

Bcl-2 和 Bax 在乙型肝炎病毒相关性肾炎患者肾组织中的表达

孙莉静, 于建平, 袁伟杰, 许静, 于光, 崔若兰

(第二军医大学长海医院肾内科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**观察 Bcl-2 和 Bax 在乙型肝炎病毒相关性肾炎(HBV-GN)患者肾组织中的表达情况。**方法:**选取肾病理资料完整的 HBV-GN 患者 20 例,对照组 10 例为基本正常肾组织。采用 TUNEL 法检测细胞凋亡情况,并计算凋亡指数,免疫组化检测肾组织 Bax 和 Bcl-2 表达。**结果:**HBV-GN 组较对照组肾细胞的凋亡指数明显增加,凋亡细胞多分布于近端、远端肾小管及集合管上皮细胞,肾小球少见。HBV-GN 组 Bcl-2 主要见于肾小管上皮细胞表达,呈质、膜和核多部位阳性,Bax 在肾小球、肾小管均有表达,主要定位于肾小管上皮细胞,包曼囊壁、肾小球系膜区少见。**结论:**HBV-GN 细胞凋亡的主要发生部位是肾小管上皮细胞,Bax 和 Bcl-2 多表达于肾小管上皮,提示肾小管间质的损害可能也是 HBV-GN 致病的重要机制之一。

[关键词] 肾炎;肝炎病毒,乙型;Bcl-2;Bax

[中图分类号] R 735.34

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2007)05-0492-03

Expression of Bcl-2 and Bax in renal tissues of patients with hepatitis B virus-associated glomerulonephritis

SUN Li-jing, YU Jian-ping, YUAN Wei-jie, XU Jing, YU Guang, CUI Ruo-lan (Department of Nephrology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression of Bcl-2 and Bax in renal tissues of patients with hepatitis B virus-associated glomerulonephritis (HBV-GN). **Methods:** Twenty HBV-GN specimens with complete nephrology data and 10 normal renal specimens were randomly chosen for the present study. Cell apoptosis was detected by means of terminal deoxynucleotidyl transferase mediated d-UTP nick end labeling (TUNEL) and the apoptotic index was calculated; immunohistochemistry was used to detect the protein expression of Bax and Bcl-2. **Results:** The apoptotic index in HBV-GN group was obviously higher than that of the control group; the apoptotic cells were mainly distributed in the proximal and distal renal tubules and the collecting duct epithelial cells, seldom seen in the glomerular cells. The expression of Bcl-2 in HBV-GN patients was predominately present in the renal tubular epithelia cells (positive in the plasma, membrane and nuclear); the expression of Bax was found in both glomerular cells and renal tubular cells, mainly in tubular epithelial cells, seldom seen in Bowman's capsule or glomerular mesangial region. **Conclusion:** Apoptosis in the kidney of HBV-GN patients mainly occurs in the renal tubular epithelial cells; expression of Bax and Bcl-2 is mainly in the renal tubular epithelial cells, suggesting that the injury of tubular interstitial damage may be one of the important factors for the development of HBV-GN.

[KEY WORDS] nephritis; hepatitis B virus; Bcl-2; Bax

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(5): 492-494]

有关乙型肝炎病毒相关性肾炎(HBV-GN)的发病机制目前尚不十分清楚。HBV-GN 虽以肾小球损害为主,但与原发性肾小球疾病一样,肾小管-间质的损害也不可忽视。而多种肾脏疾病的发生和发展除与细胞凋亡有着密切关系外,还伴随有凋亡相关基因的表达变化,本研究拟了解 HBV-GN 发生过程中细胞的凋亡情况,检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 在 HBV-GN 患者肾组织的表达,以进一步探讨 HBV-GN 的发病机制。

1 对象和方法

1.1 对象 选取肾病理资料完整的 HBV-GN 患者 20 例,男性 15 例,女性 5 例;年龄为 17~59 岁,平均(34.2 ± 10.7)岁。其中免疫球蛋白相关肾病

