

阿托伐他汀对高糖诱导的系膜细胞凋亡的影响*

朱 丹¹, 胡 莹¹, 赵 欣², 马吉芳¹, 郝建兵¹, 任连生¹, 崔 蕾¹ (1. 哈尔滨医科大学附属第一医院肾内二病房 150070; 2. 黑龙江省医院血液透析中心, 哈尔滨 150001)

【摘要】 目的 探讨不同浓度阿托伐他汀对大鼠系膜细胞凋亡的影响。**方法** 体外培养大鼠永生系膜细胞, 分为 5 组: 对照(C)组; 高糖(30 mmol/L)(H)组; 高糖(30 mmol/L)+阿托伐他汀(10^{-7} mmol/L)(H+A1)组; 高糖(30 mmol/L)+阿托伐他汀(10^{-6} mmol/L)(H+A2)组; 高糖(30 mmol/L)+阿托伐他汀(10^{-5} mmol/L)(H+A3)组。采用 Annexin V-FITC 和 PI 双染法检测细胞凋亡。采用 caspase-3 活性检测试剂盒检测系膜细胞 caspase-3 活性。**结果** 与 C 组相比, H 组系膜细胞凋亡率明显增加, caspase-3 活性明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 H 组相比, 高糖加不同浓度阿托伐他汀组细胞凋亡率明显降低, caspase-3 活性明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 且呈浓度依赖。**结论** 阿托伐他汀可以通过 caspase 途径抑制醛固酮诱导的大鼠系膜细胞凋亡。

【关键词】 阿托伐他汀; 高糖; 系膜细胞; 凋亡; caspase-3

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.09.007 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)09-1196-02

Effect of atorvastatin on apoptosis of hyperglycemia induced mesangial cells in rat* ZHU Dan¹, HU Ying¹, ZHAO Xin², MA Ji-fang¹, HAO Jian-bing¹, REN Lian-sheng¹, CUI Lei¹ (1. Second Department of Nephrology, First Affiliated Hospital of Haerbin Medical University, Haerbin, Heilongjiang, 150070, China; 2. Hemodialysis Center, Heilongjiang Provincial Hospital, Haerbin, Heilongjiang 150001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the influence of different concentrations of atorvastatin on apoptosis of rat mesangial cells. **Methods** Rat immortal mesangial cells were cultured in vitro and divided into 5 groups: control (C) group, hyperglycemia (30 mmol/L, H) group, hyperglycemia (30 mmol/L) + atorvastatin (10^{-7} mmol/L) (H+A1) group, hyperglycemia (30 mmol/L) + atorvastatin (10^{-6} mmol/L) (H+A2) group and hyperglycemia (30 mmol/L) + atorvastatin (10^{-5} mmol/L) (H+A3) group. Apoptosis was detected by Annexin V-FITC and PI double staining, and the caspase-3 activity was assayed by the caspase-3 activity kit. **Results** Compared with the group C, the mesangial cells apoptosis rate and caspase-3 activity in the group H were significantly increased, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the group H, the mesangial cells apoptosis rate and caspase-3 activity in the H+A1, 2, 3 groups were significantly decreased, the differences were statistically significant ($P < 0.05$), moreover which showing the concentration dependence. **Conclusion** Atorvastatin may inhibit aldosterone induced mesangial cells apoptosis via caspase pathway.

【Key words】 atorvastatin; high glucose; mesangial cells; apoptosis; caspase-3

糖尿病肾病(DN)的特点为早期出现微量蛋白尿, 后期出现大量蛋白尿, 严重 DN 可发展成尿毒症。由于 DN 的严重致残性, 越来越多的学者开始致力于对其机制进行研究。Ab-boud^[1]研究发现, 大鼠肾脏系膜细胞的凋亡与蛋白尿的多少关系密切。因此本研究推断系膜细胞的凋亡参与了 DN 的发生和发展。Danesh 和 Kanwar^[2]研究发现, 他汀类药物除了具有降脂作用外, 还具有其他方面的作用, 如抗氧化应激作用, 调节细胞周期, 减少炎症等。本研究拟探讨他汀类药物对高糖诱导系膜细胞凋亡的影响, 从而揭示 DN 发生的分子机制, 深入探讨阿托伐他汀保护肾脏的机制。

1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 系膜细胞由上海长征医院梅长林教授赠送; 阿托伐他汀为美国辉瑞公司生产的立普妥; Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒由北京宝赛生物公司生产; caspase-3 活性检测试剂盒由碧云天生物技术研究所生产。

