

白蛋白对近端肾小管上皮细胞增殖与凋亡的影响

孙良忠, 岳智慧, 陈述枚

(中山大学附属第一医院儿科, 广东 广州 510080)

摘要: **【目的】**探讨白蛋白对近端肾小管上皮细胞(PTCs)增殖与凋亡的影响。**【方法】**用不同剂量(0.1, 0.5, 1, 5, 10, 30 mg/mL)去脂牛血清白蛋白(dBSA)超载体外培养的 NRK52E, dBSA 0 mg/mL 作为对照。细胞增殖活性用 MTS 比色法检测和显微镜观察。细胞凋亡检测: 荧光染料 DAPI 染核, DNA 梯带实验, 原位末端标记(TUNEL)实验和苔盼蓝染色计数。**【结果】**高剂量 dBSA 超载未完全融合 NRK52E 细胞 144 h 后细胞变得更密集。MTS 比色结果发现, 高剂量 dBSA(5、10、30 mg/mL)超载可明显诱导 NRK52E 细胞增殖, 增殖活性分别为 $(0.700 \pm 0.045) A$ 、 $(1.021 \pm 0.029) A$ 和 $(1.273 \pm 0.173) A$, 较对照细胞 $(0.441 \pm 0.020) A$ 显著升高, P 均 < 0.05 。高剂量 dBSA 超载的 NRK52E 细胞, 有较多出现核碎裂和核固缩, 有较强 DNA 梯带和原位末端标记信号。苔盼蓝染色计数发现, 高剂量 dBSA(5、10、30 mg/mL)超载 NRK52E 细胞 72 h 的死亡细胞数 $[(680\ 000 \pm 28\ 618)/mL]$ 、 $(970\ 000 \pm 52\ 915)/mL$ 和 $(1\ 132\ 500 \pm 88\ 954)/mL$ 较对照的死亡细胞数 $[(312\ 500 \pm 28\ 395)/mL]$ 显著升高, P 均 < 0.05 ; 而且死亡细胞数呈剂量依赖性。**【结论】**白蛋白超载 NRK52E 细胞既可诱导细胞增殖, 又可诱导细胞凋亡。

关键词: 白蛋白; 肾小管上皮细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡

中图分类号: R692.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)06-0649-05

Effects of Albumin on Proliferation and Apoptosis in Proximal Renal Tubular Cells

SUN Liang-zhong, YUE Zhi-hui, CHEN Shu-mei

(Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-Sen University, Guangzhou, 510080, P.R. China)

Abstract: **【Objective】** To study the effects of albumin overload on proliferation and apoptosis in proximal tubular epithelial cells (PTCs). **【Methods】** Different concentration of delipidated bovine serum albumin (dBSA) ranged from 0.1-30 mg/mL were added to NRK52E cells cultured in vitro; dBSA 0 mg/mL as control. Cell proliferation was observed under microscope and measured by One Solution Cell Proliferation Assay Kit (MTS assay). Apoptosis were detected by following methods: DNA laddering assay, In situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL assay), nuclei changes were observed under immunofluorescent microscope after stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) and total death cells were counted with trypan blue staining under light microscope. **【Results】** Under light microscope, sub-confluent NRK52E cells became more confluent after dBSA overload 144 h. MTS assay revealed that higher dosages of dBSA (5, 10, and 30 mg/mL) overload induced significant proliferation $(0.700 \pm 0.045A, 1.021 \pm 0.029 A, \text{ and } 1.273 \pm 0.173 A, \text{ respectively})$ 48 hours later in NRK52E, and were higher than that of control cells $(0.441 \pm 0.020 A)$, $P < 0.05$. In higher dosages of dBSA (5, 10, and 30 mg/mL) overload NRK52E cells, there were more condensed or broken nuclei, stronger DNA ladders and more positive signals in TUNEL assay than those in lower dosages of dBSA overload or control NRK52E cells. Trypan blue staining revealed that death cells in higher dosages of dBSA (5, 10, and 30 mg/mL) overload NRK52E $(680\ 000 \pm 28\ 618/mL, 970\ 000 \pm 52\ 915/mL, \text{ and } 1\ 132\ 500 \pm 88\ 954/mL, \text{ respectively})$ were higher than that of control cells $(312\ 500 \pm 28\ 395/mL)$, $P < 0.05$; And death cells increased in a dose-dependent manner after dBSA overload. **【Conclusion】** Albumin overload could induce proliferation and apoptosis in PTCs.

