

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.04.010

论著·临床研究

紧密连接蛋白 claudin-2 在急性肾损伤患儿肾组织中的表达及意义

张良 李志辉 邓旭 银燕

(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** 研究紧密连接蛋白 claudin-2 在急性肾损伤 (AKI) 患儿肾组织中的表达变化, 探讨 claudin-2 与肾脏病理损害及肾功能损害程度的关系。**方法** 2009 年 12 月至 2011 年 12 月确诊为 AKI 并完善肾活检的 24 例患儿, 依据病情严重程度分为轻症组 ($n=7$) 及重症组 ($n=17$)。对照组为 12 例肾小球轻微病变的孤立性血尿患儿。采用全自动生化分析仪比色法检测血清肌酐水平; 采用肾脏病理计量评分法对肾小管间质损害程度进行分析; 免疫组织化学方法检测肾组织 claudin-2 的表达; Pearson 相关分析评估 claudin-2 与患儿肾脏病理评分及血肌酐水平间的关系。**结果** AKI 轻症组 ($190 \pm 68 \mu\text{mol/L}$) 与 AKI 重症组 ($477 \pm 128 \mu\text{mol/L}$) 血清肌酐水平均高于对照组 ($29 \pm 7 \mu\text{mol/L}$) (均 $P<0.01$), 且 AKI 重症组血清肌酐水平高于 AKI 轻症组 ($P<0.01$)。AKI 轻症组患儿肾小管间质损害计分 (10.4 ± 1.7 分) 低于重症组 (14.0 ± 1.5 分) ($P<0.05$)。AKI 轻症组 ($5.0\% \pm 0.5\%$) 与 AKI 重症组 ($3.7\% \pm 0.7\%$) claudin-2 阳性表达面积均低于对照组 ($8.0\% \pm 0.7\%$) (均 $P<0.01$), 且 AKI 重症组 claudin-2 阳性表达面积低于 AKI 轻症组 ($P<0.01$)。claudin-2 阳性表达面积与血肌酐水平及肾小管间质的病理损害评分均呈负相关 (分别 $r=-0.809$ 、 -0.903 , 均 $P<0.01$)。**结论** AKI 患儿肾组织 claudin-2 的表达水平发生变化, 且 claudin-2 的表达水平与肾脏病理损害程度及肾功能损害程度密切相关。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(4): 361-365]

[关键词] 急性肾损伤; Claudin-2; 病理; 肾功能; 儿童

Expression of tight junction protein claudin-2 in renal tissues and its significance in children with acute kidney injury

ZHANG Liang, LI Zhi-Hui, DENG Xu, YIN Yan. Department of Nephrology & Kidney Laboratory of Hunan Pediatric Research Institute, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China (Li Z-H, Email: Lizh0731@aliyun.com)

Abstract: Objective To examine changes in expression of tight junction protein claudin-2 in the renal tissues of children with acute kidney injury (AKI), and to investigate the relationship of claudin-2 expression with renal pathological lesion and renal functional lesion. **Methods** Twenty-four children who were diagnosed with AKI and had renal biopsies between December 2009 and December 2011 were included in the study. These patients were divided into mild AKI ($n=7$) and severe AKI groups ($n=17$). Children with isolated hematuria whose renal biopsy showed minor glomerular lesion were selected as the control group. Serum creatinine levels were measured by automatic biochemical analyzer. Tubulointerstitial damage was evaluated by renal pathological scores and expression of claudin-2 was examined by immunohistochemistry. The correlations of claudin-2 expression with renal pathological score and serum creatinine level were assessed by Pearson correlation analysis. **Results** The mild and severe AKI groups had significantly higher serum creatinine levels than the control group ($190 \pm 68 \mu\text{mol/L}$ and $477 \pm 128 \mu\text{mol/L}$ vs $29 \pm 7 \mu\text{mol/L}$, $P<0.01$), and the severe AKI group had a significantly higher serum creatinine level than the mild AKI group ($P<0.01$). The tubulointerstitial damage score was significantly lower in the mild AKI group than in the severe AKI group (10.4 ± 1.7 vs 14.0 ± 1.5 ; $P<0.05$). The mild and severe AKI groups had significantly smaller areas of claudin-2 expression than the control group ($5.0 \pm 0.5\%$ and $3.7 \pm 0.7\%$ vs $8.0 \pm 0.7\%$; $P<0.01$), and the severe AKI group had a

