

# 内毒素对 NRK52E 细胞生长及细胞间缝隙连接功能的影响

位 静, 甘小亮, 罗晨芳, 李晓芸, 陈景辉, 黑子清\*  
(中山大学附属第三医院麻醉科, 广东 广州 510630)

**摘 要:**【目的】研究不同浓度内毒素(LPS)对 NRK52E 细胞生长和细胞间缝隙连接功能的影响。【方法】体外培养 NRK52E 细胞,随机分为对照组及 LPS 处理组,LPS 处理组分别用 5 个不同浓度的 LPS(10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1 000 ng/mL)作用 24 h。采用四甲基偶氮唑盐法检测 NRK52E 细胞的生长;细胞荧光免疫示踪法测定 NRK52E 细胞间缝隙连接传递的功能;Western Blotting 测定对照组、LPS 10 ng/mL 组和 LPS 100 ng/mL 组 Cx43 蛋白的表达。【结果】①与对照组和 LPS 10 ng/mL 组相比,LPS 50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL 及 1 000 ng/mL 组细胞生长明显降低( $P < 0.01$ )。②与对照组相比,LPS 100 ng/mL、500 ng/mL 及 1 000 ng/mL 组细胞间缝隙连接功能明显降低( $P < 0.01$ )。③内毒素浓度与 NRK52E 细胞生长和细胞间缝隙连接传递数目呈负相关( $r = -0.941, -0.872, P < 0.01$ )。④与对照组比较,LPS 10 ng/mL 组和 LPS 100 ng/mL 组的 Cx43 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ )。【结论】LPS 对 NRK52E 细胞的生长呈浓度相关性的抑制,这种作用与细胞间缝隙连接功能有关。

**关键词:** 内毒素; NRK52E 细胞; 缝隙连接; 细胞生长

**中图分类号:** R631 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)02-0249-04

## Effects of Endotoxin on Growth Activity and Gap Junction of NRK52E Cells

WEI Jing, GAN Xiao-liang, LUO Chen-fang, LI Xiao-yun, CHEN Jing-hui, HEI Zi-qing  
(Department of Anesthesiology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】 This study was designed to observe the effects of endotoxin (LPS) on the growth activity and gap junction (GJ) of NRK52E cells. 【Methods】 The NRK52E cells were divided into control group and LPS groups, and the NRK52E cells in LPS groups were treated with LPS 10 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 500 ng/mL, and 1 000 ng/mL for 24 h respectively. The NRK52E cells growth activity was measured through MTT method, and the function of gap junction of NRK52E cells was measured through the method of fluoroimmunoassay. The protein expression of connexin 43 (Cx43) in control group, LPS 10 ng/mL group, and LPS 100 ng/mL group were also determined by Western blotting. 【Results】 ① Compared with control group and LPS 10 ng/mL group, The NRK52E cells growth activity decreased significantly in LPS 50 ng/mL, 100 ng/mL, 500 ng/mL, and 1 000 ng/mL groups ( $P < 0.01$ ). ② Compared with control group, the function of GJ decreased significantly in LPS 100 ng/mL, 500 ng/mL, and 1 000 ng/mL groups ( $P < 0.01$ ). ③ There were negative correlations among the concentration of LPS and NRK52E cells growth activity and GJ function respectively ( $r = -0.941, -0.872, P < 0.01$ ). ④ Compared with control group, the protein expression of Cx43 were decreased significantly in LPS 10 ng/mL and 100 ng/mL groups ( $P < 0.01$ ). 【Conclusions】 LPS can inhibit the NRK52E cells growth activity in a dose-depend manner, GJ function is one of the mechanisms.

