

阿托伐他汀对单侧输尿管梗阻大鼠肾小管间质中核因子- κ B表达的影响

刘斌,陈明*,张超,彭红霞,欧三桃(四川省泸州医学院附属医院肾内科,泸州医学院肾功能保护研究室,四川 泸州 646000)

摘要:目的 观察单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠肾小管间质核转录因子- κ B(NF- κ B)的动态表达及阿托伐他汀对其的影响。方法 将45只大鼠随机分为假手术组、模型组及阿托伐他汀治疗组(简称阿乐组),后两组行左侧输尿管结扎术。阿乐组术前3d开始阿托伐他汀($10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)灌胃,余两组予等量生理盐水灌胃。术后第5、10、15天分别处死各组中的5只大鼠,取左肾行HE和Masson染色动态观察肾脏病理改变,并用免疫组化方法检测肾小管间质中NF- κ B p65的动态表达。结果 组织病理显示模型组呈现进行性肾间质面积增宽,纤维化程度加重。免疫组化结果显示假手术组大鼠肾组织中仅见极少部分的肾小球系膜细胞和肾皮质远曲小管上皮细胞表达较弱的NF- κ B p65,主要位于细胞浆,各时间点的表达无明显差异。模型组大鼠肾NF- κ B p65的表达主要位于肾近曲小管和远曲小管上皮细胞浆和核中,其中以胞核表达为多,表达量较假手术组明显增加($P<0.01$),其表达随梗阻时间的延长逐渐增多。阿乐组肾小管间质中NF- κ B p65虽较假手术组明显增加($P<0.01$),但均较同期模型组有不同程度的减少($P<0.01$)。结论 UUO模型大鼠肾小管间质NF- κ B的表达明显增加,阿托伐他汀可下调NF- κ B的表达,其改善肾小管间质纤维化作用可能与抑制NF- κ B的活性有关。

关键词:肾小管间质;纤维化;核转录因子- κ B;阿托伐他汀

中图分类号:R965 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2007)02-0087-03

Effects of Atorvastatin on Expression of NF- κ B in Unilateral Ureteral Obstruction Rats

LIU Bin, CHEN Ming*, ZHANG Chao, PENG Hong-xia, OU San-tao(Department of Nephrology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the expression of NF- κ B p65 at different periods in renal tubulointerstitium and the effect of atorvastatin on the expression of NF- κ B p65 in unilateral ureteral obstruction (UUO) model rats. **METHODS** Forty-five female Sprague Dawley rats were divided into 3 groups, the sham-operated group, the model group and the atorvastatin group. The latter two groups underwent UUO and then received vehicle or atorvastatin ($10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) by daily intragastric administration from three days before the UUO operation to the day of sacrifice. The sham-operated rats received vehicle. Five rats of each group were killed respectively at 5, 10, 15 days after surgery. Histological changes of renal tissue were observed by HE and Masson staining. Immunohistochemistry for NF- κ B p65 was performed in renal tubulointerstitium at each time point. **RESULTS** The interstitial expansion and fibrosis of obstructed kidneys was prominent in the model group. Atorvastatin ameliorated interstitial expansion and fibrosis in Atorvastatin group. NF- κ B p65 were faintly stained in the sham-operated kidneys, mainly concentrated at glomerular mesangial cells and renal tubular epithelial cells. NF- κ B p65 in renal tubulointerstitium increased progressively starting from 5 to 15 days in model group comparing with the sham-operated group ($P<0.01$), the atorvastatin group had less deposition of NF- κ B p65 in renal tubulointerstitium comparing with the model group ($P<0.01$). **CONCLUSION** NF- κ B p65 expression was increased progressively in the tubulointerstitium in UUO rats. Atorvastatin may play a protective role for the kidney by downregulating NF- κ B and alleviating renal interstitial fibrosis in UUO rats.

