

·论著·

## 板层蛋白在病理肾组织中的分布及其 mRNA 的表达

黄松明,陈荣华,费莉,郭梅,黄文彦

(南京医科大学小儿肾脏病研究中心,江苏 南京 210029)

**【摘要】**目的 研究板层蛋白在肾小球疾病时质或量的改变,探讨它们在肾脏中的生理功能和病理学意义。方法 本研究以板层蛋白  $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2, \gamma_1$  结构链为观察对象,用免疫组织化学和原位杂交技术研究它们在 48 例肾小球疾病病理肾活检组织中的表达和分布是否发生质或量的改变。结果  $LN\alpha_1, \alpha_2, \beta_1$  和  $\gamma_1$  的 mRNA 在伴系膜增生的肾小球内表达有不同程度的增加,增生的系膜细胞是主要的细胞来源。在肾小球系膜增殖节段和硬化病灶附近伴有  $LN\alpha_1$  和  $\gamma_1$  的蛋白增多和  $LN\alpha_2, \beta_1$  蛋白的异常表达,而  $LN\beta_2$  链在相应节段的系膜区和 GBM 表达出现不同程度的下降。结论 在系膜增生的肾小球疾病中,增生的系膜细胞是肾小球内板层蛋白量的积聚和异常合成的重要细胞来源。在肾小球疾病中,板层蛋白的合成出现量和质的变化,这可能是肾小球疾病进展和恶化的物质基础。

**【关键词】** 板层蛋白;肾脏;表达;儿童

**【中图分类号】** R365 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2000)05-0305-06-0390-05

### Distribution of Laminins and mRNA Expression in the Pathologic Kidney

HUANG Song-Ming, CHEN Rong-Hua, FEI Li, et al.

Center of Pediatric Nephrology, Nanning Medical University, Nanjing 210029, China

**Abstract:** **Objective** To observe the qualitative and quantitative alterations of laminins in glomerular diseases, and to clarify their biological and pathological significance to evaluate the role in the pathogenesis. **Methods** Five laminin chains ( $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2$  and  $\gamma_1$ ) were studied by immunohistochemistry and in situ hybridization. The qualitative and quantitative changes of distribution and mRNA expression were observed in 48 renal biopsy specimens from patients with glomerular diseases. **Results** The mRNA expressions of  $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1$  and  $\gamma_1$  increased with different degrees in glomeruli associated with mesangial proliferation. These increases originated from proliferative mesangial cells. Increased expressions of  $\alpha_1$  and  $\gamma_1$  proteins and abnormal expressions of  $\alpha_1$  and  $\beta_1$  proteins were found in the segments with mesangial proliferation and glomerulosclerosis, whereas the expression of  $\beta_2$  decreased in the mesangium and GBM of the same lesions in various degrees. **Conclusions** Proliferative mesangial cells are the origins of abnormal accumulation and expression of laminins in the mesangial proliferative glomeruli. The quantitative and qualitative alterations of laminin chains distribution were found in glomerular diseases. It may be the basis of the progression and deterioration of glomerular diseases.

**Key words:** Laminin; Kidney; Expression; Child

板层蛋白(Laminin, LN)是一种重要的细胞外基质非胶原糖蛋白。LN在体内除了参与构建基底膜外,而且参与控制细胞的分化、生长、粘附、迁移和增殖,调节细胞的生物学功能,因而在胚胎发育、损伤修复中起着重要作用<sup>[1,2]</sup>。有证据表明,一些肾

脏疾病的发生和进展源于细胞外基质成分的基因表达或蛋白分布的异常,而在其它一些肾小球疾病的研究也表明,在病理肾组织中同样存在LN量的积聚或质的改变,而且这种改变与肾脏病理损伤程度密切相关<sup>[3,4]</sup>,其改变甚至先于肾小球病理组织学

[收稿日期] 2000-06-20; [修回日期] 2000-09-20  
[基金项目] 本课题受江苏省教委自然科学基金资助(96047)  
[作者简介] 黄松明(1966-),男,医学博士,讲师。

变化。因此,研究 LN 等细胞外基质成分在肾小球疾病中积聚的种类、部位和细胞来源对揭示肾小球疾病慢性进展及肾小球硬化的机理起重要作用,为防治肾脏疾病提供新的思路。

