

人系膜增生性肾小球肾炎中转化生长因子 β_1 在肾纤维化中的作用

刘江¹, 梁华¹, 刘长生¹, 贾金康¹, 翁红雷², 陈佳兮¹

(1. 浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009; 2. 浙江大学医学院附属第一医院, 浙江 杭州 310003)

[摘要] 目的: 探讨转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 在人系膜增生性肾小球肾炎 (MsPGN) 患者肾组织中对 I、Ⅲ、IV 型胶原的影响及在肾纤维化中的作用。方法: 采用免疫组织化学技术、天狼猩红染色偏振光法及计算机图像分析系统, 观测 31 例 MsPGN 患者肾组织中 TGF- β_1 的表达和 I、Ⅲ、IV 型胶原的分布, 分析它们之间的相互关系。结果: MsPGN 患者随着肾纤维化的加重, 在肾小球增生扩张系膜中 IV 型胶原明显增加, 并出现了 I、Ⅲ型胶原; 在肾间质中 TGF- β_1 和 I、Ⅲ、IV 型胶原的表达明显增加, 且以 Ⅲ、IV 型胶原的增加为主。TGF- β_1 与肾间质中 I、Ⅲ、IV 型胶原呈正相关 ($r=0.82, 0.92, P<0.01$), 与 I/Ⅲ、I/IV、Ⅲ/IV 呈负相关 ($r=-0.83, 0.92, P<0.001$)。结论: 在 MsPGN 中 TGF β_1 的过度表达和 I、Ⅲ、IV 型胶原的增加与肾小球和肾小管纤维异常分布关系密切, 可能是其导致肾小球硬化和肾间质纤维化的主要机理之一。

[关键词] 肾小球肾炎, 膜增生性/病理学; 转化生长因子 β ; 胶原

[中图分类号] R 692.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2004)01-0046-05

Expression of transforming growth factor- β_1 in renal fibrosis of human mesengial proliferative glomerulonephritis

LIU Jiang, LIANG Hua, LIU Chang-sheng, et al (*The Second Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China*)

[Abstract] **Objective:** To explore the possible effect of transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) on the development of renal fibrosis in human mesengial proliferative glomerulonephritis (MsPGN). **Methods:** Immunohistochemistry method, sirius red staining polarization microscopy and the computer imaging analysis system were used to detect the expression of TGF- β_1 , the distribution of collagen I, collagen Ⅲ and collagen IV. **Results:** In MsPGN with renal fibrosis, collagen IV was increased markedly, and collagen I and collagen Ⅲ appeared in the expanded mesengial matrix abnormally. Collagen Ⅲ and collagen IV were increased markedly in tubulointerstitium. TGF- β_1 expression was positively correlated with the expression of collagen I, collagen Ⅲ and collagen IV in tubulointerstitium ($r=0.82, 0.92, P<0.01$), and negatively correlated with I/Ⅲ, I/IV and Ⅲ/IV ($r=-0.83, -0.92, P<0.001$). **Conclusion:** Abnormal increase of TGF- β_1 may be one of the important factors asso-ciated with glomerular sclerosis and tubulointerstitial fibrosis through the increment and abnormal distribution of collagen I, collagen Ⅲ and collagen IV.

[Key words] Glomerulonephritis, membrano proliferative/patho; Transforming growth factor beta; Collagen

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2004, 33(1): 46-50.]

人系膜增生性肾小球肾炎 (MsPGN) 是最常见的肾小球疾病之一, 也是导致肾纤维化的重要原因。肾纤维化的特点是 I、Ⅲ 和 IV 型胶原, 纤维连接蛋白和各种蛋白聚糖等在肾组织基底膜和肾间质不恰当的积聚和分布, 导致正

常组织结构破坏, 肾功能丧失^[1]。许多细胞因子

收稿日期: 2002-03-11 修回日期: 2003-11-25

基金项目: 浙江省卫生厅资助。

作者简介: 刘江 (1968-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事肾纤维化的研究。

与肾纤维化的发展有关,尤其是转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 在诸多因素中起中心调节作用。本研究旨在通过对 TGF- β_1 与 I、Ⅲ和Ⅳ型胶原在 MsPGN 中量和分布状况的观察,分析 TGF- β_1 与 I、Ⅲ和Ⅳ型胶原的关系,探讨它们与肾纤维化的关系。

