

[文章编号] 1000-4718(2008)08-1635-04

# 尿 IgG 亚类对人肾小管上皮细胞表达巨噬细胞移动抑制因子的调节作用\*

陈伟英, 梁伟, 方芳, 余学清<sup>△</sup>  
(中山大学附属第一医院肾内科, 广东 广州 510080)

**[摘要]** 目的: 探讨微小病变型(MCD)及膜性肾病型(MN)肾病患者尿 IgG 亚类对人近端肾小管上皮细胞(HK-2 细胞)表达巨噬细胞移动抑制因子(MIF)的影响。方法: 收集 MCD 和 MN 肾病患者的尿液, 分离纯化尿 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 4 个亚类纯品, 并加以鉴定。将这两种病理类型肾病患者尿 IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 分别刺激 HK-2 细胞, 用 Western blotting 的方法检测 HK-2 细胞 MIF 蛋白表达的剂量关系(0、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0 g/L, 刺激 HK-2 细胞 24 h)和时效关系(1 g/L 刺激 HK-2 细胞 0 h、1 h、6 h、12 h、24 h、48 h)。结果: MN 和 MCD 肾病患者的尿 IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 均可上调 HK-2 细胞表达 MIF 蛋白, 并呈明显的剂量和时间依赖关系。MN 患者尿 IgG<sub>3</sub> 刺激 HK-2 细胞随着剂量的增加, MIF 蛋白表达逐渐增强, 到 1.0 g/L 时达到峰值, 时间效应则在 1h 即明显升高, 12 h 达到峰值; IgG<sub>4</sub> 在 0.1 g/L 时即达到峰值, 时间效应则 6 h 即明显升高, 12 h 达峰值。而 MCD 患者尿 IgG<sub>3</sub> 刺激 HK-2 细胞表达 MIF 蛋白, 在 1.0 g/L 时才开始明显升高, 5.0 g/L 达峰值, 时间效应上则在 12 h 才明显升高; IgG<sub>4</sub> 在 0.1 g/L 时开始明显升高, 0.5 g/L 时达峰值, 时间效应上则在 48 h 时才出现明显升高, 并达峰值。结论: MN 及 MCD 肾病患者的尿 IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 均可上调 HK-2 细胞表达 MIF 蛋白, 且 MN 患者尿 IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 的作用强于 MCD 患者, 提示这两种病理类型肾病患者尿 IgG 亚类可能存在结构或功能上的差异。

**[关键词]** 肾病, 膜性; 微小病变型; 免疫球蛋白 G; 巨噬细胞游走抑制因子

**[KEY WORDS]** Nephrosis, membranous; Minimal change disease; Immunoglobulin G; Macrophage migration - inhibitory factors

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

肾小管间质病变是决定各种肾脏病预后的重要因素, 在慢性肾功能衰竭的进展中起着关键作用。在引起肾小管上皮细胞损伤的众多因素中, 蛋白尿是一个极为重要的方面, 而 IgG 是尿蛋白的主要成分之一。我们既往的研究显示<sup>[1]</sup>, 膜性肾病型(MN)患者尿 IgG 上调细胞表达 MIF 作用强于微小病变型(MCD)尿 IgG, 那么, 尿 IgG 亚类对小管上皮细胞的作用是否存在差异? 为此, 本研究就 MN 和 MCD 肾病患者尿 IgG 亚类对人近端肾小管上皮细胞表达 MIF 蛋白的影响作初步探讨。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

小鼠抗人巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)抗体(Baylor 医学院 Lan 教授惠赠), 小鼠抗人 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 抗体(Southern Biotechnology), 山羊抗小鼠 IgG 抗体、标准分子量蛋白(Cell signaling), 0.45 μm PVDF 膜(瑞士 Roche), 0.25% 胰酶、胎牛血清(Gibco-BRL), DMEM/F12 培养基(Hyclone)。人近端肾小管上皮细胞株(HK-2 细胞)购自美国 ATCC 细胞库。

