

· 临床研究 ·

## IgA 肾病患者肾组织内 synaptopodin 的表达及意义\*

陈道军, 吴明, 詹锋, 林书典, 符克英, 韩辉  
(海南省人民医院, 海口 570311)

**摘要:**目的 观察 synaptopodin 在 IgA 肾病患者肾组织中的表达, 并探讨其在肾组织分布特征、进行相关分析, 推测病情预后。方法 分析 202 例 IgA 肾病患者的肾活检组织标本, 按 Lee 分级系统分为 5 级及参照 Katakuchi 积分方法, 依据病变程度进行积分。对选取的样本经抗人 synaptopodin 单克隆抗体间接免疫荧光染色。用免疫荧光显微镜观察及图像分析软件进行定量分析肾组织中 synaptopodin 的表达情况, 测量平均光密度值, 然后进行统计学分析。结果 对 5 组的 IgA 肾病患者肾组织中 synaptopodin 所表达的平均光密度值进行比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 病理组织中 synaptopodin 所表达的平均光密度值与 Katakuchi 积分存在负相关关系 ( $r = -0.922, P < 0.01$ )。结论 synaptopodin 可做为判断肾纤维化程度及预后的重要指标之一。

**关键词:** 肾小球肾炎, IgA; synaptopodin; Lee 分级; Katakuchi 积分; 光密度测定法

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.30.007

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)30-3146-03

## Significance of synaptopodin protein expression in renal tissues in patients with IgA nephropathy\*

Chen Daojun, Wu Ming, Zhan Feng, Lin Shudian, Fu Keying, Han Hui

(Department of Nephrology and Rheumatology, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou, Hainan 570311, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of synaptopodin protein in renal tissue in patients with IgA nephropathy, discusses the distribution characteristics of synaptopodin in renal tissues, And putative prognosis after correlation analysis. **Methods** The study including 202 inpatients with IgA nephropathy, all the cases were divided into five grades according to the Lee's classification, referred to Katakuchi scoring system, and calculated pathological integrals according to the pathologic change degree in the renal tissue. Subsequently, the renal biopsy specimens were treated with mouse anti-IgG synaptopodin by indirect immunofluorescent stain. Expression intensity of synaptopodin was observed by fluorescence microscope and imagepro plus was applied to quantify the synaptopadin expression, measured the glomerular IOD SUM and area SUM and then the statistical analysis. **Results** The mean density of synaptopodin expression had a significantly different among the five groups of renal tissues in patients with IgA nephropathy ( $P < 0.01$ ), katakuchi scoring system of renal pathological change were gradually increased from grade I to IV. **Conclusion** Synaptopodin may be an important factor for predicting renal fibrosis and prognosis of IgA nephropathy.

**Key words:** glomerulonephritis, IgA; synaptopodin; Lee's classification; katakuchi scoring system; densitometry

IgA 肾病 (IgAN) 是一种多病因引起的以肾小球系膜区 IgA 沉积为主的系膜增生性肾小球肾炎, 已成为全球最常见的原发性肾小球疾病<sup>[1]</sup>。临床和病理表现多样化, 个体预后差异悬殊, 10%~20% 的成年患者在 10 年内可进展为终末期肾脏病<sup>[2]</sup>。迄今为止尚无一种分型能准确地反映患者的临床实际情况, 各个分型之间也很难达成一致。寻找肾脏病理组织中新的生物标志物以期预测 IgAN 病情的进展和预后, 指导临床治疗将成为此研究的目的。作者选取在本院经肾活检明确诊断为 IgAN 患者的肾活检组织标本作为研究对象, 应用间接免疫荧光技术, 观察 synaptopodin 在 IgAN 患者肾组织中的表达, 并探讨其在肾组织分布特征、进行相关分析, 推测病情预后。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 回顾分析 2003 年 6 月至 2009 年 9 月在本医院经肾活检明确诊断为 IgAN 患者的 202 例肾活检组织标本, 所有病例由一位高级职称病理医师独立阅片。所有标本已经过苦味酸液固定、石蜡包埋, 2 μm 厚度切片, 均行苏木素伊红染色 (HE)、过碘酸雪夫反应 (PAS)、六胺银染色 (PASM) 和马松三色染色 (Masson), 结合 IgA 等免疫荧光检测后已确诊为 IgAN, 所有染色标本均在冰箱中存放。复习病历, 排除狼疮性

