

· 基础研究 ·

阿托伐他汀延缓肾脏衰老机制的探讨

赵佳慧¹, 程庆砾¹, 杜 婧¹, 刘 胜¹, 王小丹¹, 叶 平²(解放军总医院: ¹南楼临床部肾科, ²南楼临床部心血管二科, 北京 100853)

【摘要】目的 我们的前期研究证明长期应用阿托伐他汀可以显著改善老年大鼠肾脏衰老的病理改变, 本研究进一步探讨长期应用不同剂量的阿托伐他汀减轻老年大鼠肾脏衰老病理表现的机制。**方法** 正常 20 月龄 Wistar 雌性大鼠分为 3 组 (每组 $n=9$): 大剂量阿托伐他汀 10mg/(kg·d) 灌胃; 小剂量阿托伐他汀 1mg/(kg·d) 灌胃; 等容积生理盐水灌胃, 3 组均连续灌胃 4 个月处死大鼠 (24 月龄), 同时以 3 月龄大鼠 ($n=9$) 为对照。RT-PCR 方法检测大鼠肾组织内基质金属蛋白酶及其抑制剂 (MMPs/TIMPs)、转化生长因子 (TGF- β_1) 及过氧化物酶体增殖物活化型受体 (PPARs) 三个亚型的表达。Western 印迹法检测肾组织内 TIMP-1、MMP-9、TGF- β_1 、PPARs 三个亚型的蛋白质表达。**结果** 老年大鼠 (24 月龄) 较青年大鼠 (3 月龄) 肾组织内 MMP-9 和 TGF- β_1 的表达显著升高 (分别为 $P<0.05$ 和 $P<0.01$), TIMPs 和 PPARs 无显著变化。服用阿托伐他汀后显著降低 MMP-9 和 TGF- β_1 的表达, 升高 TIMP-1、PPAR α 、PPAR β 和 PPAR γ (分别为 $P<0.01$, $P<0.01$ 和 $P<0.05$) 的表达。**结论** 老年大鼠肾组织内 MMPs/TIMPs 显著失衡, TGF- β_1 显著高表达, 老年大鼠长期应用阿托伐他汀可能通过降低 MMP-9 表达和增高 TIMP-1 表达而纠正 MMPs/TIMPs 的失衡状态, 同时显著减低 TGF- β_1 的表达而起到明显改善老年大鼠肾脏衰老的作用。该作用是否通过阿托伐他汀对 PPARs 三个亚型的激活而产生, 尚需进一步的实验研究。

【关键词】 大鼠; 肾脏; 衰老; 阿托伐他汀; 基质金属蛋白酶; 金属蛋白酶组织抑制剂; 转化生长因子; 过氧化物酶体增殖物活化型受体

【中图分类号】 R339.34; R592**【文献标识码】** A**【DOI】** 10.3724/SP.J.1264.2012.00239

Underlying mechanism of atorvastatin against aging kidney in rats

ZHAO Jiahui¹, CHENG Qingli¹, DU Jing¹, LIU Sheng¹, WANG Xiaodan¹, YE Ping²(¹Department of Geriatric Nephrology, ²Second Department of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】Objective Our previous study had proved that long-term atorvastatin administration notably improves the pathological aging changes of kidney. The aim of this study was to find the underlying mechanism of different doses atorvastatin in attenuation of the aging changes in the kidneys. **Methods** Twenty-month-old normal female Wistar rats were divided into 3 groups ($n=9$ for each group), that is, aged control group, large and small dosed atorvastatin groups. The rats from the corresponding groups were treated with normal saline, or atorvastatin at 10 or 1 mg/(kg·d) respectively through intragastrical injection for 4 months. All rats were sacrificed at the end of treatment, and another 9 rats at the age of 3 months served as normal controls. The expression of matrix metalloproteinase (MMP-9, -2), tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP-1, -2), transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and peroxisome proliferators activated receptors (PPARs) at mRNA and protein levels in the kidney tissues were detected by RT-PCR and Western blotting respectively. **Results** The rats at 24 months old had significantly increased expression of MMP-9 and TGF- β_1 than those at 3 months old ($P<0.05$, $P<0.01$). But no change was found in the expression of TIMPs and PRARs between them. Atorvastatin reversed these above changes. It resulted in a decrease in the increased expression of MMP-9 and TGF- β_1 , and an increase in the downregulated expression of TIMP-1, PPAR α , PPAR β and PPAR γ ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$). **Conclusion** Imbalanced expression of MMPs/TIMPs exists in the aging rat kidney, with up-regulation of TGF- β_1 . Long-term treatment of atorvastatin rebalances MMPs/TIMPs expression through downregulating MMP-9, upregulating TIMP-1, and decreasing TGF- β_1 expression, and thus attenuates the aging changes in the kidneys. Further study is needed to identify whether atorvastatin-induced activation of PRARs plays roles in the process.

