

及 IgM 等),发挥体液免疫功能。CD19 为 B 细胞所共有表面标志。补体 (complement, C) 则是存在于血清及组织中的一组具有酶样活性、不耐热和功能上连续反应的球蛋白,是抗体发挥溶细胞作用的必要补充条件。T 细胞亚群、CD16 + CD56 细胞、CD19 细胞、免疫球蛋白和补体的变化可在一定程度上反映机体的免疫功能状态变化。

肛周感染是糖尿病的一个常见并发症,肛窦腺感染是其主要原因,在其发生和转归中与机体的免疫功能状态如何呢?是以细胞免疫功能下降,还是体液免疫功能下降为主,或二者均有变化呢? 本研究发现 3 组研究对象的细胞免疫指标无显著性差异 ($P > 0.05$),DM 组及 IGR 组补体 C3 水平均降低,DM 组的 IgG 明显降低,这提示糖尿病患者存在免疫力下降,且以体液免疫功能下降为主。笔者还观察到 DM 病组患者 IgG 明显降低,但 IGR 组患者无明显降低,其原因可能是随着糖尿病的进展,尤其在患者肾功能发生障碍时,肾小球基膜结构破坏,电荷屏障和分子屏障作用部分或全部丧失,血浆中 IgG 被滤过进入原尿,导致通过肾等途径排泄较多的白蛋白、IgG 所

致^[5]。有无其他机制尚有待进一步探讨。

相关性分析表明究糖代谢紊乱的程度与补体 C3、IgG 均呈负相关,以上分析体现了糖代谢紊乱与机体免疫状态,尤其是体液免疫的有机联系。因此笔者认为以补体 C3、IgG 为代表的体液免疫在肛周感染合并糖代谢紊乱发病及转归中起到关键作用,且可以作为疗效评价的指标,具有显著的临床意义。

参考文献

- 1 杨向东,陈小朝,赵向东,等. 肛周脓肿合并糖尿病 22 例临床分析[J]. 结直肠肛门外科,2008,14(6):408
- 2 Wei PL, Keller JJ, Kuo LJ, *et al*. Increased risk of diabetes following perianal abscess: a population - based follow - up study[J]. Int J Colorectal Dis,2013,28(2):235 - 240
- 3 戴建英,鲍艳芳,周冬玲. 糖尿病足相关危险因素探讨[J]. 上海预防医学,2012,24(6):301 - 302
- 4 赵雁翎. 老年糖尿病患者的营养状态与感染的关系[J]. 临床和实验医学杂志,2012,11(12):963,965
- 5 陈希,陈一伟,高春强. 尿 $\beta 2 - m$ 、IgG、Alb RIA 联检观察肾功能受损的临床价值[J]. 放射免疫学杂志,2008,21(6):569 - 570

(收稿日期:2012 - 11 - 06)

(修回日期:2012 - 11 - 09)

蛋白激酶 C α 激活参与肿瘤坏死因子 α 引起的肝肾综合征肾小球滤过率下降

闻 颖 王冬蕾 刘 沛

摘 要 目的 研究肿瘤坏死因子 α (TNF - α) 对肾小球系膜细胞蛋白激酶 C α (PKC - α) 活性的影响,揭示 TNF - α 引起肝肾综合征肾小球滤过率 (GFR) 下降的机制。**方法** 选择大鼠系膜细胞株进行体外培养。按 TNF - α 处理的不同时间点 (0、4、8、24h) 分 4 组。分别应用 Western blot、免疫荧光、免疫电镜及 PKC - α 活性定量检测方法,观察 TNF - α 对 PKC - α 表达量及活性的影响。**结果** TNF - α 处理组 PKC - α 蛋白表达与对照组比较无统计学差异 (4h: 0.75 ± 0.13 ; 8h: 0.76 ± 0.12 ; 24h: 0.78 ± 0.10 , vs 0h: 0.84 ± 0.11 , $P > 0.05$)。免疫荧光及免疫电镜发现:对照组 PKC - α 在胞质中呈弥漫性分布,核内无表达。TNF - α 处理 8、24h 组 PKC - α 存在明显核周聚集,胞核内也可见少量 PKC - α 表达,以 TNF - α 处理 8 时最明显。PKC 活性定量检测 TNF - α 处理 8、24h 组 PKC - α 活性明显增强 (4h: 1.11 ± 0.96 , $P = 0.612$; 8h: 1.87 ± 0.25 , $P = 0.000$; 24h: 1.68 ± 0.14 , $P = 0.000$ vs 0h: 1.07 ± 0.06),以 TNF - α 处理 8h 组最明显 ($P = 0.017$ vs 24h)。**结论** TNF - α 对 GMCs 中的 PKC - α 蛋白表达量无影响,却能明显增加其 PKC - α 活性,后者可能是 TNF - α 引起 GFR 下降的重要信号。

