维普资讯 http://www.cqvip.com

239-241

第24卷 第3期 重庆医科大学学报 Vol.24 No.3
1999 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1999

成纤维细胞生长因子及受体在肾小管间质纤维化过程中的表达

R692.602

基础医学院病理教研室 徐 曼*

提 要 利用免疫组织化学及原位杂交技术观察30例肾间质纤维化模型大鼠,探讨碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)及受体(FGFR－1)与肾小管间质纤维化的关系。结果显示大鼠模型中损伤的肾小管上皮过度表达bFGF.FGFR－1,且合成Ⅲ型胶元;肾间质细胞广泛表达bFGF和FGFR－1,而且此表达程度和间质细胞核增殖及小管间质Ⅲ型胶元沉积程度一致。本实验证实肾小管损伤刺激bFGF、FGFR－1的分泌,提示bFGF可能通过自分泌和(或)旁分泌机制促进肾小管上皮的再生修复、间质细胞的增殖及Ⅲ型胶元的合成,从而促进肾小管间质纤维化的形成。

关键词 碱性成纤维细胞生长因子; 成纤维细胞生长因子受体－1; 肾小管间质纤维化 bFGF. FGFR-1
中图分类号 R392.11

各种肾脏疾病进展到终末期肾衰都要经历肾小管萎缩、炎症细胞浸润和间质纤维化的过程,而间质纤维化与肾功能受损程度密切相关[1]。文献报道多种生长因子包括成纤维细胞生长因子(FGF)、转化生长因子－β(TGF－β)、血小板衍生生长因子(PDGF)和胰岛素样生长因子－1(IGF－1)等参与了肾损伤的病理过程[2]。本文拟观察腺嘌呤致大鼠肾小管间质纤维化过程中bFGF及其高亲和力受体FGFR－1在损伤的肾小管和间质细胞的表达及这些细胞的增殖情况并了解Ⅲ型胶元在小管间质的沉积程度。

1 材料与方法

1.1 大鼠肾小管间质纤维化模型的建立

Wistar大鼠36只,重150～180g,随机分组,实验组30只,正常对照组6只、动物自由饮食。实验组按0.3mg/100g/α剂量,将腺嘌呤混悬入2%淀粉液灌胃、对照组等量生理盐水灌胃,每日一次,连续五周。第1至5周每周处死实验组大鼠6只,第5周将对照组大鼠处死。取肾固定于4%多聚甲醛,常规石蜡包埋,5μm切片行HE、原位杂交、免疫组化染色.

1.2 原位杂交

1.2.1 地高辛标记bFGFcDNA探针的制作 将含bFGFcDNA1.41Kb的pGEM－3Z质粒(由美国耶鲁大学医学院提供)用限制性内切酶EcoR－Ⅰ和HindⅢ酶切,随机引物PCR法标记bFGFcDNA探针.

1.2.2 杂交步骤 取5μm的组织切片,脱蜡及梯度酒精入水,0.1MHCl处理10min,蛋白酶K(100μg/ml)37℃、15min,－20℃冷乙醇梯度脱水,风干。每张切片滴加95℃、3min处理的杂交液(含50%甲酰胺.100μg/mlssDNA、5×Denhardt液、5%硫酸葡聚糖、0.05M二硫苏糖醇、4×SSC)及bFGFcDNA探针3μl、42℃孵育18h,2×SSC及0.5×SSC42℃各洗15min×2次,滴加马血清(1:100)封闭37℃、20min,抗地高辛抗体(1:500)37℃、50min,缓冲液Ⅰ、缓冲液Ⅲ各洗5min×3次,BCIP/NBT显色30min.以杂交液不加探针为阴性对照。

1.3 免疫组化 取5μm切片,脱蜡梯度酒精入TBS,0.6%甲醇H_2O_2封闭15min,0.05%胰酶消化15min,ABC法常规操作。一抗:兔抗人bFGF抗体(1:100,SantaCruz)、鼠抗人FGFR－1抗体(1:50,SantaCruz)、鼠抗人PCNA抗体(1:100,DAKO),兔抗人Ⅲ型胶元抗体(1:100,上海医科大学病理系);二抗:兔抗鼠IgG(1:200,DAKO)、猪抗兔IgG(1:200,DAKO);ABC复合物(1:500,DAKO).以TBS代替一抗为阴性对照。

