

• 论 著 •

肾组织石蜡切片Ⅳ型胶原 α 链免疫组织化学染色在诊断 Alport 综合征中的应用

张能擘, 赵杰, 王美芳, 王慧萍, 周芹, 毕艳, 陈江华[△]

(浙江大学医学院附属第一医院肾脏病中心/浙江省肾脏病防治技术重点实验室/国家临床重点专科/浙江大学肾脏病研究所/浙江省肾脏与泌尿系统疾病临床医学研究中心, 浙江 杭州 310000)

[摘要] 目的 对 Alport 综合征(AS)患者肾脏穿刺组织进行石蜡切片Ⅳ型胶原 α 链免疫组织化学检测,探讨其临床应用价值。方法 选取 2018 年 11 月至 2022 年 7 月浙江大学医学院附属第一医院肾脏病中心确诊的 10 例 AS 患者(AS 病例组)、10 例心脏死亡器官捐献者(DCD)供肾及 10 例确诊为免疫球蛋白 A 肾病患者(对照组)的肾组织进行石蜡切片Ⅳ型胶原 $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 链全自动免疫组织化学染色,将其与冰冻切片免疫荧光染色结果进行比较。将对照组肾组织石蜡切片分别采用多种方法进行抗原修复,比较修复效果。结果 对照组肾组织 2 种染色方法Ⅳ型胶原 $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 链染色在肾小球基底膜(GBM)中均为连续线状阳性表达。AS 病例组肾组织 2 种染色方法Ⅳ型胶原 $\alpha 1$ 链染色在 GBM 均呈连续线状阳性表达, $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 链染色在 GBM 为阴性或节段弱阳性表达。2 种染色方法染色结果具有较高的一致性($Kappa=0.615, P=0.035$)。结论 石蜡切片全自动免疫组织化学检测Ⅳ型胶原 $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 和 $\alpha 5$ 能较好地用于 AS 的诊断,为 AS 的诊断和研究提供了一种可靠的技术手段。

[关键词] Alport 综合征; 诊断; Ⅳ型胶原 α 链; 免疫组织化学; 间接荧光抗体技术

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2024.10.008

中图分类号: R692

文章编号: 1009-5519(2024)10-1660-05

文献标识码: A

Immunohistochemical staining of type IV collagen α chain in paraffin sections of renal tissue in the diagnosis of Alport syndrome

ZHANG Nengbo, ZHAO Jie, WANG Meifang, WANG Hui ping, ZHOU Qin, BI Yan, CHEN Jianghua[△]
(Kidney Disease Center, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine/
Key Laboratory of Kidney Disease Prevention and Control Technology Zhejiang Provincial/
National Key Clinical Department of Kidney Diseases/Institute of Nephrology, Zhejiang
University/Zhejiang Clinical Medical Research Center of Kidney and Urinary System
Disease, Hangzhou, Zhejiang 310000, China)

[Abstract] **Objective** Immunohistochemical detection of type IV collagen alpha chain in paraffin sections of renal puncture tissues from patients with Alport syndrome (AS) was performed to explore its clinical application. **Methods** Kidney tissues from 10 AS patients (AS case group), 10 cardiac death organ donor (DCD) donor kidneys and 10 patients diagnosed with immunoglobulin A nephropathy (control group) diagnosed in Kidney Disease Center, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine from November 2018 to July 2022 were selected for fully automated immunohistochemical staining of type IV collagen $\alpha 1$, $\alpha 3$ and $\alpha 5$ chains in paraffin sections, which were compared with the results of immunofluorescence staining of frozen sections. The paraffin sections of renal tissues from the control group were subjected to antigenic repair by various methods respectively, and the repair effects were compared. **Results** In the control group, the two staining methods of renal tissue, type IV collagen $\alpha 1$, $\alpha 3$ and $\alpha 5$ chains staining, showed continuous linear positive expression in the glomerular basement membrane (GBM). The two staining methods of renal tissue of the AS case group. Type IV collagen $\alpha 1$ chain staining, showed continuous linear positive expression in the GBM, and $\alpha 3$, $\alpha 5$ chains staining showed negative or weakly positive expression in the GBM. The staining results of the two staining methods were in high consistency ($Kappa=0.615, P=0.035$). **Conclusion** Fully automated immunohistochemical detection of type IV collagen $\alpha 1$, $\alpha 3$ and $\alpha 5$ in paraffin sections can be used for diagnosis of AS better, which provides a reliable technique for the diagnosis and study of AS.

