

网络出版时间: 2021-9-7 14:47 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210907.1405.031.html>

CP-25 调控 GRK2/p38MAPK 信号在血管紧张素Ⅱ诱导小鼠系膜细胞增殖中的作用

王祥,袁晓阳,徐靓,江丽,王盛付,黄李娜,魏伟,严尚学

摘要 目的 研究芍药苷-6'-O-苯磺酸酯(CP-25)在血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)诱导的肾小球系膜细胞(MCs)增殖中的作用及相关机制。方法 体外培养SV40 MES 13系膜细胞,以AngⅡ诱导MCs增殖,高内涵成像显微镜检测不同浓度CP-25(10、100、1 000 nmol/L)对AngⅡ诱导的MCs增殖的影响;Western blot检测MCs中G蛋白偶联受体激酶-2(GRK2)和磷酸化p38(p-p38)蛋白表达水平;激光共聚焦显微镜检测GRK2和p-p38蛋白的荧光信号并分析二者共定位率;成像流式细胞仪检测MCs中GRK2入胞质的细胞比例。结果与对照组比较,AngⅡ可诱导MCs的增殖,增加GRK2和p-p38蛋白表达,上调GRK2和p-p38MAPK共定位率,提高GRK2入胞比例,差异有统计学意义($P < 0.01$)。CP-25(10、100、1 000 nmol/L)可不同程度地抑制AngⅡ诱导的增殖,抑制GRK2、p-p38蛋白表达及GRK2和p-p38的共定位水平,降低GRK2入胞比例。结论 CP-25可抑制AngⅡ诱导的MCs增殖,其机制与调节GRK2/p38信号有关。

关键词 系膜细胞; 增殖; 血管紧张素Ⅱ; GRK2; p38; CP-25
中图分类号 R 180.2160; R 350.20

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)11-1774-06
 doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.11.018

系膜细胞(mesangial cells, MCs)是肾小球主要的三大实质细胞之一,对于维持肾小球形态及功能稳态发挥着不可替代的作用^[1-2]。血管紧张素Ⅱ(angiotensinⅡ, AngⅡ)是肾素-血管紧张素系统的主要活性物质^[3]。高水平的AngⅡ可以促进肾小球系膜扩张、肾小球肥大及足细胞丢失,诱发高血压、蛋白尿以及肾小球滤过率减少。其体内水平与糖尿病型肾病、狼疮性肾炎等疾病的肾脏损伤呈正相

2021-06-04 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81330081)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 抗炎免疫药物安徽省协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 王祥,男,硕士研究生;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wwei@ahmu.edu.cn;

严尚学,男,副研究员,硕士生导师,责任作者,E-mail: yan-shx@163.com

关^[4]。

芍药苷-6'-O-苯磺酸酯(paeoniflorin-6'-O-benzene sulfonate, 代号: CP-25)是一种来源于芍药苷(paeoniflorin, Pae)结构修饰的新型活性单体。课题组前期研究^[5-7]表明,CP-25可调节多种免疫细胞功能,对小鼠胶原性关节炎、大鼠佐剂性关节炎以及小鼠干燥综合征均具有治疗作用。该研究以小鼠肾小球系膜细胞系SV40 MES 13为对象,研究CP-25对AngⅡ诱导MCs增殖的作用及其对GRK2/p38信号通路的影响,为CP-25治疗与MCs相关的肾脏疾病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 小鼠肾小球系膜细胞系SV40 MES 13(以下简称MCs)购于中国武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 试剂与仪器 AngⅡ为美国Sigma公司产品; p38MAPKXP[®] Rabbit mAb、p-p38 MAPK(Thr180/Tyr182)XP[®] Rabbit mAb、G蛋白偶联受体激酶-2(G protein coupled receptor kinase-2, GRK2)抗体为美国Cell Signaling Technology公司产品; CP-25由安徽医科大学临床药理研究所实验室合成,纯度大于98.8%。ImageStreamX Mark II成像流式细胞仪为德国密理博公司产品; 高内涵细胞成像系统为美国赛默飞公司产品; 共聚焦显微镜(SP8)为德国徕卡公司产品; 488通道荧光二抗(Rabbit)、594通道荧光二抗(Mouse)为Elab science公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 MCs置于5%CO₂、37℃恒温培养箱中培养,并用含有10%胎牛血清和1%青-链霉素的DMEM高糖培养基、DMEM-F12培养基进行换液、传代。当培养瓶中细胞密度长至80%左右时开始进行相关实验。

