

## 瑞沙托维通过抑制 TLR4/MyD88 信号通路改善系统性 红斑狼疮小鼠肾小球内皮细胞损伤的研究

田玉, 杨玉淑, 丁萌, 韩玉祥, 郭惠芳\*

(河北医科大学第二医院 风湿免疫科, 河北 石家庄 050000)

**摘要** 探讨瑞沙托维在改善系统性红斑狼疮小鼠肾小球内皮细胞损伤中的治疗作用。以 24 周龄 MRL/lpr 小鼠及对照 MRL/MPJ 鼠作为实验对象, 将 8 只 16 周龄的 MRL/MPJ 小鼠作为 Control 组, 24 只同周龄的 MRL/lpr 小鼠随机分为 LN 组、LN + TAK 组、LN + DMSO 组, 每组 8 只, 雌雄各半。LN + TAK 组小鼠腹腔注射 10 mg/kg 的瑞沙托维, 一周两次; LN + DMSO 组腹腔注射等量的 1% DMSO 溶液; 连续给药 8 w, 于 24 周龄时, 处死小鼠, 收集血、尿及肾组织标本。ELISA 方法检测血浆 SDC-1 水平, 透射电镜观察肾小球内皮糖萼, 免疫组化方法及免疫荧光双染方法检测小鼠肾小球 VCAM-1、TLR4、MyD88 的表达, 并测定小鼠肾皮质的一氧化氮浓度。同 Control 组相比, MRL/lpr 小鼠存在肾小球内皮细胞糖萼脱落, 血浆中糖萼核心蛋白 SDC-1 水平明显升高, 且 SDC-1 与蛋白尿水平呈正相关; MRL/lpr 小鼠肾小球 VCAM-1 表达明显升高, 肾皮质 NO 水平明显升高, 且 MRL/lpr 小鼠肾小球内皮细胞高表达 TLR4、MyD88。瑞沙托维治疗能够抑制 TLR4/MyD88 在 MRL/lpr 小鼠肾小球内的激活, 降低血浆 SDC-1 水平, 改善肾小球内皮糖萼脱落, 降低肾小球 VCAM-1 的表达及肾皮质 NO 水平。MRL/lpr 小鼠存在肾小球内皮细胞的损伤, 且内皮糖萼损伤与蛋白尿有关, 瑞沙托维能够通过抑制 TLR4/MyD88 信号通路改善肾小球内皮糖萼脱落以及肾小球内皮细胞的损伤, 为靶向治疗狼疮肾炎提供了临床思路。

**关键词** 系统性红斑狼疮; 狼疮肾炎; 糖萼; 肾小球内皮细胞; 瑞沙托维; TLR4/MyD88

中图分类号 R979.9

文献标志码 A

文章编号 1005-8915(2023)03-0257-06

doi:10.19526/j.cnki.1005-8915.20230307

瑞沙托维是一种新型环己烯衍生物, 它是 TLR4 的特异性抑制剂, 可以抑制一氧化氮和促炎细胞因子的产生, 抑制 TLR4 的配体依赖型和非依赖性信号传递<sup>[1-2]</sup>。以往的研究证明, TLR4 在狼疮小鼠的肾小球中高表达, 而瑞沙托维可以抑制 HMGB1 所诱导的肾脏系膜细胞纤连蛋白表达水平升高<sup>[3]</sup>, 而对于肾小球内皮细胞的作用国内未见报道。故在本研究中, 作者应用经典的狼疮小鼠模型 MRL/lpr 小鼠作为研究对象, 以探讨瑞沙托维在狼疮肾炎中肾小球内皮细胞的影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂与仪器

瑞沙托维 (Resatorvid, TAK242) 购自美国 MCE 公司, TLR4、VCAM-1、MyD88 兔单克隆抗体及 CD31 小鼠单克隆抗体均购自美国 Abcam 公司。小鼠 VCAM-1 及 SDC-1 ELISA 试剂盒均购自上海茁彩生物科技有限公司, NO 检测试剂盒购自北京碧云天生物技术有限公司。共聚焦显

微镜 (美国 Leica 公司), 全自动酶标仪 (美国 BioTek 产品), 台式高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

