

高表达 C3aR 的肥大细胞在糖尿病肾病患者 肾组织中的分布及病理意义分析*

郑敬民** 朱小东 张明超 王建平 徐丽丽 刘志红

(南京军区南京总医院解放军肾脏病研究所全军肾脏病重点实验室, 南京 210002)

摘要 选取糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)早期、中期、晚期以及正常移植供肾各 15 例, 分别作为 DN 早期组、中期组、晚期组和正常对照组, 利用各个病例的肾穿刺组织标本进行 C3aR 免疫组化染色, 分析各组中高表达 C3aR 浸润细胞的数量和分布特点, 及其与 DN 发生、发展的关系, 利用连续切片、免疫荧光双套色染色、免疫电镜、及甲苯胺蓝染色等方法对 DN 患者肾组织中高表达 C3aR 的浸润细胞进行细胞类型鉴定。结果表明: a. 光镜和免疫电镜的形态学分析显示 DN 患者肾组织中高表达 C3aR 的浸润细胞在形态上具有肥大细胞的特点, 免疫荧光双套色染色的分析显示, C3aR 浸润细胞 CD45 阴性、CD68 和类胰蛋白酶阳性, 与肥大细胞的情况一致, 甲苯胺蓝特殊染色进一步证实这是一种肥大细胞。b. 正常移植供肾组织中虽有肥大细胞分布, 但数量很少; 从 DN 早期组到 DN 中期组, 再到 DN 晚期组, 肾组织中肥大细胞的数量有一种不断增加的趋势; DN 患者肾组织肥大细胞的数量与 24 h 尿蛋白和血肌酐水平均具有很好的线性相关性。上述工作不仅揭示了在 DN 发生发展过程中肥大细胞在 DN 患者肾组织中的数量及分布情况, 提示肥大细胞很可能参与了 DN 的发生发展过程, 同时, DN 患者肾组织肥大细胞高表达过敏毒素 C3a 受体 C3aR 的发现, 提示 C3a/C3aR 通路很可能在 DN 患者肥大细胞的招募和激活过程中有重要作用。

关键词 过敏毒素, 糖尿病肾病, C3aR, 肥大细胞

学科分类号 R587.1, R363.1

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00465

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的主要微血管并发症, 也是导致终末期肾衰的重要原因。随着糖尿病发病率的增加, 国内外 DN 患者的数量正在不断增加。虽然国内外已对 DN 进行了多年的大量研究, 但有关 DN 的分子机制仍然不是很清楚, 现有治疗 DN 的措施仅能部分延缓 DN 的进程, 而无法从根本上阻断 DN 的进展^[1]。

近年来, 有关 DN 是一种慢性炎症反应的观点已逐渐为人们所接受, 但有关炎症反应的机理仍然不是很清楚。在以前的工作中^[2-5], 我们研究所利用基因芯片等方法对 2 型 DN 模型小鼠肾脏基因表达谱和 2 型 DN 患者肾小球基因表达谱进行了全面的分析, 发现 C3aR 基因在 DN 肾组织中高表达, 提示 C3aR 可能与 DN 相关。C3aR 是过敏毒素 C3a 的受体, 作为一种重要的免疫调节物质, 过敏毒素 C3a 及其受体在其他炎症反应中的作用已有不少研究, 但有关 C3a/C3aR 在 DN 中的作用却未

见更多报道。为了进一步深入探讨 C3a/C3aR 在 DN 发生发展过程中的可能作用, 最近, 我们对 C3aR 在不同病理时期 DN 小鼠和 DN 患者肾组织中的表达情况进行了比较全面的分析, 结果出乎意料地在 DN 患者肾组织中观察到一类数量众多而高表达 C3aR 的细胞, 且肾组织中这种高表达 C3aR 的细胞数量与 DN 的进展具有明显的相关性。进一步的鉴定分析表明, 这种高表达 C3aR 的细胞是一种肥大细胞。本文报道了 C3aR 在 DN 患者肾组织肥大细胞中的表达以及高表达 C3aR 的肥大细胞在不同病理阶段 DN 患者肾组织中的分布情况。

