

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.23.010

· 临床研究 ·

IgA 肾病患者扁桃体中树突状细胞和高内皮小静脉关系的研究*

余海静¹ 汪琳² 张丹² 王志斌² 刘阳^{2Δ}

(1 华中科技大学同济医学院附属同济医院感染科 湖北 武汉 430030;

2 华中科技大学同济医学院附属同济医院耳鼻喉科 - 头颈外科 湖北 武汉 430030)

摘要 目的:探讨 IgA 肾病(IgA nephropathy, IgAN)患者扁桃体树突状细胞(dendritic cells, DCs)与高内皮小静脉(High endothelial venules, HEVs)的关系。**方法:**我们检测了 25 例 IgAN 患者的扁桃体,并以复发性扁桃体炎(Recurrent tonsillitis, RT)患者的扁桃体 22 例作为对照。用免疫组化方法检测 DCs 标志物 CD208,用实时聚合酶链反应检测淋巴毒素 β(Lymphotoxin β, LT-β) mRNA 水平,用 Hematoxylin-eosin 染色确定 HEVs。**结果:** IgAN 患者扁桃体 CD208+DCs 明显高于对照组($P<0.001$)。IgAN 患者扁桃体 HEVs 明显高于对照组 ($P<0.001$)。此外, IgAN 患者扁桃体 LT-mRNA 水平明显高于对照组 ($P<0.001$)。IgAN 扁桃体中 CD208+DC 与 HEVs 明显成正相关($r=0.7427, P<0.001$)。**结论:**扁桃体 CD208+DCs 可能通过 HEVs 导致 IgAN 患者扁桃体免疫的异常而促进肾脏疾病的发展。

关键词:树突状细胞;IgA 肾病;扁桃体切除术

中图分类号:R-33;R692;R766.18 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)23-4450-04

The Relationship between Dendritic Cells and High Endothelial Venules in Tonsils of Patients with IgA Nephropathy*

YU Hai-jing¹, WANG Lin², ZHANG Dan², WANG Zhi-bin², LIU Yang^{2Δ}

(1 Department of Infectious disease, Tongji hospital, Tongji medical college, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430030, China; 2 Department of Otolaryngology-Head & Neck Surgery, Tongji hospital, Tongji medical college, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei, 430030, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship between tonsil dendritic cells(DCs) and high endothelial venules (HEVs) in tonsils of patients with IgA nephropathy (IgAN). **Methods:** The tonsils of 25 patients with IgAN and 22 patients with recurrent tonsillitis (RT) were examined and compared. The DC marker CD208 was analyzed by immunohistochemistry. The level of lymphotoxin β (LT-β) mRNA was detected by real-time polymerase chain reaction. Hematoxylin-eosin staining was used to identify HEVs. **Results:** CD208 + DCs of tonsils in IgAN patients was significantly higher than that in the control group ($P<0.001$). The HEVs of tonsils in IgAN patients were significantly higher than those in the control group ($P<0.001$). In addition, the level of LT-β mRNA in patients with IgAN was significantly higher than that in the control group ($P<0.001$). CD208 + DC was positively correlated with HEVs in tonsils of IgAN patients ($r=0.7427, P<0.001$). **Conclusions:** CD208 + DCS in tonsil may play a role in the pathogenesis of IgAN through HEVs. The results of this study support the therapeutic significance of tonsillectomy in patients with IgAN.

Key words: Dendritic cells; IgA nephropathy; Tonsillectomy

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R692; R766.18 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2021)23-4450-04

前言

IgA 肾病(IgA nephropathy, IgAN)是肾小球系膜区以 IgA 沉积为主,以血尿为主要临床表现的原发性肾小球肾炎。IgAN 临床表现多样化,预后相差甚远,发病机制至今仍有许多不明之处,而扁桃体炎被认为引起 IgAN 的因素之一, IgA 肾病发作前常有扁桃体炎等病史,在扁桃体感染后常出现肉眼血尿或尿

检加重,因此 IgAN 与扁桃体的关系一直备受人们的关注^[1-5]。扁桃体切除术对 IgAN 的疗效已被广泛认识,但扁桃体免疫导致肾小球肾炎的机制尚不清楚^[6-9]。树突状细胞(Dendritic cells, DCs)是最有效的抗原提呈细胞,其参与 IgAN 的发病机制已被一些报道所证实。在 IgAN 动物模型中观察到 DCs 粘膜激活后肾损伤恶化^[10],据报道 IgAN 患者 DCs 上 B 细胞激活因子的表达明显高于对照组^[11]。这些报道表明 DCs 促进 IgAN 的发展。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81770982;81300812)

