

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00241

p38MAPK 对大鼠肾小球系膜细胞表达 NF- κ B 和 COX-2 的调控

魏倩萍¹, 邓华聪^{1*}, 赵 劫²

1. 重庆医科大学第一附属医院内分泌科, 重庆 400016

2. 重庆医科大学超声工程研究所, 重庆 400016

[摘要] **目的:**探讨 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 和环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 之间的关系, 从而研究 p38MAPK 和 NF- κ B、COX-2 在糖尿病肾病中的作用机制。**方法:**分别以一定浓度的高葡萄糖(25 mmol/L)、高胰岛素(100 mmol/L)、过氧化氢(100 μ mol/L)和糖基化终产物(100 mg/L)孵育大鼠肾小球系膜细胞系 HBZY-1 一定时间;先分别以一定浓度的 p38MAPK 特异抑制剂 SB203580(10 μ mol/L)预处理细胞系 HBZY-1,再给予上述 4 种因素孵育细胞系 HBZY-1,观察细胞系 HBZY-1 p38MAPK、NF- κ B 和 COX-2 的表达。**结果:**高葡萄糖、高胰岛素、过氧化氢和糖基化终产物均可独立激活 p38MAPK,使其磷酸化表达量增加,NF- κ B、COX-2 表达也明显增加,与对照组比较有显著性差异($P < 0.01$);SB203580 预处理后,NF- κ B、COX-2 表达显著降低,与相应刺激组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论:**p38MAPK 可通过激活 NF- κ B、COX-2 而诱导 DM 时肾脏的损害, p38MAPK 和 NF- κ B、COX-2 在糖尿病肾病的发生发展过程中可能起重要作用。

[关键词] p38 丝裂原活化蛋白激酶类;NF- κ B;环氧化酶 2;糖尿病肾病;肾小球系膜细胞

[中图分类号] R 587.24

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2008)03-0241-04

Role of p38MAPK in regulating expression of NF- κ B and COX-2 in rat mesangial cell

WEI Qian-ping¹, DENG Hua-cong^{1*}, ZHAO Jie²

1. Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Institute of Ultrasonic Engineering, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the relationship between p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), nuclear factor- κ B (NF- κ B) and cyclooxygenase-2 (COX-2), so as to study the roles of p38MAPK, NF- κ B and COX-2 in diabetic nephropathy. **Methods:** Rat mesangial cell line HBZY-1 was incubated with certain concentrations of glucose(25 mmol/L), insulin (100 mmol/L), H₂O₂ (100 mmol/L) and glycation endproducts (AGEs) (100 mg/L) with or without pretreatment with SB203580, a specific inhibitor of p38MAPK, then the expression of p38MAPK, NF- κ B and COX-2 in the HBZY-1 cells was examined. **Results:** High glucose, high insulin, H₂O₂ and AGEs independently activated p38MAPK, increased p38MAPK phosphorylation, and significantly up-regulated the expression of NF- κ B and COX-2 compared with the control group ($P < 0.01$). Pretreatment with SB203580 significantly decreased expression of NF- κ B and COX-2 compared with the corresponding stimulating group ($P < 0.01$). **Conclusion:** p38MAPK may induce renal damage during diabetic nephropathy by activating NF- κ B and COX-2, indicating that p38MAPK, NF- κ B and COX-2 may play important roles in the development of diabetic nephropathy.

[KEY WORDS] p38 mitogen-activated protein kinases; nuclear factor-kappa B; cyclooxygenase-2; diabetic nephropathy; mesangial cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(3): 241-244]

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病(diabetes, DM)最常见、最严重的慢性并发症,随着 DM 发病率的逐年提高, DN 已成为导致慢性肾

功能衰竭的主要病因之一。其主要病理变化表现为肾小球、肾小管肥大,基底膜增厚,肾小球系膜区细胞外基质(extracellular matrix, ECM)堆积以及肾

[收稿日期] 2007-08-09 **[接受日期]** 2007-11-08

[基金项目] 国家自然科学基金(30570744). Supported by National Natural Science Foundation of China(30570744).

