

# 蛋白激酶 C 对肾小球前小动脉平滑肌细胞 I 型 IP<sub>3</sub> 受体表达影响

王静艳,刘沛,韩峰

王静艳,刘沛,韩峰,中国医科大学附属第二医院感染科 辽宁省沈阳市 110004  
王静艳,女,1963-11-20 生,辽宁省开原县人,汉族。1986 年中国医科大学本科毕业,1992 年中国医科大学硕士研究生毕业,副教授。主要从事慢性肝病及并发症的发生机制和治疗研究。  
国家自然科学基金资助, No.39870337  
项目负责人:刘沛,110004,辽宁省沈阳市和平区三好街 36 号,中国医科大学附属第二医院感染科。 syliupe@yahoo.com  
电话:024-83956962 传真:024-23891793  
收稿日期:2002-09-13 接受日期:2002-10-03

## Effects of protein kinase C on type I inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor expression in smooth muscle cells of rat glomerular afferent arterioles

Jing-Yan Wang, Pei Liu, Feng Han

Jing-Yan Wang, Pei Liu, Feng Han, Department of Infectious Disease, No 2 Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China  
Supported by the Natural Scientific Foundation of China, No. 39870337  
Correspondence to: Dr. Pei Liu, Department of Infectious Disease, No 2 Affiliated Hospital, China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. syliupe@yahoo.com  
Received: 2002-09-13 Accepted: 2002-10-03

### Abstract

AIM: To investigate the effects of protein kinase C (PKC) on type I inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor (IP<sub>3</sub> R) expression in rat glomerular afferent arterioles smooth muscle cells (RASM) treated with TNF- $\alpha$ .

METHODS: RASM were isolated and cultured from rats, type I IP<sub>3</sub> R mRNA in RASM treated with TNF- $\alpha$  and PKC activator or TNF- $\alpha$  and PKC inhibitor or PKC activator or PKC inhibitor were detected by Northern blot.

RESULTS: TNF- $\alpha$  enhanced the expression of type I IP<sub>3</sub> R mRNA in RASM; PKC inhibitor significantly inhibited the expression of type I IP<sub>3</sub> R mRNA induced by TNF- $\alpha$  (14 814.0 $\pm$ 2 029.9, 11 334.0 $\pm$ 1 104.9,  $P < 0.05$ ). PKC activator significantly enhanced the expression of type I IP<sub>3</sub> R mRNA in RASM treated without TNF- $\alpha$  (22 554.5 $\pm$ 2 625.2, 28 128.0 $\pm$ 3 698.6,  $P < 0.05$ ). PKA inhibitor could not inhibit the expression of type I IP<sub>3</sub> R mRNA induced by TNF- $\alpha$ .

CONCLUSION: TNF- $\alpha$  plays a role in signal transduction in RASM. TNF- $\alpha$  may act as the promoter of type I IP<sub>3</sub> R mRNA in RASM or activates PKC that results in the expression of type I IP<sub>3</sub> R protein. PKC and IP<sub>3</sub> promote releasing of intracellular Ca<sup>2+</sup> in RASM, inducing RASM constrict. The renal blood flow diminution is involved in the development of renal dysfunction.

Wang JY, Liu P, Han F. Effects of protein kinase C on type I inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor expression in smooth muscle cells of rat glomerular afferent arterioles. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(6):705-707

### 摘要

目的:探讨蛋白激酶C(PKC)对肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )引起的肾小球前小动脉平滑肌细胞(RASM)内I型三磷酸肌醇(IP<sub>3</sub>)受体mRNA过度表达的影响。

方法:通过对 RASM 的分离、培养,应用核酸杂交技术分别检测在 TNF- $\alpha$  和 PKC 抑制剂、TNF- $\alpha$  和 PKA 抑制剂及 PKC 激动剂作用下, RASM 内 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 的表达情况。

结果:TNF- $\alpha$  促进 RASM 内 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 表达增加; PKC 抑制剂明显抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 过度表达的作用(14 814.0 $\pm$ 2 029.9, 11 334.0 $\pm$ 1 104.9,  $P < 0.05$ ); PKC 激动剂能增强 RASM 内 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 表达(22 554.5 $\pm$ 2 625.2, 28 128.0 $\pm$ 3 698.6,  $P < 0.05$ ); PKA 抑制剂-H<sub>89</sub> 不影响 TNF- $\alpha$  诱导 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 的表达。

