

整合素连接激酶表达与儿童紫癜性肾炎肾小球损害的关系

李志辉,张翼,银燕,何金华,段翠蓉,寻劭,刘志群

(湖南省儿童医院肾内科 湖南省儿科医学研究所肾脏病研究室,湖南 长沙 410007)

[摘要] 目的 研究表明整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)在肾脏疾病的发生、发展中起着重要作用。该研究旨在探讨 ILK 与儿童紫癜性肾炎(HSPN)肾小球损害的关系。方法 188 例 HSPN 患儿按照国际儿童肾脏病组织(ISKDC)关于 HSPN 肾脏病理分级分成 5 组,即≤Ⅱa 级组、Ⅱb 级组、Ⅲa 级组、Ⅲb 级组、≥Ⅳ级组。对照组为薄基膜肾病患儿。采用免疫组织化学方法检测对照组及 HSPN 患儿肾小球 ILK 的表达,分析肾小球 ILK 表达与肾小球病理损害、尿蛋白排泄量之间的关系。结果 ①ILK 在肾小球的表达:对照、≤Ⅱa 级、Ⅱb 级、Ⅲa 级、Ⅲb 级、≥Ⅳ级组 6 组患儿肾小球 ILK 的阳性表达面积分别为:(3.35±1.01)%、(4.88±1.13)%、(9.64±1.36)%、(11.27±1.68)%、(17.42±3.0)%、(20.62±2.32)%,6 组间比较,差异有非常显著性($P<0.01$)。②随着患儿尿蛋白排泄量的增加,肾小球 ILK 表达逐渐增强,尿蛋白阴性组、尿微量白蛋白组、显著尿蛋白组及大量尿蛋白组间的 ILK 表达差异有非常显著性($P<0.01$)。结论 ILK 与儿童 HSPN 肾小球病理损害及蛋白尿的发生密切相关。

[中国当代儿科杂志,2009,11(11):888-891]

[关键词] 整合素连接激酶;紫癜性肾炎;肾小球;蛋白尿;儿童
[中图分类号] R692.3⁺4 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2009)11-0888-04

Relationship between integrin-linked kinase expression and renal glomerular damage in children with Henoch-Schönlein purpura nephritis

LI Zhi-Hui, ZHANG Yi, YIN Yan, HE Jin-Hua, DUAN Cui-Rong, XUN Mai, LIU Zhi-Qun. Department of Nephrology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China (Email:lizh0731@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective Recent studies have shown that integrin-linked kinase (ILK) plays an important role in the pathogenesis and development of some kidney diseases. This study aimed to investigate the relationship between ILK and renal glomerular damage in children with Henoch-schonlein purpura nephritis (HSPN). **Methods** One hundred and eighty-eight HSPN children (aged 3 to 17 years) were assigned to five groups according to the classification of the International Study of Kidney Disease in Children (ISKDC): grade ≤Ⅱa ($n=62$), grade Ⅱb ($n=42$), grade Ⅲa ($n=29$), grade Ⅲb ($n=40$) and grade ≥Ⅳ ($n=15$). Fifteen children with basement membrane nephropathy served as the control group. ILK expression on glomeruli was ascertained by immunohistochemical staining. The relationships of ILK expression on glomeruli with glomerular histopathologic lesions and urinary protein excretions were examined. **Results** The positive areas of ILK expression on glomeruli in the control, grade≤Ⅱa, grade Ⅱb, grade Ⅲa, grade Ⅲb and grade≥Ⅳ groups were (3.35±1.01)%, (4.88±1.13)%, (9.64±1.36)%, (11.27±1.68)%, (17.42±3.0)% and (20.62±2.32)%, respectively. There were significant differences in the ILK expression between groups ($P<0.01$). ILK expression on glomeruli increased with increased urinary protein excretions. There were significant differences in the ILK expression in children with different urinary protein excretions ($P<0.01$). **Conclusions** ILK might be involved in the process of renal glomerular histopathologic damage and the production of proteinuria in children with HSPN.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (11):888-891]

Key words: Integrin-linked kinase; Henoch-Schönlein purpura nephritis; Renal glomeruli; Proteinuria; Child

