

肝细胞生长因子、TGF- β 1 与脑动脉粥样硬化程度的关系

申冠洋, 宋志秀, 常利, 李彤

(新乡医学院第一附属医院, 河南省新乡市 453100)

[关键词] 脑动脉粥样硬化; 肝细胞生长因子; 转化生长因子 β 1

[摘要] **目的** 检测脑动脉粥样硬化(CAs)患者血清肝细胞生长因子(HGF)和转化生长因子 β 1(TGF- β 1)水平,探讨两者水平与 CAs 程度间的关系,为外源性 HGF 干预提供依据。**方法** 71 例 CAs 患者及对照组患者 33 例,抽取血样,采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清中 HGF、TGF- β 1 含量。**结果** CAs 组患者血清 HGF 水平显著低于对照组($P < 0.05$),不同 CAs 程度组患者间血清 HGF 水平相互比较差异有显著性($P < 0.05$),在 CAs 组内随 CAs 程度逐渐加重,HGF 水平表现出一定程度上升趋势。CAs 组患者血清 TGF- β 1 水平显著高于对照组($P < 0.001$),不同 CAs 程度组患者血清 TGF- β 1 水平相互比较差异有显著性($P < 0.05$),在 CAs 组内随 CAs 程度逐渐加重,TGF- β 1 水平表现出一定程度下降趋势。**结论** HGF 和 TGF- β 1 之间存在动态互逆平衡关系,考虑未来给予外源性 HGF 治疗 CAs 所致缺血性脑血管病存在可行性。

[中图分类号] R743

[文献标识码] A

Relationship Between Hepatocyte Growth Factor, Transforming Growth Factor Beta One and Cerebral Atherosclerosis Degree

SHEN Guan-Yang, SONG Zhi-Xiu, CHANG Li, and LI Tong

(The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang, Henan 453100, China)

[KEY WORDS] Cerebral Atherosclerosis; Hepatocyte Growth Factor; Transforming Growth Factor Beta One

[ABSTRACT] **Aim** To detect the serum levels of hepatocyte growth factor (HGF) and transforming growth factor beta one (TGF- β 1) in cerebral atherosclerosis(CAs) patients, explore the relationship between CAs degree and the extent of HGF, TGF- β 1, hope to provide the basis for the intervention of exogenous HGF. **Methods** 71 CAs patients and 33 normal control ones were enrolled, using the double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) to detect the serum level of HGF, TGF- β 1. **Results** The patients' serum levels of HGF in CAs group were significantly lower than the control group ($P < 0.05$). Levels of serum HGF was different compared with each other in CAs groups ($P < 0.05$), HGF levels in the CAs groups gradually increased with the CAs degree. The patients' serum levels of TGF- β 1 in CAs group were significantly higher than the control group ($P < 0.001$). Levels of serum TGF- β 1 was different compared with each other in CAs groups ($P < 0.005$), TGF- β 1 levels in the CAs groups gradually decreased with the CAs degree. **Conclusion** There has been a dynamically reciprocal balanced relationship between HGF and TGF- β 1, considering viability existing in the administration of exogenous HGF treatment for ischemic cerebrovascular disease caused by CAs in the future.

脑卒中已跃居我国第一大死亡原因和首位致残原因。脑动脉粥样硬化(cerebral atherosclerosis, CAs)是脑血管病主要原因,以弥漫性小血管病变为主,目前尚无有效治疗方法。肝细胞生长因子(hep-

atocyte growth factor, HGF)是促血管新生因子,外源性 HGF 应用于中枢神经系统其安全性有待探讨。研究表明^[1,2], HGF 与转化生长因子 β 1(transforming growth factor-beta one, TGF- β 1)是一对平衡因

[收稿日期] 2013-12-10

[基金项目] 河南省科技厅资助课题(112101310400);河南省卫生厅资助课题(201203067)

[作者简介] 申冠洋,硕士研究生,研究方向为脑血管病,E-mail 为 YANGYANGSHEN100@yeah.net。宋志秀,硕士,副主任医师,研究方向为脑血管病的临床研究及对头晕的分型及量化。通讯作者李彤,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事脑血管病的基础与临床研究。