1.2.2 细胞增殖能力测定 将1×10⁵个细胞(500 μl)接种于24孔培养板中,待细胞贴壁后,分别加入

Ang II (终浓度 50 nmol/L) 以及不同浓度的 CP-25 (终浓度 10、100、1 000 nmol/L), 对照组以培养基补齐至相同体积。培养 48 h 后, 将培养板取出。DAPI 染核 3 min, 洗涤 3 次后每孔加入 PBS 50 μ L, 以高内涵细胞成像系统拍摄并计算相同面积培养板中细胞数量的平均值。每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

1.2.3 Western blot 检测 GRK2、p38、p-p38 蛋白的表达水平 常规提取 MCs 总蛋白, 电泳, 转膜, 室温封闭后分别加一抗 GRK2 (1 : 800)、p38 MAPK (1 : 1 000)、p-p38 (1 : 1 000) 和 β -actin (1 : 2 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。加二抗 (1 : 10 000) 室温下孵育 1.5 h 后显影。使用 Image J 软件通过光密度测定法定量条带强度。重复 3 次进行半定量分析。

1.2.4 共聚焦显微镜检测 MCs 中 GRK2 与 p-p38 的共定位比例 预先将无菌的细胞爬片放在 24 孔板上, 每组设 3 个复孔。细胞完全附着后, 加入 Ang II (50 nmol/L) 处理 6 h, 再添加不同浓度的 CP-25 (终浓度为 10、100、1 000 nmol/L), 放入培养箱中培养 24 h。取出培养板, 加入抗 GRK2 (1 : 1 600) 和抗 p-p38 (1 : 1 600) 抗体 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜, 次日加入相应荧光标记的二抗室温下孵育 2 h, 共聚焦显微镜检测荧光信号, 分析每组 MCs 中 GRK2 与 p-p38 的共定位图像及比例。实验另设对照组 (培养液组) 和 Ang II (25 nmol/L) 刺激组做对照, 每组设 3 个复孔, 实验重复 3 次。

1.2.5 成像流式细胞术检测 GRK2 入胞质的比例

细胞处理同上, 收集细胞, 用 ImageStreamX Mark II 成像流式细胞仪检测胞质 GRK2 细胞比例。具体方法如下: 首先对单阳性样本进行软件自动荧光补偿, 设定标记 GRK2 (Ch02 通道, 呈绿色荧光) 和 DAPI (Ch07, 呈蓝色荧光) 的检测通道, 通过调整对焦好的单个细胞, 将 MCs 作为入胞质分析对象, GRK2 处于胞质位置的设定为阳性的细胞群, 软件自动划定胞质位置存在 GRK2 的细胞并计算统计结果。每个检测指标设 3 个复管, 实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 20.0 统计软件处理分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CP-25 对 Ang II 诱导的 MCs 增殖的影响

与对照组相比, Ang II 组可提高 MCs 单位面积细胞数, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。不同浓度 CP-25 (10、100、1 000 nmol/L) 可抑制 MCs 增殖, 降低 MCs

单位面积细胞平均值 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $F = 57.367$)。见图 1。

