

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.12.002

IgA 肾病骨桥蛋白、CD68 的表达及其与肾间质损伤的关系

杨洪梅, 钟 清

(重庆医科大学附属第一医院肾内科, 重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 IgA 肾病骨桥蛋白(Osteopontin, OPN)、CD68 的表达及其与肾间质损伤的关系。方法:根据肾活检结果选取 26 例已经确诊的原发性 IgA 肾病的肾组织作为实验组。按 Lee 氏法将肾组织病理损害分为 I~V 级并将肾间质损伤分为 0~3 级。另取 4 例因肾外伤或肾肿瘤切除的患肾中的正常肾组织作为对照组。免疫组化法检测肾组织中 OPN、CD68 的表达, RT-PCR 技术检测肾组织 OPN mRNA 的表达。结果:(1)IgA 肾病中有高达 86% 的患者伴有不同程度肾间质损伤。实验组肾间质中 CD68 的表达较对照组显著增高, 差异有统计学意义。(2)实验组 OPN、OPN mRNA 的表达均较正常组显著升高($P<0.05$)。OPN、OPN mRNA 的表达与肾间质损伤程度无相关性。肾间质内 CD68 的表达与肾间质损害成正相关。OPN 的表达与肾间质内 CD68 的表达呈正相关($r_s=0.545, P=0.044$)。结论:单核/巨噬细胞的浸润参与了 IgA 肾病肾间质的损伤。骨桥蛋白与炎症有关, 它通过介导单核巨噬细胞的浸润参与 IgA 肾病肾间质的损伤。

【关键词】IgA 肾病; 骨桥蛋白; 肾间质损伤

【中国图书分类法分类号】R692

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-10-17

Expressions of osteopontin and CD68 and their relationship with renal interstitial injury in IgA nephropathy

YANG Hongmei, ZHONG Qing

(Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the expressions of osteopontin(OPN) and CD68 in IgA nephropathy and their relationship with renal interstitial injury. Methods: According to biopsy results, renal biopsy specimens from 26 patients with diagnosed primary IgA

作者介绍: 杨洪梅(1984-), 女, 住院医师, 硕士,
研究方向: 肾脏免疫。

通信作者: 钟 清, 女, 副教授, Email: zqdm2009@163.com。

基金项目: 重庆市卫生局立项课题资助项目(编号: 2008-2-69)。

[3] Tai L, Zhou Y X. Study of determining the concentration of hydrogen sulfide in air by methylene blue spectrophotometric method[J]. Applied Mechanics and Materials, 2012, 110(116): 3086-3091.

[4] 温维丽, 董焕萍, 周晓东, 等. 硫化氢浓度测定方法的比较和建议[J]. 中国个体防护装备, 2010, (1): 42-44.

Wen W L, Dong H P, Zhou X D, et al. Comparison and suggestion of method for the titer of hydrogen sulfide[J]. China Personal Protective Equipment, 2010, (1): 42-44.

[5] Shirsat M D, Bangar M A, Deshusses M A, et al. Polyaniline nanowires-gold nanoparticles hybrid network based chemiresistive hydrogen sulfide sensor[J]. American Institute of Physics, 2009, 94(8): 0835021-0835023.

[6] 唐 丰. 硫化氢危害的安全防范与应急措施[J]. 安全与健康, 2008, (2): 44-45.

Tang F. Safety precautions and emergency measures for hydrogen sulfide hazard[J]. Safety & Health, 2008, (2): 44-45.

[7] 韩志英, 金复生. 硫化氢中毒研究进展[J]. 工业卫生与职业病,

2006, 32(2): 118-121.

Han Z Y, Jin F S. Research progress of hydrogen sulfide poisoning[J]. Industrial Health & Occupational Diseases, 2006, 32(2): 118-121.

[8] 高天荣, 刘剑虹, 李卫军. 橡胶炼胶烟气及硫化烟气中含硫化化合物的 GC/MS 分析[J]. 质谱学报, 1995, 16(2): 77-79.

Gao T R, Liu J H, Li W J. GC/MS analysis of sulphide in the smoke of processing and vulcanizing rubber[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 1995, 16(2): 77-79.

[9] 褚建新, 满 勤, 包朝胜, 等. 分光光度法检测硫化氢中毒血液中的硫化血红蛋白[J]. 法医学杂志, 2003, 19(4): 212-214.

