

MMP-9/TIMP-1 在 HHcy 致 ApoE^{-/-} 小鼠肾脏损伤中的作用机制

孔繁琪¹, 马胜超², 张辉³, 和杨杨¹, 赵丽¹, 孙炜炜³, 曹建³, 王艳华³, 田珏¹, 杨晓玲¹, 姜怡邓¹
(宁夏医科大学 1. 基础医学院, 3. 检验学院, 宁夏银川市 750004; 2. 四川大学基础医学与法医学院, 四川省成都市 610041)

[关键词] 高同型半胱氨酸血症; 基质金属蛋白酶 9; 组织型基质金属蛋白酶抑制剂 1; 肾脏损伤

[摘要] **目的** 探讨高同型半胱氨酸血症 (HHcy) 导致 ApoE^{-/-} 小鼠肾脏损伤的作用机制, 为 HHcy 所致肾脏疾病的预防和治疗提供理论和实验依据, 为肾病患者的疾病监测提供新的指标。 **方法** 将 5 周龄雄性纯合子 ApoE^{-/-} 小鼠随机分组: ApoE^{-/-} 对照组饲以普通饮食, ApoE^{-/-} 高蛋氨酸组饲以高蛋氨酸饮食, ApoE^{-/-} 干预组饲以加叶酸和维生素 B12 的高蛋氨酸饮食, 5 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄鼠饲以普通饮食作为正常对照组, 喂养 14 周后, 生化分析仪测定血清同型半胱氨酸 (Hcy)、肌酐及尿素浓度, 透射电镜和 PAS 染色检测小鼠肾脏损伤情况, 荧光定量 PCR 检测肾脏基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 和组织型基质金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP-1) mRNA 表达水平, 并免疫组织化学染色法分析肾脏 MMP-9 蛋白表达, ELISA 检测 TIMP-1 蛋白表达。 **结果** 与正常对照组相比, ApoE^{-/-} 高蛋氨酸组血清 Hcy、肌酐及尿素浓度分别升高了 3.66 倍、1.1 倍和 1.6 倍 ($P < 0.01$); 透射电镜和 PAS 染色结果显示, ApoE^{-/-} 高蛋氨酸组较正常对照组肾脏损伤明显, 荧光定量 PCR 结果显示 MMP-9 及 TIMP-1 mRNA 表达则分别升高了 5.25 倍和 1.38 倍 ($P < 0.01$); 免疫组织化学结果显示 ApoE^{-/-} 高蛋氨酸组 MMP-9 表达较正常对照组明显升高 ($P < 0.01$); ELISA 结果显示 ApoE^{-/-} 高蛋氨酸组 TIMP-1 蛋白表达比正常对照组明显升高 ($P < 0.01$)。与 ApoE^{-/-} 高蛋氨酸组相比, ApoE^{-/-} 干预组血清 Hcy 浓度下降, 且肌酐和尿素浓度均降低 ($P < 0.01$); 透射电镜和 PAS 染色结果显示, ApoE^{-/-} 干预组肾脏损伤较 ApoE^{-/-} 高蛋氨酸组减轻。血清 Hcy 浓度与其肌酐及尿素浓度呈正相关 ($r^2 = 0.4344, P < 0.0001$; $r^2 = 0.4478, P < 0.0001$), 与 MMP-9/TIMP-1 比值也呈正相关 ($r^2 = 0.39309, P < 0.001$), 且小鼠肾脏 MMP-9/TIMP-1 比值与肌酐及尿素浓度也成正相关 ($r^2 = 0.1464, P < 0.05$; $r^2 = 0.3027, P < 0.01$)。 **结论** HHcy 可能是经 MMP-9/TIMP-1 比例上调致细胞外基质降解, 继而导致肾脏损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects and Mechanisms of MMP-9/TIMP-1 in HHcy Induced ApoE^{-/-} Mice Kidney Damage

KONG Fan-Qi¹, MA Sheng-Chao², ZHANG Hui³, HE Yang-Yang¹, ZHAO Li¹, SUN Wei-Wei³, CAO Cheng-Jian³, WANG Yan-Hua³, TIAN Jue¹, YANG Xiao-Ling¹, and JIANG Yi-Deng¹

(1. School of Basic Medical Sciences, 3. College of Medical Examination, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

[KEY WORDS] Hyperhomocysteinemia; Matrix Metalloproteinase-9; Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1; Kidney Damage

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect and mechanisms of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in ApoE^{-/-} mice kidney damage induced by hyperhomocysteinemia (HHcy), provide theoretical and experimental basis for the prevention and treatment of kidney disease, and supply a new indicator for kidney disease surveillance. **Methods** 5 week old male ApoE^{-/-} mice were divided into three groups: ApoE^{-/-} control group, ApoE^{-/-} high methionine diet group and ApoE^{-/-} intervention group, and 5 week old SPF male C57BL/6J mice

[收稿日期] 2015-01-23

[修回日期] 2015-03-18

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81260105, 81160044, 81260063); 宁夏自然科学基金重点项目 (NZ13054); 宁夏回族自治区科技厅科技攻关项目 (20100820, [2012]17 号)