#### 1.2 动物

24 周龄的健康 MRL/MPJ 和同周龄、同性别、体重相匹配的 MRL/lpr 小鼠, 购自美国 Jackson 公司, 适应性喂养 1 w 以上。饲养环境为 IVC 饲养笼, 每笼 5 只, 相对湿度 (55 ± 2)%, 温度 (22 ± 2)℃。

#### 1.3 动物分组及标本处理

健康 MRL/MPJ 小鼠为 Control 组, MRL/lpr 小鼠为 LN 组, 8 只 16 周龄的 MRL/MPJ 小鼠作为 Control 组, 24 只同周龄的 MRL/lpr 小鼠随机分为 LN 组、LN + TAK 组、LN + DMSO 组, 每组 8 只, 雌雄各半。LN + TAK 组每只小鼠每次腹腔注射 10 mg/kg 的瑞沙托维, 一周两次; LN + DMSO 组腹腔注射等量的 1% DMSO 溶液; 各组小鼠均连续给药 8 w, 于小鼠 24 周龄时, 收集 24 h 尿液标本, 内眦静脉丛取血后处死, 留取的肾组织一部分 4% 多聚甲醛固定行免疫组化染色, 一部分置于液氮保存, 用于冰冻切片和肾皮质组

收稿日期: 2022-12-16 修回日期: 2023-02-17

基金项目: 河北省医学科学研究课题计划项目 (No. 20210536); 河北省科技厅重点研发计划项目 (No. 21377752D)。

作者简介: 田玉 (1978-), 女, 河北石家庄人, 汉, 风湿免疫科, 博士, 主治医师, 专业: 自身免疫性疾病, 研究方向: 内科学风湿病;

E-mail: ty19781012@163.com。

\*通信作者: 郭惠芳 (1967-), 河北唐山人, 女, 汉, 风湿免疫科, 博士; E-mail: ghf196709@126.com。

织 NO 测定,另一部分用硝酸镧固定液固定小鼠肾皮质,透射电镜观察肾小球内皮糖萼。

1.4 透射电镜标本的制作

根据参考文献[4]方法,小鼠处死后打开胸腔,剪开右心耳,另以平头针插入左心室,镊子固定针头,2%硝酸镧溶液 5 mL 缓缓注入左心室,观察肾脏至发白,另取 2%硝酸镧-戊二醛固定液 5 mL 同样方法灌注,然后取 1 mm<sup>3</sup> 肾脏皮质组织,用 2%硝酸镧-戊二醛固定液固定,梯度丙酮脱水,Epon812 浸透与包埋,超薄切片机进行切片,醋酸铀及柠檬酸铅染色,H-7500 透射电镜观察、照相。

1.5 ELISA 方法

小鼠内眦静脉取血约 1 mL 后放入肝素抗凝管,放置 30 min,3 000 r/min 离心 5 min,取血浆。严格按照试剂盒说明书操作,使用酶标仪在 OD<sub>450nm</sub> 处检测标本 OD 值,根据说明书及酶标仪读数绘制标准曲线并计算出实验样品的蛋白浓度。

1.6 免疫组织化学染色

肾组织脱蜡至水,枸橼酸修复液高压 5 min 进行抗原修复,过氧化氢 37 ℃ 避光孵育,20 min 去除内源性过氧化物酶;山羊血清于 37 ℃ 孵育 60 min,滴加抗 TLR4 抗体、MyD88 抗体、VCAM-1 抗体(均为 1:200 稀释),4 ℃ 过夜;二抗室温孵育 30 min,三抗室温孵育 30 min;DAB 显色,蒸馏水终止显色,应用苏木精进行复染,1%盐酸酒精分化,氨水返蓝,酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,并在光学显微镜下观察及拍照。

1.7 免疫荧光染色

新鲜肾组织 OTC 包埋,冰冻切片机切片后冷丙酮固定 10 min,PBS 洗涤后,正常山羊血清封闭 37 ℃ 孵育 60 min,弃血清,滴加鼠抗 CD31 一抗以及兔抗 SDC-1 一抗(稀释度均为 1:200),放入湿盒,4 ℃ 孵育过夜,第二天予 PBS 缓冲液洗涤后,避光条件下滴加 TRITC-山羊抗兔 IgG 和 FITC-山

羊抗小鼠 IgG 二抗(1 × PBS 稀释为 1:200),避光 37 ℃ 孵育 60 min,再次 PBS 洗涤 3 次,防荧光淬灭封片剂封片。激光共聚焦显微镜下观察结果。

