

血管内皮生长因子与紫癜性肾炎肾间质微血管损伤的关系

曾雪琪,许自川,党西强,何小解,易著文

(中南大学湘雅二医院小儿肾脏病研究室,湖南省小儿肾脏病临床中心,湖南 长沙 410011)

〔摘要〕 **目的** 探讨小儿紫癜性肾炎(HSPN)肾组织血管内皮生长因子(VEGF)表达与肾脏病理、肾间质微血管损伤的关系。**方法** 选取32名该院确诊的HSPN患儿为观察组,均符合中华医学会儿科学分会肾脏病学组修订的诊断标准,入院前未应用激素及其他免疫抑制剂,5例因肾外伤切除肾组织患者为对照组。所有肾脏标本进行常规苏木精-伊红染色,并进行微血管评分。免疫组化法检测VEGF及CD34的表达,以CD34作为微血管内皮细胞标志。计数微血管密度(MVD),分析肾脏VEGF表达与肾脏病理积分、微血管积分之间的关系。**结果** ①与对照组和病理分级Ⅱ级HSPN组相比,病理分级Ⅲ级及以上HSPN患儿肾脏微血管密度明显减低,并随病理分级的增加而减少,各组之间差异存在显著性。②与对照组相比,Ⅱ级HSPN组肾脏微血管评分无明显变化,Ⅲa、Ⅲb级、Ⅳ、Ⅴ级组肾脏微血管评分明显降低,随着病理分级的加重,肾脏微血管评分逐渐降低,各级之间差异有显著性($P<0.05$)。③与对照组相比,VEGF表达在病理分级Ⅱ级组表达较对照组升高($P<0.05$),而Ⅳ/Ⅴ级组则较对照组降低($P<0.05$),Ⅲa级、Ⅲb级组与对照组比较差异无显著性。HSPN组随着肾脏病理改变的加重,VEGF表达逐渐下降,各级之间比较差异有显著性($P<0.05$)。④Spearman相关性分析结果显示,肾组织VEGF表达与微血管密度变化一致,二者呈正相关,相关系数为0.953, $P<0.01$ 。**结论** VEGF表达减低可能参与了HSPN肾脏病理损害及微血管损害。
[中国当代儿科杂志,2009,11(9):717-721]

〔关键词〕 紫癜性肾炎;血管内皮生长因子;微血管损伤;儿童

〔中图分类号〕 R692.3⁺4 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008-8830(2009)09-0717-05

Expression of vascular endothelial growth factor is related to microvessel injury of renal interstitium in children with Henoch-Schönlein purpura nephritis

ZENG Xue-Qi, XU Zi-Chuan, DANG Xi-Qiang, HE Xiao-Jie, YI Zhu-Wen. Pediatric Nephropathy Institute, Second Xiangya Hospital, Central South University/Clinical Center of Pediatric Renal Disease in Hunan Province, Changsha 410011 (Dang X-Q, Email: happydang@tom.com)

Abstract: Objective To investigate the relationship between vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and microvessel injury of renal interstitium in children with Henoch-Schönlein purpura nephritis (HSPN). **Methods** Thirty-two children with HSPN and who had not received glucocorticoid or immunodepressants treatment before hospitalization were enrolled. Five children undergoing nephrectomy due to renal trauma were used as the control group. Renal samples were stained by hematoxylin and eosin and renal pathological changes were evaluated semi-quantitatively. CD34 and VEGF expression was detected by immunohistochemistry. CD34 was used as the marker for endothelial cells of renal microvessels. The microvessel density (MVD) was calculated by CD34 immunostaining. **Results** Compared with the control and the renal pathological grade II HSPN groups, MVD in the grade III and above HSPN groups decreased significantly, with an obvious reduction in MVD with the increased renal pathological grade ($P<0.05$). The renal microvessel score in the grades IIIa, IIIb, IV, and V HSPN groups decreased obviously compared with that in the control group. The renal microvessel score decreased with the increased renal pathological grade ($P<0.05$). VEGF expression in the grade II HSPN group was higher ($P<0.05$), while that in the grades IV and V HSPN group was lower than that in the control group ($P<0.05$). VEGF expression in the HSPN group showed a significant reduction with the increased renal pathological grade ($P<0.05$). There was a positive correlation between VEGF expression and MVD in renal tissue in the HSPN group ($r=0.935$, $P<0.01$). **Conclusions** The decreased expression of VEGF may be responsible for the renal pathological damage and microvessel injury in HSPN.
[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (9):717-721]