[作者简介] 孔繁琪, 硕士研究生, 主要从事心血管病理生理研究, E-mail 为 623300170@qq.com。马胜超, 博士研究生, 主要从事心血管病理生理研究。通讯作者姜怡邓, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管病理生理研究, E-mail 为 jydcn@126.com。

were chosen as normal control group. After fed for 14 weeks, the serum concentration of homocysteine (Hcy), creatinine (Cr) and urea were detected by biochemical analyzer, transmission electron microscopy and PAS staining were used to show the damage of kidney. MMP-9 and TIMP-1 mRNA expression levels of kidney were detected by real-time PCR, MMP-9 protein expression of kidney was assayed by immunohistochemical staining and TIMP-1 protein expression was detected by ELISA. **Results** Compared with normal control group, the serum concentration of Hcy, Cr and urea of ApoE^{-/-} high methionine diet group were significantly increased by 3.66-, 1.1- and 1.6-folds ($P < 0.01$). Transmission electron microscopy and PAS staining showed that kidney damage of ApoE^{-/-} high methionine diet group were more serious than normal control group. Real-time PCR results showed that mRNA expressions of MMP-9 and TIMP-1 were evidently increased by 5.25- and 1.38-folds respectively ($P < 0.01$). The results of immunohistochemistry assay showed that protein expression of MMP-9 in ApoE^{-/-} high methionine diet group was significantly higher than that in the normal control group ($P < 0.01$), ELISA assay showed TIMP-1 protein expression in the ApoE^{-/-} high methionine diet group was significantly higher than that in the normal control group ($P < 0.01$). Compared with ApoE^{-/-} high methionine diet group, Hcy levels decreased in ApoE^{-/-} intervention group ($P < 0.01$), and Cr and urea levels were significantly decreased ($P < 0.01$). Transmission electron microscopy and PAS staining showed that kidney damage of ApoE^{-/-} intervention group were relieved compared with high methionine diet group. Serum Hcy level was positively correlated with Cr and urea ($r^2 = 0.4344$, $P < 0.0001$; $r^2 = 0.4478$, $P < 0.0001$), and also with the ratio of MMP-9/TIMP-1 ($r^2 = 0.39309$, $P < 0.001$). And the ratio of MMP-9/TIMP-1 was positively correlated with Cr and urea ($r^2 = 0.1464$, $P < 0.05$; $r^2 = 0.3027$, $P < 0.01$). **Conclusions** HHcy could cause the up-regulation of MMP-9/TIMP-1 and degradation of extracellular matrix, then lead to ApoE^{-/-} mice kidney damage.

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是蛋氨酸代谢的中间产物,而血液中总 Hcy (tHcy)的浓度病理学性升高可形成高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, HHcy)^[1-2],临床及流行病学资料研究显示 HHcy 是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的独立危险因素^[3]。肾脏是清除和代谢 Hcy 的主要器官,且有研究显示 HHcy 可导致肾脏损伤^[4]。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是血管壁的重要组成部分,近年来研究发现 ECM 的合成和降解失衡是多种原发性或继发性肾病发生、发展的重要原因^[5]。而基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)是 ECM 降解的关键酶系,其中 MMP-9 是 II 型胶原酶之一,主要功能是降解明胶、IV、V、VII 型胶原和 FN、PG 及弹性蛋白等^[6]。而组织型基质金属蛋白酶抑制剂 1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)是 MMP-9 的特异性抑制剂,其通过 1:1 的形式与 MMP-9 形成复合物而抑制其活性,降低 ECM 的降解^[7]。有研究表明, MMP-9 与 TIMP-1 比值改变在肾间质纤维化形成过程中起到了重要作用^[8]。但是 HHcy 是否能够通过改变肾脏 MMP-9/TIMP-1 导致 ECM 的合成降解失衡继而导致肾脏损伤,尚未见报道。因此,本研究通过观察 MMP-9 与 TIMP-1 比值的变化以及与血清 Hcy 的相关性分析,探讨 HHcy 是否通过引起 MMP-9/TIMP-1 的改变使 ApoE^{-/-} 小鼠 ECM 合成和降解失衡以致基底膜损伤进而造成肾脏损害,为研究 HHcy 致肾脏损伤机

制提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

德国 SIEMENS 2400 全自动生化分析仪及试剂盒; Trizol 试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒 (Invitrogen, 美国); MMP-9 兔抗鼠一抗(武汉博士德生物工程有限公司); MMP-9 免疫组织化学检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司); 蛋白提取试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司); TIMP-1 ELISA 试剂盒(北京永辉生物科技有限公司); 相差显微镜(日本 Nikon 公司); 荧光定量 PCR 仪(上海 Funclyn); 5415D 型微量台式离心机(德国 Eppendorf 公司); BS110S 型精密天平(德国 Sartorius); Milli-QA10 型纯水仪(美国 MILLIPORE); 引物由上海生工生物有限公司合成。

1.2 动物模型与分组

正常小鼠(SPF 级 C57BL/6J, 12 只)和雄性纯合子 ApoE^{-/-} 小鼠(SPF 级近交系 C57BL/6J, 36 只)购自北京大学实验动物中心,选择体重和年龄均与 ApoE^{-/-} 小鼠匹配的正常雄鼠(Wild type, WT)作为正常对照。实验动物分组:①正常对照组($n = 12$):野生型小鼠饲以普通饮食;②ApoE^{-/-} 对照组($n = 12$):随机挑选 ApoE^{-/-} 小鼠 12 只,饲以普通饮食;③ApoE^{-/-} 高蛋白组($n = 12$):随机挑

选 ApoE^{-/-}小鼠 12 只,饲以高蛋白氨基酸饮食(普通饮食中加入 1.7% 蛋氨酸);④ApoE^{-/-}干预组($n = 12$):随机挑选 12 只 ApoE^{-/-}小鼠,饲以加 0.006% 叶酸和 0.0004% 维生素 B12 的高蛋白氨基酸饮食。小鼠均饲养于 SPF 级环境内,分笼饲养,室内温度控制在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度 60% 左右,明暗交替各 12 h,换气次数 18 次/小时,动物饲养笼具、饮水瓶定期消毒,所用垫料高压灭菌,饲养房内定期紫外灯消毒并自由摄食和饮水,饲养 14 周后进行实验。

1.3 血清生物化学指标检测

取标本前小鼠禁食 12 h,称重,均接受 2 mL/100 g 体重腹腔注射 20% 乌拉坦麻醉,眼球摘除取血,分离血清,应用德国 SIEMENS 2400 全自动生化分析仪测定血清 Hcy、肌酐和尿素等。