[Key words] Alport syndrome; Diagnosis; Type IV collagen α chain; Immunohistochemistry; Indirect fluorescent antibody technique

Alport 综合征(AS)是一种以血尿、进行性肾功能减退、感音神经性聋、眼部异常等为临床特点的遗传性肾脏病。编码Ⅳ型胶原 α 链的基因COL4A_n突变所致的基底膜损伤是其发病基础^[1-3]。常根据患者临床表现、家族史,以及肾活检组织电镜检查、遗传基因学诊断及免疫荧光等方法来诊断AS^[4-5]。因此,应用抗Ⅳ型胶原不同 α 链的单克隆抗体检测肾小球基底膜(GBM)Ⅳ型胶原 α 链可作为诊断AS的重要依据^[6-8]。目前,国内常采用肾组织冰冻切片免疫荧光法检测Ⅳ型胶原 α 链^[9-10];但此法肾组织冰冻切片肾小球较少、易自溶、异地运输困难,且免疫荧光对组织结构、抗原定位观察较差,为病理诊断带来不便。而石蜡切片标本无上述缺点,组织形态完整,结果易于保存,具有较强的可操作性。因此,本研究通过肾脏组织石蜡切片探索了Ⅳ型胶原 α 链免疫组织化学染色(组化染色)法在AS诊断中的应用价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 一般资料 选取2018年11月至2022年7月

浙江大学医学院附属第一医院肾脏病中心确诊的AS患者10例作为AS病例组,其临床表现、家族史及冰冻组织免疫荧光 α 3、 α 5链染色、电镜结果均符合AS。诊断标准参照《Alport综合征诊治专家共识(2023版)》^[4],即临床主要表现为持续性肾小球源性血尿或血尿伴蛋白尿的患者,且具有以下任一项即可诊断为AS:(1)肾组织电镜检查示GBM致密层撕裂、分层、薄厚不均或篮网状改变;(2)肾脏组织基底膜Ⅳ型胶原 α 3、 α 4、 α 5链免疫荧光染色异常或EBMⅣ型胶原 α 5链免疫荧光染色异常;(3)基因检测示COL4A3、COL4A4或COL4A5基因具有致病性变异。选取同期20例患者作为探索石蜡切片的修复条件和正常阳性对照(对照组),其中心脏死亡器官捐献者(DCD)供肾10例,确诊为免疫球蛋白A(IgA)肾病10例,均无AS及AS家族史。各组患者一般资料比较见表1。石蜡切片免疫组织化学阳性对照:Ⅳ型胶原 α 1链普遍分布在所有基底膜中,设置Ⅳ型胶原 α 1链染色为Ⅳ型胶原 α 3、 α 5链染色的阳性对照,以保障检测项目的可靠性。本研究经浙江大学医学院附属第一医院临床研究伦理委员会批准(IIT20230408A)。

表1 各组患者一般资料比较

项目	对照组($n=20$)		AS病例组($n=10$)
	DCD供肾($n=10$)	IgA肾病($n=10$)	
性别[$n(\%)$]			
男	10(100.0)	5(50.0)	6(60.0)
女	0	5(50.0)	4(40.0)
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	无	39.4 \pm 15.0	29.9 \pm 12.0
主要临床表现	无	血尿或血尿伴蛋白尿	血尿或血尿伴蛋白尿
电镜GBM表现	正常	正常	分层撕裂
冰冻组织免疫荧光	正常(GBM连续线状阳性)	正常(GBM连续线状阳性)	α 3链和(或) α 5链异常

