论著·临床研究

儿童紫癜性肾炎肾组织 Th1/Th2 比值与肾脏微血管损伤的关系

黄丹琳[1] 许自川[2] 党西强[1] 曾雪琪[3] 何小解[1] 易著文[1] 何庆南[1]

(1. 中南大学湘雅二医院小儿肾脏病研究室/湖南省小儿肾脏病临床中心,湖南 长沙 410011;
2. 广州市妇女儿童医疗中心肾内科,广东 广州 510120; 3. 江苏省扬州市第一人民医院儿科,江苏 扬州 225000)

[摘 要] **目的** 探讨儿童紫癜性肾炎(HSPN)肾组织 Th1/Th2 比值与肾脏微血管损伤的关系。**方法** 选取 32 名 HSPN 患儿为病例组,根据肾脏病理结果分为 4 个亚组:HSPN Ⅱ级($n=8$),Ⅲa 级($n=7$),Ⅲb 级($n=10$)及Ⅵ/Ⅴ级($n=7$)。5 例因肾外伤切除肾组织患者为对照组。免疫组化法检测肾组织 INFγ(标记 Th1 细胞)、IL-4(标记 Th2 细胞)及 CD34(标记微血管)的表达,并进行微血管评分,计算微血管密度(MVD),分析肾脏 INFγ、IL-4 表达与肾脏病理分级、肾脏微血管评分和 MVD 之间的关系。**结果** 与对照组相比,病例组肾组织 INFγ 表达降低,IL-4 表达升高,Th1/Th2 比值随着 HSPN 病理损伤的加重而减小,各级间差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,HSPNⅡ级和Ⅲa 级组 MVD 显著增加,但Ⅳ/Ⅴ级组 MVD 显著减少($P<0.05$)。与对照组和 HSPNⅡ级组比较,HSPNⅢa 级、Ⅲb 级以及Ⅳ/Ⅴ级组肾脏微血管评分明显增加,且随病理分级的增加,肾脏微血管评分逐渐增加,各级间差异有统计学意义($P<0.05$)。肾组织 Th1/Th2 比值与微血管密度变化呈负相关($r=-0.921$,$P<0.01$)。**结论** Th1/Th2 比值降低可能参与了 HSPN 肾脏微血管损伤。 [中国当代儿科杂志,2011,13(4):273-277]

[关 键 词] 紫癜性肾炎; Th1/Th2 比值; 微血管损伤; 儿童
[中图分类号] R692.3^{+4} [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2011)04-273-05

Relationship between renal Th1/Th2 ratio and renal microvascular injury in children with Henoch-Schönlein purpura nephritis

HUANG Dan-Lin, XU Zi-Chuan, DANG Xi-Qiang, ZENG Xue-Qi, HE Xiao-Jie, YI Zhu-Wen, HE Qing-Nan. Department of Pediatrics, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, *China* (*Dang X-Q, Email: happy-dang@tom.com*)

Abstract: Objective To explore possible correlations between renal Th1/Th2 ratio and renal microvascular injury in children with Henoch-Schönlein purpura nephritis (HSPN). **Methods** Thirty-two children with HSPN were enrolled. They were classified into four groups by renal pathology: HSPN class II ($n=8$), HSPN class IIIa ($n=7$), HSPN class IIIb ($n=10$) and HSPN class IV/V ($n=7$). Five patients undergoing nephrectomy due to trauma were used as the controls. INFγ, IL-4 and CD34 in the renal tissues were measured by immunohistochemical analysis. INFγ was used as a marker of Th1, IL-4 was used as a marker of Th2 and CD34 was used as a marker of microvessel. The renal microvessel density was evaluated according to the Weidner standard. The relationships among the local Th1/Th2 ratio, renal pathological grade, microvessel score and microvessel density were studied. **Results** Immunohistochemical analysis showed a lower expression of INFγ and a higher expression of IL-4 in the HSPN groups than in the control group. The local Th1/Th2 ratio in the HSPN groups decreased and correlated significantly with the renal pathological grade. There were significant differences among four HSPN subgroups ($P<0.05$). Compared with the control group, the renal microvessel density in the HSPN class II and class IIIa groups increased significantly ($P<0.05$), but it decreased in the HSPN class IV/V group ($P<0.05$). The renal microvessel scores in the HSPN class IIIa, class IIIb and class IV/V groups increased significantly compared with those in the control and the HSPN class Ⅱ. The increased renal microvessel scores were associated with more severe renal pathological changes. A negative correlation was found between the local Th1/Th2 ratio and the microvessel density in kidneys ($r=-0.921$, $P<0.01$). **Conclusions** The decrease of Th1/Th2 ratio in kidneys might be responsible for renal microvascular injury in children with HSPN. [**Chin J Contemp Pediatr**, **2011**, **13** (**4**):**273-277**]

