DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.045
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

文章编号:1000-5404(2002)01-0103-03

论著

核因子-κB/IκB系统在慢性肾炎肾小球中的表达及意义

王惠民,朱妙珍,张建国,贾昆霞,肖 兵民 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所肾内科,重庆 400042)

提 要:目的 研究慢性肾炎(CN)肾组织中核因子-κB(NF-κB)P65/IκBα系统及单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的表达并探讨它们与CN肾脏病理改变和肾功能损害的关系。方法 以NF-κB亚基P65及其抑制性亚基IκBα单抗为抗体,采用ABC免疫组织化学染色检测CN肾组织NF-κB P65/IκBα表达,并进一步分析它们与肾小球内MCP-1蛋白表达、肾脏病理改变和功能损害的关系。结果 CN肾小球中NF-κB P65及MCP-1表达较正常肾组织显著增高,而IκBα表达则明显低于正常肾组织,以增殖性肾炎(MsPGN)为最显著($P<0.01$)。CN肾小球NF-κB、MCP-1阳性细胞数与肾小球IκBα阳性细胞数呈负相关,而与肾脏病理改变及肾功能损害呈正相关。结论 NF-κB可能参与了CN的发病机制。

关键词:慢性肾炎;核因子-κB;单核细胞趋化蛋白-1
中图法分类号:R394.3;R692.302 文献标识码:A

Expression of transcription factor-κB and IκB system in renal glomerulus of chronic nephritis

WANG Hui-ming, ZHU Miao-zhen, ZHANG Jian-guo, JIA Kun-xia, XIAO Bing-min (Department of Nephrology, Dapin Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To study the roles of nuclear factor-κB(NF-κB) and IκB system and the expression of monocyte chemoatractant protein-1 (MCP-1) in the pathogenesis of chronic nephritis (CN). **Methods** ABC immunohistochemitry was used to detect the expression of NF-κB P65, inhibitory κBα(IκBα) and MCP-1 protein in renal glomerulus of CN and normal control. At the same time, the relation of the expressions of NF-κB P65 and IκBα to MCP-1 expression, renal patological changes and function impairment was studied. **Results** Higher expression of NF-κB P65 and MCP-1 but lower of IκBα was detected in CN than in normal control, that was most significant in mesangial proliferation glomerulus nephpritis(MsPGN). The number of positive cells expressing NF-κB P65 and MCP-1 in glomerulus of CN showed a negative correlation with IκBα expression, and positive correlation with histological changes and functional impairment in CN. **Conclusion** NF-κB may play an important role in the pathogenesis of CN, and the number of positive cells expressing NF-κB P65/IκBα may be considered as a predictor for the progressive renal injury in CN.

Key words: chronic nephritis; monocyte chemoatractant protein-1; transcription factor

目前研究表明,NF-κB调控体内外肾小球细胞的增殖及其分泌的多种细胞炎症因子包括单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)[1,2],但有关NF-κB/IκB系统在人类肾小球肾炎肾组织中的表达及其作用尚未见报道。我们研究了NF-κB/IκB在人类肾小球肾炎肾组织中的表达情况及其与肾脏病理改变、肾功能损害之间的关系,以探讨NF-κB的活化在慢性肾炎中作用的。

1 材料与方法

1.1 病例选择

19例慢性肾炎病人均为我科2000年2月至2001年2月住院病人,男性7例,女性12例,平均年龄(27.6±7.8)岁(13~54岁),其中系膜增殖性肾小球肾炎(MsPGN)11例,非增殖性肾炎(nonPGN)包括膜性肾病(MN)4例、硬化性肾小球肾炎(FSGS)2例、微小病变(MAG)2例。正常对照组5例,为组织配型不合的供体肾。

1.2 肾组织NF-κB P65、IκBα和MCP-1蛋白表达的检测

采用冰冻切片免疫组织化学ABC染色法。NF-κB P65、IκBα及MCP-1单抗购自美国Santa Cruz公司,SABC试剂盒购自北京中山公司。简要步骤为:取10 μm厚的肾组织冰冻切片,4 ℃丙酮固定;正常山羊血清封闭;滴加兔抗人IκBα(1∶200),4 ℃湿盒过夜,以PBS代替一抗为阴性对照;加生物素化羊抗兔IgG(1∶200),37 ℃孵育30 min;滴加三抗,37 ℃孵育30 min;DAB显色、苏木素复染、系列酒精脱水、D.P.X封片。显微镜下观察,细胞内染成棕黄色部位为阳性部位。计算平均每个肾小球横切面中NF-κB P65、IκBα和MCP-1阳性细胞数。

1.3 肾组织常规光镜检查

计算肾小球横切面(gcs)细胞数目并作半定量定级[3]:0级(正常,<60个细胞/gcs);Ⅰ级(轻度增多,60~89个细胞/gcs);Ⅱ级(中度增多,90~120个细胞/gcs);Ⅲ级(重度增多,>120个细胞/gcs)。

