论著

文章编号:1000-5404(2014)01-0042-04

UUO大鼠在厄贝沙坦联合他汀干预下对HIF-1α与HSP47表达的影响

袁 静[1*],雷 泓[2*],查 艳[1],杨 霞[1],沈 燕[1],胡 英[1],谢 莹[1],曾 雯[1] (550002 贵阳,贵州省人民医院肾脏泌尿疾病研究所[1];558000 贵州 都匀,黔南州人民医院肾内科[2])

[摘要] **目的** 探讨低氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor 1α ,HIF-1α)及热休克蛋白47(heat shock protein 47,HSP47)在单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)大鼠模型中的表达,分析血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂厄贝沙坦(Angiotensin Ⅱ receptor blocker,ARB)联合他汀对其表达的影响。**方法** 应用单侧输尿管结扎手术建立UUO大鼠模型,将健康成年的雄性SD大鼠随机分为:模型组($n=10$)、假手术组($n=10$)、厄贝沙坦60 mg/L组($n=10$)、洛伐他汀20 mg/L+厄贝沙坦60 mg/L组($n=10$)。术前2 d给药,模型组、假手术组仅予5 mL生理盐水灌胃。观察4组大鼠第2周肾组织病理学改变,应用原位杂交和蛋白印迹检测HIF-1α、HSP47在肾小管间质中的表达。**结果** UUO造模后2周与假手术组比较,模型组肾组织有高水平HIF-1α mRNA,并出现HIF-1α蛋白高表达,主要分布在小管间质细胞的细胞质;HIF-1α mRNA的表达与HSP47 mRNA的表达呈正相关($r=0.715$,$P<0.05$)。HIF-1α蛋白表达部位及程度与HSP47一致,厄贝沙坦60 mg/L治疗组、洛伐他汀20 mg/L+厄贝沙坦60 mg/L治疗组大鼠肾小管间质细胞的HIF-1α mRNA和蛋白、HSP47 mRNA表达显著减少($P<0.05$)。**结论** 厄贝沙坦联合洛伐他汀治疗可能通过降低UUO大鼠HIF-1α与HSP47在肾小管间质中的表达而发挥肾脏保护作用。

[关键词] HIF-1α;HSP47;厄贝沙坦;洛伐他汀;肾纤维化

[中图法分类号] R-332; R693.2; R972.4 [文献标志码] A

Expression alteration of HIF-1α and HSP47 in rats with chronic renal tubulointerstitial fibrosis after irbesartan treatment combined with statin

Yuan Jing[1], Lei Hong[2], Zha Yan[1], Yang Xia[1], Shen Yan[1], Hu Ying[1], Xie Ying[1], Zeng Wen[1] ([1]Institute of Nephritic and Urinary Diseases, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou Province, 550002; [2]Department of Nephrology, People's Hospital of Qiannan, Duyun, Guizhou Province, 558000, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the expression of hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) and heat shock protein 47 (HSP47) in rats with chronic kidney fibrosis, and changes of the expression after the treatment of statins and Angiotensin Ⅱ receptor blocker, irbesartan. **Methods** A total of 40 healthy adult male rats were divided into 4 groups, that is, unilateral ureteral obstruction group (UUO, $n=10$), sham operation group ($n=10$), lovastatin (20 mg/L) and irbesartan (60 mg/L) intervention group ($n=10$), and irbesartan intervention group ($n=10$). Normal saline and corresponding drugs were given to corresponding rats in 2 d before operation. In 2 weeks after operation, the renal tissues were observed for histopathological changes. *In situ* hybridization was applied to measure collagen in the kidney, and Western blotting was used to detect the expression of HIF-1α and HSP47 in the renal tubulointerstitium. **Results** In 2 weeks after UUO operation, HIF-1α mRNA and protein were highly expressed in the cytoplasm of renal interstitial cells in UUO group than in sham operation group. The expression of HIF-1α mRNA was positively correlated with that of HSP47 mRNA ($r=0.715$, $P<0.01$). Meanwhile, the level of HIF-1α mRNA and protein, and HSP47 mRNA was also down-regulated ($P<0.05$), especially after union treatment of lovastatin and irbesartan.

