论著

文章编号:1000-5404(2008)11-1010-04

慢性肾病患者肾小管上皮细胞内质网应激与细胞凋亡的关系

吴小玮,何娅妮,丁涵露,王惠明,李开龙,杨聚荣,詹 俊,张建国 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所肾内科,重庆 400042)

摘 要:目的 探讨慢性肾病(chronic kidney disease,CKD)患者蛋白尿诱导肾小管上皮细胞内质网应激与细胞凋亡的关系。方法 应用免疫组织化学技术检测CKD患者肾小管上皮细胞中内质网应激标志蛋白氧调节蛋白150(cells-oxygen-regulated protein150,ORP150)和糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78,GRP78)的表达;TUNEL法检测细胞凋亡。对各指标与CKD患者24 h尿蛋白量进行相关性分析。结果 CKD患者肾小管上皮细胞细胞质中ORP150、GRP78的表达较正常对照组显著增强($P<0.01$),且轻、中、重度蛋白尿3组各组间亦均有显著性差异($P<0.01$),并与尿蛋白水平呈正相关($r=0.695$,$r=0.76$,$P<0.01$);各组小管上皮细胞凋亡系数(apoptosis index,AI)均亦有显著性差异($P<0.01$),并与尿蛋白水平呈正相关性($r=0.835$,$P<0.01$)。结论 CKD患者肾小管上皮细胞有内质网应激与凋亡的发生,并且其强度与蛋白尿水平呈正相关关系。内质网应激可能是大量蛋白尿引起小管上皮细胞凋亡的重要环节。

关键词:慢性肾病;内质网应激;细胞凋亡
中图法分类号:R322.61;R329.28;R692.02 文献标识码:A

Endoplasmic reticulum stress may induce apoptosis of renal proximal tubular epithelial cells in chronic kidney disease

WU Xiao-wei, HE Ya-ni, DING Han-lu, WANG Hui-ming, LI Kai-long, YANG Ju-rong, ZHAN Jun, ZHANG Jian-guo (Department of Kidney, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between endoplasmic reticulum stress induced by proteinuria and apoptosis of renal proximal tubular epithelial cells in chronic kidney disease (CKD). Methods Twenty-one patients with CKD were included. According to 24-hour urinary protein excretion, they were grouped by three levels: <1.5 g/24 h, 1.5-3.5 g/24 h, >3.5 g/24 h. The control tissues were pathologically confirmed as normal renal tissues adjacent to the renal tumors. Immunohistochemistry was performed to detect the protein markers of endoplasmic reticulum of renal proximal tubular epithelial cells-oxygen-regulated protein150 (ORP150) and glucose-regulated protein 78 (GRP78), and TUNEL was used to detect the apoptosis of the epithelial cells. The correlation of proteinuria levels with ORP150, GRP78 or apoptosis index was determined. Results The expressions of ORP150 and GRP78 in endochylema of renal proximal tubular epithelial cells both increased dramatically in the CKD patients ($P<0.01$). They also showed significant difference among the patients of three levels of proteinurea ($P<0.01$), and had positive correlation with proteinuria levels ($r=0.695$, $r=0.76$, $P<0.01$). The apoptosis indexes showed significant difference among the three levels of proteinurea, and had positive correlation with proteinuria levels ($r=0.835$, $P<0.01$). Conclusion Endoplasmic reticulum stress and apoptosis of renal proximal tubular epithelial cells exist in CKD, and showed positive correlations with proteinurea. Endoplasmic reticulum stress may be essential in the apoptosis of renal proximal tubular epithelial cells induced by proteinuria.

Key words: chronic kidney disease; endoplasmic reticulum stress; apoptosis

基金项目:国家自然科学基金(30771002)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771002)
作者简介:吴小玮,女,安徽省安庆市人,硕士研究生,医师,主要从事肾脏病基础方面的研究。电话:(023)66671295,E-mail:wuxiaowei_1982@163.com
通信作者:何娅妮,电话:(023)68757871
收稿日期:2008-01-10;修回日期:2008-03-14

