

致密斑细胞 COX-2 的表达及 AP-1、NF- κ B 信号通路

刘冬妍, 李学旺, 李 航, 李雪梅, 叶文玲

中国医学科学院 中国协和医科大学 北京协和医院肾内科, 北京 100730

通信作者: 李学旺 电子邮件: leexuewang@hotmail.com

摘要: 目的 评估低盐 (LS) 培养对小鼠致密斑 (MMDD1) 细胞环氧化酶 -2 (COX-2) 表达及核因子- κ B (NF- κ B) 和活化蛋白-1 (AP-1) 活性的影响。方法 经脂质体转染含 NF- κ B 或 AP-1 的报告质粒, 采用瞬时表达方法检测正常盐 (NS) 与 LS 培养对 NF- κ B 和 AP-1 转录活性的影响。采用 RT-PCR 检测 MMDD1 细胞 COX-2 表达的变化, Western blot 方法检测细胞内 p-p38 MAPK、p-p44/42、c-Jun、c-Fos 和 COX-2 蛋白的表达。结果 LS 培养促进了 MMDD1 细胞 COX-2 mRNA 和蛋白表达 ($P < 0.01$)。LS 培养后, p38 和 p44/42 的磷酸化程度显著上调 ($P < 0.01$), 180 min 后达到高峰。p38 抑制剂 SB-203580、p44/42 抑制剂 PD-98059 可降低 LS 诱导的 COX-2 表达 ($P < 0.01$)。LS 培养促进了 c-Jun、c-Fos 蛋白表达 ($P < 0.01$), 激活了 AP-1 和 NF- κ B 的转录活性 ($P < 0.01$)。25 $\mu\text{mol/L}$ NF- κ B 抑制剂 PDTC 和 20 $\mu\text{mol/L}$ AP-1 抑制剂 curcumin 下调了 LS 诱导的 NF- κ B、AP-1 活性 ($P < 0.01$)。25 $\mu\text{mol/L}$ PDTC、20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin 降低了 LS 诱导的 COX-2 mRNA 和蛋白表达 ($P < 0.01$)。结论 LS 培养可促进 MMDD1 细胞 COX-2 的表达, 其作用可能与促进 p38MAPK、p44/42 激酶的磷酸化, 增加 NF- κ B 和 AP-1 的活性有关。

关键词: 环氧化酶 -2; 核因子- κ B; 活化蛋白-1; 质粒; 丝裂素激活蛋白激酶

中图分类号: R334⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-503X(2007)01-0078-05

Expression of Cyclooxygenase-2 in a Mouse Macula Densa Cell Lines and Signal Transduction of NF- κ B and AP-1

LIU Dong-yan, LI Xue-wang, LI Hang, LI Xue-mei, YE Weng-ling

Department of Nephrology, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China

Corresponding author: LI Xue-wang E-mail: leexuewang@hotmail.com

ABSTRACT: Objective To evaluate the effect of low salt (LS) on the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and the activity of nuclear factor kappa B (NF- κ B) and activator protein-1 (AP-1) in the mouse macula densa derived (MMDD1) cell line. **Methods** MMDD1 cells were transfected with luciferase reporter plasmid containing AP-1 or NF- κ B. Luciferase reporter assay was used to evaluate the effect of normal salt (NS) and low salt (LS) on the activities of NF- κ B and AP-1. The changes of COX-2 expression were examined by RT-PCR. The expression of p-p38 MAPK, p-p44/42, c-Jun, c-Fos, and COX-2 in MMDD1 cells were analyzed by Western blot. **Results** The expressions of COX-2 mRNA and protein in MMDD1 cells were significantly increased by LS ($P < 0.01$). Phosphorylated p38 and p44/42 MAPkinase were significantly increased by treatment at 180 min ($P < 0.01$). The up-regulated COX-2 protein expression with LS were significantly reduced with SB 203580 (p38 inhibitors) and PD-98059 (p44/42 inhibitors) ($P < 0.01$). The expressions of c-Jun and c-Fos were increased by LS. The luciferase activities of AP-1 and NF- κ B were stimulated

in LS ($P < 0.01$), the up-regulated luciferase activities were attenuated by PDTC at 25 $\mu\text{mol/L}$ (NF- κ B inhibitor) and curcumin at 20 $\mu\text{mol/L}$ (AP-1 inhibitor) ($P < 0.01$). LS altered COX-2 mRNA abundance and protein expression were decreased in treatment with PDTC at 25 $\mu\text{mol/L}$, curcumin at 20 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$).