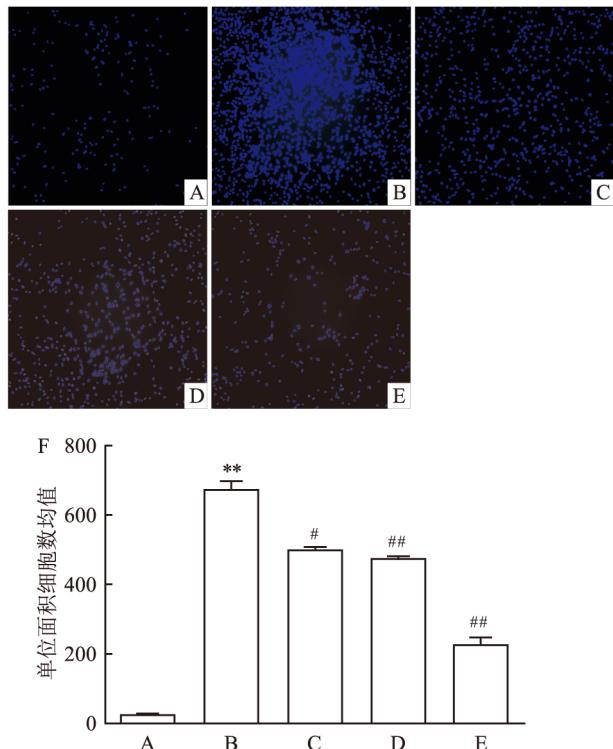


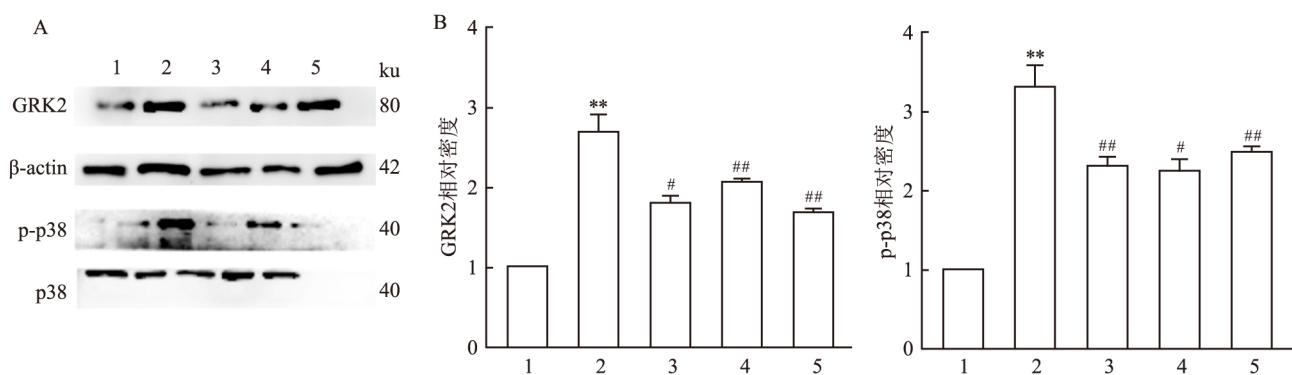
图 1 CP-25 对 MCs 增殖的影响 ($\times 200$, $n = 3$)

A: 对照组; B: Ang II 刺激组; C: CP-25 (10 nmol/L); D: CP-25 (100 nmol/L); E: CP-25 (1 000 nmol/L); F: 各组单位面积细胞数均值; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与 Ang II 刺激组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

