DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.11.031
第25卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 11
2003年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2003

文章编号:1000-5404(2003)11-1009-04

论著

ET-1、MMP-3、TIMP-1在人肾小球中的表达及意义

黄志芳,朱妙珍,何娅妮,申海鹰,张建国,杨聚荣 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所肾内科,重庆 400042)

提 要:目的 研究内皮素-1(Endothelin-1, ET-1)、基质金属蛋白酶-3(Matrix metalloprotevnase-3, MMP-3)、金属蛋白酶组织抑制剂-1(Tissue inhibitor of melalloproteinase, TIMP-1)在人肾小球中的表达变化及意义。方法 应用免疫组化技术检测32例原发性系膜增生性肾炎患者及5例对照组肾小球中ET-1、MMP-3、TIMP-1、LN蛋白的表达。结果 在中、重度系膜增生性肾炎患者的肾小球中,ET-1、MMP-3、TIMP-1、LN蛋白表达增强,MMP-3/TIMP-1比值下降($P<0.05$, $P<0.01$);ET-1的表达与MMP-3/TIMP-1比值负相关($r=-0.703$, $P<0.01$),与LN表达正相关($r=0.880$, $P<0.01$);MMP-3/TIMP-1比值与LN表达负相关($r=-0.623$, $P<0.01$)。结论 ET-1可能是肾小球MMP-3/TIMP-1下降的原因之一,这与肾小球细胞外基质(Exlracellular matrix, ECM)降解受抑密切相关。

关键词:内皮素-1;基质金属蛋白酶;金属蛋白酶组织抑制剂
中图法分类号:R322.61;R341.6;R345 文献标识码:A

The expressions of endothelin-1, matrix metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human glomeruli

HUANG Zhi-fang, ZHU Miao-zhen, HE Ya-ni, SHEN Hai-ying, ZHANG Jian-guo, YANG Ju-rong (Department of Nephrology, Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expressions of endothelin-1 (ET-1), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in human glomeruli and the related significance. **Methods** A total of 32 patients with primary mesangioproliferative glomerulonephritis (MsPGN) and 5 controls were included in this study. The expression levels of ET-1, MMP-3, TIMP-1 and LN proteins were determined by immunohistochemistry. **Results** The expressions of ET-1, MMP-3, TIMP-1 and LN proteins enhanced in normal glomeruli of moderate and severe MsPGN. The ratio of MMP-3/TIMP-1 decreased in severe MsPGN ($P<0.05$ or $P<0.01$). The expression of ET-1 was negatively correlated with the ratio of MMP-3/TIMP-1 ($r=-0.703$, $P<0.01$) but positively with the expression of LN ($r=0.880$, $P<0.01$). The ratio of MMP-3/TIMP-1 was negatively correlated with the expression of LN ($r=-0.623$, $P<0.01$). **Conclusion** ET-1 may be involved in the decrease of the ratio of MMP-3/TIMP-1, which may contribute to the inhibition of ECM de

内皮素-1(Endothelin-1, ET-1)是一种强烈的缩血管活性肽,但其非血流动力学作用引起了广大学者更为浓厚的兴趣。以往研究已经证实ET-1促进肾小球系膜细胞增生及多种细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)组分的合成,但ET-1与ECM降解代谢的研究相对较少。MMP-3是一种基质溶解酶,能够降解多种ECM组分,包括Col Ⅳ、LN、FN等,其活性受(Tissue inhibitor of melalloproteinase, TIMP-1)所抑制。MMP-3活性不足,或MMP-3/TIMP-1比例下降将导致ECM过度积聚终致肾小球硬化的发生。我们利用免疫组化技术(ISH)检测原发性系膜增生性肾炎患者的肾小球中ET-1、MMP-3、TIMP-1蛋白的表达变化及其相关性,探讨ET-1与ECM降解代谢的关系,旨在进一步阐明ET-1在肾小球肾炎中的致病机制,为肾小球肾炎的临床治疗开辟新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

兔抗人MMP-3多克隆抗体、兔抗人TIMP-1多克隆抗体、兔抗人LN多克隆抗体、小鼠抗人ET-1单克隆抗体、SABC试剂盒及DAB试剂盒购自武汉博士德公司。

作者简介:黄志芳(1974-),女,河北省廊坊市人,硕士,医师,主要从事肾小球疾病发病机制方面的研究。电话:(023)68757446
收稿日期:2002-06-26;修回日期:2002-07-12