子,依不同细胞、不同细胞环境,呈相互促进与抑制的双重效应,在组织损伤后的周围组织纤维化和中枢神经组织胶质化修复中具有明确的相互调控作用。本实验拟探讨 HGF 和 TGF- β 1 间平衡与 CAs 的关系,为外源性 HGF 应用于脑组织促脑血管新生提供依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

2012 年 12 月至 2013 年 6 月我院神经内科以缺血性脑血管病为首发症状的住院患者 71 例(CAs 组),其中男性 29 例,女性 42 例,年龄 34 ~ 87 (61.13 \pm 11.77)岁,均符合全国第四届脑血管病会议修订的诊断标准,经头部 CT 或 MRI 检查确诊,入院后完善颅内动脉血管检查(CTA 或 MRA)入选病例,并进行颅内动脉硬化程度分级。排除标准:(1)心源性脑栓塞患者;(2)严重心、肝、肺、肾脏疾病及有代谢性疾病患者;(3)血液系统疾病患者;(4)近期有外伤、感染或自身免疫性疾病患者;(5)颅内及全身肿瘤、输血,近期内使用免疫抑制剂治疗的患者等。

对照组为同期住院行外科手术治疗患者 33 例(入院常规检查排除高血压、高血脂),其中男性 20 例,女性 13 例,年龄 30 ~ 82 (56.39 \pm 12.19)岁。

1.2 脑血管硬化程度判定标准

CAs 组均根据入院后头部 CTA 或者 MRA 检查判定为脑动脉硬化患者,结合张丽雅等^[3]对脑动脉硬化程度评估标准,根据影像学检查(根据血管形态、走行、血流信号改变及远端血管显示程度评估

和综合分析,其中血管血流信号改变可为一支或多支血管)拟定颅内动脉血管硬化程度分级标准,并依标准分为轻度、中度、重度脑动脉硬化(表 1)。

1.3 标本收集

清晨空腹静脉穿刺采集患者血样 5 mL,保存于普通生化检测试管,常温下静置 2 h 后 2500 r/min 高速离心 15 min,无菌注射器分离血清,置于 1.5 mL 已高压灭菌 EP 管内,标记后 -70℃ 保存待检。

1.4 标本检测

1.4.1 检查试剂 人 HGF 检测工作试剂盒(human HGF DuoSet ELISA)和人 TGF- β 1 检测工作试剂盒(human TGF- β 1 DuoSet ELISA)均购自美国 R&D 公司(R&D Systems Inc. Minneapolis, USA);TMB 显色液(ELISA HRP 显色用);磷酸盐缓冲液;牛血清白蛋白;4-羟乙基哌嗪乙磺酸;吐温 20;96 孔酶标板 Costar 出品;其余实验试剂和仪器均由河南省神经病学研究所提供。

1.4.2 检测方法 标本检测采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定法,按照说明书要求进行酶标板包被、样品检测、显色及 OD 值测定,并根据所测 OD 值拟合标准曲线和方程,进行样品 HGF、TGF- β 1 浓度运算。

1.5 统计学处理方法

实验数据采用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析。两样本均数统计采用独立样本 *t* 检验,多组间比较选用单因素方差分析(one-way ANOVA),用 Levene 检验进行方差齐性检验,方差不齐时采用近似方差齐性检验和非参数检验。非正态分布资料以中位数和四分位数表示,进行非参数统计检验,以 $\alpha = 0.05$ 为标准检验水准。

表 1. 脑血管硬化程度判定标准

Table 1. Judging standard of cerebral atherosclerosis

	轻度	中度	重度
血管形态、走行	脑血管接近正常,管壁无僵硬,粗细均匀,走行顺畅	脑血管管壁僵硬、粗细不均,走行迂曲	脑血管管壁僵硬、粗细不均,走行迂曲
血流信号改变及远端血管显示程度	血管局部血流信号减弱,远端血管血流信号正常	血管局部血流信号明显减弱,远端血管血流信号减弱	血管局部血流信号中断,远端血管血流信号消失
大血管* 内膜	偶见($\leq 10\%$)增厚或毛糙	可见($\leq 50\%$)增厚或毛糙	易见明显($> 50\%$)增厚或毛糙
二级分支情况	显示清晰	近端显示较清晰	稀少,显示不佳
大血管* 狭窄	狭窄 $< 50\%$ 管腔	狭窄 $50\% \sim 70\%$ 管腔	狭窄 $> 70\%$ 管腔,或一侧大血管* 主干未显影或远端闭塞

