

# Hepatocyte Growth Factor (HGF): ruolo nella embriogenesi e nella fibrosi renale

C. Esposito, G. Fasoli, T. Rampino, A. Dal Canton

Unità Operativa di Nefrologia, Dialisi e Trapianto, IRCCS Policlinico San Matteo, Università di Pavia, Pavia

## HGF and kidney

*HGF is a multifunctional polypeptide with mitogenic, motogenic and morphogenic effects. These effects are mediated by c-met, a specific receptor of HGF and a member of the receptor tyrosine kinase superfamily, virtually expressed in every type of kidney cell. HGF has a central role during embryogenesis since it stimulates epithelial differentiation of metanephric mesenchymal cells and induces branching tubules, as experiments in epithelial cells cultures demonstrated. Several studies have shown also that HGF accelerates the recovery from toxic-ischemic acute renal failure. This effect seems to be mediated by the inhibition of programmed cell death and an increased cell survival. HGF inhibits apoptosis by upregulating the protooncogene Bcl-2 and downregulating Bax. Since HGF can modulate extracellular matrix turnover, authors suggest its beneficial role in tissue remodelling and particularly in chronic renal diseases. Several studies reported a key role for HGF in reducing interstitial fibrosis and glomerular sclerosis, both in in vivo and in vitro models. This protective effect is secondary to HGF antagonizing the profibrotic action of TGF- $\beta$ . HGF modulates the balance between synthesis and degradation of extracellular matrix, increasing the expression of metalloproteases and reducing the production of their specific inhibitors TIMPs. Furthermore HGF suppresses the effect of TGF- $\beta$  by blocking the axis TGF- $\beta$ /Smad. Last, the antifibrotic effect of HGF might be modulated by the proliferative status of target cells.*

*To sum up, the supplementation of exogenous HGF or the induction of endogenous HGF expression may provide an effective therapeutic strategy for combating chronic renal diseases. (G Ital Nefrol 2006; 23: 381-8)*

**KEY WORDS:** HGF, TGF- $\beta$ , Renal fibrosis, Extracellular matrix, Epithelial cell, c-met

**PAROLE CHIAVE:** HGF, TGF- $\beta$ , Fibrosi renale, Matrice extracellulare, Cellula epiteliale, c-met

## Introduzione

Il *turnover* della matrice extracellulare è un processo di notevole importanza nel rimodellamento di tutti i tessuti in condizioni fisiologiche, nel corso dello sviluppo, nella guarigione delle ferite, nei processi infiammatori e nella diffusione dei tumori. Il danno tissutale è caratterizzato da una cascata di eventi nel tentativo di riparare le alterazioni. Questo processo di guarigione prevede l'intervento di molecole come citochine e chemochine, il richiamo di cellule infiammatorie, la differenziazione e la proliferazione di cellule del tessuto danneggiato e la produzione di matrice extracellulare con il rimodellamento del tessuto. Tuttavia, soprattutto quando il danno si cronicizza, si verifica una alterazione dell'equilibrio tra sintesi e degradazione della matrice extracellulare con accumulo di quest'ultima e fibrosi tissutale. Numerosi fattori sono in grado di modulare il *turnover* della matrice extracellulare e il rimo-

dellamento tissutale. *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) è una delle molecole che ha destato il maggiore interesse negli ultimi anni. HGF è un fattore pleiotropico di natura polipeptidica originariamente purificato e caratterizzato alla fine degli anni 80 per la sua azione mitogena su epatociti in coltura (1). L'azione di HGF non si limita alla aumentata proliferazione degli epatociti; infatti questo fattore è in grado di promuovere mitosi (2), sopravvivenza (3) e rimodellamento di numerosi tessuti (Tab. I) (4). HGF è stato anche definito *scatter factor*, fattore di dispersione, per la sua capacità di aumentare la motilità di cellule in coltura allontanandole l'una dall'altra (5). Nella sua forma matura è una glicoproteina composta da due subunità, una catena  $\alpha$  e una catena  $\beta$  rispettivamente di 69 e 34 kDa tenute insieme da un ponte disolfuro. Le azioni biologiche di HGF sono mediate dal legame al suo recettore *c-met*, che è una proteina transmembrana appartenente alla famiglia dei recettori con attività *tirosin-kinasica* (6) con peso mole-

colare di 190 kD e due subunità di 50 e 145 kD legate da un ponte disolfuro, la prima delle quali è extracellulare. Il legame con HGF induce la dimerizzazione del recettore e la sua autofosforilazione a livello di un residuo di tirosina situato sulla catena  $\beta$ . Questo risulta nel richiamo di molecole che agiscono come trasduttori del segnale all'interno della cellula come PI3 *kinasi*, il complesso Grb/Sos/Ras e la fosfolipasi- $\gamma$  (7).

L'organo che presenta la maggiore espressione di HGF nell'animale adulto è il rene e non a caso nel corso degli ultimi anni sono stati fatti numerosi progressi nel determinare gli effetti di questo fattore nel corso dello sviluppo e in patologie renali.