慢性肾病（chronic kidney disease，CKD）已经成为一个威胁全世界公共健康的主要疾病，是世界范围内的公共卫生问题。蛋白尿作为独立的危险因素参与 CKD 肾小管间质损害的病理过程[1]，但其机制尚未完全阐明。有研究表明，肾病状态下大量蛋白尿可以诱导近端肾小管上皮细胞凋亡，后者与 CKD 肾小管萎缩有直接关系[2]。最近有研究报道，大量白蛋白可以作为应激源诱导小鼠近端肾小管上皮细胞内质网应激并致细胞凋亡[3]，但是关于 CKD 患者蛋白尿对肾小管上皮细胞是否具有相同作用，目前尚少见相关报道。因此，本研究通过观察 CKD 患者肾穿刺组织中小管上皮细胞内质网应激标志蛋白氧调节蛋白 150（oxygen-regulated protein150，ORP150）、糖调节蛋白 78（glucose-regulated protein 78，GRP78）的表达及细胞凋亡情况，并结合临床生化检查结果，分析它们与 CKD 患者 24 h 尿蛋白水平的关系，以期初步探讨 CKD 患者蛋白尿水平与肾小管上皮细胞内质网应激和凋亡的关系。

1　对象与方法

1.1　材料

1.1.1　对象　　根据 1999 年美国肾脏病基金会（National Kidney Foundation，NKF）公布的新的 CKD 定义，选取本院住院患者经临床和肾活检确诊为 CKD 的病例 21 例，年龄为 22～53（38±9.8）岁，平均按照患者 24 h 尿蛋白定量水平将病例分为 轻度蛋白尿组（<1.5 g/24 h，7 例，其中 IgA 肾病 4 例，系膜增生性肾小球肾炎 3 例）、中度蛋白尿组（1.5～3.5 g/24 h，7 例，其中 IgA 肾病 4 例，系膜增生性肾小球肾炎 3 例）、重度蛋白尿组（>3.5 g/24 h，7 例，其中 IgA 肾病 3 例，系膜增生性肾小球肾炎 4 例）。7 例正常组肾组织均取自肾肿瘤患者切除肾脏的远离肿瘤部分并经病理检查为正常者。

1.1.2　主要试剂和仪器　　小鼠抗人 ORP150 抗体购自日本 IBL 公司，山羊抗人 GRP78 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。二步法抗兔/鼠通用型免疫组化检测试剂盒购自美国 DAKO 公司，In Situ Cell Death Detection Kit 购自德国 Roche 公司，封闭用正常兔血清工作液、生物素标记兔抗山羊 IgG、辣根过氧化物酶标记链霉卵白素复合物、显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术公司。LEICA DM1000 倒置显微镜购自 Leica 公司。

1.2　方法

1.2.1　内质网应激标志蛋白 ORP150、GRP78 表达检测　　肾组织经常规石蜡包埋，切取 2 μm 石蜡切片进行免疫组化染色。ORP150 及 GRP78 的表达情况分别采用二步法和 SP 法检测，详细步骤按说明书进行，以 PBS 代替一抗为阴性对照。ORP150 和 GRP78 主要表达在细胞质，呈棕黄色颗粒。参考文献[4]，判定方法分为 4 级：0 分，无染色细胞或单个表达的细胞；1 分，弱表达，阳性率 10%～35%；2 分，中度表达，阳性率 35%～70%；3 分，强表达，阳性率 > 70%，每张切片至少观察 10 个视野，取其平均值。

1.2.2　细胞凋亡检测　　应用 TUNEL 技术检测凋亡细胞，光学显微镜下细胞核中有棕黄色颗粒者为凋亡细胞，每张切片随机计算至少 5 个高倍视野中的凋亡细胞数，以凋亡细胞/总细胞表示凋亡指数（apoptosis index，AI）。

1.3　统计学分析

数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用统计软件 SPSS 12.0，行单因素方差分析和直线相关分析方法。

2　结果

2.1　CKD 患者 ORP150 和 GRP78 的表达

免疫组化结果显示，正常对照组 ORP150 和 GRP78 有基础表达，CKD 患者肾小管上皮细胞 ORP150、GRP78 表达明显增加，内质网伴侣蛋白 ORP150、GRP78 是内质网应激反应的主要标志分子，表明 CKD 患者肾小管上皮细胞发生了内质网应激反应。ORP150、GRP78 免疫组化染色呈棕黄色，主要定位于肾小管上皮细胞的细胞质，细胞核不着色，见图 1、2。随着蛋白尿水平的增强各组间 ORP150、GRP78 的表达亦显著增加（$P<0.01$），见表 1。

