

· 基础研究 ·

# Raf 激酶抑制蛋白调控 NF- $\kappa$ B 信号通路 在糖尿病肾脏疾病发病中的作用 及药物干预研究

李龙 刘加林 王晓宇 张明霞 樊丰夷 周谊霞

**【摘要】** 目的 通过检测糖尿病肾脏疾病 (DKD) 大鼠肾组织 Raf 激酶抑制蛋白 (RKIP) 与 NF- $\kappa$ B 的表达, 研究利妥昔单抗 (RTX) 对 DKD 大鼠肾组织 RKIP 表达的影响。方法 SD 大鼠按随机数字表法分为正常组、DKD 模型组、RTX 治疗组 (2 周组、4 周组), 各 20 只。常规法检测血糖及 24 h 尿蛋白量。Western 印迹法检测各组 RKIP 的表达。免疫组化观察 RKIP 和 NF- $\kappa$ B 的表达。结果 DKD 模型组血糖及 24 h 尿蛋白升高 (均  $P < 0.01$ ), 大鼠肾小球 NF- $\kappa$ B 表达显著增高 ( $P < 0.01$ ), RKIP 表达降低 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较, RTX 治疗组大鼠 RKIP 表达增高 ( $P < 0.05$ ), 24 h 尿蛋白和肾小球 NF- $\kappa$ B 表达下降 (均  $P < 0.05$ )。DKD 模型组 NF- $\kappa$ B 与 RKIP 表达呈负相关。结论 RKIP 调节 NF- $\kappa$ B 途径可能在 DKD 发生发展中有重要作用。RTX 在 DKD 中可能有一定的治疗作用。

**【关键词】** 糖尿病肾病; NF- $\kappa$ B; 利妥昔单抗; Raf 激酶抑制蛋白

**RKIP regulates NF- $\kappa$ B signaling pathway in the pathogenesis of diabetic nephropathy and drug intervention** LI Long, LIU Jia-lin, WANG Xiao-yu, ZHANG Ming-xia, FAN Feng-yi, ZHOU Yi-xia. Department of Nephrology, Affiliated Hospital, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China

Corresponding author: LIU Jia-lin, Email: ljl@medmail.com.cn

**【Abstract】 Objective** To detect the expression of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) and NF- $\kappa$ B in renal tissue of diabetic kidney disease (DKD) rats model, and to investigate the effect of rituximab (RTX) on the expression of RKIP in the renal tissue of DKD rats. **Methods** SD rats were randomly divided into normal group (N), DKD model group (M) and RTX treatment group (D). Blood glucose and 24-hour urine protein of rats were determined in three groups. RKIP protein and NF- $\kappa$ B protein were determined by immunohistochemistry staining. RKIP protein expression was detected by Western blotting. **Results** Compared with N group, blood glucose, 24-hour urine protein and NF- $\kappa$ B expression in M group increased significantly (all  $P < 0.01$ ), the expression of RKIP in M group decreased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with M group, the expression of RKIP increased significantly in D group ( $P < 0.05$ ), and 24-hour urine protein and NF- $\kappa$ B expression decreased in D group (all  $P < 0.05$ ). NF- $\kappa$ B protein expression was negatively correlated with RKIP expression in M group. **Conclusions** The NF- $\kappa$ B pathway regulated by RKIP plays an important role in the development and pathogenesis of diabetic nephropathy. Rituximab may have a role in treatment of DKD.

