文章编号:1000-5404(2006)16-1659-04

论著

p38MAPK对大鼠肾小球系膜细胞表达PPAR-γ的影响

魏倩萍[1],邓华聪[1],赵 劼[2] (重庆医科大学:[1]附属第一医院内分泌科,[2]超声工程研究所,重庆 400016)

提 要:目的 探讨p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)和过氧化物酶体增殖物激活受体-γ(peroxisome proliferator-activated receptors-γ, PPAR-γ)的关系,从而研究p38MAPK和PPAR-γ在糖尿病肾病中的作用机制。**方法** 分别以高葡萄糖、高胰岛素、过氧化氢和糖基化终产物孵育大鼠肾小球系膜细胞系HBZY-1;先分别以p38MAPK特异抑制剂SB203580预处理细胞系HBZY-1,再给予上述4种因素孵育细胞系HBZY-1,观察细胞系HBZY-1 p38MAPK和PPAR-γ的表达。**结果** 高葡萄糖、高胰岛素、过氧化氢和糖基化终产物均可独立激活p38MAPK,使其磷酸化表达量增加,PPAR-γ表达明显减少;SB203580预处理后,PPAR-γ表达显著增加。**结论** 在大鼠肾小球系膜细胞,p38 MAPK对PPAR-γ具有拮抗作用,表明PPAR-γ的激活可能具有直接的肾脏保护作用。

关键词: p38丝裂原活化蛋白激酶;过氧化物酶体增殖物激活受体-γ;糖尿病肾病;大鼠肾小球系膜细胞系HBZY-1
中图法分类号: R322.61;R345;R392.13 **文献标识码:** A

A role of p38 mitogen-activated protein kinase in regulating expression of Peroxisome proliferator-activated receptors-γ in rat mesangial cells

WEI Qian-ping[1], DENG Hua-cong[1], ZHAO Jie[2] ([1]Department of Endocrinolgy, The First Affiliated Hospital, [2]Institute of Ultrasonic Engineering, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between p38MAPK and PPAR-γ, and to study the role of p38MAPK and PPAR-γ for diabetic nephropathy. Methods The expression of p38MAPK protein and PPAR-γ mRNA was investigated in rat mesangial cells line HBZY-1 that was incubated respectively with 25 mmol/L glucose, 100 nmol/L insulin, 100 μmol/L H_2O_2 and 100 mg/L AGEs. The relationship between p38MAPK and PPAR-γ expression was studied by using SB203580, a specific inhibitor of p38MAPK. Results p38MAPK had significantly higher expression, while the expression of PPAR-γ was significantly decreased in rat mesangial cells line HBZY-1 incubated with 25 mmol/L glucose, 100 nmol/L insulin, 100 μmol/L H_2O_2 and 100 mg/L AGEs respectively. PPAR-γ activity was significantly reduced when p38MAPK was inhibited by SB203580. Conclusion p38MAPK is involved in development of diabetic nephropathy and may antagonize the expression of PPAR-γ. PPAR-γ activity might protect the function of kidney.

Key words: p38 mitogen-activated protein kinase; peroxisome proliferator-activated receptors-γ; diabetic nephropathy; mesangial cells

近年来有关PPAR-γ及其激动剂在糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)中的作用日益受到重视。PPAR-γ的激活/激动剂对肾脏保护作用机制尚未完全明确[1]。p38MAPK是细胞信号传递的交汇点或共同通路[2],但它在糖尿病肾病发生发展中的作用及它与PPAR-γ关系的研究国内外报道较少。本研究在体外模拟糖尿病状态,探讨糖尿病时存在的各种应激如高葡萄糖、高胰岛素、过氧化氢和糖基化终产物(advanced glycosylation end products, AGEs)对大鼠肾小球系膜细胞系HBZY-1 p38MAPK、PPAR-γ表达的影响及二者的关系,从而明确p38MAPK和PPAR-γ在糖尿病肾病形成中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠肾小球系膜细胞系HBZY-1(中国典型培养物保藏中心CCTCC);新生牛血清及RPMI1640培养液(北京中山生物技