*:指双侧颈内动脉及大脑前、中、后动脉和椎-基底动脉。

2 结果

2.1 两组患者年龄及性别构成

对两组患者年龄、性别分别进行 Levene 方差齐

性检验(F 值即 Levene F 统计量, $P1$ 均大于 0.05, 可以认为方差齐性; $P2$ 为方差齐同条件下的 t 检验结果),结果发现两组患者年龄、性别比较差异均无显著性($P > 0.05$),表明实验随机分组均衡(表 2)。

表 2. 两组患者年龄及性别构成比较

Table 2. Comparison of age and sex in the two groups

参 数	年 龄		性 别	
	对照组($n = 33$)	CA _s 组($n = 71$)	对照组($n = 33$)	CA _s 组($n = 71$)
Mean	56.39	61.13	1.39	1.59
F		0.099		0.081
$P1$		0.754		0.776
t		1.888		1.893
$P2$		0.062		0.061

2.2 血清 HGF、TGF- β 1 含量

CA_s 组患者血清 HGF 水平显著低于对照组($P < 0.05$),而其血清 TGF- β 1 水平显著高于对照组($P < 0.01$;表 3)。不同 CA_s 程度组间患者血清 HGF 水平相互比较差异有显著性($P < 0.05$),在 CA_s 组

内随 CA_s 程度逐渐加重,HGF 水平表现出一定程度上升趋势;不同 CA_s 程度组间患者血清 TGF- β 1 水平相互比较差异有显著性($P < 0.005$),在 CA_s 组内随 CA_s 程度逐渐加重,TGF- β 1 水平表现出一定程度下降趋势(表 4)。

表 3. 两组患者 HGF、TGF- β 1 血清含量

Table 3. The serum level of HGF and TGF-beta 1 of the two groups

分 组	n	HGF (ng/L)	TGF- β 1 (ng/L)
对照组	33	1227.87(728.42 ~ 1946.13)	2870.93(1281.92 ~ 3443.61)
CA _s 组	71	673.92(226.41 ~ 1193.57)	3231.87(2924.72 ~ 3736.62)
t		-2.596	4.562
P		0.011	0.000

表 4. 不同程度脑动脉粥样硬化患者血清 HGF、TGF- β 1 含量

Table 4. The serum levels of HGF and TGF-beta 1 in different degree of CA_s patients

脑动脉硬化程度	n	HGF (ng/L)	TGF- β 1 (ng/L)
无(对照组)	33	1207.5(708.80 ~ 1926.20)	2889.80(1263.50 ~ 3458.30)
轻度	22	396.61(159.2 ~ 828.80) ^a	3246.10(3011.30 ~ 3664.90) ^b
中度	12	815.38(524.50 ~ 1315.80) ^{ac}	3220.60(2914.00 ~ 3846.20) ^{bd}
重度	37	898.58(281.77 ~ 1446.80) ^{ace}	3196.90(2898.30 ~ 3773.00) ^{bdf}
F		3.663	5.887
P		0.015	0.001

a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.005$,与对照组比较;c 为 $P < 0.05$,d 为 $P < 0.005$,与轻度 CA_s 组比较;e 为 $P < 0.05$,f 为 $P < 0.005$,与中度 CA_s 组比较。

2.3 血清 HGF 和 TGF- β 1 含量与 CA_s 程度的关系

HGF 含量在轻度 CA_s 组较对照组明显降低,在中、重度 CA_s 组 HGF 含量较前略有升高,但总体含量较对照组明显下降,HGF 水平随 CA_s 程度逐渐加重,表现出一定程度上升趋势;TGF- β 1 含量在轻度 CA_s