**【Key words】** Diabetic nephropathies; NF- $\kappa$ B; Rituximab; Raf kinase inhibitor protein

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2012.03.011

基金项目: 贵州省省长基金 [黔省专合字 (2010) 80 号]

作者单位: 550004 贵阳医学院附属医院肾内科

通信作者: 刘加林, Email: ljl@medmail.com.cn

随着人们生活水平的提高,全球糖尿病(DM)患者已超过 1.7 亿<sup>[1]</sup>,无论是 1 型还是 2 型 DM,大约 30%~40% 的患者可出现肾脏损害,即糖尿病肾脏疾病(DKD),预后极为不良。目前 DKD 的发病机制尚未完全明确,多认为与细胞内信号转导、免疫反应、代谢紊乱及肾素-血管紧张素系统(RAS)紊乱有关<sup>[2]</sup>。

NF- $\kappa$ B 在机体的免疫应答反应和细胞生长中发挥重要作用。我们以前的研究提示 NF- $\kappa$ B 在 DKD 的发生发展中有重要作用,抑制 NF- $\kappa$ B 的活化可延缓 DKD 的发展<sup>[3]</sup>。新的转移抑制因子 Raf 激酶抑制蛋白(Raf kinase inhibitor protein, RKIP)在人体的多种组织和不同类型细胞中表达,参与对细胞内 G 蛋白耦联受体信号通路和 NF- $\kappa$ B 信号通路的调控,目前在肿瘤转移机制中的研究较多。国外文献报道,RKIP 可能在蛋白激酶 C(PKC)依赖的 DKD 发病途径中扮演重要角色<sup>[4]</sup>。单克隆抗体利妥昔单抗(RTX)现已用于治疗自身免疫性血小板减少性紫癜、系统性红斑狼疮及类风湿性关节炎等免疫相关疾病<sup>[5]</sup>。Jazirehi 等<sup>[6]</sup>研究表明,利妥昔单抗应用于非霍奇金淋巴瘤(NHL)细胞系,能明显促进细胞 RKIP 的表达,增加 NHL 细胞对药物的敏感性。经检索,目前国内文献尚未见到 DKD 中关于 RKIP 的表达和其调控 NF- $\kappa$ B 及利妥昔单抗药物干预治疗的相关报道。本研究旨在探讨 DKD 肾组织中 RKIP 的表达及与 NF- $\kappa$ B 表达的相关性,并进行 RTX 药物干预,观察 RTX 是否有延缓 DKD 发展的作用。

## 材料和方法

1. 大鼠糖尿病模型及药物干预:6~8 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 60 只,称质量后按随机数字表法分为正常组(N 组)、DKD 模型组(M 组)、RTX 治疗组(D 组),各 20 只。M 组、D 组予腹腔注射链脲菌素(STZ)联合完全弗氏佐剂(CFA),并予高脂饲料喂养制作 DKD 模型。4 周时以连续 2 次随机血糖 $>16.65$  mmol/L 为 DM 造模成功<sup>[7]</sup>。14 周后以 24 h 尿蛋白量 $\geq 30$  mg 或超过 N 组尿蛋白的 10 倍,定义为 DKD 模型成功<sup>[8]</sup>。将 D 组大鼠予尾静脉注射 RTX 药物 58 mg/kg,每周 1 次,生理盐水稀释浓度为 1 g/L,每周 1 次,共给药 4 次。

2. 标本采集:DM 造模成功后每周监测大鼠

的外周血血糖,治疗组予以 RTX 治疗后 2 周(T1 期,16 周)、4 周(T2 期,18 周)处死各组大鼠。分别收集各组尿液检测 24 h 尿蛋白量,解剖大鼠右肾提取组织蛋白行 Western 印迹法检测,左侧肾脏置于 10% 中性缓冲甲醛液固定后行 HE、PAS 染色及免疫组化检测。

3. 免疫组化法检查 RKIP、NF- $\kappa$ B 蛋白的表达:采用 PV 试剂盒检测肾组织 RKIP、NF- $\kappa$ B 蛋白的表达,方法参考文献<sup>[3]</sup>。兔抗 NF- $\kappa$ B(P65)、兔抗 RKIP 均购自美国 Santa Cruz。结果采用 HPIAS-2000 型高清晰度彩色病理图像分析系统进行分析。每个标本各取 4 张切片,每张切片随机计数 3 个高倍镜视野,每个视野计数 100 个细胞,求其平均阳性率。阳性细胞百分率=[阳性细胞数/(阳性细胞数+阴性细胞数)] $\times 100\%$ ,比较各组的阳性细胞率<sup>[9]</sup>。

