

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.07.019

论著·临床研究

TGF- β 1 在儿童原发性 IgA 肾病肾损害中的临床意义

朱洪涛 茹凉 郭艳芳

(新疆医科大学第一附属医院儿科, 新疆 乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的** 探讨转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 在儿童原发性 IgA 肾病 (IgAN) 患儿肾损害中的临床意义。**方法** 选择 2008 年 5 月至 2012 年 10 月间经肾活检诊断为原发性 IgAN 的 30 例儿童为研究对象, 另 30 例健康儿童作为对照组。采用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 法检测其血和尿中 TGF- β 1 的浓度, 免疫组织化学法检查肾组织中 TGF- β 1 蛋白的表达, 并进行血、尿和肾组织中的 TGF- β 1 三者之间及其与各临床指标间的相关性分析。**结果** 原发性 IgAN 患儿血、尿的 TGF- β 1 均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。尿的 TGF- β 1 的表达与肾组织病理分级的严重性有关 ($r = 0.557, P = 0.001$); 肾脏组织中 TGF- β 1 的表达与肾组织病理分级密切相关, 且随着其病理分级的增加而增加 ($r = 0.682, P < 0.01$), 血液中 TGF- β 1 与肾脏组织中 TGF- β 1 的表达不相关 ($r = 0.038, P = 0.844$)。**结论** IgAN 患儿尿 TGF- β 1 的值与 IgAN 病理分级的严重程度相关, 临床检测尿 TGF- β 1 可能对评定慢性肾病进展及判断预后具有重要的实用价值。

[中国当代儿科杂志, 2014, 16(7): 749-753]

[关键词] 原发性 IgA 肾病; 转化生长因子 β 1; 病理分级; 儿童

Clinical significance of TGF- β 1 in children with primary IgA nephropathy

ZHU Hong-Tao, RU Liang, GUO Yan-Fang. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China (Guo Y-F, E-mail: ggyyff001@163.com)

Abstract: Objective To investigate the clinical significance of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) in children with primary IgA nephropathy (IgAN). **Methods** Thirty children who were diagnosed with primary IgAN by renal biopsy between May 2008 and October 2012 were included in the study. Thirty healthy children were used as the control group. Urinary and blood TGF- β 1 levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay, and the protein expression of TGF- β 1 in the renal tissue was measured by immunohistochemistry. The correlation between TGF- β 1 levels in blood, urine, and renal tissue and their relationship with clinical indices were analyzed. **Results** Children with primary IgAN had significantly higher urinary and blood TGF- β 1 levels than the control group ($P < 0.01$). Urinary TGF- β 1 level was positively correlated with the pathological grade of renal tissue ($r = 0.557, P = 0.001$), and a significant positive correlation was also found between the TGF- β 1 expression in the renal tissue and the pathological grade of renal tissue ($r = 0.682, P < 0.01$). There was no correlation between TGF- β 1 levels in blood and renal tissue ($r = 0.038, P = 0.844$). **Conclusions** Urinary TGF- β 1 level is significantly positively correlated with the pathological severity of disease in children with primary IgAN. Clinical measurement of urinary TGF- β 1 may be of great practical value in predicting the progression and prognosis of chronic nephropathy.

[Chin J Contemp Pediatr, 2014, 16(7): 749-753]

Key words: Primary IgA nephropathy; Transforming growth factor-beta 1; Pathological grade; Child

