

## 基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001922

## 泼尼松对阿霉素肾病小鼠肾脏 Th17/Treg 免疫平衡的影响

吴悠, 李昊, 陈婉冰, 张丽, 王墨, 张高福, 阳海平, 李秋

(重庆医科大学附属儿童医院肾脏内科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地、儿童感染免疫重庆市重点实验室, 重庆 400014)

**【摘要】目的:**探讨阿霉素肾病小鼠肾脏局部 Th17/Treg 免疫平衡的变化及泼尼松对该模型肾脏局部 Th17/Treg 免疫平衡的影响。**方法:**6~8 周龄健康雄性 BALB/c 小鼠, 随机分为正常对照(Control)组、阿霉素肾病模型(adriamycin, ADR)组、低剂量泼尼松(prednisone, Pre)治疗[ADR+Pre(low)]组和高剂量泼尼松治疗[ADR+Pre(high)]组, 两治疗组于建模第 5 周行泼尼松悬液灌胃(13.5 mg/kg 和 18 mg/kg, 1 次/d, 共 8 周)。考马斯亮蓝法检测随机尿蛋白浓度; 肌酐试剂盒检测随机尿肌酐浓度; 肾脏组织病理 HE 染色及透射电镜观察肾脏病变情况; 流式细胞术检测肾脏局部 Th17 和 Treg 细胞比例。**结果:**随建模时间进展, 与 Control 组相比, ADR 组逐渐由微小病变型肾病综合征(minimal change nephrotic syndrome, MCNS)进展为局灶节段肾小球硬化(focal segmental glomerulosclerosis, FSGS), 随机尿蛋白/肌酐比值(random urinary protein-creatinine ratio, RUPCR)较对照组明显升高(均  $P=0.000$ ), 肾脏局部 Th17 明显升高(均  $P=0.000$ ), Treg 无明显差异, Th17/Treg 逐渐失衡(均  $P=0.000$ ); 与 ADR 组相比, 两泼尼松治疗组肾脏损伤均有不同程度的缓解, RUPCR 均明显下降(均  $P<0.01$ ), 且 ADR+Pre(high)组较 ADR+Pre(low)组下降更为明显( $P<0.05$ )。ADR+Pre(high)组较 ADR 组 Th17 明显下降( $P<0.05$ ), Treg 无明显差异, Th17/Treg 比值明显下降(均  $P<0.01$ )。**结论:**随阿霉素肾病小鼠肾脏 Th17/Treg 失衡加重, 肾脏损伤加重; 而早期应用泼尼松治疗可通过下调肾脏局部 Th17 水平, 延缓 Th17/Treg 失衡, 进而发挥肾脏保护作用。

**【关键词】**泼尼松; 阿霉素肾病; Th17/Treg**【中图分类号】**R725**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-04-17

## Effect of prednisone on Th17/Treg immunologic balance in mice with adriamycin nephropathy

Wu You, Li Hao, Chen Wanbing, Zhang Li, Wang Mo, Zhang Gaofu, Yang Haiping, Li Qiu

(Department of Nephrology, Children's Hospital of Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders; Chongqing Key Laboratory of Child Infection and Immunity)

**【Abstract】Objective:** To investigate the change in Th17/Treg immunologic balance in the kidney in mice with adriamycin(ADR) nephropathy and the effect of prednisone on Th17/Treg immunologic balance in the kidney in this model. **Methods:** Healthy male BALB/c mice aged 6~8 weeks were randomly divided into control group, ADR nephropathy group(ADR group), ADR+low-dose prednisone[ADR+Pre(low)] group, and ADR+high-dose prednisone[ADR+Pre(high)] group. Since week 5 after the model was established, the two treatment groups were given prednisone suspension by gavage at a dose of 13.5 and 18 mg/kg, respectively, once a day for 8 weeks. The Coomassie brilliant blue method was used to measure the concentration of random urinary protein; Serum Creatinine Kit was used to measure random urine creatinine; HE staining and a transmission electron microscope were used to observe renal histopathological changes; flow cytometry was used to measure the percentages of Th17 and Treg cells in the kidney. **Results:** Compared with the control group, the ADR group showed progression from minimal change nephrotic syndrome to focal segmental glomerulosclerosis and significant increases in random urinary protein-creatinine ratio(RUPCR) ( $P=0.000$ ) and percentage of Th17 cells in the kidney ( $P=0.000$ ), and there was no significant difference in the percentage of Treg between the two groups; the ADR group showed Th17/Treg imbalance ( $P=0.000$ ). Compared with the ADR group, the two prednisone treatment groups had varying degrees of relief of kidney injury and a significant reduction

作者介绍: 吴悠, Email: 357113540@qq.com,

研究方向: 儿童肾脏免疫。

通信作者: 李秋, Email: liqiu809@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上资助项目(编号: 81470946)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181105.1016.040.html>

(2018-11-06)

in RUPCR ( $P < 0.01$ ), and the ADR+Pre(high) group had a significantly greater reduction than the ADR+Pre(low) group ( $P < 0.05$ ). Compared with the ADR group, the ADR+Pre(high) group had significant reductions in Th17 cells ( $P < 0.05$ ) and Th17/Treg ratio ( $P < 0.01$ ), while there was no significant difference in Treg cells between the two groups. **Conclusion:** Kidney injury becomes worse with the aggravation of Th17/Treg imbalance in the kidney in mice with ADR nephropathy. Early prednisone treatment can downregulate the percentage of Th17 cells in the kidney, delay Th17/Treg imbalance, and thus protect the kidney.

**【Key words】**prednisone; adriamycin nephropathy; Th17/Treg

原发性肾病综合征(primary nephrotic syndrome, PNS)是儿童时期最常见的慢性肾脏疾病,也是我国儿童慢性肾功能衰竭(chronic renal failure, CRF)的重要原发疾病之一<sup>[1]</sup>。其病理类型包括 80%左右的微小病变型肾病综合征(minimal change nephrotic syndrome, MCNS)和部分非微小病变型肾病综合征(non-minimal change nephrotic syndrome, NMCNS),临床上运用糖皮质激素、免疫抑制剂及细胞毒药物可以使大部分 MCNS 患儿达到缓解,但对于 NMCNS 及少部分 MCNS 疗效仍欠佳。

国内外研究已证实,儿童不同病理类型 PNS 特别是非微小病变型,其肾脏局部常伴有不同程度的炎症反应,包括 Th1、Th2、Th17 及 Treg 等细胞在肾脏局部的浸润,这说明免疫性炎症是儿童 PNS 重要的病理生理变化,也是疾病慢性化进展至肾小球硬化、发生 CRF 的关键<sup>[2-3]</sup>。本课题组前期研究提示 CD4<sup>+</sup>T 细胞功能紊乱参与了 PNS 发病<sup>[4]</sup>,其中 Th17/Treg 细胞免疫失衡是儿童 PNS 发生发展的重要机制,且与 PNS 患儿对糖皮质激素治疗敏感性及预后密切相关<sup>[5-6]</sup>。糖皮质激素是儿童 PNS 治疗的首选药物,具有消除蛋白尿、改善肾功能、延缓肾脏病理改变等作用<sup>[7]</sup>,但其是否可通过调控 Th17/Treg 免疫平衡发挥肾脏保护作用,目前尚不清楚。本实验利用阿霉素肾病小鼠模型,根据人与动物用药剂量转换公式<sup>[8]</sup>,模拟临床上 2 种不同泼尼松口服剂量(1.5 mg/kg 及 2.0 mg/kg)进行干预,进而观察 2 种不同剂量泼尼松随时间进展对肾脏局部 Th17/Treg 免疫平衡的影响,初探其延缓肾脏损害的免疫学机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级健康雄性 BALB/c 小鼠(6~8 周龄) 60 只,体质量(24.813±1.952) g,购于重庆医科大学实验动物

