维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)01-0071-04

特异性 COX-2 抑制剂对小鼠狼疮性肾炎 $CD14^+$ 表达及 TNF-α、IL-6 的影响

钟 清,甘 华,肖 刚

(重庆医科大学临床学院肾内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨特异性 COX-2 抑制剂对 MRL/lpr 自发狼疮小鼠的 $CD14^+$ 表达及 TNF-α、IL-6 的影响。方法:用特异性环氧化酶-2(COX-2)抑制剂(Rofecoxib10·kg^{-1}·d^{-1})治疗 12 周龄雌性 MRL/lpr 自发狼疮小鼠,并与未干预组对照。12 周后用放射免疫方法检测小鼠血清和尿中肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白细胞介素-6(Interleukin-6,IL-6)及尿血栓素 B_2(TXB_2)的变化;并观察小鼠尿蛋白、血肌酐、肾组织病理改变及 $CD14^+$ 细胞数的变化。结果:治疗 12 周后,治疗组与对照组比较,小鼠血清和尿中 TNF-α、IL-6 水平降低($P<0.05$);24h 尿蛋白排泄量、血肌酐水平及肾组织 $CD14^+$ 细胞数差异均有显著性意义($P<0.05$);肾小球基底膜(GBM)增厚程度差异有显著性意义($P<0.05$)。结论:特异性 COX-2 抑制剂治疗 MRL/lpr 自发狼疮小鼠,可能通过抑制单核/巨噬细胞在肾组织中的浸润,降低血清和尿中 TNF-α、IL-6 水平,从而减轻了 MRL/lpr 小鼠肾损害,对 LN 有较好的治疗作用。

【关键词】特异性 COX-2 抑制剂;TNF-α;IL-6;狼疮性肾炎

【中国图书分类法分类号】R593.241 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-09-01

Influence of specific cyclooxygenase-2 inhibitor on TNF-α, IL-6 and expression CD14 positive cells in lupus MRL/lpr mice

ZHONG Qing, et al

(*Department of Nephrology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the underlying molecular mechanisms of specific cyclooxygenase-2 inhibitor(Rofecoxib)and to evaluate its efficacy on MRL/lpr mice. *Methods*: 12-week female MRL/lpr mice were given Rofecoxib (10mg·kg^{-1}·d^{-1})for 12 weeks. Suppressive effect of the drugs on serum and urinary levels of tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin-6(IL-6) and urinary TXB_2 level were determined by using radio-immunological assay. Changes in proteinuria, serum creatinine, pathology of ltidney and the expression of CD14 in renal tissues were observed. *Results*: Compared with the ones in the control group, mice treated with Rofecoxib had lower levels of proteinuria($P<0.01$), serum creatinine($P<0.01$), urinary TXB_2($P<0.01$), TNF-α and IL-6($P<0.05$) and the thickness of glomerular base membrane (GBM) ($P<0.05$). The number of CD14 expression of the positive cells in renal tissue significantly decreased. *Conclusion*: TNF-α and IL-6 may take part in immune pathogenesis of lupus nephritis(LN). Serum and urinary levels of TNF-α, IL-6 may be useful indicators for monitoring disease degree of renal damage in LN. Rofecoxib may have a significant effect on inhibiting the production of INF-α, IL-6 in the monocytes/macrophages cells. Rofecoxib may decrease the levels of serum and urinary TNF-α, IL-6 and ameliorate renal injuries in lupus MRL/lpr mice. The specific cyclooxygenase-2 inhibitor has a renoprotective effect on MRL-lpr/lpr mice.

【Key words】Specific cyclooxygenase-2 inhibitor; Tumor necrosis factor-α; Interleukin-6; Lupus nephritis

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种侵犯多系统的自身免疫性、严重危害人类健康的疾病,常伴肾脏受累即狼疮性肾炎(Lupus nephritis, LN)。SLE 的发病与免疫功能紊乱有关,尤其是细胞因子在发病和病变进展过程中的作用倍受关注。文献报道,SLE 患者血中可溶性 $CD14^+$ 与疾病活动指数,ANA 滴度呈显著正相关[1],表明 $CD14^+$ 细胞参与了 LN 的发生。特异性 COX-2 抑制剂对狼疮性肾炎 $CD14^+$ 表达及 TNF-α、IL-6