### 2 方法

**2.1 临床资料** 35 例经肾活检证实为微小病变(MCD)或膜性肾病(MN)的原发性肾病患者。根据病理结果按以下指标进行肾小管间质病变(TIL)评分: ① 肾小管变性、坏死; ② 肾小管萎缩; ③ 间质炎症细胞浸润; ④ 间质纤维化。根据严重程度及范围, 按无、轻度(<25%)、中度(25% - 50%)、重度(>50%) 分别计为 0、1、2、3 分, 再计算总分。

**2.2 尿 IgG 亚类的提取、纯化及鉴定** 尿 IgG 亚类的分离和纯化按参考文献<sup>[2]</sup>进行。

**2.3 细胞培养** HK-2 细胞培养于含 10% 胎牛血清 2 mmol/L 谷氨酰胺的 DMEM/F12(1:1) 培养液中, 培养条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>, 每 2-3 d 换液 1 次, 每 3-5 d 传代 1 次。HK-2 细胞于培养瓶中生长至 60% - 70% 融合状态, 以无血清培养基培养 18 h, 使细胞同步于静止期。1 g/L 的 MCD 及 MN 尿 IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 刺激细胞 0、1、6、12、24、48 h, 不同浓度(0、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 g/L)的 MCD 尿 IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 及 MN 尿 IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 刺激细胞 24 h, 提取细胞总蛋白, 检测 MIF 蛋白表达。

**2.4 Western 印迹法检测 MIF 蛋白表达** 配细胞裂解液提

[收稿日期] 2007-04-23 [修回日期] 2007-12-25

\* [基金项目] 广东省自然科学基金资助项目(No. 04009432)

△通讯作者 Tel: 020-87334845; E-mail: xueqingyu@yahoo.com

取细胞总蛋白,核酸蛋白测定仪上测出总蛋白浓度。各样本取同等量总蛋白。经 100 °C 5 min 变性后,进行 SDS - PAGE。电泳后将凝胶上的蛋白条带转移至 PVDF 膜。再进行染膜。小鼠抗人 MIF I 抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜,HRP 结合的山羊抗小鼠 II 抗(1:1 000)室温孵育 1 h。加入 Lumi-GLO 发光液在暗室中进行曝光,显影、定影。

### 3 统计学处理

应用 SPSS11.0 统计学软件,采用单因素方差(One - way ANOVA)分析进行组间差异比较。

## 结 果

### 1 临床资料

除 MN 患者肾小管间质损害程度较 MCD 更为明显(TIL 评分:1.53 ± 1.70 vs 0.38 ± 0.74, P < 0.05),2 组患者 24 h 尿蛋白总量、尿总 IgG 浓度及 IgG 各亚类浓度差异情况均无差异。尿 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 亚类构成在 MN 分别为:27.3%、20.5%、34.2%、18%,在 MCD 分别为:30.5%、

21.0%、30.6%、17.9%。

### 2 尿 IgG 亚类刺激 HK - 2 细胞表达 MIF 的时效关系

**2.1 尿 IgG<sub>3</sub> 刺激 HK - 2 细胞 MIF 蛋白表达** 1 g/L MN 尿 IgG<sub>3</sub> 刺激 HK - 2 细胞, MIF 蛋白表达在 1 h 即显著增强(P < 0.05),12 h 到达高峰,见图 1A。而 1g/L MCD 尿 IgG<sub>3</sub> 刺激 HK - 2 细胞,12 h 后 MIF 蛋白表达才开始明显增多(P < 0.05),见图 1B。

**2.2 尿 IgG<sub>4</sub> 刺激 HK - 2 细胞 MIF 蛋白表达** 1 g/L MN 尿 IgG<sub>4</sub> 刺激 HK - 2 细胞, 6 h MIF 蛋白表达即显著增强(P < 0.05),12 h 到达高峰,见图 2A。而 1g/L MCD 尿 IgG<sub>4</sub> 刺激 HK - 2 细胞,48 h MIF 表达才开始增高(P < 0.05),见图 2B。

### 3 尿 IgG 亚类刺激 HK - 2 细胞表达 MIF 的量效关系

**3.1 尿 IgG<sub>3</sub> 刺激 HK - 2 细胞 MIF 蛋白表达** MN 患者尿 IgG<sub>3</sub> 刺激 HK - 2 细胞 24 h, MIF 的蛋白表达从 0.1 g/L 即开始增强,1.0 g/L 时作用达到峰值,见图 3A。MCD 患者尿 IgG<sub>3</sub> 刺激 HK - 2 细胞表达 MIF 蛋白,1.0 g/L 开始升高,5 g/L 时达到高峰,见图 3B。

