论著

文章编号:1000-5404(2008)22-2096-04

辛伐他汀对阿霉素肾病大鼠的治疗作用及白细胞介素-1β表达的影响

张 伟[1],李 秋[2],王莉佳[1],杨锡强[2] (重庆医科大学附属儿童医院:[1]免疫研究室,[2]肾脏免疫科,重庆 400014)

摘 要:目的 观察炎症因子白细胞介素-1β(interleukin-1 beta, IL-1β)在阿霉素肾病大鼠发生肾小球硬化过程中的表达,探讨辛伐他汀保护阿霉素肾病大鼠肾脏的机制。**方法** 雄性SD大鼠分为正常对照组、阿霉素肾病组(模型组)和阿霉素肾病辛伐他汀治疗组(治疗组),分别灌胃给药11周。免疫组化法观测肾组织中IL-1β的定位表达,半定量RT-PCR技术检测肾组织IL-1β mRNA的表达,酶联免疫吸附法检测血清和肾组织中IL-1β的水平,光镜观察肾小球硬化的情况。**结果** 模型组肾组织IL-1β的表达明显增强($P<0.01$),伴有明显的肾小球硬化及肾功能损害($P<0.01$);与模型组比较,治疗组肾组织IL-1β的表达、肾小球硬化及肾功能损害均减轻(分别$P<0.05$、$P<0.01$、$P<0.05$)。**结论** 辛伐他汀可能通过降低肾组织内IL-1β的表达,对肾脏起保护作用。

关键词: 肾病大鼠;肾小球硬化;HMG-CoA还原酶抑制剂;白细胞介素-1β

中图法分类号: R392.11;R692.05;R972.6 **文献标识码:** A

Renoprotective effect of simvastatin on adriamycin-induced nephropathy in rats

ZHANG Wei[1], LI Qiu[2], WANG Li-jia[1], YANG Xi-qiang[2] ([1]Department of Immunology, [2]Department of Nephroimmunology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate the role of interleukin-1 beta (IL-1β) in glomerulosclerosis secondary to adriamycin (ADR)-induced nephropathy in rats, and the effect of simvastatin on the expression of IL-1β. **Methods** Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control, ADR-induced nephropathy (model), and simvastatin-treated ADR nephropathy (treatment) groups. After ADR-induced nephropathy establishment in model and treatment groups, and eleven weeks of intragastrical administer of normal saline in normal control and model groups and of simvastatin in treatment group, the expression of IL-1β was detected by immunohistochemistry, RT-PCR and ELISA. Histopathological change of renal tissues was observed under light microscope, and glomerulosclerosis index (GSI) was also evaluated. **Results** Higher expression of IL-1β in kidney and GSI, as well as more severe loss of renal function were observed in model group than those in control group (all $P<0.01$). Those changes were less severe in treatment group than in model group, suggesting treatment with simvastatin could significantly decrease the expression of IL-1β in kidney and GSI, and slow down the loss of renal function ($P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.05$, respectively). **Conclusion** The renoprotective effect of simvastatin may be *via* decreasing the expression of IL-1β in kidney.

Key words: nephropathy; glomerulosclerosis; HMG-CoA reductase inhibitor; interleukin-1 beta

白细胞介素-1β(interleukin-1 beta, IL-1β)是重要的前炎症因子,在肾小球硬化的发生和进展过程中起着重要的作用[1]。辛伐他汀是3-羟-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMG-CoA还原酶)抑制剂,是一种临床常用的安全有效的降血脂药物。最近研究表明,辛伐他汀具有不依赖于其降脂效应的抗炎作用[2]。本实验通过观察阿霉素肾病大鼠在发生肾小球硬化过程中肾组织中IL-1β的表达变化及辛伐他汀的干预效果,旨在探讨辛伐他汀对阿霉素肾病大鼠的保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型的建立

雄性SD大鼠24只,体质量120~150 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。实验期间,动物均饲养在SPF级环境中,亮/暗周期保持在7:00/19:00,室温22~24 ℃,湿度50%~70%,自由进食和饮水。大鼠分为正常

基金项目: 国家自然科学基金(30672267);重庆市教委科技项目(KJ070301) Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672267) and the Project Foundation of Chongqing Municipal Education Committee (KJ070301)

作者简介: 张 伟,男,湖北省大冶市人,博士研究生,主要从事儿童肾脏与免疫性疾病方面的研究,现在成都市儿童医院肾内科工作。E-mail: gczhangwei@163.com

