

氟伐他汀对高糖培养的大鼠肾小球系膜细胞外基质 p38 MAPK表达的影响

王丽晖*, 吴广礼, 张丽霞, 黄旭东, 李 赛

(中国人民解放军白求恩国际和平医院肾脏病科, 河北 石家庄 050082)

摘要: 研究 HMG-CoA 还原酶抑制剂氟伐他汀 (fluvastatin) 对高糖状态下肾小球系膜细胞中 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 及其下游因子 cAMP 反应元件结合蛋白 1 (cAMP response element-binding protein, CREB₁) 表达的影响。采用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, 应用 Western blotting 检测 p38 MAPK 和 CREB₁ 及其磷酸化蛋白 (p-p38 MAPK、p-CREB₁) 的表达; 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 和纤维粘连蛋白 (FN) mRNA 的表达; 放射免疫法测定细胞上清液中层连接蛋白 (LN) 和 IV 型胶原蛋白的含量。结果表明, 与低糖对照组相比, 高糖组的系膜细胞 p-p38 MAPK、p-CREB₁ 表达明显上调, TGF- β_1 mRNA 和 FN mRNA 的表达增加, 细胞上清液中 LN 和 IV 型胶原蛋白含量增加。氟伐他汀组的 p-p38 MAPK、p-CREB₁ 表达明显下调, TGF- β_1 mRNA 和 FN mRNA 的表达降低, 同时 LN 和 IV 型胶原蛋白的含量减少。因此氟伐他汀抑制肾小球系膜细胞 TGF- β_1 的表达和细胞外基质的分泌可能部分是通过影响 p38 MAPK 及其下游因子 CREB₁ 的激活而实现的。

关键词: 氟伐他汀; HMG-CoA 还原酶抑制剂; 系膜细胞; p38 丝裂原活化蛋白激酶; cAMP 反应元件结合蛋白 1; 转化生长因子 β_1

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 02-0121-05

Effects of fluvastatin on the activation of p38 mitogen-activated protein kinase in glomerular mesangial cells under high concentration of glucose

WANG Li-hui*, WU Guang-li, ZHANG Li-xia, HUANG Xu-dong, LI Sai

(Department of Nephrology, Bethune International Peace Hospital of PLA, Shijiazhuang 050082, China)

Abstract: This study is to investigate the effects of fluvastatin on the activation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and cAMP response element-binding protein (CREB₁) in glomerular mesangial cells under high concentration of glucose. High concentration glucose and fluvastatin were used to stimulate the cultured rat glomerular mesangial cells (GMCs) *in vitro*. The protein expressions of p38 MAPK, CREB₁, p-p38 MAPK and p-CREB₁ were observed with Western blotting. TGF- β_1 and fibronectin (FN) mRNA were measured with reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). The protein synthesis of laminine (LN) and type IV collagen in the supernatants of the GMCs were detected with radioimmunoassay. Compared with low glucose control group, the expressions of p-p38 MAPK, p-CREB₁ were increased obviously in high glucose group, TGF- β_1 mRNA and FN mRNA, LN and type IV collagen in the supernatants were increased significantly in GMCs under high concentration glucose medium. The expression levels of p-p38 MAPK, p-CREB₁, TGF- β_1 mRNA, and FN mRNA, LN and type IV collagen in the supernatants were significantly lower in the fluvastatin group than those in the high concentration glucose group. It is concluded that fluvastatin can

收稿日期: 2008-08-04.

基金项目: 河北省科技攻关课题项目(072761188).

*通讯作者 Tel: 86-311-87978313, E-mail: wanglh68@163.com

inhibit over production of TGF- β_1 and ECM proteins in GMCs under high concentration of glucose, partly by regulating the phosphorylation of p38 MAPK and CREB $_1$.