## HGF nello sviluppo del rene

Nel corso dello sviluppo del rene è essenziale il rapporto tra il mesenchima metanefrico e l'epitelio dell'abbozzo ureterale. Tra queste due strutture c'è un continuo scambio di segnali. Il mesenchima metanefrico con i suoi segnali induce l'abbozzo ureterale ad allungarsi e a ramificarsi. D'altra parte l'abbozzo ureterale porta alla condensazione del metanefro e alla conversione mesenchima/epiteliale (8). Nel corso dello sviluppo HGF è espresso dal mesenchima metanefrico e il suo recettore *c-met* dall'abbozzo ureterale e dalle cellule epiteliali del nefrone. È stato dimostrato che il trattamento di embrioni renali con anticorpi neutralizzanti HGF riduce la crescita del metanefro e la morfogenesi (9), inoltre HGF aumenta la differenziazione delle cellule mesenchimali in cellule epiteliali mentre gli anticorpi anti-HGF la inibiscono. Questi dati sembrano suggerire un ruolo centrale di HGF nel corso dello sviluppo del rene. La tubulogenesi indotta dal mesenchima è una delle fasi fondamentali dello sviluppo renale. A conferma del ruolo dell'asse HGF/met sullo sviluppo del rene sono gli studi di Brinkman e Weidner che hanno dimostrato la capacità di questo fattore di stimolare cellule MDCK (cellule epiteliali renali canine) a formare strutture simili ai tubuli quando immerse in una matrice tridimensionale (3, 10), effetto che è stato successivamente dimostrato anche per cellule epiteliali derivate dall'abbozzo ureterale e dal dotto collettore. Infine in un modello *in vitro* anticorpi anti-HGF inibiscono la formazione di tubuli indotta dal mesenchima (11).

## Test di verifica

### 1) Quale è l'azione di HGF:

- Promuovere la meiosi
- Promuovere la mitosi
- Promuovere la apoptosi
- Ridurre la apoptosi
- Inibire la dedifferenziazione.

### 2) Quale è l'organo in cui è maggiore la espressione di HGF:

- Il cuore
- Il rene
- Il fegato
- Il midollo osseo
- La milza.

### 3) Nel corso dello sviluppo *c-met* è espresso da:

- Cellule epiteliali
- Cellule mesangiali
- Cellule muscolari lisce
- Cellule endoteliali
- Linfociti.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet [www.sin-italy.org/gin](http://www.sin-italy.org/gin) e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

## HGF e insufficienza renale acuta

L'insufficienza renale acuta (IRA) è una condizione caratterizzata da una elevata mortalità soprattutto quando è associata a necrosi tubulare acuta (12). Numerosi protocolli terapeutici sono stati utilizzati per accelerare la ripresa clinica dalla tubulonecrosi e quindi migliorare la prognosi dell'IRA ma senza successo soprattutto per la scarsa conoscenza dei meccanismi coinvolti nella rigenerazione cellulare. La dimostrazione che HGF ha un effetto mitogeno ed

TABELLA I - RUOLO DEL LEGAME HGF/C-MET NEL RENE

#### Organogenesi

Topi knockout per HGF o *c-met* muoiono in utero prima che appaiano alterazioni renali

#### Effetti *in vitro*

Aumentata sintesi di DNA in cellule epiteliali renali  
Scattering  
Aumento della capacità di invasività delle cellule

#### Effetti *in vivo*

- Promuove il ripristino della funzione renale dopo:  
Ischemia  
Nefrectomia monolaterale  
Danno renale indotto farmacologicamente
- Riduce la fibrosi renale in  
Danno da ostruzione ureterale  
Danno da riduzione della massa renale  
Nefropatia diabetica

è capace di indurre tubulogenesi ha fatto ipotizzare un suo ruolo nel processo di riparazione in corso di necrosi tubulare acuta. In un nostro recente studio abbiamo dimostrato che in pazienti con IRA tossico-ischemica la concentrazione sierica di HGF nella fase conclamata dell'IRA era elevata e significativamente diversa da soggetti controllo e da pazienti con insufficienza renale cronica che presentavano lo stesso filtrato. La concentrazione di HGF si riduceva progressivamente con la ripresa della funzione renale. Considerato che HGF è prodotto da cellule di derivazione mesenchimale, abbiamo coltivato cellule mesangiali con il siero di pazienti con IRA. Dopo 24 ore di incubazione la concentrazione di HGF nel sovrantante era significativamente aumentata. Questi risultati dimostrano che HGF è prodotto in corso di IRA tossico-ischemica e suggeriscono che potrebbe agire sia come un fattore endocrino rilasciato in circolo, sia come sostanza paracrina prodotta dalle cellule mesangiali con attività locale sulle cellule epiteliali tubulari (13). La possibilità che HGF possa accelerare la riparazione del danno tossico-ischemico e la ripresa della funzione renale è stata confermata da una serie di studi *in vivo*. Nagano et al hanno dimostrato in un modello di IRA indotta dalla somministrazione di glicerolo che HGF alla dose di 0.25 mg/kg somministrato iv nelle prime 36 ore riduceva la necrosi tubulare e migliorava i parametri biochimici. La somministrazione di HGF era inoltre associata a una aumentata fosforilazione del suo recettore *c-met* e di MAPK (14). Risultati analoghi sono stati ottenuti da Yamasaki et al, in un modello di IRA da dicloruro di mercurio nel topo. In questo caso la somministrazione di una sola dose di HGF riduceva le lesioni istologiche migliorando la funzione renale (15). Inoltre la somministrazione di HGF riduceva il numero di cellule epiteliali tubulari con DNA frammentato determinato mediante metodica TUNEL confermando l'effetto citoprotettivo e antiapoptotico di HGF. L'effetto citoprotettivo e antiapoptotico sembra uno dei meccanismi mediante i quali HGF esercita l'effetto benefico nel corso di IRA.

