文章编号:1000-5404(2008)05-0447-03

论著

肾组织炎症细胞浸润与其类肝素酶高表达相关

余荣杰,赵洪雯,李 敛,干 磊,刘 宏,吴雄飞 (第三军医大学西南医院肾科,重庆 400038)

摘 要:目的 观察进展期慢性肾炎患者外周血淋巴细胞及肾组织类肝素酶(heparanase, Hpa)基因表达情况,并初步探讨 Hpa 与肾组织炎细胞浸润的相关性。方法 进展期慢性肾炎患者 30 例及肾移植健康供者 10 例,采用 RT-PCR 方法检测外周血淋巴细胞类肝素酶 mRNA 表达,肾组织石蜡切片 Hpa 免疫组化染色检测肾组织 Hpa 的表达,并计数比较肾组织中炎细胞浸润程度。结果 慢性肾炎患者外周血淋巴细胞 Hpa mRNA 含量明显高于正常人($P<0.05$);免疫组化显示,慢性肾炎患者肾小球及纤维化小管间质中浸润炎细胞也存在 Hpa 表达,而正常供肾仅见肾小球内 Hpa 极低表达($P<0.05$),Hpa 表达随肾组织炎细胞浸润程度加重而递增。结论 慢性肾炎患者外周血淋巴细胞存在 Hpa 高表达,肾组织炎细胞浸润与 Hpa 的高表达存在一定相关性。

关键词:慢性肾炎;类肝素酶;炎细胞浸润
中图法分类号:R345;R392.3;R692.02 文献标识码:A

Renal tissue: inflammatory cell infiltration correlated with high expression of heparanase

YU Rong-jie, ZHAO Hong-wen, LI Lian, LIU Hong, GAN Lei, WU Xiong-fei (Institute of Kidney, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

Abstract: Objective To observe the expression of heparanase (Hpa) in the peripheral lymphocytes and renal tissue of patients with progressive chronic nephritis, and to investigate the correlation between the expressions and inflammatory cell infiltration. Methods Totally 30 cases with chronic nephritis in progression and 10 individuals as healthy donors for kidney transplantation were subjected. RT-PCR was used to determine the Hpa mRNA expression in peripheral blood lymphocytes, and immunohistochemical staining was used to paraffin sections of renal tissue to determine Hpa expression. The inflammatory cell infiltration was observed in renal tissue. Results Hpa mRNA expression in peripheral blood lymphocytes was significantly higher in chronic nephritis than normal control ($P<0.05$). Immunohistochemical staining indicated that there was Hpa expression in infiltrated inflammatory cells in glomerulus and fibrotic tubule stroma of chronic nephritis, while only very low Hpa expression was found in glomerulus of normal donor ($P<0.05$). Therefore, Hpa expression became stronger with more inflammatory cells infiltrating to renal tissue. Conclusion There is high Hpa expression in peripheral blood lymphocytes of chronic nephritis, and there might be a positive correlation between inflammatory cell infiltration and high Hpa expression in renal tissue.

Key words: chronic glomerulonephritis; heparanase; inflammatory cell infiltration

肾小管间质进行性纤维化是各种慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)共同的病理表现。其始动因素无论为免疫性或非免疫性,常首先表现为炎症细胞浸润。病理状态下肾组织炎细胞浸润是肾间质进行性纤维化的重要环节。炎细胞趋向炎症反应区必须首先穿越由细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基底膜组成的屏障。近年发现糖氨聚糖作为细胞外基质和基底膜的另一主要成分,其降解是细胞侵袭所必须的[1]。类肝素酶(heparanase, Hpa)正是一种裂解糖氨聚糖中硫酸乙酰肝素侧链的内切糖苷酶,在细胞侵袭中起着极其重要的作用。本实验拟观察慢性肾炎患者外周血淋巴细胞 Hpa 基因表达,并初步探讨 Hpa 与肾组织炎细胞浸润的相关性。

1 资料与方法

1.1 病例资料

我院 2005 年 4 – 6 月收治的临床诊断为进展期慢性肾小

作者简介:余荣杰,男,重庆市江津人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事肾移植及增殖性肾病方面的研究,发表论文 7 篇。电话:(023)68765335, E-mail: rongjie_yu@yahoo.com.cn
通信作者:吴雄飞,电话:(023)68754188, E-mail: wuxfei@126.com
收稿日期:2007-09-20 修回日期:2007-12-20

