

## · 基础研究 ·

# 氟伐他汀联合氯沙坦对血管紧张素 II 诱导的人足细胞血管内皮生长因子表达的影响及机制研究

刘佳 王笑云 徐亚光 刘艳春 卞帅博 赵鲁米 赵秀芬 钱军 邢昌赢

**【摘要】** 目的 探讨氟伐他汀联合氯沙坦对血管紧张素 II (Ang II) 诱导的人足细胞血管内皮生长因子 (VEGF) 表达的影响及机制。方法 体外培养人足细胞株, 采用不同浓度的 Ang II ( $10^{-9}$ ~ $10^{-5}$  mol/L) 刺激人足细胞, 另予氟伐他汀 ( $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L) 和 (或) 氯沙坦 ( $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L)、ERK 特异性阻断剂 PD98059 ( $5 \times 10^{-5}$  mol/L) 干预。Western 印迹法检测 VEGF、磷酸化 (p)ERK1/2 蛋白的表达。RT-PCR 法检测 VEGF mRNA 的表达。结果 Ang II 刺激后, 人足细胞 VEGF mRNA 和蛋白的表达显著增加 ( $P < 0.05$ ), p-ERK1/2 增加 ( $P < 0.05$ )。氟伐他汀、氯沙坦及 PD98059 均可下调 Ang II 诱导的 VEGF mRNA 和蛋白表达及 ERK1/2 磷酸化 ( $P < 0.05$ ), 而氟伐他汀和氯沙坦联合干预较单独作用抑制效果更为显著 ( $P < 0.01$ )。结论 氟伐他汀和氯沙坦均可抑制 Ang II 诱导足细胞 VEGF 的过表达, 且两者联合具有协同作用。抑制 ERK 信号通路可能是实现其联合作用的机制之一。

**【关键词】** 洛沙坦; 氟伐他汀; 血管内皮生长因子类; 糖尿病肾病

## Effect of combination of fluvastatin and losartan on the expression of vascular endothelial growth factor induced by angiotensin II in human podocytes and associated mechanism

LIU Jia, WANG Xiao-yun\*, XU Ya-guang, LIU Yan-chun, BIAN Shuai-bo, ZHAO Lu-mi, ZHAO Xiu-fen, QIAN Jun, XING Chang-ying. Department of Nephrology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: WANG Xiao-yun, Department of Nephrology, Nanjing BenQ Medical Center, Nanjing 210029, China, Email: xywang1941@126.com

**【Abstract】 Objective** To explore the effect and associated mechanism of fluvastatin combined with losartan on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human podocytes induced by angiotensin (Ang) II. **Methods** The differentiated human podocytes were cultured with various concentrations of Ang II ( $10^{-9}$  to  $10^{-5}$  mol/L) *in vitro*, followed by treatment of fluvastatin ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  and  $10^{-5}$  mol/L), losartan ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  and  $10^{-5}$  mol/L), extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitor PD98059, and combination of fluvastatin and losartan. Expressions of VEGF and phosphorylation (p)ERK1/2 protein in podocytes were detected by Western blotting. RT-PCR was used to examine VEGF mRNA expression ( $P < 0.01$ ). **Results** Ang II up-regulated the expressions of VEGF and p-ERK1/2 in time- and dose-dependent manner. Above elevated expressions of VEGF and p-ERK1/2 induced by Ang II could be down-regulated by fluvastatin, losartan and PD98059 respectively ( $P < 0.05$ ). More obvious reduction of above expressions was

DOI: 10.3760/ema.j.issn.1001-7097.2012.09.010

基金项目:江苏省卫生厅科研基金(H200317)

作者单位:210029 南京医科大学第一附属医院(江苏省人民医院)肾内科[刘佳、徐亚光(现在山东省聊城市第二人民医院肾内科)、刘艳春、卞帅博、赵鲁米、赵秀芬、钱军、邢昌赢];南京明基医院肾内科(王笑云)

通信作者:王笑云, Email: xywang1941@126.com

found in combination of fluvastatin and losartan as compared to single agent ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions** Either fluvastatin or losartan can down-regulate the over-expression of VEGF and p-ERK1/2 induced by Ang II in human podocytes, and their combination has a cooperative effect. The ERK signaling pathway may be one of the mechanisms of their renal protective effects.