1.4 透射电镜观察肾脏组织亚细胞结构

取 1 mm × 1 mm × 1 mm 新鲜肾组织,分别用戊二醛、锇酸固定,乙醇、丙酮脱水,包埋剂浸透,树脂与硬化剂等包埋,超薄切片机切片,枸橼酸铅双染色后电镜下观察。

1.5 PAS 染色观察肾脏组织结构改变

肾组织用 Carnoy 液固定,常规脱水包埋。石蜡切片脱蜡入蒸馏水后用自来水冲洗 3 min,再用蒸馏水浸洗 2 次。置于试剂 A 中,室温放置 7 min,自来水冲洗 1 次,再用蒸馏水浸洗 2 次。样本放入试剂 B,置于室温阴暗处浸染 20 min,自来水冲洗 10 min。样本置于试剂 C 中染核 2 min,自来水冲洗 15 min,更换双蒸水清洗,使其返蓝。逐级常规乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

1.6 荧光定量 PCR 检测肾组织中 MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 表达

按 Trizol 试剂盒说明书提取肾组织总 RNA。根据 GeneBank 数据库查询 MMP-9、TIMP-1 的基因序列并设计引物。MMP-9 上游引物 5'-TGG GAC CAT CAT AAC ATC AC-3',下游引物 5'-ATG ACA ATG TCC GCT TCG-3',产物长度为 158 bp;TIMP-1 上游引物 5'-CCA GAA CCG CAG TGA AGA GT-3',下游引物 5'-AAG GGA TAG ATA AAC AGG GAA AC-3',扩增产物 182 bp;GAPDH 上游引物 5'-GGT GAA GGT CGG TGT GAA CG-3',下游引物 5'-CTC GCT GGA AGA TGG TG-3',扩增产物 186 bp。PCR 扩增程序:95℃ 10 min,95℃ 15 s,54℃ 30 s,72℃ 30 s,72℃ 10 min,共 40 个循环,并设空白对照和内参(GADPH)对照同体系扩增。目的基因的相对量根据公式 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算, $\Delta\Delta\text{Ct} = [\text{Ct}_{(\text{GI})}(\text{待测样本}) - \text{Ct}_{(\text{GAPDH})}(\text{待测样本})] -$

$[\text{Ct}_{(\text{GI})}(\text{校正样本}) - \text{Ct}_{(\text{GAPDH})}(\text{校正样本})]$,GI 是目的基因,校正样品是任何被选做代表 1 倍目的基因表达量的样品, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示的是实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数。

1.7 免疫组织化学检测肾脏 MMP-9 蛋白表达

麻醉状态下处死小鼠后取肾脏,肾组织经 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片(4 μm)后,用 SABC 法进行 MMP-9 免疫组织化学染色,操作步骤按产品说明书进行。利用显微镜计算机图像分析系统,每张组织切片观察 10 个高倍镜视野后,计算阳性面积与整个面积,并计算两者比值,取其平均值作为每张切片 MMP-9 阳性表达值。

1.8 ELISA 检测肾脏组织 TIMP-1 蛋白表达

按照凯基全蛋白提取试剂盒提取小鼠肾脏蛋白,按 ELISA 试剂盒说明书操作,检测得到吸光度值,制作标准曲线,计算得到各个样品 TIMP-1 蛋白含量。

1.9 统计学处理

采用 Graphpad Prism 5.0 进行统计学处理。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料组间比较采用单因素方差分析,计数资料比较采用 χ^2 检验,相关分析采用 Pearson 相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠血清 Hcy 浓度

与正常对照组相比,ApoE^{-/-}对照组血清 Hcy 浓度明显增高,达到了 1.93 倍($P < 0.05$);而 ApoE^{-/-}高蛋白氨基酸组血清 Hcy 升高更为明显,达到了 3.66 倍($P < 0.01$),说明 ApoE^{-/-}小鼠饲以高蛋白氨基酸饮食可以明显诱发 HHcy,提示 HHcy 模型复制成功;同时,与 ApoE^{-/-}对照组相比,ApoE^{-/-}干预组 Hcy 浓度则下降了 46.7% ($P < 0.01$),说明叶酸和维生素 B12 可以缓解由高蛋白氨基酸饮食导致的 HHcy(图 1)。

2.2 小鼠血清肌酐和尿素浓度

与正常对照组相比,另三组血清肌酐和尿素浓度均有明显增高,其中 ApoE^{-/-}对照组血清肌酐和尿素的浓度分别升高了 1.0 倍和 1.3 倍($P < 0.05$);ApoE^{-/-}高蛋白氨基酸组血清肌酐和尿素的浓度升高更为明显,分别达到了正常对照组的 1.1 倍和 1.6 倍($P < 0.01$);ApoE^{-/-}干预组血清肌酐和尿素浓度则分别较 ApoE^{-/-}高蛋白氨基酸组下降了 8.2% 和

26.7% ($P<0.01$;图2)。

2.3 血清中 Hcy 与肌酐和尿素的相关性分析

为进一步验证 HHcy 与肾脏损伤的相关性,对 各组小鼠血清 Hcy 浓度与血清尿素和肌酐浓度进 行了相关性分析,结果显示,血清中 Hcy 浓度与肌 酐、尿素浓度呈正相关($P<0.0001$),提示 HHcy 与 肾脏损伤密切相关(图3)。

