

◇ 临床医学研究 ◇

血清、尿液 TWEAK 对狼疮性肾炎活动性的预测及其机制研究

张 培¹, 吴永贵¹, 卢 敏²

摘要 目的 探讨肿瘤坏死因子样凋亡微弱诱导剂 (TWEAK) 在狼疮性肾炎 (LN) 患者血清、尿液及肾脏的表达以及与疾病活动的相关性及其免疫机制。方法 ELISA 法检测 LN 患者及正常对照者血清、尿液中 TWEAK、单核细胞趋化因子 (MCP-1) 水平, 免疫组化法检测 LN 患者以及正常对照者肾脏组织中的 TWEAK 水平, 建立细胞迁移模型, 观察 TWEAK 对巨噬细胞迁移的影响。结果 与正常对照者比较, LN 患者血清以及尿液中的 TWEAK、MCP-1 均升高 ($P < 0.01$)。血清中 TWEAK 与系统性红斑狼疮疾病活动指数 (SLEDAI) 评分呈正相关性 ($r = 0.785, P < 0.01$), 与补体 C3 呈负相关性 ($r = -0.552, P < 0.01$); 尿液中 TWEAK 与 SLEDAI 评分呈正相关性 ($r = 0.853, P < 0.05$), 与补体 C3 呈负相关性 ($r = -0.594, P < 0.01$)。正常对照者肾脏的小管上皮细胞可见 TWEAK 表达, 肾小球很少见表达; 但在 LN 患者可见肾小管中明显增强, 肾小球表达增加, 其肾内的 TWEAK 的表达水平较正常对照者上升 ($P < 0.05$), IV 型尤为显著 ($P < 0.05$)。TWEAK 可以诱导巨噬细胞迁移增加, 可能参与 LN 病理进展。结论 LN 活动期患者血清、尿液、肾组织中 TWEAK 均表达增加, 与临床 SLEDAI 及炎症因子 MCP-1 呈正相关性; TWEAK 可作为预测 LN 活动性的有效无创临床指标, 并可能成为治疗的靶点。

关键词 狼疮性肾炎; TWEAK; MCP-1; 细胞迁移

中图分类号 R 593.24 +

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0991-05

系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是多因素引起的机体免疫失调而产生一系列自身抗体所致的自身免疫性疾病, 肾脏是 SLE 侵袭的主要器官之一, 肾脏受累后引起的肾小球肾炎称为狼疮性肾炎 (lupus nephritis, LN), LN 的病理学改变多样而多变, 发病机制错综复杂。如何有效评价 LN 的活动性, 给予对症治疗对于判断患者生存及预后极其重要。肾穿刺活检病理检查是诊断 LN 及评判疾病活动性的金标准, 但因其存在创伤性及患者

