

洛伐他汀对人肾小球系膜细胞胰岛素样生长因子-1 表达的影响

杨涛^{1①}, 陈家伟¹, 刘超¹, 刘翠萍¹, 杨永年²

(¹南京医科大学第一附属医院, 南京 210029; ²复旦大学附属中山医院, 上海 200032)

【摘要】 目的: 观察 HMG-CoA 还原酶抑制剂洛伐他汀对人肾小球系膜细胞胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 表达及纤维连接蛋白、层粘连蛋白和 IV 型胶原分泌的影响。方法: 分别于体外低糖 (5.6 mmol/L) 和高糖 (30 mmol/L) 环境中培养人胎肾小球系膜细胞, 用 RT-PCR 法检测系膜细胞 IGF-1 mRNA 表达水平, 用酶免和放免法测定细胞上清液中纤维连接蛋白、层粘连蛋白和 IV 型胶原含量。分别在培养液中加入洛伐他汀或/和西拉普利, 观察不同刺激时间和药物浓度对上述基质蛋白指标的影响。选择刺激时间 48 h 和刺激浓度 10 μ mol/L, 观察单用或联用洛伐他汀和西拉普利对系膜细胞 IGF-1 mRNA 表达的影响。结果: 高糖环境下肾小球系膜细胞过度增殖, 细胞上清液中纤维连接蛋白、层粘连蛋白和 IV 型胶原含量增加, IGF-1 mRNA 表达明显增加。洛伐他汀和西拉普利均可明显抑制系膜细胞增殖, 降低细胞上清液中基质蛋白浓度, IGF-1 mRNA 表达亦显著下降。洛伐他汀对 IGF-1 mRNA 表达的抑制作用略强于西拉普利, 但两者联用未显示更强的抑制效果。结论: 高糖可刺激人肾小球系膜细胞 IGF-1 高表达, 并增加基质蛋白的分泌, 洛伐他汀与西拉普利类似, 均可一定程度逆转上述现象, 提示他汀类药物可能有益于早期糖尿病肾病的防治。

【关键词】 系膜细胞; 他汀; 胰岛素样生长因子-1; 表达; 西拉普利

【中图分类号】 R318 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2003)06-0524-05

糖尿病肾病 (DN) 是糖尿病最常见慢性并发症之一, 也是导致终末期肾脏疾病 (ESRD) 的主要原因之一, 其特征性病理改变是细胞外基质 (ECM) 蛋白在肾小球过度沉积, 转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 是这一过程的主要介导体。DN 早期肾脏体积增大, 并伴有局部胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 表达增加。有研究发现他汀类药物 (statin) 可减少糖尿病大鼠尿蛋白排泄量, 阻止肾小球硬化病变的进展^[1]。我们以前的研究亦发现他汀类药物可抑制肾小球系膜细胞 TGF- β_1 的表达和 ECM 蛋白的分泌 (待发表)。那么他汀类药物对系膜细胞 IGF-1 的表达是否有直接的影响呢? 为此我们开展了本研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

肾组织: 孕 4~6 月水囊引产胎儿肾脏。

药品: 洛伐他汀由韩国汉城 Soon Chun Hyang 大学 Hyonam 肾脏病研究所 Hi Bahl Lee 博士提供, 西拉普利由 Roche 公司提供。

试剂: RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司, HEPES、胶原酶、4-甲基偶氮四唑蓝 (MTT)、二甲亚砜 (DMSO)、TRIzol 均购自美国 Sigma 公司, RT-PCR 二步法试剂盒由 Sigma 公司提供。

1.2 主要方法

1.2.1 细胞培养和刺激试验 肾小球系膜细胞培养及鉴定参照于力方等^[2]方法, 并加以改良。用结蛋白抗体、波形蛋白抗体和角蛋白抗体分别进行间接免疫荧光染色, 细胞免疫病理鉴定结果证实为系膜细胞 (图 1)。取第 4~8 代系膜细胞用于刺激试验, 分为低糖 (5.6 mmol/L) 对照组 (IG)、高糖 (30 mmol/L) 对照组 (HG)、高糖+洛伐他汀组 (HG+Lov)、高糖+西拉普利组 (HG+Cil) 和高糖+洛伐他汀+西拉普利组 (HG+Lov+Cil)。选择 10 μ mol/L 药物浓度分别观察 24, 48, 72 h 刺激时间对细胞增殖的影响; 选择刺激时间 48 h, 分别观察 1, 10, 100 和 500 μ mol/L 药物浓度对细胞增殖的影响。系膜细胞培养于 75 cm³ 培养瓶内, 传代后 48 h 换液, 加入含相应刺激药物 (浓度均为 10 μ mol/L)

