文章编号:1000-5404(2012)10-0959-04

论著

NALP3表达与糖尿病肾病肾间质炎症的关系

张锦华,张建国,杨聚荣,林利容,詹 俊,李开龙,何娅妮 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肾内科)

[摘要] **目的** 探讨糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)患者肾组织中NALP3的表达变化与肾小管间质炎症之间的关系。**方法** 应用免疫组化及激光共聚焦技术检测DKD患者肾小管上皮细胞NALP3及IL-1β的表达变化及其相互关系,ELISA法检测尿液IL-1β水平,生化方法检测血清总胆固醇、低密度脂蛋白(LDL)、血肌酐(Serum creatinine, SCr)、24 h尿蛋白,计算出肾小球滤过率(estimated glomerular filtration rate, eGFR),对各指标与DKD时肾小管间质损伤、eGFR进行相关性分析。**结果** DKD患者尿液IL-1β水平较对照组明显增高($P<0.05$),肾小管上皮细胞NALP3及IL-1β的表达较对照组显著增高($P<0.05$),且二者的表达与肾小管间质损伤显著相关($P<0.01$);激光共聚焦显示DKD患者NALP3表达增高的同时伴有IL-1β的增加;NALP3及IL-1β阳性细胞比例与患者年龄、体质量指数、舒张压、LDL、24 h尿蛋白、总胆固醇无显著相关性,但与血肌酐、尿IL-1β、eGFR显著相关($P<0.01$)。**结论** DKD患者肾小管上皮细胞NALP3表达与炎性细胞因子IL-1β水平、肾间质损伤及肾功能改变明显相关,提示NALP3的表达变化很可能与DKD肾小管间质炎症反应存在密切关系。

[关键词] 糖尿病肾病;NALP3;IL-1β;炎症
[中图法分类号] R392.3;R587.2;R692.302 [文献标志码] A

Relationship between NALP3 expression and renal tubulointerstitial inflammation in diabetic kidney disease

Zhang Jinhua, Zhang Jianguo, Yang Jurong, Lin Lirong, Zhan Jun, Li Kailong, He Yani (Department of Nephrology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the relationship between renal tissue expression of NALP3 and renal tubulointerstitial inflammation in patients with diabetic kidney disease (DKD). **Methods** Thirty patients with DKD were enrolled (patient group), and the pathologically confirmed normal renal tissues adjacent to the renal angiomyolipoma or kidney transplants were assigned as a control group. Immunohistochemistry and confocal laser scanning microscopy were performed to detect the expressions of NALP3 and IL-1β in renal tubular epithelial cells and their relationship. The levels of urine IL-1β, serum total cholesterol, low density lipoprotein (LDL), serum creatinine (SCr) and 24 h urine protein were measured by ELISA. The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated and the correlations between the indicators and renal tubulointerstitial inflammation were analyzed. **Results** The level of IL-1β in the urine of the patient group was significantly higher than that of the control group. The expression of NALP3 and IL-1β in renal tubular epithelial cells both increased significantly in the patient group compared with those in the control group ($P<0.05$), and their expression was positively correlated with renal tubulointerstitial injury ($r=0.66$, $r=0.55$, $P<0.001$). The confocal laser scanning microscopy showed that the NALP3 expression upregulated accompanied by the increase of IL-1β expression in the DKD patients. The proportion of NALP3 and IL-1β positive cells was significantly correlated with SCr, urine IL-1β and eGFR ($P<0.01$), but was not correlated with the age, body mass index (BMI), diastolic pressure, LDL, 24 h urine protein or serum total cholesterol. **Conclusion** NALP3 expression in renal tubular epithelial cells is closely related to the level of inflammatory cytokine IL-1β, renal tubulointerstitial injury and renal function changes in DKD patients, suggesting that NALP3 expression plays an important role in renal tubulointerstitial inflammation in DKD.

