

· 基础研究 ·

辛伐他汀与阿托伐他汀对高糖培养大鼠肾小球系膜细胞 p27 蛋白表达的影响

徐艳丽, 李青菊[△]

(郑州大学第二附属医院内分泌科 450014)

摘要:目的 探讨辛伐他汀和阿托伐他汀对高糖培养的大鼠肾小球系膜细胞 p27 表达的影响。方法 将体外培养大鼠肾小球系膜细胞分为正常对照组(葡萄糖浓度 5.6 mmol/L)、高糖组(葡萄糖浓度 30 mmol/L)、高糖辛伐他汀组(葡萄糖浓度 30 mmol/L, 辛伐他汀浓度 10 μmol/L)、高糖阿托伐他汀组(葡萄糖浓度 30 mmol/L, 阿托伐他汀浓度 10 μmol/L)。每组设置 6 个复孔, 于 24、48、72、120 h 收集细胞, Western blotting 法测定大鼠肾小球系膜细胞 p27 蛋白的表达, 逆转录 PCR 测定 p27mRNA 的表达。结果 高糖组 p27 蛋白浓度及 mRNA 水平均较正常对照组升高($P < 0.05$); 高糖辛伐他汀组及高糖阿托伐他汀组 p27 蛋白浓度及 mRNA 水平均较高糖组降低($P < 0.05$)。结论 他汀类药物通过调节肾小球系膜细胞 p27 的表达, 可发挥非依赖降脂的肾脏保护作用。

关键词:辛伐他汀; 阿托伐他汀; 高血糖; 大鼠肾小球系膜细胞; p27 蛋白

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.28.026

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)28-3400-03

Effect of simvastatin and atorvastatin on the expression of p27 protein in mesangial cells of rat under high glucose

Xu Yanli, Li Qingju[△]

(Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450014, China)

Abstract: Objective To explore the effect of simvastatin and atorvastatin on the level of p27 protein in mesangial cells of rat under high glucose. **Methods** Cultured rat mesangial cells *in vitro* were divided into four groups: normal glucose(5.6 mmol/L glucose), high glucose(30 mmol/L glucose), high glucose(30 mmol/L glucose) plus simvastatin(10 μmol/L), high glucose(30mmol/L glucose) plus atorvastatin(10 μmol/L). After treatment for 24, 48, 72 120 hours, the cells were collected. The protein level of p27 was detected by Western blotting and the mRNA level of p27 was detected by RT-PCR. **Results** Compared to the normal glucose group, the levels of p27 protein and mRNA in the high glucose group had a significant increase($P < 0.05$). Compared to the high glucose group, the level of p27 protein and mRNA in the high glucose plus simvastatin or atorvastatin group both had a significant decrease($P < 0.05$). **Conclusion** By modulating the expression of P27 in mesangial cells, statins could become the independent lipid-decreasing drug to prevent kidney.

Key words: simvastatin; atorvastatin; high glucose; rat mesangial cells; p27 protein

近年来他汀类药物对糖尿病肾病非依赖降脂的肾脏保护作用越来越受到人们的重视。糖尿病肾病早期病理特征为肾小球系膜细胞的增殖与肥大^[1]。p27 是一种重要的细胞周期激酶抑制剂, 其在肾小球系膜细胞增殖与肥大过程中起到重要作用^[2]。他汀类药物是否通过影响 p27 蛋白的表达来发挥非依赖降脂的肾脏保护作用目前还不清楚。本实验采用体外培养大鼠肾小球系膜细胞, 观察辛伐他汀及阿托伐他汀对高糖刺激大鼠肾小球系膜细胞 p27 蛋白表达的影响, 以探讨他汀类药物的非依赖降脂肾脏保护的作用机制。