中心[SYXK(渝)2012-0001],于重庆医科大学儿科研究所动物中心 SPF 级环境中饲养[SYXK(渝)2012-0015]。本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.1.2 实验试剂 考马斯亮蓝试剂购于上海碧云天生物技术有限公司;肌酐试剂盒购于南京建成生物科技有限公司;醋酸泼尼松片购于重庆科瑞制药有限公司;离子霉素、佛波酯购于美国 Sigma 公司;高尔基体阻断剂、细胞固定/通透液购于美国 BD 公司;大鼠抗小鼠 PE-CY5.5 CD3 抗体购于美国 BioLegend 公司;美洲仓鼠抗小鼠 FITC  $\gamma\delta$ TCR 抗体、大鼠抗小鼠 PE-CY7 CD4 抗体、大鼠抗小鼠 PE-CY7 CD8 抗体、大鼠抗小鼠 PE CD25 抗体、大鼠抗小鼠 PE IL-17 抗体、大鼠抗小鼠 APC Foxp3 抗体均购于美国 eBioscience 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 模型构建与分组 小鼠先随机分为:正常对照组(Control 组,  $n=18$ );阿霉素肾病模型组(ADR 组,  $n=42$ ),于第 0 周末接取尿液后(Control 组 2 只无尿,  $n=16$ ; ADR 组 6 只无尿,  $n=36$ ),ADR 组行一次性尾静脉注射阿霉素 10.5 mg/kg 造模,Control 组以等剂量生理盐水代替。建模第 4 周末:ADR 组小鼠死亡 3 只,接取两组尿液后各组随机处死 6 只小鼠,并将 ADR 组剩余 33 只小鼠进一步分组为 ADR 组( $n=11$ )、低剂量泼尼松治疗组[ADR+Pre(low)组,  $n=11$ ]及高剂量泼尼松治疗组[ADR+Pre(high)组,  $n=11$ ],对照组( $n=12$ )不变;小鼠尿液标本分组同前,Control 组(4 只无尿,  $n=14$ ),ADR 组(2 只无尿,  $n=9$ ),ADR+Pre(low)组(2 只无尿,  $n=9$ ),ADR+Pre(high)组(4 只无尿,  $n=7$ )。建模第 5 周始:根据不同物种用药剂量换算公式<sup>[8]</sup>,ADR+Pre(low)组及 ADR+Pre(high)组分别予以泼尼松 13.5 mg/kg(模拟临床剂量 1.5 mg/kg)及 18 mg/kg(模拟临床剂量 2.0 mg/kg)灌胃至建模第 12 周末,1 次/d,其余 2 组以生理盐水代替。建模第 8 周末:接取各组尿液,[对照组(2 只无尿,  $n=10$ ),ADR 组(5 只无尿,  $n=6$ ),ADR+Pre(low)组(1 只无尿,  $n=10$ ),ADR+Pre(high)组(2 只无尿,  $n=9$ )],随后每组各随机处死部分小鼠[对照组( $n=6$ ),ADR 组( $n=5$ ),ADR+Pre(low)组( $n=5$ ),ADR+Pre(high)组( $n=5$ )]。建模第 12 周末:接取各组尿液[对照组( $n=6$ ),ADR 组( $n=6$ ),ADR+Pre(low)组( $n=6$ ),ADR+Pre(high)组( $n=6$ )],随后处死各组小鼠[对照组( $n=6$ ),ADR 组( $n=6$ ),ADR+Pre(low)组(接尿后死亡 1 只,  $n=5$ ),ADR+Pre(high)组(接尿后死亡 1 只,  $n=5$ )]。

1.2.2 泼尼松悬液的制备 将每 5 mg 醋酸泼尼松片研碎后溶于 2 mL 生理盐水中,充分涡旋混匀后制成浓度为 2.5 mg/mL 的泼尼松悬液,用于灌胃。

1.2.3 随机尿蛋白浓度的检测 于建模第 0、4、8、12 周末收集小鼠随机尿液,取 96 孔板 1 块,每份尿液标本设置 1 个主孔及 1 个复孔,每孔中加入随机尿液 2  $\mu$ L、PBS 液 14  $\mu$ L 及考马斯亮蓝溶液 285  $\mu$ L 后盖上板盖,置于摇床上摇匀,放入酶标仪,在 595 nm 波长处进行尿蛋白吸光度(absorbance, A) 值测定并计算尿蛋白浓度。

1.2.4 随机尿肌酐含量的检测 于建模第 0、4、8、12 周末收集小鼠随机尿液,取 96 孔板 1 块,设置 3 孔,分别加入已用 PBS 稀释 10 倍的随机尿液 6  $\mu$ L、标准品 6  $\mu$ L 及 ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L,3 孔各再做 2 个复孔,再向各孔中加入酶溶液 A 试剂 180  $\mu$ L,37  $^{\circ}$ C 孵箱避光孵育 5 min 后,于酶标仪 546 nm 波长处测定 1 次 A 值,记为 A1;再向各孔中加入酶溶液 B 试剂 60  $\mu$ L,37  $^{\circ}$ C 孵箱避光孵育 5 min 后,于酶标仪 546 nm 波长处再测定 1 次 A 值,记为 A2,根据说明书公式计算随机尿液中的肌酐含量。

1.2.5 肾脏组织采集及病理检测 分别于建模第 4、8、12 周末,在生物安全设施无菌条件下,先将一侧肾脏剥离,取上段约 1 mm<sup>3</sup> 的肾脏皮质组织,浸泡于 4% 戊二醛固定后行透射电镜检测,余加入灭菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)研磨制备肾脏组织匀浆液;再用 PBS 将另一侧肾脏灌注洗至发白,取肾脏上 1/3 段皮质组织,经固定、脱水、包埋后制成石蜡切片(厚度为 3  $\mu$ m),行 HE 染色。

1.2.6 肾脏组织匀浆液中细胞数的调整 取部分制备好的肾脏组织匀浆液,离心弃上清,加入 2 mL 红细胞裂解液混匀后静置 10 min,加入 3 mL PBS 洗涤,离心弃上清,用含 10% 胎牛血清的 PRMI1640 培养基混悬至 2 mL,调整细胞数为  $1 \times 10^6$  个/mL,平均分为 2 管(Th17 管及 Treg 管)。

