

# 高脂血症肾移植患者外周血 MCP-1 及其受体 CCR2 mRNA 表达及辛伐他汀治疗的影响

王玉新<sup>1</sup>, 史艳玲<sup>1</sup>, 李清芹<sup>1</sup>, 邹和群<sup>1</sup>, 徐琴君<sup>2</sup>, 唐孝达<sup>2</sup>

(1.中山大学附属第五医院肾内科,广东 珠海 519000; 2.上海交通大学附属上海第一人民医院器官移植中心,上海 200080)

**摘要:**【目的】探讨肾移植术后高脂血症患者外周血单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)及其受体 CCR2 mRNA 的表达及辛伐他汀治疗影响。【方法】根据患者肾移植术后6个月的血脂水平,从167例肾移植受者中选择60例作为研究对象,其中30例为血脂正常组(A组),30例为血脂增高组(B组),健康体检者30例作为对照组,逆转录聚合酶链反应检测各组外周血 MCP-1 及 CCR2 mRNA 表达水平。血脂增高组给予辛伐他汀治疗,分别于1.5个月、3个月时复查血脂水平及 MCP-1、CCR2 mRNA 表达水平。【结果】肾移植受者外周血 MCP-1 及其 CCR2 mRNA 表达水平显著高于对照组,B组增高更为显著。辛伐他汀治疗1.5个月时,B组患者血脂水平及外周血 MCP-1、CCR2 mRNA 表达水平显著降低,3个月时进一步降低。【结论】肾移植后高脂血症患者外周血 MCP-1 及 CCR2 mRNA 表达水平显著增高,可能参与了移植后心血管疾病及慢性移植肾排斥的发生。辛伐他汀治疗可显著降低肾移植受者外周血 MCP-1 及其 CCR2 mRNA 表达水平,此可能有助于减少或延缓移植后心血管疾病及慢性移植肾病的发生。

**关键词:**肾移植;高脂血症;单核细胞趋化蛋白-1;逆转录-聚合酶链反应;辛伐他汀

中图分类号:R617

文献标识码:A

文章编号:1676-3554(2005)06-0672-04

## mRNA Expression of MCP-1 and Its Receptor CCR2 in Renal Transplant Recipients with Hyperlipidemia and Influence by Simvastatin Treatment

WANG Yu-xin<sup>1</sup>, SHI Yan-ling<sup>1</sup>, LI Qing-qin<sup>1</sup>, ZOU He-qun<sup>1</sup>, XU Qin-jun<sup>2</sup>, TANG Xiao-da<sup>2</sup>

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

**Abstract:**【Objective】To investigate the mRNA expression 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 were divided into two groups. Patients in Group A were without hyperlipidemia ( $n=30$ ) and group B were with hyperlipidemia ( $n=30$ ). Control group consists of 30 healthy volunteers. The patients in group B were treated with Simvastatin for 3 months. The mRNA expressions of MCP-1 and CCR2 were detected with RT-PCR. 【Results】The mRNA expressions of MCP-1 and CCR2 in post transplant recipients were significantly higher compared to normal controls, which were more evident in group B than those in group A. Serum lipid levels in the patients of group B decreased significantly after Simvastatin treatment. Meanwhile, the mRNA expression of MCP-1 and CCR2 reduced significantly at the 1.5<sup>th</sup> month of Simvastatin treatment, and reduced to a evidence even significantly lower than those in group A at the 3<sup>th</sup> month.【Conclusions】It is suggested that up-regulated expression of MCP-1 and CCR2 mRNA may be involved in the pathogenesis of CAN and CVD in renal transplant recipients with hyperlipidemia. Simvastatin might be used to reduce the mRNA expressions of MCP-1 and CCR2 in renal recipients with hyperlipidemia.