作者简介:余海静(1979-),女,博士后,主治医师,主要研究方向:肝脏免疫,E-mail:yhjmarry@hotmail.com

Δ 通讯作者:刘阳(1979-),男,硕士生导师,副教授,主要研究方向:局部粘膜免疫,E-mail:noah_05@sina.com,电话:027-83663809

(收稿日期:2021-01-16 接受日期:2021-02-14)

高内皮微静脉(High endothelial venules, HEVs)是一种扁桃体及其它淋巴器官专于淋巴细胞募集的血管^[12-14]。最近发现产生淋巴毒素 β (Lymphotoxin β , LT- β)的树突状细胞与肿瘤相关的 HEVs 之间相互作用^[15]。研究发现 LT- β 在以 HEVs 高密度为特征的乳腺癌中特异性高表达,DCs 是乳腺癌微环境中 LT- β 的主要产生者。此外,肿瘤相关的 HEVs 周围常有成熟的树突状细胞簇,DC-LAMP+DC 的丰度与肿瘤相关的 HEVs 的密度密切相关^[15]。DCs 与 HEV 共培养实验表明 DCs 对 HEV 内皮细胞的作用是直接的,需要 LT β 受体依赖性信号^[15]。本研究旨在探讨 IgAN 患者扁桃体中 DCs 和 HEVs 的关系,结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 临床资料

IgAN 组:2004 年 7 月至 2017 年 6 月在华中科技大学同济医学院附属同济医院耳鼻喉科-头颈科行扁桃体切除术,男 15 例、女 10 例,年龄 19-76 岁(平均 45 ± 5.5 岁),病程 2.5 个月~4.5 年。诊断标准:根据肾脏活检结果,典型病理学检查可见以 IgA 为主的免疫复合物沉积在肾小球系膜区。组织学诊断基于光镜和免疫荧光结果。排除标准是诊断继发性 IgAN 疾病(如 IgA 血管炎、狼疮性肾炎)和类固醇或免疫抑制治疗。患者有蛋白尿和血尿,尿蛋白为 1.30 ± 0.60 g/d,血尿为 45.5 ± 30.8 / 高倍视野。血清肌酐为 98.5 ± 22.9 μ mol/L。无急性扁桃体炎病史。

RT 组:复发性扁桃体炎(Recurrent tonsillitis, RT),诊断标准:扁桃体急性炎症反复发作,每年发作 4 次以上。男 14 例、女 8 例,年龄 15~64 岁,平均 22 ± 11 岁。患者肾功能正常,无血尿或蛋白尿史,无急性扁桃体炎发作史。病程 2.5~15 年。

1.2 Hematoxylin-eosin 染色

(1)扁桃体组织切片脱蜡,脱蜡二甲苯 I、II 各 10 分钟。(2)覆水,100%(I、II)、90%、80%、70%酒精各 5 分钟,自来水冲洗 5 分钟 $\times 3$ 。(3)苏木精染色 5 分钟,根据染色情况,可以适当增加或减少染色时间,流水冲洗。(4)5%乙酸分化 1 分钟。(5)伊红染色 1 分钟,流水冲洗。(6)脱水:70%、80%、90%、100%酒精各 10 秒,二甲苯 1 分钟,封片。

1.3 免疫组织化学

扁桃体组织切片脱蜡,抗原修复,正常小牛血清封闭 30 分钟。然后用兔抗 CD208 多克隆抗体(1:200;武汉博士德生物工程有限公司)固定,在 37℃ 下孵育 4 小时。加入小鼠抗兔多克隆抗体(1:300 稀释液,武汉博士德生物工程有限公司),37℃ 孵育 1 小时。用正常血清代替原抗体进行阴性对照。计数,稍加修改^[12]。阳性判断标准:细胞胞浆或胞核有棕黄色物质表达。fgl2 阳性细胞的表达结果为细胞 / 高倍视野(Cell/HP)^[12-14]。

1.4 实时定量 PCR

用实时定量 PCR 检测扁桃体组织 LT- β mRNA 表达水平,具体参照以往文献方法进行^[8]。引物序列如下:LT- β 上游引物,5'-GAG GAC TGG TAA CGG AGA CG -3';下游引物 5'-GGG CTG AGA TCT GTT TCT GG- 3'; β -actin 上游引物,5'-AAG ATG ACC CAG ATG TTT GAGACC-3';下游引物,5'-AGC CAG GTC CAGACG CAG GAT-3'。

