

巨噬细胞移动抑制因子在盐敏感性高血压大鼠肾损伤中的表达及意义

王海燕, 宁少雄, 尚志星, 邵珊, 乔晞, 王利华

山西医科大学第二医院肾内科 山西省肾脏病研究所, 山西 太原 030001

摘要: **目的** 研究盐敏感性高血压大鼠肾损伤中巨噬细胞移动抑制因子(MIF)表达的变化及 MIF 抑制剂(ISO-1)对肾脏的保护作用。**方法** 40 只健康雄性 SD 大鼠,行左肾摘除术后存活 30 只,随机分为 3 组:空白组 8 只,皮下注射等量的植物油,饮用自来水。其余用作造模;皮下注射醋酸去氧皮质酮(DOCA)油剂($30\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{周}^{-1}$),饮用 1% NaCl,0.2% KCl 盐水,8 周后取其中造模成功的大鼠 16 只,随机分为模型组和干预组,每组 8 只。第 9 周开始干预组以 ISO-1 $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ 隔日皮下注射,模型组和空白组以等量的生理盐水皮下注射,持续 4 周。各组大鼠每周监测收缩压。于 0、4、8、12 周检测 24 h 尿蛋白定量。实验完成后处死大鼠,取右肾标本,做 HE 染色后观察肾脏组织病理改变,半定量分析肾小管的损伤程度。Western 印迹法检测肾组织中 MIF 蛋白的表达。**结果** 12 周时,与空白组比较,模型组的收缩压[(112.41 ± 0.87) mm Hg vs (175.12 ± 0.89) mm Hg],24 h 尿蛋白量[(3.53 ± 0.30) mg vs (19.66 ± 0.48) mg],MIF 的表达量[(0.0515 ± 0.0005) vs (0.6525 ± 0.0282)]明显增高(P 均 < 0.05),肾脏尤其肾小管的病理损伤较空白组明显加重;与模型组比较,干预组的收缩压[(175.12 ± 0.89) mm Hg vs (139.23 ± 1.12) mm Hg],24 h 尿蛋白量[(19.66 ± 0.48) mg vs (7.71 ± 0.84) mg],MIF 的表达量[(0.6525 ± 0.0282) vs (0.5564 ± 0.0007)]明显降低(P 均 < 0.05),肾脏尤其肾小管的病理损伤较模型组减轻。**结论** MIF 可能参与盐敏感性高血压大鼠肾脏损伤的过程,ISO-1 可减轻 MIF 对肾脏的损伤,保护肾脏。

关键词: 盐敏感性高血压; 肾损伤; 巨噬细胞移动抑制因子; ISO-1

中图分类号: R 544.1 R-33 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2015)07-0840-04

Expression and significance of MIF in salt sensitive hypertension rats with renal injury

WANG Hai-yan, NING Shao-xiong, SHANG Zhi-xing, SHAO Shan, QIAO Xi, WANG Li-hua

Department of Nephrology, Shanxi Kidney Disease Institute, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

Corresponding author: WANG Li-hua, E-mail: lihuawang236@126.com

Abstract: Objective To study the changes of macrophage migration inhibitory factor(MIF) expression in the salt sensitive hypertension with renal damage and the renal protective effect of ISO-1 (MIF inhibitor). **Methods** Out of 40 male SD rats after left-nephrectomy, 30 survival rats were randomly divided into 3 groups: (1) the rats in blank group ($n = 8$) were administered by subcutaneous injection of equivalent vegetable oil and fed with tap water. (2) the remainder 22 rats were used as modeling; the rats were administered by subcutaneous injection of desoxycorticosterone acetate (DOCA) oil ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{week}^{-1}$) and fed with 1% NaCl, 0.2% KCl salt water, and 16 rats successfully modeled after 8 weeks were randomly divided into model group and intervention group ($n = 8$ each). From the ninth week, the rats in intervention group were administered by subcutaneous injection of ISO-1 ($200 \mu\text{g}/\text{kg}, \text{qod}$), and the rats in model group and blank group were administered by subcutaneous injection of equal normal saline for four weeks. Systolic pressures were measured weekly. The 24-hour urine proteins quantity was respectively measured in 0-, 4-, 8- and 12-week. The rats were killed after finishing the experiment, and the right kidney samples were taken. The HE staining was made to observe the pathological changes of kidney tissues and analyze the renal tubular damage degree by semi-quantitative determination. The expression of MIF protein in renal tissues was detected by Western blot method. **Results** Compared with blank group at 12-week, the systolic pres-

