

脂多糖通过 MAPK 信号通路诱导肾小管上皮细胞核因子 κ B 抑制蛋白释放

吴乙恺 郑世翔 陈星华 丁国华

摘要 **目的** 观察脂多糖(LPS)刺激肾小管上皮细胞(NRK-52E)后核因子 κ B 抑制蛋白(I- κ B)的表达,分析 MAPK 信号通路的变化与 I- κ B 的关联,探讨 LPS 促进 NRK-52E 细胞炎性反应的信号通路的变化。**方法** 细胞同步化后,将其分为对照组、LPS(1 μ g/ml)组、MAPK 抑制剂组,LPS 刺激不同时间(5、15、30、60min)后免疫印迹法检测 p38、JNK MAPK 及 I- κ B 磷酸化水平,给予抑制剂 6h 后免疫印迹法检测 I- κ B 磷酸化水平。**结果** 与对照组相比,LPS 显著上调 NRK-52E 细胞 p38、JNK MAPK 及 I- κ B 磷酸化水平(P 均 < 0.05)。与 LPS 组相比,MAPK 抑制剂干预显著抑制 LPS 诱导的细胞 I- κ B 的释放($P < 0.05$)。**结论** LPS 对 NRK-52E 细胞 MAPK 信号通路具有激活效应,该信号通路激活可能是 LPS 促进肾小管上皮细胞炎性相关因子释放的重要机制之一。

关键词 脂多糖 肾小管上皮细胞 MAPK 信号通路 炎性因子

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.02.013

Lipopolysaccharide Induces the Release of Inflammatory Factor via MAPK Signalling Pathway in Rat Tubular Epithelial Cells. Wu Yikai, Zheng Shixiang, Ding Guohua, et al. Division of Nephrology, Renmin Hospital, Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To observe the release of inflammatory factors after lipopolysaccharide stimulation in renal tubular epithelial cells(NRK-52E), to analyze whether the effects were mediated by MAPK signalling pathway, and to reveal the mechanism of injury by LPS on NRK-52E cells. **Methods** After synchronization, cells incubated with LPS(1 μ g/ml) were used as the stimulation groups, cells without stimulation were as normal control. To determine the role of MAPK signalling pathway, equal number of NRK-52E cells was added with MAPK signalling pathway inhibitors for 6 h and then incubated with LPS(1 μ g/ml). Western blot was used to analyze the phosphorylation of p38, JNK, I- κ B expression. **Results** The phosphorylation of p38, JNK were highly expressed in LPS-induced NRK-52E cells($P < 0.05$), and the I- κ B level were also increased markedly compared with control group($P < 0.05$). In NRK-52E cells that were pre-incubated with MAPK signalling pathway inhibitors, the phosphorylation of I- κ B were obviously inhibited compared with LPS group($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of LPS-induced injury effect on NRK-52E cells is related to the phosphorylation of p38, JNK MAPK signalling pathway, which is followed by the enhancement of the phosphorylation of I- κ B expression. This process is inhibited by MAPK signalling pathway inhibitor via modulation of inflammation pathway.

Key words Lipopolysaccharide; Renal tubular epithelial cells(NRK-52E); MAPK signalling pathway; Inflammatory factor

p38、JNK MAPK 是丝裂原活化蛋白激酶家族的重要成员,介导细胞内信号转导,主要在细胞增殖、分化、凋亡、神经元可塑性变化等多种生理和病理过程中发挥重要作用^[1]。近年来,随着研究的不断深入,人们发现 p38、JNK MAPK 信号转导通路可能与脂多糖介导的肾小管上皮细胞损伤有关^[2]。内毒素(endotoxin)系革兰阴性杆菌细胞壁组成成分,其主要生物活性成分为脂多糖(lipopolysaccharide, LPS),内毒

素可导致脓毒血症(sepsis)甚至多器官功能障碍综合征(MODS),常被用来制作急性肾损伤模型^[3]。但 LPS 引起肾小管上皮细胞损伤的分子机制还不十分清楚。本研究以大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E)为模型,探讨 LPS 对肾小管上皮细胞 I- κ B 表达的影响及 p38、JNK MAPK 信号通路在其中的作用,为开展 LPS 对肾小管上皮细胞的损伤及分子机制的研究奠定基础。

