

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.05.005

肝细胞生长因子在高氧暴露新生鼠肾组织中表达的变化

田小宁, 陈贻骥

(重庆医科大学附属儿童医院新生儿诊治中心、儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室、
儿科学重庆市重点实验室、重庆市儿童发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:观察高氧暴露下新生大鼠肾组织结构的变化和肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)表达的变化。方法:采用高氧暴露致新生大鼠肺损伤模型,将出生 12 h 内的 72 只 SD 大鼠随机分成 2 组, I 组:正常空气; II 组:高氧(90% ± 5% 氧气)。于 3、7、14 d 各处死 8 只取标本,用苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin, HE)染色法观察肾组织结构变化;用免疫组织化学法检测 HGF 蛋白表达水平;用逆转录聚合酶链反应(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 HGF mRNA 表达强度。结果:①与 I 组比较, II 组可见系膜细胞增生,肾小管上皮细胞肿胀,炎性细胞浸润。随时间延长,病理变化愈明显。②与 I 组比较, II 组 3 d 时 HGF 蛋白表达水平增强($P < 0.05$), 7 d 时明显增强($P < 0.05$), 14 d 时也增强($P < 0.05$),但与 7 d 相比,增强趋势减弱;③HGF mRNA 表达强度与其蛋白表达水平变化趋势相似。结论:HGF 在高氧暴露致新生大鼠肾组织损伤中表达增强。

【关键词】高氧;新生鼠;肾组织;肝细胞生长因子**【中国图书分类法分类号】**R722.1**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2011-11-29Expression changes of hepatocyte growth factor in the renal tissue
of neonatal rats exposed to hyperoxia

TIAN Xiaoning, CHEN Yiji

(Neonatal Diagnosis and Treatment Centre, Children's Hospital, Chongqing Medical University;
Key Laboratory of Child Development and Disorders, Ministry of Education;
Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science
and Technology Cooperation Center for Child Development and Disorders)

【Abstract】Objective: To examine the changes of the renal tissue structure and the expression changes of hepatocyte growth factor (HGF) in the renal tissue of neonatal rats exposed to hyperoxia. **Methods:** Neonatal rat lung injury model was induced by exposing to hyperoxia. Seventy-two neonatal sprague-dawley (SD) rats were randomly divided into group I ($n = 36$) and group II ($n = 36$) within 12 h after birth. The rats in group I were exposed to normal air while those in group II to hyperoxia. Eight rats in each group were killed on 3th, 7th, 14th d after birth to make the samples. The changes of the renal tissue structure were examined by hematoxylin-eosin (HE) staining method; the protein expressions of HGF in the renal tissue were detected by immunohistochemical method; the mRNA expression intensities of HGF were measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** ① Mesangial cell proliferation, renal tubular epithelial cells swelling and inflammatory cells infiltration were observed in group II compared with those in group I. The pathological changes became more and more obvious with the passage of time. ② The protein expression levels of HGF were enhanced on 3th d in group II compared with those in group I ($P < 0.05$), with more enhanced effect on 7th and on 14th d ($P < 0.05$). However, the enhanced tendency on 14th d was weaker than that on 7th d. ③ HGF mRNA expression intensities were similar to the changing tendency of their protein expression levels. **Conclusion:** The expression levels of HGF are enhanced in hyperoxia induced renal tissue injury.

【Key words】hyperoxia; neonatal rats; renal tissue; hepatocyte growth factor

作者介绍: 田小宁 (1980-), 女, 硕士,

研究方向: 新生儿疾病。

通信作者: 陈贻骥, 男, 教授, Email: chenij55@yahoo.com.cn。

随着围产医学的发展、机械通气技术的完善及肺表面活性物质的应用, 新生儿尤其是早产儿存活率不断提高, 这些危重新生儿常伴随发生低氧血症,

氧疗是其不可缺少的重要治疗措施。但长时间吸入高氧可发生许多并发症,如慢性肺疾病(Chronic lung disease, CLD)、视网膜病、神经系统损伤等,这些并发症国内外文献多有报道,但对高氧致肾脏损伤的研究甚少。国内外研究发现,肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)在年长儿及成人多种肾脏损伤修复过程中发挥着重要的生物学作用;而有关新生儿的研究报道不多。因此,本研究以新生 SD 大鼠为研究对象,采用持续高氧暴露致新生大鼠肺损伤模型,观察新生大鼠肾组织结构的变化及其 HGF 表达的变化,旨在探讨持续高氧暴露致肾脏损伤的发病机制及可能的防治途径。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料和试剂

