文章编号:1000-5404(2005)20-2083-03

论著

NGAL在急性药物相关性间质性肾炎中的表达及其意义

张建国[1],丁涵露[1],任姜汶[1],高闻达[2] ([1]第三军医大学大坪医院野战外科研究所肾内科,重庆 400042;[2]Department of Medicine, Division of Immunology, Transplant Research Center, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA 02215, USA)

提 要:目的 了解急性药物相关性间质性肾炎(acute drug induced interstitial nephritis, AIN)患者肾组织中NGAL的表达及NGAL与肾小管-间质病理损害程度的关系。**方法** 免疫组化观察正常肾组织和AIN患者肾组织NGAL的表达,以及NGAL阳性强度与小管-间质病理损害程度的关系。**结果** AIN患者肾组织表达NGAL较正常组增多、增强;其小管NGAL阳性强度与小管-间质病理损害程度呈负相关。**结论** NGAL在AIN肾小管-间质病理损害中起重要作用。

关键词:急性药物相关性间质性肾炎;NGAL
中图法分类号:R692.33;R977.6 **文献标识码**:A

Expression and significance of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in drug-induced acute interstitial nephritis

ZHANG Jian-guo[1], DING Han-lu[1], REN Jiang-wen[1], GAO Wen-da[2] ([1]Department of Kidney, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; [2]Department of Medicine, Division of Immunology, Transplant Research Center, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, MA 02215, USA)

Abstract: **Objective** To investigate the role of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in the pathogenesis of drug-induced acute interstitial nephritis (AIN) and its correlation with the degree of tubulointerstitial lesions. **Methods** The renal tissues from 15 diagnosed drug-induced AIN patients were performed immunohistochemical staining to detect the expression of NGAL. Another 15 normal renal tissues were served as control. **Results** NGAL expression were significantly higher in AIN than that in the normal renal tissue. The intensity of positive NGAL in renal tissues of AIN showed a negative correlation with the degree of tubulointerstitial lesions. **Conclusion** Increased expression of NGAL in renal tissue of AIN has an important effect on the degree of tubulointerstitial lesions.

Key words: drug-induced acute interstitial nephritis; NGAL

急性药物相关性间质性肾炎(acute drug induced interstitial nephritis, AIN)是一组病变主要在肾小管-间质的急性炎症性疾病,病理检查可见弥漫性肾间质炎症细胞浸润、水肿及不同程度的肾小管退行性变,而肾小球及肾血管基本正常。青霉素类和非甾体类抗炎药是引起AIN的最为常见原因,其发病机制不太明确,虽然大多数患者的预后比较好,但有极少数遗留肾功能不全,并最终进展为终末期肾病,因此进一步探讨AIN患者肾小管-间质损伤的保护机制对改善其预后有重要意义。

NGAL(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)是lipocalin家族的新成员,是1993年在人中性粒细胞中被发现的一种小分子量分泌性蛋白[1],人NGAL分子量为25×10^3。体内外研究均发现,肾近曲小管细胞在损伤后可高表达NGAL,而且体内注射重组的NGAL可减轻小鼠肾脏缺血-再灌注所引起的肾小管损伤[2],但有关AIN患者肾组织中NGAL的表达及其意义,目前少见报道,故本实验拟观察AIN患者肾组织中NGAL的表达及其与肾小管-间质损伤之间的关系。

作者简介:张建国(1966-),男,湖北省黄岗市人,硕士,副主任医师,副教授,主要从事慢性肾炎发病机制及治疗方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)68757446

收稿日期:2005-07-29;修回日期:2005-10-10

1 对象与方法

1.1 研究对象

1.1.1 实验组 15 例 AIN 患者均为 2004－2005 年我院住院患者，男性 8 例，女性 7 例，年龄 16～48（22.9±5.6）岁，均经临床表现、实验室检查和肾活检组织病理检查确诊为青霉素类或非甾体类抗炎药引起的 AIN，肾活检前均未用糖皮质激素治疗。

1.1.2 对照组 15 例，来自肾移植配型不合的供肾以及肾肿瘤做肾切除术但远离肿瘤部位的肾组织，均经光镜证实肾组织正常。

1.2 材料与方法

1.2.1 材料 大鼠抗人 NGAL 单克隆抗体，美国 RD systems 公司产品；PV9000 Immuno-Bridge$^+$ 二步法免疫组化试剂盒，美国 GBI 公司；DAB 显色试剂盒，北京中山公司。

