

· 临床论著 ·

肾病综合征患儿外周血淋巴细胞 HDAC1 表达与糖皮质激素反应差异性的相关研究

姜小花 关凤军 董晨 彭倩倩

【摘要】 目的 检测原发性肾病综合征(PNS)患儿外周血淋巴细胞去乙酰化转移酶1(HDAC1)的表达水平,探讨HDAC1在PNS患儿糖皮质激素(GC)耐药中的作用。**方法** 选择徐州医学院附属医院住院PNS患儿为研究对象,按照患儿对GC的疗效分成两组:激素敏感型肾病综合征(SSNS)25例,激素耐药型肾病综合征(SRNS)29例,SRNS组根据临床治疗分为未用环磷酰胺(CTX)组16例以及CTX冲击5疗程组13例2个亚组;另选取10名健康体检儿童作为对照组。取血分离淋巴细胞,分别应用Western blot及RT-PCR法检测HDAC1蛋白及mRNA的表达。**结果** 各组患儿外周血淋巴细胞均有HDAC1的表达;GC治疗前,SRNS组HDAC1蛋白(0.4224 ± 0.0084)及mRNA(0.5596 ± 0.009)表达均低于SSNS组(0.6755 ± 0.0105 , 0.7682 ± 0.0003)及正常对照组(0.5067 ± 0.0145 , 0.6703 ± 0.0011),差异有统计学意义($P < 0.01$),SSNS组HDAC1表达高于正常对照组,差异有统计学意义;GC治疗6周时,SRNS组HDAC1蛋白(0.3536 ± 0.0041)及mRNA(0.5587 ± 0.0008)表达低于正常对照组及SSNS组,差异有统计学意义($P < 0.01$);SSNS组HDAC1蛋白(0.6385 ± 0.0074)及mRNA(0.7633 ± 0.0007)表达高于正常对照组(0.5067 ± 0.0145 , 0.6703 ± 0.0011),差异有统计学意义($P < 0.01$);CTX组HDAC1蛋白(0.4965 ± 0.0153)及mRNA(0.6766 ± 0.0010)表达低于SSNS组,但高于SRNS组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),但与正常对照组差异无统计学意义。且各组对应的各指标GC治疗前后差异有统计学意义。**结论** 不同GC反应PNS患儿有HDAC1表达差异;GC治疗可能影响HDAC1的表达;CTX应用可干预HDAC1表达。

【关键词】 肾病综合征; 组蛋白脱乙酰基酶类; 糖皮质激素类

Correlation studies between different glucocorticoid response and histone deacetylase-1 expression of peripheral blood lymphocytes in children with nephrotic syndrome JIANG Xiao-hua, GUAN Feng-jun, DONG Chen, PENG Qian-qian. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, China
Corresponding author: GUAN Feng-jun, Email: guanxiaomu@sina.com

【Abstract】 Objective To test histone deacetylase 1 (HDAC1) expression of peripheral blood lymphocytes in children with primary nephrotic syndrome, to explore the role of HDAC1 in PNS with Glucocorticoid resistance. **Methods** 54 cases hospitalized were chosen as subjects, who were divided into two groups: SSNS (25), SRNS (29) according to their response to GC during follow-up. In SRNS group, subjects were divided again into 2 subgroups, 13 cases in CTX treated group and 16 cases in untreated group, and 10 healthy children serving as control. Collected peripheral blood and isolated lymphocytes, Western Blot and RT-PCR methods were adopted respectively to test HDAC1 protein and mRNA expression. **Results** HDAC1 expression could be found in all the groups; Before GC treatment, SRNS group HDAC1 protein (0.4224 ± 0.0084) and mRNA (0.5596 ± 0.009) expression were both significantly lower than those in SSNS group (0.6755 ± 0.0105 , 0.7682 ± 0.0003) and normal control (0.5067 ± 0.0145 , 0.6703 ± 0.0011), difference was statistically significant ($P < 0.01$), and HDAC1 expression was significantly higher than those in SSNS group and the normal control, there was significant difference according to statistics; after GC treated, HDAC1 protein (0.3536 ± 0.0041) and mRNA (0.5587 ± 0.0008) were both lower in SRNS group than those in normal control and SSNS group, the difference was statistically significant ($P < 0.01$); HDAC1 protein (0.6385 ± 0.0074) and mRNA (0.7633 ± 0.0007) expression in SSNS group were both higher than those in normal control (0.5067 ± 0.0145 , 0.6703 ± 0.0011), significant difference was found between them statistically ($P < 0.01$); HDAC1 protein (0.4965 ± 0.0153) and mRNA (0.6766 ± 0.0010) in CTX group were both