Key words: Henoch-Schönlein purpura nephritis; Vascular endothelial growth factor; Microvessel injury; Child

[收稿日期]2008-10-16;[修回日期]2008-11-24
[基金项目]国家自然科学基金(30500546),湖南省科技厅科技计划项目(06SK-3029-11)。
[作者简介]曾雪琪,女,硕士,医师。主攻方向:儿童肾脏病。现在江苏省扬州市第一人民医院儿科,邮编:225000。
[通讯作者]党西强,男,教授,中南大学湘雅二医院儿科,邮编:410011。

过敏性紫癜 (Henoch-Schönlein purpura, HSP) 是以小血管炎为主要病变的系统性血管炎。HSP 继发肾脏损害者称为紫癜性肾炎 (Henoch-Schönlein purpura nephritis, HSPN)。肾脏受累的程度是决定患者临床症状和预后的最主要因素^[1]。目前,对于肾脏病的研究国内外开始重视肾脏间质微血管在肾脏病发生及慢性化发展中所起的重要作用,认为血管损伤是慢性肾脏病早期事件之一^[2~5]。微血管损伤引起肾脏血管密度减少,导致肾组织血供不足,引起肾间质慢性缺血缺氧改变,导致小管间质纤维化。而血管损伤的初始因素是血管内皮细胞的损伤。血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是一种作用于血管内皮的丝裂原,通过与内皮细胞表面的特异性受体结合,诱导内皮细胞分裂、增生、迁移和形成管腔^[6],是血管发育成熟的病理生理过程中最主要的血管生成因子,也是功能极强的血管通透因子^[7,8],与血管内皮细胞的损伤与修复密切相关。已有研究发现,HSPN 患儿存在肾间质血管损害,且与肾小球、肾小管间质病变呈正相关^[9]。HSPN 作为一种继发性肾脏病,其发生发展过程中内皮细胞损伤与肾组织间质改变的研究也日渐受到瞩目。本研究以 HSPN 患儿为研究对象,检测 HSPN 患儿肾组织微血管密度的变化以及 VEGF 的表达,以探讨 VEGF 与 HSPN 肾脏微血管损伤之间的关系。

1 对象与方法

1.1 对象

所有病例均为中南大学湘雅二医院儿科 2006 年 1~10 月住院患儿,参照中华医学会儿科学分会肾脏病学组修订的多级儿童肾脏病研究中心 (ICK-DC) 标准^[10],经临床及病理诊断,全部入选病例均确诊为 HSPN。观察组共 32 例,其中男 19 例,女 13 例,年龄 4~15 岁,病程 7 d 至 2.1 年。正常对照组肾组织为我院泌尿外科住院的 5 例因肾外伤切除肾组织的患者,5 例患者均无肾脏病史,血压、血常规、尿常规、肝肾功能均正常,肉眼和光镜下未见肾脏病理学改变。

1.2 主要仪器和试剂

电热恒温三用水浴箱,微波炉,病理切片机,显微镜:日本产 NIKON ECLIPSE 400 型,数码相机为日本产 Nikon 3.34 MEGA PIXELS,微量移液器为 Labsystems 公司产品。0.1 M PBS (pH 7.2~7.4)、0.01 M 枸橼酸缓冲溶液 (pH 6.0)、多聚赖氨酸,即

用型 SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒购于中杉生物工程有限公司。兔抗人 VEGF 以及 CD34 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。二抗为羊抗兔多克隆抗体,购于北京中杉生物技术有限公司。

1.3 实验方法及步骤

1.3.1 免疫组化方法 肾组织 VEGF 和 CD34 表达的免疫组织化学检测采用 SABC 法进行。所用玻片经多聚赖氨酸预处理。肾活检组织常规石蜡包埋、切片 (4 μm)、脱蜡、脱水,山羊血清封闭,微波消化,加兔抗人 VEGF 或 CD34 (1:100) 单克隆抗体,4℃ 过夜,PBS 冲洗后,滴加生物素标记的羊抗兔二抗和辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,37℃ 分别孵育 20 min,DAB 显色,苏木素复染,封片。

1.3.2 染色切片图像分析 VEGF 表达采用 CMIAS 多功能真彩色病理分析系统 (由北京航空航天大学图像中心提供) 进行免疫组化分析。计算每张切片 10 个 400 倍视野下染色区域面积占整个肾组织面积的百分比,以均值表示每例肾组织阳性面积信号。肾微血管密度的计数方法参照 Weidner^[11] 的方法,每张切片中肾小球肾小管各取 3 个视野各计数 50 个细胞,取其平均值,无表达为 (-),表达细胞 <10% 为 (±),表达细胞 10%~30% 为 (+),表达细胞 >30% 为 (++) ,共分四级,分别计为 0,1,2,3 分。