1.5 统计学分析

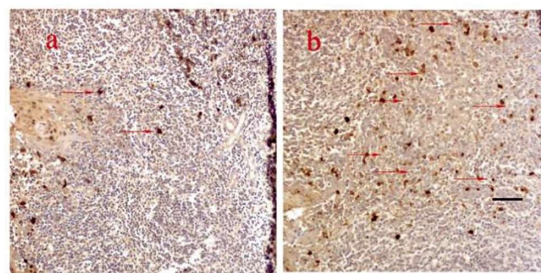
数据表示为平均值 $\pm$ 标准差。采用 Mann-Whitney U 方法检验。用 Pearson 或 Spearman 相关系数分析两个变量之间的关系。当 $P < 0.05$ 时,具有统计学差异。

2 结果

2.1 扁桃体中 CD208 的免疫组化染色

免疫组化染色显示,扁桃体组织中 CD208 阳性反应为棕黄色颗粒,阳性反应细胞主要位于扁桃体滤泡间区。IgAN 患者扁桃体 CD208+DCs 数量(60 ± 2 个 / 高倍镜)明显高于 RT 对照组(20 ± 1 个 / 高倍镜)(** $P < 0.001$)。

A



B

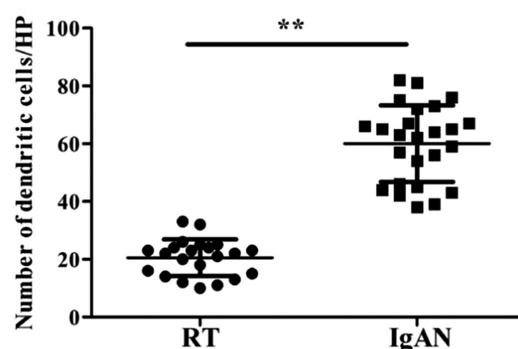


图1 复发性扁桃体炎患者和 IgA 肾病患者扁桃体组织中 CD208+DCs 比较($\times 200$)

注:A,复发性扁桃体炎患者和 IgA 肾病患者扁桃体组织中 CD208+DCs 的免疫组化染色 B,复发性扁桃体炎患者和 IgA 肾病患者扁桃体组织中 CD208+DCs 数目比较;a,复发性扁桃体炎患者;b,IgA 肾病患者;红色箭头所示阳性细胞。

Fig.1 Comparison of CD208+DCs between RT and IgAN groups ($\times 200$)

Note: A. immunohistochemical staining of CD208 + DCs in tonsillitis and IgA nephropathy patients, B, the number of CD208 + DCS in tonsillitis and IgA nephropathy patients; a. Patients with recurrent tonsillitis; b. IgA nephropathy patients; The red arrows showed the positive cells. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$, RT: n=22, IgAN: n=25, ** $P < 0.001$. a: RT; b: IgAN

2.2 扁桃体中 HEVs 的 HE 染色

HE 染色显示,HEVs 主要位于扁桃体滤泡间区,HEVs 内皮细胞成柱状。HEVs 内可见少许淋巴细胞。IgAN 患者扁桃体 HEVs 数(67 ± 3 个 / 高倍镜)量明显高于 RT 对照组(40 ± 2 个 / 高倍镜)(** $P < 0.001$)。

2.3 LT β 基因在 IgAN 患者扁桃体中的表达

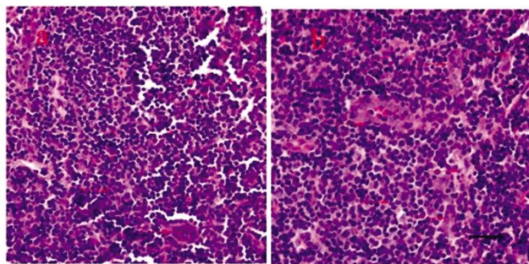
IgAN 患者扁桃体 LT β mRNA 水平明显高于 RT 对照组($P < 0.001$), (图 3)。

2.4 IgAN 扁桃体中 CD208+DC 与 HEVs 关系

鉴于以上研究结果, IgAN 扁桃体中 CD208+DC 显著增

加,而 IgAN 扁桃体中 HEVs 也显著增加。将 CD208+DC 数量与 HEVs 数量进行相关分析。结果表明 CD208+DC 与 HEVs 呈显著正相关($r=0.7872, P<0.001$)(图 4)。