① 【收稿日期】 2003-02-21 【*通讯作者】 Tel: 025-83718836-6426 E-mail: yangt@njmu.edu.cn

【基金项目】 国家“九五”科技攻关计划资助项目 (No. 96-906-05-0)

的低糖或高糖培养液, 置 37 ℃ 孵箱继续培养 48 h 后, 吸取细胞上清液, 用于纤维连接蛋白(FN)、层黏连蛋白(IAM)和 IV 型胶原测定, 并立即抽提系膜细胞总 RNA, 用于 RT-PCR。

1.2.2 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR) 细胞总 RNA 抽提采用 TRIzol 法, RT-PCR 采用二步法在 Perkin Elmer 公司 2400PCR 仪上进行。引物序列设计如下。人 IGF-1: 上游引物, 5'-CTA, GGC, ACT, CTG, CTT, GC-3', 下游引物, 5'-CTT, GGG, CAT, GTC, AGT, GTG, GC-3', 扩增产物 296bp^[3]; GAPDH: 上游引物, 5'-CAC, CCT, GTT, GCT, GTA, GCC, ATA, TTC-3', 下游引物, 5'-GAC, ATC, AAG, AAG, GTG, GTG, AAG, CAG-3', 扩增产物 196bp^[4]。以上引物均由上海生物工程公司合成。取 10 μg 总 RNA 标本, 采用 AMV 逆转酶系统进行逆转录, 反应体积 20 μl。PCR 反应体系: Taq 10×Buffer 5.0 μl、MgCl₂ 1.5 mmol/L、dNTP 200 μmol/L、上游引物 1.25 μmol/L、下游引物 1.25 μmol/L、Taq 酶 1.5 u、cDNA 2.0 μl

(20~40 ng)和灭菌双蒸水 37.5 μl(反应体积 50 μl)。反应条件: 预变性 94 ℃ 5 min 进入循环, 变性 94 ℃ 1 min, 退火 58 ℃ 1 min, 复性 72 ℃ 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 ℃ 7min 延伸。取 PCR 产物 10 μl 在 1.5% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭)上电泳, 以 pUC19 为 DNA Marker, 用 Kodak Digital 1D Image Analysis Software(Eastman Kodak Company)成像系统扫描电泳结果, 测定光密度值并计算 IGF-1/GAPDH 光密度比值。

1.2.3 细胞上清蛋白测定 纤维连接蛋白(American Diagnostica Inc., USA)采用 ELISA 检测, 层黏连蛋白和 IV 型胶原采用 RIA 测定(上海海军医学研究所生物技术中心试剂盒)。

1.3 统计学处理
表中数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用 t 检验, 多组间比较用 F 检验, 全部数据应用 SPSS10.0 统计分析软件处理。



Fig 1. Identification of cultured mesangial cells by immunohistochemistry method

2 结 果

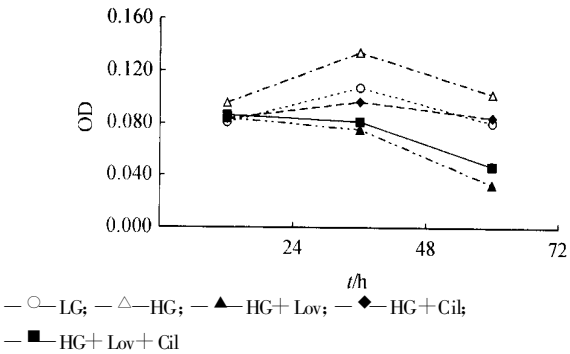
2.1 对系膜细胞增殖的影响

时间曲线: 与低糖组相比, 高糖可促进系膜细胞(MC)增殖; 单用或联用洛伐他汀和西拉普利 24, 48 h 后均可使高糖环境下 MC 的增殖受到抑制; 药物刺激 72 h 后可使 MC 增殖低于正常(图 2)。

浓度曲线: 1 μmol/L 浓度的洛伐他汀和西拉普利对 MC 增殖抑制作用较弱, 药物浓度为 10, 100, 500 μmol/L 时, MC 增殖受到显著抑制, 此 3 种浓度的抑制作用无显著性差异(图 3)。

