

## 普伐他汀对高糖培养肾小球系膜细胞 P38 促分裂原活化蛋白激酶信号通路的影响

倪连松\*, 郑景晨, 金洁娜, 沈飞霞

(温州医学院附属第一医院内分泌科, 浙江 温州 325000)

**摘要:**目的 探讨普伐他汀对高糖培养大鼠肾小球系膜细胞(MC) p38 促分裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)信号传导通路的影响。方法 大鼠 MC 分别培养在正常糖  $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (正常对照组), 高糖  $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (高糖组), 葡萄糖  $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  + p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 (SB)  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 及葡萄糖  $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  + 普伐他汀 (PV)  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。ELISA 法检测培养上清液 IV 型胶原 (Col-IV)、纤连蛋白 (FN) 含量; Phospho-ELISA 法检测胞浆及胞核内 p38MAPK 和磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK) 蛋白的表达; 以及 RT-PCR 法检测 p38MAPK mRNA 的表达。结果 与正常对照组比较, 高糖组 MC 合成基质蛋白 Col-IV, FN 增多; 胞浆及胞核内 p-p38MAPK 的表达增加。SB 或 PV 干预能部分或完全逆转这一变化。与高糖组比较, SB 干预后, 上清液中 Col-IV 含量下降 [48 h:  $(21.19 \pm 3.21) \text{ vs } (16.75 \pm 1.93) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $n=6$ ,  $P<0.05$ ]、FN 减少 [48 h:  $(13.47 \pm 1.27) \text{ vs } (12.01 \pm 0.85) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $n=6$ ,  $P<0.05$ ]; 胞浆及胞核内 p-p38MAPK 表达显著下调。PV 干预后, 上清液中 Col-IV 含量下降 [48 h:  $(21.19 \pm 3.21) \text{ vs } (14.97 \pm 3.04) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $n=6$ ,  $P<0.05$ ]、FN 减少 [48 h:  $(13.57 \pm 1.27) \text{ vs } (11.99 \pm 0.98) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $n=6$ ,  $P<0.05$ ]; 胞核内 p-p38MAPK 表达显著下调, 但对胞浆内 p-p38MAPK 的表达则无显著影响。各组总 p38MAPK 蛋白水平及 p38MAPK mRNA 表达则没有明显改变。结论 PV 能够显著下调高糖培养的

MC 胞核内 p38MAPK 信号传导通路的活化, 进而减少胞外基质合成, 达到对糖尿病肾病的治疗作用。

**关键词:** 普伐他汀; 糖尿病性肾病; 肾小球系膜细胞; p38 促分裂原活化蛋白激酶

中图分类号: R966, R972.6

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2009)05-0368-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2009.05.006

促分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 是体内广泛存在的丝氨酸/苏氨酸蛋白调节激酶, 是细胞内主要的信号传导系统。p38MAPK 是 MAPK 家族的经典成员之一, 是细胞信号传递的交汇点或共同通路, 在各种细胞外刺激作用下, p38MAPK 三肽区的苏氨酸和酪氨酸被双磷酸化而被激活, 进而引起细胞生长、增殖和分化等过程<sup>[1]</sup>。在高糖、血管活性物质和细胞因子等因素作用下所致的 p38MAPK 激活, 可能是糖尿病慢性并发症发生发展的共同通路<sup>[2]</sup>。迄今, 有关 p38MAPK 通路在糖尿病性肾病发病过程中的作用的相关研究还很少见。Adhikary 等<sup>[3]</sup>报道, 在糖尿病患者肾脏多种细胞中磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK) 表达比正常人明显升高, 尤其是系膜细胞 (mesangial cells, MC) 中表达增加最为显著; 同时, 在胰岛素依赖型和非胰岛素依赖型糖尿病大鼠肾脏中也可发现大量的 p38MAPK 激活, p-p38MAPK 水平在糖尿病开始阶段和肾脏组织损伤之前即升高 2 ~ 6 倍, 而总的 p38MAPK 表达则无明显变化<sup>[3]</sup>。也已有体外实验发现, 高糖刺激可使体外培养的 MC 胞内 p38MAPK 活化, 而一些生长因子如内皮素-1、血管紧张素 II 和血小板源生长因子则可以使已经活化的 p38MAPK 的活性进一步增强<sup>[4]</sup>。

