

胰岛素样生长因子在常染色体显性遗传性多囊肾病发病中的作用

吴玉梅¹,梅长林^{1*},孙田美¹,张维莉¹,章建全²,张玲²,宋吉¹,戴兵¹,汤兵¹

(1. 第二军医大学长征医院肾内科,上海 200003; 2. 长征医院超声诊断科)

[摘要] 目的:研究胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)在常染色体显性遗传性多囊肾病(autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD)发病中的作用。方法:采用酶联免疫吸附法测定 41 例 ADPKD 患者血液、囊肿液及尿液中 IGF-1 浓度;应用免疫组织化学染色方法检测 IGF-1 及其受体(IGF-1R)在 ADPKD 囊肿组织中的表达。结果:41 例 ADPKD 患者囊肿液中的 IGF-1 浓度 $[(162.0 \pm 5.06) \text{ ng/ml}]$ 显著高于血液 $[(76.0 \pm 28.13) \text{ ng/ml}]$ 和尿液 $[(62.0 \pm 11.18) \text{ ng/ml}]$ 中浓度($P < 0.01$);IGF-1 和 IGF-1R 在 ADPKD 囊肿组织中的囊肿衬里上皮细胞、平滑肌细胞及间质细胞均呈阳性表达。结论:囊肿液中 IGF-1 的增多可能来自囊肿衬里上皮细胞及间质细胞的合成和分泌,并与囊肿的形成和长大有关。

[关键词] 多囊肾病,常染色体显性;胰岛素样生长因子;囊肿衬里上皮细胞

[中图分类号] R 692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)06-0623-03

Role of insulin-like growth factor-1 in pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease

WU Yu-Mei¹, MEI Chang-Lin^{1*}, SUN Tian-Mei¹, ZHANG Wei-Li¹, ZHANG Jian-Quan², ZHANG Ling², SONG Ji¹, DAI Bing¹, TANG Bing¹ (1. Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Ultrasonic Diagnosis, Changzheng Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). **Methods:** IGF-1 levels in the plasma, urine and cystic fluid from 41 patients with ADPKD were determined by ELISA. The expressions of IGF-1 and IGF-1 receptor (IGF-1R) in ADPKD kidney tissues were detected with immunohistochemistry. **Results:** The levels of IGF-1 in cystic fluid $[(162.0 \pm 5.06) \text{ ng/ml}]$ were greatly higher than those in plasma $[(76.0 \pm 28.13) \text{ ng/ml}, P < 0.01]$ and urine $[(62.0 \pm 11.18) \text{ ng/ml}, P < 0.01]$. IGF-1 and IGF-1R were mostly expressed in cystlining-epithelial cells, smooth muscle cells and interstitial cells. **Conclusion:** The increasing IGF-1 in cystic fluid may be from cystlining-epithelial cells and interstitial cells. IGF-1 may be involved in the formation and development of kidney cysts.

[KEY WORDS] polycystic kidney disease, autosomal dominant; insulin-like growth factor-1; cystlining-epithelial cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(6): 623-625]

常染色体显性遗传性多囊肾病(ADPKD)是人类最常见单基因遗传性疾病之一,以充满液体的多个囊泡聚集在肾脏或其他器官为特征,其中有关肾脏囊泡发生、发展的详细机制目前尚未完全阐明。本实验室前期工作曾观察到角质细胞生长因子(KGF)对体外培养的ADPKD囊肿衬里上皮细胞有促增殖作用,且在囊肿组织中高表达,提示KGF可能参与ADPKD囊肿的形成和发展^[1,2]。胰岛素样生长因子1(IGF-1)也是一种能够刺激上皮细胞增殖分裂的细胞生长因子,可促进部分肾脏疾病的发生和发展^[3,4]。为进一步阐明IGF-1在ADPKD发生、发展中的作用,我们开展了本实验研究,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 标本采集 根据家族遗传史、临床表现、影像