Il distacco delle cellule dalla membrana basale con la formazione di detriti cellulari e l'ostruzione tubulare rappresenta una fase molto importante nello sviluppo dell'IRA. Recentemente è stato ipotizzato che l'effetto protettivo di HGF nell'IRA sia legato ad un aumento dell'adesione delle cellule epiteliali alle molecole della matrice (16). L'aumentata adesione indotta da HGF ridurrebbe il danno tubulare. Infine HGF sarebbe in grado di preservare l'espressione di E-caderina, una molecola essenziale nell'adesione tra cellule e nel mantenimento della polarità e dell'integrità strutturale (17). Quindi HGF accelera la ripresa dall'IRA sia per il suo effetto mitogeno sulle cellule epiteliali che esprimono il suo recettore *c-met*, sia per l'effetto antiapoptotico mediato anche dalla capacità di preservare le molecole di adesione e la polarità delle cellule epiteliali.

## Test di verifica

### 1) La concentrazione sierica di HGF nella fase conclamata dell'IRA tossico-ischemica è:

- Bassa
- Elevata
- Elevata solo in pazienti in trattamento dialitico
- Elevata solo in pazienti trapiantati
- Non significativamente diversa da soggetti controllo.

### 2) Con quale meccanismo HGF ridurrebbe il danno tubulare:

- Per apoptosi
- Riducendo la deposizione di matrice mesangiale
- Aumentando la proliferazione epiteliale
- Favorendo l'angiogenesi
- Preservando l'espressione di E-caderina e la polarità delle cellule epiteliali.

### 3) Quale dei seguenti effetti è stato dimostrato *in vitro* per HGF:

- Diminuisce la sintesi di DNA in cellule epiteliali renali
- Riduce la produzione di ossido nitrico
- Riduce la capacità di proliferazione cellulare
- Aumenta la capacità di aggregazione cellulare
- Aumenta la capacità di invasività delle cellule.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet [www.sin-italy.org/gin](http://www.sin-italy.org/gin) e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

## HGF e fibrosi renale

Il ruolo di HGF nella fibrosi renale è stato alquanto controverso. La possibilità che questo fattore potesse modulare il *turnover* della matrice extracellulare era dimostrata dall'aumento della invasività indotta su cellule tumorali NIH 3T3 e legata ad un aumento della degradazione della matrice extracellulare (18). Uno studio effettuato su topi transgenici per HGF ha dimostrato che in questi topi l'espressione elevata di HGF si associava ad elevati livelli di HGF circolanti già dalle prime fasi di sviluppo e gli animali presentavano una malattia renale progressiva con iperplasia tubulare, glomerulosclerosi e malattia policistica (19). Gli Autori suggerivano che l'elevata concentrazione di HGF, non inibita da altri fattori poteva alterare la differenziazione tessutale e la rigenerazione con sviluppo di patologie renali e tumori. Una alterazione del *turnover* in senso profibrotico indotta da HGF veniva anche dimostrata dal nostro gruppo su colture di cellule endoteliali e su cellule mesoteliali di soggetti in dialisi peritoneale in corso di peritonite.

## Effetto di HGF su cellule endoteliali e mesoteliali

Le cellule endoteliali partecipano attivamente al rimodellamento della matrice extracellulare sia in condizioni fisiologiche che patologiche come il diabete (20, 21). HGF stimola l'angiogenesi e sembra in grado di modulare il rimodellamento della matrice (22). Per questo motivo abbiamo valutato l'effetto di HGF su cellule endoteliali in coltura. Le cellule endoteliali trattate con HGF presentavano un aumento della proliferazione e una aumentata espressione di collagene tipo I e di inibitore tissutale delle metalloproteasi, alterazioni che favoriscono una netta deposizione di matrice (23). Questi risultati suggeriscono che HGF favorisce l'accumulo di matrice extracellulare in cellule endoteliali mediante un aumento dell'espressione di TIMP-1 e una riduzione dell'attività delle metalloproteasi. A conferma di un effetto profibrotico sono anche i risultati dello studio sulle cellule mesoteliali. Il peritoneo nei pazienti in trattamento dialitico peritoneale va incontro ad una progressiva fibrosi che viene accelerata dai processi infiammatori (24). I risultati del nostro studio dimostrano che i leucociti prelevati dal liquido peritoneale di pazienti in dialisi con peritonite presentavano una elevata produzione di HGF. Inoltre nelle cellule mesoteliali in coltura HGF induceva un aumento della produzione di collagene e una loro differenziazione in senso miofibroblastico (25). Questi risultati suggerivano un effetto profibrotico di HGF e un suo ruolo nella fibrosi del peritoneo dei soggetti in dialisi peritoneale.