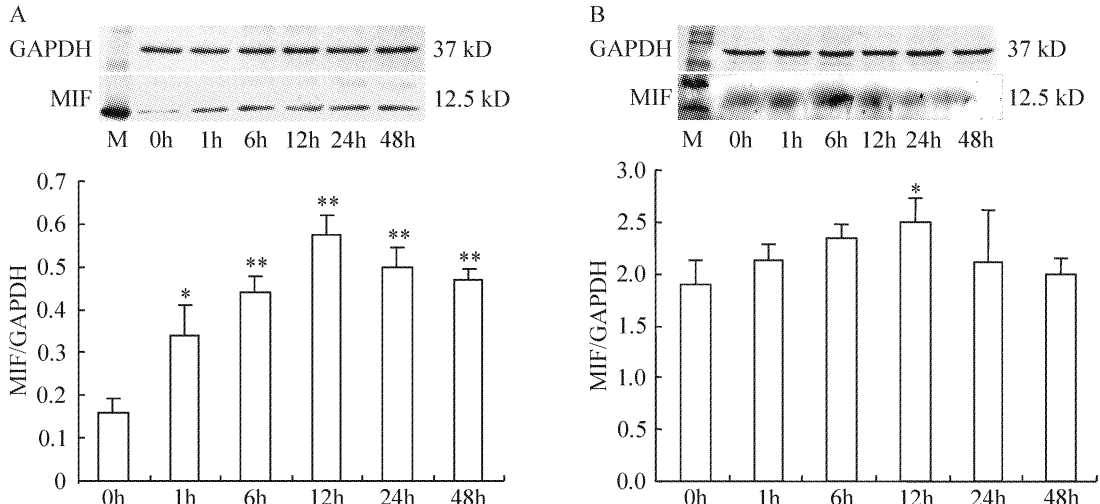


Fig 1 MIF protein expression in HK - 2 cells after MN IgG<sub>3</sub> (A) and MCD IgG<sub>3</sub> (B) stimulation.  $\bar{x} \pm s$ . n = 3. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs 0 h. M; marker.

### 图 1 IgG<sub>3</sub> (MN) 和 IgG<sub>3</sub> (MCD) 刺激 HK - 2 细胞表达 MIF 蛋白时效关系

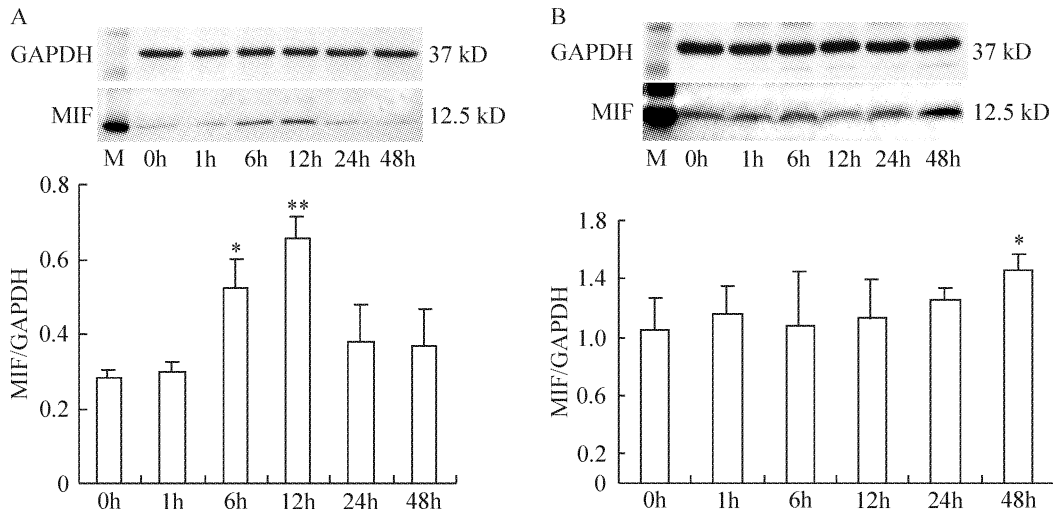


Fig 2 MIF protein expression in HK - 2 cells after MN IgG<sub>4</sub> (A) and MCD IgG<sub>4</sub> (B) stimulation.  $\bar{x} \pm s$ . n = 3. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs 0 h. M; marker.

