

网络出版时间: 2016-8-1 14:07 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160801.1407.066.html

阿托伐他汀对高糖高脂下系膜细胞的影响

何笑云¹ 欧春麟² 肖艳华¹ 周素娴¹

摘要 探讨阿托伐他汀对高糖高脂环境下人肾小球系膜细胞产生细胞外基质 (ECM) 及转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 的影响。将系膜细胞分为对照组、阿托伐他汀组、高糖高脂组、高糖高脂 + 阿托伐他汀组, 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测 TGF- β 1 的表达以及用 ELISA 法检测细胞上清液中 IV 型胶原 (Col IV) 和纤维连接蛋白 (Fn) 的含量。高糖高脂组较对照组 TGF- β 1 mRNA 的表达水平明显增加 ($P < 0.05$), 而高糖高脂 + 阿托伐他汀组较高糖高脂组能明显抑制 TGF- β 1 mRNA 的表达水平 ($P < 0.05$); 高糖高脂组较对照组细胞上清液中 Col IV、Fn 含量明显增加 ($P < 0.05$), 而这种作用可被阿托伐他汀所抑制 ($P < 0.05$)。高糖高脂可增加系膜细胞分泌 TGF- β 1 及 ECM 表达, 而阿托伐他汀可逆转这一作用。

关键词 阿托伐他汀; 高糖高脂; 系膜细胞; 转化生长因子- β 1

中图分类号 R 692.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)09-1375-03

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是一种在糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 患者临床发病率占 20% ~ 40% 的代谢紊乱性疾病, 常具有进行性肾间质纤维化的特征^[1]。阿托伐他汀是 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂, 在降脂、改善内皮功能、抑制细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 聚集等方面发挥着重要作用^[2]。尽管转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 与 DN 的发生密切相关^[3-5], 但在 DN 发生过程中, 阿托伐他汀与 TGF- β 1 的关系尚未明确。该研究通过探讨阿托伐他汀对高糖高脂条件下 TGF- β 1 及 ECM 的影响, 以进一步揭示 DN 的发病机制。

1 材料与方法

1.1 材料 逆转录试剂盒 (reverse transcription sys-

tem) (货号: A3500, 美国 Promega 公司); SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (货号: RR820A, 日本 TaKaRa 公司); D-葡萄糖 (D-glucose, D-GS) (美国 Biomol 公司)、溶血卵磷脂 (lysophosphatidylcholine, LPC) (美国 Sigma 公司); 阿托伐他汀 (大连辉瑞制药公司); IV 型胶原 (collagen IV, Col IV) 和纤维连接蛋白 (fibronectin, Fn) 的 ELISA 试剂盒 (深圳晶美生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 人肾小球系膜细胞为东南大学附属中大医院馈赠, 所用培养液为含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 培养基, 细胞保持在 37 °C 含有 5% CO₂ 的潮湿环境中。实验过程共分为四组: ① 对照组 (5.5 mmol/L D-GS)^[6-7]; ② 阿托伐他汀组 (10 μ mol/L); ③ 高糖高脂组 (30 mmol/L D-GS + 20 mg/L LPC); ④ 高糖高脂 + 阿托伐他汀组 (30 mmol/L D-GS + 20 mg/L LPC + 10 μ mol/L 阿托伐他汀)。

1.2.2 ELISA 法检测细胞上清液中 Col IV 和 Fn 的含量 收集细胞上清液, 参照 ELISA 试剂盒说明书测定各组 Col IV 与 Fn 的含量, 各组均设置 3 个复孔, 实验重复 3 次。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 法检测 TGF- β 1 mRNA 表达水平 采用 TRIzol 法提取各组细胞的总 RNA, 反转录得到 cDNA, 进行 qRT-PCR 法检测。引物序列如下: 人 TGF- β 1 mRNA 的上游引物: 5'-ACTACTACGC-CAAGGAGGTCAC-3', 下游引物: 5'-TGCTTGAAGT-GTCATAGATTTTCG-3'; 人 GAPDH mRNA 的上游引物: 5'-ACACCCACTCCTCCACCTTT-3', 下游引物: 5'-TTACTCCTTGAGGCCATGT-3', 引物根据 GenBank 序列, 用软件 Primer Premier 5.0 和 Oligo 6.22 设计, 由华大基因生物科技有限公司合成。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 重复 40 个循环。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析目的基因的相对表达量。各组均设置 3 个复孔, 实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 13.0 软件进行分析,

2016-04-19 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81260314、81560148); 广西硕士研究生创新项目 (编号: YCSZ2015218)

作者单位: ¹ 桂林医学院附属医院内分泌科 桂林 541001

² 中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078

作者简介: 何笑云, 女, 硕士研究生;

