

## p38 丝裂素活化蛋白激酶在高糖损伤人脐静脉内皮细胞中的作用

罗春英, 刘小鹏, 文格波, 李 赟, 曹仁贤, 刘江华, 文 芳

(南华大学附属第一医院临床研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 内科学; 糖尿病; 人脐静脉内皮细胞; p38 丝裂素活化蛋白激酶; 蛋白激酶 C; 细胞凋亡; 葡萄糖

[摘要] 目的 探讨 p38 丝裂素活化蛋白激酶在高糖导致人脐静脉内皮细胞损伤过程中的作用及 p38 丝裂素活化蛋白激酶激活是否为蛋白激酶 C 依赖途径。方法 体外分离培养人脐静脉内皮细胞, 加入 22 mmol/L 葡萄糖及 PMA、GF109203X(蛋白激酶 C 特异抑制剂)、SB203580(p38 丝裂素活化蛋白激酶特异抑制剂)培养 72 h。采用 Western blot 检测磷酸化 p38 丝裂素活化蛋白激酶蛋白的表达, 用逆转录聚合酶链反应检测 p38 丝裂素活化蛋白激酶 mRNA 的表达, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果 高糖及 PMA 使磷酸化 p38 丝裂素活化蛋白激酶蛋白表达量与 mRNA 水平明显升高, 人脐静脉内皮细胞凋亡率明显升高。高糖培养人脐静脉内皮细胞 72 h 后磷酸化 p38 丝裂素活化蛋白激酶蛋白表达量、mRNA 水平、人脐静脉内皮细胞凋亡率分别由  $0.189 \pm 0.0103$ 、 $0.313 \pm 0.0153$  和 5.15% 上升至  $0.605 \pm 0.0407$ 、 $0.447 \pm 0.0252$  和 16.8% ( $P < 0.05$ )。SB203580 和 GF109203X 预处理后使 p38 丝裂素活化蛋白激酶蛋白磷酸化的表达量与 mRNA 水平明显下降, 人脐静脉内皮细胞凋亡率下降 ( $P < 0.05$ )。结论 p38 丝裂素活化蛋白激酶激活在高糖导致人脐静脉内皮细胞损伤过程中起促进作用, p38 丝裂素活化蛋白激酶激活可能为蛋白激酶 C 依赖途径。p38 丝裂素活化蛋白激酶特异阻断剂对高糖损伤内皮细胞有保护作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### The Effect of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase on the High Glucose-Induced Damage to Human Umbilical Vein Endothelial Cell

LUO Chun-Ying, LIU Xiao-Peng, WEN Ge-Bo, LI Yun, CAO Ren-Xian, LIU Jiang-Hua, and WEN Fang

(Department of Clinic Research, First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Diabetes; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; p38 Mitogen-Activated Protein Kinase; Protein Kinase C; Apoptosis; Glucose; Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of the p38 mitogen-activated protein kinase(p38MAPK) on the high glucose-mediated damage to human umbilical vein endothelial cell(hUVEC) and to investigate the effect of the protein kinase C (PKC) dependent pathway on the activation of glucose on p38MAPK. **Methods** HUVEC were isolated from umbilical cords of normal pregnancies. HUVEC were exposed for 72 h to 5 mmol/L (control), 22 mmol/L glucose(HG), phorbol myristate acetate (PMA, a PKC agonist), GF109203X (a general PKC-specific inhibitor), SB203580(a p38MAPK-specific inhibitor). The expression of phospho-p38MAPK protein and p38MAPK mRNA were detected by Western blot and reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) respectively. The apoptosis of hUVEC were quantitated by flow cytometry using propidium iodid staining. **Results** High glucose and PMA increased the expression of phospho-p38MAPK, p38MAPK mRNA and apoptosis of hUVEC significantly. Incubation of hUVEC with high glucose for 72 h increased the expression of phospho-p38MAPK, p38MAPK mRNA and apoptosis of hUVEC ( $0.605 \pm 0.0407$ ,  $0.447 \pm 0.0252$ , 16.8%) versus incubation with low glucose ( $0.189 \pm 0.0103$ ,  $0.313 \pm 0.0153$ , 5.15%,  $P < 0.05$ ) respectively. But the expression of phospho-p38MAPK, p38MAPK mRNA and apoptosis of hUVEC were inhibited by GF109203X and SB203580. **Conclusions** The activation of p38MAPK may accelerate the high glucose-mediated damage to hUVEC. Hyperglycemia can partly activate p38MAPK by PKC dependent pathway. p38MAPK-specific inhibitor may protect hUVEC in the high glucose-mediated damage.