**【Key words】** Losartan; Fluvastatin; Vascular endothelial growth factors; Diabetic nephropathy

糖尿病肾脏病(DKD)是糖尿病并发症,可发展为终末期肾病(ESRD),导致患者死亡。足细胞在 DKD 的发生发展过程中起重要的作用<sup>[1-2]</sup>。血管内皮细胞生长因子(VEGF)在 DKD 早期肾组织中表达上调,阻断 VEGF 可改善糖尿病大鼠的蛋白尿水平<sup>[3]</sup>。血管紧张素(Ang)II 是肾脏局部肾素血管紧张素系统(RAS)的主要效应因子,可上调肾小管上皮细胞及足细胞 VEGF 表达,而在此过程中,Akt、ERK、p-38 等信号通路可能发挥着重要作用<sup>[4-5]</sup>。氟伐他汀是经典的降脂药,具有非降脂依赖的肾保护作用<sup>[6-8]</sup>。氯沙坦是 Ang II 受体拮抗剂(ARB),有降血压、降低肾内高滤过和减少蛋白尿等作用,是治疗 DKD 首选药物之一。本实验探讨他汀类联合 ARB 类药物的肾保护作用及可能机制,为防治 DKD 提供新的理论依据。

## 材料与方 法

1. 材料:永生化人足细胞株由英国 Bristol 大学 Moin A Saleem 教授惠赠,氟伐他汀(粉剂,北京诺华),氯沙坦(粉剂,美国默沙东),RPMI1640、胎牛血清和青链霉素(美国 Gibco),ITS(胰岛素-转铁蛋白-硒钠,Insulin-transferrin-selenium)(美国 Sigma),Trizol 和 DEPC(美国 Invitrogen),RT-PCR 试剂盒(大连 TaKaRa),血管紧张素 II(Ang II)(美国 Merck),兔抗人 VEGF121 多克隆抗体(美国 Santa Cruz),小鼠抗人磷酸化胞外信号调节激酶 1/2(p-ERK1/2)单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology),小鼠抗人  $\alpha$ -微管蛋白( $\alpha$ -tubulin)单克隆抗体(武汉博士德),兔抗人  $\beta$ -actin 抗体(北京博奥森),PD98059(美国 Gibco)。

2. 足细胞培养与分组:完全培养基为 RPMI 1640 加 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 mg/L 和 ITS,在 5%CO<sub>2</sub> 和 95%O<sub>2</sub> 培养箱内培养。33℃使足细胞传代,37℃分化 14 d 后改用 1% 胎牛血清培养基同步化处理 24 h。氟伐他汀用

DMSO 溶解,终质量浓度 < 1 g/L。将足细胞随机分组:(1)Ang II 不同浓度(10<sup>-9</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup> mol/L)分别刺激 24 h;(2)Ang II(10<sup>-7</sup> mol/L)分别刺激 0、6、12、24 h;(3)正常对照组、Ang II 组、Ang II + 不同浓度氟伐他汀(Flu 10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup> mol/L)组,Ang II 浓度均为 10<sup>-7</sup> mol/L,均刺激 24 h;(4)正常对照组、Ang II 组、Ang II + 不同浓度氯沙坦(Los 10<sup>-7</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup> mol/L)组,Ang II 浓度均为 10<sup>-7</sup> mol/L,均刺激 24 h;(5)正常对照组、Ang II 组、Ang II + ERK 特异性抑制剂 PD98059(5 × 10<sup>-5</sup> mol/L)组、Ang II + 氟伐他汀(Flu 10<sup>-6</sup> mol/L)组、Ang II + 氯沙坦(Los 10<sup>-6</sup> mol/L)组、Ang II + 氟伐他汀(Flu 10<sup>-6</sup> mol/L) + 氯沙坦(Los 10<sup>-6</sup> mol/L)组,Ang II 浓度均为 10<sup>-7</sup> mol/L,均刺激 24 h。每实验组设置 3 个复孔,同一实验重复 3 次。