1 材料与与方法

1.1 材料 大鼠肾小球系膜细胞株(中国科学院典型培养物保藏委员会, 细胞数量 5×10^7), 葡萄糖浓度为 5.6 mmol/L 的低糖 DMEM(细胞培养基)培养液(Thermo 公司), Trizol 试剂(Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒(Fermentas 公司), 辛伐他汀(Merck 公司), 阿托伐他汀(辉瑞制药有限公司), 兔抗 p27 单克隆抗体(CST 公司), 鼠抗 β-actin 单克隆抗体(武汉博士德公司)等。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 将大鼠肾小球系膜细胞置于含 5% CO₂, 37℃ 的培养箱中, 用含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养液进行常规培养, 每 2 天换液 1 次, 待细胞铺满整个培养瓶底的 80% 时可行传代培养。传至第 5~6 代可进行实验。实验前 24 h 用不含胎牛血清的 DMEM 培养基进行培养。细胞分为 4 组(各组细胞数量 10^6): 正常对照组: 培养液中葡萄糖浓度为 5.6 mmol/L; 高糖组: 葡萄糖浓度为 30 mmol/L; 高糖辛伐他汀组: 葡萄糖浓度为 30 mmol/L, 辛伐他汀浓度为 10 μmol/L; 高糖阿托伐他汀组: 葡萄糖浓度为 30 mmol/L, 阿托伐他汀浓度为 10 μmol/L。每组设置 6 个复孔, 于 24、48、72、120 h 收集细胞进行蛋白及 mRNA 的测定。

1.2.2 观察细胞形态 4 组细胞分别在 24、48、72、120 h 在倒置相差显微镜下观察细胞形态并拍照记录。

1.2.3 逆转录 PCR(RT-PCR)测定细胞 p27 mRNA 的表达 采用 Trizol 试剂提取细胞总 mRNA, RT-PCR 试剂盒进行逆转录。RT-PCR 法测定大鼠肾小球系膜细胞 p27 mRNA 的表

达,RT-PCR 引物详细序列如下:p27 引物序列:正链为 5'-GGA CTT GGA GAA GCA CTG C-3',反链为 5'-CGA GTC AGG CAT TTG GTC C-3',扩增片段大小为 282 bp。GAPDH 引物序列:正链为 5'-GAC AAG ATG GTG AAG GTC GG-3',反链为 5'-CAT GGA CTG TGG TCA TGA GC-3',扩增片段大小为 538 bp。PCR 反应条件为:95℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 40 s,60℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 30 s,循环结束后 72℃ 延伸 7 min,循环 38 次。PCR 产物加于 2% 的琼脂糖凝胶(0.5 μg/mL EB),120V 电泳 20 min。通过凝胶成像分析系统扫描,测定电泳条带的灰度,灰度值是将目的基因与内参基因的电泳条带灰度值相比作为数据进行统计学分析。

1.2.4 Western blotting 测定细胞 p27 蛋白的表达 裂解液 裂解细胞收集细胞总蛋白,采用 BCA 法进行蛋白浓度的测定,取总蛋白 75 μg,经 12% 的 SDS-PAGE 电泳后,转移至聚偏二氯乙烯膜上,并用丽春红染色观察转移效果。然后用含有封闭液的 TBST 室温封闭 1 h,弃去原有封闭液,加入用 5% 脱脂奶粉稀释的 p27 兔单克隆抗体(1:1 000 稀释)及 β-actin 单克隆抗体(1:500 稀释),4℃ 过夜。洗膜后加辣根过氧化物酶标记的 IgG(1:4 000 稀释),置于脱色摇床上,使之充分反应 2 h。再次用 TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,再次洗膜后加入 ECL 显色剂,增强化学发光。采用凝胶图像分析系统及 Genetool 软件

