

原发性系膜增殖性肾小球肾炎患者外周血及肾脏组织中 Caspase-3 及 Annexin V 的变化及其临床意义

张曦 李茹艳 张钧泰 于璐

【摘要】 目的 探讨慢性系膜增殖性肾小球肾炎(MsPGN)患者外周血及肾脏组织中淋巴细胞调亡指标 Caspase-3 和 Annexin V 的变化及其临床意义。**方法** 采用流式细胞技术检测 36 例 MsPGN 患者和 20 例正常对照者外周血 Caspase-3 及 Annexin V 表达情况,同时观察其肾脏组织 Caspase-3 及 Annexin V 的免疫组织化学染色结果。**结果** Caspase-3 在正常肾脏组织的肾小球系膜区无表达,肾间质少量分布;Annexin V 和纤维蛋白原(FIB)在肾小球囊壁及系膜区有少量沉积,偶见肾间质少量分布,在肾小管上皮细胞中无表达。Caspase-3、Annexin V 及 FIB 在不同程度 MsPGN 患者的肾脏组织内均有表达,且肾小管、肾间质着色深于肾小球。Caspase-3、Annexin V 及 FIB 在肾脏组织的表达强度与系膜增生及肾小管、间质病变程度相关。MsPGN 患者外周血 Caspase-3、Annexin V 增高水平与系膜增生程度相一致。相关性分析结果显示,MsPGN 患者血清 Caspase-3、Annexin V 水平与 FIB 的表达均呈正相关($r=0.4258, P<0.05; r=0.4131, P<0.05$)。**结论** MsPGN 患者体内存在调亡或调亡相关性免疫机制失调,淋巴细胞调亡可能参与了 MsPGN 的病变过程及肾脏纤维化。

【关键词】 系膜增殖性肾小球肾炎; Caspase-3; Annexin V; 调亡

慢性系膜增殖性肾小球肾炎(MsPGN)是我国最常见的肾小球肾炎,是由异常免疫调节及自身抗体产生过量引起的一组自身免疫性疾病,以肾小球内的系膜细胞增生、系膜基质增多为主要病理表现,最终导致肾小球纤维化及硬化。有研究显示,细胞调亡参与了 MsPGN 的发生发展^[1-2]。本研究通过检测 MsPGN 患者外周血淋巴细胞调亡指标 Caspase-3 及 Annexin V 的变化,观察 Caspase-3 及 Annexin V 在 MsPGN 患者肾小球和肾小管的表达,探讨其在 MsPGN 病变中的临床意义。

对象与方法

1. 对象:2009 年 6 月~2013 年 6 月于我科经肾脏组织病理检查(包括光镜检查、免疫荧光、电镜检查)和临床资料确诊的原发性 MsPGN 患者 36 例,包括隐匿型肾小球肾炎 12 例、慢性肾小球肾炎 5 例、原发肾病综合征 19 例;其中男 16 例,女 20 例,年龄 17~65 岁,平均年龄(37.8 ± 20.6)岁。收集 20 例健康体检者作

为外周血对照组,其中男 8 例,女 12 例,年龄 20~67 岁,平均年龄(39.4 ± 26.8)岁;收集同期于我院就诊的肾破裂伤且术后随访尿常规正常的 6 例患者正常肾组织作为肾脏组织对照组。排除标准:(1)继发性肾小球疾病患者;(2)近期合并心、脑、肺、肝等重要器官疾病及肿瘤等患者;(3)近 3 个月内使用糖皮质激素等免疫抑制剂及中药患者。本研究经我院伦理委员会审核通过,所有患者术前均签署知情同意书。

2. 方法

(1)免疫组织化学染色法观察肾脏组织 Caspase-3、Annexin V 及纤维蛋白原(FIB)的表达:肾脏组织标本经 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋,切片厚度为 3 μm 。切片经苏木素-伊红(HE)染色、过碘酸-雪夫(PAS)染色、六胺银(PASM)染色和 Masson 三色染色,并采用电镜观察。采用美国 abcam 公司提供的直接免疫荧光标记 Annexin V 鼠抗人单克隆抗体、Caspase-3 兔抗人多克隆抗体及兔抗鼠 IgG;DAB 显色试剂盒和 SP 即用型试剂盒购自 YBscience 基因公司。Caspase-3 及 Annexin V 染色结果:呈棕黄色颗粒分布于细胞膜,少部分于细胞浆染色,并进行半定量分析:“+++”为阳性细胞 >50%;“++”为阳性细胞 25%~50%;“+”为阳性细胞 5%~25%;“±”为阳性细胞 1%~5%;