关键词 蛋白激酶 C α 肿瘤坏死因子 α 肝肾综合征 肾小球系膜细胞 1,4,5 - 三磷酸肌醇受体

Activated Protein Kinase C alpha Participates in the Decreased Glomerular Filtration Rate in Hepatorenal Syndrome Induced by Tumor Necrosis Factor Alpha. Wen Ying, Wang Donglei, Liu Pei. Department of Infectious Diseases, Affiliated No. 1 Hospital of China Medical University, Liaoning 110001, China

Abstract Objective To investigate the effect of tumor necrosis factor alpha (TNF - α) on the expression and activity of protein ki-

nase C alpha (PKC - α) in glomerular mesangial cells (GMCs) in order to delineate the mechanisms of decreased glomerular filtration rate in hepatorenal syndrome caused by TNF - α . **Methods** We choosed GMCs line from rats as our material. GMCs were divided into TNF - α - treated 0, 4, 8, 24h groups. We identified the effect of TNF - α on the expression and activity of PKC - α by Western blot, immunofluorescence staining, immune electron microscopy and PKC activity assays. **Results** TNF - α could not affect the protein level of PKC - α (4h: 0.75 ± 0.13 ; 8h: 0.76 ± 0.12 ; 24h: 0.78 ± 0.10 , vs 0h: 0.84 ± 0.11 , $P > 0.05$). Immunofluorescence staining and immune electron microscopy for PKC - α showed that in unstimulated cells, PKC - α was detected only in the cytoplasm. PKC - α in GMCs treated by TNF - α showed subcellular localization to perinucleus and into nucleus which was the sign of activated PKC - α . TNF - α induced an increase in PKC - α activity. PKC - α activity was globally upregulated in TNF - α - treated 8, 24h groups (4h: 1.11 ± 0.96 , $P = 0.612$; 8h: 1.87 ± 0.25 , $P = 0.000$; 24h: 1.68 ± 0.14 , $P = 0.000$ vs 0h: 1.07 ± 0.06). The maximal effect was seen at TNF - α - treated 8h group ($P = 0.017$ vs 24h). **Conclusion** The phenomenon that TNF - α can not affect the protein expression levels of PKC - α , but increase the activity of PKC - α in GMCs may be an important signal in the mechanisms of decreased GFR caused by TNF - α .

Key words Protein kinase C alpha; Tumor necrosis factor alpha; Hepatorenal syndrome; Glomerular mesangial cells; Inositol 1, 4, 5 - trisphosphate receptors

肝肾综合征 (hepatorenal syndrome, HRS) 是肝硬化晚期的严重并发症, 肾小球滤过率 (glomerular filtration rate, GFR) 明显下降^[1]。暴发性肝衰竭时肾血管平滑肌细胞和肾小球系膜细胞 (glomerular mesangial cells, GMCs) 的 I 型 1, 4, 5 - 三磷酸肌醇受体 (inositol 1, 4, 5 - trisphosphate receptors, IP₃Rs) 表达增加, 并认为与肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF - α) 有关, 其确切的信号转导机制不详^[2,3]。蛋白激酶 C α (protein kinase C alpha, PKC - α) 是 TNF - α 的一个下游信号分子, 肾损伤时 PKC - α 向核周转位激活^[4]; 应用 PKC 抑制剂可明显改善缺血再灌注的移植肾的损伤^[5]。为了明确在大鼠 GMCs 中, PKC - α 能否被 TNF - α 激活并参与其信号转导, 笔者应用 Western blot、免疫荧光、免疫电镜及 PKC 活性定量检测方法, 观察了 TNF - α 对 PKC - α 表达量及活性的影响, 探讨 TNF - α 引起 HRS 时 GFR 下降的分子机制。