周素娴, 女, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zoe_doctor@163.com

表1 阿托伐他汀对高糖高脂下系膜细胞 Col IV、Fn 的影响($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	阿托伐他汀组	高糖高脂组	高糖高脂 + 阿托伐他汀组	F 值	P 值
Col IV($\mu\text{g/L}$)	4.54 \pm 0.74	3.75 \pm 0.79	16.32 \pm 1.55*	10.80 \pm 1.70#	64.75	0.00
Fn(mg/L)	3.90 \pm 0.43	3.09 \pm 0.67	7.89 \pm 0.34*	5.17 \pm 0.34#	60.50	0.00

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与高糖高脂组比较: # $P < 0.05$

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 采用单因素方差分析(One-way ANOVA)及两两比较的 t 检验(Student t -test)分析。

2 结果

2.1 阿托伐他汀对高脂高糖环境下系膜细胞 TGF- β 1 mRNA 表达的影响 与对照组(1.00 \pm 0.00)比较,高糖高脂组系膜细胞的 TGF- β 1 mRNA(1.88 \pm 0.21)表达水平明显上调($P < 0.05$),而高糖高脂 + 阿托伐他汀组(1.43 \pm 0.22)相对于高糖高脂组系膜细胞的 TGF- β 1 mRNA 表达水平明显受到抑制($F = 24.62, P < 0.05$)。

2.2 高脂高糖环境对系膜细胞 ECM 分泌的影响 收集实验各组的细胞上清液进行 ELISA 法检测显示,与对照组比较,高糖高脂组系膜细胞的细胞上清液中 Col IV、Fn 含量均升高($P < 0.05$)。见表1。

2.3 阿托伐他汀对高脂高糖环境下系膜细胞 Col IV、Fn 的影响 与高糖高脂组比较,高糖高脂 + 阿托伐他汀组的细胞上清液中 Col IV、Fn 含量明显受到抑制($P < 0.05$)。见表1。阿托伐他汀可抑制高糖高脂刺激引起的 ECM 相关因子的分泌。

3 讨论

DN 是 DM 的主要微血管并发症之一,常常与 DM 患者终末期肾脏病密切相关。DN 的发生发展与 ECM 积聚、系膜区的扩张和基底膜的增厚等有关。Col IV 和 Fn 作为 ECM 的重要成分,其过多沉积是诱发各种慢性肾脏疾病(如肾脏进展性纤维化)的病理基础。TGF- β 1 是目前被认为最重要的促纤维化因子^[8],是 TGF- β 超家族的成员之一,通常以自分泌、旁分泌两种方式调节细胞的增殖、分化和凋亡等生物功能。TGF- β 1 与 DN 的联系密切,在 DN 肾脏肥大、肾小球和肾小管基底膜增厚及肾小管间质纤维化^[9]等中均扮演着重要角色。研究^[10]显示,高糖高脂饮食能够促进新西兰兔表达 Col IV、Fn 和 TGF- β 1 等分子,改变其肾小管、间质的结构和功能,促进肾小管间质的纤维化;本研究显示,在高糖高脂环境下,系膜细胞 TGF- β 1 mRNA 的表达较对照组显著增高,细胞上清液中 Col IV、Fn 含量也

明显增加。此外, Yang et al^[11] 研究发现链脲佐菌素大鼠模型的肾皮质 TGF- β 1 表达升高,并且早于 ECM 扩张; Hwang et al^[12] 也发现利用 shRNA 技术沉默 TGF- β 1 的表达后,能够显著地下调 Col-IV 以及 Fn 的表达。可见, TGF- β 1 与 DN 发生过程中系膜细胞 ECM 的分泌密切相关。

阿托伐他汀是临床一线的降脂药物,耐受性极好,且不良反应轻微。该药通过抑制胆固醇与肝脏羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶抑制剂合成,继而降低血液内的血清脂蛋白及胆固醇浓度。近年来的研究^[13-14]显示,阿托伐他汀在调节 ECM 的异常分泌中也扮演了重要角色。Schierwagen et al^[13] 研究发现在单关节扎的大鼠模型中,阿托伐他汀能够明显抑制 Col I、III、IV 和 VI 的表达从而缓解大鼠的肝纤维化病情;本研究显示,在阿托伐他汀的处理下,可明显降低高糖高脂刺激人肾小球系膜细胞诱导的 Col IV、Fn 的分泌。此外,殷建等^[14]对 80 例糖尿病肾病患者的肾功能相关血清指标进行研究,发现阿托伐他汀治疗组血清中胱抑素 C、基质金属蛋白酶抑制剂-1、TGF- β 1 及 Col IV 等肾纤维化指标的含量明显降低;李成芳^[15]对 40 例早期 DN 患者分组进行阿托伐他汀治疗,发现阿托伐他汀能够通过降低 TGF- β 1 发挥肾脏保护作用。本研究显示,在阿托伐他汀的处理下,可明显降低由高糖高脂刺激人肾小球系膜细胞诱导的 TGF- β 1 表达升高。