条件限制使其不能广泛应用及反复进行。因此寻找评价 LN 活动性相关的临床指标尤为重要。肿瘤坏死因子样凋亡微弱诱导剂 (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis, TWEAK) 是肿瘤坏死因子配体超家族的新成员, TWEAK 以膜结合蛋白形式合成后迅速分解为小的可溶性片段^[1], 与其受体人成纤维细胞生长因子诱导 14 (Fn14) 相结合, 具有诱导炎症反应、刺激凋亡及激活细胞增生等多种生物学活性。Zhao et al^[2] 对 TWEAK/Fn14 轴在慢性移植植物抗宿主的 SLE 鼠模型研究表明 Fn14 基因敲除鼠的肾脏疾病严重程度显著降低, 表现为肾脏免疫球蛋白 G 沉积, 吞噬细胞浸润以及白介素-1、单核趋化因子-1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)、调节活化正常 T 细胞表达与分泌的趋化因子和干扰素诱导蛋白-10 等细胞因子均明显减少。同样, 用抗 TWEAK 中和抗体处理也显示肾脏白介素-6、白介素-10, MCP-1 和蛋白尿减少。该实验拟观察 TWEAK 在肾组织中的表达, 血清、尿液 TWEAK 水平与疾病活动性的相关性, 并进一步阐明可能的机制。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集 2012 年 3 月~2013 年 3 月于安徽医科大学第一附属医院肾脏内科住院 LN 患者 74 例, 其中男 36 例, 女 38 例; 年龄 14~59 (33.34 ± 11.7) 岁。SLE 患者均符合 2009 年美国风湿病学会修订的 SLE 分类标准。LN 诊断标准: 确诊为 SLE 的患者, 伴有持续性蛋白尿 (24 h 尿蛋白 > 0.5 g) 或管型 (可为红细胞、白细胞、颗粒管型或混合型) 或经肾活检病理证实为 LN。41 例患者接受肾脏组织活检, 病理为 LN (III 型 7 例, IV 型 26 例, V 型 8 例)。正常对照组血清及尿液选择 14 例门诊健康体检者 (无高血压、糖尿病等慢性基础疾病, 且各项生化指标正常、自身抗体检测阴性), 其中男 2 例, 女 12 例; 年龄 18~35 (26.35 ± 5.24) 岁; 病理标本选取本院泌尿外科 10 例肾肿瘤切除患者距离肿瘤部位至少 2 cm 的肾脏组织。本研究符合安徽医科大学第一附属医院伦理委员会要求, 参加研究患者均签署同

2015-04-14 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1208085QH172)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 肾脏内科、² 检验科, 合肥 230022

作者简介: 张 培, 女, 硕士, 副主任医师;

吴永贵, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wuyonggui@medmail.com.cn

意书。

1.2 临床资料及相关指标的收集 ① 研究对象均进行血常规、肝肾功能、抗核抗体、抗-dsDNA 和免疫球蛋白及补体成分 C3、C4、血沉检测。抗核抗体和抗-dsDNA 半定量检测采用间接免疫荧光法,试剂盒购自德国欧蒙公司;自身抗体送安徽医科大学第一附属医院风湿科实验室检测。根据临床表现及实验室检查对患者进行 SLE 疾病活动指数(systemic lupus erythematosus disease activity index, SLEDAI) 评分;② 肾穿刺组织进行免疫荧光、HE、PAS、PASM、Masson 染色,采用光镜、免疫荧光显微镜对肾组织活检标本进行观察,参照 2003 年国际肾脏病协会/肾脏病理协会的病理分型标准对病理进行分型,用 Austin 半定量方法^[3]对疾病活动性指数(activity index, AI) 和慢性指数(chronic index, CI) 进行判定。

1.3 ELISA 法测定血清及尿液中 TWEAK、MCP-1 水平 按照 ELISA 试剂盒说明书步骤进行操作,分别测定血清以及尿液中 TWEAK、MCP-1 水平。

1.4 免疫组化活检测肾组织 TWEAK 水平 石蜡标本经二甲苯脱蜡,下行酒精水化;分别采用微波、高压抗原修复,滴加 0.3% 的 H₂O₂ 溶液,滴加正常动物血清,过夜,滴加一抗 4℃ 过夜,然后滴加生物素化二抗,再滴加链霉亲和素-生物素化过氧化物酶复合物, DAB 显色,苏木精复染,脱水,封片。使用 Image Pro-Plus 16.0 图像分析软件对免疫组化图像进行数据分析处理,以高倍镜下累计光密度平均值代表该患者肾内 TWEAK 表达水平。

1.5 建立巨噬细胞迁移模型

1.5.1 原代血管内皮细胞体外分离及培养 将实验小鼠脱臼处死,75% 乙醇溶液浸泡 10 min,打开胸腔找到主动脉,从两头剪下,去除动脉周围组织,分离出完整主动脉,放在培养皿中剪成小组织块,平铺于培养皿中,约 4 h 后加 4 ml 培养基(低糖 DMEM +10% 胎牛血清),置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中进行培养,隔天换液,约 3~7 d 细胞爬出,待细胞 90% 融合后代传,第 4 代较纯,可用于本实验。

