

网络出版时间: 2019-3-26 13:45 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190322.1759.021.html>

Rac1 抑制剂对高糖诱导大鼠 肾小球系膜细胞损伤的影响及其作用机制

范高霞¹, 甘 甜¹, 周晓燕², 凌宏威³, 应长江³, 李 伟³

摘要 目的 探讨 Rac1 抑制剂(NSC23766) 对高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞损伤的影响及其机制。方法 以大鼠肾小球系膜细胞为研究对象, 将大鼠肾小球系膜细胞随机分为正常糖组(NG 组)、高糖刺激组(HG 组)、高糖刺激 + NSC23766 组(HG + NSC 组)、溶剂对照组(HG + DMSO 组) 和渗透压对照甘露醇组(MG 组)。应用 CCK-8 试剂盒检测不同浓度 NSC23766 对高糖诱导的大鼠肾小球系膜细胞活力的影响, 采用流式细胞仪检测各组大鼠肾小球系膜细胞凋亡情况, 采用 Western blot 法检测各组大鼠肾小球系膜细胞磷酸化氨基末端蛋白激酶(p-JNK)、Cleaved caspase-3 蛋白表达水平、核因子 κ B(NF- κ B) 核转入水平, 应用智能激光共聚焦显微镜分析各组细胞 NF- κ B 表达情况。结果 与 NG 组比较, HG 组细胞活力降低($P < 0.05$), 细胞凋亡率升高($P < 0.05$), p-JNK、Cleaved caspase-3 蛋白表达量增加, NF- κ B 核转入增加($P < 0.05$); 与 HG 组比较, HG + NSC(10 μ mol/L) 组细胞活力明显增加($P < 0.05$), 细胞凋亡率降低($P < 0.05$), p-JNK、Cleaved caspase-3 蛋白表达量降低, NF- κ B 核转入减少($P < 0.05$); 与 HG + NSC(10 μ mol/L) 组比较, HG + DMSO 组细胞活力降低($P < 0.05$), 细胞凋亡率升高($P < 0.05$), p-JNK、Cleaved caspase-3、蛋白表达水平增加, NF- κ B 核转入增加($P < 0.05$)。Rac1 抑制剂(NSC23766) 可使高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞活力增加, 凋亡率下降, 降低 p-JNK、Cleaved caspase-3 蛋白表达水平和 NF- κ B 核转入量。结论 NSC23766 可通过抑制 Rac1/JNK/NF- κ B 信号通路减轻高糖诱导的肾小球系膜细胞损伤。

关键词 Rac1 抑制剂; 肾小球系膜细胞; 磷酸化氨基末端蛋白激酶; 凋亡; 糖尿病肾病

中图分类号 R 587.1; R 587.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)04-0605-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.021

2019-01-04 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81701298)

作者单位: 徐州医科大学¹ 研究生学院、² 形态学教学中心, 徐州 221004

³ 徐州医科大学附属医院内分泌科, 徐州 221004

作者简介: 范高霞, 女, 硕士研究生;

李 伟, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: liwei0190@163.com;

应长江, 男, 副教授, 副主任医师, 责任作者, E-mail: yej321651@163.com

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病常见的微血管并发症, Zhang et al^[1] 研究发现 DN 患者住院率逐渐增加, 给社会带来极大地经济负担。DN 的发生与遗传易感性、高血糖、低度炎症状态、血管内皮细胞功能紊乱等多种因素有关, 但其具体发病机制尚不明确。已知肾小球系膜细胞是肾小球的主要功能细胞, 在人体正常生理状态下能够收缩细胞骨架, 分泌细胞因子。体外研究^[2] 表明高糖环境可诱导肾小球系膜细胞增殖、系膜细胞基质增生, 同时持续的高糖刺激会引起肾小球系膜细胞凋亡。因此, 抑制肾小球系膜细胞的异常增殖与凋亡, 对于改善高糖引起的肾小球系膜细胞损伤, 延缓 DN 的发展起到重要作用。Ras 相关的 C3 肉毒杆菌毒素底物 1(Rac1) 是鸟苷三磷酸水解酶(GTPases) 的 Rac 家族成员, 在调节增殖、凋亡、分化中起着重要作用^[3-4]。体外研究^[5-6] 表明, 敲除 Rac1 或抑制 c-Jun 氨基末端激酶(c-jun n-terminal kinase, JNK)/核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路可以减轻肾脏损伤, 但是 Rac1 与 JNK/NF- κ B 信号通路之间的关系尚不清楚, 为了进一步探究敲除 Rac1 对肾脏的保护作用是否与 JNK/NF- κ B 信号通路有关, 该研究以肾小球系膜细胞为研究对象, 体外模拟高糖环境, 检测 NSC23766 对其细胞活性、细胞凋亡及 p-JNK、NF- κ B 的蛋白表达的影响, 为探索 DN 的发病机制提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料 大鼠肾小球系膜细胞(徐州医科大学药理学实验室赠予); DMEM 培养基、含 0.25% EDTA 的胰蛋白酶(江苏凯基生物技术股份有限公司); 胎牛血清(杭州四季青公司); 细胞活性检测试剂盒 CCK-8、4% 多聚甲醛、Triton X-100、山羊血清、抗荧光猝灭剂(徐州 VICMED 公司); AnnexinV-7 AAD/PI 凋亡检测试剂盒(美国 BD Bioscience); Rac1 抑制剂(NSC23766, 美国 selleck 公司); 鼠抗 JNK、p-JNK 多克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司); 兔抗 NF- κ B 多克隆抗体(美国 Cell Signal

