

氟伐他汀对糖尿病大鼠肾脏 p27^{kip1} 表达的影响

刘娟¹, 朱昆¹, 罗萍^{2*}

(1. 中国人民解放军第二零八医院 肾内科, 吉林 长春 130062; 2. 吉林大学第二医院, 吉林 长春 130041)

[摘要] 目的: 观察氟伐他汀(Flu)对糖尿病(DM)大鼠模型中肾脏 p27^{kip1}蛋白表达的影响, 探讨其对糖尿病肾脏组织保护作用的机制。方法: 将成年雄性 Wistar 大鼠随机分为 4 组, 正常对照组(C), 氟伐他汀对照组(CF), DM 模型组(DM), 氟伐他汀模型组(DMF); DM 组和 DMF 组大鼠一次性腹腔注射链脲霉素(STZ)制成糖尿病大鼠模型, C 组和 CF 组注射等量的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液; 模型成功后 CF 组、DMF 组即给予氟伐他汀灌胃, 其余 2 组大鼠给予等量蒸馏水灌胃; 实验 8 W 时检测血清中生化指标和 24 h 尿蛋白, 并计算肌酐清除率(Ccr)和肾脏肥大指数(KHI); 免疫组织化学技术及 Western blot 检测肾脏组织中 p27^{kip1}蛋白表达水平。结果: 实验 8 W 后, DM 组、DMF 组的血甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)、24 h 尿蛋白、KHI、Ccr 高于 C 组和 CF 组($P < 0.05$), DMF 组 24 h 尿蛋白、KHI、Ccr 低于 DM 组($P < 0.05$); 免疫组织化学技术半定量分析显示, DMF 组中 p27^{kip1}蛋白表达水平较 DM 组降低($P < 0.05$); Western blot 免疫印迹条带显示, DM、DMF 组 p27^{kip1}水平较 C、CF 组明显增高($P < 0.01$), DMF 组 p27^{kip1}相对表达量低于 DM 组($P < 0.05$)。结论: 氟伐他汀有非依赖降脂的肾脏保护作用, 其机制之一是通过调节细胞周期激酶抑制剂 p27^{kip1}表达而实现。

[关键词] 糖尿病, 实验性; 氟伐他汀; 细胞周期激酶抑制剂; p27^{kip1}; 大鼠, Wistar

[中图分类号] R363; R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2014)01-0070-04

Effect of Fluvastatin on p27^{kip1} in the Kidney Tissue of Rats with DM

LIU Juan¹, ZHU Kun¹, LUO Ping²

(1. Department of Nephrology, the 208th Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Changchun 130062, Jilin, China; 2. The 2nd Hospital of Jilin University, Changchun 130041, Jilin, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of fluvastatin on p27^{kip1} in the kidney tissue of rats with diabetes mellitus, to explore the mechanism of its protective effect on kidney tissue of rats with diabetes mellitus. **Methods:** Adult male Wistar rats were randomly divided into four groups, normal control group (group C), Flu-treated control group (group CF), DM model group (group DM) and Flu-treated DM group (group DMF). DM rat model was induced by STZ intraperitoneal injection. Once the models were successfully established, fluvastatin was given to group CF and DMF, then tested for bio-chemist index and quantity of 24 hour urinary protein, and then Ccr and KHI were calculated. The p27^{kip1} expressions were assessed by immunohistochemistry. The p27^{kip1} expression was detected by Western blot. **Results:** Semiquantitative analysis with immunohistochemistry technique showed that p27^{kip1} expressions in group DMF were decreased compared with group DM ($P < 0.05$). Western blot showed that p27^{kip1} expression in group DM and DMF was much higher than group C and CF ($P < 0.01$), and the relative p27^{kip1} expression of group DMF was lower than group DM ($P < 0.05$). **Conclusions:** The protection of fluvastatin to the kidney, through the effect of independent decreasing blood lipid, one of the effective mechanisms is adjusting the CKI p27^{kip1}, repressing the abnormal proliferation and hypertrophy of renal cells.

*通信作者 E-mail: luopingjen@msn.com

网络出版时间:2014-02-26 网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20140226.1518.055.html>

[Key words] diabetic mellitus, experimental; fluvastatin; cyclin dependent kinase inhibitor; p27^{kip1}; rats, Wistar