### 图 2 IgG<sub>4</sub> (MN) 和 IgG<sub>4</sub> (MCD) 刺激 HK - 2 细胞表达 MIF 蛋白的时效关系

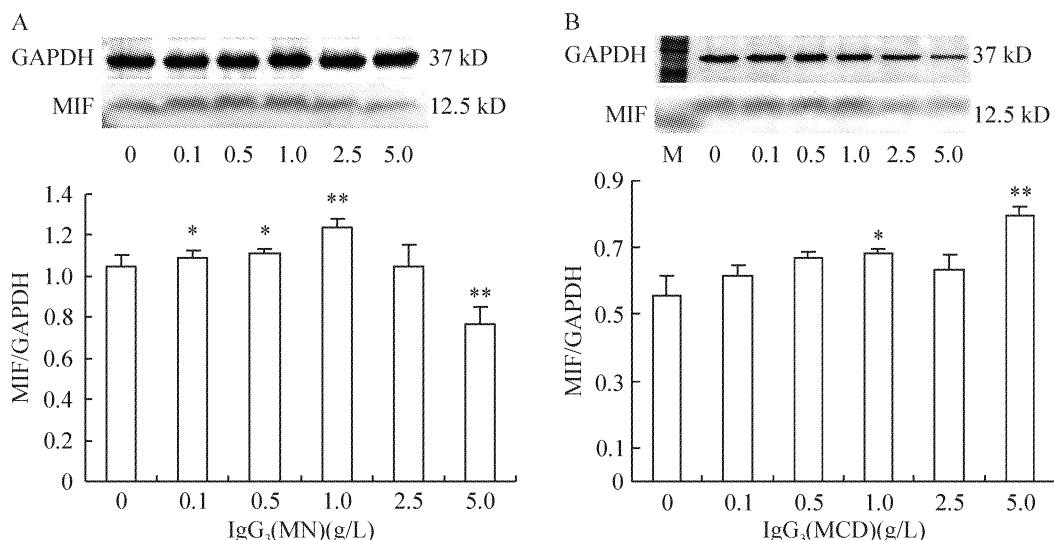


Fig 3 MIF protein expression in HK - 2 cells after MN IgG<sub>3</sub> (A) and MCD IgG<sub>3</sub> (B) stimulation.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0 g/L. M; marker.

