

• 论著 •

氟伐他汀对高糖状态下肾小球系膜细胞 JAK/STAT 信号蛋白表达的影响

史永红 赵松 任福卓 刘青娟 段惠军

【摘要】 目的 观察氟伐他汀对体外培养的肾小球系膜细胞信号蛋白 Janus 酪氨酸激酶 2 (JAK2)、信号转导和转录活化因子 1 (STAT1)、STAT3 表达的影响。方法 体外培养大鼠肾小球系膜细胞, 分别给予高糖和氟伐他汀干预。采用免疫沉淀和蛋白质免疫印迹法 (Western blotting) 检测 JAK2 磷酸化表达; Western blotting 检测信号蛋白 JAK2、STAT1、p-STAT1、STAT3 和 p-STAT3 的表达; 半定量逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) mRNA 的表达; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定细胞上清液中 TGF- β 1 和纤维连接蛋白 (FN) 的含量。结果 与低糖组比较, 高糖组肾小球系膜细胞 p-JAK2 (802 ± 124 比 204 ± 31)、p-STAT1 ($2\ 856.6 \pm 337.8$ 比 617.7 ± 76.2) 和 p-STAT3 ($3\ 049.8 \pm 421.3$ 比 946.7 ± 141.2) 表达均明显增强; 上清液中 TGF- β 1 [$(2.87 \pm 0.34) \mu\text{g/L}$ 比 $(1.20 \pm 0.11) \mu\text{g/L}$] 和 FN [$(6.34 \pm 0.61) \text{mg/L}$ 比 $(3.24 \pm 0.26) \text{mg/L}$] 的含量均增高, TGF- β 1 mRNA 表达增加 (P 均 < 0.01)。与高糖组比较, 高糖+氟伐他汀组 p-JAK2 (412 ± 67)、p-STAT1 ($1\ 178.4 \pm 137.1$) 和 p-STAT3 ($1\ 572.6 \pm 181.2$) 表达均明显下调, TGF- β 1 [$(1.94 \pm 0.27) \mu\text{g/L}$] 和 FN [$(4.27 \pm 0.33) \text{mg/L}$] 含量减少, 同时 TGF- β 1 mRNA 表达降低 (P 均 < 0.05)。结论 高糖能激活肾小球系膜细胞 JAK/STAT 信号途径, 氟伐他汀抑制肾小球系膜细胞 TGF- β 1 和 FN 的分泌可能部分是通过影响 JAK/STAT 信号通路的激活而实现的。

【关键词】 糖尿病肾病; 氟伐他汀; 系膜细胞; 细胞外基质; Janus 酪氨酸激酶/信号转导和转录活化因子

Effects of fluvastatin on the expression of Janus kinase 2/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) in glomerular mesangial cells under high concentration of glucose SHI Yong-hong, ZHAO Song, REN Yun-zhuo, LIU Qing-juan, DUAN Hui-jun. Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China

Corresponding author: DUAN Hui-jun (Email: duanhj999@163.com)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of fluvastatin on activation of Janus kinase 2 (JAK2) and signal transducers and activators of transcription 1, 3 (STAT1, 3) in glomerular mesangial cells (GMCs) under high concentration of glucose. Methods Rat GMCs were cultured in vitro, and they were treated with glucose and fluvastatin respectively. Tyrosine phosphorylation of JAK2 (p-JAK2) expression was detected by immunoprecipitation and Western blotting analysis. The protein expressions of JAK2, STAT1, p-STAT1, STAT3 and p-STAT3 were assessed by Western blotting. The protein synthesis of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and fibronectin (FN) in the supernatants of the GMCs were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). TGF- β 1 mRNA was assessed by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). Results Compared with low glucose control group, the expressions of p-JAK2 (802 ± 124 vs. 204 ± 31), p-STAT1 ($2\ 856.6 \pm 337.8$ vs. 617.7 ± 76.2), p-STAT3 ($3\ 049.8 \pm 421.3$ vs. 946.7 ± 141.2) and TGF- β 1 mRNA were significantly up-regulated in GMCs under high glucose medium, and the concentration of TGF- β 1 in the supernatants [$(2.87 \pm 0.34) \mu\text{g/L}$ vs. $(1.20 \pm 0.11) \mu\text{g/L}$] and FN [$(6.34 \pm 0.61) \text{mg/L}$ vs. $(3.24 \pm 0.26) \text{mg/L}$, both $P < 0.01$] were higher in the supernatants. The expression levels of p-JAK2 (412 ± 67), p-STAT1 ($1\ 178.4 \pm 137.1$), p-STAT3 ($1\ 572.6 \pm 181.2$) and TGF- β 1 mRNA were significantly lower in fluvastatin group than those in high glucose group. The concentration of TGF- β 1 [$(1.94 \pm 0.27) \mu\text{g/L}$] and FN [$(4.27 \pm 0.33) \text{mg/L}$] in the supernatants in fluvastatin group were lower than those in high glucose control group (all $P < 0.05$). Conclusion Fluvastatin can inhibit overproduction of TGF- β 1 and FN in GMCs under high concentration of glucose, the underlying mechanism may partly be attributable to its influence on phosphorylation of JAK/STAT.

