

· 基础研究 ·

MMP-2、MMP-3、TIMP-1 及氯沙坦与氨氯地平在老年前期 自发性高血压大鼠肾硬化中的作用及其机理探讨

康熙梅 牟善初 张晓英 康秋风

【摘要】 目的 探讨 MMPs/TIMPs 与高血压性肾损害的关系。方法 将 SHR 随机分为 3 组, 每组 10 只。氨氯地平 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 或氯沙坦 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 治疗 3 个月, 为实验组; 以模型 SHR 为空白对照组。同时以 10 只 WKY 大鼠为健康对照组。测量治疗前、后血压变化, 血尿素氮、肌酐和 24 h 尿蛋白定量, 观察 IV 型胶原 (CoIV)、层连蛋白 (LM)、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶-3 (MMP-3)、基质金属蛋白酶抑制剂-1 (TIMP-1) 在肾组织中的表达。结果 ①SHR 血压显著增高; 肾功能明显受损; 肾组织病理改变显著。肾小球细胞外基质 (ECM) 成分 (如: CoIV、LM) 及 TIMP-1 表达增多; MMP-3、MMP-2 表达减少; ②治疗后, 血压明显降低; 肾功能损害减缓; 肾组织病理改变减轻。肾组织中 CoIV、LM、TIMP-1 表达减少; MMP-3、MMP-2 表达增多。结论 氯沙坦与氨氯地平能延缓高血压性肾损害, 改善已失调的 MMPs/TIMPs 比例; 减少 ECM 在肾小球中的聚积, 具有延缓高血压性肾硬化的作用。

【关键词】 大鼠, 自发性高血压; 肾损害; 基质金属蛋白酶; 基质金属蛋白酶抑制剂-1; 氯沙坦; 氨氯地平

MMP-2, MMP-3 and TIMP-1 in glomerular sclerosis of SHR and mechanism of delaying glomerular sclerosis by treatment with losartan and amlodipine

KANG Zhaomei, MU Shanchu, Zhang Xiaoying, KANG Qiufeng

Department of Geriatric Nephrology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

【Abstracts】 Objective To study the role of MMP-2, MMP-3 and TIMP-1 in glomerular sclerosis of spontaneously hypertensive rats (SHR) and to study the renal protective effect of losartan and amlodipine on SHR. Methods After the treatment with losartan ($30 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$) and amlodipine ($10 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$) for 3 months, the blood pressure (BP), urine protein (UP), the renal pathological lesions, and the expression of collagen IV (CoIV), laminin (LM), matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 in the SHR and Wistar-Kyoto (WKY) rats (control) were studied. Results Losartan and amlodipine not only reduced BP, 24h UP and renal injuries, but also significantly decreased the expression of CoIV and LM, modulated MMPs/TIMPs and ameliorated glomerular sclerosis in SHR. Conclusions The modulating effect of losartan and amlodipine on the ratio between MMPs and TIMPs and on the extracellular matrix (ECM) metabolism through the direct and indirect pathways may be one of the therapeutic mechanisms of ATRA and CCB in ameliorating glomerular sclerosis.

【Key words】 SHR; injury, renal; matrix metalloproteinases; losartan; amlodipine

高血压性肾硬化 (hypertension nephropathy sclerosis, HNS) 是老年终末期肾病的主要原因之

—^[1], 其发病机理不仅与血管活性物质 (如血管紧张素 II、内皮素等) 有关, 而且可能与基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs)、基质金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs) 及 MMPs/TIMPs 的比值密切相关^[2-7]。HNS 的主要病理变化是肾小球硬化, 肾小球硬化的主要病理特征是肾小球系膜细胞增殖及系膜增厚。其主要原因是由于细胞外基质 (extracellular matrix,

作者单位: 100853 北京, 解放军总医院营养科 (康熙梅, 牟善初, 张晓英); 032000 介休, 山西省介休市汾西矿务局总医院骨科 (康秋风)

