

狼疮性肾炎患者 HMGB1 和 RAGE 的表达及意义

叶莉莉, 徐星铭

摘要 目的 探讨高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 及晚期糖基化终产物受体 (RAGE) 在狼疮性肾炎 (LN) 中的作用。方法 ELISA 法检测系统性红斑狼疮 (SLE) 患者及正常对照者血清、尿液中 HMGB1 的表达水平, 免疫组化法检测 SLE 患者及正常对照者肾组织中 HMGB1 及 RAGE 的表达水平。结果 SLE 患者血清及尿液的 HMGB1 水平与正常对照者比较均升高 ($P < 0.01$), 活动期 SLE 患者较稳定期 SLE 患者明显升高 ($P < 0.05$)。狼疮肾损害者血清 HMGB1 水平明显高于狼疮非肾损害者 ($P < 0.05$) 且与 SLE 疾病活动指数 (SLEDAI) 评分、24 h 尿蛋白定量、白细胞计数呈正相关性 ($P < 0.05$), 尿液中 HMGB1 水平与 SLEDAI 评分呈正相关性 ($P < 0.05$)。正常对照者肾组织肾小管上皮细胞可中等强度表达 HMGB1 和 RAGE, 肾小球未见表达; 而在 SLE 患者可见肾小管中表达有所增强, 肾小球中也明显表达, 其肾内的 HMGB1 和 RAGE 的表达水平较正常对照者明显增加 ($P < 0.05$); IV 型、IV + V 型 SLE 患者肾内 HMGB1 的表达量均明显高于 II 型 ($P < 0.05$), IV 型 SLE 患者肾内 RAGE 的表达量高于 II 型 ($P < 0.05$)。结论 HMGB1 和 RAGE 可能参与了 LN 的发病过程, 与疾病的病理变化有关。

关键词 系统性红斑狼疮; 狼疮性肾炎; 高迁移率族蛋白 B1; 晚期糖基化终产物受体

中图分类号 R 593.242

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)04-0533-05

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一种自身免疫性疾病, 其发病机制主要是致病性自身抗体的产生、免疫复合物的沉积、细胞因子的激活, 肾脏是最常见的受累器官之一, 是 SLE 患者的主要死因。高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein box 1, HMGB1) 作为一种促炎细胞因子, 在介导炎症细胞的活化、细胞因子的产生和分泌、免疫细胞的激活与迁移方面起着重要作用^[1]。晚期糖基化终产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 是 HMGB1 的主要受体, 两者结合后通过核转录因子 NF- κ B 的活化介导一系列炎症反应^[2]。关于 HMGB1 和 RAGE 在狼疮性肾

炎 (lupus nephritis, LN) 患者肾内的表达罕见报道。该研究通过检测 HMGB1 和 RAGE 在 LN 患者体内水平, 探讨两者与 LN 的病理及临床关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2013 年 4 月 ~ 2014 年 6 月安徽医科大学第一附属医院肾脏内科、风湿科、皮肤科共 64 例 SLE 住院患者血清 (其中 47 例患者同时留取尿液), 男 6 例, 女 58 例, 年龄 17 ~ 51 (34.19 ± 9.17) 岁。患者均符合 1997 年美国风湿病协会修订的 SLE 诊断标准。采用 2000 年 SLE 疾病活动指数 (SLE disease activity index, SLEDAI-2000) 进行评分。收集 10 例门诊健康体检者 (各生化指标正常, 自身抗体阴性, 无糖尿病、高血压、风湿免疫等疾病) 的血清和尿液作为 SLE 患者血清和尿液的正常对照, 其中男 1 例, 女 9 例, 年龄 19 ~ 40 (31.50 ± 5.80) 岁。64 例患者中有 25 例经肾活检确诊为 LN (II 型 6 例、III 型 4 例、IV 型 10 例、IV + V 型 5 例) 且每例肾组织切片中至少有 8 个肾小球。选取 10 例我院泌尿外科肾肿瘤切除患者远离肿瘤部位至少 2 cm 的肾组织作为 SLE 患者肾组织的正常对照, 经光镜检查肾组织无结构及病理改变。该实验入选对象均知情并签署同意书, 同时符合院伦理委员会要求。

