DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.03.021

细胞外基质在人增殖性肾小球肾炎病变中的变化及意义

申海鹰* 朱妙珍 李天星 (第三军医大学附属大坪医院肾内科) 重庆,400042

提 要 目的: 测定肾小球细胞外基质(ECM)中透明质酸(Hyaluronic, HA)、层粘蛋白(Laminin, LN)的含量变化,以探讨其在肾小球硬化机制中的作用。方法: 采用放射免疫法对32例肾小球肾炎患者和15例正常肾组织进行测定。结果: 肾组织中 HA LN和前胶原-3(PC-3)随病变进展明显增加。结论: HA LN和 PC-3与肾小球硬化密切相关。

关键词 增殖性肾小球肾炎;细胞外基质;放射免疫测定

中图法分类号 R692.31

肾小球系膜细胞增殖及肾小球细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)积聚是多种增殖性肾小球疾病的共同病理特征及肾小球硬化、毁损的前奏[1]。明确增殖性肾小球病变过程中 ECM 组分的变化,将有助于揭示肾小球硬化的机制。但现有研究多限于对 ECM 组分的定性或半定量研究,本实验采用放免测定方法,检测了32例增殖性肾小球肾炎(Proliferative glomerulonephritis, PGN)患者和15例正常肾组织中透明质酸(Hyaluronic, HA)、层粘蛋白(Laminin, LN)及前胶原-3(Procollagen type-3, PC-3)这3种 ECM 成分含量,以期为肾小球硬化机制的研究提供资料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例选择 在本院治疗并行经皮肾穿刺活检的 PGN患者32例,包括系膜增殖性肾小球肾炎19例、膜增殖性肾小球肾炎13例(按1982年 WHO肾小球形态学标准分类)[2],其中男性18例、女性14例,平均年龄32.4岁。设正常对照15例,均为肾移植供肾者。

1.1.2 标本采取 患者肾组织由肾穿刺活检获取后,取少部分置液氮保存,备测 ECM成分含量;其余组织行免疫组化及 HE、PAS染色。患者均抽取空腹静脉血,分离血清后保存,备测 ECM含量;正常对照组于取肾标本同时抽血,同法处理。

1.2 方法

1.2.1 肾组织匀浆制备[3] 自液氮中取出肾组织,置60℃~70℃烤箱内烘干,研成粉末、准确称量后加入2.0 ml HAC抽提1 d, 4℃ 10000 r/min离心20 min,取部分上清液按 Lowry法进行蛋白定量。

1.2.2 病理分级[2] 共分为3级: 轻度(11例)为系膜组织轻度增生、毛细血管基底膜无或轻度增厚、管腔无或轻度受压;中度(14例)为系膜组织弥漫增生、毛细血管基底膜增厚管腔受压;重度(7例)为系膜组织高度增生、呈指状及团块状、毛细血管基底膜及管腔明显病变变形。

1.2.3 放免检测 应用上海第二军医大学海军医学研究所提供的 HA LN放免试剂盒,重庆市肿瘤研究所提供的 PC-3放免试剂盒,按说明书操作,测定肾组织及血清中 HA LN、PC-3含量。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用第三军医大学数学教研室编制的医用统计程序包 SPMR进行方差分析、t 检验。

2 结果

2.1 肾组织中 HA LN、PC-3含量变化,见表1

轻度 PGN时,肾组织中 HA含量较正常对照增高($P<0.05$),其余两种 ECM成分与正常相似($P>0.05$);中度 PGN时,肾组织中 HA LN和 PC-3含量均较正常对照显著增高($P<0.01$),重度 PGN时,肾组织中 LN和 PC-3含量增加较正常对照更为显著($P<0.01$),也较轻、中度 PGN明显增加($P<0.05$),重度 PGN组 HA含量虽较正常对照及轻度 PGN组明显增加($P<0.05$),但与中度 PGN组差异不显著($P>0.05$)。

