

## • 基础实验研究论著 •

## JNK 通路在 Ang II 所致肾小球足细胞内质网应激性凋亡中的作用

张姬欣<sup>1</sup>, 柳洁<sup>2△</sup>, 秦洁<sup>2</sup>, 马春明<sup>1</sup>, 李艳<sup>1</sup>, 程宁<sup>1</sup>

(1. 山西医科大学研究生学院, 山西太原 030001; 2. 山西省人民医院内分泌科, 山西太原 030012)

**摘要:**目的 研究内质网应激(ERS)在 Ang II 所致肾小球足细胞损伤中的作用及 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)通路在 Ang II 所致肾小球足细胞凋亡中的促进作用及其特异性抑制剂 SP600125 的保护。方法 足细胞诱导分化, 随机分为对照组(N组); Ang II 组(A组); Ang II + SP600125 组(A+S组), 作用 48 h 后, 倒置显微镜下观察足细胞形态变化, 并用流式细胞仪测定细胞凋亡率, 实时定量 PCR 测定 GRP78 mRNA、p-JNK mRNA 表达, Western blot 测定 GRP78 蛋白、p-JNK 蛋白的表达。结果 经统计学分析后, A 组与 N 组比较, 细胞凋亡率增加, GRP78 mRNA、p-JNK mRNA 的表达增多, 且 GRP78 蛋白、p-JNK 蛋白的表达较 N 组增多, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); A+S 组足细胞凋亡率、p-JNK mRNA、p-JNK 蛋白的表达较 A 组均有减少, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 高 Ang II 可以在体外诱导足细胞发生凋亡。高 Ang II 诱导足细胞凋亡是由 ERS 途径所介导的, 并通过了 JNK 途径引起细胞凋亡。JNK 途径特异性抑制剂 SP600125 通过抑制 c-Jun 氨基末端激酶通路的激活抑制了足细胞的凋亡。

**关键词:**足细胞; 内质网应激; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.17.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)17-2218-03

**Role of the JNK pathway in Ang II induced podocyte apoptosis in endoplasmic reticulum stress**Zhang Jixin<sup>1</sup>, Liu Jie<sup>2△</sup>, Qin Jie<sup>2</sup>, Ma Chunming<sup>1</sup>, Li Yan<sup>1</sup>, Cheng Ning<sup>1</sup>

(Graduate School of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China;

2. Department of Endocrinology, Shanxi Provincial People's Hospital, Taiyuan, Shanxi 030012, China)

**Abstract: Objective** To explore the effect of endoplasmic reticulum stress(ERS) in Ang II caused glomerular podocyte injury and the c-Jun N-terminal kinase(JNK) pathway in the apoptosis induced by Ang II glomerular podocyte in promoting the role of protection and its specific inhibitor SP600125). **Methods** Cultivate podocyte cell to be differentiated and then randomly divided into control group(N group), Ang II group(A group), Ang II + SP600125 group(A+S group). After 48 hours, observe cell morphology change, detected cell apoptosis rate using flow cytometer, detected the expression of GRP78 mRNA and p-JNK mRNA with Real-time PCR and detected the expression of GRP78 protein and p-JNK protein with Western blot. **Results** The cell apoptosis rates of A group were higher than N group. Realtime PCR showed the GRP78 mRNA, p-JNK mRNA expression of A group were higher than N group. Western blot show the GRP78 protein, p-JNK protein expression of Ang II group were higher than N group, the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ). Compared with A group, the cell apoptosis rates, the p-JNK mRNA expression and the p-JNK protein expression of A+S group were significantly reduced, the difference was statistically significant( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** High Ang II can induce podocyte apoptosis in vitro. High Ang II can activate ERS to speed apoptosis of podocyte, and may induce cell apoptosis through JNK pathway. The inhibitor SP600125 antagonistic apoptosis of podocyte by inhibiting JNK pathway.

