DOI:10.16016/j.1000-5404.201408168

论著

糖尿病肾病肾组织 TRAIL 表达与肾小管间质损伤的关系

陈 佳,戴欢子,霍本刚,杨聚荣,林利容,张建国,郑卢权,何娅妮 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肾内科)

[摘要] **目的** 探讨肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand,TRAIL)在糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)患者肾组织的表达以及与肾组织损伤之间的关系。**方法** 选取2010-2013年本科收治的36例患有2型糖尿病经肾活检诊断为DN患者,9例肾错构瘤或肾癌切除术患者经病理检查为正常组织作为对照。收集各组患者人口学资料、临床数据,免疫组织化学检测肾组织TRAIL表达,并与临床数据及肾组织病理损伤进行相关性分析。**结果** DN患者TRAIL主要表达于肾小管上皮细胞细胞质和/或细胞膜,其表达水平随着肾小管间质损伤的加重而逐渐增加;与收缩压、尿蛋白定量、尿NAG、尿蛋白/尿肌酐、尿酸、尿素氮、血肌酐、胱抑素C呈正相关($P<0.05$, $P<0.01$),与eGFR呈负相关($r=-0.936$, $P<0.01$)。**结论** DN肾组织TRAIL表达与肾组织损伤程度及肾功能密切相关,提示TRAIL在DN疾病进展中具有重要作用。

[关键词] 糖尿病肾病;肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体;肾小管间质损伤
[中图法分类号] R363.2;R587.2;R692 [文献标志码] A

Relationship of TRAIL expression with renal tubulointerstitial injury in diabetic nephropathy

Chen Jia, Dai Huanzi, Huo Bengang, Yang Jurong, Lin Lirong, Zhang Jianguo, Zheng Luquan, He Yani (Department of Nephrology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in the patients with diabetic nephropathy (DN) and the relationship between TRAIL expression and renal tissue injury. **Methods** Thirty-six patients with type 2 diabetes mellitus and biopsy identified DN were recruited for this study, and 9 patients with normal kidney tissues after renal hamartoma or cancer resection were collected as the control group. All the patients were selected from the department of nephrology in Daping Hospital from January 2010 to December 2013. The demographic data and clinical data of all the patients were collected. TRAIL expression in renal tissues was detected with immunohistochemical assay, and its correlation with clinical data and renal tissue injury was analyzed. **Results** TRAIL was mainly expressed in cell membrane and/or cytoplasm of renal tubular epithelial cells, and its expression level rose along with the severity of renal tubulointerstitial injury. TRAIL expression was positively correlated with systolic blood pressure, quantitative urinary protein, urinary N-acetyl-β-D-glucosaminidase, urinary albumin/creatinine, uric acid, urea nitrogen, serum creatinine and cystatin C, and negatively correlated with estimated glomerular filtration rate ($r=-0.936$, $P<0.01$). **Conclusion** TRAIL expression is closely related to renal tissue injury severity and renal function, which suggests that TRAIL plays an important role in DN progression.

[**Key words**] diabetic nephropathy; TRAIL; renal tubulointerstitial injury

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81470962). Corresponding author: He Yani, E-mail: heynmai@yahoo.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81470962)
[通信作者] 何娅妮,E-mail:heynmai@yahoo.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141205.1529.063.html(2014-12-02)

糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)是糖尿病患者最常见的并发症,也是导致终末期肾病的主要原因。近年研究表明肾小管间质损伤在DN进展中具有至关重要的作用,与患者肾脏预后直接相关[1]。细胞凋亡过度与炎症细胞活化是肾小管间质损伤的重要原因[1-2]。肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand,TRAIL)是调节细胞凋亡和免疫炎症状态的关键信号分子,属于肿瘤坏死因子超家族成员,可通过与不同类型受体结合导致细胞凋亡失衡以及免疫炎症反应等进而加速疾病进展[2-3]。本研究检测不同肾小管间质损伤程度的DN患者肾组织TRAIL表达,分析其表达水平与肾组织损伤程度以及临床资料的相关性,探讨TRAIL在DN中可能发挥的作用,以期明确TRAIL在DN疾病进展中的重要性。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取2010-2013年在本科住院的2型糖尿病患者,并经肾活检病理检查诊断为DN患者36例。所有患者尿蛋白定量>150 mg/d,采用胰岛素控制血糖、血管紧张素转化酶抑制剂或钙通道抑制剂降压、他汀类药物控制血脂。排除合并有其他肾脏疾病(如IgA肾病、膜性肾病、局灶节段硬化性肾小球肾炎等)以及患有恶性肿瘤、病毒性肝炎、结核等疾病的患者。对照组9例(尿蛋白定量<150 mg/d)肾组织标本取自肾错构瘤或肾癌切除术病灶旁组织经病理检查为正常的组织。收集患者年龄、性别、体质量指数(BMI)、收缩压(SBP)、舒张压(DBP),于肾活检前1 d采集患者的血尿标本,送本院检验科检测血肌酐(Scr)、尿酸(UA)、尿素氮(BUN)、胱抑素C(Cyc)、白蛋白(Alb)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL)、糖化血红蛋白(HbA1c)、C反应蛋白(CRP)、尿蛋白定量、尿N-乙酰-β-氨基葡萄糖苷酶(NAG)、尿蛋白/尿肌酐,根据慢性肾脏病流行病学合作研究公式(CKD-EPI)计算肾小球率过滤(estimated glomerular filtration,eGFR)。