3. VEGF mRNA 测定:用 RT-PCR 半定量法。以 Trizol 法提取细胞总 RNA。VEGF 引物序列正义:5'-AGAGAGAGACGGGGTCAGAGAG-3',反义:5'-CCCAGAAGTTGGACGAAAAGTT-3',产物 322 bp。内参 GAPDH 引物序列正义:5'-GTCTT CACTACCATGGAGAAGG-3',反义:5'-TCATGGAT GACCTTGGCCAG-3',产物 250 bp。参照 RT-PCR 试剂盒说明书操作,PCR 扩增反应条件:95℃ 5 min,95℃变性 45 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 32 个循环,末轮循环 72℃延伸 10 min。产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像分析系统进行结果扫描,以 GAPDH 为内参照。

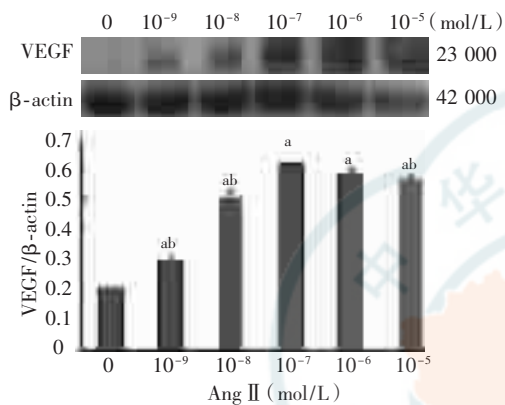
4. VEGF、p-ERK1/2 蛋白表达测定:用 Western 印迹法。提取人足细胞全蛋白,测定蛋白浓度后与上样缓冲液混合,加热变性。行电泳、转膜,封闭膜上的非特异性结合位点,分别加一抗、二抗孵育膜,洗膜,曝光,再经显影、定影获得蛋白印迹。胶片经扫描后分析条带的灰度值,以  $\alpha$ -tubulin 和  $\beta$ -actin 为内参照。

5. 统计学处理:应用 SPSS 13.0 统计软件分析。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素

方差分析, 各组间两两比较采用 LSD 法。

### 结 果

1. 不同浓度 Ang II 对人足细胞 VEGF 表达的影响:  $10^{-9} \sim 10^{-5}$  mol/L Ang II 分别干预人足细胞 24 h 后, 与正常对照组相比, VEGF 表达均明显升高 (均  $P < 0.01$ ), 于  $10^{-7}$  mol/L 时作用最明显。Ang II 在一定范围内呈浓度依赖性, 见图 1。

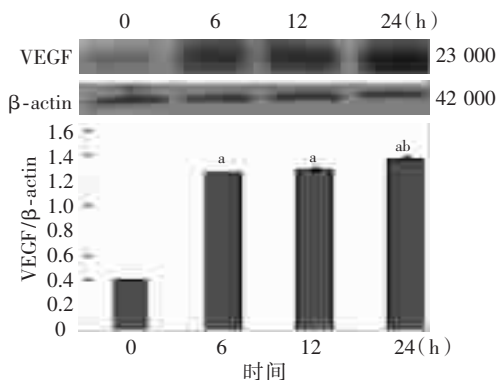


注: 与 0 mol/L 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与  $10^{-7}$  mol/L 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

图 1 不同浓度 Ang II 作用 24 h 对人足细胞 VEGF 蛋白表达的影响

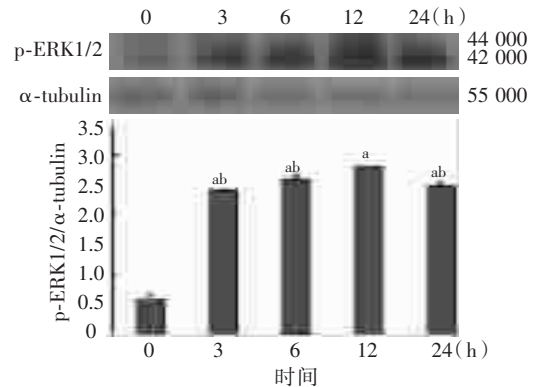
2. Ang II 作用不同时间对人足细胞 VEGF 表达的影响: 选择  $10^{-7}$  mol/L Ang II 分别干预 0、6、12、24 h, 结果显示, 随着刺激时间延长, VEGF 表达量逐渐增加, 24 h 达高峰, 呈时间依赖性, 见图 2。

