

结缔组织生长因子在 UPJO 引发肾积水儿童患者肾组织中的表达*

曹广信¹, 李俊峰², 张广平³, 张传光², 刘永东², 韩建强³, 商希峰², 胡 强^{2**}

(1. 潍坊市人民医院 血管外科, 山东 潍坊 261041; 2. 潍坊市人民医院 小儿外科, 山东 潍坊 261041; 3. 潍坊医学院, 山东 潍坊 261041)

[摘要] 目的: 研究结缔组织生长因子(CTGF)在肾盂输尿管连接部梗阻(UPJO)引发肾积水儿童患者肾组织中的表达。方法: 20例UPJO引发肾积水组患儿的患肾标本作为观察组, 8例肾外伤等儿童肾组织作为对照组, 分别取肾实质、肾盂、肾盂输尿管连接处(观察组取狭窄段)、远端输尿管(观察组取靠近狭窄段的1~2 cm)组织标本, 应用HE染色观察其形态学特征, 免疫组织化学染色法检测其CTGF的表达和分布差异性。结果: HE染色可见对照组肾脏各部位无明显病理改变; 观察组肾实质见肾小球数目和面积减少、肾小管间质中纤维化明显、呈灶状分布, 肾盂及肾盂输尿管连接处的移行上皮细胞被挤压变形; CTGF主要在肾小管上皮细胞胞、肾盂上皮细胞、输尿管上皮细胞及平滑肌细胞胞浆中表达; 与对照组比较, 除远端输尿管外, 观察组肾实质、肾盂、肾盂输尿管连接处的CTGF阳性颗粒面密度值和光密度值均高于对照组, 观察组肾实质、肾盂、肾盂输尿管连接处的CTGF阳性表达率和表达强度均高于对照组($P < 0.05$)。结论: 儿童UPJO引起的肾积水患肾组织中有不同程度的纤维化改变, CTGF在患肾的高表达可能是其发生纤维化的机制之一。

[关键词] 结缔组织生长因子; 免疫组织化学; 肾盂积水, 先天性; 肾盂输尿管连接部梗阻; 图像处理, 计算机辅助

[中图分类号] R726 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)10-1224-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.10.024

Expression of Connective Tissue Growth Factor in Kidney Tissue of Children Patients with Hydronephrosis Caused by UPJO

CAO Guangxin¹, LI Junfeng², ZHANG Guangping³, ZHANG Chuanguang²,
LIU Yongdong², HAN Jianqiang³, SHANG Xifeng², HU Qiang²

(1. Department of Vascular Surgery, Weifang People's Hospital, Weifang 261041, Shandong, China; 2. Department of Pediatric Surgery, Weifang People's Hospital, Weifang 261041, Shandong, China;
3. Weifang Medical University, Weifang 261041, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To study expression of connective tissue growth factor (CTGF) in kidney tissue of children patients with hydronephrosis caused by UPJO. **Method:** 20 cases kidney specimen of hydronephrosis caused by UPJO in children were enrolled as observation group, and 8 cases of renal trauma tissue of children as control group. The tissue specimen of renal parenchyma, renal pelvis, junction of renal pelvis and ureter (narrow section of observation group), and distal ureter were taken respectively. HE staining was adopted to observe their morphological characteristics and immunohistochemical staining was used to detect the expression and distribution difference of CTGF protein. **Results:** HE staining showed that control group had no significant pathological changes in different parts

* [基金项目] 山东省潍坊市科技发展项目(20090203)

** 通信作者 E-mail: dhq7936@163.com

网络出版时间: 2016-10-17 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20161017.1445.054.html>

of the kidney. In the observation group, the number and area of glomeruli of kidney was decreased, the fibrosis was obvious in the renal tubular interstitial, and the transitional epithelial cells in the renal pelvis and the junction renal pelvis and ureter were extruded and deformed. CTGF is mainly expressed in renal tubular epithelial cells, renal pelvis epithelial cells, ureteral epithelial cells and smooth muscle cells. Compared with control group, in addition to the distal ureter, the observation group was higher in the CTGF positive granular surface density and light density of the renal parenchyma, pelvis and renal pelvis. The positive expression rate and the expression intensity of CTGF in the observation group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusions:** The renal tissue in children patients with hydronephrosis caused by UPJO shows different degrees of fibrosis change, and high expression of CTGF in kidney may be one of the mechanisms of the occurrence of fibration.