## 1 资料与方法

### 1.1 标本

48 例病理标本取自本科肾脏疾病儿童经皮肾活检肾组织,其中微小病变(MCNS)4 例,系膜增殖性肾小球肾炎(MsPGN)18 例,局灶节段肾小球硬化(FSGS)6 例,IgA 肾病 5 例,IgM 肾病 2 例,毛细血管内增生性肾小球肾炎(EnPGN)4 例,紫癜性肾炎 9 例。正常肾组织对照标本 3 例,为拟行肾移植的未用肾或肾肿瘤行肾切除术后的瘤旁正常肾组织。

### 1.2 主要试剂

单克隆抗体:LN $\alpha_1$ (4C<sub>7</sub>)、 $\alpha_2$ (5H<sub>2</sub>)、 $\beta_1$ (4E<sub>10</sub>)小鼠抗人单抗由美国 Dr. Engvall E 惠赠; $\beta_2$ (C<sub>4</sub>)链、 $\gamma_2$ (2E<sub>8</sub>)小鼠抗人单抗购自美国 The Developmental Studies Hybridoma Bank;免疫检测试剂盒(Streptavidin-peroxidase, with AEC)购自法国 Immunotech 公司,cDNA 探针来源:LN $\alpha_1$ (2.5kb)、 $\alpha_2$ (3.2kb)、 $\beta_1$ (3.6kb)、 $\gamma_1$ (4kb)的 cDNA 克隆由瑞典 Dr. Karl Tryggvason 惠赠。

### 1.3 间接免疫碱性磷酸酶法

取组织冰冻切片 PBS 平衡、阻断剂处理后加单抗 37℃ 孵育 60 min;Bouin 液去除内源性碱性磷酸酶后加碱性磷酸酶标记的二抗,37℃ 孵育 60 min;缓冲液洗片后,加酶底物溶液显色;0.5%美兰复染细胞核后封片,镜检。

### 1.4 原位杂交

石蜡切片经脱蜡、水化后,置枸橼酸缓冲液中微波处理。多聚甲醛固定、蛋白酶 K 消化、再固定后梯度乙醇脱水,自然干燥。室温预杂交 1h,2×SSC 洗片后,42℃ 杂交过液。不同浓度 SSC 溶液洗片,加阻断剂、AP 标记的抗地高辛抗体、酶底物溶液,显色后中止反应,封片、观察。每一标本设立阴性对照,同一标本除在杂交时加入等量的不含探针的杂交液 42℃ 过液外,其余操作均与实验标本相同。

### 1.5 免疫结果判定

光镜下根据底物显色判断表达强度,底物显色呈淡红色,则为弱阳性,底物显色呈红色,为阳性,如底物显色呈深红色,则为强阳性,无底物着色为阴性。

## 1.6 原位杂交结果

(1)在显微镜下直接观察其部位、根据底物显色判断表达强度;(2)根据疾病类型和肾小球病变性质,在每组病例中随机选择 15 个肾小球,用图像系统检测每个小球着色的面积及该小球的总面积(肾小囊以内),以两者的百分比表示阳性信号的相对含量。

### 1.7 统计学处理

将图像处理系统测得的阳性面积百分率用平方根反正弦转化,用 Excel 分析软件进行单因素方差分析及最小显著法进行统计学处理,组间比较用  $q$  检验。

## 2 结果

### 2.1 板层蛋白结构链在病理肾组织中的分布

2.1.1 LN $\alpha_1$  链 在部分病理肾小球中其蛋白表达量出现改变(表 1)。在系膜增殖性肾小球肾炎、IgA 肾病、IgM 肾病、紫癜性肾炎的部分病例肾小球中,增殖扩大的系膜区其蛋白表达增强,相邻节段的肾小球基底膜(glomerular basement membrane, GBM)的阳性度也增加;有 2 例节段肾小球硬化病例的肾小球硬化灶附近节段的 GBM 和系膜区蛋白有不同程度增加;4 例毛细血管内增生性肾小球肾炎的肾组织中,仅 1 例在增殖的系膜区呈节段性增加。4 例微小病变的肾小球中分布基本正常。

2.1.2 LN $\alpha_2$  链 可在部分病变肾小球的系膜区出现节段性异常表达(表 1)。主要在一些增生性肾炎病例中,如系膜增殖性肾小球肾炎、1 例毛细血管内增生性肾炎、IgA 肾病等;而大部分病例的 GBM 中未见其表达,仅在 2 例系膜增生性肾炎出现节段性弱阳性。同时还可在部分增生性肾小球疾病的肾实质和小管基膜出现不同程度的蛋白表达。(图 1)