[收稿日期] 2013-07-26; [接受日期] 2014-02-06

[基金项目] 湖南省卫生厅科研基金资助项目 (132013-103)。

[作者简介] 张良, 男, 硕士, 医师。

[通信作者] 李志辉, 女, 主任医师, 教授。

significantly smaller area of claudin-2 expression than the mild AKI group ($P<0.01$). The area of claudin-2 expression was negatively correlated with serum creatinine level and tubulointerstitial damage score ($r=-0.809$ and -0.903 ; $P<0.01$).

Conclusions There are changes in the distribution and expression of claudin-2 in proximal tubular epithelial cells among children with AKI, and claudin-2 expression is closely related to renal pathological lesion and renal functional lesion.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(4): 361-365]

Key words: Acute kidney injury; Claudin-2; Pathology; Renal function; Child

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是临床上常见的危重症, 目前对其病理生理、发病机制及早期诊断标志物的研究已取得长足进步, 但其病死率仍高达 50%, 故进一步阐明其发病机制、探索新的治疗靶点及治疗措施成为临床研究的重要课题。目前研究发现肾小管上皮细胞紧密连接的破坏导致细胞凋亡、坏死、脱落, 从而堵塞管腔, 是 AKI 发生发展的重要机制^[1]。Claudin-2 是细胞紧密连接蛋白的主要组成部分, 更为重要的是 claudin-2 主要表达于近端肾小管上皮细胞, 故其可能与 AKI 的发生、发展有关联。Gonzalez 等^[2]在氧自由基介导的 MDCK II 肾小管上皮细胞损害的体外研究中证实 claudin-2 水平在 24 h 有显著降低, 但 claudin-2 在 AKI 患儿肾组织中的表达变化及意义不清楚, 少见文献报道。本研究探讨 AKI 患儿肾组织 claudin-2 的表达变化及与肾脏病理损害、肾功能的关系, 为明确 AKI 发生及发展的机制提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料及分组

选取 2009 年 12 月至 2011 年 12 月在本院肾内科住院的 AKI 患儿 24 例为研究对象, 其中男 15 例, 女 9 例, 年龄 3 个月~10 岁 5 个月, 平均年龄 3.9 ± 2.9 岁。AKI 患儿均符合 2005 年荷兰阿姆斯特丹急性肾衰竭国际研讨会关于 AKI 的诊断标准, 即肾功能急剧下降, 48 h 内血清肌酐水平增加到损伤前的 1.5 倍或增加 $26.4 \mu\text{mol/L}$, 和 (或) 尿量 $<0.5 \text{ mL}/(\text{kg} \cdot \text{h})$, 持续 6 h 以上; 并依据其进行 AKI 分期^[3], 将 AKI 1 期及 2 期的 7 例患儿纳入轻症病例组, 其中男 6 例, 女 1 例, 中位年龄 3 岁 (7 个月~10 岁); AKI 3 期的患儿 17 例纳入重症病例组, 其中男 12 例, 女 5 例, 中位年龄 3 岁 (7 个月~10 岁)。纳入标准: (1) 年龄 ≤ 14 岁; (2) 完善肾活检, 明确肾脏病理损害以肾小管间质损害为主; (3) 排除肾前性、肾后性及肾小

球疾病所致的急性肾衰竭。另选择同期本院肾内科住院的年龄和性别与研究组相匹配的 12 例临床诊断为孤立性血尿的患儿为对照组, 纳入标准:

- (1) 临床表现为单纯镜下血尿;
- (2) 肾脏病理诊断为肾小球轻微病变, 无肾小管及间质损害;
- (3) 排除其他肾脏疾病。

1.2 主要试剂

兔抗人 claudin-2 多克隆抗体购自美国 Biworld 公司; 免疫组化染色试剂盒及 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 血清肌酐水平检测

所有患儿入院后均抽取空腹肘静脉血 3 mL, 采用全自动生化分析仪比色法检测血清肌酐水平。

1.4 肾小管间质病理损害的计量评分

$4 \mu\text{m}$ 肾组织石蜡切片, 行 HE 染色, 每例患儿肾脏组织随机选取 6 张切片, 每张切片随机选取 10 个视野, 参照文献^[4]按照肾脏病理计量评分法对肾小管间质进行半定量分析, 计分标准如下: 评价肾小管间质损害包括肾小管萎缩、上皮细胞变性、上皮细胞坏死、间质水肿、肾间质纤维化及炎性细胞浸润共 6 项指标。每 1 项指标分成轻、中、重度损害, 分别计分 1、2、3 分。累计分数 0~18 分, 总积分 ≤ 4 分定为肾小管间质轻度损害, 5~8 分定为中度损害, ≥ 9 分定为重度损害。

1.5 统计学分析

用 SPSS 18.0 统计软件包对数据进行统计学分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验; 有相关趋势的资料用 Pearson 相关分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清肌酐水平

3 组患儿间血清肌酐水平比较差异有统计学意义 ($F=82.86$, $P<0.01$), 其中 AKI 轻症组 ($190 \pm 68 \mu\text{mol/L}$) 与 AKI 重症组 ($477 \pm$

128 $\mu\text{mol/L}$) 血清肌酐水平均高于对照组 ($29 \pm 7 \mu\text{mol/L}$) (均 $P < 0.01$), 且 AKI 重症组血清肌酐水平高于 AKI 轻症组 ($P < 0.01$)。

2.2 AKI 患儿肾小管间质病理损害

AKI 患儿肾组织 HE 染色示肾小管均有不同程度的刷状缘脱落, 上皮细胞呈颗粒样、空泡样变性, 部分肾小管上皮细胞脱落、坏死、堵塞管腔; 对照组肾组织 HE 染色均为肾小球轻微病变, 肾小管及间质未见异常 (图 1)。AKI 轻症组患儿肾小管间质损害计分为 10.4 ± 1.7 分, 重症组肾小管间质病理损害计分为 14.0 ± 1.5 分, 两组间比较差异有统计学意义 ($t = -5.09$, $P < 0.05$)。

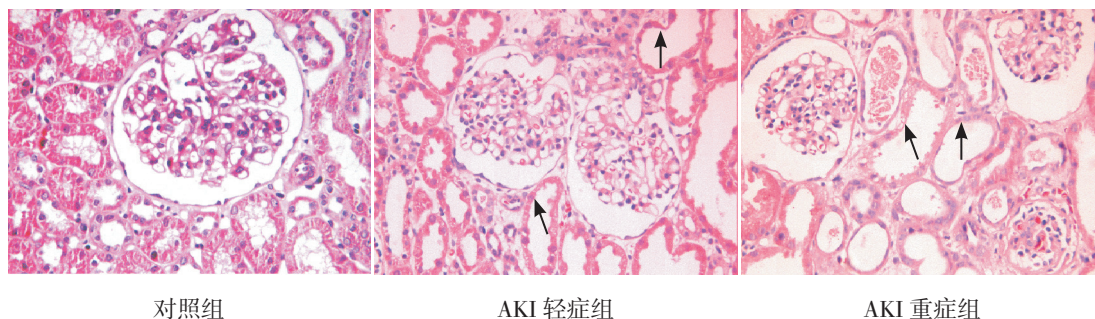


图 1 各组患儿肾组织 HE 染色 ($\times 400$) 对照组患儿肾脏病理示肾小管及间质正常, AKI 轻症组患儿肾脏病理示部分肾小管上皮细胞坏死、刷状缘脱落 (箭头所示), 间质水肿, 炎性细胞浸润; AKI 重症组患儿肾脏病理示大部分肾小管上皮细胞坏死、刷状缘脱落 (箭头所示), 间质水肿, 炎性细胞浸润。

