DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.036
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
1212 2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)10-1212-04

系膜增生性肾炎中单核细胞趋化蛋白-1的表达和单核巨噬细胞的浸润

丁涵露,贾昆霞,张建国,朱妙珍 (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 观察在系膜增生性肾炎(MsPGN)中,单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的表达和单核/巨噬细胞(MΦ)的浸润情况。方法 采用免疫组织化学和原位杂交技术观察17例MsPGN患者肾活检组织。结果 ①轻度MsPGN中,肾小球和肾小管间质中有少量MΦ浸润,MCP-1无明显表达($P>0.05$);②中度MsPGN中,肾小球、肾小管-间质中的MΦ浸润数、MCP-1表达量显著增高($P<0.01$),肾小球MCP-1$^+$细胞数与肾小球内MΦ数呈正相关($r=0.90$, $P<0.01$);MCP-1$^+$小管数与小管间质内MΦ数亦呈正相关($r=0.86$, $P<0.01$)。结论 ①MΦ参与中度MsPGN中肾小球和肾间质小管的炎症病变;②肾小球和肾小管间质中浸润的MΦ可能受MCP-1趋化作用的影响。

关键词:系膜增生性肾炎;单核/巨噬细胞;单核细胞趋化蛋白-1
中图法分类号:R392.13;R692.31 文献标识码:A

Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and infiltration of monocyte/macrophage in human mesangial proliferative glomerulonephritis

DING Han-lu, JIA Kun-xia, ZHANG Jian-guo, ZHU Miao-zhen (Department of Nephrology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) and infiltration of monocyte/macrophage (MΦ) in renal tissue of mesangial proliferative glomerulonephritis (MsPGN). Methods MCP-1 expression and MΦ infiltration in the renal biopsy tissues of 17 MsPGN patients were studied with immunohistochemical method and *in situ* hybridization. Results ①In mild MsPGN group, little MΦ infiltration and MCP-1 expression were observed in glomerular and renal tubulointerstitial areas was found ($P>0.05$). ②In medium MsPGN group, MCP-1 and CD68 expression were significantly higher than that in normal control ($P<0.01$). The number of cells expressed MCP-1 in glomerular and tubulointer-stitial areas showed a strong correlation with the number of MΦ infiltration ($r=0.90$, $P<0.01$, $r=0.86$, $P<0.01$). Conclusion ①In medium MsPGN, MΦ participates in and mediates the inflammation of both glomerular and tubulointerstitial areas. ②MΦ infiltration in glomerular and tubulointerstitial areas may be chemoattracted partially by MCP-1.

Key words: mesangial proliferative glomerulonephritis; monocyte/macrophage; monocyte chemoattractant protein-1

在肾小球肾炎的发生发展过程中,外周血单核细胞(Monocyte, MC)浸润于肾间质有极为重要的意义。浸润的巨噬细胞(Macrophage, MΦ)被激活后产生蛋白激酶、活性氧、活性氮、细胞因子及生长因子等造成肾组织不同程度的损伤[1,2],但其浸润机制目前不完全明确。单核细胞趋化蛋白-1(Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1)是新近明确的对单核/巨噬细胞具有趋化、激活作用的细胞因子[3],有关人类急进性肾炎、狼疮性肾炎、膜性肾病、局灶节段性肾小球硬化中MCP-1表达MΦ浸润的情况国内外已有报道[4~7],而人类MsPGN中MCP-1表达,MΦ浸润情况未见报道,本研究以我国肾小球肾炎中的主要病理类型——系膜增生性肾炎(Mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)为实验对象,探讨MCP-1,MΦ在其中的表达、浸润情况及其相互关系,为临床治疗系膜增生性肾炎提供部分实验依据。

作者简介:丁涵露(1970—),女,山东省日照市人,硕士,主治医师,主要从事肾小球肾炎方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68757446

收稿日期:2001-06-16;修回日期:2001-08-30

1 材料与方法

1.1 实验对象

1.1.1 实验组 ①本组17例,其中男性10例,女性7例,平均年龄29.1岁,均排除狼疮性肾炎等继发性肾炎,所有患者均经肾组织穿刺活检(肾活检前未接受激素治疗),按WHO 1982年制定的肾小球疾病分类标准诊断为MsPGN(不包括IgA肾病,并排除间质性肾炎);②MsPGN的病理分级[8]:轻度系膜增生为增生的系膜宽度不超过毛细血管直径,且呈节段性分布,毛细血管腔呈开放状;中度系膜增生为增生的系膜宽度超过毛细血管的直径,系膜区多呈弥漫性分布,毛细血管腔呈现轻度不等的挤压现象。本组轻度MsPGN 9例,中度MsPGN 8例。