CYS-1 型便携式数字测氧仪购自上海嘉定电子仪器厂;兔抗大鼠 HGF 多克隆抗体、多聚赖氨酸溶液购自北京博奥森生物技术有限公司;浓缩型 DAB 试剂盒、免疫组化染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;高纯总 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)、2 × Power Taq PCR MasterMix、DNA Marker I 购自北京百泰克生物技术有限公司;RT 反应试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;HGF 及 β-action 引物由北京三博远志生物技术有限公司提供。

1.2 实验分组、动物模型建立、标本采集与保存

1.2.1 实验分组 将体重 250 g 左右的 12 只雌性 SD 大鼠与雄性 SD 大鼠交配(3:1),于孕 21~23 d 时自然分娩,随机抽取体重 6 g 左右的新生鼠 72 只(性别不限)于生后 12 h 内分成 2 组,每组 36 只。I 组:正常空气;II 组:高氧。每组再随机分为 3、7、14 d 3 个亚组。

1.2.2 动物模型建立 II 组置于氧箱中(自制有机玻璃箱)^[1],氧浓度控制在(90±5)%,每日用测氧仪监测,钙石灰吸附 CO₂,使 CO₂ 浓度低于 0.5%,湿度 60%~70%,温度 25℃~26℃,每天开箱 1 h,清洁氧箱、更换垫料、喂水、喂饲料、称重,每天两组更换母鼠以防因母鼠氧中毒而护理能力降低。I 组置于同一室内正常空气中,喂养条件与前相同。

1.2.3 标本采集与保存 分别于 3、7、14 d 随机抽取各组标本 8 只,称重后水合氯醛麻醉,迅速分离肾组织,用冷生理盐水洗净残血,吸干水分,右肾放于冻存管中液氮速冻后-80℃冷冻保存备用,左肾用 4% 多聚甲醛固定 24 h 后常规制成石蜡块放于 4℃保存备用。

1.3 方法

1.3.1 病理切片观察 取出保存的石蜡标本连续切片,厚度 3.5 μm,常规做 HE 染色,光镜下观察各组各时间点肾组织病理变化并摄片保存(400 倍)。

1.3.2 免疫组织化学法检测 HGF 蛋白表达水平 按照免

疫组化 SP 3 步法试剂盒说明书进行(兔抗大鼠 HGF 多克隆抗体(I 抗) 1:400 稀释,其中 1 张用 PBS 代替 I 抗做阴性对照)。HGF 蛋白表达以细胞质出现棕黄色为阳性表达,每张切片在 400 倍光镜下随机选取 5 个视野,采用 Image-Pro Plus 5.1 Chinese 图像分析系统计算平均累计吸光度值,取平均值,检测 HGF 蛋白表达水平。

1.3.3 RT-PCR 检测 HGF mRNA 表达强度 根据 RNA 提取试剂盒说明提取 RNA;进行逆转录反应(20 μl 体系);PCR 扩增(25 μl 体系),引物序列为:HGF 上游引物 5'-CCC GGT GCT GCA GCA TGT CCT-3',下游引物 5'-TCC CCT CGA GGA TTT CGA CAG-3',产物长度 573 bp;β-action 上游引物 5'-CAC CCG CGA GTA CAA CCT TC-3',下游引物 5'-CCC ATA CCC ACC ATC ACA CC-3',产物长度 206 bp;产物行凝胶电泳分离,紫外灯下观察摄片,图像采用 Quantity One v462 PC21.0 凝胶定量分析软件进行分析,比较 HGF 与 β-action 扩增条带灰度比。

1.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据统计分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组数据进行正态性检验,组间比较采用 *t* 检验。检验水准定为 α=0.05。

