

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.19.003

文章编号: 1005-8982(2017)19-0012-05

IgA 肾病大鼠肾组织中 T 细胞免疫球蛋白与黏蛋白域基因 1 的表达和意义*

王纓, 胡贵荣, 李弼民

(南昌大学第一附属医院 肾内科, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 观察 IgA 肾病(IgAN)大鼠肾组织中 T 细胞免疫球蛋白与黏蛋白域基因 1(TIM-1)的表达, 探讨 TIM-1 在 IgAN 大鼠发病中的作用。**方法** 20 只雄性 SD 大鼠随机分成 IgAN 模型组和对照组, 每组 10 只。在复制模型完成后处死大鼠, 取肾脏, 肾组织切片行 PAS 染色, 免疫荧光观察大鼠肾脏病理变化, 并行免疫组织化学法检测肾组织中 TIM-1 的表达, 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 TIM-1 mRNA 的表达。**结果** IgAN 组 TIM-1 主要分布在肾小球和肾小管, 表达量较对照组增加($P < 0.05$)。IgAN 组肾组织中 TIM-1 mRNA 表达量均较对照组升高。TIM-1 mRNA 相对表达量和肾脏病理 Katakuchi 评分呈正相关, 且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** TIM-1 可能参与了 IgAN 的发生发展。

关键词: 肾小球肾炎; IgA; T 细胞免疫球蛋白与黏蛋白域基因 -1

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Expression of TIM-1 in renal tissue of IgAN rats and significance*

Ying Wang, Gui-rong Hu, Bi-min Li

(Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University,
Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-1 (TIM-1) in rats with IgA nephropathy (IgAN), and to explore the role of TIM-1 in the pathogenesis of IgAN. **Methods** Twenty male SD rats were randomized into two groups, i.e. IgAN model group (10 rats) and control group (10 rats). The rats were sacrificed after the completion of building the model and the kidneys were obtained. The pathological changes of the rat kidneys were observed after PAS and immunofluorescence staining. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of TIM-1 protein and RT-PCR was used to measure the expression of TIM-1 mRNA in the renal tissue. **Results** TIM-1 expression in the IgAN group mainly distributed in glomeruli and renal tubules, the expression levels of TIM-1 mRNA and protein significantly increased in the IgAN group compared with those in the control group ($P < 0.05$). A positive correlation was found between the expression quantity of TIM-1 mRNA and Katakuchi score ($r = 0.846, P < 0.05$). **Conclusions** TIM-1 may be involved in the occurrence and development of IgAN.

Keywords: IgAN; T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-1 (TIM-1); rat

IgA 肾病(IgA Nephropathy, IgAN)是目前最常见的原发性肾小球疾病之一, 目前国际上尚无广泛被认同的 IgAN 发病机制, 其中机体免疫功能障碍,

多种细胞因子和炎症介质分泌异常被认为是 IgAN 发病的重要因素。T 细胞亚群分化异常在多种自身免疫疾病发病中渐被阐明证实, Th1/Th2 失衡与

收稿日期: 2016-12-20

* 基金项目: 江西省自然科学基金(No: 20142BAB205006); 江西省教育厅科学技术研究项目(No: 14005)

[通信作者] 李弼民, E-mail: lbnjx@163.com

IgAN 相关性也已开始受到重视。T 细胞免疫球蛋白与黏蛋白域 (T-cell immunoglobulin domain and mucin domain, TIM) 基因家族共同编码具有多种生物活性的 I 型跨膜糖蛋白,广泛表达并参与多种 T 细胞介导的各类免疫反应。其中,T 细胞免疫球蛋白与黏蛋白域基因 1 (TIM-1) 与其天然配体 T 细胞免疫球蛋白与黏蛋白域基因 4 (TIM-4) 特异性结合共刺激 T 细胞增殖,调节 Th1/Th2 细胞的平衡^[1]。综上所述,Th1/Th2 失衡参与 IgAN 发病,而 TIM-1 信号通路可调控多种 T 细胞亚群免疫功能,调节 T 细胞平衡,那么在肾脏组织中 TIM-1 的表达如何? 本研究通过复制 IgAN 大鼠模型,观察 IgAN 大鼠肾组织中 TIM-1 的表达,初步探讨 TIM-1 在 IgAN 中的作用与机制。

