

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.09.012

文章编号: 1005-8982(2017)09-0059-05

IgA 肾病肾组织中 OPN、TGF- β_1 的表达 及其与临床、病理的关系*

李海剑¹,程根阳²,刘慧³,李亦彤⁴,陶雅非¹,王建刚¹,李玉东³

(1.郑州大学附属南阳市中心医院 肾病风湿免疫科,河南 南阳 473009;2.郑州大学第一附属医院 肾内科,河南 郑州 450052;3.郑州大学附属南阳市中心医院 心内科,河南 南阳 473009;
4.华中科技大学同济医学院 第一临床学院,湖北 武汉 430030)

摘要:目的 探讨免疫球蛋白 A (IgA) 肾病肾活检组织中骨桥蛋白 (OPN)、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 的表达及其与临床指标及组织病理的关系。**方法** 应用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法测定 60 例 IgA 患者,30 例微小病变肾病 (MCD) 患者及 20 例正常肾组织肾组织中 OPN、TGF- β_1 。同时测定各组血肌酐、肌酐清除率、24 h 尿蛋白定量水平,应用 Haas 分型标准和 Katarfuchi 分级对 IgA 患者进行病理评价,并分析肾组织 OPN、TGF- β_1 与临床指标及病理的关系。**结果** IgA 肾病组 Haas 各分型 (I~V 型) 血肌酐、24 h 尿蛋白定量及肾组织中 OPN、TGF- β_1 表达水平高于 MCD 对照组和健康对照组 ($P<0.05$),而肌酐清除率低于 MCD 对照组和健康对照组 ($P<0.05$),其中 Haas 分型中 IV 和 V 型肾组织中 OPN、TGF- β_1 表达高于 I、II 和 III 型 ($P<0.05$)。IgA 肾病组 Katarfuchi 分级 (0~III 级) 血肌酐、24 h 尿蛋白定量及肾组织中 OPN、TGF- β_1 表达水平高于 MCD 对照组和健康对照组 ($P<0.05$),肌酐清除率低于 MCD 对照组和健康对照组 ($P<0.05$)。随着 Katarfuchi 分级增加,IgA 肾组织中 OPN、TGF- β_1 表达水平升高 ($P<0.05$)。经 Spearman 相关分析,IgA 患者 Haas 分型、Katarfuchi 分级与肾组织中 OPN、TGF- β_1 、24 h 尿蛋白定量呈正相关 ($P<0.05$)。**结论** OPN、TGF- β_1 参与 IgA 肾病肾小管间质损伤病理过程,是引起 IgA 肾病病情恶化的重要因素之一。

关键词: IgA 肾病;肾活检组织;骨桥蛋白;转化生长因子;临床病理

中图分类号: R692.3

文献标识码: A

Expressions of OPN and TGF- β_1 in renal tissue of patients with IgA nephropathy and their correlations with clinical and pathological parameters*

Hai-jian Li¹, Gen-yang Cheng², Hui Liu³, Yi-tong Li⁴,

Ya-fei Tao¹, Jian-gang Wang¹, Yu-dong Li³

(1. Department of Nephrology and Rheumatology, Nanyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Nanyang, Henan 473009, China; 2. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China; 3. Department of Cardiology, Nanyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Nanyang, Henan 473009, China; 4. Department of Medical Imaging, the First Clinical College, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of osteopontin (OPN) and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in renal biopsy tissue of IgA nephropathy and their relationships with clinicopathological parameters.

收稿日期:2016-10-18

* 基金项目:河南省科技攻关计划项目 (No:152102310056)