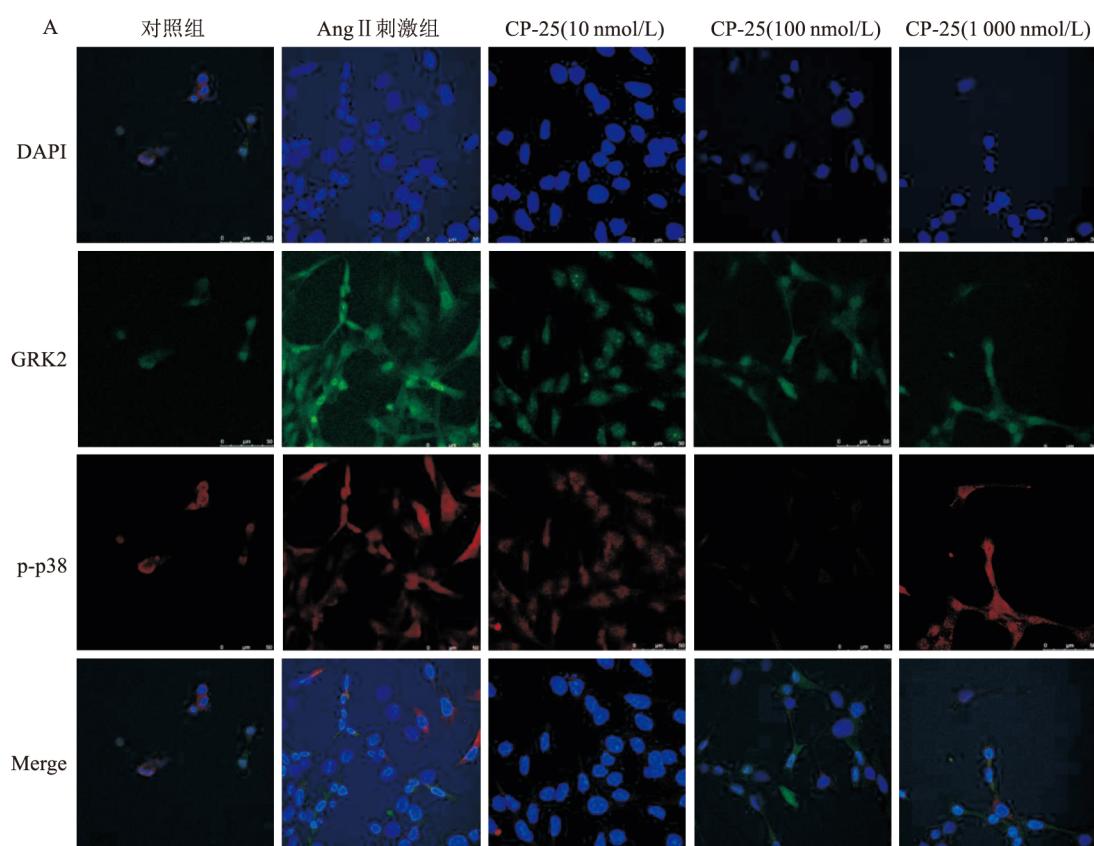
2.2 CP-25 对 GRK2 和 p-p38 蛋白表达的影响

检测 MCs 的 GRK2、p38 和 p-p38 的蛋白水平, 结果如图 2 所示。与对照组相比, Ang II 组可促进 GRK2、p-p38 蛋白表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。对 p38 水平无明显影响; 与 Ang II 刺激组比较, CP-25 (10、100、1 000 nmol/L) 可不同程度地抑制 GRK2 以及 p-p38 的蛋白表达水平, 差异有统计学意义 ($F = 109.397$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。