**Key words:** podocyte; endoplasmic reticulum stress; polymerase chain reaction

糖尿病肾病(DN)是糖尿病常见的并发症。足细胞作为肾小球三种固有细胞之一, 它的凋亡对 DN 发生、发展发挥着重要的作用, 内质网应激性凋亡途径是一条新近发现的凋亡途径, 在 DN 发生、发展中的作用成为研究的热点。许多研究证实了糖尿病常常伴随着 RAS 系统不恰当的活化, 促使血管紧张素转换酶激活, 血管紧张素 II (Ang II) 的生成增加, 参与并加重了肾脏的损伤。足细胞可表达 Ang II 受体, 是 Ang II 的靶细胞之一。本研究观察 Ang II 是否通过激活内质网应激性凋亡途径诱导足细胞凋亡。

**1 材料与方****1.1 材料** 条件永生小鼠足细胞由厦门大学细胞库提供,诱导分化后随机分为对照组(N组); Ang II 组(A组, Ang II 浓度为  $10^{-8}$  mol/L); Ang II + SP600125 组(A+S组,  $10^{-8}$  mol/L Ang II + 20  $\mu$ mol/L SP600125, 其中 SP600125 预先处理 30 min)。**1.2 仪器与试剂** FC500 流式细胞仪由美国贝克曼公司提供; 实时定量 PCR 系统由美国 ABI 公司提供; 数字凝胶成像系统由 Applied Biosystems 提供; Ang II 由 Sigma 公司提供; SP600125 由 Selleck Chemicals 公司提供; Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒由凯基生物有限公司提供; PCR 反应试剂盒由大连宝生物工程有限公司提供; 双色预染蛋白质标记物由北京天根生化科技有限公司提供。

### 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养与鉴定** 培养条件永生小鼠足细胞株: RPMI1640 细胞培养液中加入 10% 胎牛血清 (FBS)、10~50 U/mL 小鼠重组  $\gamma$ -IFN、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素配置培养基, 在 33 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中传代培养。将细胞置于 37 °C、不添加  $\gamma$ -IFN 的条件下诱导分化 7~10 d, 倒置显微镜下观察未分化及已分化足细胞形态进行鉴定。

**1.3.2 流式细胞仪测定细胞凋亡率** 各环境作用 48 h 收集细胞进行凋亡检测。用不含 EDTA 的胰酶消化后离心, 用 PBS 清洗细胞 2 次 (2 000 r/min 离心 5 min), 用 500  $\mu$ L 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 再加 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 及 5  $\mu$ L 碘化丙啶, 混匀, 室温、避光条件反应 5~15 min, 注意检测应在 1 h 内完成。

**1.3.3 Realtime-PCR 测定 GRP78、p-JNK 的 mRNA 表达** 参照试剂盒说明提取 RNA、进行 RNA-cDNA 逆转录反应, 取合成好的 cDNA 进行实时荧光定量 PCR 反应。引物设计如下, 内参 (237 bp) 上游: 5'-CTT CCT GGG CAT GGA GTC-3', 下游: 5'-GCC GAT CCA CAC GGA GTA -3'; GRP78 (144 bp) 上游: 5'-GGT ATT GAA ACT GTG GGA GGA G-3', 下游: 5'-TAG GGG TCG TTC ACC TTC ATA G-3'; p-JNK (238 bp) 上游: 5'-CAA TGA AAT AAC CCC AGA GGA A-3', 下游: 5'-TCA AAA TGG AGA AGG ATG TGC-3'。PCR 条件: 预变性 95 °C 30 s, PCR 反应 95 °C, 5 s 60 °C, 31 s, 40 个循环。用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>, 表示实验组的靶基因表达相对于 N 组的变化倍数。其中,  $\Delta\Delta$ Ct = (Ct<sub>靶基因</sub> - Ct<sub>内参基因</sub>)<sub>实验组</sub> - (Ct<sub>靶基因</sub> - Ct<sub>内参基因</sub>)<sub>N组</sub>。

**1.3.4 Western Blot 测定 GRP78、p-JNK 的蛋白表达** 分别提取总蛋白, 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、蛋白印迹、ECL 显色, 测定 GRP78、p-JNK 的蛋白表达。用“灰度值靶蛋白/灰度值内参”代表靶蛋白的相对表达量。