【Key words】 diabetic nephropathy; fluvastatin; mesangial cell; extracellular matrix; Janus kinase/signal transducers and activators of transcription

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目 (C2004000536)

作者单位: 050017 石家庄, 河北医科大学病理学教研室

通讯作者: 段惠军, Email: duanhj999@163.com

作者简介: 史永红 (1970-), 男 (汉族), 河北省人, 医学博士, 讲师, 曾获河北省科技进步二等奖, 发表论文 20 余篇。

Janus 酪氨酸激酶/信号转导和转录活化因子 (JAK/STAT) 介导的信号途径是细胞内信号转导过程的重要通道,能调节细胞的多种生物学效应^[1]。有报道高糖和血管紧张素 II (Ang II) 都能激活体外培养的肾小球系膜细胞 JAK/STAT 信号途径^[2]。在糖尿病大鼠,肾小球细胞中 JAK/STAT 信号途径也被激活,并且 Ang II 1 型受体拮抗剂氯沙坦能抑制 JAK2 和 STAT3 的磷酸化^[3]。研究表明,羟甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂具有抗炎及内皮细胞保护作用,而这些作用并不依赖其降脂作用^[4]。氟伐他汀能抑制 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞 JAK/STAT 信号途径激活^[5]。本研究中将观察氟伐他汀对高糖条件下肾小球系膜细胞 JAK2、STAT1 和 STAT3 的激活,以及对转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) mRNA 表达和 TGF- β 1、纤维连接蛋白 (FN) 分泌的影响,探讨氟伐他汀是否也能抑制高糖刺激引起的肾小球系膜细胞 JAK/STAT 信号途径激活。

1 材料与与方法

1.1 试剂: 氟伐他汀 (北京诺华制药有限公司); 特异性 JAK2 抑制剂 AG490 (美国 Calbiochem 公司); 小鼠抗磷酸化 STAT1 (p-STAT1, A-2) 单克隆抗体 (单抗)、小鼠抗 p-STAT3 (B-7) 单抗、兔抗 JAK2、STAT1、STAT3 多克隆抗体 (多抗)、小鼠抗 p-Try (PY99) 单抗和增强化学发光 (ECL) 试剂 (美国 Santa Cruz 公司); IV 型胶原酶 (美国 Sigma 公司); 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒 (美国 Promega 公司); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗小鼠或兔 IgG (进口分装)。

1.2 系膜细胞的分离培养和刺激实验: 选择体重 160 g 左右的雄性 Wistar 大鼠 (由河北省实验动物中心提供), 取部分肾脏组织, 剪碎皮质, 经不锈钢筛网, 收集 200 目以上的肾小球, 加入质量分数为 0.1% 的 IV 型胶原酶消化后离心收集肾小球, 加入 RPMI 1640 培养液, 于 CO₂ 孵箱中培养, 定时换液, 约 2~3 周时系膜细胞长满培养瓶底, 经鉴定为系膜细胞, 消化传代, 取第 4~10 代细胞用于实验研究。将系膜细胞分成 5 组: 低糖 (5.5 mmol/L 葡萄糖) 组; 高糖 (30.0 mmol/L 葡萄糖) 组; 低糖 + 甘露醇 (24.5 mmol/L) 组; 高糖 + AG490 (10 μ mol/L) 组; 高糖 + 氟伐他汀 (1 μ mol/L) 组。于刺激 48 h 收集细胞, 分别提取蛋白、RNA 及细胞上清液。