1.2.2 NGAL 免疫组织化学染色 石蜡切片 4 μm，行二步法免疫组化染色，常规脱蜡、水洗后，3% H_2O_2 室温 15 min，行枸橼酸盐微波修复，滴加一抗：大鼠抗人 NGAL 单克隆抗体（稀释比例为 1∶100），4 ℃过夜。次日 0.01 mol/L PBS 洗 5 min×3 次后，即按照 PV9000 Immuno-Bridge$^+$ 二步法免疫组化试剂盒说明书进行操作，依次滴加增敏剂37 ℃ 30 min，滴加二抗37 ℃ 30 min，DAB 显色，苏木精复染细胞核。阴性对照以大鼠正常 IgG 代替一抗，同法操作。

1.2.3 肾小管间质病理损害程度的判定[3] 根据肾小管扩张程度、肾小管萎缩程度、肾小管上皮细胞空泡变性程度、肾小管上皮细胞坏死程度、间质纤维化程度及肾间质炎症细胞浸润程度的无、轻、中、重分别计 0、1、2、3 分，结果以每例样本的相加总和表示。

1.2.4 结果分析 NGAL 免疫组化表达采用半定量法分析，由 3 人同时进行。根据它们在皮质肾组织中的染色强度分为 0～3 分，即 0 分：无染色；1 分：弱阳性；2 分：中度阳性；3 分：强阳性。

1.3 统计学分析

数据以等级资料表示，实验组与对照组的 NGAL 阳性表达强度的比较，采用非参数检验中两样本等级资料的 Mann-Whitney Test 方法。对照组与实验组 NGAL 阳性表达强度与小管-间质病理损害程度的相关分析用 Spearman 等级相关分析。以 SPSS10.0 统计软件处理数据。

2 结果

2.1 NGAL 在正常肾组织中的表达

正常肾组织中，近端肾小管上皮细胞表达弱的 NGAL 见图 1、表 1；肾小球、远端肾小管上皮细胞、集合管上皮细胞及阴性对照未见 NGAL 阳性染色。

2.2 NGAL 在 AIN 患者肾组织中的表达

AIN 患者肾组织中，近端肾小管上皮细胞表达 NGAL 较正常肾组织增高、增强（图 2、表 1）。免疫组化阳性染色颗粒位于肾小管上皮细胞胞浆中，在肾小球、远端肾小管上皮细胞、集合管上皮细胞及阴性对照未见 NGAL 表达。

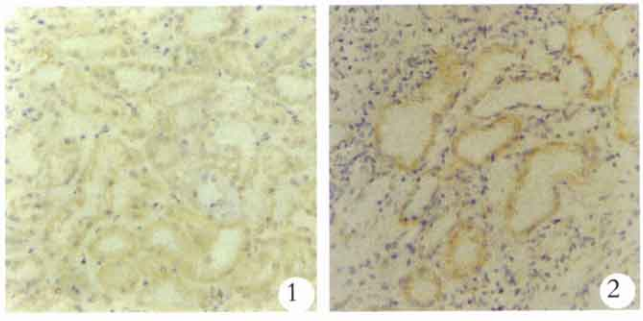


图 1 NGAL 在正常肾组织中弱表达（免疫组化×200）

Fig 1 NGAL expression in normal renal tissues（Immunohistochemical staining ×200）

图 2 NGAL 在 AIN 肾组织中的表达增强（免疫组化×200）

Fig 2 The intensed NGAL expression in the renal tissue of AIN（Immunohistochemical staining ×200）

表 1 肾组织 NGAL 表达和小管-间质病理损害程度总积分（n=15）

Tab 1 Correlation of NGAL expression in renal tissues and degree of renal tubule interstitial lesions（n=15）

Group	NGAL$^+$ intensity		Degree of renal tubule interstitial lesion	
	Rank	n	Rank	n
Normal control	0	3	0	1
	1	9	1	8
	2	1	2	4
	3	2	3	2
AIN	1	4	5	4
	2	3	6	5
	3	8	7	6

2.3 NGAL 表达与 AIN 小管-间质病理损害程度相关分析

15 例 AIN 患者近端肾小管上皮细胞 NGAL 阳性表达强度与小管-间质病理损害程度呈显著负相关（r = －0.724，P=0.001）。

3 讨论

最初发现，NGAL 是在中幼粒细胞和晚幼粒细胞的分化阶段合成的[4]，可诱导白细胞内颗粒的释放，以消灭病原微生物[5]。近期研究认为，NGAL 可在肿瘤细胞及多种上皮细胞中表达，包括近端肾小管上皮细胞。损伤后的肾小管上皮细胞表达的 NGAL 可诱导

肾小管-间质中浸润的中性粒细胞发生凋亡以保护肾组织免受炎细胞的侵害，同时 NGAL 可诱导肾间充质细胞向肾小管上皮细胞的转化，从而诱导肾小管上皮细胞的再生[2,6]。动物实验显示，体内注射重组的 NGAL 可减轻小鼠肾脏缺血-再灌注所引起的肾小管损伤[2]。这可能是因为，NGAL 作为一个铁转运蛋白参与了损伤后肾小管上皮细胞内的铁转运和诱导血红素加氧酶的生成，从而有利于损伤小管的再生[7]，为如何保护损伤的肾小管提供了重要的思路。

