

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01293

## 过氧化物酶增殖物激活受体- $\gamma$ 在大鼠肾脏组织衰老过程中的表达变化及其与氧化应激的关系

张颖玮, 时多, 熊锡山, 张红, 胡惠民, 梅长林\*

第二军医大学长征医院肾内科, 上海 200003

**[摘要]** **目的:**观察过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )在不同年龄大鼠肾组织中的表达与分布,并进一步探讨其与衰老过程中氧化应激的关系。**方法:**选用3个月龄、12个月龄、24个月龄自然衰老SD大鼠为模型,Western印迹分析PPAR $\gamma$ 在不同年龄大鼠肾组织中的表达,通过测定超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的活性反映肾组织细胞抗氧化能力。**结果:**应用Western印迹检测肾脏PPAR $\gamma$ 的蛋白表达,发现PPAR $\gamma$ 蛋白在大鼠肾组织中表达随月龄下降,3个月龄肾组织中PPAR $\gamma$ 表达明显高于24个月龄大鼠( $P < 0.01$ );SOD、GSH-PX活性均随月龄增加明显下降( $P < 0.01$ ),两者的活性均与PPAR $\gamma$ 蛋白的表达呈明显正相关( $r = 0.900, r = 0.890, P$ 均 $< 0.01$ )。**结论:**PPAR $\gamma$ 在大鼠肾组织衰老过程中呈下降趋势,这种变化与肾脏组织抗氧化应激能力下降有关。

**[关键词]** 肾;过氧化物酶增殖物激活受体- $\gamma$ ;衰老;氧化应激

**[中图分类号]** R 692 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)11-1293-03

### Expression of peroxisome proliferators-activate receptor $\gamma$ in renal tissue of aging rats and its relationship with oxidative stress

ZHANG Ying-wei, SHI Duo, XIONG Xi-shan, ZHANG Hong, HU Hui-min, MEI Chang-lin\*

Department of Nephrology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the expression of peroxisome proliferator-activate receptor  $\gamma$ (PPAR $\gamma$ ) in the kidneys of rats at different ages, so as to study the possible association of PPAR $\gamma$  expression with oxidative stress in the aging process. **Methods:** Rat aging model was established using 3-, 12-, and 24-month old rats. Western blotting was used to determining the protein expression of PPAR $\gamma$ . The changes anti-oxidative ability of renal tissue were studied by determining the activities of superoxidisedismutase(SOD) and glutathione peroxidase(GSH-PX). **Results:** Western blotting assay showed that the renal expression of PPAR $\gamma$  protein decreased with the aging of rats, with that of 3-month group significantly higher than that of the 24-month group( $P < 0.01$ ). The activities of SOD and GSH-PX decreased with the aging of rats( $P < 0.01$ ). Both the SOD activities were positively correlated with the expression of PPAR $\gamma$  protein( $r = 0.90, r = 0.89, P < 0.01$ ). **Conclusion:** Renal PPAR $\gamma$  has a decreasing tendency during the aging process of rats, which is correlated with the down-regulation of anti-oxidative ability of renal tissue.

**[KEY WORDS]** kidney; peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; aging; oxidative stress

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(11):1293-1295]

衰老,亦称老化,是指随着年龄增长而产生的一系列生理学和解剖学的变化,也是人体对内外环境适应能力逐渐减退的表现<sup>[1]</sup>。肾脏内的氧供十分丰富,血供量大,是机体内最易产生氧自由基(OFR)的器官之一。随着自由基化学和自由基生物学的研究深入发展,现普遍认为氧自由基等是损伤肾组织的

主要因素<sup>[2]</sup>。过氧化物酶增殖物激活受体- $\gamma$ (PPAR $\gamma$ )是一种胰岛素增敏剂,近年来在治疗糖尿病肾病研究中一直是热点。它不仅能增加胰岛素敏感性,参与糖类、脂质代谢,而且对糖尿病肾病及非糖尿病肾病患者均具有降压、降蛋白尿,保护肾脏等作用<sup>[3]</sup>。Villegas等<sup>[4]</sup>报道过氧化物酶增殖物激活

**[收稿日期]** 2008-04-08 **[接受日期]** 2008-09-27

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(2007CB07400). Supported by the National Basic Research Program(“973 Program”)(2007CB507400).