1 材料和方法

1.1 病例选择 在 2000 年 1 月至 2001 年 1 月本科住院经病理确诊为原发性 MsPGN 的 49 例患者中,选取 31 例临床资料较完整及肾活检标本保留充足的患者作为研究对象。收集同时期本院泌尿外科无高血压、无高血糖且尿常规正常的 5 例肾肿瘤患者,取其远离肿瘤的正常肾组织为对照组标本。全部标本经 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋,切片厚度 4 μm 。切片经 HE、PAS、PASM 和 Massou 三色染色。

1.2 MsPGN 的病理分型^[2] 轻度:增生的系膜宽度不超过毛细血管的直径,毛细血管呈开放状,无挤压现象。中度:增生的系膜宽度超过毛细血管的直径,毛细血管呈现轻重不等的挤压现象。重度:增生的系膜在弥漫性指状分布的基础上,呈团块状聚集,系膜基质明显增多,在团块状增生聚集的部位,毛细血管结构破坏,血管消失。

1.3 肾小管间质损害的病理分级^[3] I 级:间质基本正常,轻度小管变性、扩张;Ⅱ级:间质纤维化和小管萎缩 < 20%,散在炎症细胞浸润;Ⅲ级:间质纤维化和小管萎缩达 30%~40%,散在和/或弥漫性炎症细胞浸润;Ⅳ级:间质纤维化和小管萎缩 50% 以上,散在和/或弥漫性炎症细胞浸润。各病例的肾小球系膜增生程度与肾小管间质改变程度关系详见表 1。

1.4 免疫组织化学检查 采用免疫组织化学 SP 法检测。石蜡切片常规脱蜡水化后,以 3% 过氧化氢灭活 20 min,微波进行抗原修复 10 min,10% 正常山羊血清封闭 30 min,分别滴加适当稀释的第一抗体(抗 TGF- β_1 1 : 50;抗Ⅳ型胶原 1 : 50)后,4℃ 过夜。滴加生物素标记的第二抗体,再加辣根过氧化物酶(HRP)标记链酶亲和素,37℃ 孵育 30 min,滴加 DAB-H₂O₂ 显色液,显微镜下检测显色,最后苏木素对比染

色,常规脱水,透明封片。以上各步骤间均以 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。对照组均以 PBS 液替代一抗。药盒均由北京中山公司提供。

表 1 MsPGN 中肾小球系膜增生程度和肾小管间质改变程度的关系

Table 1 The relationship between glomerular mesengial proliferation and renal tubulointerstitial changes

Pathologic type	n	Classification of renal tubulointerstitial changes (case)				
		normal	I	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ
Slight	9	6	2	1		
Middle	12	0	1	11		
Severe	10	0	0	0	10	

1.5 天狼猩红染色偏振法检测 I、Ⅲ型胶原 石蜡切片常规脱蜡水化后,在天狼猩红液浸染 25 min,常规脱水,透明封片。在偏光镜下 I 型胶原呈亮红色及橘红色,Ⅲ型胶原呈绿色。

1.6 图像分析 采用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文报告分析系统(同济医科大学清屏影象公司),通过光学显微镜放大 200 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 100 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,以两者的比值表示每种成分在肾小球中的含量,计算每例切片上所有肾小球各比值的均值,以此值代表此例患者某种成分在肾小球中的相对含量。同样,计算每个视野中肾小管间质阳性着色的面积及整个肾小管面积,取其均值代表此例患者某种成分在肾小管间质的相对含量。天狼猩红染色标本在偏光镜下取相应颜色的面积进行计算,方法同免疫组化标本。

1.7 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件包,多组间比较采用秩和检验,TGF- β_1 与各型胶原间关系采用直线相关分析。取双侧, $P < 0.05$ 为统计学差异有显著性。

