

# IL-12、LPS 对肾小管上皮细胞中 lck/P<sub>38</sub> 信号传递的影响

李清刚, 李幼姬, 李志坚, 黄凌虹

(中山医科大学附属第一医院肾内科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨 IL-12、LPS 对肾小管上皮细胞中 lck 基因表达及活性改变的影响, 明确 lck/P<sub>38</sub> 信号传递途径在炎症过程的作用。【方法】用原位杂交、放射自显影分别检测 lck 基因表达及 lck 活性, 用免疫印迹法对肾小管上皮细胞在 IL-12、LPS 刺激下其 P<sub>38</sub> 磷酸化进行测定。【结果】肾小管上皮细胞经 IL-12、LPS 刺激后 lck mRNA 表达水平增高, lck 活性在刺激后 5 min 时最强, 加入 lck 抑制剂 PP<sub>1</sub>, IL-12 刺激 lck 活性明显减弱。IL-12 及 LPS 可以促进肾小管上皮细胞中 P<sub>38</sub> 活化、磷酸化, 在 15 min 时最强, 加入 lck 抑制剂后则抑制 IL-12 刺激时的 P<sub>38</sub> 磷酸化, 而 LPS 刺激组不明显。【结论】IL-12、LPS 可通过促进肾小管上皮细胞中 lck/P<sub>38</sub> 活化, 参与炎症过程。

关键词: 肾小管; 上皮细胞; 白细胞介素 12; 脂多糖类; 淋巴细胞特异蛋白质酪氨酸激酶 p56(LCK); P<sub>38</sub>

中图分类号: R 392.11 文献标识码: A 文献编号: 1000-257X(2000)03-0190-03

## Effect of IL-12 and LPS on lck/P<sub>38</sub> Signalling Pathways in Tubular Epithelium

LI Qing-gang, LI You-ji, LI Zhi-jian, HUANG Ling-hong

(Department of Nephrology, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:**【Objective】In order to investigate IL-12 and LPS on Lck gene expression and its activity in renal tubular epithelial cells (TEC) and clarify roles of IL-12 and P<sub>38</sub> signalling pathways involved in inflammation.【Methods】mRNA expression of lck and lck activity were determined by in situ hybridization and autoradiography respectively. P<sub>38</sub> phosphorylation upon IL-12 and LPS stimulations was detected by Western blot analysis.【Results】Increased mRNA expression of lck was observed after stimulation of TEC with IL-12 and LPS. The maximal effect on lck activity was present at 5 min after stimulation and the activity of lck was markedly decreased upon IL-12 treatment in the presence of lck selective inhibitor PP<sub>1</sub>. Moreover, IL-12 and LPS may induce the phosphorylation of P<sub>38</sub> in TEC, maximal phosphorylation occurred at 15 min after stimulation. In addition, PP<sub>1</sub> inhibited the phosphorylation of P<sub>38</sub> induced by IL-12.【Conclusion】IL-12 and LPS are involved in inflammation via the activation of lck/P<sub>38</sub> in TEC.

**Key words:** kidney tubules; epithelial cells; interleukin-12; lipopolysaccharide receptors; lymphocyte specific protein tyrosine kinase p56(LCK); P<sub>38</sub>

最近报道狼疮肾炎肾小管上皮细胞异常合成白细胞介素 12(IL-12)<sup>[1]</sup>, 它与肾间质病理改变密切相关, 但对它发挥生物学作用的细胞内信号传递机制尚不清楚。目前发现 IL-12 在 T 淋巴细胞可以促进 lck 表达及活化, 而 lck 又可调节 P<sub>38</sub> 活化, 发挥生物学作用<sup>[2]</sup>。本实验目的是探讨肾小管上皮细胞是否存在 lck 及 IL-12、LPS 对肾小管上皮细胞作

用时 lck/P<sub>38</sub> 信号传递途径的变化, 寻找它们对肾小管上皮细胞作用的内在机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞来源

取 BALB/C 小鼠, 雌性, 5~6 周, 参照文献[3]分离培养肾小管上皮细胞, 经形态学及酶学鉴定,

收稿日期: 2000-01-04

基金项目: 卫生部基金资助课题(94-1-105)

