

[文章编号] 1007-3949(2005)13-01-0065-04

•临床研究•

肾移植术后高脂血症患者转化生长因子和受体 mRNA 表达及辛伐他汀降脂治疗对其影响

韩从辉¹, 王晓鸿¹, 王玉新¹, 桂西青¹, 徐琴君², 郑克立¹, 唐孝达²

(1. 中山大学附属第五医院泌尿外科, 广东省珠海市 519000;

2. 上海交通大学附属上海第一人民医院肾脏内科, 上海市 200080)

[关键词] 外科学; 肾移植患者脂代谢紊乱的研究; 逆转录聚合酶链反应; 肾移植; 高脂血症; 转化生长因子; 辛伐他汀

[摘要] **目的** 研究肾脏移植术后高脂血症同转化生长因子 β 及其受体 mRNA 表达之间的关系, 探讨其导致慢性移植肾病的可能机制与防治措施。**方法** 肾移植术血脂正常组、血脂增高组及正常对照组各 30 例, 血脂增高组应用辛伐他汀 20 mg/d 进行降脂治疗, 于服药后 1.5 及 3 个月复查血脂; 同时于不同时段应用逆转录聚合酶链反应检测外周血单个核细胞转化生长因子 β 及其受体 mRNA 表达。**结果** 血脂增高组患者血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇水平均显著高于血脂正常组及正常对照组($P=0.000$), 辛伐他汀降脂治疗 1.5 及 3 个月后血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇水平呈递减趋势, 且有显著差异(P 值分别为 0.000、0.000、0.027); 外周血单个核细胞转化生长因子 β 及其受体 mRNA 表达水平按正常对照组、血脂正常组、血脂增高组的顺序递增, 血脂增高组患者于辛伐他汀治疗后随血脂的下降呈逐步下降趋势。**结论** 肾移植患者高脂血症可导致转化生长因子 β 及其受体 mRNA 表达水平上调, 可能是高脂血症引起动脉硬化、慢性移植肾病的机制之一; 辛伐他汀降脂治疗可使转化生长因子 β 及其受体的表达下调, 有助于减少肾移植患者动脉硬化及慢性移植肾病的发生。

[中图分类号] R6

[文献标识码] A

The mRNA Expression of Transforming Growth Factor (TGF) β 1 and its Receptor TGF β R3 mRNA in Peripheral Monocyte Cells of Kidney Transplant Patients with Hyperlipidemia and the Influence of Treatment with Simvastatin

HAN Cong-Hui¹, WANG Xiao-Hong¹, WANG Yu-Xin¹, GUI Xi-Qing¹, XU Qin-Jun², ZHENG Ke-Li¹, and TANG Xiao-Da²

(1. Department of Nephrology, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000; 2. Department of Nephrology, First People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200080, China)

[KEY WORDS] Kidney Transplantation; Hyperlipidemia; Transforming Growth Factor; Simvastatin; Chronic Allograft Nephropathy; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) and hyperlipidemia are involved in the pathogenesis of chronic allograft nephropathy (CAN) and atherosclerosis post renal transplantation. In this study, the mRNA expressions of TGF β 1 and its receptor TGF β R3 were measured to investigate the mRNA expressions of MCP-1 and CCR2 in peripheral blood monocyte cells of renal transplant recipients and the influence by Simvastatin treatment. **Methods** Sixty recipients were selected from 167 renal transplant recipients and divided into group without hyperlipidemia ($n=30$) and hyperlipidemia group ($n=30$). Control group consists of 30 healthy volunteers. The patients with hyperlipidemia were treated with Simvastatin for 3 months. The mRNA expressions of TGF β 1 and TGF β R3 were detected with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The serum lipid levels and the mRNA expression of TGF β 1 and TGF β R3 in renal transplant recipients were significantly higher than that in controls. The mRNA expression of TGF β 1 and TGF β R3 in patients with hyperlipidemia were more significantly higher than that in the patients without hyperlipidemia ($P=0.000$), and the serum lipid levels and the mRNA expression of TGF β 1 and TGF β R3 decreased gradually at 1.5 months and 3 months after treated with Simvastatin. **Conclusions** Hyperlipidemia in renal transplant recipients might result in upregulated mRNA expression of TGF β 1 and TGF β R3 in renal transplant recipients, Simvastatin treatment may decrease the serum lipid levels and the mRNA expression of TGF β 1 and TGF β R3 in peripheral mononuclear cells, and it may be one of the important mechanism to prevent CAN and atherosclerosis in renal recipients with hyperlipidemia.

