

辛伐他汀通过上调血红素氧合酶-1 减少肾脏缺血再灌注损伤

李娜¹, 丁胜¹, 王红祥¹, 赵滢¹, 容松²

(1. 武汉市中心医院, 武汉 430014; 2. 贵州省遵义医学院, 贵州 遵义 563003)

[摘要] 目的:探讨辛伐他汀对肾缺血再灌注损伤(IRI)的影响及其作用机制。方法:30只雄性SD大鼠分成3组,治疗组术前连续3d给予辛伐他汀 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ig,模型组和假手术组术前3d生理盐水 ig。治疗组与模型组大鼠左肾肾蒂夹闭45 min以诱导缺血再灌注损伤,并将右肾切除。假手术组仅行右肾切除术。术前和术后24 h取血;术后24 h处死大鼠,检测血清肌酐水平,了解肾脏功能及受损情况,观察肾组织病理改变,运用蛋白免疫印迹方法检测血红素氧合酶-1(HO-1)的表达水平,运用免疫组化方法对HO-1和ED-1阳性巨噬细胞进行定位。结果:治疗组和模型组相比,血清肌酐水平、肾损伤明显降低($P<0.05$),肾组织中HO-1表达明显增加($P<0.05$),表达HO-1的大部来自浸润的单核/巨噬细胞。结论:辛伐他汀能正向调节肾组织中HO-1的表达,从而发挥其抗炎作用,减轻肾组织损伤。

[关键词] 辛伐他汀;缺血再灌注损伤;血红素氧合酶-1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0210-04

Simvastatin Reduce Renal Ischemia-reperfusion Injury by Up-Regulation of Heme Oxygenase-1

LI Na¹, DING Sheng¹, WANG Hong-xiang¹, ZHAO Shi¹, RONG Song²

(1. The Central Hospital of Wuhan, Wuhan 430014, China; 2. Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

[Abstract] **Objective:** In the present study we addressed the ability and the mechanism of simvastatin to reduce ischemia-reperfusion injury (IRI) through up-regulation of heme oxygenase-1 (HO-1) expression. **Method:** Thirty male SD rats were divided into three groups. Rats in treatment group were given Simvastatin ($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) ig 3 days before operation; rats in the control group were given only saline pre-operatively. We induced IRI in these two groups by left renal pedicle clamping for 45 min and performed right kidney resection. Rats in the sham operation group only received right kidney resection. All the animals were sacrificed 24 h after IRI. Blood samples were drawn before the surgery and 24 h after IRI for renal function measurement. Renal morphology and expression of ED-1 and HO-1 were investigated by histological means, immunohistochemistry and Western blot, respectively. **Result:** Simvastatin pre-treatment reduced quantitative renal damage and attenuated renal dysfunction. Simvastatin treatment increased HO-1 expression on the protein level in the kidney. By immunohistochemistry we identified infiltrating macrophages as the major source for HO-1 expression at 24 h post-ischemia. **Conclusion:** Simvastatin treatment up-regulates HO-1 in circulating monocytes. The local delivery of HO-1 by infiltrating monocytes/macrophages exerts local anti-inflammatory effects after IRI and thus might reduce tissue destruction.

[Key words] simvastatin; ischemia-reperfusion injury; heme oxygenase-1

血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)作为

血红素分解代谢的限速酶,是机体重要的抗损伤物质。实验室及临床研究都显示他汀类药物具有独立于调脂治疗以外的细胞保护、抗炎及抗氧化作用,且有证据表明:他汀能够诱导血管平滑肌细胞、内皮细胞、巨噬细胞等多种细胞中血红素氧合酶-1的表

[收稿日期] 2011-02-28

[第一作者] 李娜,住院医师,从事内分泌学研究, Tel: 13720398264, E-mail: ludingyue@hotmail.com

达^[1-3]。本实验通过观察辛伐他汀对肾缺血再灌注损伤的影响,探讨他汀对肾缺血再灌注损伤的防治作用及其相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 SD 大鼠,30 只,体重 250 ~ 300 g,第三军医大学大坪医院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(渝)20090003。

