文章编号:0253－3626(2003)01－0021－04

NF－κBp65 在主动性 Heymann 肾炎肾小球损伤中的作用

杜晓刚,甘　华

(重庆医科大学临床学院肾内科,重庆　400016)

【摘　要】目的:探讨主动性 Heymann 肾炎(AHN)肾小球内 NF－κBp65 的活化及意义。方法:8～10 周龄 Wistar 雌性大鼠 20 只平均分 2 组,肾炎模型组予皮下免疫 Fx1A/CFA,对照组予皮下注射 CFA。免疫组化染色观察大鼠肾小球内 NF－κBp65 的活化及其与肾组织病理和生化指标改变的相互关系。结果:与对照组比较,肾炎模型组大鼠肾小球基底膜(GBM)明显增厚、肾小球 NF－κBp65 的活化明显增加,差异有显著性($P<0.01$);肾小球内 NF－κBp65 的活化与 GBM 增厚程度呈明显的直接正相关($P<0.05$)。结论:NF－κBp65 的活化参与了 AHN 的肾小球的病理损害过程。

【关键词】主动性 Hymann 肾炎;肾小球;核因子 κB

【中国图书分类法分类号】R692.3　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－06－17

Activation and significance of NF－κBp65 on the lesion of glomerulus in active Heymann nephritis

DU Xiaogang, et al

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

【Abstract】 *Objective*: To study the activation and significance of NF－κBp65 in active Heymann nephritis in rats. *Methods*: Female Wistar rats 6～8 weeks of age were used. The nephritis was induced with FxIA/CFA by subcutaneous injection and the control group with CFA. After the rats were killed, the activation of NF－κBp65 in renal tissue was observed by use of immunohistochemical dyeing; also observed were the changes in pathology, urinary protein and albumin and the relationship between these 3 factors. *Results*: Compared with the control group, the thickness of GBM increased ($P<0.01$), as well as the activation of NF－κBp65 in renal tissue. A tight positive correlation was found between NF－κBp65 in glomerulus and the thickness of GBM. *Conclusion*: The activation of NF－κBp65 may play an important role in the pathological lesion in the glomerulus of AHN.

【Key words】 Active Heymann nephritis; Glomerulus; Nuclear factor－κB

NF－κB(nuclear factor of kappa B)作为具有多向性调节作用的核转录因子,包括 p50、p52、p65、(Rel A)、p68(Rel B)和 C－Rel 等蛋白亚基,广泛参与许多基因,特别是免疫炎症相关基因的转录调控,通过调控一系列重要的免疫因子基因表达,参与免疫和炎症反应,以及某些细胞的生长调控[1]。近期实验研究表明,NF－κB 可调控肾小球系膜细胞的增生及其分泌的多种细胞炎症因子[2]。在以非系膜细胞炎性病变为主要特征的肾小球疾病中,有关 NF－κB 在肾组织中的表达及其作用尚少见文献报道。本文首次观察了 NF－κBp65 在主动性 Heymann 肾炎(AHN)中的表达情况及其与肾脏病理生理改变的关系,旨在探讨 NF－κBp65 在膜性肾炎发病中的作用。

作者简介:杜晓刚(1970－　),男,硕士,主治医师,
主要研究方向:肾小球疾病的发病机理及防治。

基金项目:重庆市卫生局科研资助项目(编号 01－2045)。

1　材料和方法

1.1　肾小管刷状缘膜抗原(FxIA)的提取制备

采用钙离子聚集法提取[3]。具体如下:取成年 Wistar 大鼠新鲜或冷冻肾皮质 4℃下匀浆,按 1:30(v/w)加入 50mmol/L 甘露醇/2mmol/L Tris－HCl(pH7.0)在冰浴中匀浆,搅拌 5min。加入 1mol/L $CaCl_2$ 至终浓度为 10mmol/L,冰浴中搅拌 10min,4℃下离心,3000g×15min;留上清液离心,43000g×20min;沉淀重复洗涤 1 次。考马斯亮蓝行蛋白定量,－20℃冰箱冻存备用。