[收稿日期] 2004-04-02

[修回日期] 2004-08-09

[作者简介] 韩从辉, 医学博士后, 副教授, 主要从事肾移植研究。通讯作者王玉新, 博士后, 副教授, 主要从事肾脏移植后慢性移植肾病的临床和基础研究, E-mail 为 yuxinwang@citiz.net。桂西青, 医学硕士, 副教授, 主要从事泌尿外科及肾移植的临床及基础研究。

研究发现,约60%的肾脏移植患者伴有高脂血症,是肾移植患者动脉硬化及慢性移植肾病(chronic allograft nephropathy, CAN)发生的重要因素,其机制尚不明确^[1, 2]。近年研究报道,细胞生长因子与动脉硬化和慢性移植肾病有关联^[3, 4]。本研究采用逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法对伴有高脂血症的肾移植患者外周血单个核细胞中转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor $\beta 1$, TGF $\beta 1$)及其受体TGF β R3 mRNA表达水平进行检测,并观察降脂治疗后的变化,探讨高脂血症对上述因子表达的影响。

1 对象与方法

1.1 试剂与仪器

血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)试剂为英国Randox公司产品,高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)检测试剂为德国宝灵曼公司产品;淋巴细胞分离液Ficol购自上海生物制品所, RNA抽提试剂、逆转录试剂购自Gibco公司;PCR试剂、琼脂糖购自Promega公司。PT-200型微电脑基因扩增仪为MJRESEARCH公司产品, POWER/PAC200型电泳仪为BIO-RAD公司产品, Uitrospec 3000型紫外分光光度计为Pharmacia公司产品, EBA12R型冷浴离心机为Tettich公司产品, Bio IMAGING SYSTEM为Gene Genius公司产品。

1.2 病例选择

167例肾移植患者,原发病为慢性肾小球肾炎,移植前血清TC、TG水平正常;术后采用强的松+环孢素+霉酚酸酯抗排斥反应治疗方案;尿量、尿常规正常,血肌酐 < 170 mmol/L;根据移植后6~8个月血脂水平分为两组:血脂正常组30例,其中男16例,女14例,年龄 40 ± 10 岁;血脂增高组30例(TC > 5.85 mmol/L或TG > 1.70 mmol/L),其中男17例,女13例,年龄 41 ± 9 岁;血脂增高组服用辛伐他汀(商品名舒降之,默沙东公司产品)20 mg/d治疗。正常对照组为健康体检者30例,男15例,女15例,年龄 40 ± 9 岁。

1.3 标本收集

于肾移植前一天及术后6个月取枸橼酸钠抗凝血5 mL,分离外周血单个核细胞(peripheral mononuclear cell, PMNC)用于总RNA抽提。高脂血症组于

辛伐他汀治疗后1.5及3个月复查血脂。所有受试者抽血前1个月内无感染病史。

1.4 血脂检测方法

采用酶法检测TC和TG,直接法检测HDLC和LDLC。

1.5 外周血单个核细胞的分离及总RNA抽提

空白试管中加入Ficol 2~3 mL备用;血标本以两倍体积的生理盐水稀释后缓慢加入Ficol试管中,2 000 g常温离心30 min,此时血标本由上至下可分为四个层面:生理盐水与血浆、PMNC混悬液、Ficol和红细胞,抽取PMNC混悬液,加生理盐水洗涤2次,将底层的PMNC转移至无Rnase的Ependoff管中,加Trizol 1 mL,剧烈震荡,使之充分混匀,置室温5 min后加氯仿0.2 mL,继续12 000 g、4℃离心15 min;将上清液转移至另一Ependoff管中,加异丙醇0.5 mL,室温静置10 min,12 000 g、4℃离心15 min,弃上清液后加75%乙醇1 mL,12 000 g、4℃离心10 min;弃上清液,室温自然干燥5~10 min,加DEPC水20 μ L,充分混匀,取1 μ L以纯水稀释100倍,紫外分光光度计测OD值与RNA浓度,余RNA -80°C 冻存。