Technology 公司); 鼠抗活化性半胱天冬酶 3 (cleaved caspase-3) 多克隆抗体、鼠抗 Rac1 多克隆抗体及组蛋白(H3)多克隆抗体、 β -actin 抗体及山羊抗鼠、兔 IgG 抗体、Alexa Flour 488-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG(美国 Proteintech 公司); 二甲喹甲酸(BCA)蛋白浓度检测试剂盒、配胶试剂盒、DAPI(上海碧云天有限公司); 37 °C、5% CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司); 奥德赛双色红外激光成像扫描仪(中国香港基因有限公司); 智能激光扫描共聚焦显微镜(Olympus Fv 10i, 日本奥林巴斯光学公司)。

1.2 研究方法

1.2.1 大鼠肾小球系膜细胞的培养^[7] 提前预热含有 10% 胎牛血清、含 1% 青霉素、1% 链霉素的 DMEM 低糖培养基,同时打开水浴箱并设置 37 °C,打开超净台紫外线 30 min 后将细胞从液氮罐中拿出并迅速放入 37 °C 水浴箱中,轻柔快速的晃动至解冻,约 1 min 时间,75% 酒精擦拭外表面后迅速转入超净台,将细胞悬于 5 ml DMEM 低糖完全培养基中,吹打均匀后离心,弃去培养基,将细胞重悬,取 1 滴计数,调整细胞密度至 5×10^5 个/ml 密度接种至 10 cm 培养皿中,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。2~3 d 后,光镜下观察细胞汇合度达 80% 以上即传代,按细胞密度为 5×10^5 个/ml 进行传代培养,取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 优化实验条件及实验分组 取不同的糖浓度刺激大鼠肾小球系膜细胞,同时采用不同浓度的甘露醇以排除由于高糖产生的渗透压对细胞的影响。前期实验表明在 25 mmol/L 的高糖条件下,12 h 和 24 h 系膜细胞活力增加,48 h 和 72 h 系膜细胞活力降低^[8]。因此本实验选择该实验条件进行下一步实验。细胞生长至对数期后,细胞用无血清 DMEM 低糖培养基培养 24 h 后(同步化),将大鼠肾小球系膜细胞随机分为正常糖组(NG 组,含 5.6 mmol/L 葡萄糖的低糖培养基)、高糖刺激组(HG 组,含 25 mmol/L 葡萄糖的高糖培养基)、高糖刺激 + NSC23766 组(HG + NSC 组,含 25 mmol/L 葡萄糖 + 不同浓度的 NSC23766)、溶剂对照组(HG + DMSO 组,含 25 mmol/L 葡萄糖 + 与药物干预组同体积的 DMSO 试剂)、渗透压对照甘露醇组(MG 组,含 5.6 mmol/L 葡萄糖 + 19.4 mmol/L 的甘露醇),每 24 h 更换培养基,培养 48 h。

1.2.3 NSC23766 干预检测高糖诱导肾小球系膜细胞活力的影响 细胞以 1×10^5 个/ml 接种于 96 孔

板内,100 μ l/孔。按照 1.2.2 方法进行细胞培养,细胞培养 48 h 后,加入 CCK-8 溶液,在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育 2 h 后用酶标仪在 450 nm 波长处测定每孔吸光度(optical density, OD)值,每个实验组设 6 个复孔,重复 3 次。

