

· 短篇论著 ·

洛伐他汀对多囊肾囊肿衬里上皮细胞增殖和细胞外基质分泌的影响

Effect of lovastatin on proliferation and extracellular matrix secretion in cyst-lining epithelial cells of autosomal dominant polycystic kidney disease

袁志忠¹, 徐成钢¹, 高春芳², 梅长林¹

(1. 第二军医大学长征医院肾内科, 解放军肾脏病中心, 上海 200003; 2. 长征医院实验诊断科)

[摘要] **目的:**观察洛伐他汀对人常染色体显性遗传性多囊肾(ADPKD)囊肿衬里上皮细胞增殖和细胞外基质(ECM)分泌的影响。**方法:**用不同浓度的洛伐他汀和香叶基香叶基焦磷酸(GGPP)处理培养的ADPKD囊肿衬里上皮细胞,24或48 h后,MTT法检测细胞增殖,ELISA法检测I型胶原、III型前胶原和IV型胶原。**结果:**ADPKD囊肿衬里上皮细胞分别经1,5,10,20,50 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀处理24或48 h后,细胞增殖、I型胶原和IV型胶原分泌受到明显抑制,呈剂量依赖性关系。GGPP能明显逆转洛伐他汀对ADPKD囊肿衬里上皮细胞增殖和ECM分泌的抑制作用。但洛伐他汀对III型前胶原分泌无明显影响。**结论:**洛伐他汀可能通过阻断甲羟戊酸途径,抑制ADPKD囊肿衬里上皮细胞增殖、I型和IV型胶原等细胞外基质的表达,从而延缓多囊肾病的发生与发展。

[关键词] 洛伐他汀;多囊肾;常染色体显性;上皮细胞;细胞增殖;细胞外基质

[中图分类号] R 692 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2006)01-0111-02

肾囊肿的形成和间质纤维化是人常染色体显性遗传性多囊肾病(ADPKD)最重要的病理特征之一,随着囊肿数量、大小及肾间质纤维化程度进行性增加,最终可导致终末期肾功能衰竭。囊肿的形成过程包括囊肿衬里上皮细胞增殖、囊液积聚和ECM改变^[1]。HMG-CoA还原酶抑制剂(HCRI)是目前临床上应用最广泛的一类降脂药,动物和临床研究表明,HCRI能延缓包括多囊肾病在内的慢性肾病的进展,该类药物不仅具有明确的降脂作用,而且还具有抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、抗炎、减少细胞外基质积聚等多种非降脂作用^[2]。

本研究观察洛伐他汀(lovastatin)体外对人ADPKD肾囊肿衬里上皮细胞增殖、ECM分泌的影响,探讨洛伐他汀对ADPKD潜在的治疗作用及其机制,为临床合理、有效的选择药物提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 人ADPKD肾囊肿衬里上皮细胞株由本科实验室自建^[3],洛伐他汀为LKT Laboratories, Inc产品,香叶基香叶基焦磷酸(GGPP)为Sigma产品,RPMI 1640培养基为Gibco产品,I型胶原Col I及III型前胶原(P III NP)ELISA法测定试剂盒购自Orion Diagnostica公司,IV型胶原ELISA法测定试剂盒购自中科院细胞所。洛伐他汀溶液按照国外文献报道预先将洛伐他汀水解成活性成分^[4]。称取洛伐他汀粉末90 mg,加1.81 ml无水乙醇,在55℃下溶解,再加入0.6 mol/L NaOH 0.9 ml,室温下30 min,用1 mol/L HCl将pH调至8.0,无菌水定容至22.5 ml,洛伐他汀终浓度为4 mg/ml,分装,-20℃保存。使用时用含2%胎牛血清RPMI 1640培养液配制成终浓度为1、5、10、20、50 $\mu\text{mol/L}$ 的应用液。

1.2 MTT法检测细胞增殖 取对数生长期的ADPKD囊

肿衬里上皮细胞接种于96孔板(1×10^4 /孔),在37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养24 h后,换含无血清RPMI 1640培养液培养24 h,使细胞静止于G₁期。弃上清,换用含不同浓度洛伐他汀1,5,10,15,20,50 $\mu\text{mol/L}$ 或洛伐他汀(20 $\mu\text{mol/L}$)+GGPP(5,10 $\mu\text{mol/L}$)的应用液100 μl /孔,同时设置用无药溶剂处理的空白对照组,每组设8复孔,在37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养24和48 h。于刺激结束前4 h,加入10 μl /孔的MTT溶液(5 g/L),用酶标仪在550 nm波长下测定各孔的光密度值,参考波长为690 nm。

1.3 I型、IV型胶原和III型前胶原含量的测定 应用ELISA方法检测不同浓度洛伐他汀1,10,50 $\mu\text{mol/L}$ 或洛伐他汀(50 $\mu\text{mol/L}$)+GGPP(10 $\mu\text{mol/L}$)作用48 h后细胞上清液中I型、IV型胶原和III型前胶原含量。

1.4 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行t检验。

2 结果

2.1 ADPKD囊肿衬里上皮细胞增殖的MTT检测结果 在所用浓度范围内,ADPKD囊肿衬里上皮细胞经锥虫蓝染色活细胞达95%以上,但细胞增殖受到明显抑制,并随洛伐他汀浓度增加,ADPKD囊肿衬里上皮细胞增殖水平逐渐减少,呈剂量依赖性关系。GGPP能明显逆转洛伐他汀对ADPKD囊肿衬里上皮细胞增殖的抑制作用(表1)。

