

# 系膜增生性肾小球肾炎患儿 Bax 蛋白表达与外周血淋巴细胞凋亡的关系

赵彤, 卢思广

(徐州医学院附属医院儿科, 江苏 徐州 221002)

**摘要:**目的 明确病理类型为系膜增生性肾小球肾炎 (mesangial proliferative glomerulonephritis M sPGN) 的原发性肾病综合征 (nephrotic syndrome NS) 患儿外周血淋巴细胞 (peripheral blood lymphocytes PBLs) Bax 蛋白的表达与 PBLs 凋亡的关系。探讨 M sPGN-NS 患儿糖皮质激素 (glucocorticoid GC) 抵抗的部分机制。方法 所有患儿和正常儿童均于清晨空腹条件下采取静脉血, 以密度梯度离心法分离 PBLs 所得细胞用植物血凝素 (phytohemagglutinin PHA) 或 PHA +  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 地塞米松 (dexamethasone Dex) 处理, 培养 24 h 和 48 h 后应用流式细胞仪检测 Bax 蛋白的表达及细胞凋亡率。结果 ① M sPGN-NS 患儿与正常儿童 Dex 组 PBLs Bax 蛋白表达量均显著高于空白对照组 ( $P < 0.01$ ), 且呈时间依赖性 (48 h  $>$  24 h), 但各时间点 M sPGN-NS 患儿 Dex 组 Bax 的表达均低于正常儿童相应组 ( $P < 0.01$ ); ② M sPGN-NS 患儿与正常儿童 Dex 组 PBLs 凋亡率均高于空白对照组 ( $P < 0.01$ ), 且呈时间依赖性 (48 h  $>$  24 h), 但各时间点 M sPGN-NS 患儿 Dex 组细胞凋亡率均低于正常儿童组 ( $P < 0.01$ )。结论 M sPGN-NS 患儿 PBLs Bax 蛋白表达水平与 PBLs 凋亡率呈明显正相关, 但其表达显著低于正常对照组, 提示 Bax 蛋白的低表达是导致 M sPGN-NS 患儿 PBLs 凋亡减少, 进而造成 GC 抵抗的原因之一。

**关键词:**系膜增生性肾小球肾炎; 肾病综合征; 外周血淋巴细胞; Bax 凋亡

**中图分类号:** R692.3<sup>+</sup>1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2065(2010)02-0089-04

## The relationship between expression of Bax protein and apoptosis in peripheral blood lymphocytes in children with mesangial proliferative glomerulonephritis

ZHAO Tong LU Siguang

(Department of Pediatrics Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College Xuzhou Jiangsu 221002 China)

**Abstract:** Objective To investigate the relationship between expression of Bax protein and apoptosis in peripheral blood lymphocytes (PBLs) in children with primary nephrotic syndrome (NS) with the pathology type of mesangial proliferative glomerulonephritis (M sPGN), so to further explore the mechanism of glucocorticoid-resistance in children. Methods The PBLs in M sPGN-NS and normal children were isolated with Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. Then they were treated with phytohemagglutinin (PHA) or PHA plus dexamethasone (Dex). At the 24<sup>th</sup> and 48<sup>th</sup> hour of culture the expression levels of Bax protein and apoptosis proportion were measured by flow cytometric analysis. Results The Bax protein levels in PBLs of Dex in the control group were much higher than those in both the M sPGN-NS group and normal children ( $P < 0.01$ ) in a time-dependence manner (48 h  $>$  24 h). However at each time point the Bax protein levels of Dex group in M sPGN-NS children were all lower than those in normal children ( $P < 0.01$ ). The apoptosis proportions of PBLs remarkably increased after Dex treatment in both M sPGN-NS and normal children ( $P < 0.01$ ), also in a time-dependence manner. But at each time point the apoptosis proportions of Dex group in M sPGN-NS children were all lower than those in normal children ( $P < 0.01$ ). Conclusion In PBLs of M sPGN-NS children the expression of Bax protein has positive correlation with apoptosis proportions but at a level significantly lower than in the normal control group. The low expression of Bax protein probably accounts for the decreasing apoptosis proportions of PBLs which leads to glucocorticoid-resistance in children with M sPGN-NS.

