DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.14.028
第26卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 14
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

文章编号:1000-5404(2004)14-1291-04

论著

糖尿病肾病患者单核细胞趋化蛋白-1与小管间质损害关系的研究

闫振成,张建国,黄志芳,王惠明, 涵露,李开龙 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所肾内科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨局部单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)表达和分泌与人糖尿病肾病(DN)病变的关系。方法 采用免疫组化和原位杂交检测人DN肾组织MCP-1蛋白和mRNA表达,并用免疫组化检测CD68;尿液和血清MCP-1水平测定采用ELISA法。结果 DN肾小管间质MCP-1表达明显增高($P<0.01$),小管间质病变越重,MCP-1表达越高($P<0.01$)。DN肾小管间质CD68表达明显增高($P<0.01$),小管间质病变间差异明显($P<0.01$)。DN肾小球MCP-1、CD68表达较正常对照明显增高($P<0.05$)。DN尿液MCP-1水平明显较正常对照组增高($P<0.01$),与间质纤维化密切相关,且与临床蛋白尿程度呈正相关。结论 DN患者肾组织内MCP-1表达与肾病变发生发展密切相关,尤其与肾小管间质病变的形成有关,这可能与MCP-1具有强烈趋化和激活单核/巨噬细胞而致肾小管间质损害有关,尿液MCP-1水平可能是反映肾小管间质病变程度的最佳指标之一。

关键词:糖尿病肾病;肾小管间质病变;单核细胞趋化蛋白-1
中图法分类号:R392.11;R692.390.2 文献标识码:A

Relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with renal tubulointerstitial lesions in human diabetic nephropathy

YAN Zhen-cheng, ZHANG Jian-guo, HUANG Zhi-fang, WANG Hui-ming, DING Han-lu, LI Kai-long ([1]Department of Nephrology, [2]Department of Hypertension and Endocrinology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship of the local expression and production of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) of patients with diabetic nephropathy (DN). Methods The MCP-1 protein and mRNA expressions were detected by immunohistochemical method and *in situ* hybridization. The CD68 expression was examined by immunohistochemical method. Urinary and serum MCP-1 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Results MCP-1 expression increased significantly in DN renal tubulointerstitium in a degree-dependent manner ($P<0.01$). Significantly increased expression of MCP-1 was also found in DN renal glomeruli ($P<0.05$). The expression levels of MCP-1 and CD68 in DN renal glomeruli were significantly higher than those in the normal control ($P<0.05$). Urinary level of MCP-1 in DN was significantly higher than that in the control, which was closely correlated with interstitial fibrosis and positively correlated with urinary levels of protein. Conclusion The expression of MCP-1 may be involved in the development of DN, especially in the formation of renal tubulointerstitial lesions possibly through monocyte/macrophage recruitment and activation. Urinary level of MCP-1 may be one of the best markers for the diagnosis of renal tubulointerstitial lesions.

Key words: diabetic nephropathy; tubulointerstitial lesion; monocyte; chemoattractant protein-1

糖尿病肾病(diabetes nephropathy, DN)的发生及发展是多因素综合作用的结果,基质蛋白积聚导致的肾小球硬化和间质纤维化是DN的显著特点。现研究显示,DN不仅有肾小球的损害,肾小管损害也是DN的重要组成部分,事实上在正常尿白蛋白排泄率阶段已发现肾小管蛋白的异常,肾小管损害可能早于肾小球损害。现认为,除了代谢紊乱和血流动力学异常外,单核/巨噬细胞浸润肾组织也是DN发展的重要因素,单核巨噬细胞可能通过释放多种活性介质参与肾损害。单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1,MCP-1)是由单个核细胞和其它非白细胞所分泌,如纤维母细胞及肾固有细胞(系膜细胞和小管上皮细胞),具有强烈的趋化作用。最近研究显示,MCP-1在实验性肾小球肾炎模型小管间质损害中发挥重要作用。然而在DN中炎性细胞浸润机制和细胞激活的临床意义仍不清楚,值得深入研究。

