论著

文章编号:1000-5404(2014)03-0248-05

赖氨大黄酸通过升高 miRNA-451 抑制肺癌 A549 细胞迁移

纪春梅[1],甄永占[2],骆广玲[3],赵毓芳[2],朱丽华[2] (063000 河北 唐山,唐山协和医院呼吸内科[1];063000 河北 唐山,河北联合大学基础医学院组织学与胚胎学教研室[2];063000 河北 唐山,开滦医疗集团林西医院妇产科[3])

[摘要] **目的** 研究赖氨大黄酸(rhein lysinate,RHL)对肺癌细胞株(A549)迁移的影响及 miRNA-451 在其中的作用。**方法** 选取处于对数生长期的 A549 细胞株,并分为对照组、不同剂量(0、10、20、40、80、160 μmol/L)的 RHL 组。采用 MTT 法检测各组细胞 48 h 增殖情况;细胞划痕实验和 Transwell 实验检测各组细胞 48 h 迁移情况;Real-time PCR 检测各组细胞 48 h miRNA-451 和基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases-9,MMP-9)的转录水平;Western blot 检测各组细胞 48 h MMP-9 蛋白水平变化。**结果** 细胞培养 48 h 后,RHL 处理组 A549 细胞增殖活性呈现明显剂量依赖性抑制。细胞划痕实验和 Transwell 实验均发现 80 μmol/L RHL 能够抑制 A549 细胞迁移。同时 80 μmol/L 以上剂量的 RHL 能够显著升高 miR-451 水平,降低 MMP-9 的转录水平($P<0.05$)。Western blot 检测结果也证实了 80 μmol/L 以上剂量的 RHL 能够显著抑制 MMP-9 蛋白表达水平($P<0.05$)。**结论** RHL 通过诱导 miR-451 的表达、抑制 MMP-9 的表达,从而抑制 A549 细胞迁移。

[关键词] 赖氨大黄酸;肺肿瘤;细胞迁移;miRNA-451;基质金属蛋白酶-9
[中图法分类号] R73-361; R734.2; R977.4 [文献标志码] A

Rhein lysinate inhibits migration in lung cancer A549 cells by miRNA-451 upregulation

Ji Chunmei[1], Zhen Yongzhan[2], Luo Guangling[3], Zhao Yufang[2], Zhu Lihua[2] ([1]Department of Respiratory Medicine, Xiehe Hospital, Tangshan, Hebei Province, 063000; [2]Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Hebei United University, Tangshan, Hebei Province, 063000; [3]Department of Gynaecology and Obstetrics, Linxi Hospital of Kailuan Medical Systems, Tangshan, Hebei Province, 063000, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of Rhein lysinate (RHL) on the migration of human lung cancer cell line (A549) and the role of miRNA-451 signal pathway in cell migration, and to provide theoretical foundation for clinical trial of RHL against lung cancer. **Methods** A549 cells in logarithm growth phase were selected and randomly divided into various groups: a blank control group and different concentrations of RHL groups. After A549 cells were treated by RHL for 48 h, MTT assay was used to detect A549 cell proliferation. Wound healing and Transwell assay were used to detect the migratory ability of A549 cells. The levels of miRNA-451 and MMP-9 mRNA were detected by real-time PCR. The expression of MMP-9 protein was detected by Western blot. **Results** After A549 cells were treated by RHL for 48 h, cell viability was inhibited in a dose-dependent manner. Wound healing and Transwell assay results showed that RHL (80 μmol/L) could inhibit the migratory ability of A549 cells. Compared with control group, the levels of miR-451 were increased, while the mRNA levels of MMP-9 were decreased in RHL (≥ 80 μmol/L)-treated groups ($P<0.05$). Compared with control group, Western blot results also showed that the expression of MMP-9 protein was decreased in RHL (≥ 80 μmol/L)-treated group ($P<0.05$). **Conclusion** RHL can inhibit the migratory ability of A549 cells by inducing the expression of miR-451 and thereby inhibiting the transcription and expression of MMP-9.

