

# 乙酰肝素酶和核因子- $\kappa$ B在原发性膜性肾病患者肾小球内的表达及意义

姚素花, 郭文友

(中国石油中心医院肾内科, 河北廊坊 065000)

[摘要] 目的: 探讨乙酰肝素酶(heparanase, Hpa)和核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)在原发性膜性肾病(idiopathic membranous nephropathy, IMN)患者肾小球中的表达与蛋白尿、血肌酐的关系。方法: 用免疫组化法检测36例IMN患者与6例正常对照者肾小球内Hpa和NF- $\kappa$ B的表达情况。结果: Hpa和NF- $\kappa$ B在对照组正常肾组织的肾小球基底膜及肾小管上皮细胞仅有少量表达; 在IMN组肾小球基底膜及肾小管上皮细胞的表达较对照组均明显增强( $P < 0.01$ )。一期IMN组与二期IMN组比较, 肾小球内Hpa、NF- $\kappa$ B的表达无显著性差异( $P > 0.05$ )。IMN组肾小球内Hpa、NF- $\kappa$ B与24h尿蛋白定量存在正相关关系( $P < 0.01$ ); 与血肌酐无相关性。Hpa与NF- $\kappa$ B之间呈正相关( $P < 0.05$ )。结论: NF- $\kappa$ B、Hpa的异常表达参与IMN的肾病理损害与蛋白尿的形成。本实验结果可为IMN的治疗策略进一步提供参考, 即适当下调NF- $\kappa$ B及Hpa有益于IMN的转归。

[关键词] 原发性膜性肾病; 乙酰肝素酶; 核因子- $\kappa$ B; 蛋白尿

[中图分类号] R692

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-7210(2007)10(c)-009-03

## Clinical significance of expression Hpa and NF- $\kappa$ B in glomeruli of idiopathic membranous nephropathy

YAO Su-hua, GUO Wen-you

(Department of Nephrology, The Central Hospital of Petrol China, Langfang 065000, China)

[Abstract] Objective: To explore the expression of Hpa and NF- $\kappa$ B in glomeruli of patients with idiopathic membranous nephropathy(IMN)and its relationship with albuminuria and serum creatinine. Methods: Immunohistochemistry was applied to detect the expression of Hpa and NF- $\kappa$ B in renal glomerulus of patients with IMN and control group. Results: Hpa and NF- $\kappa$ B expressed at a low level in the glomerular basement membrane and in the tubular epithelial cells in control group. Compared with control group, the expressions of Hpa and NF- $\kappa$ B were significantly increased in IMN group( $P < 0.01$ ). There was no significant difference of the expression of Hpa and NF- $\kappa$ B between stage I IMN group and stage II IMN group ( $P > 0.05$ ). The expressions of Hpa and NF- $\kappa$ B positively correlated with the urine protein quantitation in 24 hours; moreover the expressions of Hpa and NF- $\kappa$ B did not correlate with serum creatinine. Hpa positively correlated with NF- $\kappa$ B. Conclusion: The abnormal expressions of NF- $\kappa$ B and Hpa may correlate with the renal pathology and the development of proteinuria in patients with IMN; there were correlation between Hpa and NF- $\kappa$ B. The result of the experiment provides evidence for the therapy of IMN, namely, down-regulation of NF- $\kappa$ B and Hpa was good for the recovery of IMN.

[Key words] Idiopathic membranous nephropathy; Heparanase; Nuclear factor- $\kappa$ B; Urine protein

乙酰肝素酶(heparanase, Hpa)是一种葡糖苷酸内切酶,可水解乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)。HSPG的减少可导致GBM的选择通透性改变以及肾小球上皮细胞和内皮细胞锚连位点的丧失,同时释放多种生长因子,包括成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)、血管内皮生长因子(VEGF)等<sup>[1-6]</sup>。核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)是一种具有多向性调节作用的核转录因子,与多种基因特别是免疫炎症相关基因的转录调节密切相关<sup>[7,9]</sup>。鉴于上述两个因子的作用尚未定论,且无两种因子在IMN患者肾小球内表达变化及其意义的系统报道,我们采用免疫组化的方法同步检测Hpa、NF- $\kappa$ B在IMN患者肾小球内的表达情况,以了解Hpa、NF- $\kappa$ B之间的关系及其对IMN的影响,为IMN的治疗提供依据。