作者简介:闫振成(1966—),男,河北省张家口市人,博士,主治医师,主要从事肾小球疾病的发病机制方面的研究,电话:(023)68757443

收稿日期:2003-01-17;修回日期:2003-04-21

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 临床资料

病人来源于我院住院的2型糖尿病肾病患者共28例，其中男性12例，女性16例，年龄21～52岁，平均年龄(39.5±8.2)岁。均行肾穿刺活检，取部分肾组织立即行冰冻切片，然后以4 ℃丙酮固定10 min，－70 ℃冰箱保存，供免疫组织化学检测。其余肾组织于10%中性福尔马林液中固定，供常规病理染色用。在患者行肾活检前留取尿液，抽血，离心后取上清，－70 ℃冰箱保存，以备检测MCP-1水平。肾组织对照12例，男性10例，女性2例，肾组织取自手术切除肾肿瘤的周围正常肾组织，同前处理。25例正常人作为尿液和血清MCP-1的正常对照，男性15例，女性10例，年龄25～45岁，平均年龄(35±10.5)岁，留取血清和尿液进行检测，同上述方法处理。排除其它代谢性疾病，肝病、药源性糖耐量异常，原发性或其它继发性肾小球疾病。所有受试者均留置24 h尿液，查24 h尿蛋白定量，抽血查肾功能，并测血压和检测血脂。

1.2 病理学检查

取上述肾组织切片，常规HE、PAS、PASM染色，行病理诊断及病理分级。4 μm石蜡切片，脱蜡至水，分别用苏木素、PAS、PASM染色，在光镜下观察。每张切片至少10个以上肾小球，采用半定量方法评估肾小球硬化程度，根据肾小球硬化灶所占肾小球比例分为0～++++：0表示肾小球无病变，＋表示肾小球25%受损，++表示26%～50%受损，+++表示51%～75%受损，++++表示76%～100%受损。肾小管-间质病变根据间质纤维化和小管萎缩的程度而分为0～3级，0级无小管间质病变，1级表示小灶性，2级表示片灶性，3级表示弥漫性，并对间质纤维化进行分级，0级无纤维化，Ⅰ级小灶状，Ⅱ局灶性，Ⅲ级表示弥漫性[1,2]。

1.3 免疫组织化学

1.3.1 肾组织MCP-1蛋白表达的检测 经4 ℃丙酮固定的冰冻切片，PBS漂洗3次，0.3% H_2O_2 甲醇后固定15 min，2% BSA室温封闭30 min，小鼠抗人MCP-1单克隆抗体(Pharmigen公司)4 ℃过夜，PBS漂洗3次，每次5 min。生物素标记的羊抗小鼠IgG 37 ℃ 40 min，PBS漂洗3次，辣根过氧化酶标记的链霉卵蛋白素37 ℃ 30 min，PBS漂洗3次，DAB-H_2O_2 显色，水洗终止，苏木素复染细胞核。每张切片计算10个肾小球MCP-1表达阳性细胞的平均数，小管间质MCP-1的表达以每平方毫米中阳性细胞数表示。

1.3.2 肾组织CD68表达的检测 一抗为小鼠抗人CD68单克隆抗体，余步骤同上。阴性对照采用0.01 mol/L PBS替代一抗，同法操作。

1.3.3 尿液MCP-1水平的检测 于肾穿刺当日早晨收集中段尿10 ml，200× g 离心5 min，去除细胞和沉淀物，上清保存于－70 ℃待测。并取25例年龄相匹配的对照尿液10 ml，同上处理，ELISA法检测(ELISA试剂由华美生物工程公司提供)。加入小鼠抗人MCP-1单抗4 ℃过夜，漂洗后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG 37 ℃ 40 min，漂洗。磷酸盐-柠檬酸缓冲液37 ℃ 15 min，2 mol/L硫酸终止反应，然后与酶联免疫分析仪上于492 nm处测定吸光度(A)值，并根据标准曲线，计算其含量(pg/ml)，阴性对照以PBS代替一抗。同时检测尿肌酐，尿肌酐校正尿液MCP-1，以pg/mg表示。

1.4 原位杂交检测肾组织内MCP-1表达

1.4.1 原位杂交探针的制作 杂交用探针为文献[2]报道的由35对碱基组成的寡核苷酸，它与MCP-1 cDNA的第257-291个核苷酸互补，探针序列为3′-CGGATGTTGGGTTTGCTTGTCCAGGTGGTCCAAGG-5′(上海细胞生物所合成)。采用寡核苷酸3′端地高辛标记和检测药盒(宝灵曼公司)，按照试剂盒说明书进行标记和检测。

1.4.2 原位杂交流程 取冻存的肾组织切片，4% PFA室温固定20 min，蛋白酶K于37 ℃消化20 min，0.25%乙酸4 ℃ 30 min，37 ℃预杂交45 min，以浓度为2.5 μg/ml的MCP-1探针于42 ℃杂交16 h，以4× SSC、2× SSC洗片，20 μg/ml RNA酶消化，于以1× SSC、0.5× SSC洗片；3% BSA 37 ℃封闭30 min，1∶2 000的地高辛抗体(宝灵曼公司)室温孵育1 h，NBT及BCIP暗盒内显色约5 h后终止，以不加探针的杂交液杂交的标本作为阴性对照。