2 结果

2.1 模型病理特点

模型肾体积增大,表面变粗糙.切面肾皮质增厚、灰黄色,皮髓质分界清楚,质地略变硬。光镜下可见病灶主要位于皮髓交界区,模型第1到2周,肾小球轻度充血增大。肾小管内有结晶形成,其近侧端肾小管扩张,上皮轻度萎缩.周围间质可见中性白细胞及淋巴、单核细胞浸润。模型第3到5周,结晶分布更加广泛、其周围有胞浆丰富、界限不清、核园或椭圆、偶见核分裂像的细胞,还可见多核巨细胞,共同围绕结晶形成肉芽肿.近侧端肾小管扩

* 女,1964－03出生,讲师

维普资讯 http://www.cqvip.com

张更明显、上皮萎缩变扁,同时可见再生的肾小管上皮细胞核大、深染。间质可见多量短梭形成纤维细胞增生、巨噬细胞浸润。小管间隔逐渐增宽、间质纤维化。

2.2 bFGF原位杂交

正常大鼠局灶近端小管上皮细胞胞浆bFGFmRNA淡紫蓝色弱阳性着色。模型第1到5周,受损伤的小管上皮胞浆紫蓝色阳性着色,间质细胞阳性细胞数逐渐增多,肉芽肿内细胞胞浆广泛紫蓝色阳性染色。

2.3 免疫组化

正常大鼠皮髓交界处部分近端肾小管上皮胞浆内bFGF浅棕黄色阳性着色,FGFR－1阴性。偶见间质细胞bFGF阳性着色。肾小管上皮和间质细胞胞核偶见PCNA阳性。肾间质内有极少量Ⅲ型胶元。

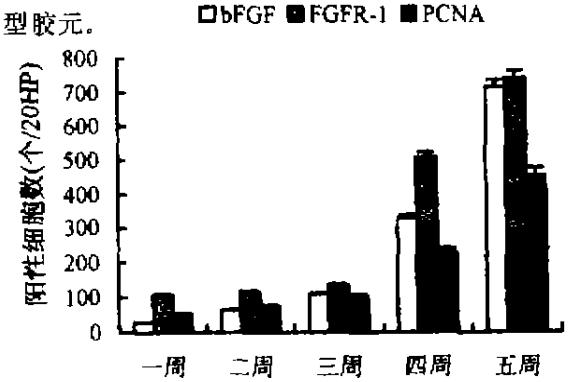


图1 不同时段肾间质细胞bFGF、FGFR－1和PCNA阳性细胞数(记数20个高倍视野)

模型第1到5周,肾小管上皮表达bFGF增强,且范围较正常肾扩大;FGFR－1在模型第1到3周位于大部分肾小管腔面胞膜呈逐渐增强的阳性表达,而第4到5周则仅见于再生的小管上皮;肾小管上皮PCNA阳性细胞核数各周持续增加。此外,第2到5周受损肾小管上皮胞浆Ⅲ型胶元阳性着色。间质内成纤维细胞、巨噬细胞表达bFGF、FGFR－1和PCNA阳性细胞数逐渐增加,Ⅲ型胶元的沉积也逐渐增多。结晶周围肉芽肿细胞均表达bFGF、FGFR－1,广泛表达PCNA和Ⅲ型胶元(图1)。

3 讨论

bFGF是一分子量18KD的非糖基化单链多肽,因其具有刺激3T3成纤维细胞分裂增殖作用而得名。bFGF通过与其特异性高亲和力受体FGFR－1结合,激活靶细胞内酪氨酸蛋白激酶而促细胞代谢,同时还能定位于靶细胞核通过影响RNA聚合酶Ⅰ加强核蛋白体基因的转录,加速细胞由G0期进入G1期,G1期向S期转化,促进细胞分裂增殖[3]。

