

· 论 著 ·

肾组织肥大细胞表型特点分析研究

郑敬民, 尹 广, 姚根宏, 王建平, 刘志红

〔摘要〕 目的 阐明各种肾病患者肾组织肥大细胞的表型特点。方法 选取包括糖尿病肾病、IgA 肾病、急性间质性肾炎、慢性间质性肾炎、过敏性紫癜性肾炎、膜性肾病和狼疮性肾炎在内的肾病患者 369 例, 正常供肾 16 例, 以免疫组化方法检测肾活检标本中肥大细胞类胰蛋白酶和糜蛋白酶表达情况, 对其进行分型分析。结果 双连续切片分析发现, 绝大多数肥大细胞表现为类胰蛋白酶和糜蛋白酶染色双阳性, 仅有少数表现为类胰蛋白酶或糜蛋白酶单阳性; “双夹心”连续切片分析法显示, 所谓的类胰蛋白酶或糜蛋白酶单阳性肥大细胞实际上是类胰蛋白酶和糜蛋白酶双阳性; 以类胰蛋白酶为标记分子和以糜蛋白酶为标记分子检测肾组织肥大细胞的结果比较没有显著区别。结论 类胰蛋白酶糜蛋白酶亚型(MC_{TC}亚型)是正常个体和肾病患者肾组织肥大细胞的基本亚型。

〔关键词〕 肥大细胞; 肾脏病; 肥大细胞亚型

〔中图分类号〕 R329.461 〔文献标志码〕 A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2013.02.001

Subtyping of renal mast cells in patients with renal diseases

ZHENG Jing-min, YIN Guang, YAO Gen-hong, WANG Jian-ping, LIU Zhi-hong. Research Institute of Nephropathy, Jingling Hospital, Nanjing, Jiangsu 210002, China

〔Abstract〕 Objective To determine the subtype of renal mast cells in patients with renal diseases. Methods 369 patients with different renal diseases, including diabetic nephropathy, IgA nephropathy, acute interstitial nephritis, chronic interstitial nephritis, anaphylactoidpurpura nephritis, membranous nephropathy and lupus nephritis, were recruited and 16 normal kidney donors were used as normal controls. Immunohistochemical staining for tryptase and chymase was carried out on the serial renal sections of patients and controls. Mast cells were subtyped based on the expression of tryptase and chymase. Results Analysis based on two serial renal sections showed that most of mast cells were positive for both tryptase and chymase, only a small proportion was single positive. Analysis based on a kind of sandwich serial renal sections demonstrated that the previously found tryptase or chymase single positive mast cells were in fact positive for both tryptase and chymase. Mast cell counting based on immunohistochemical staining for tryptase or for chymase obtained similar results. Conclusion MC_{TC} is the major subtype of renal mast cells.

〔Key words〕 mast cells; renal diseases; mast cell subtype

近年来, 有关肥大细胞在肾病中的作用引起了不少研究者的注意。肥大细胞很可能在多种肾病的发生发展中有重要病理意义^[1-6], 但目前对于肾组织肥大细胞的确切病理作用仍不是很清楚。肥大细胞是一类多功能细胞, 具有高度的异质性^[5,7]。了解肾组织肥大细胞的表型特点, 对于阐明肾组织肥大细胞的功能, 探讨其在各种肾脏病理情况下的病理意义很有必要。目前对于肾组织肥大细胞的表型仍缺乏分析, 少数文献间的结果也差异很大。为此, 本文利用本研究所的肾活检标本资源优势对不同肾脏病患者肾组织肥大细胞的亚型进行了比较全面的分析, 以阐明肾脏病患者肾组织肥大细胞的亚型问题。

1 材料与方法

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK2012779)
作者单位: 210002 江苏南京, 南京军区南京总医院解放军肾脏病研究所, 全军肾脏病重点实验室

1.1 材料 小鼠抗人类胰蛋白酶抗体和糜蛋白酶抗体为 Chemicon 公司产品。Envision 试剂和显色液 DAB 为 Dako 公司产品。NIS Element BR 软件为 Nikon 公司产品。