作者简介: 康熙梅, 女, 医学硕士, 主治医师

通讯作者: 康熙梅, 电话: 010-66937443

ECM)堆积所致。ECM 堆积由 ECM 产生增多和(或)降解减少引起^[2-7]。近年来发现肾组织 ECM 降解系统,尤其 MMPs 及其组织抑制因子 TIMPs 功能紊乱与 ECM 过多堆积关系更为密切^[5-7]。为探讨 MMPs、TIMPs 与 HNS 之间的关系,作者选择血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂(angiotensin Ⅱ receptor antagonist, ATRA)氯沙坦(losartan)、钙通道阻滞剂(calcium channel blockade, CCB)氨氯地平(amlodipine)对 13 月龄自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)治疗 3 个月,以同龄 WKY(Wistar-Kyoto)大鼠为健康对照;旨在通过测定治疗前后大鼠的血压变化、测定血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐(serum creatinine, Scr)和 24 h 尿蛋白(proteinuria, UP)定量,观察Ⅳ型胶原(collagen Ⅳ, CoⅣ)、层连蛋白(laminin, LM)、基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-3、基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIM-1)在肾组织中的表达。拟寻找一条延缓高血压性肾硬化更为有效的治疗措施。现将实验结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 将 30 只 13 月龄 SHR,雌性 12 只,体重(210±10)g;雄性 18 只,体重(360±20)g;随机分为 3 组:SHR 模型组、氯沙坦(默沙东药厂赞助)与氨氯地平(辉瑞制药厂)治疗组各 10 只。同时以同龄 WKY 大鼠 10 只为健康对照组,体重:雌性(220±15)g、雄性(365±25)g。实验动物购自北京阜外医院动物中心。

1.2 实验方法 从 13 月龄始采用灌胃法,氯沙坦剂量为 30 mg·kg⁻¹·d⁻¹,氨氯地平剂量为 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹治疗,时间为 3 个月。SHR 模型组及 WKY 健康对照组灌以等量饮用水。

采用大鼠尾动脉血压测定仪(KN-210,日本),测量大鼠实验 0、6、12 周血压各 3 次,取其平均值。将大鼠分别置代谢笼中,于实验 0、12 周禁食,只予以饮水,留取 24 h 尿,记尿量,取 1ml 送本院临检科,用 Array ⑧ 360 System CE 型尿蛋白测定仪测 24 h UP;另取 2 ml 尿测〔7150 自动生化分析仪(Hitachi,日

本〕尿肌酐(Ucr);抽取动脉血 2 ml 低温高速离心(3 000r/min,10 min)后取上清液与 2 ml 尿送本院生化科,用 7150 自动生化分析仪测定 BUN、Scr 并计算出肌酐清除率(creatinine clearance rate, Ccr)。

12 周后将大鼠用乙醚麻醉,摘取肾脏,剥去肾包膜,置 4%多聚甲醛液中固定备用,制石蜡切片(厚 4 μm)。HE 常规染色,光镜下观察病理变化。用超敏 S-P 法,滴加 MMP-2、MMP-3、TIMP-1、CoⅣ、LM 单克隆抗体,行免疫组化染色,观察它们在肾组织中的表达。以人肺癌、肝癌组织中的 MMP-2、MMP-3、TIMP-1 的表达为阳性,以免疫组化染色过程中不滴加一抗为阴性对照。在同一光强度,预先未知分组的条件下读片,采用 Monika 等^[8]及 Razzaque 等^[9]建立的半定量方法,对 MMP-2、MMP-3、TIMP-1、CoⅣ、LM 在肾组织中的表达强度评分:无表达为“-”,弱表达为“+”,中等表达为“++”,中强表达为“+++”,强表达为“++++”。

1.3 实验数据计算及统计学分析 符合正态分布的计量资料以均数±标准差表示,组间比较用 *t* 检验,等级资料比较用 Riddit 分析。以 *P*<0.05 表示显著性差异,以 *P*<0.01 表示极显著性差异。各统计资料在计算机下用 EXCEL 软件进行。