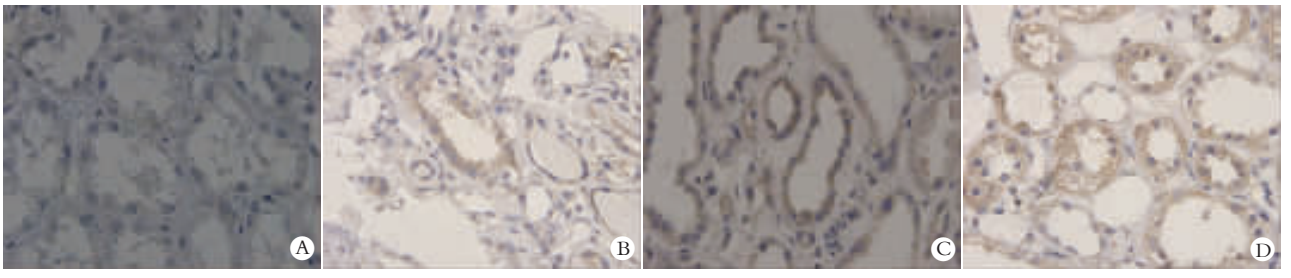
2.2　CKD 患者小管上皮细胞的凋亡

与正常对照组比较，CKD 患者小管上皮细胞凋亡明显，TUNEL 染色后凋亡细胞核呈棕褐色，见图 3。CKD 患者 24 h 尿蛋白量与 AI 呈正相关，各组间均有显著性差异（$P<0.01$），见表 1。

表 1　CKD 患者蛋白尿水平与小管上皮细胞 ORP150、GRP78 及凋亡系数的关系（$n=7$，$\bar{x}\pm s$）

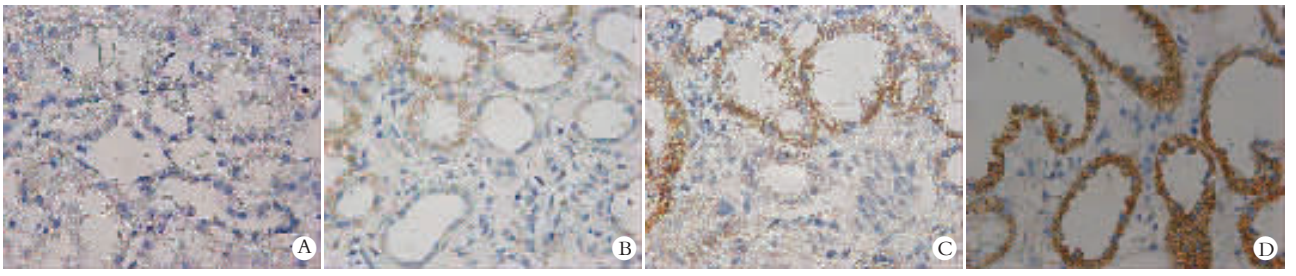
组别	GRP78	ORP150	AI（%）
正常对照组	0.07±0.26	0.11±0.32	3.05±3.58
轻度蛋白尿组	0.97±0.54[a]	1.16±0.53[a]	8.38±4.26[a]
中度蛋白尿组	2.09±0.56[ab]	2.13±0.61[ab]	16.7±6.80[ab]
重度蛋白尿组	2.43±0.50[abc]	2.41±0.60[abc]	40.89±9.19[abc]

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与轻度蛋白尿组比较；c：$P<0.01$，与中度蛋白尿组比较



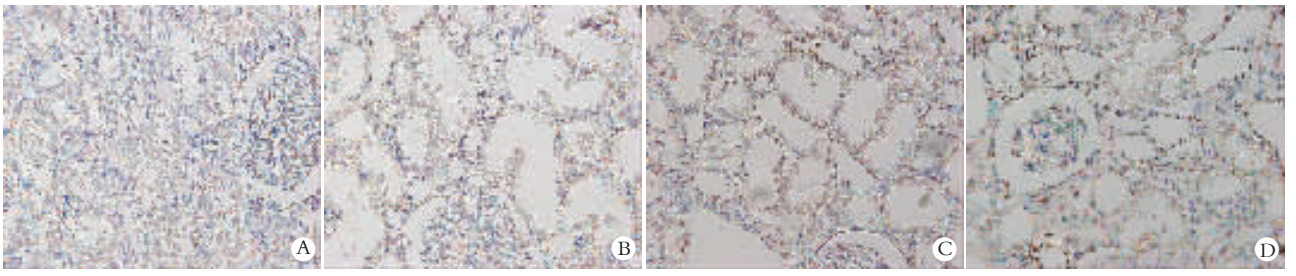
A：正常对照组；B：轻度蛋白尿组；C：中度蛋白尿组；D：重度蛋白尿组

图 1　各组肾小管上皮细胞 ORP150 的表达　（二步法×200）



A:正常对照组;B:轻度蛋白尿组;C:中度蛋白尿组;D:重度蛋白尿组

图2 各组肾小管上皮细胞GRP78的表达 (S-P×200)