1.2 分组 对照(C)组, 高糖(30 mmol/L)(H)组, 高糖(30 mmol/L)+阿托伐他汀(10^{-7} mmol/L)(H+A1)组, 高糖(30

mmol/L)+阿托伐他汀(10^{-6} mmol/L)(H+A2)组, 高糖(30 mmol/L)+阿托伐他汀(10^{-5} mmol/L)(H+A3)组。各组细胞加药后培养 24 h。

1.3 检测方法

1.3.1 caspase-3 活性检测 按碧云天 caspase-3 试剂盒说明书中步骤, 迅速测定 caspase-3 的酶活性。

1.3.2 流式细胞术检测系膜细胞凋亡率 采用 Annexin V-FITC 和 PI 双染法将样本中正常、坏死、凋亡细胞区分开。采用的判定标准为: 左上象限 PI(+), AnnexinV(-) 表示坏死细胞区; 左下象限 PI(-), AnnexinV(-) 表示活细胞区; 右上象限 PI(+), Annexin V(+) 表示凋亡晚期或死亡细胞区; 右下象限 PI(-), AnnexinV(+) 表示早期凋亡细胞区。

1.4 统计学处理 所有计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS18.0 软件进行统计学处理, 组间比较用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

阿托伐他汀对 caspase-3 活性和系膜细胞凋亡率的影响

* 基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12521293)。

作者简介: 朱丹, 女, 博士, 副主任医师, 主要从事糖尿病肾病肾纤维化研究。

见表 1。与 C 组相比, H 组 caspase-3 活性明显增高, 为 $(16.29 \pm 1.01)\%$, 差异有统计学意义 $(P < 0.05)$, H + A1 组为 $(12.37 \pm 1.02)\%$, H + A2 组为 $(9.25 \pm 0.92)\%$, H + A3 组为 $(6.26 \pm 0.45)\%$, 均较 H 组明显降低, 差异有统计学意义 $(P < 0.05)$, 且呈浓度依赖。C 组阿托伐他汀对系膜细胞凋亡率为 $(2.71 \pm 0.24)\%$, H 组为 $(20.05 \pm 0.21)\%$, H + A1 组为 $(16.45 \pm 0.45)\%$, H + A2 组为 $(12.31 \pm 0.33)\%$, H + A3 组为 $(7.25 \pm 0.73)\%$ 。高糖可以诱导系膜细胞凋亡, 而阿托伐他汀可以抑制系膜细胞凋亡, 且其作用呈浓度依赖。

表 1 各组 caspase-3 活性和系膜细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	caspase-3 活性	系膜细胞凋亡率
C 组	4.59 ± 0.19	2.71 ± 0.24
H 组	$16.29 \pm 1.01^*$	$20.05 \pm 0.21^*$
H + A1 组	$12.37 \pm 1.02^{* \#}$	$16.45 \pm 0.45^{* \#}$
H + A2 组	$9.25 \pm 0.92^{* \# \Delta}$	$12.31 \pm 0.33^{* \# \Delta}$
H + A3 组	$6.26 \pm 0.45^{* \# \Delta \blacktriangle}$	$7.25 \pm 0.73^{* \# \Delta \blacktriangle}$

注: 与 C 组相比, $^* P < 0.05$; 与 H 组相比, $^\# P < 0.05$; 与 H + A1 组相比, $^\Delta P < 0.05$; 与 H + A2 组相比, $^\blacktriangle P < 0.05$ 。

3 讨 论

细胞凋亡可能会引起系膜细胞减少, 增加尿蛋白漏出, 从而最终导致肾小球硬化^[3]; 而肾小管萎缩、肾间质纤维化, 可以由肾小管上皮细胞凋亡引起, 造成尿蛋白加重, 最终损害肾功能^[4]。近些年, 随着人们对肾脏细胞凋亡研究的不断深入, 发现细胞凋亡与 DN 的发生和发展密切相关。