sure $[(112.41 \pm 0.87) \text{ mm Hg vs } (175.12 \pm 0.89) \text{ mm Hg}]$, 24-hour urinary protein quantity $[(3.53 \pm 0.30) \text{ mg vs } (19.66 \pm 0.48) \text{ mg}]$, amount of MIF expression $[(0.0515 \pm 0.0005) \text{ vs } (0.6525 \pm 0.0282)]$ in the model group increased significantly (all $P < 0.05$); compared with model group, the systolic pressure $[(175.12 \pm 0.89) \text{ mm Hg vs } (139.23 \pm 1.12) \text{ mm Hg}]$, 24-hour urinary protein quantity $[(19.66 \pm 0.48) \text{ mg vs } (7.71 \pm 0.84) \text{ mg}]$, amount of MIF expression $[(0.6525 \pm 0.0282) \text{ vs } (0.5564 \pm 0.0007)]$ in the intervention group decreased significantly (all $P < 0.05$), and the pathological damages in the kidney especially the kidney tubules lightened significantly. **Conclusion** MIF might participate in the renal damage process in salt sensitive hypertension rats, and ISO-1 can ease MIF-induced kidney damage, thus protect the kidney.

Key words: Salt sensitive hypertension; Renal damage; Macrophage migration inhibitory factor; ISO-1

高血压肾损害导致的肾功能衰竭约占终末期肾脏病的 20% 以上, 而盐敏感者在高血压人群中高达 28% ~ 74%^[1]。经研究, 巨噬细胞移动抑制因子 (MIF) 是一种强大的炎症前细胞因子, 在多种肾脏病变中, 肾固有细胞可高表达 MIF, 从而诱发肾组织炎症损伤, 加剧肾小球系膜区 IV 型胶原的聚集, 并最终促成肾脏的硬化^[2]。ISO-1 [(S, R)-3-(4-hydroxyphenyl)-4, 5-dihydro-5-isoxazole Acetic acid methyl ester] MIF 抑制剂] 能抑制 MIF 酶的活性与促炎活性, 从而达到一定的抗炎和减缓免疫损伤的作用^[3], 本文旨在研究 MIF 在盐敏感性高血压肾损伤模型中的表达及 ISO-1 对肾脏的保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 健康 SD 雄性大鼠 40 只 (山西医科大学动物室提供), 醋酸去氧皮质酮 (Sigma 公司提供), MIF 抗体 (圣克鲁斯生物技术公司提供), ISO-1 (美国的 abcam 公司提供), 山羊抗小鼠 IgG (上海生物工程有限公司提供)

1.2 模型制造 雄性 SD 大鼠 40 只, 体重 150 ~ 180 g, 适应性饲养 1 周。术前禁饮食 12 h, 10% 水合氯醛 (0.3 ml · 100 g⁻¹) 腹腔麻醉, 切除左肾, 术后连续 2 d 腹腔注射青霉素预防感染。

1.3 实验分组 存活大鼠 30 只随机分为空白组 8 只、实验组 22 只。空白组大鼠皮下注射植物油, 饮用自来水, 实验组大鼠皮下注射醋酸去氧皮质酮 30 mg · kg⁻¹ · 周⁻¹, 饮用 1% NaCl, 0.2% KCl 盐水, 用 BP-6A 无创血压仪每周监测大鼠血压, 收缩压 $\geq 140 \text{ mm Hg}$ (1 mm Hg = 0.133 kPa) 或者较基础收缩压上升 30 mm Hg 者为造模成功^[4]。取造模成功的高血压大鼠 16 只随机分为模型组和干预组, 每组 8 只。干预组于第 9 周予 ISO-1 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 隔日皮下注射, 连续 4 周^[3]。