1.1.2 试剂和仪器 辛伐他汀(Merck 公司)批号 567021;单克隆小鼠抗大鼠 HO-1 抗体和多克隆兔抗大鼠单核细胞/巨噬细胞 ED-1 抗体(Serotec 公司);10% 标准驴血清及免疫荧光 Cy2 和 Cy3 结合二抗(West Grove 公司);羊抗兔辣根过氧化物酶(Dianova 公司);加强的化学发光试剂盒(Zaventem 公司);AU400 生化分析仪(Olympus 公司),荧光显微镜(Leica 公司);电泳转印系统(Bio-Rad 公司);全自动免疫组化染色系统(Daki 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及治疗方法 动物随机分为 3 组。模型组术前 3 d 生理盐水 ig,术中将左肾肾蒂夹闭 45 min 以诱导缺血再灌注损伤,并将其右肾切除;治疗组手术同模型组,术前连续 3 d 给予辛伐他汀 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig;假手术组术前 3 d 生理盐水 ig 并行右肾切除术。术前和术后 24 h 抽取血样,检测血清肌酐。所有的大鼠均在术后 24 h 处死,取左肾待检。

1.2.2 组织标本处理 用于组织学观察的肾组织先用冷盐水灌注,4% 甲醛固定 24 h 后,置入 Sorenson's 缓冲液中 $-4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 24 h,换液再保存 24 h 后,乙醇梯度脱水、石蜡包埋,常规制片,片厚 $1.5 \text{ } \mu\text{m}$,PAS 染色,观察肾组织损伤程度;用于免疫组织化学的肾组织放入 $-35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 异戊烷中冰冻;用于蛋白免疫印迹的肾组织置于液态氮中速冻,两组标本放置 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2.3 血清学指标检测 术前及术后 24 h 眼眶后静脉丛取血约 $100 \text{ } \mu\text{L}$, $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,上清置于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。生化分析仪测量血清肌酐(Cre)的浓度。

1.2.4 蛋白免疫印迹法检测 HO-1 蛋白表达 冰冻肾组织样本放入组织裂解液中,用定子-转子匀浆器研磨 30 s,转移进 EP 管中, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min。总蛋白浓度用生化分析仪测定。 $70 \text{ } \mu\text{g}$ 的蛋白置入上样缓冲液中,在 10% 的分离胶中电泳,

再转移到 PVDF 膜上。膜用 5% 的脱脂奶封闭抗体,抗 HO-1 的一抗 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 液漂洗 3 次,每次 10 min,用羊抗兔辣根过氧化物酶二抗室温下孵育 1 h,TBST 漂洗 3 次后,用加强的化学发光试剂盒检测。以 14-3-3 蛋白为内参照,相对密度用 Quantity One 软件半定量。

1.2.5 免疫组化法检测 HO-1 在肾脏中的表达 冰冻切片切成 $6 \text{ } \mu\text{m}$ 厚度。在非直接免疫荧光发光法中,非特异性的结合部位用 10% 驴血清封闭 30 min,然后加入单克隆小鼠抗大鼠 HO-1 一抗室温孵育 1 h。冰冻切片放在潮湿盒里防止切片干透。然后用 Cy3 结合的二抗室温下孵育 1 h。标本上滴二氨基联苯胺(DAB)染色剂,封片后置于免疫荧光显微镜下观察。依据 10 个高倍视野($400 \times$)中 HO-1 阳性的细胞计数评分。另有一部分切片加入单克隆小鼠抗大鼠 HO-1 抗体和多克隆兔抗大鼠 ED-1 抗体,然后用 Cy2 和 Cy3 结合的二抗进行双色荧光染色。

1.3 数据分析 使用 SPSS 13.0 软件分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 辛伐他汀对模型大鼠血清 Cre 含量的影响 缺血再灌注后 24 h,和手术前比较,模型组血 Cre 明显增高,说明再灌注导致严重肾功能损伤($P < 0.05$)。而辛伐他汀血 Cre 和模型组比较,则有显著下降($P < 0.05$);假手术组 Cre 水平没有显著变化。

表 1 辛伐他汀对模型大鼠肌酐含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Cre/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
假手术	-	58 ± 18
模型	-	336 ± 24
辛伐他汀	10	$178 \pm 34^{1)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 辛伐他汀对模型大鼠肾脏病理变化的影响 所有切片进行双盲法评分,评分标准:200 倍镜下观察,受损面积 $< 5\%$ 为 0 分,受损面积 $5\% \sim 20\%$ 为 1 分,受损面积 $20\% \sim 50\%$ 为 2 分,受损面积 $50\% \sim 75\%$ 为 3 分,受损面积 $> 75\%$ 为 4 分。模型组可见外髓中肾小管刷状缘缺损,上皮细胞脱落导致肾小管阻塞和基底膜裸露的面积较大,评分(3.7 ± 0.1)。而治疗组肾小管的坏死面积明显减少,有较多正常肾小管及刷状缘,评分为(2.6 ± 0.2),与模型组相比,差异显著($P < 0.01$)。