Chu J X, Man Q, Bao C S, et al. Determination of hemoglobin in poisoned blood by spectrophotometry[J]. Journal of Forensic Medicine, 2003, 19(4): 212-214.

[10] Ago M, Ago K, Ogata M. Two fatalities by hydrogen sulfide poisoning: variation of pathological and toxicological findings[J]. Leg Med (Tokyo), 2008, 10(3): 148-152.

(责任编辑: 关蕴良)

nephropathy were selected as experimental group. According to Lee's method, pathological injuries were divided into I-V grades and renal interstitial injuries were divided into 0-3 levels. The other four normal renal tissue specimens taken from patients with renal trauma or renal tumor were taken as control group. Blood pressure, serum creatinine, creatinine clearance rate were collected and calculated. Expressions of OPN and CD68 in renal tissues were investigated by immunohistochemistry. mRNA expressions of OPN were investigated by RT-PCR. **Results:** (1) Up to 86% patients with IgA nephropathy had renal interstitial injury. Expressions of CD68 in experiment group were significantly higher than those in control group, with statistical differences. (2) Expressions of OPN and mRNA were higher in experiment group than in control group ($P < 0.05$) and were not correlated with renal interstitial injuries. Expressions of CD68 in renal interstitial substance were positively correlated with renal interstitial injuries. Expressions of OPN were positively correlated with expressions of CD68 in renal interstitial substance ($r_s = 0.545, P = 0.044$). **Conclusions:** Monocyte/macrophage infiltration in IgA nephropathy is involved in renal interstitial injury. OPN, associated with inflammation, participates in renal interstitial injury by mediating mononuclear and macrophages.

【Key words】IgA nephropathy; osteopontin; renal interstitial injury

骨桥蛋白 (Osteopontin, OPN) 是一种多功能的细胞外基质蛋白, 它能促进细胞的粘附、运动, 激活肿瘤细胞, 并在炎症、免疫调节及感染性疾病中起着重要作用。研究发现, 在糖尿病肾病, 狼疮性肾炎等肾脏疾病中 OPN 的表达增高。但目前国内尚无 OPN 在 IgA 肾病中的研究报道。本文探讨 OPN 及 CD68 的表达与 IgA 肾病肾小管间质损伤的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 鼠抗人 OPN 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 鼠抗人 CD68 单克隆抗体购自北京中杉生物技术有限公司; 鼠 Polymer Kit 购自北京中杉生物技术有限公司; RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 标本来源 收集本科室 2009 年 1 月-2010 年 2 月通过肾活检按世界卫生组织 1982 年的诊断标准确诊为 IgA 肾病的 26 例肾组织作为实验组, 并排除狼疮性肾炎、乙肝相关性肾炎、紫癜性肾炎等继发性肾小球疾病, 其中男 14 例, 女 12 例, 年龄 13~63 岁, 平均 (36.0 ± 11.8) 岁。另取 4 例因肾外伤或肾肿瘤切除的患肾中的正常肾组织作为对照组。

1.2 方法

1.2.1 IgA 肾病肾脏组织病理损害程度分级标准 根据南京军区福州总医院病理科所出的肾活检报告, 按 Lee 修改的 Meadow 分级方法将肾脏组织病理损害分为 I-V 级。肾间质纤维化和肾小管萎缩程度被分为 0-3 级: ①0 级为无病灶; ②1 级为病灶累积皮质部间质的 25% 以下; ③2 级为病灶累及肾皮质部间质的 25%~50%; ④3 级为病灶累积皮质部间质 50% 以上。

1.2.2 免疫组化法检测肾组织 OPN、CD68 的表达 采用 PV 二步法测定肾组织中 OPN、CD68 的表达。细胞浆着棕黄色者为阳性表达细胞, 胞浆无棕色或与背景色一致者为阴性, 并通

过光学显微镜放大 400 倍摄取图像。(1)OPN 蛋白表达: 选取 5 个高倍镜视野 ($400 \times$), 用 Image-Pro Plus 软件进行分析, 测定阳性细胞核或胞浆的平均吸光度。(2)CD68 结果计算如下: $400 \times$ 光镜下随机选取 5 个肾小球 (尽量选正切面), 计数每个肾小球 CD68 阳性细胞数, 再算出 5 个肾小球阳性细胞数的平均值作为每例肾小球内的阳性细胞数。 $400 \times$ 光镜在肾皮质内靠近肾小球处随机选取 3~5 个肾小管间质区视野 (视野内无肾小球, 间质区内细胞数不少于 200 个), 计数 CD68 阳性细胞数和间质细胞数, 计算 CD68 阳性细胞百分比。

