

## 肾间质纤维化诊断与评估方法的研究进展

何辉 赵明

肾间质纤维化几乎是所有慢性肾脏疾病发展的最终结果,与慢性肾衰竭进展密切相关,是导致终末期肾衰竭的主要病因<sup>[1]</sup>。肾间质纤维化常伴有肾小管萎缩、间质炎性细胞浸润、成纤维细胞聚积以及间质基质沉积等特征性病理改变。主要发生机制包括<sup>[1-2]</sup>:间质成纤维细胞增殖、活化;肾小管上皮细胞转分化为肌成纤维细胞;某些血管活性物质和细胞因子参与;细胞外基质(ECM)成分产生增多和(或)降解减少,其中ECM合成和降解失衡是纤维化形成的直接原因,最终导致大量ECM沉积。肾间质成纤维细胞是肾间质内主要的肾脏固有细胞之一,是间质纤维化过程中最主要的ECM分泌细胞,当其受到外界刺激后能迅速增殖产生大量纤维连接蛋白、层黏蛋白和胶原纤维。近年来研究表明肾小管间质病变较肾小球病变在肾脏疾病进展中的意义更为重要,是反映肾功能下降严重程度和判断预后最重要的指标<sup>[3]</sup>。因此对肾间质纤维化早期诊断的研究越来越受到国内外研究者的重视。本文主要对病理染色、免疫组化及非线性光学技术在肾间质纤维化诊断中的应用进行综述。

### 一、Masson三色染色和苦味酸天狼星红染色

Masson三色染色法能同时显示胶原纤维和肌纤维,是胶原纤维、肌纤维染色的最常见方法。细胞核被染蓝褐色后能清晰辨认组织形态,在许多疾病的病理诊断、鉴别诊断和研究工作中均具有重要的价值<sup>[4-6]</sup>。Masson染色能清晰地显示肾小球沉淀的免疫复合物和基底膜、系膜基质及胶原纤维等<sup>[5]</sup>。见图1A。因其操作方法简便,在普通显微镜下就可得到明确的结果,是目前临床上诊断肾间质纤维化的首选方法。Masson染色效果的关键在于固定液的选择和显微镜调色技术的发挥。有研究对常规方法作了一些改进以提高染色效果,如选择苦味酸为固定液,能迅速沉淀组织中的蛋白质,苦味酸固定后的组织密度疏松,使组织结构孔隙宽、渗透性高,有利于大分子染料对组织的浸透,使胶原纤维在系膜区、基底膜和沉淀

复合物以及肾小管细胞的刷状缘和基部纵纹均能清晰显示<sup>[7]</sup>。有文献报道增加细胞核媒染剂天青石蓝的含量,其成份中高铁盐与Mayer苏木精结合使用,具有较强抗酸性能力,能准确地显示肾小球基底膜、系膜基质、胶原纤维和有免疫复合物的沉积,并且易识别沉积的部位和病变范围<sup>[8]</sup>。梁惠珍等<sup>[9]</sup>用比布列西猩红染液代替丽春红,增强胶原纤维的着色能力,但这仅是为了突出肌纤维,而不能使各种组织成分均能鲜明地体现。有学者使用微波辐射技术可以使固定液、染料分子扩散更快,固定效果更好,着色更快,结合更牢固,以达到缩短染色时间和增强染色效果,也使其保存长久、不易褪色,但组织切片长时间在微波条件下极易掉片<sup>[10-11]</sup>。

天狼星红是一种强酸性和长形展开的分子结构染料,每个分子内含有6个磺酸基,与胶原分子的碱性氨基酸发生强烈反应,吸附反应极稳定,染色后不易褪色,具有较强的特异性。它可以和胶原纤维反应产生明显的双折光现象,普通光镜下天狼星红着色的胶原纤维呈红色,见图1B。偏光显微镜下可以分辨不同类型的胶原纤维,见图1C。I型胶原纤维:紧密排列,显示很强的双折光性,呈黄色或红色的纤维;II型胶原纤维:显示弱的双折光,呈多种色彩的疏松网状分布;III型胶原纤维:显示弱的双折光,呈绿色的细纤维;IV型胶原纤维:显示弱的双折光的基膜,呈淡黄色,尤其是I、III型胶原所显示的不同颜色对比鲜明,极易区别这两种类型的胶原<sup>[12-13]</sup>。天狼星红染色法操作步骤相对简单,且可以观察胶原类型,研究各类型胶原在不同疾病和肾脏部位的排列及分布特点。因天狼星红染色只有在偏光显微镜下才能分辨出不同的胶原纤维,限制了其在临床上的推广,所以目前还只是应用于科研领域。

