维普资讯 http://www.cqvip.com

236-238

(5)

第24卷 第3期 重庆医科大学学报 Vol.24 No.3
1999 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1999

高葡萄糖介导MDCK细胞蛋白激酶C活性变化

临床学院内分泌科 蒋 涛* 汪恕萍 周 波
基础医学院生化教研室 曾昭淳

R587.2
R692.02

提 要 观察了高葡萄糖对MDCK细胞蛋白激酶C(PKC)信号转导通路的影响。结果表明MDCK细胞在高葡萄糖环境下,PKC从细胞浆到细胞膜移位活化,同时细胞Na^+,K^+-ATP酶活性下降,此可为PKC抑制剂staurosporine所阻止。因此,高糖引起肾小管细胞PKC信号系统异常可能是糖尿病肾病发生的重要机制。

关键词 蛋白激酶C; Na^+,K^+-ATP酶; 糖尿病肾病
中图分类号 R737.9

糖尿病肾病 MDCK细胞 信号转导

糖尿病肾病(DN)是糖尿病最常见的慢性并发症之一。近年来细胞信号转导系统与DN的关系倍受关注。蛋白激酶C(PKC)是细胞内诸多信号转导系统相互影响(Cross Talk)的中心环节。国外研究证实高葡萄糖可诱导肾小球细胞PKC信号通路活化,进而导致细胞外基质增多等病理改变[1],但高葡萄糖对肾小管细胞中该通路的影响国内、外均未见报道。本文选择来源于犬肾近曲及远曲小管的上皮细胞株Madin-Darby Canine Kidney(MDCK)为研究对象,旨在探讨高葡萄糖对肾小管细胞中PKC信号系统的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 MDCK细胞株来源American Type Culture Collection(ATCC)。

1.1.2 试剂Ⅲ-S型组蛋白和Staurosporine(SS)购自美国Sigma公司,[γ-^{32}p]ATP(>500°Ci/mmol)购自北京亚辉生物医学工程公司,余为国产分析纯化学试剂。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

分为对照组和高糖组。其葡萄糖浓度分别为5.5mmol/L和22mmol/L。实验时将细胞培养至融合状态以后,换成含2%血清的培养液,在不同条件下孵育3天后作PKC活性等检测。

1.2.2 PKC活性测定 本文采用Lee[2]的方法检测细胞PKC活性。

用磷酸缓冲液(PBS)和bufferA各洗涤细胞两次,洗涤后的细胞加入5mlbufferA并从培养皿上刮下,bufferA组成:Tris-HCl 20mM(pH7.5)、2.0mM乙二胺四乙酸、0.5mM乙二醇双(2—氨基乙醚)四乙酸、2mM苯甲磺酰氟化物、25μg/ml亮抑蛋白酶肽、0.33M蔗糖。用玻璃匀浆器于冰浴中制匀浆,离心30min(100,000g),上清液作为PKC检测的细胞浆部分。沉淀用bufferA再悬浮和洗涤,离心60min(100,000g),弃上清,沉淀加入5ml含0.2%TritonX-100的bufferA进行悬浮,于0℃摇动孵育1h,再离心60min(100,000g),上清液作为PKC检测的细胞膜部分。测定各部分蛋白质含量。以Ⅲ-S型组蛋白为底物,在反应体系中加入[γ—^{32}p]ATP,通过测定底物的磷酸化分别测定各组细胞总PKC活性及细胞膜、细胞浆PKC活性。

1.2.3 细胞Na^+,K^+-ATP酶活性测定

各组细胞用PBS悬浮,制匀浆,并作蛋白定量,取0.1ml匀浆加1.0ml孵育液于37℃保温15min,孵育液的主要成分:200mmol/L Tris HCl(pH7.4)2.5ml,左旋咪唑6mg,1mol/LNaCl1ml,200mmol/L KCl 1ml,20mmol/L MgCl 21ml,底物为ATP·2Na 12mg。然后加入15%三氯乙酸1ml终止反应,离心取上清液1ml加入钼酸氨0.5ml、1-2-4氨基萘酚磺酸2ml,充分混匀15min后使酶分解产物无机磷呈色,分光光度计测定680nm处读数,与标准无机磷酸呈色进行比较,以含有或无1.5mmol/L哇巴因时ATP水解释放无机磷之差作为Na^+,K^+-ATP酶活性。