【Key words】 rat; kidney; aging; atorvastatin; matrix metalloproteinase; tissue inhibitors of metalloproteinase; transforming growth factor; peroxisome proliferators -activated receptor.

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (70872713) and the Innovative Foundation of Scientific and Technological Research of Young Talents of Chinese PLA General Hospital (07MP40).

收稿日期: 2012-06-05; 修回日期: 2012-11-01

基金项目: 国家自然科学基金 (70872713); 解放军总医院苗圃基金 (07MP40)

通讯作者: 叶 平, Tel: 010-66876369, E-mail: yeping@sina.com

当今世界已逐渐步入老龄化社会,衰老本身给家庭和社会带来较为沉重的经济负担。人们一直尝试寻找衰老的根源,但至今仍不明确。肾脏的衰老是人体衰老机制中尤为突出的部分,人类从 40 岁起肾脏的功能开始逐年减退,增龄本身不仅给肾脏带来显著的损害,而且也是各种急、慢性肾脏疾病的独立危险因素。我们的研究小组在前期的研究工作中惊喜地发现,老年大鼠长期服用阿托伐他汀可以显著改善衰老肾脏的异常病理表现,包括显著减轻肾小球局灶节段硬化的程度,减少肾间质内炎性细胞浸润,显著改善肾内小动脉粥样硬化病变的程度,且大剂量药物组作用更加显著。分析这些作用可能是通过阿托伐他汀的降低血脂作用和显著减轻肾内小动脉硬化,减轻肾组织缺血、缺氧的发生而综合起效的^[1]。但在研究中我们还发现,长期应用阿托伐他汀还可以显著减少老龄大鼠肾间质内炎性细胞的浸润,但阿托伐他汀是通过何种机制发挥此种作用的呢?我们带着这个疑问进行了相关机制的探讨。

1 材料与方法

1.1 动物模型的制备及分组

雌性 Wistar 大鼠,每组 9 只。(1)青年组:3 月龄,未灌胃;(2)老年大剂量他汀组:24 月龄,从 20 个月龄起连续灌胃大剂量阿托伐他汀[10mg/(kg·d)] 4 个月;(3)老年小剂量他汀组:24 月龄,从 20 个月龄起连续灌胃小剂量阿托伐他汀[1mg/(kg·d)] 4 个月;(4)老年空白对照组:24 月龄,从 20 个月龄起连续灌胃等体积的生理盐水 4 个月。

1.2 动物标本的留取

腹腔注射麻醉大鼠,眼眶取血 3ml/只,离心后取血清。取腹正中切口,分离双侧肾脏,将肾组织迅速分为多份:取右肾下极固定于 10%中性福尔马林液,余部分置液氮中保存。

1.3 RT-PCR 方法检测目的基因的 mRNA 表达

目的基因包括肾组织内基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-9、MMP-2 及其抑制剂——金属蛋白酶组织抑制剂-1(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1, TIMP-1)、TIMP-2,转化生长因子-β₁(transforming growth factor, TGF-β₁)和过氧化物酶体增殖物活化型受体 α(peroxisome proliferator-activated receptor α, PPARα)、PPARβ、PPARγ。采用 Trizol 试剂提取肾组织总 RNA,用核酸蛋白分析仪检测波长 260nm 和 280nm 的吸光度值,计算提取 RNA 样品的浓度和纯度。依据检测浓度调