1.2.4 流式细胞仪检测各组肾小球系膜细胞凋亡率 细胞以 5×10^5 个/ml 接种于 6 孔板内,2 ml/孔,按照实验分组干预 48 h 后,用不含 EDTA 的胰酶将细胞消化下来,离心,重悬,取 1×10^6 个/100 μ l 细胞于流式管中,细胞清洗 3 次后分别加入 5 μ l Annexin V 和 5 μ l 7 AAD,轻柔涡旋后,室温避光孵育 15 min 后使用流式细胞仪检测各组大鼠肾小球系膜细胞的凋亡率,实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测各组细胞 p-JNK、Cleaved caspase-3 蛋白表达及 NF- κ B 核转入情况 各组大鼠肾小球系膜细胞按照 1.2.2 中实验方法培养 48 h 后,根据试剂盒说明书提取胞质及胞核蛋白,提取过程中加入磷酸酶抑制剂。用 BCA 法检测蛋白浓度。取 30 μ g 蛋白样品煮沸变性后在 8%~12% SDS-PAGE 凝胶进行电泳,转移到硝酸纤维素膜(nitrocellulose membrane, NC)膜上。3% BSA 或牛奶室温封闭 2 h,一抗 JNK、p-JNK、NF- κ B、Cleaved caspase-3、H3、 β -actin 按照 1:500 浓度,4 °C 摇床过夜,TBST 洗膜 3 次,二抗浓度为 1:500,室温闭光孵育 2 h,TBST 清洗 3 次后在奥德赛双色红外激光成像系统扫描,Image J 软件进行图像分析处理。

1.2.6 智能激光共聚焦显微镜分析各组细胞 NF- κ B 表达情况 各组大鼠肾小球系膜细胞接种于 NEST 皿中,按照 1.2.2 中实验方法培养 48 h 后, PBS 清洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 清洗 3 次,0.3% 的 Triton X-100 破膜 30 min,10% 山羊血清封闭 1 h,加入抗 NF- κ B 抗体按照 1:400 于 4 °C 冰箱孵育过夜, PBS 清洗 3 次,山羊抗兔荧光二抗室温避光孵育 2 h, PBS 清洗 3 次, DAPI 染核 10 min, PBS 清洗后封片,于智能激光共聚焦显微镜拍照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,所有数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。计量资料两组间比较采用 t 检验,多组间比较先行方差齐性分析,若方差齐则采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间有差别则多组间的两两比较采用 q 检验,以 $\alpha = 0.05$ 为检验标准, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSC23766 药物浓度的筛选 与 NG 组(1.846

± 0.045) 比较, HG 组 (0.611 ± 0.092) 细胞活力明显降低 ($F = 863.064$, $P < 0.05$); 与 HG 组比较, HG + NSC ($2.5 \mu\text{mol/L}$) 组 (0.626 ± 0.097) 及 HG + NSC ($5 \mu\text{mol/L}$) 组 (0.645 ± 0.095) 细胞活力升高, 但是差异无统计学意义 ($F = 0.184$, $P > 0.05$); HG + NSC ($10 \mu\text{mol/L}$) 组 (1.313 ± 0.061) 细胞活力升高较明显, 与 HG 组比较差异有统计学意义 ($F = 289.748$, $P < 0.05$); 提示 NSC23766 浓度在 $10 \mu\text{mol/L}$ 时对肾小球系膜细胞具有保护作用, 见图 1。

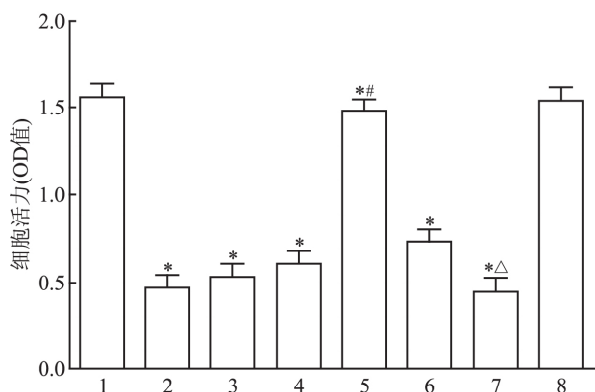


图1 CCK-8 检测 NSC23766 对高糖诱导的肾小球系膜细胞的影响

1: NG 组; 2: HG 组; 3: HG + NSC ($2.5 \mu\text{mol/L}$) 组; 4: HG + NSC ($5 \mu\text{mol/L}$) 组; 5: HG + NSC ($10 \mu\text{mol/L}$) 组; 6: HG + NSC ($20 \mu\text{mol/L}$) 组; 7: HG + DMSO 组; 8: MG 组; 与 NG 组比较: * $P < 0.05$; 与 HG 组比较: # $P < 0.05$; 与 HG + NSC ($10 \mu\text{mol/L}$) 组比较: Δ $P < 0.05$

