

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01038

洛伐他汀对多囊肾囊肿衬里上皮细胞 $\alpha 1$ (I) 胶原启动子活性的影响

Effect of lovastatin on $\alpha 1$ (I) collagen promotor activity in cyst-lining epithelial cells of autosomal dominant polycystic kidney disease

袁志忠¹, 徐成钢^{2*}, 梅长林², 高春芳³

1. 第二军医大学长征医院贵宾科, 上海 200003

2. 第二军医大学长征医院肾内科, 上海 200003

3. 第二军医大学东方肝胆外科医院实验诊断科, 上海 200438

[摘要] **目的** 观察洛伐他汀对人常染色体显性遗传性多囊肾病(ADPKD)囊肿衬里上皮细胞 COL I $\alpha 1$ 基因启动子活性的影响。**方法** 用 FuGENE 转染法将 pCOLH0.27 或 pCOLH2.5 重组体瞬时转染至 ADPKD 囊肿衬里上皮细胞, 用不同浓度的洛伐他汀和香叶基香叶基焦磷酸(GGPP)处理转染细胞, 24 h 后, 用 ELISA 法测定细胞报告基因 CAT 表达量。以未加入药物孔的 CAT 值为 1, 计算出实验孔 CAT 的相对表达量。**结果** 瞬时转染 pCOLH0.27 或 pCOLH2.5 的 ADPKD 囊肿衬里上皮细胞, 经 10 或 50 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀处理 24 h 后, pCOLH0.27 与 pCOLH2.5 的活性均受明显抑制。10 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀使 pCOLH0.27 与 pCOLH2.5 活性分别下降 22% 和 26% ($P < 0.05$), 50 $\mu\text{mol/L}$ 洛伐他汀使 pCOLH0.27 与 pCOLH2.5 活性分别下降 37% 和 39% ($P < 0.01$)。洛伐他汀对 pCOLH0.27 与 pCOLH2.5 活性的抑制水平相近。GGPP 可逆转这一作用 ($P < 0.01$)。**结论** 洛伐他汀对 ADPKD 囊肿衬里上皮细胞 COL I $\alpha 1$ 基因启动子活性有明显抑制作用。洛伐他汀的这一作用可能与其抑制 GGPP 产生, 从而阻断促纤维化细胞因子信号转导有关。

[关键词] 洛伐他汀; 常染色体显性多囊肾; 上皮细胞; 胶原 I 型; 启动子**[中图分类号]** R 692.12**[文献标志码]** B**[文章编号]** 0258-879X(2011)09-1038-02

I 型胶原(COL I)是器官纤维化时产生的各型胶原蛋白中的主要成分。在常染色体显性遗传性多囊肾病(ADPKD)进展中, 它的过度积聚可导致肾小球硬化、肾小管基底膜增厚和间质纤维化的发生和发展。COL I 基因表达的调控主要在转录水平^[1]。研究证实 HMG-CoA 还原酶抑制剂(HCRI)能抑制 COL I 等多种细胞外基质(ECM)成分的合成^[2]。我们前期研究发现洛伐他汀可减少 ADPKD 囊肿衬里上皮细胞 COL I 和 COL IV 的分泌^[3]。但这一作用是否通过对基因启动子活性的调控而发挥作用, 目前尚不清楚。为此, 我们观察了洛伐他汀对 ADPKD 囊肿衬里上皮细胞 COL I $\alpha 1$ 基因启动子活性的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞 人 ADPKD 肾囊肿衬里上皮细胞株由本院肾内科实验室自建^[4]。

1.2 主要试剂和仪器 人 COL I $\alpha 1$ 启动子重组体 pCOLH0.27 与 pCOLH2.5 由本院实验诊断科提供, 均含 SV40 增强子、CAT 报告基因及 COL I $\alpha 1$ 启动子片段, 经酶切鉴定, 证实重组体 pCOLH0.27、pCOLH2.5 分别相应于人 COL I $\alpha 1$ 基因上游 -268 ~ +42 bp、-2 483 ~ +42 bp 序列, 报告基因测活显示两者均具有很强的启动表达活性^[5]。

洛伐他汀为 LKT Laboratories, Inc 产品, 香叶基香叶基

焦磷酸(GGPP)为 Sigma 公司产品, FuGENE 转染试剂、裂解缓冲液、CAT ELISA 检测试剂盒为 Roche 公司产品, β -gal 质粒、 β -gal assay 2 \times buffer 为 Promega 公司产品, CAT 表达阳性质粒为 Invitrogen 公司产品, Du-600 型紫外分光光度计为 Beckman 公司产品, 128 型酶标仪为 ClinBio 公司产品。