[收稿日期] 2013-11-17; [接受日期] 2014-02-13

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (编号 2010211A50)。

[作者简介] 朱洪涛, 女, 硕士, 主治医师, 讲师。

[通信作者] 郭艳芳, 女, 主任医师, 教授。

原发性IgA肾病(IgA nephropathy, IgAN)是最常见的原发性肾小球疾病之一,在我国其发病率占原发性肾小球疾病的26%~34%。既往认为该病进展缓慢,为良性病变,但研究显示约35%~40%的IgAN患儿在发病20年后进展到终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)^[1-2]。肾纤维化是各种慢性肾脏疾病通往ESRD的共同通路,转化生长因子 β 1(transforming growth factor β 1, TGF- β 1)是目前研究的热点,它是一种多功能的细胞因子,可促进系膜细胞(mesangial cell, MC)的增殖及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的聚积^[3]。其过度表达可通过多种途径,促进肾小球细胞增生,肾小球硬化,肾小管萎缩和肾间质纤维化,在肾脏损伤的发展过程中起着重要作用。无论是肾小球的硬化还是肾小管的纤维化都是反映肾功能下降严重程度和判断疾病预后的关键指标^[4]。原发性IgAN患儿TGF- β 1是如何变化的,以及如何可以阻止肾脏纤维化,进而减少ESRD的发生,是基础和临床医学研究面临的共同难题。本研究拟通过应用酶联免疫吸附法(ELISA)及免疫荧光的方法对健康儿童、原发性IgAN患儿血浆、尿液和肾组织中TGF- β 1进行检测和分析,结合其病理结果进行分级,旨在探讨TGF- β 1在IgAN患儿肾脏损伤的发生、发展过程中的临床意义,以期为临床预测原发性IgAN肾脏损害提供实验室依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2008年5月至2012年10月我院儿科共收治IgAN患儿30例,其中男15例,女15例;年龄6~14岁,平均 10.4 ± 2.4 岁。IgAN的病理诊断参照2008年IgAN牛津分型^[5]。另选取同期我院儿童保健门诊体检健康的30例儿童为对照组,其中男16例,女14例;年龄2~14岁,平均 6.4 ± 4.1 岁。两组间性别、年龄比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。研究对象均排除合并其他自身免疫性疾病、变应性疾病、肿瘤或其他原发及继发性肾小球疾病。

1.2 标本的采集

IgAN组于入院后第2天清晨空腹抽取肘前静

脉血3 mL,经3000 r/min离心20 min后,收集血清置于 -80°C 冰箱内保存;并留取清洁中段晨尿,置于普通试管内,经3000 r/min离心20 min后,仔细收集上清液2 mL于试管内,置于 -80°C 冰箱内保存。30例IgAN组患儿B超定位下肾穿刺活检,每例肾穿刺活检组织取出后分成2份,分别甲醛中固定及低温保存送检。肾活检组织标本均送至南京军区福州总医院病理科进行WHO病理分级。IgAN组患儿均在未治疗前留取血液、尿液及肾组织标本。对照组儿童于清晨空腹抽取肘前静脉血3 mL,并留取清洁中段晨尿,采集方法同前。本研究获得我院医学伦理委员会批准和知情同意。

1.3 血浆和尿液TGF- β 1浓度的测定

采用ELISA法测定血浆、尿液中TGF- β 1浓度,测定试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司,检测方法按说明书进行。

1.4 肾组织TGF- β 1蛋白的测定

采用组织免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶法(streptavidin peroxidase conjugated method, SP)检测肾组织TGF- β 1蛋白的表达。免疫组化染色方法应用兔TGF- β 1多克隆抗体,购自美国Proteintech Group Inc公司。具体操作方法如下:将肾组织常规包埋并制成石蜡切片,每例留取2~4张,常规脱蜡水化后,微波进行抗原修复,3%过氧化氢灭活30 min;磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,加封闭液室温孵育30 min后弃去,滴加适当稀释的抗TGF- β 1一抗(抗TGF- β 1 1:50), 4°C 过夜。PBS冲洗后,5 min \times 3次,滴加非生物素标记的二抗,室温孵育60 min;PBS冲洗后滴加酶标亲和素,室温孵育30 min;PBS冲洗后滴加DAB- H_2O_2 显色液,显微镜下检测显色,最后苏木素对比染色,常规脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。以0.01 mol/L PBS代替一抗、二抗和SP试剂作阴性对照。

1.5 图像分析

阳性结果染色呈棕黄色,用Image-Pro-Plus 5.0图象分析软件进行图象定量分析。对获取的免疫组化标本通过光学显微镜放大400倍摄取图像,每例肾小球数大于8个,肾小管随机视野10个,肾小管数均大于50个,对所选视野中的阳性信号进行图像分析。在免疫组化标本中,计算每个肾