**Key words:** kidney transplantation; hyperlipidemia; MCP-1; RT-PCR; simvastatin

[J SUN Yat-sen University (Med Sci), 2005, 26(6):672-675]

收稿日期:2005-06-30

基金项目:国家自然科学基金资助项目(3997034);美国CMB科学研究基金资助项目(CMB-SUMS#98-677);广东省自然科学基金资助项目(990106)

作者简介:王玉新(1963-),男,山东潍坊人,医学博士,博士后,副教授;邹和群,通讯作者. E-mail:yuxinwang@citiz.net

肾移植后约半数以上患者发生脂代谢紊乱,是移植后心血管疾病及慢性移植肾病的重要原因<sup>[1-5]</sup>。趋化因子是一类能使细胞发生趋化运动的小分子细胞因子,可以趋化中性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞、树突状细胞等多种炎症细胞,在移植排斥、恶性肿瘤等多种病理过程发挥重要作用。其中,单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)及其受体 CCR2(chemokine receptor 2, CCR2)在心血管疾病及慢性移植肾病发生中起重要作用<sup>[6-8]</sup>。本研究应用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法检测肾移植后高脂血症患者外周血中 MCP-1 及其受体 CCR2 mRNA 表达水平,并观察辛伐他汀降脂治疗对其影响,为移植后心血管病变及慢性移植肾病的防治提供新的思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病例选择

167例肾移植受者患者,移植前均为血液透析治疗,原发病为慢性肾小球肾炎,移植前血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)水平正常;术后采用泼尼松+环孢素+霉酚酸酯的免疫抑制方案治疗;术后至实验结束的整个过程中,常规检测血清肌酐、尿素氮、白蛋白和尿常规、24 h尿蛋白定量、24 h尿肌酐定量,移植后尿量、尿常规及血压、肝功能均一直正常,血肌酐<170 mmol/L,未曾发生急性排斥反应。

### 1.2 实验分组

根据患者移植后6个月时血脂水平,从上述167例肾移植受者中选择60例作为本研究对象,A组为移植后血脂正常组(TC≤5.85 mmol/L, TG≤1.70 mmol/L)30例,其中男16例,女14例,年龄(40±10)岁;B组为血脂增高组(TC>5.85 mmol/L或和TG>1.70 mmol/L)30例,其中男17例,女13例,年龄(41±9)岁。B组患者予辛伐他汀治疗(商品名为舒降之,杭州默沙东中国制药有限公司,规格为20 mg/片),分别于治疗后1.5个月及3个月时检测血脂水平及外周血 MCP-1、CCR2 mRNA 表达水平。A、B 2组患者移植前血脂水平均正常,2组间性别、年龄、各项血脂水平及 MCP-1、CCR2 mRNA 表达水平无显著差异。健康体检者30例作为对照

组,其中男15例,女15例,年龄(40±9)岁。

### 1.3 标本收集

对照组、病例组移植前及移植后6个月分别抽取空腹血,检测血清 TC、TG、LDL 和 HDL 水平,同时留取枸橼酸钠抗凝血5 mL 分离外周单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)用于 RNA 抽提及 MCP-1、CCR2 mRNA 水平检测。血脂增高组分别于辛伐他汀治疗1.5个月、3个月时留取标本检测血脂及 MCP-1、CCR2 mRNA 水平。所有受试者无自身免疫性疾病史,抽血前1个月内无感染性病史。

### 1.4 总 RNA 抽提

采用淋巴细胞分离液(Ficol)、梯度离心法分离获得 PBMC,应用 TriZol-氯仿一步法抽提 PBMC 中的总 RNA(试剂 TriZol 为美国 Gibco 公司产品)。

### 1.5 RT-PCR 方法检测 PMNC 中 MCP-1 及其受体 CCR2 mRNA 表达

1.5.1 逆转录 取 RNA 1 μg, Random Primer 1 μL(美国 Gibco 公司产品), dNTP 1 μL(美国 Promega 公司产品),加 DEPC 水至 11.5 μL(美国 Gibco 公司产品),70 °C 预变性 5 min;加 5×Buffer 5 μL, 0.1 mmol/L DTT 2 μL, Rnase OUT Rnase Inhib 0.5 μL(美国 Gibco 公司产品), M-MLVRT 1 μL(美国 Gibco 公司产品),37 °C 1 h, 95 °C 5 min 终止反应。