球肾炎住院患者30例及肾移植健康供者10例。肾炎组男性10例，女性20例，年龄18～67（37.87±2.14）岁；血肌酐（158.00±13.92）μmol/L。健康供者男性9例，女性1例，年龄20～42（27.44±2.35）岁，血肌酐（61.46±3.75）μmol/L。所有病例及肾移植健康供者抽取外周血5 ml，供分离外周血淋巴细胞。肾炎患者经皮肾穿刺活检获取肾组织，肾移植健康供者肾组织于取肾后直接穿刺获取肾组织。

1.2 方法

1.2.1 Ficoll法分离外周血淋巴细胞 采血4 ml，枸橼酸抗凝，人淋巴细胞分离液（天津TBD公司）分离外周血淋巴细胞。

1.2.2 外周血淋巴细胞Hpa mRNA表达 Tripure（Roche Diagnostics Corporation）RNA提取液提取淋巴细胞总RNA。紫外分光光度计（Du-640，美国Beckman公司）测定其纯度和含量，取RNA样本2 μg采用逆转录-聚合酶链反应（RT-PCR）检测Hpa mRNA的表达。Hpa（GenBank NM_006665）引物（上海生工合成）序列为：正义5′-CTCATAGCAACCAGAGGAAG-3′；反义5′-ACACAATTCACCCCTGTAAG-3′，产物402 bp。管家基因（GAPDH）的扩增产物为452 bp（上海英骏生物技术有限公司合成）。

扩增产物检测：PCR扩增完毕后，每个反应体系取5 μl，于12 g/L的琼脂糖凝胶中电泳，在凝胶成像系统（美国Bio-Rad公司）中分析电泳带的灰度值，用Hpa和GAPDH吸光度积分比值表示Hpa mRNA表达的相对水平。

1.2.3 肾组织病理学观察及Hpa免疫组化 肾活检肾组织标本经升汞-苦味酸混合固定液固定，石蜡包埋，切片厚4 μm，分别进行HE、PAS、PASM常规染色，光镜观察肾组织病理变化及炎细胞浸润，根据小管间质炎细胞浸润情况分为轻度、中度、重度3组。轻度：炎细胞散在浸润；中度：炎细胞散在浸润+轻度巢状浸润；重度：炎细胞弥漫+巢状浸润。采用SABC法，以PBS替代一抗作阴性对照染色，检测肾组织Hpa的表达，结果采用CMIAS医学图像分析系统进行半定量分析。

1.3 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，两组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 肾组织病理

10例健康供者肾组织未见异常，肾小球及肾小管间质未见明显炎细胞浸润。30例临床诊断为慢性肾炎的病例中，除25例原发性肾小球肾炎外，还分别发现有3例狼疮性肾炎及2例慢性小管间质性肾炎，其肾脏病理诊断详见表1。所有病例肾小球及小管间质均见不同程度炎细胞浸润，尤其是小管间质。肾组织炎细胞浸润程度轻、中、重度3个亚组，分别有10、16例及4例。肾组织慢性纤维化改变越重，肾组织炎症细胞浸润程度也越重。见图1。

表1 病理诊断及肾组织炎细胞浸润程度（例）

病理诊断	炎细胞浸润程度			合计
	轻度	中度	重度	
系膜增生性肾炎	1	2		3
膜增生性肾炎	1	1		2
膜性肾病（MN）	2	2		4
IgA肾病（IgAN）				
IgAN-Ⅰ	2	1		3
IgAN-Ⅱ	2	2		4
IgAN-Ⅲ	1	2	1	4
IgAN-Ⅳ		1	1	2
局灶节段硬化性肾炎（FSGS）	1	1		2
硬化性肾炎			1	1
狼疮性肾炎		2	1	3
慢性小管间质性肾炎		2		2
合计	10	16	4	30

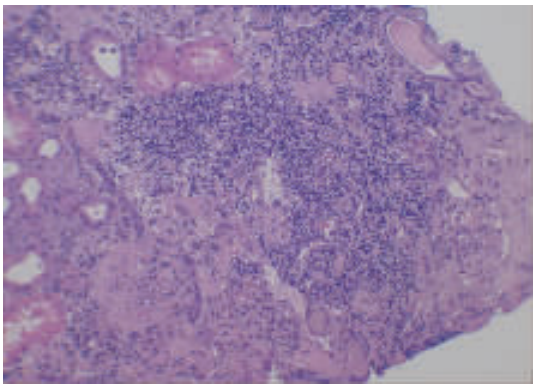
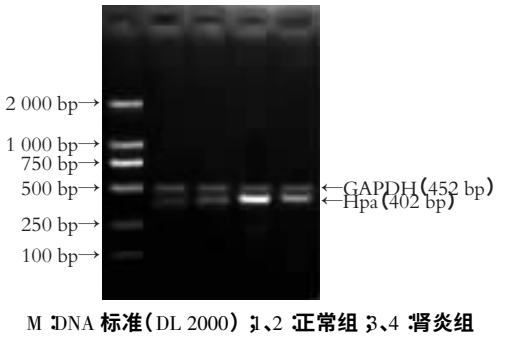