他汀类药物是 3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂, 能有效降低总胆固醇和低密度脂蛋白水

收稿日期: 2008-12-29 接受日期: 2009-05-13

基金项目: 温州市科技局基金资助项目 (Y2004A009); 浙江省留学回国基金资助项目 (2005HG01)

作者简介: 倪连松 (1971-), 男, 浙江省瑞安人, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事糖尿病性肾病发病机制及治疗研究。

\* 联系作者 E-mail: nils1014@163.com Tel: 13758876020

平,且具有不依赖改善血脂的肾脏保护作用,通过抑制多种细胞生长因子而影响 MC 增殖和系膜基质增生,以及肾脏的氧化应激反应和纤维化<sup>[5]</sup>,从而对糖尿病性肾病进展起着重要的保护作用。但是这种作用的具体机制目前仍没有明确的定论。迄今,有关他汀类药物对 p38MAPK 信号通路影响的报道还极为少见。最近 Rupérez 等<sup>[6]</sup>报道,阿托伐他汀及辛伐他汀能显著下调血管紧张素 II 诱导的培养血管平滑肌细胞 p38MAPK 及 c-Jun 氨基端激酶信号传导通路的活化,从而抑制血管的纤维化。Sakamoto 等<sup>[7]</sup>报道,氟伐他汀能通过下调胞外信号调节激酶 1/2 及 p38MAPK 的活化从而阻止器官培养动脉的血管增生。至于有关他汀类药物对肾脏疾病中 p38MAPK 信号通路的影响还未见报道。

为进一步明确 p38MAPK 通路的激活在糖尿病性肾病发病过程中的作用,以及他汀类药物对肾脏中 p38MAPK 信号传导通路的影响,阐明他汀类药物对糖尿病性肾病除调脂作用以外的肾脏保护作用的具体机制,比较观察了普伐他汀(pravastatin, PV)以及 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 (SB) 对高糖培养的大鼠肾小球 MC 胞外基质产生影响,并同时检测了胞内 p38MAPK 信号通路的变化。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与细胞

MC 为自武汉大学中国典型培养物保藏中心的大鼠肾小球系膜细胞 EC (HBZY-1), CCTCC 编号: GDC124。PV 为日本三共株式会社公司产品(产品批号: 0405005)。SB 为美国 Promega 公司产品。核蛋白抽提试剂盒、BCA 蛋白质定量试剂盒、p38MAPK 通路激活酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒购自上海康成生物工程有限公司。Trizol 及逆转录相关试剂购自美国 Invitrogen 公司。PCR 试剂盒为美国 Promega 公司产品。紫外分光光度仪为 Beckman DU460。酶标仪为美国 Bio-Tek Instruments ELX 800。DNA 扩增仪为 Eppendorf Mastercycler gradient。IV 型胶原 (type IV collagen, Col-IV) ELISA 检测试剂盒购自美国 Bionewtrans Pharmaceutical Biotechnology 公司, 纤连蛋白 (fibronectin, FN) ELISA 检测试剂盒购自大连泛邦化工技术开发有限公司(日本进口分装)。

### 1.2 大鼠肾小球系膜细胞的培养

大鼠 MC 常规培养在含 10% 胎牛血清、葡萄糖

5.5 mmol·L<sup>-1</sup> 的 DMEM 培养液中,置 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。2~3 d 传代 1 次。

### 1.3 实验分组

①正常对照组:葡萄糖浓度 5.5 mmol·L<sup>-1</sup>; ②高糖组 (high glucose, HG):葡萄糖浓度 25 mmol·L<sup>-1</sup>; ③ SB + HG 组:SB 10 μmol·L<sup>-1</sup> + 葡萄糖浓度 25 mmol·L<sup>-1</sup>; ④ PV + HG 组:PV 100 μmol·L<sup>-1</sup> + 葡萄糖浓度 25 mmol·L<sup>-1</sup>。

### 1.4 ELISA 法检测细胞培养液上清 IV 型胶原及纤连蛋白含量

MC 接种在 6 孔板中,细胞培养贴壁生长至 70%, 更换为 1% 血清的培养液同步培养 24 h, 按实验分组换为不同的培养液 1.5 mL, 分别于实验的 24 及 48 h 收集上清液, -20℃ 保存, 分别用于细胞培养液上清中 Col-IV, FN 含量的 ELISA 检测, 按说明书操作。

