

# 全反式维甲酸对抗肾小球基底膜肾炎小鼠模型肾脏损害的保护作用

李正东<sup>1</sup> 方凡<sup>2</sup> 徐波<sup>2</sup> 陈安群<sup>2</sup>

**【摘要】** 目的 探讨全反式维甲酸对肾毒性血清肾炎(NTSN)小鼠模型的作用及机制。方法 使用肾毒性血清(NTS)尾静脉注射构建 NTSN 模型,设置对照组、NTS 组、NTS + 维甲酸组。NTS 注射前 5 d 给予羊免疫球蛋白和完全弗氏佐剂腹腔注射预处理,预处理后 24 h 给予 16 mg/kg 全反式维甲酸或溶媒腹腔注射,NTS 注射后 7 d 处死小鼠。ELISA 法检测小鼠白蛋白尿/肌酐比值、小鼠 BUN;肾组织石蜡切片 HE 染色,定量分析新月体肾炎、肾小球节段硬化的百分比;肾组织冰冻切片行 CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD68 免疫荧光染色,并定量分析;QPCR 方法分析肾皮质炎症细胞趋化因子如人单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、淋巴细胞趋化因子(LTN)的表达量。结果 维甲酸处理组显著减轻肾毒性血清肾炎小鼠模型的蛋白尿[NTS 组和 NTS + 维甲酸组尿微量白蛋白/肌酐比值(UACR)分别为:(4.52 ± 0.36) × 10<sup>-3</sup> mg/g、(2.63 ± 0.18) × 10<sup>-3</sup> mg/g; *q* = 18.45, *P* < 0.01]、肾功能[NTS 组和 NTS + 维甲酸组 BUN 分别为:(16.81 ± 1.23) mmol/L、(13.33 ± 0.62) mmol/L; *q* = 6.155, *P* < 0.01]、减轻肾组织病变[NTS 组和 NTS + 维甲酸组含新月体的肾小球百分比分别为:[(36 ± 1.58) %、(22.2 ± 1.92) %; *q* = 21.46, *P* < 0.01]。维甲酸处理组每低倍镜视野下 CD8<sup>+</sup> 淋巴细胞计数、CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞计数、每高倍镜视野下 CD68 阳性细胞面积较 NTS 组均明显减少,差异有统计学意义(*q* 值分别为:9.545、8.610、11.08; *P* < 0.01);维甲酸可以显著抑制炎症细胞趋化因子(MCP-1、ICAM-1、LTN)的基因表达。结论 维甲酸通过抑制炎症细胞趋化因子的表达、减少炎症细胞的浸润,减轻 NTSN 小鼠模型的蛋白尿、新月体形成等肾损害。

**【关键词】** 全反式维甲酸; 抗肾小球基底膜肾炎; 新月体肾炎; 炎症细胞

**Protective effect of all-trans retinoic acid against renal damage in the mouse model of anti-glomerular basement membrane nephritis** Li Zhengdong<sup>1</sup>, Fang Fan<sup>2</sup>, Xu Bo<sup>2</sup>, Chen Anqun<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Department of Nephrology, Dongfeng Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442008, Hubei Province; <sup>2</sup>Department of Nephrology, Zhongshan Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China Corresponding author: Chen Anqun, Email: anqunchen@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect and mechanism of all-trans retinoic acid in the mouse model of nephrotoxic serum nephritis (NTSN). **Methods** The NTSN model was constructed by tail vein injection of nephrotoxic serum (NTS), and the mice were divided into the control group, NTS group, and NTS + retinoic acid group. Five days before the injection of NTS, goat immunoglobulin and complete Freund's adjuvant were intraperitoneally injected as pretreatment. 24 h after the pretreatment, 16 mg/kg all-trans retinoic acid or dissolvant was intraperitoneally injected. 7 days after the NTS injection, the mice were sacrificed. The albuminuria/creatinine ratio and serum BUN of the mice were measured by ELISA. HE staining of paraffin sections of renal tissue was performed, and quantitative analysis was made of the percentage of crescentic and glomerular segmental sclerosis lesions. Frozen sections of renal tissue were stained with immunofluorescence for quantitative analysis of CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD68. The QPCR method was used to analyze the expression levels of inflammatory cytokines such as human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and lymphotactin (LTN) in the renal cortex tissue. **Results** Compared with the NTS group, the NTS + retinoic acid group had significantly lower

DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-3216.2019.03.004

基金项目:福建省卫计委医学创新课题(2014-CXB-41)