1.5 统计学处理

有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。应用SPSS10.0统计软件，行组间差异用 t 检验及 F 检验。

2 结果

2.1 临床结果显示

DN组收缩压(127±9.53) mmHg，舒张压(76.89±7.67) mmHg；对照组收缩压(123.25±6.33) mmHg，舒张压(72.41±5.38) mmHg，两组间血压无差异(t=1.67，P=0.12，P>0.05)；DN组胆固醇水平为(5.2±0.38) mmol/L，甘油三酯(2.02±0.98) mmol/L；对照组胆固醇(4.84±0.45) mmol/l，甘油三酯(1.45±0.22) mmol/L，两组间血脂水平无明显差异(t=1.97，P=0.06)；DN组24 h尿蛋白为(1.58±0.85)g，对照组(0.08±0.01)g，两组间差异明显(t=3.22，P=0.003)。根据蛋白尿的程度分为：微量蛋白尿(尿白蛋白20～200 μg/min)3例，大量蛋白尿(尿白蛋白＞200 μg/min)25例，其中尿蛋白＞3.5 g/d 5例。所有患者血肌酐均在正常范围内。肾小球病变＋5例，++ 14例，+++6例，++++3例。根据肾间质病变指数分级，1级7例，2级15例，3级6例，间质纤维化的程度，0级1例，Ⅰ级8例，Ⅱ级13例，Ⅲ级6例。

2.2 MCP-1蛋白在DN肾组织的表达

免疫组化结果显示，正常肾组织仅有极小部分的肾小管-间质表达极弱的MCP-1，DN肾小管间质MCP-1表达量明显高于正常对照组(15.4±4.7) vs (5.2±1.4)/mm^2(t=5.34，P=0.01)，如图1所示，肾小球MCP-1表达与正常组比较差异明显(3.3±0.97) vs (2.4±1.1)/gcs，t=2.1，P=0.042，具体分析不同肾小球病变MCP-1表达情况，各级肾小球病变间无明显差异(F=3.43，P>0.05)。比较不同小管间质病变程度MCP-1表达量，1级[n=7，(10.3±1.7)/mm^2]，2级[n=15，(13.6±2.2)/mm^2]，3级[n=6，(25.8±3.5)/mm^2]，三级别间差异明显(F=45.3，P<0.01)，小管间质病变越重，MCP-1表达越明显。比较间质纤维化与MCP-1的关系，(0＋1)级[n=9，(11.07±3.3)/

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

mm^2] 与Ⅱ级[n= 13, (13.2±2.4) /mm^2] 差异不明显, (0+Ⅰ)和Ⅲ级[n= 6, (25.8±3.5) /mm^2] 及Ⅱ级和Ⅲ级间差异明显(F= 45.3, P< 0.01)。肾组织 MCP-1 原位杂交的结果显示, DN MCP-1mRNA 主要表达在皮质肾小管和间质浸润的单个核细胞, 而肾小球表达较弱。正常对照肾小球 MCP-1 mRNA 表达极弱且少, 肾小管-间质表达较弱。间质病变程度越重, MCP-1 mRNA 表达越强。



图1　DN 患者肾小管间质 MCP-1 表达明显增加　(ABC×200)

Fig 1　Significantly increased MCP-1 expression in DN renal tubulointerstitium　(ABC×200)

2.3　CD68 在 DN 肾组织的表达

免疫组化结果显示, 正常肾组织肾小管-间质仅有少量 CD68 弱阳性染色, 肾小球有极少量弱的 CD68 表达(图2)。DN 肾小管间质 CD68 表达量明显高于正常对照组[(14.6±3.1) *vs* (5.8±1.5) /mm^2; t= 8.20, P= 0.000], 同样肾小球 CD68 表达与正常组比较差异明显[(3.7±1.0) *vs* (1.7±0.7) /gcs; t= 5.37, P= 0.001], 不同程度肾小球病变间无明显差异。比较不同小管间质病变程度 CD68 表达量, 1级[n= 7, (11±0.8) /mm^2], 2级[n= 15, (15±2.6) /mm^2], 3级[n= 6, (17.8±2.2) /mm^2], 1级和2、3级别间差异明显(F= 11.40, P< 0.01), 2级和3级间无明显差异。



图2　DN 患者肾小管间质 CD68 表达明显增加　(ABC×200)

Fig 2　Significantly increased CD68 expression in DN renal tubulointerstitium　(ABC×200)