整合素连接激酶(integrin-linked kinase, ILK)是整合素的胞浆结合蛋白质,通过调控整合素的功能而介导细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的沉积、细胞表型改变、细胞分化、迁移以及凋亡^[1-10]。我们在前期的实验研究中已经证实 ILK 能够影响肾小球系膜细胞的生物学行为,促进 ECM 的聚集^[11,12]。紫癜性肾炎(Henoch-Schönlein purpura nephritis, HSPN)是儿童继发性肾小球疾病中最常见者,尽管其肾脏损害的临床表现、病理损害轻重不一,但其最基本的肾脏病理损害是肾小球系膜细胞

[收稿日期]2009-03-20;[修回日期]2009-04-28
[作者简介]李志辉,女,博士,主任医师。主攻方向:小儿肾脏病。

及系膜基质增生。ILK 是否参与了儿童 HSPN 的肾脏损害目前尚未见报道。

1 对象和方法

1.1 研究对象

2006 年 12 月至 2008 年 12 月在我院肾内科住院的 HSPN 患儿。病例入选标准:①按照中华医学会儿科学分会肾脏病学组 2000 年珠海会议关于紫癜性肾炎的诊断标准^[13];②完成肾活检,明确肾脏病理损害;③排除其他肾脏疾病。符合以上标准的患儿共 188 例,男 113 例,女 75 例,年龄 7.6 ± 2.6 岁;病程 7 d 至 18.3 个月,平均为 23 d。对照组病例的入选标准:①临床诊断为孤立性血尿;②肾脏病理诊断为薄基膜肾病,无其他肾脏病理损害;③排除其他肾脏疾病;符合以上标准者 15 例(男 9 例,女 6 例,年龄 7.0 ± 2.4 岁)入选为对照组。

1.2 试剂

免疫组织化学试剂盒、兔抗人 ILK 多克隆抗体购自中杉金桥公司,肾脏病理试剂购自长沙新维技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 分析肾小球损害程度与 ILK 表达水平之间的关系 以 HSPN 肾脏病理分级为依据进行分组,分级的标准参照国际儿童肾脏疾病组织 (ISK-DC) 关于 HSPN 病理分级标准。病理分级 II a 或 II a 以下组(简称 $\leq$ II a 组)62 例,男 37 例,女 25 例;病理分级 II b 组(简称 II b 组)42 例,男 25 例,女 17 例;病理分级 III a 组(简称 III a 组)29 例,男 17 例,女 10 例;病理分级 III b 组(简称 III b 组)40 例,男 23 例,女 17 例;病理分级 IV 或 IV 以上组(简称 $\geq$ IV 组),15 例,男 10 例,女 5 例。

1.3.2 分析尿蛋白量与肾小球 ILK 表达水平之间的关系 按照 24 h 尿蛋白排出量分成 5 组:①对照组 15 例;②尿常规及尿微量白蛋白检测均为阴性者(简称尿蛋白阴性组)27 例;③尿常规蛋白检测阴性,微量白蛋白检测为阳性者(简称尿微量白蛋白组)38 例;④尿常规蛋白检测阳性,24 h 尿蛋白定量 ≤ 50 mg/kg 者(简称显著尿蛋白组)93 例;⑤24 h 尿蛋白定量 > 50 mg/kg 者(简称大量尿蛋白组)30 例。

1.3.3 免疫组织化学方法检测肾组织 ILK 的表达 4 μ m 肾组织石蜡切片,经常规烤片、脱蜡、梯度乙醇至水,3% H_2O_2 处理,胰酶消化、抗原修复、血清封闭,再分别先后予兔抗人 ILK 多克隆抗体(一抗)孵育、山羊抗兔 IgG(二抗)孵育、链酶卵白素工作液孵育,再予 DAB 显色、苏木素复染,最后脱水、透明、封片,光镜下观察结果。阴性对照予 PBS 替代一抗,步骤同上。ILK 阳性信号表达采用真彩色医学图像分析软件半定量分析方法,每张切片随机选 10 个肾小球视野,分别测量其阳性表达面积,并计算平均值。

