

Wnt/ β -catenin信号通路与儿童过敏性紫癜的相关性观察

李 秀 张晓翠 张红利 赵其星 邓 芳*

(安徽医科大学第一附属医院儿科, 合肥 230022)

摘要 该文旨在观察Wnt/ β -catenin信号通路在儿童过敏性紫癜(Henoch-Schonlein purpura, HSP)中的表达, 并探讨了该信号通路在HSP中的作用及可能机制。应用免疫组化法检测HSP患儿皮肤和过敏性紫癜性肾炎(Henoch-Schonlein purpura nephritis, HSPN)患儿肾脏组织中Wnt4、 β -catenin和E-cadherin的表达, 同时对HSPN患儿的24 h尿蛋白定量与肾组织中Wnt4、 β -catenin和E-cadherin的表达做相关性分析。免疫组织化学结果显示, HSP组患儿皮肤中, Wnt4、 β -catenin表达量较正常对照组表达量显著增多($P<0.01$), E-cadherin表达量较正常对照组显著减少($P<0.01$)。HSPN患儿肾脏组织中, Wnt4、 β -catenin表达量较正常对照组表达量显著增多($P<0.01$), 主要表达在肾小管; E-cadherin表达量较正常对照组显著减少($P<0.01$)。HSPN患儿肾脏组织中, E-cadherin表达量与24 h尿蛋白定量呈负相关($R=-0.695$, $P<0.05$)。该研究结果提示, Wnt4、 β -catenin和E-cadherin在HSP患儿皮肤和HSPN患儿肾脏组织中均有异常表达, 肾组织中E-cadherin表达量与尿蛋白有相关性, 推测Wnt/ β -catenin信号通路可能参与了HSP的发病。

关键词 过敏性紫癜; Wnt/ β -catenin信号通路; 过敏性紫癜性肾炎

The Correlation between Wnt/ β -catenin Signaling Pathway and Henoch-Schonlein Purpura in Children

Li Xiu, Zhang Xiaocui, Zhang Hongli, Zhao Qixing, Deng Fang*

(Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

Abstract This study was to observe the expression of Wnt/ β -catenin signaling pathway in children with Henoch-Schonlein purpura (HSP). The expression of HSP and the possible role of the signaling pathway in HSP were discussed. Immunohistochemical method was used to detect the renal tissue in children with HSP and Henoch-Schonlein purpura nephritis (HSPN). The 24 h urine protein in children with HSPN was correlated with the expression of Wnt4, β -catenin and E-cadherin. The results of immunohistochemical staining showed that the expression of Wnt4 and β -catenin in the skin of the HSP group was significantly higher than that in the normal control group ($P<0.01$), and the expression of E-cadherin was significantly lower than that in the normal control group ($P<0.01$). In the renal tissue of children with HSPN, the expression of Wnt4 and β -catenin was signifi-

收稿日期: 2018-03-27 接受日期: 2018-06-06

安徽省2017年公益性技术应用研究联动计划项目(批准号: 1704f0804027)和安徽省教育厅2017年度高校优秀拔尖人才培养项目(批准号: GxbjZD07)资助的课题

*通讯作者: Tel: 0551-62922058, E-mail: dengfang1997@126.com

Received: March 27, 2018 Accepted: June 6, 2018

This work was supported by the Anhui Province 2017 Public Welfare Technology Application Research Linkage Plan Project (Grant No.1704f0804027) and the Project Funded by the Outstanding Top Talent Cultivation Project of the College of Education of Anhui Province in 2017 (Grant No.GxbjZD07)

*Corresponding author. Tel: +86-551-62922058, E-mail: dengfang1997@126.com

网络出版时间: 2018-06-27 16:27:54 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180627.1627.014.html>

cantly increased ($P<0.01$) in the normal control group ($P<0.01$), mainly in the renal tubules, and the expression of E-cadherin was significantly decreased than that in the normal control group ($P<0.01$). The kidney tissue of HSPN patients, the expression of E-cadherin was negatively correlated with the quantity of 24 h urinary protein ($R=-0.695$, $P<0.05$). The results suggest that Wnt4, β -catenin and E-cadherin are abnormal in the skin of HSP and the renal tissue of HSPN, and the expression of E-cadherin in renal tissue is associated with urinary protein. It is suggested that Wnt/ β -catenin signaling pathway may be involved in the pathogenesis of HSP.