[**Key words**] Rhein lysinate; lung neoplasms; cell migration; miR-451; matrix metalloproteinases-9

Supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (H2012401030) and the National Natural Science Foundation of China (81001439).
Corresponding author: Zhen Yongzhan, Tel: 86-315-3725754, E-mail: yongzhanzhen@126.com

[基金项目] 河北省自然科学基金(H2012401030);国家自然科学基金(81001439)
[通信作者] 甄永占,电话:(0315)3725754,E-mail:yongzhanzhen@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131114.1424.003.html(2013-11-14)

肺和支气管癌是当今世界上严重威胁人类健康与生命的恶性肿瘤之一。美国 2013 年癌症统计报告显示:从 1995 – 2009 年肺和支气管癌的发病率位居第 2 位,而肺和支气管癌的病死率位居第 1 位[1]。2013 年欧洲癌症大会公布的欧洲癌症病死率也表明:男性肺癌患者病死率最高,占男性癌症总病死率的 25%,女性肺癌患者病死率位居女性癌症病死率的第 2 位,占女性癌症总病死率的 14%[2]。因此寻找针对肺和支气管癌的治疗药物具有重要意义。微小 RNA(microRNA,miRNA)是一类内源性非编码小分子单链 RNA,长度为 19 ~ 25 个核苷酸,其在细胞生长、分化、凋亡和肿瘤形成过程中发挥重要作用[3-4]。有研究表明肺脏中的 miRNA 表达模式从胎儿到成人、从正常到肺癌均发生改变,特定的 miRNA 可能在肺脏的形成中发挥多重功能,而异常表达的 miRNA 也可能诱导肺癌的发生[5]。

近年来,从中药中提取的抗癌药物因其抗肿瘤作用确切,副作用小而成为国内外研究的热点。赖氨大黄酸(rhein lysinate,RHL)是大黄酸与赖氨酸反应生成的能溶于水的新化合物,前期研究表明赖氨大黄酸对乳腺癌和宫颈癌均有治疗作用[6-7]。本研究观察赖氨大黄酸是否具有抗肺癌细胞迁移的作用,进一步探讨其是否通过影响 miRNA 表达来发挥作用,旨在为赖氨大黄酸应用于临床提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验药物 RHL 按照专利(赖氨大黄酸的制备工艺及其在肿瘤治疗中的应用,申请号 200810089025.8)描述方法在本室合成,纯度 95%。

1.1.2 细胞系 肺腺癌 A549 细胞系(中国医学科学院医药生物技术研究所室保存),RPMI1640 培养基和胎牛血清(FBS,HyClone 公司,美国)。应用含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基在 37 ℃含有 5% CO_2 的培养箱中培养 A549 细胞。隔天细胞传代 1 次,实验用对数生长期细胞。

1.1.3 试剂 TRIzol 试剂(Invitrogen,美国),反转录试剂盒(Roche,美国),Real-time PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司),BCA 蛋白定量试剂盒(Pierce,美国),MMP-9 和 β-actin 抗体(Santa Cruz 公司,美国),辣根过氧化物酶标记的二抗(北京中杉金桥生物公司),二甲基亚砜(DMSO,Sigma,美国),3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐(MTT,Sigma,美国),Transwell 小室(Corning,美国),其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测赖氨大黄酸对人肺癌 A549 细胞的抑制作用 取对数生长期的 A549 癌细胞,用 RPMI1640 培养液配成 3×10^4 个细胞/mL 的细胞悬液,按每孔 200 μL 接种于 96 孔板,于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养。24 h 后加入不同浓度的赖氨大黄酸(0、10、20、40、80、160 μmol/L)。每组设 6 个平行孔。于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 48 h 后,每孔加 MTT(5 mg/mL) 20 μL。继续在培养箱中培养 4 h,终止培养。小心吸弃孔内培养液,每孔加入 150 mL DMSO,振荡 10 min,使甲臜充分溶解。在酶标仪上检测波长为 570 nm 处的光密度值[$D(570)$],计算细胞存活率。

细胞存活率 = [$D(570)_{实验组}/D(570)_{对照组}$] ×100%

1.2.2 细胞划痕实验 将 2×10^5 个 A549 肺癌细胞接种至 25 cm^2 培养瓶中、待细胞长成单层后将培养液弃去,在单层细胞的中央用灭菌枪头划出一划痕,经磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)洗涤后在显微镜下拍照,然后分别加入含 PBS 和 80 μmol/L RHL 的细胞培养液处理 48 h 后于相同位置再次拍照。