1.4 比色法检测 24 h 尿蛋白定量 入组大鼠于 0、4、8、12 周代谢笼收集 24 h 尿液, 采用考马斯亮蓝法 (CBB 法) 检测每份尿标本蛋白浓度, 乘以 24 h 尿

量, 计算尿蛋白排泄量。

1.5 HE 染色 实验结束后的肾组织采用福尔马林固定, 石蜡包埋, 切片, 切片脱蜡后做 HE 染色, 观察肾小管的损伤程度。损伤表现有: 肾小管细胞空泡样变, 颗粒样变, 炎性渗出, 纤维化。评分标准如下: 无损伤 0 分; 损伤面积 $\leq 10\%$ 1 分; 11% ~ 25% 2 分; 26% ~ 45% 3 分; 46% ~ 75% 4 分; $\geq 76\%$ 5 分, 每张切片至少选 10 个皮髓交界部视野 ($\times 400$)。上述观察采用彩色图像分析仪由专人盲法进行分析^[5]。

1.6 蛋白印迹法 (Western Blot) 检测 MIF 蛋白的表达 按上海生物工程全蛋白提取试剂盒说明书提取肾组织中的蛋白, 检测蛋白浓度, 将 40 μg 样品轻轻加至凝胶孔中进行电泳, 电泳后转移样品蛋白至 PVDF 膜上。取出转移膜置于封闭液中, 室温、摇床上缓慢摇动状态下封闭 1 h; 将封闭后的膜直接放入稀释的一抗工作液中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜; 用 1 \times TBST 洗涤三次后将膜放入二抗工作液 (1:5 000) 中, 室温、避光缓慢摇动作用 60 min; 用 1 \times TBST 洗膜; 曝光、洗片, 胶片经光密度图像扫描仪扫描, 对条带进行吸光度测定。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, 两样本均数间比较采用 LSD-*t* 检验, 方差不齐者进行 Dunnett'S T_3 检验, 不同时点指标比较采用重复测量方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血压 各组大鼠基础收缩压值差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。与空白组相比, 模型组收缩压 4 周时明显升高 ($P < 0.05$), 持续到实验结束。干预组收缩压 12 周时与模型组相比, 明显降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 尿蛋白定量 8 周末模型组 24 h 尿蛋白定量与空白组相比, 明显升高 ($P < 0.05$)。干预组 24 h 尿蛋白定量 12 周末明显低于模型组 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 肾脏病理

2.3.1 HE 染色 空白组肾小管正常。模型组大鼠肾组织可见肾小球肿胀,系膜细胞和基质增生。肾小管肿胀,上皮受损面积较大,部分空泡样变及颗粒样变,有炎性细胞渗出,个别大鼠可见肾小管呈纤维化变性。干预组肾小管空泡样变性减轻,间质的炎症细胞渗出减少。见图 1。

2.3.2 半定量分析 每张切片选 12 个皮髓交界部视野($\times 400$),每组选 8 张片子进行观察与统计,空白组损伤分数为 1.650 ± 0.283 ,模型组 4.875 ± 0.504 ,干预组 3.386 ± 1.022 ,模型组高于空白组($P < 0.05$),干预组低于模型组($P < 0.05$)。见表 2。

2.4 Western Blot 检测 MIF 蛋白表达结果 取 12 周末实验结束后的大鼠肾脏组织做 Western Blot 检测 MIF 蛋白表达量,结果用各组的灰度值与相应 Actin 灰度值的比值表示显示:空白组 MIF 蛋白的表达量很少,模型组的表达量明显增多($P < 0.05$),干预组 MIF 蛋白的表达量较模型组减少($P < 0.05$)。见表 3。

表 1 各组大鼠收缩压值 (mm Hg, $n = 8, \bar{x} \pm s$)

时段	空白组	模型组	干预组
0 周	110.12 ± 0.92	107.95 ± 0.84	109.23 ± 0.62
4 周	113.23 ± 1.21	$138.23 \pm 1.21^*$	$139.12 \pm 0.84^*$
8 周	112.31 ± 0.95	$152.42 \pm 1.06^*$	$151.33 \pm 0.67^*$
12 周	112.41 ± 0.87	$175.12 \pm 0.89^*$	$139.23 \pm 1.12^{*\Delta}$

