

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.12.024

论著·实验研究

## 分形素趋化因子在肾脏纤维化大鼠肾组织中的表达及 IL-18 结合蛋白对其表达的影响

王丽敏 李春玉 张佳滨 王禹 迟瑛娇 袁婧玮 张颖杰

(佳木斯大学附属第一医院儿科, 黑龙江 佳木斯 154003)

**[摘要]** **目的** 探讨分形素趋化因子(FKN)在肾脏纤维化大鼠肾组织中的表达情况及IL-18结合蛋白(IL-18BP)对其在肾组织内表达的影响。**方法** 将雄性Wistar大鼠随机分为假手术组( $n=24$ )、单侧输尿管梗阻模型组(模型组,  $n=22$ )和IL-18BP治疗组(治疗组,  $n=23$ )。采用单侧输尿管结扎方法造模,假手术组分离输尿管但不结扎,治疗组于造模成功后每隔1日腹腔注射1次IL-18BP(0.1 mg/kg),共7次,模型组和假手术组腹腔注射等量生理盐水。每组分别在腹腔注射完成后3 d、7 d和14 d各处死7~8只大鼠,采用免疫组织化学法和Western blot印迹法检测各组大鼠不同时间点肾组织FKN的表达水平。**结果** 同假手术组比较,不同时间点模型组肾组织FKN的表达量均明显升高(均 $P<0.01$ );同模型组比较,不同时间点治疗组肾组织FKN表达水平均明显降低(均 $P<0.01$ )。**结论** 肾脏纤维化大鼠肾组织FKN表达水平明显增高;IL-18BP特异性拮抗IL-18后,可能通过FKN途径延缓肾脏纤维化的发生发展。 [中国当代儿科杂志, 2013, 15(12): 1134-1138]

**[关键词]** 肾脏纤维化;分形素趋化因子;IL-18结合蛋白;大鼠

### Effect of IL-18BP on Fractalkine chemokine expression in the kidney tissue of rats with renal fibrosis

WANG Li-Min, LI Chun-Yu, ZHANG Jia-Bin, WANG Yu, CHI Ying-Jiao, YUAN Jing-Wei, ZHANG Ying-Jie. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154003, China (Email: wanglimin6518@163.com)

**Abstract: Objective** To study the expression of Fractalkine (FKN) in the kidney tissue of rats with renal fibrosis and the effect of IL-18BP on FKN. **Methods** Male Wistar rats were randomly assigned to sham-operation ( $n=24$ ), unilateral ureteral obstruction (UUO,  $n=22$ ), and IL-18 binding protein (IL-18BP) treatment groups ( $n=23$ ). The UUO model was prepared by unilateral ureteral ligation in the later two groups. The IL-18BP treatment group received an intraperitoneal injection of IL-18BP (0.1 mg/kg) every other day after UUO inducement, for 7 times, while normal saline was administered in the other two groups. Seven or eight rats of every group were sacrificed at 3, 7 or 14 days after IL-18BP or normal saline injections. FKN levels at various times were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** Compared with the sham-operation group, FKN levels in the kidney tissue of the untreated UUO group increased significantly at all time points ( $P<0.01$ ). IL-18BP treatment decreased significantly FKN levels in the kidney tissue at all time points compared with the untreated UUO group ( $P<0.01$ ). **Conclusions** IL-18BP treatment may down-regulate the increased FKN levels of the rat kidney tissue caused by UUO, possibly thus delays the occurrence and development of renal fibrosis. [Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(12): 1134-1138]

**Key words:** Renal fibrosis; Fractalkine; Interleukin-18 binding protein; Rats

肾脏纤维化是慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)进展至终末期肾脏病(end stage renal disease, ESRD)的共同通路。炎症反应是肾