结论: TNF- $\alpha$  影响细胞内储备 Ca<sup>2+</sup> 释放信息传递系统可能通过激活 PKC 作用于 I 型 IP<sub>3</sub> 受体基因,使 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 合成增加,导致 I 型 IP<sub>3</sub> 受体蛋白过度表达,参与促进 RASM 内储备 Ca<sup>2+</sup> 大量释放至胞质,引起肾小球前小动脉平滑肌收缩,使肾血流量减少,肾小球滤过率下降,导致肾功能异常。

王静艳,刘沛,韩峰. 蛋白激酶 C 对肾小球前小动脉平滑肌细胞 I 型 IP<sub>3</sub> 受体表达影响. 世界华人消化杂志 2003;11(6):705-707  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/705.asp>

### 0 引言

肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 在许多疾病发生中起重要作用<sup>[1-3]</sup>, 是引起重型肝炎发生的重要因子<sup>[4]</sup>. 当重型肝炎患者出现肝肾综合征(HRS)后, 预后极差. 最近研究<sup>[5]</sup> 报告, TNF- $\alpha$  可以诱导肾小球前小动脉平滑肌细胞(RASM)内 I 型三磷酸肌醇(IP<sub>3</sub>)受体过度表达, 这可能是 HRS 发生的病理生理学基础. 我们观察 RASM 在 TNF- $\alpha$ 、蛋白激酶 C(PKC)抑制剂和激动剂的作用下, 细胞内 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 表达水平, 探讨 TNF- $\alpha$  引起 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 过度表达机制。

### 1 材料和方法

1.1 材料 Wistar,  $\delta$  大鼠, 8 周龄, 体质量 150 g, 由中国医科大学动物中心提供. TNF- $\alpha$ 、细胞培养液

RPMI1 640、胎牛血清及谷氨酰胺等购于 Sigma 公司。 $\alpha$ -肌动蛋白和肌浆蛋白重链 SM-1 和 SM-2 单克隆抗体购于 Dako 公司。蛋白激酶 C 抑制剂(bisindolylmaleimide, GFX)、蛋白激酶 C 激动剂(phorbol myristate acetate, PMA)和蛋白激酶 K 抑制剂(dihydrochloride, H<sub>89</sub>)购于 Calbiochem 公司。

1.2 方法 肾小球前小动脉平滑肌细胞(RASMC)的分离、培养和鉴定参照 Zhu et al (Am J Physiol 1996;271:f1237)的方法,应用第3-4代 RASMC 进行实验。每次实验用从一只大鼠分离的 RASMC 进行,共重复3次实验。培养细胞长至一单层细胞时进行实验。每次实验分别设 TNF- $\alpha$  (100  $\mu$ g/L)同时添加 GFX(10 nmol/L)和 H<sub>89</sub> (2  $\mu$ mol/L) 2组,以添加 TNF- $\alpha$  为对照组。另外,设添加 PMA (100  $\mu$ g/L)组和未添加组。均在培养8h收集 RASMC,用硫氰酸胍裂解经 TNF- $\alpha$  和 PKC 抑制剂、激动剂和 PAK 抑制剂处理的 RASMC,用酚-氯仿抽提细胞内总 RNA, -80  $^{\circ}$ C 保存待用。根据 Nakagawa et al (Proc Natl Sci USA 1991; 88:6244)报告的 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 cDNA 全序列设计。引物选自 I 型 IP<sub>3</sub> 受体基因 SII (splice domain of the type I IP<sub>3</sub>R) 区段的上下游序列(5' -CGTGGATGTTCTACACAGACCAG-3')和(5' -TTGGAAGTCTTGAAGAGACTA-3'),由中国科学院上海生物研究所合成。按照 Sharma et al (J Biol Chem 1997; 272:14617)报告的方法制备 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 cDNA 探针。将 -80  $^{\circ}$ C 保存的 RNA 室温溶解后取 20  $\mu$ g 加入琼脂糖凝胶后电泳,转膜,用 <sup>32</sup>P 标记的 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 cDNA 探针进行杂交、洗膜,自显影获得 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 特异性电泳带。然后洗膜去掉核素,用 RNA 的 18S cDNA 作为探针进行 2 次杂交,获得 18S 特异电泳带作为内参。应用 Scion Image 图像分析软件对扫描获得的核酸杂交图像进行量化,然后用质控内参排除操作误差,进行样本标准化处理。计算方法如下:标准化的样本数值=样本量化数值-同一样本内参的量化数值。