1.2　实验动物及分组

8～10 周龄 Wistar 雌性大鼠 20 只(购于第三军医大学大坪医院动物中心),体重 80～100g,检查尿蛋白阴性后,随

机平均分成 2 组：(1)肾炎模型组：予 10mg Fx1A/CFA 足垫注射免疫，4 周后予 5mg Fx1A/CFA 背部注射加强免疫 1 次。(2)正常对照组：予 CFA 代替 Fx1A 抗原，处理同上。于实验前、初次免疫后第 4 周、第 6 周、第 8 周、第 14 周，将大鼠置代谢笼留取 24h 尿；14 周后杀鼠留取血清，取肾组织 3 块分别置液氮冻存、甲醛或戊二醛固定。

1.3　血清白蛋白以及尿蛋白定量检查

血清白蛋白：采用溴甲酚紫法。尿蛋白定量：采用考马斯亮蓝法。

1.4　肾组织病理学检查

石蜡切片，分别进行 HE 染色、PAS 染色、PASM 染色、Masson 染色；冰冻切片行免疫荧光（兔抗大鼠 IgG，Sigma 公司）检查以及戊二醛固定标本送透射电镜检查。肾组织病理定量采用北航计算机真彩色图象分析系统肾小球分析模块，400 倍下随机测定 5 个肾小球基底膜（GBM）面密度，取平均值间接反映该切片标本 GBM 的厚度。

1.5　肾组织 NF－κBp65 检测

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 TritonX－100 消化 45min。置 0.01mol/L pH6.0 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 兔抗大鼠 NF－κB（SantaCrus 公司）、生物素标记的抗兔 IgG 和辣根过氧化物酶标记的卵蛋白－生物素（博士德公司），37℃ 孵育 15min。以 DAB 显色；脱水、透明、封片。显微镜下观察，以细胞核 NF－κB65 部分或全部着色为其活化的标志。光镜下观察 10 个肾小球，计算平均每个肾小球横切面中 NF－κBp65 阳性细胞数（个/gcs）。

1.6　数据处理

全部数据计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，2 组资料比较采用 t 检验，多组资料比较用方差分析。肾组织 NF－κBp65 的活化与肾病理、生理改变的关系采用直线相关回归分析，由 SAS6.12 软件包完成。

2　结　果

2.1　尿蛋白定量

实验前两组大鼠 24h 尿蛋白定量差异无显著性（$P<0.05$）；正常对照组各时点纵向比较，24h 尿蛋白定量无统计学差异（$P>0.05$），而肾炎模型组大鼠从免疫后第 4 周开始，尿蛋白定量逐渐增加，至第 8 周达高峰，各时点纵向比较，差异有显著性（$P<0.05$）；与正常组同期比较，免疫后第 4 周开始，肾炎模型组大鼠尿蛋白明显增加（$P<0.01$）（见表 1）。

2.2　血清白蛋白水平变化

实验结束时，肾炎模型组大鼠血清白蛋白水平明显减低，与正常对照组比较，差异有显著性（$P<0.01$）（见表 1）。

2.3　肾组织病理学检查

光镜下，见肾炎模型组大鼠肾小球 GBM 不均匀增厚，部分毛细血管受压闭塞，可见上皮下有少量免疫复合物沉积。免疫荧光可见 IgG 沿肾小球毛细血管壁呈颗粒样沉积。电镜下见可见肾小球 GBM 增厚，有少量电子致密物沉积，足突广泛融合（见图 1）。病理定量分析显示：肾炎模型组大鼠肾小球 GBM 明显增厚，为正常的 2 倍，两者比较差异有显著性（$P<0.01$）（见表 2）。

2.4　肾组织 NF－κBp65 的活化

免疫组化染色显示（见图 2），肾炎模型组大鼠肾小球内 NF－κBp65 染色阳性细胞数较正常对照组明显增加，为正常组的 3 倍左右（见图 2）。

2.4　肾组织 NF－κBp65 的活化

免疫组化染色显示（见图 2），肾炎模型组大鼠肾小球内 NF－κBp65 染色阳性细胞数较正常对照组明显增加，为正常组的 3 倍左右（见图 2）。

表 1　两组大鼠尿蛋白（mg/24h）和血清白蛋白（g/L）的变化

	正常对照组	肾炎模型组	T 值	P
实验前尿蛋白	1.95±0.80	2.05±0.74	0.2681	>0.05
免疫后第 4 周尿蛋白	2.51±0.73	9.28±2.06	9.7768	<0.01
第 6 周尿蛋白	2.33±0.98	18.32±2.27	20.4734	<0.01
第 8 周尿蛋白	2.04±0.95	25.12±3.92	18.1254	<0.01
第 14 周尿蛋白	1.90±1.01	22.12±3.40	18.022	<0.01
血清白蛋白	38.19±4.12	31.13±3.39	3.8391	<0.01