* 南京军区南京总医院课题资助项目(2010M027)。

** 通讯联系人。

Tel: 025-80860805, E-mail: zhengjingmin@yahoo.com

收稿日期: 2010-09-07, 接受日期: 2010-11-15

1 材料和方法

1.1 病例选择

选择 2008 年至 2009 年来南京军区南京总医院解放军肾脏病研究所就诊, 并经临床和病理诊断为 2 型 DN 的病例共 45 例。年龄 (51 ± 9) 岁, 男: 女=24: 21, 临床符合 1997 年 WHO 糖尿病诊断标准, 肾活检病理符合 DN 病变并排除其他可能合并的原发/继发性肾脏疾病。根据临床及肾穿刺组织病理特点将 DN 患者分为 DN 早期组、DN 中期组和 DN 晚期组, 每组各 15 例, 各组年龄及性别比例相当。其中 DN 早期组主要表现为微量白蛋白尿, 24 h 尿蛋白 < 0.4 g, 肾穿刺组织病理主要表现为肾小球体积增大, 系膜区轻度增宽, 此外无其他显著病变; DN 中期组有明显的蛋白尿(24 h 尿蛋白 ≥ 1.0 g), 但肾功能正常(血肌酐 < 12.4 mg/L); DN 晚期组则表现有肾功能明显受损(血肌酐 > 14 mg/L)。同时选取 15 例移植供肾组织标本作为正常对照, 所选供肾组织病理分析均显示无明显病变。

1.2 C3aR 免疫组化分析

C3aR 免疫组化分析采用穿刺肾脏组织石蜡切片进行。石蜡切片厚 $1.5 \mu\text{m}$, 切片经常规脱蜡和复水处理后, PBS 洗 3 次(每次 5 min), 3%牛血清白蛋白封闭 30 min, 经 1:100 稀释的兔抗 C3aR 抗体于 4°C 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次(5 min/次), 加猪抗兔抗体孵育 45 min, PBS 洗涤 3 次(5 min/次), 加 PAP 试剂孵育 45 min, PBS 洗涤 3 次后进行显色反应。然后以苏木精复染 1 min, 自然风干后封片观察。上述所用试剂除兔抗 C3aR 抗体是 SANTA Cruz Biotechnology 产品外, 其余均为 DaKo 公司产品。

1.3 免疫荧光双套色染色

C3aR 和 CD45、CD68、Tryptase 的免疫荧光双套色染色采用 $1.5 \mu\text{m}$ 厚的 DN 患者穿刺肾脏组织石蜡切片, 按我所常规方法进行分析。简单过程如下: 切片经常规脱蜡和复水处理后, 以 10%胎牛血清封闭 1 h, 与第一种一抗(兔抗 C3aR 抗体, 1:100)孵育 4 h, PBS 洗 3 次, 再与相对于第一种一抗的荧光(FITC 或 TRITC)标记的二抗(驴抗兔 IgG 抗体)孵育 45 min, 然后 PBS 洗 3 次, 与抗 CD45 或抗 CD68 或抗 tryptase 抗体孵育 1 h, PBS 洗 3 次后再与相应的荧光(TRITC 或 FITC)标记二

抗孵育 45 min, 充分洗涤后置激光共聚焦显微镜下观察。同时以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.4 免疫电镜分析

按我所冷冻免疫电镜常规方法进行。过程如下: 将肾组织块切成 1 mm^3 的小块, 以含 2%甲醛和 0.02%戊二醛(pH7.2)的固定剂中室温固定 2 h, 将固定好的组织块用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 再将其投入含 10%明胶溶液中 15 min。组织块再经冷冻保护处理(将组织块投入含 2.3 mol/L 蔗糖的 0.1 mol/L PBS 缓冲液中室温 2 h)后, 使用 Leica EM FC6 冷冻超薄切片机进行冷冻切片, 冷冻超薄切片厚度约为 90 nm。切片复温后进行免疫标记, 缓冲液清洗切片数次, 5%BSA 孵育 15 min, 抗人 C3aR 多克隆抗体(1:50) 4°C 冰箱孵育过夜, 缓冲液清洗切片数次, 胶体金标记二抗(1:25 稀释, 10 nm goat anti-rabbit IgG gold, 810.011.AURION GOLD REAGENTS)室温孵育 1 h, 缓冲液清洗切片, 1%戊二醛固定 10 min, 蒸馏水冲洗切片, 2%甲基纤维素溶液和 4%酸性醋酸铀溶液按 9:1 的比例新鲜配制染色 5 min, 切片干燥后在 Hitach7500 透射电镜下观察和拍照。