表1 肾组织中 HA LN PC-3含量变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Contents of renal homogenate HA, LN and PC-3 in control and patients ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	PC-3 (μg/g protein)	HA (μg/g protein)	LN (μg/g protein)
Control	15	406.07±76.98	213.23±52.01	246.75±59.34
Mild	11	561.01±67.75	287.09±43.89*	302.04±63.76
Moderate	14	946.25±103.16**	439.93±47.87**	494.41±61.69**
Severe	7	1319.17±160.56**#△	453.29±52.01**#	715.35±81.34**#△

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control;
#: $P<0.01$ *vs* mild; △: $P<0.05$ *vs* moderate

* 申海鹰,男,30岁,主治医师,硕士

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

2.2 血清中 HA、LN、PC-3含量变化,见表 2

血清中 HA含量,在正常对照及不同程度病变的 3个 PGN组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$);前 PC-3血清含量变化亦然。3个病变组 LN含量均显著高于正常组 ($P < 0.05$),但各病变组间差异不显著 ($P > 0.05$)。

表 2 血清中 HA、LN、PC-3含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Contents of serum HA, LN and PC-3 in control and patients ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	PC-3 (ρ_B / $\mu g \cdot L^{-1}$)	HA (ρ_B / $\mu g \cdot L^{-1}$)	LN (ρ_B / $\mu g \cdot L^{-1}$)
Control	15	109.40± 18.81	100.33± 13.82	62.73± 10.69
Mild	11	127.56± 35.61	103.59± 21.45	119.6± 36.14*
Moderate	14	131.72± 31.78	94.36± 19.83	142.64± 36.49*
Severe	7	123.43± 24.08	98.72± 25.01	138.79± 33.46*

* : $P < 0.05$ *vs* control

3 讨论

系膜细胞增殖及系膜 ECM积聚,作为多种增殖性肾小球疾病的共同病理特征和肾小球硬化的前奏已为人们公认[1,4]。在 ECM积聚过程中,胶原蛋白以胶原纤维形式发挥作用,蛋白多糖则形成无定形基质填充于前者之间,各种粘连糖蛋白则在纤维与细胞之间介导两者的相互粘连。PC-3、HA和 LN分别作为胶原、蛋白多糖及粘连糖蛋白者 3种 ECM成分的代表,在肾小球 ECM积聚过程中,量及次序性的变化不尽相同[4,5]。HA变化早而明显,在轻度肾小球病变时即开始出现肾组织 HA含量增多,而此时 LN和 PC-3的变化并不显著。随后,在肾小球中度病变时,可以观察到除 HA水平在肾组织中进一步升高外,LN水平也开始升高。有报道 LN的变化通常与 4、5型胶原等同步,此时可有 1、3型间质胶原的存在[5]。本实验表明:肾小球中、重度病变时,HA、LN及间质胶原 PC-3 3者水平均有不同程度的增高,尤其 PC-3的增高最为明显,显著高于中度病变时 ($P < 0.05$)。值得注意的是:在重度病变时,HA水平并未进一步增高,是否与硬化形成后期蛋白多糖逐渐消失,为胶原填充有关。上述结果表明:随着 ECM增生扩张的进展,各正常 ECM组分的过量积聚与肾小球硬化密切相关,同时,3型胶原等间质胶原亦逐渐参与其中,并在病程后期起着主导地位。有人认为:1、3型间质胶原合成的启动和增多可以正反馈促进 MC合成 ECM成分,从而加快硬化进程,通常认为间质胶原出现与 Bowman's囊断裂、成纤维细胞进入肾小球[5,6],或者当 MC受到某些病理刺激后分泌表型发生改变,而具有产生间质胶原的能力有关[5,7]。肾小球上皮细胞,尤其系膜细胞在系膜 ECM积聚中起着重要作用,一方面,MC在病理刺激下可过度合成 ECM;另一方面,过度积聚的 ECM可导致系膜清除功能障碍,使进入系膜区的致病因子不能及明清除;同时 ECM通过 MC膜上特异性受体整合素结合,进一步调控细胞增殖、分化和物质合成,引起细胞功能异常,加重肾脏损害,而间质胶原的出现使系膜基质特性和功能发生改变,还可刺激 MC合成其它 ECM成分[8],加之系膜 ECM中缺乏间质胶原特异的胶原酶,所以更进一步加剧了 ECM积聚,加速肾小球硬化的发展。另外,本研究还对增殖性肾炎时血清中 3种 ECM成分水平进行了初步探讨,结果发现:与肾组织含量改变不同,血清 HA、LN和 PC-3变化与肾小球病变间关系似乎不尽密切。HA和 PC-3水平与病变无关 (各组间 $P > 0.05$),而血清 LN水平则在各病变组中均增高,但与病变程度无关。因临床上血清 LN水平可受到多种因素如:肝病,结缔组织病的影响[9],故其应用价值尚需进一步观察和证实,尽管如此,其仍不失为一种具有潜在临床应用价值的检测指标。