Conclusion LS can induce the expression of COX-2 in MMDD1 cells, which may be involved in the activation of p38 MAPkinase, p44/42 kinase, AP-1, and NF- κ B pathways.

Key words: cyclooxygenase-2; nuclear factor kappa B; activator protein-1; plasmid; mitogen-activated protein kinase

Acta Acad Med Sin, 2007, 29(1): 78-82

致密斑 (macula densa, MD) 细胞毗邻于具有分泌肾素功能的球旁器细胞和球外系膜细胞, 在肾脏调节水盐代谢过程中发挥重要作用。在各种高肾素动物模型中, 如给动物低盐饮食、血管紧张素转换酶抑制剂 (angiotension converting enzyme inhibitor, ACEI)、袢利尿剂及实验性肾血管性高血压模型, MD 细胞/近皮质的髓袢升枝粗段 (cortical thick ascending limb, cTALH) 细胞环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) mRNA 和蛋白水平都显著增加^[1]。研究显示, 丝裂素激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和核因子- κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 可介导脱水诱导的肾脏髓质细胞 COX-2 表达^[2,3]。本研究探讨小鼠致密斑细胞株 (macula densa, MMDD1) 细胞 COX-2 表达的可能细胞分子机制。

材料和方法

细胞株及主要试剂 MMDD1 细胞由美国尤他州立大学 Yang Tianxing 教授惠赠, DMEM/F12、胎牛血清均自美国 GIBCO 公司, 抗 COX-2 抗体均自美国 Cayman 公司, 抗磷酸化 p38、抗磷酸化 Erk、抗 c-Fos、抗 c-Jun 和抗 Actin 抗体均自美国 Santa Cruz 公司。正常盐培养液为 DMEM/F12 和等渗盐水按 1:1 混合; 低盐培养液为 DMEM/F12 和 0.3 mol/L 甘露醇按 1:1 配制。SB-203580 (p38 抑制剂) PD-98059 (p44/42 抑制剂) 均自美国 Sigma 公司。Opti-MEN I 培养液均自美国 GIBCO 公司, Lipofectamine 2000 均自美国 Invitrogen 公司。质粒 pAP1-Luc 载体、pNF κ B-Luc 载体和 pRL-SV40 载体由中国医学科学院基础医学研究所生化教研室王爱冰、李红良博士馈赠。

质粒的扩增和鉴定 按常规方法将宿主菌制成感受态状态的细胞悬液, 在 100 μl 感受态细胞中加入 10 μl 连接反应液, 先后经冰浴、热休克等处理

后, 涂布于预先涂有氨苄青霉素的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 10 ~ 12 h, 挑选单菌落, 于培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜, 离心后弃上清, 依次加入细胞悬浮液和细胞裂解液, 按试剂盒说明收获质粒。取适量 CsCl 抽提后 DNA 产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳分析, 并测序。

细胞的脂质体转染 按照试剂盒说明, 将含有报告质粒 (AP-1 质粒或 NF- κ B 质粒) 和内对照质粒的无血清与适量转染试剂混匀。室温静置 15 min 后, 转移至生长 MMDD1 的培养基中, 并设 3 孔未经转染的 MMDD1 作为酶活性的基础对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 、CO $_2$ 孵箱内孵育 6 h。弃去培养基, 换用正常盐 (normal salt, NS)、低盐 (low salt, LS) 培养液继续培养 16 h。弃去培养基, 用 PBS 冲洗 2 次, 加入 100 μl 裂解缓冲液 (passive lysis buffer, PLB) 裂解细胞, 测定相对荧光素酶活性。

