

· 论 著 ·

NALP3/ASC/caspase-1 在局灶节段性肾小球硬化肾组织中的表达变化*

张媛媛, 侯卫平, 曹雪娇, 袁发焕[△]

(第三军医大学新桥医院肾内科/全军肾脏病中心/重庆市肾脏病研究所/

国家中医药管理局重点专科, 重庆 400037)

摘要:目的 研究局灶节段性肾小球硬化(FSGS)肾病综合征(NS)患者肾组织中 NALP3 炎性复合体的表达变化与肾小管间质病理损害程度、炎症因子表达及临床生化指标之间的关系。方法 应用免疫组化检测 NS 患者正常肾组织(对照组)及 FSGS 患者肾组织(FSGS 组)肾小管上皮细胞 NALP3/ASC/caspase-1 及其下游效应分子 IL-1 β 、IL-18 表达变化,对肾小管间质损伤程度进行评分并检测肾小管间质活化巨噬细胞 F4/80 情况,收集患者血肌酐、血尿素、血浆总蛋白、清蛋白、24 h 尿蛋白等指标,计算肾小球滤过率(eGFR)。将 NALP3/ASC/caspase-1 和 IL-1 β 、IL-18 表达情况分别与肾小管间质损伤程度及各生化指标进行相关性分析。结果 FSGS 组患者肾小管上皮细胞 NALP3/ASC/caspase-1 及下游效应分子 IL-1 β 、IL-18 的表达较对照组显著增高($P < 0.01$);NALP3/ASC/caspase-1 表达强度与 IL-1 β 、IL-18 呈正相关($P < 0.01$);NALP3/ASC/caspase-1 和 IL-1 β 、IL-18 的表达与肾小管间质损伤程度及 F4/80 的表达强度呈正相关($P < 0.01$),与 24 h 尿蛋白量、血肌酐浓度呈正相关($P < 0.05$),与 eGFR 呈负相关($P < 0.05$),与尿素、血浆总蛋白、清蛋白浓度无明显相关性。结论 NALP3 炎性复合体通过激活 IL-1 β 、IL-18 等下游炎症因子,参与 FSGS 的发病机制,其表达程度越高、肾组织病变程度越重,是否能作为 FSGS 预后的预警指标,还需进一步的临床验证。

关键词:肾小球硬化症,局灶节段性;NALP3 炎性复合体;白细胞介素 1 β ;白细胞介素 18

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.03.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)03-0264-04

Expression change of NALP3/ASC/caspase-1 in renal tissues of FSGS*

Zhang Yuanyuan, Hou Weiping, Cao Xuejiao, Yuan Fahuan[△]

(Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University/Kidney Disease Center of PLA/Kidney Disease Research Institution/Important Special Department, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the expression change of renal NLR family pyrin domain containing-3 protein(NALP3) inflammasome in the nephrotic syndrome(NS) patients with focal segmental glomerulosclerosis(FSGS) and its relation with the tubulointerstitial pathogenic injury degree, expression of inflammatory factors and clinical biochemical indexes. Methods Immunohistochemistry was used to detect the expressions of NALP3/ASC/caspase-1 and their downstream effector molecule IL-1 β , IL-18 in renal tubular epithelial cells. The tubulointerstitial injury score and the activated macrophages F4/80 in renal interstitium of the FSGS patients and NS patients were evaluated. The serum creatinine, urea, total protein, albumin, 24 h urine protein and estimated glomerular filtration rate(eGFR) were observed. The correlation of tubulointerstitial injury with NALP3/ASC/caspase-1, IL-1 β , IL-18 were respectively analyzed. Results The expression of NALP3/ASC/caspase-1, IL-1 β , IL-18 in the renal tissue of the FSGS patients was significantly increased compared with that in the control group($P < 0.01$). NALP3/ASC/caspase-1 expression was positively correlated with the expression of IL-1 β , IL-18($P < 0.01$). NALP3/ASC/caspase-1, IL-1 β , IL-18 expression was positively correlated with renal tubulointerstitial injury and the F4/80 expression intensity($P < 0.01$). NALP3/ASC/caspase-1, IL-1 β , IL-18 was significantly positively correlated with 24 h urine protein and Scr, and negatively correlated with the eGFR($P < 0.05$), but had no obvious correlation with plasma urea, plasma total protein and albumin concentrations. Conclusion The NALP3 inflammasome might participate in the pathogenic mechanism of FSGS through the activation of its downstream inflammatory factor of IL-1 β , IL-18, the more higher its expression degree, the more severe the renal tissue injury, whether which could be served as the warning index needs the further clinical verification.