[基金项目] 贵州省科学技术基金([2010]2173);贵州省优秀科技教育人才省长专项资金([2010]89);贵州省国际科技合作计划([2012]7045)

* 同等贡献者

[通信作者] 查 艳,电话:(0851)5923769, E-mail:zhayan72@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131022.1411.012.html(2013-10-22)

Conclusion Combined treatment of lovastatin and irbesartan may decrease the expression of HIF-1α and HSP47 in tubulointerstiltium to protect kidney in rat models of developing nephritis.

[**Key words**] HIF-1α; HSP47; lovastatin; irbesartan; kidney fibrosis

Supported by the Foundation of Science and Technology of Guizhou Province (2010-2173), the Governor Special Foundation for Outstanding Talents of Science and Technology Education in Guizhou Province (2010-89) and the International Cooperation Project of Guizhou Province(2012-7045). Yuan Jing and Lei Hong are first authors who contributed equally to the article. Corresponding author: Zha Yan, Tel: 86-851-5923769, E-mail: zhayan72@126.com

肾小管间质纤维化病变程度与肾功能损害程度呈正相关,也是导致终末期肾衰的重要原因[1]。肾素血管紧张素系统的激活(renin-angiotensin-system, RAS)在肾间质纤维化中发挥着重要的促进作用[2]。单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)模型持续输尿管梗阻引起的慢性炎症和间质纤维化可导致肾功能的进行性丧失[3]。研究指出,在肾脏缺氧缺血损伤中,低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor 1α, HIF-1α)主要表达在肾小管间质细胞[4]。缺氧缺血状态可诱导 HIF-1α 表达增加,并启动下游基因表达上调。本研究检测 HIF-1α/热休克蛋白 47(heat shock protein 47, HSP47)的表达,分析两者相关性,观察血管紧张素受体拮抗剂和调脂药物联合运用是否间接通过对 HIF-1α 介导的 HIF-1α/HSP47 途径的干预,抑制和逆转了肾小管-间质纤维化的进展,以期揭示 HIF-1α/HSP47 在肾纤维化过程中的致病机制,为慢性肾纤维化治疗的新作用靶点提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

SD 雄性 3 月龄大鼠 40 只,许可证号 scxk(渝)2007-0005,由重庆腾鑫比尔实验动物销售有限公司提供。随机数字法分为模型组($n=10$)、假手术组($n=10$)、厄贝沙坦 60 mg/L 组($n=10$)、洛伐他汀 20 mg/L + 厄贝沙坦 60 mg/L 组($n=10$)。术前 2 d 开始给药,每天 1 次,持续至术后 2 周,假手术组、模型组仅予5 mL 生理盐水灌胃。按文献[5]的方法建立梗阻性肾病大鼠模型:单侧输尿管结扎术后 2 周麻醉,脱髓处死所有大鼠,剖取左侧肾脏,用 10% 中性甲醛溶液固定,石蜡包埋切片备用。

1.2 组织学检查

石蜡切片 HE 染色,光镜下双盲法观察肾皮质间质变化。

1.3 原位杂交检测 HIF-1α、HSP47 mRNA 表达

取 2 μm 厚石蜡切片,脱蜡至水,热修复抗原,抗原抗体反应,DAB 显色、脱水、透明、封片、显微镜观察。HIF-1α、HSP47 mRNA 原位杂交所用探针为经地高辛标记的针对 HIF-1α、HSP47 基因的多相寡核苷酸探针,按试剂盒说明书进行。测算每高倍镜视野 HIF-1α、HSP47 表达阳性的细胞数。同时应用 IPP 软件,检测各组切片染色的 IOD 值。

1.4 Western blot 检测 HIF-1α、HSP47 蛋白表达

细胞用预冷的 PBS 洗 2 遍加入组织裂解液冰浴 1 h,4 ℃、14 000 r/min 离心 15 min,取上清,Lowry 法测定蛋白浓度。每上样孔加 75 μg 总蛋白行 12% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。湿转法电转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉 37 ℃封闭 1 h,加封闭液稀释的一抗(1∶1 000)于 4 ℃过夜;洗膜后加辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗羊 IgG(1∶5 000) 37 ℃孵育 1.5 h;洗膜后加化学发光剂 ECL 反应 1 min,曝光、冲洗后扫描蛋白条带。以 β-actin 为内参照,用 Lobwork 分析系统软件对 Western blot 条带进行定量分析。

