

· 临床研究 ·

尿中足细胞数量在原发性膜性肾病中的变化*

尚 瑜, 吴 戈, 严琴琴

(西安医学院临床医学院内科教研室, 西安 710021)

摘要:目的 比较原发性膜性肾病患者和健康人的尿足细胞数,探讨尿足细胞与原发性膜性肾病之间的关系,为进一步探索原发性膜性肾病的发病机制做铺垫。方法 采用间接免疫荧光法以抗 PCX 单克隆抗体对尿沉渣进行染色。对比 40 例原发性膜性肾病患者及健康体检者尿足细胞数,比较不同病理分期膜性肾病患者尿足细胞数。结果 实验组患者尿足细胞数明显高于对照组,Ⅱ期和Ⅲ期膜性肾病患者尿足细胞数较Ⅰ期膜性肾病患者明显减少。结论 原发性膜性肾病患者尿足细胞数较正常人升高。在膜性肾病早期尿足细胞数较多,随着病理改变的加重尿足细胞数减少。

关键词:肾病;足细胞;肾组织活检

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.19.016

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)19-1915-03

Changes in number of urinary podocytes of primary membranous nephropathy patients*

Shang Yu, Wu Ge, Yan Qinqin

(Division of Internal Medicine Teaching and Research, College of Clinical Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between urinary podocytes and primary membranous nephropathy by comparing the changes in quantity of urinary podocytes of primary membranous nephropathy patients and healthy individuals, thus to set a foundation for further exploring into pathogenesis of primary membranous nephropathy. Methods Adopting indirect immunofluorescent method to dye arena by PCX single clone antibody to make a contrast concerning the number of urinary podocytes of 40 primary membranous nephropathy patients and that of healthy individuals, to find the variations of urinary podocytes number at different pathological stages. Results The number of urinary podocytes for the test group was obviously above that of control group. The number of urinary podocytes for membranous nephropathy patients at the second and third phase was apparently decreased compared with that at the first phase. Conclusion The number of urinary podocytes in primary membranous nephropathy patients is above than that of healthy individuals. At the early stage the number of urinary podocytes decreases with the aggravating of pathological change.

Key words: nephrosis; podocytes; renal tissue biopsy

特发性膜性肾病 (idiopathic membranous nephropathy, IMN) 是成人原发性肾小球疾病的常见病理类型之一,占成人原发肾病综合征 (nephrotic syndrome, NS) 的 20%~40%,其治疗一直颇受重视^[1]。以肾小球脏层上皮细胞 (podocytes) 下免疫复合物 (immunity compound, IC) 弥漫性沉积、基底膜 (glomerular basement membrane, GBM) 增厚伴钉突形成成为病理特征。本院自 1981 年以来肾穿刺诊断为膜性肾病 (membranous nephropathy, MN) 的 182 例,占原发性肾小球疾病 (3 856 例) 的 4.71%。其病变进展缓慢,对治疗不敏感,约 1/3 逐渐发展,最终进入肾功能不全^[2]。其发生机制不完全清楚,目前大多数观点认为 MN 是一种针对足细胞 (podocyte) 细胞膜抗原成分,由自身抗体介导的肾小球损伤^[3]。近几年研究发现,在许多原发和继发性肾小球疾病患者尿液中可见到足细胞病变,而且足细胞病变参与了肾小球疾病尿蛋白的形成和肾小球硬化^[4-5],多种因素可导致足细胞的损伤,包括抗足细胞膜抗体、代谢因素、血流动力学改变、基因突变、蛋白负荷过重、中毒、感染等。足细胞损伤引起的一系列肾脏病统称为足细胞病,主要的病理类型包括局灶节段性肾小球硬化 (FSGS)、MN、

微小病变肾病 (MCD)、膜增生性肾小球肾病 (MPGN) 等^[6]。

足细胞是贴覆于 GBM 表面的终末期分化细胞,在 GBM 上伸出许多叫作足突的突起,足突互相连接形成如指状交叉相接的栅栏状结构为裂孔,裂孔上覆有一层 4~6 nm 厚的薄膜,称为裂孔膜 (slit membrane, SD)^[7-8]。足细胞的特殊结构决定了其特殊的功能,可以总结为:(1)蛋白滤过的分子屏障;(2)蛋白滤过的电荷屏障;(3)抵抗肾小球内压力;(4)维持肾小球毛细血管祥的空间结构;(5)合成维持 GBM 完整的成分;(6)合成分泌血管内皮生长因子,维持肾小球内皮细胞的功能完整性^[9]。足细胞即肾小囊脏层上皮细胞,位于滤过膜的最外层,对于维持肾小球正常形态结构和功能十分重要,但对于足细胞的研究却因为实验方法的局限性而停滞不前。已知足细胞表达几种特异性标志蛋白 PCX (Podocalyxin)、WT1、podocin、synaptopodin,其中 80 年代发现的 PCX 是足细胞主要标志蛋白^[10]。当足细胞由上皮细胞前体分化出来时, podocalyxin 最先表达于足细胞顶端的表面。抗原应用单克隆抗体可以检测到。而且研究发现:表达其他几种标志蛋白的足细胞几乎都表达 PCX,故通常用抗 PCX 单克隆抗体来鉴别足细胞。由于