肾炎、紫癜性肾炎及慢性肝病等继发性 IgAN 病例。所有病例在当初确诊时已按 Lee 分级系统<sup>[3-5]</sup>分为 I~V 级 (分类), 按分层抽样的原则, 用随机号码表抽取样本, 从各级中分别随机选取 10 例标本。分 5 组, 总共标本为 50 例。

## 1.2 方法

**1.2.1 资料分析** 对选取 50 例样本, 从冰箱中调出已染色的病理标本, 重新通过光镜观察, 参照 Katakuchi 积分方法<sup>[6]</sup>, 依据病变程度进行积分。

**1.2.2 间接免疫荧光染色** 从冰箱中调取出已选定的石蜡包块, 脱蜡、水洗、热修复抗原、加一抗 (Mouse Anti-IgG Synaptopodin) 4 ℃ 过夜。PBS (pH7.2~7.6) 洗涤 2 min × 3 次。滴加二抗 (1:40 稀释), FITC 标记的兔抗小鼠 IgG, 37 ℃ 30 min。PBS (pH7.2~7.6) 洗涤 2 min × 3 次。

**1.2.3 每份肾脏病理组织同时行阴性对照。**

**1.2.4 荧光显微镜观察结果。**

## 1.2.5 分析

**1.2.5.1 荧光图片拍照** 用免疫荧光显微镜观察 (×200)。把样品放到载物台上, 快速选择视野, 每视野有一个完整的肾小球, 选择 5 个视野, 立即拍照, 在拍摄荧光照片时, 确保每张

\* 基金项目: 2009 年度海南省自然科学基金资助项目 (309076)。

照片的拍摄条件完全一致。

**1.2.5.2 图片分析** 对所得的照片用 Imagerpro6.0 图像分析软件进行定量分析肾组织中 synaptopodin 的表达情况,测量每个肾小球截面总的积分光密度值(IOD SUM)及所测肾小球截面的面积(area SUM),计算出平均光密度值[mean density=(IOD SUM)/(area sum)]<sup>[7-8]</sup>。每例肾组织 mean density 由 5 个视野的相片经图像分析后取平均值。

**1.3 主要试剂及来源** synaptopodin 一抗(Mouse Anti-IgG Synaptopodin)购自美国 Fitzgerald Industries International 公司。二抗(1:40 稀释),FITC 标记的兔抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

**1.4 统计学处理** 数据结果计量资料列表来显示,因所有的病例按 Lee 分级分为 I~V 级为多个独立样本的等级计量资料,所以,5 组肾组织中 Synaptopodin 所表达的平均光密度值、Katafuchi 积分进行组间比较将采取 Kruskal-Wallis H 检验,通过观察平均秩次(mean rank)来判断组间数据变化。对 synaptopodin 所表达的平均光密度值与 Katafuchi 积分进行相关分析。采用 SPSS16.0 软件进行分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 肾组织中 synaptopodin 所表达的平均光密度值、Katafuchi 积分进行组间比较** 各组的平均光密度值见表 1,经 Kruskal-Wallis H 检验,从 I~V 级的平均秩次分别为 44.30、35.30、26.15、16.25、5.50,H 值为 44.026, $P<0.01$ ;可认为 5 组的平均光密度值有差异,可看出随着病情的加重,synaptopodin 的表达逐渐减少,见表 2。

