

# 结缔组织生长因子在自发性高血压大鼠肾脏的表达及意义

王绍华, 刘昌慧, 刘淑华

(武汉大学人民医院老年病科, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 病理学与病理生理学; 自发性高血压大鼠; 结缔组织生长因子; 肾;  $\beta_2$ -微球蛋白; 转化生长因子  $\beta$ ; 细胞外基质

[摘要] 为了研究结缔组织生长因子在自发性高血压大鼠肾脏中的表达及其与高血压肾损害的关系, 以同龄雄性 WKY 大鼠和自发性高血压大鼠为研究对象, 测量 12 周和 32 周时尾动脉压、肾功能和尿  $\beta_2$  微球蛋白, 并用免疫组织化学法检测结缔组织生长因子在肾脏中的表达。结果发现, 与同龄 WKY 大鼠比较, 自发性高血压大鼠的尿素氮和血肌酐的差异无显著性统计学意义, 而尾动脉压明显增高 (12 周时前者为  $138 \pm 17$  mmHg, 后者为  $169 \pm 6$  mmHg,  $P < 0.01$ ; 32 周时前者为  $133.4 \pm 14.2$  mmHg, 后者为  $185.7 \pm 12.3$  mmHg,  $P < 0.01$ ); 尿  $\beta_2$  微球蛋白也显著增高 (12 周时前者为  $48.1 \pm 9.3$  ng/L, 后者为  $76.4 \pm 11.2$  ng/L,  $P < 0.05$ ; 32 周时前者为  $61.5 \pm 14.7$  ng/L, 后者为  $135.2 \pm 27.6$  ng/L,  $P < 0.05$ ), 且在自发性高血压大鼠组, 32 周龄大鼠的尿  $\beta_2$  微球蛋白也比 12 周龄的明显增加 ( $P < 0.05$ )。免疫组织化学半定量检测发现, 自发性高血压大鼠组肾脏中结缔组织生长因子的表达相对与同龄 WKY 大鼠明显升高 (12 周时前者为  $0.49 \pm 0.07$ , 后者为  $0.28 \pm 0.05$ ,  $P < 0.05$ ; 32 周时前者为  $0.81 \pm 0.08$ , 后者为  $0.32 \pm 0.04$ ,  $P < 0.01$ )。同样在自发性高血压大鼠组, 结缔组织生长因子在 32 周龄大鼠肾脏的表达也比 12 周龄有显著增加 ( $P < 0.05$ ), 而且结缔组织生长因子的表达与尿  $\beta_2$  微球蛋白有显著正相关关系 (12 周时  $r = 0.785$ ,  $P < 0.05$ ; 32 周时  $r = 0.837$ ,  $P < 0.05$ )。结果提示, 结缔组织生长因子在自发性高血压大鼠肾脏表达的显著增加, 可能是慢性高血压导致的肾损害的重要机制之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Expression of Connective Tissue Growth Factor in the Kidney of Spontaneously Hypertensive Rats

WANG Sha-Hua, LIU Chang-Hui, and LIU Shu-Hua

(Department of Geriatric, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan 430066, China)

[KEY WORDS] Spontaneously Hypertensive Rat; Connective Tissue Growth Factor; Kidney;  $\beta_2$ -microglobulin; Transforming Growth Factor; Extracellular Matrix

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression of connective tissue growth factor (CTGF) in the kidney of spontaneously hypertensive rats. **Methods** The comprised normotensive control (WKY) and hypertensive groups (SHR) were taken as the objects of study, of which blood pressure, urinary  $\beta_2$ -microglobulin, Bun, Scr were acquired at 12-week old and 32-week old respectively, at the same time, the renal expression of CTGF were determined, when the rat were sacrificed. **Results** In SIIR, the blood pressure, urinary microglobulin, except Bun, Scr were significantly increased compared with age-matched controls, even in the SHR group, the urinary  $\beta_2$ -MP in 32-week old group were markedly increased, compared with that in 12-week old group. Semi-quantitative assessment of the immune-histochemical staining showed that renal expression of CTGF in SHR groups were significantly increased compared with that in WKY groups. Further more, in SHR, the expression of CTGF in 32-week old group were also markedly increased compared with that in 12-week old group, and it is positively correlated with the increasing of urinary  $\beta_2$ -microglobulin. **Conclusion** Renal expression of CTGF is increased in SHR, which is possibly involved in the development of renal damage.