Key words: glomerulosclerosis, focal segmental; NALP3 inflammasome; interleukin-1 beta; interleukin-18

肾病综合征(nephrotic syndrome, NS)是由多种不同病理类型的肾小球疾病所引起,临床上表现为大量蛋白尿、低蛋白血症、高脂血症和水肿,是肾脏疾病最常见的综合征之一,长期持续发展将致肾功能障碍。局灶节段性肾小球硬化(focal segmental glomerulosclerosis, FSGS)为肾病综合征的一种常见病

理类型,同时伴有相应的肾小管间质急、慢性炎症病变为其显著的病理特征,大约 30%~50% FSGS 患者在 5~20 年内发展为终末期肾病^[1]。通过阿霉素诱导的 FSGS 动物模型实验发现,肾组织中炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18 在的表达显著升高,并与肾组织病理损害程度和肾功能血生化指标密切相

关^[2-3]。在 NS 患者尿液中发现 IL-1 β 、IL-18 均有升高^[4-5]。然而在 FSGS 患者肾组织中 IL-1 β 、IL-18 的表达情况以及是通过何种通路激活目前尚不清楚。目前研究资料提示,上游 NLR NALP3 炎性复合体是激活 IL-1 β 、IL-18 的重要通路^[6]。NALP3 炎性复合体是 NLRs 炎性体家族成员之一,主要表达于抗原递呈细胞发挥启动炎性体装配的作用。NALP3 炎性复合体由核心蛋白 NALP3、衔接蛋白 ASC、效应蛋白 caspase-1 以及 Cardinal 组成的多蛋白复合体。当危险信号作用于靶细胞,NALP3 可以通过激活 ASC 和 caspase-1,剪切 IL-1 家族成员前体成为具有活性的促炎症细胞因子 IL-1 β 、IL-18,从而放大病变微环境炎症瀑布效应^[7-8]。因此推测,NALP3 信号通路在 FSGS 患者肾小管间质损害中发挥重要作用。本研究通过临床收集 FSGS 患者肾组织标本,观察肾组织 NALP3 炎性复合体和细胞炎性因子 IL-1 β 、IL-18 的表达变化情况,结合肾小管间质病理损害程度、F4/80 的表达变化和临床生化检测结果,探讨 NALP3 炎性复合体在 FSGS 中表达及作用,从而进一步揭示 FSGS 的发病机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 依据 NS 诊断标准,选取 2011 年 3 月至 2013 年 3 月本院肾内科收治的临床诊断为 NS 的患者 42 例,经肾穿刺活检术及病理学检查明确诊断为 FSGS 26 例(FSGS 组),其中男 16 例,女 10 例,平均年龄(39 \pm 8)岁;对照组 16 例,其中男 10 例,女 6 例,平均年龄(41 \pm 10)岁。对照组肾组织标本均取自肾错构瘤患者肾切除远离错构瘤部位的肾组织,经光镜检查均证实为正常的肾组织。收集患者治疗前各生化指标:24 h 尿蛋白定量、血肌酐、血尿素、血浆总蛋白、血浆清蛋白。计算肾小球滤过率(eGFR), $eGFR [mL / (min \cdot 1.73 m^2)] = 186 \times SCr^{-1.154} \times 年龄^{-0.203} \times 0.742(女) \times 1.233(中国)$ ^[9]。

1.2 肾小管间质病理分级情况 参照肾小管间质损伤(tubulointerstitial damage, TID)评分的方法,对 FSGS 肾小管间质的病变进行半定量评分,根据光镜下肾小管变性、坏死,肾小管萎缩,间质炎症细胞浸润及间质纤维化 4 个指标作为评分依据,按照病变范围及严重程度分为 4 个等级:0 分,无肾小管和肾间质病变;1 分,轻度病变(小于总面积的 25%);2 分,中度病变(占总面积的 25%~50%);3 分,重度病变(大于总面积的 50%)^[10]。每张切片在低倍视野下($\times 100$ 倍)随机选取 10 个视野,取其平均值。上述结果分析均采用盲法进行,由 2 名与本研究无关病理专业人员进行评定。

