

论著·临床研究

TGF- β 与肝细胞生长因子在儿童原发性局灶节段性肾小球硬化肾组织中的表达

卫敏江 吴伟岚 陈敏怡

(上海交通大学医学院附属新华医院儿内科,上海 200092)

[摘要] 目的 通过检测转化生长因子 β (TGF- β)和肝细胞生长因子(HGF)在儿童原发性局灶节段性肾小球硬化(FSGS)肾组织中的表达,了解它们在FSGS中的作用。**方法** 选择肾活检明确诊断为原发性FSGS肾组织标本共33例,其中FSGS不伴肾小管间质病变6例,为实验1组;FSGS伴肾小管间质病变27例,为实验2组;同期因孤立性血尿入院肾活检,病理证实无显著异常改变的肾组织标本共7例,为对照组。采用免疫组化法检测TGF- β 和HGF在3组肾组织中的表达。**结果** TGF- β 和HGF在3组中均有表达,但组间差异有统计学意义($P < 0.01$)。其中两个实验组的TGF- β 和HGF的表达均较对照组明显增加($P < 0.01$),实验2组TGF- β 的表达量高于实验1组,HGF的表达量却低于实验1组。肾小管间质指数与TGF- β 的表达呈正相关,相关系数是0.763, $P < 0.01$;与HGF的表达呈负相关,相关系数是-0.461, $P < 0.05$ 。TGF- β 和HGF在FSGS肾组织中表达呈负相关,相关系数-0.425, $P < 0.05$ 。**结论** TGF- β 和HGF在儿童原发性FSGS肾组织中的表达增加;TGF- β 随着FSGS病变进展,在肾组织中表达量增加,与肾小管间质向纤维化发展相关;HGF的表达相反,与抑制肾小管间质纤维化的作用有关。

[中国当代儿科杂志,2010,12(8):630-633]

[关键词] 原发性局灶节段性肾小球硬化;转化生长因子 β ;肝细胞生长因子;儿童

[中图分类号] R692.3⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)08-0630-04

Expression of TGF- β and hepatocyte growth factor in kidney tissues of children with primary focal segmental glomerular sclerosis

WEI Min-Jiang, WU Wei-Lan, CHEN Min-Yi. Department of Pediatrics, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University of Medicine, Shanghai 200092, China (Email: wmj10@126.com)

Abstract: Objective To study the expression of transforming growth factor- β (TGF- β) and hepatocyte growth factor (HGF) in kidney tissues of children with primary focal segmental glomerular sclerosis (FSGS) and the possible role of the two growth factors in the development of FSGS. **Methods** Kidney specimens were obtained from 33 children with primary FSGS and 7 children with isolated haematuria but without FSGS (control group). Of the 33 children with primary FSGS, 6 children had no renal tubule interstitial pathological damage (Experimental I group) and 27 children had renal tubule interstitial pathological damage (Experimental II group). Expression of TGF- β and HGF in kidney tissues was ascertained by the immunohistochemical method. **Results** TGF- β and HGF were expressed in the three groups, but there were significant differences among the three groups. The expression of TGF- β and HGF in the two experiment groups increased significantly compared with that in the control group. The Experimental II group had increased TGF- β expression but a significantly decreased HGF expression compared with the Experimental I group. The index of tubule interstitial pathological changes was positively correlated with the TGF- β expression ($r = 0.763$, $P < 0.01$), but negatively correlated with the HGF expression ($r = -0.461$, $P < 0.05$) in the Experimental II group. There was a negative correlation between TGF- β and HGF expression in children with primary FSGS ($r = -0.425$, $P < 0.05$). **Conclusions** The expression of TGF- β and HGF in kidney tissues is increased in children with primary FSGS. TGF- β might be a fibrogenic factor and HGF might be an anti-fibrotic factor in the kidney in primary FSGS.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (8):630-633]

Key words: Primary focal segmental glomerular sclerosis; Transforming growth factor- β ; Hepatocyte growth factor; Child