微量蛋白尿与高血压病早期肾损害关系密切, 是衡量慢性高血压所致的肾脏疾病进展的重要指标之一<sup>[1,2]</sup>。结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 是新发现的细胞因子, 可由成纤

维细胞等分泌<sup>[3,4]</sup>。有关 CTGF 与肾纤维化的关系的研究已成为这一领域中新的热点。为了解在慢性高血压所致的肾损害中, CTGF 在肾脏的表达情况及其意义, 我们以不同年龄的 WKY 大鼠和自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rats, SHR) 为研究对象, 用免疫组织化学方法检测不同鼠龄 (12 周和 32 周) 两种大鼠肾脏中 CTGF 的表达情况, 以及同期的肾功能和尿  $\beta_2$  微球蛋白 ( $\beta_2$ -microglobulin,  $\beta_2$ -MG) 的含量, 并分析了 CTGF 的表达情况与尿  $\beta_2$ -MG 的

[收稿日期] 2004-03-22 [修回日期] 2004-08-24

[作者简介] 王绍华, 硕士研究生, 研究方向为老年高血压和冠心病。刘昌慧, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事老年心血管病的研究。刘淑华, 主任医师, 教授。

相关性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

12 周龄雄性 SHR 18 只, 随机分成 12 周龄(9 只)和 32 周龄(9 只)两组; 同龄雄性 WKY 20 只, 随机分成 12 周龄(10 只)和 32 周龄(10 只)两组。两种大鼠均购自中国医学科学院实验动物繁育中心, 12 周龄组以普通饲料适应性喂养 3 天后处死, 其它大鼠于 32 周龄加 3 天时处死。

### 1.2 大鼠尾动脉血压测量

采用 RBP-1 型大鼠尾动脉血压心率测定仪(中日友好医院)测量大鼠尾动脉血压, 计数心率。

### 1.3 生物化学指标检测

处死前用代谢笼收集大鼠 24 h 尿液, 然后拉断颈椎, 于胸部碘酒和酒精消毒, 用手触摸心尖搏动处进针, 于心脏抽血 2 mL, 加入抗凝管, 3 000 r/min 离心 5 min, 取上清液送检。尿素氮和肌酐由 HI-TACHI7150A 自动生物化学分析仪检测, 尿  $\beta_2$  微球蛋白按照放射免疫试剂盒(中国原子能科学研究所)说明书进行检测。

### 1.4 免疫组织化学检测结缔组织生长因子

肾组织标本经 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 3  $\mu$ m 厚切片, 经二甲苯脱蜡, 分级酒精水化后, 按 SP 法试剂盒(福州迈新生物技术有限公司)说明书操作。切片脱蜡入水, 蒸馏水洗 3 min  $\times$  3 次。滴加 3%  $H_2O_2$  溶液、室温 10 min, 蒸馏水洗 2 min  $\times$  2 次, PBS 洗 2 min  $\times$  2 次。加正常兔血清, 室温 15 min。去除多余血清, 加羊抗大鼠 CTGF 多克隆抗体(Santa Cruz 公司), 室温孵育 60 min, PBS 洗 3 min  $\times$  3 次。滴加生物素化的兔抗羊单克隆抗体(北京亚法生物制品有限公司), 室温孵育 15 min, PBS 洗 3 min  $\times$  3 次。滴加过氧化物酶标记的链酶亲合素, 室温孵育 15 min, PBS 洗 3 min  $\times$  3 次。DAB 显色 2~5 min, 苏木素复染、脱水封片、观察。

肾组织 CTGF 的免疫组织化学半定量分析采用 HPIAS2000 型图象分析软件(同济千屏影像工程公司研制), 分析方法为每个标本在放大 200 倍图象的肾皮质区依次选取 40 个视野, 染色阳性部位的深浅及范围以平均光密度表示。

### 1.5 统计学方法

所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 统计软件, 两组间资料比较采用  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为有显著性差异。肾组织中 CTGF 的表达与尿微量蛋白

的相关性采用 spearman 等级相关分析。

## 2 结果

### 2.1 大鼠血压、尿 $\beta_2$ 微球蛋白和肾功能改变

大鼠血压、尿  $\beta_2$  微球蛋白和肾功能的测定结果见表 1(Table 1)。与同龄 WKY 大鼠比较, SHR 尾动脉压和尿  $\beta_2$  微球蛋白均显著升高, 肾功能改变不明显, 而 WKY 组大鼠 12 周与 32 周比较, 尾动脉压和尿  $\beta_2$  微球蛋白及肾功能都无显著性差异。