2 结 果

2.1 正常肾脏中 TGF- β_1 和 I、Ⅲ及Ⅳ型胶原分布 正常肾脏的肾小球系膜中无 TGF- β_1 , 在

皮质部的肾间质中,可见少量的 TGF-β₁。Ⅰ、Ⅲ型胶原主要分布于肾间质,肾小球包曼氏囊壁含少量Ⅰ、Ⅲ型胶原,系膜中无Ⅰ、Ⅲ型胶原,Ⅳ型胶原主要分布于肾小球、肾小管基底膜及包曼氏囊壁和系膜区,在肾间质中偶可见散在分布,肾小管上皮细胞中缺如。

2.2 不同 MsPGN 中 TGF-β₁ 和Ⅰ、Ⅲ及Ⅳ型胶原的变化 正常及不同程度 MsPGN 在肾小球和肾小管间质中 TGF-β₁ 和Ⅰ、Ⅲ及Ⅳ型胶原的变化详见表 2、表 3。在中度 MsPGN 时,肾小球和肾小管上皮开始表达 TGF-β₁,随着 MsPGN 的加重,这种表达逐渐明显,而且肾小球中出现Ⅲ型及Ⅰ型胶原,并逐渐增加(尤以Ⅲ型胶原更明显),超过Ⅳ型胶原的增加($P <$

0.05);相反,在肾小管及间质随着 MsPGN 的加重,Ⅳ型胶原出现,并比Ⅲ型、Ⅰ型胶原增加更明显($P < 0.01$)。在重度 MsPGN 患者肾组织中肾小球和肾小管上皮 TGF-β₁ 表达明显增加(图 1A、图 2A);肾小球和肾小管间质Ⅰ、Ⅲ型胶原表达明显增加(图 3A、B);肾小球和肾小管Ⅳ型胶原表达明显增加(图 1B、图 2B)。

2.3 TGF-β₁ 与Ⅰ、Ⅲ和Ⅳ型胶原的相关性 MsPGN 肾小球和肾小管间质中 TGF-β₁ 与Ⅰ、Ⅲ和Ⅳ型胶原表达呈正相关(表 4)。

2.4 TGF-β₁ 与Ⅰ/Ⅲ、Ⅰ/Ⅳ和Ⅲ/Ⅳ的相关性 MsPGN 肾小球和肾小管间质中 TGF-β₁ 与Ⅰ/Ⅲ、Ⅰ/Ⅳ和Ⅲ/Ⅳ表达呈负相关(表 5)。

表 2 正常及 MsPGN 肾小球中 TGF-β₁ 和Ⅰ、Ⅲ和Ⅳ型胶原含量及其比值

Table 2 The quantity and ratio of TGF-β ₁ ,collagen Ⅰ,Ⅲ and Ⅳ in glomeruli of control and MsPGN (Median,P ₂₅ ~P ₇₅)								
Group	n	TGF-β ₁	Ⅳ	Ⅰ	Ⅲ	Ⅰ/Ⅲ	Ⅰ/Ⅳ	Ⅲ/Ⅳ
Control	5	0	7.3 (6.7~8.0)	4.6 (4.4~5.2)	4.0 (4.0~4.3)	1.1	0.6	0.5
Slight	9	0	10.0 (8.2~10.3)	7.8 (6.7~8.4)	6.9 (5.9~7.2)	1.1	0.8	0.7
Middle	12	2.2* (1.7~3.1)	19.7** (18.1~20.7)	11.6** (11.1~13.0)	14.7** (13.3~15.5)	0.8**	0.6	0.8*
Severe	10	6.7** (5.6~7.3)	30.3** (27.7~33.2)	19.2** (17.2~23.0)	22.9** (20.8~25.0)	0.9**	0.6	0.7*

vs control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表 3 正常及 MsPGN 肾小管中 TGF-β₁ 和Ⅰ、Ⅲ及Ⅳ型胶原型胶原含量及其比值