[**Key words**] Connective tissue growth factor; immunohistochemistry; hydronephrosis, congenital; junction obstruction of renal pelvis and ureter; image processing; computer - assisted

先天性肾积水主要由输尿管梗阻后尿液排出受阻引起,以肾盂输尿管连接部梗阻(UPJO)引起的肾积水最为常见^[1],可造成肾脏的肾盂、肾盏、集合管及肾小管发生扩张,出现肾间质水肿、局灶性炎症细胞浸润及间质纤维化,最终导致肾萎缩。先天性肾积水最显著的病理组织学特征是肾小管间质纤维化,是梗阻性肾病发病机制研究的重点之一,但导致其纤维化的机制众说不一^[2-4]。本研究应用 HE 和免疫组织化学(SABC 法)染色方法检测儿童 UPJO 引起肾积水患肾的肾实质、肾盂、肾盂输尿管连接处狭窄段、狭窄段远端输尿管组织样本中结缔组织生长因子(CTGF)的表达和分布,探讨 UPJO 引起的先天性肾积水的形成机制。

1 材料与方法

1.1 标本来源

观察组标本来源于住院治疗且符合 UPJO 引起先天性肾积水诊断的患儿积水肾组织^[5],对照组标本取自肾外伤、肾母细胞瘤、肾胚瘤患儿(经病理学检查证实为正常组织)。观察组 20 例患儿中,男 15 例,女 5 例;年龄 2 月~12 岁,平均(3.48 ± 0.74)岁,按文献^[5]标准,肾功能轻度受损 3 例、中度受损 5 例及重度受损 12 例。对照组 8 例,其中男 6 例,女 2 例;年龄 10 月~11 岁,平均(4.54 ± 0.98)岁;肾外伤 1 例,肾母细胞瘤 5 例,肾内胚窦瘤 2 例。两组儿童一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 方法

1.2.1 取材 分别取观察组患肾和对照组肾脏的肾实质、肾盂、肾盂输尿管连接处(观察组为狭窄

段)狭窄段、远端输尿管(观察组为靠近狭窄段的 1~2 cm)的组织标本并标记。所有标本常规处理,进行 HE 染色和免疫组织化学染色。

1.2.2 HE 染色 将石蜡切片依次脱蜡、梯度酒精水化、苏木素-伊红染色、梯度酒精脱水、透明、封固,显微镜观察。

1.2.3 免疫组织化学染色 采用 SABC 法,石蜡包埋标本、切片,二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化,3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶, PBS 缓冲液处理, 0.02 mol/L 柠檬酸微波修复,非免疫性动物血清封闭非特异性抗原,兔抗人 CTGF 多克隆抗体(购自美国 santa cruz 公司,由北京中杉金桥公司分装)稀释度为 1:100, 4℃ 孵育过夜;加生物素标记的二抗,孵育 30 min 后加标记过氧化酶的链霉亲和素孵育 30 min, DAB 显色,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。一半切片不经苏木精复染,留作图像分析,其余切片经苏木素轻度复染,脱水,透明,封片处理。同时取乳腺癌的标本做阳性对照,显微镜下观察结果。CTGF 染色阳性的细胞内可见棕黄色颗粒。每组抽取不同部位的 CTGF 染色切片各 10 张,在 20 倍物镜下每张切片按系统抽样法随机选取 5 个视野,用图像分析系统测定棕黄色阳性颗粒的总面积及平均光密度值,计算单位面积的面密度值。以面密度值反映 CTGF 蛋白阳性表达率,以平均光密度值反映 CTGF 蛋白表达强度。

1.3 统计学处理

用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本比较用 t 检验对数据进行统计分析判断均数差异显著性,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色

