

·论著·

# 糖皮质激素抑制实验性肾炎大鼠肾组织中核因子- $\kappa$ B活化及单核细胞趋化蛋白-1表达

张爱华<sup>1</sup>, 陈荣华<sup>1</sup>, 黄松明<sup>1</sup>, 邢昌赢<sup>2</sup>, 林娜<sup>1</sup>, 费莉<sup>1</sup>, 郭梅<sup>1</sup>, 潘晓勤<sup>1</sup>, 蔡毅<sup>1</sup>

(1. 南京医科大学小儿肾脏病研究中心; 2. 南京医科大学第一附属医院肾内科, 江苏南京 210029)

**[摘要]** 目的 探讨核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)活化在肾小球肾炎发病机制中的作用及糖皮质激素对NF- $\kappa$ B活化的调节作用。方法 肾毒血清肾炎应用兔抗鼠肾小球基底膜肾毒血清制备。模型组:注射肾毒血清后不加任何治疗,第14 d处死;糖皮质激素干预组(治疗组):于肾毒血清注射后第1~14 d给予地塞米松每日0.125 mg/kg腹腔注射。采用免疫组化及医学图像分析系统观察肾小球及肾小管中NF- $\kappa$ B活化和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的表达,并分析其与蛋白尿和肾小球细胞数之间的关系。结果 模型组肾小球及肾小管中NF- $\kappa$ B活化较正常对照组显著上调,分别为(38.27 ± 8.83) % vs (1.82 ± 0.68) %和(68.46 ± 12.94) % vs (16.89 ± 4.47) %,  $P$ 均 < 0.01;模型组肾小球及肾小管中MCP-1表达分别为(24.37 ± 7.06)个/gcs和(54.78 ± 11.49) %,较正常对照组显著升高( $P$  < 0.01),肾小球中NF- $\kappa$ B活化和MCP-1表达与单核细胞浸润和蛋白尿密切相关;糖皮质激素干预组肾小球及肾小管中NF- $\kappa$ B活化和MCP-1表达均显著下调。结论 NF- $\kappa$ B活化在肾小球肾炎发病机制中发挥重要作用,抑制NF- $\kappa$ B活化可能是糖皮质激素抗肾炎作用的机制之一。

**[关键词]** 核因子- $\kappa$ B;糖皮质激素;肾小球肾炎;单核细胞趋化蛋白-1;大鼠

**[中图分类号]** R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)02-0166-04

## Suppression of the Activation of Nuclear Factor- $\kappa$ B and the Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 by Glucocorticoids in Experimental Rat Glomerulonephritis

ZHANG Ai-Hua, CHEN Rong-Hua, HUANG Song-Ming, et al.

Center of Pediatric Nephrology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the role of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in the pathogenesis of glomerulonephritis and to determine whether glucocorticoids can inhibit the activation of NF- $\kappa$ B in vivo. **Methods** Nephrotoxic sera nephritis (NTN) was induced by the injection of anti-GBM antibody into the tail veins of rats. Glucocorticoid-treated rats received dexamethasone (0.125 mg/kg weight) daily for 14 days. Untreated and steroid-treated rats were killed on day 14 and NF- $\kappa$ B activation and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression were assessed in glomerulus and renal tubules of rats. **Results** Significant up-regulation of NF- $\kappa$ B activation was observed in glomerulus and renal tubules of untreated NTN rats compared to the control group [(38.27 ± 8.83) % vs (1.82 ± 0.68) %; (68.46 ± 12.94) % vs (16.89 ± 4.47) %, respectively] ( $P$  < 0.01), and so was the expression of MCP-1 [(24.37 ± 7.06) cells/gcs vs 0; (54.78 ± 11.49) % vs (11.26 ± 6.88) %] ( $P$  < 0.01). NF- $\kappa$ B activation and MCP-1 expression were associated with monocyte cell infiltration and the degree of proteinuria. Significant down-regulation of NF- $\kappa$ B activation and MCP-1 expression were observed in the glucocorticoid-treated rats. **Conclusions** The activated NF- $\kappa$ B may play a pivotal pathogenic role in glomerulonephritis and the anti-nephritic action of glucocorticoids may be mediated through the suppression of the activation of NF- $\kappa$ B.

