

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00734

阿托伐他汀不依赖降血脂的肾脏保护作用

徐珍娥¹, 闫 凤², 阮雄中², 陈压西^{2*}, 李 秋^{1*}

1. 重庆医科大学附属儿童医院肾脏内科, 重庆 400014

2. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室脂质中心, 重庆 400016

[摘要] **目的** 探讨阿托伐他汀不依赖降血脂的肾脏保护作用的可能机制。**方法** 雄性 C57BL 小鼠给予普通饮食作为对照组, CD36/SR-A/ApoE 三敲小鼠随机分为高脂组和治疗组(高脂+阿托伐他汀)。实验满 14 周后处死取标本。采用酶法检测血清脂质水平; 油红“O”染色检测肾组织内脂质沉积情况, H-E、PAS、Masson 染色观察肾脏形态学改变; 定量 PCR 技术与免疫组化检测肾组织转化生长因子(TGF-β)、纤维连接蛋白(fibronectin)、I 型胶原、IV 型胶原、α 肌动蛋白(α-SMA)表达。**结果** 阿托伐他汀能够减少三敲小鼠肾脏组织脂质沉积, 但血清中的脂质水平无明显降低。阿托伐他汀可以减少高脂饮食诱导的肾脏组织系膜细胞的增生、系膜基质的沉积, 肾小管间质炎症细胞的浸润、肾小管的变性扩张, 细胞外基质的沉积。阿托伐他汀不但可以明显降低肾组织 TGF-β 的基因与蛋白表达, 还降低纤维化相关因子的基因与蛋白表达。**结论** 阿托伐他汀可不依赖降血脂, 独立于 SR-A、CD36 受体途径而发挥肾脏保护作用; 这种作用可能是通过降低 TGF-β 的表达而实现的。

[关键词] 阿托伐他汀; 高脂血症; 肾小球硬化症; 转化生长因子 β; A 类清道夫受体; CD36 抗原

[中图分类号] R 692 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)07-0734-05

Reno-protective effects of atorvastatin independent of blood cholesterol lowering

XU Zhen-e¹, YAN Feng², RUAN Xiong-zhong², CHEN Ya-xi^{2*}, LI Qiu^{1*}

1. Department of Nephrology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

2. Centre for Lipid Research, Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To investigate whether atorvastatin can prevent renal injury in mice independent of the lipid-lowering effects. **Methods** CD36^{-/-}SR-A^{-/-}ApoE^{-/-} mice were randomly assigned to a high fat diet (high fat group) and high fat diet plus atorvastatin (atorvastatin) group; male C57BL mice with a chow diet served as controls. Terminal blood samples were taken for plasma cholesterol assay 14 weeks later. Renal sections were used for histological and immunohistochemistry assessments. The lipid accumulation in the kidney was evaluated by Oil Red O (ORO) staining. The mRNA expression of transforming growth factor-β (TGF-β), collagen I and IV, fibronectin, and α-smooth muscle actin (α-SMA) were analyzed by real-time PCR. **Results** Blood total cholesterol levels (LDL-cholesterol and HDL-cholesterol) were not significantly different between atorvastatin group and high fat group. Meanwhile, ORO staining showed that atorvastatin decreased lipid accumulation in the kidney; Masson and H-E staining demonstrated that atorvastatin therapy attenuated massive structural changes, including mesangial proliferation, interstitial matrix deposition, accumulation of extracellular matrix proteins, tubular-interstitial inflammatory cell infiltration, and renal deformations with glomerulosclerosis/tubulointerstitial fibrosis in the high fat group. Moreover, atorvastatin therapy not only decreased TGF-β expression at mRNA and protein levels, but also decreased the expression of factors related to fibrosis. **Conclusion** Atorvastatin can protect the kidney independent of the lipid-lowering effects and SR-A, CD36 receptor pathways, and it might be related to decrease of TGF-beta expression.

[Key words] atorvastatin; hyperlipidemias; glomerulosclerosis; transforming growth factor beta; class A scavenger receptors; CD36 antigens

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(7):734-738]

[收稿日期] 2010-03-12 **[接受日期]** 2010-04-27

[基金项目] 国家自然科学基金(30871159, 30971389, 30772295, 30530360), 重庆市自然科学基金重点项目(2008BA5016, 2009BA5080, 2009-1-34). Supported by National Natural Science Foundation of China (30871159, 30971389, 30772295, 30530360) and Natural Science Foundation of Chongqing Municipality(2008BA5016, 2009BA5080, 2009-1-34).