2.2 对系膜细胞上清液基质蛋白含量的影响

高糖环境下系膜细胞上清液中纤维连接蛋白、层黏连蛋白和 IV 型胶原含量明显高于低糖环境。洛伐他汀和西拉普利(均为 10 μmol/L)刺激 48 h 后可明显降低高糖环境中系膜细胞上清液中上述基



LG: low glucose; HG: high glucose; Lov: lovastatin; Cil: cilazapril
Fig 2 The effect of lovastatin and cilazapril on the proliferation of cultured mesangial cells in different stimulus duration

质蛋白含量, 洛伐他汀组层黏连蛋白和 IV 型胶原水平明显低于西拉普利组, 洛伐他汀+西拉普利组上述 3 种基质蛋白含量显著低于西拉普利组(表 1)。

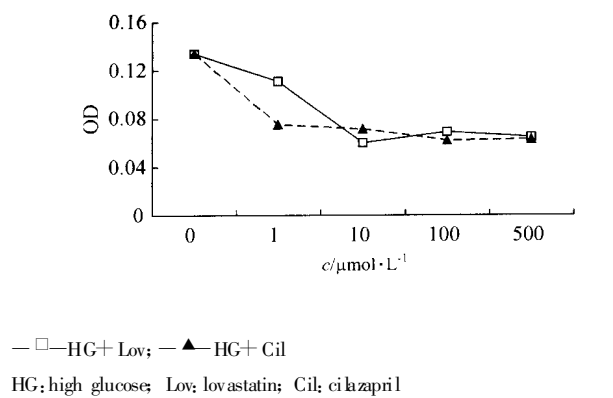


Fig 3. The effect of lovastatin and cilazapril on the proliferation of cultured mesangial cells in different stimulus concentration

Tab 1. The effect of lovastatin and cilazapril on the concentrations of ECM proteins in the supernatant of mesangial cells($n=6$)

Groups	Fibronectin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Laminine (ng/ml)	Type IV Collagen ($\mu\text{g}/\text{L}$)
LG	4.39 \pm 0.11	21.47 \pm 1.44	9.89 \pm 1.41
HG	5.16 \pm 0.38	28.50 \pm 4.08	14.52 \pm 3.15
HG+Lov	4.65 \pm 0.35*	22.31 \pm 3.72**	7.70 \pm 1.70**
HG+Cil	4.62 \pm 0.21*	24.80 \pm 3.64*	11.55 \pm 1.39*
HG+Lov+Cil	4.13 \pm 0.46 [#]	21.67 \pm 1.27 [#]	7.42 \pm 0.88 [#]

Compared with HG, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; with HG+Cil, [#] $P<0.05$

2.3 对肾小球系膜细胞 IGF-1 mRNA 表达的影响

高糖环境中肾小球系膜细胞 IGF-1 mRNA 表达较低糖环境明显升高,加入洛伐他汀、西拉普利均可一定程度逆转高糖介导的 IGF-1 mRNA 过度表达,洛伐他汀对 IGF-1 mRNA 表达的抑制作用强于西拉普利,但二者联用未显示更强的抑制效果(图 4, 图 5)。



Fig 4. The effect of lovastatin on the expression of IGF-1 mRNA in the cultured mesangial cells

Marker: pUC19 DNA

1. LG group; 2. LG+Lov group; 3. LG+Cil group; 4. LG+Lov+Cil group; 5. HG group; 6. HG+Lov group; 7. HG+Cil group; 8. HG+Lov+Cil group

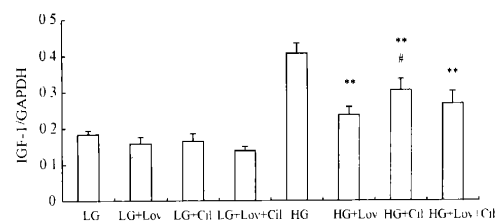


Fig 5. The effect of lovastatin and cilazapril on the expression of IGF-1 mRNA, compared with HG group, ** $P<0.01$, with HG+Lov group, [#] $P<0.05$

3 讨论

DN 早期主要病理生理改变是肾脏肥大和高血流状态,有研究认为与 GF/IGFs 系统紊乱有关,IGF-1 在上述过程中起一定作用。目前认为 IGF-1 与 DN 关系主要有 DN 早期 IGF-1 表达增加等几个方面^[5]。

既然 DN 早期 IGF-1 表达增加是不利的,所以抑制 IGF-1 在肾脏局部的表达,则可能有益于防治 DN 的进展。我们此前的研究发现,洛伐他汀可抑制高糖环境中系膜细胞 TGF- β_1 mRNA 的过度表达,并降低细胞上清液中 TGF- β_1 和细胞外基质蛋白含量。那么洛伐他汀对系膜细胞 IGF-1 表达是否有影响呢?