2.2 NSC23766 对各组肾小球系膜细胞活力的影响 与 NG 组 (1.820 ± 0.025) 比较, HG 组 (0.661 ± 0.054) 大鼠系膜细胞活力明显降低 ($F = 2.251$, $P < 0.05$); 与 HG 组比较, HG + NSC ($10 \mu\text{mol/L}$) 组 (1.260 ± 0.016) 细胞活力明显增加 ($F = 685.583$, $P < 0.05$); 与 HG + NSC ($10 \mu\text{mol/L}$) 组比较, HG + DMSO 组 (0.645 ± 0.028) 细胞活力降低 ($F = 2.114$, $P < 0.05$)。见图 2。

2.3 流式细胞仪检测各组大鼠肾小球系膜细胞凋亡率 与 NG 组 (14.950 ± 0.217) 比较, HG 组 (26.300 ± 2.000) 大鼠肾小球系膜细胞凋亡率明显增加 ($F = 1.172$, $P < 0.05$); 与 HG 组比较, HG + NSC ($10 \mu\text{mol/L}$) 组 (19.100 ± 1.000) 大鼠肾小球系膜细胞凋亡率明显降低 ($F = 31.104$, $P < 0.05$); 与 HG + NSC ($10 \mu\text{mol/L}$) 组比较, HG + DMSO 组 (27.100 ± 1.000) 大鼠肾小球系膜细胞凋亡率明显增加 ($F = 96.000$, $P < 0.05$)。见图 3。

2.4 Western blot 检测各组细胞 p-JNK、Cleaved caspase-3 蛋白表达及 NF- κ B 核转入情况 与 NG

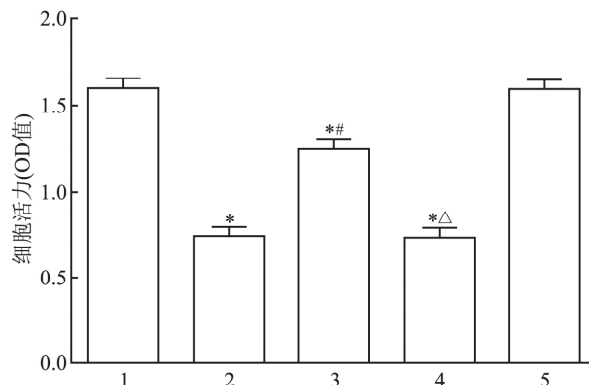


图2 CCK-8 检测各组肾小球系膜细胞活力

1: NG 组; 2: HG 组; 3: HG + NSC ($10 \mu\text{mol/L}$) 组; 4: HG + DMSO 组; 5: MG 组; 与 NG 组比较: * $P < 0.05$; 与 HG 组比较: # $P < 0.05$; 与 HG + NSC ($10 \mu\text{mol/L}$) 组比较: Δ $P < 0.05$

组比较, HG 组的 p-JNK、Cleaved caspase-3 的蛋白表达水平增加, NF- κ B 核转入水平增加 ($P < 0.05$); 与 HG 组比较, HG + NSC ($10 \mu\text{mol/L}$) 组大鼠肾小球系膜细胞 p-JNK、Cleaved caspase-3 的蛋白表达水平降低, NF- κ B 核转入水平降低 ($P < 0.05$); 与 HG + NSC ($10 \mu\text{mol/L}$) 组比较, HG + DMSO 组细胞 p-JNK、Cleaved caspase-3 表达水平增加, p-JNK、Cleaved caspase-3 的蛋白表达水平增加, NF- κ B 核转入水平增加 ($P < 0.05$), 各指标每组间差异有统计学意义 ($F_{\text{p-JNK}} = 959.200$, $F_{\text{Cleaved caspase-3}} = 435.780$, $F_{\text{NF-}\kappa\text{B}} = 60.090$, $P < 0.05$)。见图 4。

2.5 共聚焦显微镜分析各组细胞中 NF- κ B 表达情况 与 NG 组细胞比较, HG 组细胞绿色荧光入核量增加; 与 HG 组细胞比较, HG + NSC ($10 \mu\text{mol/L}$) 组绿色荧光入核量减少, 提示高糖刺激可增加 NF- κ B 核转入, Rac1 抑制剂 (NSC23766) 可减少高糖刺激引起的 NF- κ B 核转入量。见图 5。