作者介绍:钟 清(1964-),女,硕士,副主任医师,
主要研究方向:自身免疫性疾病的发病机理及防治。

维普资讯 http://www.cqvip.com

的影响尚未见报道，我们应用特异性 COX－2 抑制剂治疗 MRL/lpr 自发狼疮小鼠，通过对血清和尿 TNF－α，IL－6 水平、24h 尿蛋白排泄量、肾功能、肾组织光镜、电镜及免疫组化检测 $CD14^+$ 表达，旨在探讨特异性 COX－2 抑制剂对狼疮性肾炎的作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及治疗

MRL/lpr 自发狼疮小鼠(12 只，雌性，3 月龄)购自中国科学院上海实验动物中心，体重 20～30g，随机分成两组，每组 6 只，饲以普通饲料。其中①特异性 COX－2 抑制剂(Rofecoxib)组 6 只，予含 Rofecoxib($10mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)的 0.5% 羧甲基纤维素水灌胃 12 周。②无干预对照组 6 只，予同体积的 0.5% 羧甲基纤维素水灌胃 12 周。

1.2 尿蛋白及血清肌酐测定

采用代谢笼准确测量动物 24h 尿量，用考马斯亮蓝法测定尿蛋白排泄量。尿蛋白总量＞3mg/24h 为蛋白尿。实验开始和结束时于各鼠眶后静脉丛采血，血清置－20℃保存，采用 Jaffe 法测血清肌酐水平。

1.3 血清和尿 TNF－α、IL－6 及尿 TXB_2 的测定

实验结束后，采用放射免疫法测定治疗组和对照组血清和尿中 TNF－α、IL－6 及尿 TXB_2 浓度(试剂盒由解放军总医院科技开发中心放免所提供)，严格按照说明书操作，并由专门实验室和专职工作人员进行检测。

1.4 肾组织电镜及 $CD14^+$ 细胞数检查

于实验终点，处死动物后取肾组织戊二醛固定标本送透射电镜检查。采用微波免疫组织化学染色。石蜡切片脱蜡，0.3% H_2O_2 封闭，0.3% 的 Triton X－100 消化 45min。置 0.01mol/L pH 6.0 柠檬酸盐缓冲液中行微波修复抗原(低中档火 15min；加入抗原修复液Ⅰ号(博士德公司)37℃修复 15min；山羊血清封闭。依次加入 1∶200 小鼠抗人 CD14 多克隆抗体(邦定泰克，抗单核/巨噬细胞)、生物素标记的抗兔 IgG 和辣根过氧化酶标记的卵蛋白－生物素(博士德公司)孵育 37℃孵育 15min。切片经 DAB 显色；脱水、透明、封片。显微镜下观察。

1.5 计算机图像分析

应用北航医学病理图象定量分析系统，通过光学显微镜放大 400 倍摄取图像，输入图像分析系统内。$CD14^+$ 的定量分析：每个标本按顺序选取 5～10 个肾小球视野、5～10 个肾间质视野，选用彩色系统定标，以直径大于 4μm 的目标作为 $CD14^+$ 细胞，计数每个肾小球及单位面积肾间质 $CD14^+$ 细胞数(即单核/巨噬细胞数)。采用会达组织细胞分析图文报告系统计算电镜片(×12000 倍)肾小球基底膜的厚度(mm)，每张电镜片随机选择 10 个包含基底膜的视野，取平均值间接反映该切片标本 GBM 的厚度。

1.7 统计方法

结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，两组资料比较采用 t 检验；多组资料比较采用方差分析；小鼠尿蛋白排泄量与尿 TXB_2 的关系采用直线相关回归分析，由 SAS8.0 软件包完成。

2 结 果

2.1 24h 尿蛋白定量及血肌酐测定结果

实验开始时两组小鼠尿蛋白排泄量及血肌酐水平差异无显著性($P>0.05$)。实验结束后，Rofecoxib 组小鼠尿蛋白排泄量减少、血肌酐水平明显降低，与对照组比较差异有显著性($P<0.05$)见表 1。

表 1 两组尿蛋白、血肌酐比较($\bar{x}\pm s$)

	24h 尿蛋白(mg/d)		血肌酐(μmol/L)	
	0 周	12 周	0 周	12 周
对照组	4.3±0.4	8.6±0.4	110.3±37.4	483.1±240.9
Rofecoxib 组	4.4±0.3	6.6±0.5*	147.2±59.10	189.5±111.7**

与对照组比较：*$P<0.05$，**$P<0.01$

2.2 血清和尿中 TNF－α、IL－6 及尿 TXB_2 测定结果

Rofecoxib 组小鼠血清和尿中 TNF－α、IL－6 及尿 TXB_2 水平明显降低，与对照组比较，差异有显著性($P<0.05$)见表 2。

表 2 两组血清和尿细胞因子及尿 TXB_2 水平变化($\bar{x}\pm s$)