### 1.5 检测胞浆及胞核内的 p38MAPK 及 p-p38MAPK 蛋白

#### 1.5.1 细胞培养及实验分组

MC 以  $8 \times 10^5$  细胞总数接种于 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中,细胞培养贴壁生长 1 d 后更换为 1% 血清的培养液同步 24 h, 按实验分组换为不同的培养液 20 mL, 分别于 24 及 48 h 提取细胞蛋白。

#### 1.5.2 细胞胞浆蛋白及胞核蛋白的提取与定量

将培养于培养瓶的细胞用冰冷的 PBS 洗 2 次后,刮下细胞,用核蛋白抽提试剂盒分别提取细胞胞浆蛋白及胞核蛋白, -80℃ 冻存待用;用 BCA 蛋白质定量试剂盒分别进行胞浆蛋白及胞核蛋白的定量检测,按说明书操作。

#### 1.5.3 胞浆及胞核内的 p38MAPK 及 p-p38MAPK 蛋白的检测

上海康成公司 KC<sup>TM</sup> p38MAPK 信号通路激活酶联免疫检测试剂盒采用双抗体夹心法可同时检测总 p38MAPK, p-p38MAPK 和 GAPDH 蛋白。酶标板上已包被捕获抗体(兔抗 p38MAPK, 兔抗 p-p38MAPK 和兔抗 GAPDH 抗体)。待测样品加入微孔孵育后分别加检测抗体(小鼠抗 p38MAPK 和小鼠抗 GAPDH 抗体孵育),随后加 HRP 偶联的抗小鼠 IgG 二抗,最后加 TMB 显色。吸光度值 (A) 大小与蛋白的量成正比。经 GAPDH 校正上样误差后, p-p38MAPK 的量 ( $A_{p-p38MAPK}/A_{GAPDH}$ ) 直接反映 p38MAPK 信号通路的激活程度。按说明书操作。

### 1.6 肾小球系膜细胞 p38MAPK mRNA 表达的检测

#### 1.6.1 细胞培养及实验分组

取 MC 以每孔  $1 \times 10^5$  细胞总数接种于 6 孔板中,细胞培养贴壁生长 24 h 后更换为 1% 血清的培养液同步 24 h,按实验分组换为不同的培养液,分别于实验的 24 及 48 h 提取 RNA。

#### 1.6.2 PCR 引物设计

PCR 引物设计采用 Primer Premier 5.0 软件,由上海 Sangon 公司合成(PAGE 纯化)。P38MAPK 引物:5': GGAGAGCCTGACCTACGA, 3': ACTGCCAAG-GAGCATCTA,扩增产物为 309 bp; $\beta$  肌动蛋白引物:5': CTATCGGCAATGAGCGGTTTC,3': CTTAGGAGTTGGGGTGGCT,扩增产物为 762 bp。

#### 1.6.3 逆转录反应及 PCR 扩增

直接往 6 孔培养板中加入 1 mL 的 Trizol 溶解细胞,提取细胞总 RNA。分别取 1  $\mu$ g 总 RNA 以 MMLV 为逆转录酶作逆转录反应。取 1  $\mu$ L 逆转录所得的 cDNA 为模板,在 Taq DNA 聚合酶催化下进行 PCR 扩增。优化 PCR 扩增条件,使 PCR 扩增在对数期内进行。p38 MAPK 和  $\beta$  肌动蛋白的退火温度都为 60 $^{\circ}$ C。变性 94 $^{\circ}$ C,退火 60 $^{\circ}$ C,延伸 72 $^{\circ}$ C,30 个循环后,将 PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳。Imagemaster VDS 成像系统摄影后应用计算机图像分析软件(TotallabV1.01)行灰度扫描分析,以  $\beta$  肌动蛋白作为内参照校正,用目的基因的灰度值(gray-scale value, GV)与  $\beta$  肌动蛋白 GV 比值表示 p38 MAPK mRNA 表达的相对含量。