作者单位:442008 湖北十堰,湖北医药学院附属东风医院肾内科<sup>1</sup>;361004 福建,厦门大学附属中山医院肾内科<sup>2</sup>

通信作者:陈安群,Email: anqunchen@163.com

proteinuria. The urinary microalbumin/creatinine ratio (UACR) for NTS group and NTS + retinoic acid group was  $(4.52 \pm 0.36) \times 10^{-3} \text{ mg/g}$  ( $2.63 \pm 0.18) \times 10^{-3} \text{ mg/g}$ , respectively ( $q = 18.45, P < 0.01$ ), while the BUN level for NTS group and NTS + retinoic acid group was  $(16.81 \pm 1.23) \text{ mmol/L}$  ( $13.33 \pm 0.62) \text{ mmol/L}$ ; respectively ( $q = 6.155, P < 0.01$ ). And the percentage of glomeruli with crescents in the NTS group and NTS + retinoic acid group was 36.58% and 22.2%, respectively ( $q = 21.46, P < 0.01$ ). Compared with the NTS group, the NTS + retinoic acid group had significantly smaller CD8<sup>+</sup> lymphocyte count, CD4<sup>+</sup> lymphocyte count, and area of CD68 positive cells ( $q$  value: 9.545, 8.610, and 11.08, respectively,  $P < 0.01$ ). The expression of MCP-1, ICAM-1, and LTN was significantly inhibited by retinoic acid. **Conclusion** Retinoic acid inhibited the expression of inflammatory chemokines, reduced the infiltration of inflammatory cells, and alleviated the renal damage such as proteinuria and crescent formation in the mouse model of nephrotoxic serum nephritis.

**【Key words】** All-trans retinoic acid; Anti-glomerular basement membrane nephritis; Crescentic glomerulonephritis; Inflammatory cells

新月体肾炎是各型肾炎中预后最差的一种类型,临床进展十分迅速,若不及时进行诊断和治疗,多数患者将于数周至数月内进展至终末期肾衰竭或死亡。其病理主要表现为大量新月体形成,肾小球或肾间质内大量以单核、淋巴细胞为主的炎症细胞浸润<sup>[1]</sup>。全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)是维甲酸的衍生物,对调节细胞增殖、分化、凋亡、免疫及炎症反应起重要作用<sup>[2-3]</sup>,但维甲酸对新月体肾炎的作用和机制尚不十分清楚。肾毒性血清肾炎模型(nephrotoxic serum nephritis, NTSN),又称为抗肾小球基底膜肾炎模型,表现为新月体形成、大量炎症细胞浸润、肾小球基底膜破坏,是新月体肾炎研究最常用的模型<sup>[4]</sup>。因此我们在本研究中拟探讨全反式维甲酸对 NTSN 的作用和机制。

## 材料与方 法

### 一、主要实验材料

野生型 C57BL/6J 小鼠购自杰克逊实验室。肾毒性血清(nephrotoxic serum, NTS)冻干粉剂由美国波士顿医学院 David J. Salant 教授惠赠。羊免疫球蛋白(杰克逊免疫研究实验室 013-000-003)、完全弗氏佐剂(Sigma-F5881)、全反式维甲酸(sigma 公司)、尿白蛋白 ELISA 检测试剂盒(Bethyl Laboratory)、尿肌酐检测试剂盒(DICT-500, Bioassay Systems)、血清尿素氮检测试剂盒(BioAssay Systems)、CD8 淋巴细胞单克隆抗体(Biologend 100703)、CD4 淋巴细胞单克隆抗体(Abcam ab25475)、CD68 单核/巨噬细胞单克隆抗体(Abcam ab5344)、Alexa Fluor<sup>®</sup> 568 标记的山羊抗大鼠 IgG (Thermo Fisher Scientific)、Trizol (Thermo Fisher Scientific)、CDNA 合成试剂盒(Thermo Fisher Scientific)、SYBR PCR 试剂盒(Applied Biosystems)。

### 二、模型建立<sup>[5]</sup>

15 只野生型 C57BL/6J 小鼠,随机均分为对照组、NTS 组、NTS + 维甲酸处理组。使用无菌 PBS 溶解 NTS 冻干粉至终浓度为 67 mg/ml。0.5 mg 羊 IgG 和 45  $\mu\text{l}$  完全弗氏佐剂腹腔注射预处理。全反式维甲酸溶于花生油和 5% 二甲亚砜,预处理后 24 h 给予全反式维甲酸 16 mg/kg 腹腔注射,对照组腹腔注射溶媒,每天注射一次,直至处死小鼠。预处理 5 d 后予 100  $\mu\text{l}$  NTS 尾静脉注射构建肾毒性血清肾炎模型,对照组注射 100  $\mu\text{l}$  PBS。NTS 注射 7 d 后处死小鼠。

### 三、组织标本的收集

小鼠麻醉后仰面固定于操作台,暴露腹腔,下腔静脉取血、膀胱取尿后,从心脏进针建立静脉通道,使用 PBS 灌注 5 min 后取下双侧肾脏,将肾脏对切,一半肾组织样本用于提取 RNA - 80 $^{\circ}\text{C}$  保存。一半肾组织福尔马林固定,石蜡包埋后行组织切片(4  $\mu\text{m}$ );一半肾组织 OCT 包埋后行冰冻切片(4  $\mu\text{m}$ )。

### 四、蛋白尿和血清尿素氮检测

根据尿白蛋白检测试剂盒说明和尿肌酐检测试剂盒说明分别检测小鼠尿白蛋白、尿肌酐,取两者的比值,得到尿微量白蛋白/肌酐(urinary microalbumin/creatinine ratio, UACR)。根据商品化试剂盒说明检测小鼠血清尿素氮浓度。

### 五、肾脏组织病理学分析<sup>[6]</sup>

石蜡组织切片行 HE 染色,对肾脏的损害程度采用百分比评分法进行评估,即观察整个肾切片所有的肾小球,计算合并有新月体的肾小球数量、节段硬化的肾小球数量,除以肾小球数量的总和,得到百分比。