说明：尿蛋白各时点纵向比较，正常对照组 $P>0.05$，肾炎模型组 $P<0.05$。

表 2　两组大鼠肾小球基底膜厚度及其 NF－κBp65 的活化

	正常对照组	肾炎模型组	T 值	P
GBM 平均面密度值	0.171±0.057	0.325±0.061	5.8286	<0.01
肾小球内 p65 阳性细胞数（/gcs）	9.67±4.25	27.26±2.98	10.7231	<0.01

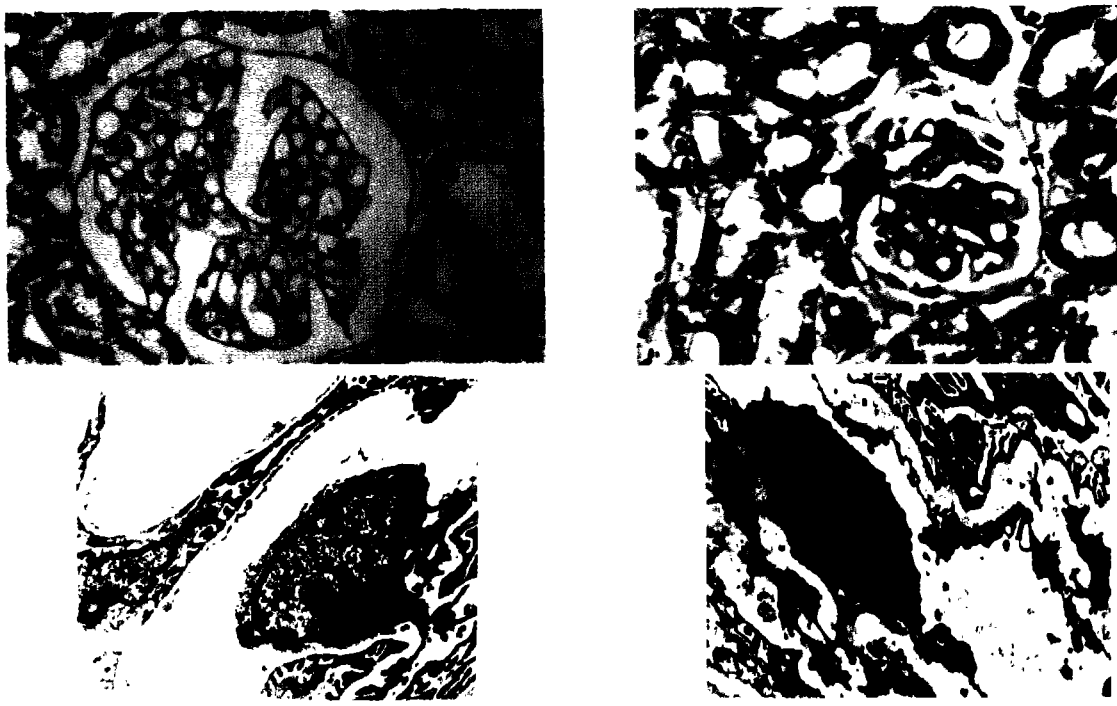


图 1 肾组织病理

①:正常对照组大鼠(HE×400) ②肾炎模型组大鼠(HE×400)

③正常对照组大鼠(电镜×8000) ④肾炎模型组大鼠(电镜×8000)