项目	对照组	Rofecoxib 组
血清 TNF－α(ng/ml)	1.28±0.51	0.73±0.28*
尿 TNF－α(ng/ml)	12.50±5.27	6.57±3.73*
血清 IL－6(pg/ml)	40.51±16.93	21.18±11.96*
尿 IL－6(pg/ml)	4937.00±1749.00	2879.40±1412.00*
尿 TXB_2(pg/ml)	1829.80±777.57	1204.5±992.25*

与对照组比较：*$P<0.05$

表 3 两组肾组织电镜及 CD^+14 细胞数目的变化($\bar{x}\pm s$)

项目	对照组	Rofecoxib 组
电镜基底膜厚度(mm)	49.34±13.00	38.22±7.00*
$CD14^+$ 细胞(/gcs)	6.92±2.60	3.29±1.21**
$CD14^+$ 细胞(/mm^2)	644.1±238.6	450.7±166.1*

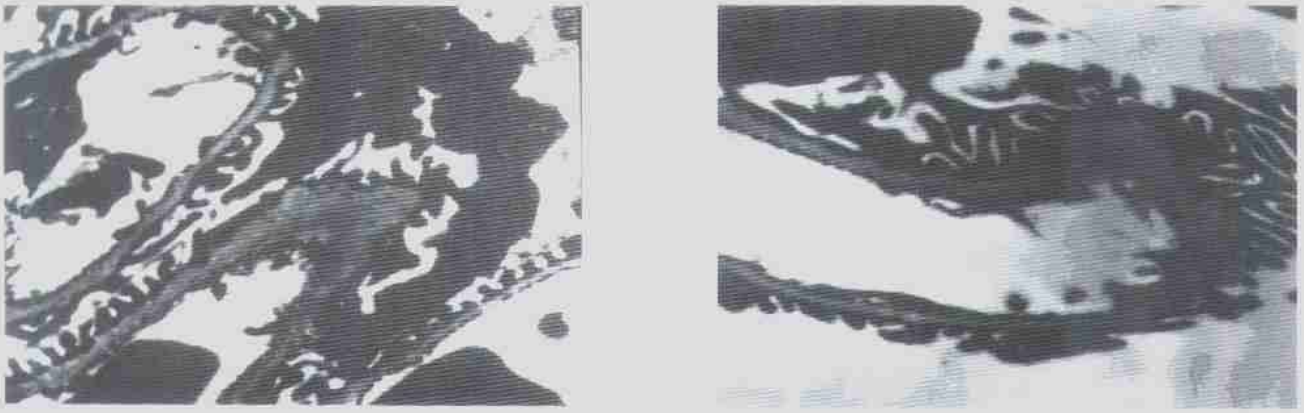
注：与对照组比较，*$P<0.05$；**$P<0.01$

2.3 MRL/lpr 小鼠肾组织电镜及 $CD14^+$ 细胞数检查

Rofecoxib 组小鼠肾组织透射电镜下可见基底膜增厚、足突广泛融合减轻，少量电子致密物沉积。与对照组比较差异有显著性($P<0.05$)。免疫组化分析结果示：Rofecoxib 组，MRL/lpr 小鼠肾小球和

维普资讯 http://www.cqvip.com

肾小管间质内浸润的 $CD14^+$ 数较对照组明显减少，与对照组比较，差异有显著性（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），见表 3、图 1、图 2。