1.3.3 肾微血管病理改变评分 参照血管炎病理变化特点及相关文献^[12],我们制定了肾脏微血管改变评分标准,对肾微血管病理改变进行评分。微血管病理评分标准:对 6 项病理指标即炎性细胞浸润、管壁增厚分层、透明样变、纤维化、洋葱样变、微血管密度进行病理记分,均为 0~3 分,标准如下:0 分,无;1 分,<25%;2 分,25%~50%;3 分,>50%。

①炎症细胞浸润 (病变血管占总血管面积的百分比);②管壁增厚分层 (管壁血管增厚的血管数占观察血管的百分比);③透明样变 (病变血管数占所观察血管的百分比);④管壁纤维化 (病变血管占观察血管的百分比);⑤洋葱样变 (病变血管数占观察血管数的百分比);⑥微血管密度 (减少的微血管占总观察血管数的百分比)。微血管病理分别按总体评 1 级,0~3 分;2 级,4~6 分;3 级,7~9 分;4 级,10~12 分;5 级,13~15 分;6 级,16~18 分。

1.4 数据处理

所有数据均采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计学处理。多组资料间和同组内比较采用单因素方差分析,相关性分析采用直线相关分析,以 $\alpha = 0.05$ (two tailed) 作为检验水准, $P < 0.05$ 为有显著性意义。

2 结果

2.1 不同病理分级 HSPN 患儿肾脏微血管密度比较

HSPN 组与对照组比较,微血管密度存在差异,见表1、图1。其中对照组与Ⅲa、Ⅲb 级以及Ⅳ、Ⅴ级组比较差异有显著性,而对照组与Ⅱ级组比较差异无显著性($P>0.05$);与对照组和Ⅱ级组相比,Ⅳ/Ⅴ级组微血管密度明显降低($P<0.01$),与Ⅲa、Ⅲb 级组相比,Ⅳ/Ⅴ级组微血管密度亦明显降低($P<0.05$)。

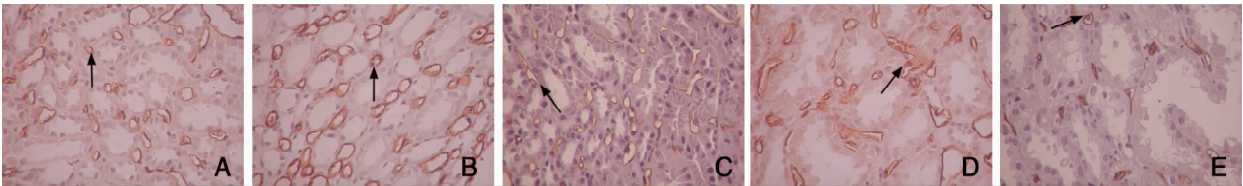


图1 各组肾间质微血管密度改变(×400,箭头所指为微血管) A:正常对照组,肾间质微血管主要分布在肾小管周围,密度正常;B:Ⅱ级 HSPN 患儿,肾间质微血管分布无明显改变,密度明显增加;C:Ⅲa 级 HSPN 患儿,肾间质微血管分布无明显改变,密度无明显增加;D:Ⅲb 级 HSPN 患儿,肾间质微血管分布无明显改变,密度无明显增加;E:Ⅳ级 HSPN 患儿,肾间质微血管密度显著减少。

2.2 不同病理分级 HSPN 患儿肾脏微血管评分比较

不同病理分级 HSPN 患儿肾脏微血管评分比较:与对照组相比,Ⅱ级 HSPN 组肾脏微血管评分无明显变化,Ⅲa、Ⅲb 级以及Ⅳ/Ⅴ级组肾脏微血管评分明显降低。HSPN 患儿肾脏微血管评分随着病理改变的加重,HSPN 肾脏微血管评分逐渐降低,各级之间差异有显著性($P<0.05$)(图2)。