通信作者: 李 秋,E-mail:liqiu809@hotmail.com

收稿日期: 2008-01-18;**修回日期:** 2008-02-27

对照组、阿霉素肾病组(模型组)、阿霉素肾病辛伐他汀治疗组(治疗组),每组 8 只。根据预实验的结果,模型组和治疗组大鼠一次性尾静脉注射阿霉素 6.5 mg/kg,对照组注射等量生理盐水。实验周期为 12 周,模型建立后 6 d,治疗组每天给予辛伐他汀3 mg/kg 灌胃,对照组和模型组每天灌等量生理盐水,灌胃 11 周,于注射阿霉素后第 12 周末结束实验。

1.2　药物与试剂

阿霉素(Pharmacia,意大利),辛伐他汀(杭州默沙东,国药准字:H19990366),兔抗鼠 IL-1β 多克隆抗体(sc-7884,Santa Cruz,美国),免疫组化二步法检测试剂盒(PV-6001,北京中山公司),ELISA 试剂盒(BMS630,Bender,奥地利),核酸提取试剂盒(R6311-01,Genemega,美国),逆转录试剂盒(DRR037S,TaKaRa),PCR 试剂盒(KT201,北京天根生化科技公司)。

1.3　标本的采集和保存

1.3.1　24 h 尿液　　将大鼠放置于代谢笼,禁食不禁水,收集第 0、1、2、4、8、12 周 24 h 尿液,分装后于 -20 ℃保存。

1.3.2　血清　　实验结束时,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠后,股动脉采血,分离血清,分装后于 -20 ℃保存。

1.3.3　肾组织　　采血后,肾脏原位灌洗冷生理盐水 10 ~ 15 ml 至双侧肾脏发白,取下双肾,剥离肾包膜,右肾上极 1/3 置于 10% 中性甲醛中固定 24 h,经梯度酒精脱水、二甲苯透明、浸蜡后,石蜡包埋;右肾中段 1/3 肾组织分离肾髓质后,肾皮质立即放入液氮中保存;右肾下极 1/3 肾组织分离肾髓质后,肾皮质制成 10% 的 PBS 匀浆,4 ℃,2 500 × *g* 离心 15 min,收集上清,-20 ℃保存备用。

1.4　生化指标的检测

考马斯亮蓝法检测 24 h 尿蛋白定量,全自动生化仪(Dimension RxL,USA)直接法检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、肌酐(Cr)的含量。

1.5　肾组织中 IL-1β 定位表达的检测

3 μm 的肾组织石蜡切片,常规脱蜡至水。3% H_2O_2 室温处理 10 min 灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水洗 3 次。将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),微波炉加热至沸腾后断电,间隔 5 min,重复 1 次以修复抗原;滴加 1∶100 稀释的兔抗鼠 IL-1β 多克隆抗体,4 ℃孵育过夜;滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体多聚体,37 ℃孵育 30 min,各步间均用 PBS(pH 7.2)洗 3 次。最后用 DAB 显色,显微镜下观察,适时终止,自来水充分冲洗,苏木精复染后脱水、透明、封片。采用 PBS 代替 IL-1β 一抗作为阴性对照,光镜下观察染色结果,阳性表达呈棕褐色。

1.6　肾组织中 IL-1β mRNA 表达的检测

取 30 ~ 50 mg 肾皮质组织,液氮中研磨,按照试剂盒说明书提取总 RNA。取 2 μg 总 RNA 加入 10 μl *Taq* Man 逆转录反应体系中,逆转录成 cDNA。取 2 μl cDNA 产物为模板,进行 PCR 扩增,同时以 β-actin 作为内参进行扩增,总反应体系为 25 μl。PCR 反应条件:94 ℃预变性 3 min,然后 30 个循环,包括 94 ℃变性 1 min,60 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 2 min,循环结束后,72 ℃延伸 5 min。根据文献[3],IL-1β 上游引物:5′-CTGTGACTCGTGGGATGATG-3′,下游引物:5′-GGGATTTTGTCGTTGCTTGT-3′;根据大鼠 β-actin 基因序列,用 Primer 5.0 程序设计 β-actin 引物,上游:5′-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGG-3′,下游:5′-ATACCCAGGAAGGAAGGCTGGAAG-3′。IL-1β 扩增产物长度为 210 bp,β-actin 扩增产物长度为 539 bp。取 5 μl PCR 产物在含有 0.005% GoldView 的 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳,用 Quantity one ChemiDocXRS 图像采集系统及分析软件(Bio-Rad,美国)对电泳条带进行分析处理,IL-1β mRNA 表达量用其条带校正容积与 β-actin 校正容积之比表示。