[通信作者] 程根阳, E-mail: chengrooter@163.com; Tel: 0371-66295965

Methods The levels of OPN and TGF- β_1 in the renal tissues of 60 cases of IgA nephropathy, 30 cases of minimal change nephropathy (MCD) and 20 people with normal kidneys were detected with immunohistochemical SP method. Serum creatinine, creatinine clearance and 24-h urinary protein were determined. Haas typing and Katakuchi grading were used to evaluate the pathological changes of IgA nephropathy patients. The correlations of OPN and TGF- β_1 in renal tissues with clinical parameters and pathological changes were analyzed. **Results** The levels of serum creatinine and 24-h urinary protein, and the expressions of OPN and TGF- β_1 in the IgA nephropathy group of Haas type I-V were higher than those in the MCD control group and the healthy control group, but the creatinine clearance was lower than that in the MCD and healthy control groups ($P < 0.05$). The expressions of OPN and TGF- β_1 in the type IV and V renal tissues were significantly higher than those in the type I, II and III renal tissues ($P < 0.05$). The levels of serum creatinine and 24-h urinary protein and the expressions of OPN and TGF- β_1 in the IgA nephropathy group of Katakuchi grade 0-III were higher than those in the MCD control group and the healthy control group, while the creatinine clearance was lower than that in the MCD and healthy control groups ($P < 0.05$). The expressions of OPN and TGF- β_1 in the renal tissue of IgA nephropathy group significantly rose with the increase of Katakuchi grade ($P < 0.05$). The Spearman correlation analysis showed that Haas type and Katakuchi grade were in positive correlations with OPN and TGF- β_1 levels in the renal tissues and 24-h urinary protein in the IgA nephropathy patients ($P < 0.05$). **Conclusions** OPN and TGF- β_1 may play important roles in the pathogenesis of IgA nephropathy and renal tubulointerstitial injury.

Keywords: IgA nephropathy; renal biopsy; osteopontin; transforming growth factor; clinical pathology

免疫球蛋白 A (Immunoglobulin A, IgA) 肾病是导致肾末期肾衰竭的重要因素,其临床病理特点表现为细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 聚集、扩张及弥漫性系膜细胞 (expansion and diffuse mesangial cells, MC) 增生^[1]。目前,肾小管间质损伤被认为是各种急慢性肾小球炎症的主要病理特征,是各类肾小球疾病发生的共同途径,极大地影响肾脏功能预后^[2]。转化生长因子- β (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 可促进 ECM 蛋白合成、沉积及 MC 增殖,并参与肾间质纤维化及刺激肾小球硬化,从而促进肾纤维化形成^[3]。骨桥蛋白 (Osteopontin, OPN) 属于多功能细胞外基质蛋白,在促进细胞黏附、聚集及介导炎症反应中起重要作用^[4]。相关研究指出,无论在原发性或继发性肾小球肾炎中均可发现 OPN 表达水平升高^[5]。因此,本研究将应用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法 (streptavidin-peroxidase, SP) 观察 IgA 肾组织中 OPN、TGF- β_1 的表达,并探讨其与临床指标、组织病理的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2014 年 6 月-2016 年 6 月在郑州大学附属南阳市中心医院经肾活检诊断为 IgA 肾病的 60 例患者作为 IgA 肾病组。纳入标准:① 年龄 >20 岁;② 经肾组织活检确诊;③ 患者均签署知情同意书。排除标准:① 肝硬化、过敏性紫癜、乙型肝炎感染、系统

性红斑狼疮、强直性脊柱炎及恶性肿瘤等系统性疾病引起的继发性肾小球疾病;② 先天性遗传性肾脏疾病。其中,男性 32 例,女性 28 例;年龄 22~58 岁,平均 35.8 ± 3.2 岁。选取 30 例经肾活检确诊为微小病变肾病 (minimal change disease, MCD) 患者为 MCD 对照组,排除标准与 IgA 肾病组相同。其中,男性 18 例,女性 12 例;年龄 22~60 岁,平均 35.9 ± 3.4 岁;另选取肾脏肿瘤切除术后肿瘤周边正常肾组织 20 例为健康对照组。其中,男性 12 例,女性 8 例;年龄 20~64 岁,平均 36.2 ± 3.5 岁,各组患者基线资料比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 测定各组临床指标 记录各组血肌酐、肌酐清除率、24 h 尿蛋白定量水平,血肌酐由本院检验科按照 Jaffe 法测定,肌酐清除率按 Cockcroft 公式计算获得,24 h 尿蛋白由实验室按考马斯亮蓝法测定。