研究表明,高糖损伤血管内皮细胞发生机制。高糖能诱导二酰基甘油(DAG)-蛋白激酶 C (protein

kinase C, PKC) 通路异常,丝裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族中 p38MAPK

[收稿日期] 2005-12-07 [修回日期] 2006-07-10

[基金项目] 湖南省教委和卫生厅科研基金(97B103)资助

[作者简介] 罗春英, 硕士, 主治医师, 现在广东省韶关粤北人民医院内分泌科工作(512025), 研究方向为糖尿病慢性并发症的发病机理, E-mail 为 luochunying1975@126.com。刘小鹏, 硕士, 主治医师, 研究方向为糖尿病慢性并发症的发病机理, E-mail 为 LXP1974@yahoo.com.cn。通讯作者文格波, 博士, 教授, 博士研究生导师, 从事糖尿病和甲状腺疾病发病的分子生物学研究, E-mail 为 wengebo@nhu.edu.cn。

通路同样参与细胞生长、发育、分化、凋亡和细胞恶化、转化等一系列过程。为此,本研究观察在高糖作用于人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, hUVEC)过程中 p38MAPK 是否被激活以及细胞凋亡情况,并观察了 p38MAPK 抑制剂、PKC 激动剂及抑制剂对此过程的影响,从而探讨其是否参与了高糖损伤 hUVEC 发生过程,以及在此过程中 p38MAPK 的作用是否通过 DAG-PKC 依赖途径实现。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

无菌取健康新生儿脐带,贮存于 PBS 液中 4℃ 冰箱保存,于 4 h 内使用。低糖型 DMEM 培养粉末(美国 Gibco 公司);胎牛血清(FBS)(美国 Gibco 公司);Affinity-Purified Rabbit Anti-phospho-p38MAPK (T180/Y182) Antibody (R&D Systems Inc 公司);UltraVision Detection System Anti-Rabbit, HRP/DAB(LAB VISION corporation);逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测试剂盒及 PCR 引物(上海生工公司);流式细胞仪(美国,型号为 Beckman coulter EPICS-X);凝胶图像分析仪(AlphaMager™ 2200)。

### 1.2 内皮细胞培养和鉴定

无菌条件下取正常分娩新生儿脐带,按改进的 Jaffe 等<sup>[1]</sup>方法分离培养。培养基为含 20% FBS、谷氨酰胺 2 mmol/L 和表皮细胞生长因子 10 μg/L 的低糖型 DMEM。倒置相差显微镜观察细胞呈单层鹅卵石状排列,免疫细胞化学与免疫荧光检测(1)因子相关抗原表达呈阳性,鉴定培养细胞为内皮细胞。

### 1.3 分组与处理

取生长良好的第 2 代细胞用于实验,按所需浓度接种于培养瓶内。hUVEC 接近汇合后,倒去培养基,用 PBS 液洗 2 遍,换上含 1% FBS 低糖型 DMEM 培养基继续培养 24 h,使细胞处于同步化状态,换实验用液后培养 72 h,用含 1% FBS 低糖型 DMEM 培养基配制下列实验用液: 对照组(葡萄糖 5.5 mmol/L);④高糖组(葡萄糖 22 mmol/L);④PMA 组(PMA 10 nmol/L); GF109203X 组(GF109203X 5 μmol/L); SB203580 组(SB203580 5 μmol/L);后 2 组为预先处理 0.5 h 后加入葡萄糖使其终浓度为 22 mmol/L;后 3 组溶媒体为 DMSO(二甲基亚砜),其最终浓度为 1:500。

### 1.4 Western 印迹法

参照分子克隆实验指南。按 BCA 蛋白含量测

定试剂盒在酶联免疫检测仪进行蛋白定量。用 AlphaMager™ 2200 图像分析仪分析,以面积和光密度的乘积为积分光密度表示,计算磷酸化 p38MAPK 与 β-actin 的积分光密度比值,以其比值代表磷酸化 p38MAPK 的相对量。