脏纤维化的起始因素之一,寻找积极有效的早期干预措施对提高患者的生存率具有极其重要的意义。分形素趋化因子(Fractalkine, FKN)是一种

[收稿日期] 2013-05-01; [修回日期] 2013-06-08

[基金项目] 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12531688)。

[作者简介] 王丽敏,女,硕士,主任医师,教授。

新发现的具有黏附功能的炎性趋化因子, 已有研究证实其参与了肾脏纤维化的病理生理过程<sup>[1]</sup>。IL-18可通过上调FKN的表达增强其介导的趋化作用参与炎症反应。IL-18结合蛋白(IL-18BP)是IL-18的特异性拮抗蛋白, 通过拮抗IL-18的生物学作用调节FKN的表达进而影响肾脏纤维化的研究国内外少见报道。本研究以单侧输尿管梗阻(UUO)模型大鼠为研究对象初步探讨FKN在肾脏纤维化肾组织中的表达情况和IL-18BP对FKN表达的影响, 为肾脏纤维化的防治提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

雄性清洁级Wistar大鼠72只, 体重 $100 \pm 20$  g, 由哈尔滨医科大学实验动物中心提供。所有大鼠予以饲料及酸化处理高压饮用水适应性喂养1周后, 采用随机排列表法随机分为假手术组、单侧输尿管梗阻模型组(模型组)、IL-18BP治疗组(治疗组), 每组24只; 再根据不同处理时间段(3 d、7 d和14 d)将各组随机分为3个亚组, 每亚组8只大鼠。

### 1.2 实验试剂

兔抗鼠FKN抗体(武汉博士德生物工程有限公司)、兔抗鼠 $\beta$ -actin多克隆抗体(北京中山生物技术公司)、IL-18BP(北京义翘神州生物技术有限公司)、DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

### 1.3 实验模型制备

以单侧输尿管结扎方法造模<sup>[2]</sup>。腹腔注射10%水合氯醛(300 mg/kg)麻醉小鼠, 固定、去毛备皮, 常规消毒后行左侧耻骨上切口, 沿左肾下极寻找到左输尿管, 以4.0号丝线两次结扎, 从中剪断输尿管以防逆行性感染, 分层缝合关闭腹腔。假手术组分离输尿管但不结扎, 随即缝合腹腔。治疗组于造模成功后每隔1日腹腔注射1次IL-18BP(0.1 mg/kg), 共7次, 其余两组腹腔注射等量生理盐水。

### 1.4 标本采集与处理

3组大鼠分别于腹腔注射完成后第3天、第7天和第14天, 腹腔注射10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)后处死大鼠。留取梗阻侧肾组织, 对剖后一半肾组织置于4%多聚甲醛溶液中固定,

常规脱水石蜡包埋, 待做苏木精-伊红(HE)染色及免疫组化染色。另一半肾组织用无菌锡纸包裹置入液氮罐内, 待做Western blot检测。整个实验过程中, 模型组3 d和7 d时各死亡1只大鼠; 治疗组7 d时死亡1只。

### 1.5 肾组织病理学检测

1.5.1 免疫组化染色 取4  $\mu$ m厚的肾组织切片, 常规脱蜡至水, 0.3%过氧化氢孵育30 min, 以阻断内源性过氧化物酶; 0.01M PBS冲洗3次, 每次5 min, 高压抗原修复: 即将切片浸入0.01M柠檬酸盐抗原修复液(pH=6.0)中, 高压3 min, 自然冷却至室温; 0.01M PBS冲洗3次, 每次5 min, 滴加一抗(FKN的工作浓度为1:200), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜; 0.01M PBS冲洗3次, 每次5 min, 滴加生物素标记的二抗, 室温孵育30 min; 0.01M PBS冲洗3次, 每次5 min, DAB显色, 苏木素复染, 中性树胶封片, 光镜观察。PBS代替一抗作为阴性对照。FKN的表达以细胞胞浆或胞核呈现棕黄色颗粒为阳性表达, 每例大鼠肾组织共选取3张切片, 每张切片随机选取6个视野, 采用HPIAS-2000型彩色全自动图像分析系统测定细胞内棕黄色颗粒的平均吸光度值并进行统计分析。