1.5 肾组织中 C3aR 高表达细胞计数和密度分析

先对每个病例(包括正常对照)的一张肾穿刺组织切片按 1.2 介绍的方法进行 C3aR 免疫组化染色, 然后在低倍镜下计数每张切片肾组织中的 C3aR 强阳性染色细胞数, 利用 NIS Element BR 软件显微镜下测量每张切片中的肾组织面积, 以每张切片中的 C3aR 强阳性染色细胞数除以该切片中肾组织的面积(mm^2)即为该病例肾组织中 C3aR 高表达细胞密度。

1.6 免疫组化染色强度的光密度扫描和 C3aR 表达水平定量分析

利用 Image Plus 2 软件进行。简单过程如下: 高倍镜下选取待测区域(如 C3aR 高表达细胞或小管上皮细胞), 测定其 IOD 值和面积(mm^2), 以测得的 IOD 值除以测定区域的面积作为该区域 C3aR 相对表达水平。每标本至少测定 20 个区域, 计算平均值。

1.7 统计学分析方法

定量检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.0 统计软件进行统计分析, 两组间均数比较采用 t 检验, 以 $P \leq 0.05$ 为差异有显著性统计学意义。

2 结 果

2.1 C3aR 免疫组化分析显示糖尿病肾病肾组织中存在高表达 C3aR 的浸润细胞

在利用免疫组化方法分析 DN 患者肾组织 C3aR 表达情况时, 我们意外地发现, 与 DN 小鼠中的情况不同, C3aR 除了在 DN 患者肾组织中的上皮细胞(足细胞、壁层上皮细胞和小管上皮细胞)表达外, 还表达于另外一类“特殊”细胞, 这种细胞广泛分布于皮质和髓质的间质、管周小血管, 此外也可侵入一些肾小管壁中(图 1)。根据图像光密度扫描分析结果, C3aR 在这种细胞中的表达水平要比其在肾脏上皮细胞中的表达水平高数十倍(图 2)。

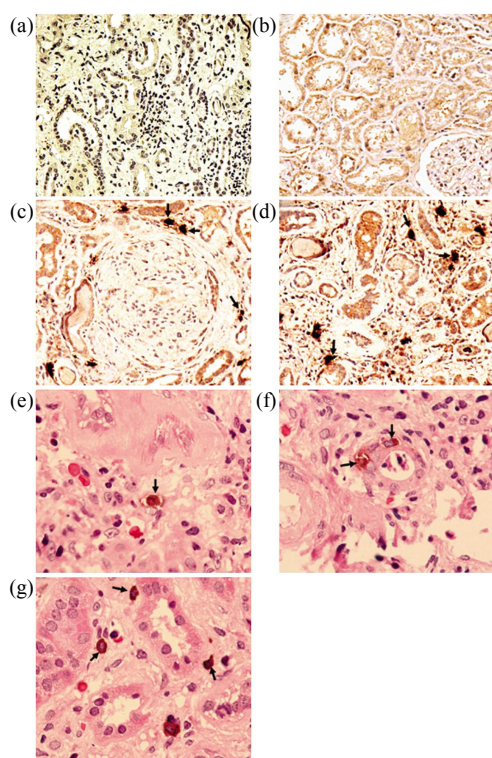


Fig. 1 A kind of C3aR highly expressing cells(shown as the black arrow) were found by immunohistochemistry in the renal tissue of patients with diabetic nephropathy (DN) (a) Negative control for immunohistochemistry. (b) Renal C3aR immunohistochemical staining of normal control sample. (c) Renal C3aR immunohistochemical staining of DN patients (showing the existence of C3aR strongly positive cells in the cortex). (d) Renal C3aR immunohistochemical staining of DN patients (showing the existence of C3aR strongly positive cells in the medulla). (e) Renal C3aR immunohistochemical plus HE staining of DN patients (showing the C3aR strongly positive cells in renal small vessel). (f) Renal C3aR immunohistochemical plus HE staining of DN patients (showing the C3aR strongly positive cells in the wall of renal tubulus). (g) Renal C3aR immunohistochemical plus HE staining of DN patients (showing the C3aR strongly positive cells in renal interstitial).