小球阳性着色的面积及整个肾小球面积，其比值为TGF-β1在肾小球中的含量，并计算各例含量的均值，以此值代表其在肾小球中的相对含量^[6]。

1.6 统计学分析

采用SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析，计量资料集中趋势描述采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，两独立样本比较采用 *t* 检验；方差齐的多组间比较采用方差分析，多组间两两比较用SNK-*q* 检验，方差不齐的多组间比较采用Kruskal-Wallis *H* 法，多组间两两比较用Mann-Whitney *U* 检验；相关分析用直线相关及Spearman 等级相关分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IgAN 组和对照组血和尿 TGF-β1 水平的比较

IgAN 患儿血 TGF-β1 水平显著高于对照组 (*P* = 0.002)；尿液 TGF-β1 水平亦显著高于对照组 (*P* < 0.001)，见表 1。

表 1 IgAN 组与对照组血浆和尿液 TGF-β1 水平的比较 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

组别	例数	血 TGF-β1	尿 TGF-β1
对照组	30	0.43 ± 0.14	0.17 ± 0.09
IgAN 组	30	0.55 ± 0.16	0.32 ± 0.11
<i>t</i> 值		3.165	5.627
<i>P</i> 值		0.002	<0.001

2.2 IgAN 不同临床分型亚组血和尿 TGF-β 水平的比较

肾炎型组血 TGF-β1 水平高于对照组 (*U* = 3.0, *P* < 0.001)，其余各亚组与对照组相比差异均无统计学意义 (*P* > 0.05)。尿液中 TGF-β1 除单纯性血尿组与对照组比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05) 外，其余各组的表达与对照组比较差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。血 TGF-β1 组间两两比较：除蛋白尿组与肾炎组间差异有统计学意义外 (*P* = 0.038) 外，其余各组间比较差异均无统计学意义。尿 TGF-β1 组间两两比较结果示肾病综合

征组与单纯血尿组 (*P* = 0.010)，肾病综合征组与血尿、蛋白尿组 (*P* = 0.003) 间 TGF-β1 水平差异有统计学意义，其余各组间比较差异均无统计学意义，见表 2。

表 2 IgAN 不同临床分型亚组间血和尿液 TGF 水平的比较 ($\bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

组别	例数	血 TGF-β1	尿 TGF-β1
对照组	30	0.431 ± 0.136	0.171 ± 0.094
单纯血尿	4	0.492 ± 0.156	0.230 ± 0.026 ^c
血尿、蛋白尿	10	0.570 ± 0.190	0.284 ± 0.060 ^{ac}
蛋白尿	6	0.523 ± 0.121	0.303 ± 0.109 ^a
肾病综合征	6	1.036 ± 0.161	0.411 ± 0.102 ^a
肾炎型	4	0.714 ± 0.114 ^{ab}	0.382 ± 0.167 ^a
<i>H</i> 值		13.299	28.278
<i>P</i> 值		0.021	<0.001

注：a 为与对照组比较，*P* < 0.05；b 为与蛋白尿组比较，*P* < 0.05；c 为与肾病综合征组比较，*P* < 0.05。

2.3 肾组织 TGF-β1 表达与血和尿 TGF-β1 及血肌酐水平的相关性

患儿血 TGF-β1 与肾组织中 TGF-β1 蛋白的表达无明显相关 (*r* = 0.038, *P* = 0.844)；血 TGF-β1 水平与肾脏病理的严重程度 (*r* = 0.045, *P* = 0.814) 和临床进展指标血肌酐亦无明显相关 (*r* = -0.062, *P* = 0.637)。不同病理分级患儿血 TGF-β1 与血肌酐水平比较各组间差异无统计学意义 (*P* > 0.05)；而尿 TGF-β1 与肾组织 TGF-β1 表达阳性面积比较各组间差异有统计学意义 (均 *P* < 0.001)，其中 IgAN IV 级尿尿和肾组织 TGF-β1 表达均高于其他 3 组 (*P* < 0.05)，而其他 3 组间比较差异均无统计学意义 (*P* > 0.05)，见表 3。

IgAN 患儿肾组织 TGF-β1 蛋白的表达在肾小球内呈散在分布，主要见于系膜细胞、内皮细胞胞浆和毛细血管壁，也分布于肾小球细胞性新月体、部分肾间质细胞。如图 1A~D 所见，随着病理分级的加重，TGF-β1 在肾小球内的表达逐渐增强，肾组织 TGF-β1 阳性面积百分比逐渐增加。肾活检病理分级与尿 TGF-β1 水平 (*r* = 0.557, *P* = 0.001) 及肾组织中的 TGF-β1 蛋白表达均呈显著正相关 (*r* = 0.682, *P* < 0.001)，见图 2 和图 3。