**表 1 各组间 synaptopodin 所表达的平均光密度值**

I	II	III	IV	V
0.433 7	0.347 0	0.313 4	0.139 2	0.021 8
0.415 8	0.420 1	0.248 9	0.252 7	0.057 9
0.638 7	0.411 2	0.241 5	0.186 6	0.020 4
0.374 2	0.389 5	0.354 3	0.241 5	0.024 7
0.575 1	0.306 5	0.328 9	0.131 1	0.010 2
0.401 3	0.356 9	0.341 5	0.106 6	0.021 0
0.462 3	0.424 4	0.287 4	0.213 5	0.056 8
0.557 4	0.365 5	0.339 1	0.101 4	0.021 9
0.602 4	0.316 3	0.357 7	0.262 7	0.011 2
0.532 1	0.420 1	0.215 5	0.130 6	0.012 0

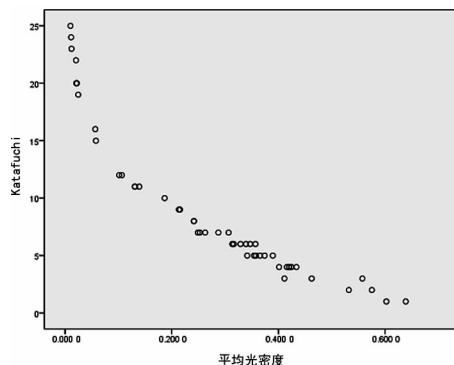
5 组样本通过光镜观察,参照 Katafuchi 积分方法,依据病变程度进行积分,经 Kruskal-Wallis H 检验结果:从 I~V 级的平均秩次分别为 7.00、16.60、23.80、34.60、45.50,H 值为 42.983, $P<0.01$ ;可认为 5 组的 Katafuchi 积分值有差异,可看出随着病情的加重,Katafuchi 积分值逐渐增大,见表 2。

**表 2 平均光密度及 Katafuchi 积分的各组平均秩次**

项目	I	II	III	IV	V	K-W
平均光密度	44.30	35.30	26.15	16.25	5.50	$P<0.01$
Katafuchi 积分	7.00	16.60	23.80	34.60	45.50	$P<0.01$

**2.2 所有选取病例的肾脏组织中平均光密度值与 Katafuchi**

病理评分值间的相关性分析 通过统计学的 Spearman 相关分析, $r=-0.992,P<0.01$ ,故认为所有选取的病例,肾脏组织中 synaptopodin 蛋白所表达的平均光密度值与 Katafuchi 病理评分值之间呈负的直线相关。



**图 1 所有病例的平均光密度与 Katafuchi 积分之间相关分析**

**3 讨 论**

Barisoni 等<sup>[9]</sup>报道了 synaptopodin 在局灶性节段性肾小球硬化(FSGS)和 HIV 相关性肾病表达下调,而在正常儿童与 MCD 患者间无差别。Kemeny 等<sup>[10]</sup>观察到在原发性 FSGS 早期阶段 synaptopodin 即消失。杨琪等<sup>[8]</sup>研究发现,synaptopodin 表达从健康人、微小病变肾病(MCD)、IgAN、系膜增殖性肾炎(MsPGN)到局灶节段性 FSGS 依次下降,由此推断它的变化影响足细胞的结构和功能,对肾小球疾病的进展有重要作用。但是,对于 synaptopodin 的表达,目前,尚无关于 IgAN 病程的研究,synaptopodin 能否作为反应 IgAN 病理程度的一项指标,本实验给予了解答。

本研究发现,synaptopodin 沿肾小球毛细血管袢呈颗粒状、线状表达,在硬化区无表达;从表 1 经统计分析后可见从 I~V 级 5 组的 IgAN 患者,肾组织中 synaptopodin 所表达的平均光密度逐渐减少,也提示了 IgAN 患者肾组织中 synaptopodin 所表达的平均光密度值与 Lee 分级一样可以反应病情的严重程度,随着病情的加重,synaptopodin 的表达逐渐减少。Katafuchi 积分法<sup>[6]</sup>也可以反应出 IgAN 病情的变化,从表 2 经统计分析后可见,本实验结果也符合此变化,随着病情的加重,Katafuchi 积分的分值也逐渐增加。从图 1 中可见,IgAN 病程中肾组织内 synaptopodin 所表达的平均光密度与 Katafuchi 积分呈反向相关。