Key words: fluvastatin; 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitor; mesangial cell; p38 mitogen-activated protein kinase; cAMP response element-binding protein 1; transform growth factor- β_1

p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 途径是近年来倍受关注的一条细胞内重要的信号转导途径,在多种因素的作用下被激活,在糖尿病肾病的发生发展中发挥一定的作用^[1]。HMG-CoA 还原酶抑制剂作为降脂药物在临床中广泛应用,但是其非依赖降脂的肾脏保护作用越来越受到人们的重视^[2]。洛伐他汀能够抑制糖尿病大鼠肾组织细胞外基质的蓄积,延缓糖尿病肾病的发展^[3]。为进一步观察他汀类药物对糖尿病肾病的保护作用机制,本实验通过体外培养大鼠肾小球系膜细胞,观察 HMG-CoA 还原酶抑制剂氟伐他汀对高糖培养系膜细胞增殖状态及细胞外基质的影响,同时观察氟伐他汀对 p38 MAPK 及其下游因子 CREB $_1$ 表达的影响,以探讨氟伐他汀可能的肾脏保护机制。

材料和方法

材料 氟伐他汀 (粉剂) 北京诺华制药有限公司馈赠。健康清洁级雄性 Wistar 大鼠,体重 120~150 g,由河北省实验动物中心 (实验动物合格证号 701073) 提供。小鼠抗大鼠 p-p38MAPK 单克隆抗体,小鼠抗大鼠 p-CREB $_1$ 单克隆抗体,兔抗大鼠 p38 MAPK、兔抗大鼠 CREB $_1$ 多克隆抗体和 ECL 增强化学发光试剂盒为 Santa Cruz 公司产品。RT-PCR 试剂为 Promega 公司产品。IV 型胶原酶为 Sigma 公司产品。辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠或兔 IgG 由北京中山公司进口分装。聚偏二氯乙烯膜 (PVDF) 为 Milipore 公司产品。

系膜细胞的分离培养和刺激实验 在无菌条件下取大鼠肾脏,将皮质剪碎,分别经 80、140 和 200 目不锈钢筛网,收集 200 目上的肾小球,加入 0.1% IV 型胶原酶消化后,离心收集消化的肾小球,加入 RPMI 1640 完全培养液 (含 0.2% 胎牛血清, 2 mmol·L⁻¹ L-谷氨酰胺, 100 ku·L⁻¹ 青霉素, 100 mg·L⁻¹ 链霉素, 0.66 ku·L⁻¹ 胰岛素), 于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养, 4~6 d 首次换液, 以后每 2~3 d 换液 1 次, 约 2~3 周系膜细胞长满培养瓶底, 经形态学和免疫细胞化学鉴定为系膜细胞。0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取 4~10 代细胞用于实验研究。将细胞分为 4 组, LG 组 (5.5 mmol·L⁻¹ 葡萄糖); LG + M 组 (5.5 mmol·L⁻¹ 葡萄糖 + 24.5 mmol·L⁻¹ 甘露醇); HG 组 (30 mmol·L⁻¹ 葡萄糖);

HG + Flu 组 (30 mmol·L⁻¹ 葡萄糖 + 10 μ mol·L⁻¹ 氟伐他汀)。于刺激的 48 h 收集细胞, 分别提取蛋白、RNA 及细胞上清液。

MTT 法检测氟伐他汀对系膜细胞增殖的影响 取第 4 代细胞胰酶消化, 加入含 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液于离心管中, 吹打, 混匀, 按细胞数 4 000/孔 (200 μ L/孔) 接种于 96 孔板。待细胞贴壁 24 h 后, 加无血清培养液 200 μ L, 同步 24 h, 使细胞同步于 G₀ 期。每 6 孔细胞为一组, 按上述分组进行刺激, 刺激时间为 12、24 及 48 h。此外, 同时观察不同浓度氟伐他汀 (1、10 和 20 μ mol·L⁻¹) 对高糖状态下系膜细胞增殖的影响, 选择刺激时间为 48 h。置 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养, 加入 MTT (5 g·L⁻¹), 于 4 h 后每孔分别加入 DMSO, 用酶标仪观察, 在 490 nm 波长处记录吸收度 (A) 值。