1.2.2 肾组织 OPN、TGF- β_1 测定 应用免疫组织化学法测定肾组织 OPN、TGF- β_1 。将留取的 IgA 肾病和 MCD 患者肾活检组织及肿瘤周边正常组织行石蜡切片,乙醇梯度脱水,微波抗原修复,加入 3% 双氧水 H_2O_2 3 ml 灭活抗原 30 min,三羟甲基胺-盐酸缓冲盐溶液 Tris-HCl buffer saline, TBS) 冲洗 3 次,常温孵化 30 min,分别加入 OPN 一抗、TGF- β_1 一抗,4℃ 孵育过夜。三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液 tris buffered saline and tween 20, TBST) 冲洗后,加入非生物素标记二抗,室温下孵化 60 min, TBS 冲洗 3 次,

室温孵化 30 min, 滴加二氨基联苯氨(Di-aminobezidin, DAB)显色, 显微镜下观察显色情况, 苏木素对比染色, 常规脱水, 透明树脂封片。显微镜下将标本放大 400 倍摄取图像, 肾小球数 >8 个/例, 肾小管数 >50 个/例, 肾小管随机视野 10 个/高倍镜, 对所选视野阳性信号进行图像分析。计算每例切片中所有肾小球阳性面积占整个肾小球面积的均值, 并以该值表示某种成分在肾小球中的相对表达量。计算肾小管间质着色面积占整个肾小管面积, 并以该值表示某种成分在肾小管间质中的相对表达量。

1.2.3 IgA 肾病病理评分标准 参照 Haas 法分为: I 型, 轻微病变 10 例; II 型, 部位节段肾小球硬化 12 例; III 型, 局部性增生 18 例; IV 型, 弥漫性增生型 12 例; V 型, 进行性慢性肾炎 8 例。Katafuchi 分级: 0 级, 无明显肾小间质病变 22 例; I 级, 肾小间质病变面积 <30% 22 例; II 级, 肾小间质受累面积 30%~70% 10 例; III 级, 肾小间质受累面积 >70% 6 例。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 做方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, 相关分析用 Spearman 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IgA 肾病组 Haas 各分型 OPN、TGF- β_1 及临床指标比较

IgA 肾病组 Haas 各分型 (I~V 型) 血肌酐、24 h

尿蛋白定量及肾组织中 OPN、TGF- β_1 表达水平与 MCD 对照组和健康对照组比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。IgA 肾病组高于 MCD 对照组和健康对照组, 而肌酐清除率与 MCD 对照组和健康对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), IgA 肾病组低于 MCD 对照组和健康对照组。Haas 分型中 IV 和 V 型肾组织中 OPN、TGF- β_1 表达与 I、II 和 III 型比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), IgA 肾病组高于 MCD 对照组和健康对照组。见表 1。

2.2 IgA 肾病组不同肾间质病变分级 OPN、TGF- β_1 及临床指标比较

IgA 肾病组 Katafuchi 分级 (0~III 级) 血肌酐、24 h 尿蛋白定量及肾组织中 OPN、TGF- β_1 表达水平与 MCD 对照组和健康对照组比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); IgA 肾病组高于 MCD 对照组和健康对照组。肌酐清除率与 MCD 对照组和健康对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), IgA 肾病组低于 MCD 对照组和健康对照组。随着 Katafuchi 分级增加, IgA 肾组织中 OPN、TGF- β_1 表达水平升高, 与对照组和健康对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2 和附图。

2.3 IgA 患者组织病理与肾组织 OPN、TGF- β_1 及临床指标的关系

经 Spearman 相关性分析可知, IgA 患者 Haas 分型、Katafuchi 分级与肾组织中 OPN、TGF- β_1 、24 h 尿蛋白定量呈正相关 ($P<0.05$)。见表 3。

表 1 IgA 肾病组 Haas 各分型 OPN、TGF- β_1 及临床指标比较 ($\bar{x}\pm s$)