1.1.2 对照组 5例,来自肾移植配型不合的供肾,均经光镜证实肾组织正常。

1.2 方法

1.2.1 CD68、MCP-1免疫组织化学染色 4 ℃丙酮固定的10~15 μm冰冻切片行S-P法染色,一抗分别为小鼠抗人CD68单克隆抗体(1∶50,识别单核/巨噬细胞,北京中山生物技术公司),小鼠抗人MCP-1单克隆抗体(1∶500,美国Promega公司),按照S-P试剂盒(福州迈新公司)说明书进行操作与测定。阴性对照以PBS代替一抗同法操作。

1.2.2 地高辛标记MCP-1寡核苷酸探针的制备 杂交用

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

cDNA 探针为 Cushing 等[9]报道的由 35 对碱基组成的寡核苷酸(上海细胞生物所合成), 它与 MCP-1 cDNA 第 257～291 个核苷酸互补。探针序列为 3'-CGG ATG TTG GGTTTGCTTGTCCAGGTGGTCCAAGG-5', 采用寡核苷酸 3' 端地高辛标记和检测药盒, 按药盒说明书进行标记与检测。

1.2.3　原位杂交流程　4%多聚甲醛固定的冰冻切片, 梯度酒精脱水, 0.1 mol/L 甘氨酸漂洗 10 min, 含 0.3% TritonX-100 的 PBS 漂洗 15 min。1 μg/ml 蛋白酶 K 37 ℃消化 20 min, 4%多聚甲醛再固定 3 min, 0.1 mol/L PBS 漂洗 2× 5 min, 滴预杂交液, 37 ℃孵育 45 min, 倾去预杂交液, 加杂交液(含 2.5 μg/ml MCP-1 探针)于 42 ℃杂交 16 h, 以 4× SSC, 2× SSC 洗片后, 20 μg/ml RNA 酶消化, 再以 1× SSC, 0.5× SSC 洗片, 3%牛血清白蛋白 37 ℃封闭 30, 滴加 1∶2 000 的地高辛抗体室温孵育 1 h, TSM1 漂洗 2× 10 min, TSM2 漂洗 2× 5 min, NBT 0.4 mg/ml/BCIP 0.2 mg/ml 室温暗处显色 3～5 h 后终止, 脱水透明, DPX 封片, 以不加探针的杂交液杂交的标本作为阴性对照。

1.3　结果分析

计算每张切片 6 个以上肾小球横切面内 MCP-1^+、$CD68^+$ 细胞数的平均数, 以 MCP-1^+ 细胞数/肾小球横切面、$CD68^+$ 细胞数/肾小球横切面表示; 计算每 mm^2 皮质肾小管 MCP-1^+ 小管占总肾小管百分数, 以 MCP-1^+ 小管%/mm^2 表示; 计算每 mm^2 皮质肾小管间质 $CD68^+$ 细胞数, 以 $CD68^+$ 细胞数/mm^2 表示。

1.4　统计学处理

本实验计量资料结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。肾炎组与正常组之间的细胞数比较用 t 检验或秩和检验。MCP-1^+ 细胞数与 $CD68^+$ 细胞数的相关分析采用直线相关。

2　结果

2.1　MΦ 的浸润情况

2.1.1　正常肾组织偶见 MΦ 浸润, 轻度 MsPGN 组有少量 MΦ 浸润, 与正常组比较无统计学意义, 中度 MsPGN 组中有大量 MΦ 浸润, 与正常组及轻度 MsPGN 组比较有统计学意义, 见表 1。

表 1　MΦ 分布情况($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Distribution of CD68 in kidney($\bar{x}\pm s$)

Group	n	MΦ in glomerulus (cell/gcs)	MΦ around glomerulus (cell/gcs)	MΦ in tubulointerstitium (cell/mm^2)	MΦ in tubule (cell/mm^2)
Control	5	0.72±0.4	0.3±2.1	27.2±0.3	18.4±1.2
MsPGN					
Mild	9	4.5±3.7	2.3±0.4	56.7±5.1	30.0±2.1
Moderate	8	16.3±4.2 *#	8.7±1.2 *#	183.0±7.1 *#	93.4±5.5 *#

gcs: Glomerular crosscut side; *: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$ *vs* MsPGN mild

