

[文章编号] 1000- 4718(2005)02- 0296- 04

# IgA 肾病肾组织内乙型肝炎病毒感染的发病机制研究\*

任淑婷<sup>1</sup>, 于琳华<sup>1</sup>, 徐长福<sup>1</sup>, 李恒力<sup>1</sup>, 冯学亮<sup>2</sup>

(西安交通大学<sup>1</sup>医学院病理学教研室, <sup>2</sup>第一医院肾内科, 陕西 西安 710061)

**[摘要]** 目的: 探讨乙型肝炎病毒感染致 IgA 肾病肾损伤的发病机制。方法: 随机选取 48 例 IgA 肾病肾穿刺组织, 参照 Meadow 病变分级标准分为 I - V 级 5 个实验组, 应用 Envision 免疫组织化学方法检测各级肾组织内 HBsAg 和 HBeAg; 同时用直接 IS- PCR 技术检测其中 18 例 IgA 肾病肾组织内 HBV DNA。结果: 48 例 IgA 肾病肾组织内 HBeAg 和 HBsAg 总的阳性检出率分别为 75.00% (36/48) 和 43.75% (21/48); 18 例 IgA 肾病肾组织内 HBV DNA 阳性检出率为 61.11% (11/18); 3 者均表现为肾小管阳性检出率高于肾小球 ( $P < 0.05$ ), 但各级之间, HBeAg、HBsAg 和 HBV DNA 检出率均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。结论: HBV 参与了 IgA 肾病的发生, 其导致肾组织损伤的机制可能主要是由细胞免疫或一系列细胞因子介导, 并非病毒直接所致; 肾小管上皮细胞可能是 HBV 感染的靶对象。

**[关键词]** 肝炎病毒, 乙型; 肾小球肾炎, IGA; 肝炎抗原, 乙型

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染与 IgA 肾病(IgA nephropathy, IgAN)的关系已引起了国内外学者广泛关注, 但 HBV 如何致 IgAN 肾损伤发生的问题目前尚不清楚。我们随机选取本地区 48 例 IgAN 肾活检组织, 应用免疫组织化学和直接原位 PCR(in site polymerase chain reaction, IS- PCR)分子生物学技术, 分别检测肾组织内 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA, 并将 3 者检出结果与肾组织病变进行了比较分析, 旨在探讨本地区 HBV 感染与 IgAN 发生的关系及 HBV 感染导致肾损伤发生的机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

选取我们存档的石蜡包埋肾穿组织及新收集的肾穿刺活检组织标本 48 例, 经光镜和免疫荧光确诊为 IgAN, 作为本实验研究对象。参照 Lee 等<sup>[1]</sup>改良的 Meadow IgAN 病理分级标准, 将 48 例研究对象分为 I - V 级 5 个实验组: I 级 15 例, II 级 11 例, III 级 10 例, IV 组 8 例, V 级 4 例。

### 2 方法

**2.1 病理诊断及形态学观察** 常规石蜡组织切片, HE、PAS、PASM 和 Masson 染色; 冰冻组织切片行免疫荧光检测。荧光标记抗 IgA、IgM、IgG 及 C<sub>3</sub> 单克隆抗

体均购自 Sigma 公司。

**2.2 肾组织内 HBsAg 和 HBeAg 的检测** 石蜡组织切片, 用两步 Envision 免疫组织化学方法检测。一抗 HBsAg 鼠抗单克隆抗体(或 HBeAg 兔抗单克隆抗体)均购自 DAKO 公司。具体方法略。每批实验均设阴性对照和阳性对照。

**2.3 肾组织内 HBV DNA 的检测** 从 48 例各级 IgAN 肾组织中随机选取 18 例进行原位 PCR 检测。寡核苷酸引物选自 HBV DNA 前 C 区序列, 产物全长 278 bp。碱基序列为: P1: 5' - ATACTGCGGAAGCTGCTAGC - 3', P2: 5' - CCGCGTAAAGAGAGGGTGCC - 3'。委托上海 Sangon 公司合成。主要步骤同文献<sup>[2]</sup>。每批实验均设无引物、正常肾组织、无 Taq 酶阴性对照及空白对照; 已知血清及组织内 HBV 均阳性的肝组织作为阳性对照。