学检查和基因突变分析结果,确定ADPKD诊断者41例,其中男29例,女12例;年龄39~58岁,平均 (46.22 ± 4.01) 岁;查血、尿常规及肝、肾功能均正常。ADPKD囊肿直径达4cm时,在B超引导下行囊肿穿刺术。术前于穿刺前留取静脉血2ml,与囊液和术后尿分别离心,取上清液,并于-20℃贮存。22例年龄、性别匹配的健康体检者的血液和尿液为对照组。10例ADPKD患者肾囊肿组织,均来自本院普外科行腹腔镜下多囊肾去顶减压术切除的标本。6例正常肾组织标本来源于本院泌尿外科行肾癌切除的正常肾组织。手术切除的新鲜肾组织,即刻用无菌手术刀切成 $1 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm} \times 0.2 \text{ cm}$ 大小数

[基金项目] 国家自然科学基金(30170901)。

[作者简介] 吴玉梅(1967-),女(汉族),硕士,主治医师。

*Corresponding author. E-mail: chlmei@public1.sta.net.cn

块,分别放于含有1/1 000焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)的4%多聚甲醛(含0.1 mol/ml PBS)及10%的甲醛溶液中固定,石蜡包埋,在切片机上连续切片,厚度为4 μm。

1.2 试剂 IGF-1 ELISA 试剂盒购自美国 B&C 公司、rhIGF-1 为 PeproTech 公司产品;兔抗人 IGF-1、IGF-1R、SABC 试剂盒购于武汉博士德生物工程技术有限公司。囊肿衬里上皮细胞系为本实验室建立。噻唑蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO)为 Amresco 公司产品。RPMI 1640 培养液为 Gibco 公司产品,PI 染液为 Sigma 公司产品;MK 3 型酶联免疫测定仪为丹麦 Labsystems Dragon Wellscan 公司产品;EPICS-XL 型流式细胞仪为美国 Coulter 公司产品;H-800 透射电镜为日本 Olympus 公司产品。

1.3 血清、尿液及囊肿液 IGF-1 测定方法 应用 IGF-1 ELISA 试剂盒测定 IGF-1 的含量,严格按照试剂盒说明操作。

1.4 囊肿组织中 IGF-1、IGF-1R 检测 采用 SABC-免疫组织化学法。切片常规脱蜡至水,经微波处理,3%过氧化氢消除内源性过氧化氢酶。封闭杂交,滴加一抗(抗 IGF-1 抗体或抗 IGF-1R 抗体 1:200)4℃过夜。次日用 PBS 缓冲液冲洗后滴加二抗(兔抗 IgG)30 min,DAB 显色后苏木精复染,脱水封片观察。以 PBS 为一抗作阴性对照。结果判断:细胞质呈棕黄色为阳性细胞,光学显微镜下观察、摄片。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 血清、尿液及囊肿液中 IGF-1 含量测定结果 ADPKD 患者囊液中 IGF-1 水平 $[(162.0 \pm 5.06) \text{ ng/ml}]$ 显著高于血清 $[(76.0 \pm 28.13) \text{ ng/ml}]$ 、尿液 $[(62.0 \pm 11.18) \text{ ng/ml}]$ 中水平 ($P < 0.01$),但血清与尿液 IGF-1 浓度间无显著差异;正常对照组血清中 IGF-1 水平明显高于 ADPKD 患者囊液、血液和尿液中的水平 ($P < 0.01$),但两组尿液 IGF-1 浓度无明显差异(图 1)。

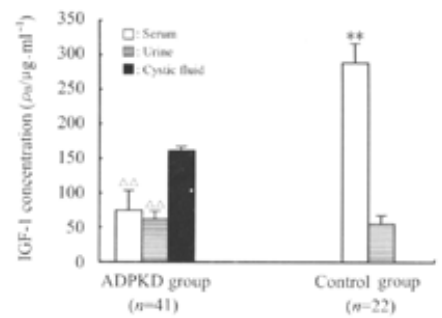


图 1 ELISA 法测定血清、尿液及囊肿液中的 IGF-1 浓度
Fig 1 Concentrations of IGF-1 in serum, urine and cystic fluid by ELISA
** $P < 0.01$ vs ADPKD group;
△△ $P < 0.01$ vs cystic fluid of ADPKD group