1.8 NO 含量测定

取小鼠肾皮质约 20 mg 置于冰上,加入 RIPA 组织裂解液,搅拌机搅碎混匀,冰上充分裂解,避光条件下严格按照一氧化氮试剂盒说明书操作。

1.9 数据处理

所有的计量资料采用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )来表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验分析,相关性分析采用 Pearson 相关性分析,Image pro plus 软件测定积分光密度。采用 IBM SPSS Statistics 21 软件进行统计,*P* < 0.05 差异具有统计学意义。

2 结果

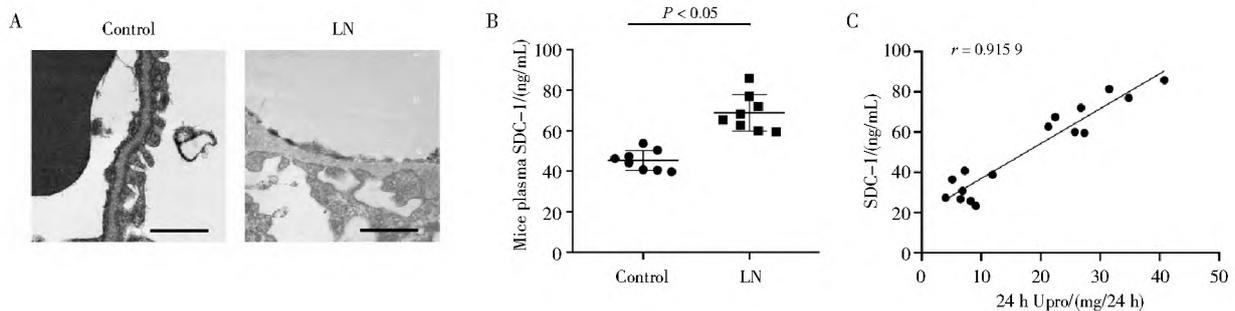
2.1 MRL/lpr 小鼠存在肾小球内皮细胞的损伤

同 Control 组相比,LN 组小鼠出现明显的蛋白尿,见表 1。透射电镜结果显示,Control 组小鼠肾小球内皮细胞表面的糖萼厚薄均匀,排列整齐,而 LN 组肾小球内皮细胞表面的糖萼变薄,部分部位缺失,见图 1A;ELISA 结果显示,LN 组小鼠血浆中糖萼核心蛋白 SDC-1 的水平较 Control 组明显升高,见图 1B;此外,Pearson 相关性分析显示血浆 SDC-1 的水平与 24 h 尿蛋白定量呈正相关,见图 1C。提示 MRL/lpr 小鼠存在肾小球内皮糖萼脱落,且与蛋白尿的产生有关。

Tab 1 Level of 24-hour urinary protein in mice

Group	24 h Upro/(mg/24 h)
Control	7.83 ± 2.64
LN	30 ± 7.40*

Compared to control, \* *P* < 0.05



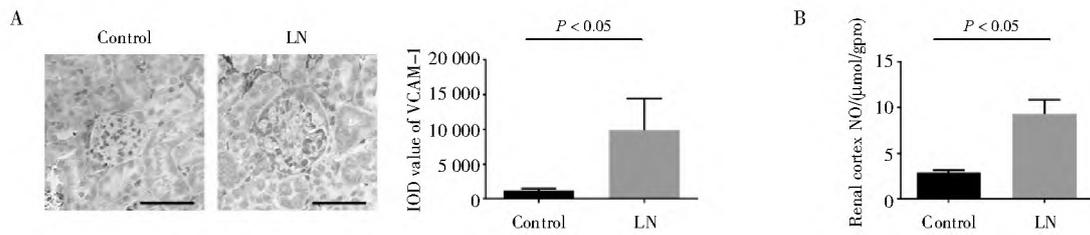
A: The glomerular endothelial glycocalyx was observed by transmission electron microscope(bar = 1 μm); B: The levels of plasma SDC-1 were measured by ELISA; C: The correlation analysis between 24-hour proteinuria and plasma SDC-1 in mice

