肾脏组织铁死亡指标谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX 4)和长链脂酰辅酶A合成酶4(ACSL 4)蛋白表达水平的改变。对小鼠肾脏组织进行丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)和Fe $^{2+}$ 含量的测定。**结果** 与NC组相比,STZ组CRE和BUN水平升高($P < 0.001$);与STZ组相比,STZ+CAR组CRE和BUN水平降低($P < 0.001$, $P < 0.01$)。肾脏组织病理学检查显示,与NC组相

比,STZ组小鼠肾组织肾小管扩张明显、炎症细胞浸润和糖原沉积增加;与STZ组相比,STZ+CAR组肾小管扩张、炎症细胞浸润和糖原沉积减少。透射电镜检测结果显示STZ组小鼠肾脏线粒体肿胀,膜密度增加,线粒体脊减少或缺失,STZ+CAR组和STZ+Fer-1组肾小管扩张明显改善、炎症细胞浸润减少。Real-time PCR检测结果显示,与NC组相比,STZ组小鼠肾脏炎症因子(IL-1 β 、IL-6、MCP-1和TNF- α)的mRNA表达水平升高($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$);与STZ组相比,STZ+CAR组IL-1 β 、IL-6、MCP-1和TNF- α)的mRNA表达下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。免疫荧光结果显示,与NC组相比,STZ组小鼠肾脏组织ROS水平升高($P < 0.001$);与STZ组相比,STZ+CAR组小鼠肾脏组织ROS水平表达下降($P < 0.01$)。与NC组相比,STZ组小鼠肾脏GPX4表达与GSH含量下降($P < 0.001$),ACSL4蛋白表达、MDA和Fe $^{2+}$ 含量增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),STZ+CAR组GPX4表达与GSH含量增加($P < 0.01$),ACSL4蛋白表达、MDA和Fe $^{2+}$ 含量下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。**结论** CAR能够抑制STZ诱导的糖尿病小鼠的铁死亡和炎症,改善糖尿病小鼠肾脏病理损伤。

关键词 糖尿病肾病;铁死亡;炎症;肌肽

中图分类号 R 587.24

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1322-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.013

糖尿病肾病是糖尿病常见的微血管并发症,也

2023-06-17 收稿

基金项目:国家自然科学基金(编号:81761138042)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肾脏内科,合肥 230022

作者简介:张 嵘,女,硕士研究生;

吴永贵,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wuyong-gui@medmail.com.cn

CD161 $^+$, MPO $^+$ and CD3 $^+$ cells in the hippocampus at 21 days after HI. Immunohistochemistry was used to detect ICAM-1 and C3a expression in the hippocampal CA1 region; and Western blot was used to detect tumor necrosis factor interleukin IL-1 β , TNF- α and IL-10 expression. **Results** Compared with control group, significantly raised TLR4 expression was observed in the left hippocampal CA1, CA3 and DG regions ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), while the expression in the TAK-242 group lowered compared to the HI group ($P < 0.05$). The number of GFAP $^+$ cells in the CA1 area of the hippocampus in the TAK-242 group of neonatal rats decreased compared to which in the HI group at 21 days after HI ($P < 0.05$), but the number of CD3 $^+$ T lymphocytes in the hippocampal CA1 area of new born rats in the HI group increased compared to which in the Control group ($P < 0.05$), but the difference between TAK-242 and the Control group was not statistically significant. The number of Iba-1 $^+$ cells, MPO $^+$ cells, CD161 $^+$ cells, the expression of ICAM-1 and C3a in hippocampal CA1 region, and the expression of TNF- α , IL-1 β and IL-10 in hippocampus of rats were not different among groups at 21 days after HIBD. **Conclusion** Early inhibition of TLR4 may ameliorate adolescent neuroimmune disorders by reducing the increase of hippocampal astrocytes after neonatal HIBD.

Key words hypoxic-ischemic brain damage; hippocampus; TLR4; rat; neuroimmune