

阿托伐他汀对单侧输尿管梗阻大鼠肾小管间质过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 表达的影响

刘斌 陈明 彭红霞 张超 欧三桃

【摘要】 目的 观察阿托伐他汀对单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠肾小管间质过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)表达的影响。方法 将 45 只大鼠随机均分为假手术组、模型组及阿托伐他汀组(阿乐组),后两组行左侧输尿管结扎术。阿乐组术前 3 d 开始给予阿托伐他汀($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃,其余两组予等量生理盐水灌胃。术后 5、10 和 15 d 分别处死各组 5 只大鼠,取左肾行苏木素-伊红(HE)和 Masson 染色,动态观察肾脏病理改变,并用免疫组化方法检测肾小管间质中 PPAR γ 的动态表达。结果 组织病理学显示,模型组呈现进行性肾小管间质面积增宽,纤维化程度加重。假手术组 PPAR γ 主要表达于内髓集合管;模型组 PPAR γ 表达则位于肾小管上皮细胞,半定量分析显示 UUO 后 5 d PPAR γ 已经明显增高,梗阻后 10 d 达到峰值,15 d PPAR γ 已降低,但仍高于假手术组(P 均 <0.01)。阿乐组肾小管间质中 PPAR γ 表达较同期模型组明显增加(P 均 <0.01)。结论 UUO 模型大鼠肾小管间质 PPAR γ 的表达量增加,并在肾小管部位出现 PPAR γ 的表达;阿托伐他汀可增加 PPAR γ 的表达,从而改善肾小管间质纤维化。

【关键词】 纤维化,肾间质; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; 阿托伐他汀

Effects of atorvastatin on expression of peroxisome proliferation activated receptor γ in unilateral ureteral obstruction in rats LIU Bin, CHEN Ming, PENG Hong-xia, ZHANG Chao, OU San-tao. Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan, China
Corresponding author: CHEN Ming (Email: chenming6699@yahoo.com.cn)

【Abstract】 **Objective** To observe the expression of peroxisome proliferation activated receptor γ (PPAR γ) at different periods in renal interstitium and to study the effect of atorvastatin on the protein expression of PPAR γ in unilateral ureteral obstruction (UUO) in a rat model. **Methods** Forty-five female Sprague-Dawley (SD) rats were divided into three groups: the sham operation group, the model group and the atorvastatin group. The latter two groups underwent UUO and then received vehicle only or atorvastatin ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) by daily gastric gavage, from three days before the UUO operation to the day of sacrifice. The sham operation rats received vehicle. Five rats of each group were sacrificed respectively at 5, 10 and 15 days after surgery. Histological changes in renal tissue were observed by hematoxylin and eosin (HE) and Masson stain. Immunohistochemistry for PPAR γ was performed in renal interstitium at each time point. **Results** Interstitial expansion and fibrosis in ureter obstructed kidney was prominent in the model group. Atorvastatin seemed to have ameliorated interstitial expansion and fibrosis in atorvastatin group. Detectable basic PPAR γ expression was observed in renal inner medulla of rats in sham operation group, and it was mainly concentrated in collecting tubules. In UUO rats, PPAR γ expression was found increased and extended to renal tubular epithelial cells. Increased PPAR γ expression was found on the 5 th day after UUO, and significant PPAR γ expression was found on the 10 th day after UUO. The increased PPAR γ expression was found to be downregulated on the 15 th day after UUO, but still significantly increased compared with that of the model group at the same time point (all $P < 0.01$). Atorvastatin could significantly increase the expression of PPAR γ as compared with the model group at each time point (all $P < 0.01$). **Conclusion** PPAR γ expression was found increased, and it appeared in renal tubular epithelial cells in UUO rats, Atorvastatin may play a protective role in the kidney by activating PPAR γ , thus alleviating renal interstitial fibrosis following UUO in rat.