**Key words:** Nuclear factor- $\kappa$ B; Glucocorticoids; Glomerulonephritis; Monocyte chemoattractant protein-1; Rat

研究证实,多种炎症介质如:炎性细胞因子、趋化因子和粘附分子等参与了肾小球肾炎炎症反应的病理生理过程。这些炎症介质诱导肾小球系膜细胞增生及细胞外基质增多,导致肾小球纤维化和硬化,最终发生肾功能衰竭。核因子- $\text{B}$  (NF- $\text{B}$ )是一种与炎症介质的产生、细胞增生、细胞外基质交联和细胞凋亡有关的转录因子,参与了多种炎症反应的信号转导过程<sup>[1]</sup>。糖皮质激素是肾脏疾病领域应用最为广泛的免疫抑制剂,能够抑制多种炎症介质的合成,减轻肾小球肾炎的炎症反应。体外研究表明,糖皮质激素主要是通过抑制转录因子的活化而发挥其抗炎作用。本研究的主要目的在于进一步研究NF- $\text{B}$ 活化在肾毒血清肾炎发病机制中的作用以及糖皮质激素治疗肾小球肾炎是否通过抑制NF- $\text{B}$ 的活化而发挥其抗炎作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

雄性SD大鼠15只,体重180~200g,购自江苏省实验动物中心。地塞米松购自南京第三制药厂。山羊抗鼠NF- $\text{B}$  p65多克隆抗体、山羊抗鼠单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)多克隆抗体及兔抗山羊IgG均为美国SANTA CRUZ产品。兔抗鼠肾小球基底膜肾毒血清(NTS)由本实验室制备。

### 1.2 模型制备

雄性SD大鼠15只,随机分为3组:模型组:尾静脉注射兔抗鼠肾小球基底膜肾毒血清(10 ml/kg),不给予任何治疗;糖皮质激素干预组(治疗组):注射肾毒血清后第1d开始给予地塞米松每日0.125 mg/kg腹腔注射;对照组:尾静脉注射等量生理盐水。所有大鼠于第14d断头处死,处死前1d留取24h尿检测尿蛋白(U<sub>p</sub>V),处死后取肾组织检查。

### 1.3 免疫组织化学染色

肾组织中NF- $\text{B}$ 活化及MCP-1表达采用免疫组化方法。肾组织标本经10%福尔马林固定,石蜡包埋,切片厚4 $\mu\text{m}$ 。应用改良ABC法,免疫组化检测试剂盒购自深圳晶美生物工程有限公司,按说明书操作。阴性对照以PBS代替一抗。每只鼠肾取4张切片。

### 1.4 计算机图像分析

应用多媒体彩色病理图文分析系统MPIAS-500(同济医科大学清平影像工程公司产品),通过光学显微镜放大400倍摄取图像,输入图像分析系统

内。肾小球中NF- $\text{B}$ 的活化:每张切片随机选取5个肾小球,计算每个肾小球中染色区域面积占整个肾小球面积的百分比,以均值表示每例肾小球中阳性信号面积;肾小球中MCP-1表达:每张切片随机选取5个肾小球,计算每个肾小球内抗体染色阳性细胞数,以均值表示每例肾小球中阳性细胞数;

皮质区肾小管中NF- $\text{B}$ 的活化及MCP-1的表达:计算每张切片皮质区50个高倍视野下阳性小管数与总肾小管数的百分数,以均值表示每例肾小管中的阳性率。另外常规方法对肾组织切片进行HE染色,每张切片随机选取5个肾小球,计算每个肾小球中细胞个数。

### 1.5 统计学处理

实验结果以均数 $\pm$ 标准差表示,采用方差分析和相关分析进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 肾组织中NF- $\text{B}$ 活化和MCP-1表达

正常肾组织可见皮质区肾小球侧壁上皮细胞及少部分肾小球系膜细胞和远端肾小管上皮细胞有少量的NF- $\text{B}$ 活化,髓质区肾小管上皮细胞和集合管则有较强的活化,活化信号位于细胞胞浆及胞核内;正常肾组织可见皮质区远端肾小管上皮细胞有少量的MCP-1表达,而肾小球及近端肾小管上皮细胞均未见有MCP-1表达。

模型组大鼠肾组织中NF- $\text{B}$ 活化和MCP-1表达显著上调,且有明显的局灶性分布趋势,主要见于肾小球系膜细胞、球囊侧壁上皮细胞以及新月体形成的部位,在肾小管间质则主要见于小管损伤的部位,见表1。