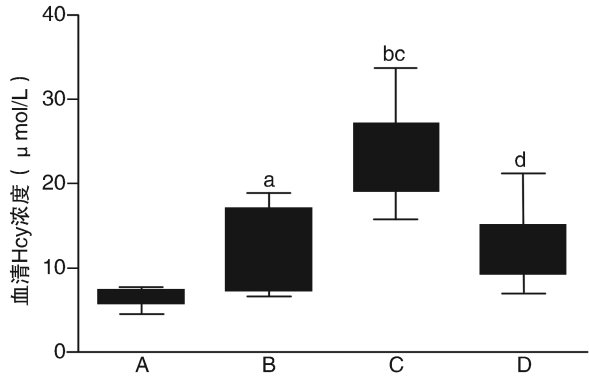


图 1. 各组小鼠血清 Hcy 浓度 A 为正常对照组, B 为 ApoE^{-/-} 对照组, C 为 ApoE^{-/-} 高蛋白氨酸组, D 为 ApoE^{-/-} 干预组。a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与正常对照组比较; c 为 $P<0.05$, 与 ApoE^{-/-} 对照组比较; d 为 $P<0.01$, 与 ApoE^{-/-} 高蛋白氨酸组比较。

Figure 1. The serum concentration of Hcy in mice

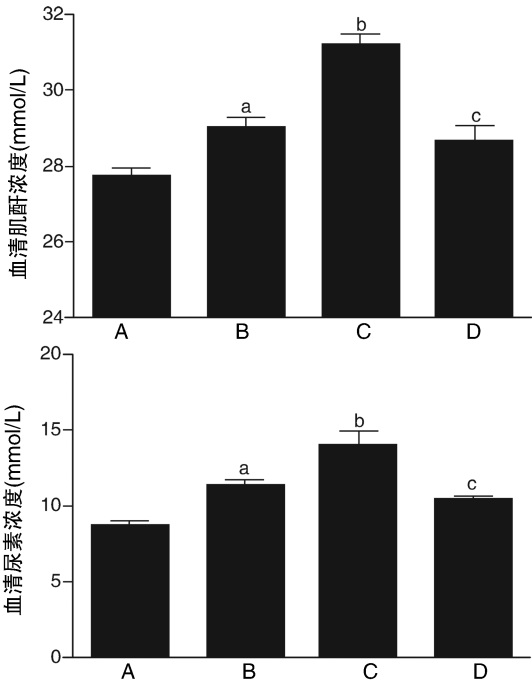


图 2. 各组小鼠血清肌酐和尿素浓度 A 为正常对照组, B 为 ApoE^{-/-} 对照组, C 为 ApoE^{-/-} 高蛋白氨酸组, D 为 ApoE^{-/-} 干预组。a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与正常对照组比较; c 为 $P<0.01$, 与 ApoE^{-/-} 高蛋白氨酸组比较。

Figure 2. The serum concentration of creatinine and urea in mice

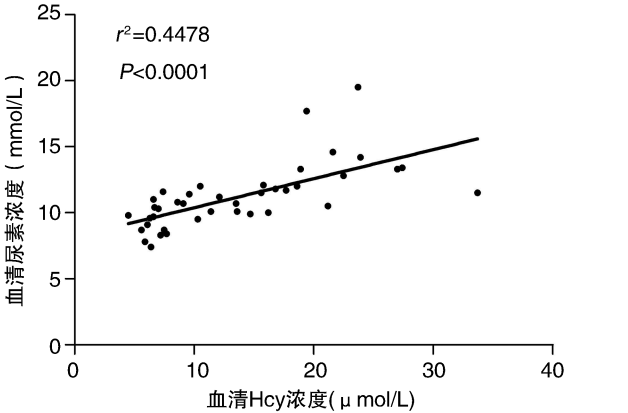
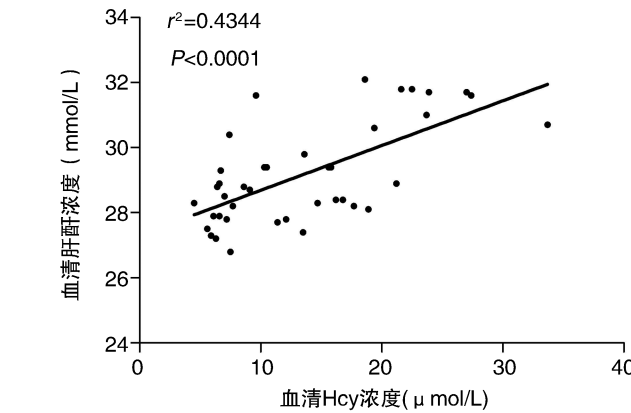


图 3. 血清 Hcy 浓度与肌酐和尿素浓度的相关性分析

Figure 3. Analysis of the correlation between serum concentration of Hcy and serum concentration of creatinine and urea

2.4 小鼠肾小球基底膜和足细胞改变

为了明确 Hcy 对肾脏的损伤作用,利用扫描电 子显微镜观察了肾小球基底膜和足细胞突触的形 态结构。正常对照组肾小球基底膜光滑清晰、薄厚 均匀,足细胞突触完整,次级足突形状规则,与基底 膜链接紧密,排列整齐。ApoE^{-/-} 对照组可见足突 有局灶性融合,并与基底膜分离,而基底膜完整光 滑。ApoE^{-/-} 高蛋白氨酸组小鼠肾小球基底膜出现薄

厚不均,局部有膨出,足细胞次级足突融合,并有局 灶性倒伏(红色箭头所示),同时在毛细血管中有大 量脂类物质聚集,堵塞管腔。ApoE^{-/-} 干预组病理 改变有所缓解,肾小球基底膜膨出少见,足细胞大 多次级足突排列整齐,但细胞核染色质有聚集现 象。电镜观察结果可以看出,饲以高蛋白氨酸饮食后 ApoE^{-/-} 小鼠肾小球有明显的病理改变,证实 HHcy 可 导致小鼠肾脏损伤(图4)。