#### 1.7 统计学分析

结果数据用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,用 SPSS

12.0 统计软件进行分析。Col-IV, FN, p38MAPK, p-p38MAPK 及 p38MAPK mRNA 表达组间差异的统计分析采用重复测量的方差分析,应用 univariate 模块的 two way ANOVA 进行分析,有显著差异者 LSD-*t* 进行两两比较;组内不同时间比较用两样本成组设计 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 普伐他汀对高糖培养系膜细胞上清液中纤维连接蛋白及 IV 型胶原含量的影响

表 1 结果显示,与正常对照组比较,高糖刺激 24 与 48 h 可增加 MC 上清液中 FN 及 Col-IV 的合成。PV 或 SB 干预 24 与 48 h 后对高糖刺激的 FN 及 Col-IV 的合成都有显著的抑制作用,可达接近对照组水平。48 与 24 h 比较各组 FN 含量均显著升高,说明随着时间的延长,即使有 PV 或 SB 的干预,也不能完全阻止 FN 合成的增加。PV 干预 48 h 后 Col-IV 含量与干预 24 h 比较无显著差异,说明 PV 干预能完全阻止 Col-IV 合成的增加,而 SB 则不能完全阻止 Col-IV 合成的增加。说明高糖培养可促进 MC 胞外基质的合成,而 PV 与 SB 的干预则能部分或完全逆转这些变化。

### 2.2 普伐他汀对高糖培养系膜细胞胞浆及胞核内 p38MAPK 及 p-p38MAPK 表达影响

表 2 结果显示,胞浆及胞核内的总 p38MAPK 蛋白在各组和各时点的表达都无明显差异( $P > 0.05$ )。表 3 结果显示,与对照组比较,高糖刺激 24 及 48 h 后可使 MC 胞浆及胞核内 p-p38MAPK 蛋白表达上调。

**Tab 1. Effects of pravastatin (PV) on contents of fibronectin (FN) and type IV collagen (Col-IV) in supernatant of glomerular mesangial cells (MC) cultivated in high concentration of glucose**

Group	FN/ $\mu$ g $\cdot$ L $^{-1}$		Col-IV/ $\mu$ g $\cdot$ L $^{-1}$	
	24	48 (h)	24	48 (h)
Control	8.73 $\pm$ 0.48	10.88 $\pm$ 0.48 $^{\Delta\Delta}$	10.97 $\pm$ 1.33	12.29 $\pm$ 1.88
HG	10.68 $\pm$ 0.50 $^{**}$	13.47 $\pm$ 1.27 $^{**\Delta\Delta}$	16.46 $\pm$ 1.97 $^{**}$	21.19 $\pm$ 3.21 $^{**\Delta}$
SB + HG	9.34 $\pm$ 1.35 $^{\#}$	12.01 $\pm$ 0.85 $^{\#\Delta\Delta}$	14.14 $\pm$ 1.89 $^{\#}$	16.75 $\pm$ 1.93 $^{\#\Delta\Delta}$
PV + HG	9.43 $\pm$ 0.73 $^{\#}$	11.99 $\pm$ 0.98 $^{\#\Delta\Delta}$	12.81 $\pm$ 2.20 $^{\#}$	14.97 $\pm$ 3.04 $^{\#\#}$

The cells were pretreated with 5.5 mmol $\cdot$ L $^{-1}$  glucose (containing 1% fetal bovine serum) for 24 h. Then, the cells were treated with 5.5 mmol $\cdot$ L $^{-1}$  glucose (control) or 25 mmol $\cdot$ L $^{-1}$  glucose (high glucose, HG) for indicated time. For SB203580 (SB) + HG group, the cells were treated with 25 mmol $\cdot$ L $^{-1}$  glucose and 10  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$  SB for indicated time, simultaneously. For PV + HG group, the cells were treated with 25 mmol $\cdot$ L $^{-1}$  glucose and 100  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$  PV for indicated time, simultaneously.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ .  $^{**} P < 0.01$ , compared with the corresponding control group;  $^{\#} P < 0.05$ ,  $^{\#\#} P < 0.01$ , compared with the corresponding HG group;  $^{\Delta} P < 0.05$ ,  $^{\Delta\Delta} P < 0.01$ , compared with the corresponding group at 24 h.