[作者简介] 徐珍娥, 博士. E-mail: xuzhenzhen22@163.com

* 通讯作者(Corresponding authors). Tel: 023-68486780, E-mail: chenyaixi@cqmu.edu.cn; Tel: 023-63603929, E-mail: liqiu809@126.com

目前他汀类药物在肾脏疾病的治疗中得到广泛应用。尽管大多数研究认为他汀类药物的肾脏保护作用是通过其降脂效应发生的,但也有研究认为他汀类药物还具有不依赖于其降血脂效应的“多效性”,能明显改善组织病理变化而发挥肾脏保护作用^[1]。既往研究显示阿托伐他汀能有效防治心肌纤维化及细胞外基质重塑,这一效应与其降低心肌中高表达的转化生长因子(TGF- β)有关^[2]。阿托伐他汀还可下调清道夫受体(SR-A、CD36)的表达从而减少组织胆固醇的沉积^[3]。本课题应用 CD36/SR-A/ApoE 三敲小鼠建立高脂血症模型进行相关研究,分析阿托伐他汀对肾脏组织的保护作用及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 10只野生型 C57BL 小鼠给予普通饮食(对照组,购自重庆医科大学动物中心),20只清洁级 ApoE/CD36/SR-A 三敲小鼠(由 Dr Maria Febbraio, Lerner Research Institute, USA 惠赠)随机分为高脂组($n=10$,给予高脂饮食)与治疗组($n=10$),治疗组给予高脂饮食及 $2 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 阿托伐他汀(加入饮料混匀)。高脂饮食配方:21%猪油,0.15%胆固醇(Harlan Tekld TD88137)。阿托伐他汀:杭州默沙东(国药准字 H19990366),研磨后配成 0.06%的生理盐水悬浊液,分装后 4°C 存放不超过 1 周。

1.2 标本采集 实验满 14 周后,禁食不禁水,次日在戊巴比妥(2.5%)麻醉下处死, Y 型开腹、开胸,1 ml 针头穿刺左心室,抽血,血标本放在冰上。肾脏进行原位灌洗后取下,一份包埋于 OCT 做冰冻切片,一份 10%甲醛固定做石蜡切片。两份 -80°C 保存,留待提 RNA。

1.3 血脂水平的测定 采用酶法测定血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白(LDL)的含量(上海荣盛生物公司)。

1.4 肾脏组织内胆固醇油红“O”染色及测定 肾组织制成 $6\sim 15 \mu\text{m}$ 厚的冰冻切片,10%中性甲醛固定 20 min,丙二醇孵育 2 min,室温下油红“O”工作液染色 30 min,苏木精复染 1 min,流水漂洗 5 min。干燥后 GVA 水溶性封片剂封片,光镜下观察组织内脂质沉积情况。根据 Gamble 等^[4]所用方法测量肾脏组织胆固醇含量。肾脏组织用 PBS 研磨后离心,沉淀物中加入 1 ml 氯仿-甲醇混合物(2:1),超声破碎 1 min。之后样品放入摇摆孵箱震荡 15 min,再离心。上清液真空干燥后,用酶法测定 TC 和游离胆固醇(FC)量;沉淀加 NaOH 后,孵育 12 h,用 Lowry 法测定总蛋白量。胆固醇酯(CE) = TC - FC,得出的

结果除以总蛋白量即为胆固醇酯的相对含量。

1.5 肾脏组织病理学观察 (1)H-E 染色:切片脱蜡水化,苏木精染色 10 min,水洗,盐酸乙醇分化,伊红染色 1 min,封片,光学显微镜观察肾组织形态结构。(2)过碘酸-希夫(PAS)染色:根据试剂盒(购自福建迈升生物公司)说明书进行 PAS 染色。(3)Masson 染色:Masson 复合液染色 5 min,磷钨酸 5 min,苯胺蓝染色 5 min,分化液分化 30~60 s,脱水透明,封片(试剂购自福建迈升生物公司)。