4. Western 印迹法检测肾小球中 RKIP 蛋白的表达:4 $^{\circ}$ C 提取肾组织总蛋白,取 60  $\mu$ g 上样。经电泳、转膜、封闭后,加兔抗 RKIP,次日加辣根酶标记山羊抗兔 IgG(北京中杉)37 $^{\circ}$ C 孵育,TBST 洗膜,ECL 显色后曝光。实验以 GAPDH 蛋白表达作为参照,将曝光后胶片拍照,用 Bio-Rad 的 1D 凝胶定量软件 Quantity One 4.52,计算 RKIP/GAPDH 值代表蛋白表达强度。

5. 统计学方法:所有计量数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,正态分布计量资料两两比较采用 *t* 检验,3 组间比较采用单因素方差分析,方差齐时用 SNK 检验,方差不齐用 Tamhane's 检验,相关分析采用 Person 相关分析。所有统计分析均采用 SPSS 18.0 统计软件完成。

## 结 果

1. 一般指标:与 N 比较,M 组血糖及 24 h 时尿蛋白明显增高(均  $P < 0.01$ );与 M 组比较,D 组血糖无明显异常,24 h 尿蛋白量明显下降( $P < 0.05$ ),见表 1。

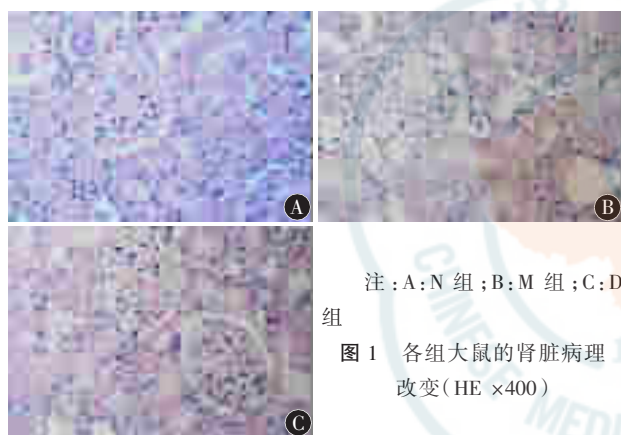
2. 各组大鼠肾脏病理学改变:M 组大鼠 T1 期表现为肾小球肥大,肾小管空泡变性、扩张,肾小球基底膜普遍增厚,系膜基质大量增加,肾小动脉增厚伴玻璃样变甚至闭塞,肾间质大量炎性细胞浸润。D 组大鼠肾小球毛细血管基底膜增厚,上述病变有不同程度的改善,肾小球体积稍有增加,未见有肾小管空泡样变,肾小球毛细血

表 1 各组大鼠血糖和 24 h 尿蛋白量( $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间	鼠数	血糖(mmol/L)	24 h 尿蛋白量(mg)
N 组	T1	10	5.51±0.55	8.66±3.22
	T2	10	5.59±0.51	9.63±1.03
M 组	T1	10	23.17±2.51 <sup>a</sup>	59.75±15.38 <sup>a</sup>
	T2	10	23.98±2.05 <sup>a</sup>	61.60±11.38 <sup>a</sup>
D 组	T1	10	22.83±1.69 <sup>a</sup>	52.14±9.49 <sup>ab</sup>
	T2	10	23.43±2.32 <sup>a</sup>	50.10±15.1 <sup>ab</sup>

注:与 N 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 M 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

