文章编号:1000-5404(2007)15-1491-03

论著

吲哚胺2,3-双加氧酶在新月体肾炎肾组织中的表达变化

侯卫平[1],袁发焕[1],赵红艳[2] (第三军医大学新桥医院:[1]全军肾脏病中心,重庆市肾病研究所,[2]病理科,重庆 400037)

提 要:目的 检测新月体肾炎患者肾组织中吲哚胺2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)的表达情况及其与肾组织浸润炎细胞的增殖和肾小管-间质病理损害程度之间的关系。**方法** 采用免疫组织化学染色法检测正常肾组织和新月体肾炎患者肾组织IDO的表达情况,并进一步分析其表达与肾间质浸润PCNA阳性炎细胞数及肾小管-间质病理损害程度之间的相关关系。**结果** 正常肾组织未检测到IDO表达,而在新月体肾炎患者肾小管上皮细胞IDO的表达显著上调,并且新月体肾炎肾小管上皮细胞IDO的表达强度与肾小管-间质PCNA阳性浸润细胞数及肾小管-间质病理损害程度显著负相关。**结论** IDO在新月体肾炎肾小管上皮细胞中高表达并与肾小管-间质炎细胞增殖及小管-间质病理损害相关,提示IDO可能通过抑制炎细胞增殖活性参与新月体肾炎肾小管-间质病理损害过程。

关键词:新月体肾炎;吲哚胺2,3-双加氧酶;核增殖抗原
中图法分类号:R345;R36;R692.3 **文献标识码**:A

Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in renal tissues of crescent nephritis

HOU Wei-ping[1], YUAN Fa-huan[1], ZHAO Hong-yan[2] ([1]Department of Nephrology, [2]Department of Pathology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in renal tissues of crescent nephritis and its correlation with cell proliferation and pathologic tubulointerstitial lesion. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect IDO expression in renal tissues of crescent nephritis and normal renal tissues. The correlation between IDO expression and the number of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) positive cells or pathologic tubulointerstitial lesion were analyzed. **Results** IDO expression was found in the renal tubular epithelial cells of crescent nephritis, while that in the normal renal tissues was negative by immunohistochemical staining. The expression of IDO protein in tubular epithelial cells showed a significantly negative correlation with the number of PCNA positive cells or tubulointerstitial lesion of crescent nephritis. **Conclusion** IDO may participate in the pathogenesis of crescent nephritis by inhibiting the cell proliferation.

Key words: crescent nephritis; indoleamine 2,3-dioxygenase; proliferating cell nuclear antigen

吲哚胺2,3-加双氧酶(indoleamine2,3-dioxygenase, IDO)是色氨酸在肝外代谢的唯一限速酶,其可代谢色氨酸为犬尿氨酸。研究表明IDO代谢产生低色氨酸和高犬尿氨酸的微环境可使多种炎性细胞尤其是T淋巴细胞不能通过G_1/S限制点而停止分化,并促使其凋亡[1]。因此IDO已成为目前T细胞介导免疫性疾病的研究热点,如研究表明在自身免疫性脑脊髓炎、过敏性哮喘等多种免疫性疾病发病机制中IDO起着重要作用[2,3]。

既往研究显示γ-干扰素基因敲除鼠可诱导更为严重的新月体肾炎,表现为大量炎细胞的浸润,但其具体机制未明。最新研究表明内源性γ-干扰素刺激抗原递呈细胞IDO的表达上调是其在多种疾病致免疫耐受的重要机制之一[4,5],这些资料提示IDO有可能参与了新月体肾炎的发病机制。因此,本研究检测新月体肾炎肾组织中IDO的表达变化,同时检测肾小管间质中PCNA阳性细胞数以反应炎性细胞在其浸润情况,并分析肾组织表达IDO与肾组织浸润炎细胞增多和新月体肾炎病理损害程度之间的关系,以初步探讨IDO在新月体肾炎病变中作用。

1 对象与方法

1.1 病例选择

所有病例选自在第三军医大学新桥医院和大坪医院住院的患者,男性14例,女性11例,年龄(31±11)(14~56)岁。肾活检组织病理改变符合以下标准者诊断为新月体肾炎:

基金项目:重庆市自然科学基金(2006BB5055)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing(2006BB5055)
作者简介:侯卫平(1973-),男,山西省五寨县人,博士,主治医师,主要从事肾炎细胞免疫方面的研究。电话:(023)68774068,E-mail:hwpdx@mail.tmmu.com.cn
通讯作者:袁发焕,电话:(023)68774321
收稿日期:2006-08-30;修回日期:2006-12-18

50% ~100%肾小球中可见细胞性或纤维细胞性新月体形成，新月体占该肾小球囊的50%以上，为半月或环状体，对照组14例，来自肾肿瘤做肾切除术但远离肿瘤部位的肾组织，经光镜检查均证实为正常肾组织。

1.2 材料

小鼠抗人IDO单克隆抗体(美国Upstate公司)；小鼠抗人PCNA单克隆抗体(美国Calbiochem公司)；ABC法免疫组织化学试剂盒(深圳晶美公司)。

1.3 方法

1.3.1 IDO和PCNA免疫组化染色检测 常规脱蜡、水洗后3% H_2O_2室温15 min消除内源性过氧化酶，行微波抗原修复后分别滴加1∶50的小鼠抗人IDO单克隆抗体和1∶100的小鼠抗人PCNA单克隆抗体，4 ℃冰箱内过夜，之后用0.01 mmol/L的PBS冲洗3次，依次滴加二抗、三抗后进行DAB显色，显微镜下控制显色时间，苏木精套染，水洗、脱水、透明后中性树胶封片，阴性对照以PBS代替一抗，其他操作同前。

1.3.2 肾小管-间质病理损害程度的判定[6] 观察以下4个指标对肾小管-间质(TIL)病理损害进行评分：肾小管变性、坏死；肾小管扩张、萎缩；间质炎性细胞浸润；间质纤维化。根据病变的程度按无、轻、中、重度分别记为0、1、2、3级，总评0分者为0级；1~4分为1级；5~8分为2级；9~12分为3级。

1.3.3 结果分析 IDO免疫组化以细胞质呈棕黄色为阳性染色，根据肾组织细胞染色强度分为0~3分：无着色为0分，浅黄色1分，黄色为2分，深棕黄色3分。PCNA免疫组化以细胞核呈棕黄色为阳性染色，并对肾小管-间质PCNA阳性浸润细胞进行计数定量分析，显微镜下计算20个高倍视野(200倍)中肾间质浸润PCNA阳性细胞数/gcs。以上结果分析均由盲法进行评定。

1.4 统计学处理

肾小管-间质PCNA阳性浸润细胞数以计数资料 $\bar{x} \pm s$ 表示，其余数据处理以等级资料表示。相关分析采用Spearman等级相关分析，所有结果在SPSS 10.0统计分析软件上处理。

2 结果

2.1 IDO和PCNA在正常肾组织的表达

正常肾组织中近端肾小管上皮细胞、远端肾小管上皮细胞及集合管上皮细胞均不表达IDO(图1、表1)，正常肾小管-间质区罕有PCNA阳性表达细胞。

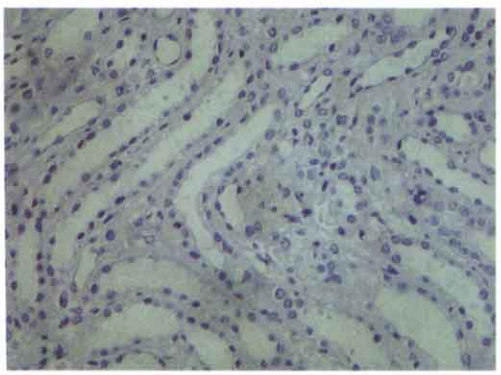


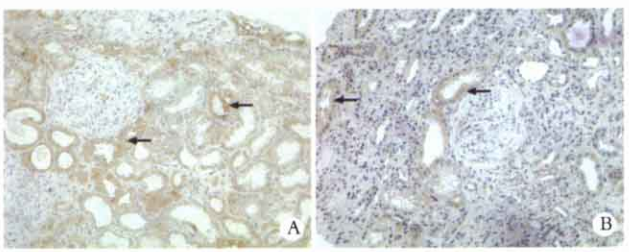
图1 正常肾组织近端肾小管上皮细胞无IDO的表达 (ABC×200)