### 1 对象与方法

#### 1.1 一般资料

病例来源于2005年11月~2007年8月在本院肾内科病房诊治的36例原发性膜性肾病患者,所有患者均为首次

经临床和病理检查确诊者。6例正常对照肾组织来自因肾脏良性肿瘤行一侧肾脏切除术患者的远离病灶的正常肾组织。

1.1.1 入选标准 IMN患者肾组织标本切片后分别经HE、PAS、MASSON及MASSON+PAS染色,在光镜下可见肾小球上皮嗜复红蛋白沉积,肾小球基底膜表现弥漫均匀增厚、空泡变、钉突形成、或链环样改变等;免疫荧光可见IgG、C3沿肾小球毛细血管袢沉积;电镜下可见足细胞下电子致密物沉积。

1.1.2 排除标准 结缔组织病、肝炎病毒、慢性肝炎、恶性实体肿瘤等相关性IMN患者,肾穿刺活检前曾服用过皮质类固醇激素、细胞毒药物、他汀类降脂药物、血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)及血管紧张素受体拮抗剂(ARB)类药物的IMN患者。

#### 1.2 分组方法

1.2.1 实验组(IMN组) 36例IMN患者,男21例,女15例,平均年龄43岁。IMN组根据病理改变分期再分为两个亚组,

其中 期 IMN 组 30 例,男 18 例,女 12 例,平均年龄 45 岁; 期 IMN 组 6 例,男 3 例,女 3 例,平均年龄 33 岁。

1.2.2 对照组 6 例因肾脏良性肿瘤行一侧肾切除术患者,其中男 5 例,女 1 例,平均年龄 46 岁,肾组织标本取自远离病灶周围的正常肾组织。

### 1.3 临床观察指标

血清肌酐、白蛋白、血脂、免疫球蛋白及补体;尿沉渣、24 h 尿蛋白定量。

### 1.4 免疫组化检查

按 SP 法进行。肾组织切片 3  $\mu\text{m}$ ,常规脱蜡、水化,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温下孵育。0.1 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中行高压抗原修复。10%正常山羊血清封闭。一抗分别为兔抗人乙酰肝素酶单克隆抗体(稀释 1 75 购自武汉博士德试剂公司);兔抗人 NF- Bp65 单克隆抗体(稀释 1 200 购自碧云天试剂公司),37  $^{\circ}\text{C}$  孵育。生物素标记山羊抗兔、大鼠、小鼠和豚鼠 IgG 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育。辣根酶标记链酶卵白素工作液 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育。DAB 显色。苏木素复染。以 PBS 替代一抗作为阴性对照。

### 1.5 免疫组化结果判定

在胞浆或胞膜处有棕黄色或棕红色颗粒状物质沉积为阳性细胞,不着色为阴性。采用北航病理图像分析系统,通过光学显微镜放大 400 倍摄取图像,输入图像分析系统内,对图像进行灰度变换,使阳性面积与背景分开,进行自动测量。肾小球 Hpa、NF- B 免疫组化阳性面积测定:在光学显微镜计算机图像分析系统屏幕上,每例标本 400 倍镜下随机观察 5 个肾小球,分别计算每个指标的阳性面积与整个肾小球面积的比值,取其平均值作为每例标本每个指标肾小球阳性面积的比值。

### 1.6 统计学方法

统计学分析均采用 SPSS11.0 计算机软件包处理,计量资料采用均数  $\pm$  标准差表示,样本均数间比较采用 t 检验,组间比较采用方差分析,各参数间的相关性分析采用 Pearson 相关分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 临床指标(表 1)