1.3 主要试剂 兔抗人 NALP3 抗体购于美国 Millipore 公司,ASC 抗体购于美国 LifeSpan Biosciences 公司,caspase-1、IL-1 β 、IL-18、F4/80 抗体均购美国 Abcam 公司。抗小鼠或兔即用型非生物素免疫组化 EliVisionTM super 检测试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司,封闭用正常山羊血清工作液、显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术公司。

1.4 肾组织切片 NALP3、ASC、caspase-1、IL-1 β 、IL-18、F4/80 的表达检测 肾组织经常规石蜡包埋,切 2 μ m 厚切片,经常规脱蜡、水洗后,行微波抗原修复,3% H₂O₂ 室温 15 min 消除内源性过氧化物酶后,分别滴加:兔抗人 NALP3 多克隆抗体(1:1 000)、兔抗人 caspase-1 多克隆抗体(1:50)、兔抗人 ASC 多克隆抗体(1:200)、兔抗人 IL-1 β 多克隆抗体(1:200)、兔抗人 IL-18 多克隆抗体(1:200),大鼠抗人 F4/80 单克隆抗体(1:50),4 $^{\circ}$ C 冰箱内过夜,0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后加入二抗工作液,在光镜下控制 DAB 溶液染

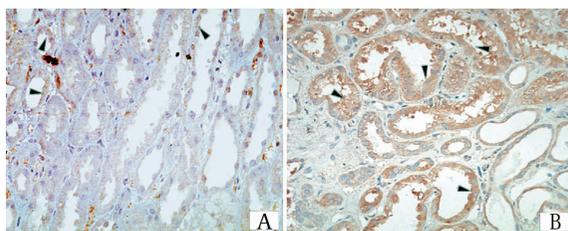
色,苏木素复染,水洗脱水、透明后中性树脂胶封片,阴性对照以 PBS 代替一抗,其他操作同前。

采用 LEICA 光学显微镜(400 \times)观察采集图像。每个切片随机测定 5 个视野,应用 Image Pro Plus 图像分析软件测量每一视野中阳性染色区域的积分光密度值(IOD)与测量区域的面积(area),计算平均光密度(mean density)=(IOD SUM)/area 对免疫组化染色进行半定量分析。

1.5 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行独立样本 *t* 检验,相关性检验采用 Pearson 相关分析进行比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

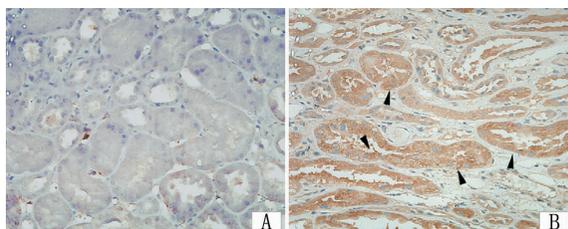
2 结果

2.1 两组患者肾组织 NALP3/ASC/caspase-1、IL-1 β 、IL-18 的表达变化及相关性分析 免疫组化结果显示,对照组肾小管上皮细胞 NALP3 有少量表达,ASC、caspase-1、IL-1 β 、IL-18 不表达,在 FSGS 组中,NALP3、ASC、caspase-1、IL-1 β 、IL-18 在肾小管上皮细胞中表达明显增强,免疫组化染色呈棕黄色,主要表达于肾小管上皮细胞的细胞质,细胞核呈阴性,见图 1~5。通过 Pearson 相关分析显示,NALP3/ASC/caspase-1 与 IL-1 β 、IL-18 的表达均呈正相关,见表 1。



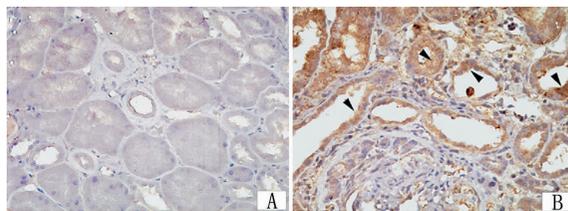
A: 对照组; B: FSGS 组; 箭头所指为表示阳性表达。

图 1 两组患者肾小管上皮细胞 NALP3 的表达变化($\times 400$)