## HGF e TGF- $\beta$

Nella fibrosi renale ha un ruolo centrale TGF- $\beta$ , una citochina con spiccata attività fibrogenica. Questo fattore induce la fibrosi renale favorendo l'apoptosi di podociti, cellule endoteliali e cellule epiteliali tubulari, inoltre ha la capacità di attivare le cellule mesangiali e i fibroblasti inducendo una elevata produzione di matrice extracellulare ed infine è in grado di indurre dedifferenziazione di cellule epiteliali in cellule mesenchimali (26). Tutte queste azioni favoriscono la deposizione di matrice con glomerulosclerosi e fibrosi interstiziale. Nonostante i lavori che dimostrano un effetto di HGF favorente la deposizione di matrice, c'è un notevole numero di studi in modelli animali di nefropatia cronica che dimostra un effetto renoprotettivo di HGF. Questa azione renoprotettiva sarebbe legata al suo effetto antiapoptotico e inibente la dedifferenziazione epitelio-mesenchimale mediato da una azione antagonista di TGF- $\beta$ . Mizuno et al hanno valutato l'espressione di HGF in un modello murino di malattia renale cronica. In questo modello gli Autori identificano due fasi della nefropatia caratterizzate da una differente espressione di HGF. Nella prima fase caratterizzata da intensa proliferazione delle cellule epiteliali tubula-

ri l'espressione di HGF aumentava, nella seconda fase caratterizzata da fibrosi interstiziale, l'espressione di HGF si riduceva mentre aumentava quella di TGF- $\beta$ . La somministrazione di anticorpi anti-HGF ai topi induceva una diminuzione dei livelli di HGF con un aumento delle aree di fibrosi e dei livelli di TGF- $\beta$  (27). Questo dimostrava che una riduzione di HGF endogeno poteva accelerare la fibrosi renale. Inoltre suggeriva che il bilancio tra HGF e TGF- $\beta$  è importante nella patogenesi della fibrosi renale. Un incremento della espressione di TGF- $\beta$  può sopprimere la produzione di HGF e viceversa. Questi risultati hanno stimolato una serie di studi per determinare l'effetto della somministrazione di HGF in modelli di fibrosi renale. La somministrazione di HGF riduceva la fibrosi interstiziale in topi con nefropatia ostruttiva da legatura dell'uretere (28). In questo modello l'espressione di TGF- $\beta$  è aumentata e si osserva una marcata fibrosi interstiziale con apoptosi delle cellule tubulari. La neutralizzazione di HGF endogeno aumentava le lesioni e l'espressione di TGF- $\beta$  mentre la somministrazione di HGF ricombinante riduceva la fibrosi, l'apoptosi e l'espressione di TGF- $\beta$ . HGF era anche in grado di prevenire la fibrosi interstiziale in un modello di riduzione della massa renale o *remnant kidney* in topi transgenici per TGF- $\beta$ . La somministrazione di HGF ricombinante riduceva l'espressione di CTGF, mediatore di TGF- $\beta$ , che modula la crescita dei fibroblasti e la produzione della matrice extracellulare (29).

La possibilità di trattare la fibrosi renale aumentando l'espressione di HGF mediante terapia genica è stata valutata da Gao et al in un modello di nefropatia ostruttiva nel ratto. Dopo l'ostruzione ureterale, i ratti venivano trattati con iniezioni intramuscolari di liposomi contenente il plasmide pUC-SRa/HGF e sacrificati dopo 2 e 4 settimane. L'espressione di HGF e i livelli ematici erano notevolmente aumentati nei ratti dalla trasfezione con HGF. Mediante ibridazione *in situ* era possibile osservare un'aumentata espressione di HGF e *c-met* nel tessuto renale dei ratti trasfettati. La trasfezione induceva una riduzione della fibrosi interstiziale e dell'infiltrazione di macrofagi determinata con metodiche di immunostochimica. HGF inoltre riduceva anche l'apoptosi delle cellule epiteliali tubulari. Questo effetto era mediato da una aumentata espressione del protooncogene Bcl-2. HGF non variava invece l'espressione di Bax. Bcl-2 e Bax sono due proteine omologhe che hanno un effetto opposto sulla crescita e sopravvivenza cellulare: Bcl-2 inibisce l'apoptosi mentre Bax agisce da fattore proapoptotico (30). Questi risultati dimostrano che è possibile indurre una elevata espressione di HGF mediante terapia genica e che HGF migliora la malattia renale cronica. Inoltre lo studio chiarisce la patogenesi della fibrosi interstiziale nel modello di ostruzione ureterale. I risultati indicano che uno dei meccanismi coinvolti è l'atrofia tubulare secondaria ad attivazione della apoptosi mediata da alterazione dell'equilibrio Bcl-2-Bax, alterazione corretta dalla terapia genica con HGF.