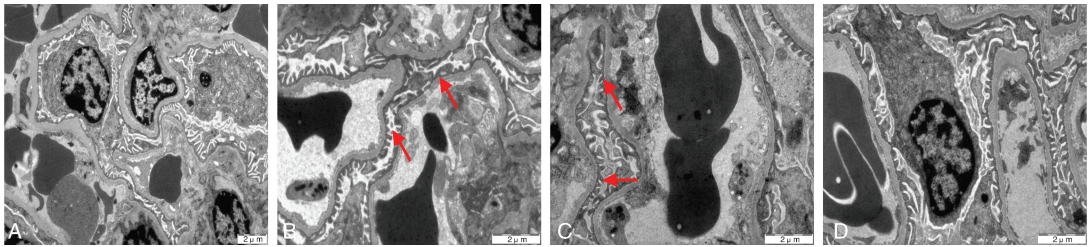


图 4. 电镜观察肾小球基底膜和足细胞超微结构的改变 (Bar = 2 μm , 20000 \times) A 为正常对照组, B 为 ApoE^{-/-} 对照组, C 为 ApoE^{-/-} 高蛋白组, D 为 ApoE^{-/-} 干预组。

Figure 4. Changes of glomerular basement membrane and podocyte ultrastructure observed by electron microscope (Bar = 2 μm , 20000 \times)

2.5 PAS 染色情况

正常对照组和 ApoE^{-/-} 对照组小鼠肾小球基底膜清晰、粗细均匀, 肾小球血管袢薄而清晰; ApoE^{-/-} 高蛋白组小鼠肾小球均不同程度地呈现基底膜粗细不均, 系膜增生, 并可见 PAS 阳性物质

沉积, 提示肾小球损伤。与 ApoE^{-/-} 高蛋白组相比, ApoE^{-/-} 干预组小鼠肾小球基底膜清晰, 均匀, 有局灶性增厚, 部分肾小球有代偿性增生, 肾小管内有轻微蛋白管型, 但病变程度有所缓解 (图 5)。

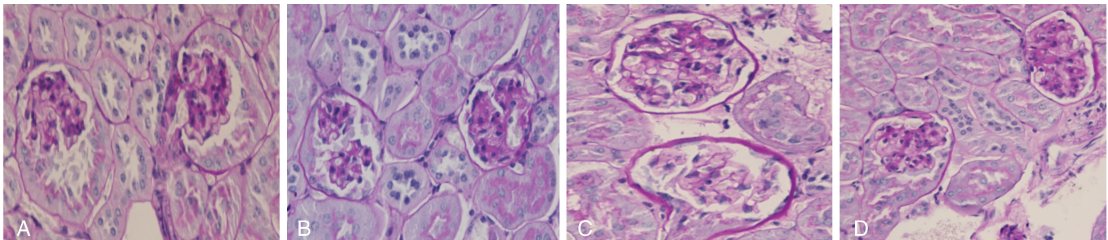


图 5. PAS 染色检测肾小球基底膜和足细胞超微结构的改变 (Bar = 20 μm , 400 \times) A 为正常对照组, B 为 ApoE^{-/-} 对照组, C 为 ApoE^{-/-} 高蛋白组, D 为 ApoE^{-/-} 干预组。

Figure 5. Changes of glomerular basement membrane and podocyte ultrastructure detected by PAS staining (Bar = 20 μm , 400 \times)

2.6 HHcy 致肾脏损伤中 MMP-9 的表达

免疫组织化学结果显示, 光镜下, 正常对照组肾小管上皮细胞未见 MMP-9 的阳性表达; ApoE^{-/-} 对照组肾小管上皮细胞 MMP-9 表达呈弱阳性; ApoE^{-/-} 高蛋白组肾小管上皮细胞 MMP-9 表达则呈现棕黄色的强阳性; ApoE^{-/-} 干预组肾小管上皮细胞 MMP-9 的表达较 ApoE^{-/-} 高蛋白组明显下降 (箭头所示为 MMP-9 阳性表达)。与正常对照组相比, ApoE^{-/-} 对照组和 ApoE^{-/-} 高蛋白组 MMP-9 蛋白表达分别升高了 1.44 倍和 2.4 倍 ($P < 0.01$); 与 ApoE^{-/-} 高蛋白组相比, ApoE^{-/-} 干预组 MMP-9 蛋白表达则下降了 39.4% ($P < 0.01$)。各组小鼠肾组织 MMP-9 mRNA 的表达趋势与蛋白相似, 与正常对照组相比, ApoE^{-/-} 对照组和 ApoE^{-/-} 高蛋白组 MMP-9 mRNA 的表达分别升高了 3.75 倍和 5.25 倍 ($P < 0.01$); ApoE^{-/-} 干预组 MMP-9 mRNA 的表达较 ApoE^{-/-} 高蛋白组则下

降了 52.4% ($P < 0.01$)。以上结果提示, 在 HHcy 致肾脏损伤过程中 MMP-9 的表达上调 (图 6)。

2.7 HHcy 致肾脏损伤中 TIMP-1 的表达

ApoE^{-/-} 对照组和 ApoE^{-/-} 高蛋白组 TIMP-1 mRNA 的表达分别为正常对照组的 1.13 倍和 1.38 倍 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 而 ApoE^{-/-} 干预组 TIMP-1 mRNA 的表达则为 ApoE^{-/-} 高蛋白组的 80% ($P < 0.01$)。TIMP-1 蛋白表达与 mRNA 的趋势相同, 与正常对照组相比, ApoE^{-/-} 高蛋白组 TIMP-1 蛋白的表达升高了 1.27 倍 ($P < 0.01$); 叶酸和维生素 B12 下调 TIMP-1 蛋白的表达, 使其较 ApoE^{-/-} 高蛋白组下降了 34.3% ($P < 0.01$; 图 7)。