1.3 蛋白质免疫印迹法 (Western blotting) 检测 JAK2、STAT1、STAT3、p-STAT1、p-STAT3 表

达: 细胞用冷磷酸盐缓冲液 (PBS, 含 1 mmol/L 正钒酸钠) 洗涤, 加细胞裂解液, 冰浴离心, 用 Lowry 法测定上清液蛋白浓度。取细胞裂解蛋白 50 μ g, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后电转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 脱脂奶粉封膜, 加兔抗 JAK2、STAT1 和 STAT3 多抗 (1:200 稀释), 小鼠抗 p-STAT1 和 p-STAT3 单抗 (1:200 稀释), 过夜、洗膜后加 HRP 标记的羊抗小鼠或兔抗体 (1:5 000 稀释), 孵育、洗膜后加 ECL 试剂, 将 PVDF 膜压片、显影、定影。用美国 UVP 公司 LabWorks 4.5 分析系统软件对 Western 条带进行定量分析, 测定杂交条带的吸光度 (A) 值。

1.4 免疫沉淀和 Western blotting 检测 p-JAK2: 取系膜细胞裂解蛋白 400 μ g, 以葡萄球菌蛋白 A 琼脂糖预澄清处理, 加入 2 μ g 兔抗 JAK2 多抗沉淀靶抗原, 再用葡萄球菌蛋白 A 琼脂糖收集抗原-抗体复合物; 经变性处理的样品置于 SDS-PAGE; 凝胶分离的样品电转移至 PVDF 膜; 先后用鼠抗 p-JAK2 单抗、HRP 耦联的山羊抗小鼠二抗检测, ECL 法显示, 对条带进行定量分析, 测定 A 值。

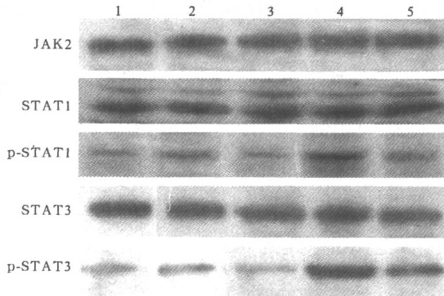
1.5 半定量 RT-PCR 检测 TGF- β 1 mRNA 表达: 一步法总 RNA 提取试剂 (TRIzol) 提取大鼠肾小球总 RNA, 用紫外-可见分光光度仪测定其纯度和含量。在莫洛尼鼠白血病病毒 (M-MLV) 逆转录酶催化下合成 cDNA, 以适量 cDNA 为模板在 TaqDNA 聚合酶催化下进行 PCR 扩增。TGF- β 1 上下游引物为: 5'-CCA TGA CAT GAA CCG ACC CT-3' 和 5'-CCG GGT TGT GTT GGT TGT AG-3', 扩增产物大小为 296 bp; 内参照三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 上下游引物为: 5'-TAT CGG ACG CCT GGT TAC-3' 和 5'-CTG TGC CGT TGA ACT TGC-3', 扩增产物大小为 140 bp。所用引物均由上海生工生物公司合成。TGF- β 1 扩增条件为: 预变性 94 $^{\circ}$ C 5 min, 进入循环, 94 $^{\circ}$ C 50 s, 58 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 8 min。将 PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳, 由凝胶图像分析系统扫描, 以管家基因 GAPDH 为内参照校正, 用目的基因与 GAPDH 的 A 值比值代表目的基因相对表达含量。

1.6 TGF- β 1 和 FN 检测: 细胞上清液中 TGF- β 1 和 FN 的含量采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 试剂盒检测, 操作按试剂盒说明书进行。

1.7 统计学处理: 采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计分析, 实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