[**Key words**] diabetic kidney disease; NALP3; IL-1β; inflammation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81070575). Corresponding author: He Yani, Tel: 86-23-68757871

[基金项目] 国家自然科学基金(81070575)
[通信作者] 何娅妮,电话:(023)68757871

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病最常见且最严重的并发症,是导致终末期肾衰竭的主要原因,但其发病机制不十分明确,近年来炎症机制在其中的作用受到重视。临床研究发现,糖尿病患者IL-1β基因和IL-1受体拮抗基因多态性效应的增强与DKD密切相关;糖尿病患者血、尿IL-1β水平显著升高,与DKD肾功能损害及心血管并发症关系十分紧密[1-2]。在DKD动物实验模型中也发现肾脏表达IL-1β增加,并与趋化因子和黏附分子的表达呈显著正相关,然而DKD时IL-1β是如何被激活进而表达增加的机制目前并不清楚。已证实高糖通过NF-κB信号通路激活肾实质细胞表达大量IL-1家族细胞因子前体分子,但这些前体促炎因子并无生物学活性,它们必须依赖IL-1转化酶(Caspase-1)的剪切作用被活化后才能发挥促炎作用[3]。NALP3炎性体由NALP3、衔接蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD,ASC)和CARDINAL(又称TUCAN;CARD8;NDDP1)以及Caspase-1组成蛋白复合体,当靶细胞感受到危险信号,NALP3可激活Caspase-1,活化炎症因子而发挥促炎作用[4]。本研究通过观察DKD肾穿刺组织中肾小管上皮细胞NALP3及IL-1β的表达变化,结合临床生化检测结果,探究NALP3是否在DKD炎症反应中具有一定的作用。

1 对象与方法

1.1 临床标本检测

依据1999年WHO、IDF公布的糖尿病诊断标准,选取2010年9月至2011年10月第三军医大学大坪医院野战外科研究所肾内科收治的经临床和肾活检确诊为2型DKD的患者30例(尿蛋白>500 mg/d或SCr> 120 μmol/L),男性12例,女性18例年龄(48±7)岁;对照组10例肾组织标本均取自肾错构瘤患者肾切除后或肾移植经病理检查为正常的肾组织(尿蛋白<500 mg/d或SCr<120 μmol/L),男性6例,女性4例,年龄(51±9)岁,均经患者本人知情同意。排除吸烟、肥胖、高血压患者。于肾活检前1 d天收集血、尿标本,送本院检验科按生化方法测定血清总胆固醇、低密度脂蛋白(LDL)、SCr、24 h尿蛋白定量,根据Cockcroft-Gault计算公式:eGFR[ml/(min/1.73 m^2)$^{-1}$] = (140 − age) × BW(kg)/72 × Scr(mg/dl) × 0.85(if female)[5],计算出DKD患者肾小球滤过率(estimated glomerular filtration rate, eGFR)值。

1.2 主要试剂和仪器

小鼠抗人NALP3抗体、兔抗人IL-1β抗体均购自美国Abcam公司,抗小鼠或兔通用型免疫组化二步法检测试剂盒购自美国DAKO公司,封闭用正常山羊血清工作液、显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术公司,FITC标记山羊抗兔IgG,Cy3标记山羊抗小鼠IgG均购自上海碧云天生物技术公司,人IL-1βELISA试剂盒购自上海西唐生物技术公司。LEICA DM1000倒置显微镜购自Leica公司。

1.3 肾小管上皮细胞NALP3及IL-1β的表达检测

肾组织经常规石蜡包埋,切片3 μm厚采用免疫组化二步法染色,一抗:小鼠抗人NALP3多克隆抗体(1∶200)、兔抗人IL-1β多克隆抗体(1∶300),按说明书进行。NALP3和IL-1β主要表达于细胞质,以细胞质出现棕黄色颗粒为阳性。参照文献[6],判定方法分为4级:0分:无阳性染色或单个阳性染色的细胞;1分:弱表达,阳性率10%~35%;2分:中度表达,阳性率35%~70%;3分:强表达,阳性率>70%,每张切片在低倍视野下任选10个视野,取其平均值。采用ELISA试剂盒检测收集的对照组与DKD患者组尿液中IL-1β水平。肾组织冰冻切片免疫荧光染色,一抗:小鼠抗人NALP3多克隆抗体(1∶50)和兔抗人IL-1β多克隆抗体(1∶50)混合液,二抗:FITC标记的山羊抗兔IgG(1∶25)和Cy3标记山羊抗小鼠IgG(1∶50),按说明书进行。激光共聚焦显微镜检测肾小管上皮细胞NALP3与IL-1β的表达关系。