### 1.5 逆转录聚合酶链反应

按照试剂盒说明书进行, p38MAPK 引物序列:上游为 5'-ATG CCG AAG ATG AAC TTT GC-3', 下游为 5'-CCC TGC TTT CAA AGG ACT GA-3'。反应条件如下: 94℃ 预变性 5 min 后, 94℃ 变性 40 s → 54℃ 退火 40 s → 72℃ 延伸 30 s, 循环 30 次后于 72℃ 延伸 10 min, 预计扩增产物长度为 199 bp。内参 GAPDH 引物序列: 上游为 5'-GTC AGT GGT GGA CCT GAC CT-3', 下游为 5'-AGG GGT CTA CAT GGC AAC TG-3'。反应条件如下: 94℃ 预变性 5 min 后, 94℃ 变性 40 s → 56℃ 退火 40 s → 72℃ 延伸 30 s, 循环 30 次后于 72℃ 延伸 10 min, 预计扩增产物长度为 420 bp。应用即用 PCR 扩增试剂盒扩增, 每次 PCR 反应至少重复 3 次。扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色后摄片, 于凝胶图像分析仪摄像, 进行灰度分析。

### 1.6 流式细胞仪定量检测细胞凋亡

收集细胞用预冷 PBS 洗涤 2 次, 按  $1 \times 10^5$ /L 加入 75% 预冷的乙醇重悬细胞, 4℃ 固定过夜。800 r/min × 8 min, 弃乙醇, 500 μL PBS 重悬细胞, 加 RnaseA(终浓度为 50 mg/L), 37℃ 水浴 30 min。500 r/min × 8 min 离心, 去上清, 加入 4℃ PBS 200 μL。加入碘化丙啶(propidium iodid, PI), 终浓度为 50 mg/L, 振荡混匀, 避光冰箱内放置 30 min, 300 目尼龙网滤过, 流式细胞仪上机检测。计数 10 000 个细胞, 进行细胞凋亡分析。

### 1.7 统计学处理

所有实验重复 3 次。统计分析用 SPSS11.0 软件, 细胞凋亡率的比较采用  $\chi^2$  检验, 其余数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单向方差分析(One-way ANOVA)分析, 以  $P < 0.05$  为差异显著性标准。

## 2 结果

### 2.1 各组 p38 丝裂素活化蛋白激酶蛋白及 mRNA 表达量的比较

高糖组与 PMA 组 p38MAPK 蛋白及 p38MAPK mRNA 表达量明显增加, PKC 阻断剂 GF109203X 组与 p38MAPK 阻断剂 SB203580 组 p38MAPK 蛋白及 p38MAPK mRNA 表达量均较高糖组明显减低(表 1 及图 1)。

表 1. 各组人脐静脉内皮细胞 p38 丝裂素活化蛋白激酶蛋白表达量的比较( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	n	光密度比值
二甲基亚砷组	3	0.000 $\pm$ 0.0000
对照组	3	0.189 $\pm$ 0.0103
高糖组	3	0.605 $\pm$ 0.0407 <sup>a</sup>
PMA 组	3	0.577 $\pm$ 0.0306 <sup>a</sup>
GF109203X 组	3	0.193 $\pm$ 0.0116 <sup>b</sup>
SB203580 组	3	0.176 $\pm$ 0.0092 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与高糖组比较。

## 2.2 各组人脐静脉内皮细胞凋亡率的比较

二甲基亚砷组与对照组细胞凋亡率差异无显著性( $P > 0.05$ ); 但高糖组与 PMA 组 hUVEC 细胞凋亡率明显增加, G1 峰前可见明显的亚二倍体峰(sub-G1), 对照组、高糖组和 PMA 组细胞凋亡率分别为 5.15%、16.80% 和 38.70%, 组间比较差异有显著性( $P < 0.05$ ); PKC 阻断剂 GF109203X 组与 p38MAPK 阻断剂 SB203580 组预处理后均较未处理的高糖组

及 PMA 组 hUVEC 细胞凋亡明显减低, 其细胞凋亡率分别由 16.80% 下降至 10.30%、8.73% 以及由 38.7% 下降至 17.0%、15.1%, 其相应比较差异有显著性( $P < 0.05$ ) (图 2)。