**Key words:** mesangial proliferative glomerulonephritis (M sPGN); nephrotic syndrome; peripheral blood lymphocytes (PBLs); Bax; apoptosis

糖皮质激素 (glucocorticoid GC) 是治疗肾病综合征 (nephrotic syndrome NS) 的首选药物, 但临床上部分 NS 患儿由于对 GC 抵抗, 致使反复应用 GC 和免疫抑制剂, 从而出现很多药物不良反应和 (或) 并发症, 加重了原有的病理损害。因此 NS 患儿 GC 抵抗的原因一直是研究的热点<sup>[1-5]</sup>。系膜增生性肾小球肾炎 (mesangial proliferative glomerulonephritis MsPGN) 是儿童原发性 NS 较常见的病理类型之一, 也是最常见的对 GC 不敏感的病理类型, 临床治疗较为困难。免疫功能紊乱可能在 MsPGN 患儿发病机制中起着重要作用。本实验采用 Bax 蛋白表达及外周血淋巴细胞 (PBLs) 凋亡率来观察系膜增生型 NS 中 GC 抵抗的可能机制。

## 1 资料和方法

1.1 研究对象 本实验所选患者为门诊随访和定期住院进行环磷酰胺冲击治疗 (3 个月和半年一次) 的原发性 NS 患儿, 他们均是初治时对 GC 不敏感, 而行肾活检术, 病理类型证实为 MsPGN, 36 例, 其中男 23 例, 女 13 例, 平均年龄 10.6 岁, 所有入选儿童近期无感染性疾病, 部分患儿已停用 GC 3 个月以上或现口服强的松最大量为 5 mg 隔日 1 次。正常儿童 (无感染性疾病、变态反应性疾病、外伤等) 30 例, 男 18 例, 女 12 例, 平均年龄 11.6 岁。于 2004 年 8 月—2005 年 2 月采血, 检测地塞米松 (Dex) 处理不同时间 (24 h, 48 h) 后 Bax 蛋白表达水平与 PBLs 凋亡情况。

1.2 试剂 小鼠抗人 Bax 单抗购自北京莱博生物技术研究所; Annexin V /PI 凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司; RPMI 1640、植物血凝素 (PHA)、新生牛血清、地塞米松等均为北京华美生物工程公司进口分装。

1.3 主要仪器 二氧化碳培养箱为美国 UVP 公司产品, 流式细胞仪 (FCM) 由美国 Calibur 公司生产。

### 1.4 方法

1.4.1 淋巴细胞分离与培养 密度梯度离心法常规分离淋巴细胞, 调制备细胞数为  $1 \times 10^9$  /L, 用含 10% 小牛血清和双抗的 RPMI 1640 完全培养基分组进行细胞培养。对照组为细胞悬液 + PHA, 处理组为细胞悬液 + PHA + Dex 置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养 24~48 h。

1.4.2 Bax 蛋白表达的检测 取 PBS 调备的浓度为  $1 \times 10^9$  /L 的细胞悬液 1 ml 用 4% 多聚甲醛固定

15~20 min, 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用含 0.1% Triton 100 和 10% 小牛血清的完全培养基洗涤 1 次, 条件为 1 000 r/min 离心 10 min, 而后加入 Bax 单抗 (浓度均为 1:100) 100 μl 混匀后室温放置 30 min, 完全培养基洗涤 2 次, 加入 FITC-山羊抗鼠 IgG (浓度为 1:100) 100 μl 混匀后室温避光放置 30 min, 完全培养基洗涤 2 次; 沉淀用完全培养基 0.5 ml 重悬, 送流式细胞仪检测。

1.4.3 淋巴细胞凋亡的检测 取 PBS 调备的浓度为  $1 \times 10^9$  /L 的细胞悬液 1 ml 1 000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 弃上清, 加入 1 ml 冷的 PBS 轻轻震荡, 使细胞悬浮, 1 000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 弃上清, 再用冷 PBS 洗涤 2 次; 将细胞重悬于 200 μl 结合缓冲液, 加入 10 μl Annexin V-FITC 和 5 μl PI 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min, 4℃ 反应 30 min, 加入 300 μl 结合缓冲液, 1 h 内上机检测。