RT-PCR 将细胞分为 NS、LS、LS + SB-203580 (10 $\mu\text{mol/L}$)、LS + SB-203580 (20 $\mu\text{mol/L}$)、LS + PD-98059 (10 $\mu\text{mol/L}$)、LS + PD-98059 (20 $\mu\text{mol/L}$)、LS + curcumin (AP-1 特异性抑制剂) (20 $\mu\text{mol/L}$) 和 LS + PDTC (NF- κ B 特异性抑制剂) (25 $\mu\text{mol/L}$) 共 8 组, 16 h 后采用 Trizol 法抽提细胞总 RNA。COX-2 引物序列: 上游 5'-ACACTCTATCACTGGCATCC-3'; 下游 5'-GAAGGGACACCCTTTCACAT-3'。GAPDH 引物序列: 上游 5'-AAGGGTGGAGCCAAACGG-3'; 下游 5'-GGGGTAGGAACACGGAA-3'。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 30 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物在 1.8% 琼脂糖凝胶电泳中分离, 凝胶成像系统拍照分析, 计算特异扩增条带的总吸光度值, 并以相应的 GAPDH 值进行校正。

Western blot LS 培养 30、60、180 min 和 NS 培养 180 min 后提取总蛋白检测 p38、pErk。NS、LS 培养 16 h 后提取细胞总蛋白检测 c-Fos、c-Jun, 28 h 后提取细胞总蛋白检测 COX-2。收集细胞总蛋

白, 加入含有蛋白酶抑制剂 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin, 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepsatin) 的蛋白裂解液 (0.01 mol/L PBS, 1% NP-40, 1 mmol/L EDTA, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS) 裂解细胞。冰浴中超声破碎细胞, 10 s 1 次, 共 5~6 次。冰浴 30 min, 12 000 g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 收集上清。蛋白检测试剂盒定量。按测定的蛋白浓度, 取适量待测样品与上样缓冲液 (100 mmol/L Tris-Cl pH 6.8, 4% SDS, 20% 甘油, 0.2% 溴酚兰, 200 mmol/LDTT) 以 1:1 混合, 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min。取 30~100 μg 蛋白按常规方法进行 SDS-PAGE 电泳。COX-2 的分离胶浓度为 8%。c-Fos、c-Jun 的分离胶浓度是 10%, p38、pErk 分离胶为 12%。

统计学处理 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.5 软件进行单因素方差分析, 方差具有齐性时用 S-N-K 检验, 方差不齐用 Tamhane's T_2 检验进行各组间比较。所有数据均重复 3 次, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

结 果

质粒的鉴定 pAPI-Luc vector、pNF κ B-Luc vector 是环形质粒, 全长均为 5 000 bp, 经电泳后得到的条带在 6 557~9 416 bp 间 (图 1)。

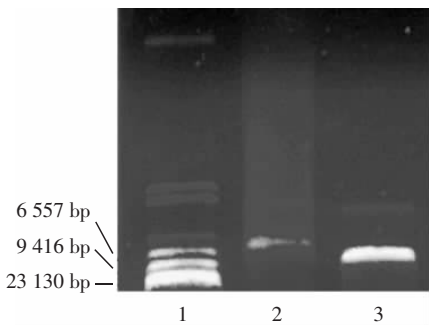


图 1 质粒 DNA 凝胶电泳图

Fig 1 Electrophoresis of plamid in agarose gel

1. DNA 梯度; 2. AP-1 荧光质粒; 3. NF κ B 质粒
1. DNA ladder; 2. pAPI-Luc vector; 3. pNF κ B-Luc vector

各组磷酸化 p38MAPK 和 p44/42 激酶的表达

LS 培养显著增加 MMDD1 细胞 p38MAPK 和 p44/42 的磷酸化程度 (图 2), LS 180 min 组磷酸化程度比较明显, 分别为 LS 0 min 组的 1.65 倍和 6.4 倍 ($P < 0.01$), 各组总 p38 和 p44/42 无明显改变。