图1 慢性肾炎患者肾组织中炎细胞重度浸润，弥漫分布 （HE×100）

表2 不同程度浸润组外周血淋巴细胞Hpa mRNA相对含量

组别		例数	Hpa mRNA（H/G，$\bar{x}\pm s$）
正常对照组		10	0.362 5±0.025 8
肾炎组	轻度浸润	10	0.453 9±0.021 3[a]
	中度浸润	16	0.664 8±0.026 6[bc]
	重度浸润	4	0.772 1±0.045 4[bd]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与肾炎组轻度浸润比较



M：DNA标准（DL 2000）；1、2：正常组；3、4：肾炎组

图2 Hpa mRNA RT-PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

2.2 外周血淋巴细胞Hpa mRNA表达

慢性肾炎组患者外周血淋巴细胞Hpa mRNA表达明显高于正常对照组，具有显著性差异[（0.608 8±0.026 9）、（0.362 5±0.025 8），$P<0.01$]；肾炎组3个亚组与对照组比较均存在显著性差异（$P<0.05$）；3亚组组间比较，外周血淋巴细胞Hpa mRNA表达有随炎细胞浸润程度加重而递增的趋势，中、重度浸润组对比轻度浸润组均存在显著性差异（$P<0.05$），而中、重度组间相差不显著（$P>0.05$）。见表2、图2。

2.3 肾组织Hpa免疫组化

健康供者肾组织Hpa免疫组化显示小管间质微量表达，而慢性肾病组肾小球、肾小管间质炎细胞浸润部位见不同程度Hpa表达，炎症细胞浸润明显部位Hpa表达增强。图像分析表明，肾炎组肾组织Hpa表达明显高于正常对照组（$P<0.01$）；而肾炎组3个亚组间比较，中度及重度浸润组Hpa表达明显高于轻度浸润组（$P<0.01$）。见表3。

表 3　肾组织 Hpa 表达情况（AOD，$\bar{x} \pm s$）

组别		例数	Hpa
正常对照组		10	0.0209 ± 0.0082
肾炎组	轻度浸润	10	0.0307 ± 0.0028[a]
	中度浸润	16	0.0481 ± 0.0021[bc]
	重度浸润	4	0.0799 ± 0.0051[bd]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与肾炎组轻度浸润比较

3　讨论

类肝素酶（heparanase，Hpa）是一种裂解细胞外基质及基底膜中糖氨聚糖硫酸乙酰肝素（heparan sulfate，HS）侧链的内切糖苷酶，在侵袭性细胞穿越血管壁，实现浸润、扩散、转移过程中的关键作用越来越受到广泛关注。而在各种慢性肾病发展过程中，常伴有肾小管间质大量炎症细胞浸润，介导小管间质炎症性损伤，并最终导致间质纤维化[2]。所以炎细胞浸润在介导肾小管间质炎症和纤维化的发生中具有重要作用。炎细胞的浸润机制除公认的各种趋化因子作用外，是否还涉及 Hpa 的异常表达？本实验观察了临床肾活检标本中肾组织炎细胞浸润情况，结果显示 30 例慢性肾炎肾组织标本中，肾小球及小管间质均见不同程度炎细胞浸润，尤其是小管间质。而且肾组织慢性化改变越重，肾组织炎症细胞浸润程度也重。关于炎细胞肾组织浸润与病理类型和 CKD 原发病的相关性有待系统研究。关于嘌呤霉素肾病中炎症细胞浸润的特点，研究表明[3]注射嘌呤霉素后第 3 周肾间质开始出现炎症细胞浸润，CD4 阳性、TCR 阳性、ICAM-1 阳性细胞增多。姜傥等[4]对 721 例肾活检资料进行了系统回顾性分析报道，在原发和/或继发性肾小球肾炎中，常发生肾小管炎，其中以新月体性肾炎、狼疮性肾炎、毛细血管内增生性肾炎、IgA 肾病、膜增生性肾炎、增生硬化性肾炎等病变时较多见，浸润的细胞多为淋巴及单核巨噬细胞，且肾间质炎性细胞浸润与纤维化程度密切相关。