1.4 肾间质损伤评分

肾间质炎症参考Verzola等[6]的检测方法,即0分:无炎症细胞浸润;1分:炎症细胞浸润10%~35%;2分:炎症细胞浸润35%~70%;3分:炎症细胞浸润>70%。肾间质纤维化根据Mezzano等[7]的方法,每张切片随机选取10个不重叠视野测定小管间质纤维化面积与同视野小管间质总面积的百分比,评分标准:0分:无病变;1分:<25%;2分;26%~50%;3分:>50%。肾小管萎缩按萎缩程度与范围评分[8],无小管萎缩:0分,小灶性萎缩:1分,显著或片灶性:2分,弥漫性重度萎缩:3分。每张切片在低倍视野下(×100倍)随机选择10个视野,取其平均值。上述结果的判读均采用盲法进行,由2名与本研究无关人员实施。

1.5 统计学分析

计量资料以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行独立样本t检验,相关性检验采用Pearson相关分析进行比较。

2 结果

2.1 2组临床资料比较

与对照组比较,2型DKD患者血肌酐、24 h尿蛋白、总胆固醇、LDL、收缩压、eGFR差异均有统计学意义($P<0.05$),年龄、病程、舒张压比较差异均无统计学意义($P>0.05$,表1)。

表1 2组生化指标比较

组别	n	血肌酐(μmol/L)	尿蛋白(g/24 h)	收缩压(mmHg)	总胆固醇(mmol/L)	LDL(mmol/L)	eGFR[ml/(min·1.73 m^2)$^{-1}$]
DKD组	30	149.4±19.4[a]	5.5±0.5[a]	142±7[a]	5.3±1.4[a]	3.0±1.5[a]	43.6±5.8[a]
对照组	10	75.4±15.7	<0.4	119±7	3.1±0.8	2.6±1.3	93.6±20.8

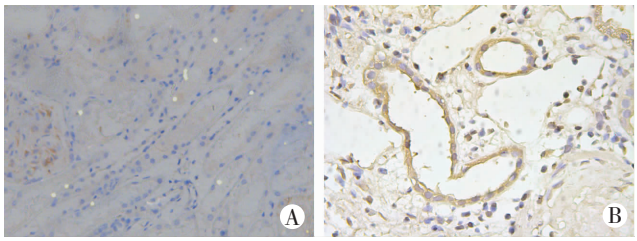
a: $P<0.05$,与对照组比较

2.2 2型DKD患者尿液IL-1β水平的变化

与对照组尿液IL-1β(65.3±5.8)比较,2型DKD患者尿液IL-1β水平显著增高[(130.1±24.1),$P<0.05$]。

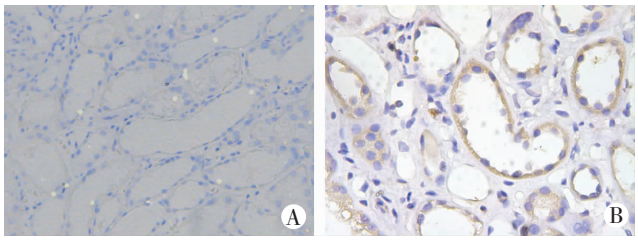
2.3 2型DKD患者肾小管上皮细胞NALP3及IL-1β的表达变化

免疫组化结果显示,对照组肾小管上皮细胞NALP3有少量基础表达、IL-1β不表达,2型DKD组肾小管上皮细胞NALP3和IL-1β表达明显增加,免疫组化染色呈棕黄色,主要表达于肾小管上皮细胞的细胞质,细胞核呈阴性(图1、2)。



A:对照组; B:2 型 DKD 组

图 1 各组肾小管上皮细胞 NALP3 的表达变化 (二步法 ×200)