1.1.2 仪器及主要试剂 间接免疫荧光试剂包括Ⅳ型胶原 α 3、 α 5链试剂盒 Wieslab™ Alport's syndrome kit、Anti collagen Ⅳ α 5(Ⅳ)chain-Human(Mono)、异硫氰酸荧光素(FITC)标记山羊抗小鼠免疫球蛋白IgG荧光二抗。免疫组织化学机器型号为百凌生物LYNX480。修复液包括乙二胺四乙酸(EDTA)碱性修复液(pH9.0)、柠檬酸酸性修复液(pH6.0)、胰酶、蛋白酶K;一抗为兔抗人 α 1链单克隆抗体、兔抗人 α 3链单克隆抗体、兔抗人 α 5链单克隆抗体;二抗试剂盒为BXV Visualization system。均购于杭州百凌生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 标本制备 肾穿刺活检组织留取部分立即进行冰冻切片,部分电镜固定,剩余组织经10%的中性福尔马林固定后脱水制成石蜡组织包埋块。

1.2.2 Ⅳ型胶原 α 3、 α 5链间接免疫荧光染色(荧光染色) 5 μ m冰冻切片室温下自然晾干,4 $^{\circ}$ C冷丙酮固定,去离子水冲洗,分别滴加单克隆兔抗人Ⅳ型胶原 α 3抗体和单克隆兔抗人Ⅳ型胶原 α 5抗体,37 $^{\circ}$ C孵

育1h,冲洗后滴加FITC标记的山羊抗小鼠免疫球蛋白IgG荧光二抗,37 $^{\circ}$ C孵育1h,冲洗吹干,甘油封片,冰箱冷藏,用荧光显微镜观察。

1.2.3 Ⅳ型胶原 α 1、 α 3、 α 5链组化染色 2 μ m石蜡切片,捞片后67 $^{\circ}$ C烤片1h,后采用全自动免疫组化染色机进行染色。染色结束后用100%乙醇脱水,吹干,树胶封片。抗原修复采用4种修复液,分别为EDTA碱性修复液热修复、柠檬酸酸性修复液热修复、胰酶修复和蛋白酶K修复。先将对照组石蜡切片采用不同方法修复后进行组化染色,根据修复和染色效果选取最佳修复方法后再对AS病例组进行组化染色。

1.2.4 图像分析 Ⅳ型胶原 α 3、 α 5链荧光染色结果判定为观察每张切片的肾小球数,对荧光抗体的沉积特点和强度进行评分。肾组织中GBM染色结果正常为连续线状阳性,减弱或节段缺失为弱阳性/节段弱阳性,完全缺失为阴性。Ⅳ型胶原 α 1、 α 3、 α 5链组化染色结果判定为观察每张切片的肾小球数,肾组织中GBM染色结果正常为连续线状阳性,减弱或节段缺

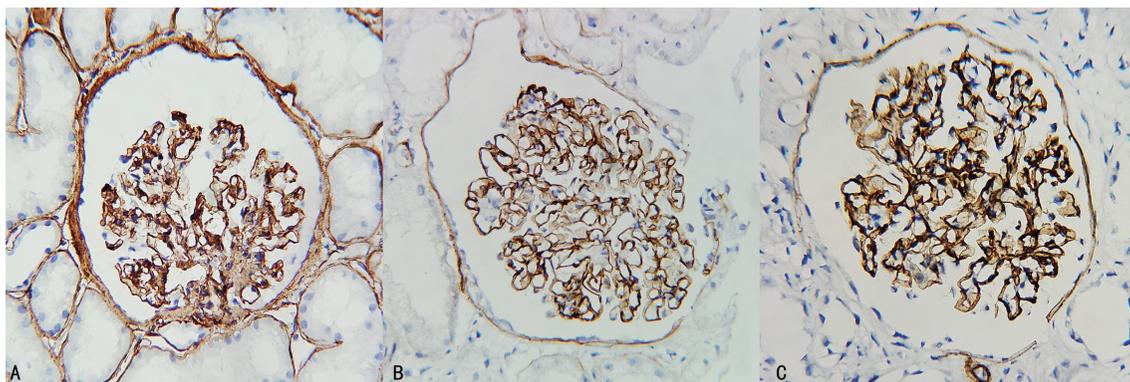
失为弱阳性/节段弱阳性,完全缺失为阴性。

1.3 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示,采用秩和检验;计数资料以率或构成比表示,采用 χ^2 检验。使用 Kappa 系数比较 2 种实验方式的一致性, $Kappa < 0.4$ 表明一致性较差, $0.4 \sim < 0.6$ 表明中度一致, $0.6 \sim 0.8$ 表明具有较高的一致性, > 0.8 表明具有极好的一致性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计