2.3 蛋白免疫印迹法检测 HO-1 蛋白表达 对 3 组各标本的印迹条带密度分别用 Quantity One 软件半

定量分析,假手术组条带密度/内参照蛋白条带密度为 0.42 ± 0.02 , 治疗组为 1.02 ± 0.1 , 与模型组 (0.56 ± 0.08) 比较,差异显著 ($P < 0.01$);模型组和假手术组差异无统计学意义。模型组可以引起 HO-1 蛋白质表达水平升高,但不明显;而治疗组 HO-1 水平却明显增高。

2.4 免疫组化 HO-1 染色定量 用每张切片 10 个高倍视野 ($400 \times$) 中 HO-1 阳性的细胞计数评分。假手术组中 HO-1 阳性细胞评分 (5.7 ± 0.9)。模型组评分 (42.2 ± 4.4),与假手术组比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。治疗组评分 (96.2 ± 5.7),与假手术组和模型组相比均有显著性增加 ($P < 0.05$)。采用单克隆小鼠抗大鼠 HO-1 抗体和多克隆兔抗大鼠 ED-1 抗体双色荧光染色,发现 HO-1 阳性的细胞大部分均为 ED-1 阳性细胞,说明 HO-1 主要表达在单核/巨噬细胞上。

3 讨论

近年来大量研究显示他汀类药物不仅有调脂作用,其对细胞增殖、炎症反应、免疫应答、血小板功能以及脂类氧化等均有作用^[4]。本实验结果显示:术前 3 d 给予辛伐他汀预处理能减轻术后 24 h 大鼠肾脏缺血再灌注损伤,包括显著降低损伤后血 Cre 的上升水平,减少急性肾小管坏死。Kostapanos 总结了他汀对肾脏损伤治疗的多效性,包括他汀在肾组织中发挥直接的抗炎和抗氧化作用,并通过增加肾血流量改善受损肾脏的功能^[5]。

血红素氧合酶(HO)是体内唯一一种催化血红素分解代谢的限速酶,可以氧化降解血红素,将其分解为一氧化碳、自由铁和胆绿素。这些降解产物具有重要的生物学活性,是机体重要的抗损伤物质。HO 有 HO-1,HO-2,HO-3 3 种同工酶,其中可诱导型 HO-1 是机体最重要的内源性保护物质之一,广泛参与组织细胞的抗氧化应激损伤。本实验观察到,预先给予辛伐他汀治疗显著增加术后 24 h 大鼠肾脏组织中 HO-1 蛋白的表达,模型组可以引起 HO-1 蛋白质表达水平升高。另有研究发现,辛伐他汀能够通过 HO-1 途径改善大鼠的肺动脉高压^[6]。该研究显示 HO-1 的活性对接受辛伐他汀治疗的大鼠肺动脉压力降低起到了关键的作用。接受辛伐他汀治疗后,大鼠肺部 HO-1 活性升高,而这种活性的升高可以被血红蛋白加氧酶抑制剂(SnPP)破坏,说明辛伐他汀发挥降低肺动脉高压的作用是通过 HO-1 介导

的。还有研究发现经辛伐他汀预处理后的肝脏缺血再灌注损伤大鼠模型,在缺血 24 h 后肝细胞中的 HO-1 表达明显升高,辛伐他汀预处理诱导的 HO-1 对肝脏缺血再灌注损伤有保护作用^[7]。在心肌的缺血再灌注损伤^[8]以及实体器官移植^[9]模型中,均发现有 HO-1 的增高,这种增高在保护细胞的同时抑制了损伤进一步发展。因此,HO-1 的激活是他汀发挥肾脏保护作用的重要机制之一。

本实验还观察到 HO-1 的表达主要来源于浸润的单核巨噬细胞。已有实验证实他汀可以减少巨噬细胞的浸润^[3]。这充分体现了巨噬细胞对炎症的双向调节作用:一方面巨噬细胞可以激活许多细胞因子、趋化因子来加重组织的损伤和继发的纤维化;另一方面巨噬细胞也参与了炎症过程中的组织修复过程。本实验的补充证实了他汀一方面通过减少巨噬细胞的浸润来降低肾脏损伤,另一方面刺激已经浸润的巨噬细胞大量表达 HO-1 来加强对肾组织的修复作用。

本实验结果为他汀类药物发挥独立于调脂治疗以外的抗损伤作用提供了依据。虽然已经知道他汀通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)等信号通路调节 HO-1 的表达^[1],但是不同的他汀类药物激活 HO-1 的信号通路并不完全相同^[10]。且他汀类药物对 HO-1 的影响与作用时间、剂量的相关性以及如何优化诱导和调控其表达也需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Kim Y M, Pae H O, Park J E, et al. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(1): 137.
- [2] Hinkelmann U, Grosser N, Erdmann K, et al. Simvastatin-dependent up-regulation of heme oxygenase-1 via mRNA stabilization in human endothelial cells [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2010, 41(1): 118.
- [3] Chen J C, Huang K C, Lin W W. HMG-CoA reductase inhibitors upregulate heme oxygenase-1 expression in murine RAW264.7 macrophages via ERK, p38 MAPK and protein kinase G pathways [J]. *Cell Signal*, 2006, 18(1): 32.
- [4] Blum A, Shamburek R. The pleiotropic effects of statins on endothelial function, vascular inflammation, immunomodulation and thrombogenesis [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 203(2): 325.