实验中观察到肾小管损伤时bFGFmRNA及蛋白质表达增强且范围扩大。FGFR－1在模型第1到3周小管腔面胞膜强阳性,第4至5周FGFR－1的阳性表达范围有所减小、但再生的小管上皮胞核PCNA呈持续增高,可能与bFGF还作用于其他类型FGFR或同时有其他生长因子刺激肾小管上皮的增殖有关。文献报道损伤的肾小管上皮分泌bFGF刺激小管上皮再生[4],除bFGF外,TGF－β、IGF－1也能刺激培养的近端小管上皮增生[6]。受损近端肾小管Ⅲ型胶元免疫组化染色阳性,说明肾小管上皮在间质纤维化过程中发挥了一定的作用。Creely也报道肾小管上皮可合成Ⅲ型胶元[6]。

实验结果还显示模型肾间质巨噬细胞和成纤维细胞表达bFGFmRNA及蛋白和FGFR－1阳性细胞数随病程逐渐增多,这些细胞的核增殖和Ⅲ型胶元的产生也增多。文献报道肾小管间质细胞表达FGF[7],肾内粗提的FGF能促进3T3成纤维细胞的DNA合成[8],间质纤维化肾的间质细胞明显增生且合成胶元的能力提高4至5倍,胶元的类型包括Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ型[9]与本文的观察结果一致。因此,小管上皮的损伤刺激bFGF过度分泌,bFGF可能通过自分泌和(或)旁分泌机制引发小管上皮和间质细胞增生及进一步分泌bFGF,而且刺激Ⅲ型胶元合成,从而促进肾间质纤维化。

此外,2,8—二羟基腺嘌呤结晶周围的肉芽肿细胞表达bFGF和FGFR－1,而且出现广泛的细胞增殖,提示bFGF可能通过自分泌和/或旁分泌机制刺激结晶周围细胞原位增殖而形成肉芽肿。Hui Y Lan也认为肉芽肿的形成是由ED1⁺的单核巨噬细胞在局部增殖所致[10]。随着病程的进展,肉芽肿内细胞逐渐转化并合成胶元,也是促进间

维普资讯 http://www.cqvip.com

质纤维化的因素之一。

总之,肾小管损伤刺激bFGF和FGFR－1的高表达在肾间质纤维化过程中起了十分重要的作用。从基因或蛋白质水平抑制bFGF的产生以阻断其刺激间质增殖分化从而减缓肾间质纤维化进程是今后值得探讨的课题。

(致谢: 本论文为作者于北京医科大学病理系研修期间在邹万忠教授悉心指导下完成,在此深表感谢!)

参 考 文 献

1. Marcussen N. Lab Invest1992;66:165
2. Fine LG, et al. J Am Soc Nephrol1992;2:1163
3. Jaye M, et al. Biochem Biophy Acta1992:1135:185
4. 杜爱萍,等. 肾脏病与透析肾移植杂志 1997;6.221
5. Chang GH, et al. J Cell Physiol1991,148:295
6. Creely JJ, et al. Am J Pathol1990;136:1247
7 Herrea GA, et al. Human Pathol1994;25:883
8. Denis Gospodarowicz. Nature1992;1135,185
9. Rodemann HP, et al. Am J Kidney Dis1991;17(6):684
10. Hui Y Lan, et al. Am J Pathol1995;147(5):1214

(收稿日期 1998－11－06)

The expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) and FGFR－1 in renal tubulointerstitial fibrosis

Xu Man
Department of pathology, college of basic medical sciences

The relationship between the expression of bFGF, FGFR－1 and renaltubulointerstitial fibrosis was investigated by using immunohistochemistry and in situ hybridization techniques in thirty rat renal tubulointerstitial fibrosis models. The results showed that injured tubular cells excessively synthesized bFGF, FGFR－1 and collagen III; in addition, interstitial cells widely expressed bFGF and FGFR－1, their degree of expression accorded with PCNA expression in these cells and with collagen III deposition in the tubulointerstitium.It suggested that injury to tubular cells enhenced the secretion of bFGF and FGFR－1.bFGF probably promoted the regeneration of injured tubular cells,the proliferation of interstitial cells and the synthzsis of collagen III through autocrine and/or paracrine mechanism, and thus accelerated the fibrosis of the renal interstitium.

KEY WORDS Basic fibroblast growth factor; Fibroblast growth factor receptor－1;Renal tubulointerstitial fibrosis