Fig 1 Glomerular endothelial cell injury in MRL/lpr mice

2.2 MRL/lpr 小鼠存在内皮细胞损伤

免疫组织化学染色结果显示,VCAM-1 蛋白阳性表达定位在细胞膜,LN 组小鼠肾小球中 VCAM-1 表达明显较 Control 组明显升高,差别具有统计学意义,见图 2A;小鼠肾

皮质组织 NO 测定结果显示,LN 组小鼠肾皮质 NO 水平较 Control 组明显升高,见图 2B。以上结果均提示,MRL/lpr 小鼠在 24 周龄出现了明显的肾小球内皮细胞损伤。



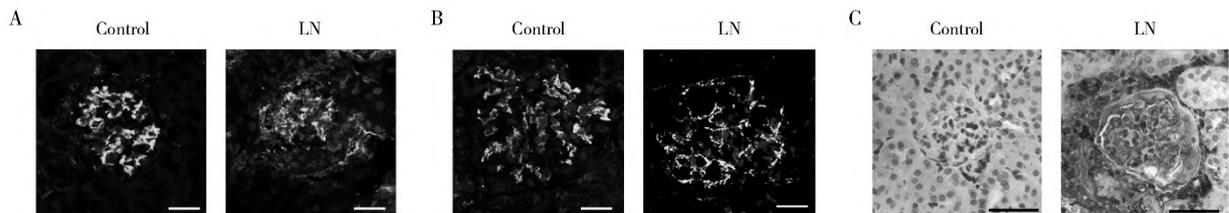
A: The expression of VCAM-1 was detected by immunohistochemistry in mice glomeruli (bar = 50  $\mu\text{m}$ ); B: The levels of NO in mice cortex

Fig 2 The injury of glomerular endothelial cell in MRL/lpr mice

2.3 MRL/lpr 小鼠肾小球存在 TLR4/MyD88 信号通路的激活

为了检验肾小球内皮细胞上 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B/p65 蛋白的表达,作者应用免疫荧光双染技术检测内皮细胞标记物 CD31 (绿色)、TLR4 (红色) 及 MyD88 (红色),结果显示,TLR4 蛋白阳性信号定位在胞膜和胞浆,Control 组肾小球中仅见少量 TLR4 与 CD31 蛋白共定位,而在 LN 组肾小

球内皮细胞上 TLR4 表达明显增强,见图 3A;同样的,MyD88 蛋白阳性表达定位于细胞浆,MyD88 蛋白在 Control 组肾小球中几乎无明显阳性表达,而在 LN 组肾小球中,MyD88 蛋白表达量升高,与 CD31 共表达增多,见图 3B;免疫组织化学染色结果显示,同 Control 组小鼠相比,LN 组小鼠肾小球的 NF- $\kappa$ B/p65 表达明显增加,且部分在胞核中,见图 3C。



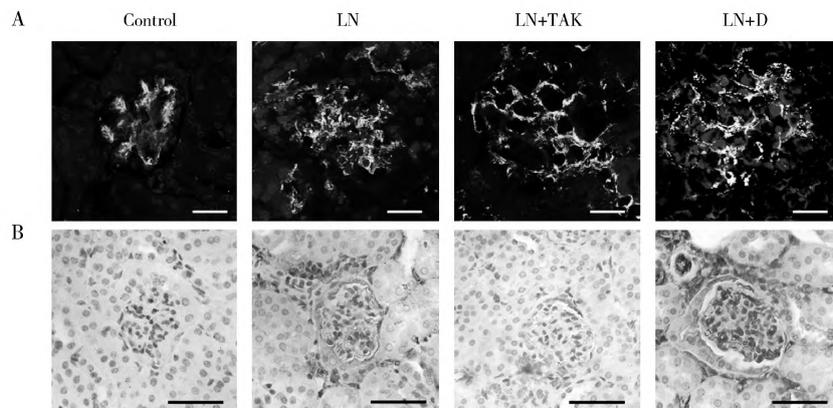
A, B: The co-localization of CD31 and TLR4 (green) and CD31 and MyD88 (B) was determined by immunofluorescence in glomerular endothelial cells of mice; C: The expression of NF- $\kappa$ B/p65 in mice glomeruli was detected by immunohistochemistry (bar = 50  $\mu\text{m}$ )

Fig 3 TLR4/MyD88 signaling pathway was activated in the glomeruli of MRL/lpr mice