对照组肾脏各部位无明显病理改变。与对照组相比,观察组肾实质区肾小球萎缩,数目减少,面积缩小,偶见肾小球局限性阶段性硬化;肾小管间质中有大量单核细胞及淋巴细胞浸润,纤维细胞增生,纤维化明显,呈灶状分布;肾盂及肾盂输尿管连接处的移行上皮细胞被挤压变形、部分萎缩、变性,细胞数减少,间质内纤维组织增生,细胞数目减少;远端输尿管则无明显异常改变。见图 1。

2.2 CTGF 的表达及分布

对照组肾小管、肾盂上皮细胞胞浆,肾盂输尿管连接处及远端输尿管细胞内有微量的 CTGF 表达,着色稀疏(图 2)。而观察组则表达增多,肾实质、肾盂、肾盂输尿管连接处狭窄段表达明显,主要集中在肾间质内,肾小管、输尿管、肾盂、狭窄段上皮细胞胞浆内,纤维化严重肾盂输尿管连接处的平滑肌细胞胞浆 CTGF 阳性表达更强(图 2)。肾小球壁层上皮细胞和内皮细胞也有少量表达,而肾小球表达不明显。远端输尿管表达较弱(图 1)。两组不同部位肾组织的 CTGF 阳性颗粒面密度值比较,除远端输尿管外,观察组肾实质、肾盂、肾盂输

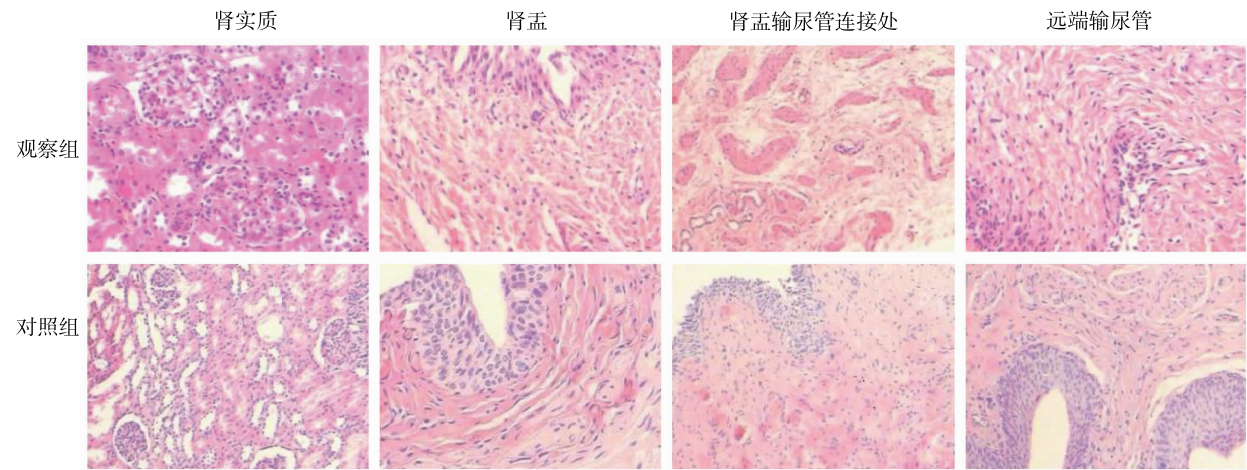
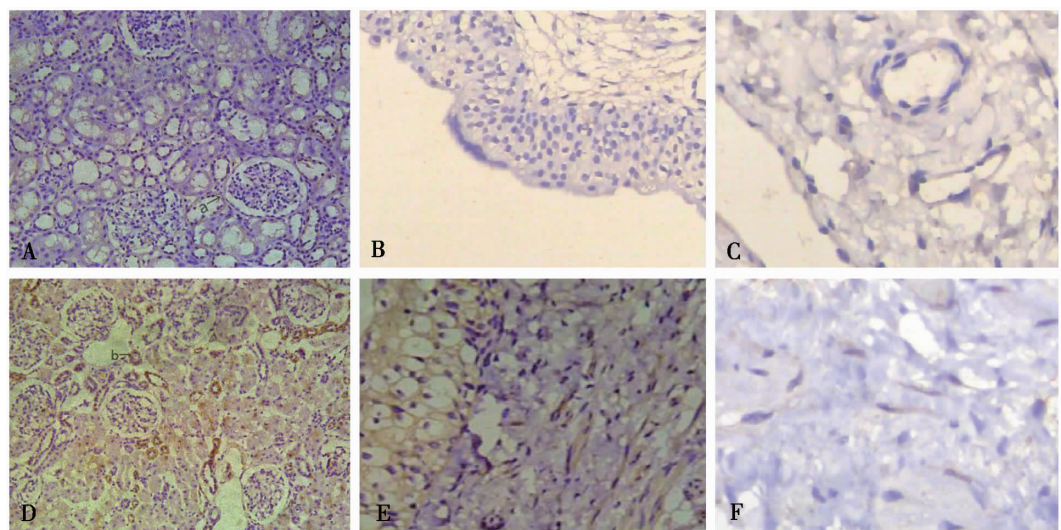