注:与空白组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠 24 h 尿蛋白定量 (mg/h, $n = 8, \bar{x} \pm s$)

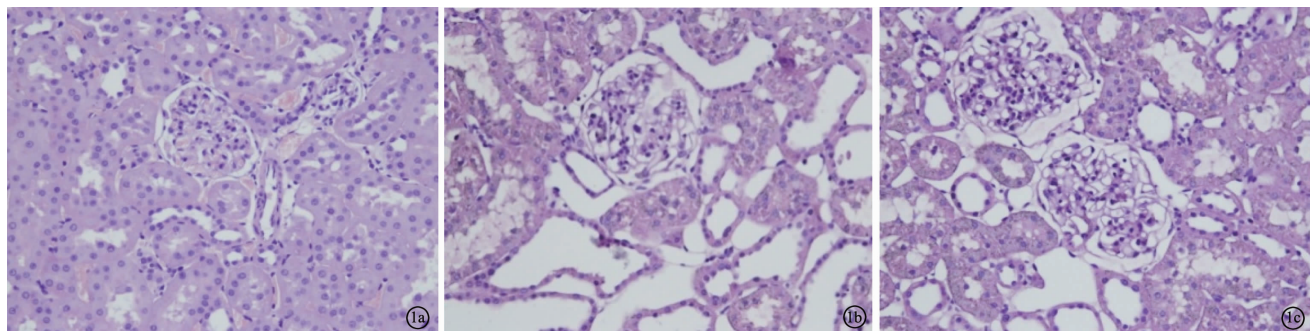
时段	空白组	模型组	干预组
0 周	3.61 ± 0.19	3.95 ± 0.84	4.23 ± 0.62
4 周	3.44 ± 0.31	8.44 ± 0.39	8.12 ± 0.58
8 周	3.51 ± 0.29	$17.65 \pm 0.48^*$	$18.92 \pm 0.92^*$
12 周	3.53 ± 0.30	$19.66 \pm 0.48^*$	$7.71 \pm 0.84^{\Delta}$

注:与空白组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

表 3 各组大鼠肾小管损伤分数与 MIF 吸光度值 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	损伤分数值	蛋白印记
空白组	1.650 ± 0.283	0.0515 ± 0.0005
模型组	$4.875 \pm 0.504^*$	$0.6525 \pm 0.0282^*$
干预组	$3.386 \pm 1.022^{*\Delta}$	$0.5564 \pm 0.0007^{*\Delta}$

注:与空白组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$ 。



注:1a:空白组;1b:模型组;1c:干预组

图 1 3 组大鼠肾组织 HE 染色($\times 400$)

3 讨论

高血压肾损伤已经成为慢性肾脏病的重要原因之一,已有实验证实,在各种高血压的肾损伤的模型中,肾间质都有大量的巨噬细胞和 T 淋巴细胞的浸润^[6]。

在盐敏感性高血压肾损伤的过程中,多种炎症细胞及免疫机制参与其中^[4],而 MIF 由激活的巨噬细胞,树突状细胞和 T 淋巴细胞产生,可以稳定表达并储存在细胞内,通过抑制巨噬细胞的游走,促进巨噬细胞在炎症局部的聚集、增生、活化及分泌一些细胞因子(如 IL-1、TNF- α 等),从而引起巨噬细胞的激活和肾脏炎症的发生^[3,7-10];研究表明,给大白兔注射肾毒血清的同时腹腔注射抗 MIF 中和抗体,巨噬细胞在肾脏组织中的浸润明显减少,肾组织病理损伤明显减轻,血肌酐水平较对照组明显下降,能有效防止

肾组织损害的发生发展,说明 MIF 在免疫介导的肾脏疾病中起着重要作用^[2],MIF 参与多种炎症性和免疫性肾脏疾病的发生与加重过程^[11,12-14]。

近年来,随着研究者对 MIF 在机体生命活动中一系列生理及病理生理作用的相继确认,利用抗 MIF 单克隆抗体在许多免疫炎症反应动物模型(如:类风湿性关节炎、脓毒败血症、免疫性肾小球肾炎等)的治疗上取得很好的结果,但是抗 MIF 单克隆抗体与 MIF 毕竟是通过一种抗原抗体反应起作用,对机体的远期影响未能确认,且抗体的造价高,不易于推广使用^[15]。ISO-1 是 MIF 右旋多巴铬色素互变异构酶的抑制剂,是一种无毒的小分子物质,它能与 MIF 活性催化位点不可逆的结合,从而强有力地抑制 MIF 酶的活性和促炎活性,阻断了其对肾脏组织的免疫和炎症损伤^[16]。