1.4 患者肾活检前1天收集血、尿标本,测定24h尿蛋白定量和肌酐清除率(Ccr)

1.5 统计学分析

定量资料结果以$\bar{x}\pm s$表示,组间比较用F检验和q检验,相关分析采用线性回归分析。所有结果均在SPSS8.0电脑软件上处理。

作者简介:王惠民(1972-),男,湖北省仙桃市人,硕士,医师,主要从事肾炎发病机制方面的研究。电话:(023)68757446

收稿日期:2001-02-15;修回日期:2001-05-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

2.1 NF-κB P65 在肾小球中的表达

正常肾组织肾小球中，部分肾小球有比较微弱的 NF-κB P65 阳性表达，主要是肾小球系膜细胞。而在慢性肾炎肾小球中，NF-κB P65 表达水平明显增高，尤其以增生性肾小球肾炎更为明显，见表 1。

2.2 IκBα 在肾小球中的表达

正常肾组织肾小球中 IκBα 表达水平较高。在慢性肾炎肾小球中表达减弱，在增殖性肾小球肾炎肾小球中表达最弱。

2.3 MCP-1 在肾小球中的表达

正常肾组织肾小球内仅有极少量的 MCP-1 蛋白表达。CN 患者肾小球中，MCP-1 阳性细胞数增多。以 MsPGN 肾小球内阳性细胞数增高最多，显着高于正常对照组。

表 1 CN 肾小球中 NF-κB P65、IκBα 表达情况及肾功能指标

Fig 1 Functional impairment and expressions of NF-κB P65、IκBα、MCP-1 in the glomerulus of CN

Group	n	Number of postive staining cells in glomerulus/gcs				Renal function impairment	
		Total cells	P65	MCP-1	IκBα	Urine Protein(g/d)	Ccr(ml/min)
Normal	6	37.3±11.2	0.32±0.11	0.33±0.17	72.3±11.3		
CN	19	82.1±15.4 *	17.5±3.9 *	21.1±3.1 *	39.2±4.3 *	1.762±0.347	87.3±3.8
MsPGN	11	96.8±18.9 *△	23.7±4.8 *△	29.2±4.1 *△	28.5±4.1 *△	2.172±0.423	81.2±3.6
nonPGN	8	67.8±15.4 *	17.5±3.9 *	19.7±3.7 *	39.2±4.3 *	1.533±0.314	96.7±4.4

Note: *: $P<0.05$ *vs* contral; △: $P<0.05$ *vs* nonPGN

2.4 CN 肾小球内 NF-κB P65、IκBα 和 MCP-1 蛋白表达的相关分析

肾小球内 NF-κB P65 阳性细胞数与 IκBα 阳性细胞数成负相关关系（$r=-0.6047$，$P<0.05$），而与 MCP-1 阳性细胞数则成正相关（$r=0.5581$，$P<0.05$）；IκBα 阳性细胞数与 MCP-1 阳性细胞数呈负相关关系（$r=-0.6447$，$P<0.05$）。

2.5 CN 肾小球内 NF-κB P65、IκBα 表达与肾小球病理学指标相关分析

CN 患者肾小球内 NF-κB P65 表达与肾小球细胞数呈正相关关系，IκBα 表达则与肾小球细胞数呈负相关关系，见表 2。

表 2 CN 患者肾小球中 NF-κB P65、IκBα 表达与肾组织病理学和肾功能指标的相关分析

Tab 2 Correlation of the expressions of P65、IκBα and MCP-1 with the histological changes and functional lesion in CN

	Total cells in glomerulus/gcs(0—3)	Urine protein(g/d)	Ccr(ml/min)
P65 postive staining cells/gcs	0.7025 *	0.7211 *	−0.6041 *
IκBα postive staining cells/gcs	−0.6653 *	−0.6177 *	0.5984 *

*: $P<0.05$; Values represent the correlation coeffecient r

2.6 CN 肾小球内 NF-κB P65、IκBα 表达与肾功能指标相关分析

CN 患者肾小球 NF-κB P65 表达与 24h 尿蛋白定量，NAG 活性成正相关，而与 Ccr 呈负相关；IκBα 表达与 24h 尿蛋白定量，而与 Ccr 呈正相关，见表 2。