2.4 瑞沙托维治疗抑制 TLR4/MyD88 信号通路

免疫荧光双染结果显示,同 LN 组小鼠相比,LN + TAK 组小鼠肾小球的 MyD88 与 CD31 的共表达明显减少,见

图 4A;而免疫组织化学染色结果显示,LN + TAK 组小鼠肾小球的 NF- $\kappa$ B/p65 表达较 LN 组明显减少,且多在胞浆中,见图 4B。



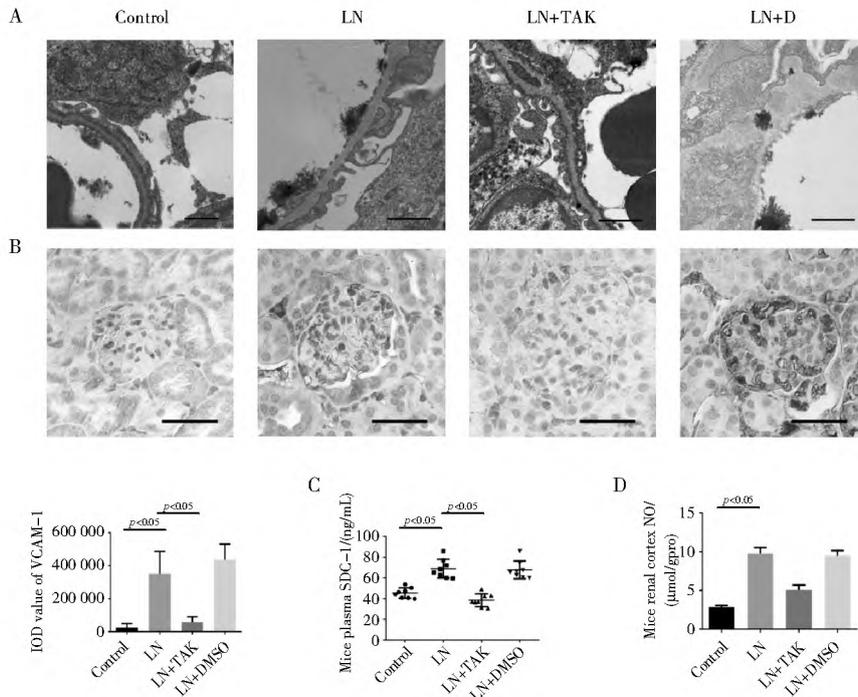
A: The co-localization of CD31 and MyD88 was determined by immunofluorescence in mice glomerular endothelial cells after Resatorvid treatment (bar = 25  $\mu\text{m}$ ); B: The expression of NF- $\kappa$ B/p65 was detected by immunohistochemistry in mice glomeruli (bar = 50  $\mu\text{m}$ )

Fig 4 Resatorvid treatment inhibited the TLR4/MyD88 signaling pathway in glomerular endothelial cells of MRL/lpr mice

### 2.5 瑞沙托维治疗改善 MRL/lpr 小鼠肾小球内皮细胞损伤

透射电镜结果显示, LN 组小鼠肾小球内皮糖萼变薄, 一些内皮细胞表面糖萼脱落, 而经瑞沙托维治疗的小鼠肾小球内皮糖萼的厚度较 LN 组有所恢复, 见图 5A; 免疫组化

结果显示, 经瑞沙托维治疗后, 小鼠肾小球的 VCAM-1 蛋白表达较 LN 组明显下降, 见图 5B; ELISA 结果显示, LN + TAK 组小鼠血浆中 SDC-1 的水平较 LN 组明显降低, 见图 5C; 经瑞沙托维治疗后, 小鼠肾皮质 NO 水平明显降低, 见图 5D。



A: Glomerular endothelial glycocalyx was observed by transmission electron microscope (bar = 1 μm); B: The changes of VCAM-1 expression in mice glomeruli were observed by immunohistochemistry after Resatorvid treatment (bar = 50 μm); C: Plasma SDC-1 was determined by ELISA after Resatorvid treatment; D: Detection of NO content in mouse renal cortex

Fig 5 Resatorvid treatment improved the injury of MRL/lpr mice glomerular endothelial cells