作者简介: 李清刚(1970-), 男, 山东临沂人, 在职博士生。

取2~3代细胞进行实验。

## 1.2 方法

1.2.1 试剂 单抗(Neomarkers公司,英国), P<sub>38</sub>试剂盒(Newlab,英国); IL-12(Propo Tech,美国), LPS(军事医学科学院); Ick 探针参照基因库(Gene Bank U19834)由上海生物工程研究所合成, 3'末端标记检测试剂盒(Roche,德国)地高辛原位杂交试剂盒(博士德公司,武汉);  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP 由北京原子能研究所提供。

1.2.2 肾小管上皮细胞中 Ick mRNA 检测 肾小管上皮细胞分别经 IL-12、LPS 刺激培养 16 h, 用原位杂交方法检测 Ick 基因表达。

1.2.3 肾小管上皮细胞中 Ick 活性检测 肾小管上皮细胞分别经 IL-12、LPS、IL-12+PP<sub>1</sub> 和 LPS+PP<sub>1</sub> 刺激 5 min、30 min, 并设空白对照, 然后提取蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳后放射自显影(-20 °C暗盒中曝光 24 h)检测其活性。

1.2.4 肾小管上皮细胞中 P<sub>38</sub> 磷酸化检测 设 LPS、IL-12、IL-12+PP<sub>1</sub> 和 IL-12+SB203580 刺激 15 min, 并设空白对照组, 用 2×SDS 加样缓冲液提取蛋白, SDS-PAGE 电转后免疫化学发光检测其蛋白磷酸化。

## 1.3 资料分析处理

在 200 倍视野下随机选取 10 个细胞, 用 Kontron IBAS2.0 全自动图象分析系统测定细胞内杂交产物的平均吸光值, 在 IBM PC/XT486 计算机 SAS 软件中进行 *t* 检验统计处理。

## 2 结果

如图 1A、B, 肾小管上皮细胞经 IL-12 和 LPS 分别刺激培养 16 h 后进行 Ick 原位杂交, 在肾小管上皮细胞胞膜可见深棕色的致密颗粒, IL-12 和 LPS 组较正常对照组增加, LPS 组最明显。细胞内杂交产物的平均 *A* 值, IL-12 (0.293 ± 0.026) 和 LPS (0.364 ± 0.012) 组均显著高于对照组 (0.267 ± 0.021), *P* < 0.05 或 < 0.01。而 Ick 活性在肾小管上皮细胞经 IL-12、LPS 刺激后, 5 min 时最强, 30 min 时开始强度减弱, 对照组则未发生磷酸化; 而加入 Ick 抑制剂 PP<sub>1</sub> 后, IL-12 或 LPS 刺激 Ick 活性的作用均明显受抑制(见图 2, 参照 Hanke 方法[4])。

肾小管上皮细胞经 IL-12 或 LPS 刺激后均可发生 P<sub>38</sub> 磷酸化, 后者作用较强, 而加入 PP<sub>1</sub> 或 SB203580 后, 除 LPS+PP<sub>1</sub> 组仍有 P<sub>38</sub> 磷酸化外, 其余均未

发生磷酸化(见图 3, 按照 Trevillyan 方法<sup>[4]</sup>)。

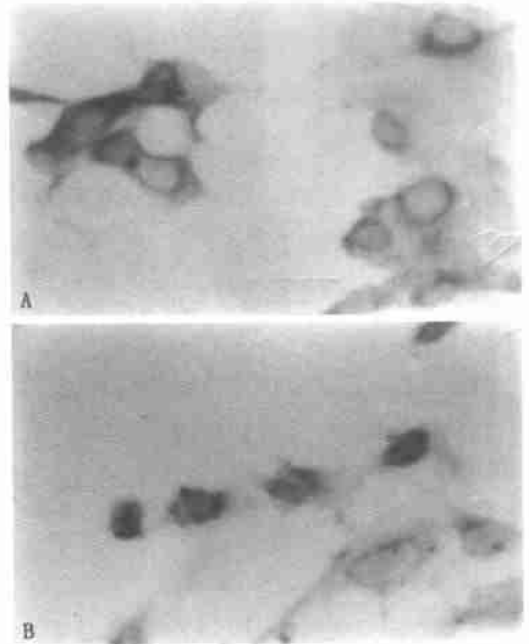


图 1 肾小管上皮细胞 Ick mRNA 表达

Fig. 1 mRNA expression of Ick in renal epithelial cells (In situ hybridization × 400)

