

# 骨化三醇对实验性 IgA 肾病大鼠 IL-17、ROR $\gamma$ t 的调节作用

高敏<sup>1,2</sup>, 罗静<sup>3</sup>, 李荣山<sup>2,4</sup>, 王利华<sup>1,2</sup>, 郭琿<sup>1,2</sup>

1. 山西医科大学第二医院肾内科, 山西 太原 030001; 2. 山西省肾脏病研究所, 山西 太原 030001;  
3. 山西医科大学第二医院风湿科, 山西 太原 030001; 4. 山西省人民医院肾内科, 山西 太原 030012

**摘要:** 目的 观察维甲酸相关孤儿受体(retinoid-related orphan receptor, ROR) $\gamma$ t、白介素(IL)-17 在实验性 IgA 肾病大鼠中的表达情况, 以及骨化三醇对 ROR $\gamma$ t、IL-17 的调节作用。方法 30 只雄性 Wistar 大鼠随机抽取 20 只, 建立 IgA 肾病大鼠模型, 再随机分为 IgA 肾病组( $n=10$ )、骨化三醇治疗组( $n=10$ ), 另 10 只为正常对照组。骨化三醇治疗组采用骨化三醇(10 ng/100 g 体重)灌胃治疗, 其他两组不予治疗。2 周后处死大鼠, 取肾脏冰盐水冲洗后切块, 以逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 ROR $\gamma$ t mRNA 及 IL-17 mRNA 的表达水平; 处死前常规检测 3 组 24 h 尿蛋白、尿红细胞计数、血肌酐水平。结果 经光镜及免疫荧光检查证实造模成功。IgA 肾病组与正常组比较, 24 h 尿蛋白含量、尿红细胞计数、ROR $\gamma$ t mRNA、IL-17 mRNA 的表达水平均显著升高( $P$  均  $< 0.01$ ); 骨化三醇治疗组与 IgA 肾病组比较, 上述指标均显著降低( $P$  均  $< 0.01$ ), 但仍高于正常对照组( $P$  均  $< 0.01$ )。结论 ROR $\gamma$ t、IL-17 可能参与 IgA 肾病的发生、发展; 骨化三醇可能通过直接或间接下调 ROR $\gamma$ t、IL-17 的表达, 对 IgA 肾病有一定治疗作用。

**关键词:** 骨化三醇; IgA 肾病; 维甲酸相关孤儿受体  $\gamma$ t; 辅助性 T 细胞 17; 白介素-17

**中图分类号:** R 692 R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2015)04-0414-04

## Regulating effect of calcitriol on ROR $\gamma$ t and IL-17 in rats with IgA nephropathy

GAO Min\*, LUO Jing, LI Rong-shan, WANG Li-hua, GUO Hui

\* Department of Nephrology, Second Hospital of Shanxi Medical University, Shanxi Province

Kidney Disease Research Institute, Taiyuan, Shanxi 030001, China

Corresponding author: GUO Hui, E-mail: ghty966@126.com

**Abstract: objective** To observe the expressions of retinoid-related orphan receptor (ROR) $\gamma$ t and interleukin (IL)-17 and the regulating effect of calcitriol on them in rats with IgA nephropathy. **Methods** Out of 30 male Wistar rats, 20 were randomly selected to set up the model of IgA nephropathy including IgA nephropathy group and calcitriol treatment group ( $n=10$  each), and the remaining 10 rats were served as normal control group. Calcitriol was administered by gavage (10 ng/100 g body weight) in calcitriol treatment group, and no treatment was given in the other groups. All rats were killed two weeks later. The kidney was taken and cut into pieces after salt water washing to detect the expression levels of ROR $\gamma$ t mRNA and IL-17 mRNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The 24-hour urine protein, urine red blood cell count and serum creatinine were routinely examined before killing the rats. **Results** Confirmed by light microscope and immunofluorescence examination, the model of IgA nephropathy was successfully established. The content of 24-hour urinary protein, urine red blood cell count and the expression levels of ROR $\gamma$ t mRNA and IL-17 mRNA in IgA nephropathy group increased significantly compared with normal control group (all  $P < 0.01$ ). The aforementioned indexes in calcitriol treatment group decreased significantly compared with IgA nephropathy group (all  $P < 0.01$ ) but were still higher than those in normal control group (all  $P < 0.01$ ). **Conclusions** ROR $\gamma$ t and IL-17 may participate in the occurrence and development of IgA nephropathy. Calcitriol may play a therapeutic role for IgA nephropathy by down-regulating the expres-

sions of ROR $\gamma$ t and IL-17 directly or indirectly.

