

· 基础研究 ·

青藤碱对 PKC- α /NF- κ B-p65 通路的抑制作用及机制

王文博¹, 罗 灿¹, 吴志皎¹, 彭明玉¹, 何庆玲¹, 王迎伟¹, 季明德^{2*}, 邱 文^{1*}

¹南京医科大学免疫学系, 江苏 南京 211166; ²江苏省中医院检验科, 江苏 南京 210006

[摘要] 目的:探讨过表达蛋白激酶 C- α (protein kinase C- α , PKC- α) 对 HEK-293T 细胞中核因子- κ B-p65 (nuclear factor- κ B-p65, NF- κ B-p65) 磷酸化水平的影响,并检查青藤碱 (sinomenine, SIN) 对 PKC- α /NF- κ B-p65 信号通路的抑制作用。方法:采用 PCR 技术扩增大鼠 PKC- α 基因蛋白质编码区 (complete sequence coding, CDS) 序列,将其插入到 pIRES2-EGFP 空载质粒中,构建野生型 (wide type, WT) PKC- α 过表达质粒 (pIRES2-PKC- α -WT, PKC- α^{WT});在 PKC- α^{WT} 质粒的基础上,将 PKC- α 第 25 位丙氨酸 (A) 与 368 位赖氨酸 (K) 分别突变为谷氨酸 (E) 和精氨酸 (R),即构建持续活化 (constitutively active, CA) 突变型 PKC- α 过表达质粒 (pIRES2-PKC- α -A25E, PKC- α^{CA}) 和显性负性 (dominant negative, DN) 突变型 PKC- α 过表达质粒 (pIRES2-PKC- α -K368R, PKC- α^{DN})。本课题组前期构建的大鼠野生型 NF- κ B-p65 过表达质粒 (pIRES2-NF- κ B-p65, p65^{WT}) 分别与上述各 PKC- α 过表达质粒共同转染 HEK-293T 细胞,免疫印迹法检测 PKC- α 、NF- κ B-p65 的表达及磷酸化水平。再将上述不同质粒转染 HEK-293T 细胞,46 h 后予 50 ng/mL SIN 处理细胞 2 h,再行免疫印迹实验分析 SIN 对 PKC- α 、NF- κ B-p65 磷酸化的影响。结果:菌液 PCR 及测序证实,上述 PKC- α 过表达质粒构建成功。在 HEK-293T 中过表达 PKC- α^{WT} 或 PKC- α^{CA} 可促进 NF- κ B-p65 的磷酸化,且过表达 PKC- α^{CA} 时尤为显著,而过表达 PKC- α^{DN} 后 NF- κ B-p65 的磷酸化无明显变化。SIN 处理可抑制 PKC- α^{WT} 、PKC- α^{CA} 和 PKC- α^{DN} 转染组 HEK-293T 细胞中 PKC- α 的磷酸化,同时也能抑制过表达 PKC- α^{WT} 上调的 NF- κ B-p65 磷酸化修饰,但不影响过表达 PKC- α^{CA} 和 PKC- α^{DN} 对 NF- κ B-p65 的磷酸化作用。结论:过表达 PKC- α 可促进 HEK-293T 细胞中 NF- κ B-p65 的磷酸化,SIN 处理 HEK-293T 细胞后可通过抑制 PKC- α 的磷酸化下调 NF- κ B-p65 的磷酸化修饰。

[关键词] 蛋白激酶 C- α ;核因子- κ B-p65;青藤碱

[中图分类号] R393

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2020)11-1583-08

doi:10.7655/NYDXBNS20201103

Inhibitory effects and mechanisms of sinomenine on PKC- α /NF- κ B-p65 pathway

WANG Wenbo¹, LUO Can¹, WU Zhijiao¹, PENG Mingyu¹, HE Qingling¹, WANG Yingwei¹, JI Mingde^{2*}, QIU Wen^{1*}

¹Department of Immunology, School of Basic Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 211166; ²Department of Laboratory Medicine, Jiangsu Provincial Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210006, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the effects of protein kinase C - α (PKC - α) over - expression on the phosphorylation level of nuclear factor- κ B-p65 (NF- κ B-p65) in human embryonic kidney 293T (HEK-293T) cells, and examine the inhibitory effect of sinomenine (SIN) on PKC- α /NF- κ B-p65 signaling pathway. **Methods:** To construct the rat wild type (WT) PKC- α over-expression plasmid (pIRES2-PKC- α WT, PKC- α^{WT}), rat PKC- α complete sequence coding (CDS) was amplified by PCR and cloned into pIRES2-EGFP. Then, alanine (A) at the site of 25 and lysine (K) at the site of 368 were mutated to glutamic (E) and arginine (R), respectively based on PKC- α^{WT} to construct PKC- α constitutively active (CA) mutant (pIRES2-PKC- α A25E, PKC- α^{CA}) and PKC- α dominant negative (DN) mutant (pIRES2-PKC- α K368R, PKC- α^{DN}). The rat wild-type NF- κ B-p65 over-expression plasmid, namely pIRES2-NF- κ B-p65 (p65^{WT}), was constructed by our research group previously. The plasmid of p65^{WT} was transfected into HEK-293T cells together with the above - mentioned different PKC - α over - expression plasmids respectively. The expression and phosphorylation levels of PKC- α and NF- κ B-p65 were detected by Western blot. Next, HEK-293T cells were co-transfected with the above-mentioned plasmids in different groups, and after 46 h cells were continuously treated with SIN at the dose of 50 ng/mL for 2 h. Then, the effects of SIN on phosphorylation of PKC- α and NF- κ B-p65 were determined by Western blot. **Results:** PCR analysis and