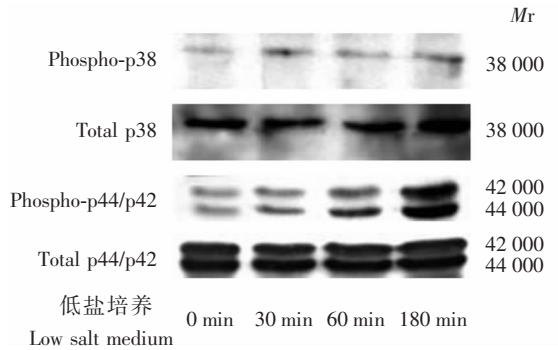


图 2 MMDD1 细胞磷酸化 p38、p44/p42 的表达

Fig 2 Expressions of pp38 and pp44/p42 in MMDD1 cells

- Mr: 相对分子质量
Mr: relative molecular mass

各组 NF- κ B 和 AP-1 转录活性的变化 LS 培养明显激活 MMDD1 细胞内 NF κ B 和 AP-1 的转录活性, 分别上调了 219.4% 和 125.9% ($P < 0.01$)。25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ NF κ B 抑制剂 PDTIC 将 LS 诱导的 NF κ B 转录活性下调了 66.3%, 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ AP-1 抑制剂 curcumin 将 LS 诱导的 AP-1 转录活性降低了 49.3%。

各组 MMDD1 细胞 c-Jun 和 c-Fos 蛋白表达 LS 培养促进 MMDD1 细胞 c-Jun、c-Fos 蛋白表达, 分别是 NS 组的 1.27 倍和 1.24 倍 ($P < 0.01$) (图 3)。

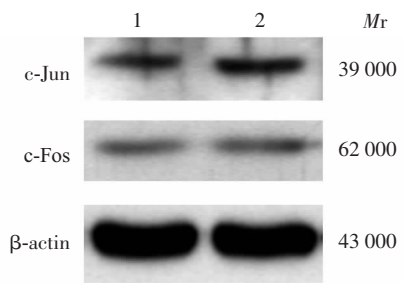


图 3 MMDD1 细胞 c-Jun、c-Fos 蛋白表达

Fig 3 Expressions of c-Jun and c-Fos in MMDD1 cells

1. 正常盐培养; 2. 低盐培养
1. normal salt medium; 2. low salt medium

各组 MMDD1 细胞 COX-2mRNA 表达 LS 培养促进 COX-mRNA 表达, 较 NS 组升高了 261.5% ($P < 0.01$), 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 、20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ p38 抑制剂 SB-203580 和 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ p44/42 抑制剂 PD-98059 明显抑制了 LS 诱导的 MMDD1 细胞 COX-2 mRNA, 使其下调 24.1%、37.9% ($P < 0.01$) (图 4)。

25 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PDTIC 和 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ curcumin 抑制 LS 诱导的 MMDD1 细胞 COX-2 mRNA 表达, 使其分别下降了 52.0% 和 48.1% ($P < 0.01$) (图 5)。

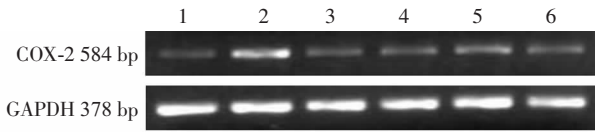


图 4 COX-2 mRNA 表达

Fig 4 Expression of COX-2 mRNA

1. 正常盐; 2. 低盐; 3. 低盐 + 10 $\mu\text{mol/L}$ SB - 203580; 4. 低盐 + 20 $\mu\text{mol/L}$ SB - 203580; 5. 低盐 + 10 $\mu\text{mol/L}$ PD - 98059; 6. 低盐 + 20 $\mu\text{mol/L}$ PD - 98059

1. NS; 2. LS; 3. LS + 10 $\mu\text{mol/L}$ SB - 203580; 4. LS + 20 $\mu\text{mol/L}$ SB - 203580; 5. LS + 10 $\mu\text{mol/L}$ PD - 98059; 6. LS + 20 $\mu\text{mol/L}$ PD - 98059

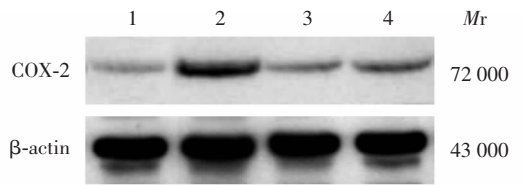


图 7 PDTC 和 curcumin 对 COX-2 蛋白表达的影响

Fig 7 Effects of PDTC and curcumin on the expression of COX-2 protein

1. 正常盐; 2. 低盐; 3. 低盐 + 25 $\mu\text{mol/L}$ PDTC; 4. 低盐 + 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin

1. NS; 2. LS; 3. LS + 25 $\mu\text{mol/L}$ PDTC; 4. LS + 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin

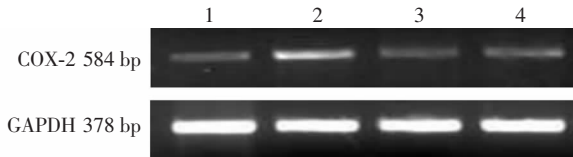


图 5 PDTC 和 curcumin 对 COX-2 mRNA 表达的影响

Fig 5 Effects of PDTC and curcumin on the expression of COX-2 mRNA

1. 正常盐; 2. 低盐; 3. 低盐 + 25 $\mu\text{mol/L}$ PDTC; 4. 低盐 + 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin

1. NS; 2. LS; 3. LS + 25 $\mu\text{mol/L}$ PDTC; 4. LS + 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin

讨 论

MD 细胞毗邻于具有分泌肾素功能的球旁器细胞和球外系膜细胞, 在肾脏调节水盐代谢过程中有重要作用。在各种高肾素动物模型中, MD 细胞 COX-2 表达增加, 目前有关 MD 细胞内 COX-2 的表达调控机制还不是很清楚。

COX-2 基因表达受多个程序调控。Cheng 等^[4]在 LS 饮食的动物肾脏皮质 MD 和 cTALH 细胞处检测到高表达的磷酸化 p38, 这提示 LS 诱导的 COX-2 表达及 PGE₂ 释放可能由 p38MAPK 途径调控。本研究进一步证实, LS 培养可诱导 MMDD1 细胞内 p38MAPK 和 p44/42 快速磷酸化, 并于 180 min 时达到高峰, 磷酸化时间明显早于 COX-2 mRNA 和蛋白的高峰时间^[5], p38MAPK 和 p44/42 通路选择性阻断剂 SB-203580 和 PD-98059 能显著下调 LS 诱导的 COX-2 mRNA 和蛋白表达及 PGE₂ 的释放, 提示 LS 诱导的 COX-2 表达增加可能是通过激活 p38MAPK 和 p44/42 激酶的活性实现的。除转录水平外, Cheng 等^[4]研究还发现 LS 培养可促进兔 cTALH 细胞 COX-2 表达, 加用 MAPK 阻断剂后 COX-2 mRNA 的半衰期显著降低, 表明 MAPK 对于在转录后水平确保 COX-2 mRNA 的稳定性也是至关重要的。

有关髓质间质细胞的研究显示, 高渗条件下有更多的 p 65 和 p 50 结合于 COX-2 启动子的 NF- κ B 位点上。经 NF- κ B 的显性基因负性抑制剂 (IkBmut) 转导后, 由高渗诱导的 COX-2 mRNA 和蛋白表达受到明显抑制, 提示脱水通过活化 NF- κ B 途径, 诱导髓质间质细胞表达 COX-2^[3]。本研究发现 MMDD1 细胞瞬时转染 NF- κ B 荧光质粒后, LS 培养可明显上调 NF- κ B 的转录活性, 加用 NF- κ B 活性抑制剂 PDTC

各组 MMDD1 细胞 COX-2 蛋白表达

LS 促进 COX-2 蛋白表达, 较 NS 组升高了 136.0% ($P < 0.01$)。10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ SB-203580 及 10 和 20 $\mu\text{mol/L}$ PD-98059 明显抑制 LS 诱导的 MMDD1 细胞 COX-2 蛋白表达, 分别降低了 41.4%、67.3%、37.9% 和 48.3% ($P < 0.01$) (图 6)。25 $\mu\text{mol/L}$ PDTC 和 20 $\mu\text{mol/L}$ curcumin 抑制低盐诱导的 COX-2 蛋白表达 ($P < 0.01$), 下降了 54.0% 和 46.0% (图 7)。