洛伐他汀溶液按照文献报道预先将洛伐他汀水解成活性成分^[6]。称取洛伐他汀粉末 90 mg, 加 1.81 ml 无水乙醇, 在 55 $^{\circ}\text{C}$ 下溶解, 再加入 0.6 mol/L 氢氧化钠 0.9 ml, 室温下放置 30 min, 用 1 mol/L 盐酸将 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 $^{\circ}\text{C}$ 保存。使用时用含 2% 胎牛血清 RPMI1640 培养液配制终浓度为 10、50 $\mu\text{mol/L}$ 的应用液。

1.3 细胞转染 pCOLH0.27 和 pCOLH2.5 质粒 传代培养的 ADPKD 囊肿衬里上皮细胞经消化后, 以 3×10^5 /孔接种于 6 孔板。细胞培养至 60% ~ 80% 融合后, 用 FuGENE 转染试剂转染 pCOLH0.27 和 pCOLH2.5 质粒各 2 μg , 同时转染 β -gal 1 μg 作为内对照, CAT 表达阳性质粒作为阳性对照。转染 24 h 后, 吸弃培养液, 换含洛伐他汀 10、50 $\mu\text{mol/L}$ 或洛伐他汀 50 $\mu\text{mol/L}$ + GGPP 20 $\mu\text{mol/L}$ 的应用液, 继续培养 24 h, 测定报告基因 CAT 的活性。

1.4 蛋白定量 终止培养的细胞用预冷的 PBS 洗 3 遍后用裂解缓冲液裂解细胞, 在紫外分光光度计上测定蛋白含量。

[收稿日期] 2011-06-23**[接受日期]** 2011-09-01**[作者简介]** 袁志忠, 博士, 副主任医师。E-mail: yuanzz29@yahoo.cn

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885394, E-mail: xx911280@sohu.com

1.5 β -gal 活性测定 100 μ l 细胞裂解液加入 100 μ l β -gal assay 2 \times buffer 混匀,置 37 $^{\circ}$ C 12 h 后加入 1 mol/L 碳酸钠混匀,酶标仪 420 nm 处测光密度。

1.6 CAT 活性测定 采用 ELISA 法,按照试剂盒说明书操作。200 μ l 细胞裂解液加入已包被抗体的 96 孔板,经第一抗体、第二抗体作用后,加入底物显色,酶标仪 405 nm~492 nm 测定光密度值。

1.7 统计学处理 所有测得 CAT 值用 β -gal 值与蛋白浓度校正,实验重复 4 次,采用 4 次的均值计算各重组体的相对活性。以未加入药物孔的 CAT 值为 1,实验孔与之比值作为实验孔 CAT 的相对表达量。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 t 检验进行统计学分析,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

洛伐他汀对 ADPKD 囊肿衬里上皮细胞 pCOLH0.27 与 pCOLH2.5 的活性均有抑制作用,随洛伐他汀剂量增加,抑制作用也增强,呈剂量依赖关系。10 μ mol/L 洛伐他汀使 pCOLH0.27 与 pCOLH2.5 活性分别下降 22% 和 26% ($P < 0.05$),50 μ mol/L 洛伐他汀使 pCOLH0.27 与 pCOLH2.5 活性分别下降 37% 和 39% ($P < 0.01$)。同浓度洛伐他汀对 pCOLH0.27 与 pCOLH2.5 活性的抑制水平相近。GGPP 有逆转作用 ($P < 0.01$),见表 1。

表 1 各组 ADPKD 囊肿衬里上皮细胞 pCOLH0.27 与 pCOLH2.5 的活性

| 组别 | (n=4, $\bar{x} \pm s$) | |
|--|--------------------------------|--------------------------------|
| | pCOLH0.27 | pCOLH2.5 |
| 对照 | 1.0 | 1.0 |
| 洛伐他汀 $c_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ | | |
| 10 | 0.78 \pm 0.04* | 0.74 \pm 0.05* |
| 50 | 0.63 \pm 0.05** | 0.61 \pm 0.09** |
| 洛伐他汀(50 μ mol/L) +GGPP(20 μ mol/L) | 0.87 \pm 0.07 $\Delta\Delta$ | 0.88 \pm 0.11 $\Delta\Delta$ |