1.2 肾组织TRAIL检测

肾组织经过常规固定包埋,切片厚度为2.5 μm,采用免疫组化二步法染色,一抗为小鼠抗人TRAIL单克隆抗体(意大利BD Pharmingen公司),稀释浓度为1:400,所有组织标本在同一条件下进行检测。细胞细胞膜和/或细胞质呈棕黄色为TRAIL表达阳性细胞,未见棕黄色染色则为TRAIL表达阴性细胞。随机选取10个高倍视野对TRAIL表达阳性的肾小管进行计数,计算肾小管上皮细胞TRAIL阳性表达百分率。

1.3 肾组织损伤评分

按照2010年《美国肾脏病杂志》发表的新型病理分级系统对糖尿病肾病肾小管间质损伤进行评分[4]。即肾小管萎缩与间质纤维化(interstitial fibrosis and tubular atro- phy,IFTA):0分(无IFTA);1分(病变范围<25%);2分(病变范围25%~50%);3分(病变范围>50%)。间质炎症:0分(无间质炎症);1分(与IFTA相关的炎性浸润);2分(无IFTA区域也有炎性浸润)。肾小球病变程度评分参考DN病理分期,即肾小球系膜增生程度。系膜增生:0分(无系膜增生);1分(轻-中度系膜增生);2分(重度系膜增生)。肾小球硬化程度:0分(无硬化);1分(结节性硬化);2分(球性硬化)。每张切片在低倍视野下(×100倍)随机选择10个视野,取其平均值。上述结果的判读均采用盲法进行,由两名与本研究无关人员实施。

1.4 统计学处理

采用SPSS 18.0统计软件,计量资料以$\bar{x} \pm s$表示。DN患者临床资料及TRAIL阳性表达百分率与对照组的比较采用t检验。TRAIL阳性表达百分率与临床资料采用Pearson相关分析,与肾组织病理损伤(系膜增生、肾小球硬化、肾小管萎缩与间质纤维化、肾间质炎症)采用Spearman相关分析。

2 结果

2.1 两组临床资料比较

36例DN患者中男性17例,女性19例;9例对照组男性4例,女性5例。与对照组相比,DN组患者收缩压、尿蛋白/尿肌酐、尿NAG、糖化血红蛋白、血肌酐、尿素氮、胱抑素C、eGFR、甘油三酯差异具有统计学意义($P<0.05$),年龄、性别、BMI、舒张压、白蛋白、CRP、尿酸、胆固醇、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。