“-”为阳性染色细胞 <1%。依据肾脏皮质区的肾小管萎缩、间质炎性细胞浸润及纤维化情况,肾小管、肾间质病变程度可以分为:轻度:<20%;中度:20%~50%;重度:>50%。

(2) 外周血 Caspase-3、Annexin V 及 FIB 检测方法:抽取静脉血 1 ml 行常规肝素抗凝,采用 Beckman Coulter Fc50 型流式细胞仪检测 Caspase-3、Annexin V,将未染色细胞作为阴性对照。采用 closs 法检测 FIB,检测仪器为 Stago compact 全自动血凝仪。记录结果并进行分析。

3. 统计学处理:应用 PEMS 3.1 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;计数资料以例表示,组间比较采用 χ^2 检验;相关性分析采用 Pearson 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同程度 MsPGN 患者肾间质和肾小管的变化:36 例 MsPGN 患者中,轻度病变 11 例,中度病变 15 例,重度病变 10 例。11 例轻度 MsPGN 患者中,7 例肾间质、肾小管无异常;3 例肾间质基本正常,肾小管轻度变性、扩张;1 例肾间质纤维化和肾小管萎缩 <20%,散在炎症细胞浸润。15 例中度 MsPGN 中,2 例肾间质基本正常,肾小管轻度变性、扩张;13 例肾间质纤维化肾小管萎缩 <20%,散在炎症细胞浸润。10 例重度 MsPGN 患者中,6 例肾间质纤维化和小管萎缩达 30%~40%,散在和(或)弥漫性炎症细胞浸润;4 例肾间质纤维化和肾小管萎缩 >50%,散在和(或)弥漫性炎症细胞浸润。

2. Caspase-3、Annexin V 和 FIB 在不同病情患者肾小球及肾小管中的表达及与病变程度的相关性:在正常肾脏组织中,Caspase-3 在肾小球系膜区无表达,肾间质少量(-~±)沉积;Annexin V 和 FIB 在肾小球囊壁及系膜区有少量(-~±)沉积,在肾间质中偶见分布,肾小管上皮细胞中无表达。不同程度 MsPGN 患者的肾脏组织中 Caspase-3、Annexin V 及 FIB 均有表达且肾小管、肾间质着色深于肾小球,见图 1~4。病变较轻患者的 Caspase-3、Annexin V 及 FIB 表达水平低于病变较重患者。随着 MsPGN 病变程度加重,患者肾间质和肾小管上皮表达 Caspase-3 及 Annexin V 逐渐明显,且肾小球中亦出现 Caspase-3 及 Annexin V 表达,以 Annexin V 表达增加更为明显($P < 0.05$),见表 1。

表 1 Caspase-3、Annexin V 及 FIB 在肾小管、肾间质的表达(例)

组别	例数	Caspase-3					Annexin V					FIB				
		-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
轻度组	11	0	0	5	5	1	0	0	1	6	4	0	0	1	7	3
中度组	15	0	0	3	8	4	0	0	2	7	8	0	0	2	4	9
重度组	10	0	0	2	5	3	0	0	2	3	3	0	0	3	3	4
对照组	6	0	1	5	0	0	0	0	5	1	0	0	0	0	4	2

3. MsPGN 患者外周血 Caspase-3 及 Annexin V 表达及与 FIB 的相关性分析结果:MsPGN 患者外周血 Caspase-3、Annexin V 和 FIB 表达水平均明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。Caspase-3 及 Annexin V 与 FIB 相关性分析结果显示,MsPGN 患者血清 Caspase-3、Annexin V 水平与 FIB 的表达均呈正相关($r = 0.4258, P < 0.05; r = 0.4131, P < 0.05$),见图 5。

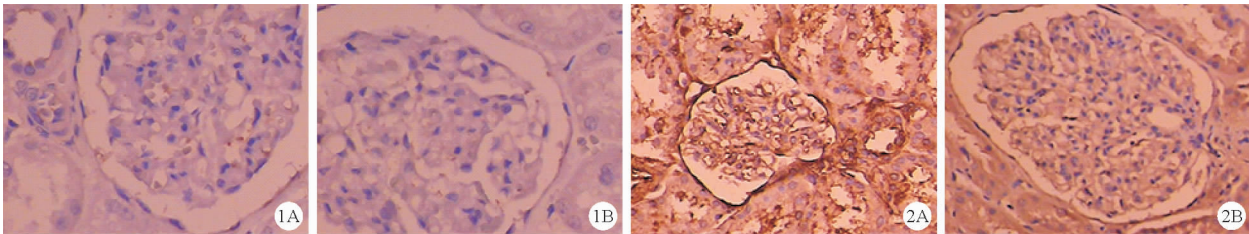


图 1 正常肾脏组织中 Caspase-3 及 Annexin V 在肾小球及肾小管中表达的免疫组化染色结果(A: Caspase-3; B: Annexin V; ×400)