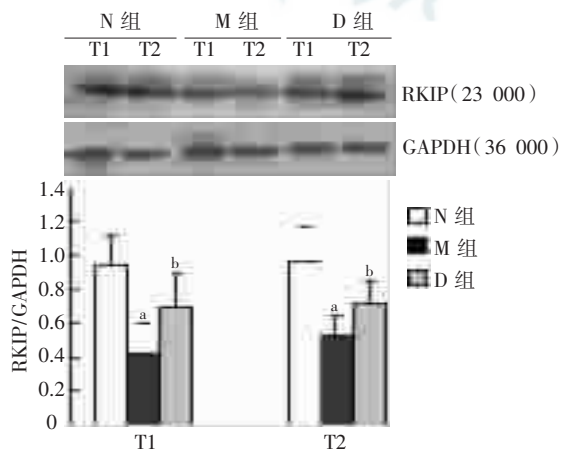
管基底膜轻度增厚及系膜基质轻度增多,间质有少量炎性细胞浸润,见图 1。



注:A:N组;B:M组;C:D组

图 1 各组大鼠的肾脏病理改变(HE ×400)

3. 各组大鼠肾组织中 RKIP 蛋白的表达: Western 印迹结果显示, N 组 T1、T2 期大鼠肾组织 RKIP 有一定量表达, M 组、D 组大鼠肾组织 RKIP 蛋白表达水平明显下降;与 M 组比较, D 组 RKIP 表达上升( $P < 0.05$ ),见图 2。RKIP 阳性部



注:与 N 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 M 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 2 各组 RKIP 蛋白的表达(Western 印迹)

位主要在细胞质和胞质膜部位,部分出现细胞核着色,呈棕黄色颗粒。N 组 T1 期、T2 期肾组织细胞质中 RKIP 表达较多,呈黄褐色;M 组肾小球、肾小管 RKIP 表达明显减少,且 T2 期较 T1 期 RKIP 的表达减少;而 D 组肾组织 RKIP 的表达均较同期 M 组有所升高,见图 3。

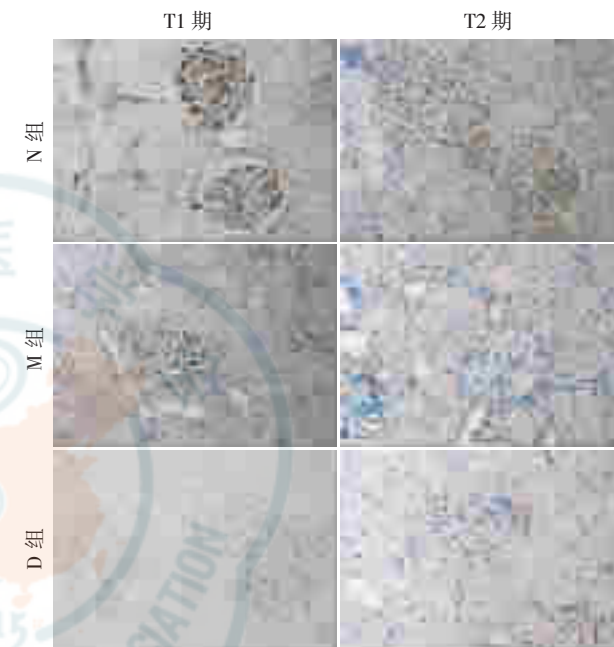


图 3 各组大鼠肾组织 RKIP 蛋白的表达(免疫组化 ×400)

4. 各组大鼠肾组织中 NF-κB 蛋白的表达: N 组肾组织基本未见 NF-κB 棕黄色阳性表达;M 组肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞和肾间质浸润的淋巴、单核巨噬细胞胞质棕黄色 NF-κB 表达明显升高,且 T2 期表达较 T1 期表达增多;16 周、18 周时, D 组 NF-κB 的表达均较同期 M 组有所下降( $P < 0.05$ )。见图 4,表 2。

表 2 T1、T2 期各组大鼠 NF-κB 阳性细胞率比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间	鼠数	NF-κB 阳性细胞率(%)
N 组	T1	10	6.30±1.49
	T2	10	6.40±1.71
M 组	T1	10	40.75±3.57 <sup>ab</sup>
	T2	10	46.22±4.27 <sup>a</sup>
D 组	T1	10	33.30±2.66 <sup>ab</sup>
	T2	10	34.14±3.43 <sup>ab</sup>