2.2 ADPKD囊肿衬里上皮细胞I型、IV型胶原和III型前胶原含量的测定 在所用浓度范围内(1~50 $\mu\text{mol/L}$),洛伐他汀能明显抑制ADPKD囊肿衬里上皮细胞IV型胶原的分泌,并呈剂量依赖性关系。在低浓度时,洛伐他汀对I型胶原的分泌无抑制作用,但在较高浓度(≥ 10 $\mu\text{mol/L}$)时,对I型胶

[作者简介] 袁志忠,博士,主治医师。

E-mail: xx911280@sohu.com

原分泌也有显著的抑制作用。GGPP可一定程度上逆转洛伐他汀对ADPKD囊肿衬里上皮细胞I型和IV型胶原分泌

的抑制作用。洛伐他汀对III型前胶原分泌无任何影响(表2)。

表1 各组ADPKD囊肿衬里上皮细胞增殖MTT检测结果

(n=8, $\bar{x} \pm s$)

时间 (t/h)	洛伐他汀组($c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)					洛伐他汀($20 \mu\text{mol/L}$) + GGPP组 ($c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)		空白组
	1	5	10	20	50	5	10	
24	0.56 ± 0.09 [△]	0.52 ± 0.12 [△]	0.47 ± 0.07 ^{△△}	0.42 ± 0.05 ^{△△}	0.36 ± 0.06 ^{△△}	0.55 ± 0.05 ^{**}	0.65 ± 0.08 ^{**}	0.67 ± 0.11
48	0.91 ± 0.11 ^{△△}	0.74 ± 0.06 ^{△△}	0.67 ± 0.08 ^{△△}	0.59 ± 0.05 ^{△△}	0.51 ± 0.05 ^{△△}	0.86 ± 0.07 ^{**}	1.03 ± 0.08 ^{**}	1.24 ± 0.17

△P<0.05, △△P<0.01 与空白组比较; * P<0.05, ** P<0.01 与 20 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀组比较

表2 各组ADPKD囊肿衬里上皮细胞I型、IV型胶原和III型前胶原含量的测定结果

(n=8, $\bar{x} \pm s$)

各型胶原	洛伐他汀组($c_B/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)			洛伐他汀($50 \mu\text{mol/L}$) + GGPP($10 \mu\text{mol/L}$)组	空白组
	1	10	50		
Col I	8.73 ± 0.87	6.37 ± 0.66 ^{△△}	5.45 ± 0.22 ^{△△}	7.58 ± 0.53 ^{**}	8.56 ± 0.74
Col IV	11.72 ± 0.83 ^{△△}	8.84 ± 0.67 ^{△△}	7.38 ± 0.75 ^{△△}	10.36 ± 1.14 ^{**}	14.90 ± 1.22
P III NP	18.32 ± 3.75	16.64 ± 4.42	16.82 ± 2.07	17.33 ± 4.54	17.24 ± 4.93

△△P<0.01 与空白组比较; ** P<0.01 与 50 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀组比较

3 讨论

在多囊肾病的发生中,PKD基因突变导致囊肿衬里上皮细胞增殖和细胞外基质分泌异常是肾囊肿发生和增大的主要原因。细胞增殖异常表现为增殖细胞核抗原表达增加,细胞数量增多,细胞形态较正常肥大,早期基因如c-myc、c-fos表达增加。Candiano等^[5]发现ADPKD囊肿衬里上皮细胞合成III型、IV型胶原以及其他未知类型胶原等ECM增多。生长在含I型胶原培养基中的MDCK细胞形成囊肿,表明ECM调节细胞黏附、生长和分化,参与囊肿的发生和增大。洛伐他汀是细胞内胆固醇合成限速酶即HMG-CoA还原酶的抑制剂。近年来的研究表明,洛伐他汀可以通过减少如甲羟戊酸、法呢基焦磷酸(FPP)、GGPP等非甾醇异戊二烯化产物的合成,抑制多种蛋白质的异戊二烯化,进而抑制多种蛋白质的功能,阻断某些信号转导途径。

本实验结果发现洛伐他汀能呈剂量依赖性地抑制人ADPKD囊肿衬里上皮细胞增殖、I型和IV型胶原的合成,提示洛伐他汀对延缓ADPKD囊肿的发生、发展和改善间质纤维化可能具有一定的临床意义和应用前景;GGPP一定程度

上能阻断洛伐他汀的上述作用,提示洛伐他汀的上述作用可能与其抑制GGPP的合成有关,更深入的作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Grantham JJ. Polycystic kidney disease: hereditary and acquired [J]. *Adv Int Med*, 1993, 38: 409-420.
- [2] 袁志忠,梅长林,宋维. 他汀类降脂药与肾脏病[J]. *全科医学临床与教育*, 2004, 2: 44-48.
- [3] 徐成钢,梅长林. 多囊肾病囊肿衬里上皮细胞细胞系的建立与鉴定[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2000, 9: 142-145.
- [4] Kita T, Brown MS, Goldstein JL. Feedback regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in liver of mice treated with mevinoлин, a competitive inhibition of the reductase [J]. *J Clin Invest*, 1980, 66: 1094-1100.
- [5] Candiano G, Gusmano R, Altieri P, et al. Extracellular matrix formation by epithelial cells from human polycystic kidney cysts in culture [J]. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1992, 63: 1-9.

[收稿日期] 2005-07-20

[修回日期] 2005-10-13

[本文编辑] 贾泽军