图 1 两组不同部位肾组织的 HE 染色(200 ×)

Fig. 1 HE staining of renal tissue in different parts of the two groups



注:A 正常肾实质,B 正常肾盂输尿管连接处,C 正常输尿管,D 肾积水肾实质,E 肾积水肾盂输尿管连接处狭窄段,F 肾积水远端输尿管

图 2 两组不同部位肾组织的免疫组织化学染色(SABC, ×200)

Fig. 2 Immunohistochemical staining of renal tissue in different parts of the two groups

尿管连接处的 CTGF 阳性颗粒面密度值和光密度值均高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1、表 2。说明观察组肾实质、肾盂、肾盂输尿管连接处的 CTGF 阳性表达率和表达强度均高于对照组。

表 1 两组不同部位肾组织 CTGF 阳性颗粒面密度值

Tab. 1 Surface area density value of CTGF positive staining

| 部位 | 面密度值($\bar{x} \pm s$) | | P |
|----------|-------------------------|--------------|-------|
| | 对照组 | 观察组 | |
| 肾实质 | 1.32 ± 0.14 | 12.05 ± 2.03 | <0.01 |
| 肾盂 | 1.15 ± 0.28 | 9.27 ± 1.95 | <0.01 |
| 肾盂输尿管连接处 | 0.97 ± 0.43 | 10.38 ± 1.76 | <0.01 |
| 远端输尿管 | 1.02 ± 0.35 | 2.08 ± 0.69 | >0.05 |

表 2 两组不同部位肾组织 CTGF 阳性颗粒平均光密度值

Tab. 2 Average optical value of CTGF positive staining

| 部位 | 平均光密度值($\bar{x} \pm s$) | | P |
|----------|---------------------------|----------------|-------|
| | 对照组 | 观察组 | |
| 肾实质 | 60.28 ± 0.49 | 368.52 ± 12.31 | <0.01 |
| 肾盂 | 74.35 ± 0.62 | 305.67 ± 10.67 | <0.01 |
| 肾盂输尿管连接处 | 80.47 ± 0.82 | 310.87 ± 8.95 | <0.01 |
| 远端输尿管 | 50.30 ± 0.47 | 160.15 ± 2.68 | >0.05 |

3 讨论

儿童先天性肾积水是主要由 UPJO 引起,约占发病原因的 90%,输尿管梗阻后引起一系列变化,肾间质水肿,局灶性炎症细胞浸润,间质纤维化,最终导致肾萎缩。先天性肾积水最显著的病理组织学特征是肾小管间质纤维化,其纤维化导致并加重了肾小管功能的损害,因此肾小管间质纤维化是梗阻性肾病发病机制研究的重点之一。近几年,国内外一些学者研究表明,肾萎缩及肾间质纤维化与一些细胞因子表达改变有关,转化生长因子-β1(TGF-β1)表达是介导间质纤维化过程的关键机制^[6]。CTGF 是 TGF-β1 致纤维化作用的下游关键性效应因子,具有促进成纤维细胞转分化,并促进它合成和分泌胶原蛋白等细胞外基质的多种作用^[7-12]。病理情况下,特别是 TGF-β₁ 介导的组织器官纤维化过程中,CTGF 可大量表达,主要作为 TGF-β₁ 的下游因子起促进 ECM 沉积和胶原合成