2.8 小鼠肾组织 MMP-9/TIMP-1 比值变化

ApoE^{-/-} 对照组和 ApoE^{-/-} 高蛋白组 MMP-9/TIMP-1 比值较正常对照组明显升高 ($P < 0.01$); 而用叶酸和维生素 B12 干预后, MMP-9/TIMP-1 比值与 ApoE^{-/-} 高蛋白组相比下降 ($P < 0.05$; 图 8)。

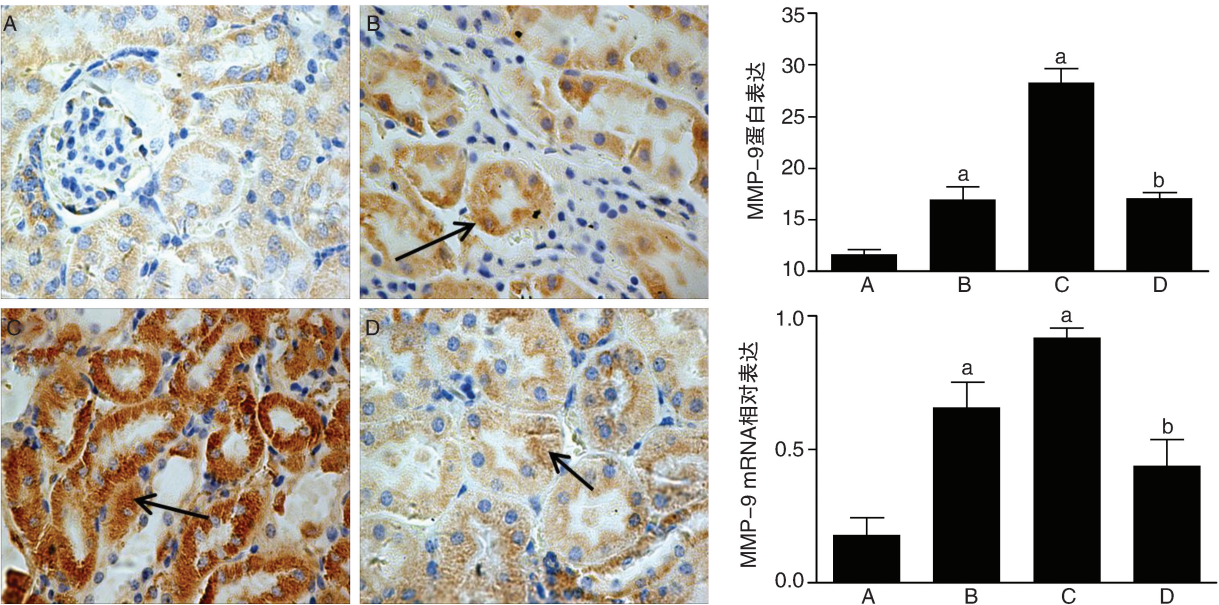


图 6. HHcy 致肾脏损伤中 MMP-9 的表达 (400 ×) A 为正常对照组, B 为 ApoE^{-/-} 对照组, C 为 ApoE^{-/-} 高蛋白氨酸组, D 为 ApoE^{-/-} 干预组。a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 ApoE^{-/-} 高蛋白氨酸组比较。

Figure 6. The expression of MMP-9 in kidney injury induced by HHcy (400 ×)

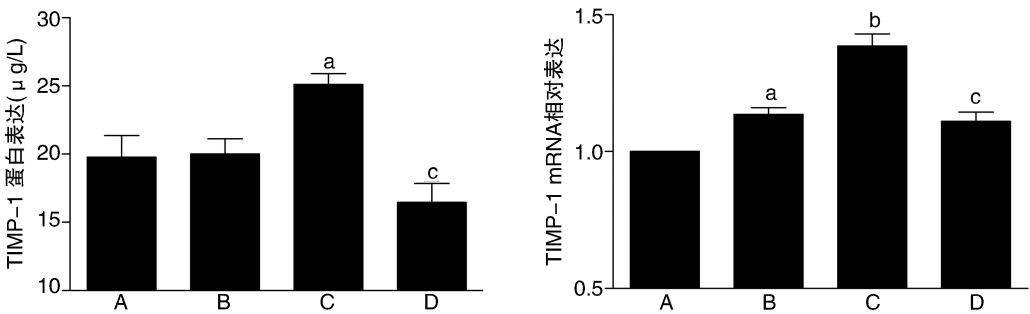


图 7. HHcy 致肾脏损伤中 TIMP-1 的表达 A 为正常对照组, B 为 ApoE^{-/-} 对照组, C 为 ApoE^{-/-} 高蛋白氨酸组, D 为 ApoE^{-/-} 干预组。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 ApoE^{-/-} 高蛋白氨酸组比较。

Figure 7. The expression of TIMP-1 in kidney injury induced by HHcy

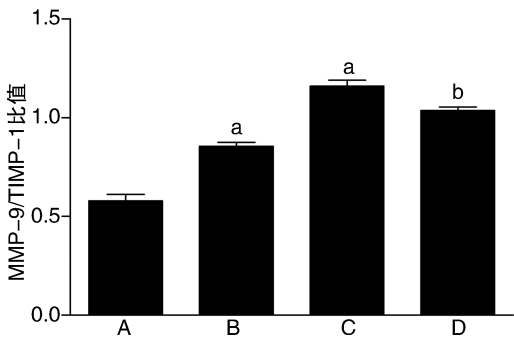


图 8. Hcy 作用下小鼠肾组织 MMP-9/TIMP-1 比值变化 A 为正常对照组, B 为 ApoE^{-/-} 对照组, C 为 ApoE^{-/-} 高蛋白氨酸组, D 为 ApoE^{-/-} 干预组。a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 ApoE^{-/-} 高蛋白氨酸组比较。