lower than those in SSNS group, while higher than those in SRNS group, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$), but no significant difference was found between CTX group and normal control, and there were significant difference before and after GC treatment in each group. **Conclusions** Different HDAC1 expressions were found in PNS children with different GC response; GC treatment may affect the expression of HDAC1, CTX administration may also affect the HDAC1 expression.

【Key words】 Nephrotic syndrome; Histone deacetylases; Glucocorticoids

糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 是治疗儿童原发性肾病综合征 (primary nephrotic syndrome, PNS) 的首选药物, 但不同患儿对 GC 反应存在一定的差别。研究表明, 约 70% 以上初次发病 PNS 患儿表现对 GC 敏感, 20% 左右对 GC 耐药, 表现为无效或仅部分有效^[1]。有研究证实^[2-3], 与遗传机制相关的 GC 耐药仅占所有患儿的 25%, 多数患儿是在治疗过程中逐渐发生了对 GC 反应性的变化。随着遗传药理学研究进展发现, 多种疾病 GC 反应个体差异及 GC 治疗后获得的耐药均与表观遗传学有密切的关系^[4-5]。从表观遗传机制入手, 探讨 PNS 患儿 GC 耐药机制迄今尚未有报道。本研究应用 Western blot 及 RT-PCR 法分别从蛋白及转录水平检测 HDAC1 的表达, 探讨 HDAC1 在 PNS 患儿 GC 耐药中的可能作用。

资料与方法

一、一般资料

选择 2011 年 7 月至 2012 年 9 月在徐州医学院附属医院儿科住院的 PNS 患儿临床符合诊断标准^[6], 且之前未用过 GC 或至少 3 个月未用 GC 治疗, 发病时无感染、外伤、心理应激及放射线接触等病史。收集标本年龄 3 ~ 12 岁。按照患儿对 GC 的反应分成两组: 激素敏感型肾病综合征 (SSNS) 组, 泼尼松足量 (2 mg/kg, 最大用量 60 mg) 治疗 6 周时且 GC 减量后尿蛋白持续 3 个月为阴性者为 GC 敏感, 共 25 例, 男 13 例, 女 12 例, 平均 (6.5 ± 0.8) 岁; 激素耐药型肾病综合征 (SRNS) 组, 泼尼松足量 (2 mg/kg, 最大用量 60 mg) 治疗 6 周时, 尿蛋白仍在 (++) 以上, 共 29 例, 其中未应用环磷酰胺 (CTX) 组 16 例, 男 9 例, 女 7 例, 平均 (6.1 ± 0.2) 岁; 应用 CTX 冲击亚组 13 例, 男 8 例, 女 5 例, 平均 (5.9 ± 0.3)。另选取 10 名健康体检儿童作为正常对照组, 男 5 例, 女 5 例, 平均 (6.2 ± 0.3) 岁。各研究组病例性别及年龄构成与对照组无统计学差异。取血前经徐州医学院伦理委员会批准。

二、试验方法及步骤

1. 淋巴细胞分离: 无菌采集静脉血 2 ml, 淋巴细胞分离液分离淋巴细胞, -80 °C 保存待检。

2. 蛋白印迹 (Western blot) 法检测 HDAC1 蛋白表达: 预冷 RIPA 蛋白裂解缓冲液裂解淋巴细胞, 提取总

蛋白; BCA 法标定蛋白浓度; 80 μg 总蛋白进行 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 半干转; 5% 脱脂奶粉封闭, 加兔抗人 HDAC1 多克隆一抗 (1: 500, Bioword 公司) 4 °C 孵育过夜, 洗膜 2 次; 加羊抗兔碱性磷酸酶标记 HDAC1 二抗 (1: 1000, Bioword 公司) 室温孵育 2 h; 碱性磷酸酶显色至出现条带, 凝胶成像分析软件扫描条带行半量化分析; β-actin 为内参照。