表 3 不同病理分级患儿 TGF-β 1 和血肌酐水平的比较

病理分级	例数	(x̄ ± s)			
		血 TGF-β 1 (ng/L)	尿 TGF-β 1 (ng/L)	肾 TGF-β 1 阳性面积 (%)	血肌酐 (μmol/L)
IgAN I 级	4	0.47 ± 0.13	0.22 ± 0.07	11 ± 3	58 ± 18
IgAN II 级	10	0.57 ± 0.15	0.29 ± 0.08	15 ± 5	51 ± 27
IgAN III 级	12	0.59 ± 0.15	0.33 ± 0.11	19 ± 7	53 ± 28
IgAN IV 级	4	0.49 ± 0.28	0.46 ± 0.09 ^a	37 ± 8 ^a	42 ± 15
F 值		0.677	4.790	14.446	0.274
P 值		0.574	0.009	<0.001	0.714

注: a 为与 IgAN I 级、II 级及 III 级组比较, P<0.05。

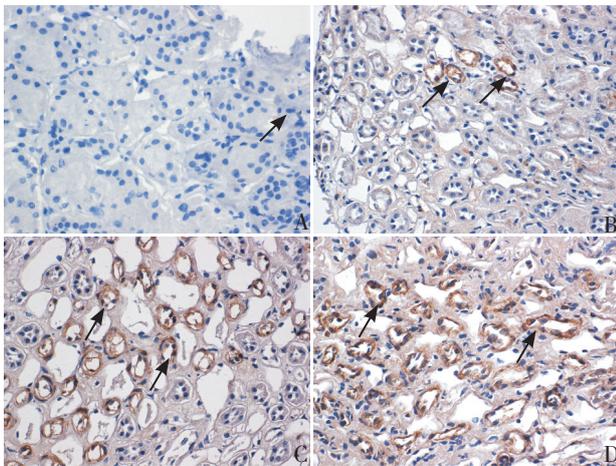


图 1 肾组织 TGF-β 1 表达 (×400) A~D 分别为 IgAN I 级、IgAN II 级、IgAN III 级和 IgAN IV 级, 随着病理分级的加重, 肾组织 TGF-β 1 表达逐渐增强。箭头所示为 TGF-β 1 阳性表达细胞。