3 讨论

系膜细胞又称间充质细胞, 位于肾小球毛细血管袢之间, 对于维持肾小球系膜细胞结构具有重要作用。高血糖诱导肾小球基底膜弥漫性增厚与肾小球系膜细胞增殖、肥大、凋亡有关, 是肾小球功能丧失和肾小管间质纤维化的主要原因^[9]。本研究显示 NSC23766 作用后肾小球系膜细胞活性明显增加, 凋亡率显著降低。本课题组前期研究与 Lin et al^[10] 研究结果一致。说明 NSC23766 对高糖诱导的肾小球系膜细胞损伤具有保护作用, 但是其机制尚不清楚。

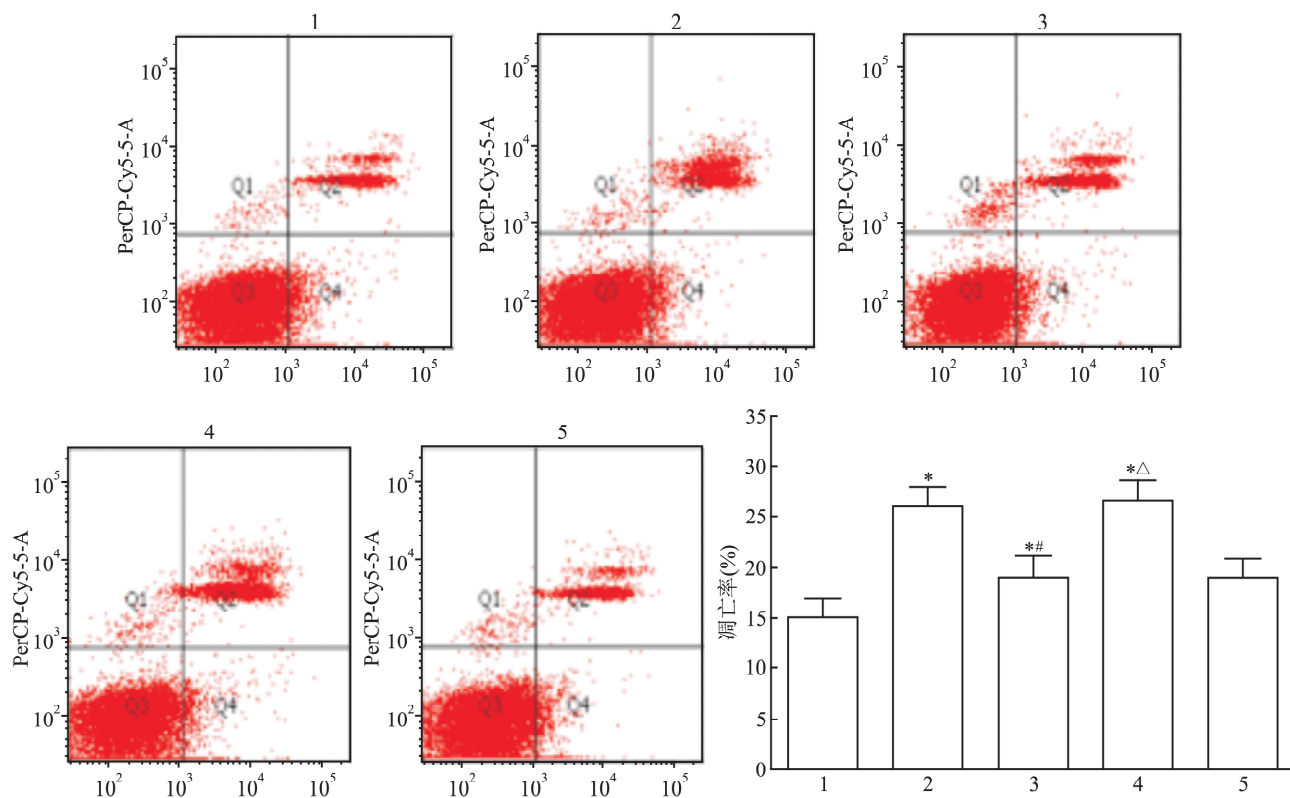


图3 流式细胞仪检测各组肾小球系膜细胞凋亡率

1: NG 组; 2: HG 组; 3: HG + NSC (10 μ mol/L) 组; 4: HG + DMSO 组; 5: MG 组; 与 NG 组比较: * $P < 0.05$; 与 HG 组比较: # $P < 0.05$; 与 HG + NSC (10 μ mol/L) 组比较: △ $P < 0.05$