A: IL-12; B: LPS; The positive brown particles were found in the cellular membrane

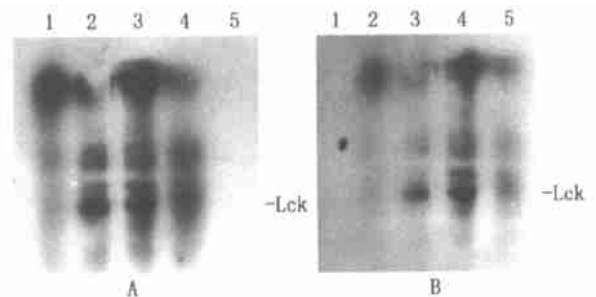


图 2 IL-12、LPS 分别刺激肾小管上皮细胞时 Ick 活性

Fig. 2 Ick activity in TEC stimulated with IL-12 and LPS, respectively (Radiography)

A: 5 min; B: 30 min; 1. Blank, 2. LPS, 3. IL-12, 4. IL-12+PP<sub>1</sub>, 5. LPS+PP<sub>1</sub>; The lanes marked 56 ku of 2, 3 were the most obvious in A, B graphs

## 3 讨论

肾小管上皮细胞的异常抗原递呈及炎症因子的自分泌、旁分泌是多种小管间质病理改变的重要环节。许多研究证实肾小管上皮细胞具有抗原递呈功能, 可表达 HLA I、II 类抗原, 合成补体 C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>, 分泌 IL-1、IL-6、IL-8、IL-12 等多种细胞因子, 参

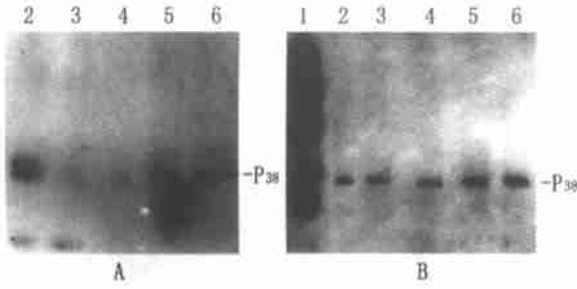


图3 IL-12、LPS 分别刺激肾小管上皮细胞 15 min 的 P<sub>38</sub>磷酸化

Fig. 3 Phosphorylation of P<sub>38</sub> in TEC was stimulated for 15 min with IL-12 or LPS (Westers blot)

A: Phosphorylation of P<sub>38</sub>; B: Nonphosphorylation of P<sub>38</sub>. 1. Marker; 2. IL-12; 3. Blank; 4. LPS+SB203580; 5. IL-12+PP<sub>1</sub>; 6. LPS+PP<sub>1</sub>

与小管炎症过程,然而这些细胞因子影响肾小管上皮细胞生物学活性的细胞内信号传递途径至今尚未完全明确。

在酪氨酸激酶家族中, lck 是非受体蛋白酪氨酸激酶丝氨酸家族成员之一, lck 主要存在于 T 和 NK 细胞。其对 T 细胞抗原——受体信号传递途径很重要<sup>[3]</sup>。Claudio 等发现 IL-12 可促进 Jurkat3 细胞的 lck 表达及发生活化,近期还发现 lck 并非限于淋巴细胞,在乳腺上皮细胞中亦存在<sup>[6]</sup>。我们的研究发现肾小管上皮细胞中存在 lck 基因表达,并且经 IL-12 和 LPS 刺激后 lck 激酶可被激活,应用 lck 抑制剂封闭其酶活性位点后,IL-12 和 LPS 不能激活 lck,与国外报道相一致<sup>[5]</sup>。这提示 IL-12 和 LPS 可作用于 lck 的某些位点而激活 lck,发挥其生物学作用。