### 3 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计学软件处理, 各组病变或各组之间计量资料比较分别行  $\chi^2$  检验和 Spearman 相关分析。

## 结 果

### 1 病理形态学观察

光镜下见肾组织病理变化具有多样性。38/48 例肾小球病变表现为不同程度系膜增生, 呈局灶节段性或弥漫性增生; 10/48 例肾小球毛细血管壁不同程度增厚, 伴有双轨形成或钉突形成呈非典型性膜性肾病改变, 其中 1 例伴有系膜弥漫性中至重度增生。

[收稿日期] 2003- 07- 30 [修回日期] 2003- 11- 05

\* [基金项目] 陕西省自然科学基金项目(No. 2000SM48)

Tel: 029- 5275189; E- mail: rst@mail.xjtu.edu.cn

肾小管上皮细胞常见的病变为颗粒变性或胞浆疏松化(图1),部分发生坏死,其腔内可见蛋白管型,部分肾小管灶状萎缩。肾间质正常或有不同程度的炎细胞浸润及结缔组织增生。肾间质小血管壁增厚,细动脉硬化。

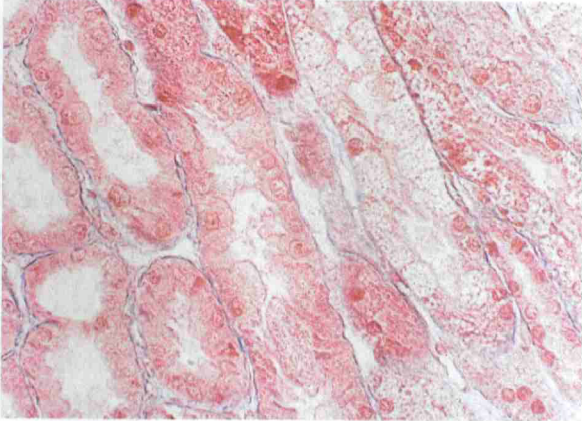


Fig 1 Granular degeneration of renal tubular epithelium (Masson staining, ×400).

图1 肾小管上皮细胞颗粒变性

## 2 免疫荧光检查

系膜区主要以 IgA 免疫球蛋白为唯一沉积,或同时伴有 IgM IgG 免疫球蛋白及补体 C<sub>3</sub> 沉积,但以 IgA 沉积最强。部分病例可见肾小球毛细血管壁及间质小血管壁颗粒状沉积。根据肾组织内沉积的免疫球蛋白不同分 A 型 AM 型 AG 型和 AMG 型,各型同时可伴或不伴补体 C<sub>3</sub> 沉积。各级肾组织内免疫荧光检查结果见表 1。

表 1 各级 IgAN 肾组织内免疫荧光检查结果

Tab 1 The immunofluorescent result in renal tissues with each grade IgAN

Grade	Cases	Immunofluorescence Type				Accompany C <sub>3</sub> Deposition
		A	AM	AG	AMG	
I	15	8	4	2	1	7
II	11	0	3	2	6	9
III	10	2	5	1	2	8
IV	8	1	3	1	3	5
V	4	0	3	0	1	3