### 六、免疫荧光染色<sup>[6]</sup>

肾脏组织冰冻切片在预冷的丙酮溶液中固定 15 min, PBS 洗 3 遍,封闭液(含 2% BSA、10% 的山羊血清)室温孵育 1 h,然后分别使用 CD8 淋巴细胞

单克隆抗体、CD4 淋巴细胞单克隆抗体或 CD68 单克隆抗体孵育过夜,第 2 天 PBS 清洗 3 遍,使用相应的荧光二抗孵育 1 h, PBS 清洗 3 遍后使用带 DAPI 的封片液封片。荧光显微镜于相同的曝光时间获取照片,每只实验小鼠获取 15 个视野的图片,使用 Image J 设定相同的阈值,分别定量 CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 阳性细胞总数,CD68 阳性细胞的面积。

七、实时荧光定量 PCR 分析基因表达

Trizol 法提取肾皮质总 RNA,测量 RNA 的浓度,每只小鼠转录 1 μg 总 RNA,逆转录试剂盒合成 cDNA,使用 SYBR 试剂盒和下列引物分析基因的表达,GAPDH 作为内参。LTN-F: 5'-GCCAATTCAGC AAGACCTCAGCCATGAG-3'; LTN-R5'-CCAAGCTT GAGGCTGTTACCCAGTCAGGGT-3'; Ccl2-F: 5'-TTAAAAACCTGGATCGGAACCAA-3'; Ccl2-R: 5'-GCATTAGCTTCAGATTTACGGGT-3'; ICAM1-F: 5'-GTGATGCTCAGGTATCCATCCA-3'; ICAM1-R: 5'-CACAGTTCTCAAAGCACAGCG-3'; GAPDH-F: 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'; GAPDH-R: 5'-TTG CTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'。

八、统计学分析

计量资料采用  $\bar{x} \pm sD$ ,均数比较采用方差分析(ANOVA, Bonferroni 校正), GraphPad Prism 7 软件用于统计分析。 $P < 0.05$  被认为具有统计学意义。

结 果

一、维甲酸可改善 NTSN 模型小鼠蛋白尿和肾功能

ELISA 方法检测小鼠 UACR: 对照组、NTS 组、NTS + 维甲酸组 UACR 的平均值分别为:  $(0.23 \pm 0.07) \times 10^{-3} \text{ mg/g}$ ,  $(4.52 \pm 0.36) \times 10^{-3} \text{ mg/g}$ ,

$(2.63 \pm 0.18) \times 10^{-3} \text{ mg/g}$ ; NTS 组和 NTS + 维甲酸组比较差异有统计学意义( $q = 18.45, P < 0.01$ ), 见图 1。

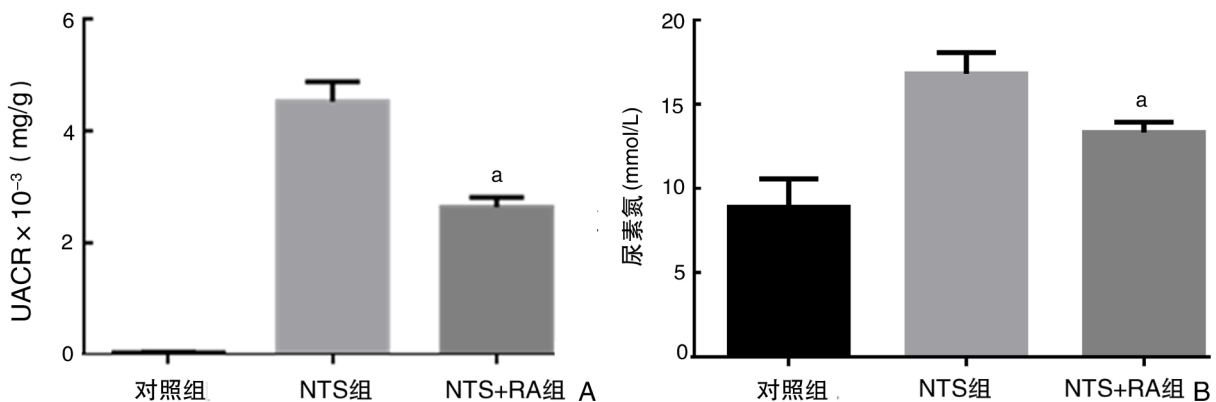
血清尿素氮检测结果示: 对照组、NTS 组、NTS + 维甲酸组 BUN 均值分别为:  $(8.90 \pm 1.68) \text{ mmol/L}$ ,  $(16.81 \pm 1.23) \text{ mmol/L}$ ,  $(13.33 \pm 0.62) \text{ mmol/L}$ ; NTS 组和 NTS + 维甲酸组比较差异有统计学意义( $q = 6.155, P < 0.01$ ), 见图 1。