1.2 主要试剂 HMGB1 的 ELISA 试剂盒购自苏州卡尔文生物科技有限公司; 兔抗人 HMGB1 多克隆抗体 (bs-0664R) 购自北京博奥森生物技术有限公司; 兔抗人 RAGE 多克隆抗体 (bs-4999R) 购自北京博奥森生物技术有限公司; 二抗试剂盒 PV-9000 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; DAB 显色剂、PBS 缓冲液、正常山羊血清封闭液、柠檬酸盐缓冲液均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 方法

1.3.1 血清和尿液标本采集及病理分型 SLE 患者及正常对照者清晨空腹常规肘静脉采血 3 ml 置于试管中。SLE 患者尿液一般收集于首次入院后, 正常对照者收集于门诊的随机尿, 均以 2 500 r/min 离心 10 min, 分离血清置于 -80 °C 冰箱保存待检。肾活检组织常规进行 HE、PAS、Masson、PASM 染色、免疫荧光, 按 2003 年 ISN 及 RPS 标准行病理分型。

2014-12-13 接收

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院肾脏内科, 合肥 230022

作者简介: 叶莉莉, 女, 硕士研究生;

徐星铭, 女, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: xxm2425@163.com

1.3.2 研究对象分组 SLE 组:血标本($n=64$)、尿标本($n=47$)、肾组织标本($n=25$) ,正常对照组:血标本($n=10$)、尿标本($n=10$)、肾组织标本($n=10$)。SLE 组患者采用 SLEDAI-2000 进行评分, ≥ 10 分为活动期, <10 分为稳定期,故 SLE 组按疾病活动性分为活动期 SLE 组[血标本($n=47$)、尿标本($n=33$)]和稳定期 SLE 组[血标本($n=17$)、尿标本($n=14$)]。SLE 组以尿常规出现血尿(尿红细胞数 >5 个/HP)、管型尿或蛋白尿(24 h 尿蛋白定量 >0.3 g 或++)为狼疮肾损害,以无血尿、管型尿、蛋白尿(24 h 尿蛋白定量 <0.3 g)为狼疮无肾脏损害,故 SLE 组按尿常规结果分为狼疮肾损害组[血标本($n=37$)、尿标本($n=28$)]和狼疮非肾损害组[血标本($n=27$)、尿标本($n=19$)]。

1.3.3 临床资料收集 收集患者的临床指标,包括血常规、尿常规、肝功能、肾功能、24 h 尿蛋白定量、免疫球蛋白补体、SLEDAI 评分等,询问患者激素及免疫抑制剂的使用情况。

1.3.4 ELISA 法检测血、尿 HMGB1 水平 按试剂盒说明书操作。

1.3.5 免疫组化法检测肾组织中 HMGB1 和 RAGE 石蜡切片脱蜡、水化、微波热抗原修复、山羊血清孵育、加入一抗(HMGB1 1:200, RAGE 1:75)4℃ 冰箱过夜,次日滴加二抗、DAB 显色、苏木精复染、返蓝、脱水、封片。图片使用 Image Pro-Plus 6.0 图像分析软件处理,以高倍镜下平均光密度值代表患者肾内 HMGB1 和 RAGE 表达水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两两比较用 t 检验,多组间比较用方差分析,指标间相关性用 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 血清 HMGB1 水平及与临床指标的相关分析

SLE 患者血清 HMGB1 的平均水平显著高于正常对照组 [(70.22 $\pm$ 11.08) $\mu\text{g/L}$ vs (44.84 $\pm$ 8.31) $\mu\text{g/L}$],差异有统计学意义($P < 0.01$)。活动期 SLE 组显著高于稳定期 SLE 组 [(71.61 $\pm$ 11.01) $\mu\text{g/L}$ vs (65.32 $\pm$ 9.40) $\mu\text{g/L}$],差异有统计学意义($P < 0.05$)。狼疮肾损害组显著高于狼疮非肾损害者 [(73.99 $\pm$ 11.17) $\mu\text{g/L}$ vs (65.04 $\pm$ 8.75) $\mu\text{g/L}$],差异有统计学意义($P < 0.05$)。Pearson 线性相关分析显示 HMGB1 水平与 SLEDAI 评分、24 h 尿蛋白定量、白细胞计数呈正相关性($r = 0.26, 0.55, 0.26$, $P < 0.05$),见图 1。与抗双链 DNA 抗体滴度、抗核抗

