文章编号:1000-5404(2008)02-0101-03

论著

# 晚期氧化蛋白产物诱导血管平滑肌细胞表达MCP-1及其信号转导通路的研究

彭侃夫,赵洪雯,余荣杰,孙 岩,王军霞,吴 亿,吴雄飞 (第三军医大学西南医院肾科,重庆 400038)

**摘 要**:**目的** 研究p38有丝分裂素激活蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, MAPK)在晚期氧化蛋白产物(advanced oxidation protein products, AOPP)诱导的鼠血管平滑肌细胞单核细胞趋化蛋白-1表达中的作用。**方法** 使用200和400 μmol/L AOPP分别以不同时间刺激培养的鼠血管平滑肌细胞,在阻断实验中加入特异性p38MAPK阻断剂SB203580阻断p38MAPK信号转导通路。采用免疫印迹法(Western blot)检测细胞中MCP-1和磷酸化p38MAPK的表达情况。**结果** 用特异性p38MAPK阻断剂SB203580预处理后,400 μmol/L AOPP刺激4 h的鼠血管平滑肌细胞MCP-1表达(平均灰度值)从42.00±0.95降至9.35±1.35受到显著抑制($P<0.01$)。**结论** ①p38MAPK信号转导途径参与了AOPP诱导的鼠血管平滑肌细胞MCP-1的表达。②晚期氧化蛋白产物促进平滑肌细胞MCP-1 mRNA和蛋白表达可能是其致动脉粥样硬化机制之一。

**关键词**:晚期氧化蛋白产物;单核细胞趋化蛋白-1;有丝分裂素激活蛋白激酶类;鼠血管平滑肌细胞;动脉粥样硬化
**中图法分类号**:R322.12;R341;R394.3 **文献标识码**:A

# Signal transduction of advanced oxidation protein products induced MCP-1 expressions in vascular smooth muscle cells

PENG Kan-fu, ZHAO Hong-wen, YU Rong-jie, SUN Yan, WANG Jun-xia, WU Yi, WU Xiong-fei (Department of Kidney, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: **Objective** To investigate the role of p38MAPK signaling pathway in advanced oxidation protein products (AOPP) induced expressions of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods** Vascular smooth muscle cells (VSMCs) were cultured and then co-incubated with AOPP (200, 400 μmol/L) for different time with or without the pretreatment of specific p38MAPK inhibitor SB203580. Western blot was used to detect the expression of phosphorylated p38MAPK. **Results** The expression of phosphorylated p38MAPK was increased after AOPP treatment and reached the highest level 4 h after stimulation, then decreased. The expression of MCP-1 was down-regulated with the pretreatment of SB203580 as compared with that in the AOPP group ($P<0.01$). **Conclusion** AOPP stimulates MCP-1 expression in VSMCs and contributes to the formation of atherosclerosis through this proinflammatory effect that is mediated at least in part through the activation of p38MAPK signaling pathway.

**Key words**: advanced oxidation protein products; p38 mitogen-activated protein kinase; monocyte chemotactic protein-1; vascular smooth muscle cells; atherosclerosis

晚期氧化蛋白产物(advanced oxidation protein products, AOPP)是1996年Witko-Sarsat等[1]发现的新尿毒症毒素。有研究报道[2],AOPP参与了尿毒症患者加速性动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的形成,通过氧化应激引起内皮细胞损伤可能是其参与AS发生、发展的机制之一[4]。我们研究发现AOPP通过促进单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)的表达而可能参与了动脉粥样硬化的晚期病变。p38丝裂素活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38-MAPK)信号转导途径是1条应激敏感的通路,但AOPP促进MCP-1表达是否是p38信号通路,国内外少见报道。本实验旨在研究p38MAPK信号传导通路在AOPP对MCP-1表达这一生物学过程中的地位和作用进行了研究,为阻断这一途径寻找理论依据。

基金项目:国家自然科学基金(30470807)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470807)
作者简介:彭侃夫,男,湖南省临湘市人,博士,副教授,主要从事尿毒症患者心血管并发症的防治,慢性移植肾病的防治,多器官功能衰竭的救治等方面的研究,发表论文20余篇。
通信作者:吴雄飞,电话:(023)68754188,E-mail: Wuxfei@126.com.
收稿日期:2007-09-20;修回日期:2007-12-14