组较对照组明显升高,在中、重度 CA_s 组 TGF- β 1 含量较前略有下降,TGF- β 1 水平随 CA_s 程度逐渐加重表现出一定程度下降趋势(图 1)。可见在 CA_s 患者体内 HGF 和 TGF- β 1 间正常平衡被打破,在 TGF- β 1 占优势时器官纤维化进程和功能失调加快,对本实验

中患者而言其颅内动脉粥样硬化进程加快。

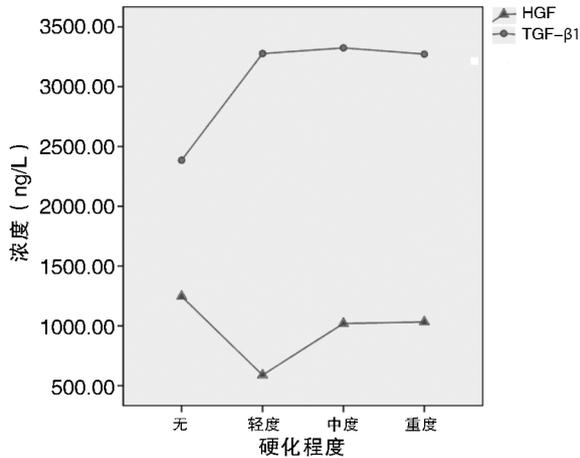


图 1. HGF、TGF-β1 含量随脑动脉粥样硬化程度改变情况
Figure 1. The changes of HGF and TGF-beta 1 content with the degree of cerebral atherosclerosis

3 讨论

脑血管疾病为神经内科常见病、多发病,其中动脉粥样硬化为主要致病因素之一;美国和欧洲调查显示,动脉粥样硬化为其首要致残和死亡原因^[4,5]。目前为止,动脉粥样硬化是冠状动脉疾病、颈动脉疾病和其他外周血管病最常见潜在病因,与较高的发病率和死亡率有关,因此,近年来对于脑动脉粥样硬化的病因、发病机制、预防等研究成为临床工作重点。在进入日趋老龄化社会的中国,发病率逐年升高的脑血管病给患者及家庭、社会都带来巨大负担,缺血性脑卒中及血管性痴呆对患者长远生活质量造成较大影响。

动脉粥样硬化改变属于病理生理学概念,目前较为公认的流行病学理论认为血管壁的慢性或者长期重复性损伤导致动脉粥样硬化,这些损伤刺激诱导突出的炎性成分的增生性应答反应^[6]。这些增生的炎性物质使得血管腔变窄,血供减少,随之血管局部血液含氧量降低。研究表明^[7],机体内氧平衡的打破有助于动脉粥样硬化的形成,且随着粥样硬化病变进展,血管壁厚度增加使得扩散进入血管内膜的氧量明显下降。此外其他媒介也会对血管壁造成慢性损伤,如机体内升高的血脂(尤其氧化形式)、吸烟时烟雾中的烃类、高血糖、高血压及其对血管壁产生的切应力、潜在的自身免疫性或传染性损伤等,都会对血管壁弹性造成影响,而血管壁弹性下降则有助于脂质等沉积,形成恶性循环。

粥样硬化斑块有稳定性与不稳定性两种,稳定性斑块由较厚较坚固的纤维帽包裹,一般不易松动、破裂;不稳定性斑块则不然,它紧靠管腔内侧,由一层薄薄的纤维帽覆盖,较大的血流冲击或其自身改变均会使纤维帽破裂,释放出胆固醇和促凝血的碎片状物质,而这些看似微小的物质则极可能导致威胁生命的事件发生,如血栓形成、心肌梗死、卒中。