3 讨论

NF-κB 作为一种重要的转录因子，正常情况下与抑制分子 IκB 结合以非活性的形式存在于细胞浆中。当细胞受到外界有关刺激时，IκB 顺序磷酸化、泛素化而降解，NF-κB P65—P50 则与 IκB 解离并向核内转移，参与众多基因的转录调控。许多免疫炎症因子如肿瘤坏死因子（TNF）、白细胞介素（IL）、粘附分子（ICAM-1、VCAM-1）、趋化分子（MCP-1）等普遍含 NF-κB 结合位点，受到 NF-κB 的调控。动物实验有充分的证据显示，NF-κB 的活化在肾小球肾炎发生发展中起中心调节的作用。但对于人类慢性肾炎肾组织中 NF-κB 的表达及活化情况，目前未见报道。我们采用免疫组织化学检测 NF-κB P65、IκBα 和 MCP-1 在 CN 肾小球中的表达，以期初步了解 NF-κB 的表达及活化在 CN 肾损害中的作用。

近期研究表明，NF-κB 的活化介导了肾小球系膜细胞表达 MCP-1，MCP-1 则是导致单核/巨噬细胞向肾组织浸润的主要炎症因子。

本实验的结果显示，与正常肾组织比较，慢性肾炎肾组织肾小球中 NF-κB 阳性细胞数显著增高，而 IκBα 阳性细胞数则下降，其中尤以增殖性肾小球肾炎更为明显。由于 IκBα 的降解是 NF-κB 活化的先决条件，这提示，在慢性肾炎肾组织中，NF-κB 的表达上调与其活化可能是并存的，但其因果关系并不明确。

此外，慢性肾炎肾小球中 NF-κB P65、IκBα 及 MCP-1 阳性细胞数之间存在着相关性，其中，P65 与 IκBα 呈负相关，与 MCP-1 呈正相关；IκBα 与 MCP-1 亦呈负相关。这提示，与一般炎症一样，在慢性肾炎发病过程中，IκBα 的降解对于 NF-κB 的活化及其后续效应如 MCP-1 表达上升可能是必不可少的。在实验性免疫复合物性肾炎，NF-κB 可通过介导 MCP-1 合成参与肾组织中单核细胞的募集反应。Rovin 等[4] 将 NF-κB P65 的反义寡核苷酸片段转移至培养的人肾小球系膜细胞，发现可明显降低 MCP-1 的表达。可以推测，NF-κB 的活化对于人类慢性肾炎中单核/巨噬细胞向肾小球内浸润可能也起着重要的调控作用。

体外实验证实，NF-κB 的活化不仅调节着系膜细胞表达诸多炎症因子，与肾小球系膜细胞的增殖也密切相关[5]，将 NF-κB 反义寡核苷酸以左肾动脉导入 Thy1.1 模型鼠中，发现可减少系膜细胞增生和 PDCF、IL—6、TNFα 等炎性因子的表达[6]，炎性因子的产生及系膜细胞增生是造成肾损害的重要方面。本研究显示，慢性肾炎肾小球内 NF-κB P65 含量与肾小球内细胞数、24h 尿蛋白定量、肌酐清除率存在相关性，推测慢性肾炎时肾小球内 NF-κB P65 水平上升可能是肾功能损害的重要机制，但这尚需进一步的直接证据。此

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

外, NF-κB 的抑制性蛋白 IκBα 在慢性肾炎肾小球内含量与肾小球内细胞数、24h 尿蛋白定量、肌酐清除率也存在相关性, 鉴于 IκBα 降解是 NF-κB 信号途径的一个必经环节, 而且有人发现, 糖皮质激素治疗慢性肾炎的机制部分即在于能增加系膜细胞内 IκBα 水平[7]。这就给我们提供了另一条防治肾小球肾炎的线索, 即是否可以通过上调肾小球细胞内 IκBα 表达或抑制其降解, 使之与尽可能多的 NF-κB 亚基结合, 从而最大程度地抑制 NF-κB 持续活化来达到缓解肾损害的目的?

总之, 本研究结果表明, 在慢性肾炎特别是增殖性肾炎肾小球中 NF-κB P65、MCP-1 表达增强, IκBα 含量下降, 它们与肾脏病理改变及功能损害之间存在着相关性。推测 NF-κB 表达水平增高及活性的增强可能是慢性肾炎病理改变及功能损害的重要机制, 通过上调细胞内 IκBα 蛋白含量来阻断 NF-κB 信号途径可能有助于慢性肾炎的防治。

参考文献:

[1] Massy Z A, Guijarro C, O' Donnell M P, *et al*. The central role of nuclear factor-kappa B in mesangial cell activation[J]. Kidney Int Suppl, 1999 Jul; 71: S76-79.

[2] Ruiz O M, Bustos M, Miguel A H, *et al*. Angiotensin II participates in mononuclesr cell recruitment in experimental immune complex nhpfritis through nuclear factor NF-κB activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis[J]. J Immunol, 1998, 161(1): 430-439.

[3] Conraol L P. Evaluation of kedney bopsy specimens. In: Tisher C C, Brenner BM, eds. Renal pathology[M]. Philadelphia: J B Lippincott Company, 1994. 85-115.