[基金项目] 国家自然科学基金 (81603358, 31470853, 31770934, 81971468)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: 37693532@qq.com; qiuwen@njmu.edu.cn

nucleotide sequencing verified that the above - mentioned PKC - α over - expression plasmids were constructed successfully. The phosphorylation of NF- κ B-p65 in HEK-293T cells was increased in response to PKC- α^{WT} and PKC- α^{CA} over-expression, especially PKC- α^{CA} over-expression. However, there was no significant change of NF- κ B-p65 phosphorylation after PKC- α^{DN} over-expression. SIN treatment could inhibit the phosphorylation of PKC- α in HEK-293T cells transfected with PKC- α^{WT} , PKC- α^{CA} and PKC- α^{DN} . SIN could also inhibit the phosphorylation of NF- κ B-p65 in HEK-293T cells caused by PKC- α^{WT} over-expression, but not by PKC- α^{CA} or PKC- α^{DN} over-expression. **Conclusion:** Over-expression of PKC- α can promote the phosphorylation of NF- κ B-p65 in HEK-293T cells. SIN treatment can down-regulate NF- κ B-p65 phosphorylation through inhibition of PKC- α phosphorylation in HEK-293T cells.

[Key words] protein kinase C- α ; nuclear factor- κ B-p65; sinomenine

[J Nanjing Med Univ, 2020, 40(11): 1583-1589, 1602]

青藤碱(sinomenine, SIN)是从中草药植物青风藤中提取的一种生物碱,药理研究与临床试验发现其具有免疫抑制及抗炎活性,同时也具有抗氧化、改善微循环等作用(图1)^[1-4]。有文献报道,SIN可通过抑制胞外信号调节激酶1/2(extracellular signal-regulated kinase1/2, ERK1/2)和p38促分裂素原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinases, p38 MAPK)的活化,下调由佛波酯刺激人肥大细胞后诱导的白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等促炎细胞因子的合成与分泌^[5]。此外,SIN可促进核因子红系2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)的表达,后者通过抑制核因子- κ B p65亚基(nuclear factor- κ B p65, NF- κ B-p65)的活化,减轻单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)模型小鼠肾组织炎症反应和组织病变^[6]。值得一提的是,已有文献报道,在人类系膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)治疗中,SIN具有减少蛋白尿,减轻肾小球炎症的作用,且疗效好,不良反应小,没有肝脏损害^[7]。但是SIN抑制MsPGN肾脏组织炎症反应的具体分子机制,目前尚未阐明。

蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)属于AGC家族(protein kinases A, protein kinases G and protein kinases C family)蛋白激酶^[8]。PKC家族各亚基调节结构域之间的差异可使其结合不同的第二信使,据此将目前已知的PKC家族成员分为3类:经典蛋白激酶C(classical PKC, cPKC)、新型蛋白激酶C(novel PKC, nPKC)、非典型蛋白激酶C(atypical PKC, aPKC)。与nPKC、aPKC的活化不同,cPKC的活化依赖于胞内 Ca^{2+} 的浓度。PKC- α 作为cPKC的重要成员,在生理或病理条件下可参与调节细胞的活化、增殖、凋亡和炎症等多种生物学行为^[9-11]。

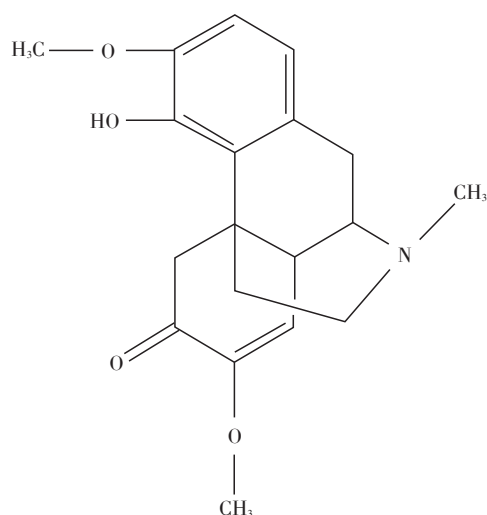


图1 SIN化学结构式

Figure 1 Chemical structural formula of SIN

核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)作为一种重要的核转录因子,在机体各器官、组织和细胞中广泛表达。因结构功能与合成方式不同,其家族可分为两类:一类是p65/RelA、RelB和c-Rel;另一类是由p105与p100裂解活化后形成的p50与p52。在静息状态时,NF- κ B通常与其抑制物以无活性的复合物形式存在于胞浆中;胞内外特异性信号刺激导致其活化释放之后,NF- κ B可迅速从胞浆易位到胞核,通过与其下游靶基因启动子结合发挥转录调节作用^[12]。截至目前,作为NF- κ B家族中研究最为广泛的成员,NF- κ B-p65在多种疾病,如心血管疾病、肠炎、肿瘤等的发生、发展过程中起到不可或缺的作用^[13]。

Thy-1肾炎(Thy-1 nephritis, Thy-1N)是目前国际公认的研究人类MsPGN的动物模型^[14-16]。本课题组前期研究结果揭示,Thy-1N大鼠病变早期的肾组织内和体外受亚溶解型C5b-9(sublytic C5b-9,启动原)刺激的大鼠肾小球系膜细胞中,PKC- α 与NF- κ B-p65的磷酸化水平均显著上调。且体内外抑制

PKC- α 磷酸化后,NF- κ B-p65的磷酸化水平亦明显降低。体内给大鼠预先注射SIN显著改善了Thy-1N大鼠病变后期肾组织的增生病变,同时也下调了早期肾内PKC- α 与NF- κ B-p65的磷酸化以及IL-6和TNF- α 的生成。因此我们推测,SIN可能作用于PKC- α 和/或NF- κ B-p65,通过抑制其磷酸化水平下调Thy-1N大鼠肾内促炎细胞因子的生成,进而减轻继发的肾组织增生病变。