对于改善缺血性脑卒中缺血部位血供、应用促血管生成因子促进血管新生也是近几年研究热点,继血管内皮细胞生长因子(vascular endothelium growth factor, VEGF)之后, HGF 成为研究热点。HGF 是由一条 69 kDa 的 α 链和一条 34 kDa 的 β 链组成的活性异质二聚体,通过其酪氨酸激酶受体 c-Met 发挥生物学功能^[8]。尤志珺等^[9]研究发现,脑缺血大鼠模型在大脑中动脉闭塞 1 h 后皮质缺血半暗带即有 HGF 表达,24 h 达高峰。因此我们假设对于 CAs 患者而言,其脑部血液供应较其他部位相对减少,局部氧含量也相应减低,局部环境也是一种“缺血缺氧”状态,那么这些群体其体内 HGF 水平也将发生改变。贺芳等^[10]推测抑制白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的表达、减少诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的表达、降低一氧化氮含量可能是 HGF 减轻脑缺血损伤机制之一。且 HGF 对星形胶质细胞缺氧糖性损伤有保护作用,可减少此类细胞凋亡,并呈剂量依赖关系^[11]。TGF- β 1 在纤维增生性组织损伤应答中为主要调控因子^[5],它在细胞因子释放、调节趋化性、调控细胞增殖、伤口收缩、钙化等过程中有重要作用。曾有学者对糖尿病肾病患者体内 HGF 与 TGF- β 1 的作用进行研究,发现两者在对疾病最终结局有重要影响的抗纤维化/再生和促纤维化/慢性炎性诱导方面有突出作用^[12]。HGF 在组织修复、增殖^[13]、迁移、分化^[14]等方面有重要作用^[15,16]。动物实验表明^[17], TGF- β 1 对于 HGF 表达、促进细胞外基质蛋白生成、抑制细胞外基质蛋白水解、诱导内皮细胞生长停滞及凋亡方面有强有力的负性调节作用,故 HGF 与 TGF- β 呈负相关。在对狼疮性肾炎患者的研究观察中发现,当 TGF- β 1 含量升高时 HGF 含量则相应下降^[12]。HGF 在许多纤维化疾病中表达异常^[18],且有学者研究发现在口腔黏膜下纤维性变组织中 TGF- β 1、血管紧张素 II (angiotensin-II, Ang II) 等促纤维化作用的细胞因子表达升高,而 HGF 及其受体在纤维化疾病中表达均降低,这和之前两者间呈负相关结论一致。

本实验以探索 HGF 与 TGF- β 1 间平衡关系为目

的,检测 CAs 患者血清中两因子含量。上述结果证明了在机体内 HGF 与 TGF- β 1 保持互逆平衡状态,两者中任何一个因子含量的改变,都会使得机体内环境发生相应改变并有伴随因子作用效果的结果出现;正如 Nakamura 等^[1] 阐述在器官功能慢性失调早期,增强的 HGF 产物抑制 TGF- β 1 产物,当 HGF 主导两者间平衡时再生与抗纤维化作为代偿性反应发生;相反,晚期 TGF- β 1 产物上调可抑制 HGF 产物,当 TGF- β 1 占优势后导致器官纤维化进程和功能失调加快,导致终末期器官衰竭。对实验结果仔细分析还发现 CAs 程度较轻时,HGF 与 TGF- β 1 水平接近对照组水平;CAs 程度越重时这两个因子的水平却远离对照组水平。对此考虑可能是由于在 CAs 早期,机体对不良刺激较敏感,为了抵制不良刺激而消耗了大量 HGF,相应的代偿尚未完成,在该慢性疾病发展过程中机体内环境改变后将逐渐适应这种不良刺激,HGF 的消耗较前减少;而为了应对机体内改变,TGF- β 1 含量也发生相应变化。

综上,我们尚且猜测在未发生 CAs 的个体中,HGF-TGF- β 1 平衡状态随着 CAs 程度的逐渐加重被打破,CAs 个体其颅内供血供氧量较正常下降,机体出于“本能”反应使得 HGF 含量一过性升高;继而 TGF- β 1 含量相对减少,为了重新维持内环境稳态,TGF- β 1 含量继发性升高,如此改变又促进了 CAs 的发生发展,血管内膜受损、炎性应答反应等则激发 TGF- β 1 大量释放,最终机体内部适应性的结果即 TGF- β 1 含量升高,HGF 含量降低。如此,我们未来将很有可能采取给予外源性 HGF 干预,纠正 HGF-TGF- β 1 平衡状态,达到预防、治疗 CAs 发生、发展的目的,为临床 CAs 和缺血性脑卒中的治疗给予指导。