图3 IgG<sub>3</sub> (MN) 和 IgG<sub>3</sub> (MCD) 刺激 HK - 2 细胞表达 MIF 蛋白量效关系

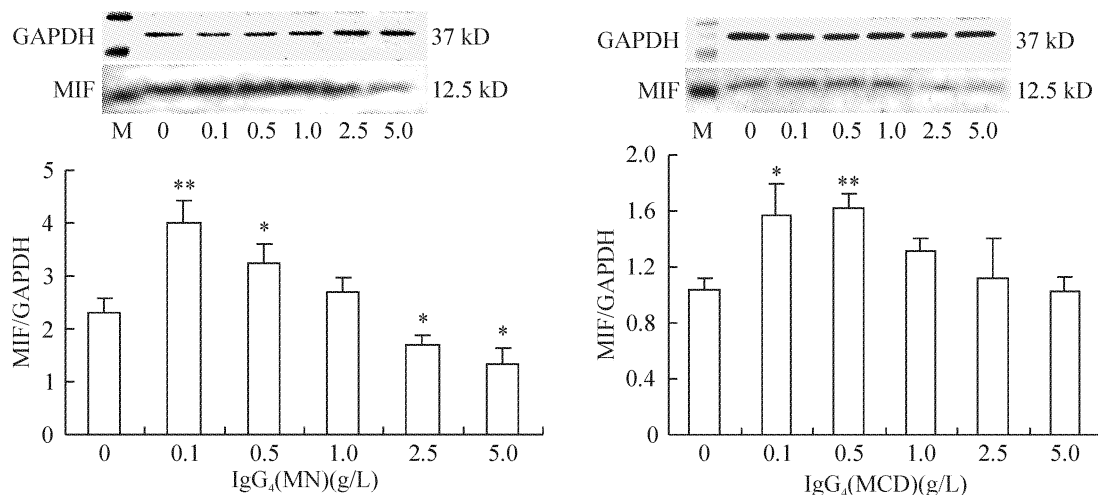


Fig 4 MIF protein expression in HK - 2 cells after MN IgG<sub>4</sub> (A) and MCD IgG<sub>4</sub> (B) stimulation.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0 g/L. M; marker.

图4 IgG<sub>4</sub> (MN) 和 IgG<sub>4</sub> (MCD) 刺激 HK - 2 细胞表达 MIF 蛋白的量效关系

3.2 尿 IgG<sub>4</sub> 刺激 HK - 2 细胞 MIF 蛋白表达 MN 患者尿 IgG<sub>4</sub> 刺激 HK - 2 细胞的量效模式, 0.1 g/L 即迅速达到高峰 ( $P < 0.01$ ), 随即逐渐下降, 见图 4A。而 MCD 患者尿 IgG<sub>4</sub> 刺激 HK - 2 细胞, MIF 蛋白表达需 0.5 g/L 才达到高峰, 见图 4B。

### 讨 论

尿蛋白是引起肾小管间质损害, 造成肾间质纤维化, 最终导致慢性肾衰竭的重要因素之一。然而, 不同病理类型的肾病患者, 尽管都有蛋白尿的存在, 但其肾小管间质损伤的程度却存在很大的差异, 有学者认为与尿蛋白的量和持续时间有关<sup>[3]</sup>, 但亦有可能是不同病理类型肾病患者尿蛋白的组分存在结构和/或功能上的差异, 导致对小管间质损伤程度的不同。

MIF 是一种重要的前炎症因子, 可引起单核巨噬细胞及

T 淋巴细胞细胞浸润, 并激活这些细胞, 促进其分泌 TNF -  $\alpha$ 、IL - 1 等细胞因子, 引起免疫细胞介导的组织损伤, 从而参与了肾小管间质的损害<sup>[4]</sup>。Lan 等<sup>[5]</sup>报道了在不同病理类型的肾病中, 小管细胞表达 MIF 的百分率与间质巨噬细胞及 T 淋巴细胞浸润、小管间质损伤、肾功能损害密切相关。说明 MIF 可能是介导进行性肾脏损害的一个关键介质。

MCD 和 MN 是原发性肾病常见的病理类型, 其对激素的治疗反应和预后均有明显差异。本研究结果显示, 尽管 2 组患者 24 h 尿蛋白总量、尿中白蛋白及 IgG 浓度均无差异, 但膜性肾病患者肾小管间质损害程度明显重于微小病变型, 其原因未明, 推测可能与尿蛋白的组成成分或尿蛋白的持续时间有关, 尿蛋白成分的差异有可能也是引起小管间质损伤不同的重要原因。我们最近的研究发现 MN 患者尿 IgG 上调 HK - 2 细胞表达 ET - 1 mRNA、MIF mRNA 和 MIF 蛋白的作用强于 MCD 患者尿 IgG, 而尿白蛋白却无类似的差异, 推测这

两种病理类型肾病患者尿 IgG 可能存在结构或亚类构成的差异,从而表现出对 HK-2 细胞生物学效应的不同。

为此,我们从 MCD 和 MN 患者尿中分离、纯化尿 IgG 各亚类,观察其对肾小管上皮细胞作用有无不同。结果显示 MN 和 MCD 肾病患者尿 IgG 成分均是由 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 组成,且两种类型的亚类构成上无明显差异,由于尿 IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 占总 IgG 的比例明显高于血清(血清中 IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 分别占 7.4% 和 3.7%,而尿标本中分别为 35% 和 18%),因此我们首先采用 IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 进行实验。MN 和 MCD 患者尿 IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 均可刺激 HK-2 细胞合成 MIF,且随着刺激时间延长和刺激剂量的增加,呈时间和剂量依赖关系。但这两种病理类型的尿 IgG 亚类的作用又存在差异,MN 患者 IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 对 HK-2 细胞表达 MIF 蛋白的作用较 MCD 强,提示这两种不同病理类型肾病患者尿 IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 可能存在结构或功能上的差异。

