

肥大细胞在 IgA 肾病中的表达及致病机制

王思远 严 苗 苏 可 陈 斌

摘 要 **目的** 通过肥大细胞在 IgA 肾病及其合并肾功能不全患者肾组织的染色,并探讨其在疾病进程中的可能作用机制。**方法** 选取正常组 12 例、IgA 肾病患者 20 例、IgA 肾病合并轻度肾功能不全患者 8 例,进行肾组织肥大细胞染色及计数。在 IL-6 或 TNF- α 刺激下,通过实时定量 PCR 及免疫印迹法检测培养的肥大细胞中肾素 mRNA 及蛋白的表达。**结果** 与正常组相比,IgA 肾病组及 IgA 肾病合并肾功能不全组肥大细胞计数梯度升高($P=0.000$),肥大细胞主要分布于肾间质,特别是纤维化区域。肥大细胞计数与小管萎缩、间质纤维化、球性肾小球硬化等存在相关关系。正常培养的肥大细胞表达肾素 mRNA 及蛋白,在 IL-6 或 TNF- α 刺激下,肾素的表达较正常组明显增多,在 24h 内呈时间依赖($P=0.000$)。**结论** 肥大细胞浸润参与 IgA 肾病的疾病过程。在致纤维细胞因子干预下,肥大细胞肾素表达上调,干预肥大细胞浸润可能是 IgA 肾病患者治疗的新靶标。

关键词 肥大细胞 IgA 肾病 IgA 肾病合并肾功能不全 肾素

中图分类号 R692

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.07.015

Mast Cells Participated in the Development of IgA Nephropathy Through Renin. Wang Siyuan, Yan Miao, Su Ke, et al. Department of Nephrology, Wuhan University, Renmin Hospital, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To observe the expression of mast cell in IgA nephropathy and explore the underlying pathogenesis mechanism. **Methods** Renal biopsies consist of control kidney ($n=12$), IgA nephropathy group ($n=20$) and IgA nephropathy associated with renal insufficiency group ($n=8$) for a quantitative evaluation of the MCs infiltration. Cultured MCs were divided into three groups: the control group, IL-6 group and TNF- α group. Real-Time PCR and Western blot were performed to quantify the renin in three groups. **Results** In a panel of human renal biopsy specimens, MCs showed gradient rise in control group, IgAN groups and IgAN associated with renal insufficiency group. MCs were localized to the renal interstitium, especially in fibrotic areas, and few MCs infiltrated in glomeruli or tubular lumina. Increased MC count was significantly correlated with tubular atrophy, IF, interstitial inflammation, global glomerulosclerosis. Mast cells could express renin mRNA and protein in control group. MCs in group IL-6 and TNF- α group significantly increased renin expression than that in control in time-dependent manners ($P=0.000$). **Conclusion** MCs may play a vital role in progressive IgAN, and renin expression in MCs may contribute to this process.

Key words Mast cells; IgA nephropathy; Renal insufficiency; Renin

IgA 肾病(IgA nephropathy, IgAN)为临床常见的一种肾脏疾病,15%~40%患者最终进展至终末期肾衰竭^[1]。小管间质病变是影响 IgAN 进展和预后的重要因素之一^[2]。目前已有文献报道 IgAN 患者肾间质存在肥大细胞浸润,且肥大细胞数量与肾纤维化程度存在正相关关系^[3]。但亦有报道发现,肥大细胞可以通过调节炎性细胞浸润并抑制去分化减轻肾脏纤维化^[4]。本研究通过分析肥大细胞在 IgAN 及其合并肾功能不全患者肾组织中的表达,并对其作用机制进行探讨。

材料与方法

1. 病例选取:肾脏标本来源包括:外伤或肾肿瘤肾切除患者的正常肾组织 12 例(正常组),IgAN 患者 20 例(IgAN 组)及 IgAN 合并肾功能不全(血 Cr 值 $<200\mu\text{mol/L}$)患者 8 例(IgARI 组)。IgAN 组及 IgARI 组标本来源于根据临床指征进行的肾活检术。对所有肾组织所进行的处理和使用均遵循国家伦理准则。诊断由肾脏病理医师根据班夫分类系统完成。

2. 肾组织肥大细胞染色和计数:4% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,切片后用 0.1% 甲苯胺蓝染色。肥大细胞的计数由两名研究者分别独立完成,并记录为“计数/平方毫米”。