2.4　血、尿 MCP-1 水平

DN 患者血清 MCP-1 水平较正常对照组增高[n= 25, (30±4.6) pg/ml *vs* n= 28, (35±10.80) pg/ml, t= 1.58, P= 0.13, P> 0.05]。DN 患者尿液 MCP-1 水平明显较正常对照增高[n= 28, (61.9±11.0) *vs* n= 25, (24.3±7) pg/mg; t= 9.03, P= 0.000, P< 0.01], 不同间质病变尿 MCP-1 比较, 1级[n= 7, (49.6±8.4) pg/mg], 2级[n= 15, (60.5±9.8) pg/mg], 3级[n= 6, (79.9±6.0) pg/mg], 三组间差异明显(F= 29.74, P< 0.01); 间质纤维化(0+Ⅰ)级[n= 9, (48.8±8.4) pg/mg, Ⅱ级: n= 13, (62.7±7.8) pg/mg, Ⅲ级: n= 6, (79.9±6.0) pg/mg], 三组间差异明显(F= 19.49, P< 0.01)。

2.5　相关分析

我们对 DN 患者尿 MCP-1 水平与 24 h 尿蛋白定量进行相关分析, 结果示尿 MCP-1 水平与 24 h 尿蛋白定量呈明显正相关(r= 0.72, P< 0.01)。

3　讨论

DN 的发生及发展是多因素综合作用的结果, 糖代谢紊乱、肾脏血流动力学改变、多种细胞因子以及遗传背景均起非常重要的作用。过去研究显示, 原发性肾小球肾炎 MCP-1 表达明显增高, 具有重要的致病意义。MCP-1 是新近发现的重要趋化因子, 具有趋化单核细胞至炎症部位, 释放细胞因子, 使肾小球固有细胞增殖, 而对小管间质细胞可能通过释放溶酶体酶, 产生氧自由基而损害小管间质[4]。那么 DN 作为代谢性疾病是否可引起 MCP-1 表达增高, 及其与病变间的关系研究尚少。

我们利用免疫组化和原位杂交检测人 DN 肾组织内 MCP-1 蛋白和 mRNA 表达, 结果显示, 肾小球内 MCP-1 表达较正常对照明显增高(P< 0.05), 不同程度肾小球病变间无明显差异。小管间质内 MCP-1 表达明显增高(P< 0.01), 各级小管间质间差异明显, 肾小管间质病变越重, MCP-1 表达越明显。MCP-1 作为重要的单核细胞趋化和活化因子, 我们检测了 CD68 表达, 结果显示 CD68 在肾小球和肾小管间质的表达特点与 MCP-1 表达基本一致, 提示 MCP-1 通过趋化单核细胞而参与 DN 的小球和小管间质病变的发生, 尤其与小管间质病变进展有关。原位杂交结果显示, MCP-1 主要表达于内皮细胞、小管上皮细胞和浸润的单个核细胞。另外, 我们检测 DN 患者尿液 MCP-1 水平, 尿液 MCP-1 水平可反映肾局部表达和分泌 MCP-1 的能力。结果显示 DN 患者尿液 MCP-1 水平明显增高, 小管间质病变越重, MCP-1 水平越高, 并与尿 24 h 蛋白定量呈正相关。我们还对 DN 间质纤维化与尿液 MCP-1 的关系进行探讨, 发现间质纤维化程度与尿液 MCP-1 水平密切相关, 程度越重, MCP-1 水平越高。结果提示, 尿液 MCP-1 水平可反映小管间质病变的程

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

度,可能部分与尿蛋白激活小管间质细胞溶酶体和抗原提呈激活间质 T 淋巴细胞而加重小管间质损害[5]。MCP-1 在实验性肾小球肾炎小管间质病变发生发展中起十分重要的作用,MCP-1 可通过 TGFβ1 介导实验性肾小球肾炎胶原和氧自由基产生增加[6]。因此,DN 患者小管间质 MCP-1 高表达,可能是上调 TGFβ1 而参与小管间质损害。