体浓度、免疫球蛋白补体、C 反应蛋白、血小板无明显相关性。

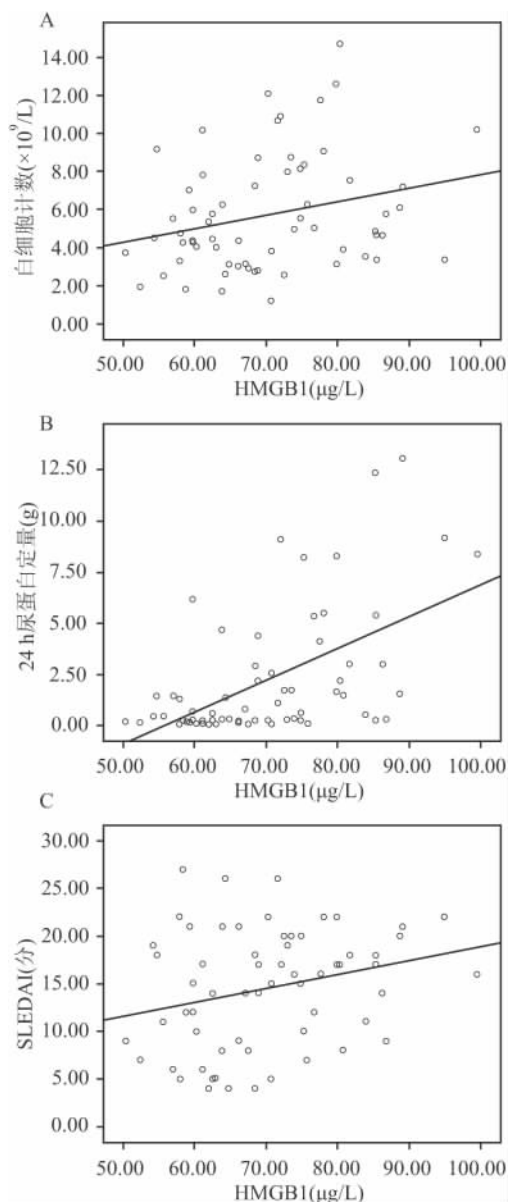


图1 SLE 患者血清 HMGB1 水平与 SLEDAI 评分、24 h 尿蛋白定量、白细胞计数的相关性

A:血清 HMGB1 水平与 SLEDAI 的相关性; B:血清 HMGB1 水平与 24 h 尿蛋白定量的相关性; C:血清 HMGB1 水平与白细胞计数的相关性

2.2 尿液 HMGB1 水平及与临床指标的相关性分析

SLE 患者尿液 HMGB1 的平均水平显著高于正常对照组 [(60.53 $\pm$ 5.80) $\mu\text{g/L}$ vs (24.25 $\pm$ 6.17) $\mu\text{g/L}$],差异有统计学意义($P < 0.01$)。活动期 SLE 组显著高于稳定期组 [(61.65 $\pm$ 5.47) $\mu\text{g/L}$ vs (57.89 $\pm$ 5.90) $\mu\text{g/L}$],差异有统计学意义($P < 0.05$)。狼疮肾损害组较狼疮非肾损害组差异无统计学意义 [(61.17 $\pm$ 5.56) $\mu\text{g/L}$ vs (59.59 $\pm$ 6.18)

$\mu\text{g/L}$]。Pearson 相关分析提示尿液 HMGB1 水平与 SLEDAI 评分呈正相关性 ($r = 0.35$, $P < 0.05$), 与 24 h 尿蛋白定量、白细胞计数、血小板计数、抗双链 DNA 抗体滴度、抗核抗体浓度、免疫球蛋白补体、C 反应蛋白无明显相关性。见图 2。