二、维甲酸可改善 NTSN 模型小鼠肾组织病理改变

观察肾组织切片所有的肾小球,计数合并有新月体的肾小球数量、节段或球型硬化的肾小球数量,分别除以肾小球总数量,即得到百分比。每组小鼠( $n = 5$ )再取平均值进行统计分析。对照组未发现新月体、节段或球性硬化; NTS 组合并有新月体的肾小球百分比为:  $(36 \pm 1.58) \%$ ; NTS + 维甲酸组合并有新月体的肾小球百分比为:  $(22.2 \pm 1.92) \%$ ; 两组间差异有统计学意义( $q = 21.46, P < 0.01$ )。NTS 组、NTS + 维甲酸组的肾小球硬化率分别为:  $(18.4 \pm 1.14) \%$ 、 $(13.0 \pm 1.58) \%$ , 差异有统计学意义( $q = 10.73, P < 0.01$ ), 见图 2。

三、维甲酸可减轻 NTSN 模型小鼠 CD8<sup>+</sup> 淋巴细胞的浸润

对肾脏冰冻组织切片行 CD8<sup>+</sup> T 细胞免疫荧光染色,在 200 倍的显微镜下获取图片,每只小鼠获取 15 个视野的图片,使用 ImageJ 计量 CD8<sup>+</sup> T 细胞总数,得到 CD8<sup>+</sup> T 细胞均数/每低倍镜视野,每组小鼠( $n = 5$ )再取平均值进行统计分析。每低倍镜视野下 CD8<sup>+</sup> T 细胞均数: 对照组为  $3.44 \pm 0.82$  个; NTS 组为  $25.72 \pm 1.56$  个; NTS + RA 组为  $17.45 \pm 2.85$  个; NTS 组与 NTS + 维甲酸组差异有统计学意义( $q = 9.545, P < 0.01$ ) 见图 3。



注: A: UACR: 尿微量白蛋白/肌酐比值; B: 血清尿素氮水平; NTS 组: 肾毒性血清肾炎组; NTS + RA 组: 肾毒性血清肾炎 + 维甲酸组; 与 NTS 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$