2.1.2　在中度 MsPGN 组中, MΦ 的表达主要集中在肾小球系膜区、肾小管间质区, 另外在肾小球周围(肾小囊内), 肾小管腔内也有少量 MΦ 表达, 见图 1、2, 而且 MΦ 在肾小球内的数量与肾小管间质内的数量相关($r=0.78$, $P<0.05$), 其他区域间无相关性。

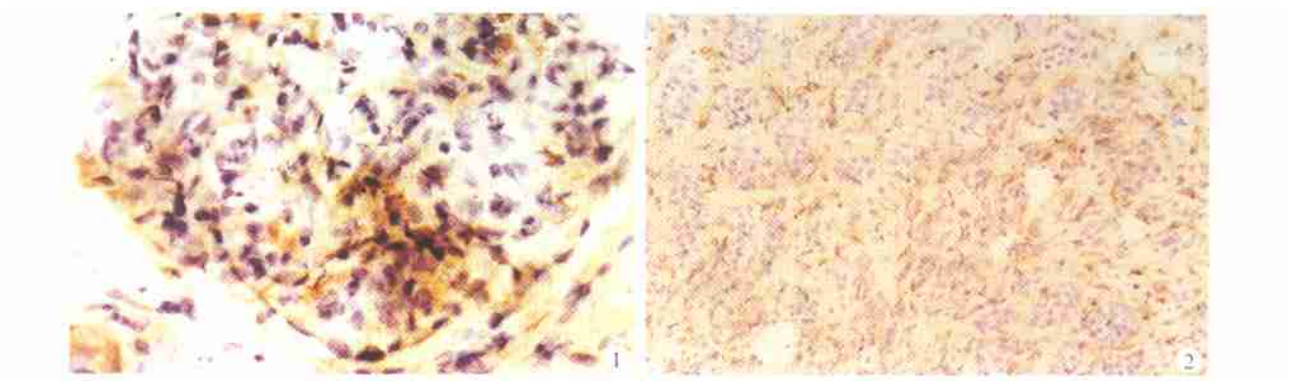


图 1　肾小球系膜区、肾小球周围表达 **CD68**　(S-P× 400)

Fig 1　Expression of CD68 in glomerular mesangial area and around glomerular capsule　(S-P× 400)

图 2　肾小管间质、肾小管腔表达 **CD68**　(S-P× 200)

Fig 2　Expression of CD168 in tubulointerstitial tissue and tubular space　(S-P× 200)

2.2　MCP-1 的表达

2.2.1　正常组肾组织有少量 MCP-1 表达, 轻度 MsPGN 组, 22%患者肾组织有弱表达, 但无统计学意义($P>0.05$), 中度 MsPGN 组, 75%患者肾组织肾小球 MCP-1^+ 细胞数及 MCP-1^+ 小管数与正常对照组及轻度 MsPGN 组相比有统计学意义, 见表 2。

表 2　MCP-1 表达情况($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Expression of MCP-1($\bar{x}\pm s$)

Group	n	MCP-1^+ in glomerulus (cell/gcs)	MCP-1^+ in tubular (%/mm^2)
Control	5	2.3±1.2	5.1±2.1
MsPGN			
Mild	9	6.8±0.3	12.4±3.7
Moderate	8	38.4±5.8 *#	40.3±5.3 *#

gcs: Glomerular crosscut side; *: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$ *vs* MsPGN mild

2.2.2　在 MCP-1 阳性的肾组织, MCP-1 阳性染色物质主要沉积于肾小球系膜区、肾小管上皮细胞的基底侧, 此外在 Bowman's 囊壁、肾血管内皮细胞及部分间质小血管壁亦可见少量表达, 见图 3、4。

2.2.3　中度 MsPGN 组中肾小球 MCP-1^+ 细胞数与肾小球内 $CD68^+$ 细胞数呈显著正相关性, $r=0.90$, $P<0.01$; MCP-1^+ 小管数与小管间质中 $CD68^+$ 细胞数亦呈正相关, $r=0.86$, $P<0.01$, 在 MCP-1^+ 表达的部位, 有明显的 MΦ 浸润, 而无 MCP-1 表达的部位, MΦ 浸润明显减少。

