维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)01-0053-04

移植肾转化因子β与慢性移植肾肾病关系的研究

王平贤，龚桂芝，徐华英，黄赤兵，范明齐，张艮甫

(第三军医大学附属新桥医院泌尿外科，重庆 400037)

【摘 要】目的：探讨移植肾转化生长因子 β_1(TGF-β_1)与慢性移植肾肾病的关系。方法：2000 年 9 月～2001 年 6 月期间，对 181 例肾功能正常的肾移植患者检测尿 TGF-β_1 含量，所得相对浓度为 150.7～527.1(pg/mg.Cr)，分别选出浓度最高和最低的各 25 例患者构成 A 组、B 组。检测两组血 TGF-β_1 浓度；两组中分别有 16 例和 13 例患者进行了移植肾穿刺活检，检测活检组织中 TGF-β_1mRNA 的表达量；3 年后，比较两组肾功能有无差异；分析 TGF-β_1mRNA 表达量与肾功能有无相关性；对肾功能不全者作移植肾穿刺活检，明明是否为慢性移植肾肾病；结果：两组患者血 TGF-β_1 浓度没有明显差异；A 组活检组织中 TGF-β_1mRNA 表达量为 1.37±0.29，明显高于 B 组(0.87±0.24)；2 年后，A 组肌酐清除率(Ccr)减少了 17.4±6.6ml/min 和 2 例)；TGF-β_1mRNA 表达量与 3 年后的肾功能之间有着明显的相关性；肾功不全的患者，移植肾穿刺活检均证实为慢性移植肾肾病。结论：TGF-β_1 与慢性移植物肾病的发生有着密切的关联；肾移植后检测尿 TGF-β_1 对远期肾功能具有预测作用。

【关键词】移植；肾；肾病；转化生长因子 β_1

【中国图书分类法分类号】R692.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-06-30

Association between TGF-β_1 in allograft and chronic allograft nephropathy

WANG Pingxian, et al

(*Department of Urology, the Second Affiliated Hospital, Third Military Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To determine the relation between transforming growth factor β_1(TGF-β_1) in allograft and chronic allograft nephropathy (CAN). *Methods*: Urine TGF-β_1 relative concentration(divided by urine creatinine) was tested in 181 recipients whose renal function were normal between August 1, 2000 and June 31, 2001. 25 cases with higher urine TGF-β_1 relative concentrations were assigned to group A, other 25 cases with lower urine TGF-β_1 to group B. In both groups biopsies were carried out in 16 cases and 13 cases respectively. TGF-β_1 mRNA in the biopsis was tested by RT-PCR. Blood TGF-β_1 concentrations in the two groups were also tested. Three years later, the renal function was compared between the two groups. The correlation between expression of TGF-β_1mRNA and long-term renal function was determined. Biopsies were carried out in renal recipients whose creatinine was higher than normal. *Results*: Blood TGF-β_1 concentrations in the two groups were not significantly different, 3 years after transplantation, there was more loss of renal function and larger number of chronic allograft nephropathy (CAN) cases in group A than group B. Expression of TGF-β_1mRNA in the allografts was found more in group A than in group B. The difference in the two groups was significant. There was a correlation between expression of TGF-β_1mRNA and long-term renal function. *Conclusion*: The findings suggest expression of TGF-β_1mRNA in the allografts is associated with chronic allograft nephropathy. The level of urine TGF-β_1 after renal transplantation can predict long-term renal function.

【Key words】Kidney transplantation; Nephropathy; TGF-β_1

由于免疫抑制剂的发展和临床移植水平的提高，肾移植近期效果已得到了显著的改善。然而，尽管应用了预防急性排斥反应足量的免疫抑制剂，肾移植远期效果却未能得以相应的提高，移植肾的平均半寿期仍徘徊在 7～10 年，这主要是因为慢性移植肾肾病(chronic allograft nephropathy, CAN)所致[1]。本研究对尿 TGF-β_1 浓度不同、能功能正常的患者，比较其肾组织中 TGF-β_1 表达有无差异，并对其进行 3 年以上的前瞻性观察，比较远期肾功能和 CAN 的发生情况，以此明确移植肾内 TGF-β_1 的表达与远期肾功能的关系，为临床早期诊断和