3. RT-PCR 法检测 HDAC1 mRNA 表达: 抽提总 RNA, 按照反转录试剂盒 (购于 TINGEN 公司) 说明书合成 cDNA, -20 °C 保存用于 PCR 反应。反应条件为 94 °C 3 min; 94 °C 30 s; 58 °C 30 s; 72 °C 45 s; 72 °C 5 min; 循环次数为 35 次。β-actin 反应条件为 94 °C 3 min; 94 °C 30 s; 48 °C 30 s; 72 °C 45 s; 72 °C 5 min; 循环次数为 30。HDAC1 及 β-actin 特异性引物有上海生物工程公司合成。HDAC1 (56 kb) 上游引物: 5'-CAAG-CAGATGCAGAGATTCAAC-3'; 下游引物为: 5'-ACAG-CACCCTCTGGTGATACTT-3'-actin (251 bp)。取 5 μl PCR 产物在含 0.5 mmol/L 的溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳, 每个产物跑 2 次电泳, 以各自的条带与 β-actin 的像素值之间进行半定量分析。

三、统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件包统计学处理, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 多组资料间比较, 方差齐者, 采用 One-Way ANOVA 分析, 组间比较采用 LSD 法; 方差不齐者, 采用非参数检验; 两组间数据比较采用配对样本 *t* 检验; 以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。所有数据分析之前都进行方差齐性检验。

表 1 各组儿童糖皮质激素治疗前后外周血淋巴细胞中 HDAC1 表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HDAC1	
		蛋白	mRNA
正常对照组	10	0.5067 ± 0.0145	0.6703 ± 0.0011
SSNS 组治疗前	25	0.6755 ± 0.0105	0.7682 ± 0.0003
SSNS 组治疗后	25	0.6385 ± 0.0074	0.7633 ± 0.0007
SRNS 组治疗前	29	0.4224 ± 0.0084	0.5596 ± 0.0009
SRNS 组治疗后	29	0.3536 ± 0.0041	0.5587 ± 0.0008
CTX 冲击亚组	13	0.4965 ± 0.0153 ^a	0.6676 ± 0.0010 ^a