我们的研究显示,高糖可刺激系膜细胞 IGF-1 mRNA 表达,并伴有细胞上清液中纤维连接蛋白、层黏连蛋白和 IV 型胶原含量升高,与以往文献报道是一致的。洛伐他汀和西拉普利干预均能一定程度抑制高糖环境中 IGF-1 mRNA 的过度表达,并降低细胞培养液中基质蛋白含量,提示他汀类药物可直接抑制系膜细胞 IGF-1 表达,从而可能有益于对早期 DN 的防治。

血胆固醇升高是糖尿病肾病(DN)发生的独立危险因素^[6],控制血脂水平对预防和延缓 DN 进展有重要意义。他汀类药物可竞争性抑制内源性胆固醇合成酶—HMG-CoA 还原酶,从而抑制 HMG-CoA 转变为甲羟戊酸,阻断甲羟戊酸代谢途径,使细胞内胆固醇合成减少。近年研究发现,他汀类药物在降低胆固醇同时,可减少尿蛋白量,抑制细胞外基质形成,阻止肾小球硬化病变的进展。以往他

汀类药物的这种作用被看作是降低血脂后带来的益处,但最近的研究显示,他汀类药物能够直接抑制肾小球系膜细胞 TGF- β_1 表达,这种抑制作用加入甲基戊酸后可被逆转^[7]。在 DN 发生发展中,有多种生长因子和细胞因子参与发病。TGF- β_1 和 IGF-1 过度表达是 DN 病理生理机制的重要环节,不同的是,在 DN 病程中 TGF- β_1 是持续性表达增强,而 IGF-1 是早期表达升高,以后降至正常水平。二者的共同点是都可以引起肾小球系膜细胞产生和积聚大量纤维连接蛋白、层黏连蛋白和 IV 型胶原,后者是 DN 最为显著的病理特点。

IGF-1 有胰岛素样生物学作用,更重要的是又具有促进细胞增殖,刺激组织细胞生长与分化的作用。近年来 IGF-1 及其受体和结合蛋白在 DN 发病中的作用日益受到重视。动物实验发现,DM 模型建立后,肾脏 IGF-1 表达立即升高,伴有肾脏体积增大,并持续 1~4 个月,以后 IGF-1 表达水平逐渐降至正常^[8]。IGF-1 可刺激系膜细胞合成纤维连接蛋白、层黏连蛋白和 IV 型胶原等细胞外基质蛋白^[9]。

本研究结果提示他汀类药物与 ACE 抑制剂类似,可抑制高糖引起的肾脏局部 IGF-1 过度表达,减少细胞外基质蛋白的产生。另外,他汀类药物对 IGF-1 表达的抑制作用亦提示它对 TGF- β_1 的抑制并非特异的。因此,他汀类药物可能有益于早期 DN 的防治,但

其肾脏保护作用还有待于进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] Han DC, Lee SK, Hwang SD, *et al*. Lovastatin prevents glomerulosclerosis in streptozotocin-induced diabetic uninephrectomized rats [J]. (Abstract) *Kidney Int*, 1993, 44: 1181-1188.
- [2] 于力方(Yu LF),陈香美(Chen XM),黎磊石(Li LS). 正常人肾小球系膜细胞培养的研究[J]. 中华肾脏病杂志(*Chin J Nephrol*), 1990, 6(2): 70-74.
- [3] 李晴(Li J),孔宪国(Kong XG),郝杰民(Hao JM)等. 结直肠癌 IGF-I mRNA 表达与浸润转移的关系[J]. 癌症(*Chin J Nephrol*), 2000, 19(2): 153-155.
- [4] Bodine PVN, Henderson RA, Green J, *et al*. Estrogen receptor- α is developmentally regulated during osteoblast differentiation and contributes to selective responsiveness of gene expression [J]. *Endocrinology*, 1998, 139: 2048-2057.
- [5] Bortz JD, Rotwein P, De Vol D, *et al*. Focal expression of insulin-like growth factor in rat kidney collecting duct [J]. *J Cell Biol*, 1998, 107: 811.
- [6] Berfield AK, Andress DL, Abrass CK. IGF-1-induced lipid accumulation impairs mesangial cell migration and contractile function [J]. *Kidney Int*, 2002, 62(4): 1229-1237.
- [7] Kim SI, Han DC, Lee HB. Lovastatin inhibits transforming growth factor- β_1 expression in diabetic rat glomeruli and cultured rat mesangial cells [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11: 80-87.
- [8] Chiarelli F, Santilli F, Mohn A. Role of growth factors in the development of diabetic complications [J]. *Horm Res*, 2000, 53(2): 53-67.
- [9] Rehman HU. The role of growth hormone in the pathogenesis of vascular complications of diabetes mellitus [J]. *Am J Med Sci*, 2000, 320(2): 128-134.