2.2 各组肾组织TRAIL表达阳性率的比较

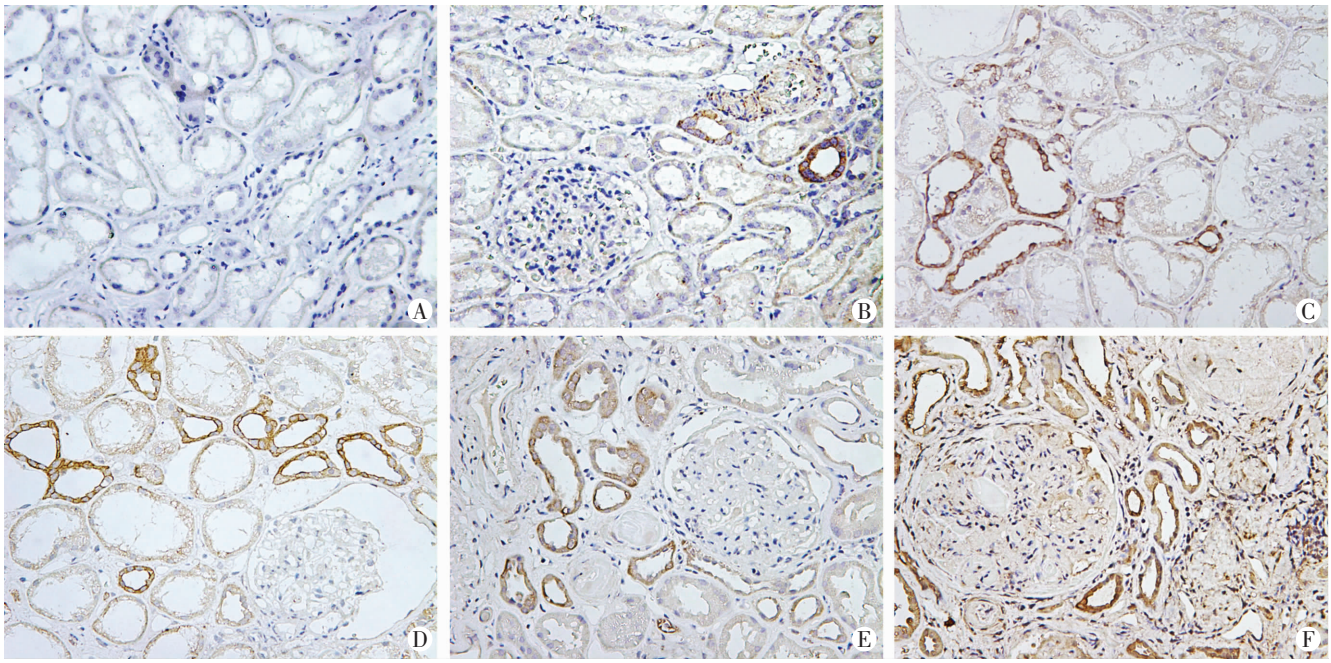
TRAIL主要表达于肾小管上皮细胞细胞质和/或细胞膜;对照组肾小管上皮细胞少量表达TRAIL,而肾小球与肾间质细胞未见表达;随着肾小管萎缩与间质纤维化程度的加重,即IFTA评分越高,肾小管细胞TRAIL表达逐渐增加与增强,并且肾小球与肾间质细胞可少量表达TRAIL(图1)。图2表明,各DN组TRAIL阳性率与对照组相比以及各IFTA组组间比较差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

表 1　DN 组与对照组临床资料比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	年龄（岁）	BMI（kg/m^2）	SBP（mmHg）	DBP（mmHg）	尿蛋白定量（g/d）	尿 NAG（U/L）	尿蛋白/尿肌酐（g/g）	Alb（g/L）	HbA1c（%）
对照组	9	54.5 ±5.9	24.2 ±2.0	113.4 ±13.3	76.6 ±6.9	0.173 ±0.042	22.7 ±2.9	0.018 ±0.009	42.4 ±4.6	5.7 ±0.2
DN 组	36	58.2 ±9.6	25.2 ±4.1	146.8 ±25.3[a]	74.3 ±11.8	3.017 ±0.166[a]	26.6 ±2.5[a]	0.422 ±0.172[a]	38.1 ±15.1	7.7 ±0.4[a]

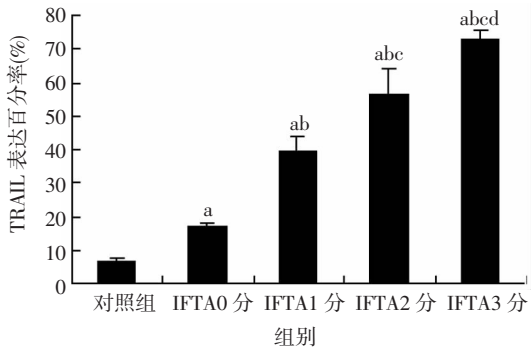
组别	n	CRP（mg/L）	UA（μmol/L）	BUN（mmol/L）	Scr（μmol/L）	Cyc（mg/L）	eGFR（ml/min）	TG（mmol/L）	TC（mmol/L）	HDL（mmol/L）	LDL（mmol/L）
对照组	9	3.32 ±0.69	313.1 ±45.2	4.769 ±0.323	72.5 ±4.1	0.927 ±0.231	103.2 ±3.9	1.40 ±0.26	5.56 ±0.47	1.386 ±0.139	3.65 ±0.24
DN 组	36	5.32 ±1.00	370.6 ±16.3	8.361 ±0.826[a]	140.6 ±15.9[a]	1.840 ±0.331[a]	62.3 ±5.5[a]	2.37 ±0.35[a]	5.57 ±0.38	1.334 ±0.121	3.10 ±0.69