1.5 统计学处理 所有数据用 SPSS 11.5 统计软件进行分析, Bax 蛋白表达水平以及凋亡率均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组之间的比较用 t 检验, Bax 蛋白表达量与凋亡率之间的关系应用相关分析,  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

2.1 MsPGN-NS 患儿与正常儿童 PBLs Bax 蛋白的表达 ① MsPGN-NS 患儿与正常儿童空白对照组 PBLs 经体外培养 24 和 48 h 后 Bax 的表达有所升高, Dex 组 Bax 的表达则显著增加 (48 h > 24 h); Dex 组各时间点 Bax 蛋白的表达均显著高于空白对照组 ( $P < 0.01$ ); ② MsPGN-NS 患儿空白对照组 Bax 蛋白的表达与正常儿童相比无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 而 Dex 组 Bax 蛋白的表达则显著低于正常儿童 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

2.2 MsPGN-NS 患儿与正常儿童 PBLs 凋亡率 ① MsPGN-NS 患儿与正常儿童空白对照组 PBLs 经体外培养 24 和 48 h 后凋亡率有所升高, Dex 组凋亡率则显著增加 ( $P < 0.01$ ), 并与处理时间呈正相关 (48 h > 24 h); Dex 组各时间点凋亡率均显著高于空白对照组 ( $P < 0.01$ ); ② MsPGN-NS 患儿空白对照组 24 h 凋亡率略低于正常儿童, 但无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 而 48 h 凋亡率明显低于正常儿童 ( $P < 0.05$ ); Dex 组凋亡率则显著低于正常儿童 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 1 肾病综合征患儿与正常儿童淋巴细胞 Bax蛋白表达的比较 ( $\bar{x} \pm s\%$ )

地塞米松 作用时间	肾病综合征患儿组 (n=36)		正常儿童对照组 (n=30)	
	对照组	Dex组	对照组	Dex组
24 h	8.63±2.65	22.52±2.98 <sup>△#</sup>	9.46±2.58	26.14±3.37 <sup>△</sup>
48 h	12.73±2.36 <sup>#</sup>	39.38±3.82 <sup>△*#</sup>	13.85±2.74 <sup>#</sup>	45.62±4.24 <sup>△#</sup>

与组内对照组比较: <sup>△</sup> P<0.01; 与正常儿童 Dex组比较: \* P<0.01; 与同组 24 h比较: <sup>#</sup> P<0.01

表 2 肾病综合征患儿与正常儿童淋巴细胞凋亡百分比的比较 ( $\bar{x} \pm s\%$ )

地塞米松 作用时间	肾病综合征患儿组 (n=36)		正常儿童对照组 (n=30)	
	对照组	Dex组	对照组	Dex组
24 h	3.42±0.87	5.39±1.06 <sup>△*</sup>	3.61±1.46	8.72±2.75 <sup>△</sup>
48 h	3.47±0.91 <sup>*</sup>	7.83±2.13 <sup>△*#</sup>	4.29±1.64 <sup>#</sup>	13.18±3.86 <sup>△#</sup>

与组内对照组比较: <sup>△</sup> P<0.01; 与正常儿童 Dex组比较: \* P<0.01; 与同组 24 h比较: <sup>#</sup> P<0.01

2.3 M sPGN-NS患儿与正常儿童 PBLs凋亡率与 Bax蛋白表达的相关性分析 M sPGN-NS患儿与正常儿童 PBLs凋亡率与 Bax蛋白的表达水平均呈

明显正相关 (P<0.01), 即 Bax蛋白表达越高, 细胞凋亡率越高, 反之亦然, 见表 3。

表 3 NS患儿外周血淋巴细胞 Bax蛋白表达水平与凋亡率的相关性分析

细胞凋亡率	Bax表达	
	空白对照组	Dex组
空白对照组	r=0.75 t=6.55 <sup>△</sup> (24 h) r=0.78 t=7.27 <sup>△</sup> (48 h)	
Dex组		r=0.82 t=8.35 <sup>△</sup> (24 h) r=0.84 t=9.03 <sup>△</sup> (48 h)

