

血管内皮生长因子与血小板反应蛋白在肾间质纤维化中的表达研究

赵 瑾, 张 莉, 孟梅霞, 王 昌

(西安市第四医院肾内科, 陕西 西安 710004)

【摘要】 目的 探讨肾病患者血管内皮生长因子(VEGF)与血小板反应蛋白(TSP)在肾间质纤维化中的阳性表达情况及其与 CD₃₄、CD₄₀ 的相关性。方法 选取本院 2011 年 5 月至 2013 年 5 月收治的不同类型肾病患者 96 例为研究对象, 根据患者肾脏受损程度将其分为轻度损伤组 38 例, 中度损伤组 32 例和重度损伤组 26 例, 并选取 30 例健康体检者为对照组, 分别应用免疫组化法对各组患者的 VEGF、TSP、CD₃₄、CD₄₀ 阳性表达情况进行分析。结果 VEGF 表达位置主要集中在足突细胞浆及肾小管上皮细胞中, TSP 主要在肾小管上皮细胞浆中表达, 在正常组织细胞中无阳性表达, CD₃₄ 及 CD₄₀ 主要在肾小管周围毛细血管内皮细胞中表达。随着患者病情增加, TSP、CD₄₀ 阳性表达率显著增加, 而 VEGF、CD₃₄ 则显著减少, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。经单因素分析显示, TSP、CD₄₀ 分别与肾间质纤维程度呈正相关, 而 VEGF、CD₃₄ 与肾间质纤维化程度呈负相关。结论 TSP 在肾实质区及肾小管上皮细胞中表达的增强及 VEGF 在足细胞及肾小管上皮细胞中表达的减弱可能是引起肾间质纤维化发生及发展的重要因素。

【关键词】 肾间质纤维化; 血管内皮生长因子; 血小板反应蛋白

【中图分类号】 R692 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2013)24-3602-03

Expression of vascular endothelial growth factor combined with platelet-reactive protein in renal interstitial fibrosis. ZHAO Jin, ZHANG Li, MENG Mei-xia, WANG Chang. Department of Internal Medicine, the Fourth Hospital of Xi'an City, Xi'an 710004, Shaanxi, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the expression of renal vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-reactive protein (TSP) in renal interstitial fibrosis and its correlation with CD₃₄, CD40. **Methods** Ninety-six patients with different types of kidney selected in our hospital from May 2011 to May 2013 were enrolled in the study. All the patients were divided into mild injury group ($n=38$), moderate injury group ($n=32$) and severe injury group ($n=26$), according to the degree of kidney damage. Thirty healthy individuals were selected as the control group. The expression levels of VEGF, TSP, CD₃₄, CD₄₀ of each group were tested with immunohistochemical staining. **Results** VEGF was mainly expressed in podocytes plasma and renal tubular epithelial cells, and TSP was mainly expressed in the cytoplasm of renal tubular epithelial cells, without expression in normal tissue cells. CD₃₄ and CD₄₀ were mainly expressed in the peritubular capillary endothelial cells. As the patient's condition increased, the positive expression of TSP, CD₄₀ was significantly increased, while that of VEGF, CD₃₄ was significantly reduced ($P < 0.05$). According to univariate analysis, TSP, CD₄₀, respectively, was positively correlated with renal interstitial fibrosis, and VEGF, CD₃₄ was negatively correlated with renal interstitial fibrosis. **Conclusion** Enhanced TSP expression in the kidney area and tubular epithelial cells, as well as reduced VEGF expression in podocytes and tubular epithelial cells may be the important factor that causes the development of renal interstitial fibrosis.

【Key words】 Renal interstitial fibrosis; Vascular endothelial growth factor (VEGF); Platelet-reactive protein (TSP)

间质性纤维化是慢性肾病中最为常见的疾病之一, 随着患者病情的发展可引起肾小管及肾小球损伤, 并引起机体出现慢性炎症反应, 从而促使炎症因子、细胞因子及粘附因子的释放, 作用于靶器官最终导致肾脏出现不可逆转性的损伤^[1]。研究表明, 血管内皮生长因子(VEGF)、血小板反应蛋白(TSP)、CD₃₄、CD₄₀与慢性肾病病情进展有密切的关系^[2]。因此, 研究引起慢性肾病的

相关因素对防止肾功能衰竭, 阻止肾小管纤维化的进一步发展有重要的意义。本文将对不同病情的肾病患者应用免疫组化法测定肾组织中 VEGF、TSP、CD₃₄、CD₄₀ 阳性表达情况, 以期对肾间质性纤维化疾病的临床诊治提高科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2011 年 5 月至 2013 年