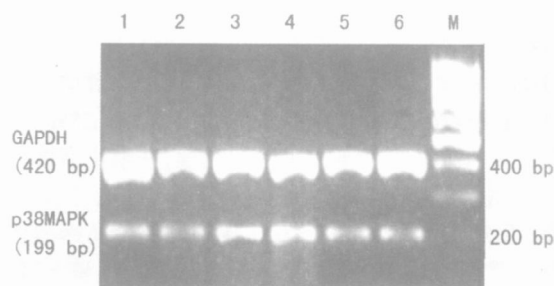


图 1. 逆转录聚合酶链反应检测各组 p38 丝裂素活化蛋白激酶 mRNA 的表达 M 为 Marker, 1 为二甲基亚砷组, 2 为对照组, 3 为高糖组, 4 为 PMA 组, 5 为 GF109203X 组, 6 为 SB203580 组。

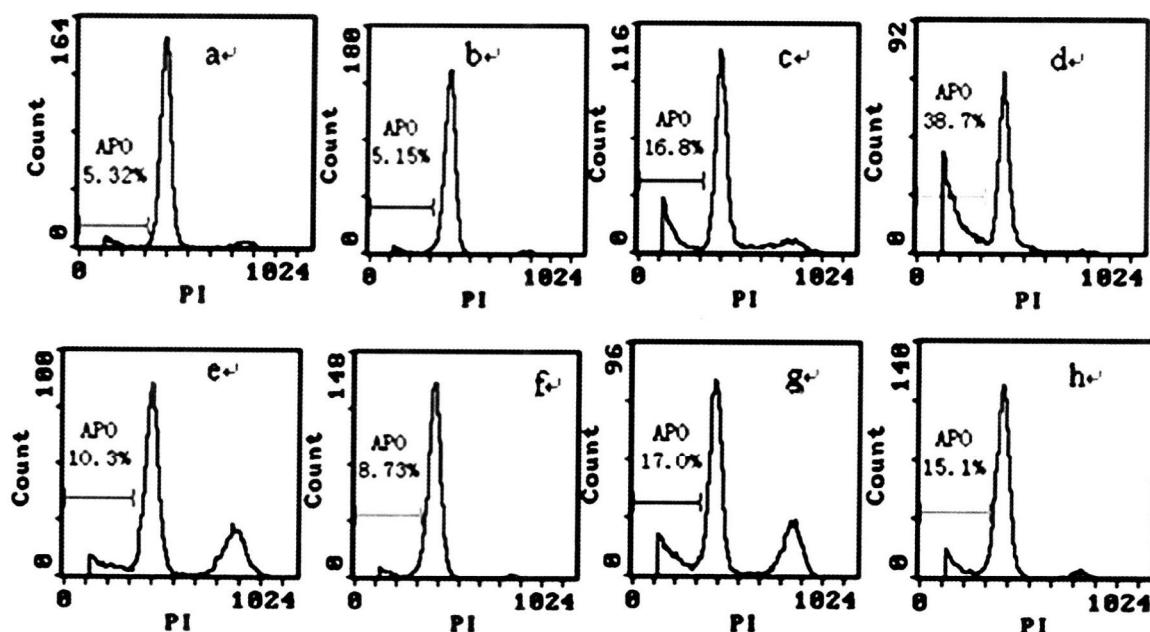


图 2. 各组人脐静脉内皮细胞凋亡的比较(流式细胞仪, PI 法) a 为二甲基亚砷组, b 为对照组, c 为高糖组, d 为 GF109203X 组, e 为 SB203580 组, f 为 PMA 组, g 为 GF109203X+ PMA 组, h 为 SB203580+ PMA 组。

## 3 讨论

研究表明内皮功能受损可能是血管并发症的关键和启动因子, 高血糖作用则被认为是引起血管内皮细胞功能紊乱的主要原因之一, 高血糖促使血管内皮细胞功能异常, 并可诱导内皮细胞凋亡。过去

对高糖诱导的二酰基甘油(DAG)-蛋白激酶 C(PKC)通路异常、蛋白质非酶糖基化及多元醇通路异常等途径引起的血管内皮细胞功能紊乱研究较多。随着分子生物学技术的发展, 有关细胞内信息传递系统的研究成为最活跃的领域之一, p38 MAPK 是细胞信

息传递的交汇点。在高糖、血管活性物质和细胞因子作用下 p38MAPK 激活引起的细胞生长、增殖、分化及凋亡,可能是糖尿病血管并发症发生、发展的共同通路<sup>[2,3]</sup>。