Table 3 The quantity and ratio of TGF-β ₁ ,collagen Ⅰ,Ⅲ and Ⅳ in renal tube of control and MsPGN (Median,P ₂₅ ~P ₇₅)								
Group	n	TGF-β ₁	Ⅳ	Ⅰ	Ⅲ	Ⅰ/Ⅲ	Ⅰ/Ⅳ	Ⅲ/Ⅳ
Control	5	0.2 (0.2~0.3)	0.1 (0.1~0.2)	6.0 (5.0~6.6)	5.6 (4.5~5.8)	1.1	43.9	40.3
Slight	9	0.6 (0.5~0.6)	1.0 (1.0~1.5)	7.9 (7.2~9.3)	6.5 (6.3~8.2)	1.2	7.7	6.9
Middle	12	3.7* (3.0~4.8)	3.5* (2.1~3.7)	9.2* (9.0~13.5)	10.9* (9.3~12.1)	0.8*	1.4*	3.1*
Severe	10	8.2* (6.2~9.2)	11.5* (10.4~12.6)	17.2* (16.4~20.7)	27.4* (23.5~30.0)	0.6*	1.5*	0.3*

vs control group,* $P < 0.01$

表 4 MsPGN 中 TGF-β₁ 与Ⅰ、Ⅲ和Ⅳ型胶原的相关性

Table 4 Correlation of TGF-β ₁ ,collagen Ⅰ,Ⅲ and Ⅳ in MsPGN (r,n=31)						
TGF-β ₁	Renal tubes			Glomeruli		
	Ⅳ	Ⅰ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅰ	Ⅲ
Renal tubes	0.886*	0.826*	0.862*	0.872*	0.833*	0.851*
Glomeruli	0.920*	0.855*	0.922*	0.913*	0.870*	0.890*

* $P < 0.001$

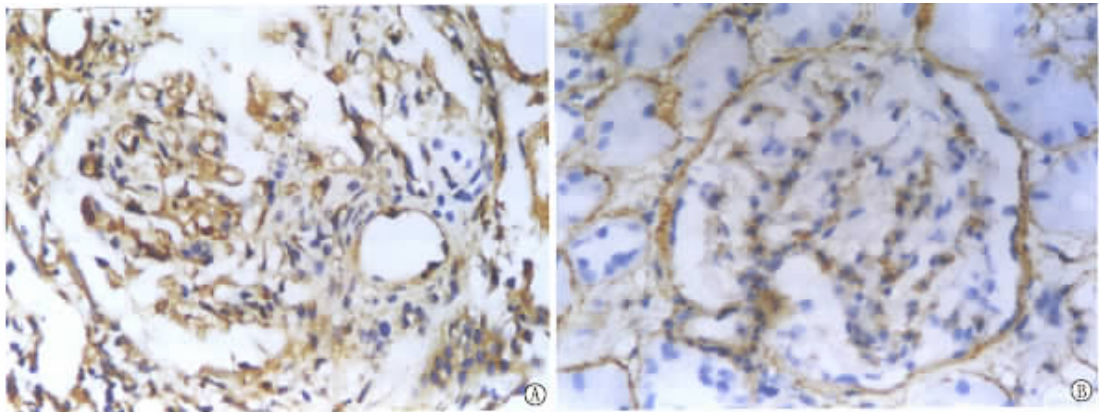


图 1 重度 MsPGN 中 TGF- β_1 和Ⅳ型胶原在肾小球中的表达

Fig. 1 Expression of TGF- β_1 and collagen Ⅳ in glomeruli in severe MsPGN (SP)×400
A: TGF- β_1 ; B: collagen Ⅳ