1.2.3 Transwell 体外侵袭实验 用预冷的无血清 RPMI 1640 培养基按 7∶1稀释基质胶,取 40 μL 稀释液加入 Transwell 上室,放置于 37 ℃、5% CO_2 的孵箱中。30 min 后取出孔板,收集 A549 肺癌细胞和经 80 μmol/L RHL 处理 48 h 后的 A549 肺癌细胞,在上室加入每毫升含有 2.5×10^5 个细胞的无血清培养基 100 μL,下室加人含 10% FBS 的培养基 600 μL,在于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 16 h。然后取出培养板,小心洗去多余培养基,用 PBS 反复清洗 3 次,甲醇室温固定 30 min,轻轻用棉签擦去微孔膜上表面的细胞,PBS 清洗后用苏木精染色,3 min 后洗去染液。最后将小室倒置于载玻片上,光学显微镜镜下观察。

1.2.4 Real-time PCR 检测转染后 miR-451 的表达和 MMP-9 的 mRNA 水平 提取 A549 肺癌细胞和经 80 μmol/L RHL 处理 48 h 后的 A549 肺癌细胞总 RNA,先进行 RT 反应:RNA 模板 100 ng、RT 引物(5′-CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAACTCAGT-3′) 2 μL,RT 缓冲液 5 × 5 μL,dNTP 混合物(每种 25 mmol/L) 2 μL,RNase 抑制剂(40 U/μL) 0.5 μL,RT 逆转录酶(200 U/μL) 0.5 μL,DEPC 水补足到 25 μL。反应条件 42 ℃ 60 min,75 ℃ 10 min。然后按照 One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR 试剂盒说明书,以 U6 作参照进行 Real-time PCR 扩增,反应体系 25 μL,其中 2 × SYRB green mix 12.5 μL,上述反转录产物 2.5 μL,miRNA 正向引物(10 μmol/L)0.5 μL,miRNA 反向引物(10 μmol/L) 0.5 μL,DEPC 水补足 25 μL。反应条件:95 ℃ 20 s,1 个循环;95 ℃ 10 s,60 ℃ 20 s,40 个循环。miR-451 正向引物:5′-ACACTCCAGCTGGGAAACCGTTACCATTAC-3′, 反向引物: 5′-TGGTGTCGTGGAGTCG-3′;U6 正向引物:5′-CTCGCTTCGGCAGCACA-3′,反向引物:5′-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3′。

提取 A549 肺癌细胞和经 80 μmol/L RHL 处理 48 h 后的 A549 肺癌细胞总 RNA,然后以 GAPDH 作参照,按照 One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR 试剂盒说明书进行 Real-time PCR 扩增。反应体系 25 μL,其中 2 × SYRB green mix 12.5 μL,总 RNA 2 μL, MMP-9 或 GAPDH 正向引物(10 μmol/L) 0.5 μL, MMP-9 或 GAPDH 反向引物(10 μmol/L) 0.5 μL, DEPC 水补足 25 μL。反应条件:42 ℃ 5 min 和 95 ℃ 20 s 1 个循环;95 ℃ 5 s,60 ℃ 20 s,40 个循环。MMP-9 和 GAPDH 的引

物序列如下:MMP-9 正向引物 5′-TCCCTTGAGACCTGAGAACC-3′,反向引物 5′-TACCAATGTGAGCCCCACCG-3′;GAPDH 正向引物 5′-CGACAGTCAGCCGCATCTT-3′,反向引物 5′-CCCCATGGTGTCTGAGCG-3′。

1.2.5 Western blot 检测 MMP-9 蛋白的表达 将处于对数生长期 A549 细胞接种于 25 cm^2 细胞培养瓶,24 h 后分别加入不同浓度的 RHL(0、20、40、80、160 μmol/L),继续培养 48 h 后,收集各组细胞用 BCA 试剂盒蛋白定量。蛋白变性后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),采用湿转法将凝胶上的蛋白转印到 PVDF 膜上。2 h 后将转印好的 PVDF 膜置于含 8% 脱脂牛奶的 1×TBST 缓冲液中,室温封闭 2 h 后加入含 MMP-9 或 β-actin 的一抗孵育液(1∶1 000),4 ℃振荡孵育过夜,1×TBST 洗 3 次,每次 15 min,加入 TBST 缓冲液稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1∶5 000)室温振荡 1 h,1×TBST 洗 3 次,每次 15 min。Millipore 发光试剂盒进行显色,将 PVDF 膜在 alpha 凝胶成像仪(Alpha 公司,美国)上照相并分析各条带灰度变化。