图 2 重度 MsPGN 患者肾脏组织 Caspase-3 及 Annexin V 在肾小球及肾小管中表达的免疫组化染色结果(A: Caspase-3, ×200; B: Annexin V, ×400)

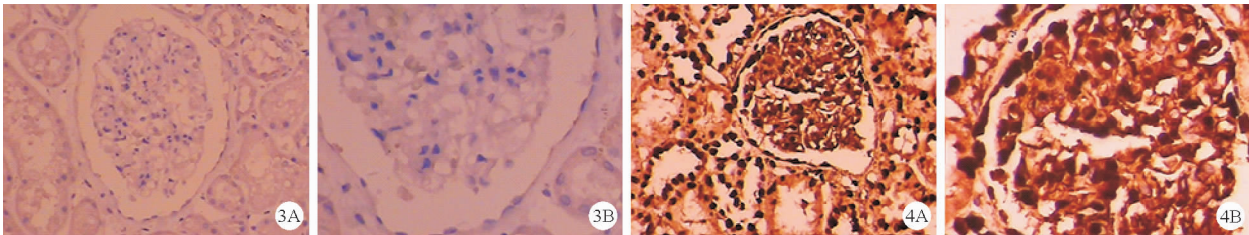


图 3 正常肾脏组织中 FIB 在肾小球及肾小管中表达的免疫组化染色结果(A: ×200; B: ×400) 图 4 重度 MsPGN 患者肾脏组织 FIB 在肾小球及肾小管中表达的免疫组化染色结果(A: ×200; B: ×400)

表 2 MsPGN 患者外周血 Caspase-3、Annexin V 及 FIB 表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Caspase-3	Annexin V	FIB
MsPGN 组	36	0.196 ± 0.109	1.89 ± 1.06	5.49 ± 1.91
对照组	20	0.106 ± 0.098	1.14 ± 0.63	3.61 ± 0.81

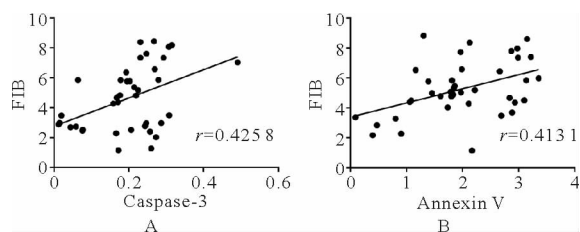


图 5 MsPGN 患者外周血 Caspase-3 及 Annexin V 与 FIB 相关性分析结果(A: Caspase-3; B: Annexin V)

讨 论

MsPGN 是导致慢性肾衰竭的常见肾小球疾病,临床上以隐匿型肾小球肾炎、慢性肾小球肾炎和肾病综合征较为多见。系膜增生情况决定其病变进展程度。在 MsPGN 发展过程中,Annexin V 和 Caspase-3 扮演重要角色,其中 Annexin V 与存在于各个器官及组织中的磷脂酰丝氨酸(PS)结合,在细胞凋亡早期,PS 自细胞内膜移向外膜,显露于细胞表面,与 Ca^{2+} 快速而紧密结合。该过程早于 DNA 降解及细胞形态学变化^[3]。Caspase-3 介导的信号传导以级联式激活并溶解蛋白酶,决定凋亡形态的变化,导致细胞凋亡,在凋亡通路中起到末端效应因子的作用^[4]。