Key words: albumin; proximal tubular epithelial cells; proliferation; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(6):649-653]

收稿日期: 2007-04-25

基金项目: 广东省自然科学基金(06300772), 广东省医学科研基金(B2004033)

作者简介: 孙良忠(1970-)男, 湖南宜章人, 博士, 讲师, Email: sunlzh@mail.sysu.edu.cn

蛋白尿作为众多肾小球疾病的共同特点,不仅提示肾小球的损害程度,而且可能导致肾小管间质损害,促进疾病的进展^[1,2]。但是蛋白尿引起肾小管间质损害的机理仍未完全明了,目前也缺乏有效的预防和治疗措施^[3]。白蛋白是蛋白尿的主要成分^[4]。早期研究发现,白蛋白超载近端肾小管上皮细胞(proximal tubular epithelial cells, PTCs),即在培养液加入大剂量白蛋白,可诱导 PTCs 增殖,但另有研究发现,大剂量白蛋白超载可诱导近端及远端肾小管上皮细胞凋亡^[5,6]。我们前期研究发现,在大鼠阿霉素肾病模型中,大量蛋白尿持续一段时间(20周)后有大量肾小管上皮细胞发生凋亡^[7-9]。过度的细胞增殖或细胞凋亡都是病理状态下的表现,都可能促进疾病进展^[9,10]。白蛋白超载 PTCs 后是诱导细胞增殖还是凋亡,目前尚没有一致意见^[11]。本研究拟观察白蛋白超载 PTCs 对细胞增殖和凋亡两方面的影响,以进一步探讨白蛋白对 PTCs 的损害机制。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

正常大鼠近端肾小管上皮细胞株(Normal rat kidney cell line 52E, NRK52E)细胞接种在 6 孔培养板或每孔含有 4 片小圆盖玻片的 6 孔培养板上。细胞培养至 70%融合(未完全融合)或 100%融合(完全融合)后,用无血清 DMEM 洗 2 次,去血清培养 24 h。然后分别给予不同剂量的去脂牛血清白蛋白(delipidated bovine serum albumin, dBSA),剂量范围:0.1~30 mg/mL, dBSA 0 mg/mL 作为对照。实验观察 48 h 和 72 h。dBSA 超载后在显微镜下观察细胞生长情况,部分实验观察至 dBSA 超载后 144 h。

1.2 细胞增殖活性的检测

细胞增殖活性检测用 Promega 公司 CellTiter 96[®] AQueous 细胞增殖一步法检测试剂盒,即四甲基偶氮唑盐[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS]改良比色法检测。按说明书方法进行。为了消除死亡细胞对结果的影响,取 630 nm 滤光片测得的结果为实际值。所有实验组和对照组均重复 3 次。

1.3 细胞凋亡的检测

1.3.1 细胞核形的观察 dBSA 超载至 72 h 后,用 PBS 洗涤 3 遍培养在盖玻片上的 NRK52E 细胞。加入-20 固定液(甲醛:丙酮,7:3 混合)固定 10 min。用抗大鼠 E-钙粘蛋白抗体(BD Biosciences)的免疫荧光实验显示细胞膜的情况,滴加含 5 $\mu\text{g/mL}$ (4',6'-diamidino-2-phenylindole, DAPI, Vector Laboratories)的封片胶至细胞面染核后,封片。荧光显微镜观察细胞核形变化,照相。

1.3.2 DNA 梯带试验 用 Calbiochem 公司的 Suicide-Track[™] DNA 梯带分离试剂盒。按说明书方法进行。

1.3.3 原位末端缺口标记细胞凋亡检测法 (In situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL 法)用 Roche 荧光标记原位细胞死亡检测试剂盒。按说明书方法进行。

1.3.4 苔盼蓝染色计数死亡细胞 不同剂量 dBSA, 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 30 mg/mL, 超载 NRK52E 细胞 72 h 后,收集悬浮细胞和胰酶消化的细胞。离心沉淀后,用生理盐水重悬细胞,取等量细胞悬液与苔盼蓝(Sigma)混合,调整每大方格细胞数为 20-50 格,5 min 后在显微镜下计数,着色的细胞为死亡细胞;实验重复 3 次。