表1 肾组织中NF- $\text{B}$ 活化和MCP-1的表达

Table 1 Activity of NF- $\text{B}$  and the expression of

MCP-1 in renal tissue ( $\bar{x} \pm s$ )

	NF- $\text{B}$ 活化(%)		MCP-1表达	
	肾小球	肾小管	肾小球(个/gcs)	肾小管(%)
对照组	1.82 $\pm$ 0.68	16.89 $\pm$ 4.47	0	11.26 $\pm$ 6.88
模型组	38.27 $\pm$ 8.83 <sup>a</sup>	68.46 $\pm$ 12.94 <sup>a</sup>	24.37 $\pm$ 7.06 <sup>a</sup>	54.78 $\pm$ 11.49 <sup>a</sup>
治疗组	4.16 $\pm$ 1.47 <sup>b</sup>	23.57 $\pm$ 7.23 <sup>b</sup>	6.56 $\pm$ 2.03 <sup>b</sup>	16.57 $\pm$ 7.90 <sup>b</sup>

注:a与对照组比较 $P < 0.01$ ; b与模型组比较 $P < 0.01$

### 2.2 肾小球中NF- $\text{B}$ 活化和MCP-1表达与蛋白尿和肾小球细胞数之间的关系

肾小球中NF- $\text{B}$ 活化与蛋白尿、肾小球细胞数

及肾小球中 MCP-1 表达呈显著正相关 ( $r$  分别 = 0.68, 0.75 和 0.89,  $P < 0.05$ ); 而肾小球中 MCP-1 表达与蛋白尿、肾小球细胞数亦呈显著正相关 ( $r$  分别 = 0.73 和 0.92,  $P < 0.01$ )。

### 2.3 糖皮质激素对 NF- $\kappa$ B 活化和 MCP-1 表达的影响

应用糖皮质激素干预的动物模型,糖皮质激素显著抑制肾毒血清诱导的肾小球及肾小管中 NF- $\kappa$ B 的活化,见表 1。肾小球内 NF- $\kappa$ B 活化的下调与蛋白尿排泄降低及肾小球细胞数减少呈正相关 ( $r$  分别 = 0.57, 0.64,  $P < 0.05, 0.01$ )。糖皮质激素干预组大鼠肾小球内 MCP-1 细胞数显著减少,肾小管中 MCP-1 表达的水平及强度均显著下调,见表 2。肾小球内 MCP-1 表达的下调与肾小球细胞数减少及尿蛋白排泄降低呈显著正相关 ( $r$  分别 = 0.67, 0.82,  $P$  均  $< 0.01$ )。

### 2.4 糖皮质激素对肾毒血清肾炎大鼠蛋白尿及肾小球细胞数的影响

肾毒血清肾炎大鼠出现大量蛋白尿,糖皮质激素显著抑制尿蛋白的排泄;模型组大鼠肾小球细胞数显著高于正常对照组,糖皮质激素干预组大鼠肾小球细胞数显著减少,与模型组相比,差异有显著性意义,见表 2。

表 2 蛋白尿及肾小球细胞数的变化

Table 2 Changes of proteinuria and glomerular cell numbers ( $\bar{x} \pm s$ )

	尿蛋白定量 (mg/24 h)	肾小球细胞数 (个/gcs)
正常对照组	8.61 $\pm$ 0.93	74.92 $\pm$ 7.35
模型组	84.10 $\pm$ 8.46 <sup>a</sup>	119.25 $\pm$ 14.18 <sup>a</sup>
激素干预组	28.85 $\pm$ 4.86 <sup>b</sup>	89.08 $\pm$ 14.84 <sup>b</sup>

注: a 与正常对照组比较  $P < 0.01$ ; b 与模型组比较  $P < 0.01$

## 3 讨论

NF- $\kappa$ B 是转录因子家族的重要成员,参与了多种炎症性细胞因子、趋化因子和促纤维化因子的合成、细胞增生、ECM 交联、细胞凋亡以及成纤维细胞的分化过程<sup>[1]</sup>。NF- $\kappa$ B 主要由 p50 和 p65 两亚基所组成,细胞静息状态下, NF- $\kappa$ B 与其抑制因子 I $\kappa$ B 相结合,形成 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B 复合体,使 NF- $\kappa$ B 以无活性的形式存在于胞浆中。当细胞受到各种刺激后, I $\kappa$ B 发生快速泛蛋白化及蛋白酶解, NF- $\kappa$ B 即被活化,并很快易位到核,与靶基因的启动子区域 B 基序结合,启动基因转录和蛋白合成<sup>[1,2]</sup>。我们采用针对