除了代谢紊乱和血流动力学异常外,单核/巨噬细胞浸润肾组织也是 DN 发展的重要因素,单核巨噬细胞释放多种活性介质参与肾损害。巨噬细胞具有清除糖化蛋白和氧化修饰的脂蛋白(ox-LDL)而阻止肾功能恶化,同时活化的巨噬细胞具有产生多种活性介质而加剧肾功能损害。DN 小管间质内 MCP-1 大量表达使巨噬细胞过度激活使其致病作用凸现。两组血脂和血压水平无明显差异,可排除血脂和血压对结果的影响。研究显示,ox-LDL 和糖化蛋白可刺激内皮细胞、系膜细胞表达 MCP-1,呈剂量依赖性[4],Ang Ⅱ也可上调 MCP-1,抑制 Ang Ⅱ可下调 DN 肾组织内 MCP-1 表达[7]。因此,我们推测 DN 患者 MCP-1 高表达可能与 Ang Ⅱ、糖化蛋白和 ox-LDL 的增高有关。有研究表明,DN 肾小球内MCP-1 表达正常[2],而我们的研究结果表明DN 肾小球内 MCP-1 表达增高($P<0.05$),而致肾小球内巨噬细胞浸润明显增多,而我们小管间质 MCP-1 的结果与文献报道一致。研究表明,Ang Ⅱ和 ox-LDL 在DN 整个肾组织内高表达,可能是 DN 肾小球内 MCP-1 表达增高的原因之一。为什么会出现肾小球内和小管间质表达差异?值得深入研究。我们结果显示 DN 患者尿液 MCP-1 水平与尿 24 h 蛋白定量呈正相关,可能与大量蛋白尿对小管间质的作用有关,蛋白尿可激活小管细胞膜,小管细胞基底侧分泌趋化因子 MCP-1[8]。间质病变轻较病变重巨噬细胞少,而间质病变重者 MCP-1 表达明显增高,与小管间质病变的程度密切相关,这可能与病例数少有关,需值得深入研究 MCP-1 在肾小球和肾小管病变中的作用。

总之,我们的研究表明,MCP-1 参与 DN 的发生发展,尤其与小管间质病变的进展有关,可能与趋化和活化单核/巨噬细胞有关,这也是 DN 发生发展的重要机制之一。

参考文献:

[1] Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats[J]. Kidney Int, 1984, 26(2): 137-143.

[2] Wada T, Fueichi K, Sakai N, *et al*. Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2000, 58(4): 1492-1499.

[3] Cushing S D, Berliner J A, Valente A J, *et al*. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein-1 in human endothelial cells and smooth muscle cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87(13): 5134-5138.

[4] Banba N, Nakamura T, Matsumura M, *et al*. Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2000, 58(2): 684-690.

[5] Wang Y, Chen J, Chen l, *et al*. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein[J]. J Am Soc Nephrol, 1997, 8(10): 1537-1545.

[6] Schneider A, Panzer U, Zahner G, *et al*. Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor-β[J]. Kidney Int, 1999, 56(1): 135-144.

[7] Kato S, Luyckx V A, Ots M, *et al*. Renin-angiotensin blockade lowers MCP-1 expression in diabetic rats[J]. Kidney Int, 1999, 56(3): 1037-1048.

[8] Wang S N, LaPage J, Hirschberg R, *et al*. Role of glomerular ultrafiltration of growth factors in progressive interstitial fibrosis in diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2000, 57(3): 1002-1014.

(编辑 薛国文)

(上接 1290 页)

(THY PULSE DRIVE) 因为无此触发脉冲也会出现无高压故障。这时,可通过开关房间门 2 (room door 2),同时观察高压控制区光缆 1 有无光信号发出。如果无光信号,首先要考虑 PPG-HTB PCB 电路板的问题,因在 PFN V MON H. E 及 PFN VMON L. E 光缆有问题时其只对 HT DRIVE PULSE 有影响,而对 THY PULSE DRIVE 没有影响。如果没有此脉冲可在维修端子 PFN 端测量到一低频电压,幅度 10 V 到 15 V 之间的电压波动。

2.2.4 闸流管有触发脉冲,检查有无高压触发脉冲(HT DRIVE PULSE) 此时可以用示波器直接测量 SK17G,在房间门 2 打开时此处应该有触发脉冲输出,其幅度应该在 15 V 左右,脉宽应为 0.7 ms,周期为 10 ms。若无此脉冲,可以进一步检查 HT PSU CONTROL PCB 电路板、PPG-HTB PCB 电路板和 DRIVER PCB 电路板(相关线路图和电压波形可在厂家给的维修手册中查到)及其相关附属器件,逐步加以解决。

3 小结

笔者在多次检修"由于无高压故障而引起无剂量率显示"的过程中,故障发生在上述原因的任何一步都有可能,需逐步分析,很快都解决了问题,大大减少了停机时间。但在维修过程中,一定要注意用放电棒给电容和 PFN 放电,以免发生危险。

关键词:Precise 直线加速器;故障检修;高压电路
中图法分类号:R197.39 文献标识码:B

参考文献:

[1] 顾本广. 医用加速器[M]. 北京:科学出版社, 2003. 430-431.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net