<sup>△</sup> P<0.01

### 3 讨论

NS是一种免疫相关性疾病, 按病理类型可分为微小病变和非微小病变 2 种类型。GC 目前是治疗 NS 的首选药物, 然而 M sPGN-NS 患儿大多表现为 GC 不敏感或耐药, 病情容易迁延反复。至今对于 M sPGN-NS 患儿 GC 治疗的反应差异性仍没有比较满意的解释。研究发现, 不同病理类型的 GC 抵抗型 NS 患儿几乎都存在 PBLs 凋亡受抑的情况。因此, 本研究选择 M sPGN 的 GC 抵抗型 NS 患儿为研究对象, 以炎症-免疫性疾病发病中淋巴细胞过度活化、增殖及凋亡不足等一系列免疫失衡机制为理论基础, 探讨 M sPGN-NS 患儿 GC 抵抗的部分可能机制。

我们采用 AnnexinV /PI 双染法, 流式细胞仪检测细胞凋亡, 此法的优点是既可以检测早期凋亡, 又可将凋亡和坏死区分开来, 较 PI 单染法具有更高的灵敏性和特异性, 提高了实验结果的可信度。研究结果显示: M sPGN-NS 患儿与正常儿童相比, 体外培养淋巴细胞的自然凋亡率 24 h 无明显差异 (P>

0.05), 而 48 h M sPGN-NS 患儿则低于正常儿童, 差异有统计学意义 (P<0.01); M sPGN-NS 患儿与正常儿童 Dex 组 PBLs 凋亡率均高于空白对照组 (P<0.01), 且呈时间依赖性 (48 h>24 h), 各时间点 M sPGN-NS 患儿 Dex 组凋亡率均低于正常儿童组 (P<0.01)。

Bax 是 Bcl-2 基因家族中重要的凋亡调控基因, 也是 Bcl-2 家族中研究最广泛的促凋亡蛋白。Bax 定位于细胞质, 作用于线粒体, Bax 蛋白本身可以形成同二聚体, 也可与 Bcl-2、Bcl-XL 蛋白等形成异二聚体, 对细胞凋亡起促进作用。Bax 和 Bcl-2 蛋白的比例决定了细胞接受凋亡信号后的命运, 当 Bax 蛋白占优势时细胞发生凋亡, 反之当 Bcl-2 蛋白表达增强时细胞继续生存。

Bax 在免疫系统发育与免疫调节中起着重要作用。许多自身免疫性疾病的发生都与 Bax 有关。Ogawa 等<sup>[6]</sup>对干燥综合征患者淋巴细胞凋亡与凋亡相关基因表达的研究结果表明干燥综合征患者 PBLs 体外培养后 T 淋巴细胞凋亡数显著增加, 并且发现这与 Bax 表达增加、Bcl-2 表达减少有关。崔

玉芳等<sup>[7]</sup>用 $\gamma$ 射线照射小鼠,观察照射不同时间小鼠 PBLs 凋亡情况,从而探讨其发生机制,结果发现照射早期小鼠 PBLs 凋亡率显著升高, PBLs Bax 蛋白表达水平也明显增加,而后期随着凋亡率的降低, Bax 蛋白的表达也明显下降。其他免疫相关性疾病如系统性红斑狼疮、B 细胞淋巴瘤、骨髓异常增生综合征等淋巴细胞凋亡也与 Bax 表达水平有关。