补肾调周法对卵巢早衰模型大鼠血清 INHB, VEGF 的影响

张大伟¹, 李翠萍^{2*}, 黄霞³, 张丹丹⁴, 范迎丽⁴, 张越⁴, 贺文婧⁴

(1. 河南中医学院基础医学院, 郑州 450008; 2. 河南中医学院第三附属医院, 郑州 450008;
3. 河南省中医药研究院, 郑州 450004; 4. 河南中医学院 2008 级研究生, 郑州 450008)

[摘要] 目的: 探讨补肾调周法对卵巢早衰模型大鼠血清抑制素 B (INHB)、血管内皮生长因子 (VEGF) 水平的影响。方法: 90 只大鼠随机分为 9 组, 即空白对照组, 模型对照组, 补肾 I 号方高、低剂量 ($68.67, 34.30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 补肾 II 号方高、低剂量 ($61.40, 30.70 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组, 补肾调周高、低剂量组, 分别序贯给药 I 号, II 号高、低剂量 (每 2 天轮换一次), 阳性对照组, 每组各 10 只。除空白对照组外其余各组均采用环磷酰胺 (CTX) 造模。给药 20 d 后, ELLSA 法测定各组大鼠血清 INHB, VEGF 水平, 光镜下观察卵巢的病理组织形态。结果: 补肾调周法能显著提高血清 INHB, VEGF 水平, 从而提高卵巢的贮备能力, 并能增加各级卵泡与黄体组织数量。结论: 补肾调周法可提高卵巢早衰模型大鼠的卵巢储备能力, 这可能是对卵巢早衰早期干预的机制之一。

[关键词] 卵巢早衰; 补肾调周; 血清抑制素 B; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2011)12-0213-04

Effects of Invigorating Kidney and Regulating Periphery on Rats with Pnemature Ovarian Failure and Its Influence on Inhibin B and Vascular Endothelial Growth Factor

ZHANG Da-wei¹, LI Cui-ping^{2*}, HUANG Xia³, ZHANG Dan-dan⁴, FAN Ying-li⁴, ZHANG Yue⁴, HE Wen-jing⁴

(1. Basic Medical College, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;
2. The Third Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

[收稿日期] 2011-03-04

[基金项目] 河南省科技厅资助项目 (092102310322)

[第一作者] 张大伟, 副教授, 从事方剂学及中医妇科教学、临床、科研, Tel: 13938427612, E-mail: zhangdw@hactem.edu.cn

[通讯作者] * 李翠萍, 教授, 博士生导师, 从事中医妇科教学、临床、科研, Tel: 13783683195, E-mail: licpingster@gmail.com

- [5] Kostapanos M S, Liberopoulos E N, Elisaf M S. Statin pleiotropy against renal injury[J]. J Cardimetab Syndr, 2009, 4(1): E4.
- [6] Hsu H H, Ko W J, Hsu J Y, et al. Simvastatin ameliorates established pulmonary hypertension through a heme oxygenase-1 dependent pathway in rats[J]. Respir Res, 2009, 10: 32.
- [7] Lai I R, Chang K J, Tsai H W, et al. Pharmacological preconditioning with simvastatin protects liver from ischemia-reperfusion injury by heme oxygenase-1 induction[J]. Transplantation, 2008, 85(5): 732.
- [8] 夏大胜. 血红素氧合酶系统抗心肌缺血再灌注损伤的研究[J]. 中国心血管杂志, 2005, 10(4): 315.
- [9] Baan C, Peeters A, Lemos F, et al. Fundamental role for HO-1 in the self-protection of renal allografts[J]. Am J Transplant, 2004, 4: 811.
- [10] Hsieh C H, Jeng J C, Hsieh M W, et al. Involvement of the p38 pathway in the differential induction of heme oxygenase-1 by statins in Neuro-2A cells exposed to lipopolysaccharide[J]. Drug Chem Toxicol, 2011, 34(1): 8.

[责任编辑 何伟]