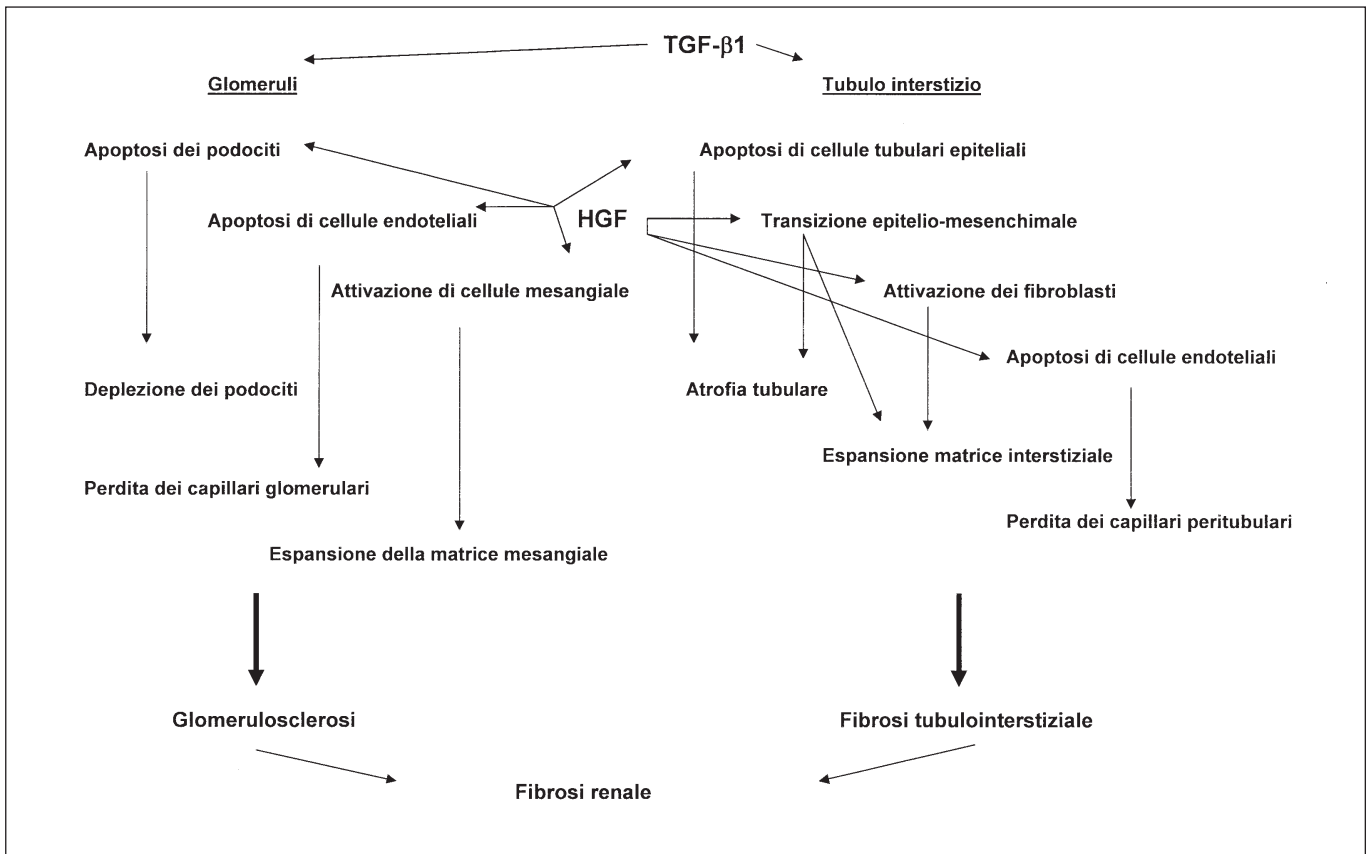


Fig. 1 - Effetti di TGF-β e HGF su glomeruli e compartimento tubulo-interstiziale.

In un modello simile di ostruzione ureterale Liu et al dimostrano che la somministrazione ritardata di HGF è in grado di ridurre la fibrosi interstiziale.

Questo effetto era secondario alla riduzione dell'attivazione miofibroblastica, della deposizione di matrice e della espressione di TGF-β indotte da HGF. In questo modello gli Autori dimostrano sia mediante tecniche di immunohistochemica che mediante *western blot* l'espressione di α-SMA, un *marker* di differenziazione fibroblastica, in cellule epiteliali tubulari. Questo suggerisce che uno dei meccanismi alla base della fibrosi tubulare in questo modello è la transdifferenziazione delle cellule epiteliali in miofibroblasti, cellule che producono molecole della matrice extracellulare. La somministrazione di HGF annullava la transdifferenziazione delle cellule epiteliali in senso miofibroblastico dimostrata dalla riduzione della espressione di α-SMA nelle cellule tubulari (31).

L'effetto di HGF sulla transdifferenziazione delle cellule epiteliali in senso miofibroblastico indotta da TGF-β era stato già dimostrato dagli stessi Autori in colture di cellule epiteliali tubulari renali (HKC) e in topi sottoposti a ostruzione ureterale (32).

