

肾病综合征患儿肾脏 ACE mRNA 表达
与病理损害相关性的研究

李志辉 易著文

(中南大学湘雅二医院小儿肾脏病研究室,湖南 长沙 410011)

[摘 要] 目的 探讨肾病综合征(NS)患儿肾脏局部肾素-血管紧张素系统(RAS)表达与肾脏病理损害的关系,阐明儿童 NS 肾脏损害慢性病理进展的部分机制。方法 采用原位杂交的方法检测 85 例原发性 NS 患儿肾脏原位血管紧张素转换酶(ACE)mRNA 的表达水平,评分法半定量评估肾脏的病理损害。结果 ①对照组、NS 患儿组肾小球内 ACE mRNA 表达阳性细胞百分率分别为 $(3.97 \pm 1.43)\%$ 和 $(22.61 \pm 12.30)\%$ ($P < 0.01$);小管间质区域分别为 $(19.15 \pm 5.96)\%$ 和 $(58.42 \pm 17.61)\%$ ($P < 0.01$)。②NS 患儿 5 种病理类型间(MCD、FSGS、MN、MPGN、MsPGN)肾小管间质区域的 ACE mRNA 表达水平各组间差异无显著性意义($P > 0.05$),肾小球内仅 MCD 组与其它各组间差异有显著性意义($P < 0.01$)。③按照肾脏病理损害的程度分成轻、中、重度 3 组,其 ACE mRNA 表达阳性细胞百分率分别为 $(30.50 \pm 6.52)\%$ 、 $(45.20 \pm 11.06)\%$ 和 $(54.77 \pm 11.86)\%$ ($P < 0.01$)。结论 在儿童 NS 肾脏的慢性病理进展中,肾脏局部 RAS 紊乱可能是重要原因之一。

[关 键 词] 肾病综合征;血管紧张素转换酶;肾脏病理;儿童

[中图分类号] R692 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2002)04-0271-04

Relationship Between the Expression of ACE mRNA in Renal and Renal
Pathologic Lesions in Children with the Nephrotic Syndrome

LI Zhi-Hui, YI Zhu-Wen

Laboratory of Pediatric Nephrology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China

Abstract: **Objective** To explore the possible correlation between the expression of the renin angiotensin system (RAS) and renal pathologic lesions, and to study the mechanism of renal progressive damages in children with the nephrotic syndrome (NS). **Methods** Eighty-five children (64 boys and 21 girls) with the primary NS were involved in this study. Renal biopsies were performed in all of them. In situ hybridization was used to semiquantitate ACE mRNA expression in renals. Histopathological lesions of renals were evaluated by the method of counting score. **Results** ①The percentage of ACE mRNA-positive cells in glomerulars of the children with NS was higher than that in normal glomerulars [$(22.61 \pm 12.3)\%$ vs $(3.97 \pm 1.43)\%$; $P < 0.01$]; so was it in tubulointerstitiums [$(58.42 \pm 17.61)\%$ vs $(19.15 \pm 5.96)\%$; $P < 0.01$]. ②No differences of ACE mRNA expression and histopathological lesions in tubulointerstitiums among the 5 different pathologic types (MCD, FSGS, MN, MPGN and MsPGN) were found. There were significant differences in ACE mRNA expression and histopathological lesions in glomerulars of the children with MCD compared with those with FSGS, MN, MPGN or MsPGN (all $P < 0.01$). ③There were significant differences in the percentage of ACE mRNA expression positive cells between the children with different degrees of kidney pathologic lesions [mild = $(30.50 \pm 6.52)\%$; moderate = $(45.20 \pm 11.06)\%$; severe = $(54.77 \pm 11.86)\%$; $P < 0.01$]. **Conclusions** The RAS disorder in situ renals might be one of the important causes of progressive renal lesions in children with NS.