A



B

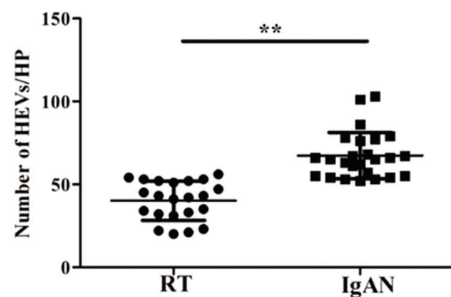


图 2 复发性扁桃体炎患者和 IgA 肾病患者扁桃体组织中 HEVs 比较($\times 400$)

注:A.复发性扁桃体炎患者和 IgA 肾病患者扁桃体组织中 HEVs 的 HE 染色 B.复发性扁桃体炎患者和 IgA 肾病患者扁桃体组织中 HEVs 数目比较 ;a,复发性扁桃体炎患者;b,IgA 肾病患者;红色箭头所示 HEVs

Fig.2 Comparison of high endothelial venules between RT and IgAN groups ($\times 400$)

Note: A. HE staining of HEVs in tonsillitis and IgA nephropathy patients, B, the number of HEVs in tonsillitis and IgA nephropathy patients;

a. Patients with recurrent tonsillitis; b. IgA nephropathy patients; The red arrows showed the positive cells. Data are expressed as $\bar{x} \pm s$, RT: $n=22$, IgAN: $n=25$, $**P<0.05$. a: RT ; b: IgAN

3 讨论

在体内,幼稚的淋巴细胞不断地从血液中循环,通过淋巴结,进入淋巴管,再回到血液中,此过程称为淋巴细胞循环,为机体提供了对外来入侵者和机体自身细胞变化的有效免疫监视。然而,在稳态过程中调节淋巴细胞循环的机制仍然不完全清楚。DC 在 T 淋巴细胞抗原递呈中的作用是众所周知的,它通过调节 HEVs 的表型来控制幼稚淋巴细胞进入淋巴组织,我们首次发现 CD208+DCs 在 IgAN 发病中可能起重要作用。

CD208 又称为 DC-LAMP,是 LAMP 家族的一员,被称为 DC 的特定标记^[16,17]。CD208+DCs 通常位于淋巴组织的细胞间区。在人树突状细胞中,CD208 在 MHC II 类分子转移到细胞表面之前的细胞内主要组织相容性复合体(MHC)II 类室中表达^[16],提示 CD208 参与了外源抗原的早期处理。除了与 MHC II 类分子密切相关外,CD208+DCs 还强烈表达 CD80、CD83 和 CD40 等共刺激分子,这些共刺激分子与 T 细胞的粘附和活

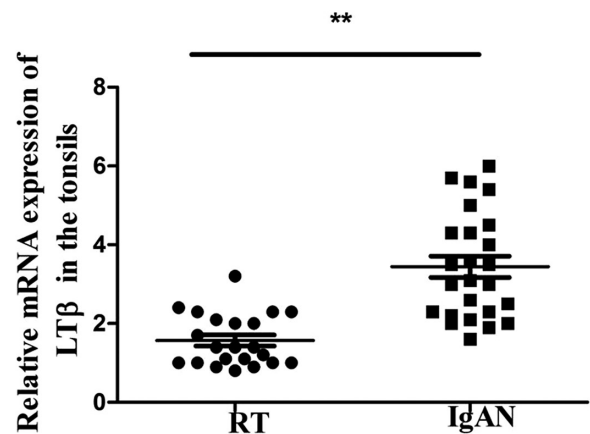


图 3 复发性扁桃体炎患者(RT)和 IgA 肾病患者(IgAN)扁桃体组织中 LTβ mRNA 比较

Fig.3 Comparison of LTβ mRNA between RT and IgAN groups

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm s$, RT: $n=22$, IgAN: $n=25$, $**P<0.001$.

$r=0.7427, P<0.001$

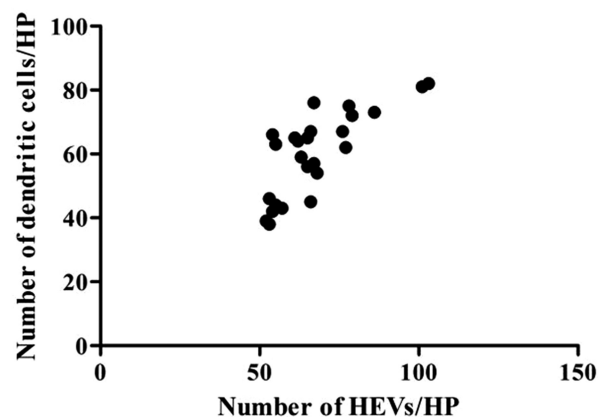


图 4 IgA 肾病患者树突状细胞和高内皮小静脉之间的相关性

Fig.4 Correlation between the number of dendritic cells and HEVs in IgAN group

Note: Data are expressed as $\bar{x} \pm s$, RT: $n=22$, IgAN: $n=25$.