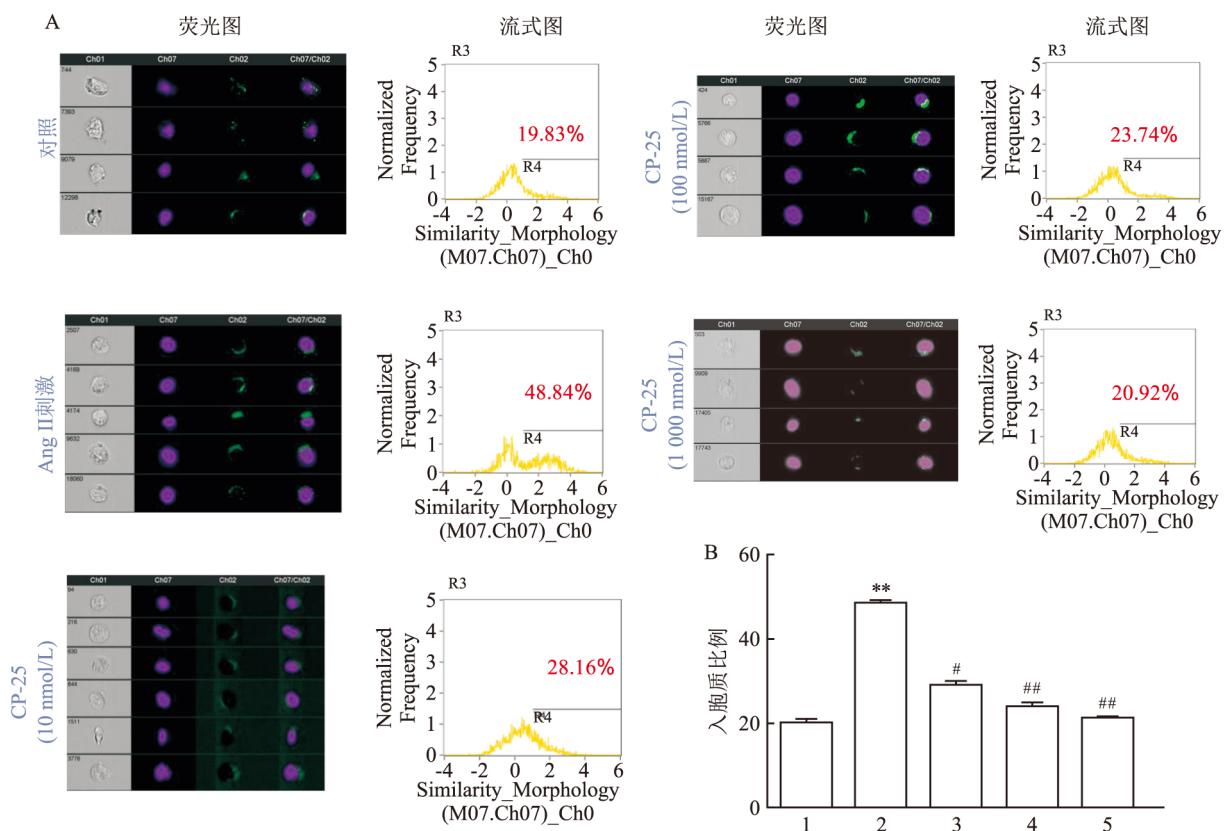
2.3 CP-25 对 GRK2 与 p-p38 共定位的影响 激光共聚焦显微镜检测 GRK2 和 p-p38 的荧光信号并分析两蛋白的共定位率数据。图 3 显示, 与对照组相比, Ang II 组蛋白的荧光强度增强, 两蛋白的共定位率上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 Ang II 刺激组相比, CP-25 (10、100、1 000 nmol/L) 可明显降低 GRK2 和 p-p38 蛋白的荧光强度, GRK2 和 p-p38 共定位率下降, 差异有统计学意义 ($F = 44.499$, $P < 0.05$)。

图2 CP-25对各组MCs中GRK2、p-p38蛋白表达水平的影响($n=3$)

A: Western blot 检测 GRK2、p-p38 的蛋白表达水平; B: 各组 GRK2、p-p38 表达水平比较; 1: 对照组; 2: Ang II 刺激组; 3: CP-25(10 nmol/L); 4: CP-25(100 nmol/L); 5: CP-25(1000 nmol/L); 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 Ang II 刺激组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图3 CP-25对GRK2与p-p38共定位率的影响($n=3$)

A: 免疫荧光法检测 GRK2、p-p38 共定位表达 $\times 400$; B: 各组共定位率比较; 1: 对照组; 2: Ang II 刺激组; 3: CP-25(10 nmol/L); 4: CP-25(100 nmol/L); 5: CP-25(1000 nmol/L); 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 Ang II 刺激组比较: # $P < 0.05$

图4 CP-25对Ang II诱导的GRK2入胞的影响($n=3$)