局灶节段性肾小球硬化(focal segmental glomerulosclerosis, FSGS)是一种累及肾小球部分毛细血管祥的非炎症硬化性疾病,是儿童和成人肾脏疾病持续进展至终末期肾病最多见的病理改变,根据病因和发病机制分为原发性和继发性 FSGS。根据国际小儿肾脏病协会报道,原发性 FSGS 占肾病综合征患儿肾活检标本的 5%~7%,占激素抵抗型肾病综合征患者肾活检标本的 32.9%^[1-2],确诊为 FSGS 后随访 10 年中,大约 30%~40% 的患者发生肾功能衰竭^[2]。转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)和肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)分别作为主要的致纤维化和抗纤维化生长因子的作用在许多的体内外实验中已经证实,但它们在儿童 FSGS 肾组织中的表达情况、与 FSGS 的病理改变、临床表现、疗效以及疾病进展的关系等方面的研究较少。本研究选择儿童原发性 FSGS 肾组织活检标本作为研究对象,通过免疫组化的方法来检测原发性 FSGS 患儿肾组织中 TGF- β 和 HGF 的表达情况,分析两生长因子与 FSGS 肾组织病理变化的关系以及在 FSGS 疾病发展过程中所发挥的作用。

1 对象和方法

1.1 研究对象及分组

2002 年 1 月至 2006 年 12 月在上海交通大学医学院附属新华医院儿肾内科经肾穿刺活检术及病理学检查明确诊断为原发性 FSGS 患儿的肾组织标本,共 33 例,依据是否伴肾小管间质病变分为实验 1 组和实验 2 组,其中 FSGS 不伴肾小管间质病变共 6 例,为实验 1 组;FSGS 伴肾小管间质病变共 27 例,为实验 2 组。选择同期因孤立性血尿入院行肾活检,经病理学检查无显著异常改变的患儿肾组织标本共 7 例作为对照组。3 组肾活检时的平均年龄和性别差异无统计学意义。

1.2 肾小管间质病理分级情况

参照 Fofl 等^[3]的半定量积分法对实验 2 组的肾小管间质病变进行病理分级,严重程度用肾小管间质指数表示。具体方法:依据病变的严重程度对各项指标进行评分,包括肾小管萎缩 0~3 分,间质纤维化 0~3 分,间质炎性细胞浸润 0~3 分,将各项所得分数相加得肾小管间质指数。

1.3 免疫组化法检测 TGF- β 和 HGF 在肾组织中的表达

将肾组织标本蜡块切片 2 μm ,放置防脱片,

<60℃ 放置过夜。通过二甲苯脱蜡、梯度酒精脱水、蒸馏水洗脱、抗原修复后滴加兔抗人 TGF- β 单克隆抗体或兔抗人 HGF 单克隆抗体(上海麦莎生物科技有限公司产品),稀释浓度均 1:50,4℃ 孵育过夜。然后经 TBS 冲洗,加入二抗、缓冲液冲洗、DAB 显色、终止反应。再经苏木精复染、水洗、盐酸酒精分化、返蓝、梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树脂胶封片。

1.4 显微图象分析

在显微镜下行单盲读片,结合 DAB 染色强度和染色范围判断结果。DAB 显色阳性反应为在特定区域出现定位明确、对比鲜明的棕黄色(可呈匀细或颗粒状)为特异性阳性反应。棕黄色越深,阳性强度越强,无棕黄色着色为阴性表达。在肾小管区域和肾小球区域随机选取 10 个高倍视野进行观察。应用显微图象分析系统(Axioplan 2 Imaging)进行显微图象半定量分析,获得免疫组化指数(平均阳性率),阳性率=阳性染色面积/视野内肾组织所测面积,每例切片取 10 个不重叠的视野测量,取平均值免疫组化指数。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 11.0 统计分析软件对资料进行统计学分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),细胞/生长因子之间的关系采用 Pearson 相关分析法,细胞/生长因子与肾小管间质指数之间的关系采用 Spearman 等级相关分析法, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF- β 在肾组织中的表达

3 组中都有 TGF- β 阳性表达,对照组 TGF- β 表达少,分布在极少数的肾小管间质区域;实验 1 组 TGF- β 的表达范围较对照组广泛,在肾小管上皮细胞、肾间质以及肾小球系膜细胞和系膜间质都有阳性表达;实验 2 组 TGF- β 的表达区域与实验 1 组相同,但表达的阳性面积和阳性强度均较前两组大。3 组的免疫组化指数经方差分析显示差异有统计学意义($F=12.591, P<0.01$)。组间比较显示,实验 1 组、实验 2 组 TGF- β 的表达较对照组明显增加(均 $P<0.01$);实验 2 组 TGF- β 的表达较实验 1 组有所增加($P<0.05$)。见表 1,图 1。