1.4 统计分析

所有数据用均数 \pm 标准差表示。数据分析用 Kruskal-Wallis 方法。所有检验用 SPSS 11.5 处理。P < 0.05 视为差异有显著性。

2 结果

2.1 dBSA 超载 NRK52E 细胞诱导细胞增殖

MTS 比色结果显示高剂量 dBSA (5、10、30 mg/mL) 超载 NRK52E 细胞的增殖活性较对照细胞明显升高,差异有显著性, P 均 < 0.05; 低剂量 dBSA (0.1、0.5、1.0 mg/mL) 超载 NRK52E 细胞的增殖活性较对照细胞也有升高,但差异无显著性, P 均 > 0.05 (图 1, 表 1)。显微镜下观察细胞生长至 dBSA 超载后 144 h 发现,高剂量 dBSA (5、10、30 mg/mL) 超载的未完全融合 (70%融合度) NRK52E 细胞变得更密集 (图 2)。

2.2 dBSA 超载 NRK52E 细胞诱导细胞凋亡

2.2.1 显微镜下细胞核形变化 dBSA 超载 NRK52E 细胞 72 h 后有部分细胞悬浮在培养液

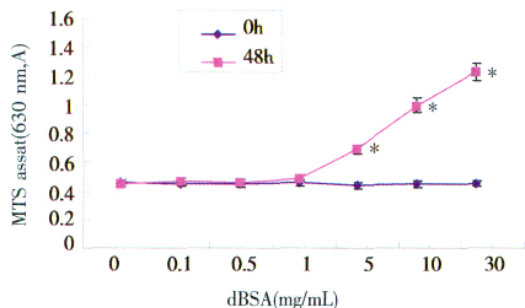


图 1 MTS 比色实验测定 dBSA 超载 NRK52E 细胞 48 h 的增殖活性

Fig.1 Cell proliferation of NRK52E after dBSA overload for 48 h

MTS assay revealed that dBSA exposure induced a dose - dependent proliferation in NRK52E. *compared with control, $P < 0.05$.

表 1 MTS 比色测定 dBSA 超载 NRK52E 细胞 48 h 的增殖活性

Table 1 MTS assay revealed cell proliferation of NRK52E after dBSA overload for 48 h

dBSA (mg/mL)	A_{630}	χ^2	P
0	0.441 4 ± 0.020 3	-	-
0.1	0.460 4 ± 0.033 8	0.048	0.827
0.5	0.454 3 ± 0.036 1	2.40	0.121
1	0.487 5 ± 0.016 9	5.15	0.076
5	0.700 1 ± 0.044 8 ¹⁾	9.23	0.026
10	1.020 7 ± 0.029 2 ¹⁾	13.58	0.009
30	1.273 0 ± 0.173 0 ¹⁾	17.42	0.004

Compared with control, 1) $P < 0.05$

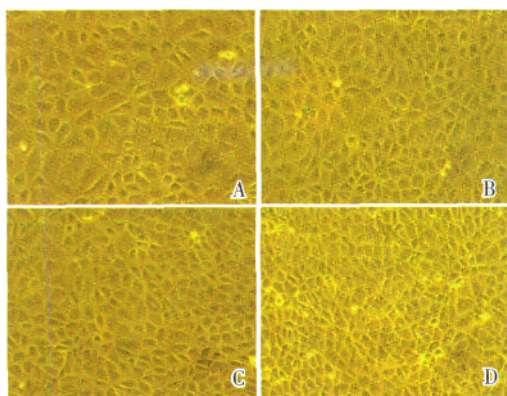


图 2 dBSA 超载未完全融合 NRK52E 细胞 144 h 后的增生情况。

Fig.2 Cell proliferation after dBSA exposure to sub-confluent NRK52E for 144 h.