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370670)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370607)
作者简介:魏倩萍(1966-),女,四川省成都市人,博士,副教授,主要从事糖尿病肾病方面的研究。电话:13110225112, E-mail: wqp68894940@163.com
通讯作者:邓华聪,电话:(023)68700611,E-mail: deng_huacong@yahoo.com.cn
收稿日期:2005-09-05;修回日期:2006-01-15

术有限公司)；蛋白质相对分子量标记物(Bio_Rad 公司)；磷酸化 p38MAPK 兔多抗(Promega 公司)；第二抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(北京中山生物技术有限公司)。p38MAPK 特异抑制剂 SB203580(Promega 公司)；柱离心式总 RNA 抽提试剂盒、RT-PCR 两步法试剂盒、PCR 相对分子量标准、PCR 引物合成(TaKaRa 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠肾小球系膜细胞系 HBZY-1 的培养 细胞系 HBZY-1 培养于含 20% 灭活新生牛血清的 RPMI1640 培养液中，培养条件为 37 ℃，饱和湿度 5% CO_2，每 2～3 天用 0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)消化传代，待细胞系 HBZY-1 长至培养瓶底 40% 后用于实验。

1.2.2 体外制备 AGE_s 参考文献[3]，按牛血清白蛋白(bovine serum albumin，BSA)50 mg/ml 与葡萄糖 90 mg/ml，在体外于 37 ℃孵育 60 d，制备结束后 AGE_s 用考马斯亮蓝法测定蛋白含量，并测定其荧光强度。-70 ℃避光保存备用。

1.2.3 实验分组 分别以一定浓度高葡萄糖、高胰岛素、过氧化氢和糖基化终末产物刺激细胞系 HBZY-1 一定时间；给予 p38MAPK 特异性抑制剂 SB203580 10 μmol/L 预处理 30 min，再分别以上述 4 种刺激因素(浓度、时间同前)孵育细胞系 HBZY-1，同时设对照组。分组情况如下：①对照组(control 组)：用等体积的 0.01 PBS 孵育细胞系 HBZY-1。②高糖组(high glucose，HG 组)：用 25 mmol/L glucose 刺激 HBZY-1 细胞 72 h。③高胰岛素组(high insulin，HI 组)：用 100 nmol/L 的 insulin 刺激 HBZY-1 细胞 24 h。④过氧化氢组(H_2O_2 组)：用 100 μmol/L 的 H_2O_2 刺激 HBZY-1 细胞 1h。⑤糖基化终末产物组(AGEs 组)：用 100 mg/L 的 AGEs 刺激 HBZY-1 细胞 6 h。⑥SB—高糖组(SB-HG 组)：用 10 μmol/L 的 SB203580 预处理 HBZY-1 细胞 30min，再以 25 mmol/L 的 glucose 刺激 72 h。⑦SB—高胰岛素组(SB-HI 组)：依次以 10 μmol/L 的 SB203580 和 100 nmol/L 的 insulin 分别刺激 HBZY-1 细胞 30 min 和 24 h。⑧SB-过氧化氢组(SB- H_2O_2 组)：依次以 10 μmol/L 的 SB203580 和 100 μmol/L 的 H_2O_2 分别刺激 HBZY-1 细胞 30 min 和 1 h。⑨SB-糖基化终末产物组(SB- AGEs 组)：先以 10 μmol/L 的 SB203580 预处理 HBZY-1 细胞 30 min，再以 100 mg/L 的 AGEs 刺激 6 h。

1.2.4 RT-PCR 法检测 PPAR-γ mRNA 表达 以柱离心式总 RNA 抽提试剂盒提取 RGMC 总 RNA，测定总 RNA 浓度，计算其纯度，A260/A280 均在 1.8～2.0 之间。

PPAR-γ[4]：扩增片段长度 642 bp，上游引物：5′-TGACCACTCCCATTCCTTTG-3′，下游引物：5′-TTTCCTGTCAAGATCGCCCT-3′；β- actin 作为内参照物：扩增片段长度 228 bp，上游引物：5′-TCCTCTGACTTCAACAGCGACACC-3′，下游引物：5′-TCTCTCTTCCTCTTGTGCTCTTGG-3′。以两步法 RT-PCR 试剂盒进行反转录扩增，扩增条件：94 ℃性 30 s，55 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min，共 35 个循环，72 ℃最后延伸 7 min。每次 PCR 反应至少重复 3 次。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，结果经图像分析系统扫描存图，并对目的条带进行密度分析。