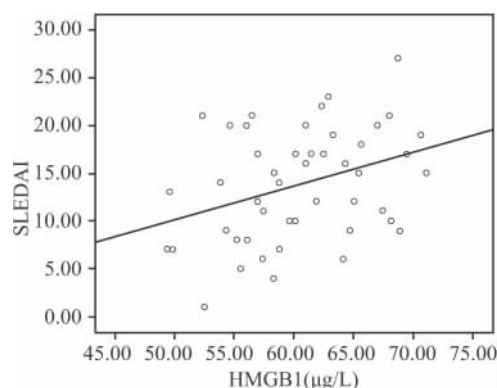


图2 SLE 患者尿液 HMGB1 水平与 SLEDAI 评分的相关性

2.3 HMGB1 在肾组织中的表达 HMGB1 在正常对照者肾组织的肾小管上皮细胞可见中等程度表达, 胞核表达为多, 肾小球未见表达; 而在 SLE 患者肾组织中, 肾小管上皮细胞 HMGB1 的表达明显增强, 肾小球也出现中等强度表达, 主要表达于细胞质及细胞外, 与正常对照者肾组织比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 3、表 1。SLE 组肾组织中 HMGB1 的平均光密度值比较, 其中以 II 型表达最弱, II 型较 IV 型和 IV + V 型相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而 III 型、IV 型、IV + V 型之间差异无统计学意义。

表1 SLE 患者与正常对照者肾组织内 HMGB1、RAGE 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HMGB1 平均 光密度值	RAGE 平均 光密度值
正常对照	10	0.249 6 ± 0.040 7	0.280 1 ± 0.041 6
SLE	25	0.338 1 ± 0.037 7*	0.351 1 ± 0.033 2*
II 型	6	0.301 2 ± 0.036 7*	0.325 4 ± 0.024 7*
III 型	4	0.332 5 ± 0.021 1*	0.360 2 ± 0.038 7*
IV 型	10	0.354 6 ± 0.027 4* #	0.368 8 ± 0.033 1* #
IV + V 型	5	0.353 9 ± 0.041 9* #	0.339 4 ± 0.015 2*

与正常对照者比较: * $P < 0.05$; 与 II 型比较: # $P < 0.05$

2.4 RAGE 在肾组织中的表达 RAGE 在正常对照者肾小管上皮细胞中等强度表达, 肾小球未见表达; 在 SLE 患者肾小管上皮细胞表达增强, 肾小球也较强表达, 主要表达于细胞膜、细胞质及细胞外, 炎性浸润区也可见明显表达。见图 4。与正常肾组织比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。SLE 组肾组织中 RAGE 的平均光密度值比较: II 型表达