[收稿日期] 2001-11-15; [修回日期] 2002-04-28
[基金项目] 卫生部资助课题(98-1-117)
[作者简介] 李志辉(1963-),女,博士,主治医师。现在中南大学湘雅三医院肾内科。

Key words: Nephrotic syndrome; Angiotensin converting enzyme; Kidney pathology; Child

目前血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin convey enzyme inhibitor, ACEI)在多种成人肾脏疾病中广泛应用。近两年来,也有在儿童 NS(nephrotic syndrome)中应用 ACEI 减少尿蛋白排出的报道^[1,2],因而推测:肾素-血管紧张素系统(renin angiotensin system, RAS)可能参与了儿童 NS 的发病,但是目前尚没有关于儿童 NS 肾脏病理损害与 RAS 关系的系统研究报道。为了证实上述的假说,我们检测了 85 例原发性 NS 患儿肾组织血管紧张素转换酶(angiotensin convey enzyme, ACE)mRNA 的表达和分布,并研究分析其与肾脏病理损害程度的关系,进一步证实和阐明 RAS 在儿童 NS 慢性病理进展中的作用,为防治儿童 NS 的病理进展提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象

入选病例为我院儿科 1993 年 7 月至 1999 年 12 月住院并进行了肾活检的 85 例原发性 NS,临床诊断根据 1981 年全国儿科肾脏病科研协作组制订的 NS 诊断标准^[3]。肾脏病理分型标准依据 1986 年中华肾脏病学会肾脏病理协作组制订的标准^[4]。85 例病人中,男 64 例,女 21 例。病理诊断为微小病变型(MCD)11 例(13%),局灶节段性肾小球硬化(FSGS)8 例(9%),膜性肾病(MN)10 例(12%),系膜毛细血管性肾炎(MPGN)22 例(26%),系膜增生性肾小球肾炎(MsPGN)34 例(40%)。正常肾组织对照组选择我院泌尿外科住院的肾肿瘤并行肾切除的病人,血压正常,血、尿常规和肝肾功能检查正常,选取的肾组织远离肿瘤部位,肉眼和光学显微镜观察,组织结构正常。

1.2 分组

观察正常肾组织(对照组)与 NS 患儿肾组织(NS 组)ACE mRNA 的表达水平。

观察 NS 患儿肾脏损害病理类型为 MCD、FSGS、MN、MPGN、MsPGN 5 组间的 ACE mRNA 的表达水平与病理损害程度。

按照肾小球损害程度分成正常、轻度、中度损害 3 组^[5]。观察 3 组间肾小球区域 ACE mRNA 的表达水平。按照小管间质损害程度分成轻度、中度、重度损害 3 组。观察 3 组间小管间质区域 ACE mRNA 的表达水平。以肾脏总的病理损害程度分成轻、中、重度 3 组,观察 3 组间肾脏原位 ACE mRNA 的表达水平。

1.3 肾组织原位 ACE mRNA 表达的检测

1.3.1 实验步骤 肾组织石蜡块切成 3~5 μm 的切片,依次烤片、脱蜡、3% H_2O_2 处理,然后滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶消化组织,洗涤后在切片上加含寡核苷酸探针的原位杂交液,于湿盒中恒温箱 37℃ 杂交过夜。洗涤后滴加杂交探针稳定液,湿盒中 37℃ 反应 5 h,然后依次滴加封闭液、兔抗地高辛,洗涤后再滴加生物素化羊抗兔 IgG, PBS 洗涤后滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液 37℃ 孵育 20 min,最后 DAB 显色、苏木素轻度复染、酒精脱水、二甲苯透明、封片。实验同时设立阴性对照,以 PBS 液代替特异性的 ACE 寡核苷酸探针,其余步骤与上述的实验步骤相同。

1.3.2 实验结果观察 细胞染色呈棕褐色为阳性细胞。分别计数肾小球内和肾小管间质区域内细胞总数和 ACE mRNA 表达阳性细胞数,计算出阳性细胞的百分率,每张切片随机选取 10 个肾小球、10 个视野的小管间质区域,取平均值。

1.4 NS 患儿肾脏病理损害评价方法

肾脏病理损害分型标准依据 1986 年中华肾脏病学会肾脏病理协作组制订的标准。肾脏病理损害程度的评价采用计分法^[5]。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计学处理,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组样本均数间比较,方差齐者采用 t 检验,方差不齐者采用 t' 检验。多组样本均数间比较,方差齐者采用 One-Way ANOVA 分析,组间两两比较采用 LSD 法,方差不齐者,首先通过数据转换成方差齐后再进行统计检验。

2 结果

2.1 正常肾组织、NS 肾组织 ACE mRNA 表达的比较

正常肾组织肾小管间质区域呈现 ACE mRNA 阳性信号表达,肾小球的阳性信号表达较弱,两者之间的差异有显著性意义($P < 0.01$)。NS 患者肾组织 ACE 表达呈现强阳性,但肾小管间质区域阳性细胞百分率高于肾小球,两者之间的差异有显著性意义($P < 0.01$)。正常对照组肾组织的肾小管间质区域及肾小球区域的 ACE mRNA 表达阳性细胞百分率均低于 NS 患者,差异有显著性意义($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 对照组、NS 组肾组织 ACE mRNA 表达阳性细胞百分率之比较