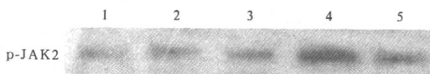
2.1 JAK2、STAT1、STAT3、p-STAT1、p-STAT3 表达(表 1,图 1):与低糖组比较,高糖组 p-STAT1、p-STAT3 表达明显增强(P 均 <0.01)。AG490 和氟伐他汀均能显著抑制高糖条件下 p-STAT1 和 p-STAT3 的水平(P 均 <0.05)。非磷酸化 JAK2、STAT1、STAT3 在各组的表达差异无统计学意义。



1~5 依次为低糖组、低糖+甘露醇组、高糖+AG490 组、高糖组、高糖+氟伐他汀组

图 1 Western blotting 检测各组大鼠肾小球系膜细胞 JAK2、STAT1、p-STAT1、STAT3 和 p-STAT3 的表达

2.2 p-JAK2 的表达(表 1;图 2):与低糖组比较,高糖组 p-JAK2 表达明显增强($P < 0.01$)。高糖+AG490 组和高糖+氟伐他汀组 p-JAK2 表达则明显受抑(P 均 <0.05)。低糖组和低糖+甘露醇组 p-JAK2 水平比较差异无统计学意义。

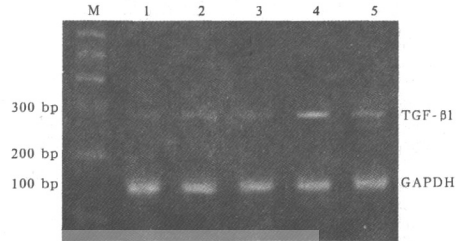


1~5 依次为低糖组、低糖+甘露醇组、高糖+AG490 组、高糖组、高糖+氟伐他汀组

图 2 免疫沉淀和 Western blotting 检测各组大鼠肾小球系膜细胞 p-JAK2 的表达

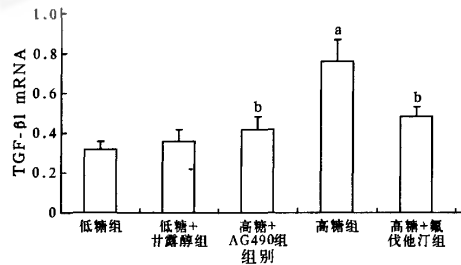
2.3 TGF- β 1 mRNA 表达(图 3,图 4):低糖组和低糖+甘露醇组 TGF- β 1 mRNA 均有少量表达。高糖组 TGF- β 1 mRNA 表达较低糖组明显增强($P <$

0.01)。AG490 和氟伐他汀都能明显降低高糖培养系膜细胞 TGF- β 1 mRNA 的表达(P 均 <0.05)。



M;DNA Marker;1~5 依次为低糖组、低糖+甘露醇组、高糖+AG490 组、高糖组、高糖+氟伐他汀组

图 3 半定量 RT-PCR 检测各组大鼠肾小球系膜细胞 TGF- β 1 mRNA 的表达



注:与低糖组比较, $^a P < 0.01$;与高糖组比较, $^b P < 0.05$

图 4 各组大鼠系膜细胞 TGF- β 1 mRNA 表达的比较

2.4 TGF- β 1 和 FN 含量(表 2):与低糖组比较,高糖组上清液中 TGF- β 1 和 FN 的含量均明显增加(P 均 <0.01);高糖+AG490 组和高糖+氟伐他汀组 TGF- β 1 和 FN 含量较高糖组降低(P 均 <0.05)。

表 2 各组大鼠肾小球系膜细胞培养上清液中 TGF- β 1 和 FN 的含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	TGF- β 1(μ g/L)	FN(mg/L)
低糖组	6	1.20 \pm 0.11	3.24 \pm 0.26
低糖+甘露醇组	6	1.29 \pm 0.21	3.54 \pm 0.29
高糖+AG490 组	6	1.72 \pm 0.29 ^b	4.01 \pm 0.51 ^b
高糖组	6	2.87 \pm 0.34 ^a	6.34 \pm 0.61 ^a
高糖+氟伐他汀组	6	1.94 \pm 0.27 ^b	4.27 \pm 0.33 ^b

