

# 肾小管间质损伤中补体激活的意义<sup>①</sup>

姜 饶<sup>②</sup> 关伟明 李幼姬

(中山医科大学附属第一医院肾内科: 广州, 510080)

**摘 要** 采用单克隆抗体免疫荧光技术观察 84例肾活检标本中各种补体成分的定位情况。结果发现,正常肾组织中可有 C5 C6 C7-9及终末补体复合物(TCC)的少量沉积;不伴明显肾小管间质损害者中,早期补体沉积阴性, TCC散在、微弱沉积;伴明显小管间质损害时常可见包括早期补体(C1 C3 C4) 中间补体(C5 C6)及终末补体(C7 C8 C9 TCC)在内的所有补体的持续沉积,补体激活与免疫球蛋白沉积关系密切。早期补体的激活多发生在狼疮性肾炎、膜增殖性肾炎及 IgA肾病等引起的肾小管间质疾病中。TCC的沉积与肾组织损伤之间关系密切。因此,可以考虑在肾小管间质损伤时,补体是作为基本致病因子参与作用的。

**主题词** 肾炎,间质性 免疫学; 补体激活/免疫学

**中图分类号** R 692.6

众多肾小球疾病都或多或少地伴有肾小管间质的损伤,以往对肾炎的认识常常过于注重肾小球的炎症过程,而忽略了对肾小管间质炎症发生、发展的探讨。近年来的大量研究发现,肾炎患者的预后主要决定于肾小管间质因素,而非肾小球本身<sup>[1]</sup>。有关肾小管间质疾病的发病机理目前多倾向于细胞免疫。然而,我们在工作中发现很多肾小球疾病中,肾小管间质常伴有补体的沉积,长期以来人们一直忽略了补体在肾小管间质损伤中的意义。为了探讨补体激活在肾小管间质损伤中的意义和作用。作者总结了 1994年间 84例肾活检资料,着重观察了补体在多种常见类型肾小球疾病中围绕肾小管间质沉积的特征。

## 1 材料与方 法

### 1.1 研究对象

本研究对象为中山医科大学附属第一医院 1994年 3~10月间的 84例肾活检标本,经肾活检证实,其原发肾小球疾病类型有:肾小球轻微病变(ML) 18例,局灶性节段性肾小球硬化(FSGS) 8例,弥漫性系膜增生性肾小球肾炎(MsPGN) 23例, IgA肾病 13例,狼疮性肾炎(LN) 1例,膜性肾病(MN) 2例,膜增殖性肾炎(MPGN) 9例。根据患者是否出现肾小管萎缩、肾小管坏死和(或)间质纤维化、间质淋巴细胞、单核细胞浸润等病变,将其分为两组: A组为伴有明显肾小管间质损害组(50例), B组为不伴有明显肾

小管间质损害组(34例)。A组中 FSGS 7例, MsPGN 13例, IgA肾病 11例, LN 1例, MPGN 8例; B组中 ML 18例, MN 2例, MsPGN 10例, IgA肾病 2例, FSGS 1例, MPGN 1例。此外,本研究选择 4例正常肾组织作为阴性对照。

### 1.2 方 法

所有肾活检标本均为经皮肾穿所得,于冷冻切片机中作 2 $\mu$ m厚度的连续切片,丙酮固定,备用。实验用抗血清有: FITC标记的兔抗人 IgG IgA IgM C3 C1q F $\gamma$  兔抗山羊 IgG及未标记的抗人终末补体复合物(TCC)新抗原的小鼠单抗均购置于 DAKO公司,未标记的山羊抗人 C4 C5 C6 C7 C8 C9 受赠于 Dr. Bhaki J(USA)。免疫荧光染色主要采用直接法及间接法进行,上述各种抗体的工作浓度均为 1:80,缓冲甘油封片后荧光显微镜下观察结果。

### 1.3 结果判断与统计学处理

本研究主要观察肾小管细胞、肾小管基底膜(TBM)、肾间质血管中免疫球蛋白(Ig)及各种补体成分的定位、沉积类型,并对其免疫荧光强度及范围(以低倍镜计算)行半定量计数<sup>[2]</sup>。计分(y值)标准: 0分,阴性染色; 1分,高倍镜下荧光显示模糊; 2分,高倍镜下荧光微弱而清晰,约>10%的小管区着色; 3分,低倍镜下荧光微弱,高倍镜下则强而清晰,约>25%的小管区着色; 4分,低倍镜下强而清晰,高倍镜下出现耀眼的荧光,约>50%的小管区着色; 5分,低