NF- $\kappa$ B p65 的抗体进行免疫组化实验,研究其在肾毒血清肾炎大鼠肾组织中的活化,分析其与蛋白尿、肾小球细胞数及 MCP-1 表达之间的关系,并进一步研究糖皮质激素对 NF- $\kappa$ B 活化和 MCP-1 表达的影响,探讨 NF- $\kappa$ B 活化在肾小球肾炎发病机制中的作用及糖皮质激素抑制炎症反应的分子机制。

本研究结果发现,肾毒血清肾炎大鼠肾组织中 NF- $\kappa$ B 活化显著上调,且与蛋白尿及肾小球细胞数呈显著正相关。我们进一步研究 NF- $\kappa$ B 活化的细胞类型时发现,正常肾组织皮质区远端肾小管上皮细胞和肾小球有较弱的活化,肾毒血清肾炎大鼠可见远端肾小管、近端肾小管和肾小球中活化显著增强,这与 Morrissey 等人<sup>[3]</sup>的研究结果相似。该学者同时应用免疫组化及凝胶电泳迁移率实验 (EMSA) 研究 NF- $\kappa$ B 在单侧输尿管结扎大鼠肾组织中活化时发现,在结扎后 4 h, NF- $\kappa$ B 活化显著上调,肾小管细胞中 NF- $\kappa$ B 活性最强,间质细胞亦呈阳性反应,而肾小球中阳性较弱。

近年来研究发现蛋白尿可直接诱导近端肾小管上皮细胞 NF- $\kappa$ B 活化<sup>[4]</sup>。Qvarnstrom 等研究证实,在纤维连接蛋白附着底物上培养的人成纤维细胞,纤维连接蛋白可呈剂量依赖性地活化 NF- $\kappa$ B<sup>[5]</sup>。此外,在立体胶原基质附着底物上生长的成纤维细胞核中亦发现有活化的 NF- $\kappa$ B<sup>[6]</sup>,提示 ECM 可诱导肾脏固有细胞内 NF- $\kappa$ B 的活化。活化的 NF- $\kappa$ B 又可诱导多种炎症介质的基因表达,这些炎症介质主要有:炎症性细胞因子、趋化因子、细胞粘附分子、MHC 和 类抗原以及细胞外基质成分等<sup>[1,2]</sup>。Sakurai 等研究肾毒血清性肾炎大鼠肾组织中 NF- $\kappa$ B 的活化时发现,肾小球内 NF- $\kappa$ B 的活性在注射肾毒血清后第 1 d 即显著增高,一直持续到第 14 d。该作者进一步采用抗氧化剂 PDTC 抑制 NF- $\kappa$ B 的活性后发现,炎症介质 IL-1, MCP-1, ICAM-1 及一氧化氮合酶 (iNOS) mRNA 表达显著下调<sup>[7]</sup>。有研究证实, IL-1 和 TNF- $\alpha$  可诱导培养人的肾小球系膜细胞中 NF- $\kappa$ B 的活化以及 MCP-1 mRNA 的表达<sup>[8,9]</sup>。这些研究结果均表明, NF- $\kappa$ B 的活化参与了肾小球肾炎的炎症反应,它不仅诱导炎症介质的合成,而且参与炎症介质的病理生理过程,从而起始肾脏损害。

肾毒血清肾炎为实验性新月体性肾小球肾炎动物模型,肾小球中有大量的单核巨噬细胞和 T 淋巴细胞浸润。血液循环中的单核细胞在肾组织所产生的趋化因子和单核细胞表面粘附分子的相互作用下,通过血管内皮细胞间隙浸润至肾小球中而成为

巨噬细胞。参与这一过程的趋化因子和粘附分子主要有:MCP-1, ICAM-1, VCAM-1等。MCP-1是趋化因子家族的重要成员,其基因启动子中均有 $\kappa$ B位点,基因转录受转录因子NF- $\kappa$ B所调控。我们的研究结果也发现,肾毒血清肾炎大鼠肾小球中MCP-1表达明显增强,且与NF- $\kappa$ B的活化、肾小球细胞数呈显著相关关系,提示活化的NF- $\kappa$ B通过促进MCP-1表达而诱导单核细胞浸润至肾小球形成新月体。