参考文献

1 Rosenblum N D. The mesangial matrix in normal and sclerotic glomerulus. Kidney Int, 1994; 45(Suppl 45): S73

2 邹万忠 主编.肾脏病理与临床.长沙:湖南科学技术出版社,1993.255~289

3 周春华,章友康,王海燕等.肾小球硬化及老年肾细胞外基质的变化研究.中华肾脏病杂志,1994;10(3):152

4 Fogo A. Internephron heterogeneity of growth factor and sclerosis. Kidney Int, 1994; 45(Suppl 45): S45

5 Floege J, Jonhnson R T, Gordon K *et al*. Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis. Kindney Int, 1991; 40(3):477

6 Oomura A, Nakamura T, Arakawa M *et al*. Alterations in the extracellular matrix components in human glomerular disease. Virchows Archiv A Pathol Anat, 1989; 415(1): 151

7 Yoshioka K, Takemura T, Tohda M *et al*. Glomerular localization of type 3 collagen in human kidney disease. Kidney Int, 1989; 35(5): 1203

8 Kashgarian M, Sterzel R B. The pathology of mesangium. Kidney Int, 1992; 41(3): 524

9 Plebani M, Burlina A. Biochemical markers of hepatic fibrosis. Clin Biochem, 1991; 24(3): 219

(收稿:1997-07-20;修回:1998-01-05)

(编辑 刘 鹏)

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

Changes of extracellular martix in human proliferative glomerulonephritis and its significance

Shen Haiying, Zhu Miaozhen, Li Tianxin (Department of Nephrology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objcetive: To measure the contents of Hyaluronic (HA), Laminin (LN) and Procollagen type-3 (PC-3) in the extracellular matrix and to explore its effects in the mechanism of glomerulus cirrhosis. Methods: Thirty two proliferative glomerulonephritis patients and 15 cases of normal renal tissues were mesaured with radioimmunoassay. Results: HA, LN and PC_3 significantly increased. Conclusion: HA, LN and PC-3 play important roles in the mechanism of glomerulus cirrhosis.

Key words proliferative glomerulonephritis; extracellular martrix; radioimmunoassay

(上接 230)

1.3 标本收集与测定

按常规方法,行纤维支气管镜肺泡灌洗(BAL)。灌洗选择病人右肺中叶或左肺舌叶,需避开肺部病变区域。用消毒生理盐水 40 ml~ 60 ml,分 2~ 3次行肺泡灌洗。同时,抽取受检者静脉血 2 ml(不抗凝)送检。

把上述血液和 BALF标本,用 Weters810高压液相色谱仪分别测出每个标本中头孢克肟的含量;同时,用常规方法测定 BALF中蛋白含量,整个过程采用双盲法,数据经计算机处理。

2 结果

两组 BALF中头孢克肟和蛋白含量和两组病例血浆头孢克肟水平,见附表。以上数据应用 SPLM软件进行统计学分析。结果 BALF中头孢克肟含量两组差异显著($P < 0.05$),其蛋白含量和头孢克肟血浆浓度两组差别不显著($P > 0.05$);BALF中单位蛋白头孢克肟含量,两组差异显著($P < 0.05$)。说明实验组 BALF的单位蛋白头孢克肟含量较对照组高,且增高达 72.79%。BALF中蛋白含量对此结果无影响,实验组 BALF中单位蛋白头孢克肟含量,两组差异显著($P < 0.05$)。说明实验组 BALF的单位蛋白头孢克肟含量较对照高。

