蛋白激酶 C 在血管紧张素Ⅱ诱导的肾小球系膜细胞收缩中的作用

张承巍[1] 王禹霄[1] 冷 蕾[2] 胡文平[3] 焦军东[1]

(1 哈尔滨医科大学附属第二医院肾内科 黑龙江 哈尔滨 150086；2 哈尔滨市第二医院内分泌科 黑龙江 哈尔滨 150056；
3 哈尔滨医科大学附属第四医院肾内科 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的：研究蛋白激酶 C(pkc)在血管紧张素Ⅱ诱导的肾小球系膜细胞（GMC）收缩中的作用。方法：人肾小球系膜细胞系用于全部实验。应用血管紧张素Ⅱ（AngⅡ）刺激蛋白激酶 C 抑制剂白屈菜红碱（CHE）处理或未处理的系膜细胞。利用激光扫描共聚焦显微镜测细胞内钙离子浓度。结果：①膜细胞经 AngⅡ诱导后，细胞出现明显的大幅度起始钙离子浓度升高 (vs.control, $p<0.05$, n=16) ②膜细胞经 CHE 预处理后减少 AngⅡ诱导的 GMC 钙离子浓度(vs AngⅡ, $p<0.05$, n=16)。结论：①血管紧张素Ⅱ诱导系膜细胞收缩。②蛋白激酶 C 参与血管紧张素Ⅱ诱导的肾小球系膜细胞的收缩过程。

关键词：系膜细胞；收缩；蛋白激酶 C

中图分类号：R692 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-6273（2011）19-3636-03

Effects of Protein Kinase C in Mesangial Cell Contraction Induced by Angiotensin Ⅱ

ZHANG Cheng-wei[1], WANG Yu-xiao[1], LENG Lei[2], HU Wen-ping[3], JIAO Jun-dong[1]

(1 The 2nd Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Haerbin 150086, China;

2 The Second Hospital of Harbin City, Harbin 150056, China;

3 The 2nd Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Haerbin 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of PKC on cells contraction in cultured mesangial cells. Methods: The human mesangial cell line was used for all experiments. Mesangial cell contraction was induced by angiotensin II. Laser scanning confocal microscopy was used to detect calcium concertration in the cells. Results: ① Mesangial cells treated by AgⅡ (10^{-6}mol/L) for 30mins signifficantly increased calcium concertration. (vs.control, $P<0.05$, n=16). ② GMC was induced by AgⅡ (10^{-6}mol/L) and CHE (10^{-5}mol/L), calcium concertration of which decreased to AgⅡ group. (vs AgⅡ. $P<0.05$, n=16). Conclusion: ①AngⅡ induced GMC contraction. ② PKC take part in AngⅡ-induced contraction of GMC.

Key words: Mesangial cells; Contraction; PKC

Chinese Library Classification(CLC): R692 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)19-3636-03

前言

肾小球系膜细胞（mesangial cell MC）是肾小球的固有细胞[1]，在维持肾小球正常的结构和功能中具有重要的作用[2]，系膜细胞收缩是肾小球硬化的早期事件[3]，在各种损害因素下，系膜细胞表现过度的持续收缩最终导致肾小球硬化和肾功能衰竭[4]。PKC 是一种钙、磷脂依赖性蛋白磷酸化酶，广泛存在于人体的各种组织细胞中[5]。它能被细胞外生物活性因素(激素、生长因素、神经递质)激活，完成靶蛋白磷酸化，通过蛋白磷酸化后生物活性的改变而完成细胞外源性信号的应答，构成细胞内重要的信息网络系统[6]。细胞内钙离子浓度升高是各种活性物质发挥生物学的基础[7]。本研究应用蛋白激酶 C 抑制剂白屈菜红碱（CHE）抑制蛋白激酶的激活[8]，从而观察蛋白激酶 C 在血管紧张素Ⅱ诱导的肾小球系膜细胞收缩中的作用。

1 材料与方法

作者简介：张承巍（1981-），男，硕士，住院医师，从事肾脏病与血液净化工作。电话：0451-86605321，15804602526，
E-mail: zhangchengwei1981@163.com

（收稿日期：2011-06-06 接受日期：2011-06-30）

1.1 实验细胞系和试剂

人肾小球系膜细胞系由南京中医学院馈赠，用于全部实验。新生小牛血清由杭州四季青公司提供；RPMI1640 培养基由 Gibco 公司提供；胰蛋白酶由 Gibco 公司提供；血管紧张素Ⅱ及 CHE 由 Sigma 公司提供；

1.2 主要仪器设备及软件

二氧化碳培养箱由日本三洋公司提供；超净工作台由苏州净化设备厂提供；超纯水系统由美国 Millipore 提供；荧光显微镜由日本 Olympus 公司提供；光学显微镜由日本 Olympus 公司提供；激光扫描共聚焦显微镜由美国 MERIDIAN 公司提供；