* 基金项目:陕西省卫生厅科学研究基金资助项目(2010E09)。

这种蛋白主要表达在肾小球上皮细胞而不表达于其他的尿道上皮细胞,因此,用其来发现和定量尿中足细胞的脱落,对评价肾小球疾病中足细胞的损伤是有意義的^[11]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2004 年 1 月至 2008 年 12 月在西安交通大学医学院第一附属医院肾脏内科住院的患者 40 例为实验组,年龄 15~71 岁,平均(41.3±13.8)岁。其中男 25 例,平均年龄(42.3±16.5)岁。女 15 例,平均年龄(39.7±8.0)岁。对照组为同一时期的 30 名健康体检者,年龄 18~74 岁,平均(40.9±16.2)岁。其中男 18 例,平均年龄(43.5±16.5)岁。女 12 例,平均年龄(37.5±15.7)岁。用四格表 χ^2 检验法比较两组的性别构成(表 1),结果 χ^2 值为 0.045($P>0.05$),故认为两组性别的构成差异无统计学意义。将两组研究对象按小于 30 岁、30~50 岁和大于 50 岁三个年龄段划分,统计各年龄段的人数,用行×列表资料的 χ^2 检验法比较两组的年龄构成(表 2)。结果显示卡方值为 0.095($P>0.05$),故认为两组研究对象年龄的构成差异无统计学意义。

1.2 纳入和排除标准 经肾穿刺术组织标本用 HE 染色、PAS 染色、Masson 染色和免疫荧光染色方法确诊为 MN。且排除以下继发性 IMN:(1)结缔组织病引起的 MN,如狼疮性肾炎、类风湿关节炎相关 MN;(2)乙型肝炎病毒相关性肾炎;(3)丙型肝炎病毒相关性肾炎;(4)过敏性紫癜性肾炎;(5)新生物所致 MN,如肺癌、乳腺癌、胃肠道及肾脏肿瘤引起的 MN;(6)药物所致 MN,如金制剂、汞、青毒胺、非固醇类消炎药等;(7)IgA 肾病中的膜性病型。共 40 例原发性膜性肾病患者入选,另选同一时期的 30 例健康体检者作为对照组。

表 1 实验组和对照组患者性别比较(n)

| 组别 | 男 | 女 | χ^2 | P |
|-----|----|----|----------|-------|
| 实验组 | 25 | 15 | 0.045 | 0.832 |
| 对照组 | 18 | 12 | | |

表 2 实验组和对照组患者年龄构成比较(n)

| 组别 | <30 岁 | 30~50 岁 | >50 岁 | χ^2 | P |
|-----|-------|---------|-------|----------|-------|
| 实验组 | 7 | 24 | 9 | 0.095 | 0.953 |
| 对照组 | 6 | 17 | 7 | | |

1.3 观察指标 每位患者入院后、肾穿刺前某日(一般为肾穿刺前 2 d)24 h 避免剧烈运动,经 12 h 空腹过夜,留取晨尿 100 mL 检测尿中足细胞。30 例健康人以同样方法留取标本。

1.4 尿足细胞的检测 查阅文献,结合北京大学的实验经验以及本室预实验结果得出最佳的尿足细胞免疫荧光检测方法。

1.4.1 制做切片 每位患者于入院后、肾穿刺前某日(一般为肾穿刺前 2 d)留取清洁中段晨尿 100 mL,离心机以 1 800 r/min 的转速离心 5 min,弃上清液,将剩余的尿沉渣混匀,取沉渣每孔 50 μ L 置自动涂片离心机(SHANDON,cat NO 740)中,以 1 200 r/min 的转速离心 2 min,取出玻片室温下干燥,然后用丙酮在 4 $^{\circ}$ C 下固定 10 min,自然干燥。

1.4.2 免疫荧光染色 将上述待染标本的载玻片以 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)轻洗 2 次,湿润;置 1%(质量分数)曲拉通 X-100,浸泡 5 min;室温下 1%(质量分数)牛血清清蛋

白 ALB(BSA)封闭 30 min,然后滴加一抗,小鼠抗人 Podocalyxin 单克隆抗体(北京大学肾内科赠予)体积比 1:20 稀释,4 $^{\circ}$ C,8 h 以上,滴加二抗,FITC 荧光标记山羊抗小鼠 IgG,体积比 1:75 稀释,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,碘化丙啶染核,甘油封片,显微镜下观察并计算每高倍镜下足细胞平均值。