作者介绍：王平贤(1964-)，男，副主任医师，博士，主要研究方向：器官移植工作。

维普资讯 http://www.cqvip.com

防治 CAN 提供依据。

1 资料与方法

1.1 肾移植患者术后免疫抑制使用方案

肾移植后最初 3～5 天使用甲基强的松龙针剂 500mg 1/d 静脉注射;能进食后即开始口服霉酚酸酯(MMF),1.0～1.5g/d;当血肌酐(Cr)≤250umol/L 时,给予环孢素 A(CsA) 8mg/kg.d 或普乐可复(FK－506)0.15mg/kg.d,均分为 2 次口服,以后根据血药浓度逐渐减量,使 CsA 血药浓度(谷值)术后 2 周内维持在 300～350ng/ml、术后第 2－4 周为 250～300ng/ml、第 4～12 周为 200～250ng/ml、第 12～48 周为 150～200ng/ml,或 FK－506 血药浓度(谷值)术后 2 周内维持在 12～15ng/ml、术后第 2～4 周为 10～12ng/ml、第 4～12 周为 7～10ng/ml、第 12～48 周为 5～7ng/ml;停用甲基强的松龙后改为泼尼松(Pred)0.6mg/kg.d、逐渐减量,肾移植 2 个月后维持在 10～15mg/d。

1.2 慢性移植肾肾病(CAN)的诊断标准

通过以下步骤明确是否为 CAN。

①临床表现:血 Cr 异常升高发生在肾移植至少 6 个月以后,以甲基强的松龙等激素冲击治疗和调整免疫抑制剂等处理后肾功无好转,并且以后移植肾功能呈现出进行性减退的趋势。

②辅助检查:通过移植肾 B 超、CsA 或 FK506 血药浓度检测等,初步排除急性排斥反应、急性环孢素 A 中毒、梗阻/返流、肾血管狭窄、感染等可导致肾功能慢性损害的有着明确原因的疾患。

③移植肾穿刺与组织学检查:对上述患者常规作移植肾穿刺活检,根据"Banff 97"分类标准,在组织学上移植肾没有急性排斥反应、急性环孢素 A 中毒、肾小球肾炎复发等特征性的病理改变,而是呈现出以间质纤维化、肾小管萎缩等为特点的各种非特异性病理改变。

1.3 检测血、尿肌酐(Cr)和 TGF－β_1 浓度

我院 2000 年 9 月～2001 年 6 月期间,对肾功能正常、同种异体肾移植时间≤1 年的 181 例肾移植患者检测血、尿 Cr 和 TGF－β_1 浓度。TGF－β_1 浓度以"双抗夹心 ELISA 法"检测。人 TGF－β_1ELISA 试剂盒购自晶美生物工程(北京)有限公司。

计算尿 TGF－β_1 的相对浓度:用尿 Cr 值对 TGF－β_1 浓度进行校正,即尿 TGF－β_1/尿 Cr(pg/mg)的值,故 TGF－β_1 相对浓度的单位为 pg/mg.Cr。

1.4 研究对象和分组

上述 181 例患者尿 TGF－β_1 相对浓度为 150.7～527.1 (pg/mg.Cr)。选出 TGF－β_1 相对浓度最高和最低的 25 例患者分别为:459.4$\beta_4$4.7(pg/mg.Cr)、210.3±41.1(pg/mg.Cr),构成 A 组和 B 组。

1.5 研究方法

①A、B 两组分别有 16 例和 13 例患者进行了移植肾穿刺活检。在超声引导下,使用 Bard 自动活检枪进行移植肾穿刺活检。每次穿刺至少 2 条组织。1 条放置于 10%的甲醛溶液中固定,另 1 条放入低温冻存管后置于液氮中冻存。上述以 10%的甲醛固定的标本经石蜡切片、HE 染色,在普通光镜下观察有无急性排斥反应、CsA 中毒等的特征性改变;并按 Banff'97 标准,比较两组病理改变有无差异。