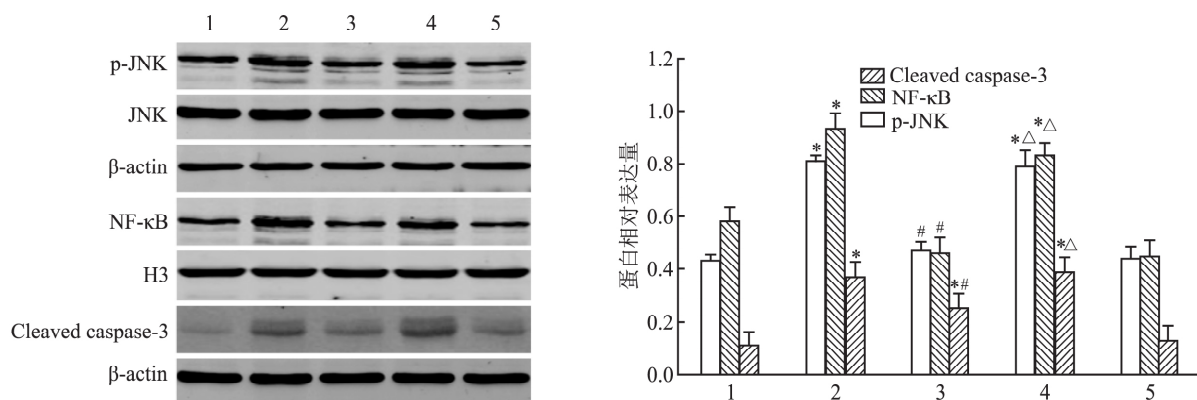


图4 Western blot 法检测各组肾小球系膜细胞 p-JNK、NF-κB、Cleaved caspase-3 蛋白表达情况

1: NG 组; 2: HG 组; 3: HG + NSC (10 μ mol/L) 组; 4: HG + DMSO 组; 5: MG 组; 与 NG 组比较: * $P < 0.05$; 与 HG 组比较: # $P < 0.05$; 与 HG + NSC (10 μ mol/L) 组比较: △ $P < 0.05$

研究^[11]表明, JNK 的磷酸化与肾小球系膜细胞损伤密切相关, 正常情况下 JNK 以去磷酸化形式存在, 外界刺激下 JNK 的氨基末端残基磷酸化, 形成 p-JNK, 发挥其生物学效应。在糖尿病大鼠模型中, 抑制 JNK 磷酸化, 可以减少 NF-κB 核转入, 并且显著降低凋亡启动子 Cleaved caspase-3 的表达, 从而减轻肾脏损伤^[6, 12]。本研究结果表明, 高糖环境下

肾小球系膜细胞 p-JNK、Cleaved caspase-3 的蛋白表达水平增加, NF-κB 的核转入水平增加。NSC23766 作用后 p-JNK、Cleaved caspase-3 的蛋白表达水平下降, NF-κB 的核转入水平减少, 由此可见, NSC23766 是通过抑制 JNK/NF-κB 信号通路对高糖引起的系膜细胞损伤起到保护作用。