综上所述,糖尿病高糖合并脂代谢紊乱的情况下,可诱导系膜细胞 TGF- β 1 的表达以及 ECM 相关因子(Col IV、Fn)的分泌,大大增加了肾小球纤维化的可能性;而阿托伐他汀可明显抑制高糖高脂的这种作用,为 DN 的治疗提供新的策略。

参考文献

- [1] Mora-Fernandez C, Dominguez-Pimentel V, de Fuentes M M, et al. Diabetic kidney disease: from physiology to therapeutics [J]. J Physiol, 2014, 592(18): 3997-4012.
- [2] 李成芳. 阿托伐他汀对慢性阻塞性肺病患者转化生长因子 β 1 的影响 [J]. 临床肺科杂志 2015 20(3): 506-8.
- [3] Gao P, Li L, Ji L, et al. Nr2 ameliorates diabetic nephropathy progression by transcriptional repression of TGFbeta1 through inter-

- actions with c-Jun and SP1 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1839(11): 1110–20.
- [4] Wang T, Chen S S, Chen R, et al. Reduced beta 2 glycoprotein I improves diabetic nephropathy via inhibiting TGF-beta1-p38 MAPK pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(3): 2321–33.
- [5] Hathaway C K, Gasim A M, Grant R, et al. Low TGF-beta1 expression prevents and high expression exacerbates diabetic nephropathy in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(18): 5815–20.
- [6] 周素娴, 雷闽湘, 赵晋晋, 等. 高糖高脂对系膜细胞产生细胞外基质及 PAF 的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(10): 2056–7.
- [7] 周素娴, 雷闽湘, 赵晋晋. D-葡萄糖对系膜细胞产生细胞外基质的时效与量效研究 [J]. *广西医学*, 2009; 31(08): 1072–3.
- [8] Munoz-Felix J M, Oujó B, Lopez-Novoa J M. The role of endoglin in kidney fibrosis [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2014, 16: e18.
- [9] Huang W, Xu C, Kahng K W, et al. Aldosterone and TGF-beta1 synergistically increase PAI-1 and decrease matrix degradation in rat renal mesangial and fibroblast cells [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008, 294(6): F1287–95.
- [10] 李宏光, 蔡元菊, 邹锦慧, 等. 高糖高脂饮食对兔肾小管间质纤维化的影响 [J]. *动物学杂志*, 2010, 45(1): 145–50.
- [11] Yang Y, Zhang S Y, Sich M, et al. Glomerular extracellular matrix and growth factors in diffuse mesangial sclerosis [J]. *Pediatr Nephrol*, 2001, 16(5): 429–38.
- [12] Hwang M, Kim H J, Noh H J, et al. TGF-beta1 siRNA suppresses the tubulointerstitial fibrosis in the kidney of ureteral obstruction [J]. *Exp Mol Pathol*, 2006, 81(1): 48–54.
- [13] Schierwagen R, Leeming D J, Klein S, et al. Serum markers of the extracellular matrix remodeling reflect antifibrotic therapy in bile-duct ligated rats [J]. *Front Physiol*, 2013, 4: 195.
- [14] 殷建欧, 妍. 阿托伐他汀对糖尿病肾病患者肾功能相关血清指标及肾脏纤维化的影响观察 [J]. *河北医学*, 2015, 21(1): 49–52.
- [15] 李成芳. 不同剂量阿托伐他汀对早期糖尿病肾病 TGF-beta1 的影响 [J]. *中国医药指南*, 2012, 10(27): 198–9.

Effect of Atorvastatin on the mesangial cells exposed to high glucose and lysophosphatidylcholine

He Xiaoyun¹, Ou Chunlin², Xiao Yanhua¹, et al

(¹Dept of Endocrinology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001;

²Cancer Research Institute, Central South University, Changsha 410078)

Abstract To investigate the effect of Atorvastatin on the role of extracellular matrix (ECM) and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) of mesangial cells in high glucose and lysophosphatidylcholine (LPC) environment. First, the expression of TGF-beta1 was detected by qRT-PCR, then divided the human mesangial cells into four groups: control, Atorvastatin, high glucose and LPC, high glucose and LPC with Atorvastatin. All the groups were cultured for 24 h. Meanwhile, the levels of collagen IV and fibronectin in the supernatant were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Compared with the control group, the expression of TGF-beta1 mRNA in high glucose and LPC group was significantly increased ($P < 0.05$). However, the expression of TGF-beta1 mRNA in high glucose and LPC with Atorvastatin group were significantly decreased compared to high glucose and LPC group ($P < 0.05$); Compared with the control group, the level of collagen IV and fibronectin in the supernatant of high glucose and LPC group was increased significantly ($P < 0.05$). However, the effect could be inhibited by Atorvastatin ($P < 0.05$). High glucose and LPC can promote the secretion of ECM and the expression of TGF-beta1 in mesangial cells, however, the effect can be inhibited by Atorvastatin obviously.

Key words Atorvastatin; high glucose and lysophosphatidylcholine; mesangial cells; transforming growth factor-beta1