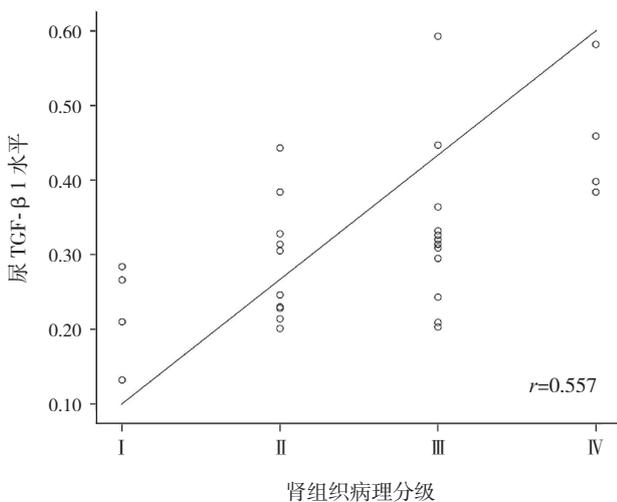


图 2 IgAN 患儿肾组织病理分级与尿中 TGF-β 1 水平之间的相关性

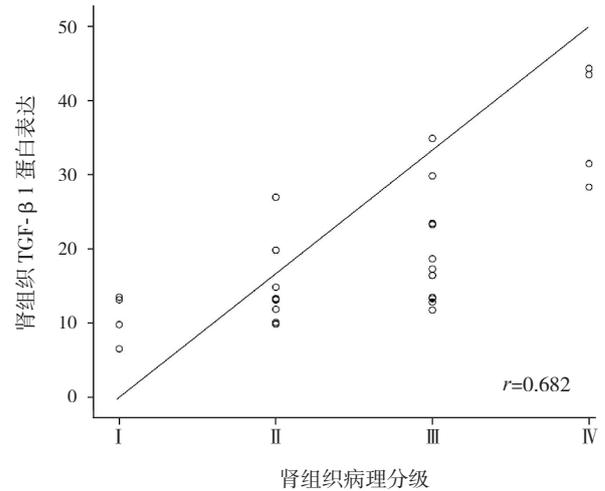


图 3 IgAN 患儿肾组织病理分级与肾组织中 TGF-β 1 表达之间的相关性

3 讨论

IgAN 是一组不伴系统疾病、在肾小球系膜区 IgA 或以 IgA 为主沉积的原发性肾小球疾病, 其终末期表现为肾小球的硬化和肾间质的纤维化。有研究显示肾小球硬化的病理特征是 MC 增殖和 ECM 增多, MC 具有产生 ECM 的功能, 而 ECM 对 MC 增殖具有反馈调节作用。ECM 的聚积又受到 TGF-β 1 调节, TGF-β 1 具有促进 MC 增殖和促进 ECM 蛋白的合成和沉积, 刺激肾小球硬化^[3]。TGF-β 1 的持续表达可导致慢性肾纤维化和肾小球硬化。国内研究显示 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^[7]。本研究检查 IgAN 患儿血液和尿液中 TGF 表达, 结果显示原发性 IgAN 患儿血液、尿液中 TGF-β 1 的表达水平与对照组有显著性差异, 说明 IgAN 患儿伴随着 MC 和系膜基质的集聚就可能伴随有 TGF-β 1 的产生。

由于 IgAN 是一种缓慢进展的疾病, 在临床研究发现高血压、肾功能损害、大量蛋白尿和肾小球硬化是 IgAN 发展的独立危险因素^[3]。尤其是蛋白尿的出现往往预示着疾病的进展。本研究检测 IgAN 不同临床分型血液和尿液中 TGF-β 1 的表达, 发现血液中 TGF-β 1 仅在肾炎型组高于正常对照组, 其他各组均无统计学意义。而尿液中 TGF-β 1 水平仅单纯血尿组与对照组比较无显著性差异, 而其他各组都有统计学意义, 尤其是有蛋白尿的患儿, 无论是临床分型是少量的有蛋

白尿还是肾病综合征型的大量蛋白尿的患儿尿液 TGF- β 1 水平与对照组比较均有显著性差异,这与文献报道相符合^[8]。血液 TGF- β 1 仅在肾炎型组高于正常对照组,而肾病综合征型组与正常对照组无显著性差异,与既往研究不符,考虑原因可能为:(1)本研究病例数过少,需要扩大样本量进一步研究证实;(2)肾脏受到损伤,可诱导肾组织局部细胞因子的增加,这些细胞因子经尿液排出,因此,尿液较血液更能反映肾组织局部细胞因子的状况及肾脏病变程度。研究显示在正常情况下,肾小球有微弱的 TGF- β 1 表达, IgAN 时, TGF- β 1 mRNA 及蛋白质的表达均增加。IgAN 患儿 TGF- β 1 基因的多态性表达与大量的蛋白尿和 MC 的增生有密切的关系^[9]。还有文献报道 IgAN 伴随着蛋白尿的患儿,尿 TGF- β 1 的水平是增加的,其原因为持续性蛋白尿的滤过致肾小管上皮细胞产生细胞因子从而刺激肾小管上皮 TGF- β 1 的产出。因此,尿 TGF- β 1 的水平与蛋白尿有一定的关系^[8]。本研究显示尿 TGF- β 1 要敏感于血 TGF- β 1 的检测,尿 TGF- β 1 的表达也随着临床表现加重而增加,提示尿 TGF- β 1 有助于判断治疗的效果及预后。