Keywords Henoch-Schonlein purpura; Wnt/ β -catenin signaling pathway; Henoch-Schonlein purpura nephritis

过敏性紫癜(Henoch-Schonlein purpura, HSP)是儿童期间最常见的一种自身免疫性血管炎性疾病,临床特点为非血小板减少性紫癜、关节炎、胃肠道症状,其中最严重的并发症之一为累及肾脏而出现蛋白尿和(或)血尿,即过敏性紫癜性肾炎(Henoch-Schonlein purpura nephritis, HSPN)^[1]。至今, HSP及其肾脏受累机制尚未建立。Wnt/ β -catenin信号通路是进化过程中比较保守的信号通路,参与了细胞的功能分化及增殖、凋亡及迁移等过程,同时在肿瘤发生发展、器官的纤维化及胚胎的发育等过程中均有重要作用^[2-4]。研究表明,在风湿性疾病中存在Wnt/ β -catenin信号通路的激活^[5-8],同时在泌尿系统疾病方面,该信号通路在急性肾小管损伤时肾小管的再生与修复^[9]、肾脏肿瘤的发生和发展^[10]中发挥重要作用,并且与肾纤维化的形成有紧密联系^[4]。

过敏性紫癜是儿童最常见的风湿性疾病,同时预后和肾脏的损伤密切相关,在过敏性紫癜中是否存在Wnt通路的激活,本实验拟用免疫组化法检测Wnt/ β -catenin信号通路在HSP的皮肤及肾脏组织的表达,初步探讨Wnt通路是否参与了HSP的发生发展。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取安徽医科大学第一附属医院2014年1月至2016年1月的HSP患者9例以及HSPN患者8例,在获取HSP患者知情同意后取其皮肤组织,其中男5例,女4例,年龄3岁6个月-13岁 $[(8.50\pm 3.07)$ 岁],正常对照组由烧伤科获得,同时收集因病情需要行肾穿HSPN患者的肾穿组织,其中男4例,女4例,年龄为9岁-13岁 $[(11.13\pm 1.81)$ 岁],正常对照组由我院病理科获得, HSP组与正常皮肤对照组(9例)年龄、性别构成差异无统计学意义, HSPN组与正常肾脏对照组(8例)年龄、性别构成差异无统计学意义。皮肤组织

及肾穿组织均进行石蜡包埋处理。

1.2 实验试剂

兔抗 β -catenin单克隆抗体、鼠抗E-cadherin单克隆抗体、兔抗Wnt4多克隆抗体均购自Abcam公司。免疫组化试剂盒和DAB显色剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 实验方法

本文采用免疫组化法检测Wnt4、 β -catenin和E-cadherin在皮肤和肾脏组织中的表达。

按照免疫组化试剂盒的操作说明分别检测HSP患儿皮肤组织、HSPN患儿肾脏组织中Wnt4、 β -catenin和E-cadherin的表达,阳性对照为已知阳性的反应片,阴性对照为PBS代替的一抗,随机观察每张切片的5个400倍物镜视野。同时通过美国Media Cybernetics公司的Image-Pro Plus图像分析软件系统对免疫组化结果进行测量。通过Image-Pro Plus图像分析软件测出每一个视野中Wnt4、 β -catenin和E-cadherin的积分光密度(integral optical density, IOD)值,并计算其平均值,即Wnt4、 β -catenin和E-cadherin的表达水平。

1.4 统计学处理

选用SPSS 17.0统计软件分析数据,所得的数据为正态分布,以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,各组间性别构成比较采用卡方检验,相关性分析采用Pearson相关分析,两组间数据分析比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Wnt4、 β -catenin和E-cadherin在HSP组皮肤的表达