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人血清白蛋白 HSA(100 mg/ml,Sigma);抗平滑肌细胞 α-actin 单克隆抗体(中山生物技术有限公司),逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(日本生物工程有限公司),MCP-1 引物(北京奥科生物公司),兔抗鼠 MCP-1 抗体(济南赛恩斯科技有限公司),MAPK 试剂盒(美国 Santa Cruz 公司),p38MAPK 特异性阻断剂 SB203580(美国 Promega 公司)。倒置相差显微镜(日本 Nikon 公司),PAC3000 型电泳仪、电泳槽及转印电泳槽(美国 Bio-Rad 公司),PTC-100-60 型 DNA 扩增仪、WFH-202 型聚合酶链反应紫外透射仪、紫外分光光度计、UVI 凝胶成像分析系统。

### 1.2 血管平滑肌细胞的原代培养与鉴定

选用 6 周龄雄性 SD 大鼠(第三军医大学实验动物中心提供)断头处死,取胸主动脉中膜以贴块法培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37 ℃、5% $CO_2$ 孵箱中培养,1 周后可见细胞从组织块边缘爬出,2 ~ 3 周出现致密细胞层,此时即可传代,传代细胞呈典型的"峰与谷"样生长,细胞经抗 α-actin 抗体鉴定为平滑肌细胞。实验所用的血管平滑肌细胞均为第 3 ~ 6 代传代细胞。

### 1.3 HOCl 孵育法体外制备 AOPP-HSA 标准品

HOCl 溶液以 PBS 新鲜配制,分光光度计测定浓度($\varepsilon = 350\ M^{-1} \cdot cm^{-1}$,290 nm,pH 12)。人血清白蛋白 HSA(100 mg/ml,Sigma)与 HOCl(100 mmol/L)室温下共孵育 30 min,透析过夜,除去 PBS,即得到 AOPP-HSA[3]。

以氯胺-T(在碘化钾存在下,最大吸收波长与 AOPP-HSA 相同,为 340 nm)为参照标准,AOPP-HSA 的浓度以相同吸光度的氯胺-T 浓度来代表。吸取 200 μl 氯胺-T(0 ~ 100 μmol/L)、制备的 AOPP-HSA 及 PBS(空白管),依次加入 20 μl 冰醋酸、10 μl 碘化钾(1.16 mol/L),摇匀后静置 2 min,紫外分光光度计在 340 nm 测定吸光度,制作氯胺-T 的标准曲线,计算出其摩尔吸光系数,以 AOPP-HSA 的吸光度除以此吸光系数,即为 AOPP-HSA 的浓度(μmol/L)。

### 1.4 VSMC 的干预

将同步化的细胞($2 \times 10^6$)按 AOPP-HSA 50、100、200、400 μmol/L 及对应浓度的 HSA 4 h,AOPP-HSA(100 μmol/L)1、4、12 h 和 24 h 分组进行干预,每个点重复 3 次。以不加刺激的细胞为正常对照组,以高温处理(42 ℃、30 min)的细胞为阳性对照者。在阻断实验中,分别给予不同浓度(5、10、15 μmol/L)特异性 p38MAPK 阻断剂 SB203580 预孵育细胞 4 h,再给予 200、400 μmol/L AOPP 刺激 4 h 后检测相关指标。

### 1.5 MCP-1 mRNA 表达水平测定[4]

采用半定量 RT-PCR 法,参照试剂盒说明书进行。

### 1.6 Western blot 法检测 MCP-1 和 MAPK 的变化

参见文献[4]。

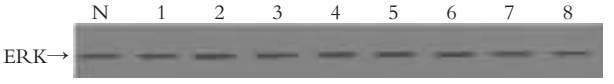
### 1.7 处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 软件进行单因素方差分析。

## 2 结果

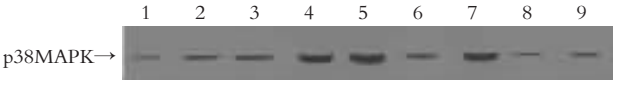
### 2.1 AOPP 对 p38MAPK 表达的影响

Western blot 检测结果显示,200 和 400 μmol/L AOPP 对细胞外调节蛋白激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)的表达无影响(图 1)。磷酸化 p38MAPK 在 200 和 400 μmol/L AOPP 诱导下,活性增强早且明显($P < 0.01$),呈时间依赖性。在 200 μmol/L AOPP 刺激下,磷酸化 p38MAPK 活性的持续时间短于 400 μmol/L AOPP 刺激。200 μmol/L AOPP 刺激约 4 h,磷酸化 p38MAPK 活性达到峰值,24 h 回复至基线水平。在 400 μmol/L AOPP 刺激下,磷酸化 p38MAPK 的活性可持续至 12 h(图 2)。