**Tab 2. Effect of PV on total p38MAPK protein expression in MC cultivated in high concentration of glucose**

Group	Total p38MAPK protein expression ( $A_{p38MAPK} : A_{GAPDH}$ )			
	Cytoplasm		Nuclei	
	24	48 (h)	24	48 (h)
Control	0.74 ± 0.07	0.76 ± 0.13	0.60 ± 0.12	0.59 ± 0.09
HG	0.79 ± 0.08	0.82 ± 0.10	0.69 ± 0.06	0.66 ± 0.11
SB + HG	0.71 ± 0.04	0.77 ± 0.11	0.56 ± 0.10	0.61 ± 0.10
PV + HG	0.73 ± 0.06	0.77 ± 0.09	0.62 ± 0.08	0.64 ± 0.07

See Tab 1 for the treatment. P38MAPK; p38 mitogen-activated protein kinase.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ . There was no significant difference among the groups.

**Tab 3. Effect of PV on p-p38MAPK protein expression in MC cultivated in high concentration of glucose**

Group	p-p38MAPK protein expression ( $A_{p-p38MAPK} : A_{GAPDH}$ )			
	Cytoplasm		Nuclei	
	24	48 (h)	24	48 (h)
Control	0.20 ± 0.03	0.24 ± 0.06	0.50 ± 0.05 <sup>#</sup>	0.54 ± 0.06 <sup>#</sup>
HG	0.33 ± 0.08 <sup>*</sup>	0.45 ± 0.10 <sup>**</sup>	0.67 ± 0.05 <sup>**#</sup>	0.83 ± 0.08 <sup>**▲#</sup>
SB + HG	0.22 ± 0.04 <sup>△</sup>	0.29 ± 0.09 <sup>△</sup>	0.53 ± 0.07 <sup>△#</sup>	0.58 ± 0.13 <sup>△△#</sup>
PV + HG	0.27 ± 0.03	0.34 ± 0.05	0.61 ± 0.05 <sup>#</sup>	0.58 ± 0.08 <sup>△△#</sup>

See Tab 1 for the treatment. p-p38MAPK; phosphorylated p38MAPK.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ . <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ , compared with the corresponding control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$ , compared with the corresponding HG group; <sup>▲</sup> $P < 0.05$ , compared with the corresponding 24 h group; <sup>#</sup> $P < 0.05$ , compared with the corresponding group in cytoplasm.

与HG组比较,SB干预24和48h后胞浆及胞核内的p-p38MAPK的表达都显著下调,可达接近对照组水平;但PV组只有干预48h后,胞核内的p-p38MAPK表达显著下调,其他处理无变化。同时,所有各组细胞胞核内的p-p38MAPK的表达要显著高于胞浆内。

p38MAPK属应激激活的蛋白激酶,其定位于胞浆与细胞核。诸多刺激因子都能通过三级激酶链激活p38MAPK信号途径,p38MAPK磷酸化被激活后胞浆中的p38MAPK即移位到细胞核,导致细胞生长、增殖、分化。表3结果显示,各组细胞胞核内的p-p38MAPK的水平要显著高于胞浆内,这就是与胞浆内p38MAPK磷酸化被激活后移位到细胞核内有关。同时表3结果表明,高糖可作为一个独立刺激因子激活p38MAPK信号系统。PV的干预则可部分逆转高糖诱导的p38MAPK的活化,但是其作用强度不及p38MAPK特异性抑制剂SB,其只能使胞核内的p-p38MAPK表达显著下调。PV干预后胞浆内p-p38MAPK表达也有一定程度的下调,但没