1.5.2 引物 日本 TAKARA 公司产品。引物序列及扩增产物长度: MCP-1 的上游引物序列为 5'-gctccagcatgaaagtctc-3', 下游引物序列为 5'-tggaatcctgaaccacttc-3', 产物长度为 279 bp; CCR2 的上游引物序列为 5'-gtgtgtggagggtccaggagt-3', 下游引物序列为 caaccagctggagtctctc, 产物长度为 282 bp; β-actin 上游引物序列为 5'-tggcacaccttctacaatgagctgcg-3', 下游引物序列为 5'-cgtcat actccttgcctccacatctgc-3', 扩增产物长度为 838 bp。

1.5.3 PCR 扩增 试剂为 Promega 公司产品。10× Buffer 5 μL, 2.5 mmol/L MgCl 4 μL, dNTP 200 μmol/L, Taq DNA 聚合酶 1.5 U, 相应引物 2 μL, 加水至 50 μL; 95 °C 预变性 3 min, 进入循环: 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环;最后 72 °C 保温 10 min 终止反应。

1.5.4 mRNA 半定量分析 取扩增后目标产物 10 μL, 扩增后 β-actin 产物 1.5 μL, 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳 30 min, 紫外光下观察结果, 选择 Marker 中

2 kb 条带作参照, SynGene tool 软件测产物条带的相对质量, 计算目标产物与  $\beta$ -actin 的比值。

### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 软件包进行统计, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间均数比较用 One way ANOVA 检验, 检验水准设  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结 果

### 2.1 MCP-1 及其受体 CCR2 mRNA 表达水平

肾移植受者移植前外周血 MCP-1 及 CCR2 mRNA 表达水平显著高于对照组, A 组、B 组间无显著差异, 移植后 6 个月时显著下降, 但仍显著高于正常对照组, B 组显著高于 A 组(表 1)。

表 1 对照组及肾移植 A、B 组 MCP-1 及其受体 CCR2 mRNA 表达水平

Table 1 The mRNA expression of MCP-1 and its receptor CCR2 in all renal transplant recipients before and after transplantation

Group	MCP-1(MCP-1/ $\beta$ -actin)	CCR2(CCR2/ $\beta$ -actin)
Controls	1.25 $\pm$ 1.84	1.50 $\pm$ 2.60
A		
Before transplantation	5.35 $\pm$ 2.98 <sup>1)</sup>	6.41 $\pm$ 3.24 <sup>1)</sup>
After transplantation	5.49 $\pm$ 3.07 <sup>1)</sup>	6.27 $\pm$ 3.17 <sup>1)</sup>
B		
Before transplantation	2.19 $\pm$ 1.69 <sup>1), 2)</sup>	3.09 $\pm$ 2.37 <sup>1), 2)</sup>
After transplantation	3.97 $\pm$ 2.37 <sup>1), 2), 3)</sup>	4.23 $\pm$ 1.72 <sup>1), 2), 3)</sup>

One way ANOVA test was performed,  $F=5.2$ ,  $P<0.01$ ; 1) Compared with controls,  $P<0.01$ ; 2) Compared before transplantation,  $P<0.01$ ; 3) Compared with Group A after transplantation,  $P<0.05$

### 2.2 血脂增高组辛伐他汀治疗后血脂水平改变

血脂增高的肾移植受者在应用辛伐他汀治疗 1.5 个月时血清 TC、TG、LDLC 水平均显著下降, 治疗 3 个月时血清 TC、TG、LDLC 水平进一步下降, 血清 HDLC 水平显著增高(表 2)。