1.2.3 RT-PCR 法检测肾组织中 OPN mRNA 的表达 取 20 mg 肾皮质组织, 加入 1 ml Trizol 试剂, 按试剂盒说明书中操作步骤进行总 RNA 的提取、RNA 的逆转录、PCR 反应。其中引物序列、退火温度、产物长度分别为: (1)OPN mRNA: 上游引物: 5'-AGAGTCGTTTCGAGTCAATGG-3'; 下游引物: 5'-CAGTTGCAGCCTTCTCAGCC-3'; 退火温度为 56 °C; 产物长度 330 bp; (2)内参 GAPDH: 上游引物: 5'-TCAGCGGCATCTTCTTTTGCATCG-3'; 下游引物: 5'-TTGTCATGGATGACCTTGGCCAGG-3'; 退火温度 62 °C; 产物长度 527 bp。将 PCR 产物进行凝胶电泳, 凝胶成像系统摄取电泳图, 通过成像分析软件 Quantiy One 进行半定量, 计算样品中 OPN mRNA/GAPDH 扩增带的吸光度值比值。

1.3 统计学处理

采用统计软件 SPSS 18.0 分析处理, 计量资料均以均数 $\pm$ 标准差表示, 组间比较采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 组间两两比较应用 LSD 法, 以 $P < 0.005$ 为差异有统计学意义。相关性分析采用 Spearman 相关分析法。

2 结果

2.1 病理学分级

实验组共 26 例, 所有病例病理学评分均在双盲下进行。肾间质纤维化和肾小管萎缩程度被分为 0-3 级, 其中 0 级 4

例,1级12例,2级8例,3级2例,有86%的患者伴有不同程度的肾间质损害;IgA肾病按Lee分级标准分为I~V级,其中I级0例,II级4例,III级6例,IV级14例,V级2例。肾间质损害0级的IgA肾病,按Lee分级为II级,以肾小球病变为主。

2.2 OPN、OPN mRNA 的表达

免疫组化发现在对照组肾脏组织中见OPN在肾小管有微量表达;实验组肾小管中OPN呈强阳性表达,可见近端小管、远端小管胞浆内充满棕黄色颗粒,其表达量明显高于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),见图1、2。RT-PCR发现实验组OPN mRNA的表达较对照组明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$),见图3,表1。实验组OPN蛋白、OPN mRNA的表达与肾间质损害程度均无相关性(P 值分别为0.258、0.375)。

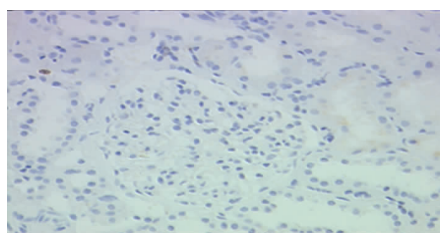


图1 对照组 OPN 的表达 (400 ×)

Fig.1 Expressions of OPN in control group (400 ×)

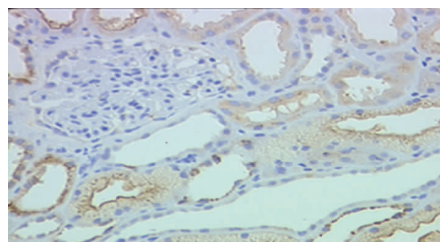
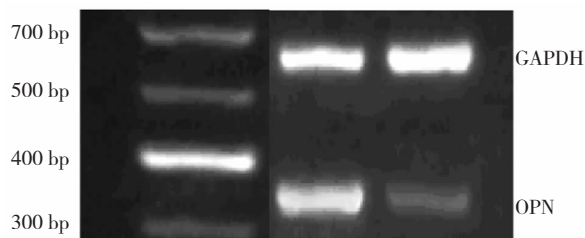


图2 实验组 OPN 的表达 (400 ×)

Fig.2 Expressions of OPN in experiment group (400 ×)