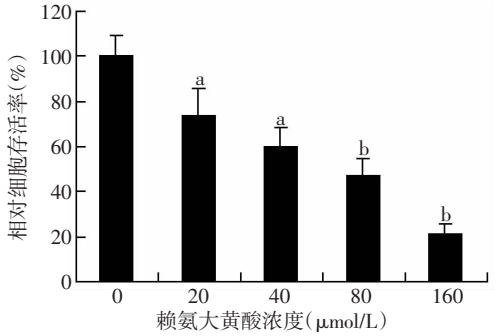
1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 赖氨大黄酸抑制肺癌 A549 细胞系增殖

应用 RHL(0、20、40、80、160 μmol/L)处理 A549 细胞 48 h,MTT 结果表明随着 RHL 剂量增加,A549 细胞增殖活性呈现出明显剂量依赖性的降低($P<0.05$,$P<0.01$,图 1)。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 0 μmol/L RHL 比较

图 1 MTT 法检测赖氨大黄酸浓度依赖性地抑制 A549 细胞增殖

2.2 赖氨大黄酸抑制 A549 肺癌细胞迁移

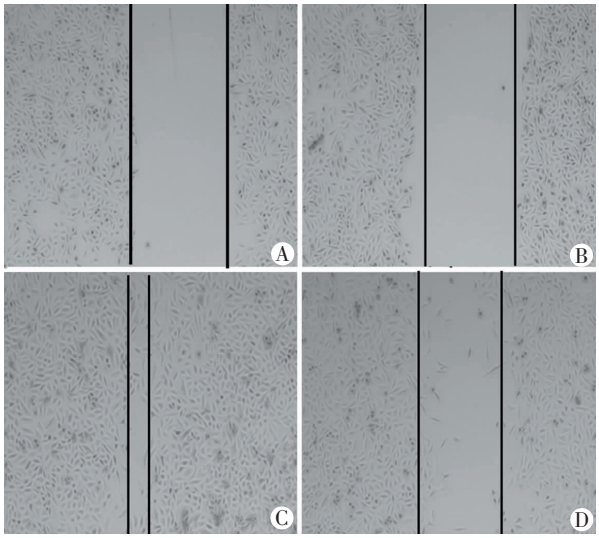
细胞划痕实验和 Transwell 实验均表明:与对照组比较,80 μmol/L RHL 能够明显抑制划痕的愈合,减少 A549 细胞穿过小室(图 2、3)。

2.3 赖氨大黄酸诱导 miR-451 表达

与对照组比较,用 80、160 μmol/L RHL 处理 A549 细胞 48 h 能够促进 miR-451 表达,而用低于 80 μmol/L RHL 处理 A549 细胞 48 h 不能促进 miR-451 表达(图 4)。

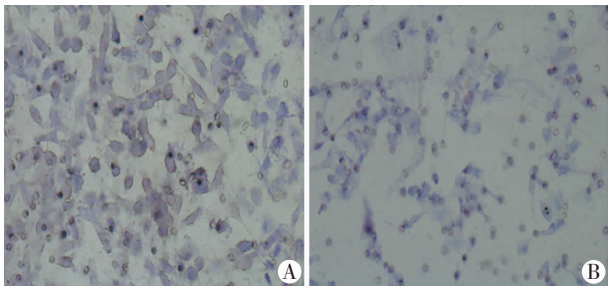
2.4 赖氨大黄酸抑制 MMP-9 的表达

与对照组比较,用 80、160 μmol/L RHL 处理 A549 细胞48 h 能够减少 MMP-9 的 mRNA 水平和蛋白表达水平($P<0.05$),而用低于 80 μmol/L RHL 处理 A549 细胞 48 h 对 A549 的 mRNA 水平和蛋白表达水平没有显著影响($P>0.05$,图 5、6)。



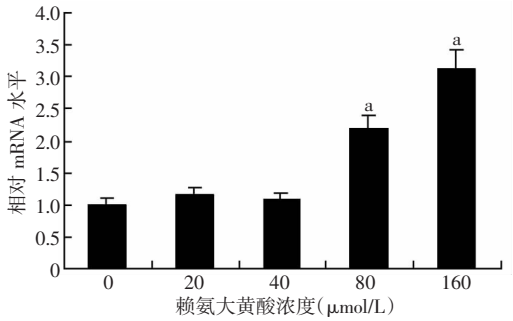
A:对照组 0 h;B:80 μmol/L RHL 组 0 h;C:对照组 48 h;D:80 μmol/L RHL 组 48 h