【Key words】 renal interstitium fibrosis; peroxisome proliferation activated receptor γ ; atorvastatin

肾小管间质纤维化是所有慢性肾脏疾病进展至

终末期肾功能衰竭的共同通路,肾小管间质炎症及纤维化病变程度是反映肾功能下降严重程度和判断预后最重要的指标^[1-2]。如何防治肾小管间质纤维化的进展是目前的研究热点之一。研究发现,活化的过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)具有调节慢性炎症和减轻慢性纤维化的作用^[3],但 PPAR γ 在肾小管间质纤维化的进程中扮演着什么角色尚不完

基金项目:四川省教育厅重点课题资助项目(2004A068)

作者单位:646000 四川省泸州医学院附属医院肾内科、泸州医学院肾功能保护研究室

通讯作者:陈明,教授(Email:chenming6699@yahoo.com.cn)

作者简介:刘斌(1973-),男(汉族),四川省人,医学硕士,主治医师(现于四川乐山市第二人民医院肾内科工作)。

全清楚,值得进一步研究。为此,我们选择单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠模型为研究对象,给予阿托伐他汀处理,观察 UUO 大鼠肾小管间质的病理改变及 PPAR γ 表达的动态变化,进一步了解阿托伐他汀能否通过调节 PPAR γ 途径达到抗肾小管间质纤维化。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂:阿托伐他汀钙片(阿乐)购自北京红惠生物制药股份有限公司,兔抗大鼠 PPAR γ 多克隆抗体购自武汉博士德生物制品公司,链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 动物模型及实验分组:清洁级 SD 大鼠 45 只,体重 130~160 g,由泸州医学院动物实验中心提供。适应性饲养 1 周后按随机数字表法均分为假手术组、UUO 模型组(模型组)、阿托伐他汀钙片治疗组(阿乐组)。后两组参照文献^[3]行左侧输尿管完全梗阻术;假手术组仅游离输尿管,不结扎。从术前 3 d 开始,阿乐组用阿托伐他汀 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹混悬于 1 ml 生理盐水中灌胃,模型组及假手术组予等量生理盐水灌胃,每日 1 次。于术后 5、10 和 15 d 每组取 5 只大鼠处死,取左肾,用体积分数为 4% 的多聚甲醛中固定,包埋,制备成 3 μ m 厚的石蜡切片备用。

1.3 肾小管间质病理学观察:取左肾组织常规行苏木素-伊红(HE)、Masson 染色,观察肾小管间质病理变化。400 倍光镜下,每张切片随机选 10 个不含肾小球的视野观察其病理损害。肾小管间质病变由 3 个参数判定(小管扩张,肾小管上皮细胞水肿、变性、坏死;间质炎性细胞浸润;间质纤维化的程度),每个参数按 0~3 分评定(0 分为正常;1 分为轻度受损,病变范围 < 15%;2 分为中度受损,病变范围 15%~50%;3 分为重度受损,病变范围 \geq 50%)^[4]。

1.4 UUO 大鼠肾小管间质 PPAR γ 免疫组化检测:兔抗大鼠 PPAR γ 多克隆抗体为 1:100,采用 SABC 法检测左肾组织中的 PPAR γ 表达,操作步骤按 SABC 试剂盒说明书进行。在高倍镜(\times 400)下,每张切片随机选 10 个肾小管间质视野,计数每个视野总的细胞数和阳性细胞数,折算成每 100 个总细胞数中的阳性细胞数,阳性细胞染色程度按切片中大多数细胞染色深度分 1~3 分^[5]。各指标阳性表达程度根据表达部位,以阳性细胞数及阳性细胞染色程度两个参数之积作为半定量分析的结果。

1.5 统计学处理:计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,使用 SPSS11.5 统计软件包作统计学分析,方差齐性用 F 检验,多组间比较采用方差分析, $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾小管间质病理学改变(表 1):HE 和 Masson 染色结果显示,假手术组肾小管结构正常,肾小管间质无面积增宽。模型组术后 5 d 出现肾小管间质增宽,伴有少量炎性细胞浸润及胶原沉积;术后 10 d 可见肾小管间质增宽,肾小管结构破坏,管腔塌陷,炎性细胞浸润,胶原成分增加;术后 15 d 可见肾小管间质损伤程度明显加重,胶原沉积明显增多。阿乐组肾小管间质损伤程度较同期模型组有所减轻($P < 0.05$),胶原沉积较同期模型组减少。

表 1 各组大鼠肾小管间质损伤的病理学改变($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 1 Pathematological changes of renal interstitium in experimental rats($\bar{x}\pm s, n=5$) 分

组别	术后 5 d	术后 10 d	术后 15 d
假手术组	0.21 \pm 0.08	0.22 \pm 0.05	0.22 \pm 0.05
模型组	3.19 \pm 0.27*	4.88 \pm 0.41*	6.13 \pm 0.39*
阿乐组	2.48 \pm 0.41**	3.74 \pm 0.61**	4.97 \pm 0.53**