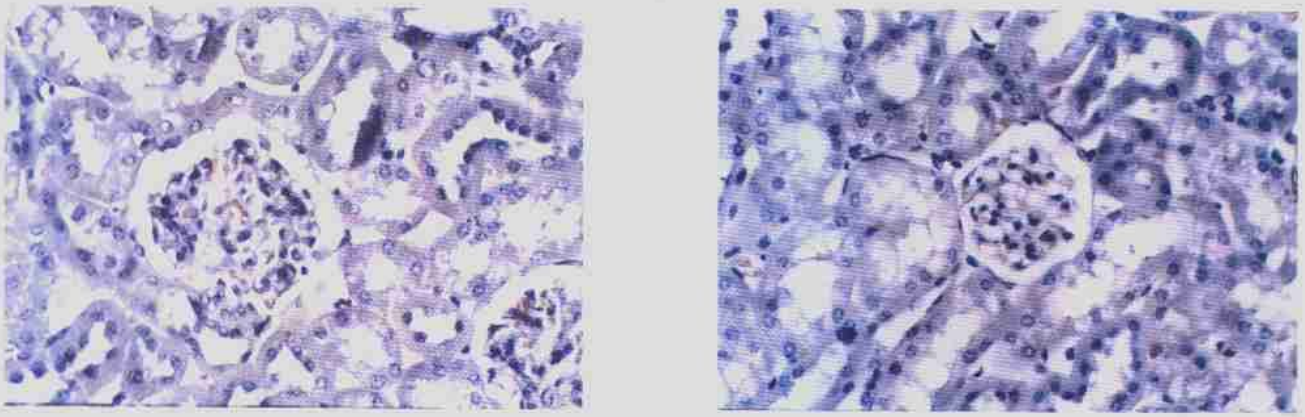


①　　②

图 1　肾组织电镜检测

①未干预对照组小鼠 GBM 明显增厚，有较多的电子致密物沉积，足突广泛融合（×1200）

②Rofecoxib 组小鼠 GBM 增厚减轻，足突广泛融合减轻（×1200）



①　　②

图 2　免疫组化染色检测 $CD14^+$（SABC×400）

①未干预对照组小鼠肾小球和肾间质 CD14 阳性细胞明显增多

②Rofecoxib 组小鼠肾小球和肾间质 CD14 阳性细胞减少

2.4　MRL/lpr 小鼠尿 TXB_2 与尿蛋白之间的关系

MRL/lpr 小鼠尿 TXB_2 与尿蛋白之间呈显著正相关，相关系数 $r=0.55399$，回归方程为 $y=0.0006x+3.9255$，决定系数 $R^2=0.3069$（$F=8.05$，$P<0.05$），见图 4。

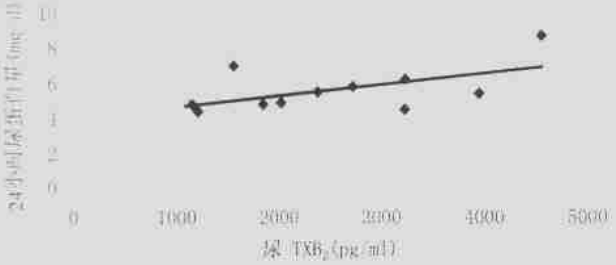


图 4　小鼠尿 TXB_2 与尿蛋白的关系

3　讨　论

$CD14^+$ 是单核/巨噬细胞表面特异的脂多糖受体，脂多糖结合蛋白催化脂多糖与 $CD14^+$ 结合从而使单核/巨噬细胞活化，产生一系列反应[2]。CD68 是单核/巨噬细胞浆内的一种糖蛋白，可作为单核巨噬细胞的标志。朱小玲等[3]研究发现 CD14 和 CD68 阳性细胞分布一致。因此本研究用肾组织 CD14 阳性染色代表单核/巨噬细胞。本研究结果发现，应用 Rofecoxib 治疗后，MRL/lpr 小鼠肾小球内浸润的 $CD14^+$ 数明显减少，小鼠血清和尿中 TNF-α、IL-6 水平下降，与对照组比较差异有显著性。其前列腺素代谢产物 TXB_2 水平显著降低，且尿 TXB_2 水平与尿蛋白排泄量呈直线正相关。透射电

维普资讯 http://www.cqvip.com

镜下可见基底膜增厚、足突广泛融合减轻，少量电子致密物沉积。MRL/lpr 小鼠尿蛋白排泄量明显减少，肾功能较稳定。

TNF－α是由单核/巨噬细胞产生的细胞因子，被认为是重要的炎症介质，主要通过①介导炎症细胞在炎症部位聚集；②与细胞之间相互作用引起组织损伤酶的释放、激活炎症细胞产生细胞毒效应；③刺激单核细胞等产生 TNF－α，加重炎症反应；④激活 T、B 淋巴细胞进一步产生抗体，导致疾病的发生和发展。TNF－α参与了细胞免疫介导的肾小球损伤[4]，活动期狼疮性肾炎患者血清和尿中 TNF－α水平显著升高[5]。单核细胞、T 和 B 淋巴细胞受病毒抗原或其它抗原的慢性刺激后可产生 IL－6。IL－6 与 TNF－α等细胞因子一起参与了 LN 免疫应答的全过程及肾组织局部的炎症反应。上述病理生理过程中，单核/巨噬细胞发挥重要作用，抑制单核/巨噬细胞的增殖可能减轻肾组织的病理过程。本研究发现，MRL/lpr 自发狼疮小鼠肾组织 $CD14^+$ 表达明显增高，血清和尿中 TNF－α、IL－6 水平增加。应用 Rofecoxib 治疗后，MRL/lpr 自发狼疮小鼠血清和尿中 TNF－α、IL－6 水平下降，从而减轻了肾脏损害。此外，文献报道[6]，特异性 COX－2 抑制剂还可明显抑制 T 淋巴细胞的活化、增殖及其细胞因子的表达，减少 IL－2 和 TNF－γ的产生。推测特异性 COX－2 抑制剂可能通过抑制单核/巨噬细胞的活化、增殖，减少 IL－6、TNF－α的产生，表明特异性 COX－2 抑制剂具有免疫调节作用。