① 国家自然科学基金资助课题; ② 第一作者, 1959年出生,女,副研究员

倍及高倍镜下均呈现耀眼的荧光,约> 75%的小管区着色。结果以秩和检验和 *t* 检验作统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 Ig 及各种补体的定位和沉积类型

各种 Ig 及补体成分主要沿肾小管基底膜及部分间质小血管壁沉积,肾小管上皮细胞内也常出现微弱、散在的阳性着色颗粒,肾间质内未见 Ig 及补体成分沉积。肾小管中 Ig 及补体的沉积类型基本相似,主要表现为带状沉积、假线状沉积及颗粒状沉积(图 1)。

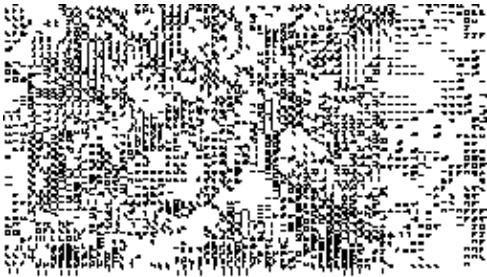


图 1 伴有明显肾小管间质损害组 TCC 免疫荧光染色可见 TCC 沿肾小管呈带状颗粒状沉积 (20× 10)

### 2.2 肾小管间质损害与补体沉积

正常肾组织中各种 Ig 及早期补体成分 (C1q C3 C4) 均为阴性, C5 C6 C7 C8 C9 TCC 则表现为微弱、散在的阳性颗粒沿肾小管基底膜呈节段性沉积(表 1)。

表 1 各组补体及免疫球蛋白沉积的免疫荧光分值 ( $\bar{y}$  分)

|     | 对照组<br>(n = 5) | 不伴有肾小管损害组<br>(n = 34) | 伴有肾管损害组<br>(n = 50) |
|-----|----------------|-----------------------|---------------------|
| C1q | 0.00           | 0.30                  | 17.50 <sup>1)</sup> |
| C3  | 0.10           | 4.35 <sup>1)</sup>    | 30.50 <sup>1)</sup> |
| C4  | 0.25           | 5.25 <sup>1)</sup>    | 16.25 <sup>1)</sup> |
| C5  | 2.60           | 12.25 <sup>1)</sup>   | 21.00 <sup>1)</sup> |
| C7  | 4.05           | 14.75 <sup>1)</sup>   | 25.75 <sup>1)</sup> |
| C8  | 3.40           | 10.50 <sup>1)</sup>   | 23.10 <sup>1)</sup> |
| C9  | 5.25           | 12.50 <sup>1)</sup>   | 28.75 <sup>1)</sup> |
| TCC | 7.05           | 19.25 <sup>1)</sup>   | 27.05 <sup>1)</sup> |
| IgG | 0.15           | 10.00 <sup>1)</sup>   | 21.25 <sup>1)</sup> |
| IgA | 0.00           | 5.25 <sup>1)</sup>    | 14.75 <sup>1)</sup> |
| IgM | 0.20           | 7.00 <sup>1)</sup>    | 18.50 <sup>1)</sup> |

1)与对照组比较, *P* < 0.01, 2) *P* < 0.001

体成分多呈阴性, C5 C6 C7~ 9 TCC 呈弱阳性, 多为散在的、无定形沉积; 伴明显肾小管间质损害组中, 早期补体沉积明显, 表现出明显的激活征象, 其中 C1q 阳性者 14 例, C3 阳性者 26 例, C4 阳性者 7 例。同时本组也表现有 C5 C7~ 9 TCC 的同时沉积, 其荧光强度较 B 组明显增强, 多为粗带状沉积。此外本组常伴有多种 Ig 的沉积, 其可以是 1 种成分单独出现, 也可以是 2 种成分同时出现, 其中以伴 IgG 沉积的机率最高 (21 例); 2 种免疫球蛋白同时出现的机率其次 (14 例), 伴 IgM 沉积者 5 例, 无免疫球蛋白沉积者 10 例。

### 2.3 补体激活与疾病类型

根据不同的疾病类型观察早期补体的沉积情况(表 2), 发现在狼疮性肾炎、膜增殖性肾炎及 IgA 肾病的小管损害时较常伴有早期补体激活的特征。

表 2 各种类型肾小球疾病与早期补体沉积的关系 n (%)

|       | n 例 | 有早期补体沉积 | 无早期补体沉积 |
|-------|-----|---------|---------|
| LN    | 11  | 11(100) | 0(0)    |
| IgAN  | 13  | 8(62)   | 3(33)   |
| MsPGN | 23  | 4(19)   | 19(81)  |
| MPGN  | 9   | 6(67)   | 3(33)   |
| FSGS  | 8   | 7(25)   | 6(75)   |
| MN    | 2   | 0(0)    | 2(100)  |
| ML    | 18  | 0(0)    | 18(100) |