### 二、免疫组织化学技术

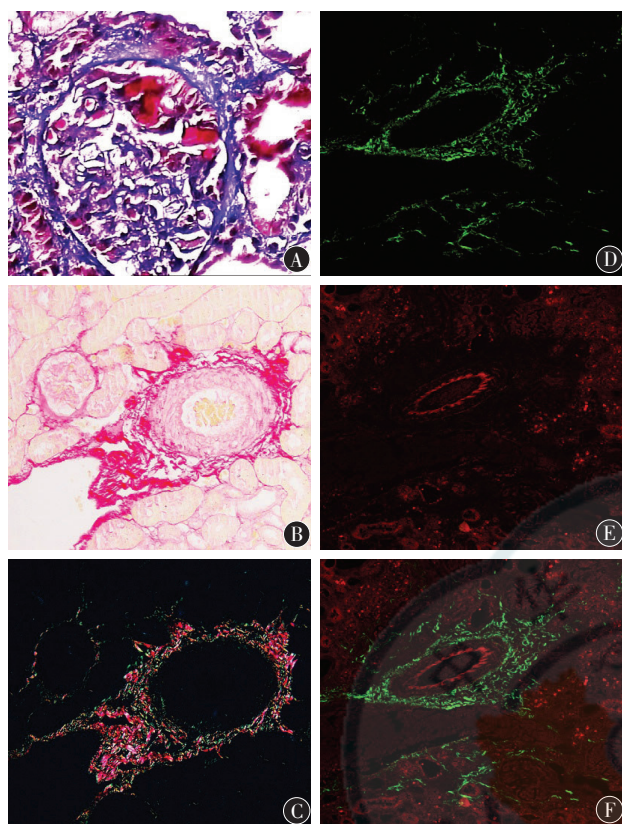
肾间质纤维化的免疫组化技术(immunohistochemistry, IHC)应用抗原抗体反应,即抗原与抗体特异性结合的原理,通过化学反应使被标记显色剂的抗体特异性显色,确定肾间质ECM成分,进行定位、定性及定量的研究。肾间质堆积的ECM成分包括基质蛋白成分(I、III型胶原纤维、纤连蛋白等)增多,也包含正常时仅存在于肾小管基膜的基质蛋白(IV型胶原和纤连蛋白等)的沉积。由于ECM成分复杂,所以常常选择肾间质纤维化中最主要的

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2013.11.016

基金项目:国家自然科学基金(81170696)

作者单位:510280 广州,南方医科大学珠江医院器官移植科移植免疫实验室

通信作者:赵明, Email: zhaomingzjy@163.com



注: A: Masson 染色; B: 天狼星红染色; C: 天狼星红染色; D: 二次谐波产生 (SHG); E: 双光子激发荧光 (TPEF); F: SHG + TPEF; A、B、C: 环孢素 A 致大鼠肾脏间质纤维化; D、E、F: 大鼠移植的肾脏间质纤维化病理改变

图 1 Masson 染色、天狼星红染色及非线性光学显微成像技术 (×200)

I、III 型胶原在一定程度上反映肾间质纤维化程度<sup>[14-15]</sup>。免疫组化多选用二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 进行最后显色, 其阳性细胞显示为棕黄色, 通常通过人工方法对阳性反应强度进行判定, 或者人工计数阳性细胞占全部细胞的百分率来对阳性反应分布进行半定量的分析<sup>[16-18]</sup>。对 IHC 的染色结果进行判定和分析, 传统的人工计数方法对胞核胞膜阳性的结果判定重复性尚可, 但对胞浆胞核及胞膜着色的结果判定有明显的差异性<sup>[19-20]</sup>。研究人员也一直在试图寻找一种比较客观、准确的方法来对 IHC 的染色结果进行判定和分析, 现在越来越应用图象分析 (image analysis, IA) 技术对 IHC 结果进行定量分析。图象分析常用的 3 个指标: 阳性面积 (area)、平均光密度 (mean density)、积分光密度 (integral optical density, IOD)<sup>[17-19]</sup>。IA 主要优点在于计算机对颜色的分辨力强, 对 IHC 染色结果的判定客观、准确, 阳性定位更准确, 背景染色干扰小, 人为因素少。虽然 IA 目前得到广泛应用, 但其客观性及重复性仍未得到大家的一致看法。IA 对组织切片质量要求较高, 尤其对于阳性较弱标本, 易