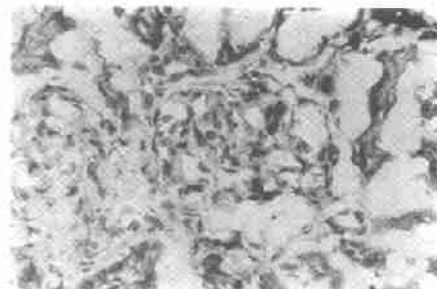


图 1 LN $\alpha_2$  在 IgA 肾病系膜区和 TBM( $\times 400$ )

Figure 1 The distribution of LN $\alpha_2$  in the mesangium and TBM of IgA nephropathy

表1 LN $\alpha_1$  和 LN $\alpha_2$  在疾病肾小球中的表达部位和强度  
Table 1 The expression of LN $\alpha_1$  and LN $\alpha_2$  in pathologic glomerulus

疾病分类	例数	LN $\alpha_1$ 在肾小球 GBM(系膜区)表达强度				LN $\alpha_2$ 在肾小球 GBM(系膜区)表达强度			
		阴性	弱阳性	阳性	强阳性	阴性	弱阳性	阳性	强阳性
正常对照	3		3	(3)		3(3)			
MCNS	4		4(1)	(3)		4(4)			
MsPGN	18		15(2)	2(11)	1(5)	16(13)	2(2)	(2)	(1)
FSGS	6		4		1(4)	1(2)	6(3)	(1)	(1)
IgA 肾病	5		4	1(3)	(2)	5(2)	(2)	(1)	
IgM 肾炎	2		2	(2)		2(1)		(1)	
EnPGN	4		4	(3)	(1)	4(3)		(1)	
紫癜性肾炎	9		6	3(5)	(4)	9(6)	(2)	(1)	

注:表中括号内外数字分别表示系膜区和 GBM 分布的例数

2.1.3 LN $\beta_1$  链 与 LN $\alpha_2$  相似,可在部分增生性肾小球疾病的系膜区或 GBM 出现节段性异常表达(表2)。如 IgA 肾病的系膜区,系膜增殖性肾小球肾炎的系膜区和 GBM 等。1 例毛细血管内增生性肾炎小球中有弱阳性表达;同时我们观察到 1 例重度系膜增殖性肾炎伴新月体形成的病变肾小球,除可在残留系膜区、GBM 有异常表达外,其新月体成分对 LN $\beta_1$  的单抗呈弥漫性的强阳性反应(图2)。而微小病变肾小球中未见  $\beta_1$  的分布。

2.1.4 LN $\beta_2$  链 与 LN $\beta_1$  分布相反,其在一些疾

病肾小球的系膜区和 GBM 表达出现不同程度的下降(表2)。如在 IgA 肾病的系膜区;同是重度系膜增殖性肾炎伴新月形成的病变肾小球,新月体成分与 LN $\beta_2$  的反应较弱,在肾小球的一个节段,系膜区表达呈强阳性(图3)。微小病变型肾小球内的分布与正常无异。

2.1.5 LN $\gamma_1$  链 在大部分病理类型的肾小球中其表达和分布与正常对照组相比无明显改变,仅在部分增殖的肾小球系膜区附近和硬化相邻节段的系膜区、GBM 表达增强(表2)。

表2 LN $\beta_1$ , LN $\beta_2$  和 LN $\gamma_1$  在疾病肾小球中的表达部位和强度  
Table 2 The expression of LN $\beta_1$ , LN $\beta_2$  and LN $\gamma_1$  in pathologic glomerulus

疾病分类	例数	LN $\beta_1$ 在肾小球 GBM(系膜区)表达强度				LN $\beta_2$ 在肾小球 GBM(系膜区)表达强度				LN $\gamma_1$ 在肾小球 GBM(系膜区)表达强度			
		阴性	弱阳性	阳性	强阳性	阴性	弱阳性	阳性	强阳性	阴性	弱阳性	阳性	强阳性
正常对照	3	3(2)					3	(3)				3(3)	
MCNS	4	4(4)					4	(4)				4(4)	
MsPGN	18	15(12)	2(2)	1(3)	(1)	4(1)	13(6)	1(10)	(1)		2(1)	13(12)	3(5)
FSGS	6	5(3)	1(3)			1	4(2)	1(4)				4(3)	2(3)
IgA 肾病	5	5(2)	(3)			1	4(2)	(3)			1	3(3)	1(2)
IgM 肾炎	2		2(2)				2(1)	(1)				2(1)	(1)
EnPGN	4	3(3)	1(1)			1(1)	3	(3)				4(4)	
紫癜性肾炎	9	7(5)	1(2)	1(2)		3	6(1)	(7)	(1)			8(7)	1(2)