[4] Rovin B H, Dickerson J A, Tan L C, *et al*. Activation of nuclear factor-kappa B correlates with MCP-1 expression by human mesangial cells[J]. Kidney Int, 1995, 48(4): 1 263-1 271.

[5] Guijarro C, Kim Y, Kasiske B L, *et al*. Central role of the transcription factor NF-κB in mesangial cell production of chemokines[J]. Contrib Nephrol, 1997, 120: 210-218.

[6] Kashihara N, Maeshima Y, Sekikawa T. *et al*. Inhibition of human mesangial cell proliferation by decoy oligonucleotiole targeting the transcription factor NF-κB[J]. J Am Soc Nephrol, 1995, 6(3): 834-841.

[7] Auwardt R B, Mudge S J, Chen C G, *et al*. Regulation of nuclear factor kappaB by corticosteroids in rat mesangial cells. J Am Soc Nephrol 1998, 9(9): 1 620-1 628.

(编辑　陈聪连)

(上接 102 页)

包括精神行为异常, 癫痫, 头痛, 发热及病理征等基本消失。改善: 以上症状体征部分消失或程度减轻。无改变: 症状仍反复发作, 体征存在。

表 1　实验组及对照组于治疗后 **20 d** 时症状体征恢复的比较

	基本正常	改善	无改变
实验组(n=15)	8	6	1
对照组(n=15)	5	4	6

基本正常及改善为治疗有效, 两组相比较 $P<0.05$

在以上病例临床观察中, 脑炎后癫痫多为全身强直阵挛发作, 用 IVIG 结合抗癫痫药物治疗较对照组中单纯使用抗癫痫药物治疗能更好地控制发作。脑炎后精神行为异常以情感及言语行为异常多见, 实验组治疗后较对照组改善较多。

脑电图改变比较, 见表 2。正常: 以 α 波为主, 兼有 β 波及少量低波幅慢波活动。轻度及界限异常: 散在中量低~中等波幅慢波活动。中度及重度异常: 大量或弥漫性中高幅慢波存在。

表 2　实验组及对照组于治疗后 **15 d** 时脑电图改变的比较

	正常	轻度及界限异常	中度及重度异常
实验组(n=15)	8	6	1
对照组(n=15)	4	4	7

正常与轻度及界限异常为治疗有效, 两组相比较 $P<0.025$

脑脊液常规生化指标比较, 见表 3。正常: 已恢复至正常指标。好转: 蛋白量下降, 白细胞数减少。异常: 蛋白量仍高, 白细胞数及淋巴分类仍高。

表 3　实验组及对照组于治疗后 **15 d** 时脑脊液常规生化指标的比较

	正常	好转	异常
实验组(n=15)	6	5	4
对照组(n=15)	1	4	10

正常与好转为治疗有效, 两组相比较 $P<0.05$

3　讨论

病毒性脑炎是一类常见的中枢神经系统感染性疾病。根据其病毒学分类有多种, 其病损可累及全脑各部分。病毒感染对脑的损害包括病毒的直接损害和组织的病理反应, 后者是机体对病毒抗原免疫反应的结果。其损害造成神经细胞变性, 坏死, 脱失, 导致多种多样的神经系统症状体征。IVIG 治疗病毒性脑炎, 其作用机制可能为: ①提高血清及组织间隙 IgG 水平。②直接中合病毒抗原。③抑制致病的细胞因子。④反馈性抑制病理性自身抗体的产生, 中和自身抗体。⑤抑制补体结合和膜攻击复合物(Menbranolytic Attack Complex)的形成。⑥对 Fc 受体的调节及阻滞作用, 加强吞噬功能和 Fc 介导的粘附作用, 增强吞噬过程中细胞生化作用。⑦对病毒感染引起的免疫缺陷状态有调节作用。据以上机制, 我们在病毒性脑炎治疗中使用 IVIG, 同未使用 IVIG 的对照组相比较, 在症状体征中, 特别是对脑炎后癫痫能更好控制, 对于精神行为异常有更好的改善, 脑电图及脑脊液常规生化指标有更多的好转。以上在统计学上有显著性差异($P<0.05$), 且临床上观察患者好转的病程有缩短, 残留的神经系统症状体征明显减轻。故作者认为使用 IVIG 对治疗病毒性脑炎有效。

关键词: 静脉注射人血丙种球蛋白; 治疗; 病毒性脑炎
中图法分类号: R512.305　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 余慧贞, 脑炎。见: 史玉泉 主编, 实用神经病学[M]. 第 2 版, 上海: 上海科学技术出版社, 1994. 397-403.

[2] Sandstedt P. Intravenous gamma globulin treats patients with epilepsy after encephalitis[J]. Lancet II, 1984, (8 421): 1 154.

[3] 黄如训, 方燕南, 病毒性脑炎。见: 黄如训, 梁秀龄 主编, 临床神经病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 281-282.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net