KEY WORDS: renal tubulointerstitium; fibrosis; NF- κ B; atorvastatin

肾小管间质纤维化是所有慢性肾脏疾病进展至终末期肾衰竭的共同通路,肾小管间质炎症及纤维化病变程度是反映肾功能下降严重程度和判断预后最重要的指标^[1]。如何防治肾小管间质纤维化的进展是目前研究的热点之一。既往研究发现细胞核转录因子- κ B(nuclear factor of kappa B, NF- κ B)可

以在转录水平调节多种细胞因子和炎性介质的表达,抑制细胞外基质(extracellular cell matrix, ECM)的合成与沉积^[2],但NF- κ B在肾小管间质纤维化的进程中扮演着什么角色尚不完全清楚,值得进一步研究。为此,我们选择单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)大鼠模型作为研究对象,

基金项目:四川省教育厅重点资助项目(2000128、2004049)

作者简介:刘斌,泸州医学院硕士研究生,现工作于四川乐山市第二人民医院肾内科

*通讯作者:陈明,四川省泸州医学院附属医院肾内科,泸州医学院肾功能保护研究室 E-mail: chenming6699@yahoo.com.cn

予阿托伐他汀处理,观察 UUO大鼠肾小管间质的病理改变、NF- κ B表达的动态变化,从而了解阿托伐他汀能否通过调节NF- κ B的途径起到抗肾小管间质纤维化的作用。

1 材料与与方法

1.1 药物与试剂

阿托伐他汀钙片(阿乐)购自北京红惠生物制药股份有限公司,兔抗大鼠NF- κ B p65多克隆抗体购自武汉博士德生物制品公司,链亲和素生物素过氧化物酶复合物法(streptavidin biotin peroxidase complex, SABC)试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 动物模型及实验分组

SD大鼠45只,清洁级,体重130~160g,由泸州医学院动物实验中心提供。适应性饲养一周后随机均分为假手术组、单侧输尿管梗阻模型组(简称模型组)、阿托伐他汀钙片治疗组(简称阿乐组)。后两组行左侧输尿管完全梗阻术,手术方法参照文献[3]进行,假手术组仅游离输尿管但不结扎。从术前3d开始,阿乐组予阿托伐他汀($10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)混悬于1mL生理盐水中灌胃,模型组及假手术组予等量生理盐水灌胃,每日一次。术后第5、10、15天每组各取5只大鼠处死,取左肾,4%多聚甲醛中固定,包埋,制备成3 μm 的石蜡切片备用。

1.3 实验大鼠肾小管间质病理学改变的观察

取左肾组织作常规HE和Masson染色,观察肾小管间质的病理变化。400倍光镜下,每张切片随机选择10个不含肾小球的视野观察其病理损害。肾小管间质病变由3个参数判定(肾小管扩张,肾小管上皮细胞水肿、变性、坏死,间质炎症细胞的浸润;间质纤维化的程度),每个参数按0~3分评定(0=正常;1=轻度受损,病变范围<15%;2=中度受损,病变范围 $\geq 15\%$, <50%;3=重度受损,病变范围 $\geq 50\%$)^[3]。

1.4 实验大鼠肾小管间质NF- κ B p65免疫组化检测

兔抗大鼠NF- κ B p65多克隆抗体(1:100),采用SABC法检测左肾小管间质中NF- κ B p65的表达,操作步骤按SABC试剂盒说明书进行。在高倍镜($\times 400$)下,随机选10个肾小管间质视野,每张切片,计数每个视野总的细胞数和阳性细胞数,折算成每100个总细胞数中的阳性细胞数,阳性细胞染色程度按切片中大多数细胞染色深度分1~3分^[4]。各指标阳性表达程度根据表达部位,以阳性细胞数及阳性细胞染色程度两个参数之积半定量分析。

1.5 统计学处理

计数资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,使用SPSS 10.0统计软件作统计学分析。

2 结果

2.1 实验大鼠肾小管间质病理学改变

HE和Masson染色结果显示假手术组肾小管结构正常,肾小管间质无增宽。模型组第5天出现肾小管间质增宽,伴有少量炎性细胞浸润及胶原沉积,第10天可见肾小管间质明显增宽,肾小管结构破坏,管腔塌陷,炎性细胞浸润,胶原成分增加,第15天可见肾小管间质损伤程度明显加重,胶原沉积明显增多。阿乐组大鼠肾小管间质损伤程度较同期模型组有所减轻,胶原沉积较同期模型组减少,见表1。