注: HDAC1 蛋白及 mRNA 表达水平用各组灰度值与 β-actin 灰度值比值的平均值表示。与正常组比较, ^a $P > 0.05$



图1 Western blot检测各组患儿外周血淋巴细胞糖皮质激素治疗前HDAC1蛋白表达

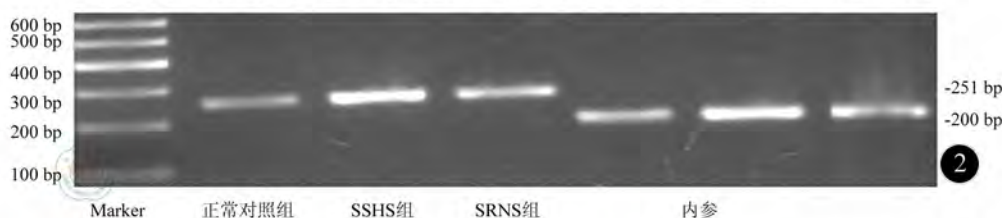


图2 检测各组患儿外周血淋巴细胞糖皮质激素治疗前HDAC1 mRNA的表达

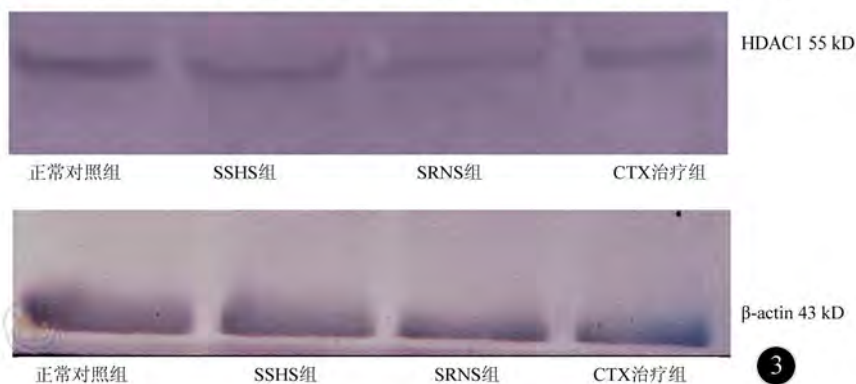


图3 Western blot检测各组患儿外周血淋巴细胞糖皮质激素治疗后HDAC1蛋白表达

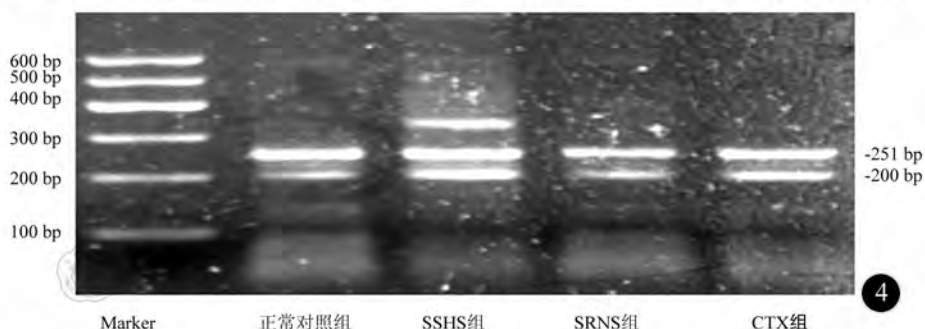


图4 检测各组患儿外周血淋巴细胞糖皮质激素治疗后HDAC1 mRNA的表达

结 果

1. GC治疗前患儿外周血淋巴细胞中HDAC1蛋白及mRNA的表达:正常对照组及PNS组均有HDAC1蛋白的表达。GC治疗前SRNS组HDAC1蛋白及mRNA表达量均明显低于SSNS组及正常对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$);SSNS组HDAC1表达量高于

正常对照组,差异有统计学意义(表1,图1,2)。

2. GC治疗后患儿外周血淋巴细胞中HDAC1蛋白及mRNA的表达:GC治疗6周后SRNS患儿HDAC1蛋白及mRNA的表达量低于SSNS及正常对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$);SSNS组HDAC1表达量高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);SRNS组应用CTX亚组HDAC1蛋白及mRNA的表达量高于

SRNS 未应用 CTX 治疗组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 但低于正常对照组, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 1, 图 3, 4)。

3. 各组 GC 治疗前后 HDAC1 蛋白及 mRNA 的表达: GC 治疗后 SSNS 及 SRNS 患儿 HDAC1 蛋白及 mRNA 的表达均低于 GC 治疗前, 差异均有统计学意义 (t 检验, $P < 0.05$) (表 1)。

讨 论

GC 耐药机制一直是研究的热点问题, 多数集中在遗传方面。然而临床上部分 GC 耐药 (SRNS) 患儿最初对 GC 敏感, 在治疗中逐渐出现 GC 相对不敏感。无论是原发性还是继发性 GC 耐药, 多数患儿应用免疫抑制剂后, 又能重新恢复 GC 敏感性。而且研究发现^[7], 免疫抑制剂有良好的节省 GC 用量的效应, 有学者称之为“允许效应”。这种短期内 GC 反应性的变化显然不能仅以遗传因素来解释, 随着遗传药理学研究发现, 基因表达发生变化而 DNA 序列无变化的现象与药物个体差异密切相关。这种现象即是表观遗传耐药机制。

近年来已经有学者在哮喘、慢性阻塞性肺疾病等患者发现 HDAC1 参与了 GC 的耐药。Ito 等^[8]报道哮喘患者的 HDAC1 含量下降, 该酶总活力有所下降。Bergeron 等^[9]也有类似报道。HDAC1 表达下降, 可破坏 GC-GR 复合体乙酰化和去乙酰化之间的动态平衡, 使 GC 不能有效抑制炎性分泌, 导致 GC 抵抗。基于以上研究, 我们推测 HDAC1 的表达也可能影响 PNS 患儿 GC 效应的发挥。通过我们试验的观察, 发现不同 GC 治疗反应 PNS 患儿存在 HDAC1 表达的差异, 证实了我们的推测。