图 1 各组小鼠尿白蛋白/肌酐比值、尿素氮比较

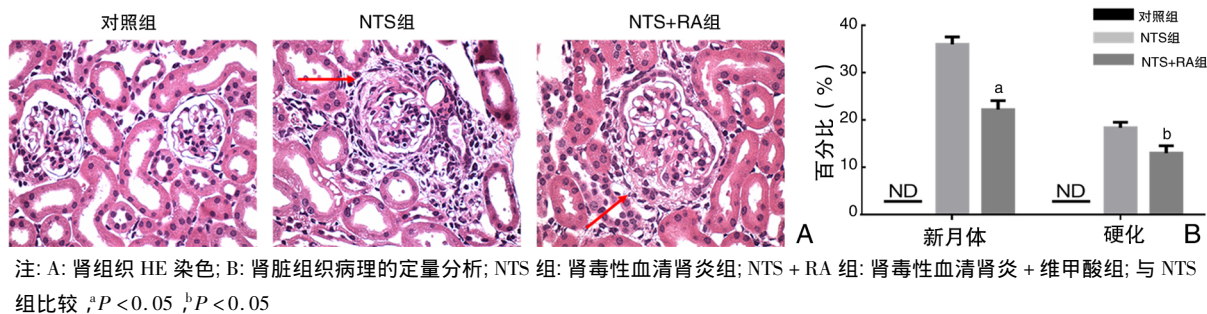


图 2 各组小鼠 HE 染色代表图片 (400 ×)、肾脏组织病理定量分析

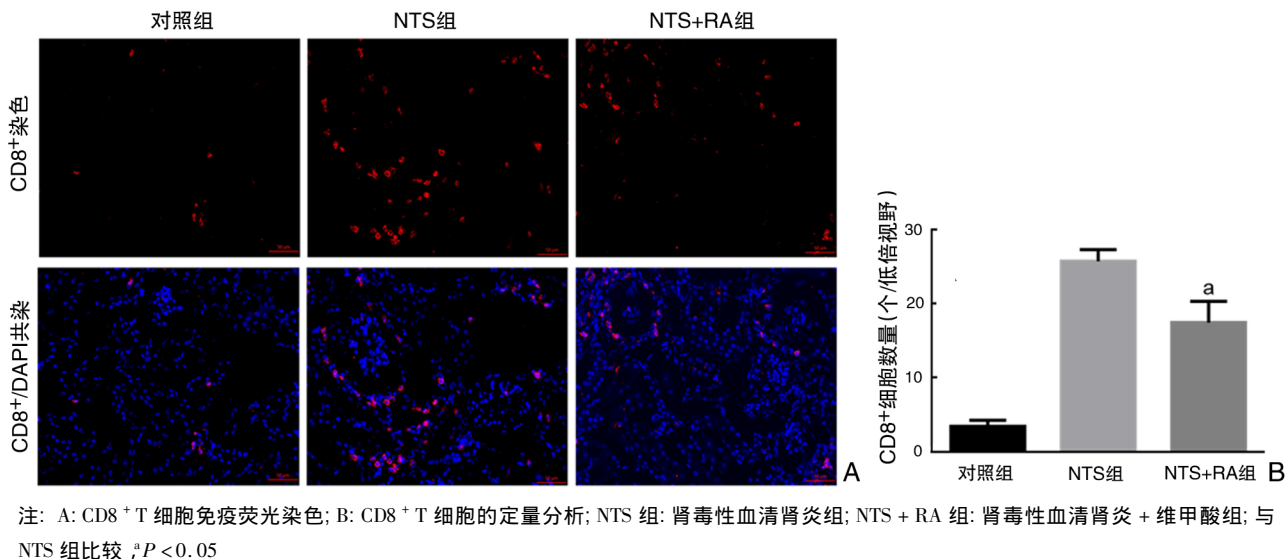


图 3 各组 CD8<sup>+</sup>T 细胞免疫荧光染色 (200 ×) 比较

#### 四、维甲酸可减轻 NTSN 模型小鼠 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞浸润

对肾脏冰冻组织切片行 CD4<sup>+</sup>T 细胞免疫荧光染色,在 200 倍的显微镜下获取图片,每只小鼠获取 15 个视野的图片,使用 ImageJ 计量 CD8<sup>+</sup>T 细胞总数,得到 CD8<sup>+</sup>T 细胞均数/每低倍镜视野,每组小鼠 (n=5) 再取平均值进行统计分析。每低倍镜视野下 CD4<sup>+</sup>T 细胞均数:对照组为 (1.23 ± 0.45) 个;NTS 组为 (16.25 ± 1.58) 个;NTS + 维甲酸组为 (9.65 ± 2.20) 个;NTS 组与 NTS + 维甲酸组差异有统计学意义 (q=8.610, P<0.01),见图 4。

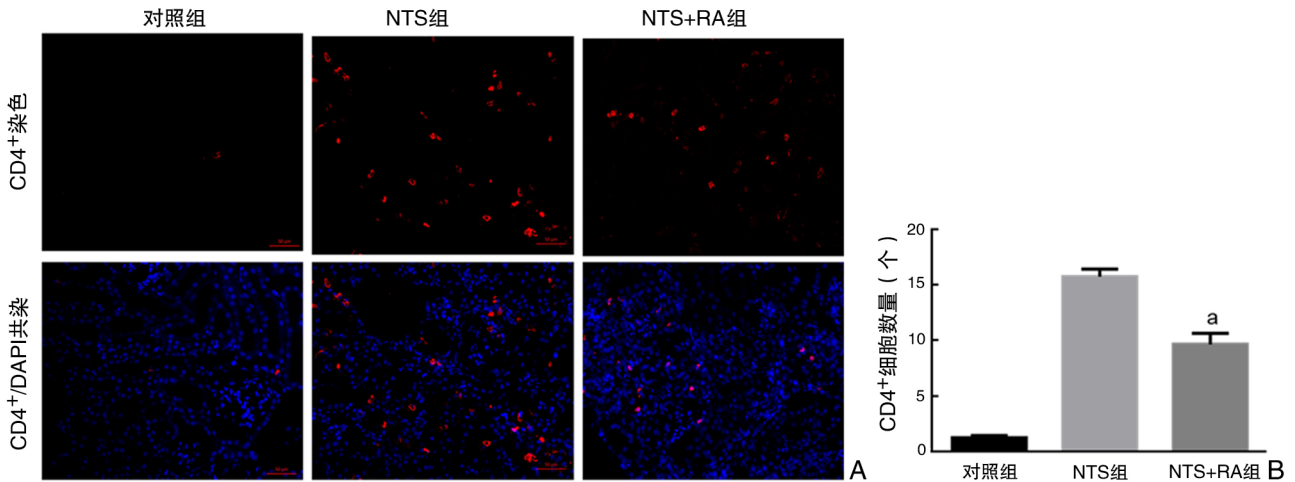
#### 五、维甲酸可减轻 NTSN 小鼠模型单核和(或)巨噬细胞浸润

对肾脏冰冻组织切片行 CD68 免疫荧光染色,在 400 倍的显微镜下获取图片,每只小鼠获取 15 个视野的图片,使用 ImageJ 计量 CD68 阳性细胞面积,得到 CD68 阳性细胞面积均数/每高倍镜视野,每组小鼠 (n=5) 再取平均值进行统计分析。每高倍镜视野下 CD68 细胞面积均数:对照组为 (0.03 ± 0.01) pixel<sup>2</sup>;NTS 组为 (0.74 ± 0.06) pixel<sup>2</sup>;NTS +

维甲酸组为: (0.42 ± 0.09) pixel<sup>2</sup>;NTS 组与 NTS + 维甲酸组差异有统计学意义 (q=11.08, P<0.01),见图 5。