1.6 逆转录聚合酶链反应检测转化生长因子 $\beta 1$ 及其受体mRNA表达

总RNA 1 μ g, Random Primer 1 μ L, dNTP 1 μ L加DEPC水至11.5 μ L,70℃预变性5 min,加5 \times Buffer 5 μ L,0.1 mol/L DTT 2 μ L, Rnase OUT Rnase Inhib 0.5 μ L, M-MLVRT 1 μ L,37℃1 h,95℃5 min后加150 μ L纯水稀释,取1 μ L紫外分光光度测定OD值与cDNA浓度,余分装后 -80°C 冻存。TGF $\beta 1$ 上游引物序列为CTGCGGATCTCTGTGTCATT,下游引物序列为GTGGTATCGTTGTAGACTC,扩增产物长度为246 bp;TGF β R3上游引物序列为CCAAGATGAATGGCACACAC,下游引物序列为CCATCTGGCCAACCACTACT,扩增产物长度为159 bp; β -actin上游引物序列为TGGCACACACCTTCTACAATGAGCTGCG,下游引物序列为CGTCATACTCCTTGCTCCACATCTGC,扩增产物长度为838 bp。加样为10 \times buffer 5 μ L,2.5 mmol/L MgCl_2 4 μ L, dNTP 1 μ L, Taq DNA聚合酶1.5 u,相应引物2 μ L,加水至50 μ L。95℃预变性3 min进入循环:94℃变性30 s,退火45 s,72℃延伸1 min,最后72℃保温10 min。退火温度分别为:TGF β R3为55℃,TGF $\beta 1$ 与 β -actin退火温度同相应目标引物。

取扩增后目标产物10~12 μ L,扩增后的 β -actin产物1.5~3 μ L,1.5~2.5%琼脂糖凝胶电泳30~50 min(电压5~8 V/cm),紫外光下观察结果(图1, Figure 1)。选择Marker中2 kb条带作参照, Synogene tool软件测定产物条带的相对重量,计

算目标产物与 β -actin 的比值。

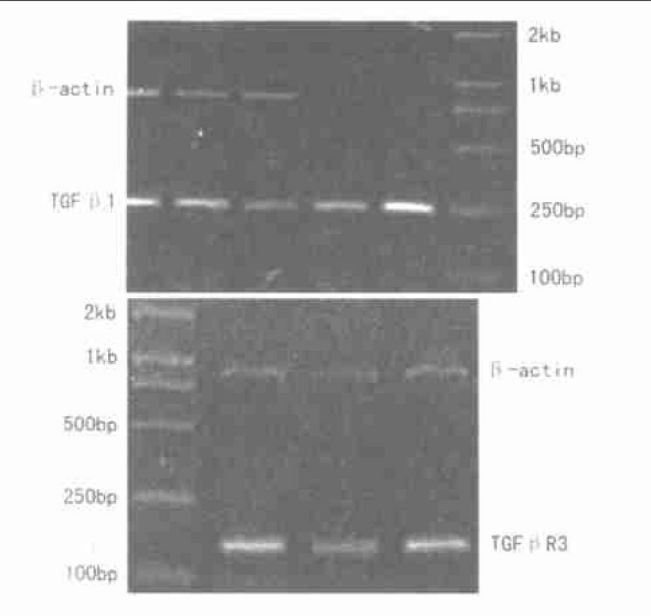


图 1. 逆转录聚合酶链反应产物电泳结果
Figure 1. The electrophoretic results of PCR

表 1. 正常对照者及肾移植患者移植前后血脂水平比较

Table 1. The serum lipid levels of controls and the patients before and after renal transplant

指 标	正常对照组	血脂正常组		血脂增高组	
		移植前	移植后	移植前	移植后
TC (mmol/L)	4.62±0.90	3.92±0.60	4.44±0.75	3.87±0.64	7.30±1.89 ^{ab}
TG (mmol/L)	1.22±0.82	1.33±0.57	1.26±0.51	1.28±0.50	3.60±1.52 ^{ab}
HDL (mmol/L)	1.31±0.30	1.11±0.21	1.9±0.61	1.09±0.18	1.38±0.59
LDL (mmol/L)	2.36±0.76	1.87±0.72	2.03±0.91	1.79±0.69	3.0±1.41 ^{ab}

a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.01$, 与移植前比较。

表 2. 血脂增高组辛伐他汀治疗前后血脂水平的比较

Table 2. The serum lipid levels in patients with hyperlipidemia before and after treatment with Simvastatin