化有关^[18,19]。此外,CD208 的表达与其他成熟标记的表达相关,如 CD86^[19]。因此 CD208+DCs 具有较强的激活 T 细胞的能力。我们发现 IgAN 患者扁桃体 CD208+DCs 的数量增加,同时有研究表明周围的 T 细胞在滤泡间区被激活,这表明 IgAN 患者扁桃体中 T 细胞的激活是加速的。

以往研究表明,在 IgAN 中,IgA 在系膜沉积中的主要亚群是 IgA1,肾小球和血清 IgA1 的铰链区的 O-聚糖链高度糖基化^[20-27],扁桃体淋巴细胞产生的 IgA1 分子也高度糖基化^[29-31]。在本研究中,CD208+DCs 出现在增大的滤泡间区。我们推测,在 IgAN 的形成过程中,CD208+DCs 可能激活免疫系统,导致扁桃体 IgA1 的异常产生。

HEVs 是一种专于淋巴细胞募集的血管^[12-14]。越来越多的证据表明,HEVs 是肿瘤病变内淋巴细胞浸润的主要通道^[15]。我们研究表明 IgAN 患者扁桃体 HEVs 明显高于对照组,提示 HEVs 参与 IgAN 患者发病。同时我们发现 CD208+DCs 与 HEVs 呈显著正相关。提示 CD208+DCs 可能促进 HEVs 的产生。研究发现 DC-LAMP+DC 的丰度与肿瘤相关的 HEVs 的密

度密切相关^[15]。共培养实验表明 DCs 对 HEV 内皮细胞的作用是需要淋巴毒素- β 受体依赖性信号^[15]。我们研究表明 IgAN 患者扁桃体中 LT- β 是增高的,提示 CD208+DC 可能通过分泌 LT β 促进 HEVs 的产生。当然,CD208+DC 可能通过分泌其它的细胞因子促进 HEVs 的增殖需要进一步治疗。

综上所述,IgAN 患者扁桃体 CD208+DCs 明显增多,LT-mRNA 表达水平升高,HEVs 增多,我们推测 CD208+DCs 增加通过加强分泌 LT β 促进 HEVs 的产生,从而导致肾脏病变恶化。因此,目前的结果可能支持 IgAN 患者扁桃体切除术的治疗意义。需要进一步研究扁桃体 CD208+DCs 对 IgAN 患者肾脏的影响。

参考文献(References)