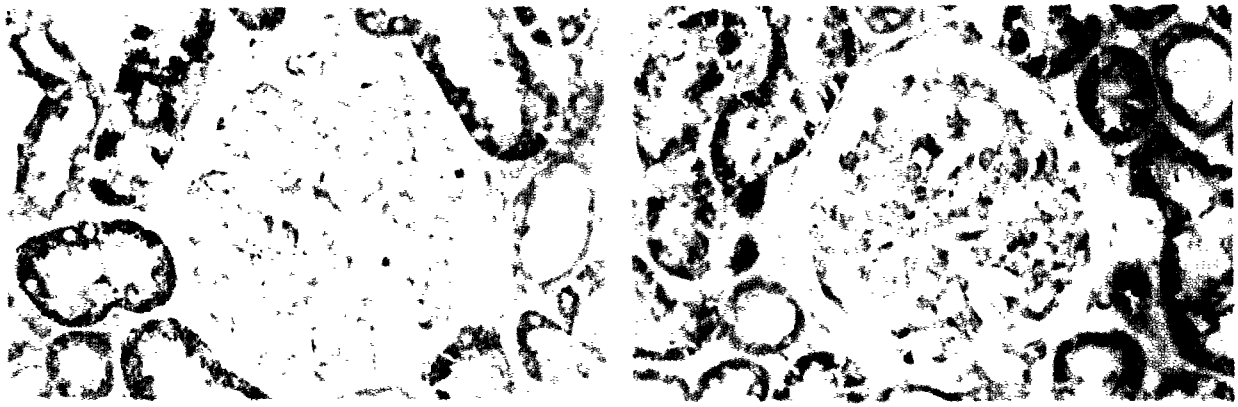


图 2 免疫组化染色检测肾小球内 NF－κBp65 的活化(SAB×400)

①正常对照组大鼠肾小球内细胞核偶见阳性着色 ②肾炎模型组大鼠肾小球内阳性着色的细胞核明显增加

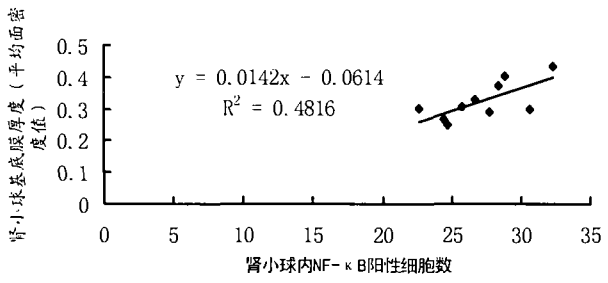


图 3 肾炎模型组大鼠肾小球内 NF－κB 阳性细胞数与肾小球基底膜厚度的关系

2.5 肾组织 NF－κBp65 的活化与肾病理变化及生化指标的相关回归分析

肾炎模型组大鼠肾小球内 NF－κBp65 阳性细胞数与肾小球基底膜厚度呈直线正相关、回归关系，相关系数 $r=0.69398$，回归方程为 $y=0.0142x-0.0614$，决定系数 $R^2=0.4816$（$F=7.432$，$P<0.05$）；但与尿蛋白水平及血清白蛋白水平无直线相关、回归关系。见图 3。

3 讨 论

Heymann 肾炎是一种自身免疫性炎症，在发病机理、病理和临床表现等方面均与人类的膜性肾炎极为相似。包括主动性Heymann肾炎(AHN)和被

动性 Heymann 肾炎（PHN）两种：前者是直接用自体或同种大鼠来源的 Fx1A 抗原免疫所诱导，后者是给动物静脉注射异种动物来源的抗 Fx1A 抗血清所诱导。本文肾炎模型组大鼠给予 Fx1A/CAF 免疫后，结果从初次免疫后第 4 周开始，尿蛋白增加，至第 8 周达高峰，为正常对照组的 10 倍左右，血清白蛋白明显低于正常对照组（$P<0.01$），结合病理检查发现大鼠肾小球 GBM 不均匀增厚，可见上皮下免疫复合物形成，免疫荧光检查见 IgG 沿肾小球毛细血管壁呈颗粒样沉积，电镜下见肾小球基底膜增厚，有上皮下电子致密物沉积，足突广泛融合，表明复制 AHN 模型成功。

NF－κB 是一种介导细胞内信号转导的重要转录因子，正常情况下与抑制物 IκB 结合，以非活性形式存在于胞浆中。脂多糖和细胞因子如 TNF－α 等，可激活 NF－κB 的诱导性激酶，后者进而活化 IκB 激酶（IκK），导致存在于细胞浆中 NF－κB/IκB 三聚体上的 IκB 磷酸化，使 NF－κB/IκB 复合物解离，随后 NF－κB 迁移入细胞核，通过与多种基因启动子或增强子特异的基因序列结合，参与多种基因（尤其是免疫炎症相关基因）的转录调控，进而参与调节免疫、炎症反应和细胞生长[2]。本实验发现：正常肾组织肾小球内存在有微量的 NF－κBp65 的活化，表明 NF－κBp65 在参与肾小球正常的新陈代谢及其生理功能中具有一定的作用。

