

· 短篇论著 ·

中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白和CD4⁺CD25^{high}Treg在早期糖尿病肾病大鼠中的表达和意义

曾艳 李广胜 李秋月 周静 吕金雷

中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)可减轻由代谢和血流动力学异常导致的持续肾损害,是糖尿病肾病(DN)发生发展中的重要因素。CD4⁺CD25^{high}Treg对DN的免疫功能紊乱起重要作用。两者的关系目前不清楚。本研究重点探讨NGAL、CD4⁺CD25^{high}Treg在2型糖尿病肾病大鼠的表达特点以及两者间的相关性,进一步阐明DN的发生发展机制。

一、材料和方法

1. 材料: 96T大鼠NGAL的ELISA试剂盒(武汉优尔生),链脲菌素(STZ,北京博爱港),山羊抗大鼠VCAM-1抗体(武汉博士德),抗CD4-FITC单抗、抗CD25-PE单抗(美国eBioscience),来氟米特(LEF,大连美罗),雄性SD大鼠(南昌大学医学院动物科学部)。

2. 模型建立和分组: 大鼠腹腔注射STZ 30 mg/kg,血糖 ≥ 16.7 mmol/L定为糖尿病模型成功。分组: 正常对照组(A, n=8)、模型组(B, n=10)、LEF干预组(C, n=10)。C组予LEF 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃, A组、B组大鼠分别予以等量生理盐水灌胃。

3. 指标检测: 成模后0周、4周、8周,分别检测各组大鼠Scr、Ucr、24 h尿蛋白量,计算Ccr = Ucr/Scr×24 h尿量÷1440;用ELISA法检测血、尿NGAL水平;用美国BD FACS Calibur型流式细胞仪检测血CD4⁺CD25^{high}Treg。

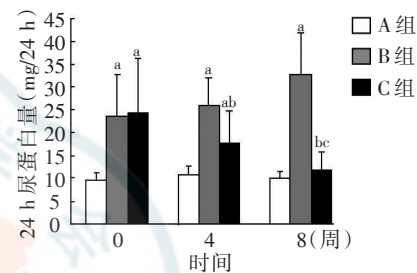
4. 肾脏病理及病理评分: 8周时将大鼠麻醉后游离并取出双侧肾脏,行HE、Masson、PASM染色,用BI2000图像系统分析,按文献[1]进行病理评分。

5. 肾脏VCAM-1表达: 用免疫组化法检测,阳性结果为肾实质及细胞质内棕褐色颗粒沉积。用Image-pro病理图像软件,测定VCAM-1阳性着色的平均吸光度,进行半定量分析。

6. 统计学分析: 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内、组间差异比较用单因素方差分析;多重比较若为方差齐性采用LSD检验;若方差不齐则采用Tamhane T2;指标间相关性用Spearman法进行分析;以P<0.05为差异有统计学意义。采用SPSS 13.0软件进行统计分析

二、结果

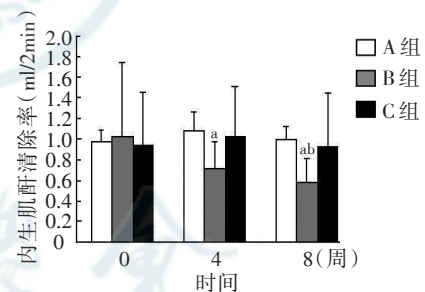
1. 尿蛋白量: B组各时间点均显著高于A组;C组4、8周均显著低于B组;C组8周时显著低于0周,见图1。