注:与低糖组比较, $^a P < 0.01$;与高糖组比较, $^b P < 0.05$

表 1 各组大鼠肾小球系膜细胞 JAK2、p-JAK2、STAT1、p-STAT1、STAT3 和 p-STAT3 的表达比较($\bar{x} \pm s$) A 值

组别	样本数	JAK2	p-JAK2	STAT1	p-STAT1	STAT3	p-STAT3
低糖组	6	4 168 \pm 841	204 \pm 31	4 278.3 \pm 224.0	617.7 \pm 76.2	1 239.4 \pm 124.6	946.7 \pm 141.2
低糖+甘露醇组	6	3 957 \pm 753	234 \pm 39	4 316.5 \pm 410.3	690.7 \pm 113.1	2 986.7 \pm 367.4	1 121.2 \pm 167.9
高糖+AG490 组	6	4 137 \pm 562	220 \pm 34 ^b	4 069.0 \pm 362.7	1 239.4 \pm 124.6 ^b	2 893.7 \pm 342.8	1 191.6 \pm 231.5 ^b
高糖组	6	4 251 \pm 812	802 \pm 124 ^a	4 523.8 \pm 369.5	2 856.6 \pm 337.8 ^a	3 206.7 \pm 403.8	3 049.8 \pm 421.3 ^a
高糖+氟伐他汀组	6	4 018 \pm 627	412 \pm 67 ^b	4 379.0 \pm 329.8	1 178.4 \pm 137.1 ^b	3 143.9 \pm 312.6	1 572.6 \pm 181.2 ^b

注:与低糖组比较, $^a P < 0.01$;与高糖组比较, $^b P < 0.05$

3 讨论

在糖尿病肾病的发病机制中,多种因素综合作用能使肾脏细胞内信号转导通路发生变化。有研究表明,高糖刺激能使多种肾脏细胞出现肥大、细胞增殖和细胞外基质(ECM)过量沉积等糖尿病肾病特征性形态学改变,而高糖状态下系膜细胞功能改变在进行性糖尿病肾病发病过程中发挥重要作用^[6]。JAK/STAT 信号的激活可能是高糖造成肾小球损伤的机制之一^[7]。JAK 激酶是一种潜在的细胞转录因子,能够激活 STAT 蛋白。活化的 STAT 蛋白能够形成同源性或异源性二聚体,转移至细胞核内,从而调节包括与细胞增殖有关基因在内的多种基因表达^[8]。此信号途径的活化能引起细胞应激、生长、增殖、分化、凋亡等多种生物学效应^[9]。本研究结果显示,高浓度葡萄糖能激活肾小球系膜细胞 JAK2、STAT1 和 STAT3,且 AG490 能显著抑制 JAK2、STAT1 和 STAT3 磷酸化,与文献^[7]报道的研究结果一致。这更进一步说明 JAK/STAT 信号途径可能在糖尿病肾病发病过程中发挥重要作用。

高血糖诱导的 TGF- β 1 和 ECM 蛋白增多是糖尿病肾病的发病机制之一。本研究表明,高糖培养的肾小球系膜细胞分泌 TGF- β 1 和 FN 显著增多,TGF- β 1 mRNA 表达明显上调。AG490 能明显抑制 TGF- β 1 mRNA 表达以及 TGF- β 1 和 FN 的分泌。提示阻断 JAK/STAT 信号能抑制高糖诱导的系膜细胞 TGF- β 1 和 FN 的合成。