注:表中括号内外数字分别表示系膜区和 GBM 分布的例数

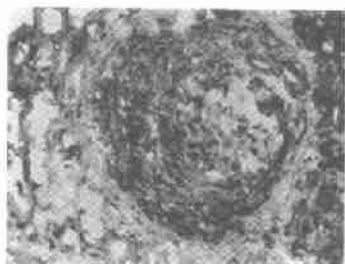


图2 LN $\beta_1$  在新月体和小球的系膜区和 GBM ( $\times 400$ )  
Figure 2 The distribution of LN $\beta_1$  in the crescent, mesangium and GBM

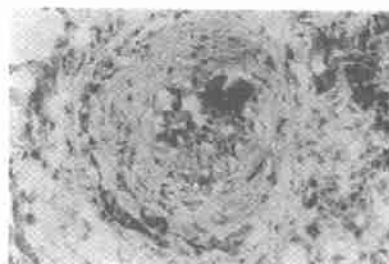


图3 LN $\beta_2$  在新月体中较弱,系膜区节段性强阳性( $\times 400$ )  
Figure 3 Weak distribution of LN $\beta_2$  in the crescent and positive in the mesangium

### 2.2 板层蛋白结构链 mRNA 在病理肾组织中的表达

根据疾病类型和肾小球病变性质,分为微小病变、毛细血管内增生性肾小球肾炎、局灶节段肾小球硬化及轻、中、重度系膜增生组(表 3)。

由原位杂交显示,  $LN\alpha_1$ ,  $LN\alpha_2$  和  $LN\beta_1$  的 mRNA 在一些增生性肾小球肾炎(如 MsPGN, IgA 肾病、IgM 肾炎、紫癜性肾炎、EnPGN)中表达明显增加(图 4,5,6),而  $LN\gamma_1$  的 mRNA 也有一定程度的表达增加;在 MCNS 的肾小球内  $LN\alpha_1$ ,  $LN\beta_2$  和  $LN\gamma_1$

的 mRNA 表达仅轻度增加,没有统计学意义;FSGS 的肾小球内  $LN\alpha_2$  的 mRNA 表达明显增强,  $LN\beta_1$  的 mRNA 表达也增高,而  $LN\alpha_1$ ,  $LN\gamma_1$  的 mRNA 的表达却有下降趋势(表 3)。表达增加除了来源于原来的表达细胞外,其它肾小球细胞也参与了异常表达,如系膜细胞有  $LN\alpha_1$  和  $LN\alpha_2$  的异常表达,  $LN\beta_1$  表达既有系膜细胞参与,也有肾小球内皮细胞,系膜细胞还参与了  $LN\gamma_1$  的表达。轻度、中度和重度系膜增生的组间各链 mRNA 的表达无明显差异。

表 3 LN mRNA 在不同病理肾组织中表达相对水平

Table 3 The expression of LN mRNA in different pathologic kidneys

( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	n	杂交信号的相对面积%			
			$LN\alpha_1$	$LN\alpha_2$	$LN\beta_1$	$LN\beta_2$
正常对照	3	15	2.82 ± 0.11	4.43 ± 0.38	2.90 ± 0.11	2.97 ± 0.27
MCNS	4	15	3.02 ± 0.21 <sup>a</sup>	4.20 ± 0.77 <sup>a</sup>	3.19 ± 0.17 <sup>a</sup>	3.00 ± 0.13 <sup>a</sup>
EnPGN	4	15	5.54 ± 0.31 <sup>a</sup>	12.9 ± 2.20 <sup>a</sup>	19.0 ± 1.60 <sup>a</sup>	4.54 ± 0.22 <sup>b</sup>
FSGS	6	15	2.71 ± 0.18 <sup>a</sup>	10.69 ± 0.78 <sup>a</sup>	5.41 ± 0.35 <sup>b</sup>	2.48 ± 0.10 <sup>a</sup>
轻度系膜增生	12	15	9.82 ± 0.16 <sup>a</sup>	10.54 ± 1.02 <sup>a</sup>	9.22 ± 2.09 <sup>a</sup>	5.61 ± 0.20 <sup>a</sup>
中度系膜增生	7	15	11.39 ± 0.10 <sup>a</sup>	11.47 ± 2.26 <sup>a</sup>	13.31 ± 0.10 <sup>a</sup>	4.99 ± 0.18 <sup>a</sup>
重度系膜增生	5	15	10.64 ± 0.16 <sup>a</sup>	10.27 ± 0.49 <sup>a</sup>	12.37 ± 2.14 <sup>a</sup>	6.33 ± 0.81 <sup>a</sup>