ADPKD: 常染色体显性遗传性多囊肾病;GGPP: 香叶基香叶基焦磷酸。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与对照组比较; $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 与 50 μ mol/L 洛伐他汀组比较

3 讨论

COL I 由两条 $\alpha 1(I)$ 链与一条 $\alpha 2(I)$ 链组成。COL I 的生物合成在转录水平和转录后水平受多种因素影响,这些因素包括细胞因子如 TGF β 、IFN γ , 化学物质如 CCl $_4$ 、乙醛等。COL I 等 ECM 基因如何在纤维化相关病理条件下激活转录尚不清楚。目前已发现在 ECM 基因特别是 COL I 基因上游存在重要的转录调控序列,这些转录调控序列(顺式调控元件)与核蛋白转录因子(反式作用因子)的相互作用是病理条件下这些基因激活转录的关键始动因素。Zf-9、SP-1、NF- κ B、AP-1、NF- κ B 等转录因子与 COL I 转录调控密切相关^[7-9]。

细胞因子对胶原蛋白基因的激活途径包括与细胞膜上的受体结合,通过信号转导系统,激活核因子与胶原基因启

动子上的顺式作用元件结合,启动胶原 mRNA 的合成。启动子的激活是信号转导途径的最后一站。本研究针对启动子激活这一环节,在转录水平研究细胞因子对胶原蛋白合成的调控。本研究结果显示,洛伐他汀呈剂量依赖地抑制 ADPKD 囊肿衬里上皮细胞 COL I $\alpha 1$ 基因启动子 pCOLH0.27 与 pCOLH2.5 的活性,表明洛伐他汀可通过对 ECM 基因启动子活性的调控,减少 ECM 的合成。GGPP 在一定程度上能阻断洛伐他汀的上述作用,提示洛伐他汀的这一作用可能与其抑制 GGPP 产生,从而阻断促纤维化细胞因子信号转导有关。洛伐他汀对 pCOLH0.27 与 pCOLH2.5 活性均有明显抑制作用,且抑制水平较为接近,提示洛伐他汀对 COL I $\alpha 1$ 基因启动子的作用部位主要在近端-0.27 kb 的区域内。此范围内的哪些顺式作用因子和反式作用因子参与这一作用有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Vuorio E, de Crombrughe B. The family of the collagen genes [J]. Annu Rev Biochem, 1990, 59: 837-872.
- [2] Kelynack K J, Hewitson T D, Martic M, McTaggart S, Becker G J. Lovastatin downregulates renal myofibroblast function *in vitro* [J]. Nephron, 2002, 91: 701-709.
- [3] 袁志忠,徐成钢,高春芳,梅长林.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[J].第二军医大学学报, 2006, 27: 111-112.
Yuan Z Z, Xiu C G, Gao C F, Mei C L. Effect of lovastatin on proliferation and extracellular matrix secretion in cyst-lining epithelial cells of autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27: 111-112.
- [4] 徐成钢,梅长林,张黎明.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.
- [5] 王皓,高春芳,万伟东,伍严安,赵文静,孔宪涛.人 $\alpha 1(I)$ 胶原基因启动子活性研究[J].第二军医大学学报, 2000, 21: 711-714.
Wang H, Gao C F, Wan W D, Wu Y A, Zhao W J, Kong X T. Activity analysis of promoter from human $\alpha 1(I)$ procollagen gene [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2000, 21: 711-714.
- [6] Kita T, Brown M S, Goldstein J L. Feedback regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in livers of mice treated with mevinolin, a competitive inhibitor of the reductase [J]. J Clin Invest, 1980, 66: 1094-1100.
- [7] Ratziu V, Lalazar A, Wong L, Dang Q, Collins C, Shaulian E, et al. Zf9, a Kruppel-like transcription factor up-regulated *in vivo* during early hepatic fibrosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 9500-9505.
- [8] 高春芳,李德岩,万伟东,伍严安,王皓,孔宪涛.改良 EMSA 法分析人 $\alpha 1(I)$ 胶原基因序列特异性 DNA 结合蛋白[J].第二军医大学学报, 2000, 21: 708-710.
Gao C F, Li D Y, Wan W D, Wu Y A, Wang H, Kong X T. Analysis of sequence-specific DNA-binding protein of human $\alpha 1(I)$ procollagen gene with improved EMSA [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2000, 21: 708-710.
- [9] Chung K Y, Agarwal A, Uitto J, Mauviel A. An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human $\alpha 2(I)$ collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor-beta [J]. J Biol Chem, 1996, 271: 3272-3278.