3. 细胞的培养:人肥大细胞系(HMC-1)购买自青岛博康生物技术有限公司,细胞完全培养基为含有 10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司), $50\mu\text{mol/L}$ 1-硫代甘油(美国 Sigma 公司, M6145)的 IMDM 培养基(美国 Gibco 公司),在 37℃,5% CO₂ 条件下进行培养。体外培养的肥大细胞分为 3 组:正常组,IL-6 刺激组(10ng/ml 美国 Peprotech 公司)及 TNF- α 刺激

基金项目:中华医学会临床研究专项基金资助项目(14050470584);中华医学会-施维亚基金资助项目(2014HX0026)

作者单位:430060 武汉大学人民医院肾内科

通讯作者:陈斌,电子信箱:chenchengcc2001@aliyun.com

组(20ng/ml 美国 Gemini Bio-products 公司)。HMC-1 细胞以 2×10^5 /ml 的密度在无血清培养基中培养 6h 后添加相应刺激,分别在 4、8 及 24h 3 个时间点收集细胞,并在 24h 收集无刺激因素肥大细胞设为正常对照组。

4. 实时定量 PCR 检测肾素 mRNA 表达:Trizol 法提取 HMC-1 细胞总 RNA,分离出的 RNA 样品通过 Nanodrop 检测 RNA 的纯度及含量,ExScript™ RT 试剂盒合成 cDNA 后,采用 Taqman 探针技术进行实时定量 PCR。肾素探针来源美国 life technology 公司,商品号 Hs00982555_m1。以 GAPDH 设为内参照。

5. 免疫印迹法检测肾素蛋白表达:用含有 Cocktail(美国 Sigma-Aldrich 公司)的细胞裂解液(0.5% 脱氧胆酸钠,0.1% 十二烷基硫酸钠,1% Triton X-100,1mmol/L 苯甲磺酰氨,150mmol/L NaCl,20mmol/L Tris,pH 7.5,5mmol/L 依地酸)裂解细胞,13000 × g 4℃ 离心,取上清,BCA 法测定蛋白浓度,取等量蛋白 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜至硝酸纤维素膜(美国 GE Healthcare 公司),一抗分别为肾素兔来源多克隆抗体(1:200,美国 Santa Cruz 公司),辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10000,美国 CST 公司),ECL(美国 Santa Cruz 公司)反

应,Geldoc(美国 Biorad 公司)扫描硝酸纤维素膜,之后采用蛋白剥离缓冲液孵育硝酸纤维素膜 30min,常规封闭液封闭后,与 GAPDH 小鼠单克隆抗体(1:20000,美国 Santa Cruz 公司)常温孵育 2h,相应二抗反应后再次显现扫描,应用 Gel-Pro Analyzer 4.5 软件进行积分吸光度(A)分析。

6. 统计学方法:数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,采用 SPSS 15.0 统计软件进行分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 人肾组织肥大细胞染色计数:IgAN 组(1.890 ± 0.578 个/平方毫米)及 IgANRI 组(5.450 ± 1.435 个/平方毫米)较正常组(0.230 ± 0.187 个/平方毫米)肥大细胞均增高($P = 0.000$),IgANRI 组较 IgAN 组肥大细胞数亦增高($P = 0.000$)。肥大细胞主要分布于肾间质,特别是纤维化区域。血管球区域及小管管腔未见肥大细胞。肥大细胞计数与小管萎缩、间质纤维化、球性肾小球硬化存在相关关系(图 1)。

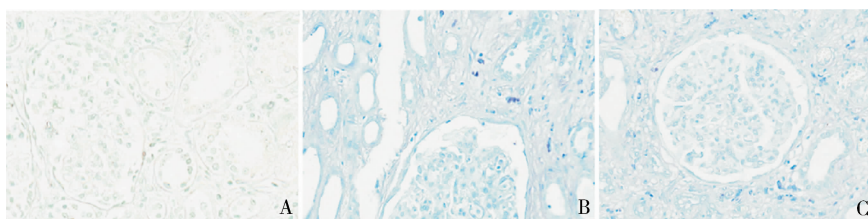


图 1 人肾组织肥大细胞计数(甲苯胺蓝染色,×400)