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

1.2 病例选择

病人来源本院肾内科2001年6月至2002年3月行肾穿刺活检的原发性系膜增生性肾小球肾炎患者32例，病人肾穿刺前无激素及免疫抑制剂治疗史。对照组来自5例肾肿瘤行全肾切除术患者远离病灶的肾组织，全部经病理检查证实为正常肾组织。分组[1]如下：①对照组：5例，男性3例，女性2例，年龄33～56岁平均(40.60±9.24)岁；②轻度系膜增生性肾小球肾炎组(轻度MsPGN)：增生的系膜组织宽度没有超过毛细血管直径，毛细血管不受挤压。12例，男性5例，女性7例，年龄从15～48岁，平均(31.00±10.50)岁，病程10 d～2年，平均(5.45±5.23)个月；③中度系膜增生性肾小球肾炎组(中度MsPGN)：增生的系膜组织宽度等于或超过毛细血管直径，毛细血管受挤压。10例，男性6例，女性4例，年龄从14～43岁，平均(30.50±10.33)岁，病程1周～半年，平均(2.42±2.32)个月；④重度系膜增生性肾小球肾炎组(重度MsPGN)：增生的系膜组织呈结节或团块状聚集，部分毛细血管消失，呈现节段性硬化。10例，男性3例，女性7例，年龄从16～48岁，平均(38.00±12.21)岁，病程平均(10.20±9.56)个月。

1.3 一般资料的收集

所有患者于肾活检前或手术前1 d收集尿、血标本，送本院检验科按常规方法测定24 h尿蛋白定量、血白蛋白及内生肌酐清除率。以患者入院时测得的第1次血压作为患者的血压。

1.4 免疫组织化学检查

采用SABC法检测ET-1、MMP-3、TIMP-1、LN蛋白的表达。石蜡切片常规脱蜡水化后，3%双氧水灭活内源性过氧化物酶，微波抗原修复20 min。正常山羊血清封闭10 min，依次滴加一抗、二抗及SABC工作液，DAB显色。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。

1.5 免疫组化结果判定

以胞浆呈清晰棕黄色为阳性。染色评分[2]以染色强度积分和阳性面积比例积分之和表示。染色强度记为0～3分，0分：无表达；1分：弱阳性(浅黄色)；2分：中度阳性(棕黄色)；3分：强阳性(深棕色)。阳性面积比例记为0～4分，0分：无表达；1分：阳性面积占肾小球总面积1%～25%；2分：阳性面积占肾小球总面积26%～50%；3分：阳性面积占肾小球总面积51%～75%；4分：阳性面积占肾小球总面积75%～100%。采用Mia-2000图像分析软件400倍视野下测量肾小球总面积，并经灰度变换将阳性染色与背景分开，测量阳性面积，计算阳性面积比例。

每例标本400倍镜下随机观察5个肾小球，分别计算其染色积分，并计算均值，作为每例标本的染色积分。

1.6 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，应用SPSS10.0统计软件进行相关分析、单因素方差分析(One-Way-ANOVA)，组间比较采用LSD。

2 结果

2.1 一般资料

轻、中、重度MsPGN患者与对照组比较，年龄、性别、血白蛋白、血压均无显著性差异($P>0.05$)；各组肾小球肾炎患者24 h尿蛋白定量较对照组明显增多($P<0.01$)；重度MsPGN患者内生肌酐清除率较对照组降低($P<0.01$)。见表1。

表1 原发性系膜增生性肾小球肾炎患者及对照组一般资料($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Clinical data in control and patients with MsPGN($\bar{x}\pm s$)

Group	Age (Years)	Sex (M/F)	Urinary protein (g/24h)	Ccr (ml/min)	Albumin in serum (g/L)	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)
Control	40.60±9.24	3/2	0.06±0.01	90.20±10.81	39.70±4.64	116.00±18.17	72.00±13.04
Mild MsPGN	31.00±10.50	5/7	1.99±0.90*	86.88±10.61	35.46±10.68	115.00±16.04	74.38±10.50
Moderate MsPGN	30.50±10.33	6/4	2.27±1.25*	74.50±8.05	28.80±13.14	126.67±28.05	81.67±18.35
Severe MsPGN	38.00±12.21	3/7	1.98±0.48*	53.33±6.91*	35.66±8.97	129.17±17.44	84.17±11.58

*：$P<0.01$ *vs* control

2.2 免疫组化染色结果

2.2.1 ET-1、MMP-3、TIMP-1、LN蛋白在肾小球的表达 轻度MsPGN患者的肾小球中，ET-1、MMP-3、TIMP-1、LN表达与对照组无显著性差异($P>0.05$)；中、重度MsPGN患者的肾小球中，四者表达较对照组显著增强($P<0.01$)。MMP-3/TIMP-1比值随着系膜增生程度的加重逐渐下降，在重度MsPGN肾小球中明显低于对照组($P<0.05$)。见表2及图1～4。