统计学处理 将各次应用 Scion Image 图像分析软件扫描所得各组标准化的样本数值用  $\bar{x} \pm s$  表示。各组间数据用方差分析进行比较,当 P < 0.05 时为有显著性。

## 2 结果

当 RASMC 暴露 TNF- $\alpha$  (100  $\mu$ g/L) 8 h, RASMC 内 I 型 IP<sub>3</sub> 受体蛋白为 TNF- $\alpha$  非添加组的 1.68 倍, I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 为 0 暴露时间组的 1.38 倍<sup>[5]</sup>。为探讨 TNF- $\alpha$  诱导 RASMC 内 I 型 IP<sub>3</sub> 受体过度表达的机制,我们应用 PKC 抑制剂(GFX)、PKC 激动剂(PMA)和蛋白激酶 K 抑制剂(H<sub>89</sub>)观察在 TNF- $\alpha$  作用下, GFX、PMA 和 H<sub>89</sub> 对 RASMC 内 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 表达的影响。

2.1 PKC 抑制剂的影响 当将 GFX(10 nmol/L)和 TNF- $\alpha$  同时加入 RASMC 进行培养,8 h 后检测 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA,经 Scion Image 图像分析软件对图片扫描, GFX 添加组 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 水平为 11 334.0 $\pm$ 1 104.9,明显低于非添加组 14 814.0 $\pm$ 2 029.9,为对照组的 76.5 % (对

照组为 100 %),两组之间比较有显著差异(P < 0.05),说明 GFX 具有抑制 TNF- $\alpha$  诱导 RASMC 内 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 过度表达的作用。

2.2 PKC 激动剂的影响 当将 PMA(100  $\mu$ g/L)加入 RASMC 进行培养,8 h 后检测 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 水平, PMA 添加组 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 表达增加(28 128.0 $\pm$ 3 698.6),与对照组(22 554.5 $\pm$ 2 625.2)(100 %)相比较为 124.7 %;两组之间比较有显著差异(P < 0.05),说明 PMA 能增强 RASMC 内 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 表达水平。

当将 H<sub>89</sub>(2  $\mu$ mol/L)和 TNF- $\alpha$  同时加入 RASMC 进行培养,8 h 后检测 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA,未发现 H<sub>89</sub> 对 TNF- $\alpha$  增强 RASMC 内 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 表达的影响。