1 材料与方法

1.1 动物

20 只 SPF 级 SD 大鼠,均为雄性,体重 180 ~ 200 g。购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。按标准饲养条件。

1.2 动物模型的复制及分组

20 只大鼠按随机数字表法分为正常对照组 ($n=10$) 和模型组 ($n=10$)。模型组:牛血清白蛋白(美国 Sigma 公司)按 400 mg/kg 隔日灌胃,至复制模型结束共 9 周;在第 6 周和第 8 周末通过尾静脉注射脂多糖(美国 Sigma 公司),0.05 mg/(只·次);每个周末通过皮下注射四氯化碳 CCl₄ (美国 Sigma 公司),每只每次蓖麻油 0.5 ml+CCl₄ 0.1 ml,共 9 周;在相同时间给予正常对照组等体积蒸馏水灌胃,同体积

生理盐水皮下注射及同等量的生理盐水尾静脉注射。

1.3 取材及标本处理

实验第 9 周复制模型完成后,采用 3%戊巴比妥麻醉大鼠迅速游离肾脏,放入 10%中性甲醛固定后用石蜡进行包埋,留待行光镜检查及免疫组织化学检查,另一部分放入 -80℃ 保存备用。

1.4 免疫组织化学法检测肾组织 TIM-1 的表达

采用 SP 法检测 TIM-1 (英国 Abcam 公司),阳性组织呈棕色,半定量结果分析采用 Image pro-plus 6.0 图像采集软件,每张切片随机采集 20 个视野 (10× 物镜),用 Image pro-plus 6.0 图像分析软件对每个视野进行分析,其阳性染色面积 / 视野总面积即为免疫组织化学阳性目标的强度。

1.5 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测大鼠肾脏组织中 TIM-1 mRNA 表达

提取细胞总 RNA,参照 cDNA 试剂盒 (AE301-02,北京全式金生物技术有限公司) 说明书合成 cDNA。采用大连宝生物有限公司 PCR 反应试剂盒进行 PCR 扩增。反应条件为 95℃ 5 s,60℃ 30 s,95℃ 15 s,60℃ 1 min,60℃ 15 s (退火温度及循环周期依据引物和 PCR 产物而定)。所有引物序列均由 Invitrogen 公司合成。引物序列见表 1。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件对实验结果进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,IgAN 模型组和正常对照组比较采用 *t* 检验,对 IgAN 模型组的 TIM-1 表达与临床、病理资料进行 Pearson 相关性分析, $P < 0.05$ 时差异为差异有统计学意义。

表 1 qRT-PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	长度 /bp
TIM-1	正向引物:AGAGTCTGCACCTCCAGTGA;反向引物:CTGTATCCCGTCTGTGAGGC	161
β -actin	正向引物:TCAGGTCATCACTATCGCAAT;反向引物:AAAGAAAGGGTGTAAAACGCA	209

2 结果

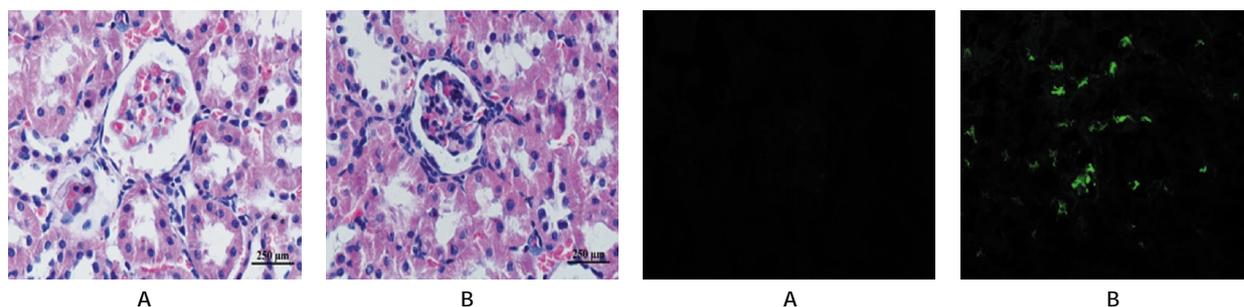
2.1 肾脏病理结果

光镜组织学见正常对照组肾小球系膜细胞无明显细胞增多,基质无明显增生,毛细血管襻开放,肾小管未见明显异常,肾间质未见明显增生,无炎症细胞浸润;模型组在肾小球内可见明显的系膜细胞增多,系膜基质中到重度增生,毛细血管管腔狭窄,肾间质内可见明显的炎症细胞浸润,并可见肿胀变性