由于缺乏相应的动物模型和大样本病例的免疫病理研究，AIN 发病机制目前尚不清楚，但其主要的病变部位在小管-间质，不仅有肾小管上皮细胞的损伤，而且小管-间质内有多种炎细胞包括中性粒细胞、淋巴细胞和单核巨噬细胞等的浸润，并呈增殖活跃状态，与肾间质纤维化病变密切相关[8]。因此探讨肾小管上皮细胞损伤后 NGAL 的表达对如何进一步抑制中性粒细胞的炎性作用及使损伤的肾小管再生无疑是重要的。

本研究表明 AIN 的肾小管上皮细胞表达 NGAL 较正常肾组织高，随着小管-间质损害的加重，其表达量下降，但仍较正常肾组织高，推测近端肾小管上皮细胞上的 NGAL 有可能诱导肾小管-间质中浸润的炎细胞发生凋亡以保护肾组织免受炎细胞的侵害，同时 NGAL 也有可能诱导肾间充质细胞向肾小管上皮细胞的转化，从而诱导肾小管上皮细胞的再生。

在本研究中，病变肾组织中 NGAL 表达的阳性强度和小管-间质病理损害程度呈负性关系，随着小管-间质损害的加重，NGAL 表达量下降，机制不明确。因此，进一步明确近端肾小管上皮细胞上的 NGAL 表达的影响因素，以及上调 AIN 近端肾小管上皮细胞 NGAL 表达，可能有助于 AIN 的治疗。

NGAL 在肾脏疾病中的研究主要集中在 NGAL 可作为早期检测肾脏急性-缺血再灌注损伤和顺铂诱导的肾脏急性损伤的指标[6,9]，另外也可作为早期检测儿童心脏术后急性肾功能衰竭发生的指标[10]。本研究表明，NGAL 在 AIN 肾小管-间质病理损害中起重要作用，但人体内肾小管上皮细胞损伤-再生及肾脏纤维化的影响因素是多样化的，有研究表明，NGAL 与明胶酶 B，即 MMP-9 的功能密切相关[10]。NGAL 可以结合 MMP 的 N-端胱氨酸开关，促进 Pro-MMP 的活化，且 NGAL 有抵消金属蛋白酶-1 组织抑制剂抑制 MMP-9 活性的作用[11]。因为 MMP-9 在降解基底膜的 IV 型胶原和基质成分中起重要作用，故推测 NGAL 可能在肾脏纤维化方面发挥作用。总之，进一步研究 NGAL 在 AIN 发病中的作用及其作用机制，以及其他还未知因素的研究，将深化我们对肾小管上皮细胞-炎细胞免疫应答的认识，为 AIN 小管-间质损伤的治疗提供更好的策略。

参考文献：

[1] Kjeldsen L, Johnsen A H, Sengelov H, *et al*. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase[J]. J Biol Chem, 1993, 268(14): 10425 - 10432.

[2] Mishra J, Mori K, Ma Q, *et al*. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(12): 3073 - 3082.

[3] Austin H A 3rd, Muenz L R, Joyce K M, *et al*. Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome[J]. Kidney Int, 1984, 25(4): 689 - 695.

[4] Goetz D H, Willie S T, Armen R S, *et al*. Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin[J]. Biochemistry, 2000, 39(8): 1935 - 1941.

[5] Bratt T, Ohlson S, Borregaard N. Interactions between neutrophil gelatinase-associated lipocalin and natural lipophilic ligands[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1472(1 - 2): 262 - 269.

[6] Mishra J, Ma Q, Prada A, *et al*. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(10): 2534 - 2543.

[7] Mori K, Lee H T, Rapoport D, *et al*. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury[J]. J Clin Invest, 2005, 115(3): 610 - 621.

[8] Cockwell P, Howie A J, Adu D, *et al*. In situ analysis of C-C chemokine mRNA in human glomerulonephritis[J]. Kidney Int, 1998, 54(3): 827 - 836.

[9] Mishra J, Mori K, Ma Q, *et al*. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity[J]. Am J Nephrol, 2004, 24(3): 307 - 315.

[10] Mishra J, Dent C, Tarabishi R, *et al*. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery[J]. Lancet, 2005, 365(9466): 1231 - 1238.

[11] Friedl A, Stoesz S P, Buckley P, *et al*. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression[J]. Histochem J, 1999, 31(7): 433 - 441.

（编辑　张大春）