

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號： NSC89-2314-B-002-515

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：朱宗信 執行機構及單位名稱：台大醫學院內科
(一般醫學科)

一、中文摘要

腎小管上皮細胞在某些生理刺激或病態狀況下會快速增生肥大，如糖尿病或腎實質喪失可導致腎小管上皮細胞增生及肥大。目前認為腎臟病的持續惡化和腎小管及間質的構造異常有密切相關。影響腎臟生長的因子有多種，如上皮生長因子、第二型血管張力素、內皮素等。調節細胞生長所經的訊息傳遞乃生長因子與其受器接合，經由次級傳訊者及蛋白質激酶等如 MAP 激酶影響立即早期基因 (c-fos, c-jun 等)，在調節基因的表現。本計劃的研究目的為在近端腎小管細胞給予內皮素探討其對立即早期基因、MAP 激酶等訊息傳遞機制的的作用。

我們的方法是以負鼠腎 (OKP) 細胞為研究模式。以北方轉漬法測定 c-jun 立即早期基因的表現，觀察內皮素的作用。並以北方轉漬法來探究內皮素對 MAP 激酶及其相關訊息傳遞機制的的作用。

結果顯示 10nM 內皮素可增加 OKP 細胞 c-jun mRNA 表現量 10 倍，此作用於 30 分鐘達到最高點。此作用可被 ET_B 選擇性拮抗劑 BQ 788 所阻斷。內皮素可增加 OKP 細胞 p44/42 MAPK 活性，此作用於 10 分鐘達到最高點。此作用可被 BQ 788 及 MEK 阻斷劑 PD 98059 所阻斷。內皮素並不會活化 OKP 細胞 p38 MAPK。

結論是內皮素可活化腎小管細胞 p44/42 MAPK 及 c-jun 立即早期基因。內皮素導致腎小管細胞增生可能和上述機制相關。

關鍵詞：腎小管、增生、內皮素、立即早期基因、MAP 激酶

Abstract:

Renal epithelial cells are capable of rapid growth periods, involving both hyperplasia and hypertrophy, in response to physiological signals or pathological processes. Renal tubuloepithelial cell growths are associated with a mixed hypertrophy and hyperplasia in diabetes mellitus and compensatory renal growth. There is a close association between the progression of chronic renal disease and structural

derangements of the tubuloepithelial compartment. Renal growth factors include epidermal growth factor, angiotensin II, endothelin, etc. The signal transduction pathways involving in renal growth regulation are described as following. The growth factors bind to their receptors, activate second messengers or protein kinases such as MAP kinases, modulate immediate early genes (c-fos, c-jun) expression, regulate other gene expression. The purpose of this project is to study the effect of endothelin on immediate early gene and MAP kinase in OKP cells.

We used OKP cell as the experimental model. The immediate early gene (c-jun) expression was assayed by northern blot. The MAP kinases activity was assayed by western blot.

Ten nM et-1 induced a ten-fold increase of c-jun mRNA abundance in OKP-ET_B6 cells; and the maximal stimulation occurred at 30 minutes. This stimulatory effect was blocked by an ET_B-selective antagonist BQ 788; but not by an ET_A-selective antagonist BQ 123, a tyrosine kinase inhibitor herbimycin A, and an intracellular calcium chelator BAPTA. ET-1 also induced a eight-fold increase of p44/42 MAP kinase activity in these cells; and the maximal stimulation occurred at 10 min. This stimulatory effect was blocked by BQ 788 and a MEK inhibitor PD 98059. the activity of p38 MAP kinase was not enhanced by ET-1 in this cells.

Keywords : renal tubule , endothelin , immediate early gene , MAP kinase

二、緣由與目的

細胞正常生長有二種型式，一種是增生，即細胞數目增加；而另一種是肥大，即細胞變大。腎臟上皮細胞在正常情況下以非常慢的速率分裂增生，但在某些生理刺激或病理狀況下，也會快速生長，包括增生及肥大[1]。急性腎小球壞死恢復期可見腎小管上皮細胞分裂增生[2]。糖尿病或腎實質喪失可導致腎小管上皮細胞增生及肥大[3,4]。腎臟病持續進行和腎小管及間質的構造異常有密切相關[5]。

影響腎臟的生長因子有多種，如上皮生長因子、由血小板來生長因子(PDGF)、變形生長因子、胰島素、類胰島素生長因子、肝細胞生長因子、第二型血管張力素、內皮素等[1,3]。調節細胞生長所經的訊息傳遞機制一般認為是生長因子或激素與其受器接合，經由酪胺酸激酶或 G 蛋白質，改變 cAMP, IP₃, 胞內鈣等次級傳訊者，再經由蛋白質激酶 A、C 或 CaMK 影響立即早期基因(c-fos, c-jun 等)而調節基因的表現[1,6]。立即早期基因中 c-fos, c-jun 其蛋白質為轉錄調節因子。c-fos 基因表現的 mRNA 為 2.2kb，其前之 promotor 受 cAMP 及蛋白質激酶 C 的調節，c-fos 蛋白質與 c-jun 蛋白質二個形成複合體，經由 leucine-zipper 機轉調節其它基因表現而調控生長[7-9]。