通讯作者: 赵 瑾。E-mail: zj@126.com

5月收治并经皮肾穿刺活检术确诊为慢性肾病的96例患者为研究对象,其中男性52例,女性44例,年龄13~67岁,平均(42.32±4.28)岁。经病理诊断对肾病类型进行确诊,其中紫癜性肾炎10例,IgA肾病39例,肾小球肾炎22例,硬化性肾炎11例,狼疮肾炎14例。参照中华医学会肾脏病学分会2011年学术年会^[3]对慢性肾病病理分类标准,将其分为轻度损伤组38例,中度损伤组32例和重度损伤组26例。另选取30例排除了慢性肾病的患者为对照组,其中男性14例,女性16例,年龄18~65岁,平均(44.92±5.96)岁,各组性别构成和年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 肾病理组织的制备 各组均经皮肾穿刺活检术选取3 μm厚的病理组织,经石蜡切片,并进行烤片,同时采用二甲苯进行脱蜡,并采用酒精对病理组织切片脱洗。

1.2.2 免疫组化法的测定 采用免疫荧光组化法检测各组肾组织中VEGF、TSP、CD₃₄、CD₄₀的表达情况。兔抗人VEGF多克隆抗体购于福州迈新生物技术公司,TSP、CD₃₄、CD₄₀鼠抗人多克隆抗体购于北京金桥生物技术公司。以1:150的浓度将兔抗体VEGF多克隆抗体稀释,TSP、CD₃₄、CD₄₀鼠抗人多克隆抗体为即用型。TSP、CD₃₄、CD₄₀采用乙二胺四乙酸(EDTA)热修复处理20 min,VEGF采用柠檬酸缓冲液于高压锅中热修复处理2 min后采用冷水洗涤,并采用磷酸盐缓冲液(PBS)对样品进行冲洗,随后依次在试样板中加入一抗、二抗以及辣根过氧化物酶(DAB)进行显色反应。经苏木精复染后采用乙醇对样本脱水并制成中性树胶封片,并与已知的阳性切片进行对比,阴性对照则采用PBS缓冲液替代一抗的样本进行参照。

1.3 免疫组化结果的判断 (1)VEGF、TSP阳性表达为棕黄色颗粒见于细胞核内,CD₃₄、CD₄₀阳性表达为棕黄色颗粒见于细胞质及细胞核内。(2)在倍数为100的显微镜下观察细胞着色情况,根据着色程度由轻至重可分别记为0、1、2、3。随机选取5个视野点,采用倍数为400的显微镜分别对5个视野进行观察,每个视野进行细胞计数,并计算细胞的阳性百分比(以500个细胞作为一组计算单位),细胞阳性百分率:1为小于10%,2为10%~50%,3为大于50%积分计算:(1)与(2)计算所得的分值相乘。积分为0分:阴性“-”;1~3分:弱阳性“+”;4~6分:中度阳性“++”;7~9分:强阳性“+++”^[4]。

1.4 统计学方法 应用SPSS17.0软件进行统计学分析,计数资料采用百分比表示;组间计数资料的比较采用 χ^2 检验,相关性采用单因素分析, $P < 0.05$ 表

示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 VEGF、TSP、CD₃₄、CD₄₀ 阳性表达位置比较 VEGF在正常肾组织中主要在足突细胞及肾小管上皮细胞中表达,并呈黄色状颗粒广泛分布在细胞核中,随着患者病情的增加,VEGF的阳性表达率逐渐下降,在重度肾损伤的组织中,只有少量在肾小管上皮细胞中呈弱阳性表达。在正常肾间质中TSP阳性表达为0,随着病情的增加,TSP阳性表达率显著增加,并广泛分别在肾小球壁层、上皮细胞浆中,此外在一些坏死、萎缩、变性的肾小管上皮细胞中也可发现TSP表达。CD₃₄广泛分布在肾小管毛细血管内皮细胞中,随着病情的加重,其阳性表达率显著减少。CD₄₀主要在肾小管周围毛细血管内皮细胞中表达,随着病情的加重,其阳性表达率显著上升。

2.2 各组 VEGF、TSP、CD₃₄、CD₄₀ 阳性表达率比较 随着患者病情增加,TSP、CD₄₀阳性表达率显著增加,而VEGF、CD₃₄阳性表达率则显著减少,其差异比较均有统计学意义($P < 0.05$),见表1~4。

表1 各组 VEGF 阳性表达情况比较(例)