材料与方法

1. 材料: 大鼠系膜细胞株, 货号: CX0130, 武汉生物细胞库; DMEM 培养液, 货号: 16000 - 044, Gibco 公司; 标准胎牛血清, 货号: 12800 - 017, Gibco 公司; TNF - α , 货号: T0157, Sigma 公司; PKC - α 抗体, 货号: SC12356, Santa Cruze 公司; FITC 标记的羊抗兔 IgG, 货号: ZF0315 北京中山生物技术有限公司; Rec - protein G sepharose 4B, 货号: 101241, Invitrogen 公司; PepTag^R Assay for Non - Radioactive Detection of Protein Kinase C Kit, 货号: V5330, Promega 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 货号: P0012, 碧云天公司; Enhanced chemiluminescence (ECL) 试剂盒, 货号: 32106, Pierce 公司。

2. 分组: 按 TNF - α (100 μ g/L) 处理 GMCs 的不同时间点 (0, 4, 8, 24h) 分 4 组。

3. PKC - α 的免疫荧光染色: 用 PBS 液代替一抗做空白

对照。GMCs 爬片后, TNF - α 处理 0, 4, 8, 24h; 4% 多聚甲醛固定 15min; 正常羊血清封闭 37 $^{\circ}$ C 20min, 勿洗; 一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜 (1:100 兔抗小鼠 PKC - α); 二抗 (FITC 标记的羊抗兔 IgG) 37 $^{\circ}$ C 30min, 蒸馏水洗片, 缓冲甘油封片, 荧光显微镜观察。

4. PKC α 免疫电镜: 培养瓶中培养细胞, TNF - α 处理 0, 4, 8, 24h。0.25% 胰酶消化, PBS 洗涤并离心, 细胞沉淀用 3% 戊二醛固定, 1% 锇酸后固定, 树脂包埋, 超薄切片, 捞于覆有 Formvar 膜的镍网上, 1% 的双氧水室温 10min; 羊血清封闭 30min; 一抗 (1:50 兔抗小鼠 PKC - α) 室温 2h; 1% 牛血清白蛋白 5min; 胶体金二抗 (1:25) 室温 1h; 醋酸铀 15min, 蒸馏水冲洗; 滤纸吸干, 37 $^{\circ}$ C 烤干, 透射电镜观察。

5. 免疫沉淀 PKC - α 及 PKC - α 活性检测: 培养瓶中培养细胞, TNF - α 处理 0, 4, 8, 24h, 每组每代细胞设 2 个样本, 并用不同代细胞重复 4 次 ($n = 8$)。加蛋白裂解液 500 μ l 提蛋白, 4 $^{\circ}$ C 14000r/min 离心 5min, BCA 法蛋白定量并调成均一浓度 (1 μ g/ μ l)。200 μ l 蛋白样品中加 0.4 μ g PKC - α 一抗及 40 μ l Protein G Agarose, 4 $^{\circ}$ C 缓慢摇动 3h。离心 5s, 去上清, PBS 洗沉淀 3 次后用于后续实验。按 PKC 活性检测试剂盒说明于冰上建立反应体系, 即在含特异性 PKC - α 纯化蛋白的 1ml 离心管中, 分别加入 PKC reaction 5 $\times$ buffer 5 μ l, C1 Peptide 5 μ l, 超声乳化的 PKC activator 5 $\times$ solution (1mg/ml 磷脂酰丝氨酸) 5 μ l, Peptide protection solution 1 μ l, 30 $^{\circ}$ C 水浴 30min, 95 $^{\circ}$ C 灭活 10min, 0.8% 琼脂糖电泳 (电泳液 pH 8.0 的 50mmol/L Tris - HCl) 15min, 紫外下数码凝胶成像。应用数码凝胶呈像分析软件分析。PKC - α 活性 = 活化带灰度值/同一样本非活化带灰度值。