注:与 N 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 M 组 T2 期比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

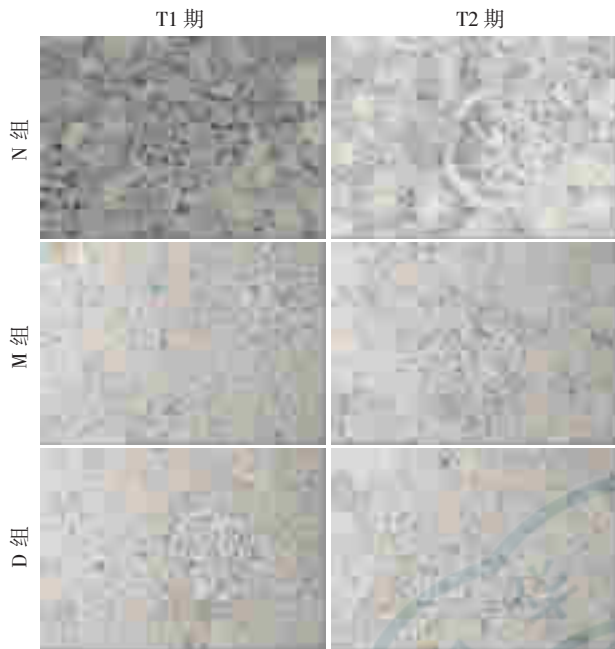


图 4 各组大鼠肾组织 NF- $\kappa$ B 蛋白的表达(免疫组化  $\times 400$ )

5. 大鼠肾组织 NF- $\kappa$ B 与 RKIP 表达的相关性: M 组 T1、T2 期 NF- $\kappa$ B 与 RKIP 存在负相关关系 (T1 期  $r = -0.71, P < 0.05$ ; T2 期  $r = -0.67, P < 0.05$ )。

## 讨 论

DKD 是 DM 重要的慢性并发症,是终末肾衰竭的主要原因之一。在代谢紊乱与血流动力学机制基础上,炎症反应机制是 DKD 持续发展的关键因素。最近有研究提出 DKD 是一种由代谢紊乱引起的炎症反应性疾病,炎症反应可能是其进展的基础<sup>[10]</sup>。

近年的研究提示 RKIP 在肝纤维化及肿瘤相关疾病中的表达下降,在前列腺癌、肺癌、肝癌、鼻咽癌、甲状腺肿瘤、子宫内膜癌等肿瘤研究中均有相关报道,发现 RKIP 的表达在正常组织中高于肿瘤组织,在肿瘤组织中原发灶高于转移灶, RKIP 低表达或缺失时,肿瘤侵袭性强,预后差,故认为 RKIP 可能是一个肿瘤转移抑制基因<sup>[11-12]</sup>。据报道在胆总管结扎大鼠肝纤维化中发现 RKIP 的蛋白表达下降<sup>[13]</sup>。

本研究发现 N 组 T1 期、T2 期肾小球和肾小管细胞质中 RKIP 表达较多, M 组肾小球、肾小管 RKIP 表达明显减少,且 T2 期较 T1 期 RKIP 的表达减少,出现典型 DKD 肾脏病理改变,如肾小球