3. Ang II 不同作用时间对人足细胞 p-ERK1/2 表达的影响: 选择  $10^{-7}$  mol/L Ang II 分别干预 0、



注: 与 0 h 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 6 h、12 h 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 2 Ang II ( $10^{-7}$  mol/L) 作用不同时间对人足细胞 VEGF 蛋白表达的影响

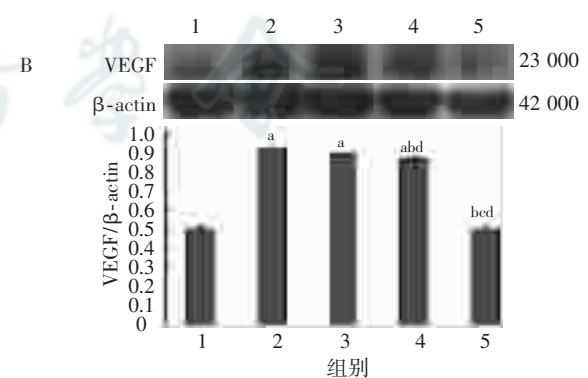
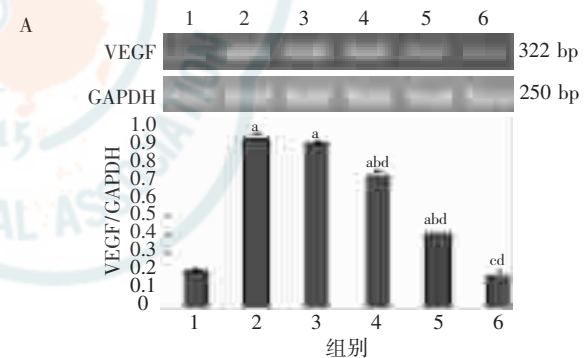


注: 与 0 h 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 12 h 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 3 Ang II ( $10^{-7}$  mol/L) 作用不同时间对人足细胞 p-ERK1/2 蛋白表达的影响 (Western 印迹)

3、6、12、24 h, 结果显示, 与 0 h 组相比, 不同时间点的 ERK1/2 磷酸化均显著增加, 12 h 作用最明显, 见图 3。

4. 氟伐他汀对 Ang II 诱导人足细胞 VEGF



注: A: VEGF、GAPDH mRNA 表达; B: VEGF、β-actin 蛋白表达; 1: 正常对照组; 2: Ang II  $10^{-7}$  mol/L 组; 3: Ang II  $10^{-7}$  mol/L + Flu  $10^{-7}$  mol/L 组; 4: Ang II  $10^{-7}$  mol/L + Flu  $10^{-6}$  mol/L 组; 5: Ang II  $10^{-7}$  mol/L + Flu  $10^{-5}$  mol/L 组; 6: Flu  $10^{-6}$  mol/L 组; 与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 Ang II  $10^{-7}$  mol/L 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; 与 Ang II  $10^{-7}$  mol/L + Flu  $10^{-7}$  mol/L 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.05$