的肾小管上皮细胞。免疫荧光:正常对照组未见 IgA 沉积,模型组可见团块状或颗粒状绿色 IgA 荧光。见图 1。

2.2 两组大鼠临床指标比较

IgAN 模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量高于正常对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),IgAN 模型组大鼠血清白蛋白较正常对照组则下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),两组血肌酐相比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。



A: 正常对照组, B: IgAN 模型组

图 1 两组大鼠肾脏病理学改变

表 2 两组大鼠 24 h 尿蛋白定量、血清白蛋白及肾功能的比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	24 h 尿蛋白定量 /g	血清白蛋白 / (g/L)	血肌酐 / ($\mu\text{mol/L}$)
正常对照组	4.321 ± 0.498	36.217 ± 0.783	39.254 ± 8.433
IgAN 模型组	8.744 ± 1.942 [†]	20.940 ± 1.779 [†]	42.32 ± 8.670
t 值	-6.721	7.734	-0.073
P 值	0.003	0.004	0.951

注: † 与正常对照组同时期相比, $P < 0.05$

2.3 两组大鼠肾脏病理损伤Katafuchi 评分

每张 HE 染色切片取任意 5 个高倍镜 ($\times 40$) 视野, 每个视野取任意 2 个小球和 2 个小管, IgAN 模型组和正常对照组的 Katafuchi 评分分别为 (6.303 ± 1.949) 和 (1.301 ± 0.823), 差异有统计学意义 ($t = 9.682, P = 0.000$), IgAN 模型组高于正常对照组。

2.4 两组大鼠肾脏 TIM-1 的表达

正常对照组仅在肾小管上皮细胞中可见少量 TIM-1 阳性表达, 而 IgAN 模型组阳性表达较正常对照组增多, 广泛分布在肾小球细胞核和肾小管上皮细胞核, 见图 2; IgAN 模型组和正常对照组的 TIM-1 定量积分分别为 (7.519 ± 1.580) 和 (1.036 ± 0.824), 差异有统计学意义 ($t = -11.551, P = 0.000$), IgAN 模型组高于正常对照组。

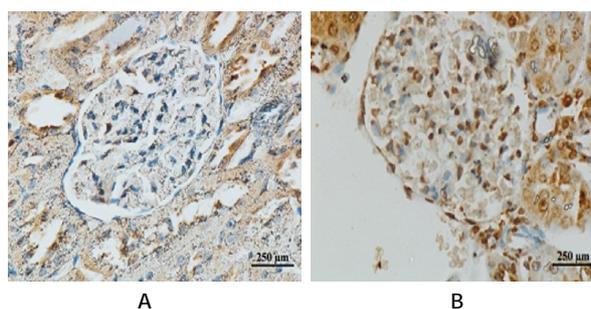
2.5 两组大鼠肾脏 TIM-1 mRNA 的表达

qRT-PCR 检测结果显示, IgAN 模型组和正常对照组的 TIM-1 mRNA 的相对表达量分别为 (2.033 ± 0.784) 和 (0.830 ± 0.209), 差异有统计学意义 ($t = 4.532, P = 0.001$), IgAN 模型组高于正常对照组。

2.6 TIM-1 表达与各个临床及病理指标间的相关性分析

采用双变量 Pearson 相关性分析法, 可见 IgAN 模型组大鼠肾脏 TIM-1 mRNA 相对表达量与 TIM-1 半定量积分呈正相关 ($r = 0.481$) (见图 3), 分