1.2.5 Western-blot 法检测磷酸化 p38MAPK 蛋白表达 培养的细胞系 HBZY-1，经 4 ℃胞浆蛋白提取液[0.5 mol/L 蔗糖，10 mmol/L HEPES (pH 7.9)，1.5 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L KCl，1 mmol/L EDTA，10% 甘油，1 mmol/L DTT，1 mmol/L PMSF，5 μg/ml Aprotinin 和 5 μg/ml Leupeptin]裂解，提取物在冰上孵育 2 h，然后 12 000×g 4 ℃离心 10 min。上清中的胞浆蛋白浓度经考马斯亮蓝法定量；沉淀加入 4 ℃预冷的核蛋白提取液，震荡混匀，冰浴 1 h；12 000×g 4 ℃离心 30 min；取上清为核蛋白，其蛋白浓度经考马斯亮蓝法定量。

磷酸化 p38MAPK 蛋白表达量采用 Western-blot 法检测，核蛋白中加入等体积 2×上样缓冲液(114 mmol/L，pH 6.8，9% 甘油，2.7% SDS，0.02% 溴芬蓝，4.5% 巯基乙醇)，煮沸 5 min。进行 10% SDS-PAGE，将蛋白转至 PVDF 膜后用 5% BSA[以 TBST(10 mmol/L Tris，pH 8.0，150 mmol/L NaCl 和 0.05% Tween)稀释]室温下封闭 2 h，用 1∶2 000 抗磷酸化 p38MAPK 兔多抗 4 ℃孵育过夜，用 0.01 PBS 充分洗涤，再用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 1∶5 000，37 ℃孵育 1 h，用 0.01 PBS 充分洗涤，DAB 显色试剂盒显色。结果经图像分析系统对目的条带进行扫描存图并进行密度分析。

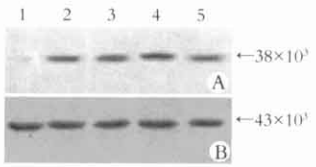
1.3 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间计量资料比较采用 SAS 统计分析软件包进行 F 分析。再作两两比较用 t 检验。

2 结果

2.1 HG、HI、H_2O_2 和 AGE_s 对大鼠肾小球系膜细胞系 HBZY-1 磷酸化 p38MAPK 蛋白表达量的影响

大鼠肾小球系膜细胞系 HBZY-1 磷酸化 p38MAPK 蛋白表达以 β-actin 作为内参照物调整后进行半定量分析。结果显示，HG、HI、H_2O_2 和 AGEs 平均光密度分别为(1.559 4±0.060 9)、(1.471 5±0.046 9)、(1.470 0±0.050 3)、(1.358 2±0.047 3)均可作为独立因素激活 p38 MAPK，细胞系 HBZY-1 磷酸化 p38 MAPK 蛋白表达明显增加，与对照组比较有显著性差异($P<0.01$)，见图 1。



A：phospho-p38MAPK；B：β-actin

1：对照组；2：HG 组；3：HI 组；4：H_2O_2 组；5：AGEs 组

图 1 Western blot 检测各刺激组 HBZY-1 细胞磷酸化 p38 MAPK 和 β-actin 蛋白表达

2.2 HG、HI、H_2O_2 和 AGE_s 对大鼠肾小球系膜细胞系 HBZY-1 PPAR-γ mRNA 表达的影响

大鼠肾小球系膜细胞系 HBZY-1 PPAR-γ mRNA 表达以 β-actin 作为内参照物调整后进行半定量分析。如表 1、图 2 所示，HG、HI、H_2O_2 和 AGEs 均可作为独立因素使细胞系 HBZY-1 PPAR-γ mRNA 表达明显减少，与对照组比较有显著性差异($P<0.01$)。