1.4.3 观察方法 由 2 位本文作者在荧光显微镜下共同观察,每份标本低倍镜视野观察全片,高倍镜下确认 PCX 标记足细胞。然后选择全片左上、左下、右上、右下和中间 5 个不同部位 10 个高倍视野,记录完整足细胞数。

1.5 常规肾脏病理检查 肾脏病理检查所有患者在 B 超引导下行经皮肾穿刺活检术,肾活检方法采用超声实时探测引导下 Tru-Cut 穿刺针穿刺获得。所取肾组织分别行光镜检查及免疫病理检查。步骤如下:(1)分取组织及固定;10%中性甲醛固定 4 h;(2)脱水到蜡;(3)石蜡包埋;(4)4 μ m 切片;水浴箱展片捞片,玻片预处理(蛋清甘油混合物);(5)温箱 60 $^{\circ}$ C 2 h 烤片;(6)分别行 HE、PAS、PASM、Masson 染色观察病理变化并进行膜性肾病分期诊断。

2 结果

2.1 实验组和对照组尿足细胞比较 用两独立样本 *t* 检验法比较实验组和对照组间尿足细胞(表 3)。结果显示 $t=15.7$ ($P<0.01$),差异均有统计学意义,即实验组患者尿足细胞数明显高于对照组。

表 3 实验组与对照组患者尿足细胞比较($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | 足细胞(个/10 HP) | <i>t</i> | P |
|-----|--------------|----------|-------|
| 试验组 | 8.2±3.3 | | |
| 对照组 | 0±0 | 15.7 | 0.001 |

2.2 不同病理分期比较 使用方差分析比较不同病理分期组患者尿足细胞计数的差异。从检验结果可以看出不同病理分期的膜性肾病患者尿足细胞计数比较差异有统计学意义($P<0.01$),进一步用 Bonferroni 法进行组间两两比较,可以看出 I 期和 II 期、I 期和 III 期患者间尿足细胞计数比较差异均有统计学意义,而 II 期和 III 期间患者尿足细胞计数比较差异无统计学意义(表 4)。

表 4 尿足细胞组间两两比较(P 值)Bonferroni 法

| 分期 | I 期 | II 期 | III 期 |
|-------|-------|-------|-------|
| I 期 | — | 0.018 | 0.016 |
| II 期 | 0.018 | — | 1.000 |
| III 期 | 0.016 | 1.000 | — |

—:表示无此项。

3 讨论

3.1 IMN 与足细胞损伤 膜性肾病发病机制尚未研究清楚,但早在 1959 年 Heymann 就成功地制造了 MN 的动物模型,即 Heymann 肾炎模型。其病理改变及临床表现完全与人类 MN 相似。后由 Debiec 等^[12]第一次证实了人类 MN 抗原的存在,他发现体内缺乏中性肽链内切酶(NEP,一种足细胞膜蛋白)的母亲在怀有正常胎儿时会产生针对 NEP 的抗体,这些抗体穿过胎盘进入胎儿体内,与患儿足细胞上的 NEP 结合,形成原位免疫复合物,导致新生儿 MN^[13]。虽然这类患者仅占 MN 的

很少一部分,但这个发现使人们相信,一定存在更多的、尚不为人所知的足细胞抗原参与了 MN 的发生。

目前对膜性肾病发病机制的研究认为:MN 是一种针对足细胞细胞膜抗原成分,由自身抗体介导的肾小球损伤。当循环抗体与足细胞表面的受体相关蛋白 RAP 结合后,形成上皮原位免疫复合物;或外源性抗原以循环免疫复合物沉积于上皮区。继而激活补体形成膜攻击复合物 C5b-9。后者插入足细胞膜,形成细胞膜上的裂孔致足细胞机械性损伤;激活足细胞,使活性氧化物的产生增加,启动脂质过氧化反应,降解 GBM,使基底膜受损;刺激足细胞产生能够分解 GBM 的蛋白酶;诱导连接 GBM 与肾小球上皮细胞的黏附分子功能的改变,主要表现为足细胞结构中以肌动蛋白为主的细胞骨架系统和足细胞中表达的特异性蛋白分子异常,从而使足细胞裂孔膜和细胞骨架的异常^[14],足细胞功能异常使滤过膜出现缺陷,导致蛋白尿产生;上调 IV 型胶原的表达等,导致肾小球 GBM 的增厚。所以说 IMN 的发生与足细胞密切相关。当足细胞受损时,早期可能是形态变化,最终从肾小球基底膜上分离、脱落,从尿中丢失肾小球内足细胞数量和密度减少^[15],滤过屏障的正常结构被破坏,肾小球基底膜裸露,与包曼囊粘连,即球囊粘连,启动肾小球硬化。