1.5.2 体外分离培养巨噬细胞 选择雄性、6~8 周龄大的 GFP 转基因小鼠,连续 3 d 用 1.5% 的淀粉溶液腹腔注射,于第 5 天取腹腔巨噬细胞。具体步骤如下:① 小鼠颈椎脱臼处死,75% 乙醇溶液浸泡 1 min;② 用剪刀剪开小鼠外层腹膜;③ 注射器注射 6 ml 冷 PBS 溶液于小鼠腹腔并按摩小鼠腹部 1 min;④ 注射器抽取腹腔灌洗液并注入 5 ml EP 管中;⑤ 腹腔灌洗液 1 000 r/min 离心 4 min;⑥ 弃去

上清液并用 3 ml 冷 PBS 溶液重悬,并 1 000 r/min 离心 4 min。反复用 3 ml 冷 PBS 溶液重悬离心 3 次;⑦ 将离心后的上清液弃去,加入 3 ml 的 DMEM 培养基重悬细胞,并种植于 60 cm² 的培养皿中;⑧ 10 min 后,摇晃弃去未贴壁细胞,加入 3 ml 的 DMEM 培养基并用移液器将贴壁细胞吹打重悬,调整细胞浓度至 1 × 10⁶ 个/ml 待用。

1.5.3 巨噬细胞迁移模型 IV 型胶原蛋白铺于带有 8 μm 孔径的插入式培养皿孵育 24 h 后,铺上血管内皮细胞约 4~5 d,待对照孔血管内皮细胞生长至 100% 融合即可。为了观察 TWEAK 对巨噬细胞迁移的影响,本实验分为两组,两组上室均加入含体积分数 10% FBS 的基础培养基/铺 1 μg IV 型胶原蛋白,并加入巨噬细胞悬液于上室,对照组:下室不加 TWEAK;实验组:下室添加 TWEAK 48 h 后,移去插入皿,收集下室细胞。计数下室细胞数,计算出 TWEAK 对单核细胞的迁移率。并用 ELISA 法检测细胞培养上清液中细胞因子 MCP-1 水平。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用 One Way-ANOVA 分析,两组间数据比较采用独立样本 *t* 检验;采用 Pearson 法进行指标相关性分析。

2 结果

2.1 TWEAK、MCP-1 在血清及尿液中的表达

ELISA 法检测显示 LN 患者血清及尿液 TWEAK 水平高于正常对照组 (*P* < 0.05),见表 1。方差分析显示 IV 型、V 型 LN 患者的血清及尿液 TWEAK 水平差异有统计学意义 (*F* = 156.85、68.38, *P* < 0.05)。ELISA 法检测 LN 组血清及尿液 MCP-1 水平高于正常对照组 (*P* < 0.05),见表 1。III 型、IV 型、V 型 LN 患者的血清、尿液 MCP-1 水平差异有统计学意义 (*F* = 122.33、71.75, *P* < 0.05)。血清及尿液中 MCP-1 与 TWEAK 水平呈相关性。

表 1 LN 患者与正常对照者血清及尿液 TWEAK 水平(μg/L, $\bar{x} \pm s$)

项目	LN 患者 (n = 76)	正常对照者 (n = 14)	t 值
血清			
TWEAK	43.70 ± 6.36*	15.22 ± 2.19	19.76
MCP-1	0.17 ± 0.01*	0.07 ± 0.01	18.70
尿液			
TWEAK	47.71 ± 12.54*	17.27 ± 2.22	12.20
MCP-1	0.14 ± 0.02*	0.07 ± 0.01	14.04

2.2 TWEAK 在肾组织中的表达 正常对照者肾

脏组织中 TWEAK 在肾小管上皮细胞可见较强的表达,但在肾小球表达极少;LN 患者肾组织肾小管上皮细胞 TWEAK 表达明显增加,肾小球中亦可见表达,见图 1。LN 组较正常对照组表达增加 ($P < 0.05$) ,方差分析显示 IV 型 LN 患者的累积光密度值较 III 型、V 型 LN 患者差异有统计学意义 ($F = 34.52, P < 0.05$) ,但 III 型、V 型之间差异无统计学意义。见图 1。