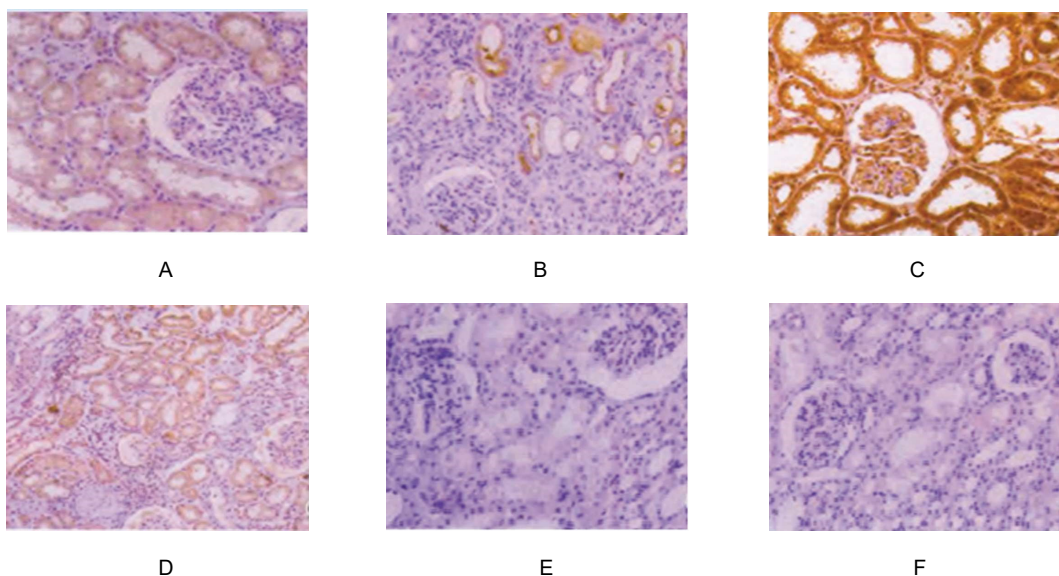
组别	血肌酐 (μ mol/L)	肌酐清除率 (ml/min)	24 h 尿蛋白定量 (g/d)	肾组织 OPN/%	肾组织 TGF- β_1 /%
健康对照组 (n=20)	45.98 \pm 2.56	130.58 \pm 3.22	1.42 \pm 0.36	2.42 \pm 0.34	3.12 \pm 0.48
MCD 对照组 (n=30)	46.22 \pm 5.69	129.96 \pm 6.48	1.43 \pm 0.45	2.58 \pm 0.45	3.09 \pm 0.52
IgA 肾病组 (n=60)					
Haas I 型 (n=10)	69.96 \pm 6.78	109.12 \pm 5.02	1.82 \pm 0.69	8.63 \pm 0.63	9.28 \pm 0.71
Haas II 型 (n=12)	68.22 \pm 8.69	107.47 \pm 9.11	2.02 \pm 0.72	8.78 \pm 0.72	9.32 \pm 0.82
Haas III 型 (n=18)	68.36 \pm 9.82	105.25 \pm 10.32	2.62 \pm 0.75	8.92 \pm 0.82	9.98 \pm 0.93
Haas IV 型 (n=12)	105.98 \pm 11.96	70.63 \pm 9.78	3.59 \pm 0.82	12.69 \pm 0.89	12.02 \pm 2.02
Haas V 型 (n=8)	128.22 \pm 13.58	63.66 \pm 12.45	4.22 \pm 1.02	13.78 \pm 0.96	12.39 \pm 2.33
F 值	124.231	145.690	111.781	120.892	121.762
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

表 2 IgA 肾病组不同肾间质病变分级 OPN、TGF- β_1 及临床指标比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	血肌酐 (μ mol/L)	肌酐清除率 (ml/min)	24 h 尿蛋白定量 (g/d)	肾组织 OPN/%	肾组织 TGF- β_1 /%
健康对照组 (n=20)	45.98 \pm 2.56	130.58 \pm 3.22	1.42 \pm 0.36	2.42 \pm 0.34	3.12 \pm 0.48
MCD 对照组 (n=30)	46.22 \pm 5.69	129.96 \pm 6.48	1.43 \pm 0.45	2.58 \pm 0.45	3.09 \pm 0.52