2 结果

2.1 药物治疗前、后大鼠血压的变化 见表 1。

2.2 药物治疗前、后大鼠 24 h UP 的变化 见表 2。

2.3 药物治疗前、后大鼠 Scr、BUN 及 Ccr 的变化 见表 3。

2.4 药物对大鼠肾组织病理结构的影响

2.4.1 光镜检查 与健康组相比,模型组肾小球萎缩,代偿性肥大明显增多;肾小管浑浊肿胀,基底膜增厚并可见蛋白管型;肾间质炎性细胞浸润,间质纤维化;肾组织内弓形动脉、叶间小动脉、入球小动脉管壁增厚,管腔狭窄,可见玻璃样变。肾小球系膜细胞增生,系膜基质增厚粘连,呈局灶性节段性硬化。氯沙坦组、氨氯地平组上述病理改变明显减轻,接近健康组大鼠的肾组织结构。说明氯沙坦与氨氯地平

表 1 实验 0、6、12 周大鼠尾动脉血压及 12 周与 0 周脉压差比较(mmHg)

组 别	动物(n)	实验 0 周	6 周	12 周	12 周与 0 周比
健康大鼠组	6	125±13	125±16	128±13	+3.5±0.2
模型组	7	179±13*	182±13*	185±14*	+5.7±1.4
氨氯地平组	9	181±17*	162±14	137±8	-44±9 [#]
氯沙坦组	8	181±17*	158±14	134±8 [#]	-47±9 [#]

注: * *P*<0.05,与同期健康大鼠比较; [#] *P*<0.05,与模型组比较

对 SHR 均有延缓肾硬化的作用(图 1~4)。

表 2 治疗 0、12 周大鼠 24 h UP 水平(mg/d)比较

组 别	动物 (n)	0 周	12 周
健康大鼠组	6	0.50±0.14	0.54±0.14
模型组	7	1.21±0.34*	2.02±0.37* [△]
氨氯地平组	9	1.20±0.33*	1.03±0.18 [#]
氯沙坦组	8	1.20±0.24*	0.69±0.14 [#]

注: * $P<0.05$, 与同期健康大鼠比较; [#] $P<0.05$, 与同期模型组比较; [△] $P<0.05$, 与同组治疗前比较

2.4.2 免疫组化 见表 4。与健康组相比,SHR 模型组肾小球中 CoⅣ、LM 表达明显增多,差异有极显著性($P<0.01$)。治疗后,肾小球中 CoⅣ、LM 表达明显减少,差异有显著性($P<0.05$)。说明治疗后,肾小球中 ECM 堆积减轻,延缓了肾小球硬化的进展。

表 3 治疗前后大鼠血 Scr、BUN、Ccr 的水平($\mu\text{mol/L}$)

组 别	动物 (n)	治疗时间	BUN	Scr	Ccr
健康大鼠组	6	治疗前	6.58±1.52	50.31±4.34	0.94±0.14
	6	治疗后	6.83±1.17	50.45±4.84	0.88±0.11
模型组	7	治疗前	9.08±1.12	58.69±7.66	0.47±0.13*
	7	治疗后	9.94±1.37	62.63±7.00	0.35±0.14*
氨氯地平组	9	治疗前	9.10±1.41	59.45±10.35	0.46±0.10
	9	治疗后	8.13±1.62	57.27±9.35	0.43±0.11
氯沙坦组	8	治疗前	9.07±1.54	59.52±9.42	0.46±0.12
	8	治疗后	8.03±1.43	57.13±8.60	0.44±0.12