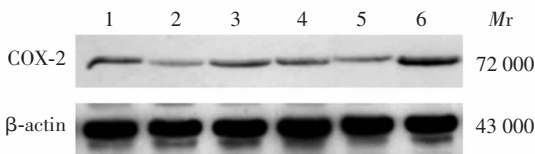


图 6 COX-2 蛋白表达

Fig 6 Expression of COX-2 protein

1. 低盐 + 10 $\mu\text{mol/L}$ SB-203580; 2. 低盐 + 20 $\mu\text{mol/L}$ SB-203580; 3. 低盐 + 10 $\mu\text{mol/L}$ PD-98059; 4. 低盐 + 20 $\mu\text{mol/L}$ PD-98059; 5. 正常盐; 6. 低盐

1. LS + 10 $\mu\text{mol/L}$ SB-203580; 2. LS + 20 $\mu\text{mol/L}$ SB-203580; 3. LS + 10 $\mu\text{mol/L}$ PD-98059; 4. LS + 20 $\mu\text{mol/L}$ PD-98059; 5. NS; 6. LS

后 COX-2 mRNA 和蛋白表达都降低, 进一步证实 LS 可能通过上调 NF- κ B 转录活性, 增加 COX-2 表达。

AP-1 是炎症、肿瘤情况下, 调节 COX-2 表达的重要转录因子, 研究发现非甾体类抗炎药可抑制 p38MAPK 的磷酸化, 抑制 c-Fos 和 c-Jun 二聚体复合物与 AP-1 DNA 位点的结合, 下调 AP-1 的活性, 从而降低 COX-2 表达^[6]。本研究发现瞬时转染 AP-1 质粒后, LS 培养促使细胞内 c-Jun 和 c-Fos 蛋白表达, 增加 AP-1 的转录活性。Curcumin 抑制 c-Fos 和 c-Jun 二聚体复合物的形成, 从而抑制 LS 诱导的 AP-1 转录活性, 降低 LS 诱导增加的 COX-2 表达。这说明 LS 培养很可能通过某些途径激活 c-Jun 和 c-Fos 蛋白, 促使二聚体结合到 COX-2 基因 AP-1 位点上, 促进 COX-2 基因转录。Woo 等^[7]却发现巨噬细胞内 p38MAPK 对 COX-2 表达有正向调节作用, 而 c-Jun (JNK 通路) 对其有负向调节作用。

综上所述, LS 可诱导 MMDD1 细胞 COX-2 表达增加, 其作用机制可能是多途径的。本研究结果初步表明, MMDD1 细胞内 COX-2 的表达与 p38MAPK、p44/p42 激酶的磷酸化, AP-1 和 NF- κ B 转录活性的增加密切相关。

参 考 文 献

[1] Castrop H, Klar J, Wagner C. General inhibition of renocortical cyclooxygenase-2 expression by the renin-angiotensin

system [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 284(4): F518-F524.

- [2] Yang T, Huang Y, Heasley LE, *et al.* MAPK mediation of hypertonicity-stimulated cyclooxygenase -2 expression in renal medullary collecting duct cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(48):23281-23286.
- [3] Hao CM, Yull F, Blackwell T, *et al.* Dehydration activates an NF- κ B-driven, COX-2-dependent survival mechanism in renal medullary interstitial cells [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(8):973-982.
- [4] Cheng HF, Harris RC. Cyclooxygenase-2 expression in cultured cortical thick ascending limb of henle in response to decreased extracellular ionic content by both transcriptional and post-transcriptional mechanisms [J]. *J Bio Chem*, 2002, 277(47):45638-45643.
- [5] 刘冬妍, 李学旺, 李航, 等. 低盐诱导的 MMDD1 细胞 COX-2 表达与 p38 丝裂素激活蛋白激酶信号通路[J]. *中华肾脏病杂志*, 2006, 22(11):697-701.
- [6] Chunl KS, Kim SH, Song YS, *et al.* Celecoxib inhibits phorbol ester-induced expression of COX-2 and activation of AP-1 and p38 MAP kinase in mouse skin [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(5):713-722.
- [7] Woo KJ, Park JW, Kwon TK. Proteasome inhibitor-induced cyclooxygenase-2 expression in Raw264.7 cells is potentiated by inhibition of c-Jun N-terminal kinase activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 342(4):1334-1340.

(2006-11-16 收稿)