**Key words:** lipopolysaccharide; NRK52E cells; gap junction; cell growth

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(2): 249-252]

血清内毒素(lipopolysaccharide, LPS)增高能引起肾脏损害,严重时导致急性肾功能不全<sup>[1]</sup>。现有研究证实肾小管上皮细胞的功能或器质性损害

在内毒素急性肾功能衰竭中起着重要作用<sup>[2]</sup>。细胞间缝隙连接(gap junction, GJ)广泛存在于实质性脏器(如心脏,肝脏,肾脏等)和组织<sup>[3]</sup>,GJ参与

收稿日期: 2009-07-25

基金项目: 广东省科技计划项目(省国际合作项目,2009B050700021)

作者简介: 位静,硕士,住院医师; \*黑子清,通信作者,教授,博士生导师, E-mail: heiziqing0530@hotmail.com

了细胞间活动的协调及信息的传递,研究显示 GJ 功能变化参与了器官损害的病理生理过程<sup>[4]</sup>。内毒素介导急性肾功能衰竭的机理十分复杂,如炎症反应、微循环障碍或直接毒性作用等<sup>[5]</sup>。LPS 对肾脏的损害是否与肾小管上皮细胞间 GJ 功能有关尚不明确。本研究将观察 LPS 对 NRK52E 细胞生长的作用,同时从细胞间缝隙连接功能变化探讨其可能机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器设备

胎牛血清和 DMEM-F12 培养基(Gibco 美国),0.25%胰酶(Gibco 美国),DMSO 溶剂(Amresco 美国),双抗(Gibco 美国),内毒素(Sigma 美国),噻唑蓝(Amresco 美国),荧光试剂 calcine-AM 和 Dil-CM (Invitrogen 美国),DMSO (Invitrogen 美国),结晶紫(Sigma 美国),NaOH(Sigma 美国)。

### 1.2 实验分组

NRK52E 细胞由中山大学附属第一医院余学清教授惠赠。NRK52E 细胞用含 100 mL/L 胎牛血清(FBS)的 DMEM-F12 培养基于 37 ℃、体积分数为 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中常规传代培养。

实验分为对照组及 LPS 处理组,对照组用含 100 mL/L FBS 的培养基培养细胞;LPS 处理组分为 5 个亚组,分别用终浓度为 10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL 及 1 000 ng/mL 的 LPS 进行处理。

### 1.3 四甲基偶氮唑盐法测定细胞生长

NRK52E 细胞用 2.5 mL/L 胰酶消化后接种于 96 孔板,贴壁后加入 100 mL/L FBS 或不同浓度的 LPS,每组设 5 个复孔,常规培养 24 h,每孔避光加入 MTT 150 μL,孵育 4 h,吸弃培养液,每孔加入 DMSO 20 μL,摇床震荡 10 min,设定空白比孔(含培养液、MTT、DMSO),采用酶标仪 490 nm 波长测定各孔  $D$  (490 nm)。

细胞生长活性 =  $(D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}})$

### 1.4 细胞荧光免疫示踪法测定细胞 GJ 传递功能

NRK52E 细胞胰酶消化后接种于 12 孔板,常规培养至贴壁,加入不同浓度的 LPS 培养 24 h,显微镜下细胞融合铺满,取其中一孔细胞加入 DMEM-F12 1 mL (含荧光试剂 calcine-AM 2.5 μL

和 Dil-CM 5 μL),作为供体细胞(donor cell)。孵育 30 min,吸弃培养液,PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,将供体细胞制成细胞悬液(800 个/mL)。其余各孔细胞 PBS 冲洗,加入供体细胞悬液 1 mL,称为受体细胞(receive cell)。继续孵育 3.5 h,荧光显微镜下观察供体细胞周围传递荧光 calcine-AM 的受体细胞数目。

### 1.5 Western blotting 法检测细胞间 Cx43 蛋白表达

NRK52E 细胞胰酶消化后接种于 6 孔板,培养 48 h 至细胞融合。将培养板放在冰上,用冰冷 PBS 冲洗 3 次,加细胞裂解液,刮取细胞,超声波粉碎,4 ℃ 12 000 ×  $g$  离心 30 min,取上清,进行蛋白定量,上样。采用 SDS-PAGE 法进行电泳 90 min。采用 PVDF 膜进行转膜,100 V,90 min。40 g/L 脱脂牛奶中室温封闭 60 min,50 g/L 脱脂牛奶中加一抗(1:2 000,Sigma),4 ℃ 摇床孵育过夜,用 TBST 洗 3 次,50 g/L 脱脂牛奶中加二抗(1:3 000,Sigma),室温孵育 30 min。曝光。膜用 TBST 洗 10 min × 3 次,用 tulblin 一抗(1:10 000,Sigma)孵育,60 min 后曝光。所有 Western blotting 结果均用 GS-800 densitometer (Bio-Rad) 进行灰度分析测量。