1.5.2 Western blot蛋白印记 取术后新鲜肾组织, 于蛋白裂解液中冰上裂解30 min, 12000 rpm/min离心5 min, 取上清液; 用考马斯亮蓝G250结合法测定蛋白含量; 加入5 $\times$ 上样缓冲液, 置于沸水中加热5 min使蛋白变性; 等量蛋白样本上样, 经10%的SDS-PAGE电泳分离, 电转移至硝酸纤维素膜, 5%脱脂奶粉封闭1~1.5 h, 一抗FKN(1:500)4 $^{\circ}$ C过夜, TBST冲洗3次, 每次10 min, 辣根过氧化物酶标记IgG-HRP(1:5000)室温孵育1~1.5 h, TBST冲洗3次, 每次10 min, 加ECL发光剂, 暗室曝光显影。用TotalLab图像扫描软件对FKN和 $\beta$ -actin蛋白表达条带进行灰度值分析, 计算平均灰度值, 以FKN与 $\beta$ -actin的灰度值比值为参数, 确定FKN蛋白表达的相对水平。每例大鼠肾组织重复完成3次Western blot检测。

### 1.6 统计学分析

应用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用LSD-*t*检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组 HE 染色结果分析

假手术组各时间点肾小管结构正常，肾间质无明显病变。模型组第 3 天，远曲小管扩张，肾间质轻度水肿，肾小管间质区域散在单核细胞、淋巴细胞浸润；第 7 天远曲小管明显扩张，肾间

质明显水肿，管腔内见少量脱落上皮细胞，部分肾小管消失；第 14 天肾小管严重破坏，肾小管、集合管呈囊状扩张，上皮细胞大量坏死，肾间质弥散性淋巴细胞、巨噬细胞浸润。治疗组各时间点肾间质炎性细胞浸润程度较模型组明显减轻。见图 1。