为了探究活化的PKC- α 是否参与调控NF- κ B-p65的磷酸化以及SIN抑制PKC- α 与NF- κ B-p65活化的机制,本实验构建了不同活性的大鼠PKC- α 过表达质粒,即野生型、持续活化突变型和显性负性突变型PKC- α 过表达质粒,将这3种质粒与本课题组前期已成功构建的大鼠野生型NF- κ B-p65过表达质粒行不同组合共转染HEK-293T工具细胞,之后给予SIN处理。观察前述不同活性的PKC- α 对NF- κ B-p65磷酸化的促进作用,以及SIN处理对PKC- α 和NF- κ B-p65磷酸化的抑制效应。为后续深入探讨Thy-1N大鼠肾小球系膜细胞中活化的PKC- α 、NF- κ B-p65之间的上下游关系,以及SIN对PKC- α 和/或NF- κ B-p65的抑制作用及其机制提供有参考价值的实验数据。

1 材料和方法

1.1 材料

人胚肾细胞(HEK-293T)(ATCC,美国),pIRES2-EGFP质粒[滁州通用生物系统(安徽)有限公司],高保真酶PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase,限制性内切酶EcoR I、Sac II和T4 DNA连接酶(TaKaRa公司,日本),琼脂糖凝胶回收试剂盒(南京翼飞雪生物科技有限公司),高纯度质粒小提中量试剂盒(北京天根生化技术有限公司),SIN(Sigma公司,美国)。磷酸化PKC- α (p-PKC- α ,T638)抗体、总PKC- α (t-PKC- α)抗体(Abcam公司,英国),磷酸化NF- κ B-p65(p-p65,Ser536)抗体、总NF- κ B-p65(t-p65)抗体、Flag标签抗体、HA标签抗体(Cell Signaling Technology公司,美国)。大鼠野生型NF- κ B-p65过表达质粒(pIRES2-NF- κ B-p65,p65^{WT})由本课题组前期构建。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

登录Nucleotide数据库查找大鼠PKC- α 基因mRNA序列(NM_001105713.1),利用Primer 5.0软件设计连接有编码Flag标签核苷酸序列的引物,用以扩增大鼠PKC- α 基因的CDS区,引物上下游分别

加入保护性碱基和酶切位点序列。上游引物:5'-CCGGAATTCATGGCTGACGTTTACCCG-3';下游引物:5'-TCCCCGCGGTCACTTATCGTCGTCATCCTTG-TAATCTACTGCACTTTGCAAGATT-3'。单下划线分别表示EcoR I、Sac II酶切位点,双下划线表示Flag标签序列,CCG、TCC为保护性碱基。

1.2.2 目的基因的扩增

提取大鼠肾小球系膜细胞总RNA,反转录为cDNA,以此cDNA为模板,用PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase进行PCR反应。反应体系为PrimeSTAR Max Premix(2 $\times$)25 μ L,上、下游引物各2 μ L,cDNA模板2 μ L,灭菌双蒸水19 μ L,循环35次。扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳后进行割胶纯化回收。

1.2.3 质粒的构建与鉴定

限制性内切酶EcoR I和Sac II分别对pIRES2-EGFP空载质粒与大鼠PKC- α 基因CDS区PCR产物进行双酶切,行琼脂糖凝胶电泳回收。在16 $^{\circ}$ C条件下经T4 DNA连接酶对二者进行连接反应,并将连接产物转化至感受态细胞DH5 α 。将上述转化后的DH5 α 感受态细胞均匀涂布于含卡那霉素抗性的LB平板表面,37 $^{\circ}$ C培养12 h。从LB平板上挑取单个菌落接种于3 mL含卡那霉素抗性的LB培养液中,180 r/min、37 $^{\circ}$ C摇床培养过夜。取上述菌液进行PCR反应,筛选阳性克隆送往通用生物系统(安徽)有限公司进行鉴定。将成功构建的质粒命名为野生型PKC- α 过表达质粒(pIRES2-PKC- α -WT,PKC- α ^{WT})。以PKC- α ^{WT}过表达质粒为基础,分别行以下位点突变:将25位丙氨酸(A)突变为谷氨酸(E),即构建持续活化突变型PKC- α 过表达质粒(pIRES2-PKC- α -A25E,PKC- α ^{CA});另将368位赖氨酸(K)突变为精氨酸(R),即构建显性负性突变型PKC- α 过表达质粒(pIRES2-PKC- α -K368R,PKC- α ^{DN})。

1.2.4 重组质粒转染HEK-293T细胞效率的评估

用Neon[™]细胞电转染系统将pIRES2-EGFP质粒转染至HEK-293T细胞,倒置显微镜下观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)的表达以评估转染效率。

1.2.5 不同活性PKC- α 对NF- κ B-p65磷酸化调控效应的验证

将上述质粒行不同分组转染HEK-293T细胞(质粒转染量为3 μ g,约1 $\times$ 10⁶个细胞),48 h时行Western blot检查p-PKC- α 、t-PKC- α 、Flag标签、p-p65、t-p65与HA标签的表达情况以评估PKC- α 、NF- κ B-p65的过表达效率,同时验证不同活性的

PKC-α对NF-κB-p65磷酸化的调控效应。分组如下:①pIRES2-EGFP组;②pIRES2-EGFP + p65^{WT}组;③PKC-α^{WT} + p65^{WT}组;④PKC-α^{CA} + p65^{WT}组;⑤PKC-α^{DN} + p65^{WT}组。Western blot 过程如下:收集 HEK-293T 细胞裂解产物于 EP 管中,煮沸使蛋白变性,12 000 g 离心 5 min,取上清行 SDS-PAGE 凝胶电泳,湿转法将蛋白转印至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上。5%脱脂奶粉溶液封闭后于一抗中 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 10 min×5 次。二抗室温孵育 45 min, TBST 洗涤后加入 ECL 发光液进行曝光。