注:与正常对照组比较, a  $P < 0.01$ ; b  $P < 0.05$ ; c  $P < 0.05$

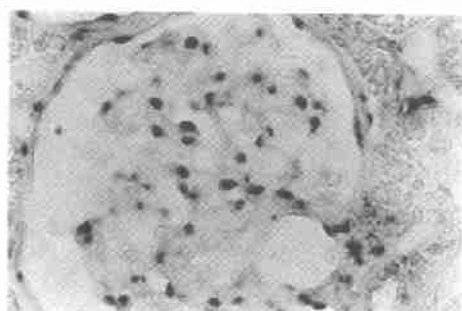


图 4  $LN\alpha_2$  在正常肾小球内的表达( $\times 400$ )

Figure 4 The expression of  $LN\alpha_2$  mRNA in normal glomerulus

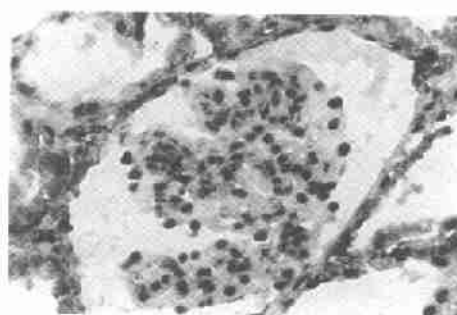


图 6 肾小球固有细胞均参与  $LN\beta_1$  mRNA 表达( $\times 400$ )

Figure 6 A complete express of  $LN\beta_1$  mRNAs in all the inner glomerular cells

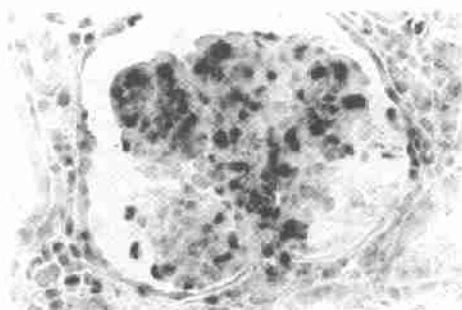


图 5  $LN\alpha_2$  在增殖节段的系膜细胞出现表达( $\times 400$ )

Figure 5 The expression of  $LN\alpha_2$  mRNA in mesangial proliferative segments

### 3 讨论

板层蛋白作为细胞外基质的主要成分之一,其在体内表达量或质的改变均可影响肾小球的形态结构和生理功能<sup>[5]</sup>。

系膜增生性肾小球肾炎主要病理特征为系膜细胞和/或细胞基质的增生,导致系膜区扩大。在免疫学检查中如果其系膜区以 IgA 沉积为主,则称为 IgA 肾病,以 IgM 沉积为主者为 IgM 肾病。紫癜性

肾炎是儿童时期常见的继发性肾小球疾病。这四者的一个共同的病理特征是系膜增生,本研究显示,它们的发病原因可能不同,但其病理组织中 LN 分子链分布基本一致,表现为在系膜增殖节段的系膜区和相邻的 GBM 节段有 LN $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  和  $\gamma_1$  的蛋白增多,而  $\beta_2$  链的蛋白反应下降。原位杂交结果显示  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  和  $\gamma_1$  的 mRNA 的表达明显增强,与对照组相比差异均有非常显著性意义,系膜增生的严重程度对 mRNA 的表达水平无明显影响。这一现象提示,不论肾小球疾病的始动因素如何,其增生的系膜细胞可能是肾小球内板层蛋白量的积聚和异常合成的重要细胞来源。以往一些研究发现,肾小球系膜细胞在与细菌共培养时,或在 IgA 肾病的系膜细胞能大量合成板层蛋白,在体内系膜区沉积并随着系膜区的扩大而增多<sup>[6,7]</sup>。但我们对板层蛋白各分子链的研究显示,它们在病理状态下系膜细胞的合成水平并非一致性增加。此外,除了一些链的量发生改变外,原在肾小球内未见分布的 LN $\alpha_2$  和  $\beta_1$  出现异常表达,因此我们认为在疾病状态下的肾小球系膜区,异常积聚的细胞外基质除了有量的增加外,更主要的是出现了质的变化。它们与细胞和其它细胞外基质的接触使肾小球的结构和功能发生了改变,参与了这些疾病的进展。