2.2 HGF 在肾组织中的表达

HGF 在各组中均有阳性表达,对照组 HGF 的

阳性表达面积少,主要分布在部分肾小管上皮细胞,在肾小球系膜细胞上偶有零星的阳性表达;实验1组 HGF 的阳性表达面积最广,分布在较多的肾小管上皮细胞区域,肾小球的系膜细胞和系膜区有较多的棕黄色阳性表达,部分区域呈深棕黄色的强阳性表达,肾间质也有少许阳性表达。实验2组 HGF 的表达区域与实验1组相仿,但阳性表达的面积和阳性强度较实验1组减少,见图2。3组免疫组化指数经方差分析显示差异有统计学意义($F = 49.548$, $P < 0.01$)。组间比较发现,实验1组和实验2组

HGF 的表达较对照组明显增加(均 $P < 0.01$);实验2组 HGF 的表达较实验1组减少,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表1。

表1 肾组织中 TGF-β和 HGF 免疫组化指数 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	例数	TGF-β	HGF
对照组	7	10.2 ± 3.6	5.1 ± 1.2
实验1组	6	19.0 ± 2.5 ^a	28.1 ± 7.8 ^a
实验2组	27	23.7 ± 7.3 ^{a,b}	10.5 ± 3.3 ^{a,c}

a:与对照组比较, $P < 0.01$;b:与实验1组比较, $P < 0.05$;c:与实验1组比较, $P < 0.01$

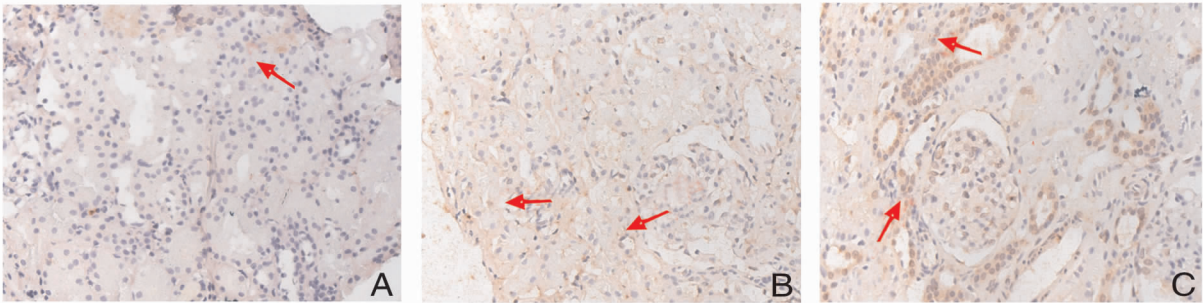


图1 TGF-β在肾组织中的表达(×400) A: 对照组,TGF-β在极少数的肾间质中少量表达; B: 实验1组,TGF-β在肾小管上皮细胞、肾间质以及肾小球内均有表达; C: 实验2组,TGF-β表达范围同实验1组,阳性面积和强度较前两组大。箭头所指为阳性表达。