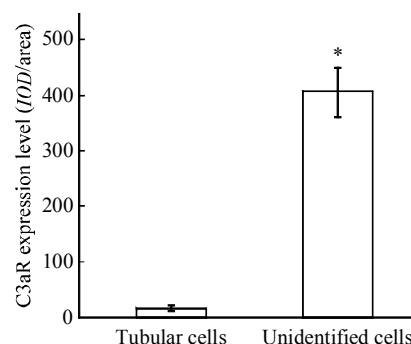


Fig. 2 The C3aR strongly positive cells(unidentified cells) found in the renal tissue of patients with diabetic nephropathy expressed more than 20 fold of C3aR as that of tubular cells

2.2 肾组织中高表达 C3aR 细胞的密度与 DN 的病理进程密切相关

利用 NIS-Elements 和 Image plus 2 图像分析软件, 我们对 C3aR 高表达细胞在不同病理时期 DN 患者肾组织中的分布情况进行了比较分析, 结果显示, 正常对照组肾组织中极少有 C3aR 高表达细胞, 而从 DN 早期开始, 肾组织中 C3aR 高表达细胞的数量随 DN 的进展逐渐增加, 每平方毫米 C3aR 高表达细胞的数量与蛋白尿、血肌酐水平均具有较好的线性关系(图 3, 4)。

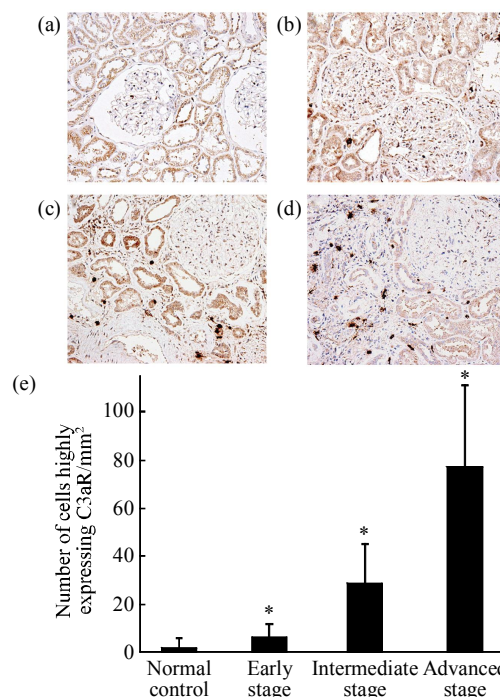


Fig. 3 Renal C3aR strongly positive cells increased with the development of diabetic nephropathy

(a) Normal control group. (b) Early stage group. (c) Intermediate stage group. (d) Advanced stage group. (e) Statistical analysis of renal mast cells in different stage of diabetic nephropathy ($n=15$ for each group).