整样品 RNA < 0.05g/L 体系。经 42℃ 30min、99℃ 5min、5℃ 5min,将 RNA 反转录为 cDNA。分别以各自目标基因的引物(表 1)PCR 扩增目标基因和内参照 GAPDH。取 RT-PCR 产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳。应用紫外凝胶成像系统分析光密度值,以待测基因与 GAPDH 的光密度比值作为 mRNA 的相对表达量。

1.4 Western 印迹法检测目的基因的蛋白质表达

用预冷的 RIPA 液进行组织匀浆,提取组织总蛋白。考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白浓度。取同样蛋白浓度的样品,加 5-SDS 蛋白电泳加样缓冲液。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白。将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶转移至硝酸纤维素膜上。经过封闭、加对应一抗(4℃,过夜)、洗膜、加二抗、洗膜、ECL 显影,扫描 X 片后,利用图像分析软件对 TIMP-1、MMP-9、TGF-β₁、PPARα、PPARβ、PPARγ 的蛋白表达进行定量分析(以 β-actin 为参照)。

1.5 统计学处理

计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间计量资料的比较采用 *t* 检验,多组间计量资料的比较采用 *F* 检验。应用 SPSS 13.0 统计软件。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 各目的基因的引物序列
Table 1 Oligonucleotide primers for PCR amplification of the target genes

名称	引物序列
TIMP-1	上游: 5'-AGACCACCTTATACCAGCGT-3' 下游: 5'-CGGAGGAAAGGTAACAGTG-3'
TIMP-2	上游: 5'-TGAGCGAGAAGGAGGTGGATT-3' 下游: 5'-ATCATAGGGCAGCGTGTGATC-3'
MMP-2	上游: 5'-CACCATCGCCCATCATCAAGT-3' 下游: 5'-TGGATTTCGAGAAAAGCGCAGCGG-3'
MMP-9	上游: 5'-CTTAGATCATTCTTCAGTGCC-3' 下游: 5'-GATCCACCTTCTGAGACTTCA-3'
GAPDH	上游: 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3' 下游: 5'-CAAAGTTGTTCATGGATGACC-3'
TGF-β ₁	上游: 5'-CTTCAGCTCCACAGAGAAGAAGTGC-3' 下游: 5'-CACGATCATGTTGGACAAGTCTCC-3'
PPAR α	上游: 5'-TGCATGTCCGTGGAGACCGTCAC-3' 下游: 5'-ACTCGGTCTTCTTGATGACC-3'
PPAR β	上游: 5'-AGCACATCTACAATGCCTACCT-3' 下游: 5'-TCTTGGCGAAGTCCGTGA-3'
PPAR γ	上游: 5'-ACTCCCATTCCTTTGACATC-3' 下游: 5'-TCCCCACAGACTCGGCACCTC-3'

2 结果

2.1 各组大鼠肾脏的目的基因的 mRNA 表达

老年大鼠较青年大鼠肾组织内 MMP-9、TGF-β₁ 的 mRNA 表达显著升高(分别为 *P* < 0.05 和 *P* < 0.01),其他基因表达差异无统计学意义(*P* > 0.05)。老年大

鼠服用小剂量阿托伐他汀后可以显著降低 MMP-9 和 TGF- β_1 的 mRNA 表达 (二者均 $P < 0.01$), 显著升高 TIMP-1、TIMP-2 的 mRNA 表达 (二者均 $P < 0.01$)。老年大剂量阿托伐他汀组的作用类似于小剂量组, 但略弱于小剂量组 (图 1)。

老年大鼠肾组织内 PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ 的 mRNA 表达较青年大鼠略有差异, 但无统计学意义 ($P > 0.05$)。老年大鼠长期服用小剂量阿托伐他汀可以显著增加 PPAR α ($P < 0.01$)、PPAR β ($P < 0.01$) 和 PPAR γ ($P < 0.05$) 三者的 mRNA 表达。老年大鼠服用大剂量阿托伐他汀的作用不如小剂量阿托伐他汀显著, 仅可以显著升高 PPAR β mRNA 的表达 ($P < 0.05$; 图 1)。