A:成像流式细胞仪检测GRK2入胞质比例;B:各组GRK2入胞比例比较;1:对照组;2:Ang II刺激组;3:CP-25(10 nmol/L);4:CP-25(100 nmol/L);5:CP-25(1 000 nmol/L);与对照组比较: ** $P < 0.01$;与Ang II刺激组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.4 CP-25对Ang II诱导GRK2入胞的影响 成像流式细胞仪检测GRK2在胞质处的MCs占MCs总数的比值。统计结果如图4所示。与对照组相比,Ang II刺激组MCs胞质处的荧光强度增强,GRK2处于胞质位置的MCs比例上升,差异有统计学意义($P < 0.01$),表明Ang II可促进MCs中GRK2的入胞;CP-25(10、100、1 000 nmol/L)可降低GRK2入胞比例($F = 57.478$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。

3 讨论

Ang II作为肾素-血管紧张素系统的重要组成部分,可调控MCs增殖、分化等生命活动进程。研究表明^[8-9]表明,Ang II与人胎儿肾小球MCs上的血管紧张素受体1(AT1)结合,可直接促进MCs增殖和纤连蛋白的表达,这一作用与其调节GRK2表达有关。本研究结果显示,Ang II可显著促进MCs增殖,促进GRK2表达水平升高,提示GRK2可能参与了MCs的增殖。

MCs作为肾小球的重要实质细胞之一,其表面表达有大量Ang II受体。Ang II受体是经典的G蛋

白偶联受体,其受体信号受GRK2调节。p38MAPK为G蛋白偶联信号下游分子,活化的p38MAPK通过上调ATF2、CHOP10、MEF2C等转录因子基因的表达和生物活性,可以影响细胞的增殖、分化和细胞因子的合成。有研究^[10]表明,GRK2是重要的GPCR调节剂,它不仅可以通过磷酸化活性GPCR的胞内结构域导致受体脱敏和内化,还可以与MAPKs中的p38亚基等各种内吞蛋白相互作用,GRK2含有pleckstrin同源结构域,这是其与p38蛋白直接发生相互作用的分子基础。另外,GRK2可将β-arrestins通过招募作用聚集到受体附近,并促进受体内在化。从而增强β-arrestins与MAPKs的相互作用,促进细胞的增殖活动。然而,GRK2/p38MAPK信号通路是否参与Ang II诱导的MCs增殖过程仍不清楚。本研究显示,Ang II可以促进GRK2与p-p38MAPK的蛋白表达,且增加两蛋白的共定位率,提示GRK2可能直接作用于p38MAPK蛋白,启动和诱导了p38MAPK下游信号,增强了MCs的增殖活动;GRK2入胞比例增加,提示GRK2主要在胞质中处理激活的G蛋白偶联受体及其信号,在

调节 G 蛋白偶联受体的脱敏和复敏中可能发挥重要作用, 其具体分子机制还需要进一步深入研究。因此, 选择性靶向作用 GRK2 可能对 MCs 增殖活动具有重要影响。

CP-25 作为一种 GRK2 抑制剂, 可直接结合 GRK2 的 Ala321 位点抑制 GRK2 活性, 调节前列腺素受体(EP4)等 G 蛋白偶联受体信号, 具有抑制类风湿关节炎滑膜细胞增殖和细胞因子分泌以及巨噬细胞极化作用^[11-13]。本研究显示, CP-25 可有效抑制 Ang II 诱导的 MCs 增殖, 下调 GRK2、p-p38 蛋白表达, 且可降低 GRK2 和 p-p38 的共定位率, 并抑制 GRK2 入胞过程, 这可能是 CP-25 抑制 Ang II 诱导的 MCs 增殖的分子机制。