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 当细胞融合至 70%时的对数生长期细胞，开始传代培养，传代时移去培养基，加入 0.25%胰蛋白酶 1ml 消化 2-4min 至细胞分散，吹打。将细胞移入离心管，离心（1000rpm,5min），培养液重新悬浮混匀细胞，接种于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基的培养瓶中，置于 37℃ 5%CO_2 的培养箱中培养。培养的 HMC 细胞为单层生长，传代率为 1:3 到 1:4，每 2-3 天传代一次。

1.3.2 激光共聚焦显微镜测细胞内钙离子浓度 LSCM 能对活

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞内部的钙离子分布及随时间的变化进行成像及测量[9]。Fluo-3AM 的负载好的标本在激光共聚焦显微镜下动态扫描细胞内荧光强度变化来指示胞内游离钙浓度的变化。在观察 Ca^{2+} 快速变化时,可选线扫方式,其采样频率为 488Hz,与 Ca^{2+} 结合的 Fluo-3 可以被 488nm 的氩离子激光激发, 可在 525nm 处探测到荧光发射,计算机软件进行自动分析处理,以荧光强度增高的百分比来衡量钙浓度的变化,在 LSCM 下选定负载好的细胞视野后,用微量加药器将实验条件要求的试剂滴加在载波片上中,试剂扩散后进行观察,以 5 秒间隔连续记录 200 秒,统计荧光强度变化

1.4 数据的统计学分析

数据进行统计分析并作图，实验数据以 mean± SE 表示，用组间 t 检验进行统计差异性检验,P<0.05 认为有显著差异。

2 结果

如表 1,图 1 所示:系膜细胞经 AngⅡ诱导后,细胞出现明显的大幅度起始钙离子浓度升高 (vs control, P<0.05, n=16).系膜细胞经 CHE 预处理后减少 AngⅡ诱导的 GMC 钙离子浓度 (vs AngⅡ. P<0.05, n=16)。

表 1 不同药物作用下对系膜细胞[Ca^{2+}]i 变化水平的影响

Table 1 Effect of various drug on [Ca^{2+}]i change of GMC

Group	Number of cell	Average fluorescens intensity
Control group	16	23.98± 10.06
AgⅡgroup	16	158.75± 14.52*
CHE+ AgⅡ group	16	59.31± 17.56**

注:数值以 mean± SE 表示,与未处理组比较:*P<0.05,与 AgⅡ组比较:**P<0.05

Note: *P<0.05 AgⅡgroup compared with control group;**P<0.05 CHE+ AgⅡgroup compared with AgⅡgroup

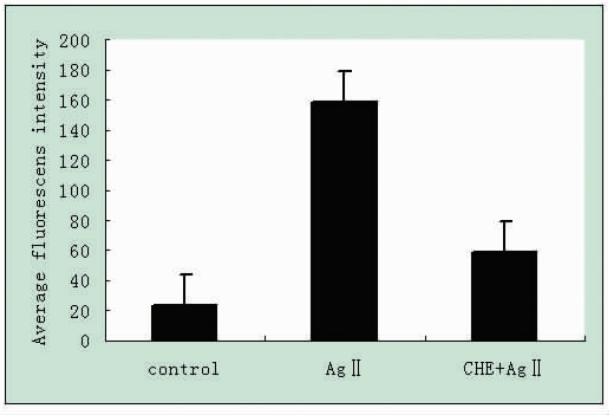

图 1 不同药物作用下对系膜细胞[Ca^{2+}]i 变化水平的影响

Fig. 1 Effect of various drug on [Ca^{2+}]i change of GMC

3 讨论

研究证实系膜细胞持续收缩在肾小球硬化和进行性肾功能衰竭中具有重要作用。系膜细胞持续收缩是肾小球硬化的共同病理特征[10]。大量的实验表明,系膜细胞持续收缩具有重要的病理作用[11],但其收缩的机制尚未完全阐明。因而,研究对系膜收缩具有调控作用的分子,不仅有助于揭示肾小球硬化的发病机制,而且对研制开发防治肾功衰竭药物具有重要的意义。

近些年发现蛋白激酶 C 与某些细胞收缩有关[12]。这些研究为揭示系膜细胞收缩机制提供了新的线索。蛋白激酶 C 在细胞收缩的作用可能存在细胞类型特异性。已有许多研究表明蛋白激酶 C 参与心肌细胞收缩过程[13],但在系膜细胞中的作用并未做过报道,本研究发现小窝蛋白和蛋白激酶 C 参与系膜细胞的收缩过程,主要有以下证据:①血管紧张素Ⅱ诱导系膜细胞收缩。②CHE 抑制血管紧张素Ⅱ介导的系膜细胞收缩。