2 结果

2.1 肾组织病理学变化

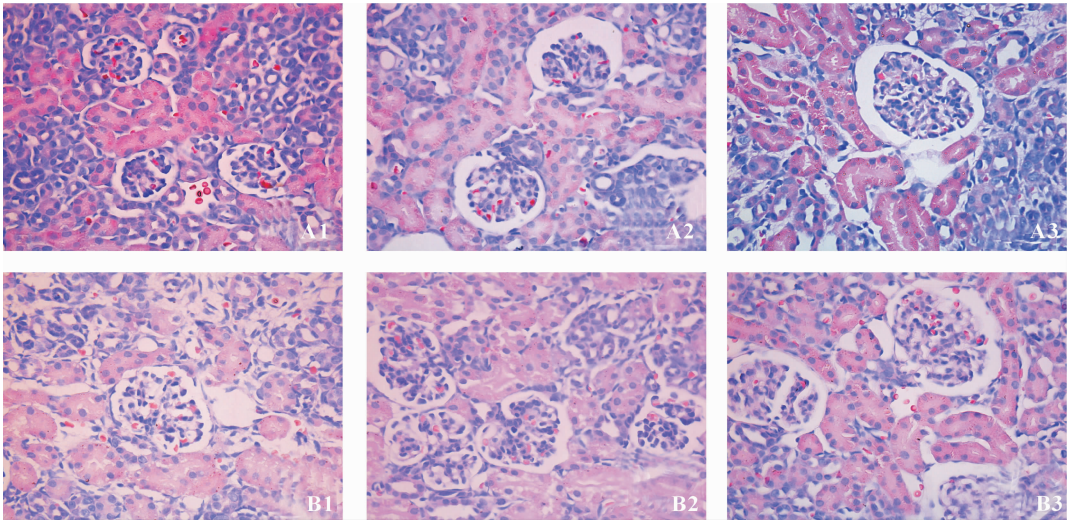
在光镜下(400 倍),I 组各时间点肾组织未见病理改变。II 组 3 d 时肾小球轻度增生,炎性细胞浸润,肾小管上皮细胞轻度肿胀;7 d 时肾小球增生较前明显,可见系膜细胞、系膜基质增生,肾小管上皮细胞肿胀变性明显,炎性细胞浸润明显;14 d 时,肾小球细胞数明显增多,系膜细胞、系膜基质增生明显,肾小管上皮细胞胞核增大,部分见空泡样变性,间质细胞增生明显,炎性细胞浸润较前减少见图 1。

2.2 HGF 蛋白表达水平的变化

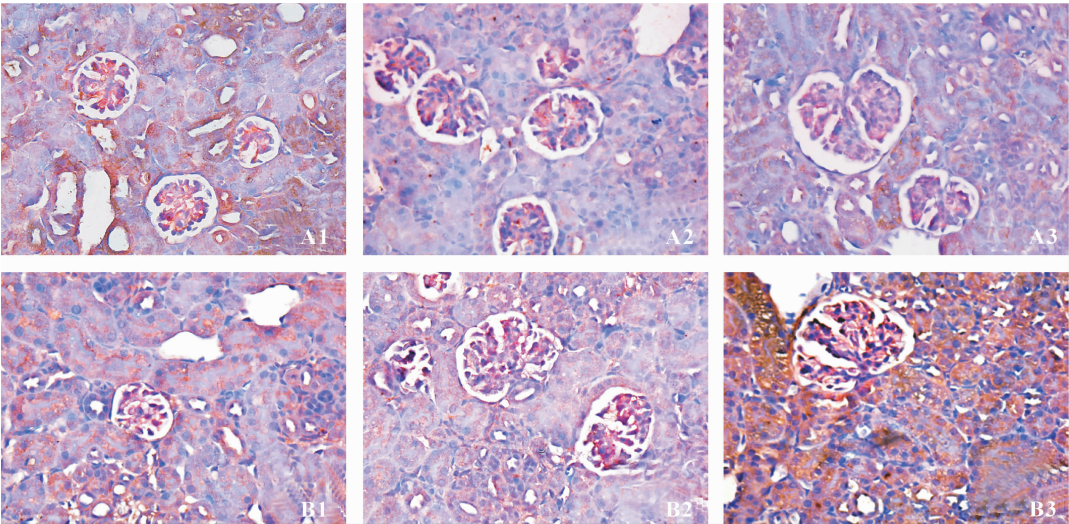
HGF 蛋白表达于多种细胞,在肾小管间质区主要由间质成纤维细胞和巨噬细胞产生,在肾小球区主要由内皮细胞和肾小球系膜细胞产生^[2],阳性部位呈棕黄色,表达于各种细胞的细胞质中。与 I 组比较,3 d 时 II 组 HGF 蛋白表达水平增强(*P*<0.05),7 d 时明显增强(*P*<0.05),14 d 时也增强(*P*<0.05),但与 7 d 比,增强趋势减弱见图 2、表 1。