导致阳性率偏高, 同时对有非特异性染色的标本分析比较困难。IHC 的定量结果与显色反应的条件密切相关, 因操作者的不同, 将 IHC 结果完全量化而得到的结果经常存在差异, 需要在切片制备, 染色和结果判定等步骤都必须实行标准化操作。而目前肾间质纤维化 IHC 结果判定尚没有统一的分级标准, 故仍主要应用于对肾间质纤维化 EMC 成分的研究分析。

IHC 手工染色的准确性仍受到标本染色的方式、技术人员熟练程度的影响, 存在个体、时空间的差异, 很难达到可重复性和统一性。目前研究人员将目光转向全自动免疫组化仪, 如美国 Bench Marker XT<sup>®</sup> 全自动免疫组化仪, 使得组织切片染色、孵育、显色全自动化。全自动免疫组化仪质量明显提高, 图象背景清晰, 非特异着色少, 无边缘效应, 阳性着色定位准确。但全自动免疫组化仪也存在一些缺陷, 如缺乏染色一致调控程序的标准; 因监控缺失导致试剂、抗体分布不均影响染色; 仪器无法调控或终止 DAB 显色, 致染色显色过度或不足; 试剂及仪器价格昂贵, 无法大范围推广等<sup>[21]</sup>。

### 三、非线性光学成像技术

近年来, 随着激光技术的发展, 非线性光学显微成像技术在生物医学中得到广泛应用。非线性光学现象中以二次谐波产生 (second harmonic generation, SHG) 和双光子激发荧光 (two-photon excited fluorescence, TPEF) 最普遍, 应用最广泛<sup>[22]</sup>。SHG 是利用生物组织的内源性信号进行成像, 主要是具有非中心对称结构的生物组织, 如生物膜、胶原纤维等。TPEF 成像是利用内源性荧光物质或者外源性荧光染料分子的双光子激发荧光信号来直接获取物质内部的微观图象<sup>[23]</sup>。SHG 与 TPEF 成像相互补充、相互印衬。目前基于 SHG 和 TPEF 的非线性光谱成像技术已应用在角膜、肺、甲状腺、胃肠道、冠状动脉及子宫颈等疾病的诊断与研究<sup>[24-27]</sup>。

Tai 等<sup>[22]</sup>将非线性光学显微成像技术和计算机辅助分析系统结合起来, 用于大鼠肝硬化模型和人肝脏纤维组织的成像和评分。作者不仅通过大鼠肝胆管结扎和四氯化碳诱导建立了肝脏纤维化模型, 与临床肝硬化患者的穿刺组织同时进行研究, 通过 SHG/TPEF 显微镜对不同时间的肝脏胶原纤维成像, 采用计算机辅助分析技术自动评估纤维化程度, 并与传统病理方法比较。结果发现该技术观察到的纤维化进程与传统病理检查结果相吻合, 且能更敏感和更特异地反映肝纤维化的进展。由于 SHG/TPEF 成像对胶原纤维的高敏感性, 能发现组织内细微的变化, 因此研究者将人的肝纤维化分级由传统病理的 4 级细分到 40 级, 并建立了由计算机软件直接读取评估结果的全自动化肝纤维化定量系统“Fibro-C-Index”。同时研究者通过对这两种不同诱因下大鼠肝脏胶原纤维的三维

成像技术分析后发现:其各自的胶原三维结构、分布的特异性差异,使得纤维化的早期发现和病因诊断成为可能。早在 2001 年 Banff 会议上提出今后研究目标<sup>[28]</sup>:早期发现进展性纤维化,准确判断和干预损伤因素导致的纤维化进展,明确诊断致病因素特征。

Strupler 等<sup>[23]</sup>应用 SHG/TPEF 技术评估小鼠肾脏的纤维化,研究者使用 SHG/TPEF 图象和病理免疫组化分别观察肾脏组织中的 I 型和 IV 型胶原纤维,将 TPEF、SHG 和免疫组化的图片叠加以观察不同胶原纤维的覆盖情况,发现 SHG/TPEF 能特异性的显示 I 型胶原纤维,而无法显示 IV 型胶原纤维,而 IV 型胶原纤维是肾小球基底膜重要成分,探讨了 SHG/TPEF 评估肾间质纤维组织的可行性。通过皮下注射血管紧张素 II 和高盐饮食的方法建立小鼠高血压肾病模型,观察肾脏标本不同区域胶原纤维沉积情况,发现皮质深层血管区的纤维化聚集明显,并根据这一现象对 SHG/TPEF 显微成像设备进行调试,选择目标区域,利用 SHG/TPEF 图象对其进行纤维化评分,并与传统病理评分结果比较,发现 SHG/TPEF 显微成像技术对胶原纤维更灵敏,纤维化评分结果更精确,同时还可显示胶原纤维的三维空间结构。