1.2 病例选择 选择 2003 - 2009 年来南京军区南京总医院解放军肾脏病研究所就诊, 并经临床和病理分析确诊的糖尿病肾病 80 例、IgA 肾病 110 例、急性间质性肾炎 22 例、慢性间质性肾炎 18 例、过敏性紫癜性肾炎 16 例、膜性肾病 53 例、狼疮性肾炎 70 例。同时以 16 例正常供肾组织作为对照。

1.3 肾组织肥大细胞的标记和计数 根据肥大细胞特异性表达类胰蛋白酶和糜蛋白酶的特点, 利用抗类胰蛋白酶抗体和抗糜蛋白酶抗体以免疫组化方法标记肾组织中的肥大细胞。低倍镜下计数每张切片肾组织皮质区中的肥大细胞数, 利用 NIS Element BR 软件测量每张切片皮质区的肾组织面积, 得出每平方毫米(mm²)肾组织(皮质区)肥大细胞数。

1.4 免疫组化分析方法 肾活检组织标本经 10% 中性甲醛固定和石蜡包埋后,切成 2 μm 厚的切片,经脱蜡和复水处理后,以高压锅进行抗原修复^[8-9]。以 3% 过氧化氢甲醇溶液灭活内源性过氧化物酶,以 10% 胎牛血清封阻 30 min。经 PBS 洗 3 次,加入相应一抗(抗类胰蛋白酶抗体或抗糜蛋白酶抗体)于 4℃ 孵育过夜;PBS 洗涤 3 次,加 En Vision 试剂室温孵育 45 min;PBS 洗涤 3 次后进行 DAB 显色,再以苏木素复染 1 min,自然风干后封片观察。

1.5 双连续切片分析法 每一份肾活检标本选用两张连续切片,一张用于类胰蛋白酶免疫组化染色,另一张进行糜蛋白酶免疫组化染色。

1.6 “双夹心”连续切片分析法 每一肾活检标本选用三张连续切片,中间一张用于进行类胰蛋白酶(或糜蛋白酶)免疫组化染色,其余两张则进行糜蛋白酶(或类胰蛋白酶)免疫组化染色。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 10.0 软件进行统计分析,定量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析 Dunnett t 双侧检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 双连续切片免疫组化分析结果 利用双连续切片分析法,首先对 10 例糖尿病肾病、10 例 IgA 肾病、5 例急性间质性肾炎、5 例慢性间质性肾炎、5 例过敏性紫癜性肾炎、10 例狼疮性肾炎、10 例膜性肾病、16 例正常供肾肾活检标本中肥大细胞的亚型进行了检测分析。发现绝大部分(超过 80%)类胰蛋白酶染色阳性的肥大细胞,在其连续切片上糜蛋白酶染色也阳性(图 1,表 1)。说明无论是对照组,还是各种肾病疾患,肾组织肥大细胞以类胰蛋白酶糜蛋白酶双阳性亚型(MC_{TC}亚型)为主($P > 0.05$)。