本实验对外周血及肾组织 Hpa 检测结果显示，在正常人外周血淋巴细胞 Hpa 有一定表达，这与文献[5]报道一致。而在进展期慢性肾炎患者，其外周血淋巴细胞 Hpa 基因表达明显增加。在正常肾组织中除远端小管及集合管可见 Hpa 一定程度表达外，间质未见明显表达。而慢性肾炎小管间质炎细胞浸润区域 Hpa 表达显著增加，而且炎细胞浸润程度重者，其外周血白细胞及肾组织 Hpa 表达明显增强。所以本实验结果提示在慢性肾炎中肾组织炎细胞迁徙、浸润的生物学行为可能涉及 Hpa 的高表达。

炎症的特征性改变是白细胞通过血管壁持续渗出以及它们随后在炎症局部聚集，硫酸乙酰肝素糖蛋白（heparan sulfate proteoglycan，HSPG）主要存在于内皮下基底膜和细胞外基质中，支撑着血管内皮，稳定毛细血管壁结构，Hpa 能水解 HSPG 中 HS。因此它在免疫细胞穿出血管壁并持续渗出到达炎症反应区的过程中起着重要作用[6]。研究表明正常人白细胞中 Hpa mRNA 表达量低，而炎症发生时外周血白细胞，特别是炎症周围血管内白细胞中 Hpa mRNA 表达明显升高[5]。Vaday 等[7]发现在炎症和免疫反应中，记忆 T 细胞和 $CD4^+$ T 淋巴细胞在接受刺激后，可立即释放 Hpa，裂解 HSPG，突破血管壁基底膜屏障和内皮的完整性，有利于循环中的免疫活性细胞外渗，到达炎症反应区。同时 HSPG 释放其结合蛋白如 bFGF 等，促进成纤维细胞增生。进一步的研究提示 Hpa 还具有粘附因子功能，辅助 T 淋巴细胞与血管内皮细胞、细胞外基质的粘附，从而最终导致免疫细胞移行到炎症区域。研究结果显示对神经抗原敏感的活化 T 细胞株诱导中枢神经系统炎症的能力与 Hpa 活性表达密切相关。而且炎症发生前多种细胞因子常常剧烈地促进神经巨噬细胞和淋巴细胞中 Hpa 表达[8]。另外，肝素和肝素衍生物以及几种有效的 Hpa 抑制剂硫酸多糖被证实有抗炎活性[6,8]，反证了 Hpa 可能参与炎症时免疫细胞侵袭外渗的过程。

综上所述，慢性肾病中存在肾组织炎症细胞浸润导致小管间质炎症性损伤，而炎细胞向炎性部位迁徙聚集可能与 Hpa 的高表达具有相关性。提示降低 Hpa 表达，减轻肾组织炎细胞过度浸润，可能具有潜在的抗炎症性损伤的治疗作用，从而延缓肾纤维化。

参考文献：

[1] Rops A L，Van-der-Vlag J，Lensen J F，*et al*. Heparan sulfate proteoglycans in glomerular inflammation[J]. Kidney Int，2004，65(3)：768－785.

[2] Liu Y. Renal fibrosis：new insights into the pathogenesis and therapeutics[J]. Kidney Int，2006，69(2)：213－217.

[3] Durvasula R V，Shankland S J. Models of glomerulonephritis[J]. Methods Mol Med，2003，86：47－66.

[4] 姜　傥，关伟明，周建中. 肾小管炎在肾小球性疾病中的临床意义[J]. 中山大学学报·医学科学版，2003，24(1)：63－67.

[5] Ferro V，Hammond E，Fairweather J K. The development of inhibitors of heparanase，a key enzyme involved in tumour metastasis，angiogenesis and inflammation[J]. Mini Rev Med Chem，2004，4(6)：693－702.

[6] Vlodavsky I，Ilan N，Naggi A，*et al*. Heparanase：structure，biological functions，and inhibition by heparin-derived mimetics of heparan sulfate[J]. Curr Pharm Des，2007，13(20)：2057－2073.

[7] Vaday G G，Lider O. Extracellular matrix moieties，cytokines，and enzymes：dynamic effects on immune cell behavior and inflammation[J]. J Leukoc Biol，2000，67(2)：149－159.

[8] Irony-Tur-Sinai M，Vlodavsky I，Ben-Sasson S A，*et al*. A synthetic heparin-mimicking polyanionic compound inhibits central nervous system inflammation[J]. J Neurol Sci，2003，206(1)：49－57.

（编辑　王　红）