指 标	治疗前	治疗 1.5 个月	治疗 3 个月
TC (mmol/L)	7.30±1.89	5.60±1.29 ^b	4.64±1.01 ^{bd}
TG (mmol/L)	3.60±1.52	2.58±1.20 ^b	1.84±0.96 ^{bd}
HDL (mmol/L)	1.38±0.59	1.31±0.60	2.16±0.96 ^{bd}
LDL (mmol/L)	3.0±1.41	2.71±1.19 ^a	2.33±0.98 ^{bc}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与治疗前比较; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与治疗 1.5 个月比较。

3 讨论

由于肾移植抗排斥反应等治疗的进展, 术后患

1.6 统计学处理

组间均数或中位数比较采用 ONOVA 检验或非参数资料的 Kruskal-Wallis 检验。

2 结果

2.1 各组血脂水平比较

血脂增高组血清 TC、TG 及 LDLC 水平均显著高于对照组及血脂正常组, 对照组与血脂正常组血清 TC、TG 及 LDLC 水平无显著性差异 (表 1, Table 1)。

2.2 辛伐他汀治疗后血脂变化

治疗 1.5 及 3 个月 TC、TG、LDLC 呈递减趋势, 且有显著差异, HDL 水平于治疗 3 个月时显著增高 (表 2, Table 2)。

2.3 转化生长因子 $\beta 1$ 及其受体 mRNA 表达水平的比较

TGF $\beta 1$ 、TGF $\beta R3$ mRNA 表达水平按对照组、血脂正常组、血脂增高组的顺序递增; 血脂增高组患者降脂治疗后呈逐步下降趋势 (表 3, Table 3)。

者急性并发症如急性排斥、感染等明显减少, 移植肾存活时间显著延长。而慢性并发症尤其是移植肾慢性肾病则成为影响肾移植患者长期存活的主要因素, 每年约有 10%~15% 的患者发生移植肾慢性肾病, 而脂代谢紊乱是慢性移植肾病及动脉硬化的主要因素之一^[2, 5, 6], 所导致的细胞生长因子的异常表达也起重要作用^[7, 8]。

转化生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) 及其受体的过度表达可促进细胞外基质沉积于血管壁及成纤维母细胞的分裂增殖, 与动脉硬化和慢性移植肾病有关^[3, 4, 9]。有研究证实, 移植肾纤维化的程度与 TGF $\beta 1$ 及其受体的表达呈正相关, TGF $\beta 1$ 在慢性移植肾病的发病机制中起重要作用, 是慢性移植肾病的一

表 3. 转化生长因子 $\beta 1$ 及其受体表达水平及辛伐他汀治疗后的变化

Table 3. TGF $\beta 1$ and TGF β R3 expression and the alteration after Simvastatin treatment

指 标	对照组	血脂正常组	血脂增高组		
			治疗前	治疗 1.5 个月	治疗 3 个月
TGF $\beta 1$	11.03 \pm 0.84	2.53 \pm 2.57 ^a	3.63 \pm 3.98 ^{ab}	3.18 \pm 1.78 ^c	2.07 \pm 1.81 ^{cd}
TGF β R3	31.40 \pm 1.81	1.78 \pm 1.32 ^a	2.71 \pm 2.38 ^{ab}	2.41 \pm 1.65 ^c	1.57 \pm 1.78 ^{cd}

a: $P < 0.05$, 与对照组比较; b: $P < 0.05$, 与血脂正常组比较; c: $P < 0.05$, 与治疗前比较; d: $P < 0.05$, 与治疗 1.5 月比较。

个主要因素^[10]。

本研究发现, 肾移植患者 TGF $\beta 1$ 及其受体 mRNA 表达水平均显著高于对照组, 其中伴高脂血症的肾移植患者 TGF $\beta 1$ 、TGF β R3 的 mRNA 表达水平显著高于血脂正常者, 降脂治疗后显著降低。提示血脂水平与 TGF $\beta 1$ 因子和其相应受体 mRNA 的表达水平有关。其机制可能是高脂血症导致泡沫细胞形成增多沉积于血管壁, 造成血管内膜损伤, 产生趋化因子, 促使单核细胞、淋巴细胞积聚于损伤部位, 血管平滑肌细胞迁移至内皮下, 并产生 TGF 等各种生长因子, 进一步促进细胞增殖与细胞外基质的形成^[6-8]。降脂治疗对 TGF 因子 mRNA 的下调作用除血脂水平降低外, 还可能与其它机制。