注:与假手术组同期比较:* $P < 0.01$;与模型组同期比较:** $P < 0.05$

2.2 肾小管间质中 PPAR γ 的表达(表 2,彩色插图 1,图 2):假手术组 PPAR γ 主要表达于内髓集合管,其次少量分布在肾小球与肾微血管,主要位于细胞的胞浆中。模型组 PPAR γ 的阳性着色主要位于肾小管上皮细胞,胞浆及胞核均有明显着色。术后 5 d PPAR γ 表达已经开始增高,10 d 达到峰值,术后 15 d PPAR γ 表达有所下降,但仍高于假手术组(P 均 < 0.01)。阿乐组术后 5 d PPAR γ 表达已明显增高,10 d 达到峰值,术后 15 d PPAR γ 表达已下降,但均高于同期模型组(P 均 < 0.01)。

表 2 各组大鼠肾小管间质 PPAR γ 的动态表达($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Expression of PPAR γ in renal interstitium by immunohistochemistry stain($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	术后 5 d	术后 10 d	术后 15 d
假手术组	1.55 \pm 0.28	1.75 \pm 0.25	1.56 \pm 0.29
模型组	15.84 \pm 1.42*	33.13 \pm 2.72*	16.24 \pm 1.93*
阿乐组	21.61 \pm 1.78**	42.47 \pm 2.72**	23.36 \pm 2.56**

注:与假手术组同期比较:* $P < 0.01$;与模型组同期比较:** $P < 0.01$

3 讨论

PPARs 属于由配体激活的 I 型核受体超家族成员,在两栖类、啮齿类和人类 PPARs 均有 3 种异构形式,即 α 、 β 及 γ 。研究发现 PPARs 的作用非常广泛,不仅参与脂肪细胞的分化、成熟和脂肪代谢,还存在于多种免疫活性细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞和肿瘤细胞中,并具有抗炎、抗增生和抗肿瘤作用,参与糖尿病、肥胖、动脉粥样硬化、肾脏纤维化等

多种疾病的病理生理过程^[3]。

研究表明 PPAR γ 具有调节炎症和减轻纤维化的作用。Hinze 等^[6]发现,人外周血单核细胞在佛波脂刺激下上清液中某些细胞因子,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)和 IL-6 水平明显增加,加入 PPAR γ 配基,如 15-脱氧前列腺素 J2 (15d-PGJ2)、胰岛素增敏剂(TZDs)或非甾体消炎镇痛药(NSAIDs)均可大大降低上述炎症因子水平,并可抑制巨噬细胞表达诱生型一氧化氮合酶(iNOS)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和 A 型清道夫受体,提示激活 PPAR γ 具有抗炎效应。有研究发现,给糖尿病肾小球硬化大鼠使用 PPAR γ 协同剂曲格列酮后,成纤维细胞生长因子- β 1(TGF- β 1) mRNA 表达减少,而对照组 TGF- β 1 mRNA 表达增加^[7],提示 PPAR γ 具有减轻肾脏纤维化的作用。本实验结果显示,PPAR γ 在假手术组主要表达于内髓集合管上皮细胞,而在 UUO 肾脏中 PPAR γ 表达位置却发生改变,以肾小管上皮细胞为主的表达增加。由于 UUO 模型主要表现为肾小管上皮细胞受损,说明肾小管上皮细胞在损伤情况下 PPAR γ 表达增强。由此推测在肾小管上皮细胞损伤状态下,PPAR γ 表达增强可能是机体保护性反应,使之易于被内源性配体如前列腺素源性物质、脂肪酸等活化,对抗肾实质细胞损伤及继发性的间质成纤维细胞增生和炎症反应等。同时本实验结果也提示,术后 5 d 就出现肾小管上皮细胞 PPAR γ 高表达,10 d 表达最多,而 15 d 出现 PPAR γ 表达下降,说明 PPAR γ 在 UUO 模型中的表达上调具有一定时限性,这可能与内源性配体局部浓度的反馈性调节及损伤因素和抗损伤因素动态平衡趋势有关。即使在 UUO 初期肾小管上皮细胞受损,应激性 PPAR γ 增高,但随着 UUO 的发展,肾小管上皮细胞萎缩,肾小管间质纤维化进展使产生 PPAR γ 的肾固有细胞减少,从而导致 PPAR γ 表达下降。进而提示可能应在肾小管间质纤维化早期使用活化 PPAR γ 的药物干预,而在 UUO 后 15 d 应用可能效果欠佳。