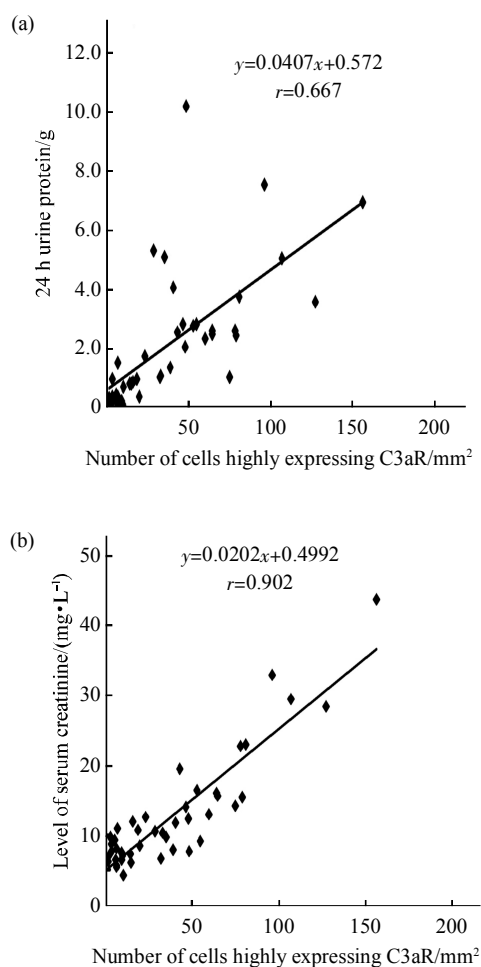


Fig. 4 A close correlation between the C3aR strongly positive cells and urine protein(a) and serum creatinine(b) was found

2.3 DN 患者肾组织中高表达 C3aR 的细胞是肥大细胞

为了鉴定 DN 患者肾组织中 C3aR 高表达细胞的类型, 我们首先利用光镜和免疫电镜技术对这种细胞的形态结构进行了分析. 基于连续切片的光镜分析显示, 这是一种单核细胞样的细胞, 而电镜的超微结构分析发现, 这种细胞内具有很多的囊泡结构, 形态上像肥大细胞. 在形态学分析的基础上, 我们对这种细胞进行了分子标记物(CD45、CD68 和类胰蛋白酶)染色, 发现这种细胞 CD45 阴性、CD68 阳性、类胰蛋白酶阳性, 说明这种细胞应该是肥大细胞, 进一步地基于甲苯胺蓝染色的分析也证明了这一点(图 5).

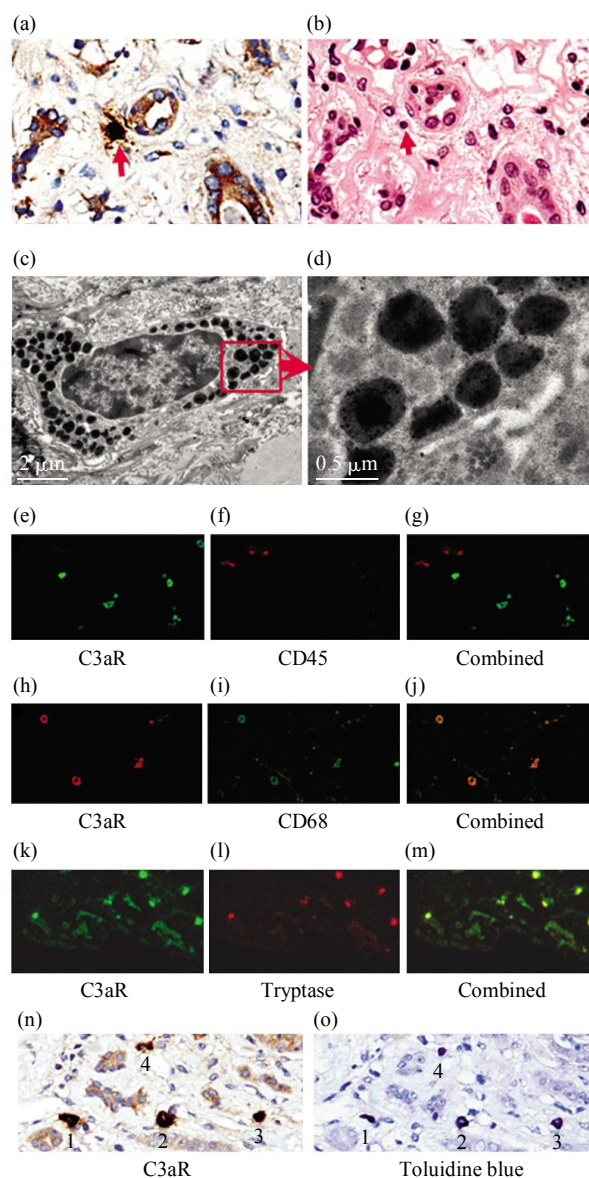


Fig. 5 The renal C3aR strongly positive cells were proved to be a kind of mast cells through morphological methods, molecular biomarker staining and toluidine blue special staining technique

Using serial sections (when one section was immunohistochemically stained with C3aR antibody(a) and the other was stained with HE(b)), the C3aR strongly positive cells was demonstrated as "mononuclear like cells"(red arrow). Immunoelectron microscopic analysis (c and d) revealed that the cells own a lot of vesicles and have a mast cell morphous, double immunofluorescence staining analysis(e~m) demonstrated that the cells were negative for CD45 staining, positive for both CD68 and tryptase staining, which is in accordance with that of mast cells; and this judgement was further proved by toluidine blue staining (n and o, n and o are serial sections).