A:正常对照组;B:轻度蛋白尿组;C:中度蛋白尿组;D:重度蛋白尿组

图3 TUNEL法检测各组小管上皮细胞凋亡 (×200)

2.3 CKD患者24h尿蛋白量与ORP150、GRP78表达及小管上皮细胞凋亡的相关分析

在各组小管上皮细胞ORP150、GRP78表达与CKD患者24 h尿蛋白水平呈正相关($r=0.695$,$r=0.76$,$P<0.01$);小管上皮细胞凋亡亦与24 h尿蛋白水平呈正相关($r=0.835$,$P<0.01$)。

3 讨论

小管间质性损伤是终末期肾脏疾病的共同通路,而目前认为,慢性蛋白尿在小管间质损伤中起了重要作用[1,5]。正常情况下,肾小球滤过的少量小分子蛋白质可被近端小管上皮细胞重吸收,在溶酶体内进行分解。但是,当任何原因造成肾小球毛细血管网滤过过多蛋白质时,暴露于过度蛋白质的近端肾小管上皮细胞将启动一系列的有害反应,产生和分泌多种炎症介质和细胞因子,包括内皮素-1(ET-1)、单核细胞趋向性蛋白(MCP-1)及调节活化正常T细胞表达和分泌的因子(RANTES)等[6,7]。近来研究提示,除炎症反应外,肾小管上皮细胞过度凋亡导致的细胞增殖与凋亡之间的不平衡亦可能是肾小管萎缩和肾功能恶化的重要机制之一。内质网应激可以激活多条途径诱导细胞凋亡的发生,包括c-Jun氨基酸末端激酶(c-Jun N-terminal kinase,JNK)、caspase-12的活化和CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer-binding protei-homologous protein,CHOP)的转录上调[8,9]。

本研究提示,CKD患者小管上皮细胞ORP150和GRP78表达显著增加,它们是进化上高保守的蛋白质,与热休克蛋白70有很高的同源性,可迅速与新生的多肽以非共价键形式结合以促进蛋白质的正确折叠和装配,并抑制错误折叠的蛋白质的聚集[10],常被作为内质网应激的标志而被检测。研究表明,ORP150、GRP78在大量白蛋白刺激鼠近端肾小管细胞(immortalized rat proximal tubular cells,IRPTCs)中呈高表达趋势,并且IRPTCs凋亡先于ORP150及GRP78表达的上调,他们解释是因为凋亡信号途径强于ORP150、GRP78的保护效应,或者保护途径的活化可能是凋亡信号途径的后续事件[3],这与本研究结果一致。CKD患者随着疾病的进展,ORP150、GRP78表达增多,与尿蛋白水平呈现正相关关系,在CKD早期,小管上皮细胞凋亡与对照组比较即有显著性增加,且随着病情进展凋亡明显增多,提示CKD患者蛋白尿刺激小管上皮细胞活化的凋亡信号途径强于内质网应激伴侣分子ORP150、GRP78的保护效应,从而导致大量小管上皮细胞凋亡。

那么,蛋白尿是如何诱导内质网应激发生的呢?正常情况下,经肾小球滤过的蛋白,主要由近端肾小管胞饮重吸收,在上皮细胞内水解成氨基酸,然后进入血循环。但是,当大量蛋白聚集在胞内时可以通过很多途径扰乱细胞功能,过度的蛋白可以上调小管上皮细胞内活性氧的产生[11]和Ca^{2+}浓度[12],而氧化-还原状态和钙动员的改变是公认的内质网应激诱导因素,所以,我们推测这些也是CKD患者小管上皮细胞内质网应激发生的潜在机制。内质网是细胞内蛋白合成后修饰、折叠及转运的关键场所,只有正常的蛋白可被转

运至其正确位置发挥功能，而未折叠及错误折叠的蛋白质则在其伴侣蛋白的作用下重新折叠或被转位至胞液，在泛素蛋白酶体中被降解。但是大量异常蛋白的堆积引起持续的应激反应可损伤内质网应激保护机制，启动级联反应，最终导致凋亡。但是，在诸多诱导细胞凋亡的途径中，到底是哪种或哪几种途径参与了 CKD 患者小管上皮细胞凋亡尚有待进一步的研究。