a：$P<0.05$，与对照组比较



A：PBS 阴性对照组；B：对照组；C：IFTA 0 分组；D：IFTA 1 分组；E：IFTA 2 分组；F：IFTA 3 分组

图 1　免疫组化观察各组肾组织 TRAIL 的表达（二步法 ×200）



a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 IFTA 0 分组比较；c：$P<0.05$，与 IFTA 1 分组比较；d：$P<0.05$，与 IFTA 2 分组比较

图 2　各组肾组织 TRAIL 表达百分率的比较

2.3　DN 患者肾组织 TRAIL 表达与临床指标的相关性

DN 患者肾组织 TRAIL 表达与收缩压、尿蛋白定量、尿 NAG、尿蛋白/尿肌酐、尿酸、尿素氮、血肌酐、光抑素 C 呈正相关，与 eGFR 呈负相关。而与年龄、体质量指数、尿糖、白蛋白、血糖、糖化血红蛋白、C 反应蛋白及血脂水平不具有相关性（表 2）。

2.4　糖尿病肾病患者肾组织 TRAIL 表达与病理损伤评分之间的关系

TRAIL 表达水平与系膜增生、肾小球硬化、肾小管萎缩与肾间质纤维化、肾间质炎症均呈正相关（表 3），且 TRAIL 表达与肾小管间质损伤相关性较肾小球病变更大。

表2 DN患者肾组织TRAIL表达与临床指标的相关性

项目	*r*值	*P*值
SBP	0.481	0.001
DBP	0.174	0.254
年龄	0.151	0.358
BMI	0.085	0.579
尿蛋白定量	0.531	<0.01
尿NAG	0.365	0.015
尿蛋白/尿肌酐	0.400	0.009
Alb	−0.051	0.740
HbA1c	0.234	0.164
UA	0.376	0.011
BUN	0.746	<0.01
Scr	0.815	<0.01
Cyc	0.504	0.01
eGFR	−0.936	<0.01
TG	0.006	0.971
TC	0.215	0.156
HDL	−0.041	0.790
LDL	0.050	0.747
CRP	0.257	0.104

表3 DN肾组织TRAIL表达与病理损伤评分的相关性

项目	*r*值	*P*值
系膜增生	0.634	<0.01
肾小球硬化	0.642	<0.01
肾小管萎缩与间质纤维化	0.792	<0.01
肾间质炎症	0.746	<0.01

3 讨论

肾脏是糖尿病最易受累的靶器官之一,DN肾脏病理改变中肾小管间质损伤扮演关键角色[1]。肾小管间质损伤主要包括肾小管萎缩与IFTA以及肾间质炎症等。研究表明肾小管间质损伤严重程度对于反应DN肾脏预后具有较好的指导意义[5-6]。在比较晚期的DN患者中,肾功能减退主要取决于肾小管间质损伤程度,而非肾小球病变[5,7]。因此,肾小管间质损伤在DN进展至终末期肾病中占据重要的作用[8]。