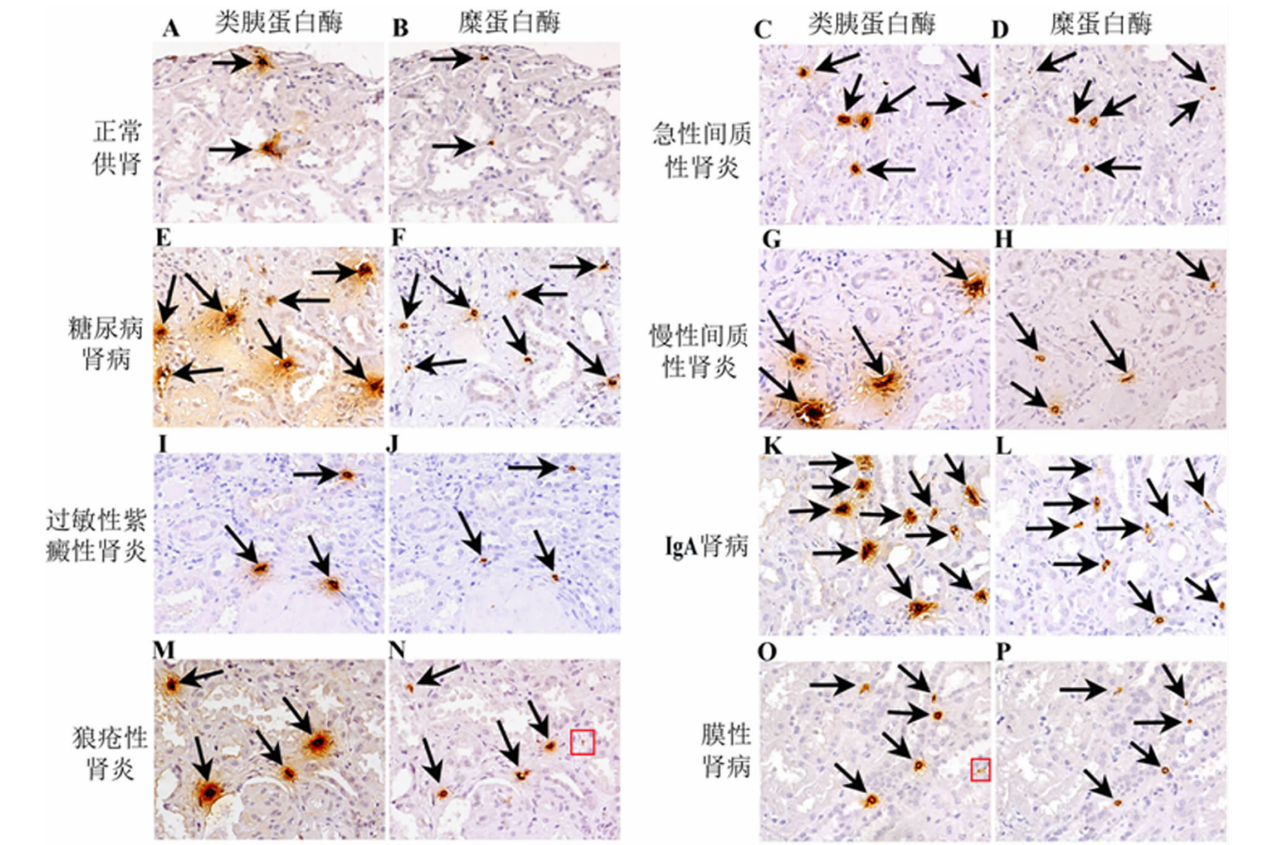


图 1 双连续切片法对各种肾脏病患者肾组织免疫组化分析结果(En Vision $\times 400$)
绝大多数肥大细胞(黑箭头所示)同时表达类胰蛋白酶和糜蛋白酶,仅有少数例外(红色方框所示)

表 1 双连续切片分析法检测各组肾组织肥大细胞中 MC _{TC} 亚型所占比例(%, $\bar{x} \pm s$)								
MC _{TC} 型	正常对照组 (n = 16)	急性间质性 肾炎组 (n = 5)	糖尿病 肾病组 (n = 10)	慢性间质性 肾炎组 (n = 5)	过敏性紫 癜性肾炎组 (n = 5)	IgA 肾病组 (n = 10)	狼疮性 肾炎组 (n = 10)	膜性肾病组 (n = 10)
比例	84.7 \pm 12.6	87.7 \pm 5.1	84.6 \pm 8.8	88.9 \pm 6.0	84.7 \pm 3.7	88.6 \pm 4.9	86.0 \pm 5.4	87.0 \pm 4.7