已有资料显示 p38MAPK 通路与糖尿病血管并发症的发生发展密切相关。本研究发现,对于 hUVEC 细胞,高糖与 PKC 激动剂 PMA 使磷酸化 p38MAPK 蛋白和 p38MAPK mRNA 表达量增加, hUVEC 的细胞凋亡率均升高;同时我们发现 p38MAPK 抑制剂 SB203580 能部分抑制此过程,并阻止高糖和 PMA 诱导的 hUVEC 细胞凋亡加速。这与李艳波等<sup>[4]</sup>发现在体外培养的 ECV304 细胞随着高糖的作用浓度及作用时间的延长(72 h 内)磷酸化 p38MAPK 蛋白含量表达增加相一致。

高糖使血管内皮细胞功能紊乱有众多途径,其中高糖诱导的二酰基甘油(DAG)-蛋白激酶 C(PKC)通路异常占有重要的位置。蛋白激酶 C(PKC)是一类钙离子—磷脂依赖性的蛋白激酶,是一种重要的第二信使,可将胞外信息传递到细胞内,催化多种蛋白质上的丝氨酸/苏氨酸磷酸化,调节细胞的生长发育、收缩、分泌、传导、通透性、细胞外基质增殖、凋亡及基因表达<sup>[5]</sup>。随着细胞内信息传递系统的研究以及对第二信使 PKC 和细胞内信号通路之间关系的研究,有研究者提出如下的通路:外界刺激作用细胞, DAG-PKC 通路激活, PKC 从胞浆中转位于胞膜上,成为有活性的 PKC,激活的 PKC 作用于 MAPK 三级级联,激活 MAPK,激活的 MAPK 部分转位于胞核内影响基因的转录和蛋白表达,部分仍留于胞浆中磷酸化其底物,影响细胞功能。刘小鹏等<sup>[6]</sup>发现高糖能激活 PKC 通路,进而引起脐静脉内皮生长因子基因表达增高。Igarashi 等<sup>[7]</sup>用高糖培养鼠主动脉平

滑肌细胞发现,中等程度高糖激活 p38MAPK 是 PKC $\delta$  依赖途径,也印证高糖激活 p38MAPK 是 PKC 依赖途径。本研究用 PKC 激动剂 PMA 与 PKC 抑制剂 GF109203X 激活或抑制 DAG-PKC 通路后观察到: PMA 能使磷酸化 p38MAPK 蛋白和 p38MAPK mRNA 表达量增加, hUVEC 的细胞凋亡率均升高;而 GF109203X 却能部分抑制此过程,从而也印证高糖激活 p38MAPK 是 PKC 依赖途径。虽然已有资料显示高糖损伤血管内皮细胞,主要是激活 PKC $\beta$ ,但在高糖损伤血管内皮细胞时 p38MAPK 信号通路激活是否为 PKC $\beta$  依赖途径,可在实验中使用特异抑制剂 LY333531 等方法,以期进一步研究。因此对细胞内信息传递系统的更进一步研究,将促进对糖尿病血管并发症发病机制的进一步认识,为防治糖尿病血管并发症提供新的思路 and 手段。

#### [参考文献]

- [1] Jaffe EA, Ralph L, Nachman, Carl G, Becker, Richard MC. Culture of human endothelial cell derived from umbilical veins: Identification by morphologic and immunologic criteria[J]. *J Clin Invest*, 1973, **52**: 2 745-756
- [2] Rama N, Stephen S, Wei B, Kiran KVY, Jerry N. Angioten II signaling in vascular smooth muscle cell under high glucose conditions[J]. *Hypertension*, 1999, **33**: 378-384
- [3] Garrington TP, Johnson GL. Organization and regulation of mitogen activated protein kinase signaling pathway[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, **11**: 211-218
- [4] 李艳波, 邓华聪, 韩君勇, 李呼伦. 高糖刺激人脐静脉内皮细胞丝裂素活化蛋白激酶 P38 的表达[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2002, **36**: 433-435
- [5] Liu WS, Heckman CA. The sevenfold way of PKC regulation[J]. *Cell Signal*, 1998, **10**: 529-542
- [6] 刘小鹏, 罗春英, 曹仁贤, 刘江华, 文芳, 李云, 等. 高糖作用下脐静脉内皮细胞中血管内皮生长因子基因表达与蛋白激酶 C 通路的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, **14** (1): 17-20
- [7] Igarashi M, Wakasaki H, Takahara N, Ishii H, Jiang ZY, Yamauchi T, et al. Glucose or diabetes activates p38 mitogen activated protein kinase via different pathways[J]. *J Clin Invest*, 1999, **103**: 185-195

(此文编辑 朱雯霞)