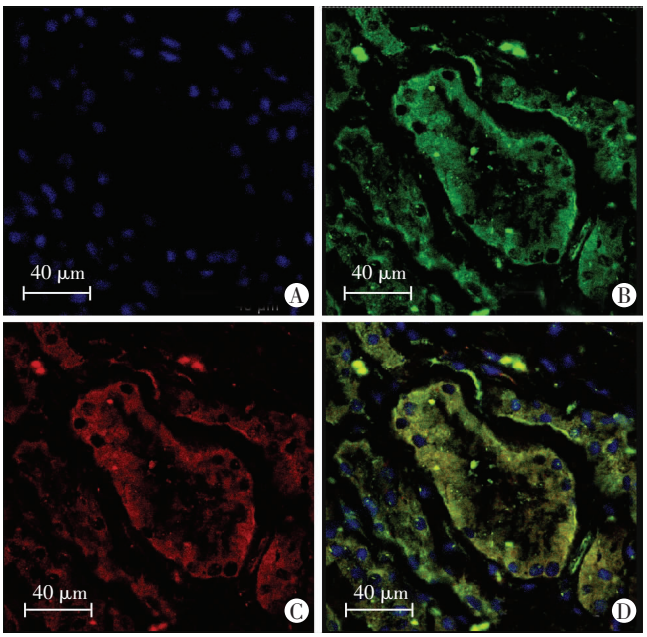


A:对照组;B:2 型 DKD 组

图 2 各组肾小管上皮细胞 IL-1β 的表达变化 (二步法 ×200)

2.4 DKD 肾小管上皮细胞 NALP3 与炎症因子 IL-1β 表达关系

激光共聚焦检测对照组肾小管上皮细胞 NALP3 呈低水平表达,其炎症因子 IL-1β 阳性表达极低甚至不表达,2 型 DKD 组肾小管上皮细胞 NALP3 表达显著增强,其炎症因子 IL-1β 阳性表达也显著增高,且二者表达增加部位一致,表明 DKD 时 NALP3 与 IL-1β 在肾小管上皮细胞的表达具有相关性,见图 3、4。

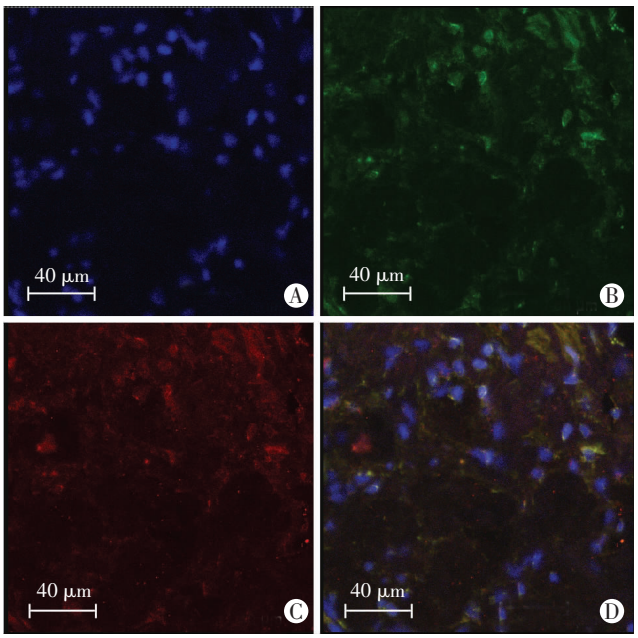


A:DAPI; B:IL-1β; C:NALP3;D:Merge

图 3 DKD 组 NALP3 与 IL-1β 共表达

2.5 DKD 患者肾小管上皮细胞 NALP3、IL-1β 分别与肾间质炎症、肾间质纤维化及肾小管萎缩之间的关系

相关分析显示肾小管上皮细胞 NALP3、IL-1β 表达与 DKD 患者肾间质炎症呈正相关关系($r=0.66$, $r=0.55$, $P<0.01$)、与肾间质纤维化呈正相关关系($r=0.65$, $r=0.50$, $P<0.01$),与肾小管萎缩呈正相关关系($r=0.63$, $r=0.56$, $P<0.01$)。