别分析 IgAN 模型组大鼠肾脏 TIM-1 mRNA 相对表达量和 24 h 尿蛋白定量、血清白蛋白变化、肾脏病理损伤 Katafuchi 评分及 TIM-1 半定量积分的相关性。结果见表 3、图 3。在 IgAN 模型组中, TIM-1 mRNA 相对表达量与 24 h 尿蛋白的变化呈正相关, 与血清白蛋白变化呈负相关, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); TIM-1 mRNA 相对表达量和肾脏病理 Katafuchi 评分呈正相关 ($r = 0.846$), 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



A: 正常对照组; B: IgAN 模型组

图 2 两组大鼠肾脏 TIM-1 的表达

表 3 TIM-1 mRNA 与 24 h 尿蛋白、血清白蛋白及肾脏病理损伤 Katafuchi 评分相关性分析

临床及病理指标	r	P 值
24 h 尿蛋白定量	0.581	0.080
血清白蛋白	-0.439	0.203
肾脏病理损伤 Katafuchi 评分	0.846	0.006

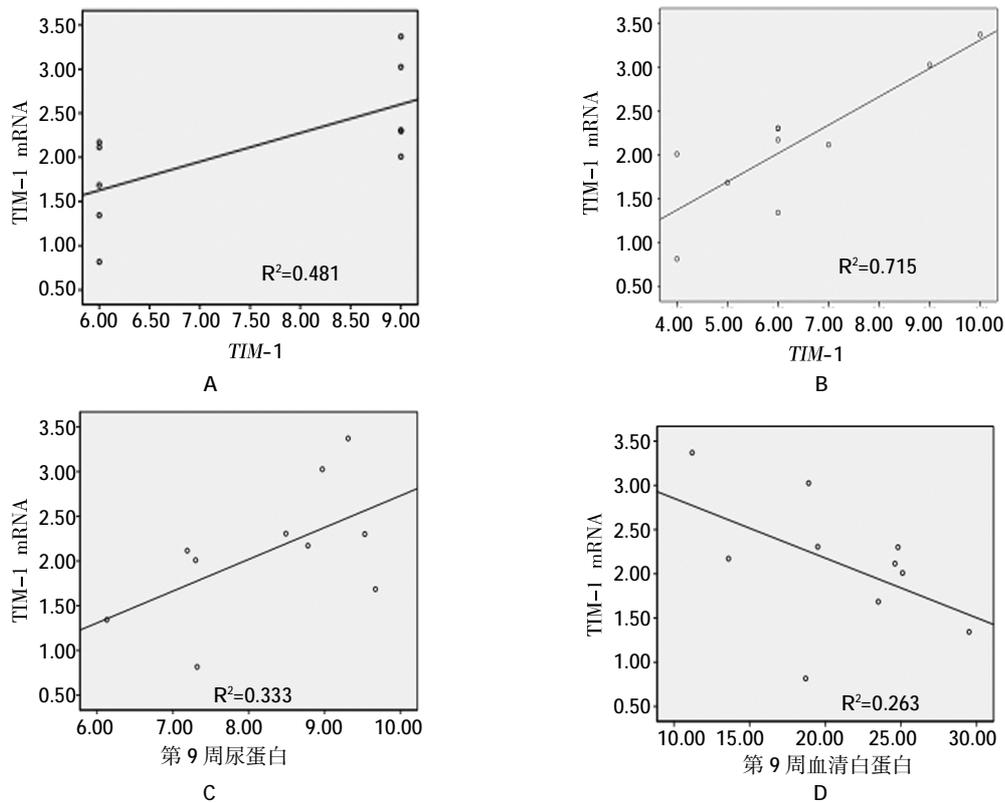


图 3 TIM-1 mRNA 与 24 h 尿蛋白、血清白蛋白及肾脏病理损伤 Katakuchi 评分相关性

3 讨论

目前国际上尚无广泛被认同的 IgAN 发病机制,其中机体免疫功能障碍,多种细胞因子和炎症介质分泌异常被认为是 IgAN 发病重要因素。T 细胞亚群分化异常在多种自身免疫疾病发病中渐被阐明证实, Th1/Th2 失衡与 IgAN 相关性也已开始受到重视。早在上世纪 90 年代年 ANDRE 等^[2]已经检测到大部分 IgAN 患者肾小球系膜区均有 IgA1 分子高表达,而过量 IgA1 需要由成熟 B 细胞在 Th2 细胞或病毒抗原的刺激下才能生成。人们还发现自发性产生 IgAN 的 ddY 小鼠幼鼠为 Th1 优势,但成年小鼠却呈现 Th2 优势、血清 IgA 水平升高, NOGAKI 等^[3]由此提出 Th1/Th2 失衡与 IgA 的分泌水平相关, Th2 优势时分泌过量 IL-4、IL-6 等细胞因子, IL-4 和 IL-6 不仅正反馈 Th2 过度分化,还同时刺激 B 细胞活化、增殖,并增加抗体分泌,可能在促进 IgAN 的发病中占据重要地位。肖俊等^[4]发现 IgAN 较正常人外周血中 IFN- γ 表达减少,而 IL-4 比例升高, Th1/Th2 比值下降并与血 IgA 水平成正比,证实了 IgAN 患者外周血中 Th1/Th2 失衡向 Th2 偏倚。近年来,参