1.2.7 流式细胞术检测肾脏局部 Th17(CD<sub>3</sub><sup>+</sup>CD<sub>8</sub><sup>-</sup>TCR $\gamma$  $\delta$ -IL-17<sup>+</sup>T)细胞比例 向 Th17 管中加入佛波酯(100 ng/ $\mu$ L)0.5  $\mu$ L、离子霉素(1 000 ng/ $\mu$ L)1  $\mu$ L 及高尔基体阻断剂 0.7  $\mu$ L,混匀后置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中刺激 6 h;加 PBS 1 mL 洗涤 2 遍,离心弃上清;加 FITC  $\gamma$  $\delta$ TCR 抗体 2.5  $\mu$ L,4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min;再加 PE-CY5.5 CD<sub>3</sub> 抗体 2  $\mu$ L、PE-CY7 CD<sub>8</sub> 抗体 2.5  $\mu$ L,4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min;加 PBS 1 mL 洗涤 2 遍,离心弃上清;加细胞固定液 300  $\mu$ L,4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min;再加细胞通透液 300  $\mu$ L 洗涤 2 遍,离心弃上清;加大鼠血清 20  $\mu$ L 封闭 20 min;加 PE IL-17 抗体 10  $\mu$ L,4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min;加 PBS 1 mL 洗涤 2 遍,离心弃上清;再加 PBS 200  $\mu$ L 重悬细胞,在流式细胞仪上进行计数(注:Th17 本应以 CD<sub>3</sub><sup>+</sup>CD<sub>4</sub><sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>共同标记选定,但由于 PMA 及离子霉素刺激导致细胞表

面 CD<sub>4</sub> 分子部分脱落,使选定结果出现偏差,故用 CD<sub>8</sub> 反向标记 CD<sub>4</sub><sup>+</sup>部分,同时排除  $\gamma$  $\delta$ T17 细胞(CD<sub>3</sub><sup>+</sup>CD<sub>4</sub><sup>-</sup>CD<sub>8</sub><sup>-</sup>TCR $\gamma$  $\delta$ <sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>)的干扰,从而选定 Th17 细胞)。

1.2.8 流式细胞术检测肾脏局部 Treg(CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD<sub>25</sub><sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T)细胞比例 向 Treg 管加 PBS 1 mL 洗涤 2 遍,离心弃上清;加 PE-CY7 CD<sub>4</sub> 抗体 2  $\mu$ L、PE CD25 抗体 1.5  $\mu$ L,4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min;加 PBS 1 mL 洗涤 2 遍,离心弃上清;加细胞固定液 300  $\mu$ L,4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min;再加细胞通透液 300  $\mu$ L 洗涤 2 遍,离心弃上清;加 20  $\mu$ L 大鼠血清封闭 20 min;加 APC Foxp3 抗体 5  $\mu$ L,4  $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min;加 PBS 1 mL 洗涤 2 遍,离心弃上清;再加 PBS 200  $\mu$ L 重悬细胞,在流式细胞仪上计数。

### 1.3 统计学分析

所有统计运算利用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,GraphPad Prism 6.0 统计软件绘制统计图。结果以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组计量资料间均数差异比较采用非配对 *t* 检验;多组单因素比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 不同时间点各组随机尿蛋白/肌酐比值比较

第 0 周末,ADR 组与 Control 组无明显统计学差异( $t=0.919, P=0.363$ )。第 4 周末,4 组 RUPCR 水平具有统计学差异( $F=9.079, P=0.000$ );ADR 组、ADR+Pre(low)组及 ADR+Pre(high)组均较 Control 组明显升高(前 2 组均  $P=0.000$ ,后一组  $P=0.002$ ),3 组之间无明显统计学差异。第 8 周末,4 组 RUPCR 水平具有统计学差异( $F=8.737, P=0.000$ );ADR 组与 ADR+Pre(low)组均明显高于 Control 组(前组  $P=0.000$ ,后组  $P=0.002$ );而 ADR+Pre(high)组则明显低于 ADR 组( $P=0.002$ )。第 12 周末,4 组 RUPCR 水平具有统计学差异( $F=27.190, P=0.000$ );与 Control 组相比,ADR 组与 ADR+Pre(low)组均明显升高(前组  $P=0.000$ ,后组  $P=0.002$ );与 ADR 组相比,两治疗组均明显降低(两组均  $P=0.000$ ),且 ADR+Pre(high)组较 ADR+Pre(low)组更低( $P=0.010$ )(表 1)。

### 2.2 不同时间点各组肾脏组织 HE 染色及透射电镜

Control 组:第 4、8、12 周末,HE 及电镜均示肾小球及肾小管形态结构正常(图 1A、C、G,图 2A、C、G)。ADR 组:第 4 周末,HE 示肾小球及肾小管形态结构正常(图 1B),电镜可见足细胞足突部分融合,提示微小病变(图 2B);第 8 周末,HE 示肾小球内较多系膜基质填充,肾间质可见少量炎症细胞浸润(图 1D),电镜可见足细胞足突广泛融合,系膜细胞未见增生(图 2D);第 12 周末,HE 及电镜均可见 FSGS 形成,肾间质可见大量炎症细胞浸润(图 1H),系膜细胞大量增生(图

表 1 不同时间点各组随机尿蛋白 / 肌酐比值

组别	第 0 周末	第 4 周末	第 8 周末	第 12 周末
Control 组	0.151 ± 0.068 (n=16)	0.089 ± 0.019 (n=14)	0.059 ± 0.037 (n=10)	0.040 ± 0.018 (n=6)
ADR 组	0.168 ± 0.054 (n=36)	0.482 ± 0.209 <sup>a</sup> (n=9)	0.308 ± 0.179 <sup>a</sup> (n=6)	0.173 ± 0.034 <sup>a</sup> (n=6)
ADR+Pre (low) 组		0.474 ± 0.313 <sup>a</sup> (n=9)	0.210 ± 0.107 <sup>b</sup> (n=10)	0.103 ± 0.030 <sup>b,d</sup> (n=6)
ADR+Pre (high) 组		0.434 ± 0.292 <sup>b</sup> (n=7)	0.132 ± 0.068 <sup>c</sup> (n=9)	0.051 ± 0.016 <sup>b,e</sup> (n=6)
t/F 值	0.919 <sup>f</sup>	9.079 <sup>g</sup>	8.737 <sup>g</sup>	27.190 <sup>g</sup>
P 值	0.363	0.000	0.000	0.000

注:表格中第 0 周对应的样本仅 2 组,故采用非配对 *t* 检验,统计量值为 *t*=0.919,对应 *P*=0.363;第 4 周对应样本有 4 组,故采用单因素方差分析,统计量值 *F*=9.079,对应总体 *P*=0.000,组间两两比较采用 LSD 检验计算,组间两两比较对应 *P* 值为下方 a~e 表示;第 8 周分析方法同第 4 周,统计量值 *F*=8.737,对应总体 *P*=0.000,组间两两比较采用 LSD 检验计算,组间两两比较对应 *P* 值为下方 a~e 表示;第 12 周分析方法同第 4 周,统计量值 *F*=32.470,对应总体 *P*=0.000,组间两两比较采用 LSD 检验计算,组间两两比较对应 *P* 值为下方 a~e 表示

a:与 Control 组比较,*P*=0.000;b:与 Control 组比较,*P*=0.002;c:与 ADR 组比较,*P*=0.002;d:与 ADR 组比较,*P*=0.000;e:与 ADR+Pre (low) 组比较,*P*=0.010;f:*t* 值;g:*F* 值