②使用逆转录聚合酶链反应(RT－PCR),检测穿刺活检组织中 TGF－β_1mRNA 的相对含量(即 TGF－β_1mRNA/β－actin mRNA 之比值),并比较两组有无差异。引物由上海生工生物工程公司设计合成,TGF－β_1 上游引物 5'－TCC－TGT－GAC－AGC－AGG－GAT－AA－3';下游引物 5'－GGC－AGA－AGT－TGG－CAT－GGT－AG－3'扩增片段长度 298bp。β－actin 上游引物 5'－AAC－CCT－AAG－GCC－AAC－CGT－GAA－AAG－3';下游物引 5'－TCA－TGA－GGT－AGT－CTG－TCA－GGT－3'扩增片段长度 240bp。通用逆转录聚合酶链反应试剂盒由美国 Promega 公司生产。

③对上述患者进行随访,至少每 3 个月检测 1 次 Ccr。对其中能保持随访满 3 年的患者,计算出 3 年内 Ccr 的损失量(随访满 3 年时的 Ccr 减去进入实验时的 Ccr)和肾功不全(血 Cr>114umol/L)的病例数。将两组中进行了穿刺活检共计 29 例患者的 TGF－β_mRNA 表达量与 3 年后各自相应的肾功能作相关性分析。对血 Cr 异常升高的患者,根据上述标准明确是否为 CAN。

1.6 统计学分析

采用 SPSS10.0 for windows 软件进行上述统计学处理;实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示;使用 χ^2 检验、t 检验判断相差的显著性;以 $P=0.05$ 为检验水准,$P<0.05$ 为相差显著,$P>0.05$ 为相差不显著。

2 结 果

2.1 A、B 两组不同因素及各检测结果比较

结果显示,进入实验时:①A、B 两组血 TGF－β_1 浓度没有明显差异($P>0.05$);②两组肾功能没有差异(两组 Ccr 比较,$P>0.05$);③两组在年龄、性别、术后时间等方面亦无明显差异($P>0.05$)。见表 1。

2.2 移植肾活检组织中 TGF－β_1mRNA 的表达

A、B 两组在进入实验时分别有 16 例和 13 例进行了移植肾穿活检,其 TGF－β_1mRNA 的相对表达量(TGF－β_1mRNA/β－actin mRNA)分别为:1.38±0.27 和 0.87±0.24,两者比较有显著差异($P<$

维普资讯 http://www.cqvip.com

0.01)。见图 1。

表 1 两组不同因素及各检测结果比较

	A 组($n=25$)	B 组($n=25$)	P 值
年龄	33.4±6.7	33.9±8.1	>0.05
性别(M/F)	14/11	16/9	>0.05
术后时间(年)	0.89±0.46	0.92±0.52	>0.05
肌酐清除率 Ccr(ml/min)	94.2±5.2	93.6±4.9	>0.05
血 TGF-β_1(ng/ml)	39.4±11.0	38.3±12.0	>0.05

表 2 两组在 3 年随访期内肾功损失量和肾功能不全病例数比较

	病例数(例)	肾功损失 Ccr(ml/min)	肾功能不全(例)
A 组	23	17.4±6.5*	11*
B 组	21	6.5±4.7	2

与对应组比较 *:$P<0.01$;#:$P<0.05$

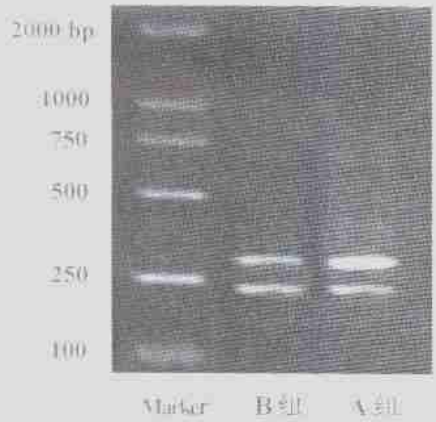


图 1 肾移植 6 个月后,移植肾活检组织 TGF-β_1mRNA 的表达(A 组 TGF-β_1mRNA 表达量明显大于 B 组)

2.3 两组移植肾活检组织病理改变与比较

两组移植肾活检组织在普通光镜下观察,均未发现急性排斥反应、CsA 中毒等有着特殊原因导致肾功能损害的特征性病理改变;根据 Banff'97 标准,A、B 两组在组织学上没有显著差异。