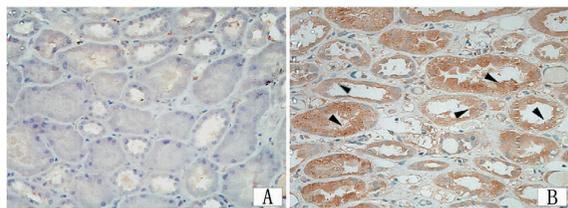
A: 对照组; B: FSGS 组; 箭头所指为表示阳性表达。

图 2 两组患者肾小管上皮细胞 ASC 的表达变化($\times 400$)



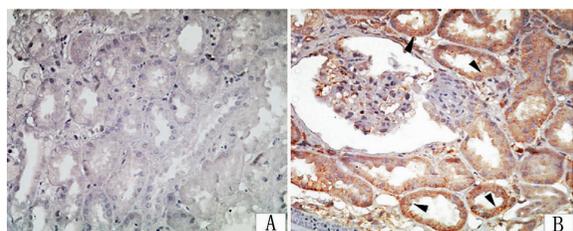
A: 对照组; B: FSGS 组; 箭头所指为表示阳性表达。

图 3 两组患者肾小管上皮细胞 caspase-1 的表达变化($\times 400$)



A: 对照组; B: FSGS 组; 箭头所指为表示阳性表达。

图 4 两组患者肾小管上皮细胞 IL-1 β 的表达变化($\times 400$)



A:对照组;B:FSGS组;箭头所指为表示阳性表达。

图 5 两组患者肾小管上皮细胞 IL-18 的表达变化(×400)

表 1 NALP3/ASC/caspase-1、IL-1β、IL-18 表达的相关性

指标	NALP3		ASC		Caspase-1	
	r	P	r	P	r	P
IL-1β	0.596	<0.01	0.525	<0.01	0.758	<0.01
IL-18	0.550	<0.01	0.622	<0.01	0.772	<0.01

表 2 肾小管间质损伤评分比较

组别	n	TID 评分
对照组	16	0.44±0.63
FSGS 组	26	1.62±0.75 ^a

^a:P<0.01,与对照组比较。

2.2 两组患者肾间质病理评分及巨噬细胞检测 与对照组相比, FSGS 组患者肾小管间质损伤评分差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 NALP3/ASC/caspase-1、IL-1β、IL-18 与肾小管间质评分及 F4/80 的相关性

指标	NALP3		ASC		Caspase-1		IL-1β		IL-18	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
TID 评分	0.617	<0.01	0.536	<0.01	0.799	<0.01	0.760	<0.01	0.631	<0.01
F4/80	0.520	<0.01	0.549	<0.01	0.561	<0.01	0.420	<0.05	0.669	<0.01

表 4 两组患者各临床生化指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	尿蛋白(g/d)	血肌酐($\mu\text{mol/L}$)	尿素(mmol/L)	eGFR[mL/(min/1.73 m ²)]	血浆总蛋白(g/L)	血浆清蛋白(g/L)
对照组	16	0.03±0.038	52.70±4.52	3.67±0.64	126.72±23.35	74.96±2.93	44.54±2.66
FSGS 组	26	6.71±3.41 ^a	86.98±32.27 ^a	6.72±2.59 ^a	72.54±35.76 ^a	50.60±4.99 ^a	26.44±3.92 ^a

^a:P<0.01,与对照组比较。

表 5 NALP3、caspase-1、IL-1β、IL-18 与肾小管间质损伤及临床生化指标的相关性

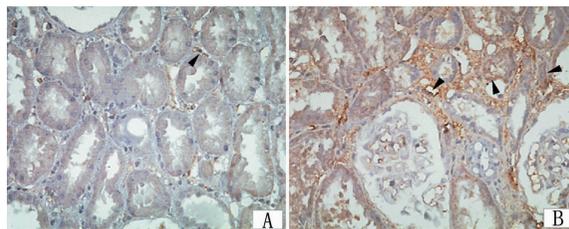
指标	NALP3		ASC		Caspase-1		IL-1β		IL-18	
	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
尿蛋白	0.421	<0.05	0.479	<0.05	0.464	<0.05	0.393	<0.05	0.489	<0.05
肌酐	0.450	<0.05	0.469	<0.05	0.485	<0.05	0.450	<0.05	0.498	<0.05
eGFR	-0.421	<0.05	-0.434	<0.05	-0.456	<0.05	-0.468	<0.05	-0.483	<0.05