表2 ET-1、MMP-3、TIMP-1及LN蛋白在肾小球的表达($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 The expressions of ET-1, MMP-3, TIMP-1 and LN proteins in human glomeruli($\bar{x}\pm s$)

Group	*n*	ET-1	MMP-3	TIMP-1	MMP-3/TIMP-1	LN
Control	5	2.20±0.45##	2.40±0.55##	2.20±0.45##	1.10±0.22#	2.60±0.55##
Mild MsPGN	12	2.75±0.71##	3.13±0.35##	2.63±0.52##	1.23±0.25##	2.75±0.46##
Moderate MsPGN	10	4.17±0.75**##	5.00±0.63**	4.95±0.89**##	1.02±0.19	5.10±0.63**##
Severe MsPGN	10	6.00±0.89**	5.33±0.52**	6.50±0.55**	0.82±0.05*	6.83±0.41**

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* control；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* severe MsPGN

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

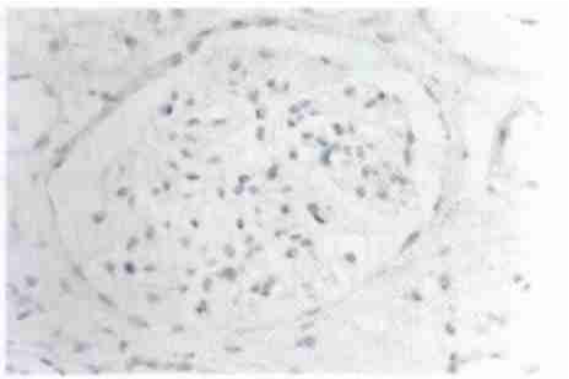


图 1　对照组肾小球 ET-1 蛋白的表达　(SABC× 400)

Fig 1　The glomerular expression of ET-1 protein in control　(SABC× 400)

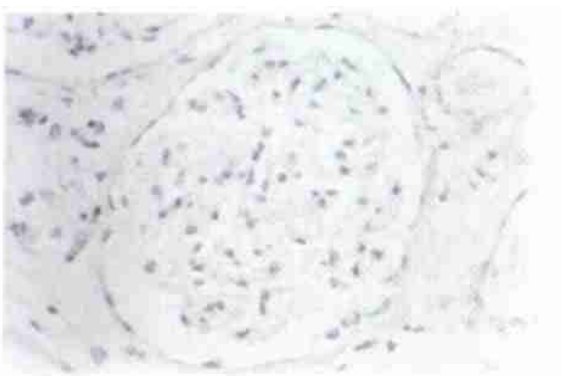


图 2　对照组肾小球 TIMP-1 蛋白的表达　(SABC× 400)

Fig 2　The glomerular expression of TIMP-1 protein in control　(SABC× 400)

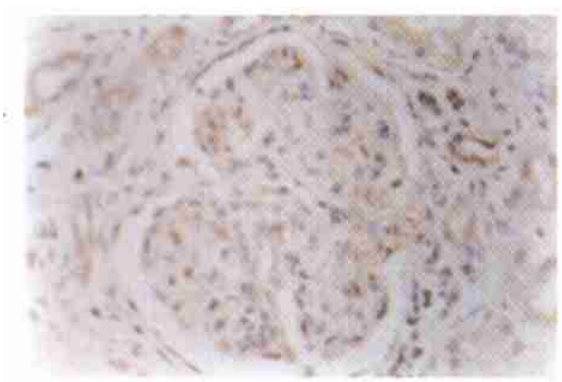


图 3　重度 Mspan 组肾小球 ET-1 蛋白的表达　(SABC× 400)

Fig 3　The glomerular expression of ET-1 protein in severe MsPGn　(SABC× 400)

2 2 2　免疫组化指标之间的相关性分析　　ET-1 在肾小球的表达与 MMP-3/TIMP-1 比值负相关(r= －0 703, P< 0 01), 与 LN 表达正相关(r= 0 880, P< 0 01); MMP-3/TIMP-1 比值与 LN 表达负相关(r= －0 623, P< 0 01)。

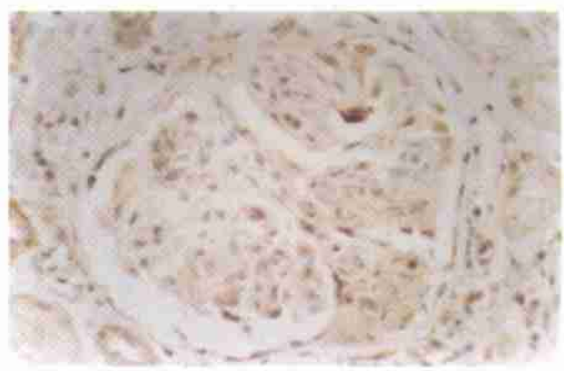


图 4　重度 MsPGN 组肾小球 TIMP-1 蛋白的表达　(SABC× 400)