表 1. 大鼠血压、尿  $\beta_2$  微球蛋白和肾功能改变( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Changes of SBP,  $\beta_2$ -MG and renal function in each group and time

指 标	WKY 大鼠		SHR	
	12 周	32 周	12 周	32 周
收缩压(mm Hg)	138 $\pm$ 17.2	133.4 $\pm$ 14.2	169 $\pm$ 6.3 <sup>b</sup>	185.7 $\pm$ 12.3 <sup>b</sup>
$\beta_2$ MG(ng/L)	48.1 $\pm$ 9.3	61.5 $\pm$ 14.7	76.4 $\pm$ 11.2 <sup>a</sup>	135.2 $\pm$ 27.6 <sup>a</sup>
肌酐( $\mu$ mol/L)	45.3 $\pm$ 10.4	48.2 $\pm$ 10.7	51.3 $\pm$ 12.5	41.2 $\pm$ 4.7
尿素氮(mmol/L)	8.4 $\pm$ 1.3	8.7 $\pm$ 2.1	8.5 $\pm$ 3.2	9.2 $\pm$ 2.3

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与同龄 WKY 大鼠比较

### 2.2 肾脏中结缔组织生长因子的表达

WKY 大鼠肾小球仅有较微弱的 CTGF 表达, 12 周和 32 周的光密度分别为 0.28  $\pm$  0.05 和 0.32  $\pm$  0.04, 而 SHR 肾小球 CTGF 的表达明显增加, 12 周和 32 周光密度值分别为 0.49  $\pm$  0.07 和 0.81  $\pm$  0.08。两组同龄比较, 差异非常显著(12 周时  $P < 0.05$ , 32 周时  $P < 0.01$ ; 表 2, Table 2)。

### 2.3 肾脏结缔组织生长因子表达与尿 $\beta_2$ 微球蛋白之间的关系

结缔组织生长因子的表达与尿  $\beta_2$  微球蛋白的测定结果见表 2(Table 2)。可见在 SHR 组, 随着高血压持续时间的延长, 肾脏 CTGF 的表达明显增加( $P < 0.05$ ), 尿  $\beta_2$  微球蛋白也显著增加。12 周时尿  $\beta_2$  微球蛋白与肾脏 CTGF 的表达呈正相关( $r = 0.785$ ,  $P < 0.05$ ); 与尾动脉压呈正相关( $r = 0.863$ ,  $P < 0.05$ ), 32 周时  $\beta_2$  微球蛋白与肾脏 CTGF 的表达同样呈正相关( $r = 0.837$ ,  $P < 0.05$ ), 而与尾动脉压无相关性( $r = 0.028$ ,  $P > 0.05$ ), 这是因为 SHR 的尾动脉压在 20 周左右已接近最高峰, 随着时间的延长不会再有较大的变化, 而尿  $\beta_2$  微球蛋白量则会随着高血压的持续存在, 因肾脏的进一步损害而加重。WKY 组大鼠 12 周及 32 周尿  $\beta_2$  微球蛋白及 CTGF 的表达差异均无显著性统计学意义。

### 2.4 光镜下自发性高血压大鼠肾组织形态学改变

12 周时 SHR 可见 CTGF 阳性主要位于局部肾小球上皮细胞、系膜细胞及系膜区, 且基底膜轻微增

厚,但未见系膜细胞显著性增生肥大。32 周时 CTGF 阳性进一步扩大,大部分肾小球上皮细胞、系膜细胞及系膜区明显可见 CTGF 表达,而且,系膜细胞明显肥大、基底膜增厚,系膜区扩张进一步加重。

表 2. 大鼠肾脏结缔组织生长因子表达与尿  $\beta_2$  微球蛋白测定结果( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2. Expression of CTGF in Kidney and the relation between CTGF and urinary  $\beta_2$ -MG at different stages

分 组	尿 $\beta_2$ 微球蛋白 (ng/L)		CTGF 光密度值	
	12 周	32 周	12 周	32 周
WKY 大鼠	48.1 $\pm$ 9.3	61.5 $\pm$ 14.7	0.28 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.04
SHR	76.4 $\pm$ 11.2 <sup>b</sup>	135.2 $\pm$ 27.6 <sup>ab</sup>	0.49 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.81 $\pm$ 0.08 <sup>ac</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与 12 周比较; b:  $P < 0.05$ , c:  $P < 0.01$ , 与同龄 WKY 大鼠比较