有统计学意义,推测这与胞浆内p-p38MAPK水平较低以及PV的抑制作用较弱有关。

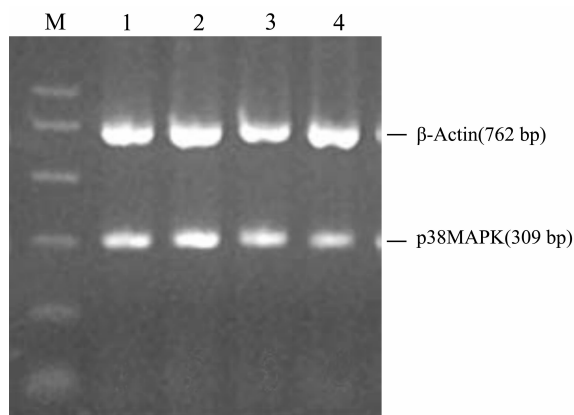
### 2.3 普伐他汀对高糖培养系膜细胞 p38MAPK mRNA 表达影响

表4及图1结果显示,各组和各时点的p38MAPK mRNA表达都无显著差异( $P > 0.05$ )。说明p38MAPK mRNA表达的调控主要发生在翻译

**Tab 4. Effect of PV on p38MAPK mRNA expression in MC cultivated in high concentration of glucose**

Group	p38MAPK mRNA ( $GV_{p38MAPK} : GV_{\beta-Actin}$ )	
	24	48 (h)
Control	0.62 ± 0.05	0.64 ± 0.08
HG	0.62 ± 0.05	0.72 ± 0.05
SB + HG	0.57 ± 0.04	0.70 ± 0.06
PV + HG	0.62 ± 0.11	0.67 ± 0.11

See Tab 1 for the treatment. GV; gray-scale value.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ . There was no significant difference among the groups.



**Fig 1. Effect of PV on expression of p38MAPK mRNA.** M: marker; lane 1: control; lane 2: HG; lane 3: SB + HG; lane 4: PV + HG.

后的蛋白质磷酸化修饰阶段,而不是发生在基因转录的 mRNA 水平。

### 3 讨论

已有研究<sup>[4,8]</sup>证实,高糖刺激可使体外培养的 MC 胞内 p38MAPK 激活,进而移位到细胞核内导致 cAMP 反应元件结合蛋白磷酸化,最后影响细胞的生长、增殖与分化。有关高糖作用下,MC 胞内 p38MAPK 被激活的时间报道不一致:最长的是 7 d,最短的是 6 h。激活时间的差异考虑与 MC 的来源及细胞生长状况不同有关。本研究发现,高糖培养 MC 24 及 48 h,胞浆及胞核内 p-p38MAPK 表达显著增强,再次证实了高糖可作为独立因素激活 MC 胞内 p38MAPK 信号通路;同时还发现高糖培养导致胞浆及胞核内 p38MAPK 蛋白磷酸化增强,而总 p38MAPK 蛋白及 mRNA 水平都没有明显改变,揭示了 p38MAPK 基因表达的调控主要发生在翻译后的蛋白质磷酸化修饰阶段,而不是发生在基因转录的 mRNA 水平或蛋白质翻译阶段。Tsiani 等<sup>[4]</sup>还发现 PKC 抑制剂(GF-109203X)不能阻断高糖所致的 p38MAPK 的活化,表明高糖时 p38MAPK 的活化是非 PKC 依赖的。另有研究发现,抗氧化剂(L-NAC/PDDI)能抑制高糖时 p38MAPK 的活化,因此高糖诱发的 p38MAPK 的活化可能并非完全由高糖的直接作用所致,也可能与高糖作用下导致的氧化应激有关<sup>[8]</sup>。

因为 PV 已在临床上应用多年,已有大量的基

础及临床方面文献对其量-效关系进行了研究。我们研究的重点是对其机制的进一步探索,因此我们在查阅了相关文献后就参照已有的文献选用了常用的研究剂量  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[9]</sup>。

本研究同时观察了 PV 及 SB 对高糖培养 MC 胞内 p38MAPK 信号通路的影响,发现二者对 p38MAPK 蛋白活化的影响也并不完全一致,SB 干预后,胞浆及胞核内 p-p38MAPK 表达同时下调;然而,PV 干预后胞核内 p-p38MAPK 表达显著下调,但是胞浆内 p-p38MAPK 的表达则无显著变化。PV 干预为什么对胞浆内 p-p38MAPK 的表达无明显的影响呢?推测二者的不同可能主要体现在对 p38MAPK 的激活影响强度的不同,SB 比 PV 有着更为强大的抑制作用。由于胞浆 p38MAPK 磷酸化后会进一步转位到细胞核内,从而导致胞浆内 p-p38MAPK 水平显著下降。并且 PV 的作用较弱,所以 PV 干预后胞浆内的 p-p38MAPK 水平虽然与高糖组比较有一定程度的下降,但没有达到统计学意义。