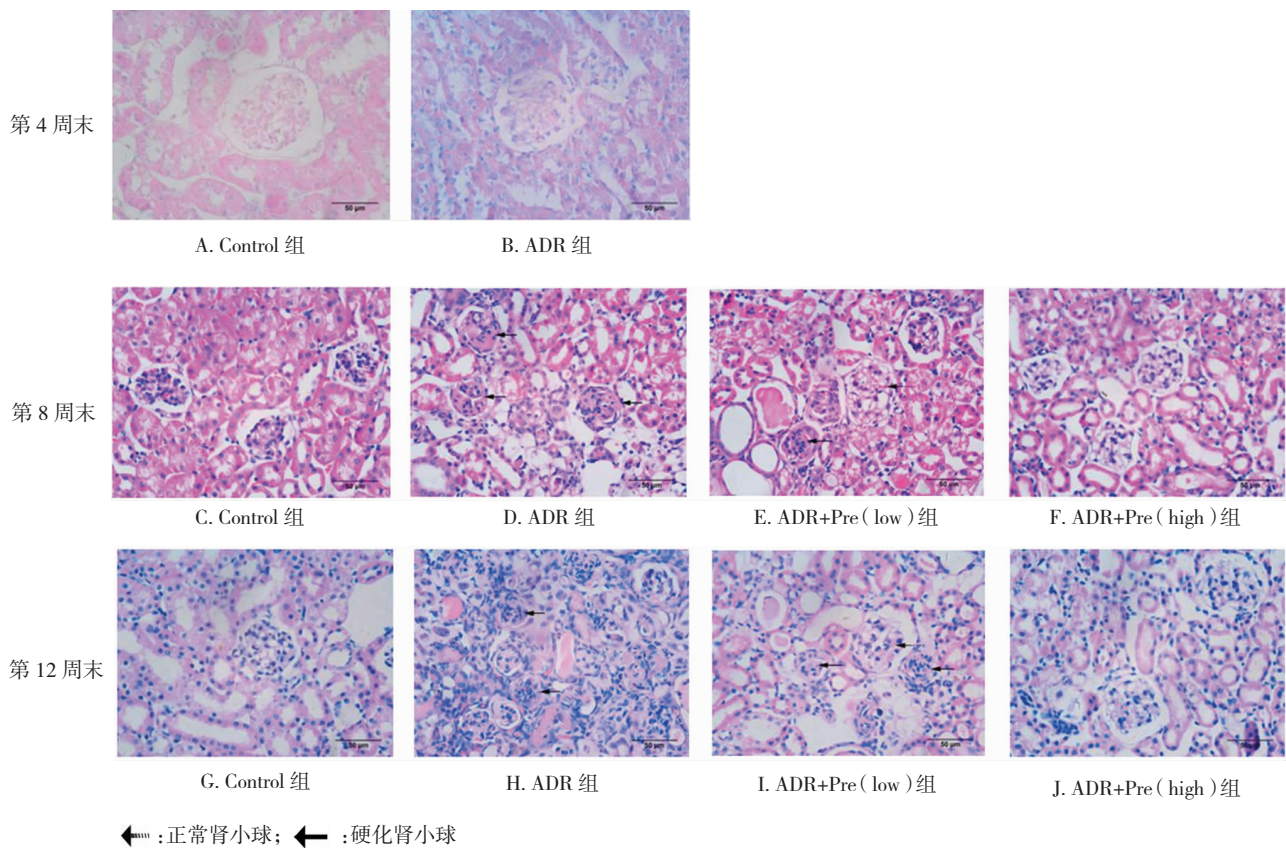


图 1 不同时间点肾脏组织 HE 染色 (400 ×)

2H)。ADR+Pre(low)组:第 8、12 周末,HE 可同时见到正常形态结构和有系膜基质填充的肾小球,肾间质有少量炎症细胞浸润(图 1E、I);电镜于第 8 周末可见足细胞足突多节段性融合,系膜细胞未见增生(图 2E),第 12 周末,可同时见到足细胞足突大片段融合及正常的区域,系膜细胞增生(图 2I)。ADR+Pre(high)组:第 8、12 周末,HE 均示肾小球形态结构正常(图 1F、J),电镜可见足细胞足突部分融合,未见系膜细胞

增生(图 2F、J)。

### 2.3 不同时间点各组小鼠肾脏局部 Th17、Treg 细胞比例及 Th17/Treg 比值的比较

2.3.1 Th17(CD<sub>3</sub><sup>+</sup>CD<sub>8</sub><sup>-</sup>TCRγδ<sup>-</sup>IL-17<sup>+</sup>T)细胞 第 4 周末,ADR 组与 Control 组无明显统计学差异(*t*=0.756,*P*=0.467)。第 8 周末,4 组 Th17 细胞水平具有统计学差异(*F*=31.552,*P*=0.000);ADR 组及 ADR+Pre(low)组肾脏局部 Th17 水平均明

显高于 Control 组(前组  $P=0.000$ , 后组  $P=0.002$ ); ADR+Pre (low) 组及 ADR+Pre (high) 组均明显低于 ADR 组(均  $P=0.000$ ); ADR+Pre (high) 组较 ADR+Pre (low) 组 Th17 水平更低( $P=0.015$ )。第 12 周末, 4 组 Th17 细胞水平具有统计学差异( $F=12.448, P=0.000$ ); ADR 组、ADR+Pre (low) 组、ADR+Pre (high) 组肾脏局部 Th17 水平均明显高于 Control 组[ADR 组  $P=0.000$ , ADR+Pre (low) 组  $P=0.005$ , ADR+Pre (high) 组  $P=0.040$ ]; ADR+Pre (low) 组与 ADR+Pre (high) 组 Th17 细胞水平较 ADR 组均明显降低(前组  $P=0.020$ , 后组  $P=0.002$ ), 但两组比较无统计学差异(表 2, 图 3, 图 4)。

2.3.2 Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T) 细胞 第 4、8、12 周末, 4 组肾脏局部 Treg 细胞比例均无统计学差异(表 3, 图 5, 图 6)。

2.3.3 Th17/Treg 细胞比值 第 4 周末, ADR 组与 Control 组无明显差异( $t=0.506, P=0.624$ )。第 8 周末, 4 组肾脏局部 Th17/Treg 细胞比值差异具有统计学意义( $F=33.699, P=0.000$ ); ADR 组、ADR+Pre (low) 组、ADR+Pre (high) 组均明显高于 Control 组(ADR 组  $P=0.000$ , ADR+Pre (low) 组  $P=0.004$ , ADR+Pre (high) 组  $P=0.012$ ); 两治疗组均明显低于 ADR 组(均  $P=0.000$ ), 但两组治疗组相比无统计学差异。第 12 周末, 四组肾脏局部 Th17/T