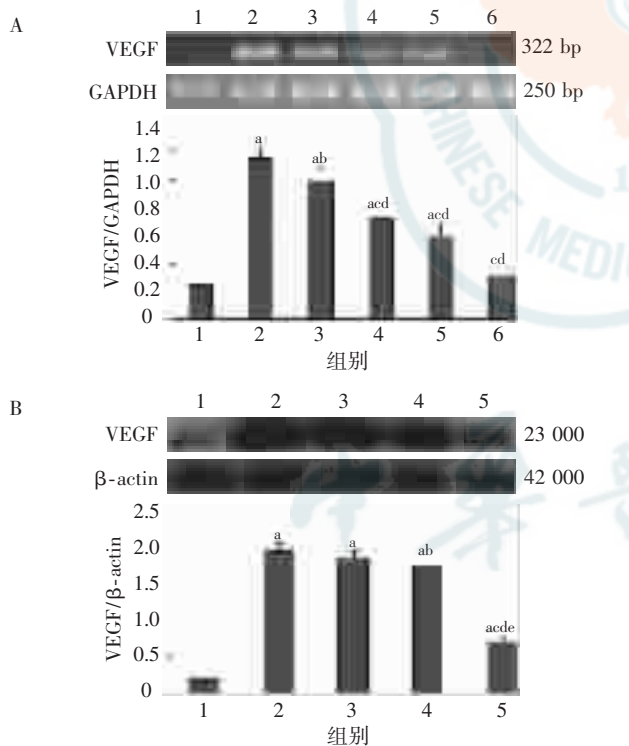
图 4 不同浓度氟伐他汀对 Ang II 诱导 VEGF mRNA 和蛋白表达的影响 (RT-PCR 和 Western 印迹)

mRNA 和蛋白表达的影响: 选择 Ang II  $10^{-7}$  mol/L 分别与不同浓度 ( $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L) 的氟伐他汀共同干预足细胞 24 h, 同时设氟伐他汀 ( $10^{-6}$  mol/L) 对照。结果显示, Ang II 可明显增加足细胞 VEGF mRNA 和蛋白的表达, 氟伐他汀  $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L 时均可降低 Ang II 诱导的 VEGF mRNA 和蛋白的表达, 而  $10^{-7}$  mol/L 时抑制作用微弱 ( $P > 0.05$ ), 单独氟伐他汀对足细胞 VEGF mRNA 表达作用与正常对照差异无统计学意义。见图 4。

5. 氯沙坦对 Ang II 诱导人足细胞 VEGF mRNA 和蛋白表达的影响: 选择 Ang II  $10^{-7}$  mol/L 分别与不同浓度 ( $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L) 氯沙坦共同干预足细胞 24 h, 同时设氯沙坦 ( $10^{-6}$  mol/L) 对照。结果显示,  $10^{-7}$  mol/L Ang II 明显增加足细胞 VEGF mRNA 和蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ), 氯沙坦  $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$  mol/L 时均可降低 Ang II 诱导的 VEGF mRNA 和蛋白的表达 ( $P < 0.05$  或  $P <$

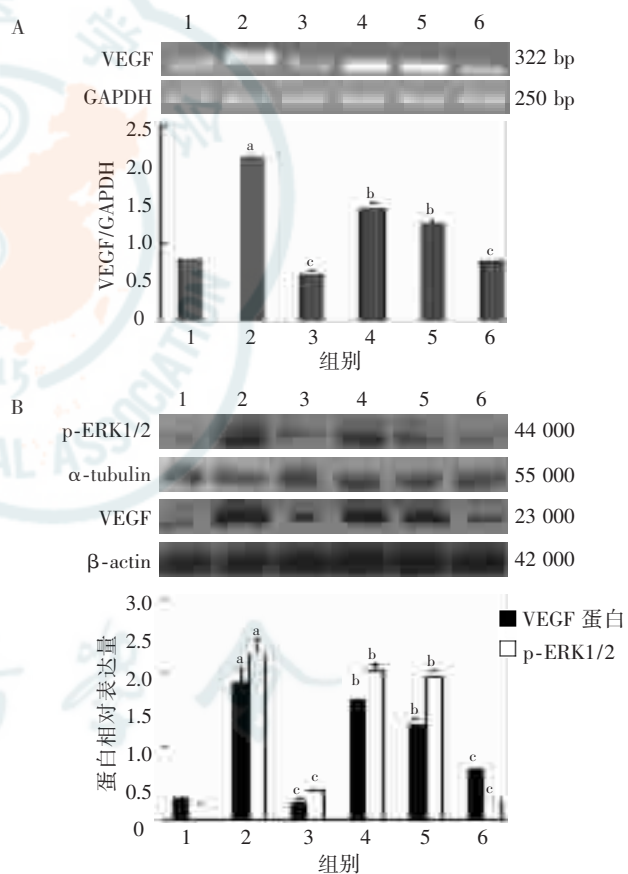
$0.01$ ); 而  $10^{-7}$  mol/L 时抑制作用不明显 ( $P > 0.05$ ); 单独氯沙坦对足细胞 VEGF mRNA 表达与正常对照差异无统计学意义。见图 5。