材料和方法

1. 细胞和试剂:大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E, 美国 ATCC 公司),胎牛血清、DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),p38、JNK 通路抑制剂 SB202190(10 μ mol/L,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81070556);湖北省自然科学基金资助项目(2015CFB347)

作者单位:430060 武汉大学人民医院肾内科

通讯作者:丁国华,电子信箱:ghxding@gmail.com

1h, 美国 CST 公司)、SP600125 (25 $\mu\text{mol/L}$, 30min, 美国 CST 公司)、p38 兔多克隆抗体、磷酸化(p) - p38 兔单克隆抗体、JNK 兔多克隆抗体、磷酸化(p) - JNK 兔单克隆抗体(美国 CST 公司)、 β - actin 鼠单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)、辣根过氧化物酶标记的二抗(美国 CST 公司)、奥德赛近红外激光扫描系统 Odyssey CLx Infrared Imaging System(Li - Cor 公司)。

2. 细胞培养及分组: NRK - 52E 细胞用含 100g/L 链霉素、100g/L 青霉素及含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基在 37℃、5% CO_2 的培养箱中培养, 细胞生长至亚融合时用 1% FBS 培养基同步化 12h 后开始试验。按不同时间(5、15、30、60min, 1 $\mu\text{g/ml}$) 分别加入脂多糖刺激; 按是否加入处理因素分为 4 组, 即正常组、LPS 组、SB202190 + LPS 组、SP600125 + LPS 组。

3. Western blot 法检测各蛋白的表达: 预冷 PBS 轻洗细胞 3 次, 用含有 Cocktail(美国 Sigma - Aldrich 公司)的细胞裂解液裂解后, 4℃、13000 $\times g$ 离心 5min, 收集上清, BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取 20 μg 蛋白, 10% SDS - PAGE 电泳, 电转至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2h, 一抗 4℃ 孵育过夜, 一抗工作浓度分别为 p38 兔多克隆抗体(1:500)、磷酸化(p) - p38 兔单克隆抗体(1:500)、JNK 兔多克隆抗体(1:500)、磷酸化(p) - JNK 兔单克隆抗体(1:500)、 β - actin 鼠单克隆抗体(1:1000), TBST 洗膜, 辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10000)室温孵育 1h, TBST 洗膜, Odyssey 红外激光成像系统扫描膜, Gel - Pro Analyzer 软件分析测量条带的灰度值, 以 β - actin 灰度值为基础, 测定各组的相对比值。

4. 统计学方法: 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 每组实验均至少重复 3 次, 计量数据以均数 $\pm$ 标准

差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 脂多糖诱导 NRK - 52E 细胞 I - κ B 蛋白表达的改变: 1 $\mu\text{g/ml}$ 脂多糖作用 NRK - 52E 细胞 5、15、30、60min, Western blot 法检测结果显示, 15min 组、30min 组 I - κ B 磷酸化水平显著高于 5min 组(P 均 < 0.05), 详见图 1。

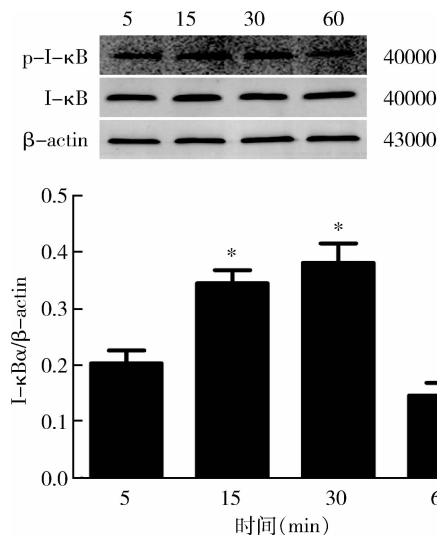


图 1 1 $\mu\text{g/ml}$ 脂多糖对 NRK - 52E 细胞 I - κ B 蛋白表达影响

$n = 3$; 与 5min 组比较, * $P < 0.05$

2. 脂多糖诱导 NRK - 52E 细胞 MAPK 通路相关蛋白磷酸化的改变: 1 $\mu\text{g/ml}$ 脂多糖作用 NRK - 52E 细胞 5、15、30、60min, Western blot 法检测结果显示, 15min 组、30min 组 p38、JNK 磷酸化水平显著高于 5min 组(P 均 < 0.05), 详见图 2。