- [1] Feriozzi S, Polci R. The role of tonsillectomy in IgA nephropathy[J]. J Nephrol, 2016, 29(1): 13-19
- [2] Kaneko T, Mii A, Fukui M, et al. IgA nephropathy and psoriatic arthritis that improved with steroid pulse therapy and mizoribine in combination with treatment for chronic tonsillitis and epipharyngitis [J]. Intern Med, 2015, 54(9): 1085-1090
- [3] Miyamoto T, Nishino T, Nakata T, et al. Impact of tonsillectomy combined with steroid pulse therapy on immunoglobulin A nephropathy depending on histological classification: a multicenter study[J]. Clin Exp Nephrol, 2016, 20(1): 50-57
- [4] Yang D, He L, Peng X, et al. The efficacy of tonsillectomy on clinical remission and relapse in patients with IgA nephropathy: a randomized controlled trial[J]. Ren Fail, 2016, 38(2): 242-248
- [5] Duan J, Liu D, Duan G, et al. Long-term efficacy of tonsillectomy as a treatment in patients with IgA nephropathy: a meta-analysis [J]. Int Urol Nephrol, 2017, 49(1): 103-112
- [6] Harabuchi Y. Clinical manifestations and pathogenesis of tonsillar focal diseases: IgA nephropathy and palmoplantar pustulosis [J]. Adv Otorhinolaryngol, 2011, 72: 1-5
- [7] Nakagawa N, Kabara M, Matsuki M, et al. Retrospective comparison of the efficacy of tonsillectomy with and without steroid-pulse therapy in IgA nephropathy patients[J]. Intern Med, 2012, 51(11): 1323-1328
- [8] Yuzawa Y, Yamamoto R, Takahashi K, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for IgA nephropathy [J]. Clin Exp Nephrol, 2016, 20(4): 511-535
- [9] Kanamoto Y, Shibata R, Ozono Y, et al. Effect of tonsillectomy on peripheral blood T cell surface markers and cytokine production in patients with IgA nephropathy accompanied by chronic tonsillitis [J]. Nihon Jinzo Gakkai Shi, 1994, 36(11): 1296-1302
- [10] Kajiyama T, Suzuki Y, Kihara M, et al. Different pathological roles of toll-like receptor 9 on mucosal B cells and dendritic cells in murine IgA nephropathy[J]. Clin Dev Immunol, 2011, 2011: 819646
- [11] Goto T, Bandoh N, Yoshizaki T, et al. Increase in B-cell-activation factor (BAFF) and IFN- γ productions by tonsillar mononuclear cells stimulated with deoxycytidyl-deoxyguanosine oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) in patients with IgA nephropathy [J]. Clin Immunol, 2008, 126(3): 260-269
- [12] 王志斌, 刘阳, 刘胜洪. IgA 肾病扁桃体 HEV 的 CD3⁺、CD20⁺ 细胞及 FasL、ICAM-1 表达 [J]. 中国免疫学杂志, 2008, 24(11): 943-947
- [13] 孙海英, 王志斌, 刘胜洪, 等. IgA 肾病扁桃体归巢受体 L- 选择素, VLA-4 α , LFA-1 和血管地址素 ICAM-1, VCAM-1 表达及意义 [J]. 中国免疫学杂志, 2011, 27(11): 832-836
- [14] 刘阳, 王志斌, 余海静, 等. Fas 配体和细胞黏附分子 1 在肥大扁桃体组织高内皮小静脉中的表达及意义 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2007, 21(15): 700-702
- [15] Martinet L, Girard JP. Regulation of tumor-associated high-endothelial venules by dendritic cells A new opportunity to promote lymphocyte infiltration into breast cancer[J]. Oncoimmunology, 2013, 2(11): e26470
- [16] de Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, et al. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment[J]. Immunity, 1998, 9(3): 325-336
- [17] Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2006, 311: 17-58
- [18] Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, et al. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily[J]. J Immunol, 1992, 149(2): 735-742
- [19] Björck P, Flores-Romo L, Liu YJ. Human interdigitating dendritic cells directly stimulate CD40-activated naive B cells [J]. Eur J Immunol, 1997, 27(5): 1266-1274
- [20] Hiki Y, Odani H, Takahashi M, et al. Mass spectrometry proves under-O-glycosylation of glomerular IgA1 in IgA nephropathy [J]. Kidney Int, 2001, 59(3): 1077-1085
- [21] Odani H, Hiki Y, Takahashi M, et al. Direct evidence for decreased sialylation and galactosylation of human serum IgA1 Fc O-glycosylated hinge peptides in IgA nephropathy by mass spectrometry[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 271(1): 268-274
- [22] Lechner SM, Abbad L, Boedec E, et al. IgA1 Protease Treatment Reverses Mesangial Deposits and Hematuria in a Model of IgA Nephropathy[J]. Am Soc Nephrol, 2016, 27(9): 2622-269
- [23] Suzuki H, Yasutake J, Makita Y, et al. IgA nephropathy and IgA vasculitis with nephritis have a shared feature involving galactose-deficient IgA1-oriented pathogenesis[J]. Kidney Int, 2018, 93(3): 700-705
- [24] Wada Y, Matsumoto K, Suzuki T, et al. Clinical significance of serum and mesangial galactose-deficient IgA1 in patients with IgA nephropathy[J]. PLoS One, 2018, 13(11): e0206865
- [25] Nakazawa S, Imamura R, Kawamura M, et al. Evaluation of IgA1 O-glycosylation in Henoch-Schönlein Purpura Nephritis Using Mass Spectrometry[J]. Transplant Proc, 2019, 51(5): 1481-1487
- [26] Li G, Wang X, Yang Z, et al. Serum Levels of Joining Chain-Containing IgA1 Are Not Elevated in Patients with IgA Nephropathy [J]. Dis Markers, 2019, 2019: 9802839
- [27] Nakazawa S, Imamura R, Kawamura M, et al. Difference in IgA1 O-glycosylation between IgA deposition donors and IgA nephropathy recipients[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 508(4): 1106-1112