[作者简介] 魏倩萍, 博士, 副教授. E-mail: wqp68894940@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 023-68700611, E-mail: deng_huacong@yahoo.com.cn

小球硬化。近年来有研究表明 NF- κ B 和 COX-2 与糖尿病肾病有密切关系^[1-2]。p38MAPK 是细胞信号传递的交汇点或共同通路^[3],但在糖尿病肾病发生中的作用及其与 NF- κ B、COX-2 的关系仍不清楚。

本研究在体外模拟糖尿病状态,探讨糖尿病时存在的各种应激如高葡萄糖(HG)、高胰岛素(HI)、过氧化氢和糖基化终产物(advanced glycosylation end products, AGEs)对大鼠肾小球系膜细胞系 HBZY-1 p38MAPK、NF- κ B 和 COX-2 表达的影响及三者间的关系,从而明确 p38MAPK 与 NF- κ B、COX-2 在糖尿病肾病形成中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠肾小球系膜细胞系 HBZY-1(中国典型培养物保藏中心 CCTCC);新生牛血清及 RPMI 1640 培养液(北京中山生物技术有限公司);蛋白质相对分子质量标记物(Bio-Rad 公司);磷酸化 p38MAPK 兔多抗(Promega 公司);COX-2 兔多抗和 NF- κ B 兔多抗(美国 Santa Cruz 公司);第二抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(北京中山生物技术有限公司);p38MAPK 特异抑制剂 SB203580(Promega 公司)。

1.2 大鼠肾小球系膜细胞系 HBZY-1 的培养 细胞系 HBZY-1 培养于含 200 ml/L 灭活新生牛血清的 RPMI-1640 培养液中,培养条件为 37℃,饱和湿度体积分数 5% CO₂,每 2~3 d 用 0.2 g/L 乙二胺四乙酸(EDTA)消化传代,待细胞系 HBZY-1 长至培养瓶底 40%后分为 9 组,以无血清培养液饥饿 24 h,然后按实验分组加入刺激(及干预)因素。

1.3 体外制备 AGEs 参考文献^[4],按牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)50 g/L,与葡萄糖 90 g/L,0.5 mmol/L EDTA 及 0.2 mmol/L PBS (pH 7.4)混匀后过滤除菌,在体外于 37℃恒温培养箱孵育 60 d,0.1 mol/L PBS(pH 7.4)中透析 48 h,制备结束后 AGEs 用考马斯亮蓝法测定蛋白含量,并测定其荧光强度,分装后于 -70℃冰箱避光保存备用。

1.4 实验分组 分别以一定浓度 HG、HI、H₂O₂ 和 AGEs 刺激细胞系 HBZY-1 一定时间;先给予 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 10 μ mol/L 预处理 30 min,再分别以上述 4 种刺激因素(浓度、时间同前)孵育细胞系 HBZY-1,同时设对照组。详细分组情况如下:(1)对照组:用等体积 0.01 mol/L

PBS(pH 7.4)孵育细胞系 HBZY-1;(2)HG 组:用 25 mmol/L 葡萄糖刺激 HBZY-1 细胞 72 h;(3)HI 组:用 100 nmol/L 胰岛素刺激 HBZY-1 细胞 24 h;(4)H₂O₂ 组:用 100 μ mol/L H₂O₂ 刺激 HBZY-1 细胞 1 h;(5)AGEs 组:用 100 mg/L AGEs 刺激 HBZY-1 细胞 6 h;(6)SB+HG 组:依次以 10 μ mol/L SB203580 和 25 mmol/L 葡萄糖分别刺激 HBZY-1 细胞 30 min 和 72 h;(7)SB+HI 组:依次以 10 μ mol/L SB203580 和 100 nmol/L 胰岛素分别刺激 HBZY-1 细胞 30 min 和 24 h;(8)SB+H₂O₂ 组:依次以 10 μ mol/L SB203580 和 100 mol/L H₂O₂ 分别刺激 HBZY-1 细胞 30 min 和 1 h;(9)SB+AGEs 组:依次以 10 μ mol/L SB203580 和 100 mg/L AGEs 分别刺激 HBZY-1 细胞 30 min 和 6 h。