#### 四、结论

目前 SHG 和 TPEF 的非线性光谱成像技术对肾间质纤维化的诊断还处于实验研究起步阶段,主要应用在动物的疾病模型及少量的临床标本上,其与传统病理染色技术胶原成像技术相比,存在以下优势:(1)SHG 能够区分纤维胶原和非纤维胶原蛋白,对病理性胶原纤维化堆积的诊断具有特异性<sup>[22]</sup>。(2)非线光学成像技术的组织既可以是石蜡切片又可以是冰冻切片,标本无需染色,排除染料成分、染色步骤或褪色等原因产生的染色差异;可以避免受到使用荧光剂所带来的浓度和光漂白效应的影响,同时避免染色中刺激、腐蚀性溶液的危险因素。(3)消除了不同操作者间和同一操作者不同时间空间的差异。(4)可显示胶原纤维三维结构,为疾病病因的诊断提供可能。(5)TPEF 可补充结构和细胞成分信息,将 TPEF 和 SHG 图象融合,就可得到胶原分布和其他组织细胞形态信息的组织图象,其中 SHG 图象呈绿色信号,见图 1D,代表胶原纤维组织;TPEF 图象呈红色信号,见图 1E,代表肾脏组织图象<sup>[23]</sup>。绿色和红色是 SHG/TPEF 图象,见图 1F。两个主要色调,通过 Image-Pro Plus、image J 等这些简易病理图象分析软件就可以测量出胶原信号表达水平,行定量分析,SHG/TPEF 图象能敏感地发现肾间质少量胶原表达,提高早期肾间质纤维化诊断率。

虽然非线性光学技术对于肾间质纤维化的诊断有着诸多优势,但是还有一些问题需要进一步确认:(1)SHG 对肾间质纤维化的 ECM 中其他成分是否还存在信号表

达。(2)能否制定类似“Fibro-C-Index”分级标准,改变目前 banff 病理分级<sup>[29-30]</sup>中肾间质纤维化仅轻、中、重度的粗略分级。(3)非线性光学三维成像技术会否发现不同肾脏疾病导致的间质纤维化中胶原纤维的三维结构,纤维束的直径、长短、密度和排列方式的特异性。非线性光学技术对各种疾病导致肾间质纤维化诊断的敏感性、特异性及可重复性还需大量的临床研究来进一步验证。随着上述问题的解决,相信非线性光学技术在肾脏疾病的诊断将发挥巨大作用。

#### 参 考 文 献

- [1] Fang Y, Yu X, Liu Y, et al. miR-29c is downregulated in renal interstitial fibrosis in humans and rats and restored by HIF- $\alpha$  activation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 304: F1274-F1282.
- [2] Dang Z, Mackinnon A, Marson L P, et al. Tubular atrophy and interstitial fibrosis after renal transplantation is dependent on galectin-3. *Transplantation*, 2012, 93: 477-484.
- [3] Becker GJ, Hewitson TD. The role of tubulointerstitial injury in chronic renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2000, 9: 133-138.
- [4] Mimura I, Nangaku M, Nishi H, et al. Cytoglobin, a novel globin, plays an antifibrotic role in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 299: F1120-F1133.
- [5] Meas-Yedid V, Servais A, Noel LH, et al. New computerized color image analysis for the quantification of interstitial fibrosis in renal transplantation. *Transplantation*, 2011, 92: 890-899.
- [6] Bonsib SM, Bhalodia A. Retrograde venous invasion in renal cell carcinoma: a complication of sinus vein and main renal vein invasion. *Mod Pathol*, 2011, 24: 1578-1585.
- [7] Carriel VS, Aneiros-Fernandez J, Arias-Santiago S, et al. A novel histochemical method for a simultaneous staining of melanin and collagen fibers. *J Histochem Cytochem*, 2011, 59: 270-277.
- [8] 张威, 朱小兰, 王朝杰, 等. 改良 Masson 染色法在肾穿刺活检组织染色中的应用. *中华病理学杂志*, 2005, 34: 375-376.
- [9] 梁惠珍, 宋一璇. 一种不易褪色的 Masson 三色染色方法及其应用. *临床与实验病理学杂志*, 2000, 16: 237.
- [10] Marcos R, Santos M, Santos N, et al. Use of destained cytology slides for the application of routine special stains. *Vet Clin Pathol*, 2009, 38(1): 94-102.
- [11] 林云恩, 龙惠东, 许惠娟, 等. 微波改良 Masson 三色法在观察博来霉素诱导的大鼠肺纤维化中应用. *临床与实验病理学杂志*, 2011, 27: 1014-1016.
- [12] Grimm PC, Nickerson P, Gough J, et al. Computerized image analysis of Sirius Red-stained renal allograft biopsies as a surrogate marker to predict long-term allograft function. *J Am*