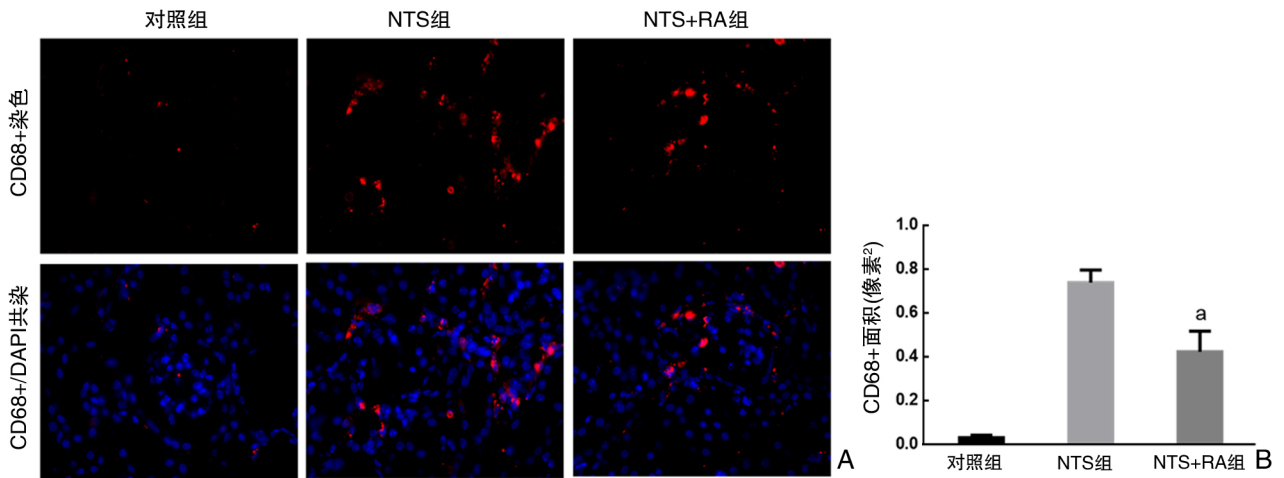
#### 六、维甲酸可抑制 NTSN 模型小鼠炎症细胞趋化因子的表达

肾皮质相关炎症细胞趋化因子基因表达的定量分析结果提示:NTS 组人单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 的表达量较对照组增加约 11.3 倍,NTS + 维甲酸组 MCP-1 的表达量较对照组增加约 6.6 倍,NTS 组和 NTS + 维甲酸组差异有统计学意义 (q=5.109, P<0.01)。NTS 组细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 的表达量较对照组增加约 4.95 倍,NTS + 维甲酸组 ICAM-1 的表达量较对照组增加约 1.65 倍,NTS 组和 NTS + 维甲酸组差异有统计学意义 (q=3.581, P<0.05)。NTS 组淋巴细胞趋化因子 (lymphotactin, LTN) 的表达量较对照组增加约 27.89 倍,NTS + 维甲酸组 LTN 的表达量较对照组增加约 17.47 倍,NTS 组与 NTS + 维甲酸组差异有统计学意义 (q=11.29, P<0.01),见图 6。



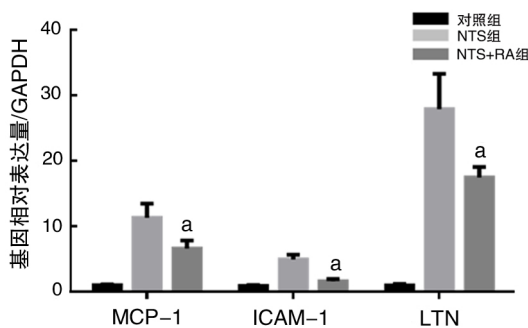
注: A: CD4<sup>+</sup>T 细胞免疫荧光染色; B: CD4<sup>+</sup>T 细胞的定量分析; NTS 组: 肾毒性血清肾炎组; NTS + RA 组: 肾毒性血清肾炎 + 维甲酸组; 与 NTS 组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05

图 4 各组 CD4<sup>+</sup>T 细胞免疫荧光染色( ×200) 比较



注: A: CD68 细胞免疫荧光染色; B: CD68 阳性细胞的面积定量分析; NTS 组: 肾毒性血清肾炎组; NTS + RA 组: 肾毒性血清肾炎 + 维甲酸组; 与 NTS 组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05

图 5 各组 CD68 细胞免疫荧光染色( ×400) 比较



注: NTS 组: 肾毒性血清肾炎组; NTS + RA 组: 肾毒性血清肾炎 + 维甲酸组; 与 NTS 组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.05; 人单核细胞趋化蛋白-1 ( MCP-1)、细胞间黏附分子-1 ( ICAM-1)、淋巴细胞趋化因子( LTN)

图 6 QPCR 定量分析肾皮质炎症细胞趋化因子的表达

## 讨论

ATRA 是维甲酸的一代衍生物,是维甲酸体内发挥生物学效应的主要成分,对调节细胞聚集、分化、凋亡、增殖及炎症反应起重要作用。维甲酸在细胞核内的两组受体,即维甲酸受体( retinoic acid receptors ,RARs) 和维甲酸 X 受体( retinoid X receptors ,RXRs) 普遍存在于各种细胞中,是配体依赖的转录调节子。ATRA 主要通过 RAR 高亲和力特异性地结合而发挥生物学效应。当缺乏 ATRA 时,RAR/RXR 形成异质二聚体,与 ATRA 调控的靶基因启动区维甲酸反应元件( retinoic acid response element ,RARE) 结合,同时募集阻遏蛋白和组蛋白脱乙酰化酶( histone deacetylases ,HDAC) 至



相应 DNA 区域 ,HDAC 重组蛋白转移乙酰基 ,改变染色质结构从而对基因转录起到抑制作用。当 ATRA 存在时 ,ATRA 与 RAR 高亲和力结合 ,RAR 发生构型改变 ,释放阻遏蛋白 ,同时募集共激活蛋白如组蛋白乙酰转移酶 ,激活 ATRA 调控的靶基因转录及表达 ,从而发挥对细胞的生物活性调控作用<sup>[7]</sup>。