### 3 讨论

慢性进行性肾病是原发性高血压患者靶器官损伤的一个重要表现,也是导致肾功能衰竭的疾病之一。自发性高血压大鼠类似人类的原发性高血压,是研究高血压及其靶器官损伤的良好动物模型。

目前认为,原发性高血压造成肾功能受损,其起始机制并不是肾血管收缩引起的肾小球缺血性损害,而主要是原发性高血压造成的肾有效滤过压增高,肾小球系膜区扩张,滤过面积缩小,滤过膜的生理完整性遭到破坏,从而尿中微量蛋白排泄增加,肾小球滤过率下降,同时肾小管重吸收功能受到一定损坏。而尿素氮和血肌酐一般只是反映中晚期肾功能改变的指标,所以尿微量蛋白的增加是高血压靶器官损害的早期信号,它反映了血管内皮功能的下降及血管动力学的改变<sup>[5]</sup>。另外,蛋白尿既是肾损害发生的起始信号,也是促进肾功能进一步恶化的主要因素。因为蛋白尿反过来会加剧肾小球的损害,两者相互促进,随着时间的推移,最后就会导致中晚期肾功能的改变<sup>[6]</sup>。

结缔组织生长因子(CTGF)是近年来新发现的由 349 个氨基酸组成的相对分子质量为 36~38 kDa 的富含半胱氨酸的分泌肽<sup>[7]</sup>,属于既刻早期反应基因中的 CCN 家族成员。体外和体内实验结果提示,CTGF 可能刺激细胞增殖及细胞外基质的合成,在肾脏中主要由脏层上皮细胞、壁层上皮细胞、系膜细胞以及肾小球和肾小管周围的间质细胞表达<sup>[8]</sup>。此后

研究证实,CTGF 广泛存在于人类组织器官中,它具有促有丝分裂、趋化细胞、诱导粘附、促进细胞增生和促进细胞外基质合成等作用,并参与机体组织的创伤与修复<sup>[9]</sup>。在生理状态时,机体组织细胞可有基础量 CTGF 分泌,病理状态下,CTGF 过度表达与某些增生性或纤维化性疾病的发生密切相关。

本实验中发现 12 周和 32 周 SHR 尿  $\beta_2$  微球蛋白明显增加,而 BUN、Scr 无明显改变,说明有早期肾小球的损害的存在,与此同时,肾小球 CTGF 的表达亦明显增加,且 CTGF 的表达与尿  $\beta_2$  微球蛋白量有显著的正相关关系。许多研究已证实高糖、转化生长因子及机械等因素与肾小球早期受损有关,Riser 等<sup>[9]</sup>发现上述因素均可以刺激肾小球系膜细胞,产生 CTGF,因此 CTGF 的表达增加可能是慢性高血压早期肾损害发生的重要机制。

总之,在本研究中,高血压组较正常组肾脏 CTGF 的表达均显著增加,且随着高血压的持续作用,肾脏 CTGF 的表达也明显增加,且与尿  $\beta_2$  微球蛋白量增加密切相关。进一步研究明确 CTGF 参与早期肾脏损害的机制,对于预防和控制慢性高血压所致的肾损害的发生和发展将具有重要的临床意义。

### [参考文献]

- [1] 梁惠英, 裴晓富, 王长厚, 彭万忠, 张军, 王玉刚, 等.  $\alpha_1$  微球蛋白对高血压病早期肾损害的临床价值. 中国动脉硬化杂志, 1998, 6(2): 155
- [2] Healy E, Hugh RB. Role of tubule epithelial cells in pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis induced by glomerular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1998, 7: 525
- [3] Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF- $\beta$  action on fibroblasts. *Cytokine Factor Rev*, 1997, 8: 171
- [4] Kothapalli D, Grotendorst GR. CTGF modulates cells cycle progression in cAMP-Parrested NRK fibroblasts. *J Cell Physiol*, 2000, 182: 119
- [5] 区碧如, 吴峻, 孙明. 早期应用 Losartan 对高血压蛋白尿的影响. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(3): 231-233
- [6] Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, et al. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol*, 1991, 114: 1285-1294
- [7] Ito Y, Aten J, Benda RJ, et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int*, 1998, 53: 853-861
- [8] Gupta S, Clarkson Mr, Duggan J. Connective tissue growth factor: potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int*, 2000, 58: 1389
- [9] Riser BL, Denichilo M, Cortes P, et al. Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11: 25-38

(此文编辑 胡必利)