- Soc Nephrol, 2003, 14: 1662-1668.
- [13] Rowshani AT, Scholten EM, Bemelman F, et al. No difference in degree of interstitial Sirius red-stained area in serial biopsies from area under concentration - over - time curves - guided cyclosporine versus tacrolimus - treated renal transplant recipients at one year. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17: 305-312.
- [14] Farris AB, Adams CD, Brousaides N, et al. Morphometric and visual evaluation of fibrosis in renal biopsies. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22: 176-186.
- [15] Lin SL, Kisseleva T, Brenner DA, et al. Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney. *Am J Pathol*, 2008, 173: 1617-1627.
- [16] Sangoi AR, Cassarino DS. PAX - 8 expression in primary and metastatic Merkel cell carcinoma: an immunohistochemical analysis. *Am J Dermatopathol*, 2013, 35: 448-451.
- [17] Jones HB, Bigley AL, Pemberton J, et al. Quantitative histopathological assessment of retardation of islets of langerhans degeneration in rosiglitazone-dosed obese ZDF rats using combined insulin and collagens (I and III) immunohistochemistry with automated image analysis and statistical modeling. *Toxicol Pathol*, 2013, 41: 425-444.
- [18] Costa RM, Nogueira F, de Sousa KP, et al. Immunoproteomic analysis of plasmodium falciparum antigens using sera from patients with clinical history of imported malaria. *Malar J*, 2013, 12: 100.
- [19] Xu YH, Sattler GL, Edwards H, et al. Nuclear-labeling index analysis (NLIA), a software package used to perform accurate automation of cell nuclear - labeling index analysis on immunohistochemically stained rat liver samples. *Comput Methods Programs Biomed*, 2000, 63:55-70.
- [20] Mayr D, Heim S, Werhan C, et al. Comprehensive immunohistochemical analysis of Her - 2/neu oncoprotein overexpression in breast cancer: HercepTest (Dako) for manual testing and Her - 2/neuTest 4B5 (Ventana) for Ventana BenchMark automatic staining system with correlation to results of fluorescence in situ hybridization (FISH). *Virchows Arch*, 2009, 454: 241-248.
- [21] 杨月红, 袁静萍, 袁修学, 等. 自动免疫组化仪的使用体会. *临床与实验病理学杂志*, 2011, 27: 333-334.
- [22] Tai DC, Tan N, Xu S, et al. Fibro - C - Index: comprehensive, morphology - based quantification of liver fibrosis using second harmonic generation and two-photon microscopy. *J Biomed Opt*, 2009, 14: 44013.
- [23] Strupler M, Pena AM, Hernest M, et al. Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues. *Opt Express*, 2007, 15: 4054-4065.
- [24] Aptel F, Olivier N, Deniset - Besseau A, et al. Multimodal nonlinear imaging of the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51: 2459-2465.
- [25] Pena AM, Fabre A, Debarre D, et al. Three - dimensional investigation and scoring of extracellular matrix remodeling during lung fibrosis using multiphoton microscopy. *Microsc Res Tech*, 2007, 70: 162-170.
- [26] Huang Z, Li Z, Chen R, et al. In vitro imaging of thyroid tissues using two - photon excited fluorescence and second harmonic generation. *Photomed Laser Surg*, 2010, 28 Suppl 1: S129-S133.
- [27] Jiang X, Zhong J, Liu Y, et al. Two - photon fluorescence and second - harmonic generation imaging of collagen in human tissue based on multiphoton microscopy. *Scanning*, 2011, 33: 53-56.
- [28] Racusen LC, Solez K, Colvin R. Fibrosis and atrophy in the renal allograft: interim report and new directions. *Am J Transplant*, 2002, 2: 203-206.
- [29] Sis B, Mengel M, Haas M, et al. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant*, 2010, 10: 464-471.
- [30] Mengel M, Chan S, Climenhaga J, et al. Banff initiative for quality assurance in transplantation (BIFQUIT): reproducibility of C4d immunohistochemistry in kidney allografts. *Am J Transplant*, 2013, 13: 1235-1245.

(收稿日期: 2013-07-24)

(本文编辑: 孙玉玲)