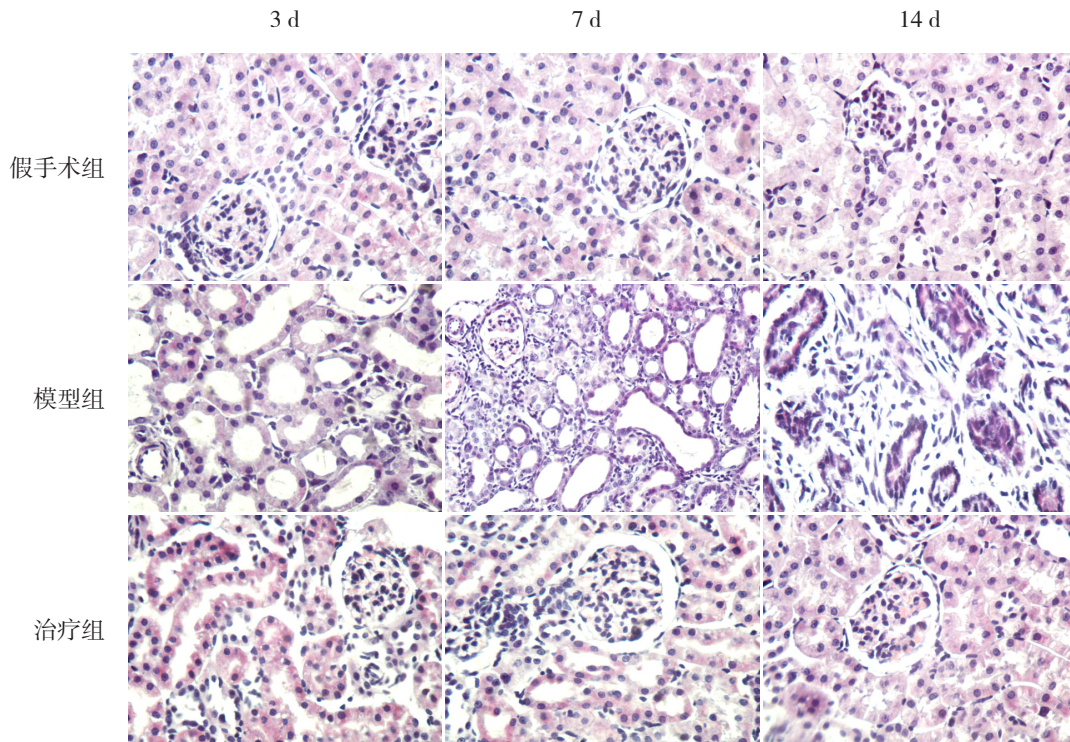


图 1 各组大鼠各时间点肾组织苏木精-伊红染色结果 ( $\times 400$ ) 假手术组各时间点肾小管结构正常，肾间质无明显病变；模型组第 3 天可见远曲小管扩张，肾间质轻度水肿，第 7 天远曲小管明显扩张，肾间质明显水肿，第 7 天肾小管严重破坏，肾间质弥散性淋巴细胞、巨噬细胞浸润；治疗组各时间点肾间质炎性细胞浸润程度较模型组明显减轻。

### 2.2 各组 FKN 表达情况分析

FKN 的表达以细胞胞浆或胞核呈现棕黄色颗粒为阳性表达。模型组大鼠 FKN 主要表达在肾小管上皮细胞和肾间质，肾小球内未见表达；模型组 FKN 在各时间点表达均高于同期假手术组 (均  $P < 0.01$ )，且呈时间依赖性增高，第 14 天 FKN 阳性表达最明显；第 7 天和第 14 天治疗组 FKN 表达较同期模型组均显著降低 (均  $P < 0.01$ )。见图 2~3。

### 2.3 Western blot 定量检测 FKN 蛋白表达

与假手术组比较，不同时间点模型组 FKN 蛋白表达水平均显著增高 (均  $P < 0.01$ )；与模型组比较，不同时间点治疗组 FKN 蛋白表达水平均显著降低 (均  $P < 0.01$ )。见图 4~5。

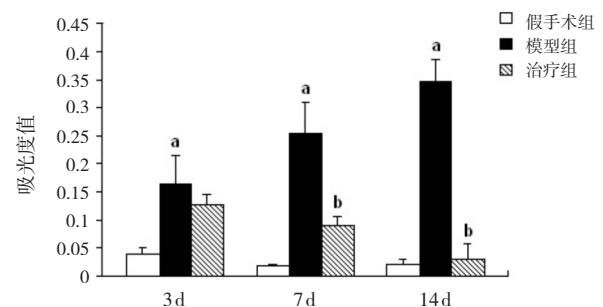


图 2 各组大鼠肾组织 FKN 表达水平比较 注：假手术组各时间点、模型组第 14 天、治疗组第 3 天及第 14 天均有 8 只大鼠参与统计分析；治疗组第 7 天、模型组第 3 天及第 7 天均有 7 只大鼠参与统计分析。a：与对照组比较， $P < 0.01$ ；b：与模型组比较， $P < 0.01$ 。