## 3 肾组织内 HBsAg 和 HBcAg 的检出情况

**3.1 肾组织内 HBsAg 和 HBcAg 的存在部位** HBsAg 主要存在于肾小管上皮细胞(近曲及远曲等)胞浆或(和)胞膜。少数肾小球系膜区、毛细血管及极少数间质细胞浆内也呈棕黄色颗粒状着色(图2)。

HBcAg 主要存在于肾小管上皮细胞(近曲及远曲等)胞浆或(和)胞核,以胞浆更为多见。少数肾小

球系膜区、毛细血管壁及部分球囊壁可见 HBcAg 阳性着色。胞浆内的 HBcAg 多呈弥漫细颗粒状与 HBsAg 呈粗颗粒状不同。

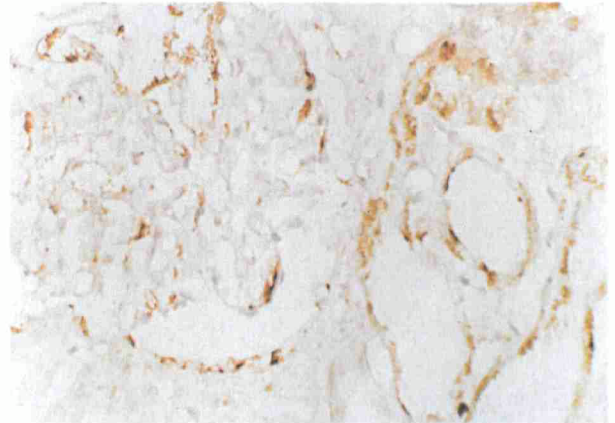


Fig 2 There are positive granules of HBsAg in cytoplasm of renal tubular epithelium and wall of glomerular capillaries (Envision immunohistochemical method, DAB developer, ×400).

图2 肾小球毛细血管壁及肾小管上皮细胞浆 HBsAg 呈棕黄色颗粒状着色

**3.2 肾组织内 HBsAg 和 HBcAg 的检出率** 48 例 IgAN 肾组织内,HBsAg HBcAg 和 HBAg 总的阳性检出率分别为 43.75% (21/48)、75.00% (36/48) 和 81.25% (39/48)。其中 HBsAg HBcAg 和 HBAg 在肾小球检出阳性者必伴随肾小管检出阳性,即 HBsAg、HBcAg 和 HBAg 均表现为肾小管阳性检出率高于肾小球。

各级病变之间,肾组织内 HBsAg HBcAg 和 HBAg 检出率(包括肾小球及肾小管各自检出率)经统计学处理无显著差异,同时病变级别与 3 者检出之间也均无显著相关(均  $P > 0.05$ )。肾组织内 HBAg 的检出情况详见表 2。

## 4 肾组织内 HBV DNA 的检出及定位

HBV DNA 阳性颗粒主要位于肾小管上皮细胞(近曲及远曲等)浆内(图3),部分病例肾小球系膜区及肾间质细胞也有阳性着色,1 例在间质小血管壁有阳性着色。

18 例 IgAN 肾组织内 HBV DNA 检出阳性者 11 例,占 61.11%,其中肾小球及肾小管的阳性检出率分别为 16.67% (3/18) 和 55.56% (10/18),且肾小球 HBV DNA 阳性者必伴随有肾小管 HBV DNA 阳性,即肾小管 HBV DNA 阳性检出率高于肾小球。经统计学  $\chi^2$  和 Spearman 相关分析,各级病变之间 HBV DNA 阳性检出率无显著差异及相关性( $r = -0.250, P > 0.05$ )。

表 2 48 例 IgAN 肾组织内 HBsAg 检出情况

Tab 2 The detected state of HBsAg in 48 cases renal tissues with IgAN

Grade	Case	HBsAg+			HBcAg+			HBsAg+		
		Both	G	EP	Both	G	EP	Both	G	EP
I	15	10	2	10	8	2	8	9	1	9
II	11	11	7	11	5	3	5	11	5	11
III	10	10	2	10	5	0	5	9	2	9
IV+ V	12	8	2	8	3	1	3	7	1	7
Su	48	39	13	39	21	6	21	36	9	36

HBsAg+ is HBsAg+ or (and) HBcAg+ . Both means glomerulus and renal tubular epithelium. EP means renal tubular epithelium. G is abbreviation of glomerulus. Su is abbreviation of summation.



Fig 3 There are positive granules of HBV DNA in cytoplasm of renal tubular epithelium and a few interstitial cell (IS-PCR, AEC developer, ×200).

