DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.041
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
454 2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)04-0454-03

蛋白激酶亚型在肾小球肾炎中的表达及意义

肖兵民,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 检测蛋白激酶C(Protein kinase C,PKC)的α、β2、ε3种亚型在肾小球肾炎中的表达,并探讨其在发病机制中的意义。方法 应用免疫组织化学技术检测16例系膜增生性肾炎(MsPGN)、12例非增生性肾炎(nonPGN)病人肾穿刺标本及6例正常肾组织中PKCα、2β、ε的表达。结果 MsPGN组肾小球部位PKCβ2表达明显高于nonPGN组($P<0.01$)。结论 PKCβ2与MsPGN的发病密切相关,PKCβ2可能参与了增生性肾小球肾炎的发病机制。

关键词:肾小球肾炎;蛋白激酶C;信号传导
中图法分类号:R345.57;R394.2;R692.31 文献标识码:A

Expressions of protein kinase C subtypes in glomerulonephritis and their significance

XIAO Bing-min, ZHU Miao-zhen (Department of Nephrology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions and significance of protein kinase C (PKC) subtype α, β2 and ε in the pathogenesis of glomerulonephritis. Methods Immunohistochemical assays was used to examine the expressions of PKCα, PKCβ2 and PKCε in biopsy specimens of kidney from patients with mesangial proliferative glomerulonephritis (MsPGN) ($n=16$), nonproliferative golmerulonephritis (nonPGN) ($n=12$), and in structurally normal kidneys ($n=6$). Results The PKCβ2 expression in the glomerular was significantly higher in MsPGN patients than in nonPGN or normal kidney groups. Conclusion PKCβ2 has a close association with MsPGN and might take part in the initiation of this renal disease.

Key words: glomerulonephritis; protein kinase C; signal transduction

蛋白激酶C(Protein kinase C, PKC)是一种钙、磷脂依赖性蛋白磷酸化酶,至少有12种同工酶,广泛存在于人体的各种组织细胞中,有着广泛特异的底物蛋白。PKC活化后,通过底物磷酸化,产生广泛而重要的生理作用。各种因素引起的肾内PKC的激活,可通过多种机制发挥其致病作用[1]。有关PKC亚型在肾小球肾炎中表达的研究报道甚为少见。本实验采用免疫组织化学方法观察PKCα、β2、ε3种亚型在增生性肾小球肾炎肾组织中的表达。试探讨PKC在肾小球肾炎发病机制中的重要作用,以期进一步阐明肾小球发病机制,为临床寻求PKC抑制剂等新的防治手段,提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

兔抗人PKCα、PKCβ2、PKCε单克隆抗体及S-P免疫组织化试剂盒系北京中山公司产品;3,3-二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒系福州迈新公司产品。

1.2 病人及分组

病人来源于大坪医院肾内科1999年5月至2000年2月住院行肾穿刺活检的慢性肾小球肾炎病人28例,均为原发性肾小球肾炎,按1982年WHO拟订的肾小球疾病形态学类标准进行病理诊断分组。病人肾穿刺前无正规激素及免疫抑制剂治疗史。

1.2.1 系膜增生性肾炎(Mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)组 共16例,男性6例,女性10例,年龄从12~51(27.13±9.39)岁。其中轻度系膜增生性肾炎9例,中度系膜增生性肾炎6例,重度系膜增生性肾炎1例。

1.2.2 非增生性肾炎(Nonproliferative golmerulonephritis, nonPGN)组 共12例,男性3例,女性9例,年龄从14~44(31.58±4.51)岁。其中膜性肾病6例,硬化性肾小球肾炎3例,肾小球微小病变3例。

1.2.3 正常对照(Control)组 6例,来自因组织配型不合的供体肾,供肾者均为男性,全部经病理检查证实为正常肾组织。

1.3 肾组织标本的收集及处理

病人肾组织由肾穿刺活检获取。取组织两端部分立即-18 ℃恒冷冰冻切片,厚度10~15 μm,然后以4 ℃丙酮固定10 min,-30 ℃冰箱密封保存,供免疫组织化学染色用。所剩组织置于10%中性福尔马林液中固定,供病理染色用。正常对照组肾组织取自供体肾,石蜡包埋蜡块,同法处理。

1.4 免疫组织化学

常规S-P法免疫组织化学染色,PKCα、β2、ε抗体稀释度为1∶100。

1.5 结果判定

免疫组化的PKC 3种亚型的连续冰冻切片镜下视野中,细胞浆棕黄色染色的细胞为阳性表达细胞,肾小球或肾间质中有阳性细胞的病例判为该类免疫组化的阳性表达病例。

1.6 统计学方法

计数资料用χ^2检验。

作者简介:肖兵民(1970-),男,浙江省淳安县人,硕士,主治医师,主要从事肾小球疾病发病机制方面的研究,现在解放军113医院肾内科,宁波 315040。电话:(023)68757476