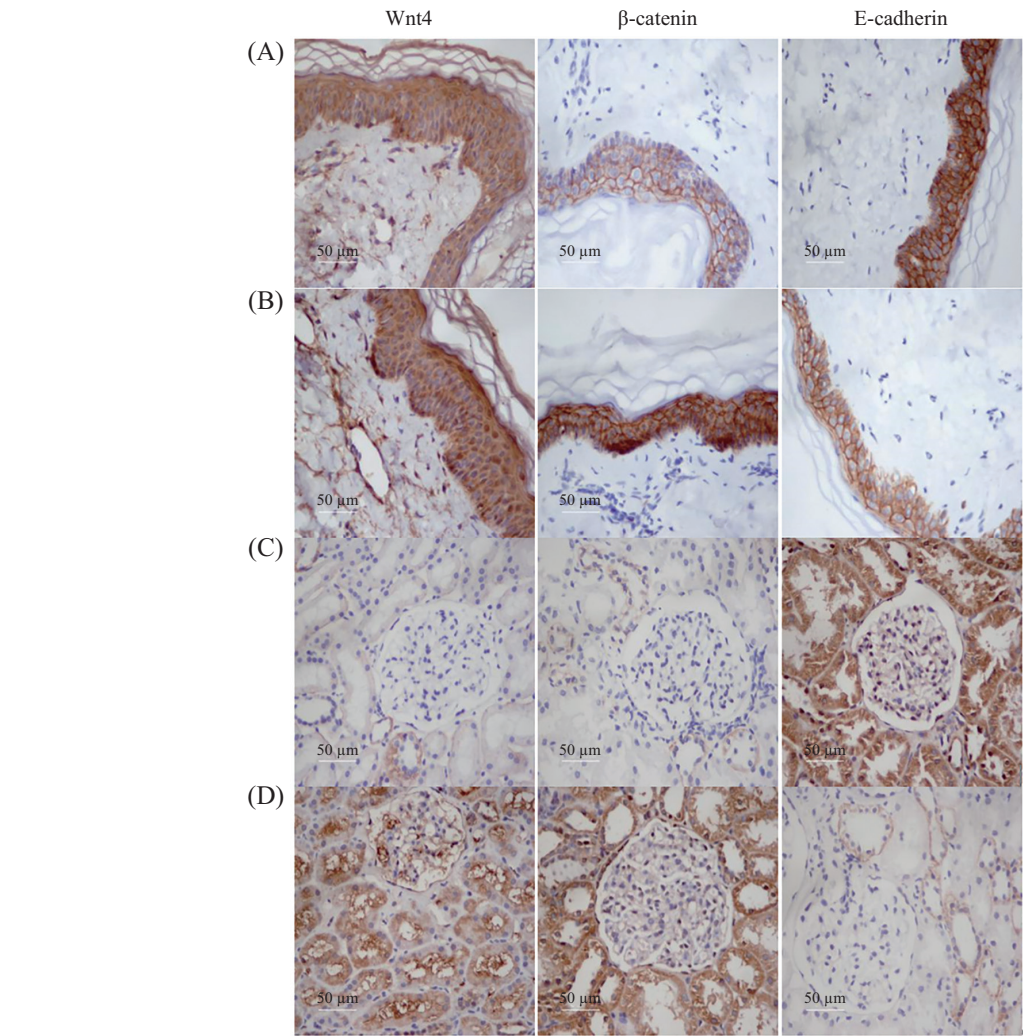
Wnt4、 β -catenin在HSP组的表达主要位于细胞质和细胞膜,而在正常对照组中表达较少,主要位于细胞膜; Wnt4、 β -catenin在HSP组中皮肤的表达高

于正常对照组($P<0.01$)。E-cadherin在HSP组的表达主要位于细胞质, 而E-cadherin在正常对照组中表达主要位于细胞膜; E-cadherin在HSP组中皮肤的表达低于正常对照组($P<0.01$)(图1和表1)。

2.2 Wnt4、 β -catenin和E-cadherin在HSPN组肾脏组织的表达

Wnt4、 β -catenin在HSPN组的表达主要位于细

胞质, 主要表达在肾小管中, 而在正常组中表达较少; Wnt4、 β -catenin在HSPN组中肾脏组织的表达高于正常对照组($P<0.01$)。E-cadherin在HSPN的表达主要表达在肾小管, 而正常肾组织中, E-cadherin表达主要集中于肾小管上皮细胞的细胞膜及细胞间隙中; E-cadherin在HSPN组中肾脏组织的表达低于正常对照组($P<0.01$)(图1和表2), HSPN组中E-cadherin



A: 正常皮肤对照组; B: HSP组; C: 正常肾脏对照组; D: HSPN组。
A: normal skin control group; B: HSP group; C: normal kidney control group; D: HSPN group.