2.2 IGF-1 及 IGF-1R 多囊肾组织中的表达 免疫组织化学染色显示,IGF-1 及其受体在囊肿组织的囊肿衬里上皮细胞、平滑肌、间质细胞胞质中染色均呈强阳性,而 IGF-1 在正常肾组织远端肾小管上皮细胞和集合管上皮细胞质中染色阳性,IGF-1R 在正常肾组织近端肾小管上皮细胞胞质染色阳性(图 2)。

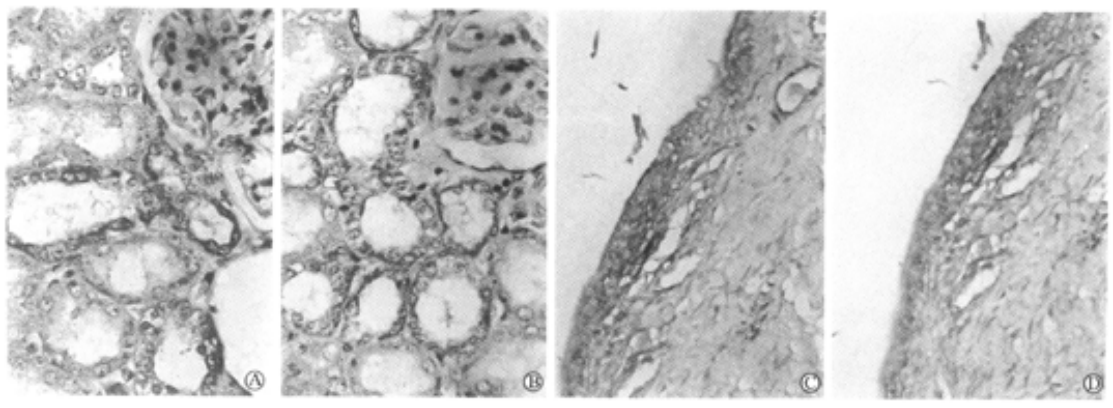


图 2 IGF-1 及其受体在正常肾和 ADPKD 囊肿组织中的表达
Fig 2 Expression of IGF-1 and IGF-1R in normal renal and cystic tissue(×400)
A,B: Normal renal tissue; C,D: Renal cystic tissue; A, C: Expression of IGF-1; B,D: Expression of IGF-1R

3 讨论

IGF-1是由70个氨基酸残基组成的单链多肽,机体内多种组织器官能合成和分泌IGF-1,但循环中的IGF-1主要由肝脏合成和分泌,并受生长激素(HG)/IGF-1调节,局部组织合成和分泌的IGF-1可能与循环中的IGF-1共同对局部靶组织起作用^[5]。IGF-1可由产生部位转运至起效部位。其生物学功能是:(1)类似胰岛素的代谢作用,促进组织摄取葡萄糖,刺激糖原异生和糖酵解;(2)促有丝分裂作用;刺激RNA、DNA的合成和细胞增殖,特别是在细胞周期G₀、G₁和G₁、G_S阶段有重大意义。

