

辛伐他汀对高糖培养肾小球系膜细胞增殖和细胞周期的影响及机制*

林志鑫¹,傅君舟^{1△},梁鸣¹,崔如健²,周道祥³,张亚杰⁴

(1.广州市第一人民医院肾内科 510000;2.广州医科大学附属第一医院内科 510120;

3.广州市越秀区中医医院检验科 510030;4.广州医学院第二附属医院肾内科 510260)

[摘要] **目的** 研究辛伐他汀(SIM)对高糖培养肾小球系膜细胞(GMC)增殖和细胞周期的影响,并观察其炎症因子和细胞外基质的变化。**方法** 将大鼠 GMCs 分为 4 组:低糖组[LG 组,葡萄糖(Glu)5.6 mmol/L],高糖组(HG 组, Glu 30 mmol/L),HG+SIM(10 μg/L)组和 HG+SIM(25 μg/L)组。采用 4-甲基偶氮四唑蓝(MTT)法检测各组细胞的增殖能力,同时比较各组细胞的 G₀/G₁,G₂+M 期和 S 期细胞比例。比较各组细胞上清液中的转化生长因子 β₁(TGF-β₁)、纤维黏连蛋白(FN)和Ⅳ型胶原(COL4)水平。**结果** HG 组不同时刻的吸光度(A)高于 HG+SIM(10 μg/L)组、HG+SIM(25 μg/L)和 LG 组,差异有统计学意义(P<0.05)。LG 组的 G₀/G₁ 期细胞比例为(35.67±3.38)%,S 期细胞比例为(41.24±5.64)%;HG 组的 G₀/G₁ 期细胞比例为(25.88±4.02)%,S 期细胞比例为(28.65±1.88)%;HG+SIM(10 μg/L)组的 G₀/G₁ 期细胞比例为(28.12±2.01)%,S 期细胞比例为(35.55±2.09)%;HG+SIM(25 μg/L)组的 G₀/G₁ 期细胞比例为(31.85±3.52)%,S 期细胞比例为(39.82±2.23)%,差异有统计学意义(P<0.05)。HG 组上清液 TGF-β₁、FN 和 COL4 水平高于 HG+SIM(10 μg/L)组、HG+SIM(25 μg/L)和 LG 组,差异有统计学意义(P<0.05)。**结论** SIM 可以通过降低 TGF-β₁ 水平来抑制 GMCs 的增殖并调整细胞周期,抑制 GMCs 肥大。

[关键词] 辛伐他汀;肾小球系膜细胞;细胞增殖;细胞周期;转化生长因子 β**[中图分类号]** R587.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)01-0024-03

Effect and mechanism of simvastatin on proliferation and cycle of glomerular mesangial cells cultured in high-concentration glucose*

Lin Zhixin¹,Fu Junzhou^{1△},Liang Ming¹,Cui Rujian²,Zhou Daoxiang³,Zhang Yajie⁴

(1. Department of Nephrology, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510000, China; 2. Department of

Nephrology, the First Affiliated hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China;

3. Department of Clinical Laboratory, Yuexiu District Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou,

Guangdong 510030, China; 4. Department of Nephrology, the Second Affiliated hospital of

Guangzhou Medical College, Guangdong, Guangzhou 510260, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of simvastatin(SIM) on the proliferation and cycle of glomerular mesangial cells (GMCs) cultured in high concentration of glucose, and to observe the variation of inflammation factor and extracellular matrix. **Methods** GMCs of rats were divided into 4 groups: low glucose(LG) group(Glu 5.6 mmol/L), High glucose (HG) group(Glu 30 mmol/L), HG+SIM(10 μg/L)group and HG+SIM group(25 μg/L). Cells' proliferation activity was tested by MTT, simultaneously compared the ratio of cells in different period (G₀/G₁, G₂+M and M), and levels of TGF-β₁, FN and COL4 were compared among different groups. **Results** Absorbancy (A) of different periods in HG group was higher than that in other 3 groups, difference had statistical significance(P<0.05). In LG group, the ratio of cells in G₀/G₁ were(35.67±3.38)% while S-stage were(41.24±5.64)%; in HG group, the ratio of cells in G₀/G₁ were(25.88±4.02)% while S-stage were(28.65±1.88)%; in HG+SIM(10 μg/L)group, the ratio of cells in G₀/G₁ were(28.12±2.01)% while S-stage cell were(35.55±2.09)%; in HG+SIM(25 μg/L)group, the ratio of cells in G₀/G₁ were(31.85±3.52)%, while in S-stage were(39.82±2.23)%, the difference had statistical significance(P<0.05). Levels of TGF-β₁, FN and COL4 in HG group were higher than those of in HG+SIM(10 μg/L)group, HG+SIM(25 μg/L)group and LG group, the difference had statistical significance(P<0.05). **Conclusion** By decreasing TGF-β₁ level, simvastatin can inhibit the proliferation of GMCs and regulate the cell cycle, to suppress the hypertrophy of GMCs.