诱发细胞异常合成 LN 的机制目前尚不完全明了,已有体外培养和动物研究表明细胞所处环境的改变、炎症因子如 TGF- $\beta$  的刺激等,可使肾小球细胞产生细胞外基质的调节失常、肾小球系膜细胞的表型改变,而导致增殖和蛋白合成异常<sup>[6,8]</sup>。进一步研究其表达和分泌的调控,探讨肾小球疾病的发病和进展的机制将是未来研究的一个方向。

体外系膜细胞培养的研究还发现,在系膜细胞过度增殖异常合成 LN 等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)时,基质降解酶的 mRNA 水平明显下降<sup>[11]</sup>。我们观察到体内尽管系膜增生的轻、中、重之间 LN mRNA 表达无明显差异,但 LN $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  的蛋白在系膜区的含量却随着系膜增生而增加,这种现象的产生可能在系膜增生异常合成细胞外基质的同时伴随着机体对 LN 降解能力不同程度的下降。

本研究还发现,在毛细血管内增生性肾小球肾炎的肾小球内,尽管其增殖的肾小球固有细胞能异常高表达 LN $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\gamma_1$  的 mRNA,但其蛋白在肾小球内的分布却大致正常,仅 1 例  $\alpha_1$  在系膜区、 $\beta_1$  在系膜区和 GBM 出现弱阳性反应,这种基因表达

和蛋白分泌的不平行现象,尽管尚不能解释其产生的原因,但推测此时蛋白合成和分布的调控主要在转录后水平。研究发现 LN 在微小病变的肾小球内 mRNA 的表达和蛋白的分布均无明显改变,微小病变和毛细血管内增生性肾小球肾炎在临床上预后均较好,尽管后者在急期也有内皮和少量系膜细胞的增殖、系膜区的扩大,但最终常能恢复正常的结构形态, LN 在这两种病理类型的肾小球内分布基本正常;在提示肾小球疾病预后不良的新月体内可见大量仅在肾小球发育早期出现的 LN $\beta_1$ , 因此推测,板层蛋白各分子链分布的改变能否成为判断肾小球疾病预后的一个指标,有待进一步跟踪研究。

在我们所研究的部分肾小球疾病中,板层蛋白  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  在肾组织中出现异常表达。推测它们也参与板层蛋白的构成,从而改变了细胞与 ECM 及 FCM 和 ECM 之间的连接和构成,使肾小球的结构和功能发生改变,而这些改变可能是肾小球疾病进一步进展和恶化的物质基础。

#### [参 考 文 献]

- [1] Timpl R. Structure and biological activity of basement membrane proteins [J]. *Eur J Biochem*, 1989, 180(3): 487-502.
- [2] Abrahamson DR, St John PL. Loss of laminin epitopes during glomerular basement membrane assembly in developing mouse kidneys [J]. *J Histochem*, 1992, 40(12): 1943-1955.
- [3] Buyukabani N, Kroz D. Distribution of the extracellular matrix components in human glomerular lesions [J]. *J Pathol*, 1994, 172(2): 199-207.
- [4] Zhang YZ, Lee HS. Quantitative changes in the glomerular basement membrane components in human membranous nephropathy [J]. *J Pathol*, 1997, 183 (9): 8-5.
- [5] Noakes PG, Miner JH, Gautam M. et al. The renal glomerulus of mice lacking slamminin/laminin $\beta_2$ : nephrosis despite molecular compensation by laminin $\beta_1$  [J]. *Nat Genet*, 1995, 10 (8): 400-406.
- [6] Sharma S, Sankaran RT, Gibbons N, et al. Escherichia coil-macrophage interactions modulate mesangial cell proliferation and matrix synthesis [J]. *Nephron*, 1996, 73 (4): 587-596.
- [7] Horkoshi S, Ebihara I, Nakamura T, et al. Abnormal distribution of mesangium-specific laminin in glomeruli of patients with idiopathic membranous nephropathy [J]. *Nephron*, 1999, 81 (3): 284-288.
- [8] Schnaper HW, Kopp JB, Poncelet AC, et al. Increased expression of extracellular matrix proteins and decreased expression of matrix proteases after serial passage of glomerular mesangial cells [J]. *J Cell Sci*, 1996, 109 (Pt 10): 2521-2528.

(本文编辑:黄榕)