收稿日期:2000-06-12;修回日期:2000-11-20

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

2　结果

2.1　PKCα、β2、ε 在肾小球肾炎中肾小球部位的表达

肾小球内 PKCα 在 MsPGN 组可见 1 例表达, 与正常对照组及 nonPGN 组相比差异无显著性($P>0.05$)。肾小球内 PKCβ2 的表达, 在 MsPGN 组, 见图 1, 显著高于正常对照组及 nonPGN 组($P<0.01$); 肾小球内 PKC 在 MsPGN 组、nonPGN 组有少量例数表达, 两组间相比差异无显著性($P>0.05$), 见表 1。

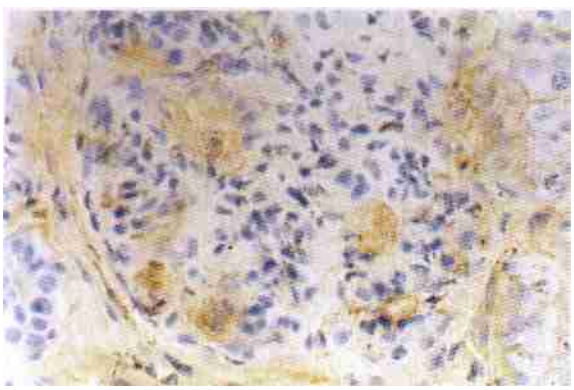


图 1　**MsPGN** 肾小球 **PKC**β**2** 免疫组化阳性表达　(S-P× 400)

Fig 1　The positive expression of PKCβ**2 in glomerular of MsPGN**　(S-P× 400)

表 1　**PKC**α、β**2**、ε 在肾小球部位的表达

Tab 1　Expression of PKCα、β**2**、ε **in glomerular**

Group	*n*	PKCα(+)	PKCβ2(+)	PKCε(+)
Control	6	0	0	0
nonPGN	12	0	2**	2**
MsPGN	16	1	12**##	2**

**: $P<0.01$ *vs* control, ##: $P<0.01$ *vs* nonPGN

2.2　PKCα、β2、ε 在肾小球肾炎中肾小管间质部位的表达

PKCβ2 在 3 组中均无表达。PKCα、ε 在 MsPGN 组及 nonPGN 组均有少量病例表达, 两组间相比差异无显著性($P>0.05$), 见表 2。

表 2　**PKC**α、β**2**、ε 在肾小管间质部位的表达

Tab 2　Expression of PKCα、β**2**、ε **in tubule-interstitial**

Group	*n*	PKCα(+)	PKCβ2(+)	PKCε(+)
Control	6	0	0	0
nonPGN	12	2**	0	2**
MsPGN	16	2**	0	3**

**: $P<0.01$ *vs* control

3　讨论

PKC 是一系列的丝氨酸或苏氨酸蛋白激酶家族, 至少存在 12 种同工酶亚型, 分布于不同的组织及其不同的细胞区域。PKC 在机体对外界刺激产生反应的信号通路中起重要作用。在静止细胞中, PKC 主要以非活性形式存在于胞浆中, 当外界刺激因素作用细胞产生激活因子如二脂酰甘油或钙离子后, 这些激活因子与 PKC 的结合便引起了它的别构效应, 暴露出 ATP 结合位点及其催化结构区, 从而获得磷酸化下游底物蛋白的能力, 导致 PKC 活化。细胞内 PKC 激活后, 可通过多条途径增加其特异性基因的转录。根据分子结构, PKC 可分为 3 大类[2]: ①经典型 PKC, 依赖 Ca^{2+} 和二脂酰甘油的激活, 如 PKCα、β1、β2、ε; ②新型 PKC, 它们的激活仅需二脂酰甘油, 如 PKCδ、ε、η 和 θ; ③非典型 PKC, 不需要 Ca^{2+} 及二脂酰甘油而需要磷脂的激活, 如 PKCλ、μ、τ 和 ζ。PKC 各亚型具有组织分布和功能的特异性, 即不同组织和细胞中所含的 PKC 亚型是不同的, 且不同的 PKC 亚型在不同组织和细胞中所具有生理功能亦不完全相同[3]。肾小球细胞中主要存在 PKCα、β2、ε 和 δ[4,5]。肾小管间质、集合管主要表达 PKCα、δ、η、θ[6]。各种因素引起的肾内 PKC 的激活, 可通过以下等机制发挥其致病作用[1]: ①促进系膜细胞及其他肾脏固有细胞增殖。②促进肾内细胞外基质进行性积聚。③增加肾小球毛细血管通透性。④改变肾小球的血液动力学。