图1 Wnt4、 β -catenin和E-cadherin在皮肤和肾脏组织中的表达
Fig.1 Expressions of Wnt4, β -catenin and E-cadherin in skin and kidney tissue

表1 Wnt4、 β -catenin和E-cadherin在HSP组皮肤组织的表达($\bar{x}\pm s$)				
Table 1 Expression of Wnt4, β -catenin and E-cadherin in the skin tissue of group HSP ($\bar{x}\pm s$)				
项目	正常对照组($n=9$)	HSPN组($n=9$)	t 值	P 值
Project	Normal control group ($n=9$)	HSPN group ($n=9$)	t value	P value
Wnt4	0.269 $\pm$ 0.086	0.492 $\pm$ 0.123	4.419	0.001
β -catenin	0.324 $\pm$ 0.104	0.754 $\pm$ 0.073	10.042	0.001
E-cadherin	0.660 $\pm$ 0.125	0.149 $\pm$ 0.021	12.093	0.001

表2 Wnt4、 β -catenin和E-cadherin在HSPN组肾脏组织的表达($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Expression of Wnt4, β -catenin and E-cadherin in renal tissues of HSPN group ($\bar{x}\pm s$)				
项目	正常对照组($n=8$)	HSPN组($n=8$)	t 值	P 值
Project	Normal control group ($n=8$)	HSPN group ($n=8$)	t value	P value
Wnt4	0.210 $\pm$ 0.037	0.411 $\pm$ 0.102	5.247	0.001
β -catenin	0.247 $\pm$ 0.067	0.725 $\pm$ 0.154	8.058	0.001
E-cadherin	0.580 $\pm$ 0.165	0.243 $\pm$ 0.025	5.716	0.001

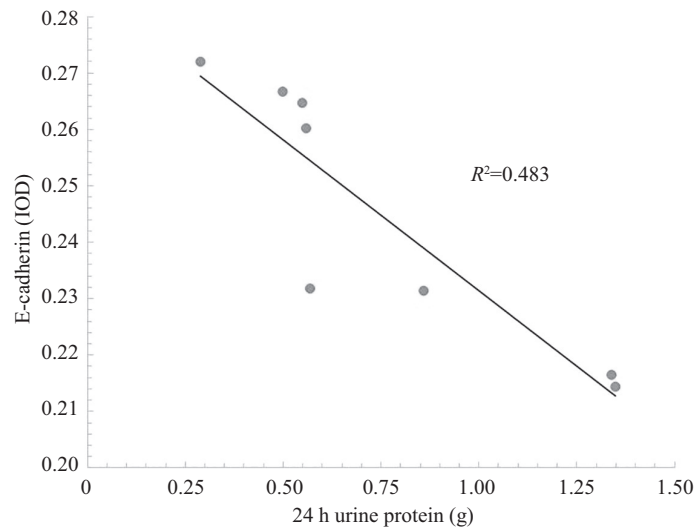


图2 在HSPN组中E-cadherin与24 h尿蛋白定量的相关性分析

Fig.2 Correlation analysis between E-cadherin and 24 h urine protein in group HSPN

表达量与24 h尿蛋白定量呈负相关性($R=-0.695$, $P<0.05$)(图2)。

3 讨论

HSP是儿童最常见的风湿性疾病, Wnt/ β -catenin信号通路广泛存在于风湿性疾病中。研究表明, 在类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)患者中, 其关节内增生成纤维细胞样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)存在Wnt信号通路的激活, 并出现 β -catenin表达增加^[5]。在系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者中, Deng等^[6]发现, 其外周血CD4⁺T细胞中, 与Wnt/ β -catenin信号通路有关的基因如HIG2、TCF7、KHSRP、WWPI等均出现异常, 以上基因在调节T细胞的增殖和分化中充当了枢纽作用。系统性硬化症(systemic sclerosis, SSc)的研究发现, SSc患者体内同样出现了Wnt信号通路的激活, 表现在Wnt-1和Wnt-10b的活性增加, 皮肤纤维母细胞中 β -catenin表达升高, 这与纤维化直接关联^[8]。正常机体成熟肾脏中Wnt信号是安静的, 体内 β -catenin主要在细胞膜处和

E-cadherin结合为复合体, 对防止细胞的迁移、维持同型细胞的黏附发挥重要作用, 而在胞质中只有小部分 β -catenin。近年来, Wnt/ β -catenin信号通路在肾小管间质损伤中的研究获得较多关注。研究显示, 在不同的肾间质纤维化动物模型中, 均发现Wnt4蛋白的表达升高, 主要表达在集合管上皮细胞, 并且伴随集合管周围纤维化形成^[11]。在UUO鼠模型中发现, Wnt蛋白家族中发现只有三种蛋白未升高, 其他Wnt蛋白的表达均升高, 同时发现 β -catenin聚集及其下游相关基因的表达增加^[4]。下游基因MMP-7通过调节Wnt/ β -catenin信号通路, 可破坏肾小管上皮细胞基底膜, 从而加速肾间质纤维化的发生发展^[12]。王珍等^[13]分析了 β -catenin及相关下游基因 α -SMA和MMP-7在IgA肾病患者肾组织中的表达, 结果显示, β -catenin、 α -SMA和MMP-7在IgA肾病患者中表达明显增加, β -catenin在伴有肾小管间质病变的肾组织 β -catenin表达水平高于无肾小管间质病变的肾组织, 表明了经典Wnt信号通路的激活可能参与了IgA肾病的肾小管间质损伤的过程。