[Key words] simvastatin; glomerular mesangial cells; cell proliferation; cell cycle; transforming growth factor β

糖尿病肾病是糖尿病发展的长期并发症,患者晚期基底膜增厚、系膜基质增加,肾小球滤过率下降,部分肾小球功能荒废,患者肾功能下降,出现氮质血症,水肿及高血压等症状^[1]。高血糖可以刺激肾小球系膜细胞增生和肥大,最终引起肾小球滤过率下降及肾功能减退^[2]。目前,他汀类药物在糖尿病肾病治疗中的应用得到了临床的重视^[3]。本次研究旨在研究辛伐他汀(SIM)对高糖培养肾小球系膜细胞(GMC)增殖和细胞周

期的影响并对其机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)GMC:HBZY-1 细胞由上海蔚通实业有限公司提供。(2)药物:SIM 由杭州默沙东制药有限公司提供,批号 20150201。(3)试剂:RPMI-1640 培养基(R1383)、0.5%胰蛋白酶和 D-Hank's 溶液由美国 Gibco 公司提供,小牛血清(FCS)由上海浦东高桥畜牧厂提供,4-甲基偶氮四唑蓝(MTT)

和二甲亚砜(DMSO)均由美国 Sigma 公司提供,转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)ELISA 试剂盒和纤维黏连蛋白(FN)ELISA 试剂盒由上海岚派生物科技有限公司提供,IV型胶原(COL4)化学发光免疫试剂盒由北京盛世中方生物科技有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 液体配制 标准 RPMI-1640 培养液配制:取 RPMI-1640 粉剂一袋溶于 300 mL 三蒸水中,称取 2 g 碳酸氢钠粉末、2 g(11.1 mmol)葡萄糖(Glu)和 2.38 g 谷氨酰胺粉末溶于上述液体,加三蒸水调剂体积至 1 000 mL,并用 0.1 mol/L 的碳酸氢钠和 0.1 mol/L 的盐酸溶液调节 pH 至 6.9,用滤菌纸滤过后 4 °C 保存备用。低糖 RPMI-1640 培养液配制:配制高糖培养基时,取 RPMI-1640 粉剂一袋溶于 300 mL 三蒸水中,称取 2 g 碳酸氢钠粉末、1 g(5.6 mmol)Glu、2.38 g 谷氨酰胺粉末溶于上述液体,其余方法同标准 RPMI-1640 培养基的配制。配制高糖培养基时,取 RPMI-1640 粉剂一袋溶于 300 mL 三蒸水中,称取 2 g 碳酸氢钠粉末、5.4 g(30.0 mmol)Glu、2.38 g 谷氨酰胺粉末溶于上述液体,其余方法同标准 RPMI-1640 培养基的配制。