1.6 肾组织 TGF- β 及肾脏纤维化相关因子的检测

1.6.1 Real-time PCR TRIzol 法抽提总 RNA,检测 RNA 的质量符合实验的要求,用 ABI 反转录试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,参照 GenBank 中的 mRNA 设计 TGF- β 、I 型胶原蛋白(collagen I)、IV 型胶原蛋白(collagen IV)、 α 肌动蛋白(α -SMA)和纤维连接蛋白(fibronectin, FN)引物(表 1),18S rRNA 为内参。适当浓度的待测样品 cDNA $2 \mu\text{l}$,加入上、下游引物各 $0.25 \mu\text{l}$ (25 pmol/L),SYBER Green mix (ABI 公司) $12.5 \mu\text{l}$,无菌双蒸水补齐至 $25 \mu\text{l}$,于 Bio-Rad PCR 仪中进行反应。Real-time PCR 采用不同管 Ct 值比较相对定量法进行定量。

表 1 定量 PCR 引物

Tab 1 Primers for real-time PCR

Gene	Primer
18S rRNA	F: 5'-TCG AGG CCC TGT AAT TGG AA-3' R: 5'-CCC TCC AAT GGA TCC TCG TT-3'
TGF- β	F: 5'-GCA GTG GCT GAA CCA AGG A-3' R: 5'-AGC AGT GAG CGC TGA ATC G-3'
Collagen I	F: 5'-CAA CCT GGA CGC CAT CAA G-3' R: 5'-CAG ACG GCT GAG TAG GGA ACA-3'
Collagen IV	F: 5'-CCG AGC CAG TCC ATT TAT AGA ATG-3' R: 5'-CAG CGA AGC CAG CCA GAA-3'
α -SMA	F: 5'-CCA GAG CAA GAG AGG GAT CCT-3' R: 5'-TGT CGT CCC AGT TGG TGA TG-3'
Fibronectin	F: 5'-AGG CAG AAA ACA GGT CTC GAT T-3' R: 5'-TGA ATG AGT TGG CGG TGA TAT C-3'

1.6.2 免疫组织化学法检测 采用免疫组织化学二步法检测小鼠肾组织 TGF- β 、collagen I、collagen IV、 α -SMA、FN 的表达,采用 PBS 代替一抗作为阴性对照。肾组织石蜡块制成 $3 \mu\text{m}$ 厚切片,一抗浓度 1:100,光镜下观察染色结果,阳性表达呈棕褐色。试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.7 统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用 SPSS 13.0 统计学软件,正态分布方差齐者采用单因素方差分析,多个实验组之间两两比较采用 LSD 检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 一般情况与尿蛋白 三组小鼠在实验过程中,体质量均有不同程度的增加,对照组[(20.98 ± 1.67) g]与高脂组[(18.93 ± 1.96) g]比较差异有统计学意义($P < 0.05$),高脂组与治疗组[(19.4 ± 1.56) g]之间没有统计学差异。从大体组织标本可见,高脂组肾脏体积稍减少,治疗组肾脏体积有所增

大。治疗组尿蛋白[(1.53 ± 0.60) g]水平低于高脂组[(2.74 ± 0.44) g, $P < 0.05$],提示阿托伐他汀能减轻尿蛋白的程度。

2.2 阿托伐他汀对模型小鼠血脂的影响 高脂组的血清脂质高于普通饮食组($P < 0.05$),治疗组的血清脂质(包括血清 TC、LDL、HDL、TG)水平较高脂组的脂质水平有所降低但差异无统计学意义(表 2)。

表 2 阿托伐他汀对血清脂质水平的影响
Tab 2 Effect of atorvastatin on serum lipid level

[$n=10, \bar{x} \pm s, \text{CB}/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$]

Group	TC	LDL-C	HDL-C	TG
Control	1.61 ± 0.54	0.72 ± 0.16	0.41 ± 0.07	0.38 ± 0.12
High fat diet	44.57 ± 5.60*	16.80 ± 4.80*	9.07 ± 1.47*	6.10 ± 2.89*
Atorvastatin	43.83 ± 4.19*	15.93 ± 1.94*	10.72 ± 4.30*	5.08 ± 2.01*