既往在 GC 抵抗研究中发现 NF- κ B 可与 GR 直接作用, NF- κ B 和 GR 可竞争性与有限的转录辅助因子结合, GC 通过上调 I- κ B α 基因而抑制 NF- κ B 活性^[10]。在 GC 反应细胞中, NF- κ B 的预先活化可能是使 GC 产生抵抗的一个重要原因。本研究发现 HDAC1 在各组均有表达, GC 治疗前后 SRNS 组 HDAC1 蛋白及 mRNA 表达均低于 SSNS 组, 可能是 HDAC1 表达降低使去乙酰化的 NF- κ B 乙酰化, NF- κ B 被激活导致活化的 GR 结合 GC 反应元件的能力下降, 从而引起 GC 抵抗。进而说明 HDAC1 表达降低可能参与了 GC 抵抗机制。与 COPD 患者 GC 抵抗 HDAC1 表达趋势相一致。

本研究还发现 CTX 冲击亚组 HDAC1 表达高于

SRNS 组 GC 治疗后, 但与 SSNS 患儿 GC 治疗前无明显差异。分析与 CTX 药理作用有关。CTX 能减少 B 细胞分泌抗体、干扰 DNA 的合成及抑制 T 细胞介导的非特异性炎症。动物实验表明大剂量 CTX 可诱导免疫耐受, 使动物对各种特异性抗原长时间内不会反应^[11]。目前普遍认为, PNS 发病与细胞免疫功能紊乱有关, 多种细胞因子、炎症因子参与 PNS 的发病。CTX 干预 GC 耐药患儿 HDAC1 表达, 可能通过某些关键细胞因子发挥作用, 但具体机制需进一步探讨。

本研究提示 HDAC1 作为一种转录因子, 可能为非基因水平 GC 耐药机制之一, 进一步明确该酶参与 GC 耐药的机制, 有可能为 PNS 患儿的治疗提供新的药物靶点及治疗途径。

参 考 文 献

- [1] Kim JS, Bellew CA, Silverstein DM, et al. High incidence of initial and late steroid resistance in childhood nephrotic syndrome. *Kidney International*, 2005, 68: 1275-1281.
- [2] Caridi G, Bertelli R, Di Duca M, et al. Broadening the Spectrum of Diseases Related to Podocin Mutations. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14: 1278-1286.
- [3] Nickavar A, Safarzadeh AE, Sotoudeh K, et al. Mycophenolate Mofetil for Treatment of Idiopathic Nephrotic Syndrome in Children. *Iran J Kidney Dis*, 2012, 6: 346-349.
- [4] Chen P, Jiang T, Ouyang J, et al. Epigenetic programming of diverse glucocorticoid response and inflammatory/immune-mediated disease. *Med Hypotheses*, 2009, 73: 657-658.
- [5] Turner JD, Pelascini LP, Macedo JA, et al. Highly individualized methylation patterns of alternative glucocorticoid receptor promoters suggest individualized epigenetic regulatory mechanisms. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: 7207-7218.
- [6] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 儿童常见肾脏疾病诊治循证指南激素敏感、复发/依赖肾病综合征诊治循证指南(试行). *中华儿科杂志*, 2009, 47: 167-169.
- [7] Gross WL. New concepts in treatment protocols for severe systemic vasculitis. *Curr Opin Rheumatol*, 1999, 11: 41-46.
- [8] Ito K, Caramori G, Lim S, et al. Expression and activity of histone deacetylases in human asthmatic airways. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166: 392-396.
- [9] Bergeron C, Fukakusa M, Olivenstein R, et al. Increased glucocorticoid-receptor-beta expression, but not decreased histone deacetylase 2, in severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117: 703-705.
- [10] Deroo BJ, Archer TK. Glucocorticoid receptor activation of the Ikappa B alpha promoter within chromatin. *Mol Biol Cell*, 2001, 12: 3365-3374.
- [11] Cobo M, Hernandez D, Rodriguez C, et al. Successful therapeutic use of rituximab in refractory membranous glomerulonephritis. *Clin Nephrol*, 2006, 66: 54-57.

(收稿日期: 2013-03-18)

(本文编辑: 戚红丹)