## HGF e TGF-β/*Smad* pathway

L'effetto antifibrotico di HGF sottolineato dalla maggior parte degli studi sembra quindi legato alla azione antagonista nei confronti di TGF-β (Fig. 1). Tuttavia solo recentemente è stato studiato il meccanismo mediante il quale HGF antagonizza TGF-β (33). TGF-β induce i suoi effetti biologici mediante degli effettori chiamati *Smad* (34). Dopo la stimolazione con TGF-β, *Smad 2* e *Smad 3* sono fosforilate e legano *Smad 4*. Il complesso trasloca nel nucleo dove, dopo aver legato lo *Smad binding element*, controlla la trascrizione dei geni responsivi al TGF-β. HGF è in grado di bloccare la traslocazione nucleare del complesso *Smad-2-3-4* in fibroblasti.

Questo effetto sembra mediato dalla fosforilazione e attivazione di Erk-1 e -2, infatti l'inibizione dell'attivazione di Erk-1 e -2 induce l'accumulo di *Smad 2/3* nel nucleo e ripristina l'attivazione miofibroblastica indotta da TGF-β. Nelle cellule mesangiali HGF stabilizza il corepressore di *Smad*, TGIF, che non viene degradato e non permette la trascrizione dei gene regolati da TGF-β. Infine nelle cellule epiteliali tubulari HGF aumenta l'espressione di un corepressore di *Smad*, SnoN, che blocca la espressione genica mediata da *Smad 2/3* (34).

In considerazione degli effetti riportati sulle cellule mesangiali in coltura è ipotizzabile un ruolo di HGF sulla sclerosi glomerulare. Il nostro gruppo ha recentemente valutato l'effetto di HGF sul *turnover* della matrice extracellulare in glomeruli umani isolati (35). Per escludere che i risultati ottenuti fossero legati all'azione di HGF su cellule non glomerulari, abbiamo isolato i glomeruli da reni perfusi subito prima del trapianto.

L'incubazione dei glomeruli con HGF riduceva l'espressione di collagene e di TGF- $\beta$  mentre aumentava l'espressione di metalloproteasi 9 e parallelamente riduceva quella di TIMP-1. Inoltre HGF preservava l'espressione del suo recettore *c-met* nei glomeruli trattati. Questi risultati confermano l'effetto antifibrotico di HGF e l'azione antagonistica su TGF- $\beta$ .

### Modulazione dell'effetto di HGF e stato delle cellule bersaglio

HGF protegge quindi il rene dalla fibrosi interstiziale e dalla sclerosi glomerulare. Come spiegare i risultati degli studi che dimostrano un suo effetto profibrotico?

Abbiamo ipotizzato che l'effetto di HGF sul rimodellamento e sul *turnover* della matrice extracellulare potrebbe essere determinato dal diverso stato di proliferazione delle cellule. È stato infatti dimostrato che la risposta cellulare ad uno stimolo esterno può dipendere dal *turnover* cellulare (36). La risposta di un tipo cellulare ad uno stesso stimolo potrebbe essere diversa se la cellula è in fase proliferativa o è quiescente.

Per verificare questa ipotesi abbiamo coltivato cellule epiteliali tubulari renali (HK-2) su plastica e su agarosio per impedire la proliferazione cellulare. Le cellule non trattate erano utilizzate come controllo. Le cellule HK-2 su plastica presentavano una crescita normale, mentre quelle piantate su agarosio presentavano un arresto della crescita. Le cellule venivano trattate con HGF per 24 ore.

Dopo 24 ore di incubazione si procedeva a determinare i livelli di mRNA, la produzione di matrice extracellulare e l'espressione e la produzione di TGF- $\beta$ .

I risultati dimostrano che HGF ha effetti diversi se le cellule sono in diversa attività proliferativa (37) infatti l'effetto antifibrotico con riduzione di TGF- $\beta$ , TIMP-1 e TIMP-2 e aumento di MMP-2 e MMP-9 era presente solo nelle cellule quiescenti. Inoltre la diminuzione dell'espressione di TGF- $\beta$  era mediata da un aumento della produzione del corepressore di *Smad*, SnoN, come riportato da altri.

### Conclusioni

HGF è un fattore intrinseco che modula la proliferazione cellulare e il rimodellamento tessutale in condizioni fisiologiche. È in grado di accelerare la ripresa funzionale in

corso di IRA da danno tossico-ischemico e infine protegge il rene dallo sviluppo di fibrosi interstiziale e sclerosi glomerulare in seguito ad un danno cronico. HGF può essere considerato uno dei principali fattori antifibrotici. Il meccanismo della sua azione antifibrotica è prevalentemente svolto antagonizzando l'effetto di TGF- $\beta$  e l'asse TGF- $\beta$ /*Smad*. In situazioni particolari, legate probabilmente allo stato proliferativo delle cellule bersaglio, HGF potrebbe aumentare il danno favorendo la fibrosi tessutale. Il trattamento con HGF o misure atte ad incrementare l'espressione di HGF endogeno potrebbero aprire nuovi orizzonti nella terapia delle malattie renali croniche.