注: * $P<0.05$, 与同期健康大鼠比较

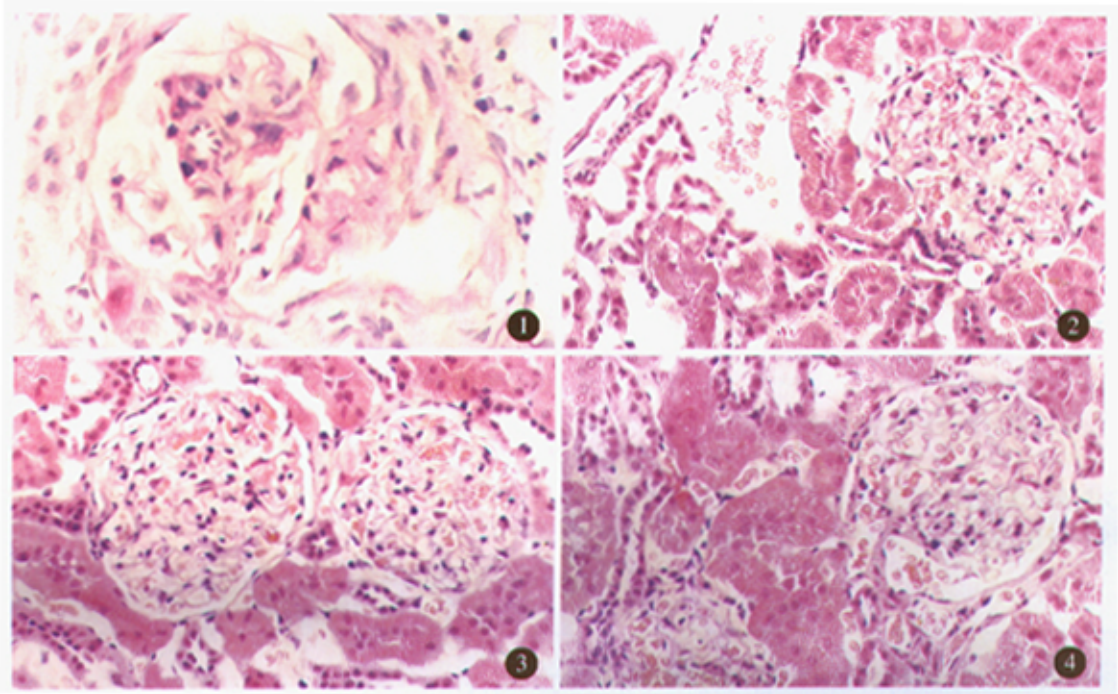


图 1 16 月龄模型组 大鼠肾小球系膜细胞增生,系膜基质聚集,毛细血管祥粘连,包曼囊增厚,呈局灶性硬化,PAS 染色($\times 400$)

图 2 16 月龄健康组 大鼠肾小球完好,入球小动脉管壁薄,腔圆。肾小管正常,叶间小动脉管壁正常,管腔通畅。HE 染色($\times 200$)

图 3 氨氯地平治疗 3 个月后 SHR 肾小球大小正常,无明显萎缩及代偿性肥大,入球小动脉基本正常,无硬化及玻璃样改变,肾小管浑浊肿胀明显减轻。HE 染色($\times 200$)

图 4 氯沙坦治疗 3 个月后 SHR 肾小球大小正常,无明显萎缩及代偿性肥大,入球小动脉基本正常,无硬化及玻璃样改变,肾小管浑浊肿胀明显减轻。HE 染色($\times 200$)

表 4 4 组大鼠肾小球中 CoⅣ、LM 表达的变化

组 别	CoⅣLM					LM				
	-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++
健康大鼠组	0	5	1	0	0	0	5	1	0	0
模型组**	0	0	0	1	6	0	0	0	2	5
氨氯地平组#	0	0	7	2	0	0	0	6	3	0
氯沙坦组#	0	0	6	2	0	0	0	6	2	0

注: ** $P < 0.01$, 与健康大鼠比较; # $P < 0.05$, 氨氯地平组、氯沙坦组分别与模型组比较

2.5 药物对 SHR 肾组织中 MMP-2、MMP-3、TIMP-1 表达的影响 用 MMP-2、MMP-3、TIMP-1 特异性抗体,对 SHR、WKY 大鼠肾组织进行免疫组化染色,结果见表 5。