### 2.4 补体在肾间质血管壁的沉积

血管沉积状况显示: B 组肾间质血管壁几乎不见有早期补体及 Ig 沉积, A 组中有 5 例表现出明显的 C1q C3 C4 的沉积。C5 C6 C7~ 9 以及 TCC 新抗原的沉积, 两组间并未表现出明显差异。

### 2.5 补体激活与肾小管损伤的关系

连续切片同时作光镜检查发现, TCC 常沉积在肾小管细胞明显受损处, 主要表现为肾小管上皮细胞的浊肿、细胞核固缩、细胞坏死及脱落, TCC 沉积量多者, 其组织损伤严重, C3 Ig 等的沉积则无此种特定联系。

## 3 讨论

不伴有明显肾小管间质损害组中 Ig 及早期补

体系统通过经典途径和替代途径激活。在补

体激活过程中会产生有超敏毒素作用的 C3a C4a C5a,起调理作用的 C3b C4b 以及最终形成的膜结合性 C5b-9,即补体攻膜复合体 (membrane attack complex MAC),或液相的 SC5b-9,后两者统称为终末补体复合体 (terminal complement complexes, TCC)。补体参与了多种类型疾病的病理过程。

过去的工作主要集中在 MAC对肾小球病理过程的影响<sup>[3-5]</sup>。本研究则着重探讨在肾小管间质损伤中补体激活的意义。本研究先后检测了正常以及一系列肾小球疾病患者的肾组织中的补体沉积情况,发现在肾小管间质明显受损时,常伴有包括早期补体、中间补体及终末补体在内的所有补体成分的明显沉积,强烈地提示了肾小管间质损伤时有补体的原位激活。TCC的沉积不仅在有损伤时明显,且与肾组织损伤程度之间关系密切。TCC多沉积于肾小管明显受损处,TCC沉积多者,其组织损伤严重,而 C3 Ig 的沉积则未发现这种特定的联系。因此,可以考虑在人类肾小管间质的损伤过程中,补体是作为基本致病因子参与引起肾小管间质损伤的;实验还发现,肾小管间质损伤时,补体的沉积常伴有一种或多种 Ig 的同时沉积,且常分布在同一节段的肾小管基底膜上,补体激活似与 Ig 沉积关系密切。但并非所有病例 TCC与 Ig 和(或)早期补体的沉积总是同时出现,这也提示我们,在肾小管间质的损伤中,肾小管间质中的补体激活并不完全依赖于 Ig 的沉积。

在肾小管间质损伤过程中,补体的激活除经典的抗原-抗体复合物外,可能尚有其它的补体激活调节机制。目前已经发现<sup>[6]</sup>: C3可为一系列补体蛋白溶酶所激活,有人认为肾小管内任何蛋白酶-抗蛋白酶的失衡均可能激活补体系统,导致肾小管间质的损伤;此外尚发现,在细胞表面一些膜源性因子如涎酸等也参与替代补体的激活与调节。当细胞表面涎酸类物质缺乏时可能激活替代途径,引发一系列损伤; Houlo 等人发现,补体激活的血小板也可分泌 TCC 蛋白,目前这些蛋白质的功能尚不清楚,很可能与血小板依赖性免疫损伤有关。因为血小板可为 TCC 所激活,而释放出来的终末补体蛋白又可放大血小板的激活;此外,也有人发现肾小管间质性损害可表现为孤立的补体成分沿 TBM 沉积,此种现象多发生于部分肾切除模型。认为残存肾单位中氨的生成增加,可以激活补体替代途径导致补体激活。低 K<sup>+</sup> 肾病时也有类似的补体激活,给这类模型补充 Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> 的摄入,可以减少 C 的沉积并减轻肾小管

间质的损害。此外,也有人发现,肾小管上皮细胞刷状缘在一定条件下可直接激活补体系统。因此,在肾小管间质损伤中,补体的激活,尤其是非经典激活途径的意义值得重视。

本实验发现 TCC 的沉积与肾小管细胞受损之间有某种特定的联系。TCC 沉积处常是细胞明显受损处, TCC 沉积量多者,其组织损伤严重。这一现象提示了 TCC 在肾小管细胞受损处的致病作用。事实上, TCC 的细胞溶解作用在病理学上的意义并不大,更为值得注意的是 TCC 在细胞病变过程中的非致病作用,如由 [Ca<sup>2+</sup>] (细胞内钙离子浓度) 变化介导产生的一系列非致死作用,包括引发细胞激活,导致一些具有重要生物学活性物质如反应性氧代谢物,花生四烯酸代谢产物,包括前列腺素 (PGs)、白三烯 (LTx)、血栓素 (TXB),以及磷脂醇类物质的产生、释放等。因此,对肾小管间质中补体激活作用的认识,将有助于探讨肾小管间质损伤的本质,为临床提供诊治依据。