项目	期 IMN 组	期 IMN 组	对照组
N	30	6	6
Age(Years)	44.79 $\pm$ 14.45	33.40 $\pm$ 9.21	46.05 $\pm$ 10.12
Sex(M/F)	18:12	3:3	5:1
Upro(g/24 h)	4.29 $\pm$ 1.98	4.56 $\pm$ 2.55	0.02 $\pm$ 0.01
ALB(g/L)	27.17 $\pm$ 7.20	24.32 $\pm$ 9.16	43.25 $\pm$ 3.87
Scr( $\mu\text{mol/L}$ )	82.75 $\pm$ 17.84	74.30 $\pm$ 12.37	69.74 $\pm$ 10.2

### 2.2 免疫组化

2.2.1 Hpa 表达情况 Hpa 在对照组正常肾组织的肾小球基底膜、肾小球足细胞、系膜细胞及肾小管上皮细胞有少量表达。Hpa 在 IMN 患者肾组织的肾小球基底膜及肾小管上皮细胞有表达。IMN 期组及 期组与对照组比较,肾小球内 Hpa 表达明显增强(P<0.01); 期 IMN 组与 期 IMN 组比较,肾小球内 Hpa 表达差异无显著性(P>0.05)(表 2)。

表 2 IMN 与对照组患者肾小球 Hpa 和 NF- B 的表达情况

组别	例数	Hpa(%)	NF- B(%)
期 IMN 组	30	51.20 $\pm$ 7.89*	41.46 $\pm$ 4.86*
期 IMN 组	6	46.18 $\pm$ 3.08*	48.82 $\pm$ 1.73*
对照组	6	22.21 $\pm$ 2.32	21.23 $\pm$ 2.90

与对照组比较,\* P<0.01

2.2.2 NF- B 表达情况 NF- B 在对照组正常肾组织的肾小球足细胞、系膜细胞、肾小管上皮细胞有少量表达。NF- B 在 IMN 患者肾小球足细胞、系膜细胞、肾小管上皮细胞有大量表达。IMN 期组及 期组与对照组比较,肾小球内 NF- B 表达明显增强(P<0.01); 期 IMN 组与 期 IMN 组比较,肾小球内 NF- B 表达差异无显著性(P>0.05)(表 2)。

### 2.3 免疫组化指标与临床指标相关性分析

Hpa 与 24 h 尿蛋白定量呈正相关关系,r=0.54,P<0.01,有统计学意义;NF- B 与 24 h 尿蛋白定量呈正相关关系,r=0.50,P<0.05,有统计学意义。二者与血肌酐均无相关性。

### 2.4 Hpa、NF- B 之间的相关性分析

Hpa 与 NF- B 之间呈正相关关系,r=0.40,P<0.05,有统计学意义。

## 3 讨论

IMN 的病因及发病机理并不十分清楚。可能涉及到基因多态性<sup>[9]</sup>、自身免疫、炎症反应、矫枉失衡等多方面的问题。IMN 病变主要位于肾小球滤过膜,以肾小球脏层上皮细胞下嗜复红物质广泛沉积、肾小球基底膜(glomerular basement membrane, GBM)空泡变、僵硬、增厚、“钉突”形成、链环变等为特征。

肾小球滤过膜主要包括有孔的内皮细胞、GMB 和上皮细胞。型胶原形成 GBM 的基本骨架,其间还填充着许多物质,包括层粘连蛋白、纤维连接蛋白、巢蛋白、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)等。由于 GBM 参与肾小球滤过膜的滤过,以上成分的改变均可能影响肾小球的滤过功能而出现蛋白尿。