图 2 细胞划痕实验观察赖氨大黄酸抑制 A549 细胞迁移 (×100)



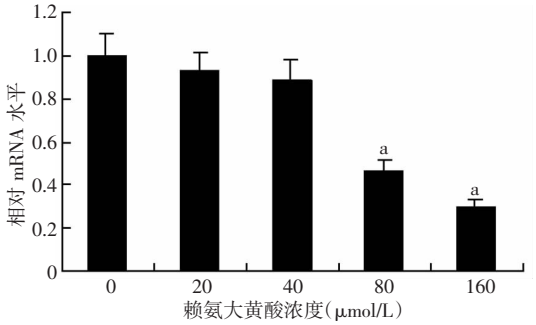
A:对照组;B:80 μmol/L RHL 组

图 3 Transwell 实验观察赖氨大黄酸抑制 A549 细胞迁移 (×100)



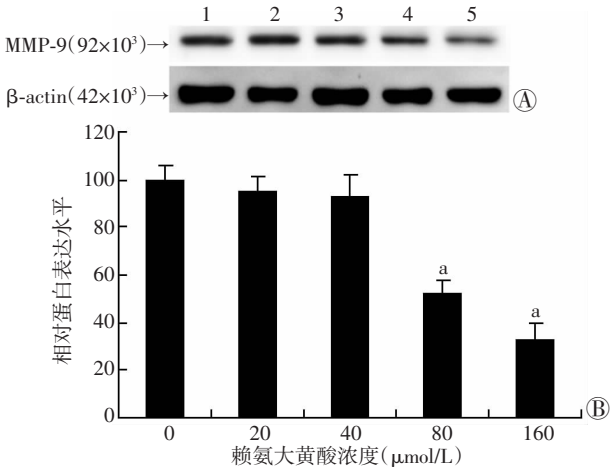
a:$P<0.05$,与 0 μmol/L RHL 比较

图 4 Real-time PCR 检测赖氨大黄酸促进 miR-451 表达



a:$P<0.05$,与 0 μmol/L RHL 比较

图 5 Real-time PCR 检测赖氨大黄酸抑制 MMP-9 mRNA 表达



A:Western blot 检测结果　1～5:RHL 浓度分别为 0、20、40、80、160 μmol/L;B:半定量分析结果　a:$P<0.05$,与 0 μmol/L RHL 比较

图 6　Western blot 检测赖氨大黄酸抑制 MMP-9 表达

3　讨论

miRNA 是一类内源性非编码小分子单链 RNA,能够通过转录抑制和 mRNA 降解来介导转录后基因沉默[8]。近期研究表明 miRNA 在细胞复杂的功能网络中扮演者重要角色,其参与了细胞增殖、分化、凋亡和发育等过程。有趣的是,超过 50% 的 miRNA 位于脆性位点(fragile sites)和与癌症相关的基因组区域,而且一些 miRNA 在物种之间具有高度进化保守性,也存在组织和时间上的功能特异性[9]。多数研究均发现在肺癌的发生、发展过程中 miRNA 也起着重要作用。文献[10－11]发现与正常对照肺组织相比,肺癌组织中一些 miRNA 出现下调。Takahashi 等[11]发现在肺癌组织或者肺癌细胞系中一些 miRNA 表达减少(miR-107、miR-185 和 let-7a),一些 miRNA 过表达(miR-31)。Cheng 等[12]发现过表达 miR-21 和 miR-24 能够显著抑制 A549 和 H1299 细胞增殖。Zhong 等[13]发现过表达 let-7a、miR-107 和 miR-126 能够抑制肿瘤生长。miR-451 是一个近几年发现的与肺癌密切相关的 miRNA。研究发现 miR-451 的过表达能够抑制非小细胞肺癌(NSCLC)细胞系增殖和诱发其凋亡[14]。上调 miR-451 能够增加顺铂对 NSCLC A549 细胞系的敏感性。有研究发现在伊马替尼耐药的 K562 细胞系中 c-myc 基因能够降低 miR-144/451 的表达,恢复 miR-144/451 表达后能够逆转伊马替尼耐药[15]。我们前期研究发现赖氨大黄酸能够抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡和自噬,但未观察其对 miRNA 的作用[6－7, 16]。本研究主要观察赖氨大黄酸是否通过 miRNA 影响肺癌 A549 细胞的迁移。