1.2.6 SIN 处理细胞对 PKC-α 和 NF-κB-p65 蛋白及磷酸化水平的影响

同上,将上述质粒行不同组合共转染 HEK-293T 细胞,转染后 46 h 换用含 50 ng/mL SIN 的培养基处理,对照组予 DMSO 处理。48 h 时 Western blot 检查 p-PKC-α、t-PKC-α、Flag 标签、p-p65、t-p65 与 HA 标签的表达水平,确定 SIN 对 PKC-α 和 NF-κB-p65 磷酸化水平的调控作用。

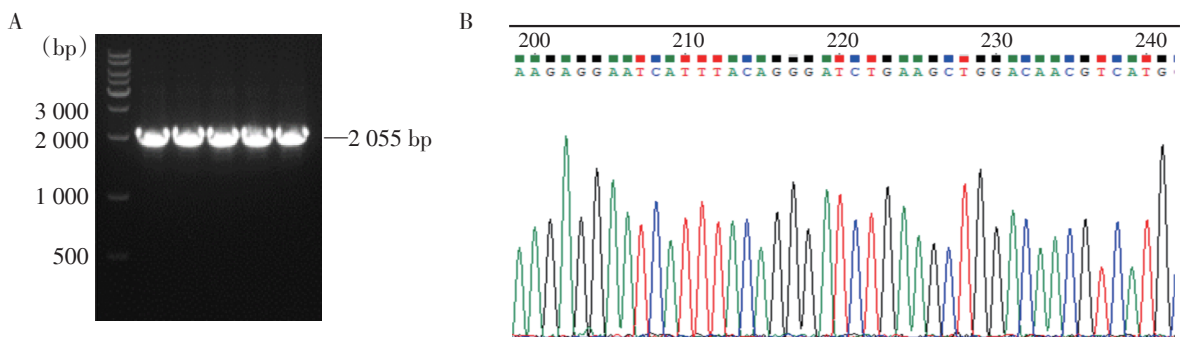
1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。所得定量数据均以均数±标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示。采用方差分析和 Bonfferoni 法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠野生型、持续活化突变型、显性负性突变型 PKC-α 过表达质粒的构建与鉴定以及质粒转染效率的评估

PCR 扩增连接 Flag 标签的大鼠 PKC-α 基因 CDS 区序列,将其插入到 pIRS2-EGFP 空载质粒中。菌液 PCR(图 2A)、测序(图 2B)及 BLAST 对比后证实,大鼠野生型 PKC-α 过表达质粒构建成功,将其命名为 pIRES2-PKC-α-WT(简称 PKC-α^{WT})。随后,将 PKC-α^{WT} 的 25 位丙氨酸(A)与 368 位赖氨酸(K)分别突变为谷氨酸(E)和精氨酸(R),即构建持续活化突变型 PKC-α 过表达质粒(pIRES2-PKC-α-A25E,简称 PKC-α^{CA})和显性负性突变型 PKC-α 过表达质粒



A:菌液 PCR 电泳条带 B:部分 DNA 测序图谱。

图 2 PKC-α 过表达质粒的构建与鉴定

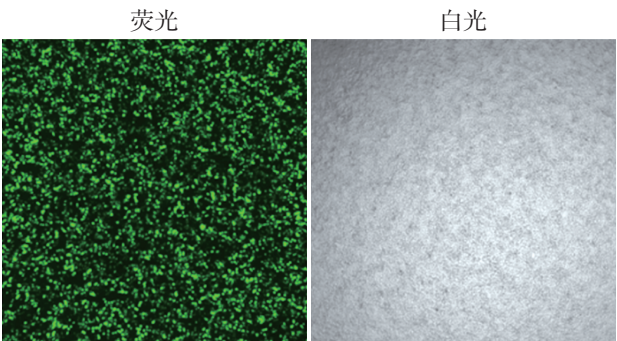
Figure 2 Construction and identification of PKC-α over-expression plasmid

(pIRES2-PKC-α-K368R,简称 PKC-α^{DN})。

之后,通过 NeonTM 电转染系统将 pIRES2-EGFP 质粒转染 HEK-293T 细胞,倒置荧光显微镜下观察 GFP 的表达情况。结果(图 3)显示, pIRES2-EGFP 质粒电转染 HEK-293T 细胞 48 h 后,外源性蛋白 GFP 显著表达,转染效率达 80% 左右。

2.2 野生型、持续活化突变型、显性负性突变型 PKC-α 对 HEK-293T 细胞中 NF-κB-p65 磷酸化水平的影响

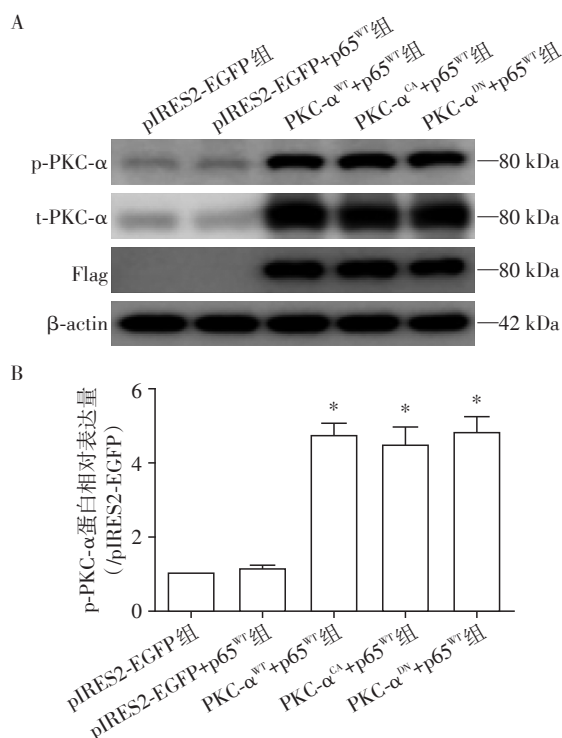
结果显示,3 种 PKC-α 质粒均可在 HEK-293T 细胞中表达外源性 PKC-α 蛋白,且其磷酸化水平升高约 4 倍。另过表达 NF-κB-p65(即 pIRES2-EGFP+