综上, CP-25 可抑制 Ang II 诱导的 MCs 增殖, 其机制与调节 GRK2/p38MAPK 信号有关。

参考文献

- [1] Davies M, Thomas G J, Shewring L D, et al. Mesangial cell proteoglycans: synthesis and metabolism [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1992, 2(10 Suppl): S88-94.
- [2] Kwok S K, Tsokos G C. New insights into the role of renal resident cells in the pathogenesis of lupus nephritis [J]. *Korean J Intern Med*, 2018, 33(2): 284-9.
- [3] Clotet-Freixas S, Soler M J, Palau V, et al. Sex dimorphism in Ang II-mediated crosstalk between ACE2 and ACE in diabetic nephropathy [J]. *Lab Invest*, 2018, 98(9): 1237-49.
- [4] Nishiyama A, Kobori H. Independent regulation of renin-angiotensin-aldosterone system in the kidney [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2018, 22(6): 1231-9.
- [5] Liu X, Lu L, Tao B B, et al. All-trans retinoic acid inhibits the increases in fibronectin and PAI-1 induced by TGF- β 1 and Ang II in rat mesangial cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(9): 1035-41.
- [6] Goldsmith Z G, Dhanasekaran D N. G protein regulation of MAPK networks [J]. *Oncogene*, 2007, 26(22): 3122-42.
- [7] Jia X Y, Chang Y, Wei F, et al. CP-25 reverses prostaglandin E2 receptor desensitization-induced fibroblast-like synoviocyte dysfunction via the G protein-coupled receptor kinase 2 in autoimmune arthritis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(8): 1029-39.
- [8] 丁朝霞, 杨少锋, 吴启富, 等. 白芍总苷对 MRL/lpr 小鼠狼疮性肾炎的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(4): 656-60.
- [9] Chen J Y, Wu H X, Chen Y, et al. Paeoniflorin inhibits proliferation of fibroblast-like synoviocytes through suppressing G-protein-coupled receptor kinase 2 [J]. *Planta Medica*, 2012, 78(7): 665-71.
- [10] Akaishi T, Abe M, Okuda H, et al. High glucose level and angiotensin II type 1 receptor stimulation synergistically amplify oxidative stress in renal mesangial cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5214.
- [11] Niu H, Nie L, Liu M, et al. Benazepril affects integrin-linked kinase and smooth muscle alpha-actin expression in diabetic rat glomerulus and cultured mesangial cells [J]. *BMC Nephrol*, 2014, 15: 135.
- [12] Han C, Li Y, Wang Y, et al. Development of inflammatory immune response-related drugs based on G protein-coupled receptor kinase 2 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(2): 729-45.
- [13] 韩陈陈. G 蛋白偶联受体激酶 2 对人成纤维样滑膜细胞 EP4 受体信号通路的调节及 CP-25 的作用 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2017.

The role of CP-25 on the proliferation induced by angiotensin II in mouse mesangial cells through regulating GRK2/p38MAPK signals

Wang Xiang, Yuan Xiaoyang, Xu Liang, et al

(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University; Key Lab of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education; Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the effects and mechanisms of paeoniflorin-6'-O-benzenesulfonate (CP-25) on the proliferation of mesangial cells (MCs) induced by angiotensin (Ang) II. **Methods** The mesangial cell line SV40 MES 13 was cultured *in vitro* and stimulated with Ang II (50 nmol/L) for 2 days. CP-25 (10, 100, 1 000 nmol/L) was added at same time. After co-cultured 48 h, the proliferation of MCs was measured by high-content imaging microscope. The protein expression levels of GRK2 and phosphorylated p38 (p-p38) in MCs were detected by Western blot. The fluorescence signaling of GRK2 and p-p38 protein was measured with laser confocal microscope and its colocalization rates were analyzed. The proportion of GRK2 into the cytoplasm was detected with cytometer imaging flow. **Results** Compared to the control group, the results showed that Ang II could significantly promote

网络出版时间: 2021-9-7 14:46 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210907.1402.017.html>