细胞外基质代谢的失平衡(合成增多,降解减少)是糖尿病肾病形成的关键性因素。Col-IV 与 FN 是构成细胞外基质的主要结构蛋白。本研究发现高糖培养对 MC 分泌 Col-IV 和 FN 有显著的促进作用,与已有报道一致<sup>[10-11]</sup>。SB 是 p38MAPK 激活特异性抑制剂,本研究结果表明 SB 干预能完全抑制胞浆和胞核内的 p38MAPK 的活化,所以 SB 干预所致的 MC Col-IV, FN 合成减少显然与胞内 p38MAPK 信号通路活化的阻断有关。同时本研究结果还表明, PV 干预除了能抑制高糖培养 MC 胞核内 p38MAPK 的磷酸化外,也能使高糖培养 MC 合成 Col-IV, FN 显著减少。据此推测:PV 干预对 MC Col-IV, FN 分泌的抑制作用与其对 MC 胞核内 p38MAPK 活化的抑制作用有关, PV 可能部分是通过抑制 p38MAPK 通路从而影响 FN 与 Col-IV 分泌的。

### 4 参考文献:

- [1] Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, *et al.* Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta[J]. *J Biol Chem*, 1997, **272**(48): 30122 - 30128.
- [2] Shanmugam N, Reddy MA, Guha M, Natarajan R.

- High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells [J]. *Diabetes*, 2003, **52**(5):1256–1264.
- [3] Adhikary L, Chow F, Nikolic-Paterson DJ, Stambe C, Dowling J, Atkins RC. Abnormal p38 mitogen-activated protein kinase signalling in human and experimental diabetic nephropathy [J]. *Diabetologia*, 2004, **47**(7):1210–1222.
- [4] Tsiani E, Lekas P, Fantus IG, Dlugosz J, Whiteside C. High glucose-enhanced activation of mesangial cell p38 MAPK by ET-1, ANG II, and platelet-derived growth factor [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, **282**(1):E161–E169.
- [5] Oda H, Keane WF. Recent advances in statins and the kidney [J]. *Kidney Int Suppl*, 1999, **71**:S2–S5.
- [6] Rupérez M, Rodrigues-Díez R, Blanco-Colio LM, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Esteban V, et al. HMG-CoA reductase inhibitors decrease angiotensin II-induced vascular fibrosis: role of RhoA/ROCK and MAPK pathways [J]. *Hypertension*, 2007, **50**(2):377–383.
- [7] Sakamoto K, Murata T, Chuma H, Hori M, Ozaki H. Fluvastatin prevents vascular hyperplasia by inhibiting phenotype modulation and proliferation through extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 and p38 mitogen-activated protein kinase inactivation in organ-cultured artery [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25**(2):327–333.
- [8] Wilmer WA, Dixon CL, Hebert C. Chronic exposure of human mesangial cells to high glucose environments activates the p38 MAPK pathway [J]. *Kidney Int*, 2001, **60**(3):858–871.
- [9] Chen HC, Guh JY, Shin SJ, Lai YH. Pravastatin suppresses superoxide and fibronectin production of glomerular mesangial cells induced by oxidized-LDL and high glucose [J]. *Atherosclerosis*, 2002, **160**(1):141–146.
- [10] Koya D, Haneda M, Nakagawa H, Isshiki K, Sato H, Maeda S, et al. Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC beta inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes [J]. *FASEB J*, 2000, **14**(3):439–447.
- [11] Park IS, Kiyomoto H, Abboud SL, Abboud HE. Expression of transforming growth factor-beta and type IV collagen in early streptozotocin-induced diabetes [J]. *Diabetes*, 1997, **46**(3):473–480.

## Effects of pravastatin on signal passway of p38 mitogen-activated protein kinase in glomerular mesangial cells incubated with high concentration of glucose

NI Lian-Song\*, ZHENG Jing-Chen, JIN Jie-Na, SHEN Fei-Xia

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

**Abstract:** **AIM** To investigate effects of pravastatin (PV) on the signal passway of p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) in glomerular mesangial cells (MC) incubated in high concentration of glucose. **METHODS** MC were incubated in media containing glucose 5.5 mmol·L<sup>-1</sup> (control), high glucose (HG) 25 mmol·L<sup>-1</sup>, glucose 25 mmol·L<sup>-1</sup> + SB203580 (specific inhibitor of p38MAPK) 10 μmol·L<sup>-1</sup> (SB + HG), glucose 25 mmol·L<sup>-1</sup> + PV 100 μmol·L<sup>-1</sup> (PV + HG), respectively.