N:正常对照组;2、4、6、8:分别是 1、4、12、24 h AOPP 200 μmol/L;1、3、5、7:分别是 1、4、12、24 h AOPP 400 μmol/L

**图 1 Western blot 检测不同浓度 AOPP 诱导血管平滑肌细胞 ERK 的影响**

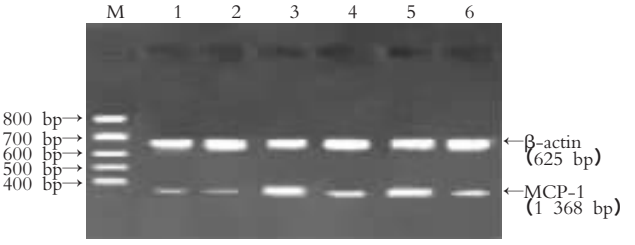



N:正常对照组;2、4、6、8:分别是 1、4、12、24 h AOPP 200 μmol/L;1、3、5、7:分别是 1、4、12、24 h AOPP 400 μmol/L

**图 2 Western blot 检测不同浓度 AOPP 诱导血管平滑肌细胞磷酸化 p38MAPK 的影响**

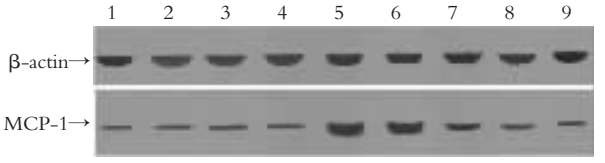
### 2.2 阻断 p38MAPK 信息转导通路对 AOPP 诱导 MCP-1 表达的影响

基础状态下 MCP-1 mRNA 和蛋白质在未被干预的血管平滑肌细胞中有表达,AOPP 刺激 4 h 后可刺激 MCP-1 表达明显上调($P < 0.01$)[4]。特异性 p38MAPK 阻断剂 SB203580 对鼠血管平滑肌细胞的 MCP-1 mRNA 基础表达具有明显抑制作用(图 3),同时可呈浓度依赖性抑制 AOPP 刺激 4 h 鼠血管平滑肌细胞 MCP-1 的表达(图 4,表 1)




M:标准;1:正常对照;2: SB203580 作用组;3: 200 μmol/L AOPP;4: 2 +3 作用者;5: 400 μmol/L AOPP;6:2 +5 作用者

**图 3 RT-PCR 检测 15 μmol/L 特异性 p38MAPK 阻断剂 SB203580 对不同浓度 AOPP 刺激 4 h 的血管平滑肌细胞 MCP-1 mRNA 表达的影响**




1:正常对照;2 -4:分别为 5、10、15 μmol/L SB203580 作用正常对照组;5:阳性对照组;6:400 μmol/L AOPP 刺激组;7 -9:分别为 5、10、15 μmol/L SB203580 和 400 μmol/L AOPP 作用组

**图 4 Western blot 检测不同浓度特异性 p38MAPK 阻断剂 SB203580 对 400 μmol/L AOPP 刺激 4 h 诱导血管平滑肌 MCP-1 表达的影响**

表 1　不同浓度特异性 p38MAPK 阻断剂 SB203580 对正常对照和 400 μmol/L AOPP 刺激 4 h 的血管平滑肌 MCP-1 表达平均灰度值的影响($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

| SB203580 浓度(μmol/L) | 正常对照组 | 400 μmol/L AOPP 刺激 4 h |
|---|---|---|
| 0 | 9.50 ± 0.89 | 42.00 ± 0.95 |
| 5 | 9.25 ± 0.96 | 30.25 ± 1.27 |
| 10 | 9.00 ± 1.26 | 15.50 ± 2.15 |
| 15 | 10.25 ± 1.50 | 9.35 ± 1.35 |
| $F$ 值 | 0.625 | 236.647 |
| $P$ 值 | 0.672 | 0.000 |

阳性对照组,血管平滑肌细胞 MCP-1 表达平均灰度值为(41.35 ± 1.75)

## 3　讨论

AOPP 是新的尿毒症毒素,其参与动脉粥样硬化的研究已有报道,我们前期研究发现 AOPP 呈浓度和时间依赖方式增加 SMCs 的 MCP-1 表达[4]。推测此途径可能参与了动脉粥样硬化的晚期发病过程。如何预防乃是研究的关键,所以了解其信号转导通路对临床具有积极意义。