### 1.6 统计学处理

所有数据用均数 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示,应用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析(LSD 法),内毒素浓度、细胞生长和 GJ 传递数目之间进行 Pearson 相关性分析。以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 LPS 对 NRK52E 细胞生长的作用

LPS 作用 24 h 后 NRK52E 细胞的生长趋势表现为 LPS 10 ng/mL 时 NRK52E 细胞的生存率为  $(71 \pm 2)\%$ ,LPS 50 ng/mL 为  $(65 \pm 2)\%$ ,LPS 100 ng/mL 的生存率为  $(60 \pm 3)\%$ ,LPS 500 ng/mL 时为  $(52 \pm 3)\%$ ,LPS 1 000 ng/mL 时细胞生存率为  $(41 \pm 2)\%$ ,与对照组比较均有明显降低( $P < 0.01$ ,  $n = 6$ )。与 LPS 10 ng/mL 相比,LPS 50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL 及 1 000 ng/mL 各组均明显降低( $P < 0.01$ ,  $n = 6$ , 图 1)。

### 2.2 LPS 对 NRK52E 细胞间 GJ 传递功能的作用

结果显示 NRK52E 细胞间荧光传递数目,与

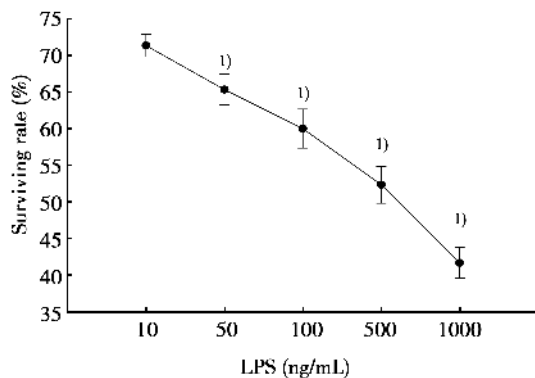


图1 LPS对NRK52E细胞生长活性的影响

Fig.1 The figure shows the survival rate of NRK52E cells after treatment with LPS for 24 h

\*  $P < 0.01$  vs. LPS 10 ng/mL; ( $n = 6$ )

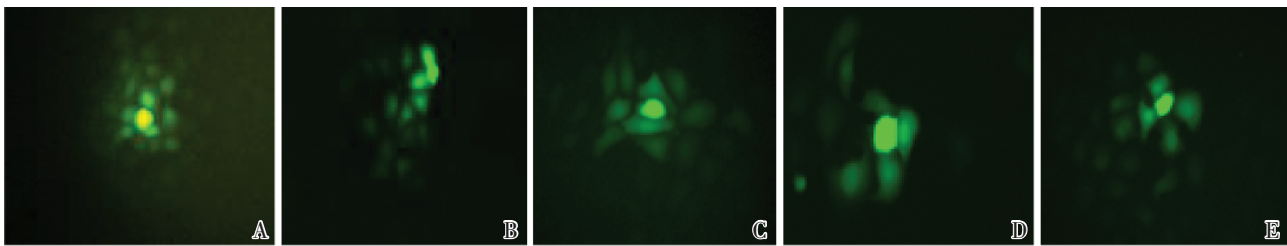


图2 LPS作用24h后NRK52E细胞缝隙连接间荧光传递情况

Fig.2 The dye coupling through GJ between NRK52E cells after treatment with LPS for 24 h, as show by parachute dye coupling assay

A: The dye coupling through GJ in Control group,  $\times 200$ ; B: The dye coupling through GJ in LPS 10 ng/mL group,  $\times 200$ ; C: The dye coupling through GJ in LPS 50 ng/mL group,  $\times 200$ ; D: The dye coupling through GJ in LPS 500 ng/mL group,  $\times 200$ ; E: The dye coupling through GJ in LPS 1 000 ng/mL group,  $\times 200$