## 3 讨论

肝硬化、肝癌和重型肝炎常并发 HRS<sup>[6]</sup>。肾血流减少,肾小球滤过率降低,是引起急性肾功能衰竭的主要原因,而肾小球前小动脉的收缩和舒张功能的状态直接影响着肾血流和肾小球滤过率。肾小球前小动脉的收缩和舒张受着细胞内 Ca<sup>2+</sup> 的调节。当细胞膜上的受体接受某些特异性物质刺激后,细胞内出现 IP<sub>3</sub> 水平增高,而增高的 IP<sub>3</sub> 与 IP<sub>3</sub> 受体结合后导致细胞内储备 Ca<sup>2+</sup> 释放,使效应细胞发生生物反应<sup>[7]</sup>。众所周知,一些血管活性物质,如内皮素<sup>[8]</sup>、血管紧张素 II、血管加压素<sup>[9]</sup>和白三烯<sup>[10]</sup>等均能提高细胞内 Ca<sup>2+</sup> 释放,引起细胞收缩,其主要机制是刺激细胞内 IP<sub>3</sub> 水平增高。许多临床研究证明<sup>[11,12]</sup>: HRS 患者血清中许多血管活性物质明显增高,并认为是导致 HRS 时肾血流量减少和肾小球滤过率下降的主要原因<sup>[13]</sup>。但是,临床上应用血管活性物质拮抗剂治疗 HRS 未得到良好效果,提示导致 HRS 时肾血流量减少和肾小球滤过率下降发生可能还通过其他途径。最近研究发现,细胞因子可以诱导许多细胞内的第二信使及其受体过度表达。TGF- $\beta$  可以抑制肾系膜细胞内 I 型 IP<sub>3</sub> 受体表达,并抑制血管紧张素 II 刺激细胞内储备 Ca<sup>2+</sup> 释放;重型肝炎患者血清中 TNF- $\alpha$  明显升高<sup>[4]</sup>,是肝坏死发生的重要因子。TNF- $\alpha$  可以通过活化 Fas 引起心肌细胞内 IP<sub>3</sub> 水平增高,诱导其细胞凋亡<sup>[14]</sup>。IP<sub>3</sub> 受体家族在鼠的肾脏上广泛存在, I 型和 III 型 IP<sub>3</sub> 受体主要存在于血管壁细胞内,尤其是血管平滑肌细胞<sup>[15]</sup>。TNF- $\alpha$  可以诱导 RASMC 内 I 型 IP<sub>3</sub> 受体蛋白表达增加。过度表达的 I 型 IP<sub>3</sub> 受体为 RASMC 内储备 Ca<sup>2+</sup> 大量释放提供了可能性<sup>[5]</sup>。但是,细胞内储备 Ca<sup>2+</sup> 大量释放又受其他细胞内第二信使(如 DAG-PKC)的影响。PKC 抑制剂可以使血管肌原性张力降低,而 PKC 激动剂则使血管张力增高<sup>[16]</sup>。这可能是由于 PKC 引起 IP<sub>3</sub> 受体磷酸化,动员细胞内储备 Ca<sup>2+</sup> 大量释放所致<sup>[17]</sup>。活化的 PKC 可以介导 TNF- $\alpha$  对肠上皮细胞的损伤作用<sup>[18]</sup>。我们的研究发现, PKC 抑制剂 - GFX 可以明显抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 RASMC 内 I 型 IP<sub>3</sub> 受体的过度表达;而 PKA 抑制剂 - H<sub>89</sub> 无此作用; PKC 激动剂 - PMA 能增强 RASMC

内 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 表达水平. 在许多生理反应过程中, 需要 IP<sub>3</sub> - Ca<sup>2+</sup> 和 DAG - PKC 两条信号途径同时参与并协调作用, 尤其是一些细胞对激动剂产生持久反应时, PKC 与 IP<sub>3</sub> 的协同作用更为突出. 我们的结果提示: TNF- $\alpha$  诱导的 RSMC 内 I 型 IP<sub>3</sub> 受体的过度表达可能是通过所活化的 PKC 作用于 I 型 IP<sub>3</sub> 受体的基因促使 I 型 IP<sub>3</sub> 受体 mRNA 过度表达. 肾血流量受肾小球前小动脉收缩和舒张的控制, 而血管平滑肌细胞内 Ca<sup>2+</sup> 水平高低与肾小球前小动脉的舒张收缩功能直接相关. 所以, RSMC 内 I 型 IP<sub>3</sub> 受体表达增加和 PKC 的正反馈作用可能是血管活性物质引起细胞内储备 Ca<sup>2+</sup> 释放入胞质, 促进肾小球前小动脉发生异常收缩的病理生理基础.

由此可见, TNF- $\alpha$  在重型肝炎并发肾功能衰竭中起到一定作用, 其作用机制是参与了细胞内的信息传递系统的变化. TNF- $\alpha$  可能是通过直接增强 I 型 IP<sub>3</sub> 受体的 mRNA 表达或通过所活化的 PKC 作用于 I 型 IP<sub>3</sub> 受体的基因促使 I 型 IP<sub>3</sub> 受体过度表达, 由此导致 I 型 IP<sub>3</sub> 受体蛋白表达增加. 为重型肝炎、肝硬化患者血中高浓度的内皮素和血管紧张素 II 刺激 RSMC 内 IP<sub>3</sub> 水平增高, 引起大量储存 Ca<sup>2+</sup> 迅速释放入胞质, 致肾小球前小动脉发生异常收缩, 肾血流量减少, 肾小球滤过率降低, 肾功能衰竭发生提供了病理生理学基础.