**1.4 统计学处理** 每个实验重复 6 次, 所有数据经 SPSS13.0 统计软件进行处理, 计量资料进行正态性检验后, 统计结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组比较 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, 若不满足正态性、方差齐性, 采用秩和检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 倒置显微镜下观察足细胞形态变化** 未分化足细胞表现为卵圆形, 呈上皮样细胞外观。胞体较小、胞核呈圆形或卵圆形, 位于细胞中央。当诱导分化 4~6 d 后细胞增殖的速度逐渐减慢并开始出现分化态细胞的特征: 胞体逐渐变大, 伸出明显的突起, 并且相邻足细胞的突起相互交叉, 形成连接。在高 Ang II 环境下, 受损的足细胞可见细胞回缩, 间隙变宽, 形态多样不规则, 胞浆中出现空泡。足突变细、融合, 直至消失。SP600125 预先干预, 足细胞受损情况好转。

**2.2 细胞凋亡率、GRP78、p-JNK 表达的变化** 与 N 组凋亡率 [(1.20 ± 0.42)%] 比较, A 组凋亡率 [(14.02 ± 3.52)%] 增加; 与 A 组凋亡率比较, A+S 组凋亡率 [(5.80 ± 1.01)%] 减少。A 组 GRP78 mRNA (3.51 ± 0.19)、GRP78 蛋白 (1.54 ± 0.22) 的表达上调, 与 N 组 [GRP78 mRNA (1.00 ± 0.00)、GRP78 蛋白 (0.66 ± 0.08)] 比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。A+S 组与 A 组比较, p-JNK mRNA、p-JNK 蛋白的表达下调,

差异有统计意义 (*P* < 0.05) 同时 A+S 组与 N 组比较, 细胞凋亡率、p-JNK mRNA、p-JNK 蛋白的表达仍较高, 差异有统计意义 (*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 各组 p-JNK mRNA、p-JNK 蛋白的变化

组别	P-JNK mRNA (2 <sup>-<math>\Delta\Delta</math>Ct</sup> 表示)	p-JNK 蛋白的相对表达量 (灰度值靶蛋白/灰度值内参表示)	
		I 条带 (46 × 10 <sup>3</sup> )	II 条带 (55 × 10 <sup>3</sup> )
N 组	1.00 ± 0.00	0.67 ± 0.06	0.56 ± 0.07
A 组	3.69 ± 0.14*	1.34 ± 0.12*	1.34 ± 0.06*
A+S 组	2.18 ± 0.09*#	1.00 ± 0.07*#	1.08 ± 0.08*#

\*: *P* < 0.05, 与 N 组比较; #: *P* < 0.05, 与 A 组比较。

## 3 讨论

伴随着生活方式的改变, 糖尿病的发病率呈逐年上升的趋势。它对肾脏的损害很广泛, 可以引起肾脏多个结构的破坏。DN 无论是临床表现, 进展速度还是远期预后都有别于其他原因引起的肾脏疾病, 严重影响着人类健康。

DN 的多种发病机制不断提出, 包括血流动力学的改变, 氧化应激与糖代谢紊乱, 胰岛素抵抗, 细胞因子的作用等, 同时也有越来越多的实验研究证据支持过度的细胞凋亡参与其发生、发展<sup>[1-2]</sup>, 而具体的通路尚不明确。

肾小球的 3 种固有细胞 (系膜细胞、内皮细胞、足细胞) 在维持肾脏的正常运行中各自发挥不同的作用, 均参与了 DN 的病理生理过程。其中, 足细胞分布于基底膜外表面, 形态为星型多突起样, 主要功能包括构成肾小球滤过屏障、对抗毛细血管腔内的流体静水压、维持毛细血管扩张、合成肾小球基底膜基质成分<sup>[3]</sup>、清除肾小囊腔中免疫复合物等大分子物质、合成血管内皮生长因子等<sup>[4]</sup>。当足细胞受到各种刺激时, 一旦无法适应, 则诱导凋亡或坏死, 参与 DN 的发生、发展。