糖皮质激素是肾脏病领域应用最为广泛的一种免疫抑制剂,它能有效地抑制多种炎症介质的基因表达。近年来研究发现糖皮质激素是通过抑制NF- $\kappa$ B的活性来发挥其免疫抑制效应的。体外研究表明,地塞米松可阻断TNF- $\alpha$ , IL-1和LPS诱导的HeLa细胞、单核细胞和小鼠杂交瘤细胞中NF- $\kappa$ B结合活性的增高<sup>[10]</sup>。我们的研究结果也发现,地塞米松显著抑制肾毒血清肾炎大鼠蛋白尿排泄及新月体形成,免疫组化研究结果显示,地塞米松明显抑制模型组大鼠肾小球及肾小管间质中NF- $\kappa$ B的活化及MCP-1的表达。NF- $\kappa$ B活化和MCP-1表达的下调与肾小球细胞数和蛋白尿呈显著正相关,提示糖皮质激素减轻肾小球肾炎的炎症反应可能是通过抑制NF- $\kappa$ B的活性来实现的。糖皮质激素抑制NF- $\kappa$ B活化的机制目前认为是糖皮质激素与其受体结合,继而以糖皮质激素-受体复合物的形式进入细胞核,直接激活MAD-3基因,使I $\kappa$ B合成增加。新合成的I $\kappa$ B与解离的NF- $\kappa$ B重新结合,阻断NF- $\kappa$ B进入细胞核,最终抑制靶基因的转录和炎症介质的合成与释放<sup>[11]</sup>。

总之,本研究结果证实,肾毒血清肾炎大鼠肾组织中NF- $\kappa$ B活化及MCP-1显著上调,与肾组织病理改变和临床表现密切相关,抑制NF- $\kappa$ B的活化可能是糖皮质激素发挥其抗炎作用的途径之一。

## [参 考 文 献]

- [1] Morrissey J, Klahr S. Transcription factor NF- $\kappa$ B regulation of renal fibrosis during ureteral obstruction [J]. *Semin Nephrol*, 1998, 18(6): 603 - 611.
- [2] May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF- $\kappa$ B [J]. *Immunol Today*, 1998, 19(2): 80 - 88.
- [3] Morrissey JJ, Klahr S. Enalapril decreases nuclear factor  $\kappa$ B activation in the kidney with ureteral obstruction [J]. *Kidney Int*, 1997, 52(4): 926 - 933.
- [4] Zoja C, Donadelli R, Colleoni S, et al. Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF- $\kappa$ B activation [J]. *Kidney Int*, 1998, 53(6): 1608 - 1615.
- [5] Qwarnstrom EE, Ostberg CO, Turk GL, et al. Fibronectin attachment activates the NF- $\kappa$ B p50/p65 heterodimer in fibroblasts and smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(49): 30765 - 30768.
- [6] Xu J, Zutter MM, Santoro SA, et al. A three-dimensional collagen lattice activates NF- $\kappa$ B in human fibroblasts: role in integrin  $\alpha$ 2 gene expression and tissue remodeling [J]. *J Cell Biol*, 1998, 140(3): 709 - 719.
- [7] Sakurai H, Hisada Y, Ueno M, et al. Activation of transcription factor NF- $\kappa$ B in experimental glomerulonephritis in rats [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1316(2): 132 - 138.
- [8] Rovin BH, Dickerson JA, Tan LC, et al. Modulation of IL-1-induced chemokine expression in human mesangial cells through alterations in redox status [J]. *Cytokine*. 1997, 9(3): 178 - 186.
- [9] Khachigian LM, Collins T, Fries JW. Nuclear factor- $\kappa$ B mediates induction of vascular cell adhesion molecule-1 in glomerular mesangial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995, 206(2): 462 - 467.
- [10] Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, et al. Role of transcriptional activation of I $\kappa$ B in mediation of immunosuppression by glucocorticoids [J]. *Science*, 1995, 270(5234): 283 - 286.
- [11] Marx J. How the glucocorticoids suppress immunity [J]. *Science*, 1995, 270(5234): 232 - 233.

(本文编辑:曹励之)