

尿 TGF- β 1 检测在诊断慢性肾炎中的临床应用*

王小丽,刘瑞东 (泰山医学院附属莱芜市人民医院检验科,山东莱芜 271100)

摘要:目的 研究慢性肾炎患者尿转化生长因子 β 1(TGF- β 1)水平的变化及临床意义。方法 以22例健康者作为正常对照组(Norm),与40例慢性肾脏疾病患者尿 TGF- β 1 水平作比较,利用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和酶联免疫吸附试验(ELISA)的方法检测尿 TGF- β 1 水平。结果 与正常对照组(31.53 ± 11.59 ng/mmol.Cr)相比较,16例系膜增生性肾炎(MPG)患者(76.44 ± 24.29 ng/mmol.Cr),14例局灶性肾小球硬化症(FGS)患者(65.07 ± 20.59 ng/mmol.Cr)和10例IgA肾炎(IgA N)患者的尿 TGF- β 1 水平(67.01 ± 21.95 ng/mmol.Cr)明显增高,且差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 尿 TGF- β 1 水平变化可作为反映慢性肾炎的病情、判断病理类型及疾病诊断和疗效观察的重要指标。

关键词:转化生长因子- β 1;系膜增生性肾炎;局灶性肾小球硬化症;IgA 肾炎

中图分类号:R692.3;R392.11 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2015)01-088-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.01.024

Clinical Application of Urinary Transforming Growth Factor-Beta(TGF- β 1) Measurement in Diagnosing Chronic Nephritis

WANG Xiao-li, LIU Rui-dong (Department of Clinical Laboratory, Laiwu Municipal People's Hospital Affiliated Taishan Medical College, Shandong Laiwu 271100, China)

Abstract: Objective To investigate the level of urinary TGF- β 1 and evaluate its clinical significance in patients with chronic nephritis. Methods 22 healthy people and 40 patients with chronic nephritis were selected, the levels of urinary TGF- β 1 were measured by RT-PCR and ELISA. Results Urinary TGF- β 1 were significantly increased in Mesangial Proliferative Glomerulonephritis (76.44 ± 24.29 ng/mmol.Cr vs 31.53 ± 11.59 ng/mmol.Cr, $P < 0.01$); Focal Glomerular Sclerosis (65.07 ± 20.59 ng/mmol.Cr vs 31.53 ± 11.59 ng/mmol.Cr, $P < 0.01$) and IgA Nephritis (67.01 ± 21.95 ng/mmol.Cr vs 31.53 ± 11.59 ng/mmol.Cr, $P < 0.01$), comparing with normal group. Conclusion The levels of urinary TGF- β 1 could be a predictor in reflecting the state of renal disease, estimating pathological type, diagnosing the renal disease and observing the therapeutic effects.

Keywords: TGF- β 1; MPG; FGS; IgA N

转化生长因子 β 1(transforming growth factor-beta, TGF- β 1)是一种促进组织纤维化的重要细胞因子,可加速慢性肾炎患者肾脏组织的病理性组织硬化,且 TGF- β 1 增高是终末期肾脏疾病进展的重要病理生理机制。目前,唯一可防止肾脏疾病恶化的方法就是早发现、早诊断、早治疗。尿 TGF- β 1 含量可评估肾脏 TGF- β 1 的产生水平,对肾脏疾病的诊断预后及评估疗效非常重要。因此,尿 TGF- β 1 的检测对监测某些类型的肾脏疾病是非常重要的无伤害性的检测手段。本研究是为了评估尿 TGF- β 1 在慢性肾炎患者病理类型及临床诊断中的研究意义。

1 材料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 肾脏病患者组:我院2012年1月~2013年5月住院患者诊断为原发性慢性肾炎的住院患者40例,其中,系膜增生性肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MPG)患者16例,局灶性肾小球硬化症(focal glomerular sclerosis, FGS)

患者14例, IgA 肾炎(IgA nephritis, IgA N)患者10例;年龄15~71岁,平均年龄 50.1 ± 13.4 岁,诊断标准符合美国 KDOQI 指南制订的临床诊断标准^[1]。

1.1.2 健康对照组:选择同期来我院体检中心健康体检正常者22例:男性10例,女性12例,年龄20~70岁,平均年龄 48.5 ± 13.6 岁,无原发性肾小球或肾小管间质性疾病、尿路感染、心力衰竭、高血压、结缔组织病及近期使用肾毒性药物史。