#### 4 参考文献

- 1 Wang JY, Wang XL, Liu P. Detection of serum TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-6 and IL-8 in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 1999;5:38-40
- 2 臧国庆, 俞红, 周霞秋, 廖丹, 谢青, 王斌. TNF- $\alpha$  体外介导小鼠肝细胞凋亡和坏死. *世界华人消化杂志* 2000;8:303-306
- 3 董满库, 崔彦, 陈昌玮, 周立艳, 刘子沛, 李晓鸥, 吉敏. 大鼠肝脏缺血再灌注损伤中 TNF- $\alpha$  的变化. *世界华人消化杂志* 2001;9:354-355
- 4 Muto Y, Nouri-Aria KT, Meager A, Alexander GJ, Eddleston AL, Williams R. Enhanced tumor necrosis factor and interleukin-1

- 5 in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1988;2:72-74
- 6 王静艳, 孙锦春, 吕飒, 刘沛. 肿瘤坏死因子 - $\alpha$  增强大鼠肾小球前小动脉平滑肌细胞内 I 型三磷酸肌醇受体的表达. *中华内科杂志* 2002;41:86-89
- 7 Bataller R, Gines P, Guevara M, Arroyo V. Hepatorenal syndrome. *Semin Liver Dis* 1997;17:233-247
- 8 Michikawa T, Hamanaka H, Otsu H, Yamamoto A, Miyawaki A, Furuichi T, Tashiro Y, Mikoshiba K. Transmembrane topology and sites of N-glycosylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 1994;269:9184-9189
- 9 Badr KF, Murray JJ, Breyer MD, Takahashi K, Inagami T, Harris RC. Mesangial cell, glomerular and renal vascular response to endothelin in the rat kidney. Elucidation of signal transduction pathways. *J Clin Invest* 1989;83:336-342
- 10 Arroyo V, Gines P, Jimenez W. Ascites, renal failure and electrolyte disorders in cirrhosis. Pathogenesis, diagnosis and treatment, in oxford textbook of clinical hepatology, edited by mcintyre N, Benhamou JP, Bircher J. Oxford Med Publications, 1991:pp429-470
- 11 Moore K, Taylos GW, Maltby NH, Siegers D, Fuller RW, Dollery CT, Williams R. Increased production of cysteinyl leukotrienes in hepatorenal syndrome. *J Hepatol* 1990;11:263-271
- 12 Moller S, Emmeluth C, Henriksen JH. Elevated circulating plasma endothelin-1 concentrations in cirrhosis. *J Hepatol* 1993;19:285-290
- 13 Lloch J, Gines P, Arroyo V, Salmeron MJ, Gines A, Jimenez W, Gaya J, Rivera F, Rodes J. Effect of dipyridamole on kidney function in cirrhosis. *Hepatology* 1993;17:59-64
- 14 Anand R, Harry D, Holt S, Milner P, Dashwood M, Goodier D, Jarmulowicz M, Moore K. Endothelin is an important determinant of renal function in a rat model of acute liver and renal failure. *Gut* 2002;50:111-117
- 15 Woodcock EA, Matkovich SJ, Binah O. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> and cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res* 1998;40:251-256
- 16 Fujimoto T, Nakade S, Miyawaki A, Mikoshiba K, Ogawa K. Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J Cell Biol* 1992;119: 1507-1513
- 17 Osol G, Laher I, Cipolla M. Protein kinase C modulates basal myogenic tone in resistance arteries from the cerebral circulation. *Circ Res* 1991;68:359-367
- 18 Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem* 1991;266: 11144-11152
- 19 Chang Q, Tepperman BL. The role of protein kinase C isozymes in TNF-alpha-induced cytotoxicity to a rat intestinal epithelial cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280: G572-583

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

#### • 编委来信 •

编辑:您好!

我写的关于溃疡性结肠炎分型治疗的 3 篇文章被国内影响因子排名第一的《世界华人消化杂志》录用, 非常荣幸和感谢. 现将和这 3 篇文章相关的述评《重视溃疡性结肠炎的诊断和个体化规范化治疗》寄去, 请按有关规定审阅.

我的关于溃疡性结肠炎动物模型、发病机制、诊断和治疗的一系列研究论文主要发表在《世界华人消化杂志》和《World Journal of Gastroenterology》上, 现在已经获得全军科技进步奖 2 项, 中英国际合作课题、山东省卫生厅课题和济南军区课题各一项, 《溃疡性结肠炎的现代诊疗和进展》一书也将于年内出版, 我也被邀请到国内许多城市作相关报告. 所有这些成绩取得, 都和杂志的一贯支持分不开, 再次表示衷心感谢. 而我也将一如既往关心、支持、宣传和爱护杂志, 共同发展和提高.

江学良 2003-05-19