Fig 4　The glomerular expression of TIMP-1 protein in seveve MsPGN　(SABC× 400)

2 2 3　免疫组化指标与临床资料的相关性分析　　肾小球内 ET-1、LN 表达与内生肌酐清除率均成负相关(r= －0 748, r= －0 845, P< 0 01), 与尿蛋白定量、血白蛋白、血压均无相关性(P> 0 05); 肾小球 MMP-3/TIMP-1 比值与内生肌酐清除率正相关(r= 0 795, P< 0 01)。见表 3。

表 3　肾小球内 ET-1、MMP-3/TIMP-1、LN 蛋白的表达与临床资料的相关性分析(相关系数 r)

Tab 3　Correlation of immunohistochemical parameters with clinical data (Correlation coefficient　r)

	Urinary proteins	Albumin in serum	Ccr	SBP	DBP
ET-1	0.388	－0.231	－0.748 *	0.224	0.292
MMP-3/TIMP-1	－0.052	0.028	0.795 *	－0.033	－0.170
LN	0.318	－0.097	－0.845 *	0.281	0.348

*: P< 0.01

3　讨论

ET-1 是一种强烈的缩血管活性肽, 但近年来其非血流动力学作用日益引起人们的重视。ET-1 与系膜细胞表面受体结合后, 激活 Ca^{2+}、PKC、PLC 等途径, 上调Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ型前胶原基因及细胞增殖相关基因, 促进系膜细胞增殖及 ECM 合成[3]。但 ET-1 与 ECM 降解代谢的研究相对较少。ECM 降解代谢下降是肾小球硬化发生与发展的重要机制之一。为了探讨 ET-1 在 ECM 降解代谢中的作用, 我们观察了原发性系膜增生性肾炎患者肾小球中 ET-1、MMP-3、TIMP-1 蛋白的表达变化及其相关性。

以往研究多限于动物模型, 或从患者血液及尿液中检测 ET-1, 本实验在人类肾组织中研究 ET-1 蛋白的表达变化。本实验结果显示在中、重度系膜增生性肾炎患者的肾小球中, ET-1 蛋白表达显著增强, 而且增

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

殖程度越重，表达越强，ET-1 的表达与 LN 在肾小球的表达正相关，与内生肌酐清除率负相关，提示 ET-1 在肾小球的过度表达可能参与 ECM 过度积聚以及肾功能的衰退过程。

ECM 合成增多和或降解减少是 ECM 过度积聚的重要机制。体外实验已经证实 ET-1 以剂量及时间依赖方式促进系膜细胞增殖，Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ型前胶原及纤维连接蛋白 mRNA 表达增强[4,5]。最近研究表明 ET-1 在 ECM 降解代谢中亦起着重要作用。Ⅰ型纤溶酶原激活物抑制物(PAI)是丝氨酸蛋白酶抑制剂家族成员，ET-1 促进 PAImRNA 及蛋白的表达，抑制纤溶酶原激活物对纤溶酶原的活化，从而抑制 ECM 的降解[6]。Yao 等[7] 发现 ET-1 抑制系膜细胞 MMP-2 的合成与活化，降低 ECM 降解。ET-1 还能够促进肾间质成纤维细胞 MMP-1、TIMP-1 及 TIMP-2mRNA 的表达[8]。但 ET-1 与肾小球 MMP-3/TIMP-1 表达的关系未见报道。

我们发现在中、重度系膜增生性肾炎患者的肾小球中 MMP-3、TIMP-1 蛋白表达增强，但 MMP-3/TIMP-1 比值随着病变程度的进展逐渐下降，尤其在重度系膜增生性肾炎患者中明显降低。ET-1 在肾小球的表达与 MMP-3/TIMP-1 比值负相关，MMP-3/TIMP-1 比值与 LN 的表达负相关，与内生肌酐清除率正相关，提示 ET-1 可能通过降低 MMP-3/TIMP-1 比值抑制 ECM 降解代谢，导致 ECM 在肾小球内过度积聚以至肾功能进行性下降。