1.2 仪器与试剂 日立7600全自动生化分析仪,科美化学发光仪,贝克曼免疫比浊仪, RNA 提取试剂、RT-PCR 试剂盒购于日本 TaKaRa 公司, TGF- β 1 试剂盒购自上海酶联生物耗材有限公司,清蛋白免疫分析试剂盒购自北京北方生物技术研究所,扩增引物 TGF- β 1 (ID: Hs00998133_m1)^[2] 购自 Bioystems 公司, β -actin 引物: GCTGTCCCTG-TATGCCTCT/GATGTCACGCACGATTTCC 购自 Invitrogen 公司。

1.3 方法

* 作者简介:王小丽(1982-),女,学士,初级检验师,专业:临床检验, E-mail:twx111@163.com。

1.3.1 标本收集:收集受试者 24 h 尿,准确记录尿量,标本不加防腐剂,混匀后留取 10 ml 保存于一40℃冰箱待测。清晨留取尿液 10 ml。

1.3.2 尿 TGF-β1 的 mRNA 水平的检测:收集患者及健康者晨尿尿沉渣标本 RT-PCR 法检测 TGF-β1 的 mRNA 水平。根据说明书操作:尿标本 1 800 r/min,离心 10 min,弃去上清,用生理盐水重悬沉淀物,1 000 r/min 离心 10 min,一80℃冷冻保存备用。RNA 提取后逆转录为 cDNA,进行 PCR 检测,PCR 扩增的条件是:94℃预变性 5 min;94℃ 30 s,62℃ 30 s,循环 40 次;72℃延伸 10 min。利用实时定量 PCR 和 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析 TGF-β1 基因相对表达量。

1.3.3 尿 TGF-β1 蛋白水平的测定:采用双抗体夹心 ELISA 法。收集后的标本 1 000×g 离心 10 min,分离去除尿沉渣,以上标本分装后置一70℃冰箱保存待测。

尿标本以 1:1 稀释。因 TGF-β1 在体内多以无活性形式存在,故予 20 μl 1 ml/dl HCl 酸化使其活化,加入 20 μl 1 ml/dl NaOH 中和,加入稀释后的标准品 50 μl 及待测样品 50 μl 于反应孔内。立即加入 50 μl 的生物素标记抗体。盖上膜板,轻轻振荡混匀,37℃温育 1 h。洗涤 3 次。每孔加入 80 μl 的亲链酶素-HRP,轻轻振荡混匀,37℃温育 30 min。洗涤 3 次。每孔加入底物 A,B 各 50 μl,轻轻振荡混匀,37℃避光温育 10 min。取出酶标板,迅速加入 50 μl 终止液,立即测定 450 nm 波长处各孔的吸光度 A 值。

1.3.4 尿清蛋白的测定:采用放射免疫分析法,由全自动 γ 免疫计数器分析检测。

1.3.5 Ccr 测定:留取 24 h 尿液,准确记录尿量,混匀取出 10 ml,当日检测 24 h 尿肌酐,按公式 $Ccr (ml/min) = 1.73 \times 24 h \text{ 尿肌酐浓度} (\mu mol/L) \times \text{每分钟尿量} (ml/min)$,实测体表面积,计算结果。

1.4 统计学分析 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用 SPSS 17.0 统计学软件进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组慢性肾炎患者与健康者尿 TGF-β1 mRNA 水平比较 RT-PCR 结果显示,MPG 组、FGS 组、IgA N 组的尿 TGF-β1 mRNA 水平表达明显增高(图 1),且差异有统计学意义($P < 0.01$),而 MPG 组、FGS 组、IgA N 组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 各组慢性肾炎患者与健康者尿 TGF-β1 蛋白水平比较 见表 1。检测慢性肾炎患者尿 TGF-β1 的同时检测同一尿标本的尿肌酐,用其作为标准比

(尿 TGF-β1/Cr),以减少尿检测 TGF-β1 不稳定状态的影响。慢性肾炎患者尿 TGF-β1 的蛋白浓度均高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