注:与同时间点A组比较,^aP<0.01;与同时间点B组比较,^bP<0.05;与C组0周比较,^cP<0.01

图1 各组大鼠不同时间点尿蛋白量变化

2. Ccr: B组4周、8周时显著低于A组;B组8周时显著低于0周;C组各时间点无明显变化,见图2。



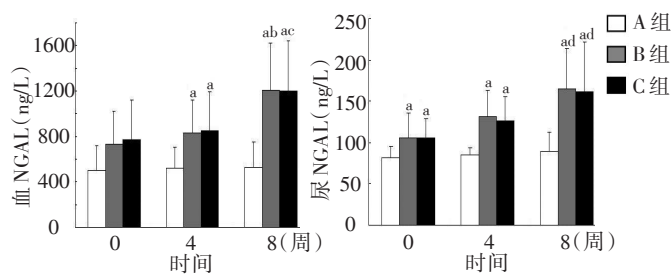
注:与A组同时间点比较,^aP<0.05;与B组0周比较,^bP<0.05

图2 各组大鼠不同时间点Ccr的变化

3. 血NGAL: 0周时各组间差异无统计学意义;B组4周、8周时显著高于A组;B组8周时显著高于4周;C组4周、8周时显著高于A组;C组8周时显著高于0周,见图3。

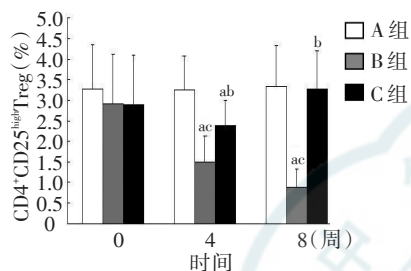
4. 尿NGAL: B、C组0周、4周、8周均显著高于A组;B组、C组8周时均显著高于0周,见图3。

5. CD4⁺CD25^{high}Treg的表达: B组4周、8周时显著低于A组;B组4周时显著低于0周,8周时进一步下降;C组4周时与显著低于A组;8周时上升,与A组差异无统计学意义,但与B组同时间点差异均有统计学意义,见图4。



注:与 A 组同时间点比较, ^a $P < 0.05$; 与 B 组 4 周比较, ^b $P < 0.05$; 与 C 组 0 周比较, ^c $P < 0.05$; 与同组 0 周比较, ^d $P < 0.05$

图 3 各组大鼠不同时间点血、尿 NGAL 的变化



注:与 A 组同时间点比较, ^a $P < 0.01$; 与 B 组同时间点比较 ^b $P < 0.01$; 与 B 组 0 周比较, ^c $P < 0.01$

图 4 各组大鼠不同时间点 CD4⁺CD25^{high}Treg 的表达

6. 肾脏病理: A 组大鼠肾组织无异常。B 组肾小球系膜区明显增宽,系膜细胞及基质弥漫性增生,部分毛细血管充血扩张,呈分叶状,基底膜增厚,部分肾小管上皮肿胀,肾小管萎缩,间质炎性细胞广泛浸润,有纤维化。C 组病变较 B 组改善,见图 5。B、C 组大鼠肾小球、肾小管评分及总评分均显著高于 A 组;C 组肾小管评分和总评分显著低于 B 组,见表 1。

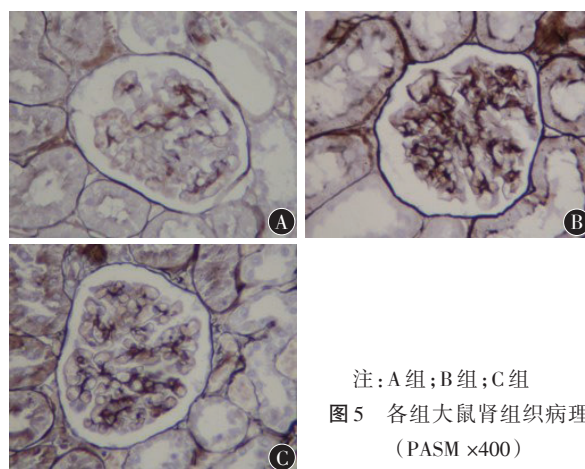
7. VCAM-1 表达: A 组大鼠肾组织无或仅有少量 VCAM-1 表达,吸光度为 0.328 ± 0.044 ; B 组肾小球内皮细胞、肾小管上皮细胞和肾间质有显著棕黄色颗粒阳性表达,吸光度为 0.484 ± 0.083 ,显著高于 A 组 ($P < 0.05$); C 组肾小球内皮细胞、肾小管上皮细胞和肾间质也有棕黄色颗粒阳性表达,吸光度为 0.419 ± 0.049 ,显著低于 B 组 ($P < 0.05$),见图 6。