以系膜细胞增殖和系膜区细胞外基质积聚为特征的系膜增生性肾小球肾炎是我国最常见的原发性肾小球疾病和增生性肾小球肾炎的代表性类型。据近年不完全统计, 此类肾炎占我国成人原发性肾小球疾病活检病例的 24.7% ~ 30.3%。有关肾小球肾炎肾组织内 PKC 亚型的表达的报道鲜有。本实验中, 我们选取存在于肾小球部位的 PKCα、β2、ε 3 种亚型, 采用免疫组织化学技术, 检测了它们在 16 例系膜增生性肾小球肾炎, 12 例非增生性肾小球肾炎肾组织中的表达。研究结果发现, 系膜增生性肾小球肾炎肾小球部位 PKCβ2 表达增强, 在肾小管间质部位无 PKCβ2 表达, 与国外有关研究结果相似[7], 提示 PKCβ2 与系膜增生性肾小球肾炎的发病密切相关, PKCβ2 可能参与了增生性肾小球肾炎的发病机制, PKCβ2 依赖途径可能是系膜增生性肾小球肾炎中肾小球细胞增殖及细胞外基质积聚的主要信号转导途径之一。本实验结果, 为我们进一步阐明肾小球肾炎发病机制, 寻找 PKC 抑制剂等抗信号转导药物治疗肾小球疾病提供了初步实验依据。目前 PKCβ 特异性抑制剂 LY333531 已用于实验中治疗糖尿病肾病, 取得了一定疗效。Koya 等[8] 在 STZ 诱导的糖尿病大鼠中发现, 口服 LY333531 两周后可逆转肾小球高滤过, 8 周后可明显降低蛋白尿, 肾小球部位转化生长因子β、Ⅳ型胶原及连接蛋白 mRNA 表达明显下降。但 PKC 各亚型在增生性肾小球肾炎及其他肾脏疾病的发病机制中有何重要作用, 尚需进一步作体内体外实验研究。

参考文献:

[1] Young B A, Johnson R J, Alpers D, *et al*. Cellular events of experimental diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 1995, 47(10): 935—944.

[2] Mellor H, Parker P J, Peter J. The extended protein kinase C superfamily [J]. Biochem J, 1998, 332(Pt2): 281—292.

[3] Azzi A, Boscoboinik D, Hensey D. The protein kinase C family[J]. Eur J Biochem, 1992, 208(4): 547—557.

[4] Goldberg M, Steinberg S F. Tissue-specific developm ental regulation of protein kinase C isoforms[J]. Biochem Pharmacol, 1996, 51(8): 1 089—1 093.

[5] Badrzono T, Kapor-Drezgic J, Dlugosz A, *et al*. Altered expression of di-

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

acylglycerol-sensitive protein kinase C isoforms in diabetic rat glomerular cells[J]. Diabetes, 1998, 47(7): 668—676.
[6] Fukuzaki A, Kaneto H, Ikeda S, *et al*. Characterization of protein kinase C expression in human kidney[J]. Tohoku J Exp Med, 1996, 178(3): 263—269.
[7] Ganz M B, Abu-Nader R, Saxena R, *et al*. Protein kinase C beta II isoform is up-regulated in human proliferative glomerulonephritis[J]. Exp Nephrol, 1997, 5(3): 225—232.
[8] Koya D, Jirousek M R, Lin Y W, *et al*. Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of TGF-β, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats[J]. J Clin Invest, 1997, 100(1): 115—126.

(编辑 王 红)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)04-0456-01

心脏不停跳手术围手术期血浆 MDA、LDH 和 NO 的变化规律及意义

Changes and significance of plasma MDA, LDH and NO in perioperative period of beating heart operation

郝 嘉, 肖 颖彬, 王学锋, 陈 林 (第三军医大学附属新桥医院心血管外科, 重庆 400037)

体外循环(CPB)中氧自由基大量释放能造成心肌细胞损伤。本研究观察了婴幼儿先心病 CPB 不同时期乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)和一氧化氮(NO)的变化规律, 以了解不停跳心脏手术时心肌的损伤情况以便采取针对性措施。

1 材料和方法

血标本采集: 先心病患者 16 例, 男 10 例, 女 6 例, 年龄(3.9±1.2)岁, 体重(13.8±5.5)kg。患儿在 CPB 下行不停跳心内直视手术, 转流时间(53±14)min。于术前、转流 30 min、转流结束、术毕和术后 1 d 采血(血标本均无明显溶血)。