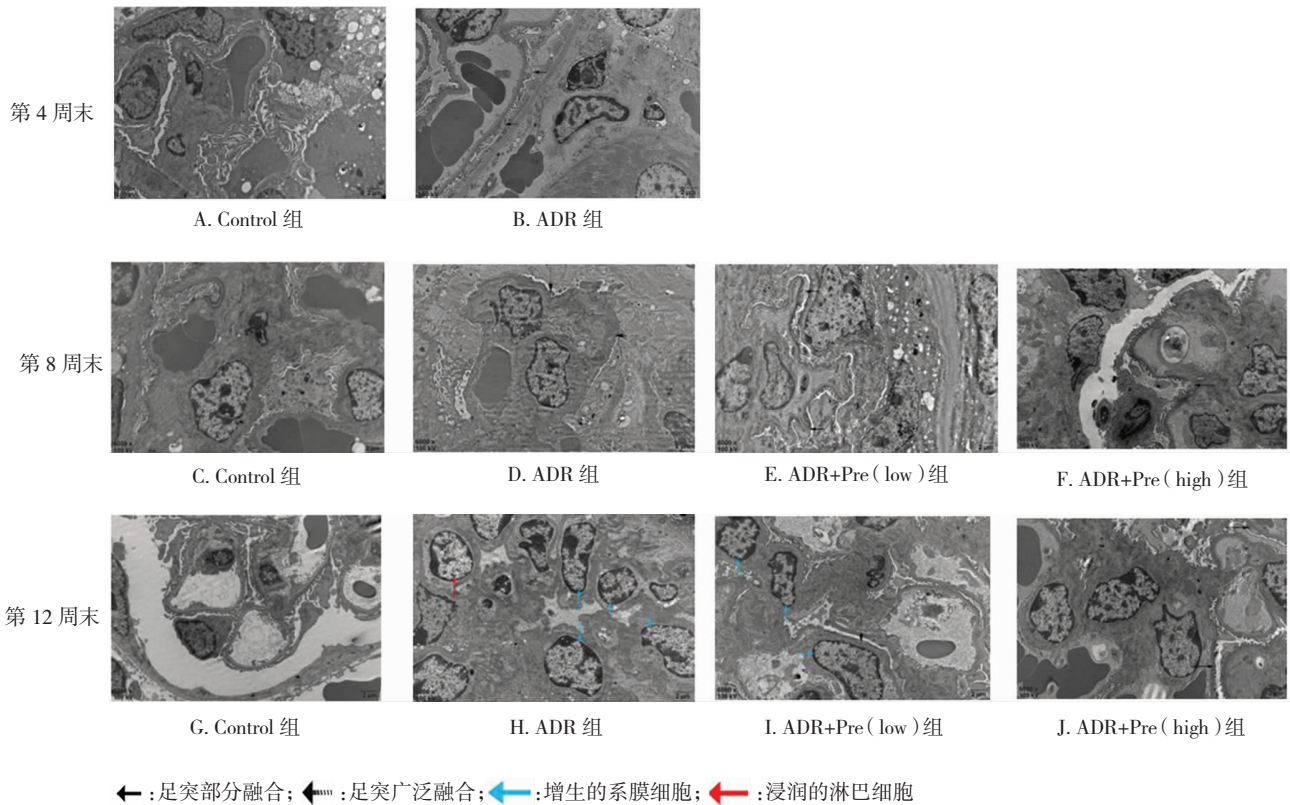


图 2 不同时间点肾脏组织透射电镜 (6 000 ×)

表 2 不同时间点各组肾脏局部 Th17 细胞比例

组别	第 4 周末	第 8 周末	第 12 周末
Control 组	1.345 ± 0.245 (n=6)	1.022 ± 0.131 (n=6)	2.780 ± 1.145 (n=6)
ADR 组	1.433 ± 0.145 (n=6)	2.515 ± 0.263 <sup>a</sup> (n=5)	7.750 ± 1.515 <sup>a</sup> (n=6)
ADR+Pre (low) 组		1.643 ± 0.377 <sup>bc</sup> (n=5)	5.549 ± 1.981 <sup>bc</sup> (n=5)
ADR+Pre (high) 组		1.176 ± 0.290 <sup>cd</sup> (n=5)	4.697 ± 0.855 <sup>bd</sup> (n=5)
<i>t/F</i> 值	0.756 <sup>i</sup>	31.552 <sup>j</sup>	12.448 <sup>j</sup>
<i>P</i> 值	0.467	0.000	0.000

注: 表格中第 4 周对应的样本仅两组, 故采用非配对 *t* 检验, 统计量值为  $t=0.756$ , 对应  $P=0.624$ ; 第 8 周对应样本有 4 组, 故采用单因素方差分析, 统计量值  $F=31.552$ , 对应总体  $P=0.000$ , 组间两两比较对应 *P* 值为下方 a~h 表示; 第 12 周分析方法同第 8 周, 统计量值  $F=12.448$ , 对应总体  $P=0.000$ , 组间两两比较对应 *P* 值为下方 a~h 表示

a: 与 Control 组比较,  $P=0.000$ ; b: 与 Control 组比较,  $P=0.002$ ; c: 与 ADR 组比较,  $P=0.000$ ; d: 与 ADR+Pre (low) 组比较,  $P=0.015$ ; e: 与 Control 组比较,  $P=0.005$ ; f: 与 Control 组比较,  $P=0.040$ ; g: 与 ADR 组比较,  $P=0.020$ ; h: 与 ADR 组比较,  $P=0.002$ ; i: *t* 值; j: *F* 值