pIRES2-EGFP 质粒转染 HEK-293T 细胞后 48 h, GFP 的表达情况(×100)。

图 3 HEK-293T 细胞中 pIRES2-EGFP 质粒的转染效率
Figure 3 Transfection efficiency of pIRES2 - EGFP in HEK-293T cells

p65^{WT}组)与对照组(即pIRES2-EGFP组)相比,其PKC- α 的磷酸化水平未见明显变化(图4),提示,NF- κ B-p65对PKC- α 的磷酸化可能无调控作用。此外,过表达野生型PKC- α (即PKC- α^{WT} +p65^{WT}组)和持续活化突变型PKC- α (即PKC- α^{CA} +p65^{WT}组),其NF- κ B-p65磷酸化的水平较过表达显性负性突变型PKC- α (即PKC- α^{DN} +p65^{WT}组)和空载对照组(即pIRES2-EGFP+p65^{WT}组)相比,均分别升高约4倍与6倍。此外,过表达显性负性突变型PKC- α (即PKC- α^{DN} +p65^{WT}组)与空载对照组(即pIRES2-EGFP+p65^{WT}组)相比,其NF- κ B-p65的磷酸化水平未见明显变化(图5)。提示,PKC- α 可作为上游激酶调节NF- κ B-p65的磷酸化,且以持续活化突变型PKC- α (PKC- α^{CA})对NF- κ B-p65磷酸化的上调效应最为显著,而显性负性突变型PKC- α (PKC- α^{DN})则对NF- κ B-p65的磷酸化无明显影响。



HEK-293T细胞中转染不同质粒后48 h, Western blot检测t-PKC- α 、p-PKC- α 、Flag标签的表达水平。A: Western blot电泳条带; B: 直方图定量分析。与pIRES2-EGFP组比较, $P < 0.01$ ($n=3$)。

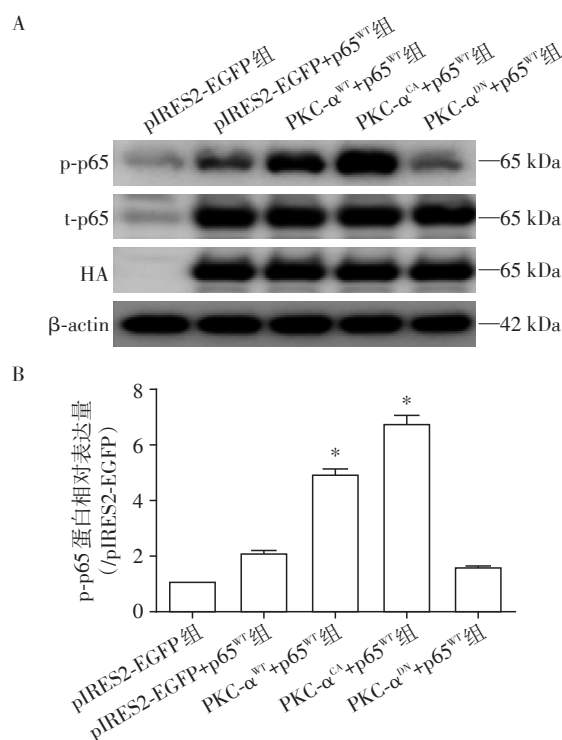
图4 PKC- α 过表达及其磷酸化水平的检测

Figure 4 Detection of PKC- α over-expression and phosphorylation

2.3 HEK-293T细胞中SIN对PKC- α /NF- κ B-p65通路的影响

如图6所示, SIN可将HEK-293T细胞中外源性野生型PKC- α (即PKC- α^{WT} +p65^{WT}组)、持续活化突

变型PKC- α (即PKC- α^{CA} +p65^{WT}组)和显性负性突变型PKC- α (即PKC- α^{DN} +p65^{WT}组)的磷酸化水平下调至原来的40%左右。此外, SIN亦可将过表达野生型PKC- α (即PKC- α^{WT} +p65^{WT}组)的HEK-293T细胞中NF- κ B-p65磷酸化下调至原来的50%左右,但对过表达持续活化突变型PKC- α (即PKC- α^{CA} +p65^{WT}组)的HEK-293T细胞中的NF- κ B-p65磷酸化修饰程度无明显影响,而过表达空载质粒(即pIRES2-EGFP+p65^{WT}组)和过表达显性负性突变型PKC- α (即PKC- α^{DN} +p65^{WT}组)的HEK-293T细胞中的NF- κ B-p65磷酸化水平处于较低水平,故未见SIN对其有明显影响(图7)。鉴于SIN能显著抑制过表达野生型PKC- α 后HEK-293T细胞中NF- κ B-p65的磷酸化水平,却不能下调过表达持续活化突变型PKC- α 后NF- κ B-p65的磷酸化水平,提示SIN抑制NF- κ B-p65磷酸化的作用可能是通过抑制NF- κ B-p65上游激酶PKC- α 的活性发挥的。