2.2 “双夹心”连续切片分析法分析结果 在上述双连续切片中有少数肾组织肥大细胞仅表现为类胰蛋白酶阳性或糜蛋白酶阳性。为进一步明确这些肥大细胞的亚型,进一步采用了“双夹心”连续切片分析法进行了分析,结果发现:那些在一张连续切片中显示糜蛋白酶或类胰蛋白酶阴性的肥大细胞在另一张连续切片中则显示糜蛋白酶或类胰蛋白酶阳性(图 2)。在整个实验分析中,并未发现真正糜蛋白酶或类胰蛋白酶单阳性的肾组织肥大细胞。

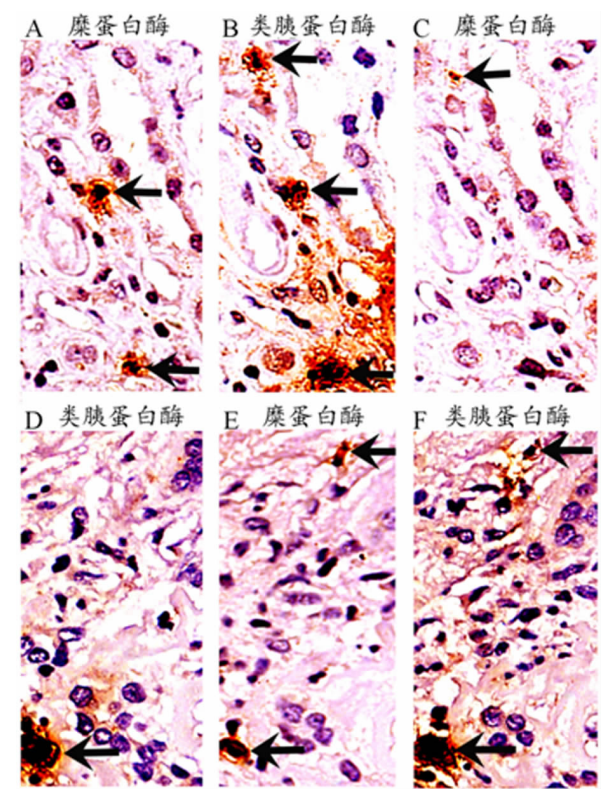


图 2 “双夹心”连续切片免疫组化分析结果(En Vision ×400)
一些所谓的仅表达类胰蛋白酶阳性或糜蛋白酶阳性的肥大细胞(黑箭头所示)其实同时表达类胰蛋白酶和糜蛋白酶阳性。图中 A、B、C 来自于一组 3 张连续切片, D、E、F 来自于另一组 3 张连续切片

2.3 肾组织类胰蛋白酶阳性肥大细胞和糜蛋白酶阳性肥大细胞数比较 分别以类胰蛋白酶和糜蛋白酶为标记分子,对 80 例糖尿病肾病、110 例 IgA 肾病、22 例急性间质性肾炎、18 例慢性间质性肾炎、16 例过敏性紫癜性肾炎、53 例膜性肾病和 70 例狼疮

性肾炎肾组织中的肥大细胞进行了计数分析。结果显示在所分析的各种肾脏病患者肾组织中,所测得的类胰蛋白酶阳性肥大细胞数与糜蛋白酶阳性肥大细胞数无显著性差异($P>0.05$,表 2)。

3 讨 论

肥大细胞最初因参与 I 型过敏反应而为人们所关注^[10]。但近年来的研究表明,肥大细胞还是先天性免疫和适应性免疫反应的重要调节者^[11-12]。肥大细胞具有高度的异质性,不同组织器官,甚至同一组织器官在不同病理情况下,其肥大细胞的表型均可存在差异。阐明特定组织器官在特定病理情况下肥大细胞的表型无疑有助于揭示肥大细胞的功能和病理意义。