3 讨论

FSGS 是 NS 的一种常见的病理类型,光镜下病理特征为病变呈局灶、节段分布,表现为受累节段的硬化(系膜基质增多、毛细血管闭塞、球囊粘连等),同时伴有显著的肾小管间质急、慢性炎性病变,而且肾小球病变程度往往与肾小管间质病变程度呈正相关^[11-12]。

0.01)。见表 2。免疫组化结果显示,对照组肾间质 F4/80 有少量表达,在 FSGS 组中, F4/80 表达明显增强,主要表达于肾小管间质活化巨噬细胞的细胞膜,免疫组化染色呈棕黄色。见图 6。

2.3 FSGS 患者肾小管上皮细胞 NALP3/ASC/caspase-1、IL-1β、IL-18 与肾小管间质损伤程度及 F4/80 的相关性分析 患者肾小管上皮细胞 NALP3/ASC/caspase-1、IL-1β、IL-18 的表达与肾小管间质损伤程度及 F4/80 的表达呈正相关,见表 3。



A:对照组;B:FSGS组;箭头所指为表示阳性表达。

图 6 两组患者肾小管间质 F4/80 的表达变化(×400)

2.4 两组患者肾小管上皮细胞 NALP3、caspase-1、IL-1β、IL-18 与临床生化指标的相关性 与对照组相比, FSGS 患者尿蛋白、血肌酐、尿素、eGFR、血清总蛋白、清蛋白差异均有统计学意义($P < 0.01$),见表 4。相关性分析结果显示, FSGS 患者肾小管上皮细胞 NALP3、caspase-1、IL-1β、IL-18 的表达水平与尿素、血浆总蛋白、清蛋白的水平无显著相关,与尿蛋白、血肌酐呈正相关($P < 0.05$),与 eGFR 呈负相关($P < 0.05$),见表 5。

IL-1β 主要由单核-巨噬细胞分泌,能进一步触发炎症反应,在局部和全身炎症反应中起到了核心作用。通过 FSGS 动物模型发现,模型小鼠比正常对照小鼠肾组织中 IL-1β 表达明显升高^[2]。IL-18 主要由活化的巨噬细胞生成,能刺激 Th1 细胞分泌粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、IFN-γ 以及 IL-2,并能够促进 Th1 细胞的增殖。动物实验发现,通过蛋白结合的方

式减少 IL-18 的表达,能减轻 FSGS 模型小鼠蛋白尿、肾组织损伤程度、肾间质巨噬细胞和 T 细胞的数量以及炎症因子表达,说明 IL-18 在 FSGS 的发病机制中扮演了重要的角色^[3]。此外,既往研究证明肾病综合征患者尿中 IL-18 水平明显升高,并与尿蛋白存在明显相关性^[5]。

NALP3 炎性复合体是 IL-1 β 、IL-18 活化的重要信号通路。NLRs 炎性体是机体多种非特异性天然免疫危险信号刺激抗原递呈细胞表达的一类蛋白复合体,其对机体获得性免疫反应具有重要调控作用^[13]。NALP3 炎性体是 NLRs 炎性体家族成员之一,由 NALP3,衔接蛋白 ASC 和 Cardinal,以及 caspase-1 组成蛋白复合体,主要表达于巨噬细胞、DCs 等 APC 发挥启动炎性体装配的作用^[7]。NALP3 炎性体能感受胞质内多种微生物产物和代谢性应激,一旦危险信号作用于靶细胞,NALP3 立即发生寡聚化,募集 ASC 和 Cardinal,激活 caspase-1,剪切 IL-1 家族成员前体成为具有活性的 IL-1 β 、IL-18 促炎症细胞因子,进而放大病变微环境炎症瀑布效应^[8]。Wang 等^[14]认为阿霉素诱导的肾病综合征小鼠通过 ATP 受体 P2X7 可诱导 NALP3 炎性体活化导致炎性细胞因子释放从而损伤肾组织。Vilaysane 等^[15]对 CKD 患者研究发现 FSGS 患者肾组织中 NALP3 mRNA 表达显著增高,且与肾功能恶化程度显著相关;通过输尿管梗阻实验发现,与对照组相比 NALP3 基因敲出小鼠肾组织炎症浸润和纤维化程度明显减轻,其原因可能是 caspase-1 活性下降以及 IL-1 β 和 IL-18 成熟受阻。但在 FSGS 型肾病综合征患者肾组织标本中 NALP3 炎性复合体和 IL-1 β 、IL-18 表达情况如何及二者关系均未见相关报道。对此本研究首次检测并分析它们在 FSGS 患者肾组织中的表达及意义。