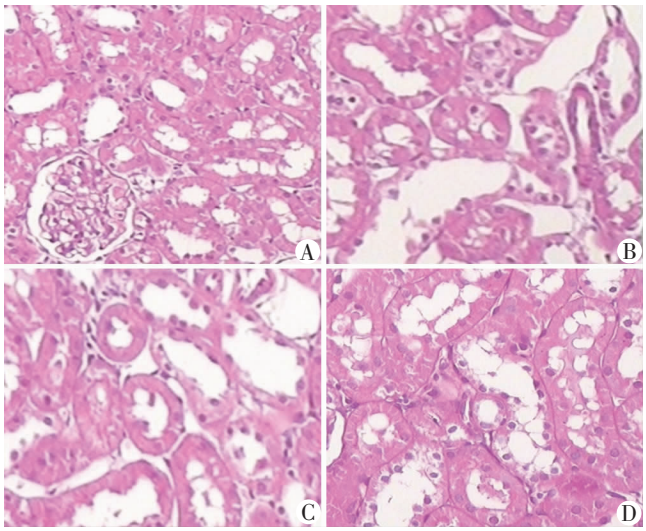
1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数比较采用方差分析。

2 结果

2.1 厄贝沙坦联合洛伐他汀治疗对 UUO 模型大鼠肾组织形态学变化的影响

假手术组肾小球、肾小管未见异常病变(图 1A);模型组可见肾小球严重萎缩,系膜区增宽,小管腔增大,近曲小管为主的上皮细胞肿胀、空泡状变性,部份肾小管上皮细胞脱落,小管间质结构紊乱,呈纤维化、萎缩倾向(图 1B);应用厄贝沙坦治疗后,肾脏损害程度减轻(图 1C),应用厄贝沙坦联合洛伐他汀组肾脏损害程度减轻更为明显(图 1D)。



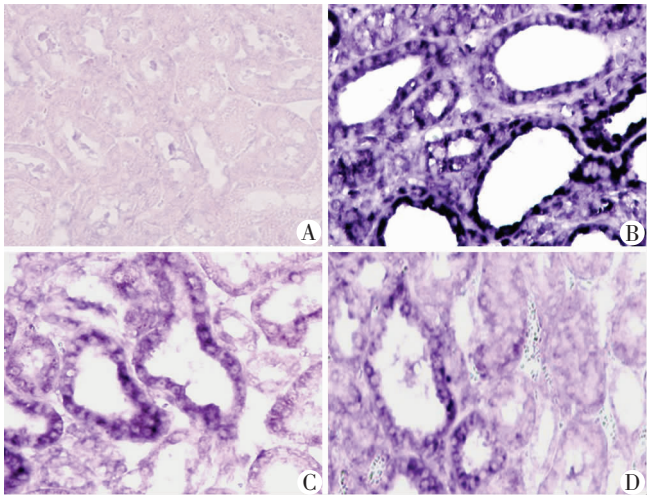
A:假手术组;B:模型组;C:厄贝沙坦 60 mg/L 组;D:洛伐他汀 20 mg/L + 厄贝沙坦 60 mg/L 组

图 1 厄贝沙坦联合洛伐他汀对 4 组大鼠肾组织病理改变的影响 (HE ×200)

2.2 厄贝沙坦联合洛伐他汀对 UUO 模型大鼠肾小管间质 HIF-1α 表达的影响

2.2.1 原位杂交检测 4 组大鼠肾小管间质 HIF-1α mRNA 的表达 HIF-1α mRNA 主要集中于肾小管上皮细胞和间质细

胞的细胞质,假手术组 HIF-1α mRNA 表达极少,模型组 HIF-1α mRNA 的表达较假手术组显著增加,表明模型组处于显著氧化应激状态($P<0.01$)。厄贝沙坦 60 mg/L 组 HIF-1α mRNA 的表达较模型组显著下降($P<0.05$),洛伐他汀 20 mg/L + 厄贝沙坦 60 mg/L 组 HIF-1α mRNA 的表达下降更为显著,与厄贝沙坦 60 mg/L 组比较差异有统计学意义($P<0.05$,图 2、表 1)。