2.3 血清及尿液 TWEAK 与临床指标相关性分析
血清 TWEAK 水平与 SLEDAI 评分呈正相关性 ($r = 0.785, P < 0.01$) ,与血 MCP-1 呈正相关性 ($r = 0.367, P < 0.01$) ,与补体 C3 呈负相关性 ($r =$

$-0.552, P < 0.01$) ,与 AI 呈正相关性 ($r = 0.634, P < 0.01$) 。尿液 TWEAK 水平与 SLEDAI 评分呈正相关性 ($r = 0.853, P < 0.01$) ,与补体 C3 呈负相关性 ($r = -0.594, P < 0.01$) ,与肾脏病理 AI 呈正相关性 ($r = 0.564, P < 0.01$) 。血清、尿液 TWEAK 水平与白细胞计数、血小板计数、血清 IgG、IgA、IgM 以及 24 h 尿蛋白等指标均无相关性。见图 2。

2.4 TWEAK 对巨噬细胞迁移的影响 为了确定培养体系中加入 TWEAK 对巨噬细胞的迁移有无影响,使用不加 TWEAK 的培养体系作为对照。然后实验组加入 TWEAK 后和对照组一起放入培养箱中 48 h 后,评估巨噬细胞穿过 PET 膜的百分比(穿膜

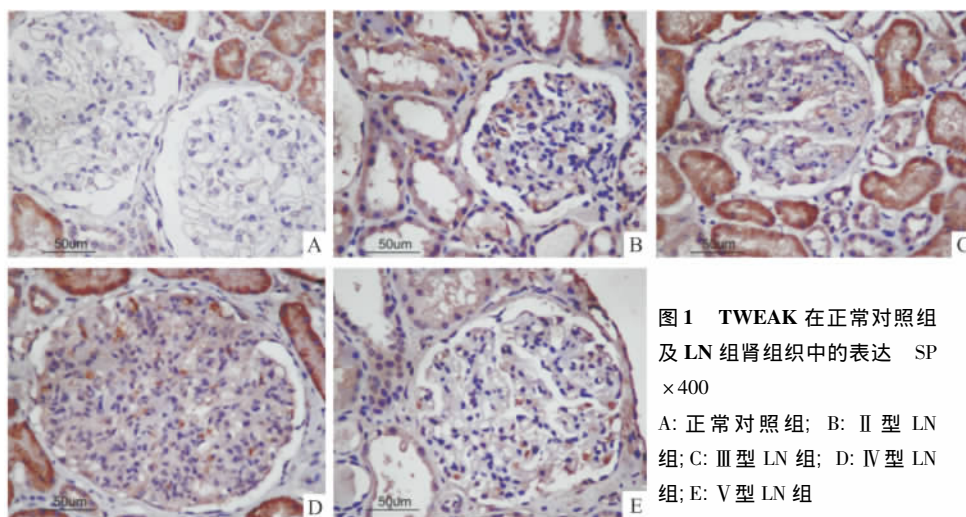


图1 TWEAK 在正常对照组及 LN 组肾组织中的表达 SP $\times 400$
A: 正常对照组; B: II 型 LN 组; C: III 型 LN 组; D: IV 型 LN 组; E: V 型 LN 组