目前对于 HGF、TGF- β 1 间内在关系仍在探索研究阶段,也许可以从分子生物学角度进行研究,通过两分子间信号传导通路分析其在动脉粥样硬化病变中的相关性,以更好指导临床动脉硬化预防及治疗。

(致谢:感谢神经内三科全体医护人员及河南省神经病学研究所对本实验的大力支持,感谢导师李彤教授的辛勤培养,感谢麻醉科岳修勤老师给予的无私帮助。)

[参考文献]

[1] Nakamura T, Mizuno S. The discovery of hepatocyte growth factor (HGF) and its significance for cell biology, life sciences and clinical medicine[J]. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2010, 86 (6): 588-610.

[2] Narmada BC, Chia SM, Tucker-Kellogg L, et al. HGF regulates the

activation of TGF- β 1 in rat hepatocytes and hepatic stellate cells [J]. J Cell Physiol, 2013, 228(2): 393-401.

- [3] 张丽雅,周旭峰,高志翔,等. MRA 对脑梗塞患者颅内动脉硬化程度评估探讨[J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2009, 7(5): 5-7.
- [4] Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics—2010 update—a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2010, 121(7): 948-954.
- [5] Peterson S, Peto V, Rayner M, et al. European cardiovascular disease statistics, 2005 ed[M]. London, UK: British Heart Foundation Health Promotion Research Group and Health Economics Research Centre, Department of Public Health, University of Oxford, 2005.
- [6] Toma I, McCaffrey TA. Transforming growth factor- β and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects[J]. Cell Tissue Res, 2012, 347(1): 155-75.
- [7] Gao L, Chen Q, Zhou X, et al. The role of hypoxia-inducible factor-1 in atherosclerosis[J]. J Clin Pathol, 2012, 65(10): 872-876.
- [8] Okayama K, Azuma J, Dosaka N, et al. Hepatocyte growth factor reduces cardiac fibrosis by inhibiting endothelial-mesenchymal transition[J]. Hypertension, 2012, 59(5): 958-965.
- [9] 尤志珺,刘勇. 人肝细胞生长因子基因转染治疗脑梗死的实验研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2010, 27(12): 1 064-067.
- [10] 贺芳,叶蓓,陈建珍,等. HGF 对脑缺血/再灌注大鼠 iNOS, NO 及 IL-1 β 的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2014, 39(1): 23-29.
- [11] 贺芳,邹力祥,刘发益,等. 肝细胞生长因子对星形胶质细胞缺氧糖损伤的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2005, 30(3): 266-269.
- [12] Capuano A, Costanzi S, Peluso G, et al. Hepatocyte growth factor and transforming growth factor β 1 ratio at baseline can predict early response to cyclophosphamide in systemic lupus erythematosus nephritis[J]. Arthritis Rheumatism, 2006, 54(11): 3 633-639.
- [13] Ohya W, Funakoshi H, Kurosawa T, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) promotes oligodendrocyte progenitor cell proliferation and inhibits its differentiation during postnatal development in the rat[J]. Brain Res, 2007, 25(1147): 51-65.
- [14] Zhu G, Huang L, Song M, et al. Over-expression of hepatocyte growth factor in smooth muscle cells regulates endothelial progenitor cells differentiation migration and proliferation[J]. Int J Cardiol, 2010, 138(1): 70-80.
- [15] Mizuno S, Matsumoto K, Kurosawa T, et al. Reciprocal balance of HGF and TGF β 1 in renal fibrosis in mice[J]. Kidney Int, 2000, 57(9): 37-48.
- [16] Liu Y. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanism of action[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 287(1): F7-16.
- [17] Kopp JB, Factor VM, Mozes M, et al. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF β 1 develop progressive renal disease [J]. Lab Invest, 1996, 74(6): 991-1003.
- [18] 张珊珊. HGF/c-met 在口腔黏膜下纤维化组织中表达的研究 [J]. 实用口腔医学杂志, 2013, 28(1): 110-113.

(此文编辑 许雪梅)