1.2.2 细胞培养及传代 将-80 °C 保存的 HBZY-1 细胞于 37 °C 水浴快速溶化,用 5.0 mL 培养基混匀于已融化的细胞悬液,离心机 1 500 r/min 离心 3 min。弃上清,再吸取 5.0 mL 培养基混匀细胞沉淀,再 1 500 r/min 离心 3 min,弃上清液,细胞沉淀用 5.0 mL 培养基混匀加入 75 cm² 方瓶,另加入 14.0 mL 培养基。于 37 °C、5% CO₂ 孵育箱中培养。当细胞长至 70%~80% 开始进行传代:弃 GMCs 原培养液,加入 0.25% 的胰蛋白酶 3~4 mL 消化 2 min,弃胰蛋白酶溶液。加入 10 mL 的标准 RPMI-1640 培养液反复吹打至细胞脱落,将制备的细胞悬液接种于培养基或培养板中继续传代培养。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖 取对数生长期的细胞,制备细胞密度为 2×10^5 个/mL 的单细胞悬液,将 100 μ L 的细胞悬液加入 96 孔板中。设置 4 组,包括:低糖组(LG 组, Glu 5.6 mmol/L)18 孔,3 个时间点,每个时间点 6 个复孔,高糖组(HG 组, Glu 30 mmol/L)18 孔, HG+SIM(10 μ g/L)组 18 孔, HG+SIM(25 μ g/L)组 18 孔,4 组实验并列同时进行。分别检测各组细胞生长 24、48、72 h 的细胞浓度:每孔加入 100 μ L 的 5 mg/mL 的 MTT 溶液;将 24 孔板于 37 °C 下孵育 4 h,弃去液体,每孔加入 500 μ L DMSO,振荡 10 min 后采用 AMR-100 酶标仪在 450 nm 处测吸光度(A)值,根据 A 值绘制细胞的生长曲线。

1.2.4 细胞周期检测 取对数生长期的细胞,制备细胞密度为 2×10^5 个/mL 的单细胞悬液,将 500 μ L 的细胞悬液置于 12 孔板中,细胞的分组及处理方式同 1.4。将各组细胞于 37

°C、5%CO₂ 孵育箱中培养 72 h 后进行细胞周期检测:抽取上清液,做好标记后置于-20 °C 中保存。加入 0.25% 的胰蛋白酶 0.2 mL 消化 2 min,弃胰蛋白酶溶液,加入 0.5 mL 的 RPMI-1640 培养液反复吹打至细胞脱落。将单细胞悬液加入 2 mL 圆底离心管中,1 500 r/min 离心,5 min,弃上清液。加入 PBS 1 mL 离心洗涤 1 次,弃上清液。加入 2 mL 预冷的 70% 乙醇,4 °C 固定 30 min,或-20 °C 固定过夜。离心,弃上清液。用 1 \times PBS 1 mL 洗涤 1 次,离心。加入含 50 mg/L 的含 RNA 酶的 500 μ L 1 \times PBS 中,37 °C 孵育 30 min,离心。用 1 \times PBS 1 mL 洗涤 1 次,离心。用 50 g/L 碘化丙啶(PI)溶液进行避光染色 30 min 后用流式细胞仪分析 G₀/G₁、G₂+M 期和 S 期细胞所占的比例。

1.2.5 细胞上清液 TGF- β_1 、FN 及 COL4 检测 将 1.5 中制备的细胞上清液于 37 °C 下快速解冻,使用 ELISA 检测上清液中的 TGF- β_1 和 FN 水平, COL4 检测采用化学发光免疫法。

1.3 统计学处理 采用 SPSS15.0 软件对数据进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差分析,不同时刻的 A 值比较采用重复测量的方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞不同时刻的 A 值比较 HG 组上不同时刻的 A 值高于 HG+SIM(10 μ g/L)组、HG+SIM(25 μ g/L)和 LG 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

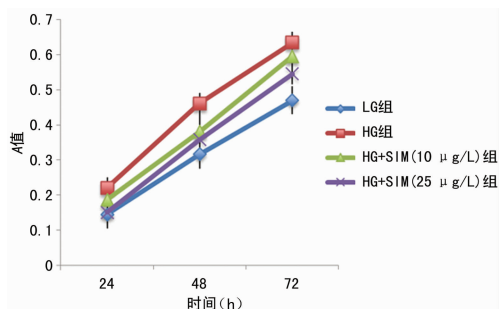
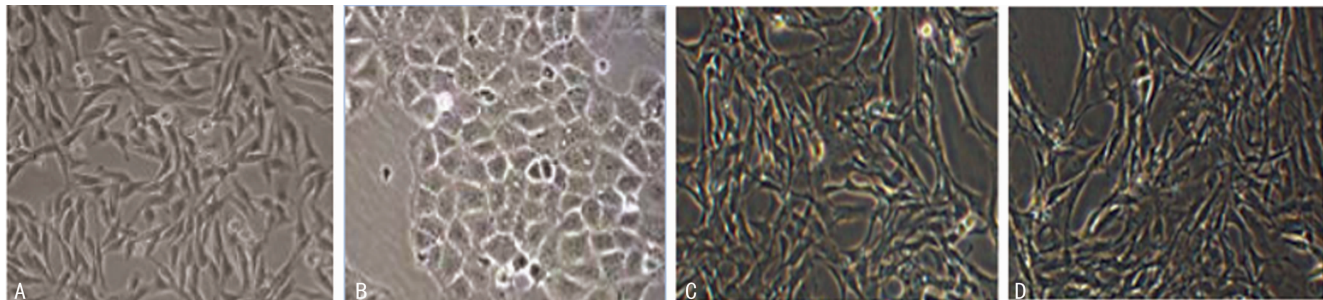