对蛋白条带进行分析,用测量得到的 p27/β-actin 光密度比值作为 p27 蛋白的相对表达量。

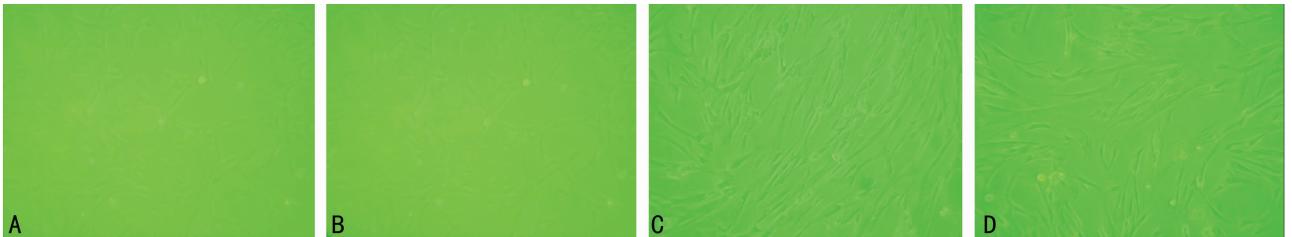
1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 分析软件进行统计学处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠肾小球系膜细胞形态学 正常对照组肾小球系膜细胞呈长梭形,核呈圆形,居中间。高糖组细胞数量增多,体积增大,成旋涡状排列。高糖辛伐他汀组和高糖阿托伐他汀组细胞数量减少。见图 1。

2.2 各组大鼠肾小球系膜细胞 p27 mRNA 转录水平 表 1 结果显示,在不同时间段,高糖组、高糖辛伐他汀、高糖阿托伐他汀组 p27 mRNA 转录量均较正常对照组升高($P<0.05$);在不同时间段,高糖辛伐他汀组、高糖阿托伐他汀组大鼠肾小球系膜细胞 p27 mRNA 表达较高糖组降低($P<0.05$)。

2.3 各组大鼠肾小球系膜细胞 p27 蛋白表达水平 表 2 结果显示,在不同时间段,高糖组、高糖辛伐他汀组、高糖阿托伐他汀组 p27 蛋白表达均较正常对照组升高($P<0.05$);在 48、72 及 120 h,高糖辛伐他汀组 p27 蛋白表达均较高糖组降低($P<0.05$);在 24、48、72 及 120 h,高糖阿托伐他汀组 p27 蛋白表达均较高糖组降低($P<0.05$)。



A:正常对照组 48 h(×400);B:高糖组 48 h(×400);C:高糖辛伐他汀组 48 h(×400);D:高糖阿托伐他汀组 48 h(×400)。

图 1 各组大鼠肾小球系膜细胞形态学

表 1 各组大鼠肾小球系膜细胞 p27 mRNA 转录水平($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	24 h	48 h	72 h	120 h
正常对照组	0.384±0.175	0.386±0.210	0.392±0.172	0.395±0.182
高糖组	1.006±0.182 ^a	1.010±0.210 ^a	1.384±0.175 ^a	1.639±0.279 ^a
高糖辛伐他汀组	0.887±0.172 ^a	0.697±0.249 ^{ab}	0.656±0.096 ^{ab}	0.560±0.144 ^{ab}
高糖阿托伐他汀组	0.866±0.085 ^{ab}	0.688±0.256 ^{ab}	0.630±0.166 ^{ab}	0.537±0.141 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与正常对照组比较;^b: $P<0.05$,与高糖组比较。

表 2 各组大鼠肾小球系膜细胞 p27 蛋白相对表达量($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	24 h	48 h	72 h	120 h
正常对照组	0.72±0.11	0.78±0.13	0.98±0.21	1.30±0.27
高糖组	1.21±0.10 ^a	1.45±0.18 ^a	1.79±0.20 ^a	2.09±0.13 ^a
高糖辛伐他汀组	1.08±0.05 ^a	1.25±0.14 ^{ab}	1.45±0.15 ^{ab}	1.49±0.21 ^b
高糖阿托伐他汀组	0.86±0.14 ^{ab}	1.27±0.11 ^{ab}	1.31±0.16 ^{ab}	1.52±0.20 ^b