许多学者研究表明, 他汀类药物可以减少尿蛋白排泄, 延缓糖尿病患者肾小球滤过率下降, 减少肾小球硬化速度, 从而延缓 DN 的进展, 起到肾脏保护作用^[5]。

Zhou 等^[6]研究发现, 阿托伐他汀可以通过减少线粒体融合蛋白 2 的表达来抑制心肌缺血大鼠心肌细胞的凋亡。Nam 等^[7]研究发现, 瑞舒伐他汀可以通过 smad 依赖性通路及 smad 非依赖性通路减少环孢素肾病模型大鼠肾脏细胞的凋亡, 抑制炎症, 减轻肾脏纤维化。Ishibashi 等^[8]研究表明, 普伐他汀可以通过减少晚期糖基化终末产物受体, 从而抑制近端肾小管细胞凋亡。Copaja 等^[9]研究发现, 辛伐他汀可以通过 Rho 依赖机制诱导心肌成纤维细胞凋亡。Lavi 等^[10]研究发现, 内皮祖细胞在高胆固醇猪的肾脏中可以凋亡, 但辛伐他汀可以减少高胆固醇血症引起的细胞凋亡, 从而减少肾脏损伤, 起到肾脏保护作用。Cormack-Aboud 等^[11]研究发现, 瑞舒伐他汀可以通过 P21 依赖性抗凋亡通路抑制足细胞凋亡, 从而减少足细胞损伤, 减少尿蛋白, 保护肾脏。Lin 等^[12]研究发现, 辛伐他汀可以通过调节 Wnt 信号通路抑制高糖诱导的系膜细胞凋亡。Bussolati 等^[13]研究表明, 他汀类药物可以减少氧化低密度脂蛋白诱导的细胞凋亡, 也可以减少肾小球足细胞膜裂空蛋白丢失, 其作用可能是通过 Akt 通路实现的。

本研究发现, 高糖作用于肾小球系膜细胞引起凋亡的同时, 可引起 caspase-3 活性增加, 表明高糖是通过活化 caspase 引起系膜细胞凋亡的, 而阿托伐他汀可以通过抑制 caspase 活化减少系膜细胞凋亡, 且随着阿托伐他汀浓度增加, 其抑制高糖诱导的系膜细胞凋亡作用逐渐加强。

综上所述, 本研究结果显示, 高糖引起 caspase-3 活化, 从而诱导大鼠系膜细胞凋亡, 而高糖的上述作用可以被阿托伐他汀所抑制, 且呈浓度依赖性。

参考文献

[1] Abboud HE. Mesangial cell biology[J]. Exp Cell Res, 2012, 318(9): 979-985.

[2] Danesh FR, Kanwar YS. Modulatory effects of HMG-CoA reductase Inhibitors in diabetic microangiopathy[J]. FASEB J, 2004, 18(7): 805-815.

[3] Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, et al. Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7[J]. J Clin Invest, 2001, 108(6): 807-816.

[4] Sugiyama H, Kashiwara N, Makino H, et al. Apoptosis in glomerular sclerosis[J]. Kidney Int, 1996, 49(1): 103-111.

[5] Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF heart protection study of ch-olesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomized placebo-controlled trial [J]. Lancet, 2002, 360(9326): 7-22.

[6] Zhou W, Chen L, Chen M. Atorvastatin inhibits cardiomyocyte apoptosis via down-regulation the expression mitofusin 2 after myocardial ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2014, 30(4): 388-390.

[7] Nam HK, Lee SJ, Kim MH, et al. Rosuvastatin attenuates inflammation, apoptosis and fibrosis in a rat model of Cyclosporine-Induced nephropathy[J]. Am J Nephrol, 2013, 37(1): 7-15.

[8] Ishibashi Y, Yamagishi S, Matsui T, et al. Pravastatin inhibits advanced glycation end products (AGEs)-induced proximal tubular cell apoptosis and injury by reducing receptor for AGEs (RAGE) level[J]. Metabolism, 2012, 61(8): 1067-1072.

[9] Copaja M, Venegas D, Aránguiz P, et al. Simvastatin Induces Apoptosis by a Rho-dependent mechanism in cultured cardiac fibroblasts and myofibroblasts[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2011, 255(1): 57-64.

[10] Lavi R, Zhu XY, Chade AR, et al. Simvastatin decreases endothelial progenitor cell apoptosis in the kidney of hypertensive hypercholesterolemic pigs [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(5): 976-983.

[11] Cormack-Aboud FC, Brinkkoetter PT, Pippin JW, et al. Rosuvastatin protects against podocyte apoptosis in vitro [J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(2): 404-412.

[12] Lin CL, Cheng H, Tung CW, et al. Simvastatin reverses high glucose-induced apoptosis of mesangial cells via modulation of Wnt signaling pathway[J]. Am J Nephrol, 2008, 28(2): 290-297.

[13] Bussolati B, Derogibus MC, Fonsato V, et al. Statins prevent oxidized LDL-induced injury of glomerular podocytes by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-signaling pathway[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(7): 1936-1947.