Table 1 Comparison of percentage of ACE mRNA positive cells in kidneys between the controlled and NS groups ($\bar{x} \pm s, \%$)					
组别	例数	肾小球区域	肾小管间质区域	t'	P
对照组	6	3.97±1.43	19.15±5.96	-6.02	<0.01
肾病组	85	22.61±12.30	58.42±17.61	-15.37	<0.01
t'		3.690	5.416		
P		<0.01	<0.01		

2.2 肾脏病理损害类型与肾组织 ACE mRNA 表达的关系

表 2 MCD、FSGS、MN、MPGN 和 MsPGN 组 肾小球和小管间质 ACE mRNA 表达阳性细胞百分率及病理损害评分之比较

Table 2 Percentage of ACE mRNA expression positive cells and marks of pathologic lesions in glomerular and tubulointerstitium among MCD, FSGS, MN, MPGN and MsPGN groups ($\bar{x} \pm s, \%$)					
分组	例数	肾组织 ACE mRNA 表达阳性细胞百分率(%)		肾脏病理损害评分(分数)	
		肾小球区域	小管间质区域	肾小球	小管间质
MCD	11	6.07±2.23	52.93±18.87	1.36±1.43	7.18±5.08
FSGS	8	25.27±8.11 ^a	58.66±21.64	6.0±2.39 ^a	7.63±4.07
MN	10	22.30±10.74 ^a	56.92±14.88	4.40±2.22 ^a	7.60±4.45
MPGN	22	22.72±8.22 ^a	57.66±14.69	6.0±2.0 ^a	7.09±2.91
MsPGN	34	27.34±13.40 ^a	61.08±19.13	5.56±2.54 ^a	8.62±3.19
F		6.909	0.484	9.494	0.724
P		0.000	0.747	0.000	0.578

注：a 与 MCD 组比较, $P < 0.01$

2.3 肾脏组织病理损害程度与肾组织 ACE mRNA 表达的关系

2.3.1 按照肾小球损害的程度 分成正常(5 例, 6%)、轻度损害(59 例, 69%)、中度损害(20 例, 24%)、因重度损害仅 1 例, 未进行统计处理。3 组间肾小球区域的 ACE mRNA 表达：正常组为(7.88±6.32)%、轻度损害组为(19.85±9.65)%、中度损害组为(35.33±10.41)%、3 组间差异有显著性意义($F = 25.32, P < 0.01$)。

2.3.2 按照小管间质损害的程度 分为轻度损害(31 例, 36%)、中度损害(41 例, 48%)、重度损害(13 例, 15%)3 组。3 组间小管间质区域的 ACE mRNA 表达：轻度组为(42.73±6.80)%、中度组为(61.19±11.96)%、重度损害组为(87.09±5.02)%、3 组间差异有显著性意义($F = 103.01, P < 0.01$)。

2.3.3 按照肾脏总的病理损害程度 分为轻度损害(30 例, 35%)、中度损害(47 例, 55%)、重度损害(8 例, 9%)3 组。3 组间肾组织(肾小球和小管间质

按照肾脏损害的病理类型分成 MCD、FSGS、MN、MPGN、MsPGN 5 组。我们检测了这 5 种不同的病理类型肾组织 ACE mRNA 的表达(图 1~3, 见封 III)。发现 5 组间比较, 肾小球的 ACE mRNA 表达差异有显著性意义($P < 0.01$)、进一步组间两两比较, MCD 组低于其它各组, 差异有显著性意义($P < 0.01$)、其余各组两两比较, 差异无显著性意义($P > 0.05$)、肾小管间质区域的 ACE mRNA 表达, 5 组间差异无显著性意义($P > 0.05$)。见表 2。而 5 组间的肾小球病理损害程度、小管间质病理损害程度与 ACE mRNA 的表达水平相平行, 相关系数分别为 0.482 和 0.85, $P < 0.01$ 。

区域的平均值)ACE mRNA 表达阳性细胞百分率：轻度组为(30.50±6.52)%、中度组为(45.20±11.06)%、重度损害组为(54.77±11.86)%、3 组间差异有显著性意义($F = 29.58, P < 0.01$)；中、重度损害组 ACE mRNA 阳性细胞百分率明显高于轻度损害组($P < 0.01$)、重度损害组 ACE mRNA 阳性细胞百分率又明显高于中度损害组($P < 0.01$)。