近幾年來研究發現細胞生長調節所經的訊息傳遞機制除了上述之外還有一個很重要的系統，即 mitogen-activated protein (MAP) kinases [10,11]。事實上 MAP kinase 為一大類，包括 extracellular signal-regulated kinase (ERK)，c-jun kinase/stress activated protein kinase (JNK/SAPK)，p38 MAP kinase [10,11]。以 ERK1/2 為例說明，一般來講，表皮生長因子等活化受器酪胺酸激酶，活化 RAS，活化 Raf，再活化 MAP kinase kinase (MEK)，再活化 ERK 1/2，而進入細胞核內活化 Elk-1 等轉錄調節因子[10,11]。

在腎小球膈(mesangial)細胞，內皮素可刺激 phospholipase C，c-fos gene 表現，MAP kinase 活性及細胞分裂增生[15-18]。內皮素轉植鼠表現腎絲球硬化及腎間質纖維化[19]。吾人之前的研究發現內皮素可造成腎小管細胞增生[20]；內皮素亦可活化腎小管細胞的酪胺酸激酶[21]。因此吾人想進一步探討前述調節細胞增生的機制在內皮素對腎小管細胞增生作用中是否扮演重要的角色。

本計劃的研究目的，是討論在近端腎小管細胞給予內皮素對立即早期基因，MAP kinase 等傳遞機制的的作用。

三、 材料與方法

細胞培養

由 Dr. Alpern 的實驗室取得負鼠腎細胞(OKP cells)，使用含高葡萄糖(450mg/dL)，10%胎牛血清(fetal bovine serum)，100U/ml penicillin，100mg/ml streptomycin 的 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)培養液，置於 37°C，含 5% CO₂ 之潮化空氣的培養櫃培養。細胞的繼代遷植(passage)按一般方法實行之。要作實驗時，改用低葡萄糖培養液，細胞長至將滿後換成不含胎牛血清培養液 24 小時再作實驗。

立即早期基因(c-jun)表現之測定

利用北方轉漬法來測定 c-jun 基因的表現。從內含 c-jun cDNA 質體的細菌大量製備質體，再用試管內轉錄方法作成 c-jun 的 RNA 探針。細胞加入不同濃度的內皮素後，以 guanidinium thiocyanate/苯酚/氯仿方法分離其 RNA，電泳於甲醛變性處理之瓊脂糖膠，再將膠轉移至尼龍膜，再與 RNA 探針雜合。探針的偵測是利用免疫性生光反應方法，使用抗 digoxigenin 之抗體結合鹼性磷酸酵素及 CSPD，以 X 光片記錄探針之訊號。

西方轉漬法(Western Blotting)

細胞於培養皿長滿後，換成不含血清之培養液 24 小時，用 PBS 清洗 3 次，以 RIPA 緩衝液(內含 NaCl 150mM，Tris HCl [pH7.4] 50 mM，EDTA 2.5mM，EGTA 5 mM，b-glycerophosphate 50 mM，NaF 50 mM，Na orthovanadate 1 mM，phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF] 1 mM，dithiothreitol 0.5mM，Triton X-100 1%，

Na deoxycholate 1%, SDS 0.1%, pepstatin 2 mg/ml, leupeptin 5 mg/ml, aprotinin 5 mg/ml) 將細胞刮下, 置於 4°C 45 分, 以 10,000 g 離心 15 分, 取上清液以 RIPA 緩衝液稀釋為 3 mg protein/ml (Bradford, 1976)。再以 2X SDS loading buffer (內含 5mM TrisHCl [pH6.8], 1% SDS, 10% glycerol, 1% 2-mercaptoethanol) 稀釋, 以 7.5% 膠作 SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)。再將膠所含的蛋白質用 electrotransfer 於 4°C 轉移至 nitrocellulose 膜。先用內含 5% 脫脂奶粉及 0.05% Tween 20 的 PBS 來 blocking 膜 1 小時。再來以同樣溶液加入 anti-ERK, anti-phospho-ERK, anti-p38 MAPK, anti-phosphop38 MAPK, anti-MEK, anti-phospho MEK 等各種抗體和膜作用 1 小時。再用含 0.1% Tween 20 的 PBS 清洗膜 15 分 1 次, 5 分 2 次。再以含 1/5000 稀釋 horseradish peroxidase-labeled sheep anti-rabbit IgG, 5% 脫脂奶粉, 0.05% Tween 20 的 PBS 與膜作用一小時。再依前述的方法清洗之。然後再作 enhanced chemiluminescence (ECL), 所用的 ECL kit 為 Amersham 出品。各種操作時, 加入的內皮素為各種濃度及各個時程。此外我們亦測試內皮素受器拮抗劑 BQ788 (ET_B 特定性), BQ 123 (ET_A 特定性) 及 MEK 抑制劑 PD 98059 的作用。