Western blotting 检测 p38 MAPK、CREB $_1$ 、p-p38 MAPK 和 p-CREB $_1$ 的表达 细胞用冰冷 PBS (1 mmol·L⁻¹ 正钒酸钠) 洗 2 遍, 加入细胞裂解液 (20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, 2.5 mmol·L⁻¹ EDTA, 0.1% 甘油, 10 g·L⁻¹ SDS, 0.01% Triton X-100, 50 g·L⁻¹ 去氧胆酸钠, 10 mmol·L⁻¹ 焦磷酸钠, 50 mmol·L⁻¹ 氟化钠, 1 mmol·L⁻¹ 正钒酸钠, 1 g·L⁻¹ 苯甲基磺酰氨), 冰浴 1 h。4 °C、14 000 r·min⁻¹ 离心 25 min。Lowry 法测定上清液蛋白浓度, 取细胞裂解蛋白 50 μ g, 经 8% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳后电转移至 PVDF 膜; 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 2 h, 加入一抗, 1:200 稀释, 4 °C 过夜, 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠或兔抗体 (1:5 000 稀释), 37 °C 孵育 1.5 h; 洗膜后加入 ECL 试剂, 然后将 PVDF 膜放入 X 光片暗盒, 压片, 显影, 定影。用美国 UVP 公司 LabWorks 4.5 分析系统软件对 Western blotting 条带进行定量分析, 确定杂交条带的吸收度值。

逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 TGF- β_1 mRNA 和 FN mRNA 的表达 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 用紫外-可见分光光度仪测定其纯度和含量。在逆转录酶催化下合成 cDNA, 以适量 cDNA 为模板在 Taq DNA 聚合酶催化下进行 PCR 扩增。TGF- β_1 的上下游引物分别为 5' CCA TGA CAT GAA CCG ACC CT 3' 和 5' CCG GGT TGT GTT GGT TGT AG 3',

扩增片段为 296 bp; FN 的上下游引物分别为 5' CTG AAC CAG CCT ACG GAT GAC T 3' 和 5' CCG TCG TCA TAA CAC GTT GCT 3', 扩增片段为 305 bp; GAPDH 的上下游引物分别为 5' TAT CGG ACG CCT GGT TAC 3' 和 5' CTG TGC CGT TGA ACT TGC 3', 扩增片段为 140 bp。所用引物均由上海生工生物公司合成。TGF- β_1 和 FN 的扩增条件: 预变性 94 °C 5 min, 进入循环, 94 °C 50 s, 退火温度分别为 58 °C 和 56.9 °C 60 s, 72 °C 60 s, 30 个循环后 72 °C 8 min。将 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 置于凝胶图像分析系统 (UVP 公司, 美国) 进行吸收度扫描, 以管家基因 GAPDH 作为内参照校正, 用目的基因的吸收度与 GAPDH 吸收度的比值代表目的基因的相对表达含量。

放射免疫法检测细胞上清液 IV 型胶原蛋白和 LN 的分泌 取各组细胞上清液约 4 mL, 吸入 5 mL 冻存管中, -80 °C 冰箱冷冻保存。采用 LGJ0.5-II 冷冻干燥机将细胞上清液冷冻成干粉, 进行放射免疫检测时应用蒸馏水进行相应稀释。LN 及 IV 型胶原蛋白测定采用竞争法, 严格按试剂盒使用说明书进行操作。

统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计, 组间比较采用方差分析。

结果

1 肾小球系膜细胞的鉴定

倒置相差显微镜下见系膜细胞呈梭形、不规则星形或树枝状, 生长旺盛时多呈梭形。HE 染色见系膜细胞浆向外伸出数个长短不一的突起, 核清晰位于细胞中央, 呈圆形或椭圆形 (图 1)。免疫细胞化学研究显示胞浆结蛋白阳性 (图 2), 角蛋白、VIII 因子阴性, 以此证明这些细胞为系膜细胞而非肾小球上皮细胞或内皮细胞。