肥大,肾小管空泡变性、扩张,肾小球基底膜普遍增厚,系膜基质大量增加,肾小动脉增厚伴玻璃样变甚至闭塞,肾间质大量炎性细胞浸润。我们的研究还发现 M 组肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞和肾间质浸润的淋巴、单核巨噬细胞胞质 NF- $\kappa$ B 表达明显升高,且 T2 期表达较 T1 期表达增多,提示 NF- $\kappa$ B 在 DKD 发生发展中有重要作用,与我们以前的研究结果相似<sup>[3]</sup>。RKIP 与 NF- $\kappa$ B 的相关性分析结果显示, RKIP 与 NF- $\kappa$ B 呈负相关。RKIP 调控 NF- $\kappa$ B 在 DKD 发生发展的机制为 RKIP 能与 NF- $\kappa$ B 激活途径中的 4 个激酶 NIK (NF- $\kappa$ B inducing kinase)、TAK1 (TGF- $\beta$  activated kinase1)、IKK $\alpha$  (I $\kappa$ B kinase) 和 IKK $\beta$  (I- $\kappa$ B kinase $\beta$ ) 相互作用,从而抑制 NF- $\kappa$ B 的激活。DKD 时 RKIP 的表达降低, NF- $\kappa$ B 信号通路激活,使抑制 NF- $\kappa$ B 活化的 I $\kappa$ B- $\alpha$  特定位点上的丝氨酸残基发生磷酸化,释放出 NF- $\kappa$ B; NF- $\kappa$ B 进入细胞核后,与特定的 DNA 序列结合,参与众多基因的转录子调节并且产生种种生物学活性<sup>[14]</sup>。因此, RKIP 的表达降低及 NF- $\kappa$ B 信号通路途径的激活,促进了 DKD 的进展。

利妥昔单抗是第 1 个被美国 FDA 批准用于临床治疗的人鼠嵌合型单克隆抗体,现已作为弥漫大 B 细胞淋巴瘤的一线治疗药物<sup>[15]</sup>。最近国外有一组关于糖尿病的临床实验发现, B 淋巴细胞免疫参与 T 淋巴细胞免疫介导的糖尿病发病,进一步提出 B 淋巴细胞可能参与糖尿病的发病机制,选用利妥昔单抗可选择性消耗 B 淋巴细胞,证实其在糖尿病发展中可能发挥重要作用<sup>[16]</sup>。利妥昔单抗可能有部分保护胰岛  $\beta$  细胞的功能,同时也为 B 淋巴细胞在糖尿病的发病机制研究中开辟了新的途径<sup>[15]</sup>。利妥昔单抗治疗组大鼠 RKIP 表达上升, 24 h 尿蛋白和肾小球内 NF- $\kappa$ B 表达下降, DKD 肾脏病理改变减轻,但经检索,至今国内外尚未见利妥昔单抗应用于 DKD 的实验报道。

本研究提示 RKIP 调节 NF- $\kappa$ B 信号途径可能参与 DKD 免疫炎症反应发病机制, RKIP 的表达异常可能与 DKD 进展相关。利妥昔单抗在 DKD 中可能有一定的治疗作用,但尚需要进一步研究探索。