目前认为导致IFTA的重要原因是肾小管上皮细胞凋亡失衡[1]。细胞是否凋亡取决于细胞所处的微环境,在DN中所特有的高糖氧应激和炎性微环境中,多种刺激因子包括氧自由基、肿瘤坏死因子等均可诱导细胞凋亡[9]。细胞凋亡的主要信号通路包括死亡受体信号途径和线粒体-细胞色素C释放途径,TRAIL是死亡信号途径的重要信号分子。TRAIL属于Ⅱ型跨膜蛋白,细胞膜外区存在金属蛋白酶作用位点,可被相应的蛋白酶从近膜区切下,形成仍然具有生物活性的可溶型活性分子,可在血浆中被检测。TRAIL与死亡受体4(death receptor 4)、DR5结合,通过死亡诱导信号复合物(death inducing signaling complex, DISC)、Caspase-8信号途径诱发病变细胞凋亡[3]。正常生理条件下TRAIL可少量表达于肾脏、心脏等组织但并不具有细胞毒性;而疾病状态下,诸多致病因子如干扰素-γ(interferon-γ, IFN-γ)、白细胞介素-6(interleukin, IL-6)等可诱导TRAIL高表达,导致细胞凋亡过度而加速疾病进展[3]。我们通过检测肾脏组织中TRAIL表达,发现DN组较对照组表达水平明显增高,同Lorz等[9]的研究一致。此外,我们还发现随着IFTA程度的加重,TRAIL阳性百分率逐渐升高。文献[9]报道表明肾小管细胞TRAIL高表达的原因并非高糖环境所致,而是由于肿瘤坏死因子-α、IFN-γ等细胞因子刺激所致,高糖只是增加了细胞对TRAIL诱导凋亡的敏感性。因此,DN中肾小管上皮细胞在高糖微环境与高水平促凋亡因子TRAIL双重效应下,加速了细胞凋亡进而促进肾小管萎缩与间质纤维化。

TRAIL除了与死亡受体结合发挥经典的促凋亡效应,可与诱骗受体1(decoy receptor 1)、DcR2、骨保护素(osteoprotegerin, OPG)结合而发挥凋亡抵抗效应[3]。在衰老的成纤维细胞中发现,由于诱骗受体2高表达,TRAIL诱导下而细胞发生凋亡抵抗[10]。我们实验室科研团队在IgA肾病中发现病变肾小管上皮细胞TRAIL及诱骗受体DcR2均高表达的同时促凋亡蛋白Caspase-8表达低下,抗凋亡蛋白FLIP表达增加,因而发生凋亡抵抗现象。凋亡抵抗的病变细胞长期滞留蓄积可产生大量的促炎因子、趋化因子、细胞基质等物质,损害邻近细胞,引起组织局部炎症和纤维化,导致疾病进展[11]。

TRAIL作为免疫系统调节因子,与免疫炎症反应密切相关[12]。本实验结果表明,TRAIL的表达水平与肾间质炎症呈正相关。而我们前期研究发现,在DN特有的高糖微环境中,活性氧类物质蓄积、NLAP3炎性体活化等均可刺激炎性细胞因子(IL-1β、IL-18等)的释放[13]。上述细胞因子可能促进肾间质TRAIL蛋白表达的同时亦促使炎症细胞活化,导致肾间质炎症程度加重。然而,在脲链霉素诱导的自身免疫性糖尿病(即1型糖尿病)大鼠肾脏中发现,阻断TRAIL的表达可导致肾脏病变发生率与严重程度增加,而给予重组TRAIL处理后可通过调节自身免疫炎症反应而改善胰岛功能、降低肿瘤坏死因子-α、细胞黏附因子-1等指标表达,提示TRAIL在1型糖尿病所致肾脏疾病中可能具有保护作用[14]。此外,在同样的动物模型实验中发现,在早期(<12周)肾脏组织损伤较轻时TRAIL表达水平低下,当给予缬沙坦处理后可上调

TRAIL的表达可保护肾脏功能[15]。而我们通过对36例2型糖尿病肾病研究发现,TRAIL的表达水平较正常对照组织明显增加,并且与肾间质炎症程度呈正相关,与肾脏预后呈负相关(表2、3)。以上说明,TRAIL在DN中具有双重利弊效应,而此效应可能取决于糖尿病的疾病类型和疾病严重程度[2]。

此外,TRAIL还可以促进细胞异常增殖。在狼疮性肾炎中发现,TRAIL可通过磷脂酰肌醇-3-激酶/丝氨酸激酶等途径促进肾小管细胞增殖[16]。我们通过检测对照和DN组TRAIL表达,发现对照组肾小球不表达TRAIL,而在DN组发现TRAIL除表达于肾小管细胞外尚表达于肾小球细胞,并随着肾小球病变程度加重其表达水平有所增加,说明TRAIL可能通过促进系膜细胞增殖和基质增生加速DN进展。我们还发现,DN中肾小管TRAIL阳性百分率与肾小球系膜增生与肾小球硬化程度呈正相关,说明TRAIL导致肾间质损伤的同时可能会促进系膜细胞与基质增生加速肾小球病变。