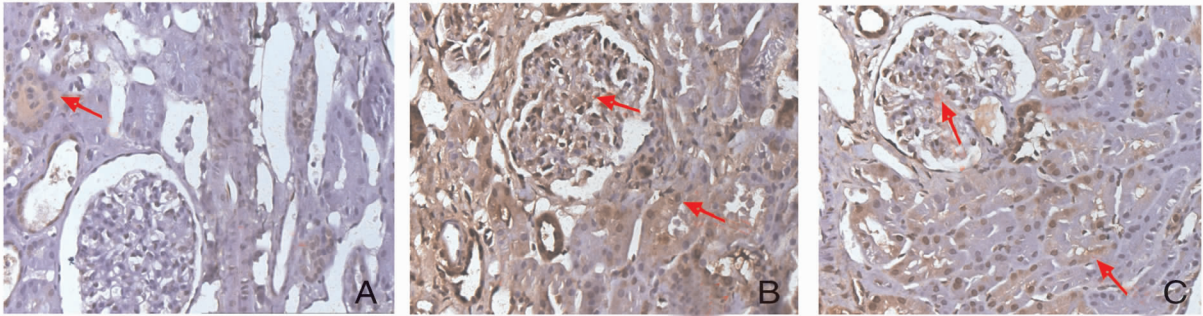


图2 HGF在肾组织中的表达(×400) A: 对照组,HGF阳性表达面积少,主要在肾小管间质表达; B: 实验1组,HGF的表达面积和强度最强; C: 实验2组,HGF的表达较实验1组弱,分布区域相同。箭头所指为阳性表达。

2.3 TGF-β和 HGF 的表达与肾小管间质病变的关系

2.3.1 肾小管间质的病理分级情况 通过 Fof 的半定量积分法对实验2组的27例FSGS患儿的肾小管间质的病变程度进一步进行病理分级,结果显示肾小管间质指数1分4例,2分9例,3分5例,4分4例,6分1例,7分2例,8分2例。

2.3.2 TGF-β、HGF 的表达与肾小管间质指数的关系 将 TGF-β、HGF 在实验2组中表达的免疫组化指数分别与肾小管间质指数通过 Spearman 等级相关分析,结果显示肾小管间质指数与 TGF-β 表达

呈正相关,相关系数 $r = 0.763$, $P < 0.01$;与 HGF 表达呈负相关,相关系数 $r = -0.461$, $P < 0.05$ 。

2.4 TGF-β和 HGF 在 FSGS 肾组织中表达的相互关系

将 TGF-β 和 HGF 在 FSGS 肾组织中表达的免疫组化指数通过 Pearson 相关分析显示两者之间存在负相关,相关系数 $r = -0.425$, $P < 0.05$ 。

3 讨论

TGF-β 的致肾纤维化作用近年来已从大量的研

究中得到证实。在各种进展性肾脏疾病如 IgA 肾病、糖尿病肾病、系膜增生性肾病、FSGS、狼疮性肾炎等患者的肾活检组织中都发现有 TGF- β mRNA 的表达增加^[4]。本研究显示 TGF- β 的表达在实验 1 组、实验 2 组表达明显增高,与对照组比较差异有统计学意义,说明 TGF- β 在儿童原发性 FSGS 肾组织中表达是显著增高的。从表达的部位来看,TGF- β 主要在肾小管上皮细胞和肾间质区域表达,在肾小球系膜区仅有少许表达,这主要与 TGF- β 合成和发挥作用的部位有关。TGF- β 主要在肾间质和肾小管上皮细胞的胞质内合成,而且 TGF- β 的致纤维化作用主要场所是肾小管间质。TGF- β 在实验 2 组的表达较实验 1 组显著增加,TGF- β 的表达与肾小管间质指数呈正相关,说明 TGF- β 的表达与肾小管间质病变程度密切相关。大量的研究已经证实 TGF- β 可通过不同的途径来增加细胞外基质 (ECM) 的合成、减少 ECM 的降解,诱导肾小管上皮细胞转分化,从而导致肾脏纤维化。因此,TGF- β 在 FSGS 中表达越高,促纤维化的作用就越强,FSGS 肾组织的肾小管间质病变就越重,就越容易使 FSGS 向终末期肾衰竭发展。

本研究中显示 HGF 主要在肾小管上皮细胞和肾间质中表达,在 FSGS 肾组织的肾小球系膜区和系膜细胞中也有部分表达。由于 HGF 的受体 c-Met 主要分布在近曲小管、髓袢的厚段和薄段以及集合管,HGF 以内分泌、自分泌和旁分泌的形式特异性作用于肾小管上皮细胞,因此检测时可能更多地发现它在肾小管上皮细胞表达。不管实验 1 组还是实验 2 组,HGF 表达的免疫组化指数均显著高于对照组,说明 HGF 在 FSGS 中的表达显著升高。由于 FSGS 的病理改变比对照组要严重,HGF 的高表达从一个方面也反映了 HGF 对肾脏的一种自我修复作用。HGF 的表达与肾小管间质的病变相关分析显示,实验 1 组 HGF 的表达显著高于实验 2 组,且与肾小管间质指数呈负相关,说明 HGF 在肾组织中表达越高,越不容易发生肾小管间质病变,如 HGF 表达降低,则可能出现不同程度的肾小管间质病变,说明 HGF 具有一定的抑制 FSGS 肾小管间质纤维化的作用。先前对 HGF 的各项研究也证实,HGF 具有抑制肾纤维化的作用^[5-6]。HGF 主要通过促使 ECM 的降解,抑制 EMT 和抑制肾小管上皮细胞的凋亡等多种途径来发挥其抗肾纤维化的作用^[7-9]。