文献表明，NF－κB 可调控肾小球系膜细胞的增殖或凋亡及其多种炎症介质如 TNF－α、IL－1、IL－2、IL－2a、IL－6、IL－8 和 CSF，ICAM－1、VCAM－1、E－selectin、MHC－Ⅱ类抗原、IFN－β、MCP－1 以及 iNOS 等转录和表达[2]。在肾小球疾病发生过程中，许多因素也可刺激肾组织内细胞 NF－κB 活化，参与调控炎症介质及细胞因子的产生。Das 等[4]在小鼠免疫复合物肾炎模型中，应用 EMSA 方法观察发现，肾脏细胞内 NF－κB 活性显著增加。Mudge 等[5]在 PHN 模型中发现，肾小球核提取物 NF－κB 结合活性明显增加，主要包括 p65 和 p50 两种亚基均增加；免疫组化定位分析表明主要是足细胞的 NF－κBp50 的活化；给予 NF－κB 抑制剂 PDTC（二硫代氨基甲酸吡咯烷酮），可明显减少 NF－κB 依赖性的 IL－1β 产生和基质金属蛋白酶 9 的分泌，而后者可降解基底膜上的胶原成分，促进蛋白尿的产生。本文观察显示，在 AHN 模型鼠，肾小球内 NF－κBp65 阳性细胞数明显增加；通过免疫组化定位分析显示其阳性细胞主要是受损的足细胞；且肾小球内 NF－κBp65 阳性细胞数与肾小球基底膜的厚度具有明显的直线正相关、回归关系，提示在 AHN 模型中，与 NF－κBp50 类似，足细胞 NF－κBp65 的活化在肾小球的损伤方面也具有极为重要的意义。

过去一直认为 Heymann 肾炎是体液免疫应答引起的肾小球损伤，但近年来大量的证据表明，Fx1A 免疫后，抗原直接刺激 T 细胞转化为效应 T 细胞，浸润迁移至肾组织所诱导的细胞免疫异常，在 AHN 的发生发展中具有更为重要的作用。研究表明[6,7]，AHN 模型大鼠在蛋白尿形成前，肾小球中即可有参与细胞免疫反应的 CD_4^+ Th_1 细胞、$CD8^+$ 细胞毒 T 细胞（CTL）和巨噬细胞浸润，靶抗原通过 TCR 介导和 CD28 双信号通路刺激活化 T 细胞同时，也导致 NF－κB 的激活[8,9]，进而调控着 IL－2、IL－2R 基因的转录表达[10]，而后者的高表达在调节 T 淋巴细胞激活中起着关键的作用。同时，Penny[6]用 RT－PCR 方法也证实，AHN 中肾小球内 Th_1 细胞因子如 IL－2、IFN－ν、TNF－β、CTL 细胞因子如穿孔素和颗粒酶以及巨噬细胞因子如 TNF－α 等炎症因子 mRNA 表达也明显增加，表明 DTH 和 CTL 的细胞毒作用参与了 AHN 的发生[11]。上述炎症细胞和炎症介质均可活化、损伤靶细胞——足细胞，引起蛋白尿。而这些炎症细胞的活化、浸润以及炎症介质的分泌，均需要 NF－κB 的转录调节[1]。故本文在 AHN 肾小球内 NF－κB 阳性染色的细胞，除足细胞外，可能有部分即为浸润的炎症细胞。

综上所述，本文通过免疫组化定位分析，结果表明足细胞和肾小球内浸润的炎症细胞 NF－κBp65 活性明显增加，在 AHN 的发生发展中发挥了极为重要的作用。

参 考 文 献

[1] Baldwin AS Jr. The NF－κB and I kappa B proteins: discoveries and insights [J]. Annu Rev Immunol, 1996; 14(1): 649－683.

[2] Guijarro C, Kim Y, Kassiske BL, et al. Central role of the transcription factor NF－κB in mesangial　（下转第 31 页）

西地那非片能够明显地降低患者子宫和卵巢动脉的 PI 及 RI 值(P 值均<0.05),增加子宫和卵巢的血供,有利于妊娠,这与 Sher 等[6]的研究结果相同。研究中用药后子宫内膜虽好于用药前一周期的同期水平,但差异无显著性($P>0.05$),分析其原因可能为①本研究中 6 例患者有贫腔结核史,病变可能累及内膜;②用药时间短,疗程不够;③样本量小,有待进一步总结。另外,在研究中观察到用药前宫腔注液时有返流的病例治疗后大部分返流现象消失,可能系枸橼酸西地那非使子宫平滑肌舒张,降低了宫腔内的压力。总的来说用枸橼酸西地那非片治疗后能改善子宫和卵巢的血供,有利于内膜的发育,提高人工授精的成功率。