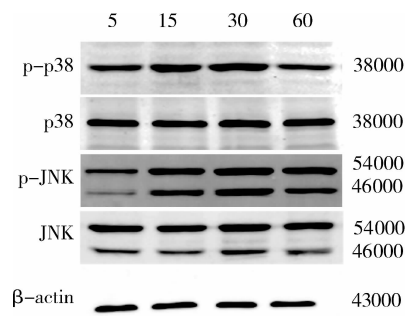


图 2 1 $\mu\text{g/ml}$ 脂多糖对 NRK - 52E 细胞 MAPK 信号通路相关蛋白的影响

$n = 3$; 与 5min 组比较, * $P < 0.05$

3. MAPK 通路抑制剂对脂多糖诱导 NRK - 52E

细胞 I - κ B 蛋白表达的影响: 与正常 NRK - 52E 细胞

相比,脂多糖(1 μ g/ml)刺激 30min 可使 p38、JNK、I- κ B 的磷酸化水平显著增高($P < 0.05$),而 SB202190 以及 SP600125 处理后可使其磷酸化水平显著回落($P < 0.05$),见图 3。

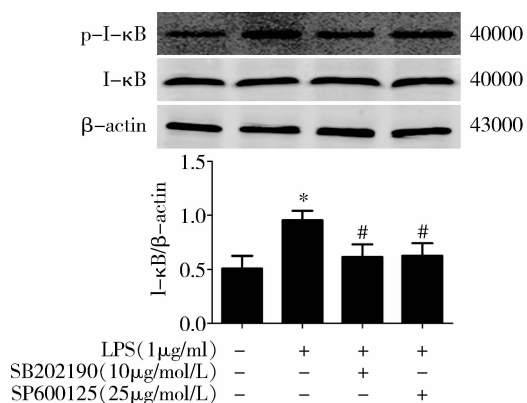


图 3 MAPK 通路抑制剂对 NRK-52E 细胞 I κ -B 蛋白表达的影响

与正常对照组比较, * $P < 0.05$;

与单独 LPS 刺激组比较, # $P < 0.05$

讨 论

目前,革兰阴性菌内毒素脂多糖导致的脓毒血症休克仍是引起临床患者死亡的重要原因之一^[4]。脂多糖是革兰阴性杆菌细胞壁的主要成分,为一种两亲的分子,包括细胞外膜疏水的磷脂部分和细胞内膜亲水的多糖部分。脂多糖分子的磷脂部分和多糖部分都参与脂多糖的生物活性^[5]。脂多糖的识别和信号转导是革兰阴性杆菌发生炎症反应的关键。脂多糖可通过介导 p38、JNK MAPK 信号通路的磷酸化从而激活肾小管上皮细胞 I- κ B 的磷酸化增加,进一步诱导多种炎症因子的表达^[6]。

既往研究表明,MAPK 信号通路在肾脏疾病的发生、发展中发挥重要作用^[7]。丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族作为一类丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶信号转导系统,是细胞内一类重要的跨膜信号转导通路,其主要有 4 个家族成员:细胞外信号调节的蛋白激酶(ERK)、应激活化的蛋白激酶(JNK)、p38 MAPK 和 ERK5 通路^[8, 9]。其中 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)家族是 1990 年被发现的促分裂原活化蛋白激酶超家族成员,属于进化上保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其可被多种刺激因子激活,能够将细胞外信号转入细胞内,启动核因子的转录和翻译,最终

引起多种病理生理反应,包括细胞分化、增殖、发育、炎症反应以及凋亡等^[10, 11]。

p38 MAPK 在信号转导分子的转到中起重要作用,当其发生磷酸化后即可被激活,激活的 p38 MAPK 可继续激活下游蛋白发生磷酸化,例如可以使核转录因子发生磷酸化而启动基因转录,对炎症反应通路形成调控作用^[12]。Sun 等^[13]认为 JNK MAPK 活化后可上调肿瘤坏死因子- α 的形成,而肿瘤坏死因子- α 反过来又能促进 JNK MAPK 的磷酸化,从而形成一个恶性循环,使其炎症反应进一步放大。研究发现,通过采用内毒素休克大鼠模型,应用 p38 MAPK 通路抑制剂可以显著降低脓毒症的病死率^[14]。Wang 等^[15]建立小鼠肾动脉硬化的模型,发现抑制 p38 MAPK 信号通路活化可显著改善肾小管损伤,进而减少肾纤维化的发生。