内质网应激为内质网在各种刺激因素作用下, 损伤其折叠蛋白的能力, 未折叠的蛋白蓄积, 促使内质网启动未折叠蛋白反应 (UPR), 起到早期保护作用, 当 ERS 强度较大或持续时间过长, 相关的细胞凋亡机制启动, 从而损伤细胞。真核细胞内质网中存在许多的分子伴侣<sup>[5]</sup>, 参与 ERS 信号通路, 在新生蛋白的折叠及错误折叠蛋白的降解中起着重要作用。其中糖调节蛋白 78 (GRP78) 被广泛用于 ERS 的研究, 它属于热休克蛋白家族 (HSP70 家族), 又称为 Bip (binding protein)。GRP78 的末端存在不同的结构域, 发挥不同的功能, N' 端具有 ATP 酶活性, 而未折叠蛋白则可以与 C' 端结合<sup>[6]</sup>。本实验选它作为 ERS 的标志性蛋白进行研究。

DM 患者肾脏中 Ang II 在组织局部聚集<sup>[7]</sup>。Ang II 改变肾脏血流动力学, 也可以促进血管内皮功能的障碍, 近年来, 它的非血流动力学效应开始受到人们的关注。Ang II 可以诱导多种细胞的凋亡, 其机制与内质网应激有关。已经有研究证实了 Ang II 可以通过激活 ERS 诱导系膜细胞凋亡<sup>[8]</sup>, 而 Ang II 通过 ERS 诱导足细胞凋亡鲜有报道。Ang II 可能激活了氧化应激从而引起内质网应激, 此外, Ang II 促蛋白合成的效应使未折叠蛋白过度蓄积于内质网中, 也可能参与 ERS。

细胞凋亡可以由多种信号传导通路介导, ESR 引起细胞凋亡的三条途径包括 CHOP/GADD153 基因激活转录、c-Jun

氨基末端激酶通路(JNK)活化、caspase-13 的激活<sup>[9]</sup>。

JNK 信号通路是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)中重要的组成部分,参与从细胞表面向细胞核传递信号。JNK 也被称为应激活化蛋白激酶,可以被许多刺激(如生长因子、环境因素、细胞因子等)激活,从而参与细胞增殖、分化及凋亡。JNK 基因可以编码 46kDa 及 55kDa 两种不同蛋白,取决于是否存在羧基。

对许多疾病的研究都支持 JNK 通路在细胞凋亡中的促进作用: A $\beta$ 25-35 通过激活 JNK 及其底物 c-JUN 诱导海马神经元凋亡,给予特异性抑制剂 SP600125 后,抑制了 JNK 及 c-JUN 的激活,细胞凋亡减少<sup>[10]</sup>。Wang 等<sup>[11]</sup>研究证实 JNK 途径参与了甲基苯丙胺引起的神经母细胞瘤的细胞凋亡,同时证实了 SP600125 有保护作用。

SP600125 是一种常用的 JNK 途径的高选择性抑制剂,通过竞争性结合 ATP 位点抑制 JNK 激酶。SP600125 可以通过抑制 JNK 介导的 c-Jun 磷酸化而发挥作用,因其高效、高选择性常常被用于 JNK 信号通路的研究<sup>[12]</sup>。当 SP600125 浓度为 10  $\mu$ mol/L 时可使 JNK 通路抑制 75%,当浓度达 20  $\mu$ mol/L 时可使 JNK 通路抑制大于 90%,本实验用 SP600125 预先干预,可以抑制 p-JNK 的表达,从而起到减少细胞凋亡的作用,一方面验证了 JNK 通路在高 Ang II 所致足细胞损伤中的促凋亡作用,另一方面也为足细胞的保护提供了新的治疗靶点。

## 参考文献

- [1] Susztak K, Raff AC, Schiffer M, et al. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy[J]. *Diabetes*, 2006, 55(1): 225-233.
- [2] Park CW, Kim HW, Ko SH, et al. Accelerated diabetic nephropathy in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor

alpha[J]. *Diabetes*, 2006, 55(4): 885-893.