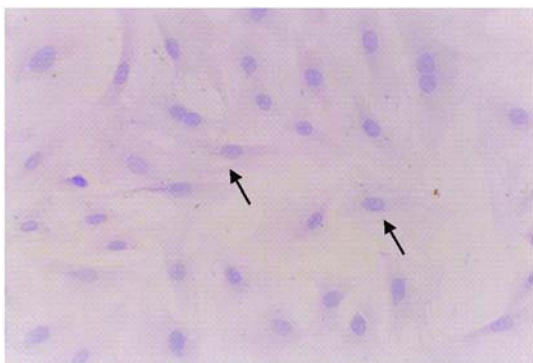


Figure 1 HE stains of rat glomerular mesangial cells (HE $\times 200$)

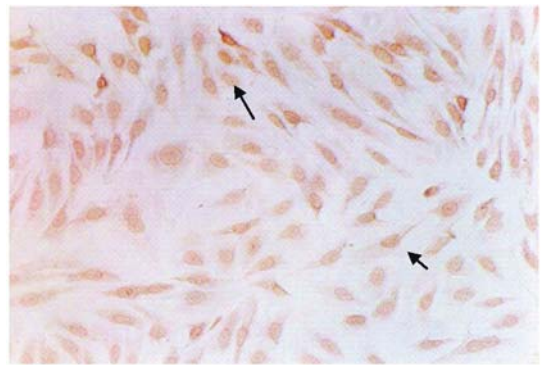


Figure 2 Immunohistochemical staining for desimin in glomerular mesangial cells (DAB, $\times 200$)

2 氟伐他汀对系膜细胞增殖的影响

与低糖对照组相比, 高糖能够促进系膜细胞增殖, 并随时间延长更加明显; 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟伐他汀作用 24 和 48 h 后, 可抑制高糖对系膜细胞的促增殖作用 (表 1)。1、10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟伐他汀对高糖培养系膜细胞增殖都有抑制作用, 并且抑制作用随药物浓度的增加而增加 (表 2)。

Table 1 Effects of fluvastatin on proliferation of rat glomerular mesangial cell at different stimulated times (ratio of IOD)

Group	12 h	24 h	48 h
LG	0.281 ± 0.018	0.312 ± 0.027	0.456 ± 0.031
LG + M	0.267 ± 0.019	0.337 ± 0.030	0.473 ± 0.021
HG	$0.364 \pm 0.016^*$	$0.481 \pm 0.057^{**}$	$0.692 \pm 0.043^{**}$
HG + Flu	$0.295 \pm 0.015^\#$	$0.354 \pm 0.043^\#$	$0.469 \pm 0.037^\#$

LG: Low glucose (5.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$); LG + M: Low glucose (5.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) + mannitol (24.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$); HG: High glucose (30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$); HG + Flu: High glucose (30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) + fluvastatin (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs LG group; $^\#P < 0.05$ vs HG group

Table 2 Effects of fluvastatin on proliferation of glomerular mesangial cell at different concentrations

Group	A
HG	0.350 ± 0.023
HG + Flu (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$0.227 \pm 0.026^{**}$
HG + Flu (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$0.246 \pm 0.024^{**}$
HG + Flu (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$0.136 \pm 0.015^{**}$

HG: High glucose (30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$ vs HG group

3 氟伐他汀对系膜细胞 p38 MAPK 信号通道蛋白的影响

与低糖对照组相比, 高糖组 p-p38 MAPK 和 p-CREB $_1$ 表达上调 ($P < 0.05$)。氟伐他汀组 p-p38 MAPK 和 p-CREB $_1$ 表达下调 ($P < 0.05$)。非磷酸化 p38 MAPK 和 CREB $_1$ 在各组表达差异无显著性 (图 3)。