维甲酸缺乏或者 RAR/RXR 敲除可导致小鼠肾脏单位的减少<sup>[8]</sup>。在抗 Thy-1 肾炎动物模型中 ,维甲酸可以通过抑制系膜细胞增殖、减少细胞外基质的沉积、减少单核细胞的浸润从而限制肾脏损害<sup>[9]</sup>。在嘌呤霉素氨基核苷肾病大鼠模型中 ,维甲酸处理组有较少的间质单核细胞浸润 ,纤维连接蛋白表达减少 ,对单核细胞浸润起关键作用的 MCP-1 的表达量也减少<sup>[10]</sup>。在糖尿病肾病的早期模型中 ,维甲酸可以通过降低肾脏 MCP-1 和 ED-1 的蛋白合成 ,降低蛋白尿水平。体外用维甲酸处理培养的足细胞 ,可以通过减少单核趋化蛋白的合成从而减少炎症通路的激活<sup>[11]</sup>。在狼疮性肾炎的小鼠模型中 ,维甲酸可以减少肾脏趋化因子和细胞因子的表达、减少肾小球 IgG 沉积、减少蛋白尿、改善肾小球病变<sup>[12]</sup>。然而维甲酸在新月体肾炎中的作用和机制却不十分清楚。

NTSN 模型是以 CD8<sup>+</sup>T 细胞浸润为主的新月体肾小球肾炎<sup>[13]</sup> ,巨噬细胞招募在病程中起关键作用 ,TH1 细胞激活亦发挥着重要的作用。我们的研究发现维甲酸可以减轻蛋白尿、改善肾功能、减少新月体的形成 ,与以往报道一致<sup>[5]</sup>。NTSN 模型小鼠较对照小鼠 CD8<sup>+</sup>T 细胞和巨噬细胞浸润明显增加 ,符合疾病的自然病程;同时本研究模型维甲酸可以明显减少淋巴细胞和巨噬细胞的浸润 ,既往未见维甲酸减少淋巴细胞浸润的报道。

维甲酸可以明显减少 CD8<sup>+</sup>T 细胞和巨噬细胞的浸润 ,表现为肾小球和肾间质的 CD8<sup>+</sup>T 细胞和巨噬细胞浸润明显减少。ICAM-1 和 MCP-1 在巨噬细胞招募中起至关重要的作用<sup>[14-15]</sup> ,而我们的研究表明维甲酸可以明显抑制 ICAM-1 和 MCP-1 在肾皮质的基因表达水平 ,ICAM-1 和 MCP-1 的表达减少可能导致了巨噬细胞浸润减少。CD8<sup>+</sup>T 细胞、NK 细胞、肥大细胞均能产生 LTN ,而 CD4<sup>+</sup>T 细胞或单核细胞不表达 LTN<sup>[13]</sup>。LTN 特异性的趋化 CD8<sup>+</sup>T 细胞和自然杀伤细胞 ,本研究发现 NTSN 的模型中 LTN 表达量显著增高 ,而全反式维甲酸处理可以减少肾脏皮质 LTN 的表达 ,浸润的 CD8<sup>+</sup>T 细胞减少可能与 LTN 因子表达减少有关。

激活的 TH1 细胞可以招募更多的炎症细胞 ,刺

激巨噬细胞产生肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、一氧化氮(NO)等损伤调节因子 ,导致肾小球壁层上皮细胞增殖 ,促进特征性的新月体形成<sup>[4]</sup>。本研究的结果提示维甲酸处理可以明显减少肾间质的 CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞的数量 ,减少新月体形成 ,可能与维甲酸抑制一系列炎症因子的表达有关。如 Oseto 等<sup>[16]</sup>曾报道在抗肾小球基底膜肾炎模型中 ,ATRA 可以减少肾小球增殖细胞核抗原( proliferating cell nuclear antigen , PCNA) 阳性细胞、ED-1 阳性细胞数和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(  $\alpha$ -smooth muscle actin ,  $\alpha$ -SMA) 阳性面积 ,抑制 TNF- $\alpha$ 、白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、增强子结合蛋白- $\delta$  (CCAAT/enhancer binding protein- $\delta$  , C/EBP $\delta$ )、血小板衍生生长因子( platelet-derived growth factor , PDGF)、转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、I 型胶原和  $\alpha$ -SMA 等基因表达 ,从而减轻蛋白尿、减少肾脏新月体形成。Rao 等<sup>[17]</sup>发现 ATRA 处理可以通过增加 I $\kappa$ B $\alpha$  活性、抑制核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 活性 ,从而下调 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达 ,保护肝脏的缺血再灌注损伤。Nozaki 等<sup>[18]</sup>发现 ATRA 可以减少 IL-6、IL-12、TNF- $\alpha$  等细胞因子的表达 ,减少巨噬细胞的浸润 ,从而减轻胶原诱导的关节炎小鼠模型的关节损害。在 LPS 的模型中 ,维甲酸可以抑制 LPS 诱导的巨噬细胞产生 IL-12 ,维甲酸诱导的 IL-12 抑制依赖于 NF- $\kappa$ B 活性的抑制<sup>[19]</sup>。这些均说明 NF- $\kappa$ B 活性的抑制是维甲酸抗炎的可能机制 ,维甲酸可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 通路 ,广泛抑制炎症细胞因子的表达。