### 3 讨论

狼疮肾炎 (Lupus nephritis, LN) 是系统性红斑狼疮 (Systemic lupus erythematosus, SLE) 的重要并发症, 其特征是免疫复合物的沉积以及炎细胞浸润, 免疫复合物及补体激活诱导肾脏细胞的活化和损伤<sup>[5-6]</sup>。蛋白尿是狼疮肾炎最典型的临床表现之一, 也是判断反映疾病活动性以及疗效的参考指标<sup>[7]</sup>, 其病理特点是肾小球滤过屏障 (Glomerular filtration barrier, GFB) 的损伤<sup>[8]</sup>。

肾小球内皮细胞 (Glomerular endothelial cells, GEC) 位于肾小球滤过屏障的最外层, 外面包裹着一层糖萼 (Glycocalyx), 完整的糖萼结构维持了正常血管系统的内稳态。Syndecan-1 (SDC-1) 是内皮细胞表面糖萼的核心蛋白组成部分, 在糖尿病<sup>[9]</sup>、脓毒症<sup>[10]</sup> 等病理状态下, 外周血中 SDC-1 水平升高, 提示糖萼脱落, 进而出现内皮损伤。作者的研究结果显示, MRL/lpr 小鼠肾小球内皮细胞表面的糖萼厚度明显变薄, 且血浆中 SDC-1 水平较 Control 组明显升高, 提示在狼疮肾炎中存在肾小球内皮糖萼脱落。血管细

胞黏附分子 (Vascular cell adhesion molecule, VCAM-1) 以及一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 现已证实 在狼疮肾炎的患者血清中明显升高且与内皮细胞损伤有关<sup>[11-12]</sup>。作者的研究结果表明, MRL/lpr 小鼠血中的 VCAM-1 表达水平升高, 肾皮质组织 NO 水平也明显升高, 提示狼疮肾炎存在肾小球内皮细胞的损伤。

以往的研究表明, TLR2 和 TLR4 可以介导高血糖诱导的微血管内皮细胞炎症和内皮糖萼的功能紊乱<sup>[13]</sup>, 并且与大血管相比, 微血管内皮细胞具有更强烈的炎症反应, TLR4 的表达水平更高<sup>[14]</sup>, 这些结果提示 TLR4 的激活在内皮细胞的损伤中起着重要作用。瑞沙托维 (Resatorvid) 作为选择性的 Toll 样受体 4 (TLR4) 的抑制剂, 能够与 TLR4 细胞内结构域 TIR 结合, 阻止 TLR4 信号在细胞内的传导<sup>[15]</sup>。已有研究表明, 糖尿病动物模型的大脑微血管中高表达 TLR4 蛋白, 抑制内皮的 TLR4 表达能够减轻水肿、梗塞, 减少神经血管损伤<sup>[16-17]</sup>。

作者的研究结果显示, MRL/lpr 小鼠肾小球内皮细胞的 TLR4 蛋白明显增加, 提示在狼疮小鼠的肾小球内皮细

胞存在 TLR4 的激活。在狼疮小鼠腹腔注射瑞沙托维后,其肾小球内皮糖萼的厚度有所改善,血浆中糖萼核心蛋白 SDC-1 的水平明显下降,血浆 VCAM-1 及肾皮质 NO 的水平明显下调,提示瑞沙托维能通过抑制 TLR4 与下游的信号通路的结合从而改善肾小球内皮细胞的损伤。

髓样分化因子 88 (Myeloid differentiation 88, MyD88) 是 TLR 信号通路下游的关键接头分子,目前已知 MyD88 参与所有除 (TLR3) 外所有的信号传导。研究发现 TLR4 可被其配体识别,通过激活 MyD88 依赖性信号通路或非经典信号通路,最终驱动炎症介质(包括细胞因子和趋化因子)的产生<sup>[18-19]</sup>。在 MyD88 依赖性途径中,MyD88 募集白介素 1 受体相关激酶 (Interleukin 1 receptor-associated kinase, IRAK),该激酶与衔接蛋白肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (Tumor necrosis factor-receptor-associated factor 6, TRAF6) 相互作用,导致核因子 NF- $\kappa$ B 易位<sup>[20]</sup>。作者的试验结果显示,瑞沙托维治疗明显下调了小鼠肾小球内皮细胞 MyD88 蛋白的表达,减少了肾小球 NF- $\kappa$ B 的核转位,提示瑞沙托维可能通过抑制 TLR4/MyD88 信号通路的激活部分改善了 MRL/lpr 小鼠的肾小球内皮损伤。