1.3.4 统计学分析方法 应用 SPSS 11.5 统计软件进行处理,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间资料采用方差分析,两组间比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 ILK 在肾小球的表达

对照组肾小球脏层上皮细胞、系膜细胞均有 ILK 弱阳性信号表达;ILK 在 HSPN 患儿肾小球脏层上皮细胞、系膜细胞、系膜基质及肾小球壁层上皮细胞均有较强的阳性信号表达(图 1)。

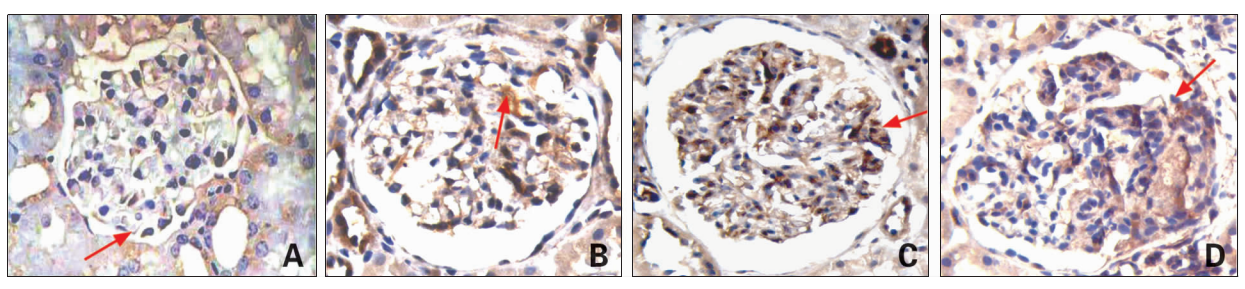


图 1 ILK 在肾小球的表达($\times 400$) A:对照组脏层上皮细胞 ILK 呈弱阳性表达;B:肾小球局灶节段性病变的 ILK 阳性表达;C:肾小球弥漫性病变的 ILK 阳性表达;D:肾小球新月体病变的 ILK 阳性表达。

2.2 ILK 与肾小球损害的关系

在 HSPN 患儿,随着肾脏损害级别的增加,ILK 阳性表达信号逐渐增强,对照组、 $\leq$ II a 组、II b 组、

III a 组、III b 组、 $\geq$ IV 组的 ILK 阳性表达面积分别为 $(3.35 \pm 1.01)\%$ 、 $(4.88 \pm 1.13)\%$ 、 $(9.64 \pm 1.36)\%$ 、 $(11.27 \pm 1.68)\%$ 、 $(17.42 \pm 3.0)\%$ 、

(20.62 ± 2.32)% ,6 组间 ILK 阳性表达面积比较差异有非常显著性($P < 0.01$,表 1)。

表 1 不同级别肾脏病理损害组肾小球 ILK 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)		
组别	例数	ILK 阳性表达面积
对照	15	3.35 ± 1.01
≤ II a	62	4.88 ± 1.13 ^a
II b	42	9.64 ± 1.36 ^{b,c}
III a	29	11.27 ± 1.68 ^{b,c,d}
III b	40	17.42 ± 3.0 ^{b,c,e,f}
≥ IV	15	20.62 ± 2.32 ^{b,c,e,f,g}
F 值		154.602
P 值		<0.01

a:与对照组比较, $P < 0.05$; b:与对照组比较, $P < 0.01$; c:与 ≤ II a组比较, $P < 0.01$; d:与 II b 组比较, $P < 0.05$; e:与 II b 组比较, $P < 0.01$; f:与 III a 组比较, $P < 0.01$; g:与 III b 组比较, $P < 0.01$ 。

2.3 ILK 与 24 h 尿蛋白排出量之间的关系

随着患儿 24 h 尿蛋白排泄量的增加,肾小球 ILK 阳性表达信号逐渐增强,对照组、尿蛋白阴性组、尿微量白蛋白组、显著尿蛋白组、大量尿蛋白组 6 组间 ILK 阳性表达面积比较差异有非常显著性($P < 0.01$)。尿蛋白阴性组与对照组之间的 ILK 阳性表达面积差异无显著性(表 2)。