丝裂原活化的蛋白激酶(MAPK)是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是细胞将胞外信号转导至核内的重要信号转导系统[5]。MAPK 家族主要包括胞外信号调节激酶(ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)以及 p38MAPK。其中 p38MAPK 信号通路参与了细胞的生长发育及细胞间功能同步等多种生理过程,并可调节多种细胞 IL-6、TNF-α、TGF-β 等细胞因子的表达,介导炎症、应激等多种细胞反应,被认为参与了炎症和纤维化过程[6-9]。

p38MAPK 是参与炎症反应的细胞内的重要通路,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。MAPK 至少具有 6 个亚家族,其中针对 ERK、应激活化蛋白激酶及 p38/高渗透性甘油反应激酶的研究较多。这些 MAPK 亚家族的信号通路具有高度保守性,即经 3 个关键激酶通过级联信号将细胞外刺激传递至细胞核后,再通过磷酸化转录因子调节细胞功能。不同的 MAPK 亚家族具有相对独立的信号通路,作用于不同底物,从而介导不同细胞的不同生物学效应。一般认为 ERK 激活与细胞增殖有关,p38MAPK 激活与炎症和应激反应的调控密切相关[10,11],p38MAPK 通路还参与细胞的存活、分化及发育过程[12]。

本研究探讨了 AOPP 对于 MAPK 的影响,结果显示 AOPP 对 ERK 的激活无影响;AOPP 可首先激活鼠血管平滑肌细胞 p38MAPK。为了进一步证实在鼠血管平滑肌细胞中由 AOPP 激活的 MAPK 对 MCP-1 mRNA 及其蛋白水平的影响,我们在研究中探讨了特异性 p38MAPK 阻断剂 SB203580 的作用,结果显示 SB203580 可阻碍由 AOPP 引起的 MCP-1 表达增加,这说明 AOPP 诱导的 MCP-1 mRNA 表达是依赖 p38MAPK 信号转导途径实现的。综上所述,本研究证实了 AOPP 可诱导鼠血管平滑肌细胞 MCP-1 mRNA 及其蛋白表达水平增加。AOPP 首先激活 p38MAPK,其特异性阻断剂 SB203580 在基因和蛋白水平均可抑制由 AOPP 所引起的 MCP-1 表达增加。以上结果说明 p38MAPK 参与了 AOPP 引起的 MCP-1 增加过程。AOPP 诱导 VSMC 的 MCP-1 表达表明 AOPP 通过促进单核细胞向血管内迁移而参与致动脉粥样硬化这一过程,有效地阻止这一过程在预防尿毒症患者心血管并发症的发生、发展中可能有重要意义。

## 参考文献:


[1] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, *et al*. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia[J]. Kidney Int, 1996, 49(5): 1304 – 1313.

[2] 袁　方, 刘尚喜, 侯凡凡, 等. 晚期氧化蛋白产物导致血管内皮细胞氧化应激损伤[J]. 解放军医学杂志, 2004, 29(11): 951 – 954.

[3] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen-Khoa T, *et al*. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure[J]. J Immunol, 1998, 161(5): 2524 – 2532.

[4] 彭侃夫, 吴雄飞, 赵洪雯, 等. 晚期氧化蛋白产物对血管平滑肌细胞单核细胞趋化蛋白-1 表达的影响[J]. 中国血液净化, 2006, 5(5): 252 – 255.

[5] Stambe C, Atkins R C, Tesch G H, *et al*. The role of p38alpha mitogen-activated protein kinase activation in renal fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(2): 370 – 379.

[6] Wilmer W A, Dixon C L, Hebert C. Chronic exposure of human mesangial cells to high glucose environments activates the p38 MAPK pathway[J]. Kidney Int, 2001, 60(3): 858 – 871.

[7] Chang P C, Chen T H, Chang C J, *et al*. Advanced glycosylation end products induce inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression *via* a p38 MAPK-dependent pathway[J]. Kidney Int, 2004, 65(5): 1664 – 1675.

[8] Sakai N, Wada T, Furuichi K, *et al*. Involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 in human diabetic nephropathy[J]. Am J Kidney Dis, 2005, 45(1): 54 – 65.

[9] Fujita H, Omori S, Ishikura K, *et al*. ERK and p38 mediate high-glucose-induced hypertrophy and TGF-beta expression in renal tubular cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 286(1): F120 – F126.

[10] Dhanasekaran N, Premkumar-Reddy E. Signaling by dual specificity kinases[J]. Oncogene, 1998, 17(11 Reviews): 1447 – 1455.

[11] Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function[J]. Cell Signal, 2000, 12(1): 1 – 13.

[12] Seger R, Krebs E G. The MAPK signaling cascade[J]. FASEB J, 1995, 9(9): 726 – 735.


(编辑　王　红)