3 讨 论

3.1 高血压对肾功能的损害及 MMP-2、MMP-3、TIMP-1 在肾硬化的作用 本实验选择 16 月龄 SHR(相当于人类老年前期)作为研究对象。结果表明,SHR 血压明显升高;24 h Up 排泄增加;肾功能降低;肾组织病理改变显著;肾小球中 CoⅣ、LM 及 TIMP-1 表达明显增多;MMP-3、MMP-2 表达明显减少(尤以 MMP-3 为著)。已形成肾小球 ECM 的堆积,存在肾小球硬化及肾小管-间质纤维化。证明长期的高血压状态确实可以引起肾功能损害,造成肾小球硬化。因此,降低血压与降低尿蛋白对延缓肾损害均具有意义^[10]。

CoⅣ及 LM 是构成 ECM 的主要成分,这些成分合成增加和(或)降解减少均可造成 ECM 在肾小球局部的聚集,ECM 聚集是造成肾小球硬化的直接原因^[4]。MMPs、TIMPs 功能紊乱及 MMPs/TIMPs 比例失调是造成 ECM 降解减少、ECM 堆积,导致肾小球硬化的主要原因^[2,7]。MMP-2 即明胶酶-A(CoⅣ酶)、MMP-3 即基质溶解素-1,活化后都具有降解 CoⅣ与 LM 等多种 ECM 成分的作用^[4,7];

TIMP-1 是机体组织中天然存在的 MMPs 酶抑制剂之一,可与活化的胶原酶、活化的基质溶解素及 MMP-3 形成 1:1 复合体,抑制其活性,可能具有减少 ECM 多种成分的降解,导致 ECM 在机体组织局部的聚积^[4,6]。本实验证明,16 月龄 SHR 确实存在肾小球内 ECM 堆积及 MMPs/TIMPs 比例失调。是否能通过直接和(或)间接调整 MMPs/TIMPs 的比例来改善或延缓 HNS 将具有重要意义,这有待于进一步的研究。

3.2 氯沙坦与氨氯地平对 SHR 肾功能保护作用及机制的探讨 氯沙坦是第一个口服非肽类特异性竞争性 ATⅡ,能全面阻断 ATⅡ的作用^[11],具有高亲和力(在各种组织中,对特异性 ATⅡ结合部位有高度亲和力);高选择性(对 AT1R 的拮抗较 AT2R 高 30 000 倍);高特异性(对其他受体无亲和力);无激动剂活性(对离体血管平滑肌细胞标本无作用);无血管紧张素转换酶抑制剂的副作用,对缓激肽无影响,几乎无咳嗽等副作用;还有增加尿酸排泄的作用^[11]。

动物实验表明,氨氯地平扩张肾小球入球小动脉,而对出球小动脉几无扩张作用^[12]。可减小残肾肾小球毛细血管压力,降低血管壁张力,减少肾脏代偿性增大;减低残余肾单位的高代谢,减缓肾损害;可通过减少大分子物质在肾小球系膜区的沉积,抑制系膜细胞及基质的增生,减缓肾小球硬化的发展;可抑制生长因子促有丝分裂作用;减少自由基的产生;减弱 ET 的缩血管作用;改善尿毒症性肾钙质沉着;对血糖、血脂无不利影响^[12]。

本实验用氯沙坦、氨氯地平治疗后,SHR 血压下降,肾功能损害延缓,24 h Up 排泄减少(尤以氯沙坦为著)。肾组织病理改变普遍减轻;肾小球 CoⅣ、LM 与 TIMP-1 的表达明显减弱;MMP-3、MMP-2 表达增多(尤以 MMP-3 为著)。表明这两种药都具有降压、减少蛋白尿,延缓肾损害的作用,