近年来,IGF-1在肾脏病中的研究受到重视,据报道SPRD-cy大鼠血中及肾组织中IGF-1水平明显增高^[6]。体外实验已观察到人及动物肾小球系膜细胞上存在IGF-1特异性受体,一定条件下肾小球系膜细胞可以合成、分泌IGF-1,提示IGF-1与肾小球系膜病变有关^[7]。Toshio等^[8]在转基因动物实验中发现,转有人IGF-1基因的小鼠血IGF-1水平明显升高,但不表现出肾小球硬化,而仅仅出现肾小球肥大。以上结果提示血循环中IGF-1单独不能导致正常肾小球硬化的发生,但不能排除病理条件下肾小球局部IGF-1自分泌而加重肾小球系膜病,进而导致肾小球硬化。本实验研究发现,ADPKD囊肿液中IGF-1含量较血液及尿液中显著增高,IGF-1及其受体在囊肿组织中均呈阳性表达,提示囊肿衬里上皮细胞和囊肿组织中的其他细胞合成IGF-1增加。推测多囊肾组织及囊肿液中IGF-1的增高可以刺激具有肿瘤习性的囊肿衬里上皮细胞异常增殖及合成分泌异常物质,加速囊肿的发生和长大。正常肾组织免疫组化检测结果显示,IGF-1及其受体在肾单位的不同部位有不同表达,即IGF-1主要在远端小管和集合小管表达,而其受体则在近端小管大量表达,与文献^[5]报道一致。提示IGF-1在肾脏发育及不同的病理过程中发挥着不同的作用。

本实验同时发现,ADPKD患者血清及囊肿液IGF-1浓度均低于正常健康对照组血清中的浓度,推测可能的因素如下:(1)囊肿是个封闭的囊腔,囊肿外产生的IGF-1未能进入囊腔。故囊肿液IGF-1主要来自囊肿衬里上皮细胞合成分泌,因而囊肿液IGF-1浓度低于正常人血清,但高于患者本身血清浓度;(2)对照组血清为健康者空腹体检时所得,空

腹血糖可能引起应激性IGF-1升高。

以上研究提示,囊肿衬里上皮细胞通过自分泌作用产生IGF-1增多,增多的IGF-1可以进一步刺激囊肿衬里上皮细胞增殖,引起囊肿进行性长大,这可能是ADPKD囊肿发生、进展的机制之一。

【参考文献】

- [1] 刘沙勤,梅长林,孙田美,等.角质细胞生长因子对常染色体显性遗传性多囊肾囊肿衬里上皮细胞的促增殖作用[J].第二军医大学学报,2002,23(8):871-873.
- [2] 刘沙勤,梅长林,孙田美,等.角质细胞生长因子在常染色体显性遗传性多囊肾囊肿组织中的表达[J].第二军医大学学报,2003,24(1):22-24.
- [3] Pietrzakowski Z, Sell C, Lammers R, et al. The role of insulin-like growth factor I (IGF-1) and the IGF-1 receptor in epidermal growth factor-stimulated growth of 3T3 cells[J]. *Mol Cell Biol*, 1992, 12(4): 3883-3889.
- [4] 周平,陈学荣,李世荫,等.胰岛素样生长因子1,白介素1和肿瘤坏死因子 α 基因在自发狼疮肾炎小鼠肾脏中的表达[J].中国皮肤性病科学杂志,1999,13(1):102-104.
- [5] Miyatake N, Shikata K, Wada J, et al. Differential distribution of insulin like growth factor 1 and insulin like growth factor binding proteins in experimental diabetic rat kidney [J]. *Nephron*, 1999, 81(2): 317-323.
- [6] Aukema HM, Housini I. Dietary soy protein effects on disease and IGF-1 in male and female Han: SPRD-cy rats[J]. *Kidney Int*, 2001, 59(1): 52-61.
- [7] Stella M, Raimun D, Hirschber G, et al. Insulin like growth factor 1 induces mesangial proliferation and increases mRNA and secretion of collagen[J]. *Kidney Int*, 1995, 48(1): 45-51.
- [8] Toshio D, Liliane J, Striker LJ, et al. Progressive glomerulosclerosis develops in transgenic mice chronically pressing growth hormone and growth hormone releasing factor but not in those expressing insulin like growth factor 1 [J]. *Am J Pathol*, 1988, 133(1): 398-403.

【收稿日期】 2003-11-03

【修回日期】 2004-03-15

【本文编辑】 邓晓群