的作用。相关研究将 CTGF 作为纤维化的一个指标^[13]。阻断 CTGF 的产生及其促纤维化效应可能为今后先天性肾积水的治疗提供了一个新的靶点^[14]。调控纤维化肾 CTGF 的表达,对延缓肾纤维化进展,可能有一定意义。先天性肾积水的病因、发病机制目前仍不清楚,但与肾及相关组织纤维化密切相关,本研究通过观察 CTGF 在儿童 UPJO 引发肾积水的患肾不同部位的表达,初步探讨 UPJO 引发肾积水的发病机制。

本研究对 20 例 UPJO 引起的先天性肾积水儿童患肾不同部位的组织标本进行 HE 染色,发现肾实质区肾小球萎缩,数目减少,面积缩小,肾小管间质中有大量单核细胞及淋巴细胞浸润,纤维细胞增生,纤维化明显,呈灶状分布。肾盂及肾盂输尿管连接处的移行上皮细胞被挤压变形,部分萎缩、变性,上皮细胞数目减少,间质内纤维组织增生,细胞数目减少。免疫组织化学染色发现,CTGF 蛋白在患肾组织、肾盂、肾盂输尿管连接处狭窄段表达明显,主要集中在肾间质内,肾小管、输尿管、肾盂、狭窄段上皮细胞胞浆内,纤维化严重肾盂输尿管连接处的平滑肌细胞 CTGF 阳性表达更强。远端输尿管及对照组组织表达较弱,说明患肾的肾实质、肾盂、肾盂输尿管连接处狭窄部等部位发生明显纤维化,远端输尿管及对照组则无明显纤维化改变。

综上,儿童 UPJO 引起肾积水患肾组织中有不同程度的纤维化改变,CTGF 在纤维化明显的组织中表达较强,而在无明显纤维化的组织中表达较弱,说明 CTGF 的表达与先天性肾积水组织纤维化有关,在其发病过程中可能发挥重要作用。

4 参考文献

[1] 谢向辉,黄澄如,孙宁,等. 小儿先天性肾盂输尿管连接部梗阻诊治 265 例[J]. 临床小儿外科杂志, 2008(6): 39-41.

[2] Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis [J]. Pediatr Nephrol, 2000 (3-4):290-301.

[3] Kajbafzadeh AM, Payabvash S, Salmasi AH, et al. Smooth muscle cell apoptosis and defective neural development in congenital ureteropelvic junction obstruction [J]. J Urol, 2006 (2):718-723.

[4] Gratzke C, Uckert S, Kedia G, et al. In vitro effects of PDE5 inhibitors sildenafil, vardenafil and tadalafil on isolated human ureteral smooth muscle: A basic research approach[J]. Urol Res, 2007 (1): 49-54.

(下转第 1230 页)

的影响,患儿数量逐渐增多,因而先天性心脏病并发小儿心律失常发生率也呈上升趋势^[4]。临床上,采用电起搏、电击复律、射频消融术等非手术方法治疗先天性心脏病并发心律失常,可在短时间内收获最佳效果^[5]。但这种方法不能从根本上治疗心脏的器质性病变,心律失常仍会反复发作。因而,目前很多学者建议,应先使用内科药物对患儿进行心律失常治疗,然后再实施根治性心脏外科手术,可使患儿获得最佳预后并根除心律失常发作的本质病因^[6]。

普罗帕酮是 Ic 类药物,是临床上一种常见的广谱抗心律失常药物,主要通过竞争性阻断 β 受体、膜稳定等起到治疗心律失常的作用,同时兼具钙拮抗作用。该药在临床中的应用较广,但是大剂量使用普罗帕酮会引起负性肌力增加、心输出量降低等不良反应,因此临床中不建议大剂量使用^[7-8]。美托洛尔为具有心脏选择性的 β_1 受体阻滞剂,其通过抑制心收缩力,使心率降低,达到抑制室性心律失常、室上性快速心律失常的效果^[9-10]。

