# 糖尿病肾病患者 podocalyxin 及 TGF-β1 表达的意义

邢玲玲[1]，于连英[1]，傅淑霞[1]，杨　林[1]，李邵梅[1]，刘青娟[2]

（1. 河北医科大学第二医院，石家庄　050000；
2. 河北医科大学基础医学院，石家庄　050017）

**摘要**：目的：探讨糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）患者尿液中足细胞标志蛋白——足萼蛋白（podocalyxin，PCX）的水平与肾组织中转化生长因子-β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）表达的关系。方法：收集 30 例 DN 患者 24 h 尿标本，并以 10 例健康志愿者 24 h 尿标本作为对照，ELISA 方法检测患者尿液中 PCX 的水平。DN 患者的肾组织标本根据肾小球病变分为 3 组，并以 10 例肾脏肿瘤远端肾组织作为对照组。采用免疫组织化学方法检测各组肾小球内 TGF-β1 的表达。结果：DN 患者尿 PCX 的水平明显高于健康对照组［（32.3±3.5）mg/L vs（2.0±0.4）mg/L，$P<0.05$］，并随肾小球病变加重表达增多。肾小球内 TGF-β1 的表达在Ⅲ级病变组显著增多，尤其伴有硬化的区域。尿 PCX 水平与肾小球 TGF-β1 表达量、24 h 尿蛋白排泄量、血肌酐（Scr）呈正相关关系（$r$ 分别为 0.835，0.742，0.599，均有 $P<0.01$）。结论：尿 PCX 水平可作为预测 DN 患者病情的新指标；TGF-β1 与 DN 足细胞损伤有关。

**关键词**：内科学；足萼蛋白；转化生长因子-β1；糖尿病肾病
**中图分类号**：R587.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1674-2850(2012)06-1065-5

# Role of podocalyxin and TGF-β1 in patients with diabetic nephropathy

XING Lingling[1]，YU Lianying[1]，FU Shuxia[1]，YANG Lin[1]，LI Shaomei[1]，LIU Qingjuan[2]

（1. *The Second Hospital of Hebei Medical University*，*Shijiazhuang*　050000，*China*；
2. *Basic College of Hebei Medical University*，*Shijiazhuang*　050017，*China*）

**Abstract**：Objective：To investigate the relation between podocyte marker protein podocalyxin (PCX) and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) in patients with diabetic nephropathy (DN). Methods：Twenty-four hour urinary samples from 30 patients with DN and 10 healthy volunteers as control group were collected to detect the level of PCX by ELASA. All patients with DN were divided into three groups by glomerular lesion and 10 cases of renal tumors distal renal tissue as control group. The expression of TGF-β1 in glomeruli was detected by immunohistochemistry. Results：The levels of PCX were significantly higher in the urine from patients with DN compared with those in the control group［(32.3±3.5) mg/L vs (2.0±0.4) mg/L，$P<0.05$），and gradually increased along with glomerular lesion aggravating. The expression of TGF-β1 in glomeruli was obvious in the third grade glomerular lesion，especially in sclerotic area. There were obviously positive correlation between the level of urine PCX and expression of TGF-β1 in diabetic glomeruli，24h urine protein excretion，serum creatinine（$r=0.835$ $P<0.01$，$r=0.742$ $P<0.01$，$r=0.599$ $P<0.01$，respectively). Conclusion：The level of urine PCX can be used as a novel marker for forecasting the condition of patients with DN and TGF-β1 correlates with the podocyte injury.