### Test di verifica

#### 1) TGF- $\beta$ è una citochina con spiccata attività fibrogenica che agisce:

- Favorendo la proliferazione di podociti, cellule endoteliali e cellule epiteliali tubulari
- Inibendo le cellule mesangiali e i fibroblasti con ridotta produzione di matrice extracellulare
- Inducendo dedifferenziazione di cellule epiteliali in cellule mesenchimali
- Aumentando la produzione di collagene stimolando le metalloproteasi
- Inducendo vasocostrizione.

#### 2) Bcl-2 e Bax sono due proteine omologhe che agiscono sulla crescita e sopravvivenza cellulare: in che modo?

- Bax inibisce l'apoptosi mentre Bcl-2 agisce da fattore proapoptotico
- Bcl-2 inibisce l'apoptosi mentre Bax agisce da fattore proapoptotico
- Bax e Bcl-2 agiscono da fattori pro-apoptotici
- Bax stimola la mitosi
- Bcl-2 blocca le cellule in fase G1.

#### 3) In cellule epiteliali tubulari, HGF presenta un effetto antifibrotico se le cellule sono in diversa fase proliferativa:

- L'effetto antifibrotico è presente solo nelle cellule quiescenti
- L'effetto antifibrotico con riduzione di TGF- $\beta$ , TIMP-1 e TIMP-2 e aumento di MMP-2 e MMP-9 è presente solo nelle cellule in mitosi
- Le cellule quiescenti mostrano aumento di TIMP-1, TIMP-2 e diminuzione delle metallo-proteasi
- L'effetto antifibrotico è presente solo in cellule in mitosi
- L'aumento di espressione di TIMP-1 e TIMP-2 è associata a aumento della proliferazione.

La risposta corretta alle domande sarà disponibile sul sito internet [www.sin-italy.org/gin](http://www.sin-italy.org/gin) e in questo numero del giornale cartaceo dopo il Notiziario SIN

## Riassunto

*Hepatocyte Growth Factor* (HGF) è un polipeptide multifunzionale che possiede un effetto mitogeno, motogeno e morfogenetico. Questi effetti sono mediati dal legame con il recettore specifico *c-met* presente su quasi tutte le cellule renali. HGF ha un ruolo centrale nel corso dell'embriogenesi perchè permette la differenziazione delle cellule mesenchimali in cellule epiteliali tubulari. Inoltre induce la tubulogenesi e l'angiogenesi. Numerosi lavori hanno dimostrato che HGF accelera la ripresa funzionale in corso di insufficienza renale acuta (IRA) tossico-ischemica. Questo effetto sembra mediato da una inibizione dell'apoptosi e da una aumentata sopravvivenza cellulare. L'inibizione dell'apoptosi indotta da HGF è probabilmente secondaria alla aumentata espressione del protooncogene Bcl-2 e alla riduzione di Bax. HGF è in grado di modulare il *turnover* della matrice extracellulare. Per questo motivo è stato ipotizzato un suo ruolo nei processi di rimodellamento tessutale e soprattutto nel danno renale cronico. Numerosi studi hanno dimostrato che HGF è in grado di ridurre la fibrosi intersti-

ziale e la sclerosi glomerulare in modelli *in vivo* ed *in vitro*. Questo effetto è secondario all'azione antagonistica di HGF nei confronti di TGF- $\beta$ , una citochina ad azione fibrogenica. L'effetto antifibrotico di HGF sembra mediato da una aumento della produzione di metalloproteasi e da una riduzione degli inibitori specifici di queste proteasi. HGF inoltre sarebbe in grado di inibire l'effetto di TGF- $\beta$  bloccando l'asse TGF- $\beta$ /*Smad*. Infine l'effetto antifibrotico di HGF potrebbe essere modulato dallo stato delle cellule *target*.

HGF è un fattore antifibrotico che potrebbe aprire nuovi orizzonti terapeutici nel trattamento delle malattie renali croniche.

Indirizzo degli Autori:

Prof. Ciro Esposito  
U.O. di Nefrologia, Dialisi e Trapianto  
IRCCS Policlinico San Matteo  
Università di Pavia  
P.le Golgi, 2  
27100 Pavia  
e-mail: espositociro56@hotmail.com