足细胞是维持肾小球滤过膜结构和功能正常的主要细胞之一。而足细胞特殊结构的维持主要依赖于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。足细胞减少是疾病活动性的重要标志<sup>[11]</sup>。Mundel 和 Stuart<sup>[12]</sup>总结了各种因素引起足细胞损伤的原因:(1)裂孔隔膜复合物及脂筏的异常;(2)GBM 或足细胞-GBM 相互作用的影响;(3)肌动蛋白细胞骨架及其与  $\alpha$ -actinin-4 的联系破坏;(4)足细胞丧失其表面的电荷屏障。而在 actin 细胞骨架相关蛋白中有一种由 YNPO 基因编码 synaptopodin,该基因含 3 个外显子。synaptopodin 是一种与肌动蛋白微丝紧密相连的富含脯氨酸的线状蛋白。足细胞的结构和功能之间有着密切的因果联系,足细胞具有对抗肾小囊内张力的结构基础。synaptopodin 和  $\alpha$ -actinin-4 可以与足细胞表达的紧密连接蛋白 MAGI-1 相互作用而

与肌动蛋白骨架连接<sup>[13]</sup>,其基因的突变或缺失可以导致足细胞结构的改变,引起蛋白尿和肾小球硬化的发生。足细胞的再生能力有限,当足细胞损伤时,足细胞只能通过有限的增生能力代偿缺失的足细胞。当损伤进一步加重时,足细胞从肾小球基底膜上剥脱的速度超出了足细胞的代偿能力,使肾小球基底膜部分区域裸露,肾小球滤过膜的完整性遭到破坏。足细胞损伤后数量减少将导致肾小球硬化<sup>[14]</sup>。

在 IgAN 肾小球固有细胞的研究方面,以往人们重点关注在系膜细胞的病变,目前,越来越多的肾脏病学者对肾小球足细胞在肾病中的变化及意义进行深入研究。Gagliardini 和 Benigni<sup>[15]</sup>发现 IgAN 的 nephrin、podocin、podoplanin 表达减少。IgAN 是一组临床综合征,临床表现为肾病综合征样改变,病理上也可表现有新月体肾炎或硬化性肾炎,临床表现多样性。Habib 等<sup>[16]</sup>研究显示,IgAN 时蛋白尿多少是影响预后的重要因素,无蛋白尿的患者预后良好。由于发病机制尚未完全阐明,目前,缺乏病因性治疗手段,IgAN 治疗现状并不令人满意。很多研究都致力于寻找与预后或治疗相关的组织学危险因素。肾脏病理表现则能够提供更多的信息。除了较为公认的 Haas 和 Lee 分级系统,Katafuchi 积分法<sup>[6]</sup>及其他多种半定量评分系统也得到了越来越多的应用。然而,迄今为止尚无一种分型能准确地反映患者的临床实际情况,各个分型之间也很难达成一致。传统的 Lee 分级或 Katafuchi 积分存在有较大的主观因素,不利于病情精确的评估及预测,特别是对于个体患者更不利于疗效的观察。

对于一些局灶节段性增生硬化型 IgAN,其非硬化肾小球的病理形态呈轻微病理改变,传统的 Lee 分级或 Katafuchi 积分更不能反映病情的严重程度,诊断时可能均被列为 I 级 IgAN 或 Katafuchi 积分较低,但局灶节段性增生硬化型 IgAN 预后并不乐观,甚至临床上可表现为大量蛋白尿。Yang 等<sup>[17]</sup>对 MCD 患儿 18 例,DMH 患儿 7 例,FSGS 患者 13 例和正常儿童 7 例的肾组织进行免疫组化分析,并且用计算机图像分析法作定量研究,得出以下结论:从 MCD 到 FSGS, synaptopodin 的表达依次减少,尤其在 MCD 和 FSGS 之间 synaptopodin 的表达存在显著差异。可见,肾组织中 synaptopodin 的定量分析可对局灶节段性增生硬化型 IgAN 进行区分, synaptopodin 所表达的平均光密度值的变化,可反应出 IgAN 病情。