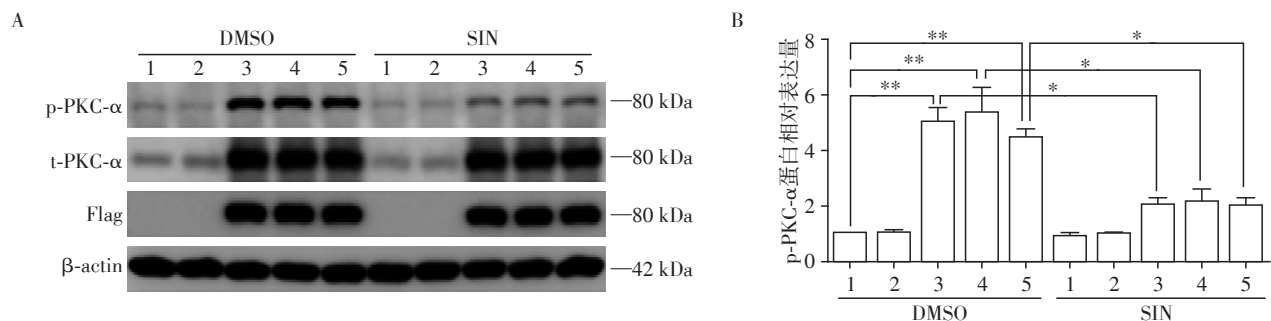
HEK-293T细胞中转染不同质粒后48 h, Western blot检查t-NF- κ B-p65、p-NF- κ B-p65、HA标签的表达水平。A: Western blot电泳条带; B: 直方图定量分析。与pIRES2-EGFP组比较, $P < 0.01$ ($n=3$)。

图5 PKC- α 过表达对NF- κ B-p65蛋白磷酸化的影响

Figure 5 Effects of PKC- α over-expression on NF- κ B-p65 protein phosphorylation

3 讨论

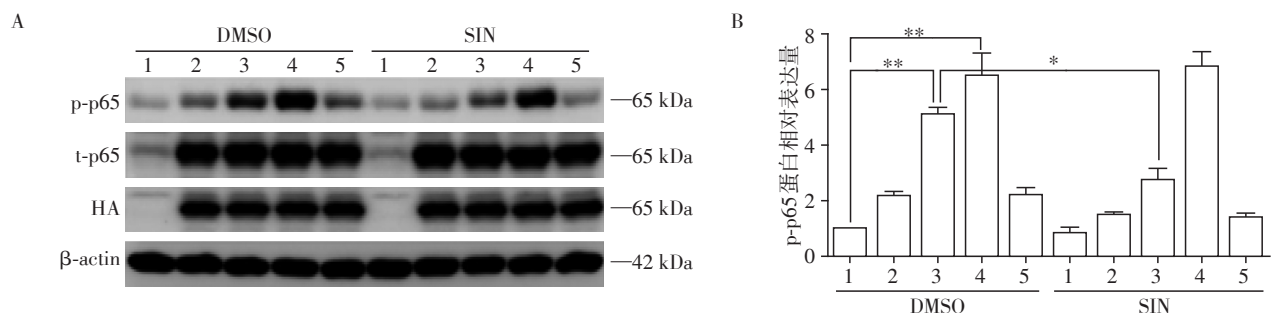
本课题组前期研究发现,在Thy-1N大鼠肾组织



SIN处理转染不同质粒后的HEK-293T细胞,Western blot检测p-PKC-α、t-PKC-α、Flag标签的表达情况。A:Western blot电泳条带;B:直方图定量分析。两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=3$)。1:pIRES2-EGFP组;2:pIRES2-EGFP+p65^{WT}组;3:PKC-α^{WT}+p65^{WT}组;4:PKC-α^{CA}+p65^{WT}组;5:PKC-α^{DN}+p65^{WT}组。

图6 SIN对PKC-α表达及其磷酸化水平的影响

Figure 6 Effects of SIN on PKC-α expression and phosphorylation



SIN处理转染不同质粒后的HEK-293T细胞,Western blot检查p-NF-κB-p65、t-NF-κB-p65与HA标签的表达水平。A:Western blot电泳条带;B:直方图定量分析。两组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n=3$)。1:pIRES2-EGFP组;2:pIRES2-EGFP+p65^{WT}组;3:PKC-α^{WT}+p65^{WT}组;4:PKC-α^{CA}+p65^{WT}组;5:PKC-α^{DN}+p65^{WT}组。

图7 SIN对NF-κB-p65表达及其磷酸化水平的影响

Figure 7 Effects of SIN on NF-κB-p65 expression and phosphorylation

和体外受 sublytic C5b-9 刺激的大鼠肾小球系膜细胞中,PKC-α与NF-κB-p65蛋白的磷酸化修饰均显著增强。体内外抑制PKC-α与NF-κB-p65活性后可显著下调促炎细胞因子IL-6和TNF-α的生成,抑制Thy-1N大鼠肾组织内肾小球系膜细胞的增生与细胞外基质的分泌,此外,抑制PKC-α的活性后,NF-κB-p65的磷酸化水平亦被明显抑制。提示PKC-α与NF-κB-p65可作为信号分子与转录因子参与调节Thy-1N大鼠肾组织的病变进程,PKC-α可作为上游激酶调节NF-κB-p65的磷酸化活性。

如前所述,SIN可通过调节多种信号通路发挥抗炎抗氧化等生物学功效。然而,SIN能否改善Thy-1N大鼠病变进程中肾组织炎性损伤与增生病变,在机制上是否与PKC-α和/或NF-κB-p65的活化有关,目前并不清楚。对此,本研究分别用不同剂量的SIN处理Thy-1N大鼠,结果发现SIN处理可下调PKC-α与NF-κB-p65的磷酸化水平,因此推测SIN可能通过抑制PKC-α和/或NF-κB-p65的磷酸化水平