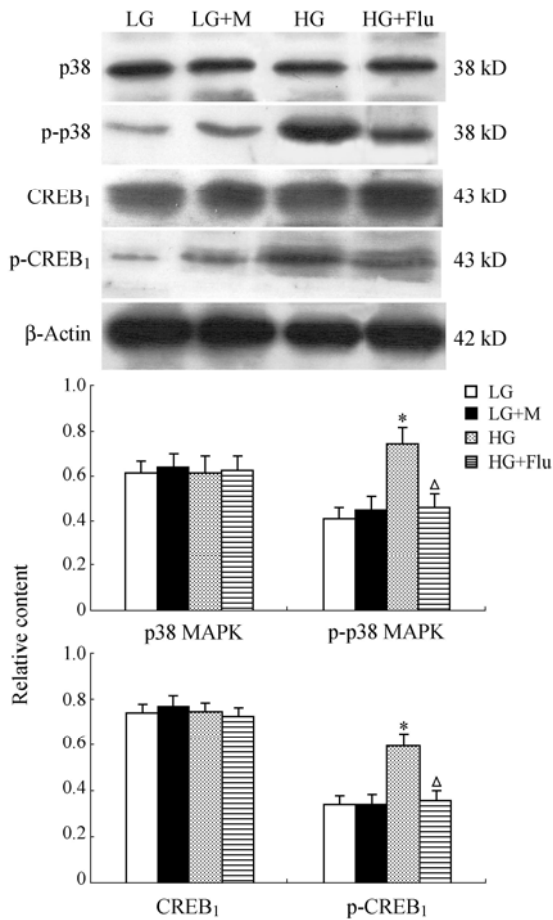


Figure 3 Effects of fluvastatin on expression of p38 MAPK and CREB₁ in rat glomerular mesangial cell by Western blotting. LG: Low glucose (5.5 mmol·L⁻¹); LG + M: Low glucose (5.5 mmol·L⁻¹) + mannitol (24.5 mmol·L⁻¹); HG: High glucose (30 mmol·L⁻¹); HG + Flu: High glucose (30 mmol·L⁻¹) + fluvastatin (10 μmol·L⁻¹). **P* < 0.05 vs LG group; ^Δ*P* < 0.05 vs HG group

4 氟伐他汀对 TGF-β₁ mRNA 和 FN mRNA 的影响

与低糖对照组相比, 高糖刺激 48 h 可以使系膜细胞的 TGF-β₁ mRNA 和 FN mRNA 升高 (*P* < 0.05)。与高糖组相比, 氟伐他汀组的 TGF-β₁ mRNA 和 FN mRNA 的表达明显降低 (*P* < 0.05), 见图 4。

5 氟伐他汀对细胞上清液 LN 和 IV 型胶原蛋白的影响

在高糖刺激 48 h 的系膜细胞上清液中, LN 和 IV 型胶原蛋白的含量增加, 与低糖对照组比较差异有统计学意义。与高糖组相比, 氟伐他汀组的 LN 和 IV 型胶原蛋白的含量降低 (*P* < 0.05), 见表 3。

Table 3 Effects of fluvastatin on the concentration of laminine and collagen IV in the supernatant of mesangial cells

Group	LN / ng·mL ⁻¹	Collage IV / ng·mL ⁻¹
LG	23.45 ± 3.5	11.53 ± 1.5
LG + M	22.53 ± 2.98	10.35 ± 2.12
HG	35.45 ± 4.23*	15.31 ± 2.34*
HG + Flu	27.31 ± 3.34 [#]	14.15 ± 2.02 [#]

LG: Low glucose (5.5 mmol·L⁻¹); LG + M: Low glucose (5.5 mmol·L⁻¹) + mannitol (24.5 mmol·L⁻¹); HG: High glucose (30 mmol·L⁻¹); HG + Flu: High glucose (30 mmol·L⁻¹) + fluvastatin (10 μmol·L⁻¹). *n* = 6, $\bar{x} \pm s$. **P* < 0.05 vs LG group; [#]*P* < 0.05 vs HG group

讨论

他汀类药物 (statins) 是 3-羟-3 甲基戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂, 主要用于治疗脂类代谢异常。它可以通过阻断细胞内甲羟戊酸代谢途径, 使细胞胆固醇和多种非甾醇异戊二烯产物, 如焦磷