## Bibliografia

1. Nakamura T, Teramoto H, Ichihara A. Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1986; 83: 6489-93.
2. Roos F, Ryan AM, Chamow SM, Bennett GL, Schwall RH. Induction of liver growth in normal mice by infusion of hepatocyte growth factor/scatter factor. *Am J Physiol* 1995; 268: G380-G386.
3. Brinkmann V, Foroutan H, Sachs M, Weidner KM, Birchmeier W. Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells. *J Cell Biology* 1995; 131: 1573-86.
4. Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 639-44.
5. Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature (Lond)* 1987; 327: 238-42.
6. Naldini L, Vigna E, Narsimhan R, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene *c-met*. *Oncogene* 1991; 6: 501-4.
7. Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, et al. A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 1994; 77: 261-71.
8. Grobstein C. Trans-filter induction of tubules in mouse metanephrogenic mesenchyme. *Exp Cell Res* 1956; 10: 424-40.
9. Woolf AS, Kolatsi-Joannou M, Hardman P, et al. Role of hepatocyte growth factor/scatter factor and the met receptor in the early development of the metanephros. *J Cell Biol* 1995; 128: 171-84.
10. Weidner KM, Sachs M, Birchmeier W. The MET receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J Cell Biol* 1993; 121: 145-54.
11. Santos OF, Barros EJ, Yang XM, et al. Involvement of hepatocyte growth factor in kidney development. *Dev Biol* 1994; 163: 525-9.
12. Liano F. Severity of acute renal failure: The need of measurement. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9: 229-38.
13. Libetta C, Rampino T, Esposito C, Fornoni A, Semeraro L, Dal Canton A. Stimulation of hepatocyte growth factor in human acute renal failure. *Nephron* 1998; 80: 41-5.
14. Nagano T, Mori-Kudo I, Tsuchida A, Kawamura T, Taiji M, Noguchi H. Ameliorative effect of hepatocyte growth factor on glycerol-induced acute renal failure with acute tubular necrosis. *Nephron* 2002; 1: 730-8.
15. Yamasaki N, Nagano T, Mori-Kudo, et al. Hepatocyte growth factor protects functional and histological disorders of HgCl<sub>2</sub>-induced acute renal failure mice. *Nephron* 2002; 90: 195-205.
16. Liu Y. Hepatocyte growth factor promotes renal epithelial cell survival by dual mechanism. *Am J Physiol* 1999; 277: F624-F633.
17. Bush KT, Tsukamoto T, Nigam SK. Selective degradation of E-cadherin and dissolution of E-cadherin-catenin complexes in epithelial ischemia. *Am J Physiol* 2000; 278: F847-F852.
18. Rong S, Segal S, Anver M, Resau JH, Vande Woude GF. Invasiveness and metastasis of NIH 3t3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4731-5.
19. Takayama H, Larochele WJ, Sabnis SG, et al. Renal tubular hyperplasia, polycystic disease and glomerulosclerosis in transgenic mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Lab Invest* 1997; 77: 131-8.
20. Esposito C, Fuiano G, Dal Canton A. Endothelial cells. In: Tetta C ed. *Immunopharmacology of the renal system*. Acad Press Limited, London 1993; 35-48.
21. Lenz O, Striker LJ, Jacot TA, Elliot SJ, Killen PD, Striker GE. Glomerular endothelial cells synthesize collagen but little gelatinase A and B. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 2040-8.
22. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267:

- 10931-4.
23. Esposito C, Foschi A, Fasoli G, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) modula il ricambio della matrice extracellulare in colture di cellule endoteliali umane. *G Ital Nefrol* 2000; 17: 27-31.
  24. Dobbie JW. Pathogenesis of peritoneal fibrosing syndrome (sclerosing peritonitis) in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 1992; 12: 14-27.
  25. Rampino T, Cancarini G, Gregorini M, et al. Hepatocyte growth factor/scatter factor released during peritonitis is active on mesothelial cells. *Am J Pathol* 2001; 159: 1275-85.
  26. Branton MH, Kopp JB. TGF- $\beta$  and fibrosis. *Microbes and infection* 1999; 1: 1349-65.
  27. Mizuno S, Matsumoto K, Kurosawa T, Mizuno-Horikawa Y, Nakamura T. Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor- $\beta$ 1 in renal fibrosis in mice. *Kidney Int* 2000; 57: 937-48.
  28. Mizuno S, Matsumoto K, Nakamura T. Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2001; 59: 1304-14.
  29. Inoue T, Okada H, Kobayashi T, et al. Hepatocyte growth factor counteracts transforming growth factor- $\beta$ 1, through attenuation of connective tissue growth factor induction, and prevent renal fibrogenesis in 5/6 nephrectomized mice. *FASEB J* 2003; 17: 268-72.
  30. Gao X, Mae H, Ayabe N, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy retards the progression of chronic obstructive nephropathy. *Kidney Int* 2002; 62: 1238-48.
  31. Yang J, Liu Y. Delayed administration of hepatocyte growth factor reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F349-F357.
  32. Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 96-107.
  33. Yang J, Dai C, Liu Y. Hepatocyte growth factor suppresses renal interstitial myofibroblast activation and intercepts *Smad* signal transduction. *Am J Pathol* 2003; 163: 621-32.
  34. De Caestecker MP, Parks WT, Frank CJ, et al. Smad2 transduces common signal from receptor serine-threonine and tyrosine kinases. *Genes Dev* 1998; 12: 1587-92.
  35. Liu Y. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanism of action. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: F7-F16.
  36. Esposito C, Parrilla B, De Mauri A, et al. Hepatocyte growth factor (HGF) modulates matrix turnover in human glomeruli. *Kidney Int* 2005; 67: 2143-50.
  37. He CJ, Striker LJ, Tsokos M, Yang CW, Peten EP, Striker GE. Relationships between mesangial cell proliferation and types I and IV collagen mRNA levels in vitro. *Am J Physiol* 1995; 269: C554-C562.
  38. Esposito C, Parrilla B, Fasoli G, et al. HGF antifibrogenic effect on quiescent renal tubular epithelial cells (HK-2) is mediated by *Smad*-corepressor SnoN. *Nephrol Dial Transpl* 2005; 20: 208.