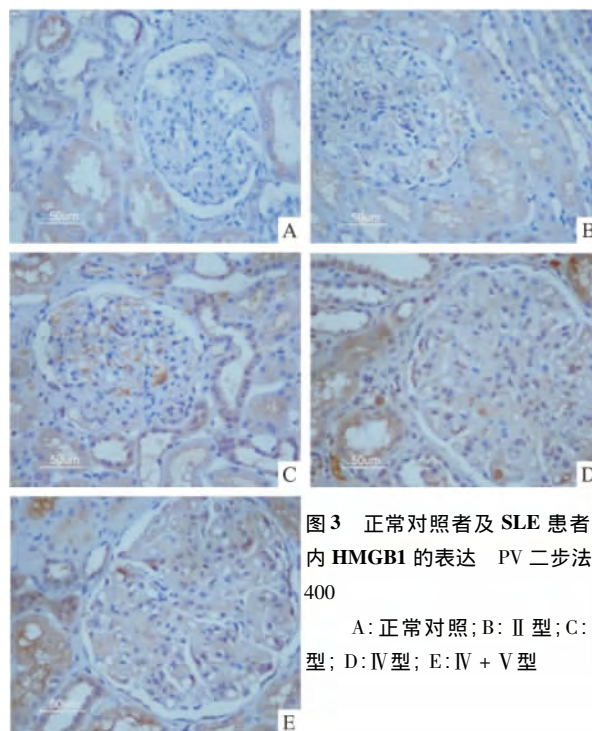


图3 正常对照者及 SLE 患者肾内 HMGB1 的表达 PV 二步法 × 400

A: 正常对照; B: II 型; C: III 型; D: IV 型; E: IV + V 型

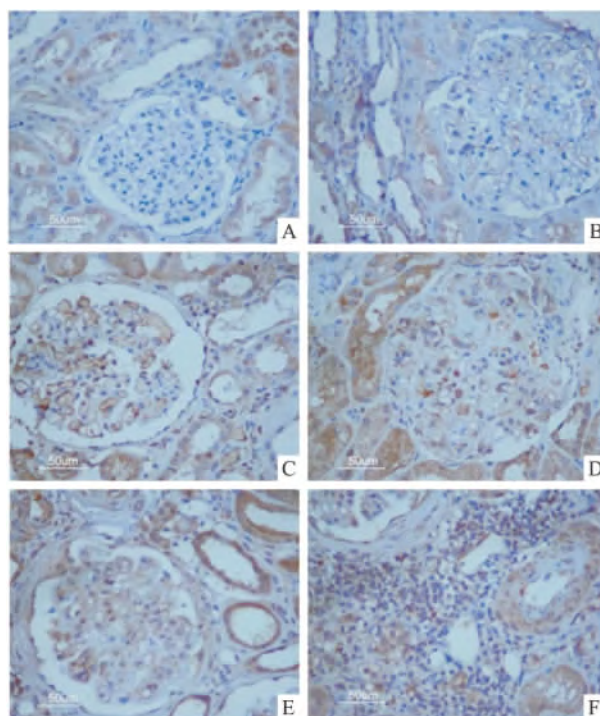


图4 正常对照者及 SLE 患者肾内 RAGE 的表达 PV 二步法 × 400

A: 正常对照者; B: II 型 SLE 患者; C: III 型 SLE 患者; D: IV 型 SLE 患者; E: IV + V 型 SLE 患者; F: 炎性浸润细胞的 SLE 患者

最轻, II 型较 IV 型相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 III 型、IV 型、IV + V 型之间差异无统计学意义。

3 讨论

HMGB1 是一种高度保守的染色质蛋白, 主要存

在于真核细胞内,参与维持染色体结构的稳定,调节基因的转录、修复等^[3]。当单核巨噬细胞、树突状细胞等受到刺激后可主动分泌 HMGB1,组织细胞受损、凋亡、坏死后也可被动释放 HMGB1^[4]。细胞外的 HMGB1 与细胞膜上特异性受体(如 RAGE)结合,刺激炎性细胞的活化聚集,促进细胞因子(如 IL-1、TNF- α 等)的大量释放,同时 HMGB1 做为一个内源性免疫佐剂,对树突状细胞的成熟迁移、辅助性 T 细胞的极化起重要作用^[5-6]。

本研究显示 SLE 患者血清 HMGB1 水平显著高于正常对照者,与研究^[7]结果一致。稳定期 SLE 组单核细胞等相对处于静止状态,而活动期 SLE 组外周血中存在较多的促炎细胞因子,免疫细胞相对活化,更多的 HMGB1 由细胞核分泌至细胞外。SLE 患者 SLEDAI 评分越高,其狼疮活动度就越高,免疫细胞的活化及细胞因子的产生随之升高;活动期 SLE 组血清 HMGB1 水平明显高于稳定期 SLE 组,与 SLEDAI 评分呈正相关性。这与研究^[8]结果一致,提示 HMGB1 参与了 SLE 的发病,与疾病的活动有关。