6. Western blot 分析: 生长于 6 孔板中 GMCs, 经 TNF - α 处理 0, 4, 8, 24h 后, 每组每代细胞设 2 个样本, 并用不同代细胞重复 4 次 ($n = 8$)。PBS 洗, 加 RIPA 蛋白裂解液 15min, 12000r/min 离心 15min, 收集上清。BCA 法测定蛋白浓度。用蒸馏水将蛋白样品调成相同浓度, 加上样缓冲液沸水煮 5min。加样孔注入提取液 (蛋白 30 μ g) 及标准分子质量蛋白, 8% SDS - PAGE 电泳 100V 3h。50V 转膜 2h; 5% 脱脂奶粉的

TBST 封闭过夜;一抗(1:500 兔抗小鼠 PKC- α)室温 2h;二抗(1:3000)室温 2h;ECL 显影,观察分子质量 80kDa 条带,并以分子质量 45kDa 的 β -actin 作为内参,应用数码凝胶呈像分析软件分析。PKC- α 蛋白含量 = 样本 PKC- α 蛋白灰度值/同一样本 β -actin 灰度值。

7. 统计学方法:采用 SPSS 10.0 软件分析,计量资料数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间的比较经方差齐性检验后采用单因素方差分析(LSD 法), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 荧光显微镜及透射电镜下 PKC- α 的分布:正常情况下 PKC- α 在胞质中呈弥漫性分布,核内无表达。TNF- α 处理 8、24h 组 PKC- α 存在明显的向核周聚集,胞核内也可见少量 PKC- α 表达,以 TNF- α 处理 8h 时最明显(图 1、图 2)。

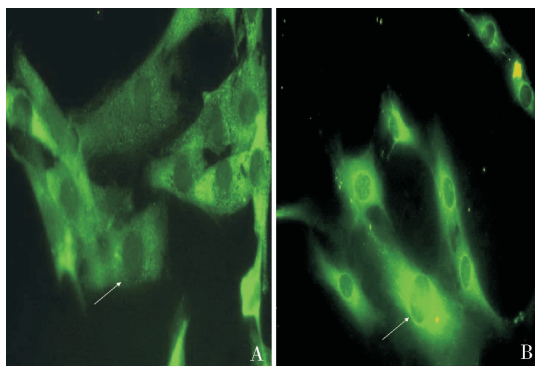


图 1 荧光显微镜下 TNF- α 对 PKC- α 的转位激活($\times 200$)

A. 对照组,PKC- α 在胞质中呈弥漫性分布,核内无表达;B. TNF- α 处理 8h 组,PKC- α 向核周、核内转位

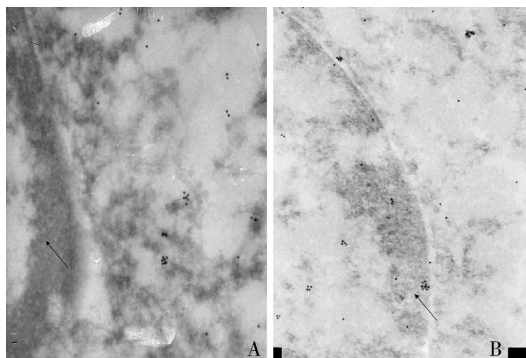


图 2 透射电镜下 TNF- α 对 PKC- α 转位的影响($\times 40000$)

A. 对照组,PKC- α 在胞质中呈弥漫性分布,核内无表达(箭头所示);B. TNF- α 处理 8h 组,PKC- α 向核周、核内转位(箭头所示)

2. PKC- α 活性检测:对照组细胞有中等强度 PKC- α 的活性带(正常情况下 PKC- α 对细胞的生长发育即起到了一定作用)。TNF- α 处理 8、24h

后,PKC- α 活性带较 0h 明显增强(4h: 1.11 ± 0.96 , $P = 0.612$; 8h: 1.87 ± 0.25 , $P = 0.000$; 24h: 1.68 ± 0.14 , $P = 0.000$ vs 0h: 1.07 ± 0.06),以 TNF- α 处理 8h 组 PKC- α 活性增加的最明显($P = 0.017$ vs 24h)(图 3)。