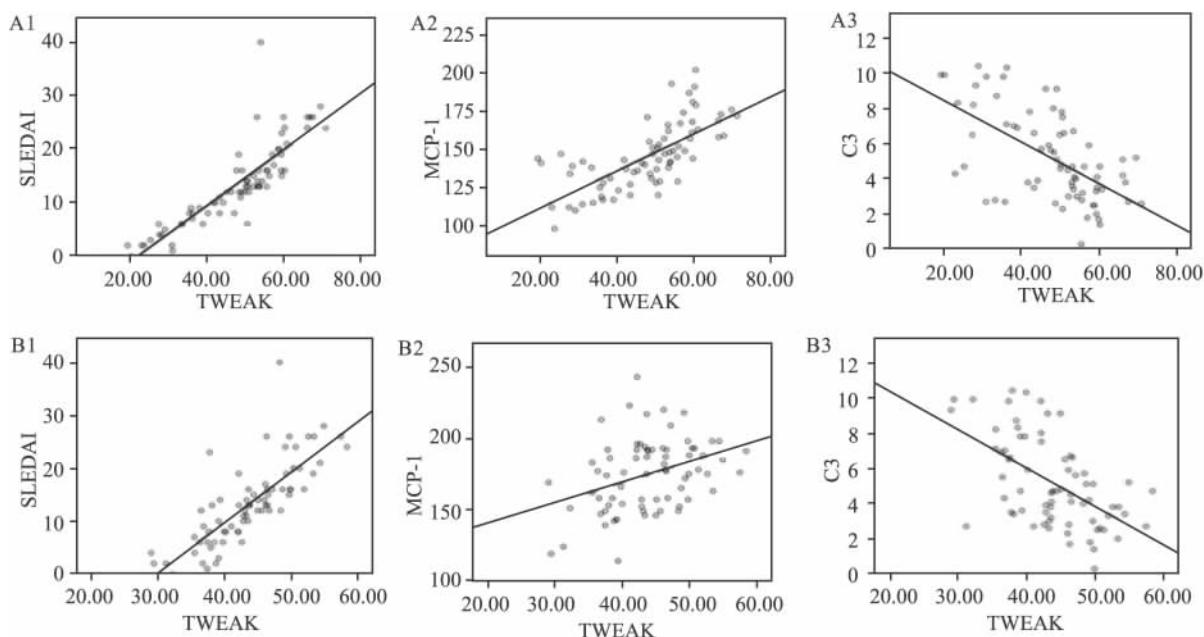


图2 血清、尿液 TWEAK 水平与临床指标的相关性
A: 尿液; B: 血清; 1: SLEDAI; 2: MCP-1; 3: C3

率) ,显示巨噬细胞的穿膜率显著高于对照组。见图3。

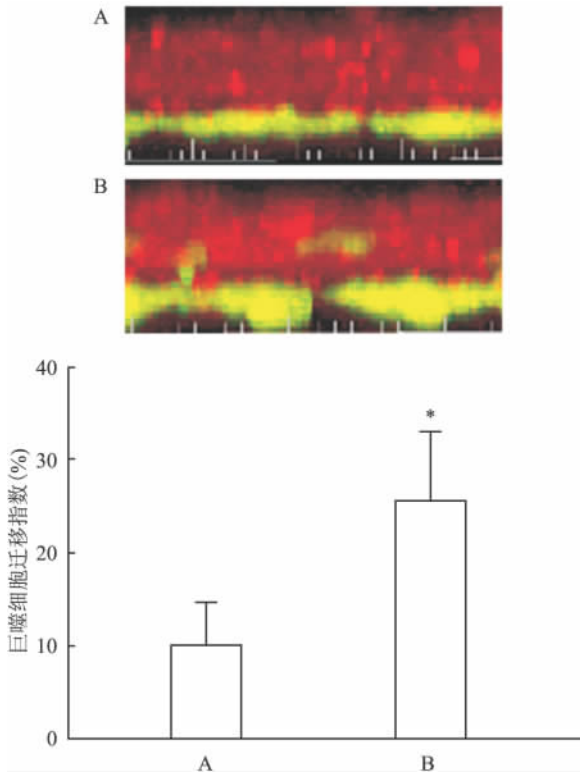


图3 TWEAK对巨噬细胞迁移的影响

A: 对照组; B: 实验组; 与对照组比较: * P < 0.05

3 讨论

目前与LN活动性有关的许多新型生物标志物,均缺乏大规模的纵向队列研究。未来研究方向着重于将SLE的生物标志物与简便可行的临床指标相结合,以提高肾脏病复发及进展预测的敏感性和特异性^[3]。研究^[4]显示,与SLE肾脏未受累患者比较,LN标志物包括TWEAK、MCP-1及骨桥蛋白等均有升高,评估肾损害具有合理的敏感性及特异性,与SLEDAI评分呈正相关性。本实验结果与之相符,是其更好的补充,本研究检测表明LN患者血清中的TWEAK水平较正常对照者明显上升,血液TWEAK水平与SLEDAI呈正相关性,并且血清MCP-1水平明显高于正常对照者,与疾病活动性呈正相关性,且血清TWEAK与MCP-1呈相关性。Liu et al^[5]发现,LN患者外周血单个核细胞中TWEAK水平升高与抗-dsDNA、SLEDAI评分呈高度相关性,提示其与LN活动性高度相关。

TWEAK可促进肾脏炎症细胞浸润,在体内和体外环境中刺激肾细胞增殖。TWEAK通过Fn14

相互作用引起前炎症化学因子及细胞因子释放,系膜细胞给予TWEAK治疗可以引起IKB的磷酸化,此外还可引起细胞增殖存活^[6-8]。如上所述TWEAK在促进炎症反应、肾细胞增殖和凋亡及血管纤维化方面的调节功能,LN患者局部TWEAK表达增多,提示TWEAK可能在LN病理进展中发挥积极作用。