MMP-3 蛋白表达增强可能是伴随着系膜细胞增生及 ECM 合成增多而出现的机体的代偿机制。但由于 TIMP-1 表达增强，抑制 MMP-3 的活性，因此即使 MMP-3 表达增强，但是其降解活性并不增加，或者下降，致使 ECM 逐渐积聚，终至肾小球硬化的发生。TIMP-1 表达增强与肾小球硬化的发生密切相关。Carome 等[9] 发现硬化性肾小球中 TIMP-1 及 TIMP-2 基因表达较正常肾小球显著增强。

综上所述，ET-1 在肾小球中表达上调可能导致 MMP-3/TIMP-1 比例下降，使 ECM 降解受抑，促使肾小球硬化的发生。阻断 ET-1 的作用，将可能成为肾小球肾炎临床治疗的新策略。

参考文献：

[1] 邹万忠，谌贻璞，章友康. 肾活检病理诊断图鉴[M]. 北京：人民卫生出版社，2000.5.

[2] 邱德凯，马 雄，彭延申，等. 原发性肝细胞癌及癌旁组织中环氧合酶-2 的表达及其意义[J]. 中华消化杂志，2001，21(3)：142－144.

[3] Kohan D E. Endothelins in the normal and diseased kidney[J]. Am J Kidney Dis，1997，29(1)：2－26.

[4] 蒋更如，左静南，冯菡芳，等. ET-1 对系膜细胞增殖和前胶原 mRNA 表达的影响[J]. 上海第二医科大学学报，1999，19(4)：307－310.

[5] Gomez-Garre D，Ruiz-Ortega M，Ortego M，*et al*. Effects and interactions of endothelin-1 and angiotensin II on matrix protein expression and synthesis and mesangial cell growth[J]. Hypertension，1996，27(4)：885－892.

[6] Iwamoto T，Tamaki K，Nakayama M，*et al*. Effect of endothelin 1 on fibrinolysis and plasminogen activator inhibitor 1 synthesis in rat mesangial cells[J]. Nephron，1996，73(2)：273－279.

[7] Yao J，Morioka T，Li B，*et al*. Endothelin is a potent inhibitor of matrix metalloproteinase-2 secretion and activation in rat mesangial cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol，2001，280(4)：F628－35.

[8] 田雪飞，唐功耀，谌贻璞. 内皮素-1 及内皮素受体 A 拮抗剂对人肾间质成纤维细胞的作用[J]. 中华医学杂志，2002，82(1)：5－9.

[9] Carome M A，Striker L J，Peten E P，*et al*. Human glomeruli express TIMP-1mRNA and TIMP-2 protein and mRNA[J]. Am J Physiol，1993，264(6 Pt 2)：F923－929.

(编辑 陈聪连)

(上接 999 页)

3 讨论

本组临床观察显示：治疗后两组患者均达到强化治疗标准。A、B 两组病人控制血糖达标时间及每日胰岛素的量均有显著性差异。说明二甲双胍与胰岛素有协同和增强胰岛素降糖作用，从而减少胰岛素的用量。2 型 DM 常伴脂质代谢紊乱，多见 TG 升高为主，脂质代谢紊乱又进一步加重糖代谢紊乱，二者互为因果关系。这与 VLDL-TG 的产生过多和 VLDL-TG 的清除缺陷脂蛋白酶(LPL)的活性低下有关[1]。经胰岛素强化治疗后 A、B 两组病人 TG 均比治疗前改善，但 A 组病人的差异无显著性，而 B 组病人的差异有显著性。

2 型 DM 的发病与胰岛素抵抗和胰岛素分泌缺陷有关。慢性高血糖加重胰岛素抵抗和胰岛素分泌缺陷。胰岛素强化治疗降低葡萄糖毒性作用后有利于胰岛素β细胞恢复分泌和改善胰岛素抵抗。二甲双胍和胰岛素联合治疗，一方面使胰岛β细胞减轻负荷，另一方面二甲双胍能够改善机体的胰岛素敏感性，因此继发性磺脲类失效者加用二甲双胍可能有利血糖控制[2]。

通过本组资料的临床观察，治疗磺脲类降糖药继发失效的 2 型 DM 患者，应用胰岛素治疗同时服用二甲双胍，有利于血糖控制和改善脂代谢，对预防高胰岛素血症所致的不良作用有积极意义。

关键词：2 型糖尿病；胰岛素强化治疗；二甲双胍
中图法分类号：R587.105 文献标识码：B

参考文献：

[1] 吴雪怡，杨永年. 2 型糖尿病病人脂代谢紊乱与大血管并发症[J]. 实用糖尿病杂志.1999，7(1)：17.

[2] 傅祖植，王佑民. 2型糖尿病的综合治疗[J]. 中华内分泌代谢杂志，2000.16(6)：389－391.

(编辑 陈聪连)

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