P<sub>38</sub>是一种分裂原蛋白激酶(MAPK),有学者发现抑制 lck 活性会抑制 P<sub>38</sub>激酶<sup>[5]</sup>。我们在实验中亦证实应用 lck 抑制剂后,IL-12 刺激的 P<sub>38</sub>磷酸化明显受抑制,而 LPS 则仍使 P<sub>38</sub>磷酸化。这提示 IL-12 对 P<sub>38</sub>的磷酸化是唯一通过 lck 激活后实现的, lck 激活促使 P<sub>38</sub>磷酸化,而 LPS 可能还通过除 lck 外的途径活化 P<sub>38</sub>。应用 SB203580 直接抑制了 P<sub>38</sub>磷酸化,使 P<sub>38</sub>不能作用于下游信号传导分子,这与 Trevillyan 等<sup>[9]</sup>的报道结论是一致的。现在研究发现, P<sub>38</sub>的激活可磷酸化多种转录因子,如活化转录

因子 ELK(丝氨酸<sup>383/389</sup>),使其和血清反应元件 SRE 结合;它也能活化转录因子 ATF2(丝氨酸<sup>89/171</sup>),介导 ATF2 和 cAMP 反应元件(CRE)的结合;它还能磷酸化转录因子 Max(丝氨酸<sup>82</sup>),致使 Max 和 myc 转录因子形成复合物,从而发挥多种生物学作用。

我们的实验发现, IL-12、LPS 可以通过激活 lck 诱使 P<sub>38</sub>磷酸化,亦证实了在肾小管上皮细胞, IL-12 作用时 P<sub>38</sub>活化可受 lck 调节,而 LPS 亦可通过 lck 途经激活 P<sub>38</sub>,发挥 P<sub>38</sub>的多种信号传递作用。

#### 参考文献

- [1] Fan X, Oertli B, Wuthich R P, *et al*. Up-regulation of tubular epithelial interleukin-12 in autoimmune MRL-Fas (lpr) mice with renal injury[J]. *Kidney Int*, 1997, 51(1): 79.
- [2] Konakova M, Huch O F, Schceuing. Downstream targets of urokinase-type plasminogen-activator-mediated signal transduction[J]. *Eur J Biochem*, 1998, 253(2): 2421.
- [3] Detisac C J, sews M A, Garvin A J, *et al*. Tissue culture of human kidney epithelial cells of proximal tubule origin[J]. *Kidney Int*, 1984, 25(2): 383.
- [4] Hanke J H, Gander J L, Dow R L, *et al*. Discovery of a novel potent, and src family-selective tyrosine kinase inhibitor: study of lck- and fyn-T-dependent T cell activation[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(2): 695.
- [5] Trevillyan J M, Chiou X G, Ballaron S J, *et al*. Inhibition of p56 (lck) tyrosine kinase by isothiazolones[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 364(1): 19.
- [6] Gemitsma J S J, Hiemstra P S, Geritsen A F, *et al*. IL-8 by human proximal tubular epithelial cells in vitro[J]. *Clin Exp Immunol*, 1996, 103(2): 289.
- [7] Gemitsma J S, Geritsen A F, Van kooten C, *et al*. Interleukin-1a enhances the biosynthesis of complement C3 and factor B by human proximal tubular epithelial cells in vitro [J]. *Mol Immunol*, 1996, 33[10]: 847.
- [8] Gemitsma J S J, Geritsen A F, Deley M, *et al*. Interferon-γ induces biosynthesis of complement C2, C4 and factor H by human proximal tubular epithelial cells[J]. *Cytokine*, 1997, 9(4): 275.
- [9] Amundatottir L T, Leder P. Signal transduction pathways activated and required for mammary carcinogenesis in response to specific oncogenes[J]. *Oncogene*, 1998, 16(6): 737.

(编辑 黄小延)