续表 2

组别	血肌酐 (μ mol/L)	肌酐清除率 (ml/min)	24 h 尿蛋白定量 (g/d)	肾组织 OPN/%	肾组织 TGF- β_1 /%
IgA 肾病组 n=60)					
0 级 n=22)	70.26 \pm 6.12	103.26 \pm 8.02	1.79 \pm 0.36	9.89 \pm 0.92	10.12 \pm 1.02
I 级 n=22)	75.02 \pm 6.98	93.96 \pm 7.69	1.92 \pm 0.41	10.02 \pm 1.02	12.45 \pm 1.69
II 级 n=10)	108.12 \pm 7.45	82.12 \pm 6.32	3.69 \pm 0.32	13.96 \pm 3.45	13.42 \pm 3.88
III 级 n=6)	132.45 \pm 10.33	63.89 \pm 5.69	5.12 \pm 1.22	15.88 \pm 4.02	15.69 \pm 5.13
F 值	152.362	169.422	171.022	183.262	142.024
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000



A: TGF- β_1 在 Katafuchi I 级的表达; B: OPN 在 Katafuchi I 级的表达; C: TGF- β_1 在 Katafuchi III 级的表达; D: OPN 在 Katafuchi III 级的表达; E: TGF- β_1 在 MCD 对照组中的表达; F: OPN 在 MCD 对照组中的表达

附图 IgA 肾病组不同肾间质病变分级 OPN、TGF- β_1 的表达 (DAB 染色 \times 400)

表 3 IgA 患者组织病理与肾组织 OPN、TGF- β_1 及临床指标的关系

指标	相关性	血肌酐	肌酐清除率	24 h 尿蛋白定量	OPN	TGF- β_1
Haas 分型	r 值	0.122	- 0.118	0.330	0.340	0.332
	P 值	0.460	0.502	0.000	0.000	0.000
Katafuchi 分级	r 值	0.144	- 0.124	0.327	0.315	0.340
	P 值	0.598	0.478	0.000	0.000	0.000

3 讨论

IgA 肾病是临床常见的原发性肾小球疾病。本研究发现, IgA 肾病组 Haas 法分级提示为肾小球损伤, 随着 Haas 分级增加, 患者肾小球损伤程度明显增加。肾小管间质损伤被认为是肾小球疾病病情进展的重要表现, 本研究中肾小管间质损伤发生率为 63.33% (38/60), 与健康对照组和 MCD 对照组比较, IgA 肾病血肌酐水平、24 h 尿蛋白定量增加, 而肌酐清除率下降, 且肾间质损伤程度与 24 h 尿蛋白定量

呈正相关^[9]。本实验结果与 HARUHARA 等^[7]的研究一致。提示 24 h 蛋白尿可作为参与 IgA 肾病肾小管间质损伤过程的重要致病因子, 是引起 IgA 肾病恶化的重要因素之一。

OPN 近年在肾脏疾病发生过程中所发挥的重要性逐渐被认识, 本研究发现, 在正常肾脏组织和 MCD 对照组中均有微量表达, 而在 IgA 肾病肾小管中 OPN 蛋白表达水平上调, 且随着肾小管间质病变程度加深, OPN 蛋白表达水平升高^[8-9]。CEN 等^[10]研究发现, IgA 肾病近端小管及远端小管上皮细胞

OPN表达水平显著上调,且上调程度与肾间质损害程度呈正相关。LANGDON等^[1]在鼠间质性肾炎动物模型中发现,肾间质损伤区域肾小管上皮OPN蛋白表达水平显著升高,且OPN升高较24h尿蛋白改变要早,因此可将OPN作为肾小管损伤的早期标志物。在本研究中,IgA患者肾小球损伤及肾间质损害程度与OPN呈正相关,提示OPN表达水平上调与IgA肾病病情进展关系密切。考虑其可能机制为OPN作为趋化分子及巨噬细胞黏附分子,可与整合素受体结合并介导巨噬细胞黏附及迁移,从而促进巨噬细胞到达肾间质,进一步介导肾间质炎症反应,加重肾间质损伤。