他汀类降脂药是细胞内胆固醇合成限速酶即三羟甲基甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂,研究提示,他汀类药物具有非降脂的肾脏保护作用,其可能机制包括调节细胞增殖/凋亡平衡、细胞因子的产生及细胞内信号转导通路等^[8]。我们的前期实验表明,阿托伐他汀通过抑制 UUO 大鼠肾小管间质中胶原 I (Col I)、Col IV、纤维连结蛋白(FN)等细胞外基质(ECM)的沉积,抑制 TGF- β 1

和金属蛋白酶组织抑制剂-1(TIMP-1)的表达,从而有效抑制了肾小管间质纤维化的进展^[9]。但阿托伐他汀抗肾小管间质纤维化的具体机制并不完全清楚。Ishibashi 等^[10]的研究发现,他汀类药物激活 PPAR γ 能够抑制内皮细胞单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)以及化学因子受体 2(CCR2)的表达,从而抑制单核细胞和 T 淋巴细胞的黏附和募集。有学者报道,普伐他汀和阿托伐他汀可以通过上调 PPAR γ 的表达而抑制单核细胞炎症介质的释放从而达到抗炎作用^[11]。本实验结果提示,阿乐组肾小管间质中 PPAR γ 较假手术组明显增加,且较同期模型组的增加程度更加明显,即 PPAR γ 在阿托伐他汀处理后表达上调,这可能是阿托伐他汀抗 UUO 大鼠肾小管间质纤维化的一种重要机制。

参考文献:

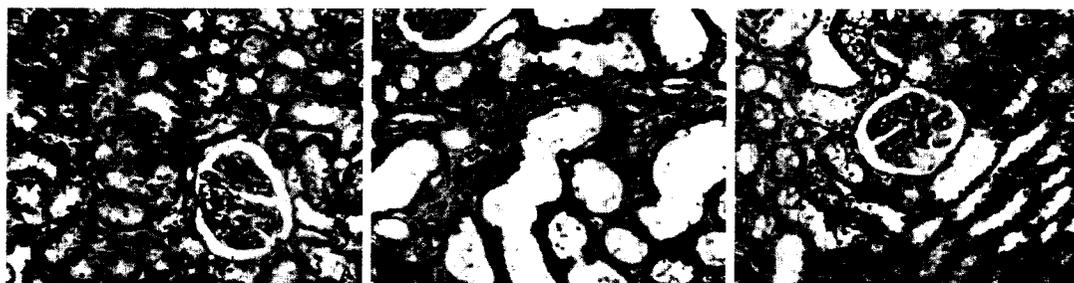
- Zafiriou S, Stanners S R, Polhill T S, et al. Pioglitazone increases renal tubular cell albumin uptake but limits proinflammatory and fibrotic responses[J]. *Kidney Int*, 2004, 65(5):1647-1653.
- 阳晓,魏毅,叶任高,等.依那普利对大鼠肾细胞外基质蓄积的作用观察[J]. *中国危重病急救医学*, 2000, 12(4):198-201.
- Guan Y F, Breyer M D. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease[J]. *Kidney Int*, 2000, 60(1):14-30.
- 薛痕,樊均明,陈亮,等.大鼠肾间质纤维化动物模型的实验研究[J]. *四川动物*, 2004, 23(1):16-20.
- 陶立坚,孙剑,金鸥,等. p27 在单侧输尿管结扎大鼠肾间质纤维化模型中的表达[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2004, 29(1):58-60.
- Hinze B, Brune K, Pahl A. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 inhibits the expression of proinflammatory genes in human blood monocytes via a PPAR-gamma-independent mechanism[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 302(2):415-420.
- Panchapakesan U, Sumual S, Pollock C A, et al. PPAR gamma agonists exert antifibrotic effects in renal tubular cells exposed to high glucose[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 289(5):F1153-1158.
- 郭汉林,靳建旭,李晓阳,等.阿托伐他汀对老年血脂异常的调脂及非调脂作用[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2005, 12(1):51-53.
- 陈明,欧三桃.阿托伐他汀对单侧输尿管梗阻大鼠肾小管间质纤维化的影响[J]. *中华肾脏病杂志*, 2005, 21(1):30.
- Ishibashi M, Egashira K, Hiasa K, et al. Antiinflammatory and antiarteriosclerotic effects of pioglitazone[J]. *Hypertension*, 2002, 40(5):687-693.
- Chana R S, Lewington A J, Brunskill N J. Differential effects of peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPAR gamma) ligands in proximal tubular cells: thiazolidinediones are partial PPAR gamma agonists[J]. *Kidney Int*, 2004, 65(6):2081-2090.