**Key words:** Calcitriol; IgA nephropathy; Retinoid-related orphan receptor  $\gamma$ t; Interleukin-17

IgA 肾病 (IgA nephropathy) 是一种自身免疫性肾小球疾病。Turner 等<sup>[1]</sup> 研究发现, Th17 细胞引起的免疫反应在肾脏炎症性疾病的发病中起到关键作用。因此, 维甲酸相关孤儿受体 (retinoid-related orphan receptor, ROR) $\gamma$ t、白介素 (IL)-17 作为 Th17 细胞转录的关键因子及主要的效应因子, 在 IgA 肾病的发病、发展中的作用越来越受到重视。Zold 等<sup>[2]</sup> 发现, 维生素 D 缺乏与多种自身免疫性疾病发病有关。尽管已有大量研究表明骨化三醇存在免疫调节作用, 目前已用于 1 型糖尿病、炎症性肠病、系统性红斑狼疮等的治疗<sup>[3]</sup>, 但其作用机制尚不十分明确。骨化三醇是否在 IgA 肾病中具有同样的治疗作用, 其作用机理如何? 本研究通过观察 IgA 肾病大鼠中 ROR $\gamma$ t、IL-17 的表达, 探讨 ROR $\gamma$ t、IL-17 在 IgA 肾病大鼠发病中的作用, 以及骨化三醇是否可通过干预 ROR $\gamma$ t 和/或 IL-17 来防治 IgA 肾病的进展和可能的干预机制。

## 1 材料与方法

**1.1 大鼠 IgA 肾病模型的建立** 健康清洁级雄性 Wistar 大鼠 30 只, 鼠龄 8~10 周, 体重 180~220 g。由山西医科大学实验动物中心提供。造模所用试剂四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>, 上海国药集团化学试剂有限公司)、脂多糖 (LPS, 美国 Sigma 公司)、牛血清白蛋白 (BSA, 美国 Amresco 公司)、蓖麻油 (湖北生化试剂公司)、骨化三醇 (上海罗氏制药有限公司)。20 只按文献<sup>[4]</sup> 介绍的 IgA 肾病模型改良方法造模, 采用 BSA + CCl<sub>4</sub> + LPS 联合造模。口服 BSA 400 mg/kg, 隔日灌胃 1 次, 持续 12 周; 每周 1 次皮下注射 CCl<sub>4</sub> 0.1 ml + 0.3 ml 蓖麻油, 共 12 周; 第 8 周末开始每只每次尾静脉注射 0.05 mg LPS。10 只正常对照组在相同时间予同体积蒸馏水灌胃, 同等量生理盐水尾静脉及皮下注射。实验期间所有大鼠自由饮食、饮水 (蒸馏水)。

**1.2 大鼠 IgA 肾病模型的鉴定及动物分组** 实验第 12 周取杀 1 只造模大鼠, 取肾脏行光镜及免疫荧光检查, 以鉴定造模成功与否。将造模大鼠随机分为 IgA 肾病组 ( $n=10$ )、骨化三醇治疗组 ( $n=10$ )。骨化三醇治疗组每日骨化三醇 (10 ng/100 g 体重) 灌胃, IgA 肾病组与正常对照组 ( $n=10$ ) 每日灌胃同等量蒸馏水, 共 2 周。2 周后处死大鼠。取肾脏冰盐水冲洗后切块, 液氮速冻, -70 °C 冰箱保存备用。

**1.3 逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测各组大**

鼠 ROR $\gamma$ t mRNA、IL-17 mRNA 的相对表达量 RNAi-so Plus 抽提试剂、RNA 逆转录试剂盒、RT-PCR SYBR Green 试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司, ROR $\gamma$ t、IL-17 及  $\beta$ -actin 的引物由上海生工生物科技公司提供, 引物序列如下:

ROR $\gamma$ t-F: 5'-CGGTAGGTGGAAGTGGTGTGTC-3'

ROR $\gamma$ t-R: 5'-GCAGGGAGGAACTGAAGACC-3'

IL-17-F: 5'-TCTCCAGAACGTGAAGGTCAA-3'

IL-17-R: 5'-CAGAGTCCAGGCTGAAGTGG-3'

$\beta$ -actin F: 5'-TGAAGTACCCCATTGAACACGG-3'

$\beta$ -actin R: 5'-TGCTCGAAGTCTAGGGCAACATA-3'