本研究对治疗组先天性心脏病并发心律失常患儿采用普罗帕酮联合美托洛尔治疗,结果显示总有效率(91.67%)明显高于对照组患儿(65.63%);且治疗后室性早搏、房性早搏、短阵室速、短阵房速发作次数均少于对照组,同时两组患者不良反应发生率均低。综上所述,普罗帕酮联合美托洛尔治疗小儿心脏病并发心律失常安全有效,在临床中可推广

应用。

4 参考文献

- [1] Doniger SJ, Sharieff GQ. Pediatric dysrhythmias[J]. Pediatric Clinics of North America, 2006(1):85-105.
 - [2] 楚涛. 缺血性心肌病左室重构和心功能与室性心律失常的关系[J]. 贵阳医学院学报, 2012(3):287-288.
 - [3] 杨晓东. 儿童心律失常的临床诊断和治疗[J]. 中华临床医师杂志, 2012(24):7961-7964.
 - [4] 颜幸燕, 黄朝宁. 胎儿先天性心脏病的产前超声诊断研究进展[J]. 现代医药卫生, 2016(5):702-704.
 - [5] 叶赞凯, 马坚, 张澎, 等. 83 例小儿心律失常射频消融手术治疗效果分析[J]. 中国循环杂志, 2013(1):33-36.
 - [6] Kaltman J, Shah M. Evaluation of the child with an arrhythmia[J]. Pediatric Clinics of North America, 2004(6):1537-1551.
 - [7] 季顺民, 陈瑜, 钱勇, 等. 稳心颗粒联合普罗帕酮治疗肺源性心脏病心律失常疗效观察[J]. 中国临床医生, 2015(11):46-47.
 - [8] 郭占慧. 盐酸普罗帕酮的不良反应临床观察[J]. 中国医药指南, 2010(32):280-281.
 - [9] 刘小宇. 步长稳心颗粒与美托洛尔联合治疗心律失常 40 例疗效评估报道[J]. 中国医学创新, 2015(34):133-134.
 - [10] 白玫. 胺碘酮联合美托洛尔治疗房颤 47 例[J]. 中国药业, 2015(23):200-201.
- (2016-06-25 收稿, 2016-09-15 修回)
中文编辑: 周 凌; 英文编辑: 刘 华
-
- (上接第 1227 页)
- [5] 陈跃, 庄红明, 赵瑞芳, 等. 儿科核医学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2013:87-93.
 - [6] Jeong MH, Kim SJ, Kang H, et al. Cucurbitacin I Attenuates Cardiomyocyte Hypertrophy via Inhibition of Connective Tissue Growth Factor (CCN2) and TGF- β /Smads Signalings[J]. PLoS One, 2015(8):e0136236.
 - [7] Cao YL, Duan Y, Zhu LX, et al. TGF- β 1, in association with the increased expression of connective tissue growth factor, induce the hypertrophy of the ligamentum flavum through the p38 MAPK pathway[J]. Int J Mol Med, 2016(2):391-398.
 - [8] Kisseleva T, Brenner DA. Mechanisms of fibrogenesis[J]. Exp Biol Med, 2008(2):109-122.
 - [9] Dtmcan MR. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis; down-regulation by cAMP[J]. FASEB J, 1999(13):1774-86.
 - [10] 王一娜, 李璐, 古杰若, 等. 结缔组织生长因子在风湿性心脏病患者二尖瓣乳头肌中的表达[J]. 中华医学杂志, 2016(15):1192-1195.
 - [11] Brigstock DR. The CCN family: a new stimulus package[J]. J Endocrinol, 2003(178):169-175.
 - [12] 杜娟, 刘晓丹, 王力宁, 等. 普罗布考对结缔组织生长因子在系膜细胞中表达的调节[J]. 中华肾脏病杂志, 2011(27):217-218.
 - [13] Yue XJ, Guo Y, Yang HJ, et al. Transforming growth factor- β 1 induces fibrosis in rat meningeal mesothelial cells via the p38 signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2016(2):1709-1713.
 - [14] Phanish MK, Winn SK, Dockrell ME, et al. Connective tissue growth factor-(CTGF, CCN2)-a marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis[J]. Nephron Exp Nephrol, 2010(3):e83-e92.
- (2016-07-25 收稿, 2016-08-28 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘 华