MDA、LDH 和 NO 测定: MDA 和 LDH 采用南京建成试剂盒, MDA 测定采用硫代巴比妥酸法, LDH 测定采用二硝基苯肼法, 用 722 分光光度计分别在 532 nm 和 440 nm 处比色。NO 测定采用我校 NO 试剂盒在酶标仪上测定。结果按公式校正: 校正值 = 测得值× 术前 HCT/ 术后 HCT(HCT 为血球压积)。

统计学分析: 采用单因素方差分析法。

2 结果

单因素方差分析: CPB 开始后 MDA 测定值逐渐升高, 在术后 1 d 达到高峰, 术前、转流 30 min、转流结束、术毕和术后 1 d 测定值分别为(4.7±0.2)、(5.4±0.3)、(6.1±0.5)、(7.0±0.2)和(7.9±0.4) mmol/L。LDH 也逐渐升高, 在手术结束时达到高峰, 其术前、转流 30 min、转流结束、术毕和术后 1 d 的测定值分别为(481.4±44.3)、(941.3±59.4)、(1 232.1±69.5)、(1 380.6±59.9)和(1 091.9±127.9) U/L。NO 在转流停止达到高峰, 它在以上时相点的测定值分别为(0.16±0.03)、(0.22±0.02)、(0.26±0.02)、(0.19±0.02)和(0.15±0.02) μmol/L。3 项指标中除 NO 术后 1 d 组外各组均与术前差异显著($P<0.001$), 组间差异也有显著性。

相关系数显著性检验: MDA 与 LDH 明显相关($r=0.69$), MDA 与 NO 相关($P=0.02$, $r=0.33$); LDH 与 NO 无明显相关。

3 讨论

MDA 反映心肌的脂质过氧化程度, 有学者观察 CPB 术中 MDA 了解氧自由基产生及释放规律, 以探讨心肌缺血再灌注损伤情况[1], 本结果发现 MDA 和 NO 升高, NO 可能是介导心肌细胞损害的原因之一, 它通过心肌脂质过氧化从而使血浆 MDA 升高。有学者用外周血 LDH 反映心肌细胞受损程度[2]。本结果发现术后 LDH 增高并与 MDA 明显相关, 因此 LDH 升高主要是由 NO 等氧自由基引起心肌脂质过氧化损伤后形成的。

自由基 NO 与心肌抑顿有关, 过量 NO 能直接激活细胞膜上蛋白激酶, 增高 cGMP 水平并抑制细胞能量代谢, 特别是在 NO 与 O_2^- 反应形成氧化性极强的 $ONOO^-$, 进一步损伤细胞功能和结构[3], 本研究发现 NO 在转流结束达到高峰后下降, 可能原因是: NO 合成底物耗竭或其转运系统破坏, 炎性细胞释放的大量氧自由基也可以灭活 NO[4], 本研究发现反映脂质过氧化程度的 MDA 与 NO 相关支持该理由, 但也有学者认为 CPB 术后血清 NO 呈下降趋势。

氧自由基是引起以上指标变化的重要原因, 其产生原因是: ①缺血再灌注后心肌组织产生大量的 O_2^-; ②激活 WBC 生成氧自由基; ③吸入高浓度氧及氧合器中血液与纯氧直接接触构成高氧环境使组织产生氧自由基增加。后两者可能是引起氧自由基释放导致心肌损伤的主要因素。

因此, 为更有效地减轻心脏不停跳手术中氧自由基造成的心肌损伤, 根据 NO 变化规律适时使用 NO 拮抗剂、氧自由基清除剂、抑制氧自由基释放药或减少炎症细胞量等措施是很有益的。

关键词: 体外循环; 丙二醛; 乳酸脱氢酶; 一氧化氮
中图法分类号: R619; R541.1 文献标识码: B

作者简介: 郝 嘉(1973—), 男, 四川省荣县人, 硕士, 医师, 主要从事体外循环肺损伤方面的研究 电话: (023)65218768

收稿日期: 2000-02-21; 修回日期: 2000-07-14

参考文献:

[1] 吴锋耀. 体外循环心脏手术病人血浆丙二醛的动态观察[J]. 广西医学, 1996, 18(1): 58—59.
[2] 林丽娜, 王万铁. 体外循环时血浆一氧化氮水平的动态变化[J]. 中华麻醉学杂志, 1997, 17(10): 609.
[3] 李 强, 许霖水. NO 对内毒素血症大鼠胰岛细胞的作用[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(1): 42—44.
[4] 王心怡, 吴淑红. 体外循环中血浆一氧化氮和内皮素水平的动态观察[J]. 中华麻醉学杂志, 1998, 18(2): 84—85.

(编辑 冯崇英)

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