学意义。

2 结 果

2.1 石蜡切片最佳修复方法 $\alpha 1$ 链采用 EDTA 碱性修复液热修复 20 min、胰酶修复 5 min, $\alpha 3$ 链采用 EDTA 碱性修复液热修复 20 min、蛋白酶 K 修复 5 min, $\alpha 5$ 链采用 EDTA 碱性修复液热修复 20 min、胰酶修复 5 min。对照组肾组织 GBM 均为连续线状阳性表达,抗原定位准确,背景清晰,效果最佳。见图 1。



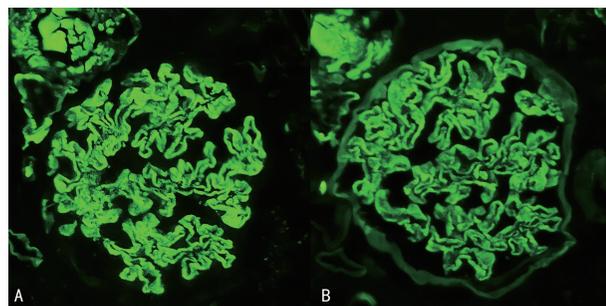
注:A. $\alpha 1$ 链;B. $\alpha 3$ 链;C. $\alpha 5$ 链。

图 1 对照组肾组织组化染色结果(400 \times)

2.2 肾组织冰冻切片荧光染色结果 对照组肾组织 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 链荧光染色均正常,在 GBM 上呈连续线状阳性表达。见图 2。AS 病例组肾组织 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 链在 GBM 上呈阴性或节段弱阳性表达。见图 3。

组化染色为节段弱阳性,荧光染色为阴性 ($Kappa = 0.615, P = 0.035$)。见表 2。组化染色结果见图 4。

2.3 肾组织石蜡切片组化染色结果及与荧光染色结果比较 对照组肾组织 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 链组化染色在 GBM 均呈连续线状阳性。AS 病例组肾组织 IV 型胶原 $\alpha 3$ 链组化染色与荧光染色比较,病例 1~6(病例 7~10 因 $\alpha 3$ 链荧光抗体缺少而未做)强度和分布部位一致 ($Kappa = 1.000, P = 0.010$)。AS 病例组肾组织 IV 型胶原 $\alpha 5$ 链组化染色与荧光染色比较,病例 1、3~5、7~10 强度和分布部位一致,病例 2、6 IV 型胶原 $\alpha 5$ 链



注:A. $\alpha 3$ 链;B. $\alpha 5$ 链。

图 2 对照组肾组织荧光染色结果(400 \times)

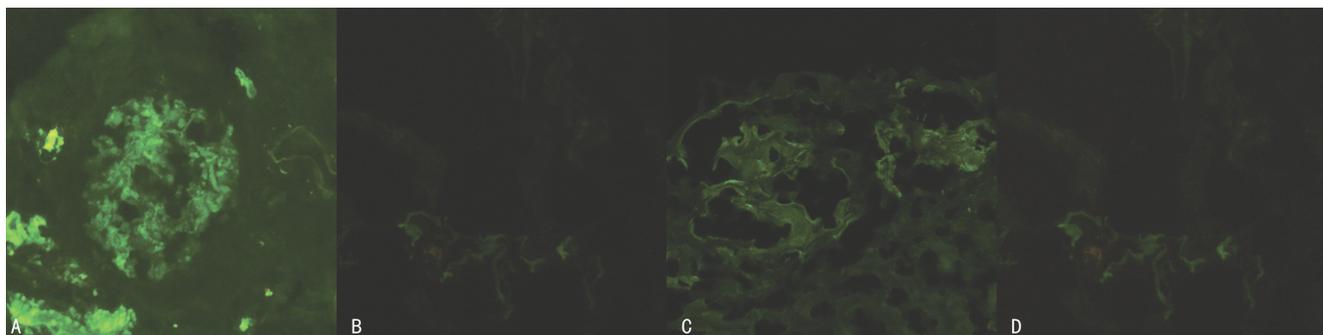
表 2 2 组肾组织免疫荧光与组化染色结果比较(GBM)