研究^[9]显示致病性抗双链 DNA 抗体 1A3F 上调肾小球系膜细胞促炎症反应基因诱导狼疮肾损害的主要作用机制与内源性损伤分子 HMGB1 相结合有关,在抗双链 DNA 抗体诱导的肾脏损害中, HMGB1 作为一种促炎症反应的调停者,在 LN 的发病机制中至关重要。本实验显示狼疮肾损害组血清 HMGB1 水平明显高于狼疮非肾损害组,且与 24 h 尿蛋白定量呈正相关性。同时本实验还检测了患者尿液中 HMGB1 的水平,显示 SLE 患者尿液 HMGB1 水平显著高于健康对照者,与研究^[10]结果一致,尤以活动期 SLE 患者为甚,与 SLEDAI 评分呈正相关性,但并未表明其在狼疮肾损害者与狼疮非肾损害者之间的差异,有待进一步探究。研究^[11]显示 HMGB1 不仅在 LN 大鼠的血清中升高,在肾组织中可见显著表达,本研究对不同病理类型 SLE 患者肾组织中的 HMGB1 表达进行免疫组化检测显示在正常对照者肾小管上皮细胞可见中等强度表达,而在 SLE 患者肾小管上皮细胞的表达增强,肾小球也出现较强表达,其中 II 型的表达量较轻,IV 型、IV + V 型的表达量较为严重,提示 HMGB1 可能参与了 LN 的病理发展过程。

研究^[2]显示 HMGB1 与其主要受体 RAGE 相结合激活 NF- κ B 途径,引发一系列炎症反应;在 RAGE 基因敲除鼠中其炎症因子的分泌下降 70%^[12],这

说明 HMGB1 的促炎作用在很大程度上依赖 RAGE。本研究显示正常对照者的肾组织中肾小球未见 RAGE 的表达,肾小管中度表达;而在 SLE 患者中肾小球、肾小管均强表达,且 II 型表达较轻,IV 型最强,在 LN 病变中以 I 型、II 型为轻,IV 型最重, RAGE 在不同病理类型 LN 肾组织的表达程度与 LN 的病理严重程度相当,提示 RAGE 可以作为预测 LN 病变严重程度的指标之一。

参考文献

- [1] Messmer D, Yang H, Telusma G, et al. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization [J]. *J Immunol* 2004, 173(1):307-13.
- [2] Feng L, Zhu M, Zhang M, et al. Amelioration of compound 4'-di-phenylmethane-bis (methyl) carbamate on high mobility group box1-mediated inflammation and oxidant stress responses in human umbilical vein endothelial cells via RAGE/ERK1/2/NF- κ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol* 2013, 15(2):206-16.
- [3] Lang S S, Reddy M C, Vasquez K M. Human HMGB1 directly facilitates interactions between nucleotide excision repair proteins on triplex-directed psoralen interstrand crosslinks [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2009, 8(7):865-72.
- [4] Dumitriu I E, Baruah P, Valentinis B, et al. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products [J]. *J Immunol*, 2005, 174(12):7506-15.
- [5] Dumitriu I E, Baruah P, Bianchi M E, et al. Requirement of HMGB1 and RAGE for the maturation of human plasmacytoid dendritic cells [J]. *Eur J Immunol* 2005, 35(7):2184-90.
- [6] Liu Q Y, Yao Y M, Yao Y H, et al. High mobility group box 1 protein suppresses T cell-mediated immunity via CD11c (low) CD45RB (high) dendritic cell differentiation [J]. *Cytokine*, 2011, 54(2):205-11.
- [7] Ma C Y, Jiao Y L, Zhang J, et al. Elevated plasma level of HMGB1 is associated with disease activity and combined alterations with IFN- α and TNF- α in systemic lupus erythematosus [J]. *Rheumatol Int*, 2012, 32(2):395-402.
- [8] Kanakoudi-Tsakalidou F, Farmaki E, Tzimouli V, et al. Simultaneous changes in serum HMGB1 and IFN- α levels and in LAIR-1 expression on plasmacytoid dendritic cells of patients with juvenile SLE. New therapeutic options? [J]. *Lupus*, 2014, 23(3):305-12.
- [9] Qing X, Pitashny M, Thomas D B, et al. Pathogenic anti-DNA antibodies modulate gene expression in mesangial cells: involvement of HMGB1 in anti-DNA antibody-induced renal injury [J]. *Immunol Lett*, 2008, 121(1):61-73.
- [10] Abdulahad D A, Westra J, Bijzet J, et al. Urine levels of HMGB1 in Systemic Lupus Erythematosus patients with and without renal manifestations [J]. *Arthritis Res Ther* 2012, 14(4):184-94.