Rac1 是细胞内重要的信号转导分子, 其有

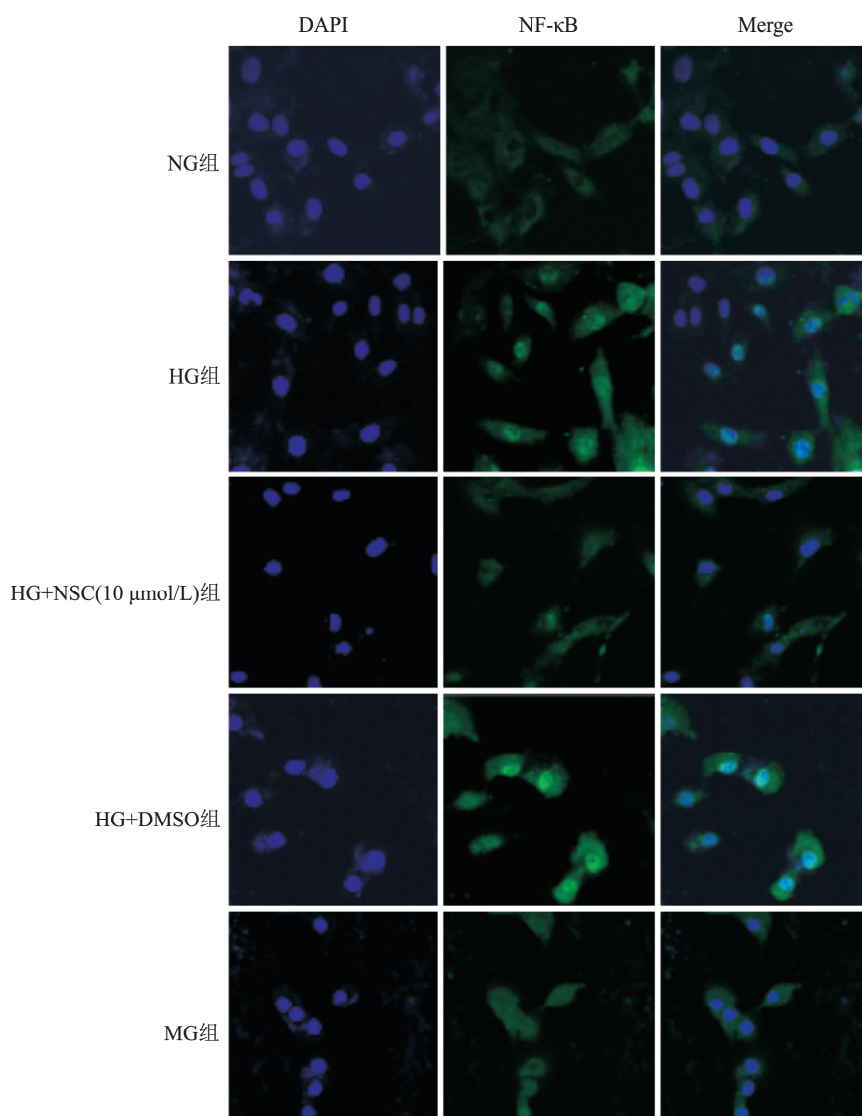


图5 智能激光共聚焦显微镜分析各组肾小球系膜细胞 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 蛋白表达情况 $\times 600$

GTPase 结合区,因此表现出 GTP 酶活性, GTP 酶在有活性的三磷酸鸟苷(GTP) 与无活性的二磷酸鸟苷(GDP) 两种构象之间的循环过程起着多条信号转导通路的“分子开关”作用,使得 Rac1 可在活性型 GTP 结合形式和限制型或失活型 GDP 结合形式两种构象之间进行循环^[13]。NSC23766 是一种 Rac1 GTPase 抑制剂,通过鸟嘌呤核苷酸交换因子(GEFs) ,靶向抑制 Rac1 活性。研究^[14-15]表明 NSC23766 对于肾小球疾病起保护作用,其可能的机制与抗炎、抗凋亡、抗氧化有关,但是其对肾脏保护作用具体信号通路尚不明确。本研究表明: NSC23766 作用后抑制了 Rac1/JNK/NF- κ B 信号通路从而对高糖诱导的肾小球系膜细胞起到保护作用,但是有研究^[15]表明足细胞特异性 Rac1 缺失通过 Rac1/PAK1/ β -catenin 信号通路可以改善链脲菌

素诱导的 DN 小鼠足细胞损伤和蛋白尿,由此可见抑制 Rac1 活性还可能与其他信号通路有关,其详细机制有待进一步研究。

综上所述,本研究表明 NSC23766 对高糖诱导肾小球系膜细胞具有保护作用,其分子机制可能与抑制 Rac1/JNK/NF- κ B 通路有关,本研究为 DN 的发生机制提供相关依据。

参考文献

- [1] Zhang L, Long J, Jiang W, et al. Trends in chronic kidney disease in China[J]. *New Engl J Med*, 2016, 375(9): 905-6.
- [2] Xu Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. *Jama*, 2013, 310(9): 948-59.
- [3] Pani G, Colavitti R, Bedogni B, et al. A redox signaling mechanism for density-dependent inhibition of cell growth[J]. *J Biol Inorg Chem* 2000, 275(49): 38891-9.