Key words: Henoch-Schönlein purpura nephritis; Th1/Th2 ratio; Microvascular injury; Child

[收稿日期]2010-12-27;[修回日期]2011-01-28
[基金项目]国家自然科学基金项目(编号 30500546);湖南省科技厅科技计划项目(编号 06SK-3029-11)。
[作者简介]黄丹琳,女,硕士,主治医师。
[通信作者]党西强,副主任医师。

紫癜性肾炎(Henoch-Schönlein purpura nephritis,HSPN)是过敏性紫癜(HSP)在肾脏的表现,为儿童期常见的肾小球疾病之一,病理上主要表现为肾小球系膜增生,系膜区 IgA 沉积及上皮细胞新月体形成,可出现肾小管萎缩、间质炎性细胞浸润,间质纤维化等间质改变。目前 HSPN 组织损伤的关键环节尚未完全明确,研究证实 HSPN 发病与患儿机体免疫紊乱密切相关[1]。辅助性 T 细胞(T helper cell,Th)是机体执行免疫功能的重要细胞,其中 Th1 细胞主要辅助细胞免疫,Th2 细胞辅助体液免疫。目前已发现微生物感染、肿瘤、自身免疫病、变态反应、移植排斥反应等多种疾病均存有 Th1/Th2 漂移现象[2],而且在 HSP 患者体内,Th 细胞亚群也发生改变[3-7]。在 HSP 急性期,血中 Th1/Th2 出现失衡,呈现 Th2 相对优势,导致患儿体液免疫应答为主导地位,产生大量多克隆免疫球蛋白和自身抗体。自身抗体与抗原结合形成免疫复合物并激活补体而引起血管炎症,并可沉积于肾组织局部,造成免疫损害[8]。但是目前尚未见有关于肾脏组织 Th1/Th2 变化的文献报道。肾脏受累的程度是决定临床症状和预后的最主要因素,研究发现 HSPN 患儿存在肾间质血管损害,且与肾小球、肾小管间质病变呈正相关[9-10]。目前,国内外研究认为血管损伤是慢性肾脏病早期事件之一[11-14],造成微血管密度(MVD)减少,血供不足,肾间质慢性缺血缺氧改变,导致小管间质纤维化。但是肾脏组织 Th1/Th2 变化与微血管病变的关系如何,目前罕见报道。故本研究以肾脏组织 Th1/Th2 变化为切入点,以 INFγ 标记 Th1 细胞,以 IL-4 标记 Th2 细胞,用血管内皮标记物 CD34 单克隆抗体标记新生血管,探讨 Th1/Th2 的比值和 MVD 的变化与 HSPN 发病以及肾脏微血管损伤之间的关系,为 HSPN 肾脏发病的发病机制的理解提供新的突破点,为临床治疗提供新的思路和方法。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择我科 2006 年 1 月至 2006 年 10 月收治的 32 例 HSPN 患儿为病例组,其中男 19 例,女 13 例,年龄 4 ~ 15 岁,病程 7 d 至 2.1 年,均符合 2000 年中华医学会儿科学分会肾脏病学组制订的 HSPN 诊断标准[15]。获得家属书面知情同意后,于 B 超引导下行肾活检,根据病理结果分为 HSPN Ⅱ 级(8 例)、HSPN Ⅲa 级(7 例)、HSPN Ⅲb 级(10 例)和 HSPN Ⅳ/Ⅴ级(7 例)共 4 个病例组。对照组为我院泌尿外科住院的 5 例因肾外伤切除肾组织的患者(均获知情同意和医院伦理委员会的批准),5 例患者均无肾脏病史,血压、血常规、尿常规、肝肾功能均正常,肉眼和光镜下未见肾脏病理学改变。