临床上通常以肾活检病理检查作为诊断各种肾脏疾病的金指标。由于肾活检是一项有创检查,在一定程度上受医疗条件及患者本身条件限制,而且不能用于追踪观察。尿蛋白是通常临床使用的观测指标。Yu 等^[16]认为尿足细胞评估肾小球损伤比尿蛋白更敏感。检测尿足细胞是新近发展起来的一项无创检查,此方法的临床应用价值值得关注。本文对 40 例 IMN 患者进行尿足细胞检测,发现所有患者尿中有足细胞排出,而 30 例健康人尿中未发现足细胞。

3.2 尿足细胞与病理改变 IMN 的病理特点是在肾小球基底膜外侧有免疫复合物的沉积,造成基底膜增厚、“钉突”形成,系膜区多正常。早期肾小管间质基本正常,晚期时可发生小管萎缩,间质纤维化。免疫荧光染色以 IgG 和 C3 为主,并呈弥漫性均匀一致的颗粒状沿基底膜分布,有时可见和 C4C1q 沉着。

因为 IMN 起病时蛋白尿、高血压等临床症状较明显,容易被发现,所以患者初诊时多为 I 期和 II 期。本文结果显示 I 期 IMN 患者尿足细胞数多于 II 期和 III 期 IMN 患者,分析其原因可能是发病初期肾脏病变活动性大,足细胞损伤严重,因而脱落从尿中丢失的足细胞数较多。足细胞是终末分化细胞,分裂增殖能力有限,一旦损伤,不能再生,随着病情的进展,足细胞的不断脱落,肾组织中足细胞数逐渐减少,尿中足细胞也减少。

总之,通过对 IMN 患者和健康人的回顾性临床研究,发现 IMN 患者尿足细胞数较正常人升高,表明 IMN 患者的确存在足细胞损伤,但其足细胞损伤的机制尚不清楚,有待进一步研究。尿足细胞定量是新近发展起来的一种检测方法,尽管对于尿足细胞在一些方面还存在着许多问题和未知,但由于其为一种无创性检查,随着人们对其认识的不断深入,检测方法的不断成熟,尿足细胞检测将越来越多地被用于 IMN 及其他原发性肾小球疾病的诊断、监测以及预后判断的研究。

参考文献:

- [1] Nachman PH, Jennette JC, Falk RJ. Primary glomerular disease//Brenner BM, ed. The Kidney[M]. 8th ed. Philadelphia; Saunders, 2008;987-1066.
- [2] 王惠. 足细胞损伤机制研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2008, 9(11):1018-1021.
- [3] 王瑞石. 膜性肾病的发病机制[J]. 肾脏病与透析移植杂志, 2006, 15(2):161-166.
- [4] Petermann A, Floege J. Podocyte damage resulting in podocy-turia; a potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity[J]. Nephron Clin Pract, 2007, 106(2):c61-66.
- [5] Spadlo A, Wyka K, Kowalewska-Pietrzak M, et al. Evaluation of the podocytes in urine in the nephrotic syndrome in childhood[J]. Pol Merkur Lekarski, 2007, 130(22): 254-257.
- [6] 郭丽琴. 足细胞标志蛋白及足细胞疾病[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2008, 9(2):172-176.
- [7] Pavenst H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte[J]. Physiol Rev, 2003, 83:253-307.
- [8] Marshall CB, Shankland SJ. Cellcycle and glomerular disease; aminireview[J]. Nephron Exp Nephrol, 2006, 102: 39-48.
- [9] Shankland SJ. The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis[J]. Kidney Int, 2006, 69(12):2131-2147.
- [10] 刘航. 足细胞表面标志及尿中足细胞的检测[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2003, 23(4):452-456.
- [11] 李惊子. 检测尿足细胞在活动性肾小球疾病中的意义[J]. 北京大学学报:医学版, 2005, 37(5):609-612.
- [12] Debiec H, Guignon V, Ronco PM, et al. Antenatal membranous glomerulonephritis due to anti-neutral endopeptidase antibodies [J]. N Engl J Med, 2002, 346: 2053-2060.
- [13] Kalnina Z, Silina K, Meistere I, et al. Evaluation of T7 and lambda phage display systems for survey of auto antibody profiles in cancer patients[J]. J Immunol Methods, 2008, 334(1-2):37-50.
- [14] 徐瑾. 足细胞相关蛋白研究进展[J]. 重庆医学, 2007, 36(20):2112-2115.
- [15] 洪亦眉. 足细胞损伤的病因和发病机制[J]. 肾脏病与透析移植杂志, 2009, 18(1):63-69.
- [16] Yu D, Petermann A, Kunter U, et al. Urinary podocyte loss is a more specific marker of ongoing glomerular damage than proteinuria[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(6): 1733-1741.