1.7　血清及肾组织匀浆上清 IL-1β 水平检测

采用酶联免疫吸附法(ELISA),标准品倍比稀释,标本 2 倍稀释,均设复孔,每孔加样 100 μl 后,再加入 50 μl 生物素标记的抗大鼠 IL-1β 抗体,充分混匀后 25 ℃孵育 2 h;洗涤液洗涤 3 次后每孔加链霉亲和素-辣根过氧化物酶 100 μl,25 ℃孵育 1 h;充分洗板后每孔加入底物工作液 100 μl,25 ℃避光反应 20 min,加入终止液混匀,酶标仪 450 nm 波长下测 D(450)值。以标准品浓度建立标准曲线,计算样品 IL-1β 值。

1.8　肾小球硬化指数的统计

肾组织石蜡切片,经 HE、PAS 染色,光镜下根据肾小球毛细血管袢塌陷或消失、肾小囊断裂或纤维素样物渗出,半定量评价肾小球硬化程度,肾小球硬化指数的统计方法[4]为:肾小球硬化程度根据肾小球硬化灶所占肾小球比例分为 5 个等级,0 级:肾小球基本正常;1 级:肾小球硬化面积≤25%;2 级:25% < 肾小球硬化面积≤50%;3 级:50% < 肾小球硬化面积≤75%;4 级:肾小球硬化面积 > 75%。据每张切片肾小球平均硬化面积积分计算出肾小球硬化指数(glomerulosclerosis index,GSI)表示肾小球硬化程度,公式为 GSI = [(1 × N1 + 2 × N2 + 3 × N3 + 4 × N4)/每张切片肾小球总数] × 100%(N1 ~ N4 分别表示 1 ~ 4 级损害肾小球个数),每张切片采用盲法,随机至少观察 30 个肾小球。

1.9　统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 或 M 表示。多组资料间比较,方差齐者,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法;非正态分布数据比较,采用 Kruskal-Wallis 分析;对有相关趋势的变量采用 Pearson 相关分析。

2　结果

2.1　各组模型不同时期 24 h 尿蛋白水平比较

实验前各组尿蛋白排泄量差异无统计学意义。与对照组比较,模型组和治疗组注射阿霉素 1 周后 24 h 尿蛋白量开始升高,第 2 周出现大量蛋白尿,第 4 周进一步升高,持续至第 12 周,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。第 4 周和第 8 周时,治疗组 24 h 尿蛋白量低于模型组($P < 0.05$,$P < 0.01$,表 1)。

表 1　各组大鼠不同时期 24 h 尿蛋白水平比较

($mg \cdot 100g^{-1} \cdot d^{-1}$,$n = 8$,$\bar{x} \pm s$)

组别	0 周	1 周	2 周	4 周	8 周	12 周
对照组	1.36 ± 0.62	1.58 ± 0.43	03.35 ± 0.83	05.06 ± 1.76	08.18 ± 2.28	08.49 ± 2.72
模型组	1.33 ± 0.58	2.78 ± 0.74[a]	30.03 ± 17.99[a]	76.24 ± 24.92[a]	93.13 ± 24.65[a]	71.82 ± 30.38[a]
治疗组	1.54 ± 0.49	2.85 ± 0.84[a]	31.85 ± 21.04[a]	53.59 ± 20.74[ab]	63.20 ± 18.30[ac]	58.31 ± 20.90[a]

a:$P < 0.01$,与对照组比较;b:$P < 0.05$,c:$P < 0.01$,与模型组比较

2.2　各组模型血脂和血肌酐水平比较

与对照组比较，模型组和治疗组血脂和血肌酐均明显升高（$P<0.01$）。治疗组与模型组比较，血脂差异无统计学意义，肌酐低于模型组（$P<0.05$，表2）。

表2　各组大鼠血脂和血肌酐水平比较（mmol/L，$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

组别	TC	TG	LDL	Cr
对照组	1.95±0.30	0.88±0.23	0.24±0.04	26.94±8.08
模型组	3.35±0.46[a]	1.90±0.58[a]	0.45±0.11[a]	47.99±6.90[a]
治疗组	3.08±0.60[a]	1.81±0.51[a]	0.46±0.11[a]	38.84±8.99[ab]