表 2 不同程度的尿蛋白排泄量患儿肾小球 ILK 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)		
组别	例数	ILK 阳性表达面积
对照	15	3.4 ± 1.0
尿蛋白阴性	27	3.8 ± 1.0
尿微量白蛋白	38	6.7 ± 1.4 ^{a,c}
显著尿蛋白	93	10.9 ± 3.8 ^{b,c,d}
大量尿蛋白	30	18.5 ± 4.4 ^{b,c,d,e}
F 值		45.63
P 值		<0.01

a:与对照组比较, $P < 0.05$; b:与对照组比较, $P < 0.01$; c:与尿蛋白阴性组比较, $P < 0.01$; d:与尿微量白蛋白组比较, $P < 0.01$; e:与显著尿蛋白组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

ILK 是由 452 个氨基酸组成的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,能与整合素 β 亚基的细胞内区域结合,通过介导整合素及细胞骨架相关蛋白而参与调控细胞之间、细胞与 ECM 之间的相互作用,从而影响细胞增殖、迁移、黏附、浸润及 ECM 的组装^[1~10]。我们在前期的研究中已经发现 ILK 能够促进肾小球系膜细胞表型改变,高表达平滑肌动蛋白,导致 ECM 生成增加,促进细胞肥大、增生^[11]。目前的体内研究也发现 ILK 在糖尿病肾病、单侧输尿管梗阻模型、

衰老鼠肾脏中高表达^[14,15],并且与肾脏的纤维化密切相关^[16]。

HSPN 肾脏基本的病理损害是系膜细胞增生、系膜基质在肾小球系膜区的沉积,因此 ILK 有可能与 HSPN 的肾脏损害相关。本研究应用免疫组织化学染色的方法,检测 HSPN 患儿肾小球 ILK 的表达强度,发现在肾小球的脏层上皮细胞、系膜细胞、肾小球系膜基质 ILK 的表达均较对照组强。为了更好地分析 ILK 在 HSPN 肾脏损害中对肾小球损害的作用,我们按照 ISKDC 关于 HSPN 病理分级标准对 HSPN 患儿进行分组研究。这种分级标准是针对肾小球损害所制定,没有包含肾小管间质损害,因此我们分析比较了各组间肾小球 ILK 表达水平,结果显示随着肾脏病理损害级别的增加,ILK 的表达逐渐增强。提示 ILK 与 HSPN 患儿肾小球损害密切相关。蛋白尿是 HSPN 最常见的症状,尿液中尿蛋白的排泄量常与肾小球损害的严重程度呈正相关。本项研究按照患儿尿蛋白的排泄量进行分组,蛋白尿阴性组与对照组 ILK 表达水平差异无显著性,随着尿蛋白的增加,ILK 的表达逐渐增强,提示 ILK 有可能在蛋白尿的发生机制中起作用,可能是 HSPN 肾脏病理损害进展的重要因子。Kretzler 等^[17]发现,先天性肾病综合征患儿肾脏的 ILK mRNA 的表达水平较正常儿童高二倍,认为过表达的 ILK 有可能导致足细胞的形态、功能发生改变。本研究也发现 ILK 在肾小球的脏层上皮细胞表达增强,这是否影响脏层上皮细胞的病理、生理功能,将是我们需要进一步探讨的问题。

[参 考 文 献]

[1] Legate KR, Montañez E, Kudlacek O, Fässler R. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(1):20-31.

[2] Sepulveda JL, Wu C. The parvins[J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(1):25-35.

[3] Vespa A, D’Souza SJ, Dagnino L. A novel role for integrin-linked kinase in epithelial sheet morphogenesis [J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(9):4084-4095.

[4] Qian Y, Zhong X, Flynn DC. ILK mediates actin filament rearrangements and cell migration and invasion through PI3K/Akt/Rac1 signaling[J]. Oncogene, 2005, 24(19):3154-3165.