HSPG 是由足细胞和壁层上皮细胞分泌的位于细胞表面、细胞外基质及基底膜的大分子生物物质,由一个核心蛋白、硫酸乙酰肝素(heparin sulfate, Hs)及 GAGs 侧链组成。HSPG 是 ECM 中非结构蛋白的重要组分,其通过与 ECM 及细胞的结合发挥生物学功能。HSPG 的作用主要是为肾小球滤过膜的电荷屏障提供负电荷,也可作为足细胞、内皮细胞和壁层上皮细胞的附着点。Hs 为 HSPG 带阴离子的侧链,Hpa 于 D-葡萄糖醛酸和 N-乙酰葡萄糖间糖苷键裂解长链 Hs,使 Hs 成为小分子片段,释放 Hs 相连的致炎因子,破坏 HSPG,从而调节细胞表面和 ECM 与 HSPG 结合的各种活性因子的生物学作用,同时还可使 HSPG 上结合的负电荷减少,使 GBM 的电荷屏障受损。HSPG 的减少可导致 GBM 的选择通透性改变以及肾小球上皮细胞和内皮细胞锚连位点的丧失,同时释放与 HSPG 结合的多种生长因子,包括成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)、血管内皮生长因子(VEGF)等。相关生长因子的释放可修复 GBM,如不能修复则使 GBM 形成瘢痕<sup>[11]</sup>。炎症刺激、血小板活化可刺激 Hpa 释放。Hpa 可诱导炎症基因表达,并可激活内皮细胞产生直接的血管原性反应。Hpa 的活性与免疫细胞穿透 ECM 屏障有关,Hpa 抑制剂具有抗炎活性<sup>[12,13]</sup>。本实验结果表明:Hpa 在对照组正常肾小

球内仅少量表达,而在IMN组肾小球内的表达期与期均明显高于对照组,且与24h尿蛋白定量呈正相关,提示Hpa参与IMN蛋白尿的形成。此研究有别于Holt等<sup>[14]</sup>的结果,但与Vicki等<sup>[2]</sup>的动物实验结果一致。

NF- $\kappa$ B是一种具有多向性调节作用的核转录因子,具有有利和有害两方面的作用。一方面参与某些细胞生长调控,具有抗细胞凋亡的作用<sup>[15]</sup>;另一方面NF- $\kappa$ B在足细胞内被激活,可参与免疫和炎症反应,与蛋白尿形成有关<sup>[16,17]</sup>。另有研究证实大量持续蛋白尿可激活NF- $\kappa$ B的基因表达,并上调依赖NF- $\kappa$ B的炎症基因,加重蛋白尿<sup>[18]</sup>。许多研究也发现NF- $\kappa$ B与蛋白尿有关<sup>[19,20]</sup>。本实验结果显示:NF- $\kappa$ B在正常对照组肾小球内仅少量表达,在IMN组患者肾小球内表达明显增加,且与24h尿蛋白定量呈正相关,提示NF- $\kappa$ B参与IMN蛋白尿的形成。

NF- $\kappa$ B调节Hpa的表达,阻断NF- $\kappa$ B信号转导途径,可下调Hpa的表达<sup>[21]</sup>。NF- $\kappa$ Bp65亚单位活性与Hpa表达水平呈正相关<sup>[22]</sup>。本实验结果显示:NF- $\kappa$ B活性与Hpa表达呈正相关,提示IMN肾小球内Hpa、NF- $\kappa$ B二者对IMN蛋白尿形成的影响不是孤立的,二者之间可能有一定的协同作用。以上均表明:Hpa、NF- $\kappa$ B两因子之间具有一定的相关性,其中NF- $\kappa$ B起中心调节作用。

综上所述,本文探讨了NF- $\kappa$ B、Hpa在IMN患者肾小球内的表达及意义。实验结果提示肾小球内NF- $\kappa$ B、Hpa的异常表达对IMN的发展及蛋白尿的形成具有一定作用。通过对IMN患者肾小球内NF- $\kappa$ B、Hpa表达的认识,可以为IMN患者的适当治疗提供依据。