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与模型组比较

2.3　各组模型肾组织病理学改变及GSI比较

对照组形态学正常（图1A、D）。模型组肾小球血管袢与肾小球囊黏连，部分血管袢血管腔缩小或闭塞，血管袢塌陷萎缩；系膜细胞增生，系膜基质增宽；肾小管上皮细胞可见明显的空泡样改变，部分肾小管萎缩，肾小管管腔内出现大量的蛋白管型；肾间质伴有大量炎性细胞浸润（图1B、E）。治疗组病理改变明显减轻（图1C、F）。模型组GSI[（15.65±4.75）%]和治疗组GSI[（9.14±4.25）%]均明显高于对照组[（0.96±0.34）%]，差异有统计学意义（$P<0.01$）；治疗组GSI低于模型组（$P<0.01$）。

2.4　IL-1β在肾组织中的定位表达

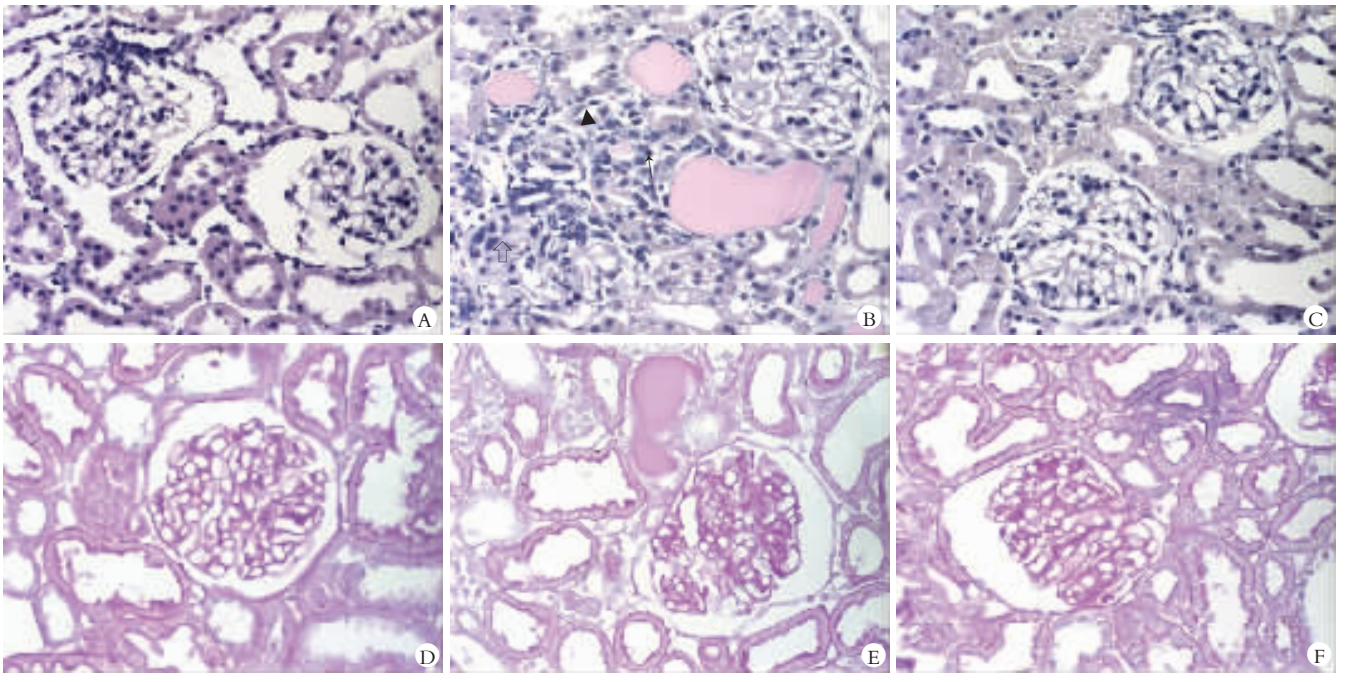
对照组有轻微的表达，主要位于肾小管细胞内（图2A）；模型组表达明显增强，位于肾小球和肾小管细胞内，肾间质未见明显表达（图2B）；治疗组表达较模型组明显减轻（图2C）。

2.5　IL-1β mRNA表达变化

与对照组（0.092±0.019）比较，模型组（0.200±0.032）和治疗组（0.150±0.022）肾组织IL-1β mRNA明显上调（$P<0.01$）；与模型组比较，治疗组IL-1β mRNA的表达明显减轻（$P<0.01$，图3）。