A: control cells, cells became hypertrophy, cell number is fewer. B: dBSA 1 mg/mL, cells became hypertrophy as well, cell number increased mildly. C: dBSA 10 mg/mL, cell number increased apparently. D: dBSA 30 mg/mL, cell number increased apparently and cells reached confluent. Light microscope, $\times 400$

中, 在高剂量 dBSA (5, 10, 30 mg/mL) 超载的 NRK52E 更为明显。荧光显微镜下观察用 DAPI 染核的培养在盖玻片上的细胞发现, 高剂量 dBSA (5, 10, 30 mg/mL) 超载的 NRK52E 细胞, 有较多细胞核出现核碎裂和核固缩 (图 3), 部分细胞与邻近的细胞分离。低剂量和对照组的细胞偶见核碎裂和核固缩, 无明显细胞分离现象。

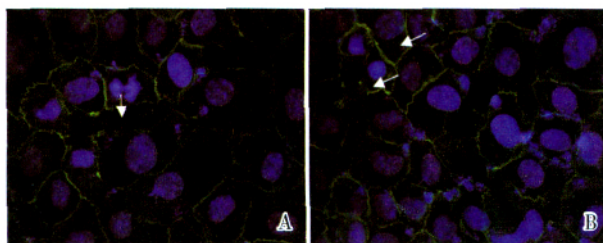


图 3 dBSA 超载 NRK52E 细胞 72 h 后细胞核形的改变

Fig.3 Nuclei changes after dBSA exposure to NRK52E for 72 h

A: dBSA 10 mg/mL, a cell with splitting nucleus (arrow) detached from neighboring cells. B: dBSA 30 mg/mL, two condensed nuclei (arrow). Immunofluorence, stained by DAPI, $\times 400$

2.2.2 DNA 梯带实验结果 高剂量 dBSA (5, 10, 30 mg/mL) 超载的 NRK52E 细胞有较强 DNA 梯

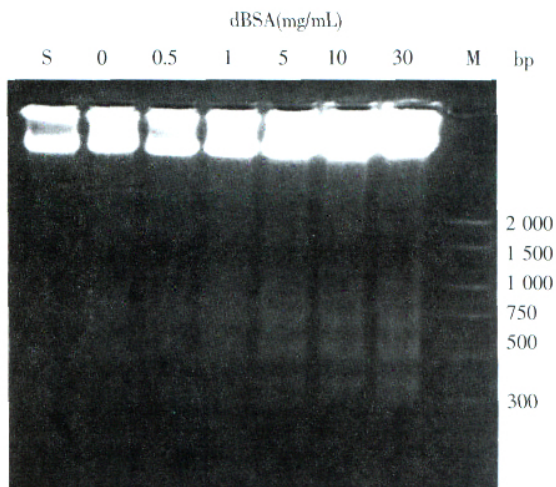


图 4 DNA 梯带实验示 dBSA 超载 NRK52E 细胞 72 h 的 DNA 梯带

Fig.4 DNA laddering assay of DNA ladders in NRK52E after dBSA exposure for 72 h

Higher dosages of dBSA (5,10,30 mg/mL) exposure to NRK52E induced stronger ladders. N: normal cultured NRK52E (containing 5% FCS in media), M: DNA molecular weight marker. (Note: As dBSA induced a dose - dependent proliferation in NRK52E, there was more DNA contained in higher dosage of dBSA overload sample which is easy mistaken as loading error)

带,低剂量 dBSA (0.5, 1.0 mg/mL) 超载的和对照 NRK52E 细胞则只有较弱 DNA 梯带,正常培养(用含 5%FCS 的 DMEM 培养)的 NRK52E 细胞,没有明显 DNA 梯带(图 4)。

2.2.3 TUNEL 实验 对培养在盖玻片上的 NRK52E 细胞进行荧光标记 TUNEL 实验。结果也发现,高剂量 dBSA (5, 10, 30 mg/mL) 超载 NRK52E 细胞有较多的阳性信号。低剂量 dBSA (0.5, 1.0 mg/mL) 超载的和对照 NRK52E 细胞阳性信号较少(图 5)。

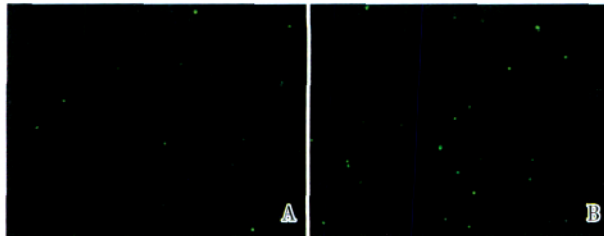


图 5 荧光标记 TUNEL 实验示 dBSA 超载 NRK52E 细胞 72 h 诱导细胞凋亡情况

Fig.5 TUNEL assay of apoptosis in NRK52E after dBSA exposure for 72 h

Fluorescent TUNEL assay. A: control NRK52E (dBSA 0 mg/mL), there were a few positive signals. B: dBSA (30 mg/mL) exposure, there were more positive signals