### 2.2 血脂增高组辛伐他汀治疗后 MCP-1 和 CCR2 mRNA 表达水平改变

血脂增高的肾移植受者在应用辛伐他汀治疗 1.5 个月(1.5th)时外周血 MCP-1、CCR2 mRNA 表达水平均显著下降, 治疗 3 个月(3th)时进一步下降(表 3)。

表 2 B 组患者辛伐他汀治疗前后血脂水平

Table 2 Serum lipid levels before and after simvastatin treatment in the recipients of group B (mmol/L)

	TC	TG	HDLC	LDLC
Before treatment	7.30 $\pm$ 1.89	3.60 $\pm$ 1.52	1.38 $\pm$ 0.59	3.0 $\pm$ 1.41
1.5th After	3.60 $\pm$ 1.29 <sup>1)</sup>	1.84 $\pm$ 0.96 <sup>1)</sup>	1.31 $\pm$ 0.60	2.71 $\pm$ 1.19 <sup>1)</sup>
3 th After	4.64 $\pm$ 1.01 <sup>2)</sup>	1.26 $\pm$ 0.51 <sup>2)</sup>	2.16 $\pm$ 0.96 <sup>2)</sup>	2.33 $\pm$ 0.98 <sup>2)</sup>

TC: total cholesterol; TG: triglyceride; HDLC: high density lipoprotein cholesterol; LDLC: low density lipoprotein cholesterol; One way ANOVA test was performed,  $F=4.3$ ,  $P<0.01$ ; 1) Compared with controls,  $P<0.05$ ; 2) Compared with the 1.5<sup>th</sup> month,  $P<0.05$

表 3 B 组患者辛伐他汀治疗前后 MCP-1 与 CCR2 mRNA 表达水平

Table 3 The mRNA expression of MCP-1 and CCR2 in patients of group B before and after Simvastatin treatment (MCP-1/ $\beta$ -actin or CCR2/ $\beta$ -actin)

Group	MCP-1(MCP-1/ $\beta$ -actin)	CCR2(CCR2/ $\beta$ -actin)
Before treatment	3.97 $\pm$ 2.37	4.23 $\pm$ 1.72
1.5 th After	2.88 $\pm$ 1.19 <sup>1)</sup>	2.78 $\pm$ 2.35 <sup>1)</sup>
3 th After	1.79 $\pm$ 1.22 <sup>1), 2)</sup>	1.83 $\pm$ 1.11 <sup>1), 2)</sup>

One Way ANOVA test was performed,  $F=3.7$ ,  $P<0.01$ ; 1) Compared with before treatment,  $P<0.05$ ; 2) Compared with the 1.5th month,  $P<0.05$

## 3 讨 论

目前已经明确, 在缺血性心脏病及慢性移植肾病的发生中, MCP-1 及其受体 CCR2 趋化炎症细胞向病变部位迁移, 其表达增强是缺血性心脏病及慢性移植肾病发生的重要机制<sup>[6-9]</sup>。本研究结果显示, 两组肾移植受者移植前外周血 MCP-1 及 CCR2 mRNA 表达水平无显著差异, 移植后高脂血症组则显著高于血脂正常组。此结果提示, 在移植后伴有高脂血症的患者, MCP-1 及其受体 CCR2 可能参与了高脂血症的致动脉硬化及促进慢性移植肾病发生的作用。

辛伐他汀是一种胆固醇合成限速酶, 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂, 目前主要用于各种原因所致的高脂血症的治疗。近研究显示, 辛伐他汀除降低血脂作用以外, 可显著降低心血管事件与慢性移植肾病的发生率。辛伐他汀发挥这一作用的机制主要是通过抑制炎症细胞的迁移及炎症因子白细胞介素 6、白细胞介素 8 及单核细胞趋化因子的产生<sup>[10-14]</sup>。还有研究显示, 洛伐他汀, 另一