1.2 主要仪器和试剂

主要仪器包括电热恒温三用水浴箱,微波炉,病理切片机,显微镜(日本产 NIKON ECLIPSE 400 型),数码相机(日本产 Nikon E990),微量移液器(5 ~ 10 μL 为 Labsystems 公司产品,20 μL、100 μL、200 μL 为 Nikon 公司产品)。0.1 MPBS(pH 7.2 ~ 7.4)、0.01枸橼酸缓冲溶液(pH 6.0)、多聚赖氨酸,即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒及 DAB 显色试剂盒购于博士德生物工程有限公司。兔抗人 INFγ、IL-4、CD34 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.3 方法及步骤

1.3.1 *免疫组化法* 采用 SABC 法检查肾组织 INFγ、IL-4 及 CD34 的表达。肾活检组织常规石蜡包埋、切片(4 μm)、脱蜡、脱水,山羊血清封闭,微波消化,加兔抗人 INFγ、IL-4、CD34 单克隆抗体,4℃过夜, PBS 冲洗后,滴加生物素标记的羊抗兔二抗和辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,37℃分别孵育 20 min,DAB 显色,苏木素复染,封片。

1.3.2 *染色切片图象分析* INFγ、IL-4、CD34 表达采用 CMIAS 多功能真彩色病理分析系统(由北京航空航天大学图像中心提供)进行免疫组化分析,计算每张切片 10 个 400 倍视野下染色区域面积占整个肾组织面积的百分比,以均值表示每例肾组织阳性面积信号。INFγ、IL-4 为胞浆染色,CD34 胞膜表达,显微镜下呈棕黄色颗粒。

1.3.3 *肾组织 Th1/Th2 比值计算* 应用 INFγ 标记 Th1 细胞,以 IL-4 标记 Th2 细胞[16], Th1/Th2 = 平均 INFγ 阳性面积百分比/平均 IL-4 阳性面积百分比。

1.3.4 *肾脏 MVD 计算* 运用 CD34 染色标记微血管来计算 MVD[17]。肾脏 MVD 的计算方法参照 Weidner[18] 的方法,每张切片中肾小球肾小管各取 3 个视野各计数 50 个细胞,取其阳性细胞百分比的平均值,分别计为 0 ~ 3 分,CD34 无表达为 0 分,CD34 阳性细胞小于 10% 为 1 分,阳性细胞占 10% ~ 30% 为 2 分,阳性细胞大于 30% 为 3 分。

1.3.5 *肾脏微血管评分* 参照血管炎病理变化特点及相关文献[19],对肾微血管病理改变进行评分并计量分析。微血管病理评分标准:对 6 项病理指标即炎性细胞浸润、管壁增厚分层、透明样变、纤维化、洋葱样变、MVD 进行病理记分,每项均为 0 ~ 3

分。前 5 项评分标准如下:0 分,无病理改变;1 分,病变血管数占观察血管数的百分比 <25%;2 分,病变血管数占观察血管数的百分比为 25% ~50%;3 分,病变血管数占观察血管数的百分比 >50%。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计学处理。数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组资料间比较采用单因素方差分析,相关性分析采用 Spearman 直线相关分析,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同病理分级 HSPN 患儿肾组织 Th1/Th2 比值

病例组 INFγ 阳性细胞面积百分比较对照组降低,IL-4 阳性细胞面积百分比较对照组升高,Th1/Th2 比值较对照组降低,差异有统计学意义;Th1/Th2 比值随 HSPN 病理损伤的加重而逐渐下降,不同病理级别组间差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1,图 1,图 2。