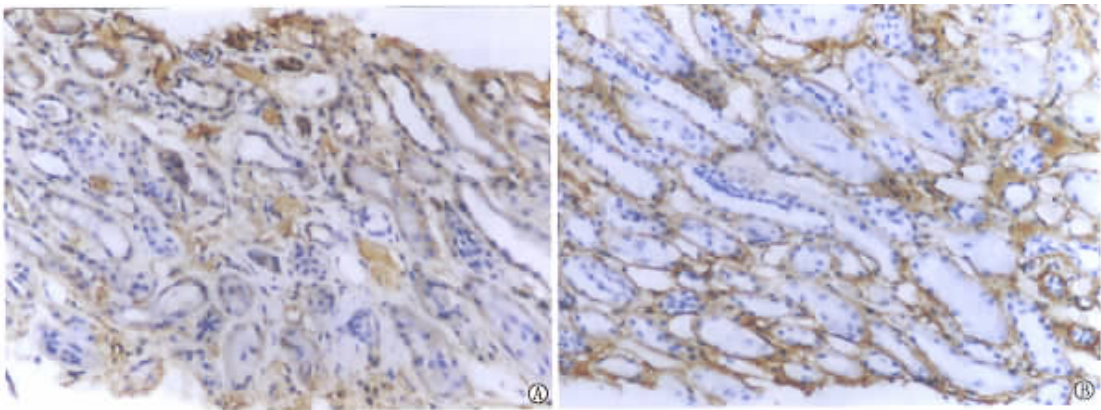


图 2 重度 MsPGN 中 TGF- β_1 和Ⅳ型胶原在肾小管中的表达

Fig. 2 Expression of TGF- β_1 and collagen Ⅳ in renal tubes in severe MsPGN (SP)×200
A: TGF- β_1 ; B: collagen Ⅳ

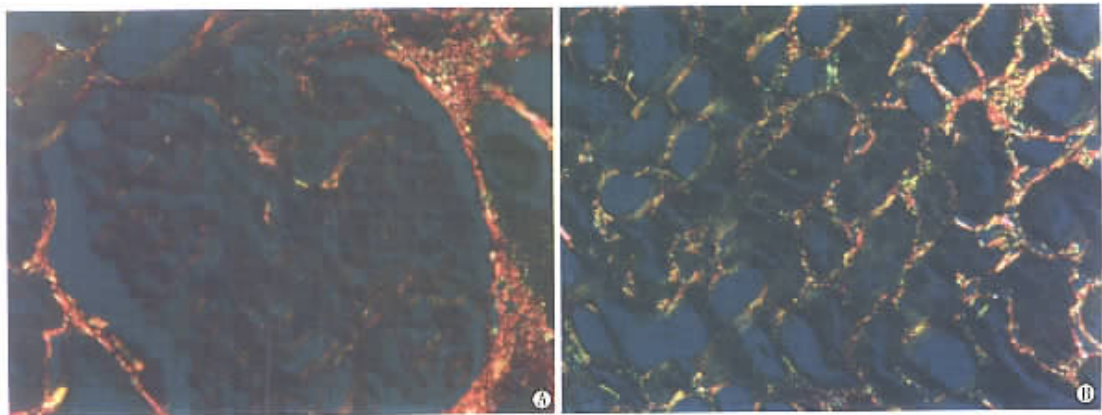


图 3 重度 MsPGN 中Ⅰ型和Ⅲ型胶原的表达

Fig. 3 Expression of collagen Ⅰ and Ⅲ in severe MsPGN (SR)
A: in glomeruli ×400; B: in renal tubes ×200; red: collagen Ⅰ; green: collagen Ⅲ

表 5 MsPGN 中 TGF-β₁ 与 I / Ⅲ、I / IV 和 Ⅲ / IV 的相关性

Table 5 Correlation of TGF-β₁,collagen I / Ⅲ, I / IV and Ⅲ / IV in MsPGN

(*r*, *n* = 31)

TGF-β ₁	Renal tubes			Glomeruli	
	I / Ⅲ	I / IV	Ⅲ / IV	I / Ⅲ	I / IV
Renal tube	-0. 830 *	-0. 886 *	-0. 836 *	-0. 687 *	-0. 420 * * *
Glomeruli	-0. 922 *	-0. 901	-0. 914 *	-0. 719 *	-0. 478 * *