8. 相关性分析: 4 周和 8 周时血 NGAL 与尿蛋白量呈正相关 ($r = 0.670, P < 0.05; r = 0.846, P < 0.01$); 与 Ccr 呈负相关 ($r = -0.660, P < 0.05; r = -0.789, P < 0.05$); 8 周时与病理评分 ($r = 0.811, P < 0.05$)、VCAM-1 ($r = 0.825, P <$

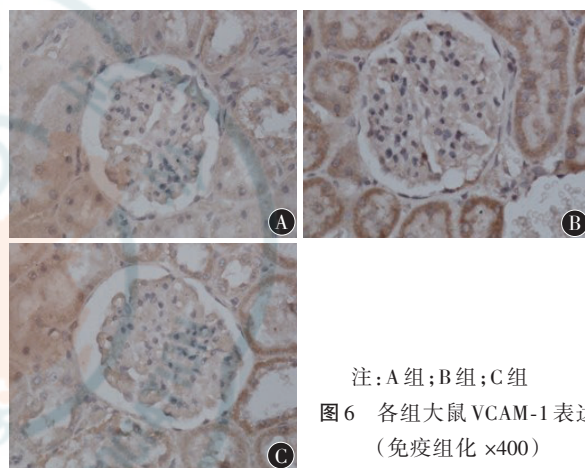
表 1 各组大鼠病理评分

组别	鼠数	肾小球评分	肾小管评分	总评分
A 组	8	0.60±0.70	1.00±1.56	1.60±1.51
B 组	8	8.25±2.31 ^a	9.38±2.00 ^a	17.63±3.29 ^a
C 组	10	6.50±1.69 ^a	6.88±0.64 ^{ab}	13.37±1.60 ^{ab}

注:与 A 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 B 组比较, ^b $P < 0.05$



注: A 组; B 组; C 组
图 5 各组大鼠肾组织病理 (PASM ×400)



注: A 组; B 组; C 组
图 6 各组大鼠 VCAM-1 表达 (免疫组化 ×400)

0.05) 呈正相关; 8 周时尿 NGAL 与尿蛋白量呈正相关 ($r = 0.726, P < 0.05$)、与 Ccr 呈负相关 ($r = -0.747, P < 0.05$)。4 周和 8 周时 CD4⁺CD25^{high}Treg 与尿蛋白量呈负相关 ($r = -0.603, P < 0.05; r = -0.767, P < 0.05$), 与 Ccr 呈正相关 ($r = 0.709, P < 0.05; r = 0.887, P < 0.05$); 8 周时 CD4⁺CD25^{high}Treg 与病理评分 ($r = -0.917, P < 0.05$)、VCAM-1 ($r = -0.701, P < 0.05$) 呈负相关。4 周时血 NGAL 与 CD4⁺CD25^{high}Treg 呈负相关 ($r = -0.758, P < 0.05$)。其余指标间均无相关。

三、讨论

尿 NGAL 是急性肾损害 (AKI) 的最佳预测指标; NGAL 也是慢性肾脏病变的标志物, 与 DN 密切相关^[2]。血 NGAL 在 DN 早期即可大幅度升高^[3]。本研究中, DN 大鼠尿 NGAL 较血 NGAL 先升高, 对早期 DN 的诊断可能比血 NGAL 更具有意义; 而血 NGAL 与尿蛋白量、病理评分呈正相关、与 Ccr 呈负相关, 提示血 NGAL 对评估 DN 肾小球损害程度具有较重要意义。LEF 在 DN 大鼠中能下调 MCP-1 等炎症因子的表达, 对改善肾脏临床和病理均有显著效果^[4-5]。本研究进一步证实了以上结论, 但发现 LEF 对 NGAL 水平无影响, 原因有待探讨。

CD4⁺CD25^{high}Treg 参与了多种肾小球肾炎的发病, 在

糖尿病病程中, CD4⁺CD25^{high}Treg 如何表达目前还有争议。本研究结果显示 DN 大鼠 CD4⁺CD25^{high}Treg 表达低于正常大鼠, 且与 VCAM-1 呈负相关, 而 LEF 干预后其表达明显回升, 提示 CD4⁺CD25^{high}Treg 可能通过调节内皮细胞炎症因子而在 DN 发病过程中发挥作用。