本实验结果发现,NALP3/ASC/caspase-1 主要表达于肾小管上皮细胞,在正常对照组中 NALP3 有表达但表达较弱,ASC、caspase-1 均无表达,而在 FSGS 患者肾组织中 NALP3、ASC、caspase-1 表达明显升高。同时发现 IL-1 β 、IL-18 均有同样的表达趋势,进一步分析显示 NALP3/ASC/caspase-1 与 IL-1 β 、IL-18 表达变化显著相关。提示在 FSGS 患者肾组织中 NALP3 炎性复合体可能是 IL-1 β 、IL-18 的重要激活通路。

同时发现在 NALP3/ASC/caspase-1 及 IL-1 β 、IL-18 表达高的部位,其周围炎症细胞明显增加,通过相关性分析 NALP3/ASC/caspase-1 和 IL-1 β 、IL-18 的高表达与患者肾小管间质损伤程度以及 F4/80 的阳性细胞数表达、尿蛋白及肾功能损害呈正相关,与 eGFR 呈负相关。提示 NALP3 炎性复合体过表达是 FSGS 患者肾小管间质炎性细胞浸润的重要原因。

综上所述,NALP3 炎性复合体通过激活 IL-1 β 、IL-18 等下游炎症因子,参与 FSGS 的发病机制,其表达程度越高、肾组织病变程度越重,是否能作为 FSGS 预后的预警指标,还需进一步的临床验证。

参考文献:

[1] Thomas DB, Franceschini N, Hogan SL, et al. Clinical and pathologic characteristics of focal segmental glomerulosclerosis pathologic variants[J]. *Kidney Int*, 2006, 69(5): 920-926.

- [2] Pereira RL, Reis VO, Semedo P, et al. Invariant natural killer T cell agonist modulates experimental focal and segmental glomerulosclerosis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32454.
- [3] Wyburn KR, Chadban SJ, Kwan T, et al. Interleukin-18 binding protein therapy is protective in adriamycin nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 304(1): F68-76.
- [4] Huang Z, Wen Q, Zhou SF, et al. Differential chemokine expression in tubular cells in response to urinary proteins from patients with nephrotic syndrome [J]. *Cytokine*, 2008, 42(2): 222-233.
- [5] Matsumoto K, Kanmatsuse K. Elevated interleukin-18 levels in the urine of nephrotic patients [J]. *Nephron*, 2001, 88(4): 334-339.
- [6] van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, et al. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection [J]. *Trends Immunol*, 2011, 32(3): 110-116.
- [7] Anders HJ, Muruve DA. The inflammasomes in kidney disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(6): 1007-1018.
- [8] Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis [J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(3): 241-247.
- [9] Ma YC, Zuo L, Chen JH, et al. Modified glomerular filtration rate estimating equation for Chinese patients with chronic kidney disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(10): 2937-2944.
- [10] Cattran DC, Coppo R, Cook HT, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification [J]. *Kidney Int*, 2009, 76(5): 534-545.
- [11] Izu A, Sugimoto K, Fujita S, et al. Nonfunction of the ECT2 gene May cause renal tubulointerstitial injury leading to focal segmental glomerulosclerosis [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2012, 16(6): 875-882.
- [12] Gbadegesin R, Lavin P, Foreman J, et al. Pathogenesis and therapy of focal segmental glomerulosclerosis: an update [J]. *Pediatr Nephrol*, 2011, 26(7): 1001-1015.
- [13] Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 229-265.
- [14] Wang YM, McRae JL, Robson SC, et al. Regulatory T cells participate in CD39-mediated protection from renal injury [J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(9): 2441-2451.
- [15] Vilaysane A, Chun J, Seamone ME, et al. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(10): 1732-1744.