3 讨 论

肥大细胞是一类“既老又新”的细胞。说它“老”，是因为人们在很早就认识到了它，并已对其进行了很多研究；而说它“新”，是因为至今人们对肥大细胞的许多方面(包括其一些功能、相关分子机制，尤其是在一些人类疾病发生发展过程中的病理意义)仍然远没有弄清楚。究其原因，恐怕与其所具有的细胞功能的多样性和高度不均一性(不仅不同物种的肥大细胞表型存在差异，就是同一物种不同解剖部位的肥大细胞的表型，包括染色特点、细胞大小、所含胞内介质成分以及T细胞依赖性等，也有明显的不同)很有关系。肥大细胞来源于造血祖细胞。通过各级血管，肥大细胞迁移入组织，同时完成其成熟过程。从已有的研究来看^[6-8]，肥大细胞不仅参与了过敏反应和一般的炎症反应的发生和发展过程，而且还与组织重构、损伤修复和组织纤维化等生理和病理过程密切相关。肥大细胞发挥其功能的方式有两种，一种是通过与细胞的直接接触(如与幼稚淋巴细胞的直接接触进行抗原提呈)，另一种是通过其囊泡中的分泌颗粒来完成。肥大细胞在接受一些刺激后会发生脱粒反应，其细胞囊泡中的内容物就会释放出来。这些内容物包括多种细胞因子、趋化因子、生长因子、组织胺以及酶等成分。这些成分不仅可直接刺激周围的免疫细胞和组织细胞，调节免疫细胞的免疫活性、刺激细胞生长、增殖或凋亡、促进炎症反应的发生和进展，还可激活一些前体物质，使其成为活性物质，从而发挥其生理功能^[9]。因此，脱粒反应是肥大细胞实现其生理病理功能的最重要方式。诱使肥大细胞发生脱粒反应的最经典途径是IgE-Fc结合交联^[10]。此外，近年来的研究还发现存在其他的替补性肥大细胞激活通路，这包括补体激活通路、微生物模式识别受体通路以及Toll样受体激活通路^[11-13]。

虽然早在1975年Johnson等^[14]就曾报道，慢性肾衰竭患者肾组织存在肥大细胞增加的现象，但长期以来，并未引起人们的充分重视。除了少数几篇有关肾组织肥大细胞数量与肾脏病相关性分析的文献外^[15-19]，至今在肥大细胞与肾脏病关系方面的深入研究仍然不多。就已报道的文献来看，一般认为肾组织中肥大细胞的主要病理意义是促纤维化作用^[20]，但亦存在完全不同的报道^[21]。有关肥大细胞在各种肾脏病中的病理作用和具体机制仍然不是