图 3 肾小管上皮细胞及少许间质细胞浆内 HBV DNA 呈红色颗粒状阳性着色

### 5 肾组织内 HBV DNA 与 HBsAg 及 HBcAg 检出结果比较

在 HBV DNA 阳性组, HBcAg 阳性检出率(8/11) 较 HBsAg(3/11) 高。但  $\chi^2$  检验表明, 肾组织内 HBV DNA 与 HBsAg 及 HBcAg 检出之间均无显著差异 ( $P = 0.05, P > 0.05$ )。

## 讨 论

IgAN 是一种最常见的肾小球肾炎, 是引起终末期肾衰竭的常见原因<sup>[3]</sup>。迄今 IgA 肾病的病因和发病机制仍不甚清楚。多数学者认为<sup>[4]</sup>, IgAN 的发生主要与粘膜免疫有关, 同时也与肝胆疾病、饮食抗原及病毒感染等多种因素有关。其中乙型肝炎病毒感染与 IgAN 发病的关系目前倍受学者们关注。研究表明<sup>[5-8]</sup>, HBV 感染与 IgAN 发病关系密切, 其不仅可通过形成免疫复合物导致肾损伤, 也可直接感染肾细胞参与肾损伤。

我国是乙肝病毒感染高发区。由于不同地区 HBV 感染率有所不同, 因此目前 IgAN 肾组织内 HBV

感染的检出结果, 各家报道不一<sup>[9-11]</sup>。本地区 HBV 感染与 IgAN 发生的关系目前尚未见报道。本实验发现 HBsAg、HBcAg 和 HBsAg 在肾组织中均有较高检出率, 而且 HBsAg 和 HBcAg 检出率(分别为 81.25%, 75.00%) 明显高于以往文献报道<sup>[9]</sup>(HBsAg 69.20%; HBsAg 42.90%; HBcAg 38.50%), 但 HBsAg 检出率(43.75%) 基本一致。文献报道<sup>[12]</sup>肾小球内 HBsAg 沉积与 HBV 抗原血症呈正相关, 因此可推测该结果与西北地区乙肝感染率较高有关(或与所选择病例大多均为血清 HBV 感染标志阴性有关, 仅有 2 例为阳性), 提示本地区 IgAN 发生与 HBV 感染关系密切。

本实验中, HBsAg、HBcAg 及 HBV DNA 检出率均表现为肾小管高于肾小球, 与我们曾经报道一致<sup>[2]</sup>, 提示 HBV 可能在肾小管上皮细胞内复制及表达, 即肾小管上皮细胞是 HBV 感染肾组织的靶细胞。其次, 肾小管上皮细胞常见的细胞水肿性病变与病毒性肝炎肝细胞病变相类似, 从病理形态上也支持了这一推测。

那么 HBV 直接感染肾组织细胞又是如何导致肾损伤发生的? 这一问题的研究目前报道较少。本文研究结果经统计学处理发现, 肾组织内 HBsAg、HBcAg 和 HBV DNA 的检出率与 IgAN 病变分级之间, 及肾组织内 HBV DNA 与其 HBsAg 及 HBcAg 检出之间均无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 提示 HBV 感染肾组织后病毒不直接损伤肾细胞, 而是通过细胞免疫介导或一系列细胞因子介导, 这与乙肝发病机制类似。目前认为, 介导乙型肝炎发生的 Tc 细胞攻击的主要靶抗原是肝细胞膜上的 HBcAg 和 HBeAg<sup>[13]</sup>。有学者<sup>[9]</sup>报道, 肾组织内 HBcAg 和 HBV DNA 存在与否与肾小管病变、间质炎症及间质纤维化病变的程度明显相关; 在 HBV 感染阳性组 CD3<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞明显高于阴性组, 并可见数量不等的 T 淋巴细胞入侵 HBcAg 和 HBsAg 阳性肾小管壁或围绕其周围, 提示 HBV 相关性肾炎病变的发生确有细胞免疫介导。