四、結果與討論

內皮素可增加 OKP 細胞 c-jun mRNA 表現量, 由劑量反應 (圖 1) 可見在 10nM 為作用最高點; 而時程反應 (圖 2) 可見在 15 時已有明顯增加, 在 30 分鐘到達最高點。內皮素增加 c-jun 的作用可被 ET_B 選擇性拮抗劑 BQ 788 所阻斷 (圖 3), 但不被 ET_A 選擇性拮抗劑、酪胺酸激酶抑制劑、胞內鈣離子結合劑等所阻斷。

內皮素增加 OKP 細胞 p44/42 MAPK 活性量, 由劑量反應 (圖 4) 可見在 10nM 為作用最高點; 而時程反應 (圖 5) 以 10 分鐘為最高點。內皮素活化 MAPK 的作用可被 BQ 788 所阻斷 (圖 6), 但不被 ET_A 選擇性拮抗劑 BQ 123 所阻斷。MAPK 的上游訊息傳遞機制是 MEK, 而 PD 98059 是 MEK 的抑制劑。內皮素活化 MAPK 的作用可被 PD 98059 所阻斷 (圖 7)。內皮素並不會活化 p38 MAPK。內皮素可活化 MEK, 其時程反應 (圖 8) 顯示在 5 分鐘時達到最高點。

由以上的結果, 尤其是時序性反應, 如內皮素增加 c-jun 的最高點在 30 分鐘; 活化 MAPK 的最高點在 10 分; 活化 MEK 的最高點在 5 分, 由此更可驗證訊息傳遞中各項機制, 何者為前而何者在後。此外在經由各項拮抗劑的作用可知哪一個訊息傳遞機智是否在另一個機制之前。進一步的研究應探討內皮素對 MAPK 下游的各項訊息傳遞如 Elk 1 等; 也想進一步研究內皮素使腎小管細胞增生的作用能否被 MEK 抑制劑所阻斷。

結論是在近端腎小管細胞, 內皮素經由 ET_B 受器, raf-1, MEK, MAPK, 立即早期基因 (c-jun) 而調節細胞增生。

五、参考文献

1. Preisig PA, Franch HA : Renal epithelial hyperplasia and hypertrophy. *Semin Nephrol* 1995; 15:327-340.
2. Toback FG : Regeneration after acute tubular necrosis. *Kidney Int* 1992; 41:226-246.
3. Wolf G : Cellular mechanisms of tubule hypertrophy and hyperplasia in renal injury. *Miner Electrolyte Metab* 1995; 21:303-316
4. Norman JT, Fine LG : Renal growth and hypertrophy, in Massry SG, Glassock RJ(eds) : *Textbook of Nephrology*. Baltimore, MD, Williams & Wilkins. 1995;pp 146-158.
5. Nath KA : Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am J Kid Dis* 1992; 20:1-17.
6. Wolf G, Neilson EG : Molecular mechanisms of tubulointerstitial hypertrophy and hyperplasia. *Kidney Int* 1991;39:401-420.
7. Curran T, Gordon MB, Rubino KL, Sambucetti LC : Isolation and characterization of the c-fos(rat) cDNA and analysis of post-translational modification in vitro. *Oncogene* 1987;2:79-84.
8. Ryder K, Nathans D : Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988;85:8464-8467.
9. Angel P, Karin M : The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991;1072:129-157.
10. Seger R, Krebs EG : The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 1995;9:726-735.
11. Treisman R : Regulation of transcription by MAP kinase cascades, *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:205-215.
12. Simonson MS, Wann S, Mene P, Dubyak GR, Kester M, Nakazato Y, Sedor JR, Dunn MJ : Endothelin stimulates phospholipase C, Na⁺/H⁺ exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest* 1989;83:708-712.
13. Herman WH, Simonson MS : Nuclear signaling by endothelin-1. *J Biol Chem* 1995;270:11654-11661.
14. Marsen TA, Schramek H, Dunn MJ : Renal action of endothelin: Linking cellular signaling pathways to kidney disease. *Kidney Int* 1994;45:336-344.
15. Wang Y, Pouyssegur J, Dunn MJ : Endothelin stimulates mitogen-activated protein kinase activity in mesangial cells through ET_A. *J Am Soc Nephrol* 1994;5:1074-1080.