与自身免疫性疾病的发病的 Treg/Th17 细胞平衡在 IgAN 患者向 Treg 有所偏倚也渐受重视, LIN 等^[5]证实了其肾脏组织 Foxp3 表达上调、而致炎因子 IL-17A 的表达减少,尽管在血清中 IL-17A 表达有所升高。

21 世纪初 MCINTIRE 等^[6]在分析人类染色体 5q23-35 基因与哮喘的易感性时,在染色体 5q33.2 上识别出一个基因的主要序列编码完全背离了控制气道高反应性的 TAPR 调节器,且与人类甲肝病毒 (HAV)受体同源,首次将其命名为 TIM-1。TIM 家族在小鼠有 8 个基因 (TIM-1 至 TIM-8),其中 TIM-5 至 TIM-8 为有待证实序列的预测基因,在人类发现有 3 个: TIM-1 (Havcr1)、TIM-3 (Havcr2)、TIM-4^[7]。小鼠和人类 TIM 基因编码区分别位于染色体 11b1.1 和 5q33.2 上,这两处染色体区在人类基因图谱中被证实为与过敏性和自身免疫性疾病易感性相关,中国地区的儿童哮喘等的发病有可能也同 TIM-1、TIM-3、TIM-4 的基因多态性存在一定联系^[8]。T 细胞免疫球蛋白和黏蛋白基因家族编码的跨膜糖蛋白具有多种生物活性,各自表达于 T 淋巴细胞、APC 等

不同细胞表面,主要参与调节 T 辅助细胞介导的各种免疫反应,其中, *TIM-1* 与其天然配体 *TIM-4* 特异性结合,共刺激 T 细胞增殖,可调节多种效应性 T 细胞的表达,影响 Th1/Th2 细胞的平衡^[9],而 Th1/Th2 失衡,Th0 分化向 Th2 偏倚,在调节 Th2 反映中起重要作用。研究证实在 Henoch-Schonlein purpura 患者外周血单核细胞中 Th2 占优势且 *TIM-1* mRNA 的表达上调,并与血清 IgA1 和 IL-4 分子水平呈正相关^[9]。在有关哮喘小鼠模型中发现 *TIM-1* 介导免疫反应,当给予抗 *TIM-1* 抗体后可减少气道黏液高分泌,且 IL-4 表达下调,说明 *TIM-1* 通过调节 Th2 细胞,参与了气道高反应^[10]。