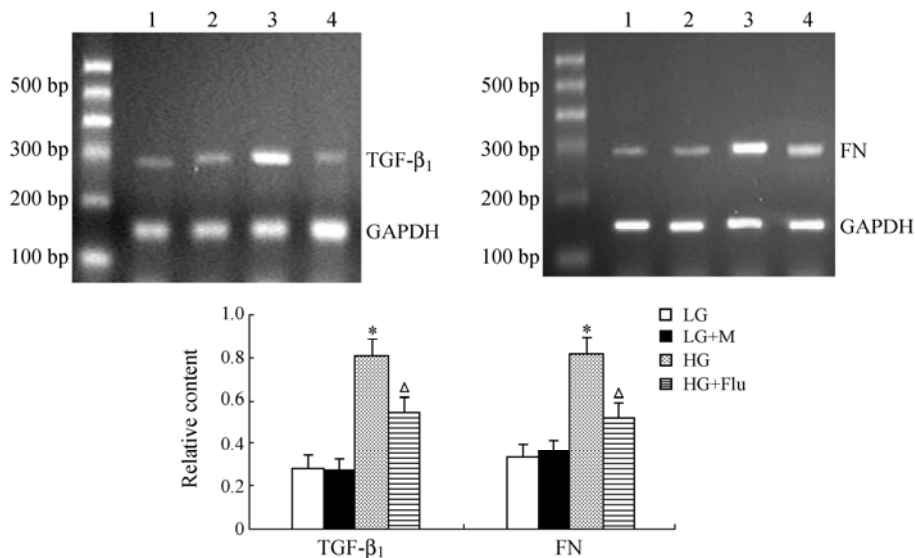


Figure 4 Effects of fluvastatin on expressions of TGF-β₁ mRNA and FN mRNA in rat glomerular mesangial cell by RT-PCR. LG: Low glucose (5.5 mmol·L⁻¹); LG + M: Low glucose (5.5 mmol·L⁻¹) + mannitol (24.5 mmol·L⁻¹); HG: High glucose (30 mmol·L⁻¹); HG + Flu: High glucose (30 mmol·L⁻¹) + fluvastatin (10 μmol·L⁻¹). **P* < 0.05 vs LG group; ^Δ*P* < 0.05 vs HG group

酸法呢酯 (farnesyl pyrophosphate, FPP)、香叶基焦磷酸香叶酯 (geranyl geranyl pyrophosphate, GGPP) 的生成减少^[4]。近年来他汀类药物非依赖降脂的一些肾脏保护作用更让人们关注。主要表现在可以有效减轻肾脏细胞增殖肥大和 ECM 的积聚, 减少尿蛋白排泄量, 延缓慢性肾功能不全的进展^[5]。

系膜细胞是肾小球内最活跃的固有细胞, 具有产生细胞外基质、分泌细胞因子、吞噬和清除异物等多种功能, 其功能异常与多种肾脏疾病的发生、发展有关。高血糖诱导的 TGF- β_1 和细胞外基质蛋白的增加是糖尿病肾病的可能发病机制之一^[6]。而 MEK 的阻断剂 PD98059 和 p38 的阻断剂 SB203580 可以明显阻断 TGF- β_1 的表达和 MAPK 激活^[7]。而糖尿病肾病时多种因素可以通过 MAPK 通路增强 TGF- β_1 及其下游因子结缔组织生长因子的表达^[8], 这样, TGF- β_1 和 MAPK 通路之间形成了正负反馈机制, 加速糖尿病肾病的发生发展^[9]。在本研究中也观察到, 高糖引起系膜细胞 TGF- β_1 mRNA 表达升高的同时, 也伴有 FN mRNA 及细胞上清液 FN 和 IV 型胶原蛋白含量的增加。提示高糖状态下可以通过诱导 TGF- β_1 表达增加来促进 ECM 的产生。应用氟伐他汀后, TGF- β_1 mRNA 及 FN mRNA、细胞上清液 FN 和 IV 型胶原蛋白含量明显降低。提示氟伐他汀可以明显抑制高糖培养下系膜细胞分泌 TGF- β_1 和 ECM 的产生。这与文献^[6]报道一致。