- [4] Humar M, Aadriopoulos N, Pischke S E, et al. Inhibition of activator protein 1 by barbiturates is mediated by differential effects on mitogen-activated protein kinases and the small G proteins ras and rac-1 [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 311(3): 1232–40.
- [5] Nagase M, Kurihara H, Aiba A, et al. Deletion of Rac1GTPase in the myeloid lineage protects against inflammation-mediated kidney injury in mice [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150886.
- [6] Huang W, Lan X, Li X, et al. Long non-coding RNA PVT1 promote LPS-induced septic acute kidney injury by regulating TNF α and JNK/NF- κ B pathways in HK-2 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 47: 134–40.
- [7] 张红利, 张晓翠, 李秀, 等. 人重组血管紧张素转化酶 2 对血管紧张素诱导的人肾小球系膜细胞增殖凋亡的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(5): 707–10.
- [8] Ying C, Chen L, Wang S, et al. Zeaxanthin ameliorates high glucose-induced mesangial cell apoptosis through inhibiting oxidative stress *via* activating AKT signalling-pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 796–805.
- [9] Zou Y, Chen Z, Li J, et al. Progesterone and adiponectin receptor 3 up-regulates fibronectin and intercellular adhesion molecule-1 in glomerular mesangial cells *via* activating NF- κ B signaling pathway under high glucose conditions [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 275.
- [10] Lin C L, Wang J Y, Ko J Y, et al. Superoxide destabilization of beta-catenin augments apoptosis of high-glucose-stressed mesangial cells [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(6): 2934–42.
- [11] Grynberg K, Ma F Y, Nikolic-paterson D J. The JNK signaling pathway in renal fibrosis [J]. *Front Physiol*, 2017, 8(829): 1–12.
- [12] Purvis G S D, Chiazza F, Chen J, et al. Annexin A1 attenuates microvascular complications through restoration of Akt signalling in a murine model of type 1 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2018, 61(2): 482–95.
- [13] Bosco E E, Mulloy J C, Zheng Y. Rac1 GTPase: a "Rac" of all trades [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(3): 370–4.
- [14] Kim E Y, Roshanravan H, Dryer S E. Syndecan-4 ectodomain evokes mobilization of podocyte TRPC6 channels and their associated pathways: an essential role for integrin signaling [J]. *Bba-mol Cell Res*, 2015, 1853(10 Pt A): 2610–20.
- [15] Lu Z, Hu M, Fan M, et al. Podocyte-specific Rac1 deficiency ameliorates podocyte damage and proteinuria in STZ-induced diabetic nephropathy in mice [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 342.

Effect of Rac1 inhibitor on high glucose induced injury of rat mesangial cells and its mechanism

Fan Gaoxia¹, Gan Tian¹, Zhou Xiaoyan², et al

(¹Graduate School, ²Morphology Teaching Center, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004)

Abstract Objective To investigate the effect of Rac1 inhibitor(NSC23766) on high glucose induced Rat glomerular mesangial cells injury and its mechanism. **Methods** Glomerular mesangial cells were used as the research object, rat mesangial cells were randomly divided into five groups: normal glucose group(NG group), high glucose stimulation group(HG group), high glucose stimulation + NSC23766 group(HG + NSC group), solvent control group(HG + DMSO group) and osmotic mannitol control group(MG group). The effect of different drug concentrations on high glucose induced mesangial cells injury was detected by CCK-8 kit. The apoptosis rate of rat mesangial cells was detected by flow cytometry. Western blot was used to detect the expression of phosphorylated amino terminal protein kinase(p-JNK) protein, nuclear factor- κ B(NF- κ B) nuclear transfer and Cleaved caspase-3 activation in glomerular mesangial cells of each group. The expression of NF- κ B in each group was analyzed by intelligent laser confocal microscope. **Results** The cell viability of HG group was decreased, and the apoptosis rate, the expression of p-JNK, Cleaved caspase-3 protein, and the NF- κ B nuclear transfer was increased compared with NG group ($P < 0.05$). The cell viability of HG + NSC(10 μ mol/L) group was increased, and the apoptosis rate, the expression of p-JNK, Cleaved caspase-3 protein, and the NF- κ B nuclear transfer was decreased compared with HG group ($P < 0.05$). The cell viability of HG + DMSO group was decreased, and the apoptosis rate, the expression of p-JNK, cleaved caspase-3 protein, and the NF- κ B nuclear transfer was increased compared with HG + NSC(10 μ mol/L) group. Rac1 inhibitor(NSC23766) attenuated high glucose induced glomerular mesangial cell injury in rats, decreased apoptosis rate, decreased expression of p-JNK and cleaved caspase-3 protein, and decreased NF- κ B nuclear transduction. **Conclusion** NSC23766 can attenuate high glucose induced mesangial cell injury by inhibiting Rac1/JNK/NF- κ B signaling pathway.

Key words Rac1 inhibitor; mesangial cells; p-JNK; apoptosis; diabetic nephropathy