## [参 考 文 献]

- [1] Lee SMK, Rao VM, Franklin WA, et al. IgA nephropathy: morphologic predictors of progressive renal disease[J]. *Human Pathol*, 1982, 13(4): 314– 322.
- [2] Ren Shuting, Yu Linhua, Xu Changfu, et al. Detection and significance of HBV in renal tissue of HBV associated glomerulonephritis patients [J]. *ACAD J XJTU*, 2002, 14 (2): 124– 127.
- [3] 王 悦, 赵明辉, 章友康, 等. IgA 肾病患者血清 IgA<sub>1</sub> 与正常人肾小球系膜细胞结合动力学研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(9): 1101– 1104.
- [4] Clarkson AR, Woodroffe AJ, Bannister KM, et al. The syndrome of IgA nephropathy[J]. *Clin Nephrol*, 1984, 21(1): 7 – 14.
- [5] 沈 雯, 陆福明, 张秀荣, 等. 乙型肝炎病毒感染与肾小球肾炎[J]. *中华肾脏病杂志*, 1999, 15(3): 177– 180.
- [6] 黄朝兴, 吴淑珍, 李凡凡. 原位杂交检测 HBV 相关性肾炎患者肾组织 HBV DNA[J]. *浙江医学*, 2000, 22(3): 136– 138.
- [7] Lin CY, Lo SC. Treatment of hepatitis B virus– associated membrane– ous nephropathy with adenine arabinoside and thymic extract[J]. *Kidney Int*, 1991, 39(2): 301– 306.
- [8] Nagy J, Baitai G, Brasch H, et al. The role of hepatitis B surface antigen in the pathogenesis of glomerulopathies [J]. *Clin Nephrol*, 1979, 12(3): 109– 116.
- [9] 马学玲, 张月娥, 方利君, 等. HBV 感染与 IgA 肾病肾小管– 间质病变的关系[J]. *中华病理学杂志*, 1998, 27 (4): 269– 272.
- [10] Iida H, Izumin K, Asaka M, et al. IgA nephropathy and hepatitis B virus: IgA nephropathy unrelated to hepatitis B surface antigenemia[J]. *Nephron*, 1990, 54(1): 18– 20.
- [11] 程惠芳, 俞雁平, 王海燕, 等. 乙型肝炎病毒是否为 IgA 肾病的致病原? [J]. *中华内科杂志*, 1990, 29(11): 663 – 665.
- [12] Iida H, Izumino K, Asaka M, et al. Membranoproliferative glomerulonephritis associated with chronic hepatitis B in adults: pathogenetic role of HBsAg[J]. *Am J Nephrol*, 1987, 7(4): 319– 324.
- [13] 李梦东 主编. 实用传染病学[M]. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1998.

## Mechanism of hepatitis B virus infection in renal tissues with IgA nephropathy

REN Shu– ting<sup>1</sup>, YU Lin– hua<sup>1</sup>, XU Chang– fu<sup>1</sup>, LI Heng– li<sup>1</sup>, FENG Xue– liang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathology, Medical College of Xi'an Jiaotong University, <sup>2</sup>Department of Kidney Medicine, First Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

[**ABSTRACT**] **AIM:** To identify the pathogenesis of renal lesions induced by hepatitis B virus (HBV) infection in IgA nephropathy (IgAN). **METHODS:** Forty– eight renal biopsy tissues of IgAN were selected, and were divided into five grades from I to V according to the classified standard of Meadow. HBsAg and HBcAg in renal tissues were detected by immunohistochemistry methods of Envision. Eighteen renal tissues with IgAN among 48 renal biopsy tissues were selected randomly, and then HBV DNA in these tissues was detected by direct in site polymerase chain reaction (IS – PCR) method. **RESULTS:** Thirty– six (36/48, 75.00%) and twenty– one (21/39, 53.85%) cases were positive with HBcAg and HBsAg in 48 cases renal tissues with IgAN, respectively. The positive rate of HBV DNA in 18 cases with IgAN was 61.11% (11/18). The positive rate of HBcAg, HBsAg and HBV DNA in renal tissues were all no significance between every grade ( $P > 0.05$ ), but the positive rate of HBcAg, HBsAg and HBV DNA in renal tubule were all higher than that in glomeruli ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSIONS:** HBV really takes part in the occurrence of IgAN. HBV maybe induces the renal injury by cell– mediated immunity or a series of cytokines but not by virus direct damage. The renal tubule epithelium may be the targeting cells of HBV infection.

[**KEY WORDS**] Hepatitis B virus; Glomerulonephritis, IGA; Hepatitis B antigens