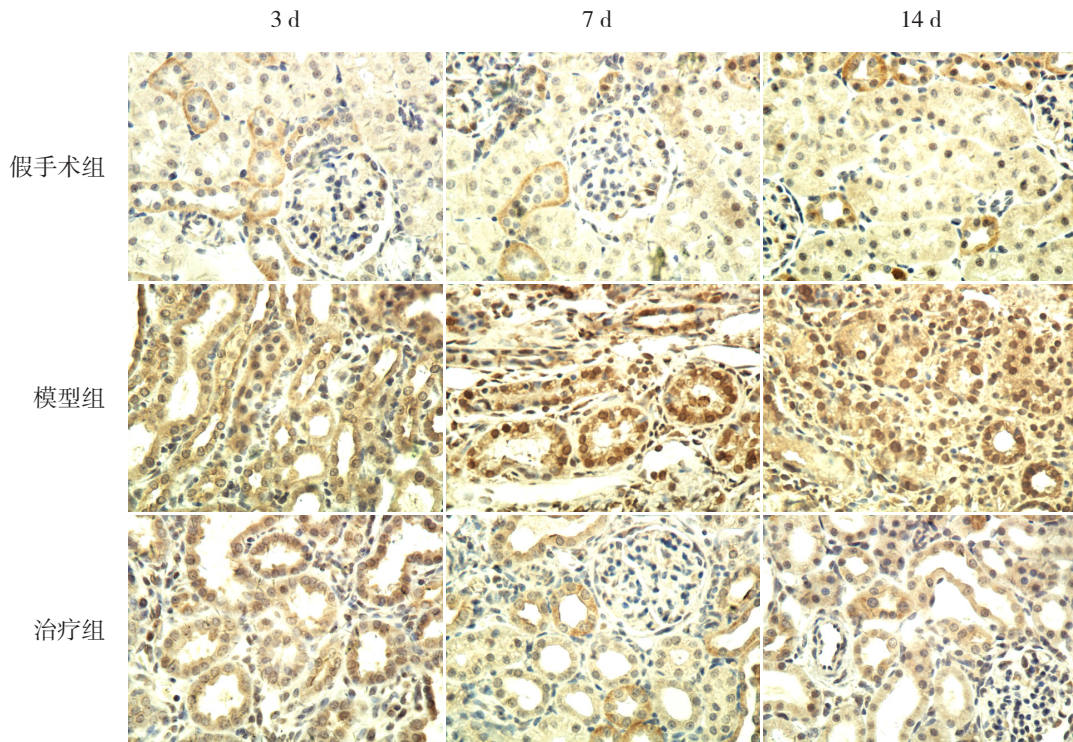


图 3 FKN 在各时间点各组大鼠肾组织中的表达 (DAB 显色,  $\times 400$ ) FKN 表达于肾小管上皮细胞和肾间质, 肾小球内未见表达; 其在模型组各时间点的表达均高于同期假手术组; 治疗组 FKN 表达较同期模型组均显著降低。细胞胞浆或胞核呈现棕黄色颗粒为 FKN 阳性表达。

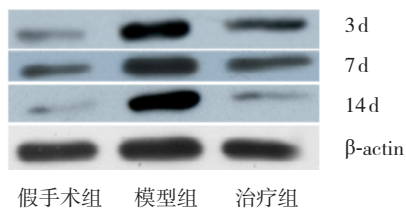


图 4 Western blot 定量检测 3 组大鼠肾组织中 FKN 蛋白表达

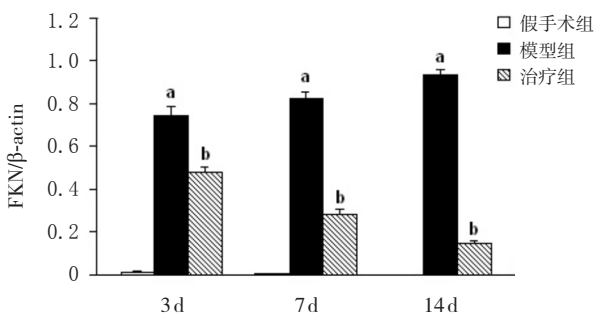


图 5 Western blot 检测各组大鼠肾组织中 FKN 表达水平比较 注: 假手术组各时间点、模型组第 14 天、治疗组第 3 天及第 14 天均有 8 只大鼠参与统计分析; 治疗组第 7 天、模型组第 3 天及第 7 天均有 7 只大鼠参与统计分析。a: 与假手术组比较,  $P < 0.01$ ; b: 与模型组比较,  $P < 0.01$ 。