新月体形成预示着疾病预后差 ,而炎症细胞浸润在新月体的发展发展中起至关重要作用 ,我们的研究显示 ,维甲酸可以减少炎症趋化因子的表达 ,从而减少炎症细胞的浸润 ,改善肾功能和肾脏组织学 ,是临床上治疗新月体肾炎有应用潜力的一个药物。

#### 参 考 文 献

- [1] Moroni G , Ponticelli C. Rapidly progressive crescentic glomerulonephritis: early treatment is a must [J]. *Autoimmun Rev* , 2014 , 13 ( 7 ) : 723-729.
- [2] Czarnecki P , Das S , Parigi SM , et al. Retinoic acid and its role in modulating intestinal innate immunity [J]. *Nutrients* , 2017 , 9 ( 1 ) : 68.
- [3] Rhinn M , Dolle P. Retinoic acid signalling during development [J]. *Development* , 2012 , 139 ( 5 ) : 843-858.
- [4] Kurtz C , Panzer U , Anders HJ , et al. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications [J]. *Nat Rev Immunol* , 2013 , 13 ( 10 ) : 738-753.
- [5] Dai Y , Chen A , Liu R , et al. Retinoic acid improves nephrotoxic serum-induced glomerulonephritis through activation of podocyte retinoic acid receptor alpha [J]. *Kidney Int* , 2017 , 92 ( 6 ) : 1444-1457.

- [6] Chen A , Lee K , D'Agati VD , et al. Bowman's capsule provides a protective niche for podocytes from cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells [J]. *J Clin Invest* , 2018 , 128( 8 ) : 3413-3424.
- [7] Kim CH. Control of innate and adaptive lymphocytes by the RAR-retinoic acid axis [J]. *Immune Netw* , 2018 , 18( 1 ) : e1.
- [8] Mallipattu SK , He JC. The beneficial role of retinoids in glomerular disease [J]. *Front Med ( Lausanne )* , 2015 , 2( 16 ) : 1-5.
- [9] Lehrke I , Schaier M , Schade K , et al. Retinoid receptor-specific agonists alleviate experimental glomerulonephritis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol* , 2002 , 282( 4 ) : F741-F751.
- [10] Suzuki A , Ito T , Imai E , et al. Retinoids regulate the repairing process of the podocytes in puromycin aminonucleoside-induced nephrotic rats [J]. *J Am Soc Nephrol* , 2003 , 14( 4 ) : 981-991.
- [11] Han SY , So GA , Jee YH , et al. Effect of retinoic acid in experimental diabetic nephropathy [J]. *Immunol Cell Biol* , 2004 , 82( 6 ) : 568-576.
- [12] Perez de Lema G , Lucio-Cazana FJ , Molina A , et al. Retinoic acid treatment protects MRL/lpr lupus mice from the development of glomerular disease [J]. *Kidney Int* , 2004 , 66( 3 ) : 1018-1028.
- [13] Natori Y , Ou ZL , Yamamoto-Shuda Y , et al. Expression of lymphotactin mRNA in experimental crescentic glomerulonephritis [J]. *Clin Exp Immunol* , 1998 , 113( 2 ) : 265-268.
- [14] Hill PA , Lan HY , Nikolic-Paterson DJ , et al. The ICAM-1 / LFA-1 interaction in glomerular leukocytic accumulation in anti-GBM glomerulonephritis [J]. *Kidney Int* , 1994 , 45( 3 ) : 700-708.
- [15] Janssen U , Ostendorf T , Gaertner S , et al. Improved survival and amelioration of nephrotoxic nephritis in intercellular adhesion molecule-1 knockout mice [J]. *J Am Soc Nephrol* , 1998 , 9( 10 ) : 1805-1814.
- [16] Oseto S , Moriyama T , Kawada N , et al. Therapeutic effect of all-trans retinoic acid on rats with anti-GBM antibody glomerulonephritis [J]. *Kidney Int* , 2003 , 64( 4 ) : 1241-1252.
- [17] Rao J , Qian X , Wang P , et al. All-trans retinoic acid preconditioning protects against liver ischemia/reperfusion injury by inhibiting the nuclear factor kappa B signaling pathway [J]. *J Surg Res* , 2013 , 180( 2 ) : e99-e106.
- [18] Nozaki Y , Yamagata T , Sugiyama M , et al. Anti-inflammatory effect of all-trans-retinoic acid in inflammatory arthritis [J]. *Clin Immunol* , 2006 , 119( 3 ) : 272-279.
- [19] Na SY , Kang BY , Chung SW , et al. Retinoids inhibit interleukin-12 production in macrophages through physical associations of retinoid X receptor and NFkappaB [J]. *J Biol Chem* , 1999 , 274( 12 ) : 7674-7680.

( 本文编辑: 陈瑛、王建中 )

( 收稿日期: 2018-08-13 )

李正东, 方凡, 徐波, 等. 全反式维甲酸对抗肾小球基底膜肾炎小鼠模型肾脏损害的保护作用 [J/CD]. *中华肾病研究电子杂志* , 2019 , 8( 3 ) : 114-120.