1.3 统计学处理

结果以$\bar{x}\pm s$差表示,组间比较用SAS6.12版统计软件包作t检验或方差分析。

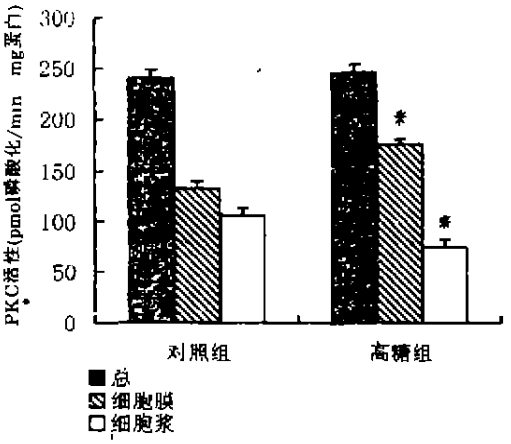
2 结果

2.1 两组细胞PKC活性的变化

* 女,1968-12出生,博士生

维普资讯 http://www.cqvip.com

如图1所示,对照组和高糖组细胞各孵育3天后分别测PKC总活性及细胞膜、细胞浆PKC活性,发现高糖组较对照组PKC总活性无显著性差异,但细胞膜PKC活性显著增高,细胞浆PKC活性显著下降。

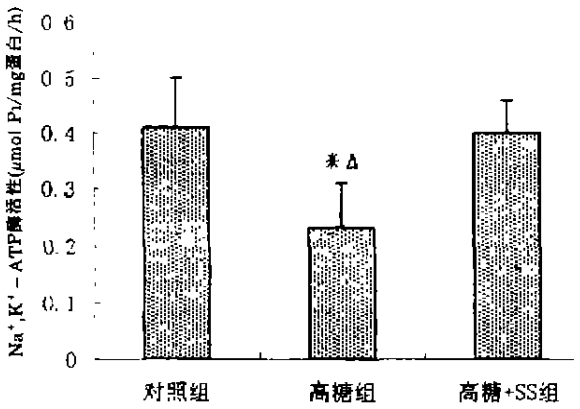


与对照组比较 * $P<0.001$

图1 两组细胞PCK活性(pmol磷酸化/min.mg蛋白)

2.2 高糖及PKC抑制剂SS对MDCK细胞Na^+,K^+-ATP酶活性的影响

对照组与高糖+SS组比较Na^+,K^+-ATP酶活性无明显变化,而高糖组与此二组比较Na^+,K^+-ATP酶活性显著降低(见图2)。



与对照组比较 * $P<0.05$

与高糖+SS组比较 Δ $P<0.05$

图2 各组细胞Na^+,K^+-ATP酶活性

($\mu molP_i$/mg蛋白/h)

3 讨论

PKC是一组丝-苏氨酸激酶的总称,广泛存在于机体的许多组织内,通过对底物蛋白(如膜蛋白、酶蛋白及第三信使等)的磷酸化而参与激素和细胞因子等的细胞内信号转导、离子通道调节、基因表达调控等机体的一系列重要过程,成为生物界和医学界研究的一大热点,已证实高糖能够影响的重要代谢调节通路之一就是PKC信号转导系统。