**[作者简介]** 张颖玮,博士,主治医师。现在济南军区总医院肾内科,济南 250031. E-mail:zywz118@yahoo.com.cn

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-25070386, E-mail:Chlmei@public.star.net.cn

受体激动剂类药物罗格列酮(rosiglitazone)具有降低超氧化物歧化酶(SOD)的活性,进而减少活性氧(ROS)的产生,以对抗氧化应激的作用。PPAR $\gamma$ 在健康大鼠肾脏的随龄表达如何?它是否参与了调节肾脏衰老的过程?其相关文献报道还很少。本研究旨在观察 PPAR $\gamma$  在大鼠衰老过程中肾组织的表达,并探讨其随龄表达分布与肾脏衰老过程中氧化应激的关系,为进一步阐明衰老机制及其预防提供实验依据。

### 1 材料和方法

1.1 动物分组及标本留取 SD 雄性大鼠(第二军医大学实验动物中心提供),常规条件下于第二军医大学实验动物中心分笼饲养,保持 12 h 的昼夜循环,室温控制在 23℃ 左右,湿度维持在 40%~50%,自由进食水。分别饲养至 3、12、24 个月龄(3 个月龄组、12 个月龄组、24 个月龄组,  $n=10$ ),断头处死,放血干净,生理盐水冲洗肾脏,一侧肾脏迅速分割后置于液氮保存,随后 -80℃ 保存留待蛋白质等检测中使用,对侧肾脏立即制备组织匀浆。

1.2 试剂 一抗 PPAR $\gamma$  的兔多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG, ECL 显色系统均购自美国 MILLIPORE 公司。核蛋白抽提试剂盒为 Pierce 公司产品,BCA-100 蛋白定量试剂盒为上海申能博彩公司产品。SOD、GSH-PX 测定试剂盒均购自南京建成生物试剂公司。

1.3 SOD 及 GSH-PX 活力测定 取肾组织块约 0.3~0.5 g,加入冷生理盐水,用眼科小剪尽快剪碎(在冰水浴中进行),倒入玻璃匀浆管中,于冰水浴中研磨 6~8 min,制备成质量体积分数为 10% 的组织匀浆,2 500×g,离心 10 min,取组织匀浆上清再用生理盐水按 1:9 体积比稀释,参照试剂盒说明测定组织匀浆上清中 SOD、GSH-PX 的浓度。

1.4 PPAR $\gamma$  蛋白的测定 取 -80℃ 保存的组织约 100 mg,按照核蛋白提取试剂盒说明书进行操作,将最后得到的约 200  $\mu$ l 核蛋白提取液每管 20  $\mu$ l 分装, -80℃ 保存待用。上样 15  $\mu$ l, SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,加入 1:500 稀释的兔抗 PPAR  $\gamma$  一抗及 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗。ECL 检测试剂盒显影, X 线片压片曝光, KO-DAK 凝胶成像分析系统分析结果。检测后的膜重新封闭 10 min,于清除缓冲液孵育 30 min, TBST 清洗 2 次,再封闭过夜,重复上述步骤进行内参照 Histone-H(一抗 1:500 稀释,二抗 1:5 000 稀释)的结

合。PPAR $\gamma$  蛋白相对表达量以其特异性结合条带与内参结合条带的光密度( $D$ )比值表示。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计分析软件,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用  $t$  检验,多组间采用单因素方差分析及直线相关分析。

### 2 结果

2.1 大鼠肾组织 SOD、GSH-PX 活性的测定结果 如图 1 所示,肾组织中的 SOD 和 GSH-PX 在随着月龄增加而明显下降,24 月龄组和 3 月龄组相比( $P<0.01$ )、12 月龄组与 3 月龄组相比均具有统计学意义( $P<0.05$ )。