与我们前期实验结果相同,赖氨大黄酸能够浓度依赖性地抑制肺癌 A549 细胞增殖,在细胞划痕实验和 Tanswell 实验中,我们进一步观察到 80 μmol/L RHL 能够明显抑制肺癌 A549 细胞迁移。采用 Real-time PCR 检测了几个肺癌相关基因 let-7a、hsa-miR-494、miR-107、miR-451 和 miR-185,发现赖氨大黄酸能够升高 miR-451 的表达水平。有研究报道 miR-451 能够抑制 A549 细胞侵袭转移[17];文献[18]的基因芯片检测结果也发现 MMP-9 是 miR-451 作用的一个靶基因,本研究进一步观察了赖氨大黄酸对 MMP-9 转录和表达水平的影响。

采用 Real-time PCR 检测发现高于 80 μmol/L 的 RHL 能够降低 MMP-9 mRNA 水平,Western blot 检测结果也表明高于 80 μmol/L 的 RHL 能够抑制 MMP-9 蛋白表达。Real-time PCR 检测同时发现 miR-451 的表达水平增加,与 MMP-9 mRNA 和蛋白表达变化呈反向关系。这进一步证实了赖氨大黄酸通过促进 miR-451 的表达,推测赖氨大黄酸可能通过促进 miR-451 的表达,然后 miR-451 与 MMP-9 mRNA 结合并诱发其降解,最终降低 MMP-9 蛋白表达,从而达到抑制肿瘤细胞迁移的作用。

参考文献:

[1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11－30.

[2] Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, *et al*. European cancer mortality predictions for the year 2013[J]. Ann Oncol, 2013, 24(3): 792－800.

[3] Kiran C, Deepika P. Lung cancer: microRNA and target database[J]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2012, 15(7): 429－434.

[4] Megiorni F, Pizzuti A, Frati L. Clinical Significance of MicroRNA Expression Profiles and Polymorphisms in Lung Cancer Development and Management[J]. Patholog Res Int, 2011, 2011: 780652.

[5] 王萱怡. 微小 RNA 在肺癌中的研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志, 2010, 37(6): 451－453.

[6] Lin Y J, Zhen Y S. Rhein lysinate suppresses the growth of breast cancer cells and potentiates the inhibitory effect of Taxol in athymic mice[J]. Anticancer Drugs, 2009, 20(1): 65－72.

[7] Lin Y J, Zhen Y Z, Zhao Y F, *et al*. Rhein lysinate induced S-phase arrest and increased the anti-tumor activity of 5-FU in HeLa cells[J]. Am J Chin Med, 2011, 39(4): 817－825.

[8] Pan X, Wang R, Wang Z X. The Potential role of miR-451 in cancer diagnosis, prognosis, and therapy[J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(7): 1153－1162.

[9] Calin G A, Sevignani C, Dumitru C D, *et al*. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in

cancers[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(9): 2999-3004.
[10] Volinia S, Calin G A, Liu C G, *et al*. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(7): 2257-2261.
[11] Takahashi Y, Forrest A R, Maeno E, *et al*. MiR-107 and MiR-185 can induce cell cycle arrest in human non small cell lung cancer cell lines[J]. PLoS One, 2009, 4(8): e6677.
[12] Cheng A M, Byrom M W, Shelton J, *et al*. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis[J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(4): 1290-1297.
[13] Zhong M, Ma X, Sun C, *et al*. MicroRNAs reduce tumor growth and contribute to enhance cytotoxicity induced by gefitinib in non-small cell lung cancer[J]. Chem Biol Interact, 2010, 184(3): 431-438.
[14] Bian H B, Pan X, Yang J S, *et al*. Upregulation of microRNA-451 increases cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cell line (A549)[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30: 20.
[15] Pan X, Wang R, Wang Z X. The potential role of miR-451 in cancer diagnosis, prognosis, and therapy[J]. Mol Cancer Ther, 2013, 12(7): 1153-1162.
[16] Lin Y J, Zhen Y Z, Shang B Y, *et al*. Rhein lysinate suppresses the growth of tumor cells and increases the anti-tumor activity of Taxol in mice[J]. Am J Chin Med, 2009, 37(5): 923-931.
[17] 姚莉, 孙艳, 查何, 等. miRNA-451表达质粒的构建及对人A549肺癌细胞侵袭转移及凋亡的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(10): 841-845.
[18] 聂伟伟, 唐林, 韦凤, 等. miR-144/451基因簇调控网络的生物信息学分析[J]. 医学研究生学报, 2012, 25(3): 229-233.