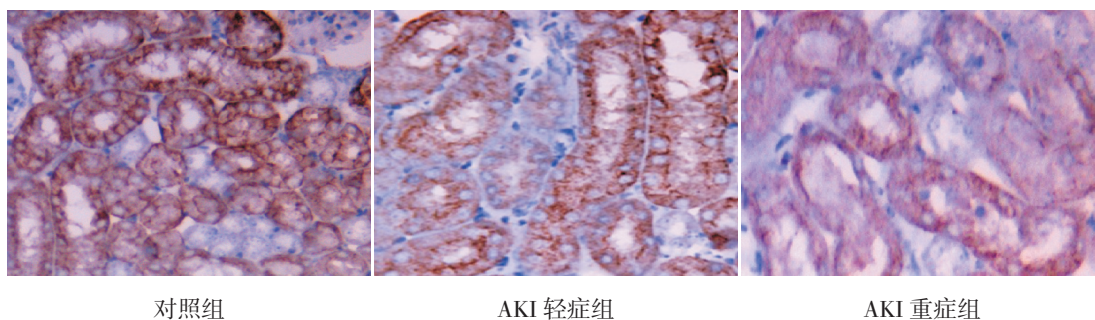


图 2 各组患儿肾组织 claudin-2 的表达 (DAB 显色, $\times 400$) 对照组患儿 claudin-2 表达于近端肾小管上皮细胞胞膜, 主要为胞膜顶端及相邻细胞侧, 呈规则的栅栏样均匀连续排列, 胞质区少量表达; AKI 轻症组患儿 claudin-2 表达于近端肾小管上皮细胞胞膜, 表达降低、缺如, 排列紊乱, 胞核及核膜无表达, 胞质中表达增多; AKI 重症组患儿 claudin-2 在胞质中表达明显增多, 胞膜上表达降低、缺如及排列紊乱更明显。图中 claudin-2 的阳性表达呈现棕色。

2.3.2 Claudin-2 表达变化 3 组患儿间肾组织 claudin-2 阳性表达面积比较差异有统计学意义 ($F = 44.77$, $P < 0.01$), 其中 AKI 轻症组 ($5.0\% \pm 0.5\%$) 与 AKI 重症组 ($3.7\% \pm 0.7\%$) claudin-2 阳性表达面积均低于对照组 ($8.0\% \pm 0.7\%$) (均 $P < 0.01$), 且 AKI 重症组 claudin-2 阳性表达面积

2.3 肾组织 claudin-2 的分布和表达变化

2.3.1 Claudin-2 分布变化 对照组患儿肾组织 claudin-2 表达于近端肾小管上皮细胞胞膜, 主要为顶端及相邻细胞侧, 呈规则的栅栏样均匀连续排列, 胞质区少量染色, 胞核及核膜无表达, 远端肾小管、肾小球及肾间质无表达。AKI 患儿肾组织 claudin-2 表达于近端肾小管上皮细胞胞膜, 胞质区表达增加, 胞核及核膜无表达, 远端肾小管、肾小球及肾间质无表达, 但近端肾小管上皮胞膜上的 claudin-2 表达明显降低, 排列断裂, 表现为不同程度的淡染及不着色区。见图 2。

低于 AKI 轻症组 ($P < 0.01$)。

2.4 Claudin-2 表达与肾脏病理及血肌酐水平的关系

相关性分析结果示 claudin-2 阳性表达面积与肾小管间质的病理损害评分呈负相关 ($r = -0.809$, $P < 0.01$), 与血清肌酐水平亦呈负相关 ($r = -0.903$, $P < 0.01$)。