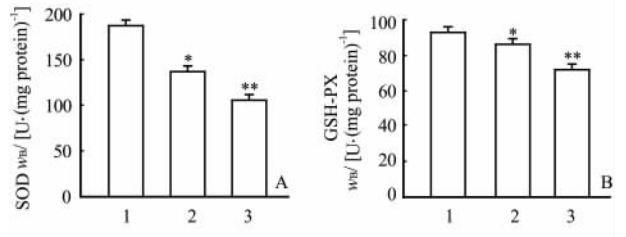


图 1 大鼠肾组织衰老过程中 SOD(A)、GSH-PX 活性(B)的改变

Fig 1 Activity of SOD(A) and GSH-PX(B) of rats kidney in various groups

1: 3-month-old group; 2: 12-month-old group; 3: 24-month-old group. \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$  vs 3-month-old group

2.2 PPAR $\gamma$  在大鼠肾组织中的蛋白表达结果 应用 Western 印迹检测肾脏 PPAR $\gamma$  的蛋白表达(图 2),发现 PPAR $\gamma$  蛋白在 3 个月龄大鼠肾组织中表达明显高于 24 个月龄大鼠( $P<0.01$ ),12 个月龄组与 3 个月龄组相比及 24 个月龄组与 12 个月龄组相比均无统计学差异。

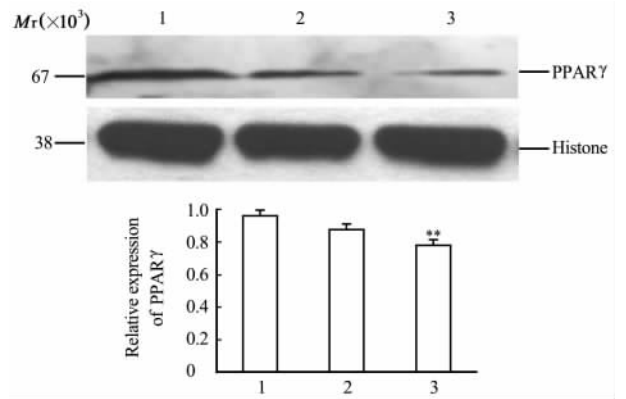


图 2 Western 印迹分析 PPAR $\gamma$  在肾脏衰老过程中的表达  
Fig 2 Western blotting analysis of PPAR $\gamma$  protein expression during rat kidney aging

1: 3-month-old group; 2: 12-month-old group; 3: 24-month-old group. \*\*  $P<0.01$  vs 3-month-old group;  $n=3, \bar{x} \pm s$

2.3 PPAR $\gamma$  与 SOD、GSH-PX 相关性分析 肾组织中 PPAR $\gamma$  蛋白的表达与 SOD、GSH-PX 均呈线型正相关( $r=0.90, r=0.89, P$  均 $<0.01$ )。

### 3 讨论

PPAR $\gamma$  是核内受体转录因子超家族成员之一, 目前已发现有 3 种类型的 PPARs: PPAR- $\alpha$ 、PPAR- $\beta$ 、PPAR $\gamma$ , 它们在肾脏均有不同程度的表达。激活的 PPAR $\gamma$  可以促进脂肪组织中某些与葡萄糖转运和利用相关基因的表达, 与葡萄糖的吸收和利用之间有着非常密切的联系, 它还可以诱导脂肪组织分化、促进三酰甘油的贮存<sup>[5]</sup>, 在脂肪生成、胰岛素敏感性、细胞周期调节及细胞分化、炎症反应中起重要作用<sup>[6]</sup>。