综上,MRL/lpr 小鼠存在肾小球内皮细胞的损伤,且内皮糖萼损伤与蛋白尿有关,瑞沙托维能够通过抑制 TLR4/MyD88 信号通路改善肾小球内皮糖萼脱落以及肾小球内皮细胞的损伤,为靶向治疗狼疮肾炎提供了临床思路。

致谢:本研究的动物试验在河北医科大学病理与病理生理学教研室的大力资助下完成,感谢刘淑霞教授对于本试验的指导与资助。

### 参考文献

- [ 1 ] Woller SA, Ravula SB, Tucci FC, et al. Systemic TAK-242 prevents intrathecal LPS evoked hyperalgesia in male, but not female mice and prevents delayed allodynia following intraplantar formalin in both male and female mice; The role of TLR4 in the evolution of a persistent pain state [ J ]. *Brain Behav Immun*, 2016, **56**:271-280.
- [ 2 ] 魏媛,朱雅男,杨卫东. Toll 样受体 -4 抑制剂 TAK -242 对大鼠重度牙周炎骨吸收的影响 [ J ]. *口腔疾病防治*, 2022, **30** (03):160-168.
- [ 3 ] 高璠,汪鑫,杨冉,等. HMGB1/TLR4 介导狼疮性肾炎肾小球细胞增殖和细胞外基质沉积 [ J ]. *中国药理学通报*, 2021, **37** (1):125-131.
- [ 4 ] 刘增波,梅长林,胡惠民,等. 镭示踪法透射电镜显示肾脏细胞糖萼的方法学研究 [ J ]. *临床肾脏病杂志*, 2015, **15** (1):42-46.
- [ 5 ] Gururani Subodh, Devarasetti Phani Kumar, Uppin Megha, et al. Treatment outcomes in refractory lupus nephritis: Data from an observational study [ J ]. *Lupus*, 2021, **30** (11):1725-1731.
- [ 6 ] 孙凌云,刘昱东. 狼疮肾炎诊治新进展 [ J ]. *中华临床免疫和变态反应*, 2022, **16** (05):545-547.
- [ 7 ] Chen X, Wang DD, Li ZP. Analysis of time course and dose effect of tacrolimus on proteinuria in lupus nephritis patients [ J ]. *J Clin Pharm Ther*, 2021, **46** (1):106-113.
- [ 8 ] Fu R, Guo CH, Wang S, et al. Podocyte activation of NLRP3 inflammasomes contributes to the development of proteinuria in lupus nephritis [ J ]. *Arthritis Rheumatol*, 2017, **69** (8):1636-1646.
- [ 9 ] 盖丰丰,方立明,谢圣芳,等. 泽兰通过保护糖萼核心蛋白缓解高糖诱导的肾小球内皮细胞损伤 [ J ]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2022, **23** (3):200-203.
- [ 10 ] 华玉思,何敏,王若然,等. 不同液体复苏对脓毒性休克大鼠肾功能及糖萼的影响 [ J ]. *中华内科杂志*, 2021, **60** (6):552-555.
- [ 11 ] da Rosa Franchi Santos L F, Stadtlober N P, Costa Dall'Aqua L G, et al. Increased adhesion molecule levels in systemic lupus erythematosus: relationships with severity of illness, autoimmunity, metabolic syndrome and cortisol levels [ J ]. *Lupus*, 2018, **27** (3):380-388.
- [ 12 ] Tao J, Zhao J, Qi XM, et al. Complement-mediated M2/M1 macrophage polarization may be involved in crescent formation in lupus nephritis [ J ]. *Int Immunopharmacol*, 2021, **101**:108278-108278.
- [ 13 ] Ren G, Bhatnagar S, Hahn Daniel J, et al. Long-chain acyl-CoA synthetase-1 mediates the palmitic acid-induced inflammatory response in human aortic endothelial cells [ J ]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2020, **319** (5):E893-E903.
- [ 14 ] 贺尚文,王月明,张慧,等. 白头翁汤通过抑制 TLR4-ERK1/2 信号通路缓解 LPS 诱导的微血管内皮细胞炎症反应 [ J ]. *畜牧兽医学报*, 2021, **52** (08):2317-2325.
- [ 15 ] Kashani Bahareh, Zandi Zahra, Bashash Davood, et al. Small molecule inhibitor of TLR4 inhibits ovarian cancer cell proliferation: new insight into the anticancer effect of TAK-242 (Resatorvid) [ J ]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2020, **85** (1):47-59.
- [ 16 ] Locker Kathryn CS, Kachapati Kritika, Wu YH, et al. Endosomal sequestration of TLR4 antibody induces myeloid-derived suppressor cells and reverses acute type 1 diabetes [ J ]. *Diabetes*, 2022, **71** (3):470-482.
- [ 17 ] Abdul Yasir, Abdelsaid Mohammed, Li Weiguo, et al. Inhibition of toll-like receptor-4 (TLR-4) improves neurobehavioral outcomes after acute ischemic stroke in diabetic rats: Possible role of vascular endothelial TLR-4 [ J ]. *Mol Neurobiol*, 2019, **56** (3):1607-1617.
- [ 18 ] Zhao BJ, Zhang Q, Liang XC, et al. Quercetin reduces inflammation in a rat model of diabetic peripheral neuropathy by regulating the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signalling pathway [ J ]. *Eur J Pharmacol*, 2021, **912**:174607-174607.
- [ 19 ] Du XH, Shi R, Wang YL, et al. Isoforskolin and forskolin attenuate lipopolysaccharide-induced inflammation through TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B cascades in human mononuclear leukocytes [ J ].