HGF 与 TGF- β 两者间的研究发现,在肾脏损伤的早期,HGF 的表达增加,对肾脏起修复的作用。但随着损伤的持续存在,HGF 的表达逐渐下调,伴随

TGF- β 的表达增加。肾脏 HGF 水平与肾小管增生呈正相关,与肾脏 TGF- β 水平、ECM 聚积及肾小管凋亡呈负相关^[7-8]。在腺嘌呤致大鼠肾功能衰竭模型中,通过半定量分析不同阶段肾组织中 TGF- β 和 HGF 的表达,发现 HGF 和 TGF- β 在肾脏纤维化不同阶段的表达关系以及与肾组织损害的关系^[10]。本研究分析了 TGF- β 与 HGF 在 FSGS 肾组织中的表达,结果发现两者之间存在负相关,说明两者在 FSGS 肾小管间质纤维化的过程中发挥着相反的作用,TGF- β 具有促进肾小管间质纤维化的作用,而 HGF 具有抑制作用。

总之,本研究显示 TGF- β 和 HGF 在儿童 FSGS 肾组织中的表达增加。TGF- β 随着 FSGS 的发展,在肾组织中表达量不断增加,促使肾小管间质向纤维化发展;HGF 在 FSGS 表达增高,发挥保护肾脏和促进修复的作用,在一定程度上能抑制肾小管间质纤维化。

[参 考 文 献]

- [1] Abrantes MM, Cardoso LS, Lima EM, Silva JM, Diniz JS, Bambirra EA, et al. Predictive factors of chronic kidney disease in primary focal segmental glomerulosclerosis[J]. *Pediatr Nephrol*, 2006, 21(7):1003-1012.
- [2] Abrantes MM, Cardoso LSB, Lima EM, Silva JMP, Diniz JS, Bambirra EA, et al. Clinical course of 110 children and adolescents with primary focal segmental glomerulosclerosis[J]. *Pediatr Nephrol*, 2006, 21(7):482-489.
- [3] Fofi C, Pecci G, Galliani M, Comunian MC, Muda AO, Pierucci A, et al. IgA nephropathy: multivariate statistical analysis aimed at predicting outcome[J]. *J Nephrol*, 2001, 14(4):280-285.
- [4] Gagliardini E, Benigni A. Therapeutic potential of TGF- β inhibition in chronic renal failure[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2007, 7(3):293-298.
- [5] 安娜,刘惠兰. 肝细胞生长因子对肾保护作用的研究进展[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2007, 27(2):281-284.
- [6] 薛痕,樊均明,陈亮,李孜,胡章学,刘先蓉. 肝细胞生长因子负性调控细胞转分化在肾间质纤维化中的作用[J]. *中华肾脏病杂志*, 2005, 21(8):458-463.
- [7] Liu Y, Yang J. Hepatocyte growth factor: new arsenal in the fights against renal fibrosis? [J]. *Kidney Int*, 2006, 70(2):238-240.
- [8] Esposito C, Parrilla B, De Mauri A, Cornacchia F, Fasoli G, Foschi A, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) modulates matrix turnover in human glomeruli[J]. *Kidney Int*, 2005, 67(6):2143-2150.
- [9] 郭劲,张伯科. 肝细胞生长因子在肾脏生理和病理过程中的作用[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2007, 27(2):264-268.
- [10] 李暖,陈新德,杨达胜,赵得安,毕凌云. 肝细胞生长因子在大鼠肾小管间质纤维化中的表达及意义[J]. *新乡医学院学报*, 2006, 23(5):472-474.

(本文编辑:黄 榕)