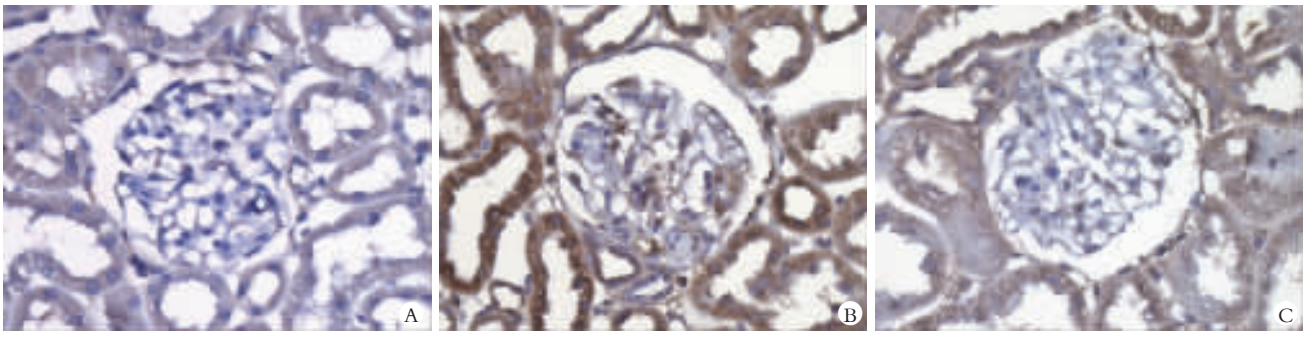
2.6　IL-1β在血清和肾组织中定量检测结果

各组血清IL-1β水平差异无统计学意义；模型组和治疗组肾脏匀浆上清IL-1β水平明显高于对照组（$P<0.01$），治疗组肾脏匀浆上清IL-1β水平低于模型组（$P<0.05$，表3）。



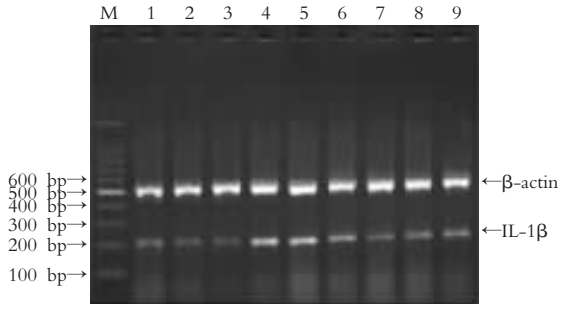
A，D：对照组；B，E：模型组；C，F：治疗组。A～C：HE　×400；D～F：PAS　×400　⇧：局灶阶段性肾小球硬化；↑：肾小管萎缩；▲：炎症细胞浸润

图1　肾组织光镜下形态学改变



A：对照组，B：模型组，C：治疗组

图2　免疫组化分析肾组织内IL-1β的定位表达　（S-P×400）



M:DNA 标准;1 ~3:对照组;4 ~6:模型组;7 ~9:治疗组

图 3　各组模型肾脏 IL-1β mRNA 电泳图

表 3　各组大鼠血清及肾脏匀浆上清 IL-1β 水平比较　(pg/ml, $n=8$)

组别	血清(M, range)	肾脏匀浆上清($\bar{x}\pm s$)
对照组	54.45(33.35 ~163.44)	422.17 ±104.19
模型组	117.04(37.68 ~917.73)	786.09 ±227.31[a]
治疗组	124.60(10.36 ~295.74)	616.26 ±128.99[ab]

a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

2.7　相关性分析

肾脏组织内 IL-1β 的表达与肾小球硬化指数呈显著正相关($r=0.584$,$P<0.01$)。

3　讨论

高脂血症是肾病综合征的重要的病理生理改变,从受损伤的肾小球基底膜滤过到肾组织的脂质,通过上调肾脏细胞 NF-κB 及 IL-1β 的表达,诱发肾组织内的炎症反应[5]。IL-1β 是重要的前炎症因子,可诱导 T 淋巴细胞、单核巨噬细胞和成纤维细胞浸润到肾组织内,导致系膜细胞增生,细胞外基质的产生,正常组织结构的破坏,最终发生不可逆的肾硬化[6]。本模型组和治疗组血清 IL-1β 水平与对照组比较无明显升高,可能与阿霉素肾病早期病理改变为微小病变型,肾小球内无免疫复合物的沉积,缺乏全身炎症反应的刺激有关。但是模型组和治疗组肾组织 IL-1β 表达明显较对照组高,定位检测表明 IL-1β 主要位于肾小球和肾小管细胞内,提示肾脏固有细胞是 IL-1β 的主要来源,这与文献[7,8]报道相同。本组资料显示,阿霉素肾病大鼠后期肾组织 IL-1β 表达升高,肾脏局部存在较严重的炎症反应,是发生肾小球硬化的重要危险因素。