组别	例数	VEGF 表达				阳性率(%)	阴性率(%)
		-	+	++	+++		
对照组	30	0	0	13	17	100.00	0
轻度肾损伤	38	6	8	12	12	84.21 ^a	15.79
中度肾损伤	32	12	4	7	9	62.50 ^{ab}	37.50
重度肾损伤	26	16	3	4	3	38.46 ^{abc}	61.54

注:^a与对照组比较, $\chi^2=12.785, P=0.000$; ^b与轻度肾损伤比较, $\chi^2=9.321, P=0.000$; ^c与中度肾损伤比较, $\chi^2=8.242, P=0.000$ 。

表2 各组 TSP 阳性表达情况比较(例)

组别	例数	TSP 表达				阳性率(%)	阴性率(%)
		-	+	++	+++		
对照组	30	30	0	0	0	100.00	0
轻度肾损伤	38	19	9	7	3	50.00 ^a	50.00
中度肾损伤	32	12	5	7	8	62.50 ^{ab}	37.50
重度肾损伤	26	6	5	6	9	76.92 ^{abc}	23.08

注:^a与对照组比较, $\chi^2=8.632, P=0.000$; ^b与轻度肾损伤比较, $\chi^2=9.632, P=0.000$; ^c与中度肾损伤比较, $\chi^2=7.645, P=0.001$ 。

表3 各组 CD₃₄ 阳性表达情况比较(例)

组别	例数	CD ₃₄ 表达				阳性率(%)	阴性率(%)
		-	+	++	+++		
对照组	30	0	4	11	15	0	100.00
轻度肾损伤	38	9	9	8	12	76.32 ^a	23.68
中度肾损伤	32	18	7	5	2	43.75 ^{ab}	56.25
重度肾损伤	26	18	4	3	1	30.77 ^{abc}	69.23

注:^a与对照组比较, $\chi^2=9.301, P=0.000$; ^b与轻度肾损伤比较, $\chi^2=12.012, P=0.000$; ^c与中度肾损伤比较, $\chi^2=11.308, P=0.000$ 。

表 4 各组 CD₄₀ 阳性表达情况比较 (例)

组别	例数	CD ₄₀ 表达				阳性率 (%)	阴性率 (%)
		-	+	++	+++		
对照组	30	30	0	0	0	100.00	
轻度肾损伤	38	20	9	6	3	47.37 ^a	
中度肾损伤	32	15	8	7	2	53.13 ^{ab}	
重度肾损伤	26	10	5	8	3	61.54 ^{abc}	

注: ^a 与对照组比较, $\chi^2=12.301, P=0.000$; ^b 与轻度肾损伤比较, $\chi^2=9.452, P=0.000$; ^c 与中度肾损伤比较, $\chi^2=9.452, P=0.000$ 。

2.3 相关性分析 经单因素分析可知, TSP ($r=0.396, P=0.000$)、CD₄₀ ($r=0.402, P=0.000$) 分别与肾间质损伤程度呈正相关, 而 VEGF ($r=-0.362, P=0.000$)、CD₃₄ ($r=-0.308, P=0.000$) 与肾间质损伤程度呈负相关。VEGF 与 TSP 呈负相关 ($r=-0.345, P=0.001$), 与 CD₃₄ 呈正相关 ($r=0.362, P=0.004$), 与 CD₄₀ 呈负相关 ($r=0.319, P=0.014$)。TSP 与 CD₃₄ 呈正相关 ($r=0.342, P=0.001$), 与 CD₄₀ 呈负相关 ($r=-0.393, P=0.000$)。

3 讨论

肾间质纤维化是慢性肾病向终末期肾病发展的中间过程, 而这过程是由多种细胞因子共同参与及作用的结果。VEGF 属于糖蛋白, 具有增加血管通透性、诱导血管内皮细胞增生、迁移的作用, 同时能维持血管正常生理功能, 促进血管生成^[5-6]。TSP 属于三聚体基质糖蛋白, 属于内源性血管新生抑制物, 具有直接调控内皮细胞凋亡、抑制内皮细胞增生的作用^[7]。CD₃₄ 属于原活护蛋白激酶, 能抑制血管新生, 诱导内皮细胞凋亡, 减少毛细血管数量的作用^[8]。CD₄₀ 属于 TNF 家族中的一种跨膜糖蛋白, 其在肾间质中的作用是促进肾小管上皮细胞及肾小球细胞转化, 诱发肾小管及肾小球炎症反应, 并可促进炎症因子及趋化粘附因子表达, 诱发肾组织纤维原沉积, 并最终导致肾间质纤维化的发生^[9]。