2.4 两组在 3 年随访期内肾功(Ccr)损失量和肾功不全的病例数比较

A 组有 23 例、B 组有 21 例达到了至少 3 年的全程随访。结果显示:A 组在 3 年随访期内肾功能损失量和肾功不全的病例数均明显大于 B 组。见表 2。

2.5 肾功不全患者穿刺活检结果

上述 13 例肾功不全的患者,在肾功不全 1 个月内进行了移植肾穿刺活检,各标本经石蜡切片、HE 染色,在普通光镜下按 Banff'97 标准观察,均未发现有急性排斥反应、CsA 中毒等特殊因素导致 Cr 异常升高的特征性改变,而是呈现出以间质纤维化、肾小管萎缩为特点的慢性移植物肾病的组织学改变。见图 2。

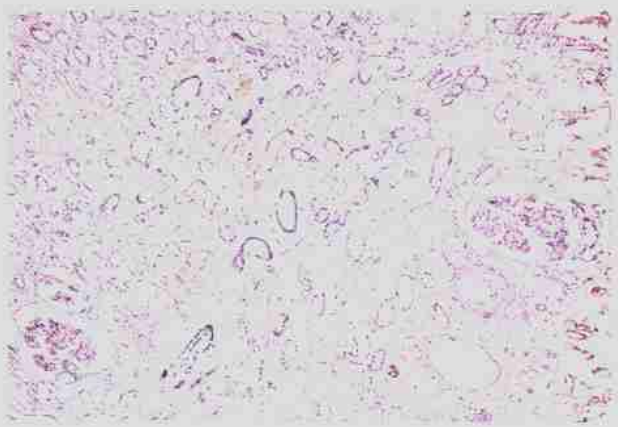


图 2 肾功不全者移植肾穿刺活检 (HE×100)间质纤维化、肾小管萎缩等的非特异性改变(慢性移植肾肾病)



图 3 移植肾 TGF-β_1mRNA 表达量与 3 年后肾功能(1/Cr×100)

2.6 TGF-β_1 与肾功能相关性分析

两组患者在进入实验时,共有 29 例(A 组:16 例、B 组:13 例)进行了移植肾穿活检,其中全程随访至少达 3 年者有 27 例,上述 27 例患者移植肾 TGF-β_1mRNA 表达量与 3 年后肾功能(1/Cr×100)之间的关系见图 3。经相关性检验,二者具有明显的相关性($P<0.01$)。

3 讨 论

慢性移植肾肾病(CAN)是指同种异体肾移植数月、特别是 1 年或数年后,移植肾功能进行性减退,最终肾功能衰竭、恢复透析,在组织学上移植肾呈现出以间质纤维化、肾小管萎缩等为特点的各种非特异性病理改变[2]。CAN 一般在肾移植 6 个月后才发生。这种移植物功能减退以往叫做慢性排斥反应,鉴于其发病原因涉及到免疫和非免疫因素,故用"慢性移植肾肾病"这一包容性更大的术语更适

维普资讯 http://www.cqvip.com

宜[3]。

转化生长因子(TGF－β_1)是一个关键的纤维发生因子,TGF－β_1 的过度产生,在许多疾病中引起不可逆的组织纤维化[4]。大量研究表明,在肾小球肾炎、糖尿病肾病、高血压引起肾小球损害等最终以细胞外基质积聚为特征的肾脏病中,都有过量的 TGF－β_1 表达[5]。TGF－β_1 在肾脏内主要表达于肾小管和肾小球,在正常情况下肾脏内仅有微量的 TGF－β_1 表达[6,7]。有研究显示,给予正常大鼠以重组的 TGF－β_1,会导致其肾小球硬化的增加:给予 TGF－β_1 拮抗剂,可以延缓纤维化肾病的发展[8,9]。有人检测了糖尿病肾病患者肾动脉、肾静脉血中的 TGF－β_1,结果发现肾静脉血中的 TGF－β_1 大于肾动脉,可见至少增加的 TGF－β_1 是由肾脏局部产生[10]。为此,肾脏细胞可能既是尿中 TGF－β_1 的来源,也是 TGF－β_1 作用的主要目标[10]。鉴于细胞外基质沉积、间质纤维化也是 CAN 的基本病理改变,因此,从理论上讲 TGF－β_1 在 CAN 的发生过程中可能发挥着作用,如果 TGF－p1 在 CAN 中起介导作用,那么尿 TGF－p1 可能是增多的。