* *P* < 0. 001 ** *P* < 0. 001 *** *P* < 0. 02

上述结果显示 TGF-β₁ 不仅与 I、Ⅲ和 IV 型胶原表达是相关的,而且与各成份增加的比例有相关性。肾脏 TGF-β₁ 增加时,肾小管中 Ⅲ 型胶原增加多于 I 型胶原,而 IV 型胶原的增加比 Ⅲ 型胶原增加更明显;肾小球中 Ⅲ 型胶原增加多于 I 型,更多于 IV 型胶原,显示 TGF-β₁ 与肾小球、肾小管胶原纤维的异常分布关系密切。

3 讨 论

肾纤维化可分为肾小球硬化和肾小管间质纤维化。肾小球细胞外基质(ECM)积聚是肾小球疾病发展至肾小球硬化的主要病理基础。ECM 的主要成分是胶原纤维(I、Ⅲ、IV 型胶原)、非胶原性糖蛋白(层黏连蛋白、纤维连接蛋白等)、弹性蛋白、蛋白多糖和氨基聚糖。有作者认为一旦肾小球系膜出现 I 型、Ⅲ 型胶原,可称之为肾小球纤维化形成^[4],这一观点强调了胶原异常分布的重要性。本实验观察到在中度 MsPGN 时,增生扩张的系膜中开始出现少量 TGF-β₁ 和 I、Ⅲ 型胶原,以及 IV 型胶原明显增加;在重度 MsPGN 时,系膜中 TGF-β₁ 和 I、Ⅲ、IV 型胶原显著增加,毛细血管受到挤压或闭塞,滤过面积减少,并且肾小管间质病变也随 MsPGN 的程度而加重。当 MsPGN 加重时,肾小球中 Ⅲ 型胶原增加比 I 和 IV 型胶原更明显(I / Ⅲ 值下降,Ⅲ / IV 值升高),而肾小管中 Ⅲ 型胶原增加比 I 型胶原明显,但低于 IV 型胶原的增加(I / Ⅲ、Ⅲ / IV 值下降)。上述结果支持肾小球系膜出现 I 型、Ⅲ 型胶原与肾纤维化密切相关和肾小球系膜增生程度与肾小管间质改变相关的观点^[5],更突出了 Ⅲ、IV 型胶原变化的重要性。研究表明,MsPGN TGF-β₁ 表达增强与胶原的增加程度密切相关^[6]。细胞因子白介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF)、血小板源生长因子(PDGF)、纤溶酶元激活物抑制剂(PAI-1)、

血管紧张素 Ⅱ(AT Ⅱ)均通过 TGF-β₁ 的中心调节而起作用^[7,8]。TGF-β₁ 刺激肾小球系膜细胞增生,使其分泌 I、Ⅲ 和 IV 型胶原及纤维连接蛋白,增强细胞表面的 ECM 结合受体整合素的表达,促进基质的黏附和沉积。同时,系膜细胞本身也可以分泌 TGF-β₁,进一步促进系膜细胞异常增殖,造成恶性循环。动物实验也表明,利用脂质体将 TGF-β₁cDMA 经肾动脉导入正常鼠的肾脏后,同侧肾脏肾小球 TGF-β₁ 蛋白表达增加,于一周内发生肾小球硬化或纤维化,而对侧的肾小球则无病变^[9]。本实验结果提示肾脏 I、Ⅲ 和 IV 型胶原增生与 TGF-β₁ 间关系密切,检测 TGF-β₁ 和 I、Ⅲ 及 IV 型胶原,尤其注意观察肾小球中 Ⅲ 型胶原和肾小管 IV 型胶原的变化,将有助于肾纤维化的早期诊断。

本实验观察到中重度 MsPGN 患者,均有肾小管间质纤维化发生(I 级 1/12,Ⅱ 级 11/12),同时 TGF-β₁ 增多以及 I、Ⅲ 和 IV 型胶原异常分布和增多。这为检测 TGF-β₁ 和 I、Ⅲ 及 IV 型胶原来早期诊断肾纤维化的发生提供了依据。本实验所采用的 TGF-β₁ 和 IV 型胶原的检测方法均为方便、简捷的免疫组化法;I、Ⅲ 型胶原的检测既有双标法免疫组化方法的优点,又有双标法操作简单、试剂便宜的优势。

References:

[1] KASUGA H, ITO Y, SAKOONOTO S, et al. Effects of anti-TGF-beta type Ⅱ receptor antibody on experimental glomerulonephritis [J]. *Kidney Int*, 2001, 60(5):1745—1755.