长期以来,人们一直推测在高葡萄糖环境下,继发于山梨醇通路活化,肌肌醇耗竭,肾脏细胞PKC活性应下降。本研究发现MDCK细胞在高葡萄糖环境下,PKC总活性较对照无明显改变,但细胞膜部位PKC活性显著增加,细胞浆部位则相应降低,提示高葡萄糖可能引起MDCK细胞内PKC由胞浆到胞膜移位活化。此与Ayo[3]等研究高葡萄糖培养的肾小球系膜细胞时的结果相似,表明高葡萄糖既可诱导肾小球细胞也可诱导肾小管细胞PKC信号转导系统发生改变。细胞膜是PKC发挥活化作用的重要部位,胞膜PKC活性增加必然引起其下游一系列底物蛋白的改变,如磷酸化原癌基因产物Raf-1,后者再启动MEK-MAPK系统,经MAPK核转位调节细胞核反应,进而导致细胞功能及结构的异常。

研究表明二脂酰甘油(DAG)是PKC重要的内源性激活物,它可来源于磷酸肌醇酯(IP)的转化和磷脂酰胆碱(PC)的裂解,亦可从葡萄糖氧化的中间产物合成而来[4]。经IP或PC裂解而形成的DAG通常是快速而短暂的(几秒到几分钟),而本文中MDCK细胞在高葡萄糖环境下培养3天后发现PKC移位活化,显然此与转化裂解途径而来的DAG无关,提示高葡萄糖可能通过糖酵解,即从头合成途径增加DAG合成,进而诱导PKC活化。

本文进一步探讨了高葡萄糖介导PKC活性改变后对MDCK细胞的影响,发现高葡萄糖引起的细胞Na,K^+-ATP酶活性下降可为PKC抑制剂SS所阻止。SS是作用于PKC C3调节区域ATP结合位点的抑制剂,对PKC活性有较强的抑制作用[5]。提示高糖可能通过诱导PKC活性变化进而

维普资讯 http://www.cqvip.com

导致Na^+、K^+－ATP酶活性降低，其机制可能为PKC活化后致胞浆型磷脂酶A_2($cPLA_2$)活性增高，并促使花生四烯酸及其产物油酸的释放，已证实后者可抑制Na^+,K^+－ATP酶的活性[6]。肾小管上皮细胞富含Na^+,K^+－ATP酶，该酶是构成钠泵的必要成分，在细胞完整性的维持及细胞功能等的调节中起重要作用[7]，其活性下降势必引起细胞一系列生理过程的异常。

综上所述，高葡萄糖可诱导MDCK细胞内DAG含量增加，促使PKC从胞浆到胞膜移位活化，然后再引起细胞Na^+,K^+－ATP酶活性下降，并进一步导致MDCK细胞一系列重要生理功能发生改变。因此，高糖引起肾小管细胞PKC信号转导通路发生异常可能在DN发生中起重要作用，关于它的研究，有可能从细胞和分子水平上进一步揭示DN的发病机制，而PKC抑制剂的研制、开发有可能为DN防治带来新的希望。

参 考 文 献

1. Fumo P, et al. Am J Physiol, 1994;267:F632
2. Lee TS, et al. J Clin Invest, 1989;83:90
3. Ayo SH, et al. Am J Physiol, 1991;261:F571
4. Rossi F, et al. J Biol Chem, 1991;266:8034
5. Robinson PJ. Biochemm Pharmacol, 1992;44:1325
6. Satoh T, et al. J Clin Inves, 1993;91:409
7. Christine H, et al. Am J Physiol, 1998;274:C356

(收稿日期 1999－01－15)

The activation of protein kinase C mediated by high glucose in MDCK cells

Jiang Tao, et al
Department of endocrinology, college of clinical medicine

The effect of high glucose on the signal transduction pathway of protein kinase C (PKC) in MDCK cells was observed. It was found that PKC was activated via translocation from cytosol to membrane in cultured MDCK cells exposed to high dextrose. However, the activity of Na^+,K^+－ATPase was decreased and this can be prevented by PKC inhibitor staurosporine(SS). These findings suggested that the activation of PKC signal transduction pathway induced by elevated glucose in renal tubular epithelial cells may be involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy.

KEY WORDS Protein kinase C; Na^+,K^+－ATPase; Nephropathy, diabetic