取大鼠肾脏组织 100 mg, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 取 2  $\mu$ l 总 RNA; 按照反转录说明书反转录合成 cDNA, 以此为模板分别用 ROR $\gamma$ t、IL-17 引物进行 RT-PCR, 反应体系 20  $\mu$ l, 反应条件: 95 °C 2 min, 95 °C 15 s, 65 °C 30 s, 40 个循环结束后, 读取 CT 值, 利用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算各目的基因的相对表达量。

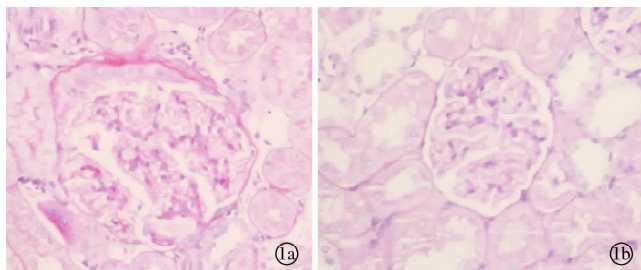
**1.4 常规检测指标** 处死前检测各组大鼠的 24 h 尿蛋白、尿红细胞、血肌酐的变化。

**1.5 统计学方法** 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 若满足方差齐性与正态分布, 多组间比较采用单因素方差分析; 两两比较采用 LSD-*t* 检验; 否则采用秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 IgA 肾病动物模型情况** 实验期间, 造模组死亡 3 只, 剩余有不同程度的精神萎靡、反应性减低、食量减少、皮毛蓬乱、肉眼血尿等现象; 正常对照组均未见明显异常。光镜 (PAS 染色,  $\times 400$ ): 造模组肾小球系膜区细胞及基质增生, 部分肾小球可见细胞新月体形成及炎性细胞浸润; 肾小管上皮细胞空泡变性、刷状缘脱落; 肾间质炎性细胞浸润, 毛细血管管腔狭窄。正常对照组未见明显异常。见图 1。免疫荧光检查 (IF,  $\times 400$ ): 造模组系膜区 IgA + + +; 正常对照组系膜区 IgA  $\pm$ 。见图 2。

**2.2 3 组 24 h 尿蛋白、尿红细胞计数、血肌酐比较** 与正常对照组比较, IgA 肾病组 24 h 尿蛋白含量、尿红细胞计数均显著升高 ( $P$  均  $< 0.01$ ); 与 IgA 肾病组比较, 骨化三醇治疗组 24 h 尿蛋白含量、尿红细胞计数均显著降低 ( $P$  均  $< 0.01$ )。但各组血肌酐水平比较差异无统计学意义 ( $P$  均  $> 0.05$ )。见表 1。



注:1a:IgA 肾病组;1b:对照组。

图 1 大鼠肾脏组织光镜检查(PAS, ×400)

表 1 3 组 24 h 尿蛋白、尿红细胞计数、  
血肌酐水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	24 h 尿蛋白 (mg/24 h)	尿红细胞计数 (个/ $\mu$ l)	血肌酐 ( $\mu$ mol/L)
对照组	10	8.78 ± 0.59	6.10 ± 0.99	41.77 ± 2.33
IgA 肾病组	7	48.73 ± 1.16 <sup>a</sup>	466.12 ± 8.04 <sup>a</sup>	44.24 ± 1.92
治疗组	9	22.62 ± 1.00 <sup>ab</sup>	265.37 ± 8.50 <sup>ab</sup>	42.99 ± 2.27
F/H 值		3.309	22.283	5.336
P 值		<0.01	<0.01	>0.05

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 IgA 肾病组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

表 2 3 组大鼠脾脏组织 ROR $\gamma$ t/IL-17 mRNA 表达水平比较  
( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	ROR $\gamma$ t mRNA	IL-17 mRNA
对照组	10	0.0300 ± 0.0010	0.0207 ± 0.0016
IgA 肾病组	7	0.2067 ± 0.0014 <sup>a</sup>	0.1607 ± 0.0019 <sup>a</sup>
治疗组	9	0.1196 ± 0.0019 <sup>ab</sup>	0.1269 ± 0.0021 <sup>ab</sup>
F/H 值		1.568	6.987
P 值		<0.01	<0.01