种胆固醇合成限速酶,可抑制神经系统炎症病变中的关键环节-白细胞移行并通过血脑屏障<sup>[15]</sup>。上述研究结果提示,辛伐他汀等胆固醇合成限速酶除调节血脂作用以外,还具有抗炎及免疫调节作用。本研究发现,高脂血症的肾移植患者在应用辛伐他汀治疗 1.5 个月时,在血脂水平降低的同时,外周血 MCP-1 及 CCR2 表达水平显著降低,3 个月时进一步显著下降,甚至显著低于移植后血脂正常组的水平。此结果提示,在移植后伴有高脂血症的患者,应用辛伐他汀治疗不仅可有效降低血脂水平,还可以显著降低外周血 MCP-1 及其受体 CCR2 mRNA 的表达水平,而后者表达增高是促使心血管疾病与慢性移植肾病发生的重要机制,因此,辛伐他汀应用于移植后高脂血症患者,可有助于减少或延缓心血管病变及慢性移植肾病的发生。

#### 参考文献:

- [1] Pannu HS, Singh D, Sandhu JS. Lipid profile before and after renal transplantation--a longitudinal study[J]. *Ren Fail*, 2003, 25(3): 411-7.
- [2] Rigatto C. Clinical epidemiology of cardiac disease in renal transplant recipients[J]. *Semin Dial*, 2003, 16(2): 106-10.
- [3] Nankivell BJ, Lau SG, Chapman JR, *et al*. Progression of macrovascular disease after transplantation [J]. *Transplantation*, 2000, 69(4):574-81.
- [4] Wanner C, Quaschnig T. Abnormal lipid metabolism after renal transplantation[J]. *Ann Transplant*, 2001, 6(1): 5-8.
- [5] 王玉新,陆元善,徐琴君,等. 肾脏移植患者脂代谢紊乱的临床研究[J]. *中华肾脏病杂志*, 2004, 20(1):61-2.
- [6] Leendert CP. Chronic renal transplant loss [J]. *Kidney Int*, 1995, 47(6): 1491-9.
- [7] Hancock W. Chemokines and transplant immunobiology [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(3):821-4.
- [8] Harrington JR. The role of MCP-1 in atherosclerosis[J]. *Stem Cells*, 2000, 18(1):65-6.
- [9] Valdes AM, Wolfe L, O'Brien EJ, *et al*. Val64Ile polymorphism in the C-C chemokine receptor 2 is associated with reduces coronary artery calcification [J]. *Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(11):1924-8.
- [10] Rezaie-Majd Q, Maca T, Bucek RA, *et al*. Simvastatin reduces expression of cytokines interleukin -6, interleukine-8, and monocyte chemoattractant protein-1 in circulating monocytes from hypercholesterolemic patients[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(7): 1194-9.
- [11] Corti R, Fuster V, Fayad ZA, *et al*. Lipid lowering by simvastatin induces regression of human atherosclerotic lesions: two years' follow-up by high-resolution noninvasive magnetic resonance imaging[J]. *Circulation*, 2002, 106 (23): 2884-7.
- [12] Lopes-Virelia M, Mironina M, Stephen P, *et al*. Role of simvastatin as an immunomodulator in type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(4): 908-13.
- [13] Wenke K, Meiser B, Thiery J, *et al*. Simvastatin initiated early after heart transplantation 8-year prospective experience[J]. *Circulation*, 2003, 107(1): 93-7.
- [14] Chello M, Mastroberto P, Patti G, *et al*. Simvastatin attenuates leucocyte endothelial interactions after coronary revascularisation with cardiopulmonary bypass [J]. *Heart*, 2003, 89(5): 538-43.
- [15] Kim SL, Han DC, Lee HB. Lovastatin inhibits transforming growth factor- $\beta$ 1 expression in diabetic rat glomeruli and cultures rat mesangial cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11(1): 80-7.

(编辑 黄小廷)