### 3 讨论

CKD 不可逆进展的最终结果是 ESRD, 其共同的肾脏病理表现均为肾小球逐步硬化, 肾间质进行性纤维化, 最终导致肾脏纤维化。先前研究发现, 在与肾功能的关系比较中, 肾间质纤维化程度比肾小球硬化程度更为紧密, 同时也是肾功能减退和判断临床预后的重要指标。而炎症反应又是肾脏纤维化的起始因素, 炎症细胞的间质浸润并激活趋化因子也是肾间质纤维化的关键环节。

FKN 是近期发现的具有趋化功能的炎性刺激因子, 是 CX3C 亚家族的惟一成员, 以膜结合型和分泌型两种形式存在, 兼具趋化因子和黏附因子功能<sup>[3-4]</sup>。分泌型 FKN 因子对单核细胞、NK 细胞和 T 细胞具有强趋化作用。膜结合型 FKN 因子在血管内皮细胞表面的表达可以被 TNF- $\alpha$ 、IL-21、IFN- $\gamma$  等炎性因子上调, 同时发现, IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  能协同诱导 FKN 的高表达。生理状态下 FKN 未见表达, 仅在表达 CX3CR1 的免疫细胞进入肾组织后, 局部组织产生的炎症因子诱导内皮细胞、肾小管上皮细胞和肾小管系膜细胞表达 FKN, 提示 FKN 是介导肾脏炎性细胞浸润的重要因子。此外也有研究证实糖尿病大鼠肾组织中

FKN的mRNA及其蛋白表达量明显增高,并参与多种肾脏疾病的发生发展,但在肾脏纤维化的相关研究中报道较少。

IL-18又称INF- $\gamma$ 诱导因子,是主要由单核细胞和巨噬细胞分泌的免疫调节因子。强烈的诱导炎性因子聚集作用是其重要特征,参与诱导Th1细胞产生INF- $\gamma$ ,增强巨噬细胞产生TNF- $\alpha$ ,增加NK细胞的细胞毒作用等过程,直接或间接地参与和促进了免疫性肾损伤<sup>[5-6]</sup>。IL-18能通过促进TNF- $\alpha$ 的产生,直接改变肾小球微循环,促使肾小球系膜细胞活化和增殖,而导致肾脏基质膨胀;还可增强Fas-FasL介导的细胞凋亡。也有研究指出,较高浓度的IL-18能够时间-剂量依赖性的促进肾小管上皮细胞凋亡及平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)的高表达,而 $\alpha$ -SMA细胞具有成肌纤维细胞的特性,据此推测IL-18可能促进肾间质纤维化和肾小管萎缩的发生发展。

IL-18BP能特异性结合IL-18,可通过降低INF- $\gamma$ 进而抑制IL-18的生物学活性<sup>[7]</sup>。在急性肾缺血再灌注损伤大鼠的研究中发现外源性的IL-18BP能抑制肾组织中巨噬细胞浸润、炎症因子高表达从而达到保护肾脏的作用<sup>[8]</sup>。近期在以UUO模型所致肾间质纤维化的实验中还证实IL-18BP可减轻梗阻诱导的上皮细胞间充质转分化和肾脏纤维化<sup>[9]</sup>。这就为我们提供这样一条思路,多种致病因素致肾脏损伤后,机体可能通过释放IL-18等化学趋化物,通过TNF- $\alpha$ 、IL-1、INF- $\gamma$ 等多种细胞途径促进下游FKN的高表达,进而趋化更多炎症级联反应的发生,最终导致肾脏纤维化。本课题组以往研究发现IL-18BP可以通过中和IL-18的生物学活性降低FKN水平,对微小病变肾病的治疗具有一定的保护作用<sup>[10]</sup>。而后的研究除了印证上述研究结果以外还发现IL-18BP能抑制IL-18下游炎性因子TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、趋化因子CCL2和CCL5等的高表达<sup>[11]</sup>。故而推测其对肾间质纤维化的病理过程可能也有不同程度影响。