根据表达类胰蛋白酶(tryptase)和糜蛋白酶(chymase)的差异,人肥大细胞可分为类胰蛋白酶型(MC_T)、类胰蛋白酶糜蛋白酶型(MC_{TC})和糜蛋白酶型(MC_C)三种亚型。 MC_T 型只表达类胰蛋白酶, MC_C 型只表达糜蛋白酶,而 MC_{TC} 型同时表达两蛋白酶。对于肾组织肥大细胞,已有的文献认为主要有 MC_{TC} 和 MC_T 两种亚型,但对于不同亚型的比例,不同的研究者得出的结论差异很大^[13-14]。笔者利用本研究所的肾活检资源优势,对不同肾脏病患者肾组织肥大细胞的亚型进行了分型分析。基于两张连续切片的分析(普遍采用的分析方法)发现,80% 以上的肾组织肥大细胞(无论是对照组还是各种肾脏病患者)同时表达类胰蛋白酶和糜蛋白酶;而进一步基于“双夹心”连续切片分析法的分析显示:一些所谓的类胰蛋白酶和糜蛋白酶单阳性肥大细胞其实是双阳性的。在本研究中,并未发现真正类胰蛋白酶或糜蛋白酶单阳性的肥大细胞,虽不能完全排除 MC_T 和 MC_C 肥大细胞在肾组织中的存在,但至少绝大部分肾组织肥大细胞均为 MC_{TC} 型肥大细胞。

对于有的文献仅发现很低比例的 MC_{TC} 肾组织肥大细胞问题,本文认为不同抗体的免疫组化染色信号强度差异是最重要的原因,从已有的文献和本文的研究结果来看,在同一情况下,糜蛋白酶抗体的检测信号明显要比类胰蛋白酶抗体的低得多。在研究中发现,即使不进行抗原修复,利用类胰蛋白酶

表 2 利用类胰蛋白酶抗体和糜蛋白酶抗体检测的肥大细胞数比较(个/ mm^2 , $\bar{x} \pm s$)							
检测方法	IgA 肾病组 ($n=110$)	过敏性紫癜性 肾炎组($n=16$)	急性间质性 肾炎组($n=22$)	慢性间质性 肾炎组($n=18$)	膜性肾病组 ($n=53$)	狼疮性肾炎 组($n=70$)	糖尿病肾病 组($n=80$)
类胰蛋白酶抗体	32.8 ± 26.9	9.9 ± 13.3	22.9 ± 21.8	43.2 ± 29.6	9.1 ± 9.0	12.9 ± 13.2	35.6 ± 31.4
糜蛋白酶抗体	31.1 ± 25.7	9.5 ± 12.5	20.4 ± 19.5	40.8 ± 29.3	8.6 ± 8.4	12.2 ± 12.5	34.8 ± 30.1

抗体也可很容易地检测到石蜡切片中的肥大细胞;而利用糜蛋白酶免疫组化检测石蜡切片中的肥大细胞则必须进行抗原修复,且即使进行了抗原修复,染色信号也远没有类胰蛋白的强。一旦抗原修复得不够,或阳性细胞计数时不够细心,均易造成糜蛋白酶阳性肥大细胞计数偏低。此外,切片造成的误差也是一个重要原因。这一点已为本文采用的“双夹心”连续切片分析法所证实。

总之,本文的研究表明,MC_{TC}型是肾组织肥大细胞的基本亚型,虽不能完全排除 MC_T 和 MC_C 型在肾组织中的存在,但这两种亚型的肥大细胞即使存在,其数量也不会太多。

【参考文献】

[1] 郑敬民,尹广,姚根宏,等. 肾病患者肾组织补体活化与肥大细胞浸润的关系研究[J]. 医学研究生学报,2012,25(10):1040-1044.

[2] Wasse H,Naqvi N,Husain A. Impact of mast cell chymase on renal disease progression[J]. Curr Hypertens Rev,2012,8(1):15-23.

[3] Wang X,Chen H,Zhang M,et al. Roles of mast cells and monocyte chemoattractant protein-1 in the renal injury of obesity-related glomerulopathy[J]. Am J Med Sci,2012,[Epub ahead of print]

[4] Summers SA,Gan PY,Dewage L,et al. Mast cell activation and degranulation promotes renal fibrosis in experimental unilateral ureteric obstruction[J]. Kidney Int,2012,82(6):676-685.