MN 患者尿 IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 刺激 HK-2 细胞表达 MIF 蛋白的作用较 MCD 肾病患者强,而 MIF 蛋白可引起单核巨噬细胞及 T 淋巴细胞浸润,激活并促进其分泌多种细胞因子,从而参与了肾小管间质的损害。因此,MN 患者尿 IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub> 导致的肾小管上皮细胞损伤程度也会比 MCD 患者更严重,这恰恰与我们在临床上观察到的现象吻合。下一步我们将探讨 MCD 和 MN 肾病患者尿 IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub> 对肾小管上皮细胞的作

用,以及探讨其它病理类型尿 IgG 各亚类对肾小管上皮细胞表达细胞因子的影响,更深入地探讨不同病理类型肾病患者肾间质损害差异的原因。

[参 考 文 献]

[1] 陈伟英,方芳,彭晖,等. 两种病理类型肾病患者尿 IgG 对人肾小管上皮细胞表达巨噬细胞移动抑制因子的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2005,21(7):384-388.

[2] 梁伟,陈伟英,余学清,等. 尿 IgG 亚类的分离纯化和鉴定[J]. 中国病理生理杂志, 2006,22(10):2078-2080.

[3] Tesar V, Zima T, Kalousiva M. Pathobiochemistry of nephrotic syndrome[J]. Adv Clin Chem, 2003,37: 173-218.

[4] Lan HY, Bacher M, Arkins RC, et al. The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat [J]. J Exp Med, 1997, 185(8):1455-1465.

[5] Lan HY, Yang NS, Robert CA, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in human glomerulonephritis[J]. Kidney Int, 2000, 57(2):499-509.

(上接第 1634 页)

促炎/抗炎平衡的建立,在大环内酯类药干预组中,EM 或 AZM 对 IL-10 的抑制作用不显著,提示有以下可能:(1)大环内酯类药对 IL-10 产生的影响是通过 TNF- $\alpha$  表达的下调而间接发挥作用;(2)TNF- $\alpha$  和 IL-10 在炎症反应中存在表达时相差异。

综合本实验结果,不论作为预防或治疗用药,MA 在一定程度上可以抑制过度激活的炎症反应,从而抑制 ALI 向 ARDS 发展,但 ALI/ABD 是严重全身炎症反应在肺部的特殊表现,病变广泛复杂,并非单一药物能够控制,使用 MA 只能作为防治 ALI/ARDS 综合措施的一个环节。

[参 考 文 献]

[1] Zhang J, Li HZ, Qi HW, et al. NF- $\kappa$ B expression in LPS induced acute lung injury in mice [J]. Di-si Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ), 2000,12(9): 515-518.

[2] Cai JH, Liu WY, Guo JJ, et al. Model establishment and early rescue of canine thoracic gunshot wound [J]. Di-si Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ), 2000,12

(9):530-532.

[3] 沈慧,沈策. 大环内酯类药物对免疫调节作用的研究进展[J]. 国外医学:呼吸系统分册, 2005,25(11): 818-821.

[4] Sun D, Zhao M, Ma D, et al. Protective effect of interleukin-1 receptor antagonist on oleic acid-induced lung injury[J]. Chin Med J(Engl), 1996, 109(7):522.

[5] 张建龙,马琪,欧晓鹏,等. 实验性 ARDS 时脑组织脂质过氧化和中分子物质动态变化研究[J]. 新疆医科大学学报, 2003, 26(3):230-232.

[6] 买买提祖农,张建龙,苏良保,等. 654-2 和肠道吸附剂对油酸肺损伤时心功能的影响[J]. 中国病理生理杂志,1998,14(2):166-169.

[7] 高桂新,沈华浩. 感冒双解剂对流感病毒 FM1 感染小鼠肺部炎性损伤的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2007,23(6):1137-1140.

[8] 李琦,钱桂生,张青,等. 油酸-内毒素序贯致伤引起大鼠急性肺损伤的特点[J]. 第三军医大学学报, 2004,26(10):856-858.