6 氟伐他汀联合氯沙坦对 Ang II 诱导人足细胞 VEGF mRNA 和蛋白表达及 ERK1/2 磷酸化的影响: 选择  $10^{-7}$  mol/L Ang II、 $10^{-6}$  mol/L 氟伐他汀及氯沙坦、 $5 \times 10^{-5}$  mol/L PD98059 干预 24 h。结果显示, PD98059 可明显降低 Ang II 诱导的 VEGF mRNA 和蛋白表达及 ERK1/2 磷酸化; 氟伐他汀、氯沙坦分别单独干预亦可降低 Ang II 诱导的上述指标的表达; 氟伐他汀及氯沙坦联合干预比单药干预抑制作用更明显 ( $P < 0.01$ )。见图 6。



注: A: VEGF、GAPDH mRNA 表达; B: VEGF、 $\beta$ -actin 蛋白表达; 1: 正常对照组; 2: Ang II  $10^{-7}$  mol/L 组; 3: Ang II  $10^{-7}$  mol/L + Los  $10^{-7}$  mol/L 组; 4: Ang II  $10^{-7}$  mol/L + Los  $10^{-6}$  mol/L 组; 5: Ang II  $10^{-7}$  mol/L + Los  $10^{-5}$  mol/L 组; 6: Los  $10^{-6}$  mol/L 组; 与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 Ang II  $10^{-7}$  mol/L 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; 与 Ang II  $10^{-7}$  mol/L + Los  $10^{-7}$  mol/L 组比较, <sup>d</sup> $P < 0.01$ ; 与 Ang II  $10^{-7}$  mol/L + Los  $10^{-6}$  mol/L 组比较, <sup>e</sup> $P < 0.01$

图 5 不同浓度氯沙坦对 Ang II 诱导 VEGF mRNA 和蛋白表达的影响 (RT-PCR 和 Western 印迹)



注: 1: 正常对照组; 2: Ang II 组; 3: Ang II + PD98059 组; 4: Ang II + Flu 组; 5: Ang II + Los 组; 6: Ang II + Flu + Los 组; A: VEGF mRNA 表达; B: p-ERK1/2、VEGF 蛋白表达; 与正常对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 Ang II 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$

图 6 氟伐他汀和氯沙坦对 Ang II 诱导 VEGF mRNA 和蛋白表达、p-ERK1/2 蛋白表达的影响 (RT-PCR 和 Western 印迹)

## 讨 论

糖尿病时, 高血糖、Ang II、糖基化终末产物

(AGE)、转化生长因子(TGF)- $\beta$  等均可刺激肾小球足细胞过度表达 VEGF, 从而造成肾小球损伤<sup>[9]</sup>。在小鼠足细胞, 高糖可激活 ERK 通路诱导 VEGF mRNA 和蛋白表达增多<sup>[10]</sup>。在小鼠近曲小管上皮细胞, 高糖一方面激活内源 RAS 进而通过 ERK 通路促进 VEGF 合成, 另一方面直接激活 ERK 通路使 VEGF 合成增加<sup>[4]</sup>。

本实验中, 在一定范围内, Ang II 可浓度依赖性使足细胞 VEGF mRNA 和蛋白表达明显上调, ERK1/2 磷酸化增多; PD98059 可抑制 ERK1/2 磷酸化并减少 Ang II 诱导的 VEGF mRNA 和蛋白表达, 表明 Ang II 可能部分地通过 ERK 通路来促进人足细胞 VEGF 表达, 进而损伤足细胞。