Fibronectin (FN) and type IV collagen (Col-IV) in supernatant were determined by ELISA method. Protein expressions of p38MAPK and phospho-p38MAPK in cytoplasm and nuclei were detected by phospho-ELISA method. The mRNA expression of p38MAPK was detected by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **RESULTS** Compared with control group, there are increased Col-IV and FN in supernatant in HG group; there are increased phospho-p38MAPK

in nuclei and cytoplasm in HG group, too. These changes could be partly or fully reversed by treatment of SB or PV. Compared with HG group, (SB + HG) or (PV + HG) group showed decreased Col-IV [48 h: (21.19 ± 3.21) vs (16.75 ± 1.93), (14.97 ± 3.04) μg·L<sup>-1</sup>, n = 6, P < 0.05] and FN [48 h: (13.47 ± 1.27) vs (12.01 ± 0.85), (11.99 ± 0.98) μg·L<sup>-1</sup>, n = 6, P < 0.05]. Phospho-p38MAPK in nuclei and cytoplasm could be decreased by treatment of SB. However, phospho-p38MAPK in nuclei but not cytoplasm could be decreased by treatment of PV. There was no significant difference of the total protein expressions and mRNA of p38MAPK among 4 groups.

**CONCLUSION** PV could down-regulate the activities of signal passway of p38MAPK in nuclei of MC incubated in high concentration of glucose, decrease synthesis of extracellular matrix and result in the treatment of diabetic nephropathy.

**Key words:** pravastatin; diabetic nephropathy; mesangial cells; p38 mitogen-activated protein kinases

**Foundation item:** The project supported by Science and Technology Bureau of Wenzhou (Y2004A009); and by funds of Returning from Overseas in Zhejiang Province (2005HG01)

\* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)

# 欢迎投稿 欢迎订阅

## 中国药理学与毒理学杂志

Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology



军事医学科学院毒物药物研究所  
中国药理学会  
中国毒理学会

---

返回首页
English

2009年8月6日 星期四
您是本网站的第 51

在线办公

- 作者在线投稿
- 作者在线查稿
- 专家在线审稿
- 编委在线审稿
- 编辑在线办公
- 主编远程办公

---

在线期刊

- 录用快报
- 当期目录
- 下期目录
- 过刊浏览
- Email Alert

文章快速检索



高级检索 | 检索说明

### 当期目录 >>>

**论著**

- 161 刘宜先 董京辉 高 瑞 马慧娟 武宇明 张 翼 何瑞荣  
钩藤碱对麻醉大鼠颈动脉窦压力感受器活动的抑制作用  
**目的** 探讨钩藤碱(Rhy)对大鼠颈动脉窦压力感受器活动的影响及其有关机制。**方法** 通过隔离灌流颈动脉窦区的方法来获得颈动脉窦压力感受器活动的各项参数, 阈压(TP)、饱和压(SP)、最大斜率(PS)和窦神经放电的最大...  
 中国药理学与毒理学杂志 2009 23 (3): 161-167 [摘要] (224) [HTML OKB] [PDF 658KB] (86)
- 168 张 伟 苗庆峰 苏素文 程佳依 王燕婷 张永健  
双苯氧嗪对豚鼠心室肌细胞膜钠电流的影响  
**目的** 观察双苯氧嗪对豚鼠心室肌细胞膜钠电流的影响。**方法** 用酶解方法分离豚鼠心室肌细胞, 全细胞膜片钳技术记录钠电流。**结果** 将细胞钳制在-80 mV, 给(-80~+50) mV, 50...  
 中国药理学与毒理学杂志 2009 23 (3): 168-175 [摘要] (135) [HTML OKB] [PDF 444KB] (55)
- 176 黄凌 朱毅 常艳波 李 婧 赵 锦  
益智仁挥发油对帕金森病模型小鼠脑内纹状体和黑质损伤的影响  
**目的** 观察益智仁挥发油(VOA)脑保护作用的机制。**方法** C57BL小鼠随机分为正常对照组、帕金森病(PD)模型组、司来吉兰10 mg·kg<sup>-1</sup>阳性对照组、VOA 0.278、0.833、2.78

新闻公告

- 《中国药理学与毒理学杂志》(CJPT)征... (2009年7月29日)
- 《中国药理学与毒理学杂志》被北大图书馆《... (2009年7月29日)

更多>>

---

友情链接