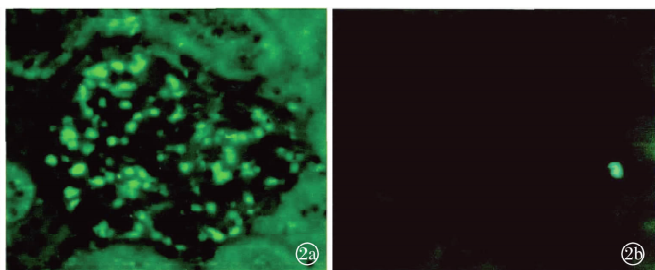
注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 IgA 肾病组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

2.3 3 组 ROR $\gamma$ t、IL-17 mRNA 表达情况比较 与对照组比较,IgA 肾病组 ROR $\gamma$ t、IL-17 mRNA 的表达水平显著升高( $P$  均  $< 0.01$ );与 IgA 肾病组比较,骨化三醇治疗组 ROR $\gamma$ t、IL-17 mRNA 的表达显著下降( $P$  均  $< 0.01$ )。见表 2。

### 3 讨论

IL-17 是辅助性 T 细胞 17(Th17)分泌的主要效应因子,能有效介导组织的炎症反应。当 IL-17 与 IL-17 受体结合后,通过 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、激活蛋白-1(AP-1)、CCAAT 增强子结合蛋白 $\delta$ (C/EBP $\delta$ )等转录因子的活性,以及 JAK(Janus kinase)家族和信号传导及转录激活因子(STAT)1、2、3、4 的酪氨酸磷酸化的活化等多种途径而介导炎症反应<sup>[5-9]</sup>。ROR 属于激素核受体超家族成员,其包括 3 个成员,分别是 ROR $\alpha$ 、ROR $\beta$ 、ROR $\gamma$ t,其中 ROR $\gamma$ t 是特异性表达于人和鼠 Th17 细胞的主要转录因子,能促进 Th17 细胞分化。

Steinmetz 等<sup>[10]</sup>通过野生型大鼠与 ROR $\gamma$ t<sup>-/-</sup>大鼠比较表明,ROR $\gamma$ t 在肾炎的发病与进展中发挥着决



注:2a:IgA 肾病组;2b:对照组。

图 2 大鼠肾脏组织免疫荧光检查(IF, ×400)

定性作用。Lin 等<sup>[11]</sup>发现,在 Ig 肾病患者的外周血中 Th17、ROR $\gamma$ t、IL-6、IL-17A、IL-23、IL-21、IL-1 $\beta$  明显升高,导致肾脏的进一步损伤。另外,Turner 等<sup>[1]</sup>发现,当外周血中 Th17 细胞升高时,Th17 细胞直接浸润使肾脏分泌趋化因子 CCL20 或刺激宿主细胞产生 CCL20,CCL20 与相应的受体结合后,促进肾脏炎症细胞的募集,引起肾脏的损伤。

骨化三醇即 1,25-二羟维生素 D<sub>3</sub> [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>],是维生素 D 主要的活性代谢产物,其主要通过与细胞核受体—维生素 D 受体(VDR)结合后发挥作用。目前已证实<sup>[12-14]</sup>,1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 通过以下机制调节 Th17 细胞:(1)1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 通过树突状细胞,间接抑制 Th17 细胞的分化;(2)在 CD4<sup>+</sup>T 细胞的介导下,通过抑制 RhoA/ROCK 信号途径,增强 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 的活性,进一步抑制 IL-17、ROR $\gamma$ t、TGF- $\beta$ 、IL-6、IL-23 等的产生;(3)Th17 细胞的分化需要一些基因(如 NF-AT、NF- $\kappa$ B、STAT3、ROR $\gamma$ t、干扰素调节因子-4 等)的参与,通过上述因子,1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 抑制 Th17 细胞的分化。

本研究通过 RT-PCR 证实了在 IgA 肾病中 ROR $\gamma$ t、IL-17 表达水平升高,经骨化三醇干预后,ROR $\gamma$ t、IL-17 降低,提示 ROR $\gamma$ t、IL-17 可能参与 IgA 肾病的发生、发展;骨化三醇通过下调 ROR $\gamma$ t、IL-17 水平对 IgA 肾病起一定治疗作用。有关骨化三醇能否通过其他信号途径延缓或抑制 IgA 肾病的发生、发展,还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Turner JE, Paust HJ, Steinmetz OM, et al. The Th17 immune response in renal inflammation[J]. Kidney Int, 2010, 77(12): 1070-1075.
- [2] Zold E, Barta Z, Bodolay E. Vitamin D deficiency and connective tissue disease[J]. Vitam Horm, 2011, 86: 261-286.
- [3] Ginanjar E, Sumariyono, Setiati S. Vitamin D and autoimmune disease[J]. Acta Med Indones, 2007, 39(3): 133-141.