在本研究中, Wnt4、 β -catenin在HSP、HSPN

组的表达量明显高于正常对照组,同时E-cadherin在HSP、HSPN组的表达量明显低于正常对照组,证明了HSP中可能存在Wnt/ β -catenin信号通路的激活, Wnt/ β -catenin信号通路如何作用于过敏性紫癜有待于进一步研究。在HSPN组Wnt4、 β -catenin表达量较正常对照组明显增多,并且多位于肾小管,而E-cadherin表达量较正常对照组明显下降,同时E-cadherin表达量与24 h尿蛋白定量存在相关性,说明了Wnt/ β -catenin信号通路可能通过肾小管间质纤维化参与肾脏的损伤。

综上所述, Wnt4、 β -catenin和E-cadherin在HSP患儿皮肤和HSPN患儿肾脏组织中均有异常表达,同时HSPN患儿肾脏组织中E-cadherin表达量与尿蛋白呈现相关性,推测Wnt/ β -catenin信号通路可能参与了HSP的发病,可能贯通了疾病发生发展的整个过程,并与预后有一定关系。

参考文献 (References)

- 1 Kawasaki Y. The pathogenesis and treatment of pediatric Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Clin Expl Nephrol* 2012; 15(5): 648-57.
- 2 Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006; 127(3): 469-80.
- 3 Naija O, Bouzaraa J, Goucha-Louzir R, Lakhoua MR. Predictive factors of severe henoch-schonlein nephritis in children: report of 34 cases. *Tunis Med* 2012; 90(12): 878.
- 4 He W, Dai C, Li Y, Zeng G, Monga SP, Liu Y. Wnt/ β -catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephro* 2009; 20(4): 765-76.
- 5 Xiao CY, Pan YF, Guo XH, Wu YQ, Gu JR, Cai D. Expression of β -catenin in rheumatoid arthritis fibroblastlike synoviocytes. *Scand J Rheumatol* 2011; 40(1): 26-33.
- 6 MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* 2009; 17(1): 9-26.
- 7 Shi YC, Worton L, Esteban L, Baldock P, Fong C, Eisman JA, *et al.* Effects of continuous activation of vitamin D and Wnt response pathways on osteoblastic proliferation and differentiation. *Bone* 2007; 41(1): 87-96.
- 8 Leah E. Connective tissue diseases: epigenetic silencing of Wnt inhibition in systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol* 2013; 9: 384.
- 9 Terada Y, Tanaka H, Okado T, Shimamura H, Inoshita S, Kuwahara M, *et al.* Expression and function of the developmental gene Wnt-4 during experimental acute renal failure in rats. *Am Soc Nephrol* 2003; 14(5): 1223-33.
- 10 臧 桐, 庄立岩, 张志文, 辛殿旗, 郭应禄. β -环连蛋白基因在肾癌中的表达及其突变分析. *中华泌尿外科杂志(Zang Tong, Zhuang Liyan, Zhang Zhiwen, Xin Dianqi, Guo Yinglu. Expression and mutation of beta-catenin in renal cell carcinoma. Chinese Journal of Urology)* 2000; 21(6): 328-30.
- 11 Surendran K, Mc Caul SP, Simon TC. A role for Wnt-4 in renal Fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282(3): F431-41.
- 12 Surendran K, Simon TC, Liapis H, McGuire JK. Matrilysin (MMP-7) expression in renal tubular damage: association with Wnt4. *Kidney Int* 2004; 65(6): 2212-22.
- 13 王 珍, 洗丽英, 叶伟标, 刘国辉, 李 仪. Wnt/ β -catenin在IgA肾病中的表达及意义. *中国中西医结合肾病杂志(Wang Zhen, Xian Liying, Ye Weibiao, Liu Guohui, Li Yi. Expression and significance of Wnt/ beta -catenin in IgA nephropathy. Chinese Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine)* 2015; (6): 506-9.