A:假手术组;B:模型组;C:厄贝沙坦 60 mg/L 组;D:洛伐他汀 20 mg/L + 厄贝沙坦 60 mg/L 组

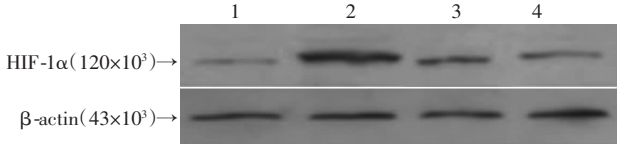
图 2 厄贝沙坦联合洛伐他汀对 4 组大鼠肾小管间质 HIF-1α mRNA 表达的影响 (原位杂交 ×200)

表 1 4 组大鼠 HIF-1α、HSP47mRNA IOD 值($n=10$, $\bar{x}\pm s$, $\times10^3$)

组别	HIF-1α	HSP47
假手术组	2.36 ± 0.34	2.34 ± 0.25
模型组	46.32 ± 6.34[a]	53.97 ± 6.38[a]
厄贝沙坦 60 mg/L 组	20.28 ± 2.73[b]	35.46 ± 4.17[b]
洛伐他汀 20 mg/L + 厄贝沙坦 60 mg/L 组	9.46 ± 2.25[c]	15.65 ± 2.73[bc]

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.01$,与模型组比较;c:$P<0.01$,与厄贝沙坦 60 mg/L 组比较

2.2.2 Western blot 检测 4 组大鼠肾小管间质 HIF-1α 蛋白的表达 模型组肾小管间质 HIF-1α 蛋白的表达较假手术对照组明显增加,表明模型组处于显著氧化应激状态($P<0.01$)。厄贝沙坦 60 mg/L 治疗组 HIF-1α 蛋白的表较模型组显著下降($P<0.05$),而洛伐他汀 20 mg/L + 厄贝沙坦 60 mg/L 治疗组 HIF-1α 蛋白的表达下降更为显著,与厄贝沙坦 60 mg/L 治疗组比较差异有统计学意义($P<0.05$,图 3)。



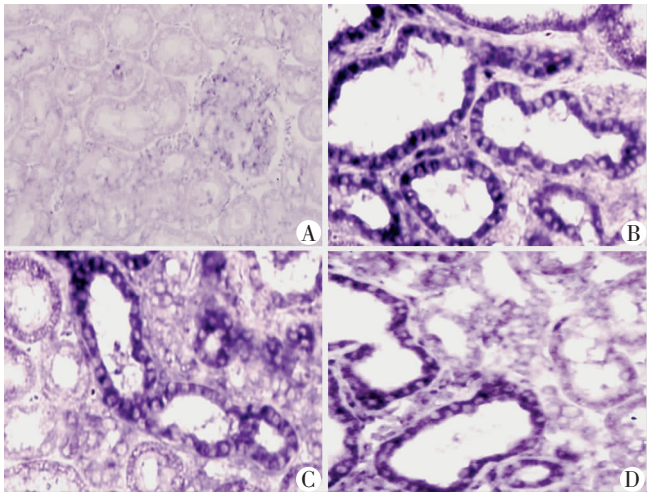
1:假手术组;2:模型组;3:厄贝沙坦 60 mg/L 组;4:洛伐他汀 20 mg/L + 厄贝沙坦 60 mg/L 组

图 3 Western blot 检测 4 组大鼠肾小管间质 HIF-1α 蛋白表达

2.3 厄贝沙坦联合洛伐他汀对 UUO 模型大鼠肾小管间质 HSP47 表达的影响

2.3.1 原位杂交检测各组大鼠肾小管间质 HSP47 mRNA 的表达 HSP47 mRNA 主要集中于肾小管上皮细胞和间质细胞的细胞质,假手术对照组 HSP47 mRNA 表达极少,模型组较假手术对照组明显增加,表明模型组肾小管间质纤维化程度明显增加($P<0.01$)。厄贝沙坦 60 mg/L 治疗组 HSP47 mRNA 的表达较模型组显著下降($P<0.05$),洛伐他汀 20 mg/L + 厄贝沙坦 60 mg/L 治疗组 HSP47 mRNA 的表达下降更为显著,与厄贝沙坦 60 mg/L 治疗组比较差异有统计学意义($P<0.05$,图 4)。