本研究中用枸橼酸西地那非片治疗前患者左右两侧子宫和卵巢动脉的 PI 及 RI 无显著性差异($P>0.05$);治疗后两侧子宫动脉相比,其 PI 及 RI 值右侧虽低于左侧,但无统计学意义($P>0.05$)。治疗后比较两侧卵巢动脉的 PI 及 RI 值,右侧明显低于左侧($P<0.01$),提示枸橼酸西地那非片能改善优势卵泡侧卵巢的血供,有利于卵泡的发育。这一结果也可能与本研究 80.5% 的患者该周期为右侧优势卵泡,优势卵泡侧的动脉血流阻力明显低于对侧有关[3],也可能与部分左侧卵巢动脉来源于左肾动脉有关。

参 考 文 献

[1] Aleem FA, Predanic M. Transvaginal color Doppler determination of the ovarian and uterine blood flow characteristics in polycystic ovary discase [J]. Fertil Steril, 1996; 65(3): 510 - 516.

[2] 罗丽兰. 不孕与不育[M]. 第 1 版, 人民卫生出版社, 1998; 734.

[3] 王玉洁, 罗丽兰, 万轩金, 等. 彩色多普勒能量图对不孕症妇女子宫动脉血液变化的观察[J]. 同济医科大学报, 2000; 29(2): 165 - 167.

[4] Goswamy RK, Williams G, Steptoe PC. Decreased uterine perfusion a cause of infertility [J]. Hum Reprod, 1988; 3(8): 955 - 959.

[5] 乐桂容, 王迎春, 朱桂金. 经阴道彩色多普勒多囊卵巢综合症治疗前后子宫卵巢动脉血流的研究[J]. 同济医科大学学报, 2000; 29(6): 584 - 587.

[6] Sher G, Fich JD. Vaginal sildenafil (Viagra): a preliminary report of a novel met hod to improve uterine artery blood flow endometrial development in patients undergoing IVF[J]. Hum Reprod, 2000; 15(4): 806 - 809.

(上接第 24 页) cell production of chemokines [J]. Contrib Nephrol, 1997; 120(1): 210 - 218.

[3] Malathi P, Preiser H, Fairclough P, et al. A rapid method for the isolation of kidney brush border membranes [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1979; 554(1): 259 - 263.

[4] Das KC, Lewis MY, White CW. Thiol modulation of TN-Fa and 1L - 1 induced MnSOD gene expression and activation of NF - κB [J]. Mol Cell Biochem, 1995; 148(1): 45 - 57.

[5] Mudge SJ, Paizis K, Auwardt RB, et al . Activation of nuclear factor - kappa B by podocytes in the autologous phase of passive Heymann nephritis [J]. Kidney Int, 2001; 59(3): 923 - 931.

[6] Penny MJ, Boyd RA, Hall BM. Role of T cells in the mediation of Heymann nephritis. ii: Identification of Thl and cytotoxic cells in golmeruli [J]. Kidney Int , 1997; 51(4): 1059 - 1068.

[7] Cattell V, Largen P, De HE, et al. Glomeruli synthesize nitrite in active Heymann nephritis: the source is infiltrating macrophages [J]. Kidney Int, 1991; 40(5): 847 - 851.

[8] Los M, Schenk H, Hexel K, et al. IL - 2 gene expression and NF - κB activation through CD28 requires reactive oxygen production by 5 - lipoxygenase [J]. EMBO J, 1995; 14(15): 3731 - 3740.

[9] Dorada B, Portoles P, Ballester S. NF - κB in Th_2 cells: delayed and long - lasting induction through the TCR complex [J]. Eur J Immunol, 1998; 28(7): 2234 - 2244.

[10] Siebenlist U , Franzoso G, Brown K. Structure , regulation and function of NF - κB [J]. Annu Rew Cell Biol, 1994; 10(4): 405 - 455.

[11] Litwin A, Adams LE, Lwvy R, et al. Cellular immunity in experimental glomerulonephritis of rats. I. Delayed hypersensitivity and lymphocyte stimulation studies with renal tubular antigens [J]. Immunology, 1971; 20(5): 755 - 766.