表 1 各组肾间质 Th1/Th2 比值、MVD 和肾间质微血管评分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Th1/Th2	MVD(分)	平均微血管评分(分)
对照组	5	0.80 ± 0.18	3.00 ± 0.10	0.60 ± 0.54
HSPN Ⅱ	8	0.56 ± 0.04^{a}	5.42 ± 0.10^{a}	1.50 ± 0.76
HSPN Ⅲa	7	0.50 ± 0.16^{a,b}	4.12 ± 0.34^{a,b}	3.71 ± 1.60^{a,b}
HSPN Ⅲb	10	0.46 ± 0.14^{a,b,c}	3.09 ± 0.45^{b,c}	5.50 ± 1.18^{a,b,c}
HSPN Ⅳ/Ⅴ	7	0.39 ± 0.02^{a,b,c,d}	1.21 ± 0.46^{a,b,c,d}	7.00 ± 0.82^{a,b,c,d}
F 值		240.235	146.795	41.721
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

a:与对照组比较,$P < 0.05$;b:与 HSPN Ⅱ级组比较,$P < 0.05$;c:与 HSPN Ⅲa 级组比较,$P < 0.05$;d:与 HSPN Ⅲb 级组比较,$P < 0.05$

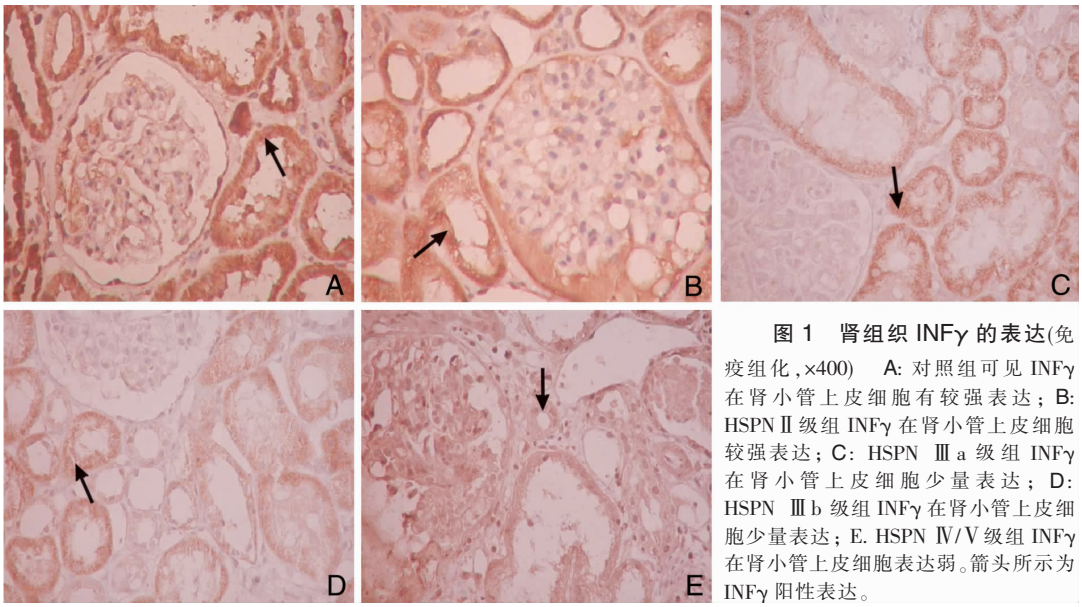

图 1 肾组织 INFγ 的表达(免疫组化,×400) A: 对照组可见 INFγ 在肾小管上皮细胞有较强表达;B: HSPNⅡ级组 INFγ 在肾小管上皮细胞较强表达;C: HSPN Ⅲa 级组 INFγ 在肾小管上皮细胞少量表达;D: HSPN Ⅲb 级组 INFγ 在肾小管上皮细胞少量表达;E. HSPN Ⅳ/Ⅴ级组 INFγ 在肾小管上皮细胞表达弱。箭头所示为 INFγ 阳性表达。

