การศึกษาความสัมพันธ์ของยีนวาสคูลาร์เอนโดทีเลียลโกรท์แฟกเตอร์กับการเกิดพยาธิสภาพในไตของผู้ป่วยโรคภูมิต้านเนื้อเยื่อตนเองที่มีภาวะไตอักเสบ

นางสาวธิติมา เบ็ญจะชาติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

THE CORRELATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND RENAL PATHOLOGY IN LUPUS NEPHRITIS

Miss Thitima Benjachat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2006
Copyright of Chulalongkorn University

492200

Thesis Title	THE CORRELATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND RENAL PATHOLOGY IN LUPUS NEPHRITIS
By	Miss Thitima Benjachat
Field of Study	Medical Science
Thesis Advisor	Assistant Professor Yingyos Avihingsanon, M.D.

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

P. Kamolratanakul ..... Dean of the Faculty of Medicine

(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

THESIS COMMITTEE

Vilai Chentanez ..... Chairman

(Associate Professor Vilai Chentanez, M.D.)

Yingyos Avihingsanon ..... Thesis Advisor

(Assistant Professor Yingyos Avihingsanon, M.D.)

Nattiya Hirankarn ..... Member

(Associate Professor Nattiya Hirankarn, M.D., Ph.D.)

Virote Sriuranpong ..... Member

(Assistant Professor Virote Sriuranpong, M.D., Ph.D.)

ธิติมา เบ็ญจะชาติ : การศึกษาความสัมพันธ์ของยีนวาสคูลาร์เอนโดทีเลียลโกรท์แฟกเตอร์กับการเกิดพยาธิสภาพในไตของผู้ป่วยโรคภูมิต้านเนื้อเยื่อตนเองที่มีภาวะไตอักเสบ (THE CORRELATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND RENAL PATHOLOGY IN LUPUS NEPHRITIS) อ.ที่ปรึกษา: ผศ.นพ.ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์, 64 หน้า.

โรค Lupus Nephritis (LN) หรือภาวะไตอักเสบลูปัส เป็นโรคที่เกิดจากภูมิต้านเนื้อเยื่อตนเองรวมไปถึงการอักเสบของไต ทำให้การทำงานของไตเสื่อมลงและมีการพัฒนาของโรคไปสู่ภาวะไตวายระยะสุดท้าย (end-stage renal disease; ESRD) ยีน Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดความผิดปกติของไตในโรคไตหลายชนิด มีส่วนในการป้องกันการตายของเซลล์ที่หลอดเลือดและ endothelial เซลล์ภายในไต โดยมีส่วนป้องกันเซลล์ไตจากภาวะการขาดออกซิเจน ผู้วิจัยได้ศึกษาความแตกต่างของการแสดงออกของยีน VEGF ภายในไตของผู้ป่วย Lupus Nephritis เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (kidney transplant donor) รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนดังกล่าวกับพยาธิสภาพภายในไตของผู้ป่วย โดยวิธี Real-Time PCR และ Immunohistochemistry โดยใช้ตัวอย่างชิ้นเนื้อไตของผู้ป่วยทั้งหมด 41 ชิ้น โดยที่ผู้ป่วยส่วนใหญ่ได้รับการวินิจฉัยว่าจัดอยู่ในกลุ่มที่มีอาการของโรครุนแรง (Class IV LN) และชิ้นเนื้อจากผู้บริจาคไตเพื่อปลูกถ่ายไตจำนวน 6 ชิ้น พบว่าในผู้ป่วยมีการแสดงออกของ VEGF mRNA และโปรตีนลดลงกว่าคนปกติ (-0.83 ± 0.7 vs. -0.001± 0.39 log copies; p=0.002) นอกจากนี้ยังพบว่าการลดลงของ VEGF mRNA มีความสัมพันธ์กับการเกิดพยาธิสภาพที่รุนแรงของไต ได้แก่ endocapillary proliferation, crescent formation และ activity score โดยผู้ป่วยที่มีระดับการแสดงออกของ VEGF mRNA ต่ำกว่าจะมีพยาธิสภาพของไตดังกล่าวมากกว่าผู้ป่วยที่มีการแสดงออกของ VEGF mRNA สูง (p-value = 0.01, 0.04 และ 0.03 ตามลำดับ) นอกจากนั้นการแสดงออกของ VEFG mRNA ที่ลดต่ำลงยังสามารถใช้ในการทำนายการเกิด doubling serum creatinine หรือ ESRD หรือทั้งสองอย่างร่วมกัน เมื่อติดตามผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือนได้อีกด้วย (p-value = 0.04, 0.01 และ 0.005, ตามลำดับ) จากความสัมพันธ์ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของ VEGF สามารถใช้ในการวินิจฉัยความรุนแรงของโรคและทำนายการเกิดไตวายเรื้อรังในระยะเวลาอันใกล้ได้อีกด้วย

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์.....ลายมือชื่อนิสิต.....ธิติมา เบ็ญจะชาติ.....