A:DAPI; B:IL-1β; C:NALP3;D:Merge

图 4 对照组 NALP3 IL-1β 共表达

2.6 DKD 患者肾小管上皮细胞 NALP3、IL-1β 与其临床参数的相关性

相关性分析显示肾小管上皮细胞 NALP3 及 IL-1β 的表达与血肌酐、eGFR 及尿 IL-1β 水平显著相关,但与患者年龄、BMI、收缩压、舒张压、LDL、总胆固醇、24 h 尿蛋白无显著相关性,见表 2。

表 2 DKD 患者肾小管上皮细胞 NALP3、IL-1β 分别与临床参数的相关性分析

相关指标	肾小管上皮 NALP3 表达水平		肾小管上皮 IL-1β 表达水平	
	r	*P*	*r*	*P*
血肌酐(μmol/l)	0.69	<0.01	0.63	<0.01
eGFR(ml/min per 1.73 m^2)	−0.73	<0.01	−0.65	<0.01
尿 IL-1β(pg/ml)	0.89	<0.01	0.83	<0.01

3 讨论

糖尿病相关的代谢紊乱和血流动力学异常导致肾组织炎症反应是 DKD 的重要病理生理基础。白介素-1 家族(IL-1β、IL-18、IL-33 等)是炎症反应早期阶段产生的多潜能细胞因子。其中 IL-1β 是引起胰岛 β 细胞损伤和凋亡的关键效应分子[9]。研究发现,2 型糖尿病大鼠给予 IL-1β 受体拮抗剂处理后组织内 $CD68^+$, $MHCII^+$ 和 $CD53^+$ 细胞浸润显著减少,循环中炎症细胞因子水平显著下降[10]。因此目前普遍认为,IL-1β 是糖尿病发病的重要驱动因素[11-12],在 DKD 发病中的关键作用受到高度关注。本实验发现,炎症细胞因子 IL-1β 在对照组肾组织中无基础表达,在 DKD 肾组织中表达显著增加,表明 DKD 肾组织出现明显的炎症反应。但是,DKD 时炎症介质 IL-1β 产生的机制目前

尚不明确。

NALP3 炎性体是 NLRs(NOD like receptors, NLRs)炎性体家族成员之一,其核心蛋白 NALP3 可识别多种病原体及内源性危险信号。近年资料证实,LPS、类脂、脂磷壁酸、脂蛋白及 dsRNA 等活化 caspase-1 均依赖于 NALP3. 当危险信号作用于靶细胞,NALP3 即发生寡聚化,募集 ASC 和 CARDINAL,激活 Caspase-1,剪切 IL-1 家族成员的前体使其成为具有活性的 IL-1β、IL-18 和 IL-33 等促炎细胞因子,进而放大炎症瀑布效应。此外,NALP3 炎性体除了可以在转录后调控 IL-1β 的产生和释放,可能还通过影响 NF-κB 调控 IL-1β 的转录[3]。因此,NALP3 在天然免疫和获得性免疫反应中扮演了"关键开关"的角色[13-15]。已证实,NALP3 活化是非感染性炎性疾病和某些代谢性疾病(如痛风、Alzheimer's 病等)的重要机制[16-18]。因此,有学者提出 NALP3 炎性体是代谢相关危险信号感受器的观点[19]。近年来,NALP3 在肾脏疾病中作用已开始受到关注,在单侧输尿管梗阻模型中, NALP3 的活化与 IL-1β 产生增加相关[20],因此我们推测 NALP3 是否也介导了 DKD 肾间质 IL-1β 活化从而引起炎症反应? 本实验结果发现,与对照组相比,DKD 肾小管上皮细胞表达 NALP3 明显增加,进一步实验发现伴随 NALP3 表达的增高,IL-1β 表达也显著增高,提示二者表达可能具有一定的相关性,同时发现在 NALP3 及 IL-1β 表达高的部位,其周围炎症细胞明显增加,这些结果提示 NALP3 活化引起肾间质炎症反应很可能与肾小管上皮细胞分泌炎症细胞因子 IL-1β 有关,这也许是 DKD 发生发展的一个关键环节。通过对 DKD 肾小管上皮细胞 NALP3 及 IL-1β 阳性表达分别与肾小管间质损伤及临床参数的相关性分析发现,DKD 时 NALP3 及炎症介质 IL-1β 的高表达与患者年龄、BMI、收缩压、舒张压、LDL、总胆固醇、24h 尿蛋白无显著相关性,但与肾间质损伤、尿 IL-1β 水平及 eGFR 显著相关($P<0.01$),提示 DKD 时存在肾间质的炎症反应,且炎症反应可能与肾功能损害有关,表明肾间质炎症反应在 DKD 的发生、发展中发挥重要作用,很可能是导致 DKD 加速进展为肾衰竭的关键因素。