Figure 8. Changes of MMP-9/TIMP-1 in kidney of mice induced by HHcy

2.9 血清 Hcy 浓度与 MMP-9/TIMP-1 比值的相关性分析

血清 Hcy 浓度与 MMP-9/TIMP-1 比值呈正相关 ($r^2 = 0.39309$, $P < 0.001$; 图 9)。

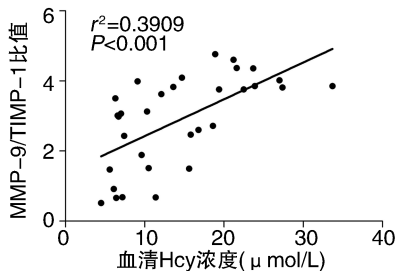


图 9. 血清 Hcy 浓度与 MMP-9/TIMP-1 比值的相关性分析
Figure 9. Analysis of the correlation between serum concentration of Hcy and MMP-9/TIMP-1 ratio

2.10 小鼠肾脏 MMP-9/TIMP-1 比值与血清肌酐和尿素浓度的相关性分析

小鼠肾脏 MMP-9/TIMP-1 比值与血清肌酐、尿

素浓度呈正相关 ($r^2 = 0.1464$, $P < 0.05$; $r^2 = 0.3027$, $P < 0.01$), 提示 MMP-9/TIMP-1 比值升高可以导致肾脏损伤(图 10)。

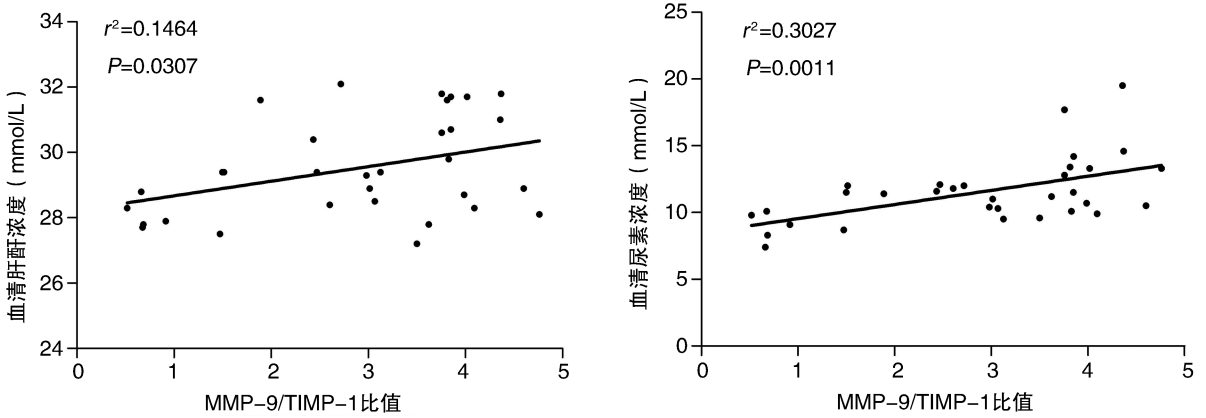


图 10. 小鼠肾脏 MMP-9/TIMP-1 比值与血清肌酐和尿素浓度的相关分析

Figure 10. Analysis of correlation between mouse kidney MMP-9/TIMP-1 ratio and serum concentration of creatinine and urea

3 讨论

Hcy 是非蛋白成分的含硫氨基酸,研究表明肾脏是清除血浆 Hcy 并进一步将其代谢的主要器官,其代谢特征主要是通过转硫通路,产生胱硫醚以及半胱氨酸,从而使肾脏的 Hcy 清除达 78%^[9]。近年有一些报道将 HHcy 与肾脏疾病联系起来,发现两者之间存在一定的关联性^[10-11]。Hcy 浓度升高与慢性肾功能不全、慢性肾功能衰竭、尿毒症、糖尿病肾病、高血压性肾病患者好发心脑血管疾病有关^[12]。本研究给予 ApoE^{-/-} 小鼠高蛋白饮食以复制 HHcy 模型,而后通过检测血清肌酐和尿素浓度、透射电镜及 PAS 染色观察肾小球、基底膜等的改变,发现 ApoE^{-/-} 高蛋白组较正常对照组和 ApoE^{-/-} 对照组而言,肾脏基底膜等发生了薄厚不均等改变,证实 HHcy 可导致肾脏损伤。同时有临床资料报道,肾病患者血清 Hcy 浓度明显升高,且随病情的加重血清 Hcy 浓度呈逐渐上升趋势,可与 Cys、RBP、肌酐、尿素等肾病相关指标联合检测,对肾脏疾病的鉴别及疾病严重程度作出判断^[13]。但是,HHcy 对肾脏损害的机制尚未完全阐明。

ECM 的合成和降解失衡是多种原发性或继发性肾病发生、发展的重要原因。MMP 是 ECM 降解的关键酶系,ECM 合成和降解的平衡是维持肾小球、肾小管结构和功能完整的必要条件,MMP-9 表达或活性的改变将直接影响 ECM 的转化,最终导致肾小球瘢痕形成、肾组织纤维化及肾功能下降^[14]。

研究发现肾硬化、糖尿病肾病等 ECM 增多的肾脏疾病患者均有 TIMP-1 增多或 MMP/TIMP-1 比例下降^[15]。研究也证实,随着疾病的加重,MMP-9 和 TIMP-1 的升高并不同步,提示 MMP-9 与 TIMP-1 的比值变化与疾病发展有密切的关系^[16]。表明 MMP-9 与 TIMP-1 比值改变参与了肾脏疾病的发生发展。本研究旨在探讨 HHcy 是否通过改变 MMP-9 与 TIMP-1 的比值而导致肾脏损伤。本研究结果发现,MMP-9/TIMP-1 比值与血清肌酐和尿素浓度呈正相关,证实了 MMP-9/TIMP-1 比值的改变与肾脏损伤程度呈正相关。而 ApoE^{-/-} 高蛋白组肾组织中 MMP-9、TIMP-1 mRNA 和蛋白表达均明显升高,表明 Hcy 会引起肾组织 MMP-9、TIMP-1 高表达。本研究也发现,在 Hcy 作用下 MMP-9/TIMP-1 比值增高,且 MMP-9/TIMP-1 比值与血清 Hcy 浓度呈正相关。提示 Hcy 可能是通过升高 MMP-9 与 TIMP-1 的比值,造成裂解肾小球基底膜和肾小管基底膜 IV 型胶原的作用增强,导致 ECM 的合成与降解失衡,最终导致 ApoE^{-/-} 小鼠肾脏损伤。