TGF- β_1 是由脂多糖及T淋巴细胞激活的单核-巨噬细胞分泌,属于促纤维化细胞因子,其在组织损伤初期具有促进组织再生及修复的作用,并在调节血管紧张素II引起的血管平滑肌增生中起重要作用^[12]。TGF- β_1 在IgA肾病病情进展过程中起重要作用,可参与IgA肾病患者ECM形成、系膜细胞增生、肾小管间质损伤等多种生理病理过程^[13]。ZHANG等^[14]指出,TGF- β_1 在调控IgA肾小球硬化及肾间质纤维化过程中发挥重要作用。本研究中,IgA患者肾组织中TGF- β_1 表达水平高于健康对照组和MCD对照组,且在Haas IV和V型及Katafuchi I~III级患者中表达水平升高,且经Spearman相关分析可知,IgA患者Haas分型、Katafuchi分级与肾组织中TGF- β_1 呈正相关,提示肾组织TGF- β_1 表达水平升高与IgA肾组织病理损伤关系密切。考虑其可能机制为在肾间质损伤过程中,TGF- β_1 可通过刺激III型胶原、蛋白多糖、纤连蛋白的表达,以及促进细胞外基质与细胞表面合成相关整合素,从而促使ECM生成及沉积进一步加重肾间质损伤^[15]。

综上所述,OPN、TGF- β_1 参与IgA肾病肾小管间质损伤病理过程,是引起IgA肾病病情恶化的重要因素之一,因此可将OPN、TGF- β_1 作为IgA肾病肾小管损伤的早期标志物。

参 考 文 献:

- [1] 侯媛媛,张立,苏森森,等. 138例IgA肾病病理分型与临床分析[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(1): 78-80.
- [2] 张军军,梁艳,权松霞,等. 分泌型IgA与IgA肾病患者临床病理及补体激活的关系[J]. 中华肾脏病杂志, 2016, 32(4): 247-252.
- [3] 初梅,李华荣,王京晶,等. 转化生长因子- β_1 和基质金属蛋白酶-9的表达在儿童IgA肾病中的临床意义[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2014, 29(13): 1017-1021.
- [4] 郝成罗,廖常彬. IgA肾病患者外周血单核细胞含量及肾组织中NF- κ B、CTGF、OPN表达量的检测及临床意义[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(11): 1079-1081.
- [5] 蔡婷,靳蕊霞,冯欣,等. IgA肾病模型肾组织中OPN、STAT3的表达变化及意义[J]. 山东医药, 2012, 52(26): 39-41.
- [6] CHA Y J, LIM B J, KIM B S, et al. Smoking-related renal histologic injury in IgA nephropathy patients[J]. Yonsei Med J, 2016, 57(1): 209-216.
- [7] HARUHARA K, TSUBOI N, KOIKE K, et al. Ambulatory blood pressure and tubulointerstitial injury in patients with IgA nephropathy[J]. Clin Kidney J, 2015, 8(6): 716-721.
- [8] LORENZEN J, LOVRIC S, KRÄMER R, et al. Osteopontin in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis: relation to disease activity, organ manifestation and immunosuppressive therapy[J]. Ann Rheum Dis, 2010, 69(6): 1169-1171.
- [9] CAI M, BOMPADA P, ATAC D, et al. Epigenetic regulation of glucose-stimulated osteopontin (OPN) expression in diabetic kidney[J]. Biophys Res Commun, 2016, 469(1): 108-113.
- [10] CEN C, AZIZ M, YANG W L, et al. Osteopontin blockade attenuates renal injury after ischemia reperfusion by inhibiting NK cell infiltration[J]. Shock, 2016, 8(4): 85-89.
- [11] LANGDON A, GROHE B. The osteopontin-controlled switching of calcium oxalate monohydrate morphologies in artificial urine provides insights into the formation of papillary kidney stones[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2016, 146(2): 296-306.
- [12] 樊平,梁新华,邹川,等. TGF- β_1 和PAI-1在老年IgA肾病患者中的表达及意义[J]. 中国老年学杂志, 2015, 2(4): 933-935.
- [13] 黄燕萍,高娜,王祥,等. NF- κ B和TGF- β_1 在大鼠IgAN纤维化进展中的作用及机制研究[J]. 中国妇幼健康研究, 2015, 5(2): 214-218.
- [14] ZHANG X Y, LIU Z M, ZHANG H F, et al. TGF- β_1 improves mucosal IgA dysfunction and dysbiosis following intestinal ischaemia-reperfusion in mice[J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(6): 1014-1023.
- [15] LI Z, LI Y, CHEN L. Association between transforming growth factor- β_1 gene-509C/T polymorphism and susceptibility of IgA nephropathy: a meta-analysis[J]. Ren Fail, 2014, 36(10): 1473-1480.

(童颖丹 编辑)