组别	性别	$\alpha 1$ 链石蜡切片组化染色	$\alpha 3$ 链		$\alpha 5$ 链	
			石蜡切片组化染色	冰冻切片荧光染色	石蜡切片组化染色	冰冻切片荧光染色
对照组						
DCD 供肾	男(10 例)	+	+	+	+	+
IgA 肾病	男(5 例)/女(5 例)	+	+	+	+	+
AS 病例组						
病例 1	男	+	-	-	-	-
病例 2	男	+	-	-	弱+(节段)	-
病例 3	女	+	-	-	-	-
病例 4	男	+	-	-	弱+(节段)	弱+(节段)
病例 5	女	+	弱+(节段)	弱+(节段)	弱+(节段)	弱+(节段)
病例 6	男	+	+	+	弱+(节段)	-
病例 7	女	+	弱+(节段)	未做	-	-

续表 2 2 组肾组织免疫荧光与组化染色结果比较 (GBM)

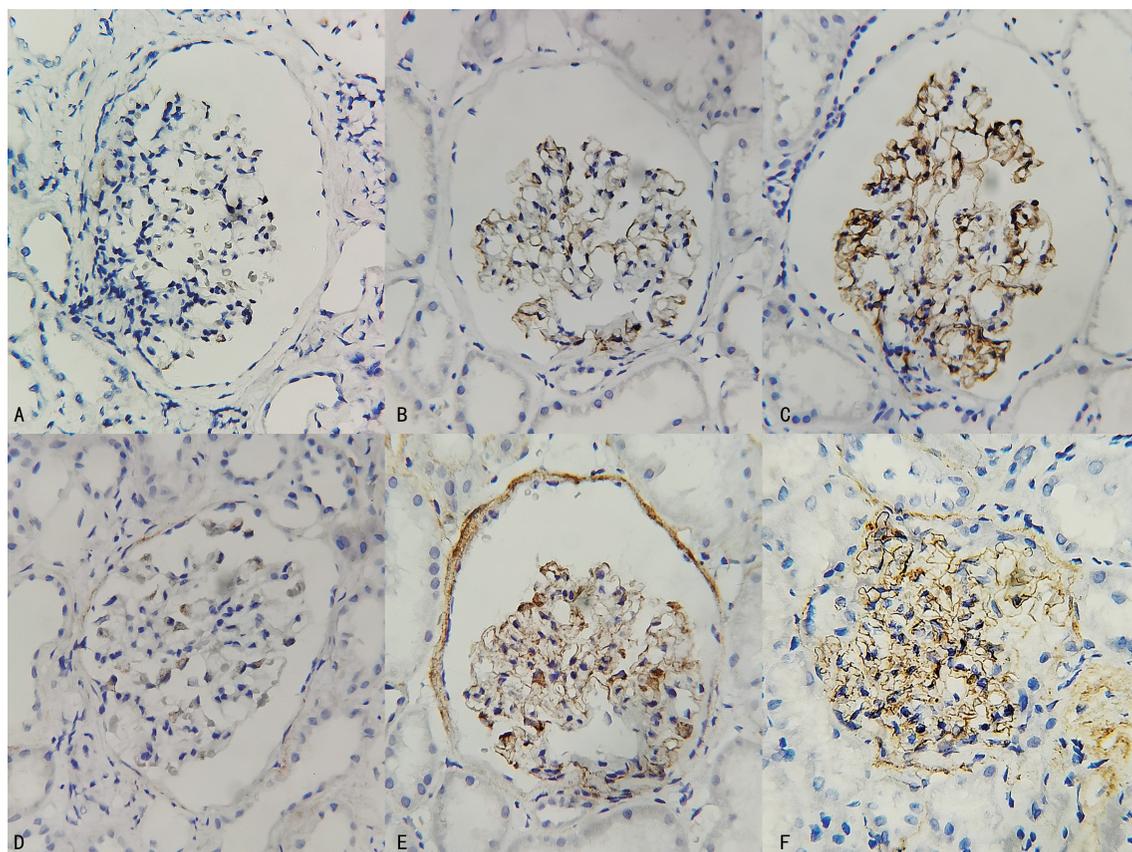
组别	性别	α1 链石蜡切片 组化染色	α3 链		α5 链	
			石蜡切片组化染色	冰冻切片荧光染色	石蜡切片组化染色	冰冻切片荧光染色
病例 8	男	+	-	未做	-	-
病例 9	男	+	弱+(节段)	未做	弱+(节段)	弱+(节段)
病例 10	女	+	+(节段)	未做	弱+(节段)	弱+(节段)