他汀类药物的抑制高糖状态下系膜细胞 ECM 分泌的作用除了与其能够减轻 TGF- β_1 的表达有关外^[10], 也可能与通过抑制 MAPK 和 JNK/stat 信号通路, 减少肾脏细胞的氧化应激和细胞黏附因子有关^[11, 12]。本实验结果显示, 高浓度葡萄糖能够激活肾小球系膜细胞 p38 MAPK 和 CREB₁, 使其磷酸化水平明显增高, 进一步提示此信号途径可能参与了糖尿病肾病的发病过程。氟伐他汀能够抑制 p38 MAPK 激酶活化, 降低 CREB₁ 的磷酸化, 同时抑制 TGF- β_1 mRNA 和 FN mRNA 的表达和上清液 FN 和 IV 型胶原蛋白含量。提示氟伐他汀能够降低高糖状态下 TGF- β_1 的高表达可能通过抑制 p38 MAPK 信号转导通路来实现, 从而减少细胞外基质蛋白的生成, 调节细胞的增殖状态, 产生明显的肾脏保护作用。

综上所述, 氟伐他汀能够抑制高糖状态下系膜细胞的增殖状态和 TGF- β_1 的过度表达, 减少细胞外基质蛋白的生成, 可能是通过抑制 p38 MAPK 信号途径的激活, 从而产生相应的肾脏保护作用。

References

- [1] Tsiani E, Lekas P, Fantus IG, et al. High glucose-enhanced activation of mesangial cell p38 MAPK by ET-1, ANG-2 and platelet-derived growth factor [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 282: E161-E169.
- [2] Ho C, Hsu YC, Tseng CC, et al. Simvastatin alleviates diabetes-induced VEGF-mediated nephropathy via the modulation of Ras signaling pathway [J]. *Ren Fail*, 2008, 30: 557-565.
- [3] Wang LH, Duan HJ, Shi YH, et al. Effects of lovastatin on renal function and expression of phosphorylating-p38 mitogen-activated protein kinase in early diabetic glomeruli [J]. *Chin Crit Care Med (中国危重病急救医学)*, 2004, 16: 734-737.
- [4] Stenvinkel P, Rodríguez-Ayala E, Massy ZA, et al. Statin treatment and diabetes affect myeloperoxidase activity in maintenance hemodialysis patients [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2006, 1: 281-287.
- [5] Danesh FR, Sadeghi MM, Amro N, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPase / p21 signaling pathway: implications for diabetic nephropathy [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2002, 99: 8301-8305.
- [6] Kolavennu V, Zeng L, Peng H, et al. Targeting of RhoA/ROCK signaling ameliorates progression of diabetic nephropathy independent of glucose control [J]. *Diabetes*, 2008, 57: 714-723.
- [7] Fujita H, Omori S, Ishikura K, et al. ERK and p38 mediate high-glucose-induced hypertrophy and TGF-beta expression in renal tubular cells [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 286: F120-F126.
- [8] Guha M, Xu ZG, Tung D, et al. Specific down-regulation of connective tissue growth factor attenuates progression of nephropathy in mouse models of type 1 and type 2 diabetes [J]. *FASEB J*, 2007, 21: 3355-3368.
- [9] Fraser D, Brunskill N, Ito T, et al. Long-term exposure of proximal tubular epithelial cells to glucose induces transforming growth factor-beta 1 synthesis via an autocrine PDGF loop [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163: 2565-2567.
- [10] Usui H, Shikata K, Matsuda M, et al. HMG-CoA reductase inhibitor ameliorates diabetic nephropathy by its pleiotropic effects in rats [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18: 265-272.
- [11] Yu HY, Inoguchi T, Nakayama M, et al. Statin attenuates high glucose-induced and angiotensin II-induced MAP kinase activity through inhibition of NAD(P)H oxidase activity in cultured mesangial cells [J]. *Med Chem*, 2005, 1: 461-466.
- [12] Banas-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 [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 291: F116-F121.