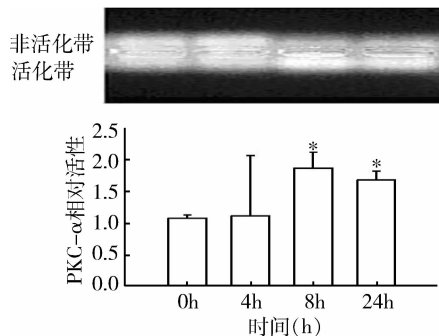


图 3 TNF- α 对 PKC- α 活性的影响

与 0h 组比较, * $P < 0.05$

3. Western blot 分析 PKC- α 蛋白表达:TNF- α 处理 0、4、8、24h 各组在 80kDa 处均可见特异性的 PKC- α 蛋白条带及 45kDa 处内参 β -actin 蛋白条带。对各条带进行灰度分析发现各组 PKC- α 蛋白表达无明显差异(4h: 0.75 ± 0.13 ; 8h: 0.76 ± 0.12 ; 24h: 0.78 ± 0.10 , vs 0h: 0.84 ± 0.11 , $P > 0.05$)(图 4)。TNF- α 处理组与对照组间相比,PKC- α 蛋白的表达无变化。

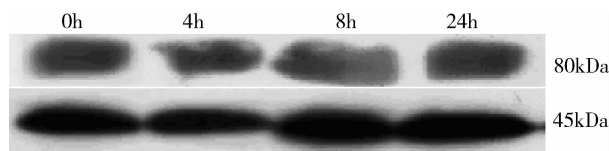


图 4 TNF- α 对 PKC- α 蛋白表达的影响

讨 论

肝肾综合征时 GFR 明显下降,其确切发病机制不详。被普遍接受的假说是由于内脏血管扩张最终导致了肾脏血管收缩及肾脏血流低灌注,而局部产生的一氧化氮是引起内脏血管扩张的原因^[6,7]。此外,细菌移位、各种细胞因子、肠系膜血管生成也是内脏血管扩张的原因。肾脏自调节功能的改变也参与了肾脏血管收缩^[8]。HRS 时血中 TNF- α 水平明显升高^[9]。近来一些国外文献均证实了拮抗 TNF- α 可预防肝肾综合征的发生,并推测其可能参与了内脏高动力循环与炎症过程,但目前对其确切的信号转导机制的研究很少^[10,11]。本课题组前期体外研究证实了 TNF- α 具有增强肾血管收缩的作用^[12]。GMCs 与

血管平滑肌细胞相似,其收缩可减少肾小球毛细血管祥数量、滤过面积以及滤过系数,使 GFR 降低。系膜细胞的舒缩功能与 PKC 激活有密切关系^[13,14]。而 PKC- α 是肾脏 PKC 的主要成分,正常时 PKC- α 以无活性形式弥漫分布于胞质,核内无表达。受刺激后激活的 PKC- α 主要向胞核和核周转位^[15]。笔者实验结果表明:①TNF- α 处理组 PKC- α 有转位激活现象,即 PKC- α 向核周移动,并证明了无活性的 PKC- α 向有活性的 PKC- α 转化增加;②TNF- α 不能引起 PKC- α 蛋白含量增加。因此,笔者认为:TNF- α 引起 PKC- α 活性升高可能是导致 GFR 下降的一个重要事件,这条信号通路与 TNF- α 引起脑微血管内皮细胞屏障衰竭的信号通路以及 TNF- α 抑制胰岛素的信号通路是一致的。进一步在肝肾综合征的动物模型上研究能否通过阻断 PKC- α 终止 TNF- α 引起的 IP₃RI 蛋白过表达,将为未来的靶向治疗提供依据。