1. 实验组;2. 对照组

图3 肾组织中 OPN mRNA 的表达

Fig.3 Expressions of OPN mRNA in renal tissues

表1 肾组织中 OPN、OPN mRNA 的表达

Tab.1 Expressions of OPN and OPN mRNA in renal tissues

分组	OPN平均吸光度	OPN mRNA/GAPDH 吸光度比值
实验组	$0.16 \pm 0.02^{\#}$	$0.87 \pm 0.15^*$
对照组	0.04 ± 0.01	0.33 ± 0.01

注:与对照组比较, #, $P<0.01$; *, $P<0.05$

2.3 CD68 的表达

在对照组的肾小球及肾间质中偶可见CD68阳性细胞散在零星分布。在实验组中CD68阳性细胞在肾间质内呈散在或成簇分布,多位于小血管旁,在肾小球内主要位于系膜区、球囊壁及新月体、毛细血管腔内。Lee分级II级、肾间质损害0级的IgA肾病,肾小球内和肾间质内CD68的表达较对照组增高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。Lee分级III~V级、肾间质损害1~3级的IgA肾病肾小球和肾间质中CD68的表达较对照组明显增高,差异有统计学意义($P<0.005$),见表2,图4、5。

表2 肾小球和肾间质 CD68 的表达

Tab.2 Expressions of CD68 in glomeruli and renal interstitial

分组	CD68阳性细胞数/ 肾小球	肾间质 CD68 阳性细胞 百分比
Lee II 级	0.15 ± 0.06 $0.24 \pm 0.13^*$	0.02 ± 0.01 $0.03 \pm 0.01^*$
对照组	$1.89 \pm 0.62^{\#}$	$0.08 \pm 0.07^{\#}$
Lee IV 级	$4.96 \pm 1.05^{\#}$	$0.15 \pm 0.06^{\#}$
Lee V 级	$8.51 \pm 1.63^{\#}$	$0.24 \pm 0.08^{\#}$

注:与对照组比较, #, $P<0.005$; *, $P>0.05$

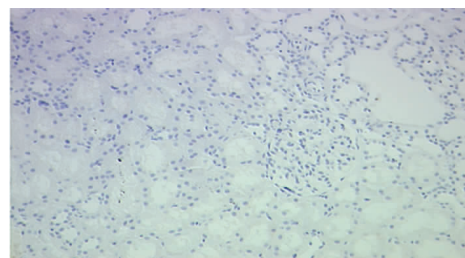


图4 对照组 CD68 的表达 (200 ×)

Fig.4 Expressions of CD68 in control group (200 ×)

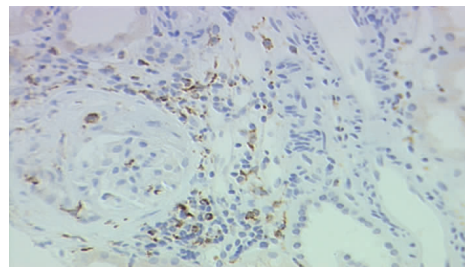


图5 实验组 CD68 的表达 (400 ×)

Fig.5 Expressions of CD68 in experiment group (400 ×)

实验组肾间质CD68的表达与肾间质损害程度呈正相关($r_s=0.836, P<0.01$)。肾间质损害程度越重,肾间质中CD阳性细胞百分比越高。

2.4 OPN 与 CD68 的关系

肾间质损害1~3级的IgA肾病小管间质OPN的表达与CD68的表达呈正相关($r_s=0.54, P=0.04$),见图6。

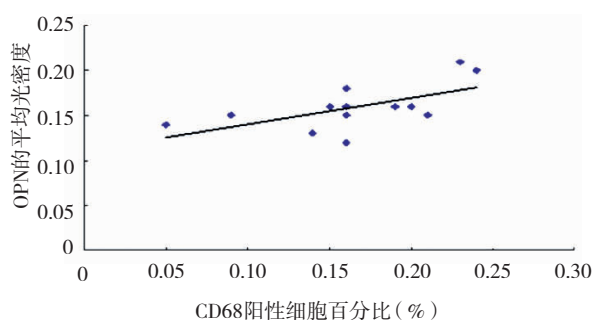


图 6 OPN 与 CD68 的关系

Fig.6 Relationship between OPN and CD68

3 讨论

IgA 肾病是全球范围内最常见的原发性肾小球疾病,约占肾活检病例的 1/3,是慢性肾脏疾病最主要的表现类型^[1]。近年来研究发现,多数患者的病情呈进行性发展,据全球范围内统计,最终有高达 30% 的 IgA 肾病可逐渐进展为终末期肾病^[2]。肾小管间质的损伤被认为是各种炎症性和非炎症性肾小球疾病发展的共同途径,它极大的影响肾脏功能及疾病的预后。本研究发现,有高达 86% 的患者伴有不同程度肾间质损伤。