2.3　MCP-1 mRNA 表达

2.3.1　正常组肾组织无 MCP-1 mRNA 表达, 轻度 MsPGN 组有 11%患者肾组织在肾小球, 肾小管有弱表达, 无统计学意义($P>0.05$), 中度 MsPGN 组中, 50%患者肾组织 MCP-1 mRNA 在

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

肾小球内有少量表达，但无统计学意义（$P>0.05$），见图 5。其在肾小管上皮细胞的表达有统计学意义（$P<0.01$），见图 6，表 3。

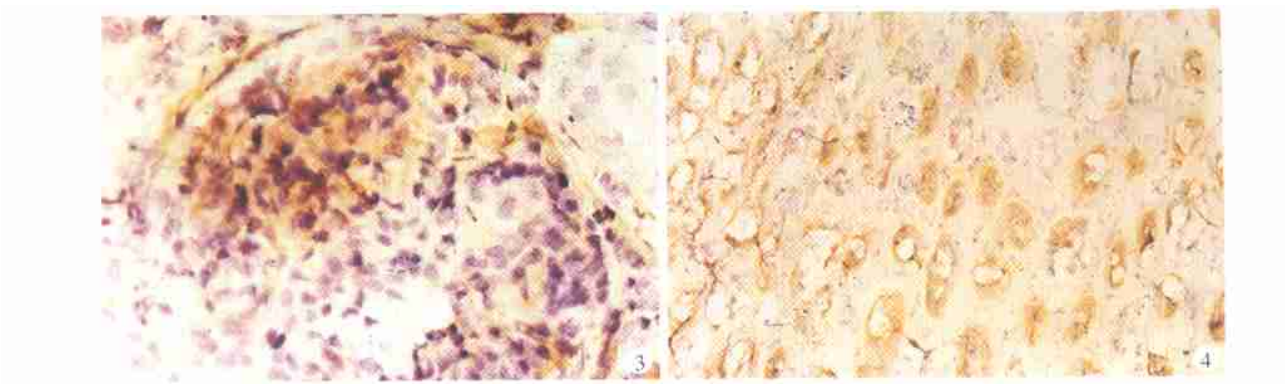


图 3 肾小球系膜区、Bowman′s 囊壁表达 MCP-1 （S-P× 400）

Fig 3 Expression of MCP-1 in glomerular mesangial area and Bowman′s capsule （S-P× 400）

图 4 肾小管上皮细胞、肾血管内皮细胞表达 MCP-1 （S-P× 200）

Fig 4 Expression of MCP-1 in tubular epithelial cells and renal vascular endothelial cells （S-P× 200）