通过荧光显微镜对肾组织中 synaptopodin 的观察并采用图像分析软件对其进行具体的量化评估。synaptopodin 所表达的平均光密度值更能具体及客观地判断 IgAN 病情的变化及评估预后,同时可以观察疗效。也为 IgAN 的研究提供一种新的指标。

#### 参考文献:

[1] Donadio JV, Grande JP. IgA nephropathy[J]. *New Engl J Med*, 2002, 347(5): 738-748.

[2] D'Amico G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy and factors predictive of disease outcome[J]. *Seminars in Nephrology*, 2004, 24(2): 179-196.

[3] Haas M. Histologic subclassification of IgA nephropathy: a clinicopathologic study of 244 cases[J]. *Amer J Kidney*

*Dis*, 1997, 29(6): 829-842.

[4] Lee HS, Lee MS, Lee SM, et al. Histological grading of IgA nephropathy predicting renal outcome: revisiting HS lee's glomerular grading system [J]. *Nephrol Dialysis Transpl*, 2005, 20(3): 342-348.

[5] Lee SM, Rao VM, Frankin WA, et al. IgA nephropathy: morphologic predictors of progressive renal disease [J]. *Human Pathology*, 1982, 13(3): 314-322.

[6] Katafuchi R, Kiyoshi Y, Oh Y, et al. Glomerular score as a prognosticator in IgA nephropathy: its usefulness and limitation [J]. *Clin Nephrol*, 1998, 49(1): 1-8.

[7] 刘志红,李世军,陈朝红,等. 糖尿病肾病患者足细胞病变的临床病理特征 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2003, 12(2): 144-148.

[8] 杨琪,汪建国,潘涛. Synaptopodin 在肾小球病变中的表达研究 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2004, 13(4): 485-488.

[9] Barisoni L, Kriz W, Mundel P, et al. The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy [J]. *J the Amer Soci Nephrol*, 1999, 10(1): 51-61.

[10] Kemeny E, Durmuller U, Nickeleit V, et al. Distribution of podocyte protein (44 KD) in different types of glomerular diseases [J]. *Virchows Arch*, 1997, 431(3): 425-430.

[11] 徐兰,杨海春,朱蔚钰,等. IgA 肾病中补体系统及肾小球肥大对足细胞的损伤 [J]. *复旦大学学报: 医学版*, 2008, 35(2): 194-198.

[12] Mundel P, Stuart J. Podocyte biology and response to injury [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(12): 3005-3010.

[13] Patrie KM, Drescher AJ, Welihinda A, et al. Interaction of two actin-binding proteins, synaptopodin and alpha-actinin-4, with the tight junction protein MAGI-1 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(33): 30183-30192.

[14] Kritiz W. Podocyte is the major culprit accounts for the progression of chronic renal disease [J]. *Microsc Res Tech*, 2002, 57(4): 189-196.

[15] Gagliardini E, Benigni A. Targeted down regulation of extracellular nephrin in human IgA nephropathy [J]. *Am J Nepro*, 2003, 23(4): 277-286.

[16] Habib R, Niaudet P, Levy M, Schonlein Henoch purpura nephritis and IgA nephropathy [A] // Tisher C, Brenner BM. *Renal Pathology* [M]. Philadelphia, Lippincott, 1994: 472-523.

[17] Yang Y, Gubler MC, Beaufile H. Dysregulation of podocyte phenotype in idiopathic collapsing glomerulopathy and HIV-associated nephropathy [J]. *Nephron*, 2002, 91(3): 416-423.