3 讨论

我们的研究发现：正常肾组织有 ACE mRNA 表达阳性信号出现, 主要定位于肾小管, 肾小球内系膜细胞也有弱的阳性信号出现, 说明肾脏内存在着 RAS, 并且提示肾小管可能是肾内合成血管紧张素 II(angiotensin II, AT II)的主要位点, 与国外 Dzau VJ 等^[6]的研究结果一致。

Lai Kn 等^[7]应用体外细胞培养和原位杂交的方法, 对正常人和 IgA 肾病、糖尿病肾病、狼疮性肾

炎病人的肾脏内固有细胞,检测 RAS 各成分的基因表达,发现在正常人的肾小球旁器细胞、系膜细胞、肾小管上皮细胞均有肾素 mRNA 表达;而 ACE、血管紧张素原(angiotensinogen, Ang)仅在肾小管上皮细胞有表达。但是在疾病状态下,RAS 各成分在肾脏固有细胞的表达均显著增强,并且在肾小球的系膜细胞也出现 ACE、Ang 的 mRNA 表达。我们的研究也显示了类似的发现:肾病综合征患儿肾组织 ACE mRNA 表达呈现强阳性,并显著高于正常对照组;NS 患儿肾小管间质区域的 ACE mRNA 阳性细胞百分率较肾小球区域的阳性信号百分率显著增高。说明在 NS 患儿,肾组织局部 ACE mRNA 表达增强,提示 AT II 的浓度可能增高,并在病理状态下肾小管仍然可能为肾内 AT II 产生的主要位点。

我们进一步用评分法对肾脏病理损害进行半定量分析,分别以肾小管间质病理损害程度分组、肾小球病理损害程度分组、肾脏总的病理损害程度分组3种方法研究肾脏组织 ACE mRNA 表达水平和病理损害程度的关系,均显示肾脏内的 ACE mRNA 表达水平与肾脏的病理损害程度相平行,肾脏的病理损害越重,ACE mRNA 表达水平越高,提示在 NS 患儿,肾内 RAS 的表达增强与肾脏组织的病理损害程度密切相关。本研究表明在5种不同的病理类型小管间质区域的 ACE mRNA 表达水平和小管间质的损害程度之间,差异无显著性意义;肾小球区域的 ACE mRNA 表达水平和肾小球损害的程度相平行,

仅有 MCD 组与其他各组间,差异有显著性意义。推测肾脏原位 ACE mRNA 表达水平可能与肾脏病理损害类型相关性较小,与肾脏的病理损害程度相关性较大。这些发现均说明肾脏的病理损害程度与肾脏原位 ACE mRNA 的表达水平密切相关。提示在 NS 患儿肾脏的慢性病理进展中,肾脏局部 RAS 紊乱是重要原因之一。

[参 考 文 献]

- [1] Prasher PK, Varma PP, Baliga KV. Efficacy of enalapril in the treatment of steroid resistant idiopathic nephrotic syndrome[J]. J Assoc Physicians India, 1999, 47(2): 180-182.
- [2] Lama G, Luongo I, Piscitelli A, et al. Enalapril: antiproteinuric effect in children with nephrotic syndrome[J]. Clin Nephrol, 2000, 53(6): 432-436.
- [3] 全国小儿肾脏病协作组.《关于小儿肾小球疾病临床分类和治疗的建议》的修订意见[J]. 中华儿科杂志, 1981, 19(4): 241-243.
- [4] 中华肾脏病学会肾脏病理协作组. 关于原发性肾小球疾病病理类型的命名的建议[J]. 中华肾脏病杂志, 1986, 2(4): 172-174.
- [5] 李志辉, 易著文, 何小解, 等. 激素耐药型和激素依赖型肾病患儿肾脏病理计量分析[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(8): 449-452.
- [6] Dzau VJ, Ingelfinger JR. Molecular biology and pathophysiology of the intrarenal rennin-angiotensin system[J]. J Hypertens Suppl, 1989, 7(7): S3-8.
- [8] Lai KN, Leung JC, Lai KB, et al. Gene expression of the renin-angiotensin system in human kidney[J]. J Hypertens, 1998, 16(1): 91-102.