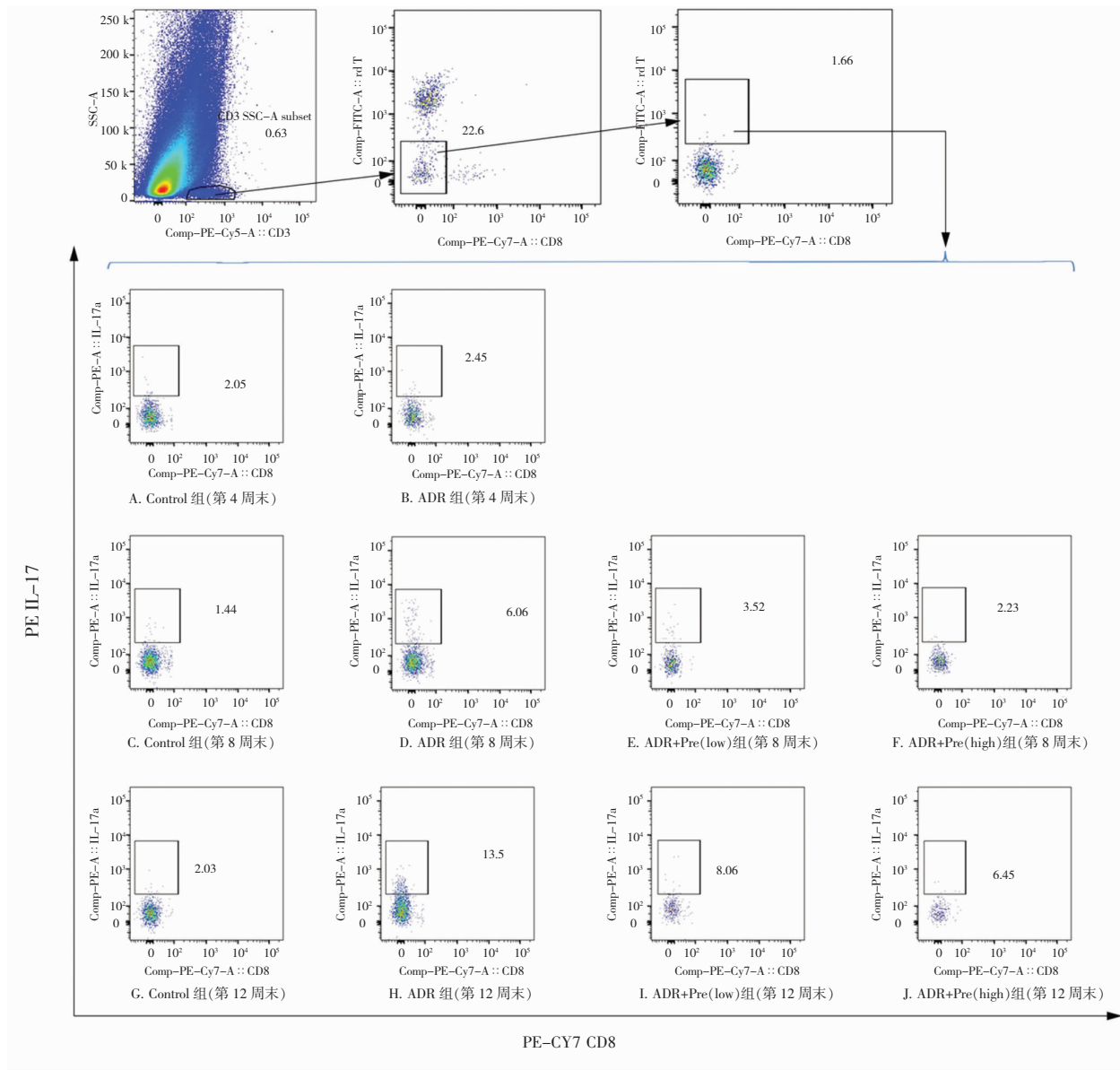


图 3 流式细胞术检测不同时间点各组肾脏局部 Th17 细胞比例

表 3 不同时间点各组肾脏局部 Treg 细胞比例

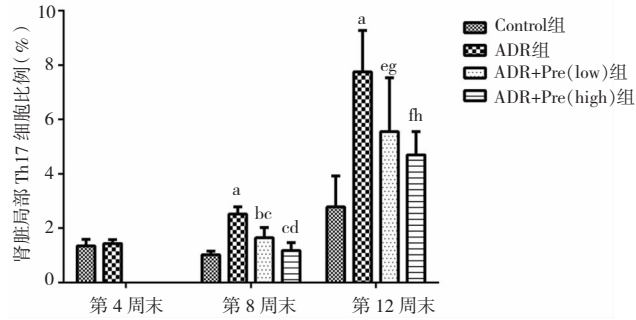
组别	第 4 周末	第 8 周末	第 12 周末
Control 组	9.528 ± 2.492 (n=6)	11.643 ± 2.300 (n=6)	10.707 ± 2.181 (n=6)
ADR 组	9.553 ± 3.282 (n=6)	9.162 ± 1.149 (n=5)	8.527 ± 1.813 (n=6)
ADR+Pre (low) 组		10.814 ± 2.007 (n=5)	8.988 ± 2.455 (n=5)
ADR+Pre (high) 组		8.274 ± 2.234 (n=5)	10.534 ± 2.248 (n=5)
t/F 值	0.015 <sup>a</sup>	3.164 <sup>b</sup>	1.601 <sup>b</sup>
P 值	0.988	0.051	0.224

注: 表格中第 4 周对应的样本仅 2 组, 故采用非配对 *t* 检验, 统计量值为 *t*=0.015, 对应 *P*=0.988; 第 8 周对应样本有 4 组, 故采用单因素方差分析, 统计量值 *F*=3.164, 对应总体 *P*=0.051, 总体无统计学差异, 故不再行各组间两两比较; 第 12 周分析方法同第 8 周, 统计量值 *F*=1.601, 对应总体 *P*=0.224, 总体无统计学差异, 故不再行各组间两两比较

a: *t* 值; b: *F* 值

Treg 细胞比值差异具有统计学意义 (*F*=7.148, *P*=0.002); ADR 组与 ADR+Pre (low) 组均明显高于 Control 组 (前组 *P*=0.000, 后组 *P*=0.027), ADR+Pre (high) 组与 Control 组无统计学差

异; ADR+Pre (low) 组与 ADR 组比较无明显统计学差异, 而 ADR+Pre (high) 组明显低于 ADR 组 (*P*=0.007); 两治疗组比较无明显统计学差异 (表 4, 图 7)。



第 4 周末: Control 组  $n=6$ , ADR 组  $n=6$

第 8 周末: Control 组  $n=6$ , ADR 组  $n=5$ , ADR+Pre(low) 组  $n=5$ , ADR+Pre(high) 组  $n=5$

第 12 周末: Control 组  $n=6$ , ADR 组  $n=6$ , ADR+Pre(low) 组  $n=5$ , ADR+Pre(high) 组  $n=5$

a: 与 Control 组比较,  $P=0.000$ ; b: 与 Control 组比较,  $P=0.002$ ; c: 与 ADR 组比较,  $P=0.000$ ; d: 与 ADR+Pre(low) 组比较,  $P=0.015$ ; e: 与 Control 组比较,  $P=0.005$ ; f: 与 Control 组比较,  $P=0.040$ ; g: 与 ADR 组比较,  $P=0.020$ ; h: 与 ADR 组比较,  $P=0.002$