本研究通过免疫组化法测定不同病变程度的慢性肾病患者体内 VEGF、TSP、CD₃₄、CD₄₀ 在肾间质中的表达情况, 结果表明, VEGF 在正常肾组织中, 主要在足突细胞及肾小管上皮细胞中表达, 随着患者病情的增加, VEGF 的阳性表达率逐渐下降。在正常肾间质中 TSP 阳性表达为 0, 随着病情的增加, TSP 阳性表达率显著增加, 并广泛分别在肾小球壁层、上皮细胞浆中, 此外在一些坏死、萎缩、变性的肾小管上皮细胞中也可发现 TSP 表达, 这种变化趋势与肾间质纤维化程度的发展是一致的。经相关性分析可知, VEGF 表达下降与 TSP 表达上升呈负相关, 其原因可能与 TSP 可竞争性结合 VEGF, 导致 VEGF 生成受阻有关。Chang 等^[10]在肾积水大鼠模型肾组织中发现,

TSP 表达水平上升时, VEGF 的表达水平下降, 两者呈负相关。陈国纯等^[11]通过半定量免疫组化法测定肾纤维化患者肾组织中 VEGF 及 TSP 的表达量, 其研究证实 TSP 表达与 VEGF 呈负相关, 本研究结果与之一致。同时, 本研究发现 CD₃₄ 广泛分布在肾小管毛细血管内皮细胞中, 随着病情的加重, 其阳性表达率显著减少。VEGF 与 CD₃₄ 呈正相关, 其原因可能与 CD₃₄ 表达增强可导致血管生成效应减弱, 从而影响肾小管周围毛细血管的生成, 使得毛细血管数量减少, 抑制 VEGF 的生成有关, 而 VEGF 生成的减少可促使 TSP 生成量的增加, 因此 TSP 与 CD₃₄ 呈正相关^[12]。此外, 本研究发现, VEGF 与 CD₄₀ 呈负相关, 其原因可能为 CD₄₀ 长期作用导致肾脏受损, 引起肾组织纤维化, 使得负性因子上调, 从而抑制 VEGF 的生成。

综上所述, TSP 在肾实质区及肾小管上皮细胞中表达的增强及 VEGF 在足细胞及肾小管上皮细胞中表达的减弱可能是引起肾间质纤维化发生及发展的重要因素。

参考文献

- [1] 谢敏, 周建华, 朱国琴. 肾间质纤维化大鼠肾周毛细血管病变的实验观察[J]. 临床儿科杂志, 2012, 11(5): 785-786.
- [2] 孙洞箫, 周盾, 邱振宇. UC-MSCs 对 UUO 大鼠肾间质 ET-1、VEGF、肾小管周 VIII 因子表达水平的影响[J]. 山东医药, 2012, 10(3): 663-664.
- [3] 陈香美, 刘志红. 肾小球肾炎遗传研究新进展[J]. 中华医学会肾脏病学分会 2011 年学术年会, 2011, 5(2): 196-197.
- [4] Sun D, Wang Y, Liu C. Effects of nitric oxide on renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction [J]. Life Sci, 2012, 14(23): 900-902.
- [5] 周璇, 裴广畅, 廖盼丽. 血管内皮生长因子 C 参与肾间质纤维化的进程[J]. 临床肾脏病杂志, 2011, 11(2): 632-633.
- [6] 孙星慧, 郑智勇, 杨顺良, 等. 慢性移植肾病患者肾组织中 VEGF 的表达变化及意义[J]. 山东医药, 2012, 14(5): 347-348.
- [7] Rojas A, Chang FC, Lin SL. The role played by perivascular cells in kidney interstitial injury [J]. Clin Nephrol, 2012, 77(5): 400-408.
- [8] 吕临静, 马宏, 郭晓媛, 等. 内抑素组织表达趋势与肾间质微血管损伤的相关性研究[J]. 中国药物与临床, 2011, 3(2): 623-624.
- [9] 徐炎, 吕永曼. 水飞蓟素对单侧输尿管结扎大鼠肾组织 TGF- β 1 及 TSP-1 表达的影响[J]. 临床肾脏病杂志, 2011, 2(3): 463-464.
- [10] Chang FC, Chou YH, Chen YT. Novel insights into pericyte-myofibroblast transition and therapeutic targets in renal fibrosis [J]. J Formos Med Assoc, 2012, 111(11): 589-592.
- [11] 陈国纯, 刘虹, 王畅. mTOR 通路调控肾间质成纤维细胞活化的机制[J]. 中华肾脏病杂志, 2012, 3(2): 487-488.
- [12] Nlandu Khodo S, Dizin E, Sossauer G. NADPH-oxidase 4 protects against kidney fibrosis during chronic renal injury [J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(12): 1967-1970.

(收稿日期: 2013-07-17)