本研究结果显示脂多糖作用于肾小管上皮细胞不同时间后可导致 I- κ B 磷酸化增加,同时 MAPK 信号通路相应蛋白磷酸化表达亦增加,为明确 MAPK 信号通路在此过程中的作用,分别给予 p38、JNK MAPK 信号通路特异性抑制剂抑制 MAPK 信号通路相关蛋白的磷酸化,发现给予抑制剂预处理后 I- κ B 磷酸化水平显著降低,提示脂多糖可能通过 MAPK 信号通路诱导肾小管上皮细胞 I- κ B 的释放。

SB202190 是一种特异性的 p38 MAPK 信号通路抑制剂,通过与 p38 ATP 中 Thr106 结合位点结合,竞争性抑制 p38 MAPK 与 ATP 结合的能力,从而使其失去活性^[16]。SP600125 是一种特异性的 JNK MAPK 信号通路抑制剂,能通过与 JNK MAPK 竞争 ATP 结合位点,实现对 JNK MAPK 激酶的抑制^[17]。本研究结果表明,LPS 可以激活 p38、JNK MAPK 信号通路,而特异性抑制剂 SB202190、SP600125 可通过与 p38、JNK MAPK 特异性结合,抑制其磷酸化水平,且可以减弱 LPS 诱导的 I- κ B 磷酸化水平,提示 p38、JNK MAPK 信号转导通路在 LPS 诱导 I- κ B 磷酸化的表达中起着关键作用。

急性肾损伤肾脏疾病常见的临床综合征,具有起病急、早期诊断困难、进展快、病死率高等特点,早期积极有效的治疗可改善患者预后,减少并发症,防止 AKI 进展为慢性肾脏病。综上所述,本研究发现脂多糖刺激可诱导肾小管上皮细胞的炎症反应,脂多糖可能通过激活 p38、JNK MAPK 信号通路参与脂多糖介导肾小管上皮细胞炎症反应的过程,针对 MAPK 信

号转导机制可为临床急性肾损伤的防治提供了新的思路和借鉴。

参考文献

- 1 Tzeng TF, Liou SS, Chang CJ, *et al.* The ethanol extract of *Lonicera japonica* (Japanese honeysuckle) attenuates diabetic nephropathy by inhibiting p - 38 MAPK activity in streptozotocin - induced diabetic rats[J]. *Planta Med*, 2014, 80(2 - 3): 121 - 129
- 2 Jaiman S, Sharma AK, Singh K, *et al.* Signalling mechanisms involved in renal pathological changes during cisplatin - induced nephropathy[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2013, 69(11): 1863 - 1874
- 3 Ramachandran G. Gram - positive and gram - negative bacterial toxins in sepsis: a brief review[J]. *Virulence*, 2014, 5(1): 213 - 218
- 4 Chang KC. Cilostazol inhibits HMGB1 release in LPS - activated RAW 264. 7 cells and increases the survival of septic mice [J]. *Thromb Res*, 2015, 136(2): 456 - 464
- 5 Rameshrad M, Maleki - Dizaji N, Vaez H, *et al.* Lipopolysaccharide induced activation of toll like receptor 4 in isolated rat heart suggests a local immune response in myocardium[J]. *Iran J Immunol*, 2015, 12(2): 104 - 116
- 6 Nair AR, Masson GS, Ebenezer PJ, *et al.* Role of TLR4 in lipopolysaccharide - induced acute kidney injury: protection by blueberry [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 71: 16 - 25
- 7 Ding Y, Yang H, Xiang W, *et al.* CD200R1 agonist attenuates lipopolysaccharide - induced inflammatory response in human renal proximal tubular epithelial cells by regulating TLR4 - MyD88 - TAK1 - mediated NF - kappaB and MAPK pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460: 287 - 294
- 8 Kim HG, Shi C, Bode AM, *et al.* p38alpha MAPK is required for arsenic - induced cell transformation[J]. *Mol Carcinog*, 2015, Epub ahead of print
- 9 Gehringer M, Muth F, Koch P, *et al.* c - Jun N - terminal kinase in-

hibitors: a patent review (2010 - 2014) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2015, 25(8): 849 - 872