^a: $P<0.05$,与正常对照组比较;^b: $P<0.05$,与高糖组比较。

3 讨 论

有文献报道,高糖培养下肾小球系膜细胞前期以增殖为主,进一步的高糖刺激,细胞复制停滞于 G₁ 期,引起细胞的肥

大^[3-6]。在高糖状态下,p27 蛋白的过度表达,抑制了细胞周期素激酶的活性,激酶活性的降低导致了肾小球系膜细胞停滞于 G₁ 期,不能正常进入 S 期,出现肥大。国外研究报道,体外培

养的小鼠系膜细胞在高糖刺激下也停顿于细胞周期的 G₁ 期, 且发生了细胞的肥大^[7], 并且 p27 蛋白水平也呈增高趋势。与本研究结果较为一致。

近年来他汀类药物的非依赖降脂的肾脏保护作用越来越受到人们的重视。糖尿病肾病的重要病理特征之一便是转化生长因子 β1(TGF-β1) 的过度表达, 辛伐他汀可明显降低高糖培养下肾小球系膜细胞上清液中 TGF-β1 的浓度的, 并抑制肾小球系膜细胞的增殖及减少细胞外基质蛋白的产生, 从而发挥肾脏保护作用^[8]。也有研究发现, 辛伐他汀可通过降低糖尿病肾病患者血清相关炎症因子如 CRP、IL-6 及 TNF-α 的水平进而减少尿蛋白, 保护肾脏功能^[3,9]。阿托伐他汀可通过降低糖尿病肾病患者超敏 C 反应蛋白、蛋白尿延缓肾功能的恶化^[4,10]。阿托伐他汀也可抑制肾小球系膜细胞的增殖、抑制血管紧张素 II、TGF-β1 的表达及分泌, 进而降低基质蛋白的生成与沉积发挥保护肾脏的功能^[11]。本研究发现, 辛伐他汀与阿托伐他汀可明显降低高糖培养的大鼠肾小球系膜细胞 p27 蛋白表达水平及 mRNA 转录水平, 据此可以认为, 辛伐他汀与阿托伐他汀可通过抑制 p27 蛋白的表达, 使细胞周期能够顺利地进入 S 期, 降低肾小球系膜细胞的肥大, 减轻糖尿病肾病患者的肾脏肥大, 对肾脏发挥保护作用。因此本研究建议, 无论糖尿病患者有无脂质代谢异常, 均可以使用他汀类药物早期治疗糖尿病肾病^[12]。

参考文献:

[1] 钱华翔, 何爱琴, 缪珩, 等. Resveratrol 对高糖培养大鼠肾小球系膜细胞氧化应激和 p27 蛋白表达的影响[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2011, 31(5): 656-659.

[2] Wolf G, Reinking R, Zahner G, et al. Erk 1, 2 phosphorylates p27(Kip1): Functional evidence for a role in high glucose-induced hypertrophy of mesangial cells[J]. *Diabetologia*, 2003, 46(8): 1090-1099.

[3] 杨铁青, 蒋慧君, 韦红金, 等. 辛伐他汀治疗早期糖尿病肾病的疗效评价[J]. *临床荟萃*, 2011, 26(19): 1674-1676.

[4] 潘攀, 周海艳, 杨晶. 阿托伐他汀治疗早期糖尿病肾病临床疗效观察[J]. *中华全科医学*, 2010, 8(11): 1374-1375.

[5] Ding DF, You N, Wu XM, et al. Resveratrol attenuates renal hypertrophy in early-stage diabetes by activating AMPK[J]. *Am J Nephrol*, 2010, 31(4): 363-374.

[6] 丁大法, 游娜, 徐家蓉, 等. Resveratrol 对糖尿病大鼠肾皮质 4E-BP1 和 S6 磷酸化表达的影响[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2009, 29(10): 1347-1351.

[7] Wolf G, Schroeder R, Ziyadeh FN, et al. High glucose stimulates expression of p27Kip1 in cultured mouse mesangial cells: relationship to hypertrophy[J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(3 Pt 2): 348-356.