**Key words**：medicine；podocalyxin；transforming growth factor-β1；diabetic nephropathy

## 0　引言

蛋白尿是 DN 的重要表现，目前发生机制仍不清楚。近年来，研究认为足细胞损伤是造成蛋白尿

**基金项目**：高等学校博士学科点专项科研基金（200800890001）；河北省卫生厅医学科学研究重点课题（20110081）；河北省教育厅科学研究计划项目（2011168）
**作者简介**：邢玲玲（1978—），女，主治医师，主要研究方向：肾脏疾病. E-mail：xingll99@sina.com

的重要原因。当足细胞损伤脱落后，肾小球内足细胞数量和密度减少，抗肾小球基底膜（glomerular basement membrane，GBM）裸露，滤过屏障受损，导致蛋白尿。PCX 是位于足细胞足突顶膜区的成熟标志蛋白，是 GBM 电荷屏障的主要成分，其正常表达保证了肾小球滤过膜电荷屏障的完整性，研究表明 PCX 在肾组织表达减少或者尿中表达增多均可反映足细胞损伤[1~2]。

TGF-β1 是一种稳定的具有多种功能的多肽生长因子，可介导高糖诱导的系膜细胞增殖和肾小管上皮细胞转分化[3~4]，并在 DN 患者肾小球硬化和肾间质纤维化方面具有重要作用[5]。目前，关于糖尿病中 TGF-β1 与足细胞损伤的关系报道较少。通过检测 DN 患者尿中 PCX 的水平和肾小球内 TGF-β1 的表达，探讨足细胞标志蛋白 PCX 在 DN 患者表达的意义及 TGF-β1 对 PCX 表达的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人足细胞标记蛋白 PCX ELASE 试剂盒购自上海源叶生物科技公司，兔抗 TGF-β1 多克隆抗体和 SABC 免疫组织化学试剂盒均购自北京中杉公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 研究对象及分组

选择 2009 年 3 月至 2011 年 3 月在河北医科大学第二医院肾内科住院、经临床和肾活检病理确诊的 DN 患者 30 例，年龄（51.5±15.7）岁，男：女＝8：7，除乙肝病毒相关性肾炎、狼疮性肾炎、淀粉样变、肿瘤性肾病等继发性肾小球疾病以外，详细收集每位患者肾活检时的临床资料，包括身高、体重、糖化血红蛋白（$HbA_1C$，用%表示含量）、24 h 尿蛋白排泄量、血白蛋白（ALB）、Scr、尿酸（UA）、血胆固醇（TC）、血甘油三酯（TG）等。活检前一日收集 24 h 尿液混匀，取出 10 mL 立即离心 2 000 r/min，10 min，取上清液－80℃保存待测，10 例健康志愿者尿标本作为对照。肾活检组织常规 HE 染色、PAS 染色及 Masson 染色，光镜观察肾小球病变情况，根据 2010 年美国肾脏病理学会糖尿病肾病分级标准[6]将肾小球病变分为 4 级：Ⅰ级单纯肾小球基底膜增厚；Ⅱ级系膜基质增宽，但无系膜节结；Ⅲ级可看到节结性肾小球硬化，球性硬化＜50%；Ⅳ级弥漫肾小球硬化，球性硬化＞50%. 石蜡切片用于 TGF-β1 免疫组织化学检测，10 例肾脏肿瘤远端肾组织作为对照组。

#### 1.2.2 尿中 PCX 水平的测定

应用人足细胞标记蛋白 PCX ELASE 试剂盒检测尿中 PCX 的水平，实验步骤严格按说明书进行。

#### 1.2.3 免疫组织化学法检测肾组织 TGF-β1 的表达

采用 SABC 免疫组织化学法。石蜡切片（4 μm）脱蜡至水，3% $H_2O_2$ 甲醇室温孵育 10 min 灭活内源性过氧化物酶；枸橼酸缓冲液微波修复暴露抗原；羊血清封闭 37℃，30 min；兔抗 TGF-β1 抗体（1：40），4℃过夜（PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照）；二抗 37℃，30 min；三抗 37℃，25 min；3,3′-二氨基联苯胺（DAB）显色；光镜观察肾小球内 TGF-β1 的表达。每张切片随机选取 10 个高倍视野，应用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统分析肾小球内阳性信号的积分光密度值（IOD），取其平均值作为最终结果。