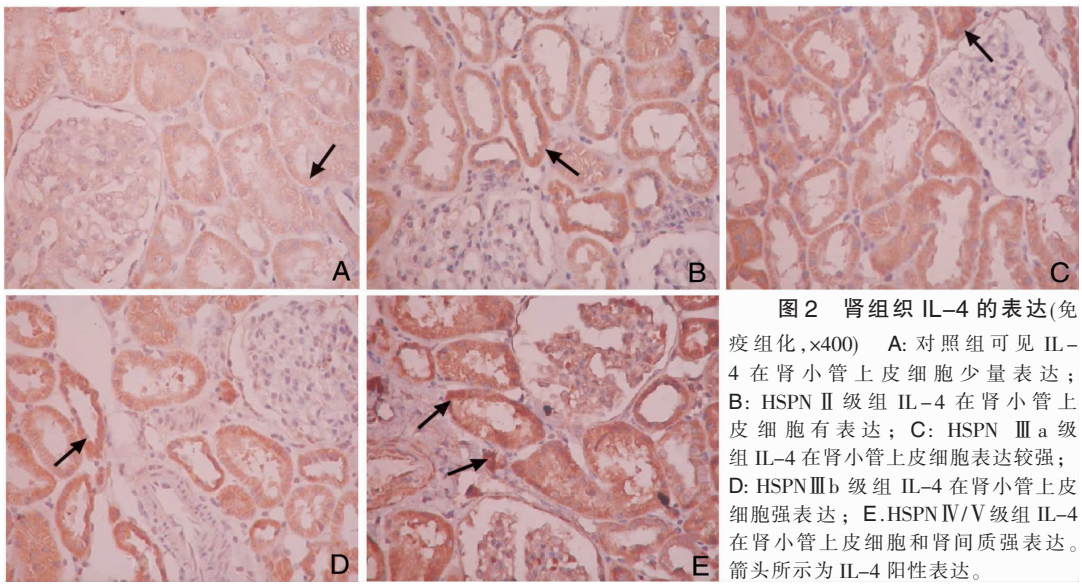

图 2 肾组织 IL-4 的表达(免疫组化,×400) A: 对照组可见 IL-4 在肾小管上皮细胞少量表达;B: HSPNⅡ级组 IL-4 在肾小管上皮细胞有表达;C: HSPN Ⅲa 级组 IL-4 在肾小管上皮细胞表达较强;D: HSPNⅢb 级组 IL-4 在肾小管上皮细胞强表达;E.HSPNⅣ/Ⅴ级组 IL-4 在肾小管上皮细胞和肾间质强表达。箭头所示为 IL-4 阳性表达。

2.2 各组肾脏 MVD 比较

病例组与对照组比较，MVD 差异有统计学意义。其中 HSPN Ⅱ级、Ⅲa 级组与对照组比较，MVD 增加，HSPN Ⅳ/Ⅴ级组与对照组比较，MVD 减少，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。而 HSPN Ⅲb 级组与对照组比较，差异无统计学意义（$P=0.626$），见表 1、图 3。

2.3 各组肾脏微血管评分比较

与对照组相比，HSPN Ⅱ级组肾脏微血管评分无明显变化（$P=0.271$），HSPN Ⅲa、Ⅲb 级以及Ⅳ/Ⅴ级组肾脏微血管评分明显增加。随着病理改变的加重，HSPN 组肾脏微血管评分逐渐增加，不同病程级别组间差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 1。