* $P < 0.05$ vs control group

2.3 阿托伐他汀对肾脏组织胆固醇沉积的影响 油红“O”染色如图 1A~1C 所示,对照组未见胆固醇沉积,与高脂组相比,治疗组肾脏的脂质沉积减少。肾脏组织胆固醇含量测定显示治疗组肾脏组织胆固醇减少($P < 0.05$,图 1D)。

2.4 阿托伐他汀对肾脏病理结构的影响 通过肾组织切片的 H-E、Masson、PAS 染色(图 2),光镜观察显示:与对照组相比,高脂组肾小球基底膜增粗,系膜细胞增生,系膜基质增宽,其间有纤维组织增生,炎症细胞浸润,肾小管萎缩有空泡变性;治疗组炎症细胞以及泡沫细胞明显减少,系膜细胞略有减少,细胞外基质增多也呈不同程度的减轻,肾小管部分恢复正常。

2.5 阿托伐他汀对肾脏纤维化因子 TGF- β 的影响 免疫组化(图 3A~3C)示高脂组中肾小球、肾小管都有较强的 TGF- β 表达,而治疗组可见上述部位染色强度减弱,染色面积减少,肾脏 TGF- β 表达受到抑制。与对照组相比,高脂组 TGF- β 的基因上调 4.34 倍;与高脂组相比,治疗组肾脏 TGF- β 的基因表达下降近 50%(图 3D)。

2.6 阿托伐他汀对肾脏纤维化相关因子基因与蛋白的影响 与高脂组相比,阿托伐他汀治疗组肾脏纤维化相关分子 FN、 α -SMA、collagen I、collagen IV 的基因分别降低了 70%、28%、50%、12%。免疫组化也显示治疗组肾脏的纤维化相关分子 FN、 α -SMA、collagen I、collagen IV 的蛋白水平下降($P < 0.05$,图 4)。

3 讨论

大量的研究表明,高脂血症不仅导致心血管疾病的发生率显著增高,同时也加速肾脏损害的进程,高脂血症和脂质在肾脏沉积是发生肾小球硬化的重要危险因素,血浆总胆固醇、低密度脂蛋白升高是发生终末期肾脏疾病的高危因素^[5-7]。但是脂质诱导肾脏损伤的分子机制尚不清楚,传统观念认为,氧化或乙酰化修饰的脂蛋白通过清道夫受体(主要是 SRA 和 CD36)摄入细胞。我们的研究小组通过 CD36/SR-A/ApoE 三敲小鼠的研究,发现高脂血症仍然导致肾脏泡沫细胞的形成及肾脏的硬化。

他汀类药物,即 3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA)还原酶抑制剂,通过竞争性抑制内源性胆固醇合成限速酶——HMG-CoA 还原酶的活性,减少胆固醇合成,从而降低血浆胆固醇水平。另外,他汀类药物还发挥非降脂效应依赖的肾脏保护:(1)通过下调清道夫受体(主要为 SRA、CD36),减少胆固醇的摄取^[8-10];(2)通过对 p21 蛋白的调控,抑制细胞增殖;(3)阻断 Rho 蛋白的类异戊二烯化修饰来促进细胞凋亡;(4)下调 Th1/Th2、CD4/CD8 T 细胞的比率,改善 Th1 和 CD4⁺T 细胞亢进的体内环境等。本研究通过敲除 SRA/CD36 受体途径,发现他汀药物组小鼠的血清脂质水平没有明显降低,肾脏组织的胆固醇沉积明显减少,提示阿托伐他汀可以不依赖于其降血脂效应及 SRA、CD36 的受体摄入途径,对脂质诱导的肾脏损伤产生保护作用,减轻肾小球硬化程度。