#### 1.2.4 统计学分析

应用 SPSS 13.0 软件分析系统进行统计学处理。计量资料用均数±标准差（$\bar{X}\pm S$）表示，两组间数据比较采用独立样本 $t$ 检验，多组间数据比较采用单因素方差分析，然后两两比较采用 LSD-$t$ 检验，具有相关趋势的变量间采用 Pearson 相关分析，$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 尿中 PCX 的表达

DN 患者尿 PCX 的水平为（32.3±3.5）mg/L，健康对照组 PCX 的水平为（2.0±0.4）mg/L，两组

间相比差异有统计学意义（$t$=27.149，$P$<0.01）。30 例 DN 患者中，Ⅰ级病变 9 例；Ⅱ级病变 10 例；Ⅲ级病变 11 例；Ⅳ级 0 例，不参与统计学处理。3 组病变尿 PCX 的水平分别为（28.7±3.4），（32.5±2.5），（34.9±1.1）mg/L，各组病变间尿 PCX 水平相比较差异均有统计学意义（Ⅰ级病变组 vs Ⅱ级病变组：$P$<0.01；Ⅰ级病变组 vs Ⅲ级病变组：$P$<0.01；Ⅱ级病变组 vs Ⅲ级病变组：$P$<0.05）。

**2.2 肾组织 TGF-β1 的表达**

正常对照组肾小管中可少量表达 TGF-β1，肾小球未见阳性表达（如图 1a 所示）；DN 患者组肾小球和肾小管中均有 TGF-β1 表达，随肾小球病变加重，TGF-β1 在肾小球表达增强，Ⅲ级病变组表达明显，尤其是硬化区域（如图 1b～图 1d 所示）。正常对照组及 3 组病变组肾小球 TGF-β1 表达的 IOD 值分别为 3.9±1.2，11.0±2.1，35.7±6.3，52.8±7.5，各组间 IOD 相比差异均有统计学意义（以上各组两两比较均为 $P$<0.01）。