2.2 各组大鼠肾脏的目的基因的蛋白质表达

老年大鼠较青年大鼠的肾组织内 MMP-9 ($P < 0.05$) 和 TGF- β_1 ($P < 0.01$) 的蛋白表达均显著升高, TIMP-1 的蛋白表达无明显变化 ($P > 0.05$)。老年大鼠长期服用大、小剂量的阿托伐他汀后均可以显著降低肾组织内 MMP-9 (二者均 $P < 0.01$) 和 TGF- β_1 (二者均 $P < 0.01$) 的蛋白表达, 升高 TIMP-1 (二者均 $P < 0.01$) 的蛋白表达。小剂量阿托伐他汀组的作用显著于大剂量阿托伐他汀组。

老年大鼠较青年大鼠的肾组织内 PPAR α 的蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), PPAR β 、PPAR γ 的蛋白表达显著升高 (分别为 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。老年大鼠长期服用小剂量阿托伐他汀后肾组织内 PPAR α 、PPAR β 和 PPAR γ 的蛋白表达均显著升高 (分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$), 以 PPAR γ 和 PPAR β 较为明显。大剂量阿托伐他汀组的结果差异较大 (图 2)。

3 讨论

在本研究中, 我们分别从 mRNA 和蛋白质水平证明了 MMPs/TIMPs 的失衡和 TGF- β 的活化参与了肾脏的衰老过程, 老年大鼠肾组织内 MMP-9 和研究中发现, MMP-9 的分泌增加后, 可促进基质的降解, 同时促进单核细胞、中性粒细胞和淋巴细胞的浸润, 进一步引起成纤维细胞的浸润和增殖, 但 TGF- β_1 显著升高, TIMPs 无明显变化。而长期口服阿托伐他汀后显著逆转这种改变, MMP-9 和 TGF- β_1 的表达明显下降, TIMP-1 的表达升高。

如何解释这些改变呢? 众所周知, TGF- β 表达的上调几乎是所有慢性肾脏疾病的共同特征^[2]。TGF- β 可以导致细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 堆积^[3], 诱导肾间质成纤维细胞增殖等, 是