219 例多囊卵巢综合征临床分析

罗莉¹, 胡红琳¹, 王长江¹, 邓大同¹, 杜娟², 宣蓉³

摘要 目的 探讨多囊卵巢综合征(PCOS)患者的临床特点和发病机制。方法 收集219例符合2003年鹿特丹诊断标准的PCOS患者,同时选取63例正常者作为对照组

2015-02-02 接收

基金项目:安徽省教育厅自然科学重点项目(编号:KJ2013Z126)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院内分泌科,合肥 230022

²安徽医科大学第四附属医院内分泌科,合肥 230022

³杭州市第三人民医院内分泌科,杭州 310000

作者简介:罗莉,女,博士研究生,主治医师;

胡红琳,女,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail:hhl1994@sina.com;

王长江,男,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:

chjw82@126.com

(N组);将PCOS患者分为两组:体重正常的PCOS患者为LP组,超重或肥胖的PCOS患者为NLP组。采集病史,进行体格检查;测定性激素及血糖、血脂等各项生化指标,进行口服糖耐量试验;最后对数据进行统计学分析。结果 ①219例PCOS患者里存在胰岛素抵抗(IR)患者[胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)≥2.69]144例(66.36%)。②NLP组空腹、餐后胰岛素水平升高,与N组相比差异有统计学意义($P < 0.01$);③LP组促黄体生成素(LH)、睾酮(T)与N组相比增高,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 IR不是PCOS发病的单纯因素,卵巢功能异常亦需关注。

关键词 多囊卵巢综合征;肥胖;胰岛素抵抗

中图分类号 R 711.75

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)04-0537-04

[11] 封晓娟,刘淑霞,张玉军等. NF- κ B 信号途径在小鼠狼疮性肾炎发病中的可能作用[J]. 中国免疫学杂志 2010 26(2):169-77.

[12] Kokkola R, Andersson A, Mullins G, et al. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages[J]. Scand J Immunol 2005 61(1):1-9.

Expression and significance of HMGB1 and RAGE in patients with lupus nephritis

Ye Lili, Xu Xingming

(Dept of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To explore the role of high mobility group box protein 1 (HMGB1) and receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in lupus nephritis (LN). **Methods** The serum and urine levels of HMGB1 were detected by ELISA in SLE patients and normal controls, and intrarenal expressions of HMGB1 and RAGE were detected by immunohistochemistry in renal tissues of SLE patients and normal-appearing renal tissues. **Results**

The serum and urine levels of HMGB1 were significantly higher in SLE patients compared to healthy controls ($P < 0.01$), in patients with active disease compared to those with inactive disease ($P < 0.05$), serum levels of HMGB1 were found to be significantly higher in patients with renal involvement compared to those without renal involvement ($P < 0.05$). In addition, the levels of serum HMGB1 showed positive correlation with SLEDAI, urine protein (24 h) and leucocyte count ($P < 0.05$). The expression of urine HMGB1 showed positive correlation with SLEDAI ($P < 0.05$). Intermediate-intensity staining of HMGB1 and RAGE was detected in renal tubules in normal-appearing renal tissues, however, both renal tubules and glomerular cells had the strong expression of HMGB1 and RAGE in SLE patients. The intrarenal production of HMGB1 and RAGE in SLE patients was obviously higher than that in normal-appearing renal tissues ($P < 0.05$), and the expression levels of HMGB1 in SLE IV and IV + V were higher than those in SLE II ($P < 0.05$). The expression levels of RAGE in SLE IV were higher than those in SLE II ($P < 0.05$). **Conclusion** HMGB1 and RAGE may play key roles in the pathogenesis of LN and may associate with the pathology category of LN.

Key words systemic lupus erythematosus; lupus nephritis; high mobility group box protein 1; advanced glycation endproducts