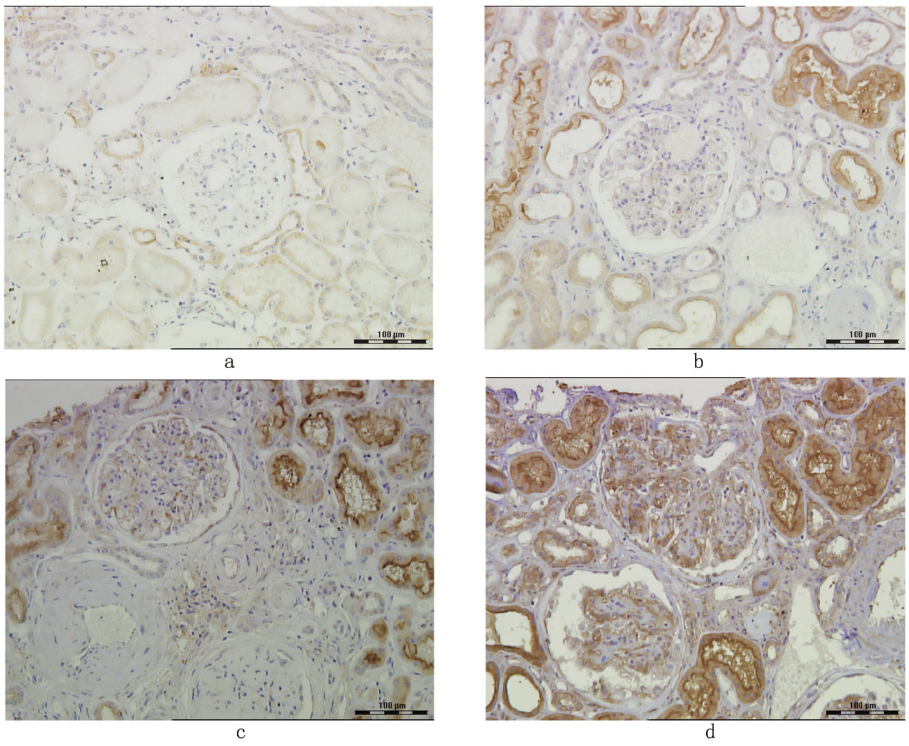



图 1 正常对照组与 DN 组肾组织中 TGF-β1 的表达

Fig. 1 Expression of TGF-β1 in renal cortex of different groups

a—正常对照组；b—DN Ⅰ级病变组；c—DN Ⅱ级病变组；d—DN Ⅲ级病变组

a-Control group; b-DN Ⅰ grade group; c-DN Ⅱ grade group; d-DN Ⅲ grade group

**2.3 尿 PCX 水平与肾组织 TGF-β1 表达及临床指标的关系**

DN 患者尿 PCX 水平与肾小球内 TGF-β1 表达量，24 h 尿蛋白排泄量，Scr，$HbA_1C$ 呈正相关关系，与 ALB 呈负相关关系（均为 $P$<0.01），与 TC，TG，UA 的水平无明显相关关系（均为 $P$>0.05），结果如表 1 所示。

表 1 尿 PCX 水平与各检测指标的相关分析

Tab. 1 Correlation analysis of PCX with other indexes

| 检测指标 | $r$ | $P$ |
|---|---|---|
| TGF-β1 | 0.835 | 0.000 |
| 24 h 尿蛋白 | 0.742 | 0.000 |
| Scr | 0.599 | 0.000 |
| $HbA_1C$ | 0.555 | 0.001 |
| ALB | −0.715 | 0.000 |
| UA | 0.337 | 0.068 |
| TC | 0.092 | 0.629 |
| TG | 0.180 | 0.341 |

## 3 讨论与结论

DN 是导致慢性肾衰竭的重要原因，也是造成糖尿病患者死亡的主要原因之一，其发病机制至今不清。近年来，随着足细胞系的建立和生化技术的发展，足细胞损伤被认为是造成糖尿病肾小球硬化的关键因素，在 DN 的发展中起着重要作用。

PCX 是富含负电荷的足细胞顶端膜蛋白，临床上将 PCX 作为检测各种肾小球疾病患者尿足细胞数量的标志分子[2,7]，其尿中含量代表足细胞损伤的程度。ACHENBACH 等[8]研究发现以 PCX 为标志的尿足细胞数与局灶节段性肾小球硬化的病情密切相关；朱颖等[9]报道足细胞损伤的程度与肾病综合征和紫癜性肾炎的病情活动及缓解有关。实验中发现 DN 患者尿 PCX 水平明显高于健康对照者，提示 DN 患者存在足细胞损伤。随着肾小球病变的加重，尿中 PCX 的水平增加，足细胞损伤的程度加重，且与 24 h 尿蛋白排泄量、Scr 正相关，这些结果不仅表明尿 PCX 水平可作为观察 DN 患者病情及预后的指标，也提示足细胞损伤参与了 DN 蛋白尿的发生和肾功能恶化。DROSSOPOULOU 等[10]报道高糖刺激人肾足细胞可引起 PCX 表达下降，表明高糖可以诱导足细胞损伤。研究显示尿 PCX 水平与糖化血红蛋白（$HbA_1C$）的含量相关，而 $HbA_1C$ 可反映 DN 患者近 3 个月来血糖控制的平均水平，结果提示高糖是造成 DN 患者足细胞损伤的关键因素。

TGF-β1 是一种重要的致纤维化因子，可促进糖尿病肾小球硬化。SCHIFFER 等[11]在 TGF-β1 转基因小鼠模型发现 TGF-β1 可以通过 p38MAPK/caspase-3和 Smad7 信号通路诱导足细胞凋亡；而 CD2AP（CD2-associated protein）作为足细胞内的裂孔膜蛋白，能够通过激活抗凋亡的 PI3K/AKT 信号通路，选择性地抑制 TGF-β1 通过 p38MAPK 诱导的足细胞凋亡[12]。实验证实，随着肾小球病变的加重，TGF-β1 的表达增强，同时肾小球内的 TGF-β1 表达与尿中 PCX 的水平有关，结果提示 TGF-β1 参与 DN 足细胞损伤。