注: + 为连续线状阳性; +(节段) 为节段阳性; 弱+(节段) 为节段弱阳性; - 为阴性。



注: A. α3 链荧光染色节段弱阳性; B. α3 链荧光染色阴性; C. α5 链荧光染色节段弱阳性; D. α5 链荧光染色阴性。

图 3 AS 病例组肾组织荧光染色结果 (400×)



注: A. α3 链染色阴性; B. α3 链染色节段弱阳性; C. α3 链染色节段阳性; D. α5 链染色阴性; E, F. α5 链染色节段弱阳性。

图 4 AS 病例组肾组织组化染色结果 (400×)

3 讨 论

AS 是编码基底膜 IV 型胶原 α 链基因突变导致的遗传病, IV 型胶原分子是 3 条 α 链相互缠绕卷曲形成的三螺旋结构, 为构成肾脏基底膜的主要成分^[11-12]。正常情况下 GBM 中 IV 型胶原 α3、α5 链免疫荧光或组化染色均呈连续线状阳性表达。在 AS 患者中由于 IV 型胶原 α 链的基因变异, 阻止或抑制 GBM 中 α3、α5

链 IV 型胶原支架的沉积, 不能构建正常的 IV 型胶原网状结构。因此, GBM 中 IV 型胶原 α3、α5 链荧光或组化染色异常, 呈节段缺失或阴性表达^[13-14]。

AS 的诊断主要根据患者临床表现、家族史, 以及肾组织学改变、基因学诊断、超微结构改变及肾组织 IV 型胶原亚链染色, 后二者是诊断 AS 的最主要依据^[15]。既往常用的 IV 型胶原 α 链检测方法为冰冻切

片荧光染色法,时常碰到以下问题:(1)冰冻切片仅有一个肾小球,甚至无肾小球、肾小球纤维硬化等情况,无法全面判断病变类型,可能造成误诊;(2)冰冻切片要求穿刺后数小时内完成荧光染色,如转送时间过长将导致组织自溶,影响诊断;(3)荧光容易淬灭,结果无法保存;(4)需配备荧光显微镜。因此,本研究探讨了石蜡切片组化染色替代法在诊断 AS 中的可行性。

石蜡切片组织抗原决定簇暴露是组化染色关键的一步^[16-18]。本研究结果显示, $\alpha 1$ 链采用 EDTA 碱性修复液热修复 20 min、胰酶修复 5 min, $\alpha 3$ 链采用 EDTA 碱性修复液热修复 20 min、蛋白酶 K 修复 5 min, $\alpha 5$ 链采用 EDTA 碱性修复液热修复 20 min、胰酶修复 5 min,组织块不易脱落,抗原定位准确,阳性显色效果良好,染色背景清晰。使用上述方法对 AS 病例组肾组织进行组化染色,并将其与荧光染色结果进行对比研究。

阳性对照为 IV 型胶原 $\alpha 1$ 链染色在对照组、AS 病例组肾组织 GBM 中均为连续线状阳性表达,证明实验过程的可靠性。对照组肾组织在 2 种染色方法中 GBM 均为连续线状阳性表达。AS 病例组肾组织 IV 型胶原 $\alpha 3$ 链、 $\alpha 5$ 链荧光染色与组化染色结果具有较高的一致性(Kappa=0.615, $P=0.035$);虽有 2 例肾组织的组化染色阳性程度略高于荧光染色,却依然符合 AS 的诊断标准。对个别结果的差异考虑为冰冻切片与石蜡切片肾小球数量不对等,IV 型胶原在每个肾小球缺失程度也不完全一致;其次为免疫组化采用仪器自动化染色,二抗标记有放大效应。