本研究证实TWEAK在正常对照者肾小球很少见表达,肾小管可见有分布;但LN患者中肾小球及肾小管TWEAK的表达量较正常对照者均明显增加;尤其是肾小球的表达显著增强,IV型LN患者的表达量较III型、V型尤为升高,IV型LN表现为细胞弥漫增生,伴有新月体形成及毛细血管祥坏死,是LN最为严重的一种病理类型,也是临床治疗的难题。本研究显示TWEAK过表达可以引起肾组织结构损伤,炎症及细胞外基质增加。TWEAK过度表达与F4/80巨噬细胞浸润相关,并且肾小管损伤的标志物及肾损伤分子显著增加,提示TWEAK加重肾小管损伤。因此靶向抑制TWEAK通路可能会改善LN的细胞浸润从而减少尿蛋白,需进一步实验以证实。

LN的发病与肾小球内细胞增殖与凋亡平衡失调有关,即细胞大量增殖的同时,细胞凋亡相对不足,从而使细胞增殖占优势^[9]。这是一种增生型肾小球肾炎自我限制的细胞凋亡介导的调控过程^[10],LN患者机体中肾组织细胞平均增生指数明显增高,同时细胞凋亡率也显著增加,存在细胞凋亡过度,可能导致进行性肾小球硬化及出现肾小球固有细胞丢失、基质及纤维性成分增多的原因。Gao et al^[11]对人肾脏系膜细胞、足细胞和肾小管上皮细胞进行研究,显示TWEAK可诱导肾细胞表达多种炎症介质包括RANTES、MCP-1、干扰素诱导蛋白-10、ICAM-1和血管细胞黏附分子等。这些细胞因子的产生均由活化的核转录因子κB介导,可被抗TWEAK单克隆抗体所抑制;TWEAK与其受体Fn14相互作用是慢性移植抗宿主病狼疮动物模型肾脏病理进展中最关键的步骤^[12]。

TWEAK刺激的趋化因子可诱导人外周血单个核细胞,尤其是单核/吞噬细胞的迁移。综上所述,TWEAK有可能在LN的发生机制以及病理变化中起着重要作用,为指导和判断狼疮活动程度提供帮助。本研究表明TWEAK可诱导巨噬细胞跨膜即迁移率增加,IV型LN表现为弥漫性细胞增生,因此TWEAK在IV型LN患者肾组织中表达最为明显。鉴于肾脏穿刺的创伤和经济压力,联合检测血清、尿

液 TWEAK 水平更为合适,尤其是尿液检查作为一种无创性的方法,为临床上判断疾病复发与活动程度及指导治疗提供依据,此外抑制 TWEAK 可能成为 LN 治疗的新方向。