以上研究结果表明：DN 患者尿中足细胞数量增加，并与蛋白尿发生、肾功能进展有关，尿中 PCX 水平可以作为判断 DN 患者病情预后的新指标。TGF-β1 可能通过诱导肾组织内足细胞损伤脱落，使尿足细胞数增加，加重 DN 进展。当然 TGF-β1 对足细胞的损伤是多种信号通路共同作用的结果，TGF-β1 究竟通过何种途径引起 DN 肾组织 PCX 表达下降或者尿中 PCX 表达增多，以及足细胞标志蛋白 PCX 的表达是否反过来可以协调 TGF-β1 对足细胞的损伤仍需进一步证实。

尿 PCX 水平可作为预测 DN 患者病情的新指标。TGF-β1 可能通过促使足细胞损伤从而促进 DN 进展。

### [参考文献] (References)

[1] KAVOURA E, GAKIOPOULOU H, PARASKEVAKOU H, et al. Immunohistochemical evaluation of podocalyxin expression in glomerulopathies associated with nephrotic syndrome[J]. Hum. Pathol., 2011, 42(2): 227-235.

[2] PETERMANN A, FLOEGE J. Podocyte damage resulting in podocyturia: a potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity[J]. Nephron Clin. Pract., 2007, 106(2): 61-66.

[3] DI P S, GESUALDO L, RANIERI E, et al. High glucose concentration induces the overexpression of transforming growth factor-beta through the activation of a platelet-derived growth factor loop in human mesangial cell[J]. Am. J. Pathol., 1996, 149(6): 2095-2106.

[4] KATTLA J J, CAREW R M, HELJIĆ M, et al. Protein kinase B/Akt activity is involved in renal TGF-β1-driven epithelial-mesenchymal transition in vitro and in vivo[J]. Am. J. Physiol. Renal Physiol., 2008, 295 (1): F215-F225.

[5] CHEN S, JIM B, ZIYADEH F N. Diabetic nephropathy and transforming growth factor-beta: transforming our view of glomerulosclerosis and fibrosis build-up[J]. Semin Nephrol., 2003, 23(6): 532-543.

[6] TERVAERT T W, MOOYAART A L, AMANN K, et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy[J]. J.

Am. Soc. Nephrol., 2010, 21(4): 556-563.

[7] SKOBERNE A, KONIECZNY A, SCHIFFER M. Glomerular epithelial cells in the urine: what has to be done to make them worthwhile?[J]. Am. J. Physiol. Renal Physiol., 2009, 296(2): F230-F241.

[8] ACHENBACH J, MENGEL M, TOSSIDOU I, et al. Parietal epithelia cells in the urine as a marker of disease activity in glomerular diseases[J]. Nephrol. Dial. Transplant., 2008, 23(10): 3138-3145.

[9] 朱颖，鹿玲. 尿足细胞标志蛋白检测对肾脏疾病的诊断价值[J]. 实用儿科临床杂志，2009，24 (5)：361-363.
ZHU Y, LU L. Detection of urinary podocyte marker protein and its value on diagnosis of kidney disease[J]. Journal of Applied Clinical Pediatrics, 2009, 24(5): 361-363. (in Chinese)

[10] DROSSOPOULOU G I, TSOTAKOS N E, TSILIBARY E C. Impaired transcription factor interplay in addition to advanced glycation end products suppress podocalyxin expression in high glucose-treated human podocytes[J]. Am. J. Physiol. Renal Physiol., 2009, 297(3): F594-F603.

[11] SCHIFFER M, BITZER M, ROBERTS I S, et al. Apoptosis in podocytesinduced by TGF-beta and Smad7[J]. J. Clin. Invest., 2001, 108(6): 807-816.

[12] SCHIFFER M, MUNDEL P, SHAW A S, et al. A novel role for theadaptor molecule CD2-associated protein in transforminggrowth factor-β-induced apoptosis[J]. J. Biol. Chem., 2004, 279(35): 37004-37012.