1.5 Western 印迹法检测 p38MAPK、NF- κ B 和 COX-2 蛋白表达 培养的细胞系 HBZY-1 经 4℃胞质蛋白提取液裂解,提取物在冰上孵育 2 h,然后 12 000 \times g 4℃离心 10 min,沉淀加入 4℃预冷核蛋白提取液,震荡混匀,冰浴 1 h,12 000 \times g 4℃离心 30 min,取上清为核蛋白,胞质蛋白和核蛋白浓度经考马斯亮蓝法定量。磷酸化 p38MAPK 蛋白表达量采用 Western 印迹法检测,核蛋白和胞质蛋白中分别加入等体积 2 \times 上样缓冲液煮沸 5 min。进行 10 mol/L SDS-PAGE,蛋白转至 PVDF 膜后用 5 g/L BSA 室温下封闭 2 h,分别用 1:2 000 抗磷酸化 p38MAPK 兔多抗,1:200 COX-2 兔多抗和 1:500 NF- κ B 兔多抗 4℃孵育过夜,用 0.01 mol/L PBS 充分洗涤,再分别用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 1:5 000,37℃孵育 1 h,用 0.01 mol/L PBS 充分洗涤,DAB 显色试剂盒显色。结果经图像分析系统对目的条带进行扫描和密度分析。

1.6 统计学处理 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间计量资料比较采用 SAS 8.0 统计分析软件包进行 F 分析,再作两两比较 *t* 检验, $P < 0.05$ 即认为有统计学差异。

2 结果

2.1 细胞系 HBZY-1 磷酸化 p38MAPK 蛋白表达 从图 1 可见,分别以 HG、HI、H₂O₂ 和 AGEs 刺激细胞系 HBZY-1,其磷酸化 p38MAPK 蛋白表达量明显增加(分别为 1.559 4 \pm 0.060 9、1.471 5 \pm 0.046 9、1.470 0 \pm 0.050 3、1.358 2 \pm 0.047 3),与对照组(0.296 9 \pm 0.013 9)比较有显著性差异($P < 0.01$,图 1)。

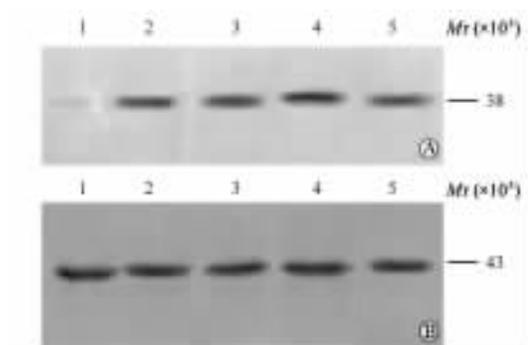


图1 Western 印迹法检测各组细胞系 HBZY-1 磷酸化 p38MAPK 蛋白和 β -actin 蛋白表达

Fig 1 Western blotting analysis of protein expression of phospho-p38MAPK and β -actin in HBZY-1 cells

1:Control;2:HG;3:HI;4:H₂O₂;5:AGEs. A:Phospho-p38MAPK; B: β -actin

2.2 细胞系 HBZY-1 NF- κ B 蛋白表达 从图 2 可见,分别以 HG、HI、H₂O₂ 和 AGEs 刺激细胞系 HBZY-1,其 NF- κ B 蛋白表达量明显增加(分别为 1.4604 ± 0.0584 、 1.3908 ± 0.0492 、 1.3904 ± 0.0490 、 1.2615 ± 0.0427),与对照组(0.2176 ± 0.0108)比较有显著性差异($P < 0.01$)。当予以 SB203580 预处理后,再分别以上述 4 种刺激因素孵育细胞系 HBZY-1,可见其 NF- κ B 蛋白表达量分别较相应未经 SB203580 预处理组显著降低(分别为 0.2821 ± 0.0114 、 0.3066 ± 0.0087 、 0.3430 ± 0.0129 、 0.3129 ± 0.0117),差异有统计学意义($P < 0.01$),但与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$,图 2)。

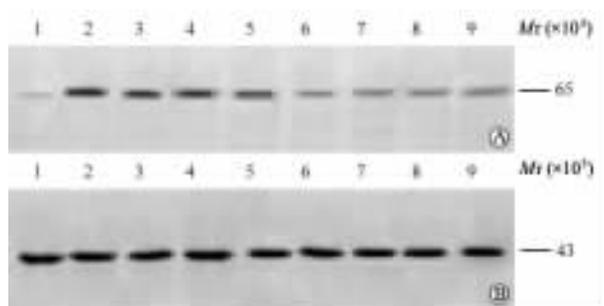


图2 Western 印迹法检测各组细胞系 HBZY-1 NF- κ B 蛋白和 β -actin 蛋白表达

Fig 2 Western blotting analysis of protein expression of NF- κ B and β -actin in HBZY-1 cells