综上所述,DKD 时,NALP3 很可能是通过活化 IL-1β 表达引起肾小管间质炎症反应,这也许是 DKD 肾间质炎症反应的重要环节。目前关于 NALP3 在 DKD 病理过程中的作用及其意义的研究尚不多见,由于 NALP3 受体蛋白是控制机体免疫炎症反应的重要触发点,其活化可引起炎症因子的剧烈释放,因此对 NALP3 在 DKD 中的作用机制的进一步研究将有助于从炎症反应起点控制的角度揭示 DKD 发生、发展的机制并可能为其提供新的治疗靶点。

参考文献:

[1] Maeda S. Do inflammatory cytokine genes confer susceptibility to diabetic nephropathy? [J]. Kidney Int, 2008, 74(4): 413-415.

[2] Araki S, Haneda M, Koya D, *et al*. Predictive impact of elevated serum level of IL-18 for early renal dysfunction in type 2 diabetes: an observational follow-up study[J]. Diabetologia, 2007, 50(4): 867-873.

[3] Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, *et al*. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis[J]. Nat Immunol, 2009, 10(3): 241-247.

[4] Zhou R, Tardivel A, Thorens B, *et al*. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation[J]. Nat Immunol, 2010, 11(2): 136-140.

[5] 陈宇, 周永华, 韩晓骏, 等. 2型糖尿病患者血清胆红素水平与糖尿病肾病关系的研究[J]. 临床荟萃, 2011, 26(4): 292-295.

[6] Verzola D, Gandolfo M T, Gaetani G, *et al*. Accelerated senescence in the kidneys of patients with type 2 diabetic nephropathy[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 295(5): F1563-F1573.

[7] Mezzano S A, Droguett M A, Burgos M E, *et al*. Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy[J]. Kidney Int, 2000, 57(1): 147-158.

[8] 吴小川, 易著文, 何小解, 等. 小儿紫癜性肾炎肾脏病理定量分析[J]. 湖南医科大学学报, 2000, 25(4): 403-405.

[9] Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases[J]. Nat Rev Rheumatol, 2010, 6(4): 232-241.

[10] Ehses J A, Lacraz G, Giroix M H, *et al*. IL-1 antagonism reduces hyperglycemia and tissue inflammation in the type 2 diabetic GK rat[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(33): 13998-14003.

[11] Pickersgill L M, Mandrup-Poulsen T R. The anti-interleukin-1 in type 1 diabetes action trial--background and rationale[J]. Diabetes Metab Res Rev, 2009, 25(4): 321-324.

[12] Malozowski S, Sahlroot J T. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus[J]. N Engl J Med, 2007, 357(3): 302-303.

[13] Lamkanfi M, Kanneganti T D. Nlrp3: an immune sensor of cellular stress and infection[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(6): 792-795.

[14] Ferrero-Miliani L, Nielsen O H, Andersen P S, *et al*. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation[J]. Clin Exp Immunol, 2006, 147(2): 227-235.

[15] Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation[J]. Cell Death Differ, 2007, 14(1): 10-22.

[16] Iyer S S, Pulskens W P, Sadler J J, *et al*. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(48): 20388-20393.

[17] Liu-Bryan R. Intracellular innate immunity in gouty arthritis: role of NALP3 inflammasome[J]. Immunol Cell Biol, 2010, 88(1): 20-23.

[18] Halle A, Hornung V, Petzold G C, *et al*. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta[J]. Nat Immunol, 2008, 9(8): 857-865.

[19] Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? [J]. Science, 2010, 327(5963): 296-300.

[20] Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W, *et al*. Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors[J]. J Biol Chem, 2009, 284(36): 24035-24048.

(收稿:2012-02-23;修回:2012-03-01)

(编辑 龙 亮)