本研究中, 4 周时血 NGAL 与 CD4⁺CD25^{high}Treg 呈负相关; 尿 NGAL 与 CD4⁺CD25^{high}Treg 无相关。其原因可能是 CD4⁺CD25^{high}Treg 表达降低除了与细胞免疫功能紊乱有关外, 还与炎症反应有关, 而 NGAL 主要是由活化的中性粒细胞和炎症血管内皮产生。具体原因和机制有待进一步研究考证。

参 考 文 献

[1] 裴华颖, 傅淑霞, 李绍梅, 等. 成人紫癜性肾炎肾脏病理评分与临床的关系(附 146 例报告). 中国医师杂志, 2005, 7:

1210-1211.
 [2] 车妙琳, 钱家麒, 戴慧莉, 等. 联合应用标志物在心脏手术后急性肾损伤的早期诊断. 中华肾脏病杂志, 2011, 27: 164-169.
 [3] Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G, et al. Neutrophil gelatinase - associated lipocalin as an early biomarker of nephropathy in diabetic patients. Kidney Blood Press Res, 2009, 32 : 91-98.
 [4] 郭汉城, 黄清河, 姚春萌. 来氟米特对糖尿病肾病大鼠肾脏单核细胞趋化蛋白 1 表达及巨噬细胞浸润的影响. 中华肾脏病杂志, 2010, 26: 59-60.
 [5] 韦丽, 刘春, 陶林, 等. 来氟米特对糖尿病大鼠肾脏的保护作用. 中华肾脏病杂志, 2012, 28: 329-330.

(收稿日期: 2012-11-06)
 (本文编辑: 李耀荣)

· 消息 ·

2013 国际足细胞研讨杭州会议·征文

由中华医学会儿科学分会肾脏学组及浙江大学医学院附属儿童医院共同主办的 2013 国际足细胞研讨杭州会议计划于 2013 年 9 月 4-5 日在浙江省杭州市浙江宾馆举行。会议已邀请 2012 年美国迈阿密国际足细胞大会主席 Jochen Reiser 教授, 瑞典 Karolinska 医学院 Karl Tryggvason 教授, 德国 Freiburg 大学医学院 Tobias Huber 教授及北京大学第一医院丁洁教授等国内外知名专家进行专题报告。

1. 征文内容: 各类足细胞病(糖尿病肾病、微小病变病、局灶节段性肾小球硬化、特发性膜性肾病等)的发病机制、临床病理、诊断、鉴别诊断及治疗方案; 足细胞病变与蛋白尿发生相关机制(足突分子、细胞骨架、离子通道、蛋白降解等)的基础研究; 模式动物与足细胞研究; 肾小球发育再生的足细胞机制等。

2. 征文要求及投稿方式: ①未在国内外公开发表过的学术论文; ②请提供 600~1200 字中文结构式的摘要一份, 包括题目、目的、方法、结果、结论等四个部分; ③同时提供英文摘要一份, 包括 Title、Background、Methods、Results、Conclusion 等内容; ④请提供作者姓名、工作单位、邮政编码等信息, 列于论文题目之下, 以方便我们邮寄参会通知; ⑤请用电子邮件投稿。请将稿件以“第一作者姓名-文章题目”的格式命名, Word 格式保存, 以附件方式发送稿件至 maojh88@126.com。邮件主题请注明“2013 国际足细胞研讨杭州会议征文”以便我们提高效率, 避免混淆; ⑥我们收到邮件后会通过邮件回复, 如在投稿后 3 天内未收到回复, 敬请电话垂询, 联系人: 毛建华, 0571-88873701 13516819071。

3. 继续教育学分: 全体参会代表可获得国家级 I 类继续教育学分。

4. 截稿日期: 2013 年 6 月 30 日。

中华医学会儿科分会肾脏学组
 浙江大学医学院附属儿童医院
 2013 年 04 月 01 日