本研究中,模型组大鼠收缩压明显增高,24 h 尿

蛋白定量增多,肾脏的肾小管泡沫样改变,肿胀明显,炎症细胞大量渗出,肾小球系膜细胞和基质增生,Western Blot 检测此组 MIF 的表达量较空白组明显增多,应用 MIF 拮抗剂 ISO-1 干预组的相同指标相应减轻,提示 MIF 可能通过巨噬细胞的聚集、细胞因子增加及免疫反应机制参与了盐敏感性高血压肾损伤的过程,ISO-1 能有效防止肾组织损害的发生发展,对 MIF 造成的肾损伤有保护作用,对盐敏感性高血压肾损伤治疗有一定的指导意义。

参考文献

- [1] Ando K, Fujita T. Pathophysiology of salt sensitivity hypertension [J]. *Ann Med*, 2012, 44: S119 - S126.
- [2] Sasaki S, Nishihira J, Ishibashi T, et al. Transgene of MIF induces podocyte injury and progressive mesangial sclerosis in the mouse kidney [J]. *Kidney Int*, 2004, 65(2): 469 - 481.
- [3] Rammos C, Hendgen-Cotta UB, Sobierajski J, et al. Macrophage migration inhibitory factor is associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal disease [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168(6): 5249 - 5256.
- [4] 赵凤, 王利华, 李荣山, 等. 调节性 T 淋巴细胞在盐敏感性高血压大鼠肾脏损害中的作用 [J]. *中华高血压杂志*, 2013, 21(2): 135 - 140.
- [5] Melnikov VY, Faubel S, Siegmund B, et al. Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1-and IL-18-mediated ischemic acute tubular necrosis in mice [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(8): 1083 - 1091.
- [6] Tian N, Gu JW, Jordan S, et al. Immune suppression prevents renal damage and dysfunction and reduces arterial pressure in salt-sensitive hypertension [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(2): H1018 - H1025.
- [7] Matsumoto K, Fukuda N, Abe M, et al. Dendritic cells and macrophages in kidney disease [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2010, 14(1): 1 - 11.
- [8] 赵雅妮, 李惊子, 王海燕. 巨噬细胞在肾脏损伤中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(11): 2147 - 2150.
- [9] Mitchell RA, Liao H, Chesney J, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(1): 345 - 350.
- [10] Lan HY, Yang N, Nikolic-Paterson DJ, et al. Expression of macrophage migration Inhibitory factor in human glomerulonephritis [J]. *Kidney Int*, 2000, 57(2): 499 - 509.
- [11] 孔耀中, 黄英伟, 陈统清, 等. 巨噬细胞移动抑制因子在原发性肾小球肾炎肾脏组织中的表达及其意义 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2000, 16(2): 383 - 386.
- [12] Nicoletti F, Créange A, Orlikowski D, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) seems crucially involved in Guillain-Barré syndrome and experimental allergic neuritis [J]. *J Neuroimmunol*, 2005, 168(1/2): 168 - 174.
- [13] 张鹤, 赵军, 孙丽萍. 血清巨噬细胞移动抑制因子与慢性肾脏病患者微炎症及颈动脉粥样硬化的关系 [J]. *中国现代医药杂志*, 2014, 2(9): 1672 - 1673.
- [14] 赵然, 姚伟娟. 巨噬细胞迁移抑制因子的功能及临床研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2014, 2(45): 93 - 99.
- [15] Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis [J]. *Nat Med*, 2003, 9(5): 517 - 524.
- [16] Lubetsky JB, Dios A, Han J, et al. The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(28): 24976 - 24982.

收稿日期: 2015 - 02 - 01 修回日期: 2015 - 02 - 28 编辑: 王海琴