有关 IgAN 的研究显示,严重的病理分级也是预示疾病进展的独立危险因素^[10]。本研究显示伴随着病理分级的增加, IgAN 肾组织 TGF- β 1 阳性表达面积也逐渐增加,肾组织 TGF- β 1 的表达与病理分级有显著的相关性。肾活检病理分级与尿及肾组织中的 TGF- β 1 蛋白表达均呈显著正相关。尿中 TGF- β 1 的水平与肾脏病理改变的严重性和肾组织的 TGF- β 1 表达有相关性,提示尿 TGF- β 1 表达水平可作为判断 IgAN 组织学损害程度和预后的重要指标。研究显示 IgAN 组中尿 TGF- β 1 水平高于正常对照组,其中以系膜增生型和局灶节段型中的尿 TGF- β 1 水平升高明显,且随着 IgAN 系膜细胞增加和细胞外基质增加的程度加重,肾脏局部 TGF- β 1 的表达也增加^[11]。Wang 等^[12]对 IgAN 大鼠模型的研究显示洛沙坦治疗组的尿 TGF- β 1 表达低于未治疗组。Song 等^[13]研究显示尿 TGF- β 1 的表达可反映患者治疗后肾纤维化改善情况,可用于监测 IgAN 的治疗效果。在 IgAN 患儿肾组织 MC 的胞质中 TGF- β 1 的表达随着病理分级的增加而逐渐增加,但 V 级 IgAN 患儿

肾组织中几乎没有 TGF- β 1 的表达。本研究未发现病理改变是 V 级的患儿,可能是因为 IgAN 在儿童病理改变相对成人要轻。本研究中患儿发病时肾功能均基本正常,肾小球硬化和大量新月体形成的病例明显要少,是本研究的不足之处。

综上所述,原发性 IgAN 的患儿伴随肾脏病理改变的加重,肾脏组织中 TGF- β 1 的表达逐渐增加;尿液 TGF- β 1 的水平与肾脏病理分级相关,尿 TGF- β 1 水平是评价 IgAN 组织学损害程度和预后的重要指标。

[参 考 文 献]

- [1] Shen P, He L, Li Y, et al. Natural history and prognostic factors of IgA nephron pathy presented with isolated microscopic hematuria in Chinese patients [J]. *Nephron Clin Pract*, 2007, 106(4): c157-c161.
- [2] Yata N, Nakanishi K, Shima Y, et al. Improved renal survival in Japanese children with IgAN[J]. *Pediatr Nephrol*, 2008, 23(6): 905-912.
- [3] Pohl M. Risikofaktoren für den Verlauf der IgA-Nephropathie[J]. *Der Nephrologe*, 2011, 6(4): 340-341.
- [4] Strutz F, Okada H, Neilson EG. The role of the tubular epithelial cell in renal fibrogenesis[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2001, 5(2): 62-74.
- [5] Cattran DC, Coppo R, Cook HT, et al. The Oxford classification of IgAN: rationale, clinicopathological correlations, and classification[J]. *Kidney Int*, 2009, 76(5): 534-545.
- [6] 周莹. IgAN 患儿血、尿和肾组织中的 TGF- β 1 与临床病理的相关性研究 [D]. 温州医学院硕士学位论文, 2009.
- [7] 卫敏江, 吴伟岚, 陈敏怡. 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 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(8): 630-633.
- [8] Kalliakmani P, Nakopoulou L, Tsakas S, et al. Urinary interleukin-6 (IL-6) and transforming growth factor (TGF- β) levels in corticosteroid-treated patients with IgAN[J]. *Clin Nephrol*, 2011, 76(2): 144-150.
- [9] Goumenos DS, Tsakas S, El Nahas AM, et al. Transforming growth factor-beta(1) in the kidney and urine of patients with glomerular disease and proteinuria[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17(12): 2145-2152.
- [10] Shin GT, Kim SJ, Ma KA, et al. ACE inhibitors attenuate expression of renal transforming growth factor-beta1 in humans[J]. *Am J Kidney Dis*, 2000, 36(5): 894-902.
- [11] D'Amico G. Natural history of idiopathic IgAN and factors predictive of disease outcome[J]. *Sem Nephrol*, 2004, 24(3): 179-196.
- [12] Wang H, Fu W, Jin Z, et al. Advanced IgAN with impaired renal function benefits from losartan treatment in rats[J]. *Ren Fail*, 2013, 35(6): 812-818.
- [13] Song JH, Lee SW, Suh JH, et al. The effects of dual blockade of the renin-angiotensin system on urinary protein and transforming growth factor-beta excretion in 2 groups of patients with IgA and diabetic nephropathy[J]. *Clin Nephrol*, 2003, 60(5): 318-326.

(本文编辑: 王晓莉)