[2] ZHOU Wan-zhong (邹万忠). *Renal Pathology and Renal Diseases (肾脏病理与临床)* [M]. Changsha: Hunan Science Publishing Company, 1993: 46—47. (in Chinese)

with diabetes mellitus [J]. **Kidney Int**, 1996, 49(4): 1120—1126.

[3] YE Xun, LI Hong (叶 迅, 李 红). A study of TGF- β_1 , vimentin and desming gene expression in the renal cortex of diabetic rats during the early diabetic period [J]. **Journal of Zhejiang University: Medical Sciences (浙江大学学报:医学版)**, 2004, 34(1): (in Chinese)

[4] ISOGAI S, MOGAMI K, SHIINA N, et al. Initial ultrastructural changes in pore size and anionic sites of the glomerular basement membrane in streptozotocin-induced diabetic rats and their prevention by insulin treatment [J]. **Nephron**, 1999, 83(1): 53—59.

[5] FAN Wu-qiang, LI Hong, CAI Wei-min (范吴强, 李红, 蔡为民). Study on TGF- β_1 mRNA transcription of peripheral blood mononuclear cell in type 2 diabetic patients with nephropathy [J]. **Chinese Journal of Endocrinology and metabolism (中华内分泌代谢杂志)**, 2001, 17(6): 341—343. (in Chinese)

[6] KORPINEN E, GROOP P H, FAGERUDD J A, et al. Increased secretion of transforming growth factor- β_1 by PBMC from patients with type1 diabetes mellitus with diabetic nephropathy [J]. **Diabet Med**, 2001, 18(2): 121—125.

[7] REINHOLD D, ANSORGE S, SCHLEICHER E D, et al. Elevated glucose levels stimulate TGF- β_1 suppress IL-2, IL-6, and IL-10 production and DNA synthesis in peripheral blood mononuclear cells [J]. **Horm Metab Res**, 1996, 28(6): 267—270.

[8] ISSHIKI K, HANEDA M, KOYA D, et al. Thiazolidione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin action in diabetic rats [J]. **Diabetes**, 2000, 49(6): 1022—1032.

[责任编辑 黄晓花]



(上接第 50 页)

[3] LIU Hong, LI Lei-shi (刘 红, 黎磊石). Tubulointerstitial change in primary mesengial proliferative glomerulonephritis [J]. **Chinese Journal of Internal Medicine (中华内科杂志)**, 1992, 3(1): 52—55 (in Chinese)

[4] WANG Hai-yan (王海燕). **Nephrology (肾脏病学)** [M]. 2nd Edition, Beijing: People Health Press, 1996: 446. (in Chinese)

[5] ZHOU Wei, CHEN Nan (周 伟, 陈 难). The relationship between mesengial proliferative glomenulonephritis and changes in glumoranotubulointerstitial [J]. **Clinical Journal of Pediatrics (实用小儿临床杂志)**, 2000, 15(5): 269—270. (in Chinese)

[6] MO W, BRECKLINC, GARBER S, et al. Changes in collagenases and TGF-beta precede structural alterations in a model of chronic renal fibrosis [J]. **Kidney Int**, 1999, 56(1): 145—153.

[7] FAN J M, NG Y Y, HILL P A, et al. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro [J]. **Kidney Int**, 1999, 56(4): 1455—1467.

[8] DONG De-chang (董德长). **Clinical Nephrology (实用肾脏病学)** [M]. Shanghai: Shanghai Science Publishing Company, 1999: 425—428. (in Chinese)

[9] ISAKA Y, FUJIWARA Y, UEDA N. et al. Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta of platelet-derived growth factor gene into the rat kidney [J]. **J Clin Invest**, 1993, 92(6): 2597—2601.

[责任编辑 黄晓花]