表1 实验大鼠肾小管间质损伤的病理学改变

Tab 1 The pathem atological change of renal tubulointerstitium in experimental rats

组别	第5天	第10天	第15天
假手术组	0.21 \pm 0.08	0.22 \pm 0.05	0.22 \pm 0.05
模型组	3.19 \pm 0.27*	4.88 \pm 0.41*	6.13 \pm 0.39*
阿乐组	2.48 \pm 0.41* #	3.74 \pm 0.61* #	4.97 \pm 0.53* #

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$

Notes: vs the sham-operated group,* $P < 0.01$; vs the model group,# $P < 0.05$

2.2 实验大鼠肾小管间质中NF- κ B p65的动态表达

在假手术组大鼠肾组织中,NF- κ B p65仅微弱表达于肾小球系膜细胞和皮质远端肾小管上皮细胞的胞浆中,且各时间点的NF- κ B p65表达量无明显差异。模型组和阿乐组NF- κ B p65的表达主要位于皮质肾小管上皮细胞的浆和核中,其中胞核较胞浆表达量多,少量炎性浸润细胞也有表达。模型组各时间点的NF- κ B p65表达量较假手术组明显增加,且随梗阻时间的延长逐渐增多。阿乐组各时间点NF- κ B p65表达趋势同模型组,较假手术组表达明显增加,但低于同期模型组,核、浆表达程度差别不大,见表2,图1。

表2 实验大鼠肾小管间质中NF- κ B p65表达的动态变化

Tab 2 The expression of NF- κ B p65 in renal tubulointerstitium of UUO rats at each time point by immunohistochemistry staining

实验组别	第5天	第10天	第15天
假手术组	1.47 \pm 0.28	1.59 \pm 0.28	1.51 \pm 0.32
模型组	24.25 \pm 2.53*	48.45 \pm 4.06*	61.38 \pm 3.50*
阿乐组	16.26 \pm 2.03* #	39.47 \pm 3.20* #	47.47 \pm 3.51* #

注:与假手术组相比,* $P < 0.01$;与模型组相比,# $P < 0.01$

Notes: vs the sham-operated group,* $P < 0.01$; vs the model group,# $P < 0.01$

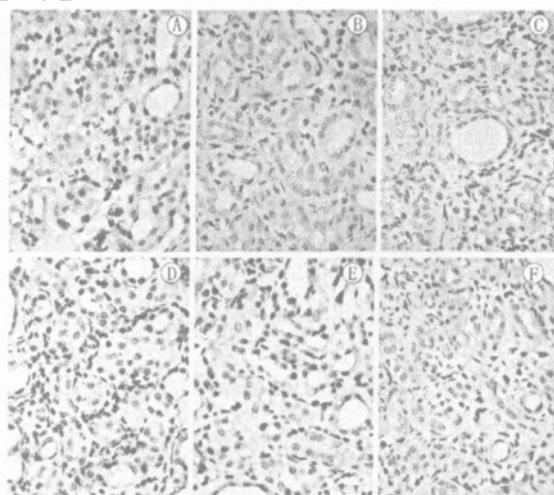


图1 不同时间点实验大鼠肾小管间质中NF- κ B p65表达变化(SABC法, $\times 400$)

A模型组第5天;B模型组第10天;C模型组第15天;D阿乐组第5天;E阿乐组第10天;F阿乐组第15天

Fig 1 The expression of NF- κ B p65 in renal tubulointerstitium of UUO rats at each time point by immunohistochemistry staining (SABC, $\times 400$)