本研究发现,肾小管TRAIL表达水平不仅与肾组织病理损伤呈正相关,而且与尿蛋白定量、尿NAG酶、尿蛋白/尿肌酐、尿酸、尿素氮、血肌酐、胱抑素C亦呈正相关,与eGFR呈负相关。这表明肾组织中TRAIL表达水平越高,肾功能越差。有研究通过检测DN患者和健康自愿者血浆中TRAIL,发现DN患者TRAIL水平明显增高,与我们在组织层面的研究所得结论相同[3]。因此,TRAIL可作为评估肾脏组织损伤程度及肾功能预后的重要指标。

本研究揭示了TRAIL作为凋亡信号通路的关键分子和免疫系统调节因子,在2型糖尿病肾病中随着肾间质病变程度加重表达水平逐渐升高,以及其与肾功能指标之间的关系,探讨了TRAIL可能促进细胞凋亡过度、炎症细胞活化等使肾组织病变加重,导致肾脏功能恶化。因此,TRAIL在DN进展中具有重要作用,未来将TRAIL系统作为新的治疗靶点有望延缓DN疾病进展。但由于TRAIL与不同类型受体作用的复杂性,以及在不同类型疾病中发病机制的差异性[17],关于TRAIL系统在DN疾病进展中的作用需要进一步研究证实。

参考文献:

[1] Habib S L. Diabetes and renal tubular cell apoptosis[J]. World J Diabetes, 2013, 4(2): 27-30.

[2] Flyvbjerg A. Diabetic angiopathy, the complement system and the tumor necrosis factor superfamily[J]. Nat Rev Endocrinol, 2010, 6(2): 94-101.

[3] Candido R. The osteoprotegerin/tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand axis in the kidney[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014, 23(1): 69-74.

[4] Tervaert T W, Mooyaart A L, Amann K, *et al*. Pathologic classification of diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(4): 556-563.

[5] Okada T, Nagao T, Matsumoto H, *et al*. Histological predictors for renal prognosis in diabetic nephropathy in diabetes mellitus type 2 patients with overt proteinuria[J]. Nephrology (Carlton), 2012, 17(1): 68-75.

[6] Ninichuk V, Kulkarni O, Clauss S, *et al*. Tubular atrophy, interstitial fibrosis, and inflammation in type 2 diabetic db/db mice. An accelerated model of advanced diabetic nephropathy[J]. Eur J Med Res, 2007, 12(8): 351-355.

[7] Bagby S P. Diabetic nephropathy and proximal tubule ROS: challenging our glomerulocentricity[J]. Kidney Int, 2007, 71(12): 1199-1202.

[8] Najafian B, Mauer M. Morphologic features of declining renal function in type 1 diabetes[J]. Semin Nephrol, 2012, 32(5): 415-422.

[9] Lorz C, Benito-Martin A, Boucherot A, *et al*. The death ligand TRAIL in diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(5): 904-914.

[10] Sagiv A, Biran A, Yon M, *et al*. Granule exocytosis mediates immune surveillance of senescent cells[J]. Oncogene, 2013, 32(15): 1971-1977.

[11] Vallon V. The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011, 300(5): R1009-R1022.

[12] Bernardi S, Norcio A, Toffoli B, *et al*. Potential role of TRAIL in the management of autoimmune diabetes mellitus[J]. Curr Pharm Des, 2012, 18(35): 5759-5765.

[13] Chen K, Zhang J, Zhang W, *et al*. ATP-P2X4 signaling mediates NLRP3 inflammasome activation: a novel pathway of diabetic nephropathy[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(5): 932-943.

[14] Mi Q S, Ly D, Lamhamedi-Cherradi S E, *et al*. Blockade of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand exacerbates type 1 diabetes in NOD mice[J]. Diabetes, 2003, 52(8): 1967-1975.

[15] 陈兵, 张燕, 柳刚, 等. 缬沙坦联合霉酚酸酯对糖尿病大鼠肾脏TRAIL及NF-κB的影响[J]. 中华医学杂志, 2008, 88(8): 540-545.

[16] Nguyen V, Cudrici C, Zernetkina V, *et al*. TRAIL, DR4 and DR5 are upregulated in kidneys from patients with lupus nephritis and exert proliferative and proinflammatory effects[J]. Clin Immunol, 2009, 132(1): 32-42.

[17] Azijli K, Weyhenmeyer B, Peters G J, *et al*. Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family[J]. Cell Death Differ, 2013, 20(7): 858-868.

(收稿:2014-08-25;修回:2014-10-11)

(编辑 龙 亮)