辛伐他汀是戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂, 除降低血脂外, 还可抑制淋巴细胞、单核细胞及 NK 细胞的增殖与活性, 以普遍用来治疗临床高胆固醇血症; 最新的研究证实辛伐他汀不仅可以改善血管内皮细胞的功能, 防治动脉硬化, 还可诱导肾小球系膜细胞的凋亡, 对肾小球硬化的防治具有一定的作用^[11-15]。本研究证实辛伐他汀对肾脏移植后高脂血症的治疗具有较好的临床效果, 有助于防止慢性移植肾病。

因此, 我们认为, 肾移植患者高脂血症可导致与动脉硬化、慢性移植肾病有关的 TGF $\beta 1$ 及其受体 mRNA 表达水平上调, 可能是高脂血症引起动脉硬化、慢性移植肾病的机制之一; 降脂治疗可使 TGF $\beta 1$ 及其受体的表达下调, 有助于减少肾移植患者动脉硬化及慢性移植肾病的发生。

[参考文献]

[1] Nankivell BJ, Lau SG, Chapman JR, O'Connell PJ, Fletcher JP, Allen RD. Progression of macrovascular disease after transplantation. *Transplant*, 2000, **69**: 574-581

[2] 王玉新, 徐琴君. 肾移植与高脂血症. *中华器官移植杂志*, 2001, **22** (4): 246-247

[3] Ariela B, BiolScid, Giuseppe R. How renal cytokines and growth factors contribute to renal disease progression. *AJKD*, 2001, **37** (Suppl 2): 21-24

[4] Attila S, Jens L, Karina S, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on growth factor mRNA in chronic renal allograft rejection in the rat. *Kidney Int*, 2000, **57**: 981-991

[5] 王祥慧. 器官移植免疫抑制剂应用的现状及其发展趋势. *上海免疫学杂志*, 2002, **22** (4): 220-224

[6] 王玉新, 陆元善, 徐琴君, 李清芹, 邹和群, 唐孝达. 肾脏移植患者脂代谢紊乱的临床研究. *中华肾脏病杂志*, 2004, **20** (1): 61

[7] Klahr S, Morrissey JJ. The role of vasoactive compounds, growth factors and cytokines in the progression of renal disease. *Kidney Int*, 2000, **57** (Suppl) 75: 7-14

[8] Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol*, 2000, **15**: 290-301

[9] Vuillemin T, Legendre C, Meduri G, Larue JR, Goupy C, Kriaa F, et al. Chronic rejection and growth factors. *Transplant Proc*, 1996, **28**: 2831-832

[10] 韩从辉, 何长民. 肾脏移植新进展. *国外医学·器官移植分册*, 2002, **2** (2): 40-44

[11] 覃军, 李爱民. 他汀类药物对血管平滑肌细胞的直接作用及其意义. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8**: 373-375

[12] 舒春兰, 周临生, 雷小勇, 成元桂. 氟伐他汀对高脂血症患者的血脂及细胞粘附分子的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10**: 62-64

[13] 苏琳, 苗懿德, 孙宁玲, 周惠清, 张万蕾. 洛伐他汀降脂治疗对老年人血管内皮功能及颈动脉内膜-中膜厚度的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9**: 420-423

[14] Katznelson S, Wang XM, Chia D, Ozawa M, Zhong HP, Hirata M, et al. The inhibitory effects of pravastatin on nature killer cell activity in vivo and cytotoxic T lymphocyte activity in vitro. *J Heart Lung Transplant*, 1998, **17**: 335-340

[15] 孙田美, 梅长林, 葛守一, 徐成钢, 赵海丹, 李林, 等. 洛伐他汀对系膜细胞凋亡及 Bcl-2 和 Bax 基因表达的影响. *中华肾脏病杂志*, 2003, **19** (1): 38-42

(此文编辑 文玉珊)

•名词解释•

[文章编号] 1007-3949(2005)13-01-0068-01

[合酶 synthase]

合酶是一种裂解酶, 可将一种底物加合到另一种底物的双键上。如 ATP 合酶、一氧化氮合酶、羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶。这类酶所催化的反应不需要磷酸酐键的水解提供能量, 如 ATP 合酶是催化 ADP 合成 ATP 的膜结合蛋白复合物, 所需的能量来自叶绿体类囊体膜或线粒体内膜的跨膜质子电化学梯度。

(易光辉 编译)