HMG-CoA 还原酶抑制剂,即他汀类药物,通过阻断甲羟戊酸途径,从而降低血浆胆固醇水平,是临床上常用的安全有效的降血脂药物。由于甲羟戊酸是细胞内一些信号蛋白的前体,参与细胞的信号转导、转录因子的活化等重要的生理过程[9],因此,他汀类药物除了降血脂作用外,还发挥抗炎、抗细胞增殖、免疫调节等多种效应。既往已有资料证实,辛伐他汀可以减轻梗阻性肾病和高血压肾病模型大鼠的肾脏病理改变[10],对于阿霉素肾病大鼠的保护作用报道较少。本组资料显示,与模型组相比,辛伐他汀治疗对血脂影响无明显差异,这可能与本组实验辛伐他汀的剂量较小有关[11];辛伐他汀治疗能显著降低肾病大鼠肾组织内 IL-1β 表达,与肾小球硬化和肾功能的改善相一致,提示辛伐他汀延缓肾小球硬化的发生和保护肾功能的作用与其抑制肾组织内 IL-1β 表达密切相关,且不依赖于其降血脂效应。辛伐他汀抑制肾脏局部 IL-1β 的异常表达的机制可能与阻断甲羟戊酸途径,影响炎症上游核转录因子的活化及通过调节 PPAR-α 途径降低 IL-1β 的表达有关[12]。

综上所述,阿霉素肾病后期,肾组织 IL-1β 表达上调是发生肾小球硬化的重要危险因素,辛伐他汀可以不依赖于其降血脂效应,通过抑制肾脏局部 IL-1β 的异常表达而减轻肾小球硬化的程度,为 HMG-CoA 还原酶抑制剂在临床肾脏疾病中的应用提供了理论依据。

参考文献:

[1] Franzen R, Pautz A, Brautigam L, *et al*. Interleukin-1beta induces chronic activation and de novo synthesis of neutral ceramidase in renal mesangial cells [J]. J Biol Chem, 2001, 276(38): 35382 -35389.

[2] Jain M K, Ridker P M. Anti-inflammatory effects of statins: clinical evidence and basic mechanisms [J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4(12): 977 -987.

[3] Navarro J F, Milena F J, Mora C, *et al*. Renal pro-inflammatory cytokine gene expression in diabetic nephropathy: effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and pentoxifylline administration [J]. Am J Nephrol, 2006, 26(6): 562 -570.

[4] Rodriguez-Iturbe B, Quiroz Y, Shahkarami A, *et al*. Mycophenolate mofetil ameliorates nephropathy in the obese Zucker rat [J]. Kidney Int, 2005, 68(3): 1041 -1047.

[5] Campese V M, Park J. HMG-CoA reductase inhibitors and the kidney [J]. Kidney Int, 2007, 71(12): 1215 -1222.

[6] Segerer S, Nelson P J, Schlondorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies [J]. J Am Soc Nephrol, 2000, 11(1): 152 -176.

[7] Tesch G H, Yang N, Yu H, *et al*. Intrinsic renal cells are the major source of interleukin-1 beta synthesis in normal and diseased rat kidney [J]. Nephrol Dial Transplant, 1997, 12(6): 1109 -1115.

[8] Niemir Z I, Stein H, Dworacki G, *et al*. Podocytes are the major source of IL-1 alpha and IL-1 beta in human glomerulonephritides [J]. Kidney Int, 1997, 52(2): 393 -403.

[9] Mason J C. Statins and their role in vascular protection [J]. Clin Sci (Lond), 2003, 105(3): 251 -266.

[10] Vieira J M Jr, Rodrigues L T, Mantovani E, *et al*. Statin monotherapy attenuates renal injury in a salt-sensitive hypertension model of renal disease [J]. Nephron Physiol, 2005, 101(4): p82 -p91.

[11] Zoja C, Corna D, Rottoli D, *et al*. Effect of combining ACE inhibitor and statin in severe experimental nephropathy [J]. Kidney Int, 2002, 61(5): 1635 -1645.

[12] Inoue I, Goto S, Mizotani K, *et al*. Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: reduction of MRNA levels for interleukin-1beta, interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in primary endothelial cells [J]. Life Sci, 2000, 67(8): 863 -876.

(编辑　龙　亮)