糖尿病肾病(diabetic mellitus, DN)的病理变化是早期出现肾脏固有细胞肥大,以后逐渐出现肾小球基底膜(GBM)增厚和肾小球系膜区为主的细胞外基质(ECM)进行性积聚。早期调节糖尿病肾脏细胞的生长状态,抑制其异常增生和肥大,会起到延缓DN发展的作用。近年来的研究表明,细胞生长的调节最终发生在细胞周期水平上^[1]。细胞周期调节蛋白控制细胞周期的运转,DN时细胞周期调节蛋白水平的改变可导致肾脏细胞肥大^[1]。p27^{kip1}通过抑制cyclin/CDK复合物活性而细胞周期停滞,使细胞发生肥大。目前他汀类药物抑制肾脏体积增大的作用机制尚不明确,其中一个机制可能是对细胞周期有调节作用。本实验旨在研究他汀类药物氟伐他汀对糖尿病大鼠肾脏组织中细胞周期激酶抑制剂p27^{kip1}表达的影响,在细胞周期水平上探讨氟伐他汀对糖尿病肾脏组织的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 模型建立及给药方式

成年雄性Wistar大鼠,体重为(200±20)g,随机分为4组:正常对照组(C,10只);氟伐他汀对照组(CF,10只);DM模型组(DM,13只);氟伐他汀模型组(DMF,14只)。DM组和DMF组大鼠一次性腹腔注射加(streptozotocin, STZ 美国 Sigma 公司, 55 mg/kg),C组和CF组注射等量的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液。48 h后经大鼠尾静脉采血测血糖,随机血糖高于16.7 mmol/L表示造模成功。模型建立后即每天给予CF组、DMF组大鼠氟伐他汀(fluvastatin, Flu,商品名来适可,诺华制药公司惠赠)2 mg/kg灌胃,C组和DM组大鼠给予等量蒸馏水灌胃。

1.2 检测项目

实验开始后每周称体重(BW),尾静脉采血,血糖仪测外周血血糖。在处死大鼠前准确收集24 h尿量。于8周时处死大鼠,心脏取血,-70℃保存,自动生化分析仪检测血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、血糖(BG)、肌酐(Scr)、甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)、24 h尿肌酐(Ucr)。考马斯亮蓝法测定24 h尿蛋白(UP)。并

计算肾脏肥大指数(KHI)=肾重(g)/BW(g)×10³,肌酐清除率(Ccr)=Ucr×尿量(V/min)×10³/(Scr×BW),单位mL/(min·kg)。

1.3 肾脏的病理学检测方法

大鼠处死后迅速取出左肾,称左肾重(KW),取肾组织,石蜡包埋,切2 μm厚片做普通肾脏病理学染色,行PAS、PAM染色。

1.4 免疫组织化学染色及Western blot检测p27^{kip1}表达

免疫组织化学染色观察p27^{kip1}的表达变化,采用盲法评估,阅片时不知道切片分组情况。每只大鼠随机选取5张病理切片,高倍镜下每张切片连续观察10个不重叠的肾皮质视野,根据p27^{kip1}的着色范围,进行半定量分析。采用Tanaka的标准判断方法评分^[2]。Western blot检测p27^{kip1}表达:取右肾皮质,保存于-70℃,提取蛋白质后进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行免疫印迹分析,用美国UVP公司LabWorks 4.5软件对Western条带进行定量分析,确定杂交条带的相对吸光度值(IOD),以p27^{kip1}的IOD与β-actin的IOD比值代表其蛋白的相对表达量。

1.5 统计学处理

计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS 12.0软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血脂、KHI、Ccr及UP检测结果

实验8周后,DM组、DMF组的血TG、TC高于C组和CF组($P < 0.01$),见表1。DM组和DMF组UP、KHI均明显高于C组和CF组($P < 0.05$),见表2,DMF组低于DM组($P < 0.05$)。DM组的Ccr高于C组和CF组($P < 0.01$),DMF组的Ccr高于C组和CF组($P < 0.05$),但DMF组较DM组Ccr有所降低($P < 0.05$),见表2。

2.2 肾脏病理学结果

DM组表现为肾小球体积增大,系膜细胞轻度增生,弥漫性的肾小球系膜区增宽,系膜基质弥漫增多,部分可见毛细血管基底膜增厚,还有部分毛细血管腔闭塞。肾小管上皮细胞肥大、出现空泡变

性。上述改变 DMF 组较 DM 组为轻, 系膜基质轻微增生, 系膜区增宽有所减轻。

表 1 实验 8 W 时各组肝功、血脂指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of liver function and blood lipid indexes among the 4 groups at the eighth week after treatment

组别	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)
C	10	64.29 ± 12.23	121.29 ± 48.50	0.62 ± 0.12	1.09 ± 0.10
CF	10	61.33 ± 8.08	106.67 ± 6.81	0.45 ± 0.19	1.26 ± 0.12
DM	13	96.15 ± 38.46	195.77 ± 116.12	1.98 ± 0.66 ⁽¹⁾	2.11 ± 0.16 ⁽¹⁾
DMF	14	89.29 ± 38.77	185.00 ± 132.79	1.65 ± 0.19 ⁽¹⁾	1.92 ± 0.20 ⁽¹⁾