参考文献

- 1 Zaza S, Bonny O, Liaudet L. Hepatorenal syndrome in patients with liver cirrhosis[J]. *Nephrol Ther*, 2005, 1: 174-182
- 2 闻颖, 崔巍, 刘沛. 暴发性肝衰竭时肾脏 I 型 1,4,5-三磷酸肌醇受体表达增加[J]. *中华肝脏病杂志*, 2007, 15(6): 403-407
- 3 王静艳, 孙景春, 吕飒, 等. 肿瘤坏死因子- α 增强大鼠肾小球前小动脉平滑肌细胞内 I 型 1,4,5-三磷酸肌醇受体表达[J]. *中华内科学杂志*, 2002, 41: 86-89
- 4 Padanilam BJ. Induction and subcellular localization of protein kinase C isozymes following renal ischemia[J]. *Kidney Int*, 2001, 59: 1789-1797
- 5 Fuller TF, Kusch A, Chaykovska L, et al. Protein kinase C inhibition ameliorates posttransplantation preservation injury in rat renal transplants[J]. *Transplantation*, 2012, 94(7): 679-686
- 6 Prakash J, Mahapatra AK, Ghosh B, et al. Clinical spectrum of renal disorders in patients with cirrhosis of liver[J]. *Ren Fail*, 2011, 33: 40-46
- 7 Kayali Z, Herring J, Baron P, et al. Increased plasma nitric oxide, L-arginine, and arginase-1 in cirrhotic patients with progressive renal dysfunction[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24: 1030-1037
- 8 Wong F. Recent advances in our understanding of hepatorenal syndrome[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2012, 9(7): 382-391
- 9 KiKi I, Yilmaz O, Erdem F, et al. Response to relationship between circulating levels of tumour necrosis factor- α and child-pugh scores in liver cirrhosis[J]. *Int J Clin Pract*, 2007, 61: 520
- 10 Riaz H, Tahir F, Munir MB. On the role of pentoxifylline versus other TNF- α inhibitors in the prevention of hepatorenal syndrome[J]. *Med Hypotheses*, 2012, 79(4): 552-553
- 11 Tyagi P, Sharma P, Sharma BC, et al. Prevention of hepatorenal syndrome in patients with cirrhosis and ascites: a pilot randomized control trial between pentoxifylline and placebo[J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 23(3): 210-217
- 12 闻颖, 王静艳, 刘沛. 肿瘤坏死因子- α 增强肾血管收缩作用的研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11(10): 583-585
- 13 Jin JS, Yao CW, Ka SM, et al. IgA immune complex blunts the contraction of cultured mesangial cells through the inhibition of protein kinase C and intracellular calcium[J]. *Chin J Physiol*, 2004, 47(2): 79-87
- 14 Chen JS, Lee HS, Jin JS, et al. Attenuation of mouse mesangial cell contractility by high glucose and mannitol: involvement of protein kinase C and focal adhesion kinase[J]. *J Biomed Sci*, 2004, 11: 142-151
- 15 Godson C, Masliah E, Balboa MA, et al. Isoform-specific redistribution of protein kinase C in living cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 21: 63-71

(收稿日期: 2012-08-12)

(修回日期: 2012-09-26)

尘螨过敏的变应性鼻炎集群免疫与常规免疫治疗的疗效及安全性临床对照研究

凡启军 刘国钧 刘学军 高金建 黄赛瑜 倪丽艳

摘要 **目的** 比较集群免疫方案和常规免疫方案用于标准化尘螨变应原治疗持续性过敏性鼻炎的疗效和安全性。**方法** 60 例中重度持续性螨过敏变应性鼻炎患者,以安脱达屋尘螨疫苗行特异性免疫治疗,其中 28 例患者接受集群免疫治疗,32 例患者接受常规免疫治疗,通过两组鼻结膜症状与体征总评分评价临床疗效,同时观察局部不良反应和全身不良反应发生率以评价治疗的安全性。**结果** 集群免疫治疗在 6 周左右达到维持剂量,剂量累加阶段疗程较常规治疗组缩短 60% 以上,在观察 6 周后,

作者单位: 325027 温州医学院附属第二医院耳鼻咽喉科

通讯作者: 倪丽艳, 电子信箱: nily2001@126.com