2.4 肾组织 Th1/Th2 与肾脏微血管评分的相关分析

Spearman 相关分析显示，病例组肾组织 Th1/Th2 比值与肾脏微血管评分呈负相关，相关系数为 −0.921（$P<0.01$），见图 4。

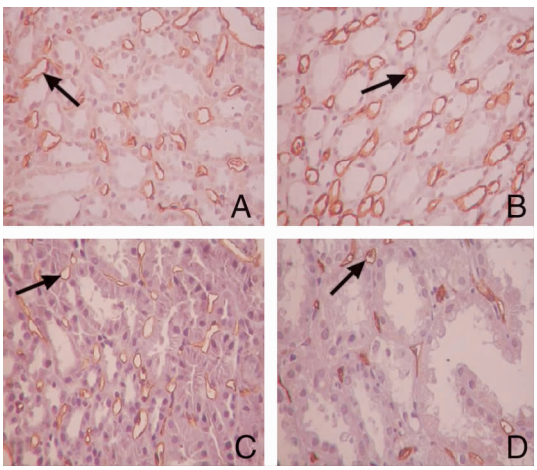

图 3 各组肾间质 MVD（免疫组化 ×400） **A**：对照组肾间质微血管棕黄色着色，均匀分布在肾小管周围；**B**：HSPN Ⅱ级组肾间质微血管密度明显增加；**C**：HSPN Ⅲa 级组肾间质棕黄色染色的微血管密度明显增加，均匀分布在肾小管周围；**D**：HSPN Ⅳ/Ⅴ级组肾间质微血管密度明显减低。箭头所指为微血管。

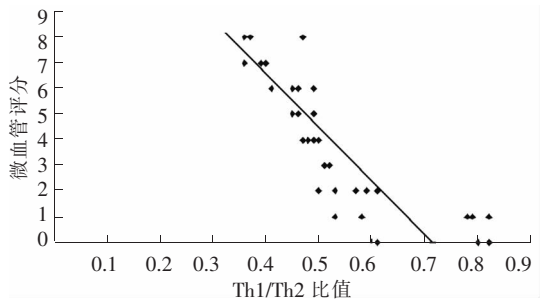

图 4 肾组织 Th1/Th2 比值与肾脏微血管评分的相关性

3 讨论

HSP 被认为是多种原因诱发的自身免疫功能失调而导致的免疫性疾病，近年来研究发现，Th 细胞亚群及其细胞因子在自身免疫疾病的发病机制及治疗中有非常重要的作用[20]。本研究发现，HSPN 患儿肾脏组织发生了 Th1/Th2 比值的变化，表现为 INFγ 表达下调，而 IL-4 表达增加，呈现 Th2 极化状态，且病理分级越重，Th2 优势越明显。与陶红等[5]报道的外周血 Th 细胞亚群变化一致，可能与 T 细胞在肾脏局部的浸润有关。肾组织 Th 细胞亚群发生变化，进而使其免疫状态发生改变，发生病理性免疫应答引起肾脏损伤。可能机制包括下面几个方面：IL-4 可使 IgE 类别转换产生大量的特异性 IgE 抗体沉积于系膜区；IL-6 增加、IL-2 分泌不足，B 细胞活化，产生大量的 IgE 和 IgA，循环免疫复合物沉积于肾小球系膜区引起局部炎症反应，局部嗜酸性粒细胞浸润，导致肾脏异常的免疫应答，刺激肾小球系膜细胞活化和增生，加重局部的炎症反应，引起肾小球硬化。

微血管损伤在肾脏病的发生及慢性化中起了重要作用[12]，肾脏血管数目减少与功能丧失与肾小球硬化及间质纤维化高度正相关，因此微血管病变是判断其预后的一个重要病理指标。本研究结果显示，与对照组相比，Ⅲ级及以上病变的 HSPN 患儿肾脏 MVD 明显下降，并随肾脏病理级别的增加，MVD 减少越明显。但 HSPN Ⅱ级和Ⅲa 级患儿，肾脏 MVD 较对照组反而增高，HSPN Ⅲb 级组与对照组比较差异无统计学意义，其原因可能是微血管轻微损伤后存在自我修复、代偿的过程，而且在炎症介质的刺激下，修复能力过强，进而使 MVD 增加。但是随着病理损伤加重，血管的自我修复远不能代偿，故其后 MVD 下降。Spearman 相关分析提示，Th1/Th2 比值与微血管积分呈负相关，Th2 优势越明显，微血管损伤越重。HSPN 肾组织呈现 Th2 细胞功能亢进表现，一方面加重局部炎症反应并引起免疫损伤，造成肾小球、肾小管损害，另一方面可能造成肾间质微血管内皮细胞损伤。内皮细胞损伤后活化，继续分泌大量细胞炎症因子，加重局部的炎症反应，因此可以认为微血管损伤可能为 Th2 细胞功能亢进引起肾脏损害的另一方面。

本研究限于体内试验研究，即对已有标本检测 Th1/Th2 比值、MVD 和微血管积分的变化进行描述性研究并对潜在的机制进行猜测。在后续研究中将

设计体外培养模型,将内皮细胞和 HSPN 患儿的淋巴细胞共培养,检测共培养后内皮细胞的变化以及相关炎症因子的表达,进一步验证此研究的结论。

[参 考 文 献]

[1] Del Prete G. The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans[J]. Int Rev Immunol, 1998, 16(3-4): 427-455.