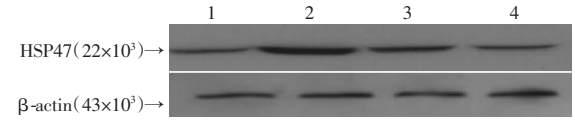
据图 2 及图 4 结果分析得出,HIF-1α 与 HSP47 mRNA 表达部位相一致,且表达呈正相关($r=0.715$, $P<0.01$)。



A:假手术组;B:模型组;C:厄贝沙坦 60 mg/L 组;D:洛伐他汀 20 mg/L + 厄贝沙坦 60 mg/L 组

图 4 厄贝沙坦联合洛伐他汀对 4 组大鼠肾小管间质 HSP47 mRNA 表达的影响 (原位杂交 ×200)

2.3.2 Western blot 检测 4 组大鼠肾小管间质 HSP47 蛋白的表达 模型组肾小管间质 HSP47 蛋白的表达较假手术对照组明显增加($P<0.01$)。厄贝沙坦 60 mg/L 治疗组 HSP47 蛋白的表达较模型组显著下降($P<0.05$),洛伐他汀 20 mg/L + 厄贝沙坦 60 mg/L 治疗组 HSP47 蛋白的表达下降更为显著,与厄贝沙坦 60 mg/L 治疗组比较差异有统计学意义($P<0.05$,图 5)。



1:假手术组;2:模型组;3:厄贝沙坦 60 mg/L 组;4:洛伐他汀 20 mg/L + 厄贝沙坦 60 mg/L 组

图 5 Western blot 检测 4 组大鼠肾小管间质 HSP47 蛋白的表达

3 讨论

肾小管间质纤维化是决定肾脏疾病进展的主要因素。HIF-1 属于转录因子,由 α/β 两个亚基形成异源二聚体。HIF-1α 在体内受氧浓度调节;而 HIF-1β 对低氧不敏感,所以 HIF-1α 蛋白可作为低氧的指标[6]。最新研究[7]通过应用 5/6 肾切除鼠模型证实了 HIF-1α 在肾纤维化中的作用。

研究表明,在肾脏缺氧损伤中,HIF-1α 主要表达

在肾小管间质细胞上[4]。缺氧缺血可诱导HIF-1α表达的增加，HIF-1α启动下游基因表达上调，如：HSP47、血管内皮生长因子、促红细胞生成素、乳酸脱氢酶、血小板衍生生长因子、一氧化氮合酶等，同时HIF-1α参与了缺氧细胞的能量代谢及氧利用障碍发生机制。目前他汀类调脂药物非调脂作用的肾脏保护机制尚未明了。HSP47是一种胶原特异性的“分子伴侣”，其表达增加与间质过度积聚胶原有密切关系[8-9]。但关于联合运用他汀类调脂药和厄贝沙坦药物是否间接通过对HIF-1α介导的HIF-1α/HSP47途径的干预，抑制和逆转肾小管间质纤维化的进展，从而揭示HIF-1α/HSP47在肾纤维化过程中的致病机制尚少见报道。因此，笔者在UUO大鼠模型中，以氧浓度敏感的HIF-1α为低氧标志物，在慢性低氧状态下，检测肾小管间质细胞HIF-1α mRNA及HSP47 mRNA的表达，以及予不同他汀类及血管紧张Ⅱ-Ⅰ型受体拮抗剂（ARB）类药物干预后上述因子表达的变化，并观察肾组织病理形态学的改变，探索ARB及他汀类药物在慢性低氧下是否对肾小管间质损害有抑制作用及其可能机制。