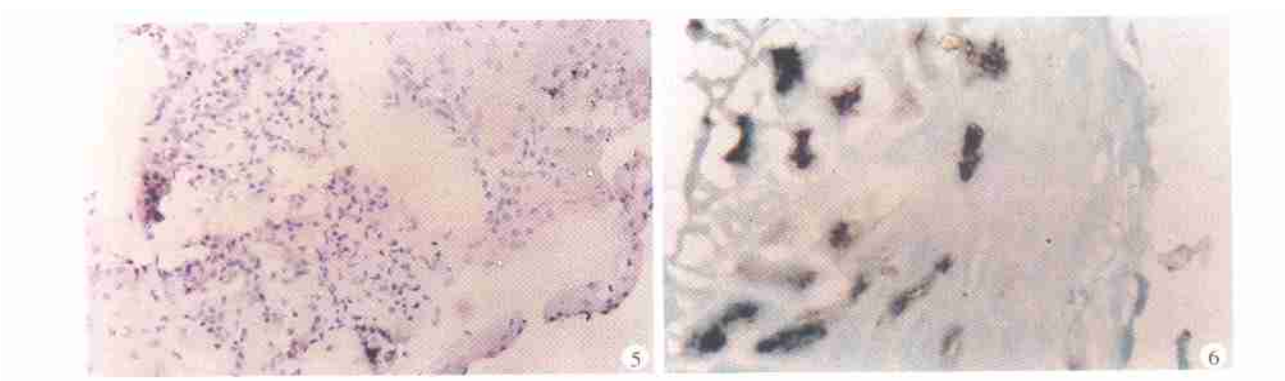


图 5 肾小球表达 MCP-1 mRNA （ISH× 400）

Fig 5 Expression of MCP-1 mRNA in glomerulus （ISH× 400）

图 6 肾小管上皮细胞表达 MCP-1 mRNA （ISH× 400）

Fig 6 Expression of MCP-1 mRNA in tubular epithelial cells （ISH× 400）

2.3.2 除部分患者在有 MCP-1 表达的区域无 MCP-1 mRNA 表达外，其它区域两者分布一致，说明 MCP-1 是原位产生的。

表 3 MCP-1 mRNA 表达情况（$\bar{x}\pm s$）

Tab 3 Expression of MCP-1 mRNA（$\bar{x}\pm s$）

Group	n	MCP-1$^+$ in glomerulus (cell/gcs)	MCP-1$^+$ in tubular (%/mm^2)
Control	5	0	0
MsPGN			
Mild	9	3.7±1.1 *	9.4±5.1 *
Moderate	8	15.8±5.5 *#	47.5±4.2 *#

gcs: glomerular crosscut side; *: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$ *vs* MsPGN mild

3 讨论

本实验发现，轻度 MsPGN 组中肾小球，肾小管间质中有少量 MΦ 浸润，中度 MsPGN 组中，MΦ 浸润明显增加，且主要集中在肾小球系膜区和肾小管间质区，其分布恰与 MsPGN 肾小球、肾小管特征性病变区域相符合，提示 MΦ 参与肾小球炎症反应过程。在中度 MsPGN 组，肾小球内 MΦ 数与小管间质内浸润的 MΦ 数呈正相关性，说明在肾小球炎症病变中，肾小球、肾小管间质的损害是一个不可分割的整体，另外，可观察到 MΦ 嵌入肾小管上皮细胞间的现象，说明 MΦ 有在肾小管间质和肾小管腔间迁移的可能。国外动物实验发现[9]，肾小管间质与肾小球中浸润的 MΦ 不是毫无关联的，而是随着炎症的发展，MΦ 在某些因素的影响下，在各区域中按一定规律进行迁移，最终达到炎症部位并形成损害，通过本实验，说明国外在动物实验中发现的现象也可能存在于人类 MsPGN 中。

MΦ 浸润到炎症局部，目前认为有以下几方面的机制：趋化作用；免疫介导作用[10]；脂质途径[11]；粘附分子作用[12]。本实验选择趋化作用中的 MCP-1 作为研究对象，观察其与 MΦ 之间的关系，免疫组化结果表明，中度 MsPGN 组中，肾小球内 MCP-1$^+$ 细胞数与球内 MΦ 浸润数呈正相关性，MCP-1$^+$ 小管数与小管间质中

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

浸润的MΦ 数亦呈正相关性，说明在中度 MsPGN 中，肾小球内及肾小管间质中 MΦ 的浸润可能部分受 MCP-1 趋化作用的影响。

除部分患者在有 MCP-1 表达的区域无 MCP-1 mRNA 表达外，其它区域两者分布一致，说明MCP-1 是原位产生的。部分患者出现 MCP-1 表达而无核酸表达，说明局部MCP-1 的表达是通过血液循环或临近细胞分泌后粘附在其表面所致，中度 MsPGN 组中，肾小球MCP-1 表达有统计学意义，而 MCP-1 mRNA 表达无统计学意义，也可能与此原因有关。

本研究在轻度MsPGN 组不论是 MCP-1 的表达还是MΦ 的浸润数从绝对值看都高于正常组，可能是例数少的原因，若扩大例数，可能会出现差异性。本实验结果表明，MΦ 是人类 MsPGN 病变的重要参与者，MCP-1 可能调控其在肾小球和肾小管间质的浸润。

参考文献：

[1] Schena F P, Gesualdo L, Grandaliano G, *et al*. Progression of renal damage in human glomerulonephritis: is there sleight of hard in winning the game[J] ? Kidney Int, 1997, 52(6): 1 439—1 457.

[2] Atkin R C, Niklic-Paterson D J, Lan H Y. Tubulointerstitial injury in glomerulonephritis[J]. Nephrology, 1996, 2(52): S2—S6.

[3] Campbell J J, Hedrick J, Zlotnick A, *et al*. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions[J]. Science, 1998, 279(7): 381—384.

[4] Gesualdo L, Grandaliano G, Ranieri E, *et al*. Monocyte recuritment in cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis: a pathogenetic role for monocyte chemotactic peptide-1[J]. Kidney Int, 1997, 51(1): 155—163.