1:Control;2:HG;3:HI;4:H₂O₂;5:AGEs;6:SB203580 + HG;7:SB203580 + HI;8:SB203580 + H₂O₂;9:SB203580 + AGEs. A: NF- κ B; B: β -actin

2.3 细胞系 HBZY-1 COX-2 蛋白表达 从图 3 可见,分别以 HG、HI、H₂O₂ 和 AGEs 刺激细胞系

HBZY-1,其 COX-2 蛋白表达量明显增加(分别为 1.5625 ± 0.0777 、 1.3693 ± 0.0377 、 1.5263 ± 0.0554 、 1.6319 ± 0.0643),与对照组(0.2713 ± 0.0130)比较有显著性差异($P < 0.01$)。当给予 SB203580 预处理后,再分别以上述 4 种刺激因素孵育细胞系 HBZY-1,可见其 COX-2 蛋白表达量分别较相应未经 SB203580 预处理组显著降低(分别为 0.3310 ± 0.0097 、 0.3628 ± 0.0149 、 0.3409 ± 0.0188 、 0.3115 ± 0.0154),差异有统计学意义($P < 0.01$),但与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$,图 3)。

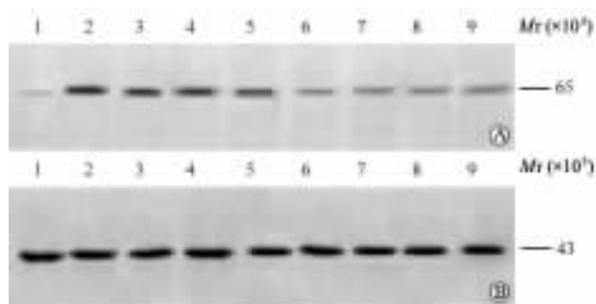


图3 Western 印迹法检测各组细胞系 HBZY-1 COX-2 蛋白和 β -actin 蛋白表达

Fig 3 Western blotting analysis of protein expression of COX-2 and β -actin in HBZY-1 cells

1:Control;2:HG;3:HI;4:H₂O₂;5:AGEs;6:SB203580 + HG;7:SB203580 + HI;8:SB203580 + H₂O₂;9:SB203580 + AGEs. A:COX-2; B: β -actin

3 讨论

本研究结果显示 HG、HI、H₂O₂ 和 AGEs 均可单独诱导细胞系 HBZY-1,使其 p38MAPK 磷酸化表达增加,NF- κ B 和 COX-2 蛋白表达也显著增加;结合文献^[5-8]和实验结果,我们认为其机制有以下几点。

3.1 4 种刺激因素诱导细胞系 HBZY-1 p38MAPK 磷酸化表达增加 (1)高糖通过高渗透压直接激活 p38MAPK;(2)高糖通过诱导细胞系 HBZY-1 产生活性氧簇(reactive oxygen species, ROS),而 ROS 可激活 p38MAPK;(3)H₂O₂ 可诱导 p38MAPK 激活;(4)AGEs 直接产生 ROS,或通过细胞系 HBZY-1 AGEs 受体产生 ROS,从而诱导 p38MAPK 激活;(5)高胰岛素血症可引起血糖增高,而高血糖可导致细胞系 HBZY-1 p38MAPK 激活。