本研究结果显示: Dex 可使 MsPGN-NS 患儿与正常儿童 PHA 刺激活化的 PBLs Bax 蛋白表达增加,与同一时间点空白对照组的自然表达相比有明显差异 ( $P < 0.01$ ),且呈时间依赖性 ( $48\text{ h} > 24\text{ h}$ ),说明 GC 可诱导人 PBLs Bax 蛋白的表达。比较 MsPGN-NS 患儿与正常儿童 Bax 蛋白的表达,我们发现空白对照组各时间点 Bax 蛋白的表达无明显差异 ( $P > 0.05$ ),但 Dex 组各时间点 MsPGN-NS 患儿 Bax 的表达均低于正常儿童 ( $P < 0.01$ )。结果提示: MsPGN-NS 患儿与正常儿童 PBLs 经 Dex 处理后凋亡率明显增加,同时伴随 Bax 蛋白的表达水平显著提高,证实了 Bax 与淋巴细胞凋亡之间存在相关关系 ( $r = 0.75 \sim 0.84$ ),并且 Bax 是促凋亡的相关蛋白之一。然而 MsPGN-NS 患儿经 Dex 处理后各时间点 PBLs Bax 蛋白的表达水平及凋亡率均低于正常儿童,说明 MsPGN-NS 患儿 PBLs 对 GC 不敏感与 Bax 低表达有一定关系,这可能是 MsPGN-NS 患儿糖皮质激素抵抗的原因之一。

综上所述,我们通过对 MsPGN-NS 患儿和正常儿童 PBLs Bax 蛋白的表达水平与凋亡率进行检测,结果表明 MsPGN-NS 患儿存在 PBLs 凋亡受抑

的情况,这与 MsPGN-NS 患儿 Bax 蛋白低表达有一定关系。提示 Bax 蛋白低表达是 MsPGN-NS 患儿 GC 抵抗的可能因素之一。

#### 参考文献:

- [1] Duclos M, Gouame C, Bonnemaïson D. Acute and chronic effects of exercise on tissue sensitivity to glucocorticoids [J]. *J Appl Physiol* 2003, 94(3): 869-875.
- [2] Kikhan BW, Corkill MM, Davison SC, et al. Response to glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis: in vitro cell-mediated immune assay predicts in vivo responses [J]. *J Rheumatol* 1991, 18(6): 821-825.
- [3] Goleva E, Kisich KO, Leung DY. A role for STAT5 in the pathogenesis of IL-2-induced glucocorticoid resistance [J]. *J Immunol* 2002, 169(10): 5934-5940.
- [4] Boussiotis VA, Lee BJ, Freeman GJ, et al. Induction of T cell clonal anergy results in resistance whereas CD28-mediated costimulation primes for susceptibility to Fas- and Bax-mediated programmed cell death [J]. *J Immunol* 1997, 159(7): 3156-3167.
- [5] Wiley RE, Cwiartka M, Alvarez D, et al. Transient corticosteroid treatment permanently amplifies the Th2 response in a murine model of asthma [J]. *J Immunol* 2004, 172(8): 4995-5005.
- [6] Ogawa N, Dang H, Kong L, et al. Lymphocyte apoptosis and apoptosis-associated gene expression in Sjögren's syndrome [J]. *Arthritis Rheum* 1996, 39(11): 1875-1885.
- [7] 崔玉芳,高亚兵,杨红,等. 辐射引起的小鼠外周血淋巴细胞凋亡及其机理 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 1998, 14(4): 278-281.

收稿日期: 2009-07-29 修回日期: 2009-11-03

本文编辑: 李昕

### 规范使用法定计量单位

本刊计量单位与单位符号按 1991 年中华医学会编辑出版部编辑的《法定计量单位在医学上的应用》一书。注意单位名称与单位符号不可混合使用,如  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{周}^{-1}$  等;单位符号中表示相除的斜线不能多于 1 条,后者可采用负指数的形式表示,如  $\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$  应用  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  表示。用光密度 (D) 代替“吸光度 (A)”,D 为斜体字。在叙述中,应先列出法定计量单位数值,而把旧制单位括在后面,如  $10\text{ kPa}$  ( $75\text{ mmHg}$ );如同一计量单位反复出现,可在首次出现时注出新旧单位的换算系数,然后只列法定计量单位。人体的血药浓度测定同人体其他检测值一样,以 L 为单位,不用 ml 或 dl。