很明确。在分析DN患者肾组织C3aR表达情况时，我们出乎意料地在糖尿病肾病患者肾组织中发现了高表达C3aR的肥大细胞。虽然已有报道认为包括肥大细胞在内的所有骨髓源性细胞均表达C3aR，但报道肾组织肥大细胞高表达C3aR仍然是第一次。从我们所分析的病例来看，正常对照组的肾组织中虽也有肥大细胞的存在，但数量极为有限，这与已报道文献^[9]的结果相似。但从DN早期开始，肾组织中肥大细胞的数量随DN的进展不断增加，且肾组织中肥大细胞的密度与24h尿蛋白和血肌酐水平具有较好的相关性。这种情况提示肥大细胞可能参与了DN的发生发展过程。那么，DN患者肾组织中的肥大细胞高水平表达C3aR究竟有什么样的病理意义呢？DN是一种因代谢异常所致的慢性炎症性疾病，患者肾组织中常存在补体沉积和活化的情况。而补体活化过程必然会产生过敏毒素C3a(补体激活时，补体成分C3被C3转换酶分解成C3a和C3b)。据报道^[22-23]，C3a可通过其受体C3aR趋化、激活肥大细胞，促使肥大细胞脱粒。因此，高表达C3aR可能既有利于DN下肥大细胞向肾脏组织中的聚集，也有利于肥大细胞通过C3a/C3aR通路被激活，从而有利于其在DN发生发展过程中发挥包括促炎和促纤维化在内的各种作用。在本文中，我们还发现，C3aR主要分布于肥大细胞内的各种囊泡中，而在细胞膜则极少发现。这是肥大细胞为了避免在特定病理情况下被过度激活而作出的一种适应性调节反应呢还是另外包含特殊的机制和病理意义？这有待于进一步地深入研究。

总之，本文发现的DN患者肾组织肥大细胞高表达C3aR以及肥大细胞的数量随DN的病理进程而增加这些现象，对于加深对DN病理机制的认识，引导人们对DN新机制的思考是很有意义的，但肥大细胞在DN中的确切病理意义仍有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Balakumar P, Arora M K, Ganti S S, *et al.* Recent advances in pharmacotherapy for diabetic nephropathy: current perspectives and future directions. *Pharmacol Res*, 2009, **60**(1): 24-32
- [2] 刘志红, 郑敬民, 吴义超, 等. db/db 糖尿病肾病小鼠肾脏基因表达谱及大黄酸对其的影响. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2002, **11**(3): 201-220
Liu Z H, Zheng J M, Wu Y C, *et al.* *Chin J Nephrol Dial Transplant*, 2002, **11**(3): 201-220
- [3] 郑敬民, 刘志红, 张 鑫, 等. db/db 小鼠糖尿病肾病相关基因的分析 and 克隆. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30**(3): 404-411

- Zheng J M, Liu Z H, Zhang X, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2003, **30**(3): 404-411
- [4] 吴义超, 刘志红, 曾彩虹, 等. 糖尿病肾病患者肾小球基因表达谱及其与病情进展的关系. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2004, **13**(6): 503-511
- Wu Y C, Liu Z H, Zhen C H, *et al.* Chin J Nephrol Dial Transplant, 2004, **13**(6): 503-511
- [5] 陈 珊, 刘志红, 王瑞石, 等. 糖尿病肾病疾病进展相关基因的基因组学研究. 中华肾脏病杂志, 2006, **22**(9): 528-534
- Chen S, Liu Z H, Wang R S, *et al.* Chin J Nephrol, 2006, **22**(9): 528-534
- [6] Abraham S N, St John A L. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. Nat Rev Immunol, 2010, **10**(6): 440-452
- [7] Pejler G, Rönnerberg E, Waern I, *et al.* Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. Blood, 2010, **115**(24): 4981-4990
- [8] Moon T C, St Laurent C D, Morris K E, *et al.* Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. Mucosal Immunol, 2010, **3**(2): 111-128
- [9] Pejler G, Abrink M, Ringvall M, *et al.* Mast cell proteases. Adv Immunol, 2007, **95**: 167-255
- [10] Beaven M A, Metzger H. Signal transduction by Fc receptors: The Fc epsilon RI case. Immunol Today, 1993, **14**(5): 222-226
- [11] Brown J M, Wilson T M, Metcalfe D D. The mast cell and allergic diseases: role in pathogenesis and implications for therapy. Clin Exp Allergy, 2008, **38**(1): 4-18
- [12] Furuta T, Imajo-Ohmi S, Fukuda H, *et al.* Mast cell-mediated immune responses through IgE antibody and Toll-like receptor 4 by malarial peroxiredoxin. Eur J Immunol, 2008, **38**(5): 1341-1350
- [13] Andoh A, Fujiyama Y, Araki Y, *et al.* Role of complement activation and mast cell degranulation in the pathogenesis of rapid intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. Digestion, 2001, **63** (Suppl 1): 103-107
- [14] Johnson A R, Hugli T E, Müller-Eberhard H J. Release of histamine from rat mast cells by the complement peptides C3a and C5a. Immunology, 1975, **28**(6): 1067-1080
- [15] Togawa H, Nakanishi K, Shima Y, *et al.* Increased chymase-positive mast cells in children with crescentic glomerulonephritis. Pediatr Nephrol, 2009, **24**(5): 1071-1075
- [16] Welker P, Krämer S, Groneberg D A, *et al.* Increased mast cell number in human hypertensive nephropathy. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, **295**(4): F1103-F1109
- [17] Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M. Immunohistochemical analysis of the interstitial mast cells in acute rejection of human renal allografts. Med Sci Monit, 2004, **10**(5): BR151-BR156
- [18] Kurusu A, Suzuki Y, Horikoshi S, *et al.* Relationship between mast cells in the tubulointerstitium and prognosis of patients with IgA nephropathy. Nephron, 2001, **89**(4): 391-397
- [19] Roberts I S, Brenchley P E. Mast cells: the forgotten cells of renal fibrosis. J Clin Pathol, 2000, **53**(11): 858-862
- [20] Silva G E, Costa R S, Ravinal R C, *et al.* Mast cells, TGF-beta1 and alpha-SMA expression in IgA nephropathy. Dis Markers, 2008, **24**(3): 181-190
- [21] Kim D H, Moon S O, Jung Y J, *et al.* Mast cells decrease renal fibrosis in unilateral ureteral obstruction. Kidney Int, 2009, **75**(10): 1031-1038
- [22] Ali H. Regulation of human mast cell and basophil function by anaphylatoxins C3a and C5a. Immunol Lett, 2010, **128**(1): 36-45
- [23] Thangam E B, Venkatesha R T, Zaidi A K, *et al.* Airway smooth muscle cells enhance C3a-induced mast cell degranulation following cell-cell contact. FASEB J, 2005, **19**(7): 798-800