[2] Jancovic D, Liu Z, Gause WC. Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways[J]. Trends Immunol, 2001, 22(8): 450-457.

[3] Qin W, Hongya W, Yongjing C, Fang X, Yue M, Xuekun Z, et al. Increased OX40 and soluble OX40 ligands in children with Henoch-Schonlein purpura: association with renal involvement[J]. Pediatr Allergy Immunol, 2011, 22(1 Pt 1): 54-59.

[4] 周承,王振开. 过敏性紫癜早期肾损害患儿 T 细胞亚群的变化及意义[J]. 实用临床医药杂志,2009,13(13): 96-98.

[5] 陶红,李秋,王莉,李翠萃,阳海平,张高福. 过敏性紫癜发病中树突状细胞与 T 辅助细胞分化失衡的关系[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(7): 677-679.

[6] 杨军,李成荣,祖莹,王国兵,李永柏. 调节性 T 细胞在儿童过敏性紫癜发病机制中的作用初探[J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(6): 411-414.

[7] 孙大庆, 张秋业, 董增义, 白枫. 过敏性紫癜病儿树突细胞分泌白细胞介素-12 水平与 TH1/TH2 的变化[J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(4): 307-310.

[8] 许自川,曾雪琪,党西强,何小解. Thl/Th2 迁移与紫癜性肾炎的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(1): 64-67.

[9] 曾雪琪, 许自川, 党西强, 何小解, 易著文. 血管内皮生长因子与紫癜性肾炎肾间质微血管损伤的关系[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(9): 717-721.

[10] 张建江,易著文,何小解,杨华彬,丁娟娟,莫双红. 紫癜性肾炎患儿肾间质血管损害与临床的关系[J]. 实用儿科临床杂志, 2006,21(8):487-489.

[11] Kaneyama T, Kobayashi S, Aoyagi D, Ehara T. Tranilast modulates fibrosis, epithelial-mesenchymal transition and peritubular capillary injury in unilateral ureteral obstruction rats[J]. Pathology, 2010, 42(6): 564-573.

[12] Kang DH, Kanellis J, Hugo C, Truong L, Anderson S, Kerjaschki D, et al. Role of The microvascular endothelium in progressive renal disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(3): 806-816.

[13] Wu L, Tiwari MM, Messer KJ, Holthoff JH, Gokden N, Brock RW, et al. Peritubular capillary dysfunction and renal tubular epithelial cell stress following lipopolysaccharide administration in mice[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 292(1): F261-F268.

[14] Ohashi R, Kitamura H, Yamanaka N. Peritubular capillary injury during the progression of experimental glomerulonephritis in rats[J]. J Am Soc Nephrol, 2000, 11(1): 47-56.

[15] 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.

[16] Mosmann TR, Coffman Rl. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties[J]. Annu Rev Immunol, 1989, 7: 145-173.

[17] Yano T, Tanikawa S, Fujie T, Masutani M, Horie T. Vascular endothelial growth factor expression and neovascularisation in non-small cell lung cancer[J]. Eur J Cancer, 2000, 36(5): 601-609.

[18] Weidner N. Tumoural vascularity as a prognostic in cancer patients: the evidence continues to grow[J]. J Pathol, 1998, 184(2):119-122.

[19] 吴杰,陈香美,师锁柱. 血管病变在 1005 例 IgA 肾病中的意义及其影响因素[J]. 中华医学杂志, 2003,83(4): 289-293.

[20] 解德琼,甘华,杜晓刚,李正荣,巫江. 终末期肾病患者 Th1/Th2 型细胞因子的特征与外周血 T 细胞凋亡的关系[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22(6):763-766.

(本文编辑:王庆红)