A. 正常组;B. IgAN 组;C. IgANRI 组

2. 肾素的定量:正常培养的肥大细胞即可产生肾素 mRNA 及蛋白,IL-6 刺激组及 TNF-α 刺激组肾素的表达较正常组肾素的表达明显增多,并呈时间依赖性升高($P < 0.05$,图 2)。

讨 论

IgAN 好发于青少年,男性多见,以肾小球系膜基质与系膜细胞增殖和(或)单核细胞浸润为特点,包括 4 项主要病理指标:系膜细胞增生、内皮细胞增生、节段性硬化或粘连及肾小管萎缩或肾间质纤维化。近年的研究证实,系膜细胞分泌炎症因子、活化补体在导致 IgA 肾病的病理改变和临床症状中起重要作用^[5]。但其具体的发病机制尚未完全阐明,积极寻找 IgAN 致病因素及探讨可能的干预因素对指导临床治疗有重要意义。

在 IgAN 中,肾小管间质病变较小球病变与疾病的进展联系更加紧密^[6,7]。研究发现小管间质浸润的肥大细胞数量可能是判断 IgAN 预后的指标之一^[3]。并且肥大细胞可通过多种机制参与肾纤维化

的过程^[8],如:肥大细胞分泌的 TGF-β1 已被证实可通过诱导上皮细胞去分化从而促进纤维化的发生^[9]。但亦有研究表明,肥大细胞缺陷小鼠肾脏 α-SMA 表达较野生型小鼠明显增加,提示肥大细胞抑制肾脏的纤维化^[4,6]。本研究收集临床肾活检标本,发现 IgAN 及 IgAN 肾功能不全患者肾间质存在肥大细胞浸润,且肥大细胞的数量与小管萎缩、间质纤维化、球性肾小球硬化等存在相关关系。提示干预肥大细胞浸润至肾组织可能延缓 IgAN 患者疾病的进展,减缓肾功能减退。

肾素-血管紧张素系统(RAS 系统)尤其是局部 RAS 系统的激活在慢性肾脏损伤中发挥重要作用^[10]。有报道发现,IgAN 中,肾间质浸润的肥大细胞在血管紧张素 II 阳性细胞团周围聚集,血管紧张素 II 阳性细胞计数与肥大细胞计数呈相关关系,并同时发现,肥大细胞本身并不能表达血管紧张素 II^[11]。提示肥大细胞与局部 RAS 激活存在一定联系。最近研究发现,缺血再灌注损伤中,心肌肥大细胞分泌肾