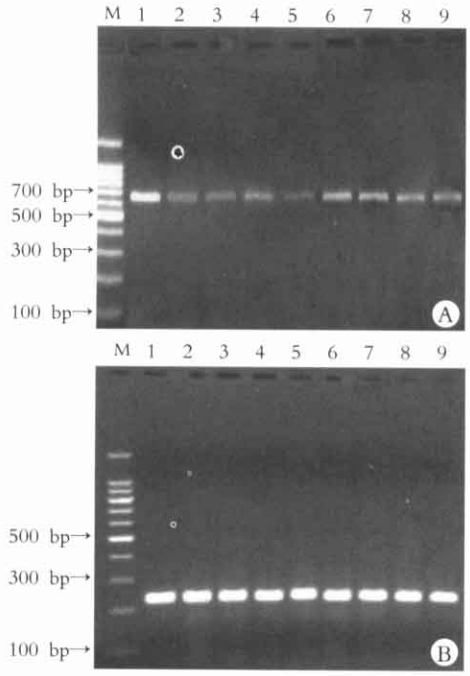
2.3　SB203580 预处理后，4 种刺激因素对大鼠肾小球系膜细胞系 HBZY-1 PPAR-γ mRNA 表达量的影响

大鼠肾小球系膜细胞系 HBZY-1 PPAR-γ mRNA 表达以 β-actin 作为内参照物调整后进行半定量分析。从表 1、图 2 可见，SB203580 预处理后，再分别以 HG、HI、H_2O_2 和 AGEs 刺激细胞系 HBZY-1，可见其 PPAR-γ mRNA 表达量分别较相应未经 SB203580 预处理组显著增加（$P<0.01$），但与对照组比较仍有明显差异（$P<0.01$）。

表 1　各处理组 HBZY-1 细胞 PPAR-γ RT-PCR 半定量结果

组别	组数	平均光密度
对照组	6	1.1103 ± 0.0248
高糖组	6	0.3773 ± 0.0184[ab]
高胰岛素组	6	0.3995 ± 0.0176[ab]
过氧化氢组	6	0.3887 ± 0.0202[ab]
糖基化终末产物组	6	0.4261 ± 0.0164[ab]
SB-高糖组	6	0.8973 ± 0.0201[a]
SB-高胰岛素组	6	0.8710 ± 0.0172[a]
SB-过氧化氢组	6	0.7897 ± 0.0177[a]
SB-糖基化终末产物组	6	0.8519 ± 0.0217[a]

a：$P<0.01$，与对照组比较，b：$P<0.01$，与相应 SB 处理组比较



A：过氧化酶体增殖物激活受体-γ；B：β-actin
M：标准；1：对照组；2：高葡萄糖组；3：高胰岛素组；4：过氧化氢组；5：糖基化终产物组；6：SB-高葡萄糖组；7：SB-高胰岛素组；8：SB-过氧化氢组；9：SB-糖基化终产物

图 2　RT-PCR 法检测各处理组 HBZY-1 细胞 PPAR-γ mRNA 和 β-actin 表达

3　讨论

糖尿病肾病是糖尿病血管并发症中最常见的慢性并发症，也是糖尿病患者死亡的主要原因，其危害性极大。目前认为，在糖尿病状态下，高血糖，胰岛素抵抗，非酶糖基化，氧化应激，血液流变学及血液动力学异常是致糖尿病肾病的主要原因及结构基础，其中高血糖是首要致病因素。糖尿病肾病早期的变化是以肾脏肥大，肾小球高滤过率以及细胞外基质合成增加为特点，有 25% ~40% 糖尿病患者可出现微量蛋白尿，最终发展为晚期糖尿病肾病。国外研究证实，在肾小球、系膜细胞和内皮细胞均有 PPAR-γ mRNA 和蛋白表达[5-7]；PPARγ 基因调控着与脂肪生成、糖尿病、肥胖相关基因的表达，还参与了多种细胞生理活动包括细胞周期调控、免疫调节、炎症、肿瘤细胞的分化等相关蛋白的转录调控[1,5,8]。