[5] Gilfillan AM,Austin SJ,Metcalf DD. Mast cell biology: introduction and overview[J]. Adv Exp Med Biol,2011,716:2-12.

[6] Ehara T,Shigematsu H. Mast cells in the kidney[J]. Nephrology (Carlton),2003,8(3):130-138.

[7] Shelburne CP,Abraham SN. The mast cell in innate and adaptive immunity[J]. Adv Exp Med Biol,2011,716:162-185.

[8] 王海,冷冬妮,石群立,等. 基底细胞样乳腺癌临床病理研究[J]. 东南国防医药,2009,11(4):293-297.

[9] 曲利娟,余英豪,曾玲,等. 大肠癌肝转移灶组织 Fas/Fas L 的表达及其作用机制的探讨[J]. 东南国防医药,2002,4(1):16-17.

[10] Sayed BA,Christy A,Quirion MR,et al. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance[J]. Annu Rev Immunol,2008,26:705-739.

[11] Kawakami T. A crucial door to the mast cell mystery knocked in[J]. J Immunol,2009,183(11):6861-6862.

[12] Galli SJ,Kalesnikoff J,Grimbaldeston MA,et al. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances[J]. Annu Rev Immunol,2005,23:749-786.

[13] Rüger BM,Hasan Q,Greenhill NS,et al. Mast cells and type VIII collagen in human diabetic nephropathy[J]. Diabetologia,1996,39(10):1215-1222.

[14] Okoń K,Stachura J. Increased mast cell density in renal interstitium is correlated with relative interstitial volume, serum creatinine and urea especially in diabetic nephropathy but also in primary glomerulonephritis[J]. Pol J Pathol,2007,58(3):193-197.

(收稿日期:2012-08-27;修回日期:2013-01-15)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)



• 短篇 •

乌司他丁联合甲泼尼龙治疗脂肪栓塞综合征 5 例的体会

尹述旺¹,阳文新¹,王跃华¹,周茹霜²

【关键词】 乌司他丁;甲泼尼龙;脂肪栓塞综合征

【中图分类号】 R683 【文献标志码】 B

doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2013.02.030

我院 2010 年 2 月 - 2012 年 4 月收治 5 例脂肪栓塞综合征(FES),经乌司他丁联合甲泼尼龙治疗后效果满意,报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料 本组 5 例,男 4 例、女 1 例,年龄 18 ~ 64 岁,平均 43 岁。致伤因素:车祸 2 例、挤压 2 例、高空坠落 1

例。骨折类型:单侧股骨合并胫腓骨骨折 2 例,双侧股骨干骨折 1 例,骨盆骨折合并单侧胫腓骨骨折 1 例,骨盆粉碎性骨折 1 例。闭合性骨折 4 例,开放性骨折 1 例。栓塞部位:肺栓塞 5 例,其中肺、脑栓塞 1 例。发病时间:术前 4 例,术后 1 例。发热、呼吸困难 5 例,意识障碍 1 例,全身皮肤出血点 4 例,休克 2 例。肺 X 线片示两肺纹理呈“暴风雪”样改变 5 例;头颅 MRI 示脑内广泛、对称性分布点状 T₁T₂ 异常信号灶 1 例;尿液镜检可见脂肪滴 5 例;血气分析示氧分压 < 60 mmHg 5 例,氧合指数 < 200 mmHg 5 例。

1.2 治疗方法 骨骼牵引 4 例,开放性骨折急诊手术固定 1 例。5 例予以乌司他丁 30 wiu 静脉滴注,1 次/6 h,使用 1 周后停药。甲泼尼龙 240 mg 静脉滴注,1 次/6 h,3 ~ 4 d 后逐渐减量直至停药。本组 5 例都予以有创机械通气,采取

(下转第 104 页)

作者单位: 1. 210002 江苏南京,解放军 81 医院急诊科;2. 210003 江苏南京,南京军区联勤部苜蓿园干休所卫生所