(IgAN) 7 例、膜型肾病(MN) 6 例、膜性增殖性肾小球肾炎(MPGN) 3 例、肾小球膜增殖性肾小球肾炎(MsPGN) 3 例、局灶节段性肾小球硬化-肾病综合征(FSGS) 1 例。血清乙肝标志物检测:单独 HBsAg(+)12 例,HBsAg 和 HBeAg 均(+)8 例,所有患者均无肝炎现症表现。肾功能诊断符合慢性肾脏病(CKD)定义者 4 例,CKD I、II 各 2 例,高血压伴随使用降压药的患者有 3 例。对照组 10 例,为肿瘤切除标本的癌旁正常肾组织。

1.2 试剂 TUNEL 试剂盒(德国宝灵曼公司); Bax 兔抗人一抗及 Bcl-2 兔抗人一抗(武汉博士德生物技术有限公司);DAB 试剂盒(瑞士 Flika 生化试

[作者简介] 孙莉静,硕士,讲师、主治医师。

剂公司);蛋白酶 K(瑞士 Roch 公司)。

1.3 TUNEL 法检测肾组织细胞凋亡 3 μm 石蜡切片常规脱蜡至水,20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白酶 K 室温下消化 20 min,按试剂盒所示步骤进行染色、显色及封固,不加蛋白酶 K 消化设为阴性对照。计算凋亡指数(apoptosis index, AI);在普通光镜下连续观察 10 个高倍视野,计数阳性细胞数,求出平均每个高倍镜视野内阳性细胞的百分率。

1.4 免疫组化检测肾组织 Bax 和 Bcl-2 表达 肾组织切片厚 3 μm ,常规脱蜡水化,一抗 Bax 兔抗人一抗或 Bcl-2 兔抗人一抗(1:50 稀释),孵育 2 h。二抗为生物素化羊抗兔 IgG,室温下置 1 h,以 PBS 代替一抗作阴性对照,DAB 显色,光镜观察阳性信号。Bax 和 Bcl-2 表达阳性的表现为胞质及胞膜有棕黄色颗粒,以肾小管上皮细胞为计数细胞,综合考虑切片中阳性细胞百分比和着色强度等。切片内无明显阳性细胞为阴性(-);阳性细胞数 $<25\%$ 为+;阳性细胞数 $25\% \sim 50\%$ 为++;阳性细胞数 $>50\%$ 为+++;以一~+为低染率,++~+++为强染率。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 10.0 统计软件,采用 t 检验进行分析。

2 结果

2.1 肾组织细胞凋亡情况 对照组和 HBV-GN 组均能观察到着色为棕黄色颗粒的凋亡细胞,但对照组肾组织内凋亡细胞较少(图 1A,1B),HBV-GN 组凋亡细胞即明显增多,肾小球可见少量凋亡细胞,肾小管的凋亡细胞明显多于肾小球,多数分布近端、远端肾小管及集合管上皮细胞(图 1C,1D),肾间质也有少量凋亡细胞分布。凋亡细胞主要位于细胞核中,呈均匀染色或颗粒状,阳性细胞分布可为弥漫型、局灶型或散在型。对照组 AI 为 $(9.56 \pm 4.32)\%$,HBV-GN 组 AI 为 $(21.89 \pm 5.66)\%$,两者相比具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 Bax 在肾脏的定位表达 对照组肾组织 Bax 基本未见表达(图 2A),而 HBV-GN 组 Bax 在肾小球、肾小管均有表达,包曼囊壁、肾小球系膜区可见,主要定位于肾小管上皮细胞(图 2B,2C)。HBV-GN 组 Bax 低染率占 37.2% ,强染率占 62.8% 。

2.3 Bcl-2 在肾脏的定位表达 对照组肾组织 Bcl-2 基本未见表达(图 3A),而 HBV-GN 组 Bcl-2 可见于肾小球少量表达,在肾小管上皮细胞表达,呈质、膜和核多部位阳性,特别在肾小管上皮细胞急性坏

死的肾组织中表达更为明显(图 3B,3C)。HBV-GN 组 Bcl-2 累计低染率为 65.5% ,强染率仅为 34.5% ,明显低于 Bax 表达的强染率($P < 0.05$)。

3 讨论

虽然 HBV-GN 以肾小球损害为主,但近年肾小管-间质的损害也日益引起重视。肾小管上皮细胞凋亡与增殖之间的不平衡可能是导致肾小管萎缩和肾功能恶化的重要机制之一^[1-2]。与 HBV-GN 发病有关的细胞凋亡情况国内外文献报道较少。有作者报道在体外用 HBV DNA 阳性的血清培养人肾小管上皮细胞(HK-2),可促进 HK-2 凋亡,同时发现细胞 Fas 表达率明显增高,且细胞凋亡比例与 HBV DNA 定量及 Fas 表达率呈正相关^[3]。