细胞生长呈正相关( $r = 0.972, 0.954, P < 0.01$ )。

#### 2.4 LPS对NRK52E细胞间Cx43蛋白表达的作用

观察对照组、LPS 10 ng/mL组和LPS 100 ng/mL组NRK52E细胞间Cx43蛋白的表达,结果显示,与对照组相比,LPS 10 ng/mL组和LPS 100 ng/mL组Cx43蛋白表达减弱,LPS 100 ng/mL组最低( $P < 0.05$ ,图3)。

### 3 讨论

本研究结果显示:随着LPS浓度的增高,体外培养的大鼠肾小管上皮细胞(NRK52E cell)的生长逐渐降低,LPS浓度与细胞生长呈负相关,这些结果证明LPS对NRK52E细胞有毒性作用,且与自身浓度有关。研究已证实内毒素的直接毒性、炎症反应、氧化损伤以及内毒素休克引起的肾脏低

对照组相比( $9.3 \pm 1.0$ ),除LPS 10 ng/mL组( $8.0 \pm 1.0$ ),LPS 50 ng/mL至1 000 ng/mL各组(LPS 50 ng/mL组: $7.3 \pm 0.5$ , LPS 100 ng/mL组: $5.2 \pm 0.5$ , LPS 500 ng/mL组: $4.5 \pm 0.6$ , LPS 1 000 ng/mL组: $2.5 \pm 0.5$ )均具有显著性差异( $P < 0.01$ ),随着LPS浓度的增加NRK52E细胞间的荧光传递数目逐渐减少,LPS 1 000 ng/mL时细胞传递数目最少( $P < 0.01$ ,图2)。

#### 2.3 LPS浓度与NRK52E细胞生长及细胞间GJ传递数目的相关性分析

LPS浓度与NRK52E细胞生长和细胞间缝隙连接传递数目呈负相关( $r = -0.941, -0.872, P < 0.01$ );NRK52E细胞间缝隙连接荧光传递数目与

灌注等因素都参与了肾脏损害的病理生理过程<sup>[5]</sup>。随着研究的深入,目前观点认为内毒素导致的肾脏损害机制十分复杂,需要进一步研究。

缝隙连接是细胞之间的一种蛋白质连接通道,广泛存在于实质性脏器,如心脏、肝脏、肾脏、中枢神经、皮肤、肌肉等组织中,是细胞间直接联系的重要通道,各种生理或伤害性信息经细胞间缝隙连接传递到相邻细胞,保持细胞群体对生长刺激和调节反应的同步性<sup>[2,6]</sup>。现已证明GJ在细胞活动、维持细胞内环境稳定、控制细胞生长和发育等均发挥重要作用<sup>[7]</sup>。研究发现,很多疾病与GJ功能改变有关<sup>[8]</sup>。Wilson等<sup>[9]</sup>证明GJ具有促凋亡的作用,GJ可以通过“旁观者效应”来诱导细胞凋亡。在脑缺血再灌注后血脑屏障通透性研究中,发现缺血2h再灌注24h半暗带内Cx43分布发生变化,在术前给以GJ阻断剂,可以降低缺血再灌注血脑屏障的通透性起到减轻脑水肿的作

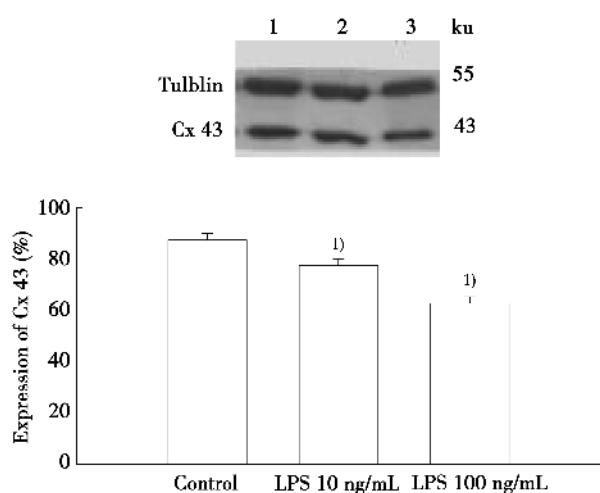


图 3 LPS 作用 24 h 对 NRK52E 细胞间 Cx43 表达的影响

Fig.3 The expression of Cx43 between NRK52E cell after treatment with LPS for 24 h

\* Compared with control group,  $P < 0.05$ .