图 1 各组细胞不同时刻的 A 值

2.2 各组细胞的细胞周期比较 各组细胞的 G₀/G₁、G₂+M 期和 S 期细胞所占的比例差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。各组细胞 72 h 时的细胞形态见图 2。LG 组细胞呈椭圆形,细胞质多有突出,与周围细胞发生接触;HG 组细胞呈近圆形,体积增大,突出减少;HG+SIM(10 μ g/L)组细胞呈椭圆形,突出减少,部分细胞内出现空泡;HG+SIM(25 μ g/L)组细胞呈椭圆形,形态与 LG 组相比无明显改变。



A:LG 组;B:HG 组;C:HG+SIM(10 μ g/L)组;D:HG+SIM(25 μ g/L)组。

图 2 各组细胞 72 h 的细胞形态($\times 400$)

表 1 各组细胞的细胞周期比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	G ₀ /G ₁ 期	G ₂ +M 期	S 期
LG 组	35.67±3.38	29.45±2.35	41.24±5.64
HG 组	25.88±4.02	37.54±1.97	28.65±1.88
HG+SIM(10 μg/L)组	28.12±2.01	27.98±3.14	35.55±2.09
HG+SIM(25 μg/L)组	31.85±3.52	29.13±3.35	39.82±2.23
F	7.782	4.125	5.577
P	<0.05	<0.05	<0.05

2.3 各组细胞的上清液 TGF-β、FN 和 COL4 水平比较 各组细胞的上清液 TGF-β₁、FN 和 COL4 水平差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 各组细胞的上清液 TGF-β₁、FN 和 COL4 水平($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

组别	TGF-β ₁	FN	COL4
LG 组	0.72±0.11	4.26±0.34	9.85±1.06
HG 组	1.34±0.17	5.98±0.51	15.62±1.74
HG+SIM(10 μg/L)组	0.95±0.09	5.02±0.46	12.89±1.18
HG+SIM(25 μg/L)组	0.83±0.12	4.76±0.39	11.74±1.27
F	5.437	4.926	4.215
P	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨 论

研究发现,高血糖是糖尿病肾病发病的重要原因之一:高血糖可以刺激 GML 增生和肥大,细胞外基质增多,肾小球血管硬化和肾间质纤维化,最终引起肾小球滤过率下降及肾功能减退^[4-5]。研究发现,他汀类药物在糖尿病肾病的治疗中具有一定的价值,SIM 可以延缓糖尿病肾病的进展^[5]。但他汀类药物改善糖尿病肾病患者肾功能的机制目前尚未明确。

本次研究中,HG 刺激的 3 组大鼠 GMC 的增殖活性明显高于 LG 培养的 GMC,3 组细胞不同时刻的 A 值明显高于 LG 组。SIM 处理的细胞增殖能力明显低于 HG 组,说明 SIM 可以抑制 GMC 的增殖。比较各组细胞的细胞周期,72 h 后,HG 刺激的 3 组细胞的 G₀/G₁ 明显低于 LG 组细胞。研究发现,高浓度的 Glu 可以阻碍 GML 的细胞周期从 G₁ 期至 S 期的转化,GMC 的 DNA 的合成受阻,而 RNA 与蛋白质的合成增加,导致细胞发生肥大。本次研究中,由于 HG 的刺激,GMC 在 G₀ 期活化后便停滞于 G₁ 期,细胞不能顺利进入 S 期,故 G₀/G₁ 和 S 期细胞比例减少^[6-7]。SIM 干预的细胞 G₀/G₁ 和 S 期细胞比例高于 HG 组。故 SIM 可以改善 GMC 的肥大,且与剂量相关。