Effect of Lovastatin on the Expression of Insulin-like Growth Factor-1 in the Cultured Human Mesangial Cells

YANG Tao¹, CHEN Jia-Wei¹, LIU Chao¹, LIU Cui-Ping¹, YANG Yong-Nian²

¹ The No. 1 Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 210029 Nanjing, China

² The Affiliated Zhong Shan Hospital Fudan University, Shanghai 200032, China

【ABSTRACT】 AIM: To observe the effect of lovastatin (statin) on the expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the cultured human mesangial cells and the secretion of fibronectin, laminin and type IV collagen proteins from them. METHODS: The human mesangial cells was respectively cultured in the medium with low glucose (5.6 mmol/L) and high glucose (30 mmol/L). The expression of IGF-1 mRNA in mesangial cells were observed by RT-PCR method and the concentrations of fibronectin, laminin and type IV collagen in the supernatant were determined by ELISA and radioimmunoassay methods. The extracellular matrix (ECM) proteins in the supernatant were detected again after addition of lovastatin, cilazapril and both of them on different stimulation time and dosage. The IGF-1 mRNA expression of mesangial cells were also detected on 48 h after stimulation of lovastatin (10 μ mol/L) and cilazapril (10

$\mu\text{mol/L}$). **RESULTS:** High glucose induced over proliferation of mesangial cells, excessive IGF-1 mRNA expression and the increased secretion of fibronectin, laminin and type IV collagen of mesangial cells. Both lovastatin and cilazapril decreased the cell proliferation, the IGF-1 mRNA expression and the level of above extracellular matrix (ECM) proteins. Lovastatin has more suppressive effect on the expression of IGF-1 mRNA than cilazapril. But combination of them has no more suppressive effect than that single of them. **CONCLUSIONS:** High glucose stimulates the cultured human mesangial cells to excessively express the IGF-1 and ECM proteins. The high glucose-induced changes can be suppressed by lovastatin and cilazapril. The results suggest that statin has a direct cellular impact on the expression of IGF-1 of mesangial cells. They also indicate that statin have potential preventive action for diabetic nephropathy.

【KEY WORDS】 Mesangial cells; Statin; IGF-1; Expression; Cilazapril

。校园信息。

中国药科大学生命科学与技术学院成立

我校于 11 月 16 日隆重举行中国药科大学“生命科学与技术学院”成立庆典大会。我校从上世纪 70 年代末创建全国第一个生物制药专业, 在 30 多年艰苦创业过程中, 学校始终把培养学生创新意识 and 创新能力作为培养目标和指导思想, 以学科建设作为发展主线, 并结合生命科学发展前沿, 不断更新办学理念, 拓宽办学思路, 在学科发展和建设、人才培养、师资队伍建设和改善办学条件、科学研究和科技开发等方面均给予大力支持和必要的投入。通过广大师生共同努力, 我校在生命科学教学、科研、科技开发和科技成果转化等领域均取得了较为显著的成绩。30 多年来, 学科发展从原来单一的生物制药专业发展成为现在拥有药学、生物学和工程学三个一级学科的 5 个二级学科, 具有硕士和博士学位授予权和药学博士后流动站。专业从原来单一的“生物制药专业”发展成现在包括“生物技术”、“生物工程”、“海洋药物”、“生化药学强化班”(国家理科基础科学研究与教学人才培养基地)和“国家生命科学与技术人才培养基地”等 5 个本科专业。在生物医药领域先后为国家培养出具有大学本科学历从事生物药物研究与开发专门人才 2000 余名, 硕士、博士近 300 名。生命科学与技术学院的成立, 将为把我校建设成国际知名的以药学为特色, 理、工、经、管、文多学科协调发展的高水平多科性大学宏伟目标的实现做出更大的贡献。