2.2.4 苔盼蓝染色计数结果 高剂量 dBSA 超载 (5, 10, 30 mg/mL) 超载 NRK52E 细胞 72 h 的死亡细胞数较对照和低剂量 dBSA (0.1, 0.5, 1.0 mg/mL) 超载 NRK52E 细胞的死亡细胞数明显增加,差异有显著性, P 均 < 0.05 (表 2); 而且死亡细胞数的增加与 dBSA 超载呈剂量依赖性(图 6)。

表 2 苔盼蓝染色计数 dBSA 超载 NRK52E 细胞 72 h 的死亡细胞数

Table 2 Trypan blue stained counting of death cells after dBSA exposure to NRK52E for 72 h

dBSA (mg/mL)	Death cells/mL	χ^2	P
0	312 500 \pm 28 395	-	-
0.1	343 500 \pm 38 604	1.19	0.275
0.5	332 500 \pm 23 848	1.689	0.430
1.0	427 500 \pm 26 458	7.21	0.066
5.0	680 000 \pm 28 618 ¹⁾	11.43	0.022
10	970 000 \pm 52 915 ¹⁾	15.13	0.010
30	1 132 500 \pm 88 954 ¹⁾	18.56	0.005

Compared with control, 1) $P < 0.05$

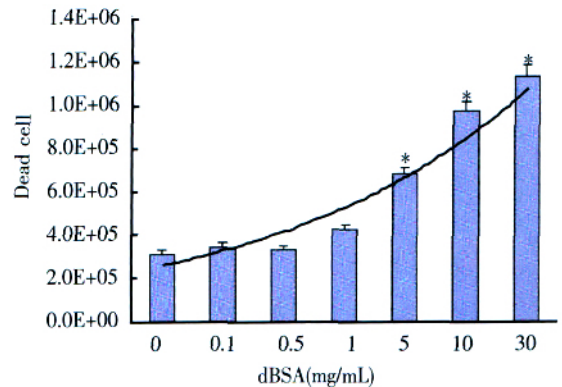


图 6 苔盼蓝染色计数 dBSA 超载 NRK52E 细胞 72 h 的死亡细胞数

Fig.6 Trypan blue stained counting of death cells after dBSA exposure to NRK52E 72 h

The number of death cells increased in a dose dependent manner for 72 h after dBSA exposure to NRK52E. * compared with control sample, $P < 0.05$

3 讨论

细胞增殖和凋亡是细胞生长过程的两种生物学现象,存在于组织器官的新陈代谢过程中,适当的细胞增殖和凋亡是维持组织器官正常结构和功能所必须的。但是过度的细胞增殖或凋亡则可能造成组织器官结构和功能的丧失,是病理状态下表现。白蛋白超载是众多伴有大量蛋白尿的肾脏疾病所存在的一种状态。本研究发现,白蛋白超载 PTCs 对细胞增殖和凋亡均有激活作用。这可能是蛋白尿造成肾小管间质损害的重要方面。

细胞增殖和凋亡是两种对立的生物学过程。在病理因素作用下,细胞继续生存或死亡是细胞面临的两种对立的生物学选择。对于一个细胞来讲,只能选择其一;生存的细胞可能发生增殖或转型,死亡的细胞可能发生凋亡或坏死。对于一组细胞来讲,最终做出哪一个选择,除了受病理损伤因素性质和强弱的影响外,还与细胞本身的状态、邻近细胞的调节信号和周围环境等因素有关^[10]。因此,在同一作用因素下,有的细胞可能发生增殖,有的则可能发生凋亡甚至坏死。本研究发现,在白蛋白超载情况下,PTCs 既有发生增殖,又有发生凋亡,并不是矛盾的结果。这除了说明白蛋白超载对 PTCs 有损伤作用外,还提示白蛋白超载对 PTCs 的损伤机制是复杂的。