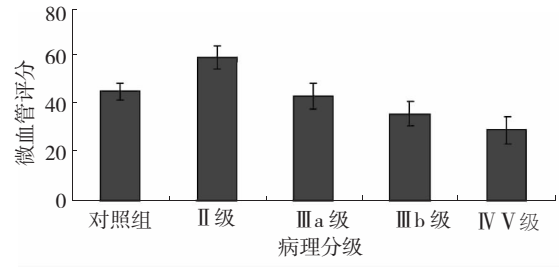


图2 不同病理分级 HSPN 患儿微血管评分

表1 不同病理分级 HSPN 患儿肾脏微血管密度比较

	例数	微血管密度
对照组	5	4.12 ± 0.34
Ⅱ级	8	5.42 ± 0.10
Ⅲa 级	7	3.09 ± 0.45 ^a
Ⅲb 级	10	3.00 ± 0.10 ^a
Ⅳ/Ⅴ级	7	1.21 ± 0.46 ^{b,c}
F 值		146.795
P 值		<0.01

a:与对照组和Ⅱ级组比较, $P<0.05$;b: $P<0.01$;c:与Ⅲa 和Ⅲb 级组比较, $P<0.05$

2.3 不同病理分级 HSPN 患儿肾脏 VEGF 表达

VEGF 表达在病理分级Ⅱ级组较对照组升高($P<0.05$),而在Ⅳ/Ⅴ级则较对照组降低($P<0.05$),Ⅲa 级、Ⅲb 级与对照组比较差异无显著性。随着病理改变的加重,VEGF 表达逐渐下降,各级之间比较差异有显著性($P<0.05$)(图3,图4)。

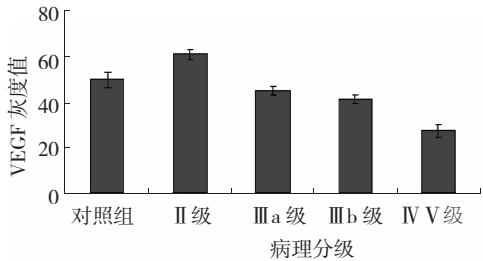


图3 不同病理分级 HSPN 患儿 VEGF 的表达

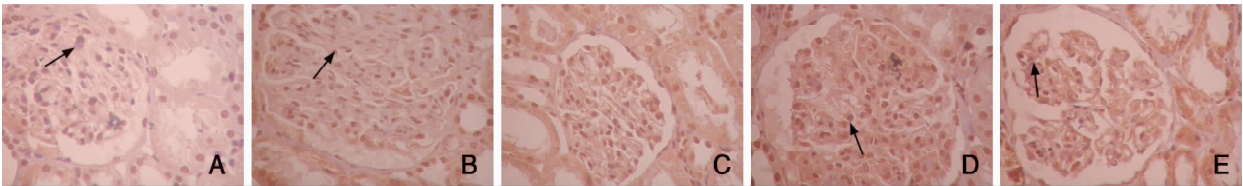


图4 各组肾组织 VEGF 表达(×400,箭头所指为阳性细胞) A:正常对照组,VEGF 主要表达在肾小球足细胞;B:Ⅱ级 HSPN 患儿,肾小球 VEGF 表达明显增加;C:Ⅲa 级 HSPN 患儿,肾小球 VEGF 表达无明显变化;D:Ⅲb 级 HSPN 患儿,肾小球 VEGF 表达无明显变化;E:Ⅳ级 HSPN 患儿,肾小球 VEGF 表达明显下降。

2.4 HSPN 肾脏 VEGF 表达与微血管密度相关性分析

Spearman 相关性分析结果显示,肾组织 VEGF 表达与微血管密度变化一致,二者呈正相关,相关系数为 0.953; $P < 0.01$ (图 5)。

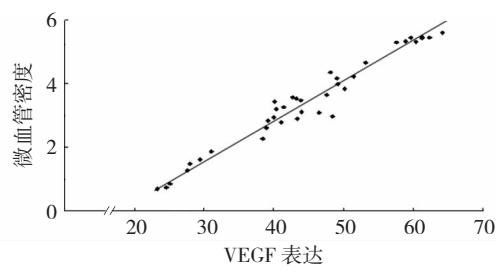


图 5 微血管密度与 VEGF 表达相关性分析

3 讨论

HSP 是儿童最常见的血管炎性疾病之一,主要累及皮肤、胃肠道及肾脏,发病机制尚不明确,一般认为是多种原因诱发的自身免疫功能失调而导致的自身免疫性疾病。目前,引起及决定肾脏损害的因素尚未明确。