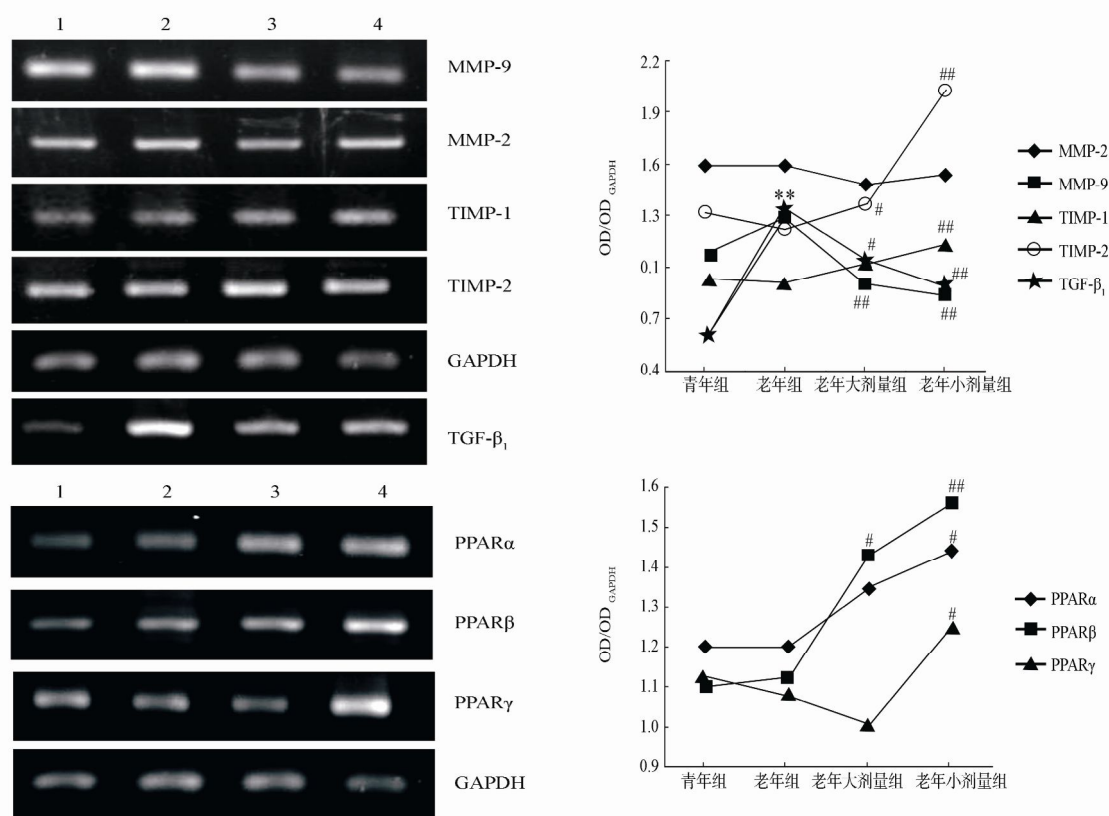


图 1 四组大鼠肾组织内各目的基因 mRNA 的表达

Figure 1 mRNA expressions of different target genes in renal tissues in different groups

1: 青年组; 2: 老年组; 3: 老年大剂量组; 4: 老年小剂量组。与青年组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与老年组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