ปีการศึกษา 2549.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....ยิ่งยศ อวิหิงสานนท์

##4874737030 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORD : VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR / VEGF mRNA / LUPUS NEPHRITIS / REAL-TIME PCR

THITIMA BENJACHAT: THE CORRELATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR AND RENAL PATHOLOGY IN LUPUS NEPHRITIS. THESIS ADVISOR: ASST.PROF. YINGYOS AVIHINGSON, MD, 64 pp.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a pivotal role in delayed progression of renal diseases such as remnant kidney model and thrombotic microangiopathy. It protects vascular endothelial and tubular epithelial cells from apoptosis, hypoxia and inflammation. This study determines an association between intra-renal VEGF gene expression and short-term renal outcome in SLE patient with active lupus nephritis. Forty-one renal biopsy samples from lupus nephritis patients were studied by real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry. The same renal biopsy core was used to study both VEGF expression and histopathology. Most patients had received the standard immunosuppressive treatment. The VEGF gene expression was normalized by 18s rRNA. Receiver operating characteristic (ROC) curves analysis was used to define the cutoff level of VEGF. The outcomes at 6-month post-treatment were doubling serum creatinine and end-stage renal disease (ESRD). All data were expressed as median and inter-quartile range (IQR). The median age (IQR) of patients was 29.5 (34-23) years. The 24-hour urinary protein excretion was 2.0 (3.61-1.11) gram/day and erythrocyturia was 12 (40-1) cell/HPF. The serum creatinine was 1.0 (2.2-0.7) mg/dl. Eighty percent biopsy samples were classified in focal or diffuse proliferative lupus nephritis. The activity and chronicity indices were 5 (11-0.5) and 2 (6-1), respectively. VEGF gene expression was significantly decreased as compared to kidney control (kidney transplant donors) (0.83 ± 0.7 vs. -0.001± 0.39 log copies; p=0.002). VEGF gene expression was inversely associated with high percentage (≥19%) of glomerular endocapillary proliferation (p=0.01), crescentic formation (p=0.04) and high activity index (p=0.03). The levels of intra-renal VEGF mRNAs at biopsy could predict ESRD, doubling serum creatinine or combination of both outcomes (p-value = 0.01, 0.04 and 0.005, respectively). In conclusion, intra-renal expression of VEGF is inversely associated with severe pathologic changes of lupus nephritis. The decreased VEGF levels were associated with poor renal outcomes. This may lead to the novel molecular classification which may be complement to the current diagnostic method of renal biopsy

Field of Study Medical Science.....Student's signature .....Thitima Benjachat.....

Academic year 2006.....Advisor's signature .....Yingyos Avihingsanon.....

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wished to express her deepest gratitude to her advisor, Assistant Professor Yingyos Avihingsanon, M.D., Department of Medicine, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, for his kind excellent supervision and invaluable advice, indispensable help, constructive criticism and guidance throughout the period of the study. His expertise in clinical and statistics improved my research skills and prepared me for future challenges.

I also would like to thanks for kindly advised, Assistant Professor Wipawee Kittikowit, MD., Mr. Telerngsak kanjanabuch, MD.,Ph.D., Faculty of Medicine, Chulalongkorn University.

I would like to thank the committee of Medical Science Program for giving me permission to commence this thesis in the first instance, to do the necessary research work.

I special thank to Mr. Preecha Raungwetworachai, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University and Assistant Professor Adis Tasanarong, MD., Department of Medicine, Faculty of Medicine, Thammasat University for their valuable advice and supporting. Moreover, I would like to thank Lupus Research Unit members for their kindness and courtesy for laboratory facilities. Without them, this work would not be accomplished.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my parents, my sister and brother, and my friends for their love, support, understanding and encouragement.