[5] Prodjosudjadi W, Gerritsma J S J, Van ES L A, *et al*. Monocyte chemoattractant protein-1 in normal and diseased human kidneys: an immunohistochemical analysis[J]. Clin Nephrol, 1995, 44(3): 148—155.

[6] Prodjosudjadi W, Gerritsma J S J, Klar-Mohamad N, *et al*. Production and cytokine-mediated regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by human proximal tubular epithelial cells[J]. Kidney Int, 1995, 48(5): 1 477—1 486.

[7] Rovin B H, Doe N, Tan L C. Monocyte Chemoattractant Protein-1 in patients with glomerular disease[J]. Am J Kidney Dis, 1996, 27(5): 640—646.

[8] 孙 林，叶任高，李幼姬，等. 系膜增殖性肾炎患者生存率的研究[J]. 中华肾脏病杂志，1996, 12(6): 359—361.

[9] Cushing S D, Berliner J A, *et al*. Minimally modified low density lipotein induces monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(13): 5 134—5 138.

[10] Rovin B H, Lefkouith J B, Schreiner G F. Mechanisms underlying the anti-inflammatory effects of essential fatty acid deficiency in experimental glomerulonephritis[J]. J Immunol, 1990, 145(4): 1 238—1 249.

[11] Kees-Folts D, Diamond J R. Relationship between hyperlipidemia, lipid mediators, and progressive glomerulosclerosis in the nephrotic syndrome [J]. Am J Nephrol, 1993, 13(5): 365—370.

[12] Munro J M, Pober J S, Cotran R S. Tumor necrosis factor and interferon-r induce distinct patterns of endothelial activation and associated leukocyte accumulation in skin of papio anubis[J]. Am J Pathol, 1989, 135(11): 121—139.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2001)10-1215-01

个案与短篇

子宫颈牙龈多原发癌 1 例

A case report of multiple primary cancer of uterine cervix and gingiva

吴秀芬，陈世旭，梁后杰 （第三军医大学附属西南院肿瘤科，重庆 400038）

患者，女性，43 岁。因左侧牙龈肿痛半年，子宫颈癌放疗后 21 d 于 2000 年 6 月 15 日入我科。患者于 2000 年 1 月中旬反复出现左上牙龈肿痛，到当地医院予抗炎、止痛治疗，用药不详，疼痛缓解，但牙龈肿胀无好转，未进一步检查及治疗。2000 年 2 月初出现不规则阴道出血，量较大，伴下腹隐痛，4 月 27 日到我院妇产科就诊，确诊为子宫颈腺癌（IV 期）。失去手术时机，2000-04-28— 05-26 到我科行放疗，DT 40 Gy/ 20 次/ 4 周。放疗后，腹痛缓解，阴道出血停止。2000 年 6 月 2 日患者觉左上牙龈肿痛加重，不能咀嚼。2000 年 6 月 14 日到我院口腔科就诊，活检确诊为左上颌牙龈小细胞癌。因查血象白细胞 1.2× 10^9/ L，且经济困难，放弃治疗，自动出院。

讨论

子宫颈癌居妇科肿瘤首位，发病因素尚不明确，主要病理类型为以下三型：①鳞癌，约占 95%；② 腺癌少见，近年有上升趋势；③混合癌[1]。子宫颈小细胞癌[2]。手术与放疗是子宫颈癌的主要治疗手段，对化疗相对抗拒，但对晚期患者，仍需采取综合治疗。牙龈癌在口腔癌中仅次于舌癌居第二位，病理类型多为鳞癌，牙龈小细胞癌尚未见报道。其治疗方法主要是手术，其他均为综合治疗的辅助措施，或仅用作姑息治疗[3]。本病例子宫颈腺癌、左上牙龈小细胞癌均经病理活检组织学确诊，时间间隔 47 d，符合同时发生的多原发癌诊断标准，即两种病理类型不同的癌，发生在两个部位，间隔小于 6 个月[4]。但临床上多原发癌多为非同时发生，其间隔时间可为几个月，亦可长达几年。因此极易误诊为转移癌或复发癌，病理检查是明

（下转 1218 页）

作者简介：吴秀芬(1971—)，女，四川省资阳县人，医师，现在重庆西南铝加工厂职工医院肿瘤科，重庆 401326。电话：(023)65800690

收稿日期：2000-10-15；修回日期：2000-12-20

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