本研究发现,模型组第3天部分肾小管管腔扩张,上皮细胞空泡变性,肾间质炎性细胞浸润、宽度增加;第14天肾小管间质纤维化程度最显著,肾小管结构消失,上皮细胞多数坏死,肾间质弥漫性炎性细胞浸润和成纤维细胞增生。同假手术组比较,模型组第3天肾组织FKN即有表达,第7天时表达显著增加,至第14天时表达最显著。FKN广泛分布于肾间质细胞胞浆,肾小管上皮细胞、血管内皮细胞等部位。说明FKN的表达水平伴随肾间质纤维化程度的加重而呈增加趋势。而

治疗组FKN的表达在各时间点较模型组却显著减少,提示IL-18BP可能通过特异性的拮抗IL-18,减轻FKN在肾血管内皮细胞和肾小管上皮细胞等的高表达,进而抑制下游FKN趋化的多种炎症因子所致的免疫性肾损伤。据此推测0.1 mg/kg的IL-18BP腹腔隔日注射可以抑制FKN的高表达,进而延缓肾间质纤维化的病理生理过程。

总之,FKN在肾脏纤维化过程中发挥着重要作用,深入研究IL-18BP拮抗IL-18进而调节免疫、抗炎、延缓肾脏纤维化的机理可以为临床防治ESRD提供理论和实验基础。然而IL-18BP影响FKN的具体细胞途径和临床用药开发等方面还有待于进一步研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] Koziolok MJ, Muller GA, Zapf A, Patschan D, Schmid H, Cohen CD, et al. Role of CX3C-chemokine CX3C-L/fractalkine expression in a model of slowly progressive renal failure[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(3): 684-698.
- [2] Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 283(5): F861-F875.
- [3] Yang XP, Mattagajasingh S, Su S, Chen G, Cai Z, Fox-Talbot K, et al. Fractalkine upregulates intercellular adhesion molecule-1 in endothelial cells through CX3CR1 and the Jak Stat5 pathway[J]. *Circ Res*, 2007, 9(10): 1001-1008.
- [4] Saederup N, Chan L, Lira SA, Charo IF. Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis[J]. *Circulation*, 2008, 117(13): 1642-1648.
- [5] 常贺,李刚,张乐,邹军,朱铨,金鑫. IL-18, IL-12及相关因子在大鼠实验性自身免疫心肌炎心肌中的表达时程和特征[J]. *免疫学杂志*, 2010, 26(6): 502-506.
- [6] 姜红堃,罗钢,姜红. 白细胞介素18在激素耐药型肾病综合征外周血单个核细胞中的表达及意义[J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11(5): 337-340.
- [7] 王丽敏,亚瑟尔. IL-18BP联合泼尼松治疗阿霉素肾病大鼠的实验研究[J]. *黑龙江医药科学*, 2012, 35(3): 1-3.
- [8] Wang J, Long Q, Zhang W, Chen N. Protective effects of exogenous interleukin 18-binding protein in a rat model of acute renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Shock*, 2012, 37(3): 333-340.
- [9] Bani-Hani AH, Leslie JA, Asanuma H, Dinarello CA, Campbell MT, Meldrum DR, et al. IL-18 neutralization ameliorates obstruction-induced epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis[J]. *Kidney Int*, 2009, 76(5): 500-511.
- [10] 王丽敏,邓李玲,郑婵娟,赵塔娜,邹艳红,李春玉. 白介素-18结合蛋白对阿霉素肾病大鼠Fractalkine表达的影响[J]. *临床儿科杂志*, 2012, 30(7): 666-669.
- [11] Wyburn KR, Chadban SJ, Kwan T. Interleukin-18 binding protein therapy is protective in adriamycin nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 304(1): F68-F76.

(本文编辑:万静)