表 1 各组不同时间点肾组织 HGF 蛋白表达水平的变化
Tab.1 Protein expression levels of HGF in the renal tissue in different groups and at different time points

组别	例数	不同时间点 HGF 蛋白表达		
		3 d	7 d	14 d
I	24	109.66 ± 16.51	126.68 ± 31.05	158.53 ± 19.53
II	24	134.87 ± 27.89	147.23 ± 23.97	171.21 ± 9.65
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05



A. 组 I ; B. 组 II ; 1. 3 d; 2. 7 d; 3. 14 d
图 1 各组不同时间点肾组织病理变化 (400 ×)
Fig. 1 Renal tissue pathological changes in different groups and at different time points (400 ×)



A. 组 I ; B. 组 II ; 1. 3 d; 2. 7 d; 3. 14 d
图 2 各组不同时间点肾组织免疫组化结果 (400 ×)
Fig. 2 Renal tissue HGF immunohistochemical results in different groups and at different time points (400 ×)

2.3 HGF mRNA 表达强度的变化

高氧暴露对 HGF mRNA 表达强度的影响。与 I 组比较, II 组 3 d 时 HGF mRNA 表达强度增强 ($P<0.05$), 7 d 时明显增强 ($P<0.05$), 14 d 时同样增强 ($P<0.05$), 但与 7 d 相比, 增强趋势有所减弱见表 2。

表 2 各组不同时间点肾组织 HGF mRNA 表达强度的变化

Tab.2 HGF mRNA expression intensities in the renal tissue in different groups and at different time points

组别	例数	不同时间点 HGF mRNA 表达		
		3 d	7 d	14 d
I	24	0.229 4 ± 0.068 5	0.301 8 ± 0.062 3	0.378 0 ± 0.049 4
II	24	0.378 8 ± 0.078 4	0.433 8 ± 0.068 2	0.499 5 ± 0.102 9
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

3 讨 论

氧疗是救治各种原因引起的危重新生儿低氧血症的重要治疗措施, 但持续高氧吸入也可以引起多脏器损伤。新生儿肾脏发育还未完善, 肾小球和肾小管正处于发育中, 肾脏又是一个高灌注器官^[3], 持续高氧吸入必然对其造成影响。

近年来, HGF 对肾脏损伤的保护作用已受到广泛关注。据文献报道, HGF 最初是由日本学者 Nakamura 等从部分肝切除的大鼠血清中分离的一种能刺激原代培养的肝细胞生长和合成的肝源性因

子,并命名为肝细胞生长因子^[4],其受体是原癌基因 c-Met 编码的一种膜蛋白,属 II 型酪氨酸激酶受体,两者结合后,通过这一信号传导通路致多种底物蛋白的酪氨酸磷酸化,继而发挥调节多种细胞增殖、分化、再生、运动等功能,是一种多功能细胞因子^[5,6]。多种组织器官都表达 HGF,以肾脏的含量最高^[2]。在肾脏,HGF 主要由肾小球系膜细胞和间质成纤维细胞产生,内皮细胞和巨噬细胞也可产生^[2],这与本实验免疫组化图片所观察到的结果一致。其受体 c-met 所有肾脏细胞均可产生^[7]。国内学者研究表明,在高氧环境下,氧自由基、超氧自由基、丙二醛、一氧化氮、一氧化氮合酶等表达增强,引发脂质过氧化作用,含有大量不饱和长链脂肪酸的肾细胞膜结构破坏,引起肾脏损伤,如肾小管细胞浊肿变性、肾小球系膜细胞和间质成纤维细胞增生、炎性细胞浸润、肾纤维化等^[8]。这些增生、浸润的细胞进一步表达 HGF 及受体 c-met,这与本实验免疫组化及 RT-PCR 结果一致。国内外文献报道,HGF 可拮抗强效致纤维化作用的转化生长因子 $\beta 1$ (Transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 的表达^[9,10],保护肾脏功能;促进肾小管上皮细胞增生,保持其形态和结构的完整性^[11,12];减少炎症介质的表达,减轻肾脏损害^[12];阻断小管上皮-肌成纤维细胞转分化 (Epithelial-myofibroblast transdifferentiation, EMT) 的发生,改善肾脏损害的程度^[13]。本研究结果显示,与 I 组比较,3 d 时 II 组 HGF 表达水平增强,7 d 时明显增强,14 d 时也增强,但与 7 d 比,增强趋势减弱,与文献报道结果相近。