微血管损伤在肾脏病的发生及慢性化中起了重要作用^[3,13],肾脏血管数目减少与功能丧失与肾小球硬化及间质纤维化高度正相关。而内皮细胞损伤是微血管发生发展的关键因素^[5]。在对人类糖尿病肾病及 IgA 肾病的研究中发现,微血管病变的发生程度与肾小管间质病变程度高度正相关,认为微血管病变是判断其预后的一个重要病理指标^[12]。本实验结果表明微血管密度在对照组与 HSPN 组之间有差异,HSPN 组间微血管密度的改变也存在差异,随肾脏病理分级的增加微血管密度减少,而Ⅲb 级微血管密度与正常对照组差异无显著性。HSPN 组肾间质微血管密度较正常对照组减少,且肾小球及肾小管-间质病理损害随着肾间质微血管密度的减少而加重,提示微血管损伤在 HSPN 的发生发展过程中占重要地位。考虑微血管损伤,肾小管周围毛细血管数目减少,血供不足导致肾小管间质慢性缺氧改变,引起肾间质炎性细胞浸润,释放炎性细胞因子及炎性介质,纤维细胞增生,小管上皮细胞的活化、凋亡,肾小管萎缩,加快肾间质纤维化进展。同时肾小管周围间质纤维化,肾小管周围毛细血管狭窄,血管阻力增加,又可导致肾小球血流量下降,进一步加重肾小球损害。

有学者认为肾组织内促血管生成因子如 VEGF

的减少是导致内皮损伤重要原因^[3]。VEGF 是一种特异性作用于血管内皮细胞的多功能细胞因子,生理状态下肾组织 VEGF 主要由肾小球脏层上皮细胞(足细胞)表达,集合管上皮细胞 VEGF 有弱表达。VEGF 能减少肾小球基底膜阴离子数目,诱导肾小球内皮细胞小窗形成,通过调节血管形成,在肾脏的正常发育和功能中起重要作用。Bailey 等^[14]研究发现在微小病变肾病患者肾组织内 VEGF mRNA 表达明显高于正常人群。在单侧输尿管结扎肾病大鼠模型早期局部 VEGF 表达增加,肾周毛细血管网处于明显增殖状态,一段时间后 VEGF 表达下降,肾周毛细血管网血管新生反应渐降至正常水平以下^[3]。提示 VEGF 下降可影响微血管对损伤的修复反应,可能参与肾脏病慢性进展。也有研究发现 HSP 患儿急性期血中 VEGF 表达增加,而恢复期表达较急性期降低,但明显高于正常组^[15,16]。本实验结果显示 VEGF 主要表达在肾小球脏层上皮细胞,肾小管亦有少量表达,与既往文献报道一致^[17];HSPN 组肾组织 VEGF 表达与正常组织有差异,且 HSPN 组间比较也有差异,HSPN 组随着病理改变的加重,VEGF 表达逐渐减少。VEGF 在 HSPN 组病理损害轻时肾组织表达高于对照组,而在损害较重时则低于对照组,但随着病理改变的加重,VEGF 表达逐渐减少;而 VEGF 随着肾小球、肾小管评分分级的改变与微血管密度的改变一致,二者呈正相关,说明 HSPN 组 VEGF 表达与微血管密度有关,VEGF 参与了 HSPN 肾脏血管损伤与修复的调节。推测在 HSPN 损伤较轻微时,肾组织局部的炎症反应引起肾小球脏层上皮细胞的破坏,细胞内储存的 VEGF 大量释放,浸润的肾小球巨噬细胞和激活的系膜细胞也可释放 VEGF,而大量释放的 VEGF 促使肾组织局部新生血管的形成,肾组织微血管密度增加。此时 VEGF 尚可参与肾组织血管内皮细胞的损伤修复。但 VEGF 分泌过多时,肾小球通透性增高,局部炎性渗出加重,又可损伤血管内皮细胞,加重病理损害。而当病理损害严重时,足细胞的破坏或晚期肾小球硬化都会使足细胞数量减少,功能障碍,不能合成生理状况下必需的较低水平的 VEGF,不足以完成血管内皮细胞的修复,血管内皮细胞数目减少,导致基底膜暴露,内源性凝血系统激活,纤维蛋白沉积,继而形成血管壁塌陷、节段硬化^[18-21]。肾间质血管损害加重,微血管密度下降,进而导致肾脏缺血,肾脏损害进一步加剧。Kang 等^[22]用 VEGF 治疗残余肾损伤模型大鼠,肾小球内皮细胞增加,肾脏纤维化程度减轻,肾功能改善,提示血管生成因子可

能为治疗肾脏疾病的新手段。

[参 考 文 献]

[1] 许自川,曾雪琪,党西强,何小解. Th1/Th2 迁移与紫癜性肾炎的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(1): 64-67.