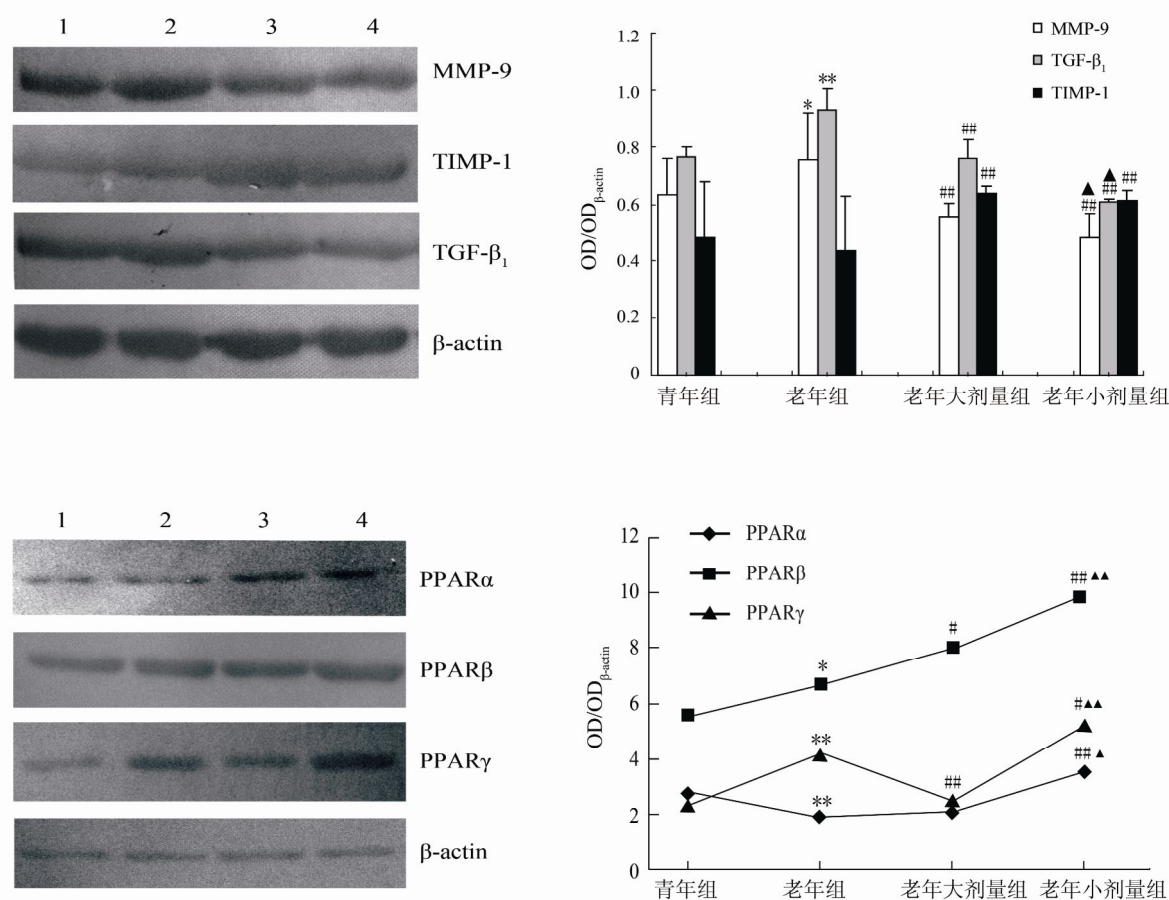


图 2 大鼠肾组织内各种蛋白质的表达

Figure 2 Protein expressions of different target genes in renal tissues of different groups

1: 青年组; 2: 老年组; 3: 老年大剂量组; 4: 老年小剂量组。与青年组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与老年组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与老年大剂量组比较, ▲ $P < 0.05$; ▲▲ $P < 0.01$

最终导致肾间质纤维化的主要细胞因子。可见老龄大鼠肾组织内 TGF- β 表达的增高显然是不利的。但是以往在肾脏病领域普遍认为 MMPs 是肾间质中 ECM 成分的主要降解酶, 是抑制肾间质纤维化的关键。但近年来对 MMPs 在肾脏病中的作用有了更深的认识。发现 MMP-2、MMP-9 及 MMP-3 能促进肾小管上皮细胞向间充质细胞转分化, 促进肾间质纤维化的发生和发展^[4]。另外, MMPs 与免疫炎症的关系也很复杂, 一方面 MMPs 促进炎细胞迁徙和炎症介质活化而促进炎症, 另一方面还参与炎症反应的细胞因子、趋化因子及黏附分子等的降解, 有利于炎症缓解, 哪种作用占主导地位可能与不同疾病的不同病理生理过程及组织器官微环境的差异有关。MMP-9 基因敲除小鼠表现为动脉粥样硬化中巨噬细胞迁移受损, 防止巨噬细胞诱导的动脉瘤形成, 防止内毒素介导的休克等^[5], 可见 MMP-9 缺失或降低对减轻炎症反应益处较大。Sanders 等^[6]也在研究抗中性粒细胞胞浆抗体相关性肾炎时发现, 大量的 MMPs 降解了 ECM, 促进白

细胞的浸润和 ECM 中促炎症介质的释放, 肾小球中 MMP-9 阳性表达的细胞数量与肾小球中新月体数量正相关, 肾小管间质内 MMP-9 的表达与中性粒细胞和单核细胞的浸润正相关。由此可见, 老龄大鼠肾组织内 MMP-9 的显著升高参与炎症反应和间质纤维化的发生。另外, 基质金属蛋白酶抑制系统——TIMPs 是体内调节 MMP 活性的重要内源性抑制系统。TIMPs 表达上调会使 MMP-TIMP 复合物增多, 抑制 MMPs 对 ECM 的降解。同时 TIMPs 还发挥着不依赖 MMPs 的生物学活性。在肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 诱导的人心肌细胞纤维化的所有这些现象可以被辛伐他汀抑制^[7]。我们的研究也发现了类似现象。

依上述相关研究的结论及本研究中观察到的现象, 分析肾脏随增龄而逐渐出现肾小球系膜基质的增多, 继而出现以 MMP-9 为主的基质金属蛋白酶系的显著失代偿性升高, 在降解肾小球增多的 ECM 的同时也促进和加速了多种炎性细胞的浸润和增多,