⁽¹⁾与 C 和 CF 组比较, $P < 0.01$

表 2 实验 8 W 时各组肾功能指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of renal function indexes among the 4 groups at the eighth week after treatment

组别	n	UP(mg/24 h)	KHI	Scr(μmol/L)	Ccr(mL/(min · kg))
C	10	2.31 ± 0.89	3.41 ± 0.39	51.43 ± 4.35	1.66 ± 0.25
CF	10	2.42 ± 1.07	3.26 ± 0.24	49.00 ± 3.46	1.64 ± 0.21
DM	13	9.74 ± 1.87 ⁽¹⁾	5.18 ± 0.35 ⁽¹⁾	58.77 ± 5.85	2.25 ± 0.35 ⁽²⁾
DMF	14	7.31 ± 1.75 ⁽¹⁾⁽³⁾	4.70 ± 0.45 ⁽¹⁾⁽³⁾	54.14 ± 6.01	2.09 ± 0.28 ⁽¹⁾⁽³⁾

⁽¹⁾与 C 和 CF 组比较, $P < 0.05$, ⁽²⁾与 DM 组比较, $P < 0.05$

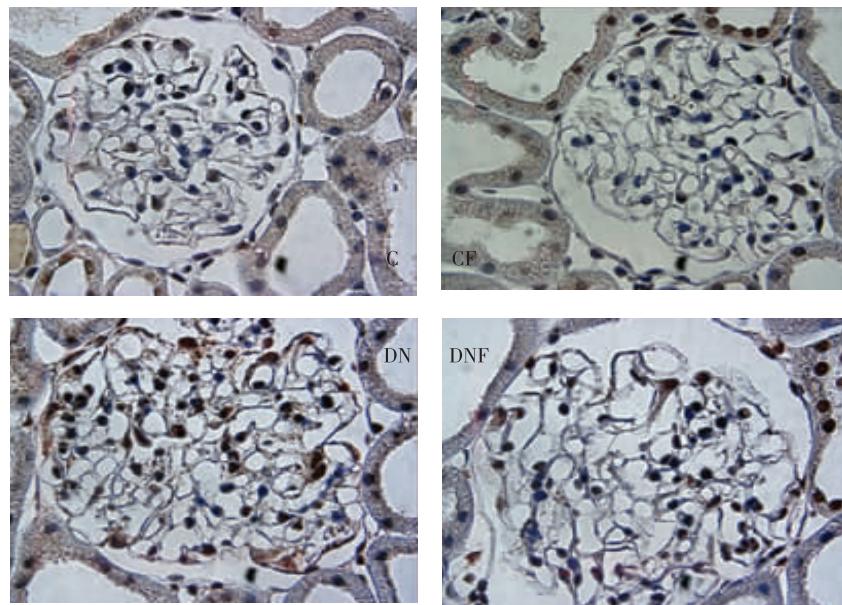
2.3 p27^{kip1} 的表达水平

免疫组织化学染色显示 DM 组大鼠肾脏固有细胞中的 p27^{kip1} 蛋白表达均高于 C 组、CF 组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 但 DMF 组中 p27^{kip1} 蛋白表达较 DM 组减少 ($P < 0.05$), 较 C 组、CF 组升高 ($P < 0.05$), 见表 3 及图 1。Western blot 显示, DM 组肾脏组织内 p27^{kip1} 水平明显增高 ($P < 0.01$), DMF 组 p27^{kip1} 相对表达量明显低于 DM 组 ($P < 0.05$), 见图 2。

表 3 各组大鼠肾皮质中 p27^{kip1} 的表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab. 3 Comparison of p27^{kip1} expression levels in renal cortex of rats in the 4 groups

组别	p27 ^{kip1}
C	1.03 ± 0.56
CF	1.10 ± 0.62
DM	2.63 ± 0.59 ⁽¹⁾
DMF	1.95 ± 0.86 ⁽¹⁾⁽²⁾

⁽¹⁾与 C 和 CF 组比较, $P < 0.01$; ⁽²⁾与 DM 组比较, $P < 0.05$

图 1 大鼠肾组织 p27^{kip1} 免疫组织化学染色 (SP, ×400)Fig. 1 Immunohistochemical stain showing p27^{kip1} expression in rat renal tissue of the 4 groups

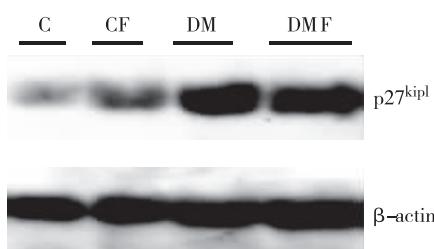


图2 肾组织中 p27^{kip1}蛋白的 Western blot 免疫印迹条带

Fig. 2 Western blot bands showing p27^{kip1} expression levels in rat renal tissues of the 4 groups