PKC 是一种钙、磷脂依赖性蛋白磷酸化酶,广泛存在于人体的各种组织细胞中。其中蛋白激酶 C 在小窝蛋白上就有表达。PKC 是丝 / 苏氨酸(Ser/Thr)蛋白激酶家族中的一员,它可以磷酸化细胞诸多作用靶位影响细胞的兴奋一收缩偶联。其中,PKC 对心肌收缩蛋白磷酸化的作用是目前研究的比较深入,结论比较确定的[14]。心肌细胞通过兴奋 - 收缩偶联调节其收缩性能。兴奋 - 收缩偶联主要包括细胞膜离子通道、肌浆网(RS)与肌小节三个主要环节。研究证实激活后的 PKC 可以磷酸化 L 型钙通道、Na^{+}-H^{+} 交换、肌浆网以及心肌细胞收缩蛋白,如心肌肌钙蛋白 I (cTnI)、心肌肌钙蛋白 T (cTnT)、肌球蛋白轻链 -2 (MLC-2)、肌球蛋白结合蛋白 C,因而可以起到调节心肌细胞收缩性能的作用 [15]。但在系膜细胞中的收缩机制还需进一步研究。

本研究通过激光共聚焦观察了正常状态下和各处理组下细胞内荧光强度的变化。发现当加入 PKC 抑制剂 CHE 后,细胞内荧光强度出现相应的减少，这一现象提示 PKC 参与了此收缩过程。

总之，本研究以 PKC 抑制剂 CHE 为干扰方法，证明了 PKC 激活后引起了系膜细胞收缩，从而说明蛋白激酶 C 参与系膜细胞的收缩过程。但是,未能进行相关作用机制的研究,后续的研究应着眼于进一步的证明这一作用,并且探索其内在的作用机制。进一步深入研究,不仅有助于揭示各种肾炎、肾小球硬化发病机制,而且对研制开发防治肾功能衰竭药物具有重要的意义。

参 考 文 献(References)

[1] Inagi R, Nangaku M, Miyata T, et al. Mesangial cell-predominant functional gene, megsin[J] .Clin Exp Nephrol, 2003, (7) :87-92

[2] Yamamoto T, Hirohama T, Uemura H. Endothelin B receptor-like immunoreactivity in podocytes of the rat kidney [J]. Arch Histol Cytol, 2002,653, 65(3) :245-250

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[3] Miyata T, Inagi R, Nangaku M, et al. Overexpression of the serpin megsin induces progressive mesangial cell proliferation and expansion[J]. J Clin Invest, 2002,109, 109 :585-593

[4] Johnson RJ, Floege J, Couser WG, et al. Role of platelet-derived growth factor in glomerular disase [J]. JASN, 1993, 4:119-128

[5] Rosse C, Linch M, Kermorgant S, et al. PKC and the control oflocalized signal dynamics [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010,11, 11 (2): 103-112

[6] Matveev S, Uittenbogaard A, van der Westhuyzen D, et al. Caveolin-1 negatively regulates SR-BI mediated selective uptake of high-density lipoprotein-derived cholesteryl ester [J]. Eur J Biochem, 2001, 268: 5609-5616

[7] Saleh H, Schlatter E, Lang D, et al. Regulation of mesangial cell apoptosis and proliferation by intracellular Ca2+ signals [J]. Kidnet Int, 2000, 58(5); 1876-1884

[8] Terada Y,Kobayashi T,Kuwana H,et al. Aldosterone stimulares proliferation of mesangial cells by activating mitogen-activated protein kinase 1/2,cyclin D1,and cyclin A [J].J Am Soc Nephrol, 2005, (16): 2296-2305

[9] Chen JT, Chen RM, Lin YL, et al. Confocal laser scanning microscopy I.An overview of principle and practice in biomedical re search [J]. Acta Anaesthesiol Taiwan, 2004,42, 42 (1) :33-40

[10] Wang Pi, Takezawa T. Reconstruction of renal glomerular tissue using collagen vitrigel scaffold[J].Journal of bioscience and bioengineering, 2005,99, 99 (6) :529-540

[11] Blanz RC, Gabbai FB, Tucker BJ, et al. Role of mesangial cell in glomerualr response to volume and angiotensin II [J]. Am J Physiol, 1993,264 :158-165

[12] Lee MW, Severson DL. Signal transduction in vascular smooth muscle:Diacylglycerol second messengers and PKC action [J].Am J Physiol, 1994,2675: 659-667

[13] Johnson JA, Gray MO, Chen CH, et al. A protein kinase C translocation inhibitor as an isozyme-selective antagonist of cardiac function [J]. J Biol Chem, 1996,271, 271 :24962-24966

[14] Su SW, Wang YL, Li JX. Relationship hetween cardiotonic effects and inhibition on cardiac sarcolemma Na~+,K~+-ATPase of strophanthidin at low concentration [J] .Acta Pharmacol Sin, 2003, (24): 1103-1107

[15] Fukami K, Inanobe S, Kanemaru K, et al. Phospholipase C is a keyenzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance[J]. Prog Lipid Res, 2010,49, 49 (4):429-437

·重要信息·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红[1] 戴薇薇[2]

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001 ;2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN :978-7-117-13344-9/R·13345) 一书已于 2010 年 9 月 14 日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一部分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gamhbir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校 7 名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人 13 名作为国内编委,还包括国内外共 40 名专家参与编写。

全书共计 130 余万字,收录图片 378 幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分 10 章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分 7 章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价 260 元, 全国各大书店有售。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net