厄贝沙坦是一种血管紧张素Ⅱ-Ⅰ型受体拮抗剂，这类药物能减少尿蛋白滤过，抑制细胞增殖、肥大、减少肾小球细胞外基质蓄积，延缓肾小球硬化及肾间质纤维化的进展[10]。3-羟-甲基戊二酰辅酶A（HMG-CoA）还原酶抑制剂他汀类药物是临床上疗效确切的抗动脉粥样硬化药物和调脂药。近年对其深入研究，认识到该类药物除具有调节血脂作用，还具有抗细胞增殖、抗炎症、免疫调节等非依赖调脂的保护肾脏作用[11]，其可能机制：①抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡；②抗炎症和保护内皮细胞；③改善肾脏血流动力学。研究指出他汀类药物可抑制血管内皮细胞与平滑肌细胞HIF-1α表达[12]。但他汀类药物联合ARB治疗前后对HIF-1α、HIF-1α/HSP47之间的关系目前少见报道。

本研究单用厄贝沙坦治疗组、厄贝沙坦联合他汀组肾小管间质细胞的HIF-1α mRNA、HSP47 mRNA含量显著减少（$P<0.05$），尤其在厄贝沙坦联合他汀组，另应用厄贝沙坦后，肾小球系膜、基底毁损、小管结构破坏程度以及小管周间质纤维化程度减轻，尤其在厄贝沙坦联合他汀组上述组织病理损害减轻更为显著。表明，在UUO大鼠模型中，对于改善肾间质组织病理学改变，调脂药物和ARB类药物的联合应用的效果优于单用ARB类药物。

本研究证实调脂药物和ARB可能间接通过对HIF-1α介导的HIF-1α/HSP47途径的干预，抑制并改善肾纤维化的进展，改善肾功能。因此，我们认为在UUO大鼠模型中，ARB联合他汀类药物可能通过减少HIF-1α的表达，从而抑制肾间质炎症反应，起到减轻肾间质纤维化及保护肾功能的作用。

参考文献：

[1] Nasu T, Kinomura M, Tanabe K, *et al*. Sustained-release prostacyclin analog ONO-1301 ameliorates? tubulointerstitial? alterations in a mouse? obstructive nephropathy? model[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2012, 302(12): F1616 - F1629.

[2] Takahashi K, Hirose T, Mori N, *et al*. The renin-angiotensin system, adrenomedullins and urotensin Ⅱ in the kidney: possible renoprotection via the kidney peptide systems[J]. Peptides, 2009, 30(8): 1575 -1585.

[3] Vidyasagar A, Reese S R, Hafez O, *et al*. Tubular expression of heat-shock protein 27 inhibits fibrogenesis in obstructive nephropathy[J]. Kidney Int, 2013, 83(1): 84 -92.

[4] 袁静，杨霞，龙艳君，等. 厄贝沙坦对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织缺氧诱导因子1α和结缔组织生长因子表达的影响[J]. 中华肾脏病杂志，2013，29(2)：119 -123.

[5] Chevalier R L, Forbes M S, Thornhill B A. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy [J]. Kidney Int, 2009, 75(11): 1145 -1152.

[6] Higgins D F, Biju M P, Akai Y, *et al*. Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 287 (6): F1223 -F1232.

[7] Deng A, Arndt M A, Satriano J, *et al*. Renal protection in chronic kidney disease: hypoxia-inducible factor activation *vs*. angiotensin Ⅱ blockade[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 299(6): F1365 -F1373.

[8] Klahr S. Obstructive nephropathy[J]. Intern Med, 2000, 39(5): 355 -361.

[9] Moriyama T, Kawada N, Ando A, *et al*. Up-regulation of HSP47 in the mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction[J]. Kidney Int, 1998, 54(1): l10 -119.

[10] Zhao G, Zhao H, Tu L, *et al*. Effects and mechanism of irbesartan on tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2010, 30(1): 48 -54.

[11] Marusic S, Lisicic A, Horvatic I, *et al*. Atorvastatin-related rhabdomyolysis and acute renal failure in a genetically predisposed patient with potential drug-drug interaction[J]. Int J Clin Pharm, 2012, 34 (6): 825 -827.

[12] Wilson S H, Herrmann J, Lerman L O, *et al*. Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasa vasorum in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering[J]. Cireulation, 2007, 105(4): 415 -418.

（**收稿**：2013-06-10；**修回**：2013-11-23）

（编辑 龙 亮）