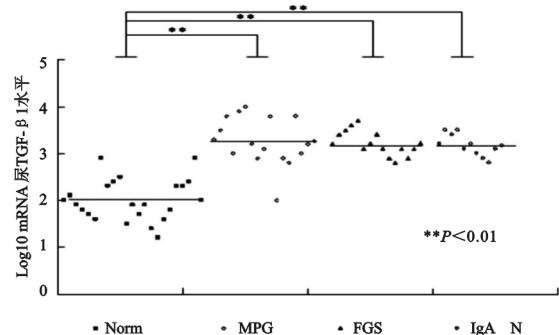


图 1 RT-PCR 检测 MPG 组、FGS 组、IgA N 组患者及健康者 TGF-β1 mRNA 的表达

表 1 各组慢性肾炎患者与健康者尿 TGF-β1 的蛋白浓度($\bar{x} \pm s$)

组别	n	尿 TGF-β1 (ng/mmol. Cr)	χ^2 值	P 值
Norm	22	31.53±11.59		
MPG	16	76.44±24.29	40.10	0.001
FGS	14	65.07±20.59	43.30	0.002
IgA N	10	67.01±21.95	53.88	0.001

2.3 各组慢性肾炎患者与健康者尿清蛋白水平比较 见表 2。慢性肾炎患者尿清蛋白/尿肌酐比值明显高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 各组慢性肾炎患者与健康者尿清蛋白的浓度($\bar{x} \pm s$)

组别	n	尿清蛋白/尿肌酐 (mg/mmol. Cr)	χ^2 值	P 值
Norm	22	62.91±8.22		
MPG	16	92.90±5.98*	4.71	0.001
FGS	14	94.35±5.87*	5.11	0.001
IgA N	10	95.29±3.81*	6.35	0.002

3 讨论 慢性肾炎是一组病程迁延,有多种病因、多种病理类型的原发性肾小球疾病。最终由于肾小球硬化和间质纤维化,导致肾脏的不可逆损伤,直至引起终末期肾衰竭。如何阻止肾小球的纤维化,延缓肾衰竭,这就要求探讨各种慢性肾炎的发病机制。然而,肾间质纤维化几乎是各种慢性肾炎进展到终末期肾病的共同途径和主要病理学基础^[3]。该过程涉及多种细胞外基质成分的积聚,如:纤粘蛋白等多种蛋白多糖;肾组织的成熟肾小管细胞由于上皮细胞间质转化作用导致细胞外间质的积累、沉积和组织纤维化,进而导致肾间质纤维化^[4];慢性肾脏疾病伴随纤维化的病理学特征,细胞间质的积累和重塑,剩余肾脏细胞的增殖,导致肾脏完整性破坏,肾脏功能受损。越来越多的研究发现,一系列生长因子与细胞因子的改变与这些纤维化成分的合成及代谢的调节密切相关,TGF-β1 可能是促进肾组织纤维化最重要的细胞因子之

一。

TGF- β 1 是一种促进细胞生长、细胞分化及维持组织稳态等多功能的细胞因子。研究发现 TGF- β 1 作为肾脏纤维化的重要分子学标志物,在肾脏组织中明显促进许多细胞外间质基因的表达^[5,6];促进细胞间质产生,参与细胞间质转化^[7],过量表达最终导致肾脏病理性的纤维化;通过减少胶原酶的产生和刺激组织抑制金属蛋白酶的表达抑制细胞外基质的转化和更新^[8]。在许多肾脏疾病中,TGF- β 1 已经成为细胞生长和细胞外基质积累的主要介导者,例如糖尿病肾病,实验性肾小球肾炎和单纯性输尿管梗阻^[9,10]。有研究表明,TGF- β 1 的作用与肾脏疾病的进展密切相关。在肾脏病患者中,TGF- β 1 可调节炎症反应;能抑制肾小管上皮细胞、肾小球上皮细胞和内皮细胞的增殖;能促进细胞外间质的合成和沉积,减少细胞外间质的降解,最终引起肾小球硬化和肾间质纤维化^[3]。Lefty A 蛋白可抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路通过减少 TGF- β 1 的表达,抑制肾小管上皮细胞的凋亡,起到对细胞的保护作用^[11]。以上大量研究表明 TGF- β 1 对肾脏疾病病情进展起重要作用,抑制 TGF- β 1 的表达对肾脏功能有重要的保护作用。