表1 肾小管-间质IDO和PCNA表达和小管-间质病理损害程度积分

组别	n	肾小管细胞IDO着色强度		肾小管间质损害程度		PCNA+浸润细胞细胞数/gcs
		等级	n	等级	n	
正常组	14	0	14	0	6	—
		1	0	1	5	—
		2	0	2	3	—
新月体肾炎组	25	1	4	1	8	5.0±1.2
		2	12	2	13	7.5±1.5
		3	9	3	4	11.5±2.1

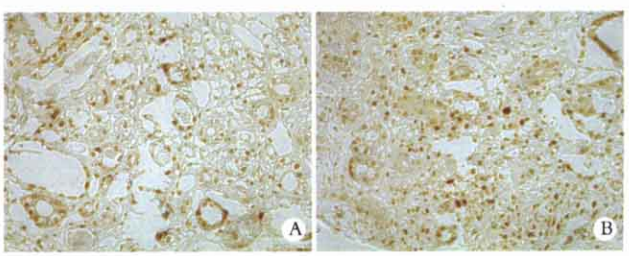
2.2 IDO和PCNA在新月体肾炎肾小管-间质细胞中的表达

免疫组织化学染色显示IDO在新月体肾炎的近端肾小管上皮细胞表达最强(图2A、表1)，在远端肾小管上皮细胞亦有表达，但随着小管间质病变的加重，IDO的表达明显减弱(图2B)，肾小球及阴性对照组未见IDO阳性染色。PCNA染色显示新月体肾炎肾小管-间质中浸润的PCNA阳性炎细胞数随病变程度的变化而不同(图3，表1)，同时肾小管上皮细胞PCNA表达也升高。



A：新月体肾炎肾小管上皮细胞IDO表达明显增强；B：随间质病变加重表达减弱；←：肾小管上皮细胞阳性染色

图2 IDO在新月体肾炎的表达情况 (ABC×200)



A：新月体病变时PCNA阳性炎细胞增多；B：随病变加重浸润PCNA阳性炎细胞进一步增多

图3 新月体肾炎肾小管-间质浸润PCNA阳性炎细胞 (ABC×400)

2.3 新月体肾炎肾小管上皮细胞IDO表达程度与肾间质PCNA阳性细胞数及肾小管-间质病理损害程度相关性分析

新月体肾炎肾小管上皮细胞IDO的表达水平与肾间质中浸润PCNA阳性细胞数呈负相关($r = -0.83$，$P < 0.01$)，与肾小

管-间质病理损害程度也呈负相关($r = -0.68$, $P < 0.01$)。

3　讨论

色氨酸是哺乳动物体内最贫乏的必需氨基酸，也是细胞增殖代谢必不可缺的氨基酸，因此色氨酸对生物体代谢具有极其重要的作用[7]。近年来研究表明抗原递呈细胞和组织固有细胞 IDO 的表达上调不仅是机体抵御微生物感染的效应机制之一，而且其在多种疾病的 T 细胞免疫耐受，如母胎耐受、移植免疫耐受和自身免疫性疾病的免疫耐受中具有重要作用[8,9]。在哺乳动物怀孕期间胎盘细胞 IDO 的表达上调，而 IDO 阻断剂可引发母体 T 细胞对胎儿的排斥反应，并致胎儿流产[8]。