## 参 考 文 献

- [1] 杨丽,梅长林. 解读美国糖尿病及慢性肾脏病临床实践

- 指南. 中华肾脏病杂志, 2007, 23: 681-684.
- [2] Mora C, Navarro JF. The role of inflammation as pathogenic factor in the development of renal disease in diabetes. *Curr Diab Rep*, 2005, 5: 399-401.
- [3] 李龙, 杨明正, 周忠启, 等. 阿托伐他汀对糖尿病大鼠肾脏保护作用及其机制探讨. *中国病理生理杂志*, 2006, 22: 2059-2061.
- [4] Bemier I, Tresca JP, Jolles P. Ligand-binding studies with a 23kDa protein purified from bovine brain cytosol. *Biochim Biophys Acta*, 1986, 871: 19-23.
- [5] 朱碧涛, 黄建萍. 利妥昔单抗治疗难治性肾病研究进展. *中华儿科杂志*, 2009, 47: 845-847.
- [6] Jazirehi AR, Vega MI, Chatterjee D, et al. Inhibition of the Raf-MEK 1/2-ERK1/2 signaling pathway. Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by rituximab. *Cancer Res*, 2004, 64: 7117-7126.
- [7] 原军英. 链脲佐菌素诱导大鼠糖尿病肾脏疾病模型研究进展. *山西医药杂志*, 2009, 38: 66-68.
- [8] Brey MD, Bottinger E, Brosius FC, et al. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16: 27-45.
- [9] 于萍, 步宏, 王华, 等. 免疫组化结果的图像分析与人工计数方法的对比研究. *生物医学工程杂志*, 2003, 20: 288-290.
- [10] 苏毅. 糖尿病肾脏疾病发病机制研究进展. *中国实用医药*, 2009, 4: 231-234.
- [11] Zeng L, Imamoto A, Rosner MR. Raf kinase inhibitory protein (RKIP): a physiological regulator and future therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*, 2008, 12: 1275-1287.
- [12] Dang-Garimella S, Yun J, Eves EM, et al. Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signaling cascade involving LIN28 and let-7. *EMBO J*, 2009, 28: 347-358.
- [13] 马俊骥, 姜慧卿, 李芳芳等. RKIP 在胆总管结扎肝纤维化大鼠肝脏组织的表达. *中国老年学杂志*, 2008, 10: 1998-2000.
- [14] Karin M, Cao Y, Greten FR, et al. NF- $\kappa$ B in cancer: From innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2: 301-310.
- [15] 吴桂英, 项颖. 利妥昔单抗治疗血液系统疾病的研究进展. *重庆医学*, 2010, 39: 113-114.
- [16] Mark D, Pescovitz MD, Carla J, et al. Rituximab, B-lymphocyte depletion and preservation of beta-cell function. *N Engl J Med*, 2009, 11: 2143-2152.

(收稿日期: 2011-06-26)

(本文编辑: 杨克魁)

## 经验交流 ·

### 凝血酶成功封堵血液透析患者左侧股动脉假性动脉瘤

李胜开 蒋甘孺 尹忠诚 郝湛军 卓晓英

患者男, 36 岁, 1 周前在外院血液透析后于左侧腹股沟区穿刺处出现肿块, 约鸡蛋大小, 渐增大, 疼痛, 行走受限, 当地医院彩超示“左侧股总动脉假性动脉瘤”, 为进一步治疗于 2011 年 11 月 12 日入我科。查体: 左腹股沟区肿胀, 可见 15 cm×10 cm 瘀斑, 压痛明显, 可闻及血管杂音, 余无特殊。血压 160/120 mm Hg。辅助检查: Hb 105 g/L, Plt 160×10<sup>9</sup>/L, Scr 1409  $\mu$ mol/L, Alb 45.3 g/L。CT: 头颅腔隙性脑梗死, 胸部无异常。心脏彩超: 左室心肌肥厚, 左房左室增大, 左心功能差 (EF 42%), 微量心包积液。左股动脉 CTA: 符合左股动脉起始处假性动脉瘤。入院后常规抗感染, 降血压, 无肝素透析 1 次。于 14 日处理假性动

脉瘤。患者平卧位, 常规消毒铺孔巾, 在彩超引导下, 以 5 ml 注射器抽取生理盐水稀释的 1000 U 凝血酶溶液, 徒手进针至假性动脉瘤内, 向彩色多普勒显示的瘘口处分次少量注射凝血酶溶液, 直至瘤内未见血流信号。术后患者足背动脉搏动与术前相比无明显变化。16 日彩超: 左侧股动脉前方探及不均质回声包块, 约 3.9 cm×2.5 cm, 界清, 无血流信号, 左侧下肢动脉血流畅通, 股动脉流速 87 cm/s。

**讨论** 血液透析时, 股静脉穿刺常见并发症为出血、感染, 误穿股动脉形成假性动脉瘤并非罕见。假性动脉瘤治疗可选介入放支架, 但我们考虑患者下肢功能的恢复, 采用凝血酶一次成功封堵, 既为患者节省大笔费用, 又保证患者下肢行走功能的恢复。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2012.03.012

作者单位: 221002 江苏省徐州医学院附属医院肾内科 (李胜开、蒋甘孺、尹忠诚), 心脏内科 (郝湛军), 彩超室 (卓晓英)

(收稿日期: 2011-11-29)

(本文编辑: 李耀荣)