单核/巨噬细胞是多功能的细胞,在与免疫细胞和非免疫细胞的细胞网络中起重要的免疫和非免疫功能。本研究发现在正常肾组织中有少量的巨噬细胞浸润,它可能起着呈递作用和参与组织的更新和修复过程。本实验发现在 IgA 肾病中 CD68 阳性细胞在肾间质内呈散在或成簇分布,多位于小血管旁,在肾小球内主要位于系膜区、球囊壁及新月体、毛细血管腔内。本实验同时发现肾间质损害 0 级、Lee 分级 II 级的 IgA 肾病的肾小球内和肾间质内 CD68 阳性细胞较对照组增高,但差异无统计学意义。Lee 分级 III~V 级、肾间质损害 1~3 级的 IgA 肾病肾小球和肾间质中 CD68 阳性细胞数较对照组显著增高,差异有统计学意义。本研究进一步发现肾间质内 CD68 的表达与肾间质损害程度成正相关,本研究与 Myllymaki 等的发现^[3]一致,提示单核/巨噬细胞的浸润在 IgA 肾病肾间质的损害的进展中起着重要作用。

本研究发现在正常肾脏组织肾小管中 OPN 有微量表达,而 IgA 肾病中肾小管 OPN 蛋白及 OPN mRNA 的表达均明显上调。Okada 等^[4]研究发现在人 IgA 肾病中远端小管和近端小管上皮细胞的胞质中 OPN 的表达上调,且上调的程度与肾间质内单核/巨噬细胞的浸润是平行的。本研究发现,OPN 及 OPN mRNA 的表达与肾间质的损害程度不具有相关性,而在肾间质损害 1~3 级的 IgA 肾病中,OPN 的表达与肾间质内 CD68 的表达呈正向关,CD68 的浸润与肾间质损害呈正相关。较多的研究发现:OPN 是一个强大的巨噬细胞黏附分子和趋化分子,巨噬细胞有大量的与 OPN 高度亲和力的受体,OPN 与整合素受体结合可介导巨噬细胞的迁移和粘附,与 CD44 结合对巨噬细胞有趋化作用,可促使巨噬细胞到达肾间质,加重肾间质损伤^[5]。故推测为 OPN 并非直接参与了肾间质损伤,而是通过介导单核巨噬细胞的浸润,参与了肾间质的损伤,就如 Lim 等^[6]发现 OPN 与炎症有关,它通过延长炎症时间间接参与肾间质纤维化。

参 考 文 献

- [1] Cai G Y, Chen X M. Immunoglobulin A nephropathy in China: progress and challenges[J]. American Journal of Nephrology, 2009, 30 (3): 268-273.
- [2] Lv J, Zhang H, Zhou Y, et al. Natural history of immunoglobulin A nephropathy and predictive factors of prognosis: a long-term follow up of 204 cases in China[J]. Nephrology, 2008, 13(3): 242-246.
- [3] Myllymaki J M, Honkanen T T, Syrjänen J T, et al. Severity of tubulointerstitial inflammation and prognosis in immunoglobulin A nephropathy[J]. Kidney Int, 2007, 71(4): 343-348.
- [4] Okada H, Moriwaki K, Konishi K, et al. Tubular osteopontin expression in human glomerulonephritis and renal vasculitis[J]. Am J Kidney Dis, 2000, 36(3): 498-506.
- [5] Ophascharoensuk V, Giacheli C M, Gordon K, et al. Obstructive uropathy in the mouse role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis[J]. Kidney Int, 1999, 56(2): 571-580.
- [6] Lim B J, Kim J H, Hong S W, et al. Expression of fibrosis-associated molecules in IgA nephropathy treated with cyclosporine[J]. Pediatr Nephrol, 2009, 24(3): 513-519.

(责任编辑:唐秋姗)