尿量随机体水量摄入的多少而改变,为了克服这一不稳定因素,本试验参照尿中其它物质测定时所常采用的惯例,即以尿 Cr 含量为参照对其进行校正,以此计算出尿中 TGF－β_1 的相对含量,即 TGF－β_1/尿 Cr。

结果显示:在实验开始时,A、B 两组患者尿 TGF－β_1 相对浓度有着显著的差异,即 A 组明显高于 B 组,但两组患者血中 TGF－β_1 浓度没有差异,表明通过肾小球基底膜的 TGF－β_1 量两组没有差异;此外对这两组患者移植肾活检组织中 TGF－β_1 表达量检测发现,A 组明显高于 B 组。根据上述两点理由可以推断 A 组移植肾细胞正在产生较多的 TGF－β_1、且 A 组尿中增加的 TGF－β_1 来源于移植肾。在实验开始时,A、B 两组患者除了尿 TGF－β_1 相对浓度不同以外,其它如年龄、性别、术后时间和肾功能(Ccr)等都没有明显差异,但随着时间的进展,A 组在 3 年随访期内肾功能损失量和肾功不全的病例数均明显多于 B 组;肾功异常者均呈现出以间质纤维化、肾小管萎缩为特点的 CAN 的组织学改变:移植肾组织中 TGF－β_1 mRNA 表达量与 3 年后的肾功能之间有着明显的相关性。结果提示 TGF－β_1 与 CAN 的发生有着密切的关联;肾移植后检测尿 TGF－β_1 对远期肾功能具有预测意义;移植肾 TGF－β_1 高表达者远期肾功能差。作者认为在肾移植的临床工作中,有必要对尿 TGF－β_1 进行监测,对尿 TGF－β_1 相对浓度明显升高的患者应预以警惕和重视。

参 考 文 献

[1] Morales JM, Andres A, Rengel M, et al. Influence of cyclosporin, tacrolimus and rapamycin on renal function and arterial hypertension after renal transplantation[J]. Nephrol－Dial－Transplant, 2001;16(1):121－124.

[2] Densem CG, Mutlak ASM, Pravica V, et al. A novel polymorphism of the gene encoding furm, a TGF－β_1 activator, and the influence on cardiac allografi vasculopathy formation[J]. Transplant Immunology, 2004;37(7):697－702.

[3] Paul LC. Chronic allografi nephropathy: An update[J]. Kidney－Int, 1999;56(3):783－793.

[4] Abdel WN, Weston BS, Roberts T, et al. Connective tissue growth factor and regulation of the mesangial cell cycle: role in cellular hypertrophy[J]. J－Am－Soc－Nephrol, 2002; 13(10):2437－2445.

[5] 肖 谦,汪恕萍. 糖尿病大鼠肾脏 TGF－β 蛋白表达的实验研究[J]. 重庆医科大学学报,2002;27(4):391－393.

[6] Amann K, Koch Ahofstetter J, et al. Glomerulosclerosis and progression: effect of subantihypertensive doses of alpha and beta blockers[J]. Kidney－Int, 2001;60(4):1309－1323.

[7] 邓世雄,谭明红. TGF－β_1 及 bFGF 在扩张型心肌病中的表达研究[J]. 重庆医科大学学报,2003;28(1):62－64.

[8] Houlihan CA, Akdeniz A, Tsalamandris C, et al. Urinary transforming growth factor－beta excretion in patients with hypertension, type 2 diabetes, and elevated albumin excretion rate: effects of angiotensm receptor blockade and sodium restriction[J]. Diabetes－Care, 2002;25(6):1072－1077.

[9] Woo YC Jong AH, Young KW, et al. Synergistic effects of mycophenolate mofetil and losartan in a model of chronic cyclosporne nephropathy[J]. Transplantation, 2003;75(3):309－315.

[10] Citterio F, Pozzetto U, Romagnoli J, et al. Plasma levels of transforming growth factor－β_1 in renal transplant recipients receiving different immunosuppressive regimens[J]. Transplantation Proceedings, 2004;36(3):698－699.