进而减轻Thy-1N大鼠肾组织炎性病变。

为了探讨PKC-α是否直接调控NF-κB-p65的磷酸化以及SIN抑制PKC-α、NF-κB-p65磷酸化的具体方式,本研究构建了大鼠野生型、持续活化突变型、显性负性突变型PKC-α过表达质粒(即PKC-α^{WT}、PKC-α^{CA}和PKC-α^{DN})。之后,利用工具细胞HEK-293T进行相关研究,结果提示,PKC-α可作为上游激酶参与调节NF-κB-p65的磷酸化,且以持续活化突变型PKC-α(PKC-α^{CA})对NF-κB-p65磷酸化的上调效应最为显著,而显性负性突变型PKC-α(PKC-α^{DN})可能是由于结构改变导致其失去对下游靶蛋白的磷酸化修饰作用,故其对NF-κB-p65的磷酸化无明显影响。此外,SIN可抑制3种不同活性PKC-α的磷酸化水平,同时也可抑制过表达野生型PKC-α对NF-κB-p65的磷酸化修饰作用。然而,SIN处理并不影响持续活化突变型与显性负性突变型PKC-α对NF-κB-p65磷酸化修饰的调节效应。推测SIN虽然可抑制持续活化突变型和显性负性突变型PKC-α苏

氨酸(T)638位的磷酸化水平,但因二者分别发生了不同的突变,故其功能可能不再受T638位的磷酸化状态的影响,即持续活化突变型PKC- α 能逆转SIN对其自身活性的抑制作用,可使NF- κ B-p65在SIN存在的情况下依旧维持较高水平的磷酸化状态;而显性负性突变型PKC- α 由于失去调节NF- κ B-p65磷酸化水平的作用,故SIN的处理亦不会对该处理组NF- κ B-p65低水平的磷酸化状态产生显著影响。这些结果提示,SIN可能是通过抑制HEK-293T细胞内PKC- α 的活性进而下调NF- κ B-p65的磷酸化。

已有文献指出,SIN可下调星形胶质细胞内Ca²⁺浓度,改善吗啡依赖的中枢神经系统病变^[17],此外,SIN也能通过抑制巨噬细胞中NF- κ B-p65活性进而减轻炎性损伤^[6,18]。本研究结果亦表明,SIN能够抑制PKC- α (PKC- α 作为经典PKC家族成员,其活性可受细胞内Ca²⁺浓度调节)与NF- κ B-p65的磷酸化,这与先前文献报道结果吻合。然而,在Thy-1N大鼠肾小球系膜细胞中,SIN具体是通过调节细胞内Ca²⁺浓度进而抑制PKC- α /NF- κ B-p65的磷酸化活性,抑或是分别直接靶向调控PKC- α 和NF- κ B-p65的磷酸化活性,目前均不清楚;此外,亦有文献报道,SIN可抑制ERK1/2、p38 MAPK等通路的活性^[5],而我们前期研究也发现,ERK1/2、p38 MAPK、JNK和STAT3等信号分子/转录因子亦参与调控Thy-1N大鼠肾组织炎性损伤与增生病变,而SIN对Thy-1N大鼠病变损伤的改善是否也与调控上述因子的活性有关,目前还未见相关文献报道,因此,上述问题仍有待进一步实验加以验证。

综上所述,为了探讨PKC- α 是否直接调控NF- κ B-p65的磷酸化以及SIN抑制PKC- α 、NF- κ B-p65活化的具体方式,本研究利用HEK-293T工具细胞进行了相关实验。可为后续深入研究SIN对Thy-1N大鼠肾内PKC- α /NF- κ B-p65通路的抑制作用及其对大鼠肾内炎性病变的影响提供有用的实验材料和研究思路。

[参考文献]

- [1] LIU W, ZHANG Y, ZHU W, et al. Sinomenine inhibits the progression of rheumatoid arthritis by regulating the secretion of inflammatory cytokines and monocyte/macrophage subsets[J]. Front Immunol, 2018, 9: 2228
- [2] WU Y, LIN Z, YAN Z, et al. Sinomenine contributes to the inhibition of the inflammatory response and the improvement of osteoarthritis in mouse-cartilage cells by acting on the Nrf2/HO-1 and NF-kappaB signaling pathways

- [J]. Int Immunopharmacol, 2019, 75: 105715
- [3] YIN N, XIONG Y, TAO W, et al. Sinomenine alleviates lipopolysaccharide - induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2020, 42(2): 147-155
- [4] SINGH D, AGRAWAL A, SINGAL C M S, et al. Sinomenine inhibits amyloid beta - induced astrocyte activation and protects neurons against indirect toxicity [J]. Mol Brain, 2020, 13(1): 30
- [5] OH Y C, KANG O H, KIM S B, et al. Anti-inflammatory effect of sinomenine by inhibition of pro-inflammatory mediators in PMA plus A23187-stimulated HMC-1 cells[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2012, 16(9): 1184-1191
- [6] QIN T, DU R, HUANG F, et al. Sinomenine activation of Nrf2 signaling prevents hyperactive inflammation and kidney injury in a mouse model of obstructive nephropathy [J]. Free Radic Biol Med, 2016, 92: 90-99
- [7] CHENG Y, LI F, WANG D, et al. Sinomenine inhibits the expression of PDL1 in the peripheral blood mononuclear cells of mesangial proliferative nephritis patients [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(4): 1223-1228
- [8] HANKS S K, HUNTER T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification[J]. Faseb J, 1995, 9(8): 576-596
- [9] LEE A, SUN Y, LIN T, et al. Amino acid-based compound activates atypical PKC and leptin receptor pathways to improve glycemia and anxiety like behavior in diabetic mice [J]. Biomaterials, 2020, 239: 119839
- [10] LI X, ZHAO Z, KUANG P, et al. Regulation of lipid metabolism in diabetic rats by *Arctium lappa* L. polysaccharide through the PKC/NF-kappaB pathway [J]. Int J Biol Macromol, 2019, 136: 115-122
- [11] PARK E, CHEN J, MOORE A, et al. Stromal cell protein kinase C-beta inhibition enhances chemosensitivity in B cell malignancies and overcomes drug resistance [J]. Sci Transl Med, 2020, 12: 526
- [12] MIRAGHAZADEH B, COOK M C. Nuclear factor-kappaB in autoimmunity: man and mouse [J]. Front Immunol, 2018, 9: 6130
- [13] PANICKER N, SARKAR S, HARISCHANDRA D S, et al. Fyn kinase regulates misfolded alpha-synuclein uptake and NLRP3 inflammasome activation in microglia [J]. J Exp Med, 2019, 216(6): 1411-1430
- [14] ZHANG J, XIE M, XIA L, et al. Sublytic C5b-9 induces IL-23 and IL-36a production by glomerular mesangial cells via PCAF-mediated KLF4 acetylation in rat Thy-1 nephritis [J]. J Immunol, 2018, 201(11): 3184-3198