*Phytother Res*, 2019, **33**(3):602-609.

[20] Yan XY, Chen SH, Huang HQ, *et al.* Functional variation of IL-

1R-associated kinases in the conserved MyD88-TRAF6 pathway during evolution[J]. *J Immunol*, 2020, **204**(4):832-843.

## Resatorvid Improve Permeability of Glomerular Endothelial Cells in MRL/lpr Mice by Inhibiting TLR4/MyD88 Pathway

TIAN Yu, YANG Yu-shu, DING Meng, HAN Yu-xiang, GUO Hui-fang\*

(*Department of Rheumatology and Immunology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China*)

**Abstract** To investigate the therapeutic effect of Resatorvid on glomerular endothelial cell injury in mice with systemic lupus erythematosus (SLE), 24-week-old MRL/lpr mice and MRL/MPJ mice were used as experimental subjects. Eight 16-week-old MRL/MPJ mice were used as control group, and 24 MRL/lpr mice of the same week were randomly divided into LN group, LN + TAK group and LN + DMSO group, with 8 mice in each group and half male and half female. LN + TAK group was intraperitoneally injected with 10 mg/kg Resatorvid twice a week. LN + DMSO group was intraperitoneally injected with 1% DMSO solution. After continuous administration for 8 weeks, mice were sacrificed, blood and urine samples were collected at 24 weeks of age. The level of plasma SDC-1 was detected by ELISA, and the glomerular endothelial glycocalyx was observed by transmission electron microscope. The expressions of VCAM-1, TLR4 and MyD88 in mice glomeruli were detected by immunohistochemical method and immunofluorescence double staining method, and the concentration of nitric oxide (NO) in mice renal cortex was determined. Compared with control group, glomerular endothelial cell glycocalyx shedding in MRL/lpr mice, the level of glycocalyx core protein SDC-1 in plasma was significantly increased, and positively correlated with the proteinuria level; The expression of VCAM-1 in the glomerulus of mice was significantly increased, the level of NO in renal cortex was significantly increased, and the glomerular endothelial cells of MRL/lpr mice highly expressed TLR4 and MyD88. Resatorvid treatment inhibit the activation of TLR4/MyD88 in the glomeruli of MRL/lpr mice, reduce the level of plasma SDC-1, relieve the glomerular endothelial glycocalyx shedding and reduce the expression of glomerular VCAM-1 and renal cortex NO level. Glomerular endothelial cells injury exist in MRL/lpr mice and the shedding of glomerular endothelial glycocalyx is related to proteinuria. Resatorvid improve the loss of endothelial glycocalyx and the damage of glomerular endothelial cells by inhibiting TLR4/MyD88 signaling pathway, which provides a clinical idea for targeted therapy of lupus nephritis.

**Key words** Systemic lupus erythematosus, Lupus nephritis, Glycocalyx, Glomerular endothelial cell, Resatorvid, TLR4/MyD88