白蛋白引起 PTCs 增殖和凋亡的机理仍有待进一步明确。早期研究发现,白蛋白超载可激活磷

脂酰肌醇3激酶(Phosphatidylinositol 3-Kinase, PI3K),诱导PTCs增殖^[5]。另有研究发现,较大剂量的白蛋白(大于5 mg/mL)超载可诱导fas抗原表达,通过激活fas-FADD-caspase-8信号通路引起PTCs凋亡^[6]。在白蛋白超载的小鼠模型,有研究发现促进细胞凋亡的神经胶质成熟因子-β(glia maturation factor-β, GMF-β)在PTCs表达增加,PTCs的抗氧化酶活性降低。说明在白蛋白超载的情况下,PTCs易于发生凋亡^[12]。

近年来有观点认为,白蛋白引起PTCs增殖和凋亡可能与H₂O₂的产生有关^[13]。白蛋白超载PTCs可激活蛋白激酶-C(protein kinase C, PKC),后者激活NADPH氧化酶,产生超氧阴离子和H₂O₂^[11]。在肿瘤细胞,有研究发现H₂O₂可激活凋亡信号调节激酶-1(apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1),激活的ASK1可促进P38和JNK(junctional adhesion molecules, JNK)的磷酸化,进而激活caspases,诱导细胞凋亡。而H₂O₂同时又可激活PI3K和Akt/PKB(protein kinase B),抑制ASK1活性。目前认为,白蛋白超载PTCs时,上述两条信号途径均被H₂O₂激活。上述信号网络最终导致细胞凋亡或增殖取决于H₂O₂所产生氧化作用的强度。但这一观点尚未完全在白蛋白超载PTCs上证实^[11]。

总之,本研究表明,白蛋白超载对PTCs有损伤作用,既可诱导PTCs增殖,又可诱导PTCs凋亡。

参考文献:

- [1] ABBATE M, ZOJA C, REMUZZI G. How does proteinuria cause progressive renal damage? [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(11): 2974-2984.
- [2] GANSEVOORT R T, BAKKER S J, DE JONG P E. Early detection of progressive chronic kidney disease: is it feasible? [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(5): 1218-1220.
- [3] 阳晓,叶任高,刘冠贤,等. 38年中西医结合治疗肾脏病的临床和实验研究[J]. *中山医科大学学报*,

2000, 21(06): 201-208.

- [4] 钱白音,邹和群,黄志清,等. 原发性慢性肾小球肾炎与尿白蛋白片段的关系[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2004, 25(04): 347-349.
- [5] DIXON R, BRUNSKILL N J. Activation of mitogenic pathways by albumin in kidney proximal tubule epithelial cells: implications for the pathophysiology of proteinuric states [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10(7): 1487-1497.
- [6] ERKAN E, DEVARAJAN P, SCHWARTZ G J. Mitochondria are the major targets in albumin-induced apoptosis in proximal tubule cells [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(4): 1199-1208.
- [7] 孙良忠,岳智慧,汤洁如,等. 细胞凋亡在阿霉素肾病大鼠肾小球硬化过程中的意义[J]. *中华儿科杂志*, 2000, 38(5): 285-287.
- [8] 孙良忠,岳智慧,陶瑜,等. 依那普利延缓肾小球硬化与肾小球细胞凋亡的关系[J]. *中华儿科杂志*, 2001, 39(5):289-292.
- [9] 孙良忠,岳智慧,陈述枚,等. 大鼠阿霉素肾病肾小球细胞凋亡介导因子的表达和ACEI的影响[J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2003, 24(4):347-351.
- [10] LIU Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(1): 1-12.
- [11] MORIGI M, MACCONI D, ZOJA C, et al. Protein overload induced NFB activation in proximal tubular cells requires H₂O₂ through a PKC dependent pathway [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(5): 1179-1189.
- [12] KAIMORI J, TAKENAKA M, NAKAJIMA H, et al. Induction of glia maturation factor-beta in proximal tubular cells leads to vulnerability to oxidative injury through the p38 pathway and changes in antioxidant enzyme activities [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(35): 33519-33527.
- [13] IMAI E, NAKAJIMA H, KAIMORI J Y. Albumin turns on a vicious spiral of oxidative stress in renal proximal tubules [J]. *Kidney Int*, 2004, 66(5): 2085-2087.

(编辑 张恩健)