1998 年,ICHIMURA 等^[11]又将其命名为肾损伤分子 1(kidney injury molecule-1, *KIM-1*),因在缺血再灌注大鼠模型中确定该分子的高度表达与肾小管损伤程度相关。*KIM-1* 是人们发现的首个非骨髓源性清道夫受体,由肾小管上皮细胞表达,并参与肾小管中凋亡细胞的吞噬清除和诱导淋巴细胞浸润。*KIM-1* 在近膜端释放出细胞外区并溶于尿液,由于在健康肾脏中几乎不表达,尿液 *KIM-1* 联合中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)、IL-8、半胱氨酸酶抑制剂 Cysc 等的检测等可以作为急性肾缺血性损伤、慢性肾脏病等各类肾损伤的诊断及预后标志。NOZAKI 等^[12]发现 *TIM-1* 增强新月体性肾小球肾炎 T 细胞免疫应答,并促进细胞介导的肾脏损害。在顺铂诱导的急性肾损伤模型中的研究发现,运用 *TIM-1* 抗体后肾脏 NF- κ B 的表达及促炎因子、趋化因子的表达下降,而且肾脏的免疫炎症反应也受到抑制^[13]。人们在 IgAN 发病中对 *TIM-1* 的研究还比较少,本研究中观察到 IgAN 大鼠肾脏 *TIM-1* mRNA 的表达上调,与肾脏病理组织学损伤程度呈正相关,差异有统计学意义;同时观察到 IgAN 大鼠肾脏 *TIM-1* mRNA 的表达上调与 24 h 尿白蛋白定量呈正相关,与血清白蛋白呈负相关,但可能因为样本量过小或检验方法的局限性,相关性分析结果差异无统计学意义,推测 *TIM-1* 可能一定程度参与大鼠 IgAN 的发病及进展。

Th1/Th2 和 Treg/Th17 失衡均参与 IgAN 发病,而 *TIM-1* 信号通路可调控多种 T 细胞亚群免疫功能,调节 T 细胞平衡,究竟 *TIM-1* 在 IgAN 的免疫发病机制中如何发挥作用,是否通过调控 Th1/Th2、

Treg/Th17 参与 IgAN 发病? 这将是下一步的研究方向。

参 考 文 献:

- [1] DEGAUQUE N, MARIAT C, KENNY J, et al. Regulation of T-cell immunity by T-cell immunoglobulin and mucin domain proteins[J]. *Transplantation*, 2007, 84(Suppl 1): S12-16.
- [2] ANDRE P M, LE POGAMP P, CHEVET D, et al. Impairment of jacalin binding to serum IgA in IgA nephropathy [J]. *J Clin Lab Anal*, 1990, 4(2): 115-119.
- [3] NOGAKI F, MUSO E, KOBAYASHI I, et al. Interleukin 12 induces crescentic glomerular lesions in a high IgA strain of ddY mice, independently of changes in IgA deposition [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15(8): 1146-1154.
- [4] 肖俊,曹春瑜,周静,等. IgAN 患者外周血 Th1、Th2、Th3 细胞水平的变化及意义[J]. *实用临床医学*, 2012, 13(12): 28-31.
- [5] LIN F J, JIANG G R, SHAN J P, et al. Imbalance of regulatory T cells to Th17 cells in IgA nephropathy[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2012, 72(3): 221-229.
- [6] MCINTIRE J J, UMETSU S E, AKBARI O, et al. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(12): 1109-1116.
- [7] KUCHROO V K, UMETSU D T, DEKRUYFF R H, et al. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(6): 454-462.
- [8] WU Q W, CAI P C, WANG L, et al. Family-based association study of Tim-1 and Tim-3 gene polymorphisms with childhood asthma in Chinese trios[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2009, 150(3): 252-260.
- [9] YUAN L P, LING L, BO H. T cell immunoglobulin and mucin-domain containing molecule 1 in peripheral blood mononuclear cells in Henoch Schonlein purpura[J]. *Indian Pediatr*, 2012, 49(3): 225-227.
- [10] 强丽霞,金寿得,唐昊,等. *TIM-1* 对哮喘小鼠气道 MUC5AC 及 Th2 细胞因子表达的影响 [J]. *第二军医大学学报*, 2012, 33(6): 581-584.
- [11] ICHIMURA T, BONVENTRE J V, BAILLY V, et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(7): 4135-4142.
- [12] NOZAKI Y, NIKOLIC-PATERSON D J, SNELGROVE S L, et al. Endogenous Tim-1 (Kim-1) promotes T-cell responses and cell-mediated injury in experimental crescentic glomerulonephritis[J]. *Kidney Int*, 2012, 81(9): 844-855.
- [13] NOZAKI Y, NIKOLIC-PATERSON D J, YAGITA H, et al. Tim-1 promotes cisplatin nephrotoxicity[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 301(5): 1098-1104.

(张西倩 编辑)