他汀类药物对足细胞的作用越来越受到关注<sup>[11]</sup>。研究证明他汀类药物对于 DKD 高糖环境下的足细胞具有保护效应, 可改善糖尿病肾脏病变, 减少蛋白尿<sup>[12-13]</sup>。我们既往的研究证实氟伐他汀可抑制糖尿病小鼠肾脏白介素-6 (IL-6) 的表达, 减少蛋白尿, 改善肾功能<sup>[8]</sup>; 还可减少 Ang II 诱导的人肾小管上皮细胞纤连蛋白 (FN) 的表达<sup>[14]</sup>。本实验中, 氟伐他汀可明显下调 Ang II 刺激的 VEGF 异常高表达, 抑制 ERK1/2 磷酸化, 且在一定范围内随着氟伐他汀干预浓度的增加, 抑制作用越明显, 其抑制效果与 ERK 通路特异性阻断剂类似, 提示氟伐他汀可能通过抑制 ERK 信号通路, 而不是直接拮抗 RAS, 下调 Ang II 诱导的 VEGF 表达。而氯沙坦亦显示了类似的抑制作用, 其机制除与直接拮抗 RAS 外, 还可能与抑制 ERK 信号通路有关。氟伐他汀与氯沙坦共同干预比两者单独作用时抑制更明显, 同时 VEGF mRNA 和蛋白的表达也下降更明显, 进一步提示两者对 Ang II 刺激下足细胞的协同保护效应与共同抑制 ERK 信号通路, 间接和或直接抑制 RAS 有关。

综上所述, 他汀类药物可下调 Ang II 导致的足细胞 VEGF 的过表达, 并且与氯沙坦有协同保护足细胞的作用, 为 DKD 的防治提供新的理论依据。

#### 参 考 文 献

[1] Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy.

Diabetes, 2005, 54: 1626-1634.

- [2] Mitu GM, Wang S, Hirschberg R. BMP7 is a podocyte survival factor and rescues podocytes from diabetic injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293: F1641- F1648.
- [3] Sung SH, Ziyadeh FN, Wang A, et al. Blockade of Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Ameliorates Diabetic Albuminuria in Mice. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17: 3093-3104.
- [4] Feliers D, Kasinath BS. Mechanism of VEGF expression by high glucose in proximal tubule epithelial cells. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 314: 136-142.
- [5] Shi RZ, Wang JC, Huang SH, et al. Angiotensin II induces vascular endothelial growth factor synthesis in mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*, 2009, 315: 10-15.
- [6] Mantuano E, Santi S, Filippi C, et al. Simvastatin and fluvastatin reduce interleukin-6 and interleukin-8 lipopolysaccharide (LPS) stimulated production by isolated human monocytes from chronic kidney disease patients. *Biomed Pharmacother*, 2007, 61: 360-365.
- [7] Banes-Berceli AK, Shaw S, Ma G, et al. Effect of simvastatin on high glucose-and angiotensin II-induced activation of the JAK/STAT pathway in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 291: F116-F121.
- [8] 王爱梅, 刘佳, 江蕾, 等. 氟伐他汀对糖尿病小鼠肾脏白介素-6 表达的影响. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2008, 28: 283-285.
- [9] Li JJ, Kwak SJ, Jung DS, et al. Podocyte biology in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl*, 2007, 106: S36-S42.
- [10] Hoshi S, Nomoto K, Kuromitsu J, et al. High glucose induced VEGF expression via PKC and ERK in glomerular podocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 290: 177-184.
- [11] Bussolati B, Deregibus MC, Fonsato V, et al. Statins prevent oxidized LDL-induced injury of glomerular podocytes by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-signaling pathway. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16: 1936-1947.
- [12] Cormack-Aboud FC, Brinkkoetter PT, Pippin JW et al. Rosuvastatin protects against podocyte apoptosis in vitro. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24: 404-12.
- [13] Whaley-Connell A, Habibi J, Nistala R, et al. Attenuation of NADPH oxidase activation and glomerular filtration barrier remodeling with statin treatment. *Hypertension*, 2008, 51: 474-480.
- [14] 刘佳, 储腊萍, 王宁宁, 等. 血管紧张素 II 及氟伐他汀对肾小管上皮细胞分泌纤连蛋白的影响. *中华肾脏病杂志*, 2007, 23: 406-407.

(收稿日期: 2012-03-06)

(本文编辑: 李耀荣)