(本文编辑 俞燕)

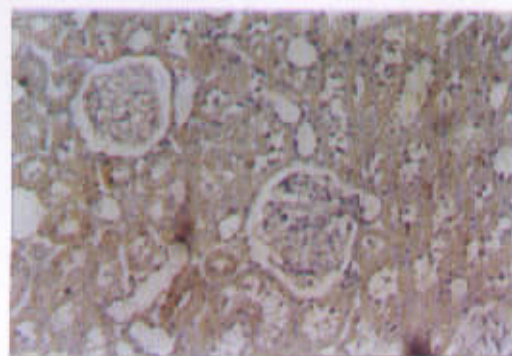


图 1 正常肾组织、ACE mRNA 表达阳性, 阳性信号主要分布于肾近曲小管, 肾小球阳性信号较弱 ($\times 200$)

Figure 1 ACE mRNA expression being positive in normal kidneys and positive sign mainly appearing in proximal tubular ($\times 200$).

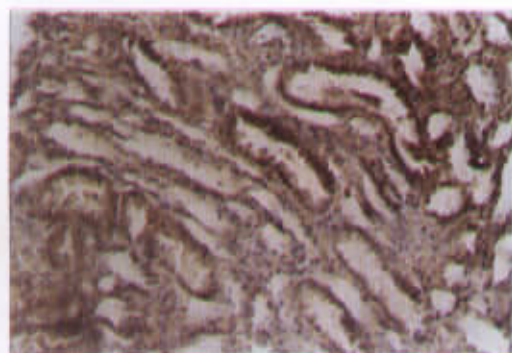


图 2 肾病综合征患儿肾小管间质 ACE mRNA 表达强阳性 ($\times 200$)

Figure 2 Expression of ACE mRNA being strongly positive in tubulo interstitium in children with NS ($\times 200$).

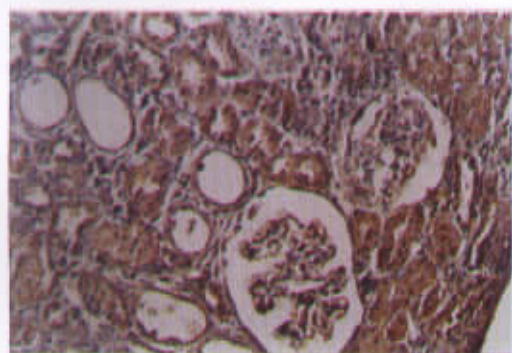


图 3 肾病综合征患儿肾小管间质及肾小球的 ACE mRNA 表达均呈强阳性 ($\times 200$)

Figure 3 Expressions of ACE mRNA in both tubulo interstitium and glomerular being strongly positive in children with NS ($\times 200$).

远端型进行性肌营养不良 1 例

(正文见第 331 页)

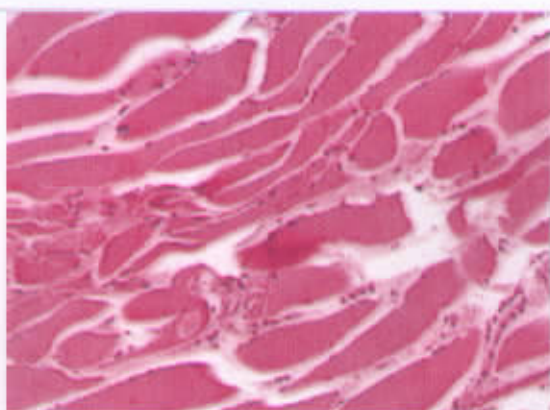
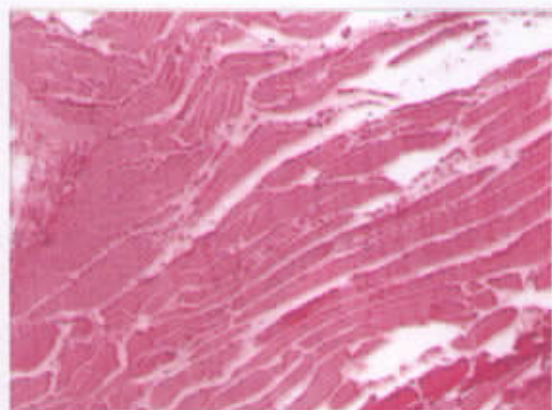


图 1 进行性肌营养不良病理检查光镜所见: 横纹肌组织部分纤维萎缩, 肌纤维大小不等, 呈退行性变性, 肌细胞核呈多个, 肌纤维伴少量脂肪浸润