- 10 刘以鹏, 梁伟, 陈星华, 等. IQGAP1 在血管紧张素 II 诱导足细胞凋亡中的作用及其机制探讨[J]. *中华肾脏病杂志*, 2014, 30(3): 210 - 216
- 11 Ju DT, Kuo WW, Ho TJ, *et al.* Protocatechuic acid from *alpinia oxyphylla* induces schwann cell migration via ERK1/2, JNK and p38 activation[J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(4): 653 - 665
- 12 Saklatvala J, Dean J, Finch A. Protein kinase cascades in intracellular signalling by interleukin - 1 and tumour necrosis factor[J]. *Biochem Soc Symp*, 1999, 64: 63 - 77
- 13 Sun HY, Wang NP, Halkos M, *et al.* Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen - activated protein kinase signalling pathways [J]. *Apoptosis*, 2006, 11(9): 1583 - 1593
- 14 Morales MG, Olguin H, Di CG, *et al.* Endotoxin - induced skeletal muscle wasting is prevented by angiotensin (1 - 7) through a p38 MAPK dependent mechanism[J]. *Clin Sci: Lond*, 2015, 129(6): 461 - 476
- 15 Wang D, Warner GM, Yin P, *et al.* Inhibition of p38 MAPK attenuates renal atrophy and fibrosis in a murine renal artery stenosis model [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 304(7): 938 - 947
- 16 Menon MB, Dhamija S, Kotlyarov A, *et al.* The problem of pyridinyl imidazole class inhibitors of MAPK14/p38alpha - MAPK11/p38beta in autophagy research[J]. *Autophagy*, 2015, 11(8): 1425 - 1427
- 17 Karanika S, Karantanos T, Kurosaka S, *et al.* GLIPR1 - DeltaTM synergizes with docetaxel in cell death and suppresses resistance to docetaxel in prostate cancer cells[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14: 122

(收稿日期: 2015 - 07 - 13)

(修回日期: 2015 - 08 - 02)

(上接第 46 页)

- 9 Ko KH, Hsu HH, Yu JC, *et al.* Non - mass - like breast lesions at ultrasonography: feature analysis and BI - RADS assessment [J]. *European Journal of Radiology*, 2015, 84(1): 77 - 85
- 10 Liang XN, Guo RJ, Li S, *et al.* Binary logistic regression analysis of solid thyroid nodules imaged by high - frequency ultrasonography, acoustic radiation force impulse, and contrast - enhanced ultrasonography [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(23): 3601 - 3610
- 11 Zhou J, Zhou C, Zhan W, *et al.* Elastography ultrasound for breast lesions: fat - to - lesion strain ratio vs gland - to - lesion strain ratio [J]. *European Radiology*, 2014, 24(12): 3171 - 3177
- 12 Liu XJ, Zhu Y, Liu PF, *et al.* Elastography for breast cancer diagnosis: a useful tool for small and BI - RADS 4 lesions [J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014, 15(24): 10739 - 10743
- 13 Caferova S, Uysal F, Balci P, *et al.* Efficacy and safety of breast radiothermometry in the differential diagnosis of breast lesions [J]. *Contemporary Oncology*, 2014, 18(3): 197 - 203

- 14 Mader R, Novofastovski I, Iervolino S, *et al.* Ultrasonography of peripheral entheses in the diagnosis and understanding of diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) [J]. *Rheumatol Int*, 2015, 35(3): 493 - 497
- 15 尹建东, 郭启勇, 卢再鸣, 等. 基于 ROC 理论定量评价放射医师诊断水平的构想 [J]. *中华医院管理杂志*, 2009, 25(10): 676 - 678
- 16 郭晓霞, 王晨雨, 王雁. 不同年资超声医师应用弹性成像技术诊断乳腺病灶价值对比 [J]. *河南医学研究*, 2013, 22(6): 841 - 843
- 17 Wei X, Li Y, Zhang S, *et al.* The role of contrast - enhanced ultrasound (CEUS) in the early assessment of microvascularization in patients with aggressive B - cell lymphoma treated by rituximab - CHOP: a preliminary study [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2014, 58(2): 363 - 776

(收稿日期: 2015 - 04 - 20)

(修回日期: 2015 - 05 - 13)