细胞增殖和凋亡平衡在 MsPGN 发生、发展及肾小球硬化发展过程中发挥重要作用。凋亡调节基因的异常表达导致 MsPGN 患者肾脏组织细胞的凋亡受阻。Caspase-3 及 Annexin V 作为细胞凋亡的早期标志物,对研究 MsPGN 患者肾脏组织病理状态、监测细胞凋亡程度有重要意义。Caspase-3 及 Annexin V 是凋亡过程中最主要的执行者,关于其在 MsPGN 肾脏组织中是否存在异常表达的文献报道较少。本研究通过检测患者肾脏组织和外周血两方面结果表明,在正常肾脏组织中,Caspase-3 在肾小球系膜区无表达,肾间质少量分布;Annexin V 和 FIB 在肾小球囊壁及系膜区有少量沉积,偶见肾间质少量分布,肾小管上皮细胞中无表达。在 36 例不同增殖程度 MsPGN 患者的肾脏组织中,Caspase-3、Annexin V 及 FIB 与正常肾脏组织相比均高表达,且通过免疫组织化学染色分析发现,肾小管、肾间质着色深于肾小球;研究进一步证实 Caspase-3、Annexin V 及 FIB 在肾脏组织的表达水平与系膜增生及肾小管、肾间质的病变程度有关。本研究观察到,MsPGN 患者外周血 Caspase-3、Annexin V 升高水平与系膜增生程度相一致,36 例 MsPGN 患者中 Caspase-3、

Annexin V 和 FIB 均高于对照组,且在 10 例重度系膜增生的 MsPGN 患者外周血差异尤为明显。相关性分析结果显示,MsPGN 患者血清 Caspase-3 及 Annexin V 水平与 FIB 的表达均呈正相关。以上结果证实 Caspase-3 及 Annexin V 在 MsPGN 患者肾脏组织和外周血中高表达,同时 FIB 在 MsPGN 患者中上调并发生沉积,且与 Caspase-3 及 Annexin V 表达呈正相关,而 FIB 含量增高会减缓血液流速,进一步促进肾小球损伤和硬化^[5]。此外,近年来研究证实,当肾小球细胞过度凋亡时,肾小球细胞数量进行性减少,引起肾小球硬化,进一步促进包括 MsPGN 在内的肾小球疾病的发展^[6]。因此,深入研究凋亡相关蛋白机制对 MsPGN 具有重要意义。本研究通过临床检测蛋白表达数据证实 Caspase-3 及 Annexin V 与 MsPGN 患者的病变程度相关,提示 Caspase-3 和 Annexin V 水平异常可能涉及 MsPGN 患者的病情发展及不良预后,检测其表达对 MsPGN 病情判断和针对性治疗具有重要临床意义。此外,有研究还发现 Caspase-3 和 Annexin V 表达水平在临床肾脏病进程中受到多因素调节,Caspase-3 和 Annexin V 作用的细胞凋亡与相关细胞的异常补偿性增殖在包括 MsPGN 在内的肾小球疾病的早、中期发展中维持平衡,并影响疾病进一步发展^[7],但本研究未对 Caspase-3 和 Annexin V 通过调控可能的分子机制对 MsPGN 的影响进行深度探讨,有待进一步研究。

综上所述,本研究发现 MsPGN 患者肾脏组织及外周血中,Caspase-3、Annexin V 和 FIB 均异常高表达,且 Caspase-3 及 Annexin V 水平与 FIB 表达呈正相关。但 Caspase-3 及 Annexin V 异常是否通过调控其他蛋白或信号通路等的表达进而影响 MsPGN 发展,还需结合临床数据进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Jakubowska A, Kiliś-Pstrusińska K. Importance of annexin V in kidney diseases[J]. Postepy Hig Med Dosw(Online), 2015, 69: 153-157.
- [2] Song XF, Tian H, Zhang ZX. Differential activation of CD95-mediated apoptosis related proteins in proximal and distal tubules during rat renal development[J]. Tissue Cell, 2016, 48(5): 417-424.
- [3] 付卫国,唐静,宗文仓. 外周血血小板膜连蛋白 V 及血小板 α 颗粒膜糖蛋白水平与颈动脉粥样硬化的关系[J]. 临床内科杂志, 2018, 35(8): 563-564.
- [4] 毛拓华,刘丹,李竞,等. 利拉鲁肽通过 p38 丝裂原活化蛋白激酶和 c-Jun 氨基末端激酶通路抑制高糖培养的 H9c2 细胞凋亡[J]. 临床内科杂志, 2017, 34(10): 699-702.
- [5] 王芳,张迎辉. 胱抑素 C、纤维蛋白原及 24h 尿蛋白定量与紫癜性肾炎患儿肾脏病理分级的相关性研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2016, 18(3): 233-237.
- [6] 国荣,于琳华. 细胞凋亡在增殖性肾小球疾病中的作用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2001, 22(3): 293-294.
- [7] Yang B, Johnson TS, Thomas GL. A shift in the Bax/Bcl-2 balance may activate caspase-3 and modulate apoptosis in experimental glomerulonephritis[J]. Kidney Int, 2002, 62(4): 1301-1313.

(收稿日期:2018-07-04)

(本文编辑:张一冰)