表 5 4 组大鼠肾组织中 MMP-2、MMP-3、TIMP-1 的表达

组别	MMP-2					MMP-3					TIMP-1				
	-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++
健康大鼠组	0	0	1	5	0	0	0	0	1	5	0	5	1	0	0
模型组	0	0	6*	1	0	0	6**	1	0	0	0	0	0	1	6**
氨氯地平组	0	0	3	6#	0	0	0	2	7##	0	0	6##	3	0	0
氯沙坦组	0	0	3	5#	0	0	0	1	7##	0	0	6##	2	0	0

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,模型组与健康大鼠组比较;# $P > 0.05$, ## $P < 0.01$,氨氯地平组、氯沙坦组分别与模型组比较

对 SHR 肾损害都具有保护作用。氯沙坦与氨氯地平能调节肾组织内 MMPs/TIMPs 比例,改善已紊乱的 MMPs、TIMPs 功能,减少 ECM 在肾小球局部的聚集。其机理是增加 ECM 的降解和(或)可能减少 ECM 成分的合成,尚不清楚,还有待于进一步的探讨。总之,氯沙坦与氨氯地平都具有明显的肾脏保护作用。

参考文献

- 1 Porush JG. Hypertension and chronic renal failure: the use of ACE inhibitors. *Am J Kidney Dis*, 1998, 31:177-184.
- 2 Chandler S, Miller KM, Clements JM, et al. Matrix metalloproteinases, tumor necrosis factor and multiple sclerosis: an overview. *J Neuroimmunol*, 1997, 72:155-161.
- 3 Ries C, Petrides PE. Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1995, 376:345-355.
- 4 Suzuki D, Miyazaki M, Jinde K, et al. *In situ* hybridization studies of matrix metalloproteinase-3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV collagen in diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 1997, 52:111-119.
- 5 Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of metalloproteinases. *Methods Enzymol*, 1995, 248:183-228.
- 6 Steinmann-Niggli K, Ziswiler R, Kung M, et al. Inhibition of matrix metalloproteinases attenuates anti-Thy1.1 nephritis. *J Am Soc Nephrol*, 1998, 9:397-407.
- 7 Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, et al. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death *in vitro*. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest*, 1998, 101:1478-1487.
- 8 Mai M, Geiger H, Hilgers KF, et al. Early interstitial changes in hypertension-induced renal injury. *Hypertension*, 1993, 22:754-765.
- 9 Razzaque MS, Cheng M, Horita Y, et al. Immunohistochemical analysis of type III and IV collagens in tubulointerstitial damage in human benign nephrosclerosis. *J Int Med Res*, 1995, 23:480-486.
- 10 Remuzzi G, Ruggenenti P, Benigni A. Understanding the nature of renal disease progression. *Kidney Int*, 1997, 51:2-15.
- 11 Holdaas H, Hartmann A, Berg KJ, et al. Renal effects of losartan and amlodipine in hypertensive patients with non-diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 1998, 13:3096-3102.
- 12 Epstein M. Calcium antagonists and the progression of chronic renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1998, 7:171-176.

(收稿日期:2002-09-20)

(本文编辑 周宇红)

· 消 息 ·

《MCDEX 药物临床信息参考》出版

由国家食品药品监督管理局药品审评中心主持编写的《MCDEX 药物临床信息参考》(2003 年版),于 2003 年 7 月由四川科学技术出版社出版。该书是一本以通用药物为主线的综述性药物信息参考书。其内容侧重于药物的临床应用信息,包括药物名称、适应证、药理、注意事项、不良反应、药物相互作用、给药说明、用法与用量、制剂与规格等,并采用条目化的编写方法,使内容清晰明理,便于查询。该书收载药品品种 1 047 个(即药物专论 1 047 篇),涵盖的中、英文药品通用名称以及商品名和别名共 10 668 个;收载范围主要为国家基本药物、医院常用药物和新上市药品。

全书约 1 200 页,售价人民币 198 元。全国各大新华书店和医药专业书店有售。也可向中华医学会杂志社联系邮购(100710,北京东四大街 42 号,联系人:姜玮)。款到寄书,免收邮资费。以下城市可电话订购、上门送书(上海:021-53960814;成都:028-85183848),供现场看样,满意后付款。