附表　**BALF**和血浆中头孢克肟和蛋白水平及其比值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	支气管肺泡灌洗液			血浆
		头孢克肟	蛋白含量	头孢克肟/蛋白	头孢克肟
对照组	8	0.086± 0.045	0.54± 0.220	0.225± 0.246	0.908± 0.676
实验组	12	0.148± 0.055*	0.370± 0.321	1.882± 0.205*	0.686± 0.389

*: $P < 0.05$ 与对照组比较

3 讨论

抗生素的治疗效果,取决于抗生素在感染局部的浓度和病原菌对抗生素的敏感性。本研究观察发现,溴环胺己醇与头孢克肟联合用药,可提高 BALF中头孢克肟水平,而对头孢克肟的血浆浓度无影响。其机制,可能与以下因素有关:① 由于本两组血浆头孢克肟水平差异不大,不能用抗生素的主动扩散解释。而两组 BALF中单位蛋白头孢克肟含量,仍是实验组的比值高于对照组 8.3倍。Braude[4]认为这种单位蛋白含量更能反应药物在肺组织中的实际浓度。由此 BALF中头孢克肟水平与 BALF中蛋白含量无关,而与溴环胺己醇有较密切的关系。② 溴环胺己醇是一种粘液溶解剂,它可以改变肺泡膜的结构和功能,增加Ⅱ型肺泡细胞和表面活性物质的合成[2,5,6]。同时,它还能使肺泡膜变薄,肺泡毛细血管扩张,血流速度加快,有利于头孢克肟向肺泡内渗透。

此外,有人认为[7,8]溴环胺己醇可以:① 抑制支气管粘膜腺体及杯状细胞中酸性粘多糖的合成,裂解痰液中的酸性粘多糖纤维,以此降低痰液粘稠度,有利于痰液排出体外;② 提高支气管粘膜上微纤毛运动及排送能力,加强了呼吸道的廓清作用。综上所述,我们认为溴环胺己醇与头孢克肟联合应用,可以提高头孢克肟穿过血-肺屏障的能力,从而增加肺组织局部头孢克肟的浓度,有利于肺部的抗感染治疗。

关键词　溴环胺已醇;头孢克肟;支气管肺泡;灌洗液
中图法分类号　R563.1

参考文献

1 Wiemeyer J C M. The mucolytic drug ambroxol induces an increase in amoxicillin concentration in lung tissue of rats. Arzneim-Forsch/Drug Res, 1981; 31(1): 974
2 Gene J J, Poderoso J C M, Corazza M B *et al*. Influence of ambroxol on amoxicillin levels in bronchoalveolar lavage fluid. Arzneim Forsch/Drug Res, 1987; 37(11): 967
3 Spatola J J, Poderoso J C M, Wiemeyer M *et al*. Influence of ambroxol on lung tissue penetration of amoxicillin. Arzneim Forsch/Drug Res, 1987; 37(11): 965
4 Braude A C, Hornstein A, Klein M *et al*. Pulmonary Disposition of tobramycin. Am Rev Resp Dis, 1983; 127: 563
5 Mira E, Benazzo M, Manzoni M *et al*. Effect of ambroxol on rabbit eustaxhian tube surfactant. ORL J Otorhinolaryngol Elat Spec, 1992; 54(3): 130
6 Uchida M, Noguchi Y, Ara Kawa R *et al*. Effects of ambroxol HCl on the guinea pig tracheal mucous secretion and the rat pulmonary surfactant secretion. Nippon Yakurigaku Zasshi, 1992; 100(4): 293
7 Michnar M, Milanowski J. Clinical evaluation of efficacy and tolerance of oral treatment with ambroxol in patients with chronic bronchitis. Pneumonol Alergol Pol, 1996; 64 (Suppl): 90
8 Bellussi L, Passali D. Tratment of upper airways inflammation with nimesulide. Drugs, 1993; 46(Suppl 1): 107

(收稿: 1997-10-04;修回: 1998-05-04)
(编辑　冯崇英)

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