本研究通过 TUNEL 法检测发现 HBV-GN 组凋亡细胞明显增多,且多见于肾小管上皮细胞,肾小球少见,提示细胞凋亡在 HBV-GN 的发病过程中起着一定的作用。

研究表明,多种肾脏疾病的发生和发展除与细胞凋亡有着密切关系外,还伴随着凋亡相关基因表达的变化^[4-5],在糖尿病肾病和梗阻性肾病动物模型中已检测到凋亡蛋白 Bax/Bcl-2 的异常表达。在原发性肾脏疾病患者的肾组织中也发现 Bax 的表达随肾小管间质病变的加重而增加。环孢素 A 所致肾毒性机制研究及实验性肾小管坏死(ATN)模型中发现肾小管上皮细胞 Bax 表达增加^[6]。在急性肾小管排异的研究中发现小管上皮细胞 Bcl-2 表达水平下降,Bax 表达水平上升,同时伴随细胞凋亡的增加^[7]。提示凋亡相关基因 Bax 和 Bcl-2 在原发和继发性肾脏疾病的进展中起着重要作用。

本研究发现对照组肾组织 Bax 和 Bcl-2 基本未见表达,而 HBV-GN 组 Bax 在肾小球、肾小管均有表达,主要定位于肾小管上皮细胞,包曼囊壁、肾小球系膜细胞少见。HBV-GN 组 Bcl-2 在肾小管上皮细胞呈阳性表达。HBV-GN 组 Bax 的强染率明显高于 Bcl-2,由此推断 Bax 和 Bcl-2 在 HBV-GN 的发病过程中起一定的作用,促进了细胞凋亡的发生。

Bax 和 Bcl-2 蛋白表达程度影响了 HBV-GN 肾组织的细胞凋亡,还可能存在其他引起 HBV-GN 细胞凋亡的因素,其确切机制还需今后进一步的研究。未来还需着力于细胞凋亡发生情况、凋亡相关基因表达与 HBV-GN 肾脏病理类型的关系研究,以进一步阐明 HBV-GN 的发病机制。

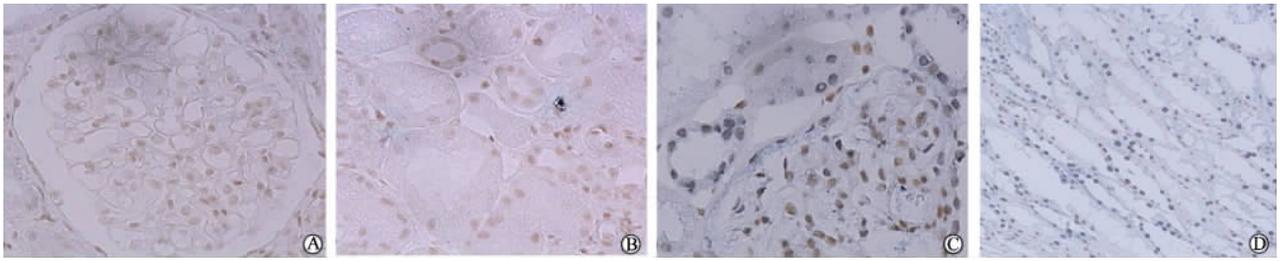


图 1 对照组和 HBV-GN 组肾组织细胞凋亡情况

Fig 1 Apoptotic cells of renal tissues in control group and HBV-GN group(TUNEL)

A;No apoptotic cells in glomerular cells in control group(×400);B;No apoptotic cells in tubular epithelial cells in control group(×400);C; More apoptotic cells were seen in renal tubular epithelial cell than in glomerular cells in HBV-GN group(×400);D:Apoptotic cells in Henle's loop and collecting duct in HBV-GN group(×200)