3 讨论

NF- κ B是一组结构相关的蛋白质家族,是一种介导细胞内信号转导的重要转录因子,p50和p65是NF- κ B活性形式的主要成分,其中以p65的活性最强。一般情况下NF- κ B与抑制分子I κ B结合以非活性的形式存在于胞浆中,当受到外界有关因素刺激时,NF- κ B与I κ B解离,从胞浆转移到胞核中,参与基因转录调控^[5]。研究表明活化的NF- κ B p65可促进肾小管上皮细胞 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的表达,从而调节肾小管上皮细胞转分化,同时也可促进转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)、细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管内皮细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)等的表达,从而导致了肾小管间质纤维化的发生^[6]。本实验结果提示在假手术组中NF- κ B p65可在肾小球系膜细胞和皮质远端肾小管上皮细胞中微弱表达,主要位于胞浆之中,而在UUO模型组大鼠中,NF- κ B的表达量较假手术组明显增高,且随着梗阻时间延长,有明显增加趋势,同时NF- κ B p65肾小管上皮细胞胞核中表达尤为明显,即发生了明显的核内转移,NF- κ B p65明显被活化。由此可见UUO大鼠肾间质内NF- κ B p65的高表达及活化是肾小管间质纤维化发生的重要原因之一。

对肾小管间质纤维化的防治目前仍缺乏有效措施,开发抗肾小管间质纤维化治疗途径具有十分重要意义。他汀类降脂药是细胞内胆固醇合成限速酶即3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶抑制剂(3-hydroxy-3-methylglutaryl Co-enzyme A Reductase Inhibitor, HMG-CoA),文献报告其对具有非降脂的肾脏保护作用^[7],我们前期实验表明阿托伐他汀通过抑制UUO大鼠肾小管间质中胶原I(collagen I, Col I)、胶原IV(collagen IV, Col IV)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)等ECM的沉积,抑制TGF β_1 和金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)的表达从而有效抑制肾小管间质纤维化的进展^[8],但阿托伐他汀抗肾小管间质纤维化的具体机制并不完全清楚。本实验结果显示阿乐组肾小管间质中NF- κ B p65的表达虽较假手术组明显增加,但均较

同期模型组有不同程度的减少,提示阿托伐他汀可下调UUO大鼠肾小管间质中NF- κ B p65的表达。同时本研究观察到模型组细胞核较胞浆NF- κ B p65表达量多,而阿乐组核、浆表达量差别不大,提示阿托伐他汀抑制了NF- κ B p65的活化。

综上所述,阿托伐他汀可下调NF- κ B的表达与活化,其改善肾小管间质纤维化作用可能与此有关。

参考文献

- [1] EITNER, FRANK, FLOEGE, JURGEN. Novel insights into renal fibrosis [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2003, 12(3): 227-232.
- [2] KIM J H, HA I S, HWANG C I, *et al*. Gene expression profiling of anti-GBM glomerulonephritis model: the role of NF-kappaB in immune complex kidney disease[J]. *Kidney Int*. 2004; 66(5): 1826-1837.
- [3] XUE H, FAN J M, CHEN L, *et al*. Investigation of renal fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction[J]. *Sichuan J Zool* (四川动物), 2004, 23(1): 16-20.
- [4] TIAO L J, SUN J, JIN O, *et al*. Expression of p27 in renal interstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction[J]. *J Cent South Univ: Med Sic*(中南大学学报:医学版), 2004, 29(1): 58-60.
- [5] VOLPINI R A, COSTA R S, DA SILVA C G, *et al*. Inhibition of nuclear factor-kappaB activation attenuates tubulointerstitial nephritis induced by gentamicin[J]. *Nephron Physiol*, 2004, 98(4): 97-106.
- [6] NG Y Y, HOU C C, WANG W, *et al*. Blockade of NFkappaB activation and renal inflammation by ultrasound-mediated gene transfer of Smad7 in rat remnant kidney[J]. *Kidney Int(Suppl)*, 2005, (94): S83-91.
- [7] LOU H Q, FU S L. The effect of simvastatin on microalbuminuria in early diabetic nephropathy[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2003, 10(5): 426-427.
- [8] CHEN M, OU S T. Experimental study of atorvastatin in preventing renal interstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction rats [J]. *Chin J Nephrol*(中华肾脏病杂志), 2005, 21(1): 30.

收稿日期: 2006-08-11