- [3] Johnson R, Yamabe H, Chen YP, et al. Glomerular epithelial cells secrete a glomerular basement membrane-degrading metalloproteinase[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1992, 2(9): 1388-1397.
- [4] Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis[J]. *Kidney Int*, 2006, 69(12): 2131-2147.
- [5] Glembotski CC. Endoplasmic reticulum stress in the heart[J]. *Circ Res*, 2007, 101(10): 975-984.
- [6] Thomas CG, Spyrou G. ERdj5 sensitizes neuroblastoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(10): 6282-6290.
- [7] Singh R, Leehey DJ. Effect of ACE inhibitors on angiotensin II in rat mesangial cells cultured in high glucose[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 357(4): 1040-1045.
- [8] 曹延萍. 内质网应激在糖尿病肾损害过程中的作用及其机制研究[D]. 河北: 河北医科大学, 2011.
- [9] 吴涛, 季光, 郑培永, 等. 内质网应激与肝细胞凋亡[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(23): 2507-2515.
- [10] 徐玮, 邓珏蕾, 汤荟冬, 等. JNK 信号转导通路在 A $\beta$ 25-35 诱导大鼠原代海马神经元凋亡中作用机制的研究[J]. *中国神经科学杂志*, 2004, 20(2): 135-139.
- [11] Wang SF, Yen JC, Yin PH, et al. Involvement of oxidative stress-activated JNK signaling in the methamphetamine-induced cell death of human SH-SY5Y cells[J]. *Toxicology*, 2008, 246(2/3): 234-241.
- [12] Jin HO, Seo SK, Woo SH, et al. SP600125 negatively regulates the mammalian target of rapamycin via ATF4-induced Redd1 expression[J]. *FEBS Lett*, 2009, 583(1): 123-127.

(收稿日期: 2013-04-12)

(上接第 2217 页)

- [5] 廖灿, 符芳, 杨昕, 等. 应用微阵列比较基因组杂交技术产前诊断 DiGeorge 综合征一例[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2011, 28(2): 238.
- [6] Ou Z, Berg JS, Yonath H, et al. Microduplications of 22q11. 2 are frequently inherited and are associated with variable phenotypes[J]. *Genet Med*, 2008, 10(4): 267-277.
- [7] Simon TJ, Wu Z, Avants B, et al. Atypical cortical connectivity and visuospatial cognitive impairments are related in children with chromosome 22q11. 2 deletion syndrome[J]. *Behav Brain Funct*, 2008, 4(1): 25.
- [8] Rauch A, Pfeiffer RA, Leipold G, et al. A novel 22q11. 2 microdeletion in DiGeorge syndrome[J]. *Am J Hum Genet*, 1999, 64(2): 659-666.
- [9] Rauch A, Zink S, Zweier C, et al. Systematic assessment of atypical deletions reveals genotype-phenotype correlation in 22q11. 2[J]. *J Med Genet*, 2005, 42(11): 871-876.
- [10] Ben-Shachar S, Ou Z, Shaw CA, et al. 22q11. 2 distal deletion: a recurrent genomic disorder distinct from DiGeorge syndrome and velocardiofacial syndrome[J]. *Am J Hum Genet*, 2008, 82(1): 214-221.

- [11] Tan TY, Collins A, James PA, et al. Phenotypic variability of distal 22q11. 2 copy number abnormalities[J]. *Am J Med Genet A*, 2011, 155A(7): 1623-1633.
- [12] Jawad AF, McDonald-McGinn DM, Zackai E, et al. Immunologic features of chromosome 22q11. 2 deletion syndrome (DiGeorge syndrome/velocardiofacial syndrome)[J]. *J Pediatr*, 2001, 139(5): 715-723.
- [13] Bassett AS, Chow EW, Husted J, et al. Clinical features of 78 adults with 22q11 Deletion Syndrome[J]. *Am J Med Genet A*, 2005, 138(4): 307-313.
- [14] Maalouf NM, Sakhae K, Odvina CV. A case of chromosome 22q11 deletion syndrome diagnosed in a 32-year-old man with hypoparathyroidism[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(10): 4817-4820.
- [15] 吴志俊, 金玮. 拷贝数变异: 基因组多样性的新形式[J]. *遗传*, 2009, 31(4): 339-347.
- [16] 马芬, 吴凤霞, 李宁, 等. 应用 Affymetrix 全基因组芯片检测染色体 7q36 区域的 DNA 拷贝数突变[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2009, 26(3): 336-339.

(收稿日期: 2013-04-01)