#### 参 考 文 献

- 1 Mackensen-Haen S, Bohle A, Christensen J, *et al.* The consequence for renal function of widening of the interstitium and changes in the tubular epithelium of the renal cortex and outer medulla in various renal diseases. *Clin Nephrol*, 1992, 37: 70
- 2 Khan T N, Sinniah R, Renal tubular antiproteinase (Alpha-1-antitrypsin and Alpha-1-antichymotrypsin) response in tubulointerstitial damage. *Nephron*, 1993, 65: 232
- 3 Cosyns J P, Kazatchkine M D, Bhakdi S, *et al.* Immunohistochemical analysis of C3 cleavage fragments factor H and the C5b-9 terminal complex of complement in de novo membranous glomerulonephritis occurring in patients with renal transplant. *Clin Nephrol* 1986, 26: 203
- 4 Hnglais N, Kazatchkine M D, Bhakdi S, *et al.* Immunohistochemical study of the C5b-9 complex of complement in human kidneys. *Kidney Int*, 1986, 30: 399
- 5 Falk R J, Sisson S P, Dalmaso A P, *et al.* Ultrastructural localisation of the membrane attack complex of complement in human renal tissues. *Am J Kid Dis*, 1987, 9: 121
- 6 Bhakdi S, Tranum-Jensen J. Membrane damage by complement. *Biochem Biophys Acta*, 1983, 737: 343

(1996-03-16收稿 1996-12-2(修回))

(下转第 139 页)

# ESTABLISHMENT AND IDENTIFICATION OF CYTOKINE GENE MODIFIED ORAL SQUAMOUS CARCINOMA CELL LINES

Zhang Qian Zhang Zhiguang

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Sun Yat-sen Memorial Hospital,  
Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510120)

Zhang Tengfei Hu Liang Chen Shishu

(Research Center of Human Gene Therapy, Shanghai Second Medical University, Shanghai, 200025)

Retroviral vectors carrying human IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , or IL-2 cDNA respectively, packaged by PA317, were used to transfect a human oral squamous carcinoma cell line (Tca-8113). After transfection, resistant clones were selected by G418 and expanded into derivative cell lines. PCR and cytokine bioassays verified the integration of cytokines into the modified cells and the secretion of relative protein products with activity by these cells. These results suggested that oral squamous carcinoma cells can be successfully and stably transduced by retroviral vectors. The establishment of the genemodified cell lines provides objects for studies on their biological behaviour.

**Subject headings** mouth neoplasms/genetics; carcinoma, squamous cell/genetics; cytokines/genetics; transfection

(上接第 129 页)

# ACTIVATION OF COMPLEMENT IN RENAL TUBULOINTERSTITIAL DAMAGE

Jiang Tang Guan Weiming Li Youji

(Department of Nephrology, First Affiliated Hospital,  
Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

In 1994, 84 Kidney biopsy tissues were studied. Deposition of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) and various complement proteins (C1q, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 and terminal complement complex neoantigens) in tubular cells, tubular basement membrane and tubulointerstitial blood vessels were studied in serial sections by immunofluorescence microscopy in order to study the significance and effect of complement activation on tubulointerstitial damage. The results showed the normal kidney tissue appeared scattered C5, C6, C7-9, TCC neo-antigen deposition. In patients without tubulointerstitial lesion, there was no early complement protein deposition and weak-positive deposition of terminal complement complex neo-antigen. In patients with significant tubulointerstitial lesion, it showed persisting deposition of all complements, including early complements, media complements and terminal complements. Complement deposition was also accompanied with one or more kinds of immunoglobulin deposition at the same time. The complements and immunoglobulins often deposit at the same segment of tubular basement membrane. The finding suggested that there was close relationship between complements and immunoglobulins in tubulointerstitial damage. In lupus nephritis, mesangial proliferative glomerulonephritis and IgA nephropathy, early complement activation often appeared. Also, there was a relationship between TCC deposition and the degree of renal tubular cells damage. Therefore, it can be concluded that complements may be an important pathogenetic factor in tubulointerstitial damage.

**Subject headings** nephritis, interstitial/immunology; complement activation/immunology