综上所述,肾组织石蜡切片 IV 型胶原 α 链组化染色结构清晰,免疫复合物沉积部位更容易判断,能较好地用于 AS 的诊断。同时,采用机器套染法,整个染色过程从脱蜡至细胞核复染均在封闭环境中自动完成,全程仅需 3 h,有利于结果的稳定和实验标准化。

参考文献

- [1] FLINTER F. Alport's syndrome[J]. J Med Genet, 1997, 34(4):326-330.
- [2] KASHTAN C E, DING J, GAROSI G, et al. Alport syndrome: A unified classification of genetic disorders of collagen IV $\alpha 345$: A position paper of the Alport Syndrome Classification Working Group[J]. Kidney Int, 2018, 93(5): 1045-1051.
- [3] 袁小涵,王惠明. IV 型胶原相关肾病的研究进展[J]. 武汉大学学报(医学版), 2020, 41(4): 678-683.
- [4] Alport 综合征协作组,国家肾脏疾病临床医学研究中心,北京医学会罕见病分会. Alport 综合征诊治专家共识(2023 版)[J]. 中华医学杂志, 2023, 103(20): 1507-1525.
- [5] 赵颖玲,于力. Alport 综合征的临床表现及诊疗进展[J]. 罕见疾病杂志, 2022, 29(4): 1-4.
- [6] KAGAWA M, KISHIRO Y, NAITO I, et al. Epitope-defined monoclonal antibodies against type-IV collagen for diagnosis of Alport's syndrome[J]. Nephrol Dial Transplant, 1997, 12(6): 1238-1241.
- [7] SU J, LIU Z H, ZENG C H, et al. Quantitative analysis of type IV collagen subchains in the glomerular basement membrane of patients with Alport syndrome with confocal microscopy[J]. Nephrol Dial Transplant, 2006, 21(7): 1838-1847.
- [8] HEIDET L, CAI Y, GUICHARNAUD L, et al. Glomerular expression of type IV collagen chains in normal and X-linked Alport syndrome kidneys[J]. Am J Pathol, 2000, 156(6): 1901-1910.
- [9] 陈彦,丁洁,黄建萍. IV 型胶原间接免疫荧光光检测在诊断不同遗传型 Alport 综合征中的应用[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(17): 1328-1330.
- [10] 丁洁,杨霁云,刘景城,等. 免疫荧光学方法检查皮肤组织 IV 型胶原 $\alpha 5$ 链诊断 Alport 综合征[J]. 中华儿科杂志, 1997, 35(4): 10-12.
- [11] WATSON S, PADALA S A, HASHMI M F, et al. Alport syndrome [M]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.
- [12] 袁昶,黄文彦. Alport 综合征的诊断和治疗进展[J]. 罕见疾病杂志, 2022, 29(1): 1-3.
- [13] NAKANISHI K, YOSHIKAWA N, IJIMA K, et al. Immunohistochemical study of $\alpha 1-5$ chains of type IV collagen in hereditary nephritis[J]. Kidney Int, 1994, 46(5): 1413-1421.
- [14] 赵颖玲,于力. Alport 综合征的临床表现及诊疗进展[J]. 罕见疾病杂志, 2022, 29(4): 1-4.
- [15] GRÜNFELD J P. Contemporary diagnostic approach in Alport's syndrome [J]. Ren Fail, 2000, 22(6): 759-763.
- [16] 俞礼霞,管娜,武国红,等. 肾组织石蜡切片 IV 型胶原 α 链免疫组织化学染色法诊断 Alport 综合征[J]. 实用儿科临床杂志, 2008, 23(5): 340-342.
- [17] 赖妙玲,郝卓芳,邓程,等. 个性化抗原修复方法在肾活检组织石蜡切片免疫荧光染色中的应用[J]. 诊断病理学杂志, 2022, 29(7): 666-668.
- [18] 董鸿瑞,王艳艳,王国勤,等. 免疫组织化学和免疫荧光染色在肾活检组织石蜡切片磷脂酶 A2 受体检测中的应用[J]. 中国医学科学院学报, 2015, 37(5): 562-566.

(收稿日期:2023-08-06 修回日期:2023-12-26)