参考文献

- [1] Chicheportiche Y, Bourdon P R, Xu H, et al. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis[J]. *J Biol Chem* ,1997 272(51) : 32401 - 10.
- [2] Zhao Z, Burkly L C, Campbell S, et al. TWEAK/Fn14 interactions are instrumental in the pathogenesis of nephritis in the chronic graft-versus-host model of systemic lupus erythematosus[J]. *J Immunol* 2007 ,179(11) : 7949 - 58.
- [3] Mok C C. Biomarkers for lupus nephritis: a critical appraisal[J]. *J Biomed Biotechnol* 2010: 638413.
- [4] El-Shehaby A, Darweesh H, El-Khatib M, et al. Correlations of urinary biomarkers TNF-Like weak inducer of apoptosis (TWEAK), osteoprotegerin (OPG), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and IL-8 with lupus nephritis[J]. *J Clin Immunol* , 2011 31(5) : 848 - 56.
- [5] Liu Z C, Zhou Q L, Li X Z, et al. Elevation of human tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis in peripheral blood mononuclear cells is correlated with disease activity and lupus nephritis in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Cytokine* 2011 53(3) : 295 - 300.
- [6] Campbell S, Burkly L C, Gao H X, et al. Proinflammatory effects of TWEAK/Fn14 interactions in glomerular mesangial cells [J]. *J Immunol* 2006 ,176(3) : 1889 - 98.
- [7] Justo P, Sanz A B, Sanchez-Niño M D, et al. Cytokine cooperation in renal tubular cell injury: the role of TWEAK [J]. *Kidney Int* 2006 ,70(10) : 1750 - 8.
- [8] Jakubowski A, Browning B, Lukashev M, et al. Dual role of TWEAK in angiogenic regulation [J]. *J Cell Sci* ,2002 ,115(Pt 2) : 267 - 74.
- [9] Mortensen E S, Fenton K A, Rekvig O P. Lupus nephritis: the central role of nucleosomes revealed [J]. *Am J Pathol* 2008 ,172(2) : 275 - 83.
- [10] Tang S, Lui S L, Lai K N. Pathogenesis of lupus nephritis: an update [J]. *Nephrology(Carlton)* 2005 ,10(2) : 174 - 9.
- [11] Gao H X, Campbell S R, Burkly I X, et al. TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) induces inflammatory and proliferative effects in human kidney cells [J]. *Cytokine* 2009 ,46(1) : 24 - 35.
- [12] Molano A, Lakhani P, Aran A, et al. TWEAK stimulation of kidney resident cells in the pathogenesis of graft versus host induced lupus nephritis [J]. *Immunol Lett* ,2009 ,125(2) : 119 - 28.

Association of serum and urine TWEAK with lupus nephritis activity and its underlying mechanism

Zhang Pei¹, Wu Yonggui¹, Lu Min²

(¹Dept of Nephrology, ²Dept of Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To discuss the expression of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) in serum, urine and renal tissue in lupus nephritis (LN). **Methods** The serum and urine levels of TWEAK were assessed by ELISA in LN patients and normal controls. Immunohistochemistry was used to detect the expressions of TWEAK in the kidney of patients and healthy controls. **Results** The serum and urine concentrations of TWEAK and MCP-1 were significantly higher in LN patients than those in healthy controls ($P < 0.01$). In addition, the level of serum TWEAK showed positive correlation with SLEDAI and negative correlation with serum C3 level ($P < 0.01$), the expression of urine TWEAK showed positive correlation with SLEDAI ($P < 0.05$). In healthy renal tissues TWEAK was distributed mainly in renal tubules and rarely seen in glomerular while the expressions of TWEAK increased in renal tubular and glomeruli stainings were found in LN patients. TWEAK could induce increased macrophage migration, may be involved in the pathological progression of lupus nephritis. **Conclusion** TWEAK may play key roles in the pathogenesis of LN. Meanwhile, TWEAK in serum and urine may be useful as markers of disease activity. The change of TWEAK maybe associated with the pathology category of LN.

Key words lupus nephritis; TWEAK; MCP-1; cell immigration