糖尿病患者多伴有脂类代谢的紊乱,他汀类药物可以通过有效的降低血脂而保护肾脏^[8]。同时,SIM 可以影响多种细胞因子及生长因子,调节炎症性细胞因子的信号传导和细胞增殖及凋亡^[9]。本次研究中,HG 刺激细胞的上清液 TGF-β₁ 水平明显高于 LG 组,而 SIM 可以降低 TGF-β₁ 和细胞外基质蛋白的水平,且与剂量相关。TGF-β₁ 在糖尿病肾病发生发展中起着重要作用^[10]。而 HG 可能通过形成糖基化终末产物,增加活性氧浓度及增高血管紧张素 II、活化己糖胺通路等上调 TGF-β₁ 的表达,该细胞因子可以通过细胞信号转化途径促进

肾小球系膜细胞合成 p27,阻止细胞从 G₁ 期进入 S 期,导致细胞肥大^[6,11]。同时,TGF-β₁ 可以促进 GMC 合成细胞基质蛋白,促进 GMC 的增生。

目前,关于 SIM 降低 TGF-β₁ 水平的机制尚未研究明确。SIM 可能是通过影响细胞因子、生长因子及激素的跨膜信号传导而抑制 TGF-β₁ 基因的表达。他汀类药物可以减少法尼酯焦磷酸的合成,从而抑制生长因子与其受体的结合,减少 p21ras 途径的激活,有效抑制 p21ras 介导的有丝分裂信号传导^[12]。同时,他汀类药物可以抑制 c-fos 和 c-jun 的表达,减轻细胞的炎症反应^[13]。综上所述,SIM 可以通过降低 TGF-β₁ 水平来抑制 GMC 的增殖并调整细胞周期,抑制 GMCs 肥大。

参考文献

- [1] 李惠秀,曹文富.糖尿病肾病发病机制及治疗进展[J].重庆医学,2013,41(21):2545-2547.
- [2] 张丽敏,高燕,李鸿燕,等.影响糖尿病肾病患者发病的相关因素分析[J].重庆医学,2014(27):3649-3651.
- [3] 杨桂珍.卡托普利联合辛伐他汀治疗早期糖尿病肾病临床观察[J].中国基层医药,2012,19(18):2758-2759.
- [4] Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Clin Sci, 2013, 124(3/4): 139-152.
- [5] Luis-Rodríguez D, Martínez-Castelao A, Górriz JL, et al. Pathophysiological role and therapeutic implications of inflammation in diabetic nephropathy[J]. World J Diabetes, 2012, 3(1): 7-18.
- [6] 徐艳丽.辛伐他汀与阿托伐他汀对高糖培养肾小球系膜细胞 p27 及 TGF-β1 表达的影响[D].郑州:郑州大学,2013.
- [7] 宋青青,孙嘉,王娇,等. TRB3 在非诺贝特抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞增殖中的作用及其机制[J].南方医科大学学报,2013,33(3):391-396.
- [8] 王洪艳,成旭东.辛伐他汀对糖尿病肾病患者非降脂保护作用的临床研究[J].现代仪器与医疗,2014(5):44-46.
- [9] 彭华,张晓东,孙艳艳,等.辛伐他汀对糖尿病肾病大鼠肾小管间质 CTGF、β-catenin 表达的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2012,13(2):112-115,后插 1.
- [10] Brennan EP, Morine MJ, Walsh DW, et al. Next-generation sequencing identifies TGF-β1-associated gene expression profiles in renal epithelial cells reiterated in human diabetic nephropathy[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822(4): 589-599.
- [11] Ma X, Ding J, Min H, et al. Protective role of low-dose TGF-β1 in early diabetic nephropathy induced by streptozotocin[J]. Int Immunopharmacol, 2013, 17(3): 752-758.
- [12] 沈琼,王飞,陈蕾,等.辛伐他汀对高糖培养肾小管上皮细胞 RANTES 和 TGF-β1 表达的影响[J].实用医学杂志,2013,29(6):867-869.
- [13] Peng H, Luo PL, Li YQ, et al. Simvastatin alleviates hyperpermeability of glomerular endothelial cells in early-stage diabetic nephropathy by inhibition of RhoA/ROCK1[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80009.