图 4 不同时间点各组肾脏局部 Th17 细胞比例

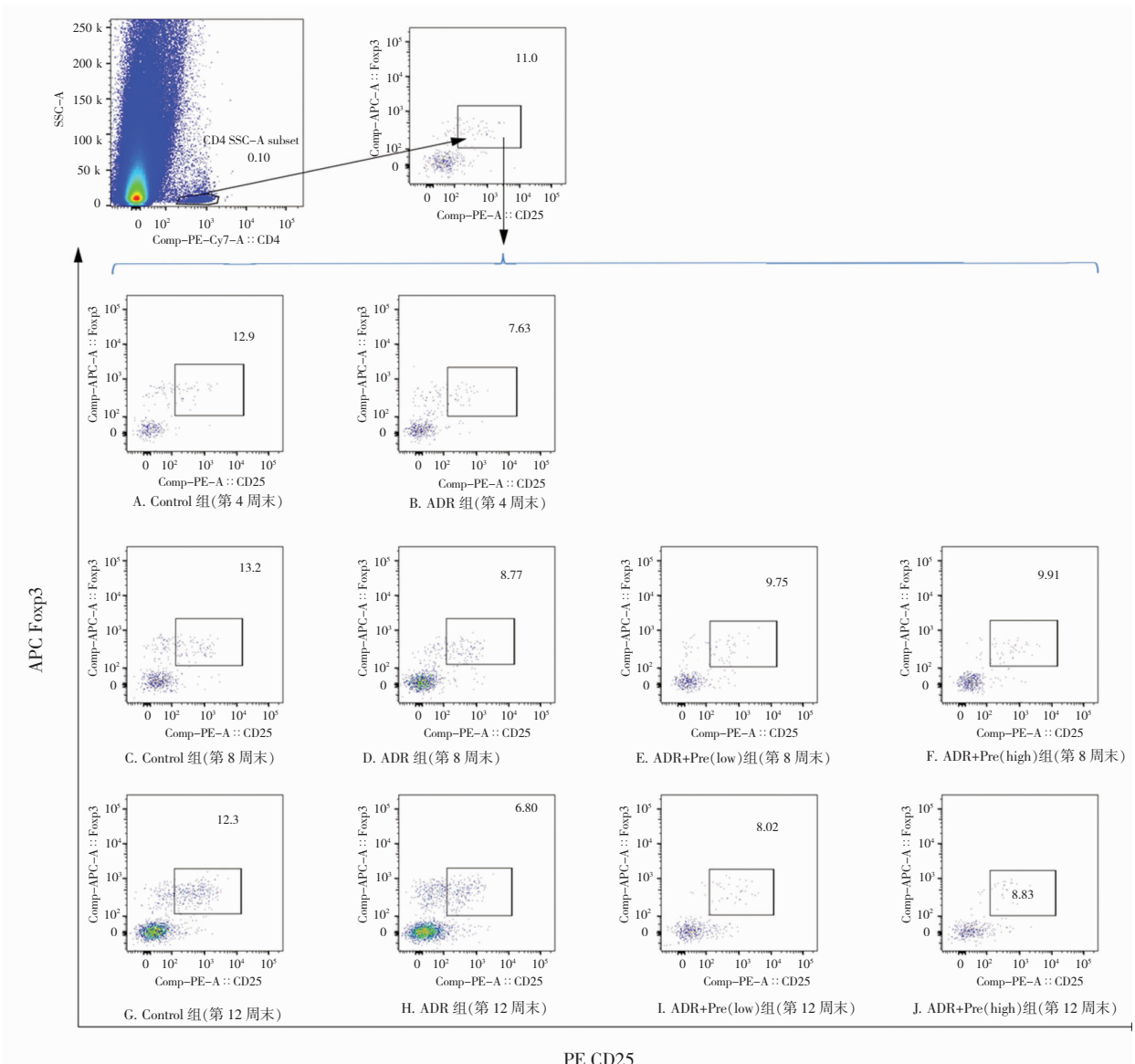


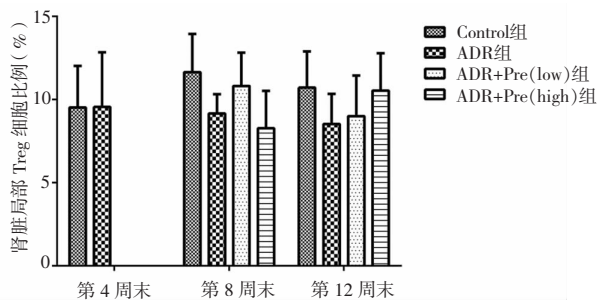
图 5 流式细胞术检测不同时间点各组肾脏局部 Treg 细胞比例

表 4 不同时间点各组肾脏局部 Th17/Treg 细胞比值

组别	第 4 周末	第 8 周末	第 12 周末
Control 组	0.149 ± 0.047 ( n=6 )	0.093 ± 0.030 ( n=6 )	0.278 ± 0.154 ( n=6 )
ADR 组	0.165 ± 0.057 ( n=6 )	0.277 ± 0.036 <sup>a</sup> ( n=5 )	0.963 ± 0.361 <sup>a</sup> ( n=6 )
ADR+Pre ( low ) 组		0.154 ± 0.034 <sup>bd</sup> ( n=5 )	0.667 ± 0.319 <sup>e</sup> ( n=5 )
ADR+Pre ( high ) 组		0.145 ± 0.023 <sup>cd</sup> ( n=5 )	0.470 ± 0.156 <sup>f</sup> ( n=5 )
t/F 值	0.506 <sup>g</sup>	33.699 <sup>h</sup>	7.148 <sup>h</sup>
P 值	0.624	0.000	0.002

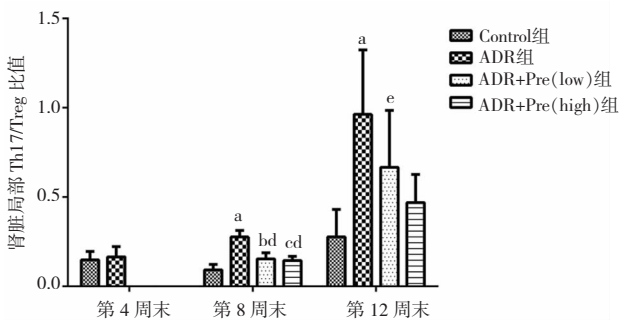
注:表格中第 4 周对应的样本仅两组,故采用非配对 t 检验,统计量值为 t=0.506,对应 P=0.624;第 8 周对应样本有 4 组,故采用单因素方差分析,统计量值 F=33.699,对应总体 P=0.000,组间两两比较对应 P 值为下方 a-f 表示;第 12 周分析方法同第 8 周,统计量值 F=7.148,对应总体 P=0.002,组间两两比较对应 P 值为下方 a-f 表示

a: 与对照组比较 P=0.000;b: 与对照组比较 P=0.004;c: 与对照组组比较 P=0.012;d: 与模型组比较 P=0.000;e: 与对照组比较 P=0.027;f: 与模型组比较 P=0.007;g:t 值;h:F 值



第 4 周末:Control 组 n=6, ADR 组 n=6  
第 8 周末:Control 组 n=6, ADR 组 n=5, ADR+Pre ( low ) 组 n=5, ADR+Pre ( high ) 组 n=5  
第 12 周末:Control 组 n=6, ADR 组 n=6, ADR+Pre ( low ) 组 n=5, ADR+Pre ( high ) 组 n=5

图 6 不同时间点各组肾脏局部 Treg 细胞比例



a: 与对照组比较 P=0.000;b: 与对照组比较 P=0.004;c: 与对照组组比较 P=0.012;d: 与模型组比较 P=0.000;e: 与对照组比较 P=0.027;f: 与模型组比较 P=0.007