3.2 4 种刺激因素诱导细胞系 HBZY-1 NF- κ B 活性增高

3.2.1 直接引起细胞系 HBZY-1 NF- κ B 活性增高

(1)高糖状态下通过细胞系 HBZY-1 线粒体内的糖氧化、脂肪氧化、体内糖基化蛋白质氧化以及细胞质内醛糖还原反应等产生大量 ROS,此外也可使 PGs 合成增多,从而产生大量的 ROS,ROS 可直接激活 NF- κ B,使下游靶基因转录活性增强,进而产生更多的炎症性细胞因子,进一步增加 ROS 的生成,二者构成级联反应,形成恶性循环,导致 NF- κ B 活性持续增高;(2)高糖本身可直接激活 NF- κ B;(3)高糖可使蛋白激酶 C(PKC)活性增高,通过 PKC 途径诱导 NF- κ B 的活化;(4) AGEs 和 AGEs 受体 (RAGE) 相互作用使 I κ B 磷酸化而导致 NF- κ B 的激活;NF- κ B 的激活作为一种正反馈,又进一步促进了 AGEs 与细胞系 HBZY-1 的结合,导致 NF- κ B 的持续活化;(5)H₂O₂ 诱导细胞系 HBZY-1 氧化应激,导致 ROS 大量生成,从而诱导 NF- κ B 的激活;(6)高胰岛素可使细胞系 HBZY-1 对胰岛素的敏感性降低,引起血糖增高,从而导致 NF- κ B 的激活。

3.2.2 通过激活 p38MAPK 而间接激活 NF- κ B

有关 p38MAPK 与 NF- κ B 二者之间的相互关系目前仍不十分清楚,但国外研究显示,p38MAPK 和 JNK 的激活与转录因子 NF- κ B 和 AP-1 活性增高相关联^[5-9];p38MAPK 信号通路的激活能促进 I κ B α 双磷酸化和降解,从而直接激活 NF- κ B 通路,提示 p38MAPK 可能通过激活 NF- κ B 而诱导 DM 时肾脏的损害。

3.3 3 种刺激因素引起细胞系 HBZY-1 COX-2 蛋白表达增高 (1)激活 MAPKs 信号通路,活化 COX-2 基因转录,诱导 COX-2 高表达;(2)通过激活 PKC 信号通路,使 COX-2 表达上调;(3)通过 PKC-NF- κ B 途径刺激细胞系 HBZY-1 上调 COX-2 表达。

本研究结果还显示,p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580,可显著抑制 NF- κ B 和 COX-2 蛋白表达,提示 COX-2 和 NF- κ B 表达受 p38MAPK 调控,p38MAPK 是 COX-2 和 NF- κ B 的上游激酶之一,p38MAPK、COX-2 和 NF- κ B 的异常活化在糖尿病

肾病的发生发展过程中可能起重要作用。

[参考文献]

- [1] Xu Z G, Li S L, Lanting L, Kim Y S, Shanmugam N, Reddy M A, et al. Relationship between 12/15-lipoxygenase and COX-2 in mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2006, 69: 512-519.
- [2] Lee F T, Cao Z, Long D M, Panagiotopoulos S, Jerums G, Cooper M E, et al. Interactions between angiotensin II and NF- κ B-dependent pathways in modulating macrophage infiltration in experimental diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15: 2139-2151.
- [3] Sakai N, Wada T, Furuichi K, Iwata Y, Yoshimoto K, Kitagawa K, et al. Involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 in human diabetic nephropathy[J]. *Am J Kidney Dis*, 2005, 45: 54-65.
- [4] Makita Z, Vlassara H, Cerami A, Rucala R. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products *in vivo* [J]. *J Biol Chem*, 1992, 267: 5133-5138.
- [5] Medeiros R, Cabrini D A, Ferreira J, Fernandes E S, Mori M A, Pesquero J B, et al. Bradykinin B1 receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein a critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B signaling pathways[J]. *Circ Res*, 2004, 94: 1375-1382.
- [6] Yabuki A, Tahara T, Taniguchi K, Matsumoto M, Suzuki S. Neuronal nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in diabetic nephropathy of type 2 diabetic OLETF rats[J]. *Exp Anim*, 2006, 55: 17-25.
- [7] Karrasch T, Steinbrecher K A, Allard B, Baldwin A S, Jobin C. Wound-induced p38MAPK-dependent histone H3 phosphorylation correlates with increased COX-2 expression in enterocytes [J]. *J Cell Physiol*, 2006, 207: 809-815.
- [8] Syeda F, Grosjean J, Houliston R A, Keogh R J, Carter T D, Paleolog E, et al. Cyclooxygenase-2 induction and prostacyclin release by protease-activated receptors in endothelial cells require cooperation between mitogen-activated protein kinase and NF- κ B pathways [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 11792-11804.
- [9] Donadelli R, Zanchi C, Moriqi M, Buelli S, Batani C, Tomasoni S, et al. Protein overload induces fractalkine upregulation in proximal tubular cells through nuclear factor κ B- and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathways[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14: 2436-2446.

[本文编辑] 尹 茶