(下转第 425 页)

- multiple sclerosis [J]. *Neurology*, 1994, 44 ( 11 Suppl 9 ) : S70 - S78.
- [6] Smith C, Birnbaum G, Carter JL, et al. Tizanidine treatment of spasticity caused by multiple sclerosis: results of a double-blind, placebo-controlled trial US Tizanidine Study Group [J]. *Neurology*, 1994, 44 ( 11 Suppl 9 ) : S34 - S42.
- [7] Emre M, Leslie GC, Muir C, et al. Correlations between dose, plasma concentrations, and antispastic action of tizanidine (Sirdalud) [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1994, 57(11) : 1355 - 1359.
- [8] Nance PW, Sheremata WA, Lynch SG, et al. Relationship of the antispasticity effect of tizanidine to plasma concentration in patients with multiple sclerosis [J]. *Arch Neurol*, 1997, 54(6) : 731 - 736.
- [9] Vakhapova V, Auriel E, Karni A. Nightly sublingual tizanidine HCl in multiple sclerosis: clinical efficacy and safety [J]. *Clin Neuropharmacol*, 2010, 33(3) : 151 - 154.
- [10] Gold R, Oreja-Guevara C. Advances in the management of multiple sclerosis spasticity: multiple sclerosis spasticity guidelines [J]. *Expert Rev Neurother*, 2013, 13(12 Suppl) : 55 - 59.
- [11] Flachenecker P, Henze T, Zettl UK. Spasticity in patients with multiple sclerosis-clinical characteristics, treatment and quality of life [J]. *Acta Neurol Scand*, 2014, 129(3) : 154 - 162.
- [12] Beard S, Hunn A, Wight J. Treatments for spasticity and pain in multiple sclerosis: a systematic review [J]. *Health Technol Assess*, 2003, 7(40) : iii, ix - x, 1 - 111.
- [13] Kaddar N, Vigneault P, Pilote S, et al. Tizanidine (Zanaflex): a muscle relaxant that may prolong the QT interval by blocking IKr [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2012, 17(1) : 102 - 109.
- [14] Haas J. Pathophysiology, assessment and management of multiple sclerosis spasticity: an update [J]. *Expert Rev Neurother*, 2011, 11(4 Suppl) : 3 - 8.

收稿日期: 2014 - 12 - 20 修回日期: 2015 - 01 - 15 编辑: 王国品

(上接第 416 页)

- [4] 张静, 李静, 桑晓红, 等. 运用两种 BSA 剂量建立 IgA 肾病大鼠模型观察 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2013, 14(1) : 13 - 16, F2 - F3.
- [5] Tsai HC, Velichko S, Hung LY, et al. IL-17A and Th17 cells in lung inflammation: an update on the role of Th17 cell differentiation and IL-17R signaling in host defense against infection [J]. *Clin Dev Immunol*, 2013 : 267971.
- [6] Arakawa T, Masaki T, Hirai T, et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 correlates with cell proliferation and renal injury in human glomerulonephritis [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(11) : 3418 - 3426.
- [7] Iyoda M, Shibata T, Kawaguchi M, et al. IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: synergy with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 298(3) : F779 - F787.
- [8] Ho AW, Gaffen SL. IL-17RC: a partner in IL-17 signaling and beyond [J]. *Semin Immunopathol*, 2010, 32(1) : 33 - 42.
- [9] Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(8) : 556 - 567.
- [10] Steinmetz OM, Summers SA, Gan PY, et al. The Th17-defining transcription factor ROR $\gamma$ t promotes glomerulonephritis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(3) : 472 - 483.
- [11] Lin FJ, Jiang GR, San JP, et al. Imbalance of regulatory T cells to Th17 cells in IgA nephropathy [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2012, 72(3) : 221 - 229.
- [12] Palmer MT, Lee YK, Maynard CL, et al. Lineage-specific effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the development of effector CD4 T Cells [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(2) : 997 - 1004.
- [13] Tang J, Zhou R, Luger D, et al. Calcitriol suppresses anti-retinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response [J]. *J Immunol*, 2009, 182(8) : 4624 - 4632.
- [14] Paintlia AS, Paintlia MK, Hollis MK, et al. Interference with RhoA-ROCK signaling mechanism in autoreactive CD4<sup>+</sup> T Cells enhances the bioavailability of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(3) : 993 - 1006.

收稿日期: 2014 - 12 - 12 修回日期: 2015 - 02 - 10 编辑: 王国品