HMG-CoA 还原酶抑制剂是降脂药物。他汀类药物对心血管的保护作用传统上归于其降胆固醇作用,但近年来其调脂功能备受关注。研究表明,他汀类药物具有明显的非调脂作用,能有效预防临床事件的发生^[10-11];其对进行性肾脏疾病有明显改善作用,这种作用是依赖其降脂作用和(或)非降脂作用^[12]。在高血压糖尿病肾病模型中,辛伐他汀能通过抑制肾小球超滤过、系膜扩增及电荷屏障破坏等非降脂作用减少蛋白尿^[13]。对 IgA 肾病患者,氟伐他汀是一种有效降低蛋白尿的药物^[14],他汀类药物能影响与进行性肾脏损伤有关的炎症和纤维化反应的细胞内信号途径^[15];可通过抑制巨噬细胞浸润、黏附分子表达,以及核转录因子- κ B (NF- κ B)和激活蛋白-1(AP-1)等 NF 激活,减少肾脏损伤,此作用不依赖于降压或降脂^[16]。本研究结果表明,氟伐他汀能抑制高糖条件下肾小球系膜细胞 JAK/STAT 信号途径激活以及 TGF- β 1 和 FN 的分泌,同时下调 TGF- β 1 mRNA 表达。提示,HMG-CoA 还原酶抑制

剂氟伐他汀的肾脏保护作用可能部分是通过抑制 JAK/STAT 信号通路活化实现的。

参考文献

- [1] Aaronson D S, Horvath C M. A road map for those who don't know JAK-STAT[J]. *Science*, 2002, 296(5573):1653-1655.
- [2] Amiri F, Shaw S, Wang X, et al. Angiotensin II activation of the JAK/STAT pathway in mesangial cells is altered by high glucose[J]. *Kidney Int*, 2002, 61(5):1605-1616.
- [3] 史永红,段惠军,何宁,等. 氟沙坦对糖尿病大鼠肾小球信号蛋白 JAK2 和 STAT3 表达的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(11):662-666.
- [4] Oda H, Keane W F. Recent advances in statins and the kidney[J]. *Kidney Int Suppl*, 1999, 71:S2-5.
- [5] Horiuchi M, Cui T X, Li Z, et al. Fluvastatin enhances the inhibitory effects of a selective angiotensin II type 1 receptor blocker, vasartan, on vascular neointimal formation [J]. *Circulation*, 2003, 107(1):106-112.
- [6] Haneda M, Koya D, Kikkawa R. Mesangial cell dysfunction as a pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Contrib Nephrol*, 2001(134):16-29.
- [7] Wang X, Shaw S, Amiri F, et al. Inhibition of the Jak/STAT signaling pathway prevents the high glucose-induced increase in tgf-beta and fibronectin synthesis in mesangial cells[J]. *Diabetes*, 2002, 51(12):3505-3509.
- [8] Darnell J E, Kerr I M, Stark G R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to INFs and other extracellular signaling proteins[J]. *Science*, 1994, 264(5164):1415-1421.
- [9] 姚胜,姚咏明,梁华平. 脓毒症时 JAK/STAT 通路的活化及意义[J]. *中国危重病急救医学*, 2001, 13(9):559-562.
- [10] 郭汉林,靳建旭,李朝阳,等. 阿托伐他汀对老年血脂异常的调脂及非调脂作用[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2005, 12(1):51-53.
- [11] 罗治华,蒋三员,钟妙文,等. 脂脉舒结合辛伐他汀治疗高脂血症的实验研究[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2004, 11(2):107-109.
- [12] Shah S, Paparello J, Danesh F R. Effects of statin therapy on the progression of chronic kidney disease [J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2005, 12(2):187-195.
- [13] Ota T, Takamura T, Ando H, et al. Preventive effect of cerivastatin on diabetic nephropathy through suppression of glomerular macrophage recruitment in a rat model [J]. *Diabetologia*, 2003, 46(6):843-851.
- [14] Buemi M, Allegra A, Corica F, et al. Effect of fluvastatin on proteinuria in patients with immunoglobulin A nephropathy [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2000, 67(4):427-431.
- [15] Wassmann S, Laufs U, Bäumer A T, et al. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normocholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species [J]. *Hypertension*, 2001, 37(6):1450-1457.
- [16] Park J K, Müller D N, Mervaala E M, et al. Cerivastatin prevents angiotensin II-induced renal injury independent of blood pressure-and cholesterol-lowering effects [J]. *Kidney Int*, 2000, 58(4):1420-1430.

(收稿日期:2007-11-30 修回日期:2008-04-28)

(本文编辑:李银平)