本实验结果显示在正常肾组织肾小管上皮细胞中未检测到 IDO 的表达，而在新月体肾炎肾小管上皮细胞 IDO 的表达明显上调，这可能是病理情况下升高的 IFN-γ 刺激肾小管上皮细胞 IDO 表达上调的结果。由于新月体肾炎肾小管间质浸润大量炎细胞为其病理特征，而细胞增殖核抗原是细胞增殖的重要检测指标，所以通常检测新月体肾炎肾小管-间质细胞 PCNA 阳性细胞反应在其浸润炎细胞的增殖情况[10]。本实验结果显示在新月体肾炎肾小管间质 PCNA 阳性浸润细胞数较正常组显著增多，但通过分析其与肾小管 IDO 表达强度间相关性显示 PCNA 阳性浸润细胞数与肾小管 IDO 表达阳性程度之间呈显著负相关。我们在体外培养的肾小管上皮细胞经 IFN-γ 刺激后通过 RT-PCR 和免疫组化检测示 IDO 的表达显著上调，并可显著抑制共培养淋巴细胞的增殖，进一步验证了病理条件下肾小管上皮细胞诱导表达的 IDO 可反馈抑制 T 细胞的增殖(另文发表)。

肾小管上皮细胞既属于肾组织固有细胞又属于不完全 APCs，作为 APCs 肾小管上皮细胞与肾间质浸润 T 细胞间的相互作用对肾小管-间质的免疫炎性损害发挥着重要作用，因此新月体肾炎肾小管上皮细胞 IDO 的表达上调可能通过与肾间质淋巴细胞的相互作用而参与了肾小管-间质病理损害的发生发展。基于本实验结果我们推测在新月体肾炎中肾小管上皮细胞 IDO 的表达上调可能反馈调节了肾小管-间质的免疫炎性反应，从而减轻了肾小管-间质的病理损害程度。随着新月体肾炎病变的发展，肾小管上皮细胞 IDO 的表达量下降，这可能与肾组织内其他下调 IDO 表达的细胞因子如 TGF-β 的增高相关，此时肾小管-间质 PCNA 阳性细胞数及肾小管-间质病理损害增加，进一步提示 IDO 可能在新月体肾炎肾小管间质病变发生发展中起着重要作用。

总之本实验显示在新月体肾炎肾小管上皮细胞中 IDO 的表达明显上调，并且 IDO 的表达强度与肾小管-间质浸润炎细胞的增殖及肾小管-间质病理损害程度之间呈负性相关，这表明肾小管上皮细胞 IDO 的表达对肾间质炎性细胞具有重要的调节作用，其可能通过代谢色氨酸产生抑制炎细胞的微环境，进而减轻了肾小管-间质的免疫炎性反应和病理损害。因此进一步研究肾小管细胞 IDO 表达调控机制及加强其表达的策略可为新月体肾炎的治疗提供新的途径。

参考文献：

[1] Bauer T M, Jiga L P, Chuang J J, *et al*. Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses *in vitro* and *in vivo*[J]. Transpl Int, 2005, 18(1): 95 - 100.

[2] Kwidzinski E, Bunse J, Aktas O, *et al*. Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation [J]. FASEB J, 2005, 19(10): 1347 - 1349.

[3] Hayashi T, Beck L, Rossetto C, *et al*. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2, 3-dioxygenase[J]. J Clin nvest, 2004, 114 (2): 270 - 279.

[4] Kitching R, Turner A L, Semple T, *et al*. Experimental autoimmune anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis: a protective role for IFN-gamma[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(7): 1764 - 1774.

[5] Wood K J, Sawitzki B. Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells *in vivo*[J]. Trends Immunol, 2006, 27 (4): 183 - 187.

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

[7] Mellor A. Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 338(1): 20 - 24.

[8] Mellor A L, Chandler P, Lee G K, *et al*. Indoleamine 2,3-dioxygenase, immunosuppression and pregnancy [J]. J Reprod Immunol, 2002, 57(1 - 2): 143 - 150.

[9] Alexander A M, Crawford M, Bertera S, *et al*. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD Islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes[J]. Diabetes, 2002, 51(2): 356 - 365.

[10] 唐　政，吴　燕，胡伟新，等. 新月体肾炎患者肾组织中浸润细胞的分布特点及临床意义[J]. 中华肾脏病杂志, 2000, 16(4): 256 - 258.

(编辑　陈聪连)