p38MAPK 可被多种细胞外刺激激活，导致细胞生长、增殖、分化和调控某些因子表达[9,10]。本研究结果显示，正常对照组大鼠肾小球系膜细胞可见 PPAR-γ mRNA 功能性表达，p38MAPK 只有微量表达；当给予高葡萄糖、高胰岛素、过氧化氢及糖基化终末产物刺激大鼠肾小球系膜细胞一定时间后，可见各刺激组细胞 p38MAPK 被激活，磷酸化表达明显增加，而 PPAR-γ mRNA 表达却显著减少，表明上述 4 种刺激因素均可分别作为独立因素导致大鼠肾小球系膜细胞 p38MAPK 表达明显增加，而 PPAR-γ 表达显著减少；给予 p38 MAPK 特异性抑制剂 SB203580 预处理大鼠肾小球系膜细胞后，再给予上述 4 种因素刺激细胞，可见 PPAR-γ 在大鼠肾小球系膜细胞 mRNA 表达显著增加。其机制尚未完全明确，结合实验结果我们认为可能有以下几点：①4 种刺激因素通过直接激活 p38MAPK 和 AP-1 信号通路，而导致系膜细胞 PPAR-γ 表达减少；②4 种刺激因素通过激活 PKC-p38MAPK 通路，激活 NF-κB，NF-κB 对 PPAR-γ 的活性具有抑制作用，从而使其 PPAR-γ 表达下调；③4 种刺激因素激活二脂酰甘油-蛋白激酶 C-细胞外信号调节激酶（DAG-PKC-ERK）途径，从而下调 PPAR-γ 表达。而 SB203580 可通过特异性抑制 p38MAPK 信号传导通路，从而使系膜细胞 PPAR-γ 表达上调，SB203580 可能还具有类似于 PPAR-γ 激动剂的作用，可通过提高胰岛素敏感性，从而减轻肾小球系膜细胞的增殖。提示在系膜细胞，p38 MAPK 对 PPAR-γ 具有拮抗作用。其确切机制尚需进一步探讨。

目前，国内外研究已表明 PPAR-γ 的激活可能具有直接的肾脏保护作用，其机制是通过抑制 DN 早期系膜增殖而发挥作用[11,12]。因此，通过抑制 p38 MAPK 信号传导通路，激活肾小球 PPAR-γ，延缓 DN 的发生发展，将可能成为治疗 DN 的一个新靶点。

参考文献：

[1] GUAN Y. Peroxisome proliferator-activated receptor family and its rela-

tionship to renal complications of the metabolic syndrome[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(11): 2801-2815.
[2] IGARASHI M, WAKASAKI H, TAKAHARA N, *et al*. Glucose or diabetes activates p38 mitogen-activated protein kinase *via* different pathways[J]. J Clin Invest, 1999, 103(2): 185-195.
[3] MAKITA Z, VLASSARA H, CERAMI A, *et al*. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products *in vivo*[J]. J Boil Chem, 1992, 267(8): 5133-5138.
[4] MASAMUNE A, SATOH K, SAKAI Y, *et al*. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma induce apoptosis in AR42J cells[J]. Pancreas, 2002, 24(2): 130-138.
[5] NICHOLAS S B, KAWANO Y, WAKINO S, *et al*. Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in mesangial cells[J]. Hypertension, 2001, 37(2 Part 2): 722-727.
[6] YOSHIOKA M, WAKISAKA M, NAKAMURA U, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 1 and contractile response of rat mesangial cells under the high glucose condition[J]. Diabetes, 2001, 50(2): A468-A469.
[7] HSUEH W A, NICHOLAS S B. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the renal mesangium[J]. Curr Opin Nephrol hypertens, 2002, 11(2): 191-195.
[8] ESCHER P, WAHLI W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions[J]. Mutat Res, 2000, 448(2): 121-138.
[9] PURVES T, MIDDLEMAS A, AGTHONG S, *et al*. A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy[J]. FASEB J, 2001, 15(13): 2508-2514.
[10] TERUEL T, HERNANDEZ R, BENITO M, *et al*. Rosiglitazone and retinoic acid induce uncoupling protein-1 (UCP-1) in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner in fetal primary brown adipocytes[J]. J Biol Chem, 2003, 278(1): 263-269.
[11] ZHENG F, FORNONI A, ELLIOT S J, *et al*. PPARgamma activation suppresses TGF-beta mediated type I collagen expression in mesangial cells[J]. Diabetes, 2001, 50(2): A74.
[12] ZHENG F, FORNONI A, ELLIOT S J, *et al*. Upregulation of type I collagen by TGF-beta in mesangial cells is blocked by PPARgamma activation[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 282(4): F639-F648.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)16-1662-01