[2] Ohashi R, Shimizu A, Masuda Y, Kitamura H, Ishizaki M, Sugisaki Y, et al. Peritubular capillary regression during the progression of experimental obstructive nephropathy[J]. Am Soc Nephrol, 2002, 13(7):1795-1805.

[3] Kang DH, Kangellis J, Hugo C, Truong L, Anderson S, Kerjaschki D, et al. Role of The microvascular endothelium in progressive renal disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(3):806-816.

[4] Kang DH, Anderson S, Kim YG, Mazzalli M, Suga S, Jefferson JA, et al. Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease[J]. Am J Kidney Dis, 2001, 37(3):601-611.

[5] Ohashi R, Kitamura H, Yamanaka N. Peritubular capillary injury during the progression of experimental glomerulonephritis in rats [J]. J Am Soc Nephrol, 2000, 11(1):47-56.

[6] Ferrara N, Gerber HO, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors[J]. Nat Med, 2003, 9(6):669-676.

[7] Gera N, Tzafra C, Stela G, Zoya P. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors[J]. FASEB J, 1999, 13(1):9-22.

[8] Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Vriese AS. The role of vascular endothelial growth factor(VEGF) in renal pathophysiology[J]. Kidney Int, 2004, 65(6):2003-2017.

[9] 张建江,易著文,何小解,杨华彬,丁娟娟,莫双红. 紫癜性肾炎患儿肾间质血管损害与临床的关系[J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(8):487-489.

[10] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组. 小儿肾小球疾病的临床分类、诊断及治疗[J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(12):746-749.

[11] Weidner N. Tumoural vascularity as a prognostic in cancer patients: the evidence continues to grow[J]. J Pathol, 1998, 184(2):119-122

[12] 吴杰,陈香美,师锁柱. 血管病变在1 005 例 IgA 肾病中的意义及其影响因素[J]. 中华医学杂志, 2003, 83(4):289-293.

[13] Ohashi R, Shimizu A, Masuda Y, Hiroshi K, Masamichi I, Yui-chi S, et al. Peritubular capillary regression during the progression of experimental obstructive nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(7):1795-1805.

[14] Bailey E, Bottomley MJ, Westwell S, Pringle JH, Furness PN, Feehally J, et al. Vascular endothelial growth factor mRNA expression in minimal change, membranous, and diabetic nephropathy demonstrated by non-isotopic in situ hybridization[J]. J Clin Pathol, 1999, 52(10):735-738.

[15] Topaloglu R, Sungur A, Baskin E, Besbab N, Saatci U, Bakkaloglu A, et al. Vascular endothelial growth factor in Henoch-Schönlein purpura[J]. J Rheumatol, 2001, 28(10):2269-2273.

[16] 张秋业,刘伟,雷珂,董增义. 过敏性紫癜患儿血浆可溶性细胞间粘附分子1 和血管内皮生长因子水平的变化[J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(6):454-455.

[17] Simon M, Rockl W, Horning C, Grone EF, Theis H, Weich HA, et al. Receptors of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor(VEGF/VPF) in fetal and adult human kidney: localization and VEGF binding site[J]. Am Soc Nephrol, 1998, 9(6):1032-1044.

[18] Kitamura H, Shimizu A, Masuda Y, Kitamura H, Shimizu A, Masuda Y, et al. Apoptosis in glomerular endothelial cells during the development of glomerulosclerosis in the remnant-kidney model [J]. Exp Nephrol, 1998, 6(4):328-336.

[19] Shimizu A, Kitamura H, Masuda Y, Ishizaki M, Sugisaki Y, Yamanaka N. Rare glomerular capillary regeneration and subsequent capillary regression with endothelial cell apoptosis in progressive glomerulonephritis[J]. Am J Pathol, 1997, 151(5):1231-1239.

[20] 张国珍,吴小川,易红,彭晓杰,党西强,何小解,等. 儿童紫癜性肾炎临床与病理相关性分析[J]. 中国当代儿科杂志,2007, 9(2):129-132.

[21] 章高平,党西强,易著文,何小解,张建江,吴小川,等. 肥大细胞在过敏性紫癜肾炎患儿肾间质纤维化中的作用[J]. 中国当代儿科杂志,2007,9(2):125-128.

[22] Kang DH, Hughes J, Mazzali M, George FS, Richard JJ. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function[J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(7):1448-1457.

(本文编辑:吉耕中)