3 讨论

一次性腹腔注射 STZ 诱导糖尿病大鼠模型成功 8 W 后, 糖尿病大鼠均不同程度出现肾脏肥大, 伴蛋白尿和 Cr 升高, 病理显示肾小球体积增大, 系膜基质扩张, ECM 积聚, 表明模型动物组已进入 DN 的早期阶段。本实验在造模成功后 DMF 组即给予氟伐他汀 2 mg/kg 干预治疗, 8 W 后, UP 及 KHI 均较 DM 模型对照组下降, 而两组血脂水平差异并无统计学意义, 表明氟伐他汀具有非依赖降脂的肾脏保护作用。

近来研究发现, 他汀类药物不仅有依赖降血脂的肾脏保护作用, 而且还有抗细胞增殖、抗炎症、免疫调节等非依赖降血脂的肾脏保护作用^[3-4]。他汀类药物发挥其肾保护作用机制之一是通过对细胞周期蛋白的调节作用来调控肾脏固有细胞的肥大、增殖和凋亡等生物学过程^[5]。

氟伐他汀对早期 DN 肾脏固有细胞中的 p27^{kip1}表达的影响有两个方面, 一方面是使 p27^{kip1}表达减少。他汀类药物非依赖降脂的肾脏保护作用是通过调节信号转导系统影响细胞因子、生长因子的作用, 可能与调节细胞凋亡/增殖平衡, 炎症因子的产生以及信号转导等有关^[6]; 而细胞因子、生长因子生成减少使其诱导的 p27^{kip1}表达减少^[7-8]; 另一方面是 he汀类药物可以抑制 p27^{kip1}的降解。在细胞增殖过程中, p27^{kip1}在细胞周期 G₁/S 期转换过程中起着非常关键作用, 高水平的 p27^{kip1}表达可阻断细胞从 G₁ 期转换至 S 期, 使细胞周期停滞在 G₁ 期。p27^{kip1}的降解可使细胞周期从 G₁ 期进展到 S 期, 从而诱导细胞增殖。洛伐他汀可使 p27^{kip1}表达增加, 细胞周期因子 D1、E 表达受抑, 细胞 DNA 合成

减少, 使细胞周期停止于 G₁ 期, 发挥其抗增殖的作用, 进而减少细胞外基质的合成^[8]。所以他汀类药物影响细胞周期的作用, 部分是通过抑制 p27^{kip1}的降解完成的。故他汀类药物通过不同的途径, 既抑制 p27^{kip1}的表达, 又抑制 p27^{kip1}的降解。形象的说, 本实验中肾脏固有细胞中 p27^{kip1}生成的“源头”被“部分阻截”后, 即使 p27^{kip1}降解减少, “节流”的作用也显得力不从心。因此, 氟伐他汀治疗组的 p27^{kip1}表达升高的程度较 DM 对照组降低, 使肾脏固有细胞肥大的程度减轻, 进而减少 ECM 分泌, 从而发挥肾保护作用。

因此, 氟伐他汀具有非依赖降脂的肾脏保护作用, 机制之一是通过调节细胞周期负性调控蛋白 p27^{kip1}表达, 抑制肾脏细胞异常的增殖与肥大, 减少细胞外基质合成而实现的。早期干预肾脏细胞的细胞周期调控, 可以延缓早期糖尿病肾病的进展。

4 参考文献

- [1] Shankland SJ. Cell-cycle control and renal disease [J]. Kidney Int, 1997(2):294 – 308.
- [2] Tanaka R, Sugihara K. Internephron heterogeneity of growth factors and sclerosis-modulation of platelet-derived growth factor by angiotensin II [J]. Kidney Int, 1995 (1):131 – 139.
- [3] Amaud C, Mach F. Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis: role on endothelial function, inflammation and immunomodulation [J]. Arch Mal Coeur Vaiss, 2005 (6):661 – 666.
- [4] Agarwal R, Curley TM. The role of statins in chronic kidney diseases [J]. Am J Med Sci, 2005(2):69 – 81.
- [5] Wolf G, Shankland SJ. P27^{Kip1}: the “rosebud” of diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2003 (3):819 – 822.
- [6] Vincent TS, Wulfert E, Merler E. Inhibition of growth factors signaling pathways by lovastatin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1991(180):1284 – 1289.
- [7] Buemi M, Nostro L, Crasci E, et al. Statins in nephritic syndrome: a new weapon against tissue injury [J]. Med Res Rev, 2005(25):587 – 609.
- [8] Oda H, Kasiske BL, Donnell MP, et al. Effects of Lovastatin on expression of cell cycle regulatory protein in vascular smooth muscle cells [J]. Kidney Int, 1999 (Suppl 71):202 – 205.

(2013-10-26 收稿, 2013-11-26 修回)

中文编辑:周凌; 英文编辑: Walid Bin Hosain