[5] Vouret-Craviari V, Boulter E, Grall D, Matthews C, Van Obberghen-Schilling E. ILK is required for the assembly of matrix-forming adhesions and capillary morphogenesis in endothelial cells [J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 19):4559-4569.

[6] Friedrich EB, Liu E, Sinha S, Cook S, Milstone DS, MacRae CA, et al. Integrin-linked kinase regulates endothelial cell survival and vascular development[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(18):8134-8144.

[7]

Vouret-Craviari V, Boulter E, Grall D, Matthews C, Van Obberghen-Schilling E. ILK is required for the assembly of matrix-forming adhesions and capillary morphogenesis in endothelial cells [J]. J Cell Sci, 2004, 117(Pt 19):4559-4569.

[8]

Wu C. The PINCH-ILK-parvin complexes: assembly, functions and regulation[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1692(2-3):55-62.

[9]

Yamaji S, Suzuki A, Kanamori H, Mishima W, Yoshimi R, Takasaki H, et al. Affixin interacts with alpha-actinin and mediates integrin signaling for reorganization of F-actin induced by initial cell-substrate interaction[J]. J Cell Biol, 2004, 165(4):539-551.

[10]

Lee YI, Kwon YJ, Joo CK. Integrin-linked kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 316(4):997-1001.

[11]

李志辉. 整合素连接激酶介导大鼠肾小球系膜细胞生物学行为的变化[J]. 实用儿科临床杂志,2007, 22(5):330-332.

[12]

李志辉,吴天慧,段翠蓉,何金华,银燕. 血管紧张素Ⅱ上调大鼠肾小球系膜细胞整合素连接激酶的表达[J]. 实用儿科临床杂志,2008, 23(5):343-345.

[13]

中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 小儿肾小球疾病的临床分类、诊断及治疗[J]. 中华儿科杂志,2001,39(12):746-749.

[14]

Guo L, Sanders PW, Woods A, Wu C. The distribution and regulation of integrin-linked kinase in normal and diabetic kidneys [J]. Am J Pathol, 2001, 159(5):1735-1742.

[15]

Li ZH, Chen XM, Xie YS, Shi S, Feng Z, Fu B, et al. Expression and significance of integrin-linked kinase in cultured cells, normal tissue, and diseased tissue of aging rat kidneys[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2004, 59(10):984-996.

[16]

景红. 整合素连接激酶在肾脏疾病中的作用[J]. 中国当代儿科杂志,2007, 9(6):619-621.

[17]

Kretzler M, Teixeira VP, Unschuld PG, Cohen CD, Wanke R, Edenhofer I, et al. Integrin-linked kinase as a candidate downstream effector in proteinuria [J]. FASEB J, 2001, 15(10):1843-1845.

(本文编辑:徐福兰)

· 消息 ·

《国际神经病学神经外科学杂志》征稿、征订启事

《国际神经病学神经外科学杂志》创刊于 1974 年,由教育部主管,中南大学主办,中南大学湘雅医院承办。是目前国内唯一一本同时涵盖神经病学和神经外科学两个紧密相联学科的专业学术期刊。创刊以来深受广大读者的好评和喜爱。本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)。

《国际神经病学神经外科学杂志》现主要栏目有论著、临床经验交流、疑难病例讨论、病例报道、专家论坛和综述等。杂志立足于国内神经病学、神经外科学领域的前沿研究,及时报道国内外神经科学领域最新的学术动态和信息。

我们热忱欢迎国内外神经科学工作者踊跃来稿,通过本刊介绍自己的研究成果和临床经验。对于论著、临床经验交流、疑难病例讨论等类型的文章将优先发表。

《国际神经病学神经外科学杂志》刊号为 CN 43-1456/R,ISSN 1673-2642,邮发代号 42-11,全国公开发行。读者对象主要为国内外从事神经病学、神经外科专业及相关专业的医务人员。杂志为双月刊,每期定价 13 元,全年定价 78 元。欢迎各级医师到当地邮局订购。杂志社也可办理邮购。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号(中南大学湘雅医院内) 《国际神经病学神经外科学杂志》编辑部,邮编:410008,电话/传真:0731-84327401,E-mail 地址:jinn@vip.163.com。