综上所述，尿 TXB_2 水平与肾脏损害程度有关，Rofecoxib 抑制了单核/巨噬细胞在肾组织的浸润，抑制细胞因子的生成，减轻免疫球蛋白 IgG 沉积于肾小球基底膜而引起的病理损害，改善足突广泛融合，减少电子致密物沉积。从而减轻 COX－2 介导的对 MRL/lpr 小鼠肾组织的病理损伤，达到减少小鼠尿蛋白，稳定肾功能的目的。表明特异性 COX－2 抑制剂对小鼠狼疮性肾炎具有较好的治疗作用。

参 考 文 献

[1] Nockher WA, Wigand R, Schoeppe W, et al. Elevated levels of soluble CD14 in serun of patients with systemic lupus erythematosus[J]. Clin Exp Immunol, 1994; 96: 15－19.

[2] Shapira L, Takashiba S, Amar S, et al. Porphyromonas gingivalis lipolysaccharide stimulation of human monocytes: dependence on serum and CD14 receptor[J]. Oral Microbiol Immtmol, 1994; 9: 112－117.

[3] 朱小玲，孟焕新，陈智滨. 快速进展性牙周炎牙龈组织中单核/巨噬细胞浸润与 MCP－1 表达[J]. 中华口腔医学杂志，1999; 34(4): 214－216.

[4] Egido J, Gomez－Chiarri M, Ortiz A, et al. Role of tumor necrosis factor－a in pathogenesis of glomenfiar diseases[J]. Kidney Int 1993; 43(S 39)S59－64.

[5] 王 丹，尹培达，唐世聪. 狼疮性肾炎患者血清肿瘤坏死因子的变化及其临床意义[J]. 中国免疫学杂志，1994; 10(增刊): 167.

[6] Iniguez MA, Ptmzon C, Fresno M. Induction of cyclooxygenase－2 on activated Tlymphocytes: regulation of T cell activation by cyclooxygenase－2 inhibitors[J]. J Immunol, 1999; 163(1): 111－119.

(上接第 66 页)

[7] Cargill H, Alleyne Jr, Cawley CM, et al. Microsurgical anatomy of the artery of Adamkiewicz and its segmental artery [J]. J Neurosurg, 1998; 89(5): 791－795.

[8] 刘正津，陈尔瑜. 临床解剖学丛书，胸部和脊柱分册[M]. 北京：人民卫生出版社，1996; 380－382.

[9] Koshino T, Murakami G, Morishita K, et al. Does the Adamkiewicz artery originate from the larger segmental arteries [J]? J Thorac Cardiovasc Surg, 1999; 117(5): 898－905.

[10] 顾恺时. 顾恺时胸心外科手术学[M]. 上海：上海科学技术出版社，2003; 1117－1137.

[11] 孙衍庆. 现代胸心外科学[M]. 北京：人民军医出版社，2000; 1442－1443.

[12] Bachet J, Guilmet D, Rosier J, et al. Protection of the spinal cord during surgery of thoraco－abdominal aortic aneurysms[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 1996; 10(10): 817－825.

[13] Grabitz K, Sandmann W, Stuhmeiner K. The risk of ischemic spinal cord injury in patients undergoing graft replacement for thoracoabdominal aortic aneurysms[J]. J Vasc Surg, 1996; 23: 230－240.

[14] Griepp RB, Ergin MA, Galla JD. Looking for the artery ofAdamkiewicz: a quest to minimize paraplegia after operations for aneurysms of the descending thoracic and thoracoabdominal aorta[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1996; 112: 1202－1215.

[15] Sari HJ, Miller CC Ⅲ, Cart C, et al. Importance of intercostals artery reattachment during thoracoabdominal aortic aneurysm repair[J]. J Vasc Surg, 1998; 27: 58－68.