3 讨论

正常的结构是细胞及组织器官发挥功能的基础,正常肾小管上皮细胞的特性是具有极性和紧密连接,肾小管上皮细胞的极性及紧密连接形成是维持正常生理功能的重要保证和结构特征。claudins 蛋白是紧密连接的重要组成部分,维持肾脏正常生理功能,其异常参与了多种肾脏疾病的发生与发展^[5]。目前已发现 claudins 家族由 24 个跨膜蛋白亚型组成,分子量约 20~27 KD,一个 claudin 分子均由 4 个跨膜结构域组成,氨基和羧基末端都在细胞内,羧基末端富含丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基。claudins 有 2 个长度不等的细胞外环,在不同 claudin 分子之间,第 1 和第 4 个跨膜片段以及细胞外环的氨基酸序列具有高度保守性。

Claudins 的主要生物学功能为栅栏功能和屏障功能。栅栏功能把上皮细胞质膜分成顶侧的脂脂部分和基侧的蛋白部分,可以阻止两个不同功能区之间的相互弥散,有助于细胞极性的形成。屏障功能则对分子大小、离子类型、细胞渗透性等具有选择性,可以调节细胞间小分子的运输,维持组织的稳态。在肾脏组织中,claudins 蛋白除维持上皮细胞的极性、控制细胞旁的扩散途径外,还参与调节细胞增殖和分化、上皮-间质转化及肿瘤的发生与进展^[6-8],是肾组织生理及病理功能的分子基础。

急性肾损伤的主要病理生理过程包括:各种原因所致的肾小管上皮细胞去分化、变性、紧密连接破坏、极性丧失,导致上皮细胞坏死、凋亡、肾小管基底膜裸露,上皮细胞脱落堵塞管腔,在修复过程中健存的细胞迁移、去分化、新的上皮细胞再生增殖、黏附,肾小管上皮极性形成、结构重建、功能恢复^[9-10]。肾小管上皮细胞紧密连接破坏是 AKI 的早期病理生理改变,是启动 AKI 发生的关键点^[11]。在肾组织中,claudin-2 主要表达于近端肾小管,维持孔道形成,即为“漏孔道”,可以选择性使小分子阳离子通过,维持近端肾小管对 Na⁺ 及水的重吸收^[12]。claudin-2 表达的改变参与了肾小管的损伤过程,Gonzalez 等^[2]在氧自由基介导的 MDCK II 肾小管上皮细胞损害中证实 claudin-2 水平在 24 h 显著降低;Ikari 等^[13]研究发

现 claudin-2 通过下调 MMP-9,能降低细胞迁移造成的肾小管损伤;另有文献报道重铬酸盐导致的急性肾衰竭中 claudin-2 分布异常^[14];但目前未见 claudin-2 在急性肾损伤患儿肾组织中的表达情况的文献报道。

本研究发现对照组及 AKI 组,claudin-2 均分布于近端肾小管上皮紧密连接的细胞膜,胞核及核膜无表达,与文献报道的正常 claudin-2 的分布一致^[12]。AKI 轻症病例组及重症病例组患儿肾组织中 claudin-2 表达水平明显低于孤立性血尿患儿,另外 claudin-2 在 AKI 组胞质中着色区增多,表明 claudin-2 有不同程度的分布异常。重症病例组 claudin-2 表达水平低于轻症病例组,差异有统计学意义,claudin-2 表达与血清肌酐水平及肾间质损害评分呈负相关。提示 claudin-2 的表达和分布异常可能参与了肾小管上皮细胞紧密连接紊乱介导急性肾损伤。

以上提示在 AKI 中肾组织 claudin-2 的表达下降及分布异常为 AKI 发生及发展的重要机制,这与 claudin-2 的生理功能意义一致,提示 claudin-2 可作为干预 AKI 进展的研究切入点及治疗潜在靶点。目前研究已证实多种上游信号分子、生长因子及信号通路参与 claudins 的调节^[2,15-17],相信随着对 claudin-2 调节机制研究的深入,对 AKI 的治疗措施也将取得新的进展。

[参 考 文 献]