Mast Cells Highly Expressing C3aR Were Found in The Kidney of Diabetic Nephropathy and Correlated With The Development of The Disease*

ZHENG Jing-Min**, ZHU Xiao-Dong, ZHANG Ming-Chao, WANG Jian-Ping, XU Li-Li, LIU Zhi-Hong

(Research Institute of Nephrology, Jinling Hospital, Nanjing 210002, China)

Abstract As a major complication of diabetes, diabetic nephropathy (DN) has become a major cause for end stage renal failure. Increasing evidences demonstrated that DN is a kind of inflammation disease. However, the exact mechanism is not completely elucidated. In an effort to investigate the possible role of C3aR in the development of DN, it was found unexpectedly a kind of C3aR highly expressing infiltrates in the renal tissue of patients with DN. To identify the cells and evaluate the possible role of the cells in the development of DN, forty five cases of patients with DN were selected and sections of their renal biopsy were analyzed by histological, immunohistochemical, double immunofluorescence labeling, immunoelectronicmicroscopic methods and toluidine blue staining while another 15 sections of renal biopsy from normal transplantation donor were used as normal controls. The number of C3aR highly positive cells in each section was counted and the density of the cell was calculated, and the correlation between the density of the cell and the development of DN was analyzed. Light microscopic and electron-microscopic analysis revealed that the cells were similar morphologically to mast cell. Double immunofluorescence labeling analysis demonstrated that the cells were positive in CD68 and tryptase staining while negative in CD45 staining, which is also in accordance with that of mast cells. Toluidine blue staining analysis further proved that the cells were a kind of mast cells. Only very small number of the C3aR highly positive mast cells was found in the renal biopsy of normal control group. However, the number of the cells increased with the development of DN, and correlated linearly with the urine protein level and serum creatinine. These results strongly suggested that mast cells are involved in the development of DN. C3aR might play an important role in the recruitment and activation of renal mast cell and thus contribute to the development of DN.

Key words anaphylatoxin, diabetic nephropathy, C3aR, mast cell

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00465

*This work was supported by a grant from Jinling Hospital Fund (2010M027).

**Corresponding author.

Tel: 86-25-80860805, E-mail: zhengjingmin@yahoo.com

Received: September 7, 2010 Accepted: November 15, 2010