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv
ENGLISH ABSTRACT.....v
ACKNOWLEDGEMENTS.....vi
CONTENTS.....vii
LIST OF TABLES.....ix
LIST OF FIGURES.....x
ABBREVATIONS.....xi
CHAPTER
I INTRODUCTION
Background and Rational.....1
Research Questions.....3
Objective.....3
Hypothesis.....4
II LITERATURE REVIEW
Lupus Nephritis.....5
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....12
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Lupus Nephritis..20
III MATERIALS AND METHODS
Patients.....22
Sample Size Calculation.....22
Definitions.....23
Kidney Biopsy Collection.....23
Total RNA Extraction.....24
Measurment Total RNA Concentration.....24
Complementary DNA (cDNA) Synthesis (RT-PCR).....24
Gene Expression Study.....25
Immunohistochemistry Study.....26

Statistical Analysis.....28

IV RESULTS

Sample Charecteristics.....30

Intra-Renal VEGF mRNA Levels in Lupus Nephritis.....31

Intra-Renal VEGF mRNA Levels were Associated with the Severity of Renal Pathology.....31

Intra-Renal VEGF Protein Expression.....33

The Association of Intra-Renal VEGF mRNA Levels and Renal Outcomes in Lupus Nephritis Patients.....34

V DISCUSSION and CONCLUSION.....41

REFERENCES.....44

APPENDICES.....52

APPENDIX A.....53

APPENDIX B.....55

APPENDIX C.....60

BIOGRAPHY.....64

LIST OF TABLES

Table Page

1. Clinical features of patients with lupus nephritis.....8
2. World Health Organization (WHO) morphologic classification of lupus nephritis (modified in 1982).....10
3. International Society of Nephrology / Renal Pathology Society (ISN/RPS) 2003 classification of lupus nephritis.....11
4. The chromosomal location, major mRNA transcript and major sizes of the VEGF ligands.....13
5. The biological activities of VEGF ligands.....14
6. The sequences of primers and fluorescence probes for VEGF and 18srRNA...26
7. Samples characteristics.....30
8. The demographics of patient with low and high level VEGF.....39
9. The comparisons of renal outcomes during 6 months of follow up and histological parameters.....40

LIST OF FIGURES

Figure Page

1. The two hypotheses for the glomerular binding of autoantibodies in lupus nephritis.....7
2. Interaction of VEGF family members with the VEGFR-1 and-2, and neuropillins 1 and 2.....14
3. The splice variants of human VEGF ligands.....17
4. Levels of VEGF mRNA in kidney biopsy.....31
5. The boxplots of VEGF mRNA levels with three different pathological groups..32
6. Intra-renal VEGF protein expression in lupus nephritis.....35
7. Glomerular VEGF protein expression.....36
8. Glomerular VEGF protein expression in serious pathological features.....37
9. The cumulative probability to remain free of renal outcomes.....38

ABBREVIATIONS

AGEs	advanced glycation end products
Ang	Agiopoietin
Ag	Antigen
Ab	Antibody
bp	base pair
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CXCR-3	CXC chemokine receptor-3
^{o}c	degree Celsius
dsDNA	double–standed deoxyribonucleic acid
DAB	diaminobenzidine
DNA	deoxyribonucleic acid
ECM	extracellular matrix
ESRD	end-stage renal disease
et al	et alii
Flt	FMS-like tyrosine kinase
GFR	glomerular filtration rate
GBM	glomerular basement membrane
HSCs	hematopoietic stem cells
HSPG	heparin sulfate proteoglycan

IC	immune complex
IgG	immunoglobulin G
IGH-I	insulin-like growth factor I
IL	interleukin
IP-10	interferon-inducible protein-10
KDR	kinases insert domain receptor
Kbp	kilo Base pair
kDa	kilo Dalton
LN	lupus nephritis
MCP-1	monocyte chemoattractant protient-1
MIP	macrophage inflammatory protein
ml	milliliter
mM	millimolar
mRNA	massager ribonucleic acid
N/A	not application
NP	nuropillin
OD	optimal density
PBS	phosphate buffer saline
PCK	protein kinase C
PCR	polymerase chain reaction

PDGF	platelet-derived growth factor
PLGF	placental growth factor
PTCs	peritubular capillaries
RK	remnant kidney
ROS	reactive oxygen species
ROC	receiver operating characteristic
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
RT-PCR	reverses transcription PCR
RTKs	receptor tyrosine kinase
SLE	systemic lupus erythematosus
TGF-β	transforming growth factor beta
TSP-1	thrombospondin-1
VEGF	vascular growth endothelial factor
VEGFR	vascular growth endothelial factor receptor
WHO	The World Health Organization
μl	microlitter
μg	microgram