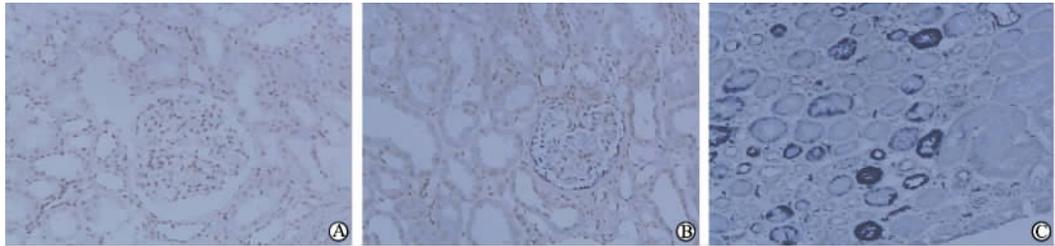


图 2 对照组和 HBV-GN 组肾组织 Bax 的表达

Fig 2 Expression of Bax in renal tissues in control and HBV-GN groups(Immunohistochemistry, ×200)

A;Bax was negative in glomerular and tubular epithelial cells in control group;B: Expression of Bax in Bowman's capsule and mesangial region in HBV-GN group;C:Expression of Bax in tubular epithelial cells in HBV-GN group

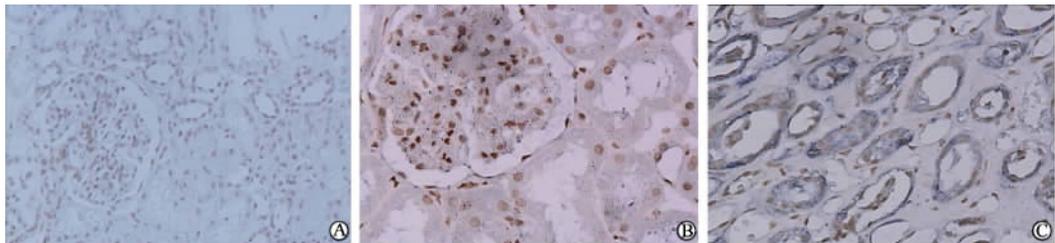


图 3 对照组和 HBV-GN 组肾组织 Bcl-2 的表达

Fig 3 Expression of Bcl-2 in renal tissues in control and HBV-GN groups(Immunohistochemistry)

A;Bcl-2 was negative in glomerular and tubular epithelial cells in control group(×200);B;Expression of Bcl-2 in glomerular cells in HBV-GN group(×400);C:Expression of Bcl-2 in tubular epithelial cells in HBV-GN group(×400)

[参考文献]

[1] Carrizo L C, Ruete C M, Manucha W A, et al. Heat shock protein 70 expression is associated with inhibition of renal tubule epithelial cell apoptosis during recovery from low-protein feeding[J]. Cell Stress Chaperones, 2006, 11: 309-324.

[2] Chien C T, Lee P H, Chen C F, et al. De novo demonstration and co-localization of free-radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischemia/reperfusion[J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12: 973-982.

[3] Deng C L, Song X W, Liang H J, et al. Chronic hepatitis B serum promotes apoptotic damage in human renal tubular cells[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12: 1752-1756.

[4] Kang B P, Urbonas A, Baddoo A, et al. IGF-1 inhibits the mitochondrial apoptosis program in mesangial cells exposed to high glucose[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 285: 1013-1024.

[5] Qiu L Q, Sinniah R, I-Hong S. Downregulation of Bcl-2 by podocytes is associated with progressive glomerular injury and clinical indices of poor renal prognosis in human IgA nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15: 79-90.

[6] Ortiz A, Lorz C, Catalan M P, et al. Expression of apoptosis regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture or following acute renal failure[J]. Kidney Int, 2000, 57: 969-981.

[7] Sharland A, Shastry S, Wang C, et al. Kinetics of intragraft cytokine expression, cellular infiltration, and cell death in rejection of renal allografts compared with acceptance of liver allografts in a rat model: early activation and apoptosis is associated with liver acceptance[J]. Transplantation, 1998, 65: 1370-1377.

[8] Yang B, Johnson T S, Thomas G L. A shift in the Bax/Bcl-2 balance may activate caspase-3 and modulate apoptosis in experimental glomerulonephritis[J]. Kidney Int, 2002, 62: 1301-1313.

[收稿日期] 2007-03-14

[修回日期] 2007-04-05

[本文编辑] 曹 静