- [1] Eadon MT, Hack BK, Xu C, et al. Endotoxemia alters tight junction gene and protein expression in the kidney[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 303(6): F821-F830.
- [2] Gonzalez JE, DiGeronimo RJ, Arthur DE, et al. Remodeling of the tight junction during recovery from exposure to hydrogen peroxide in kidney epithelial cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(11): 1561-1569.
- [3] Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury[J]. *Crit Care*, 2007, 11(2): R31.
- [4] 李志辉,易著文,何小解,等.激素耐药型和激素依耐型肾病患儿肾脏病理剂量分析[J]. *中华儿科杂志*, 2001, 39(8): 449-452.
- [5] Lee DB, Huang E, Ward HJ. Tight junction biology and kidney dysfunction[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 290(1): F20-F34.
- [6] Bilder D. Epithelial polarity and proliferation control: links from the Drosophila neoplastic tumor suppressors[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(16): 1909-1925.

- [7] Grande M, Franzen A, Karlsson JO, et al. Transforming growth factor-beta and epidermal growth factor synergistically stimulate epithelial to mesenchymal transition (EMT) through a MEK-dependent mechanism in primary cultured pig thyrocytes[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 22): 4227-4236.
- [8] Lechpammer M, Resnick MB, Sabo E, et al. The diagnostic and prognostic utility of claudin expression in renal cell neoplasms[J]. Mod Pathol, 2008, 21(11): 1320-1329.
- [9] Cantaluppi V, Quercia AD, Dellepiane S, et al. New mechanisms and recent insights in the pathogenesis of acute kidney injury (AKI) [J]. G Ital Nefrol, 2012, 29(5): 535-547.
- [10] 陈香美, 谢院生. 急性肾损伤的修复与再生 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 7 (11): 565-567.
- [11] Reyes JL, Molina-Jijon E, Rodriguez-Munoz R, et al. Tight junction proteins and oxidative stress in heavy metals-induced nephrotoxicity[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 730789.
- [12] Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, et al. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel[J]. J Cell Sci, 2010, 123(Pt 11): 1913-1921.
- [13] Ikari A, Takiguchi A, Atomi K, et al. Decrease in claudin-2 expression enhances cell migration in renal epithelial Madin-Darby canine kidney cells[J]. J Cell Physiol, 2011, 226(6): 1471-1478.
- [14] Arreola-Mendoza L, Del Razo LM, Mendoza-Garrido ME, et al. The protective effect of alpha-tocopherol against dichromate-induced renal tight junction damage is mediated via ERK1/2 [J]. Toxicol Lett, 2009, 191(2-3): 279-288.
- [15] Ikari A, Takiguchi A, Atomi K, et al. Epidermal growth factor increases clathrin-dependent endocytosis and degradation of claudin-2 protein in MDCK II cells[J]. J Cell Physiol, 2011, 226(9): 2448-2456.
- [16] Van Itallie CM, Tietgens AJ, LoGrande K, et al. Phosphorylation of claudin-2 on serine 208 promotes membrane retention and reduces trafficking to lysosomes[J]. J Cell Sci, 2012, 125(Pt 20): 4902-4912.
- [17] Yasuda T, Saegusa C, Kamakura S, et al. Rab27 effector Slp2-a transports the apical signaling molecule podocalyxin to the apical surface of MDCK II cells and regulates claudin-2 expression[J]. Mol Biol Cell, 2012, 23(16): 3229-3239.

(本文编辑: 万静)

· 消息 ·

《新生儿肺脏疾病超声诊断学》出版

由刘敬、曹海英、程秀永编写的《新生儿肺脏疾病超声诊断学》于2013年10月由河南科学技术出版社正式出版,该书用大量图片介绍了新生儿肺脏超声的基本原理、检查方法及新生儿常见肺脏疾病的超声影像学特点,不但适合超声科、新生儿科及围产医学专业医生阅读,也适合其他希望开展肺脏超声的专业人员阅读。读者可通过当当网、京东商城、亚马逊购买本书,也可直接联系我社购买,联系电话 0371-65788639。

河南科学技术出版社
2014年4月