1: Control group; 2: LPS 10 ng/mL group; 3: LPS 100 ng/mL group

用<sup>[9]</sup>。肾小管上皮细胞主要表达的缝隙连接蛋白主要是 Cx37、Cx40、Cx43<sup>[10-11]</sup>,其中 Cx43 蛋白是主要蛋白之一。本研究发现, NRK52E 细胞之间有 Cx43 蛋白的表达,内毒素处理后, Cx 43 蛋白表达有所减弱,并且有内毒素浓度依赖性。这一结果进一步证实 NRK52E 细胞之间有 Cx 43 蛋白分布,并且内毒素可能通过降低 Cx 43 蛋白的表达来影响 GJ 的功能。Parachute Assay 法是目前研究细胞间 GJ 功能的特异性方法,主要原理是荧光试剂 calcine-AM 和 Dil-CM 只能通过 GJ 传递;供体细胞含有荧光试剂,与受体细胞共同孵育后,荧光显微镜下观察供体细胞周围传递荧光的受体细胞数目<sup>[12]</sup>。我们的研究结果显示: LPS 能够抑制 Calcine-AM 在 NRK52E 细胞间的传递数目,随着其浓度增加 NRK52E 细胞间传递数目逐步减少;内毒素浓度与 NRK52E 细胞间 GJ 传递数目呈负相关, NRK52E 细胞间缝隙连接荧光传递数目与细胞生长呈现正相关,这些结果提示 GJ 功能活动参与了 NRK52E 细胞的生长,内毒素对 NRK52E 细胞的毒性作用可能与其影响细胞间 GJ 功能有关。

综上所述,内毒素对 NRK52E 细胞产生毒性作用, NRK52E 细胞间 GJ 功能的变化可能是内毒素的损伤机制之一。

#### 参考文献:

- [1] Olesen ET, de Seigneux S, Wang G, et al. Rapid and segmental specific dysregulation of AQP2, S256-pAQP2 and renal sodium transporters in rats with LPS-induced endotoxaemia [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2009, 24 (8): 2338-2349.
- [2] Saez JC, Berthoud VM, Branes MC et al. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83: 1359-1400.
- [3] Myers PR, Wright TF, Tanner MA, et al. EDRF and nitric oxide production in cultured endothelial cells: direct inhibition by endotoxin [J]. *Am J Physiol*, 1992, 262(3): H710-H718.
- [4] Tao L, Harris AL. 2-aminoethoxydiphenyl borate directly inhibits channels composed of connexin26 and/or connexin32 [J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 71(2): 570-579.
- [5] Heyman SN, Darmon D, Goldfarb M, et al. Endotoxin-induced renal failure: A role for altered renal microcirculation [J]. *Exp Nephrol*, 2000, 8(4-5): 266-274.
- [6] Wei CJ, Xu X, Lo CW. Connexins and cell signaling in development and disease [J]. *Ann Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20(4): 811-838.
- [7] Kalvelyte A, Imbrasaitė A, Bukauskiene A, et al. Connexins and apoptotic transformation [J]. *Biochem*, 2003, 66 (4): 1661-1672.
- [8] Huang RP, Hossain MZ, Huang R, et al. Connexin 43 (cx43) enhances chemotherapy induced apoptosis in human glioblastoma cells [J]. *Cancer*, 2001, 92(1): 130-138.
- [9] Li Z, Lin XM, Gong PL, et al. Effects of Ginkgo biloba extract on gap junction changes induced by reperfusion/reoxygenation after ischemia/hypoxia in rat brain [J]. *Am J Chin Med*, 2005, 33(6): 923-934.
- [10] Takenaka T, Inoue T, Kanno Y, et al. Expression and role of connexins in the rat renal [J]. *Kidney International*, 2008, 73(4): 415-422.
- [11] Haefliger JA, Demotz S, Braissant O, et al. Connexins 40 and 43 are differentially regulated within the kidneys of rats with renovascular hypertension [J]. *Kidney Int*, 2001, 60(1): 190-201.
- [12] Haefliger JA, Krattinger N, Martin D, et al. Connexin43-dependent mechanism modulates renin secretion and hypertension [J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(2): 405-413.

(编辑 徐杰)