颈内静脉穿刺插管在乳腺癌患者中的应用

陈显春[1]，杨 英[1]，宋 爽[1]，王泽惠[1]，曾小华[2]（[1]第三军医大学西南医院乳腺疾病中心，重庆 400038；[2]西南政法大学医院，重庆 400031）

乳腺癌是威胁妇女健康的重大疾病，目前对乳腺癌仍然采取以手术为主的综合治疗，随着对乳腺癌治疗观念的转变，化疗无其是新辅助化疗在乳腺癌综合治疗中发挥着越来越重要作用。为了保证化疗顺利进行，避免化疗性静脉炎发生，减轻患者痛苦，我科自2003年3月开始，采用颈内静脉穿刺插管输入化疗药物，收到良好效果，现报告如下

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组患者全部为女性，共240例，年龄22-68岁。右颈内静脉穿刺插管220例，左颈内静脉穿刺插管20例。一次性穿刺插管成功228例(95%)；失败12例(5%)，失败原因有穿刺针未进入血管，穿刺针误入颈内动脉，穿刺针滑出血管外，导丝扭曲，发生以上情况则重新穿刺插管或更换导丝，仅1例放弃穿刺。本组病例导管留置时间最短15 d，最长45 d，平均25 d。留置导管期间患者体温正常，有30例出现穿刺点局限性红肿，拔管进行导管尖端细菌培养均为阴性

1.2 方法

签知情同意书：颈内静脉穿刺插管具有一定风险，操作前应对患者进行评估，掌握好适应证和禁忌证。应把插管目的，意义，费用及操作可能出现的意外等情况告知患者与亲属，取得同意和配合

确定操作环境：最好选择在抢救室操作，一旦出现意外便于抢救。操作前认真布局场地，减少室内人员流动，做好预操作准备，保证无菌操作过程的顺利进行。关心体贴患者，使其身心放松。紧张、恐惧可导致心率增快，血压增高，胸锁乳突肌收缩，血管痉挛，影响穿刺插管成功率

摆好患者体位：选择合适穿刺点，掌握进针要领是一次性穿刺成功的基础。右颈内静脉与右无名静脉和上腔静脉几乎成一直线且右侧胸膜顶较左侧低[1]，故穿刺成功率高、安全、不易引起并发症，而左颈内静脉穿刺，有可能损伤胸导管及胸膜，临床上首选右颈内静脉穿刺插管。胸锁乳突肌三角显露明显的患者，穿刺成功率高，对于颈短，肥胖患者可在肩下垫枕，以提高一次穿刺插管成功率

选择穿刺部位：主要采用中路进针法[2]，胸锁乳突肌下端胸骨头和锁骨头与锁骨上缘组成一个三角，颈内静脉正好位于此三角的中心位置。在三角形的顶端即锁骨上缘2-3横指处作为进针点，与皮肤成30°，向外侧偏10°-15°进针，即可刺入颈内静脉

（下转1666页）

作者简介：陈显春(1964-)，女，四川省马边县人，副主任护师，主要从事乳腺疾病临床护理方面的研究。电话：023-68754163

收稿日期：2006-03-04；修回日期：2006-05-21