图 7 不同时间点各组肾脏局部 Th17/Treg 细胞比值

### 3 讨论

PNS 是儿童时期最常见的慢性肾脏疾病<sup>[1]</sup>,临床上使用糖皮质激素、免疫抑制剂及细胞毒药物可

使大部分 MCNS 达到缓解,但仍有部分患儿病情反复甚至逐渐加重,最终进展 FSGS,其具体机制尚不清楚。

阿霉素肾病小鼠模型是研究 PNS 发病机制的首选动物模型,可于早期(建模第 4 周末)模拟人 MCNS,晚期(建模第 12 周末)模拟人 FSGS<sup>[9-10]</sup>。本课题组前期研究证实 PNS 患儿外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中存在 Th17/IL-17 轴优势活化及 Th17/Treg 失衡<sup>[5-6]</sup>,同时在阿霉素肾病大鼠模型外周循环中也存在 Th17/Treg 失衡<sup>[11]</sup>,但该平衡是否在肾脏局部出现变化仍不清楚。本研究成功构建阿霉素肾病小鼠模型,结果显示肾病小鼠肾脏局部从建模 4 周末出现 MCNS,12 周末进展为 FSGS,伴系膜细胞逐渐增生及大量淋巴细胞浸润,且自 4 周末 MCNS 形成后,Th17 较正常对照组逐渐增高,Th17/Treg 逐渐失衡,与文献报道及前期研究结果相符合<sup>[5-6, 11-12]</sup>。

糖皮质激素是儿童 PNS 治疗的首选药物,具有保护肾脏、延缓肾脏病理改变等作用<sup>[7]</sup>,临床以泼尼松最为常用。在一些免疫相关性疾病,如哮喘、过敏性紫癜及系统性红斑狼疮等疾病的 PBMC 中,均有 Th17/Treg 免疫失衡参与致病<sup>[13-15]</sup>,而糖皮质激素可通过下调 PBMC 中 Th17 并上调 Treg 水平,使 Th17/Treg 恢复到平衡状态,从而缓解病情<sup>[13]</sup>。本研究在阿霉素肾病模型基础上,于早期即 MCNS 形成时即加用 2 种不同剂量泼尼松进行干预,结果提示在实验动物中,早期使用泼尼松可通过下调肾脏局部 Th17 比例,延缓 Th17/Treg 失衡,最终一定程度缓解蛋白尿并延缓了肾脏组织的进一步损伤,且高剂量较低



剂量效果更为明显。

有研究显示,人体内存在糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR),通过复杂的信号通路发挥激素应答的功能<sup>[16]</sup>。在哮喘中,Th17 相关细胞因子可诱导气道上皮细胞上调 GR 的表达<sup>[17]</sup>。Zhou 等<sup>[18]</sup>发现,小鼠足细胞表面也存在 GR,而特异性敲除 GR 后,相同刺激引起肾脏损伤后会导致更加严重的蛋白尿;相反,在 1 型糖尿病小鼠中,GR 激动剂作用后可有效抑制 Th17 的分化与效应功能<sup>[19]</sup>。但在儿童 PNS 治疗过程中,糖皮质激素是否可通过 GR 影响肾脏局部 Th17/Treg 免疫平衡,仍需进一步研究。

综上所述,阿霉素肾病小鼠随着时间推进,其肾脏局部 Th17 逐渐增高,Th17/Treg 免疫失衡加剧,从而不断加重肾脏损伤。早期使用泼尼松干预可下调肾脏局部 Th17 水平,延缓 Th17/Treg 失衡,从而在一定程度上延缓肾脏组织的进一步损伤并缓解蛋白尿。且早期使用足量泼尼松的疗效较低剂量泼尼松疗效更佳,这可能与阿霉素小鼠早期接受激素治疗可有效改善疾病预后、防止病情慢性化进展有关,同时也为儿童 PNS 应尽早行足量激素治疗奠定免疫学基础,为未临床儿童 PNS 的免疫治疗提供理论依据。

## 参 考 文 献

- [1] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 91 所医院 1990~2002 年小儿慢性肾衰竭 1268 例调查报告[J]. 中华儿科杂志,2004,42(10): 724-730.
- [2] Kurts 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.
- [3] Couser WG. Basic and translational concepts of immune-mediated glomerular diseases[J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(3): 381-399.
- [4] 蓝程, 杨锡强, 李成荣, 等. CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞在激素敏感型肾病综合征发病中的作用研究[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(4): 240-243.
- [5] Shao XS, Yang XQ, Zhao XD, et al. The prevalence of Th17 cells and FOXP3 regulatory T cells (Treg) in children with primary nephrotic syndrome[J]. Pediatr Nephrol, 2009, 24(9): 1683-1690.
- [6] Wang L, Li Q, Wang L, et al. The role of Th17/IL-17 in the pathogenesis of primary nephrotic syndrome in children[J]. Kidney Blood Press Res, 2013, 37(4-5): 332-345.
- [7] 成学琴, 鲍华英, 张爱华, 等. 儿童原发性肾病综合征不同种类糖皮质激素治疗的临床研究[J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(2): 159-161.
- [8] 章元沛. 药理学实验[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 285.
- [9] Lee VW, Harris DC. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis[J]. Nephrology (Carlton), 2011, 16(1): 30-38.
- [10] 刘练, 张高福, 李秋, 等. 阿霉素肾病小鼠的肾脏病理转变过程[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2): 13-16.
- [11] Xu Y, Lin H, Zheng W, et al. Matrine ameliorates adriamycin-induced nephropathy in rats by enhancing renal function and modulating Th17/Treg balance[J]. Eur J Pharmacol, 2016, 791: 491-501.
- [12] Wang YM, Wang Y, Harris DC, et al. Adriamycin nephropathy in BALB/c mice[J]. Curr Protoc Immunol, 2015, 108: 15.28.1-6.
- [13] Maneechotesuwan K, Kasetsinsombat K, Wamanuttajinda V, et al. Statins enhance the effects of corticosteroids on the balance between regulatory T cells and Th17 cells[J]. Clin Exp Allergy, 2013, 43(2): 212-222.
- [14] 谭雄俊, 杨宝辉, 李秋, 等. IL-10~+B 细胞对儿童过敏性紫癜 Th17/Treg 免疫平衡紊乱的影响[J]. 免疫学杂志, 2017, 33(2): 133-140.
- [15] Talaat RM, Mohamed SF, Bassyouni IH, et al. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: correlation with disease activity[J]. Cytokine, 2015, 72(2): 146-153.
- [16] Guess A, Agrawal S, Wei CC, et al. Dose- and time-dependent glucocorticoid receptor signaling in podocytes[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 299(4): F845-853.
- [17] Vazquez-Tello A, Semlali A, Chakir J, et al. Induction of glucocorticoid receptor-beta expression in epithelial cells of asthmatic airways by T-helper type 17 cytokines[J]. Clin Exp Allergy, 2010, 40(9): 1312-1322.
- [18] Zhou H, Tian X, Tufro A, et al. Loss of the podocyte glucocorticoid receptor exacerbates proteinuria after injury[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 9833.
- [19] Saksida T, Vujicic M, Nikolic I, et al. Compound A, a selective glucocorticoid receptor agonist, inhibits immunoinflammatory diabetes, induced by multiple low doses of streptozotocin in mice[J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(24): 5898-5909.

(责任编辑: 冉明会)