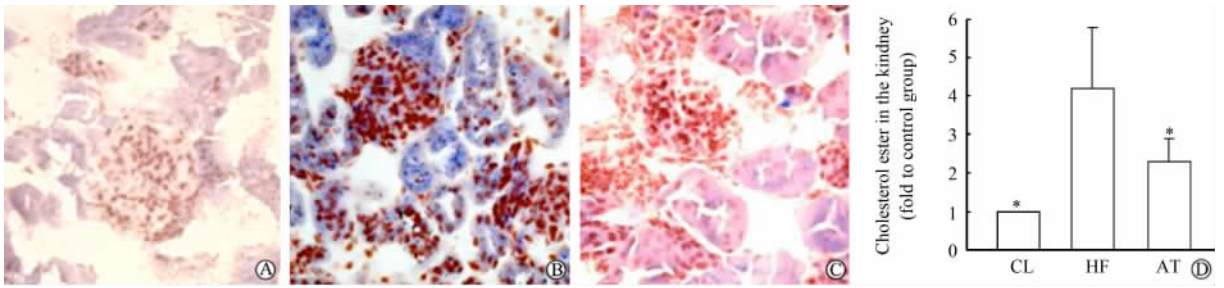


图 1 阿托伐他汀对肾脏组织胆固醇沉积的影响

Fig 1 Effect of atorvastatin on renal cholesterol ester deposition

A-C: Oil red O staining (A: Control group; B: High fat group; C: Atorvastatin group. Original magnification: $\times 400$); D: Kidney cholesterol ester detection; (CL: Control group; HF: High fat group; AT: Atorvastatin group. * $P < 0.05$ vs high fat group; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