(**收稿**:2013-08-03;**修回**:2013-09-10)
(编辑 汪勤俭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2014)03-0252-01

乙胺丁醇诱发抗中性粒细胞胞质抗体相关性急进性肾小球肾炎1例

吴 静,黄云剑 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肾内科,全军肾脏病中心,重庆市肾病研究所)

[**关键词**] 利福平;抗中性粒细胞胞质抗体;急进性肾小球肾炎
[**中图法分类号**] R692.31 [**文献标志码**] B

抗中性粒细胞胞质抗体(anti-neutrophil cyto-plasmic antibody, ANCA)是一种与中性粒细胞及单核细胞的细胞质中溶酶体酶发生反应的抗体,可引起多种小血管炎,如侵犯肾脏,可导致肾小球肾炎和肾功能不全。近年报道某些药物如丙基硫氧嘧啶、肼苯哒嗪等可诱发小血管炎,而乙胺丁醇诱发ANCA相关性急进性肾小球肾炎(rapidly progressive glomerulonephritis, RPGN)罕见[1]。现将本科发现的1例报告如下。

1 临床资料

患者,男性,68岁。因"咳嗽、咳痰1个月,双下肢水肿伴少尿5 d"入院。1个月前患者受凉后出现咳嗽、咳痰,在当地医院诊断为"肺结核",当时查肾功、尿常规正常,给予抗结核治疗1周后感厌油、恶心;逐渐出现双下肢水肿,尿量减少(约200 mL/d),转入我科诊治。入院查体:体温正常,血压152/83 mmHg,轻度贫血貌,眼睑轻度浮肿,肺部呼吸音粗,肾区无叩痛,双下肢中度凹陷性水肿。实验室检查血常规:白细胞11.48×10^9/L,中性粒细胞80%,血红蛋白92 g/L;肾功:肌酐847.2 μmol/L,尿素14.84 mmol/L;肝功正常;血沉39 mm/h;C反应蛋白16.9 mg/L;尿常规:蛋白(+),红细胞(+++),尿白细胞(+-);免疫指标:MPO(+),PANCA(+),ANCA滴度1:320,抗核抗体阴性;抗"O"阴性;淋巴细胞刺激转化试验:利福平(-),乙胺丁醇(+)。痰培养阴性。肺CT提示:肺部纹理增粗,未见肺部实质性改变。腹部彩超示:双肾测值增大,实质回声增多、增强,动脉阻力指数增高。肾活组织检查(图1):肾小球总数11个,可见4个细胞性新月体和4个纤维细胞性新月体,球袢与囊壁粘连,囊壁增厚;毛细血管袢腔开放差,可见球袢纤维素样坏死。间质局灶纤维化,炎细胞灶性浸润。系膜细胞及基质:轻~中度增生,系膜区增宽,其中可见4~5个系膜细胞。肾小管病变轻~中度(++);可见肾小管萎缩,基膜增厚,灶性分布;上皮细胞颗粒变性,坏死,基膜裸露,管腔扩张,可见细胞堆积及透明管型;肾间质病变轻度(+),间质纤维化25%~50%,呈局灶纤维化,炎细胞灶性浸润,间质动脉管壁增厚。免疫荧光阴性。病理诊断:新月体性肾小球肾炎。根据上述检查结果,诊断为乙胺丁醇诱发ANCA相关性急进性肾炎。在排除"肺结核"诊断后停用抗结核药物,给予静滴甲泼尼龙1 g/d,冲击治疗3 d,逐渐减量至维持量15 mg/d;并予以静注丙种球蛋白[0.4/(kg·d),5 d]封闭ANCA抗体。同时给予血液透析治疗,3次/周。治疗1周后,血常规正常;肾功:肌酐596 μmol/L,尿素16.97 mmol/L,尿量逐渐增多达500~800 mL/d。出院后予以口服泼尼松片15 mg/d,环磷酰胺片50 mg/d,双嘧达莫25 mg,3次/d,维持性血液透析2次/周。2个月后患者痊愈。

(下转261页)

[**通信作者**] 吴 静,E-mail:wujing_614@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131203.0955.005.html(2013-12-03)