衰老作为生物体全身各组织、器官的退行性变化, 是诸多病理、生理过程综合作用的结果。衰老的代谢学说认为: 衰老是机体代谢性障碍的结果, 而糖代谢在三大物质代谢中具有很重要的意义, 糖代谢紊乱必然会引起心、肝、脑、肺、肾等重要脏器代谢异常, 最终出现衰老。肾脏是人体器官中衰老变化最为明显的器官之一, 关于肾脏衰老的分子机制有很多, 其中氧化应激对肾组织的损伤作用已公认是肾脏衰老的发病机制之一<sup>[7]</sup>。体内自由基的含量随增龄而积累, 人体衰老之后, 体内 ROS 水平不断增加, 糖尿病、胰岛素抵抗的发生率提高。目前热量限制可延缓衰老的观点已被普遍接受, 其能量代谢途径特点就是增高胰岛素的敏感性(insulin sensitivity), 和(或)葡萄糖利用的有效性(glucose effectiveness)<sup>[8]</sup>。很多年前就有学者建议使用双胍类降糖药物作为抗衰老治疗药物<sup>[9]</sup>, PPAR $\gamma$  不仅可以调节胰岛素应答基因的转录, 还可以增加胰岛素抵抗外周组织对葡萄糖的利用, 有研究<sup>[10]</sup>显示 PPAR 与 DNA 上 PPAR 反应元件 PPRE(PPAR response element) 的结合参与了 SOD 基因启动子的调控, PPARs 与 DNA 上的 PPRE 结合能诱导大鼠细胞 SOD 基因的表达, 增加了氧自由基的清除。目前有关 PPAR $\gamma$  抗氧化抗衰老的机制国内外研究较少, 仅推测其可能机制之一是通过抗炎作用<sup>[11]</sup>。衰老时由于内分泌失调、免疫介导、代谢异常等一系列因素, 使前炎症因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  等在组织、器官中表达或释放增加, 单核细胞浸润, 形成基础的微炎症状态, 这也是衰老的标志之一, 炎症过程可以产生大量有杀伤能力的 ROS, 消耗机体正常情况下存在的抗氧化物。Sung 等<sup>[12]</sup>报道 PPAR $\gamma$  受体激动剂 2,4-thiazolidinedione 参与了与衰老相关

的氧化应激及炎症过程, 提出它能减轻与衰老相关的氧化应激反应。

本组结果显示在衰老过程中肾脏组织中 PPAR $\gamma$  的表达降低, 同时肾组织中的氧化应激标志物 SOD、GSH-PX 也分别呈现随龄下降趋势, 且具有相关性。推测 PPAR $\gamma$  可能参与了大鼠肾脏衰老过程调控, 调节肾组织抗氧化应激能力, 随着机体的衰老, PPAR $\gamma$  表达减少, 调节能力下降, 肾组织抗氧化能力下降, 这也与最近一些研究提出的观点类似<sup>[13]</sup>。基于以上实验研究结果, 提示 PPAR $\gamma$  受体激动剂类药物可能具有增加肾组织抗氧化应激能力, 从而延缓与肾脏衰老相关疾病的作用。

### [参考文献]

- [1] Schmitt R, Cantley L G. The impact of aging on kidney repair [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294: F1265-F1272.
- [2] Sohal R S. Oxidative stress hypothesis of aging [J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33: 573-574.
- [3] 周 君. PPAR $\gamma$  配体的肾脏保护作用 [J]. *海南医学*, 2006, 17: 156-158.
- [4] Villegas I, Martin A R, Toma W, de la Lastra C A. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, protects against gastric ischemia-reperfusion damage in rats: role of oxygen free radicals generation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 505(1-3): 195-203.
- [5] Michalik L, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors; three isotypes for a multitude of functions [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10: 564-570.
- [6] Masternak M M, Bartke A. PPARs in calorie restricted and genetically long-lived mice [J]. *PRAR Res*, 2007 (65): 28436-28443.
- [7] Sohal R S. Oxidative stress hypothesis of aging [J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33: 573-574.
- [8] Masoro E J. Dietary restriction [J]. *Exp Gerontol*, 1995, 30: 291-298.
- [9] Arivazhagan P, Thilakavathy T, Panneerselvam C. Antioxidant lipoate and tissue antioxidants in aged rats [J]. *Nutr Biochem*, 2000, 11: 122-127.
- [10] Yoo H Y, Chang M S, Rho H M. Induction of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene through the peroxisome proliferator-responsive element by arachidonic acid [J]. *Gene*, 1999, 234: 87-91.
- [11] von Knethen A, Brüne B. PPARgamma—an important regulator of monocyte/macrophage function [J]. *Arch Immunol Ther Exp(Warsz)*, 2003, 51: 219-226.
- [12] Sung B, Park S, Yu B P, Chung H Y. Amelioration of age-related inflammation and oxidative stress by PPAR $\gamma$  activator: suppression of NF- $\kappa$ B by 2,4-thiazolidinedione [J]. *Exp Gerontology*, 2006, 41: 590-599.
- [13] Moller D E, Berger J P. Role of PPARs in the regulation of obesity-related insulin sensitivity and inflammation [J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003, 27(Suppl 3): S17-S21.