参考文献：

[1] Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies [J]. N Engl J Med, 1998, 339(20): 1448 - 1456.
[2] Thomas M E, Schreiner G F. Contribution of proteinuria to progressive renal injury: consequences of tubular uptake of fatty acid bearing albumin [J]. Am J Nephrol, 1993, 13(5): 385 - 398.
[3] Ohse T, Inagi R, Tanaka T, *et al*. Albumin induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in renal proximal tubular cells [J]. Kidney Int, 2006, 70(8): 1447 - 1455.
[4] Hsu W M, Hsieh F J, Jeng Y M, *et al*. GRP78 expression correlates with histologic differentiation and favorable prognosis in neuroblastic tumors [J]. Int J Cancer, 2005, 113(6): 920 - 927.
[5] Praga M, Morales E. Renal damage associated with proteinuria [J]. Kidney Int Suppl, 2002, (82): 42 - 46.
[6] Dhaun N, Goddard J, Webb D J. The endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(4): 943 - 955.
[7] 何娅妮，杨聚荣，蒋建新，等. Cubilin 在白蛋白刺激肾小管上皮细胞表达 MCP-1、RANTES 中的作用 [J]. 中华医学杂志, 2004, 84(21): 1804 - 1809.
[8] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress [J]. Cell Death Differ, 2004, 11(4): 381 - 389.
[9] 吴小玮，何娅妮. 内质网应激与肾脏疾病 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2007, 16(4): 364 - 368.
[10] Ni M, Lee A S. ER chaperones in mammalian development and human diseases [J]. FEBS Lett, 2007, 581(19): 3641 - 3651.
[11] Tang S, Leung J C, Abe K, *et al*. Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells *in vitro* and *in vivo* [J]. J Clin Invest, 2003, 111(4): 515 - 527.
[12] Harris D C, Wang Y, Campbell D. Regulation of tubular cell MCP-1 production by intracellular ions: a role for sodium and calcium [J]. Exp Nephrol, 2001, 9(3): 205 - 213.

（编辑　王小寒）

文章编号：1000-5404(2008)11-1013-01

个案与短篇

重庆市城市体检人群高尿酸血症的患病情况及相关因素分析

陈玉群　（第三军医大学西南医院健康体检中心，重庆 400038）

近年来与代谢有关的疾病高尿酸血症作为动脉粥样硬化和冠心病的独立危险因素与代谢综合征的肥胖、高脂血症、高血压密切相关[1]。我们采用分层随机抽样的方式，共抽取了 2007 年本中心健康体检人群 15 823 例的血糖、甘油三酯、胆固醇等的数值并进行统计分析，现报告如下。

1　资料与方法

分层随机抽取本中心体检人员 15 823 例，年龄 20 ~ 90 岁，平均 48.3 岁，其中男性 8 352 例，女性 7 471 例。将体检人员分为两组，高尿酸血症组 5 623 例和正常尿酸组 10 200 例，两组人群在性别、年龄上无显著性差异（$P > 0.05$）。

1.2　诊断标准

高尿酸血症参照临床诊断标准：男性血尿酸≥417 μmol/L，女性血尿酸≥357 μmol/L[2]。

1.3　检测方法

空腹常规静脉采血 5 ml，检测血尿酸、血糖（GLU）、甘油三酯（TG）、总胆固醇（TC）等。仪器和试剂采用日本 Olympus AU2700 及相应的配套试剂。UA 采用酶法测定，测定程序以终点法。

1.4　统计学处理

将所调查数据进行核查后，两次核对法录入，采用 SPSS 11.0 统计软件，计量资料行 t 检验，计数资料行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　不同年龄分布及性别与高尿酸血症患病的关系

男性患病率高于女性，差异显著（$\chi^2 = 336.839$，$P < 0.05$）。女性高尿酸血症患病率随年龄增长而增加，男性高尿酸血症患病率各年龄组间差异无统计学意义（$\chi^2 = 4.28$，$P > 0.05$，表 1）。

表 1　高尿酸血症的检出情况

年龄（岁）	男			女			合计		
	受检数	高尿酸血症数	检出率（%）	受检数	高尿酸血症数	检出率（%）	受检数	高尿酸血症数	检出率（%）
20 ~	1 788	1 008	56.4	1 466	82	5.4	3 254	109	33.4
30 ~	2 412	1 312	54.4	2 034	143	6.9	4 446	145	32.7
40 ~	2 314	1 407	61.0	2 015	138	7.0[a]	4 329	155	35.9
50 ~	1 356	813	59.6	1 265	307	24.4	2 621	112	42.6
60 ~	482	232	47.9	691	281	40.6[a]	1 173	51	43.6
合计	8 352	4 772	57.1	7 471	951	12.7	1 5823	5723	36.2

a：$P < 0.05$，与 50 ~ 岁年龄组比较

（下转 1017 页）

作者简介：陈玉群，女，四川省眉山市人，检验技师。电话：(023) 68754924，E-mail：chenyuqun1111@shou.com

收稿日期：2008-02-26；修回日期：2008-04-03