(下转第1602页)

- 2016,387(10036):2383-2401
- [2] 邢艳霞,郭洁群,陈庆莉,等. 产前心理健康状况对产后母乳喂养的影响[J].南京医科大学学报(自然科学版),2010,30(8):1196-1198
- [3] FARIBA A, NICOLE L, NEWSHA M, et al. Vitamin D deficiency and antenatal and postpartum depression: a systematic review[J]. *Nutrients*, 2018, 10(4):478
- [4] SABIR M S, HAUSSLER M R, MALLICK S, et al. Optimal vitamin D spurs serotonin: 1, 25-dihydroxyvitamin D represses serotonin reuptake transport (SERT) and degradation(MAO-A)gene expression in cultured rat serotonergic neuronal cell lines[J]. *Genes Nutr*, 2018, 13:19
- [5] MASSZI G, HORVATH E M, TAR SZABO R, et al. Reduced estradiol-induced vasodilation and poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) activity in the aortas of rats with experimental polycystic ovary syndrome(PCOS)[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e55589
- [6] AMINI S, JAFARIRAD S, AMANI R. Postpartum depression and vitamin D: a systematic review[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(9):1514-1520
- [7] VAN DER PLIGT P, WILLCOX J, SZYM LEK-GAY E A, et al. Associations of maternal vitamin D deficiency with pregnancy and neonatal complications in developing countries:a systematic review[J]. *Nutrients*, 2018, 10(5):640
- [8] AGHAJAFARI F, LETOURNEAU N, MAHINPEY N, et al. Vitamin D deficiency and antenatal and postpartumdepression:a systematic review[J]. *Nutrients*, 2018, 10(4):478
- [9] WANG J, LIU N, SUN W, et al. Association between vitamin D deficiency and antepartum and postpartum depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2018, 298 (6) : 1045-1059
- [10] FRIEDMAN AK, JUAREZ B, KU SM, et al. KCNQ channel openers reverse depressive symptoms via an active resilience mechanism[J]. *Nat Commun*, 2016, 7:11671
- [11] LEE S M, MEYER M B, BENKUSKY N A, et al. The impact of VDR expression and regulation *in vivo* [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2018, 177:36-45
- [12] GRANT W B, WIMALAWANSA S J, HOLICK M F, et al. Emphasizing the health benefits of vitamin D for those with neurodevelopmental disorders and intellectual disabilities[J]. *Nutrients*, 2015, 7(3):1538-1564
- [13] BAI L, ZHANG S, ZHOU X, et al. Brain-derived neurotrophicfactor induces thioredoxin - 1 expression through TrkB/Akt/CREB pathway in SH-SY5Y cells[J]. *Biochimie*, 2019, 160:55-60
- [14] ITOH N, ENOMOTO A, NAGAI T, et al. Molecular mechanism linking BDNF/TrkB signaling with the NMDA receptor in memory: the role of Girdin in the CNS [J]. *Rev Neurosci*, 2016, 27(5):481-490
- [15] PAZINI F L, CUNHA M P, ROSA J M, et al. Creatine, similar to ketamine, counteracts depressive-like behavior induced by corticosterone via PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(10):6818-6834
- [16] LI N, LEE B, LIU R J, et al. mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists [J]. *Science*, 2010, 329(5994):959-964

[收稿日期] 2020-05-21

(上接第1589页)

- [15] YU T, WANG L, ZHAO C, et al. Sublytic C5b-9 induces proliferation of glomerular mesangial cells via ERK5/MZF1/RGC-32 axis activated by FBXO28-TRAF6 complex[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(8):5654-5671
- [16] HUANG K, LI R, WEI W. Sirt1 activation prevents anti-Thy 1.1 mesangial proliferative glomerulonephritis in the rat through the Nrf2/ARE pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 832:138-144
- [17] OU J, ZHOU Y, LI C, et al. Sinomenine protects against morphine dependence through the NMDAR1/CAMK II/CREB pathway: a possible role of astrocyte-derived exosomes[J]. *Molecules*, 2018, 23(9):2370
- [18] SHARMA R, KAMBHAMPATI S P, ZHANG Z, et al. Dendrimer mediated targeted delivery of sinomenine for the treatment of acute neuroinflammation in traumatic brain injury[J]. *J Control Release*, 2020, 323:361-375
- [19] WANG W, YANG X, CHEN Q, et al. Sinomenine attenuates septic-associated lung injury through the Nrf2-Keap1 and autophagy [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72 (2) : 259-270
- [20] SHEN Y, SONG Z, LU X, et al. Fas signaling-mediated TH9 cell differentiation favors bowel inflammation and antitumor functions[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):2924
- [21] ANDERSON K, FITZGERALD M, DUPONT M, et al. Mice deficient in PKC theta demonstrate impaired *in vivo* T cell activation and protection from T cell-mediated inflammatory diseases [J]. *Autoimmunity*, 2006, 39 (6) : 469-478
- [22] ZHANG Z J, XIAO Q, LI X Y. NF-kappaB-activated miR-574-5p promotes multiple malignant and metastatic phenotypes by targeting BNIP3 in thyroid carcinoma[J]. *Mol Cancer Res*, 2020, 18(7):955-967

[收稿日期] 2020-04-27