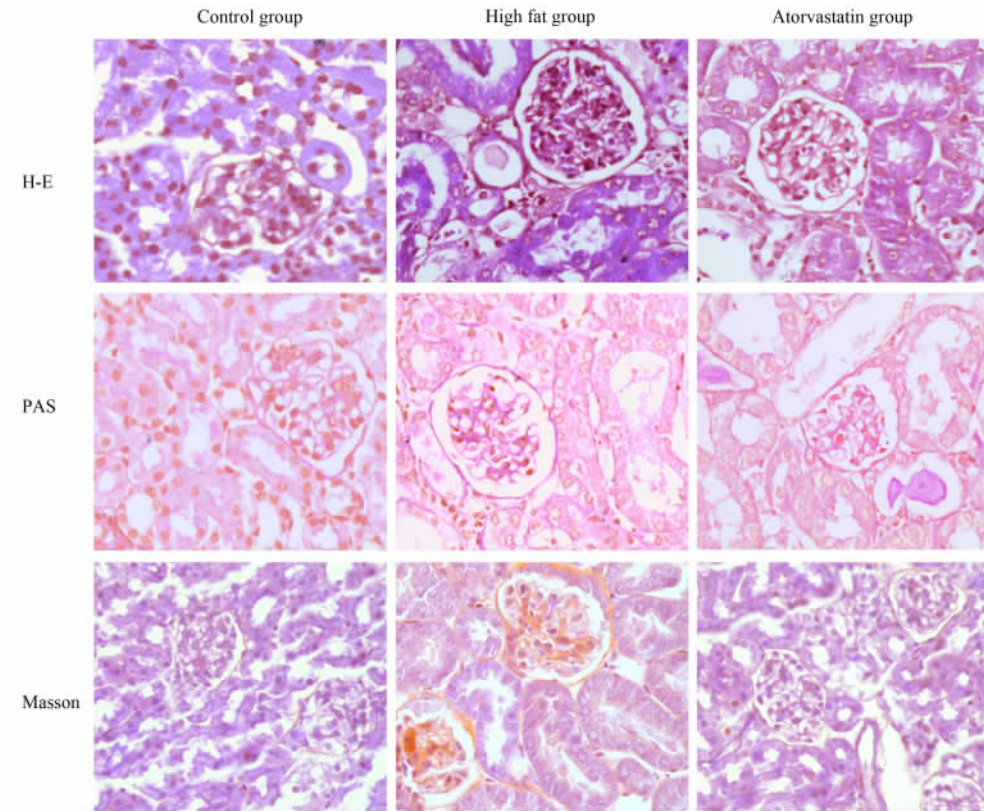


图 2 阿托伐他汀对肾脏组织病理的影响

Fig 2 Effect of atorvastatin on renal morphology

Original magnification: $\times 400$

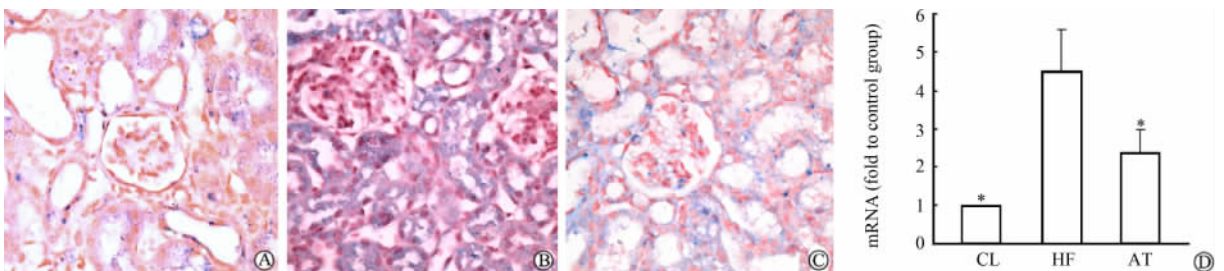


图 3 阿托伐他汀对肾脏组织 TGF- β 表达的影响

Fig 3 Effect of atorvastatin on expression of TGF- β protein and gene in renal tissue of mice

A-C: Immunohistochemistry (A: Control group; B: High fat group; C: Atorvastatin group. Original magnification: $\times 400$); D: Real-time PCR results; CL: Control group; HF: High fat group; AT: Atorvastatin group. * $P < 0.05$ vs high fat group; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