血尿素氮、肌酐等是肾功能检测的常规项目,更有效的诊断和延缓肾衰竭的检测指标有待研究。尿 TGF- β 1 较血 TGF- β 1 更能敏感地反映慢性肾炎的病理改变过程和疾病进展过程。在本研究中,我们证实了 TGF- β 1 mRNA 及蛋白水平在慢性肾炎患者的分泌明显增高。与 Kalliakmani 等^[12]研究结果相符合,尿 TGF- β 1 在 IgA 肾炎和局灶性肾小球硬化症患者中均明显增高。Yamamoto 等^[13]研究发现正常人肾脏组织只有少数肾小球细胞表达少量的 TGF- β 1 mRNA,而在人类肾小球疾病中,肾内 TGF- β 1 mRNA 含量明显升高,且与肾间质纤维化密切相关,支持本研究结论,故检测肾内 TGF- β 1 的含量具有重要的临床意义。研究证明,血管紧张素转化酶抑制剂联合血管紧张素受体拮抗剂治疗慢性肾病患者,使其尿 TGF- β 1 水平明显降低,可能是通过减少肾脏产生 TGF- β 1,从而保护肾脏功能^[14]。因此,本研究显示,尿 TGF- β 1 对诊断慢性肾炎有重要的临床意义,也为我们后续研究药物治疗慢性肾炎患者尿 TGF- β 1 水平的变化奠定了实验基础。

参考文献:

[1] 美国 NKF-K/DoQI 工作组. 慢性肾脏病及透析的临床实践指南[M]. 王海燕,王 梅,译. 北京:人民卫生出版社,2003:13.

- The United States NKF-K/DoQI Working Group. Clinical practice guidelines of chronic kidney disease and dialysis[M]. Wang HY, Wang M, Translated. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003:13.
- [2] do Nascimento JF, Canani LH, Gerchman F, et al. Messenger RNA levels of podocyte-associated proteins in subjects with different degrees of glucose tolerance with or without nephropathy[J]. BMC Nephrol, 2013, 14(1):214.
- [3] Border WA, Noble NA. Transforming growth factor betain tissue fibrosis[J]. N Engl J Med, 1994, 331(19):1286-1292.
- [4] Liu YH. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(1):1-12.
- [5] Kasinath BS. Glomerular endothelial cell proteoglycans-regulation by TGF-beta 1[J]. Arch Biochem Biophys, 1993, 305(2):370-377.
- [6] Nakamura T, Miller D, Ruoslahti E, et al. Production of extracellular matrix by glomerular epithelial cells is regulated by transforming growth factor-beta 1[J]. Kidney Int, 1992, 41(5):1213-1221.
- [7] Remuzzi G, Ruggenti P, Perico N. Chronic renal diseases: renoprotective benefits of renin-angiotensin system inhibition[J]. Ann Intern Med, 2002, 136(8):604-615.
- [8] Edwards DR, Murphy G, Reynolds JJ, et al. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor[J]. EMBO J, 1987, 6(7):1899-1904.
- [9] Kaneto H, Morrissey J, Klahr S. Increased expression of TGF-beta 1 mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation[J]. Kidney Int, 1993, 44(2):313-321.
- [10] Schneider A, Thaïss F, Rau HP, et al. Prostaglandin E1 inhibits collagen expression in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis: Possible role of TGF beta[J]. Kidney Int, 1996, 50(1):190-199.
- [11] Zheng RP, Bai T, Zhou XG, et al. Lefty a protein inhibits TGF- β 1-mediated apoptosis in human renal tubular epithelial cells[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(2):621-625.
- [12] Kalliakmani P, Nakopoulou L, Tsakas S, et al. Urinary interleukin-6 (IL-6) and transforming growth factor (TGF- β) levels in corticosteroid-treated patients with IgA nephropathy[J]. Clin Nephrol, 2011, 76(2):144-150.
- [13] Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, et al. Sustained expression of TGF- β 1 underlies development of progressive kidney fibrosis[J]. Kidney Int, 1994, 45(3):916-927.
- [14] Agarwal R, Siva S, Dunn SR, et al. Add-on angiotensin II receptor blockade lowers urinary transforming growth factor-beta levels[J]. Am J Kidney Dis, 2002, 39(3):486-492.

收稿日期:2014-07-18

修回日期:2014-12-01