(收稿日期:2007-05-17 修回日期:2007-11-30)

(本文编辑:李银平)

还原型谷胱甘肽对单侧输尿管梗阻大鼠羟脯氨酸及氧化应激反应的影响

(正文见735页)



注: A: Sham组; B: UUO组; C: GSH组

图1 各组大鼠肾脏病理学改变(HE, ×200)

Figure 1 Pathological changes of kidney of rats in each group (HE, ×200)



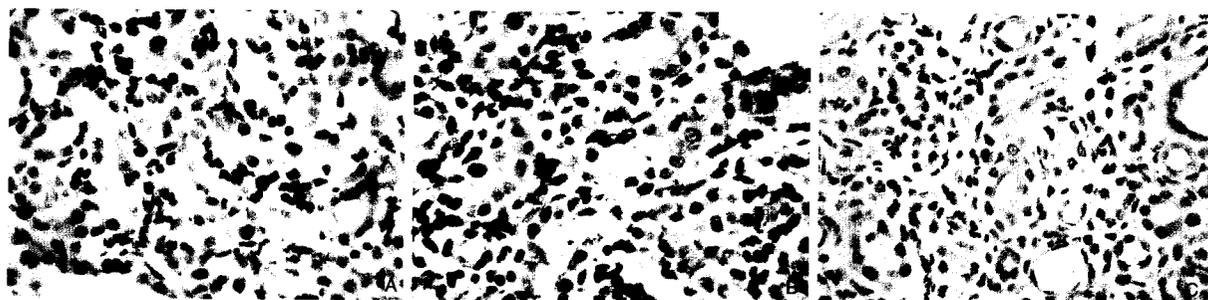
注: A: Sham组; B: UUO组; C: GSH组

图2 各组大鼠肾脏病理学改变(Masson, ×200)

Figure 2 Pathological changes of kidney of rats in each group (Masson, ×200)

阿托伐他汀对单侧输尿管梗阻大鼠肾小管间质过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 表达的影响

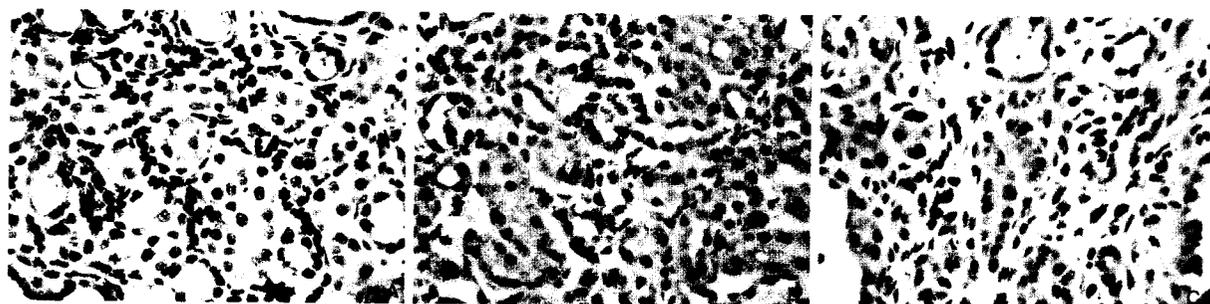
(正文见739页)



注: A: 术后5 d; B: 术后10 d; C: 术后15 d

图1 模型组大鼠肾小管间质PPAR γ 表达变化(SABC, ×400)

Figure 1 Expression of PPAR γ in renal interstitium by immunohistochemistry statin in model group(SABC, ×400)



注: A: 术后5 d; B: 术后10 d; C: 术后15 d

图2 阿乐组大鼠肾小管间质PPAR γ 表达变化(SABC, ×400)

Figure 2 Expression of PPAR γ in renal interstitium by immunohistochemistry statin in atorvastatin group(SABC, ×400)