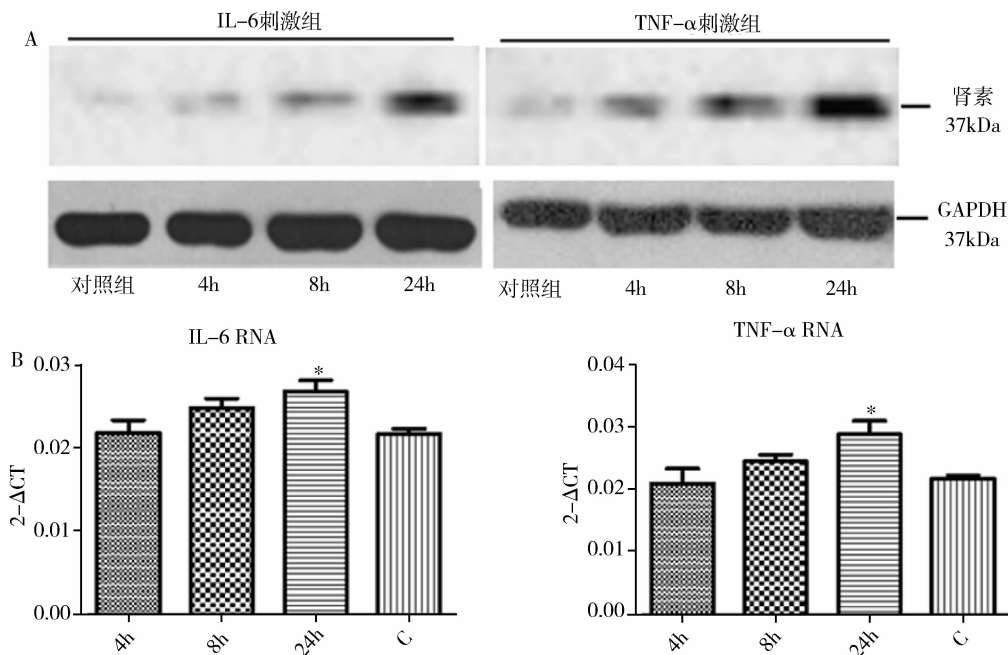


图2 肥大细胞肾素的定量

A. IL-6组与TNF-α组肥大细胞肾素蛋白表达,24h内呈时间依赖;B. IL-6组肥大细胞肾素 mRNA/GAPDH mRNA,与对照组相比,* $P < 0.05$ ($n = 3$);C. TNF-α组肥大细胞肾素 mRNA/GAPDH mRNA,与对照组相比,* $P < 0.05$ ($n = 3$)

素,激活RAS系统,从而引起心率失常的发生^[12,13]。本研究通过体外培养肥大细胞,采用实时定量PCR及免疫印迹两种方法证实,肥大细胞可表达肾素基因及蛋白,可参与局部RAS系统的激活。并且,在炎症因子IL-6和TNF-α刺激下,肥大细胞肾素mRNA及蛋白的表达呈时间梯度增加。提示IgA肾病中,系膜细胞分泌的炎症因子可通过增加肥大细胞肾素的表达,加重病理改变。对IgAN的发病机制进行了进一步的阐明。

综上所述,肥大细胞在IgAN的疾病进展中起促进作用。其中,系膜细胞分泌炎症因子刺激肥大细胞表达肾素,激活RAS系统,导致进一步的病理改变和临床症状。减轻炎症反应、干预肥大细胞浸润至肾组织及调节局部肾素表达可能是IgAN患者治疗的新靶标。

参考文献

- Berthoux F, Mohey H, Laurent B, *et al.* Predicting the risk for dialysis or death in IgA nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(4): 752-761
- Liu J, Yang JR, He YN, *et al.* Accelerated senescence of renal tubular epithelial cells is associated with disease progression of patients with immunoglobulin A (IgA) nephropathy[J]. *Transl Res*, 2012, 159(6): 454-463
- Silva GE, Costa RS, Ravinal RC. *et al.* Renal macrophage infiltration is associated with a poor outcome in IgA nephropathy[J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2012, 67(7): 697-703
- Kim DH, Moon SO, Jung YJ, *et al.* Mast cells decrease renal fibrosis

- in unilateral ureteral obstruction[J]. *Kidney Int*, 2009, 75(10): 1031-1038
- Lai KN, Leung JC, Chan LY, *et al.* Activation of podocytes by mesangial-derived TNF-α: glomerulo-podocyte communication in IgA nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294(4): 945-955
- Tomino Y. Predictors of prognosis in IgA nephropathy[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2012, 28(10): 517-520
- Lin Q, Chen Y, Lv J, *et al.* Kidney injury molecule-1 expression in IgA nephropathy and its correlation with hypoxia and tubulointerstitial inflammation[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 306(8): 885-895
- Blank U, Essig M, Scanduzzi L, *et al.* Mast cells and inflammatory kidney disease[J]. *Immunol Rev*, 2007, 217: 79-95
- Park SH, Choi MJ, Song IK, *et al.* Erythropoietin decreases renal fibrosis in mice with ureteral obstruction: role of inhibiting TGF-β-induced epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(5): 1497-1507
- Ferraro FM, Lara LS, Lowe J. Renin-angiotensin system in the kidney: What is new? [J]. *World J Nephrol*, 2014, 3(3): 64-76
- Aldi S, Takano K, Tomita K, *et al.* Histamine H4-receptors inhibit mast cell renin release in ischemia/reperfusion via protein kinase C epsilon-dependent aldehyde dehydrogenase type-2 activation[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2014, 349(3): 508-517
- Aldi S, Marino A, Tomita K, *et al.* E-NTPDase1/CD39 modulates renin release from heart mast cells during ischemia/reperfusion: a novel cardioprotective role[J]. *FASEB J*, 2014 (Epub ahead of print)
- Sakamoto-Ihara T, Suzuki Y, Kurusu A, *et al.* Possible involvement of mast cells in renal fibrosis in patients with IgA nephropathy[J]. *Inflamm Res*, 2007, 56(10): 421-427

(收稿日期:2014-11-27)

(修回日期:2014-12-19)