[8] 曹宏, 杨涛, 刘超, 等. 辛伐他汀对高糖培养肾小球系膜细胞增殖和促基质蛋白分泌的影响[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2003, 23(1): 56-59.

[9] 翟小琳, 徐晓燕. 辛伐他汀对糖尿病肾病相关炎症因子的影响分析[J]. *中国实用医药*, 2009, 4(7): 128-129.

[10] 肖宁. 阿托伐他汀治疗糖尿病早期肾病的疗效观察[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2012, 20(10): 1660, 1662.

[11] 缪珩, 李慧敏, 蒋秀琴, 等. 阿托伐他汀对高糖培养人肾系膜细胞的作用[J]. *江苏医药*, 2005, 31(4): 255-257.

[12] Costa J, Borges M, David C, et al. Efficacy of lipid lowering drug treatment for diabetic and non-diabetic patients: meta-analysis of randomised controlled trials[J]. *BMJ*, 2006, 332(7550): 1115-1124.

(收稿日期: 2013-05-26 修回日期: 2013-06-18)

(上接第 3399 页)

[6] Boniface JD, Poschke I, Mao Y, et al. Tumor-dependent down-regulation of the ζ-chain in T-cells is detectable in early breast Cancer and correlates with immune cell function[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(1): 129-139.

[7] 万华, 邹强, 董佳容, 等. 乳腺癌患者免疫指标检测及其临床意义[J]. *肿瘤*, 2006, 26(3): 279-281.

[8] 刘季芳, 祁岩超. 肿瘤免疫编辑研究进展[J]. *广东医学*, 2009, 30(10): 1579-1581.

[9] 刘志忠, 陈燕, 叶虹等. 星形细胞瘤和髓母细胞瘤患儿血清 IL-6、IL-8 和 MIP-1α 水平变化[J]. *标记免疫分析与临床*, 2012, 19(5): 278-281.

[10] 张佩莲. 趋化因子 MCP-1、MIP-1α、RANTES 与自身免疫性疾病[J]. *皮肤病与性病*, 2012, 34(4): 204-207.

[11] Ilias Basha H, Tiriveedhi V, Fleming TP, et al. Identification of immunodominant HLA-B7-restricted CD8+ cytotoxic T cell epitopes derived from mammaglobin-A expressed on human breast cancers[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 127(1): 81-89.

[12] 孙宏治, 宫建, 王巍, 等. 协同刺激分子 CD28、B7-1 在乳腺癌患者外周血的表达及意义[J]. *山东医药*, 2011, 51

(41): 57-58.

[13] 顾敏, 范原铭, 王强等. 乳腺癌患者外周血 CD4+、CD8+ 以及 CD4+CD25+ 调节性 T 细胞变化及其意义[J]. *重庆医学*, 2009, 38(7): 869-871.

[14] Khan MM, Chatterjee S, Dwivedi VP, et al. CD4+ T cell-derived novel peptide Thp5 induces interleukin-4 production in CD4+ T cells to direct T helper 2 cell differentiation[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(4): 2830-2835.

[15] 于益芝, 曹雪涛. 调节性 T 细胞在肿瘤免疫和肿瘤免疫治疗中的作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2010, 17(1): 1-6.

[16] Tomala J, Chmelova H, Mrkvan T, et al. In vivo expansion of activated naive CD8+ T cells and NK cells driven by complexes of IL-2 and anti-IL-2 monoclonal antibody as novel approach of Cancer immunotherapy[J]. *J Immunol*, 2009, 183(8): 4904-4912.

[17] 黄文炼, 徐曼, 王婷婷等. 乳腺癌 B7-H4 异常表达及与肿瘤内 CD8+ T 细胞浸润 IFN-γ 分泌的相关性研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(15): 1096-1099, 1103.

(收稿日期: 2013-05-14 修回日期: 2013-06-17)