16. Hocher B, Thone-Reineke C, Rohmeiss P et al: Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulonephrosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest* 1997;99:1380-1389.
17. Chu TS, Cano A, Yanagisawa M, Alpern RJ, Preisig PA : TGF β and herbimycin A convert endothelin-1-induced hyperplasia into hypertrophy in renal tubuloepithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 1995;6:765.
18. Chu TS, Tsuganezawa H, Peng Y, Cano A, Yanagisawa M, Alpern RJ : Role of tyrosine kinase pathways in ET $_B$ receptor activation of NHE-3. *Am J. Physiol* 1996;271:C763-C771.



圖 1：內皮素增加 OKP 細胞 c-jun mRNA 表現：劑量反應

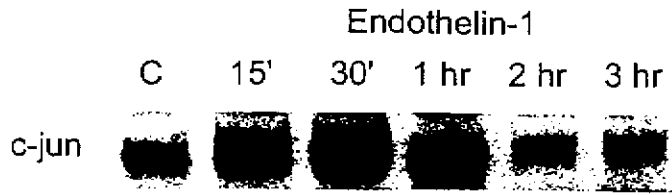


圖 2：內皮素增加 OKP 細胞 c-jun mRNA 表現：時程



圖 3：ET_B 受器拮抗劑可阻斷內皮素增加 c-jun 的作用



圖 4：內皮素活化 OKP 細胞 MAPK：劑量反應

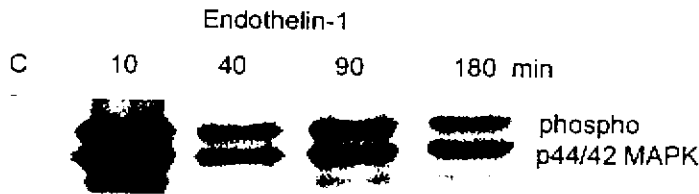


圖 5：內皮素活化 OKP 細胞 MAPK：時程

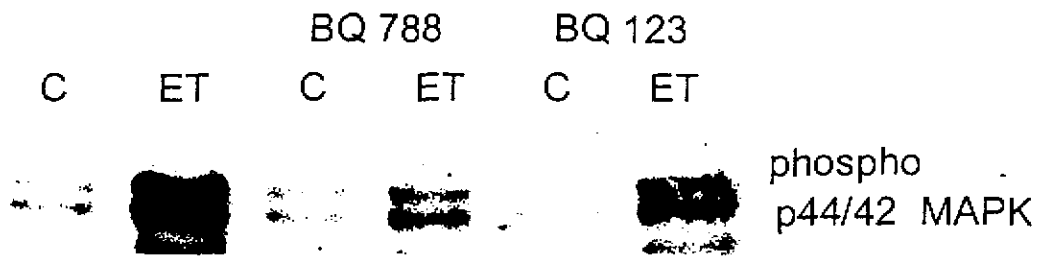


圖 6：BQ788 可阻斷內皮素活化 MAPK 的作用

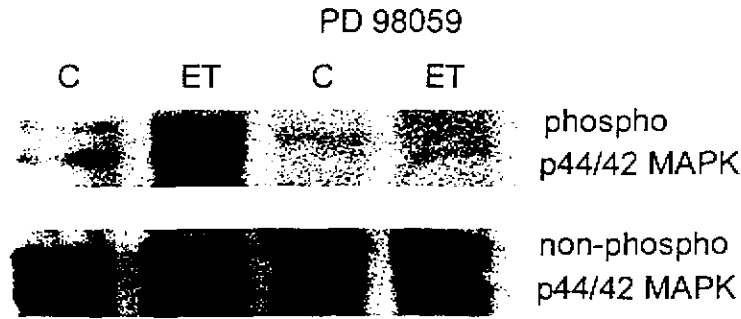


圖 7：MEK 抑制劑可阻斷內皮素活化 MAPK 的作用

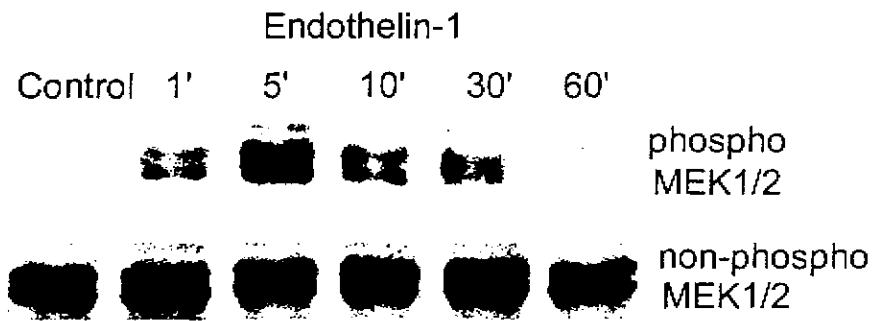


圖 8：內皮素活化 OKP 細胞 MEK：時程