#### [参考文献]

- [1] Levidiotis V, Freeman C, Tikellis C, et al. Heparanase inhibition reduces proteinuria in a model of accelerated anti-glomerular basement membrane antibody disease [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2005,10 (2):167-173.
- [2] Vicki L, Craig F, Chris T, et al. Heparanase is involved in the pathogenesis of proteinuria as a result of glomerulonephritis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004,15:68-78.
- [3] Kathy P, Geoffrey K, Mary P, et al. Heparin-binding epidermal factor in experimental models of membranous and minimal change nephropathy [J]. *Kidney International*, 1998,55:1162-1171.
- [4] Van den Hoven MJ, Rops AL, Bakker MA, et al. Increased expression of heparanase in overt diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2006,70(12):2100-2108.
- [5] Kramer A, van den Hoven M, Rops A, et al. Induction of glomerular heparanase expression in rats with adriamycin nephropathy is regulated by reactive oxygen species and the renin-angiotensin system [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(9):2513-2520.
- [6] Maxhimer JB, Somenek M, Rao G, et al. Heparanase-1 gene expression and regulation by high glucose in renal epithelial cells [J]. *Diabetes*, 2005,54:2172-2178.
- [7] Guijarro C, Kim Y, Kasiske BL, et al. Central role of the transcription factor NF- $\kappa$ B in mesangial cell production of chemokines [J]. *Contrib Nephrol*, 1997,120(2):210-218.
- [8] Ohqa S, Shikata K, Yozai K, et al. Thiazolidinedione ameliorates renal injury in experimental diabetic rats through anti-inflammatory effects mediated by inhibition of NF- $\kappa$ B activation [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 292(4): F1141- F1150.
- [9] Tomita N, Morishita R, Lan HY, et al. In vivo administration of a nuclear transcription factor- $\kappa$ B decoy suppresses experimental crescentic glomerulonephritis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000,11:1244-1252.
- [10] Thibaudin D, Thibaudin L, Berthoux P, et al. TNFA2 and d2 alleles of the tumor necrosis factor alpha gene polymorphism are associated with onset/occurrence of idiopathic membranous nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2007,71(5):431-437.
- [11] Vicki L, Jone K, Frank LI, et al. Increased expression of heparanase in puromycin aminonucleoside nephrosis [J]. *Kidney International*, 2001,60:1287-1296.
- [12] Svetlana GV, Anna I, Moshe Y, et al. Heparanase induces endothelial Cell Migration Via Protein Kinase B/Akt Activation [J]. *The Journal OF Biological Chemistry*, 2004,279(22):23536-23541.
- [13] Vicki L, Craig F, Malcolm P, et al. A synthetic heparanase inhibitor reduces proteinuria in passive Heymann nephritis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(11):2882-2892.
- [14] Holt RC, Webb NJ, Ralph S, et al. Heparanase activity is dysregulated in children with steroid-sensitive nephritic syndrome [J]. *Kidney Int*, 2005,67(1):122-129.
- [15] Shukla S, MacLennan GT, Fu P, et al. Nuclear factor- $\kappa$ B/p65 (RelA) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression [J]. *Neoplasia*, 2004,6(4):390-400.
- [16] Mudge SJ, Paizis K, Auwardt RB, et al. Activation of nuclear factor- $\kappa$ B by podocytes in the autologous phase of passive Heymann nephritis [J]. *Kidney International*, 2001,59:923-931.
- [17] Mezzano S, Aros C, Droguett A, et al. NF- $\kappa$ B activation and over-expression of regulated genes in human diabetic nephropathy [J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2004, 19(10):2505-2512.
- [18] Rangan GK, Wang YP, Tay YC, et al. Inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B activation reduces cortical tubulointerstitial injury in proteinuric rats [J]. *Kidney International*, 1999,56:118-134.
- [19] Gomez-Garre D, Largo R, Tejera N, et al. Activation of NF- $\kappa$ B in tubular epithelial cells of rats with intense proteinuria [J]. *Hypertension*, 2001, 37:1171.
- [20] Mezzano SA, Barria M, Droguett MA, et al. Tubular NF- $\kappa$ B and AP-1 activation in human proteinuric renal disease [J]. *Kidney International*, 2001,60:1366-1377.
- [21] Andela VB, Schwarz EM, Puzas JE, et al. Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappa B [J]. *Cancer Res*, 2000, 60:6557-6562.
- [22] Cao HJ, Fang Y, Zhang X, et al. Tumor metastasis and the reciprocal regulation of heparanase gene expression by nuclear factor kappa B in human gastric carcinoma tissue [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(6):903-907.

(收稿日期:2007-08-24)