综上所述,HGF 在高氧暴露致新生大鼠肾组织损伤中表达增强,对受损肾组织有一定的保护作用,由此也将为临床预防和治疗新生儿高氧所致脏器损伤提供新的契机和思路。

参 考 文 献

[1] 张亚维,陈贻骥,徐雅丽. 维甲酸对高氧暴露新生大鼠肺组织角化细胞生长因子表达的影响[J]. 中国病理生理杂志,2011,27(1):27

-32.

Zhang Y W, Chen Y J, Xu Y L. Effect of retinoic acid on expression of keratinocyte growth factor and keratinocyte growth factor receptor in injured lung tissues of neonatal rats exposed to hyperoxia[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2011, 27(1):27-32.

[2] Liu Y. Hepatocyte growth factor and the kidney[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2002, 11(1):23-30.

[3] 刘雪雁,吴捷,薛辛东. 高氧致新生鼠肺损伤时肾组织一氧化氮及自由基的变化[J]. 中国当代儿科杂志,2005,7(1):71-74.

Liu X Y, Wu J, Xun X D. Changes of nitric oxide and oxygen free radical in the kidney of neonatal rats with prolonged hyperoxic lung injury[J]. Chin J Contemp Pediaty, 2005, 7(1):71-74.

[4] Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(1):188-202.

[5] Miyazawa K, Shimomura T, Kitamura N. Activation of hepatocyte growth factor in the injured tissues is mediated by hepatocyte growth factor activator[J]. J Biol Chem, 1996, 271(7):3615-3618.

[6] Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases[J]. Kidney Int, 2001, 59(6):2023-2038.

[7] Fornoni A, Li H, Foschi A, et al. Hepatocyte growth factor, but not insulin-like growth factor I, protects podocytes against cyclosporine A-induced apoptosis[J]. Am J Pathol, 2001, 158(1):275-280.

[8] 刘大军,李德天,刘葵. 吸高浓度氧对新生鼠肾脏的影响及其机制[J]. 上海医学,2007,30(3):191-193.

Liu D J, Li D T, Liu K. Effect and mechanisms of high concentration oxygen inhalation on the kidney of newborn rats[J]. Shanghai Med J, 2007, 30(3):191-193.

[9] Iekushi K, Taniyama Y, Azuma J, et al. Hepatocyte growth factor attenuates renal fibrosis through TGF- $\beta 1$ suppression by apoptosis of myofibroblasts[J]. J Hypertens, 2010, 28(12):2454-2461.

[10] Tan R Y, Zhang X H, Yang J W, et al. Molecular basis for the cell type-specific induction of SnoN expression by hepatocyte growth factor[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(8):2340-2349.

[11] Isaka Y, Yamada K, Takabatake Y, et al. Electroporation-mediated HGF gene transfection protected the kidney against graft injury[J]. Gene Ther, 2005, 12(10):815-820.

[12] Gong R, Rifai A, Ge Y, et al. Hepatocyte growth factor suppresses proinflammatory NF- κ B activation through GSK3 β inactivation in renal tubular epithelial cells[J]. J Biol Chem, 2008, 283(12):7401-7410.

[13] Yang J, Dai C, Liu Y. A novel mechanism by which hepatocyte growth factor blocks tubular epithelial to mesenchymal transition[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(1):68-78.

(责任编辑:唐秋姗)