研究表明,血清 Hcy 浓度受遗传与环境因素共同影响^[17],血清叶酸、维生素 B12 浓度与血清 Hcy 浓度呈负相关,增加 B 族维生素的摄入可降低 Hcy 浓度^[18]。本研究证实,叶酸和维生素 B12 干预可以降低血清 Hcy 浓度,且能缓解 HHcy 引起的肾脏损伤。同时,与 ApoE^{-/-} 高蛋白组相比,饲以叶酸和维生素 B12 干预后 MMP-9/TIMP-1 比值降低,说明叶酸和维生素 B12 对 HHcy 导致的肾损害有一定的

拮抗作用,同时也从另一方面说明 MMP-9 与 TIMP-1 的表达变化可能是 HHcy 致肾损害的机制之一。

本研究阐述了 MMP-9/TIMP-1 比值在 HHcy 导致 ApoE^{-/-} 小鼠肾脏损伤中的作用及机制,为研究肾脏损伤机制和临床预防、治疗肾脏疾病建立新的理论基础及提供新的思路和靶标,同时为肾病患者的疾病监测提供新的指标。

[参考文献]

- [1] Fang P, Zhang D, Cheng Z, et al. Hyperhomocysteinemia potentiates hyperglycemia-induced inflammatory monocyte differentiation and atherosclerosis[J]. *Diabetes*, 2014, 63 (12): 4 275-290.
- [2] 段俊丽,李月,王一尘,等. 过量服用蛋氨酸所致高同型半胱氨酸血症对缺血性血管新生的抑制作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (6): 493-497.
- [3] 李录,贾绍斌,孙娜. 同型半胱氨酸对内皮细胞 Bcl-2 基因甲基化水平的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21 (12): 1 075-078.
- [4] Suszyńska-Zajczyk J, Utyro O, Jakubowski H. Methionine-induced hyperhomocysteinemia and bleomycin hydrolase deficiency alter the expression of mouse kidney proteins involved in renal disease[J]. *Mol Genet Metab*, 2014, 112 (4): 339-346.
- [5] 王聪霞,丁法明. 基质金属蛋白酶与易损斑块的研究及其展望[J]. *西安交通大学学报*, 2012, 33 (6): 667-670.
- [6] Zeng R, Wen F, Zhang X, et al. Serum levels of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 elevated in polypoidal choroidal vasculopathy but not in age-related macular degeneration[J]. *Mol Vis*, 2013, 19: 729-736.
- [7] Wereszczynska-Siemiatkowska U, Siemiatkowski A, Swidnicka-Siergiejko A, et al. The imbalance between matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in acute pancreatitis[J]. *Z Gastroenterol*, 2015, 53 (3): 199-204.
- [8] 韩园园,魏仲南. MMP-9/TIMP-1 在肾间质纤维化过程中的作用机制及中医药对其干预的研究进展[J]. *中国医药指南*, 2013, 11 (3): 40-41.

- [9] 郝健,甄怀蒙. 慢性肾脏病患者血浆同型半胱氨酸水平与左室重构的关系[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25 (21): 3 604-606.
- [10] Suszyńska-Zajczyk J, Sikora M, Jakubowski H. Paraoxonase 1 deficiency and hyperhomocysteinemia alter the expression of mouse kidney proteins involved in renal disease[J]. *Mol Genet Metab*, 2014, 113 (3): 200-206.
- [11] Rossi GL, Giordano A, Breda S, et al. Big-endothelin 1 (big ET-1) and homocysteine in the serum of dogs with chronic kidney disease[J]. *Vet J*, 2013, 198 (1): 109-115.
- [12] 杨志娜,田卫东,胡金川,等. 高同型半胱氨酸血症与肾脏疾病的相关研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34 (5): 630-631.
- [13] Suszyńska-Zajczyk J, Utyro O, Jakubowski H. Methionine-induced hyperhomocysteinemia and bleomycin hydrolase deficiency alter the expression of mouse kidney proteins involved in renal disease[J]. *Mol Genet Metab*, 2014, 112 (4): 339-346.
- [14] 魏晴雪,万毅刚,赵青,等. 肾脏细胞外基质降解的分子机制及中药的干预作用[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38 (4): 533-538.
- [15] Lu H, Cao X, Zhang H, et al. Imbalance between MMP-2, 9 and TIMP-1 promote the invasion and metastasis of renal cell carcinoma via SKP2 signaling pathways[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35 (10): 9 807-813.
- [16] Ridnour LA, Dhanapal S, Hoos M, et al. Nitric oxide-mediated regulation of β -amyloid clearance via alterations of MMP-9/TIMP-1[J]. *J Neurochem*, 2012, 123 (5): 736-749.
- [17] Moore SE, Mansoor MA, Bates CJ, et al. Plasma homocysteine, folate and vitamin B(12) compared between rural Gambian and UK adults[J]. *Br J Nutr*, 2006, 96 (3): 508-515.
- [18] Murakami K, Sasaki S, Uenishi K. Higher intake of vitamin B6 and dairy products and lower intake of green and oolong tea are independently associated with lower serum homocysteine concentration in young Japanese women[J]. *Nutr Res*, 2013, 33 (8): 653-660.

(此文编辑 文玉珊)