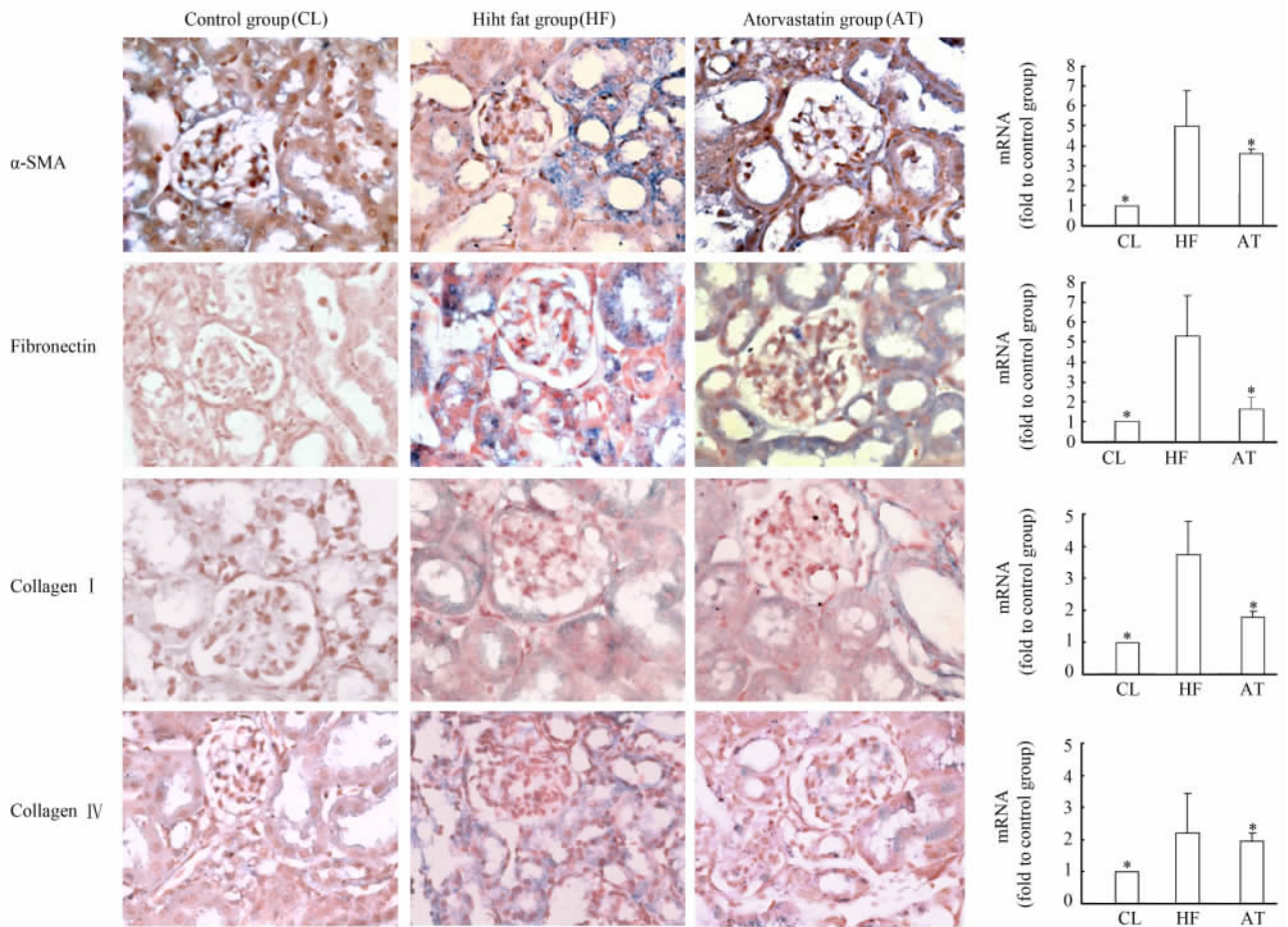


图 4 阿托伐他汀对肾脏组织纤维连接蛋白、肌动蛋白及胶原蛋白 I、IV 型表达的影响

Fig 4 Effect of atorvastatin on expression of α -SMA, fibronectin, collagen I, and collagen IV in kidney tissues

Original magnification: $\times 400$. * $P < 0.05$ vs high fat group; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$

转化生长因子是组织器官纤维化发生的主要调节因子,可刺激成纤维细胞增殖及胶原蛋白、纤维连接蛋白及蛋白多糖等细胞外基质成分的合成,促进纤维化的发生。本研究发现阿托伐他汀治疗组肾脏组织 TGF- β 表达明显低于高脂组,提示他汀类药物可能通过降低 TGF- β 的表达,下调 FN、 α -SMA 和 collagen I、collagen IV^[11],发挥肾脏保护作用。并且这种肾脏的保护作用独立于降血脂及 SRA、CD36 受体摄入途径。

[参考文献]

[1] Walker D B, Walker T J, Jacobson T A. Chronic kidney disease and statins: improving cardiovascular outcomes[J]. Curr Atheroscler Rep, 2009, 11: 301-308.
 [2] Fernandez-Fresnedo G, Gomez-Alamillo C, Ruiz J C, de Francisco A L, Arias M. Chronic renal disease in renal transplant patients: management of cardiovascular risk factors[J]. Transplant Proc, 2009, 41: 1637-1638.
 [3] Fuhrman B, Koren L, Volkova N, Keidar S, Hayek T, Aviram M. Atorvastatin therapy in hypercholesterolemic patients suppresses cellular uptake of oxidized-LDL by differentiating monocytes[J]. Atherosclerosis, 2002, 164: 179-185.
 [4] Gamble W, Vaughan M, Kruth H S, Avigan J. Procedure for

determination of free and total cholesterol in micro- or nanogram amounts suitable for studies with cultured cells[J]. J Lipid Res, 1978, 19: 1068-1070.
 [5] Piecha G, Adamczak M, Ritz E. Dyslipidemia in chronic kidney disease: pathogenesis and intervention [J]. Pol Arch Med Wewn, 2009, 119(7-8): 487-492.
 [6] Chmielewski M, Rutkowski B. Mechanisms of dyslipidemia in chronic kidney disease[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 297: F835.
 [7] Attman P O, Samuelsson O. Dyslipidemia of kidney disease[J]. Curr Opin Lipidol, 2009, 20: 293-299.
 [8] Bruni F, Pasqui A L, Pastorelli M, Bova G, Cercignani M, Palazzuoli A, et al. Different effect of statins on platelet oxidized-LDL receptor (CD36 and LOX-1) expression in hypercholesterolemic subjects [J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2005, 11: 417-428.
 [9] Chmielewski M, Bryl E, Marzec L, Aleksandrowicz E, Witkowski J M, Rutkowski B. Expression of scavenger receptor CD36 in chronic renal failure patients[J]. Artif Organs, 2005, 29: 608-614.
 [10] Zhao S P, Zhang D Q. Atorvastatin enhances cellular uptake of oxidized LDL in adipocytes from hypercholesterolemic rabbits [J]. Clin Chim Acta, 2004, 339(1-2): 189-194.
 [11] Ikejiri A, Hirano T, Murayama S, Yoshino G, Gushiken N, Hyodo T, et al. Effects of atorvastatin on triglyceride-rich lipoproteins, low-density lipoprotein subclass, and C-reactive protein in hemodialysis patients[J]. Metabolism, 2004, 53: 1113-1117.