进一步释放大量的炎症因子、趋化因子及激活 TGF- β ，导致肾小球缓慢出现局灶节段性硬化的改变。而服用阿托伐他汀显著下调 MMP-9 的表达，同时还通过显著上调 TIMP-1 的表达进一步加强对 MMP-9 的抑制，更加减弱 MMP-9 的不利作用，减少炎症细胞的浸润，阻断炎症因子及致纤维化因子的瀑布式释放，同时还显著减少 TGF- β 的表达，纠正和改善参与肾脏老化相关的不利细胞因子和炎症因子的状态，减轻肾脏老化的病理改变。尽管老年大鼠服用小剂量的阿托伐他汀对细胞因子的影响强于服用大剂量的阿托伐他汀，但大剂量阿托伐他汀的降低血脂作用更加明显，因为多项研究结果均提示低密度脂蛋白胆固醇和极低密度脂蛋白胆固醇本身即为炎症因子枢纽的 NF- κ B 的激活物^[8]，这也是导致脂质肾损害的主要原因。同时强化降脂改善肾脏各级血管粥样硬化病变的作用更加明显，对肾脏局部血流动力学的影响也较大，最终导致大剂量阿托伐他汀改善衰老肾脏的病理变化的作用最为显著。所以，阿托伐他汀在显著降低老年大鼠血清总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇的同时通过下调 MMP-9、TGF- β_1 和上调 TIMP-1 的表达，减少炎症因子和致纤维化因子的多重作用综合起效，而起到保护肾脏、延缓肾脏衰老的作用。

但阿托伐他汀通过何种机制影响 MMPs/TIMPs 的平衡和抑制 TGF- β 的活化尚不能解释清楚。本研究中观察到大鼠随增龄肾脏组织内的 PPARs 的变化略有不同，老化肾脏的 PPAR α 轻度降低，而 PPAR β 、PPAR γ 的水平轻度升高。过往的研究认为 PPARs 被其配体激活后均有较明显抗炎作用和肾脏保护作用。例如 Zheng 等^[9]发现 PPAR γ 激活可以抑制系膜细胞中 TGF- β 介导的 I 型胶原表达增加；贝特类药物通过激活 PPAR α 可以抑制 NF- κ B 的表达而阻止顺铂诱导的急性肾衰^[10]；PPAR β 的配体可以显著地保护肾脏避免发生急性缺血-再灌注损伤^[11]。本研究中发现老年大鼠长期服用小剂量的阿托伐他汀后可显著增加 PPAR 三个亚型的表达，老化肾脏为明显获益状态，可显著改善老化肾脏的肾小球局灶节段

性硬化，明显减少肾间质内炎性细胞浸润。但小剂量的阿托伐他汀是通过何种途径增加 PPAR 三个亚型的表达？阿托伐他汀是否可以作为 PPARs 的外源性配体？需要进一步的实验证据来证明。

【参考文献】

- [1] 赵佳慧, 程庆砾, 叶平. 阿托伐他汀治疗对肾脏衰老的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2011, 27(1): 98-101.
- [2] Bottinger EP. TGF-beta in renal injury and disease[J]. Semin Nephrol, 2007, 27(3): 309-320.
- [3] Yang J, Dai C, Liu Y. Hepatocyte growth factor suppresses renal interstitial myofibroblast activation and intercepts Smad signal transduction[J]. Am J Pathol, 2003, 163(2): 621-632.
- [4] Cheng S, Lovett DH. Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation[J]. Am J Pathol, 2003, 162(6): 1937-1949.
- [5] Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(8): 617-629.
- [6] Sanders JS, van Goor H, Hanemaaijer R, et al. Renal expression of matrix metalloproteinases in human ANCA-associated glomerulonephritis[J]. Nephrol Dial Transplant, 2004, 19(6): 1412-1419.
- [7] Porter KE, Turner NA, O'Regan DJ, et al. Tumor necrosis factor alpha induces human atrial myofibroblast proliferation, invasion and MMP-9 secretion: inhibition by simvastatin[J]. Cardiovasc Res, 2004, 64(3): 507-515.
- [8] Guijarro C, Egido J. Transcription factor-kB (NF-kB) and renal disease[J]. Kidney Int, 2001, 59(2): 415-424.
- [9] Zheng F, Fomoni A, Elliot SJ, et al. Upregulation of type I collagen by TGF- β in mesangial cells is blocked by PPAR γ activation[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 282(4): F639-F648.
- [10] Zelvyte I, Dominaitiene R, Crisby M, et al. Modulation of inflammatory mediators and PPARgamma and NFkappaB expression by pravastatin in response to lipoproteins in human monocytes *in vitro*[J]. Pharmacol Res, 2002, 45(2): 147-154.
- [11] Letavernier E, Perez J, Joye E, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta exerts a strong protection from ischemic acute renal failure[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(8): 2395-2402.

(编辑: 王雪萍)