基于低糖低血清营养胁迫构建内质网应激和自噬模型及其评价

化维, 朱嫚嫚, 刘加涛

摘要 目的 通过营养胁迫构建内质网应激和自噬模型并评价其对肿瘤增殖和凋亡的影响。方法 以含 1% 血清的低糖 DMEM 培养基分别处理 HepG2 细胞、Huh7 细胞不同时间, Western blot 检测内质网应激标志蛋白葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、活化转录因子-6 (ATF6)、必需肌醇 1 α (IRE1 α)、蛋白激酶 RNA 样内质网激蛋白 (PERK) 和自噬蛋白轻链 3 (LC3)、核孔蛋白 62 (P62)、自噬相关蛋白 1 (Beclin-1) 的表达。免疫荧光双染观察自噬蛋白 LC3 和 GRP78 的共表达情况。分别采用流式细胞术和 CCK-8 检测营养胁迫对细胞凋亡和增殖的影响。结果 Western blot 结果显示营养胁迫可时间依赖性的增加肝癌细胞内质网应激和自噬相关蛋白的表达, 且在 36 h 达到高峰。激光共聚焦检测结果进一步证明营养胁迫 36 h 后肝癌细胞 GRP78 和 LC3 荧光强度显著增加。流式细胞术结果显示, 低糖低血清营养胁迫模型不会增加肝癌细胞凋亡, 但 CCK-8 实验提示营养胁迫可抑制肝癌细胞的增殖。结论 1% 血清低糖 DMEM 不仅可以诱导内质网应激和自噬且不增加肿瘤细胞凋亡, 更符合微环境肿瘤细胞生存状态, 为研究内质网应激和自噬提供一种新方法。

关键词 营养胁迫; 内质网应激; 自噬; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 735.7; Q 2-33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)11-1779-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.11.019

2021-07-21 接收

基金项目 国家自然科学基金(编号: 82072687); 安徽省自然科学基金(编号: 2008085MH257); 高校优秀青年人才支持计划(编号: gxyq2020008)

作者单位 安徽医科大学第一附属医院药剂科, 合肥 230022

作者简介 化维, 女, 硕士研究生, 初级药师;

刘加涛, 男, 副主任药师, 责任作者, E-mail: liujiatao@ahmu.edu.cn

肿瘤细胞增殖异常活跃, 常处于缺血、低氧等营养缺乏的应激状态。肿瘤细胞可通过内质网应激和自噬过程应对恶劣的微环境, 来维持自身存活^[1]。多项研究^[2]表明, 内质网应激和自噬共同参与多种肿瘤的发生发展、侵袭转移、凋亡抵抗等生物学过程。目前, 大部分研究者都采用化学药物体外构建内质网应激或自噬模型, 如通过衣霉素阻止蛋白质合成过程中 N 糖基化的形成构建内质网应激模型, 通过雷帕霉素特异性的抑制 mTOR 通路激活自噬。这些方法诱导内质网应激或自噬虽然操作简单, 但也存在诸多的问题。此外, 为了克服药物诱导模型的缺陷, 部分研究者分别采用无血清基础培养基饥饿^[3]或者 Hanks 液等平衡液使肿瘤细胞处于完全没有生长因子、葡萄糖等极端的状态诱导内质网应激或自噬模型。为尽可能规避化学药物和极端营养胁迫诱导应激模型造成的实验误差, 该研究采用含 1% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基体外构建营养胁迫模型, 检测该模型条件下肝癌细胞内质网应激和自噬水平, 以期为体外研究内质网应激和自噬在肿瘤发生发展等过程中的作用和机制提供模型。

1 材料与方法

1.1 细胞 人肝癌细胞 HepG2 购自中国科学院上海细胞库; 人肝癌细胞 Huh7 购自武汉普诺赛细胞生物有限公司。

1.2 主要试剂 细胞培养用胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM、低糖 DMEM 基础培养基均购自以色列 BI 公司; 1% 的青霉素-链霉素和胰蛋白酶购自上海碧云天有限公司; 山羊抗兔蛋白激酶

the MCs proliferation, increase the protein expression levels of CRK2 and p-p38, up-regulate the colocalization rates of CRK2 and p-p38, and increase the proportion of CRK2 into the cytoplasm. CP-25 (10, 100, 1 000 nmol/L) could inhibit the proliferation induced by Ang II to varying degrees, reduce the protein expression levels of CRK2, p-p38 and the co-localization rates of CRK2 and p-p38, and down-regulate the ratios of CRK2 into cytoplasm. **Conclusion** CP-25 can inhibit MCs' proliferation stimulated with Ang II, and its mechanism may be related to CRK2/p38MAPK signaling pathway.

Key words mesangial cell; proliferation; Ang II; CRK2; p38; CP-25