论著

文章编号:1000-5404(2008)22-2120-04

白藜芦醇苷对缺氧复氧HK2细胞损伤保护作用的研究

胡语航[1],王兴勇[1],何素蓉[2],杨廷芳[1],徐 静[1],熊 燚[1],周海银[1],何 蓉[1] ([1]重庆医科大学附属儿童医院ICU,重庆 400014;[2]重庆市第一人民医院儿科,重庆 400010)

摘 要:目的 探讨白藜芦醇苷(polydatin, PD)对缺氧复氧(hypoxia/re-oxygenation, H/R)肾小管上皮细胞损伤的保护作用。**方法** 在缺氧仓中充入95% N_2、5% CO_2混合气体模拟缺氧环境,将人近曲肾小管上皮细胞(human kidney proximal tubular epithelial cell, HK2)根据不同处理分为4组:正常对照组、H/R组、PDTC组和PD处理组,除对照组外每组均予以先缺氧24 h后复氧6 h处理;MTT法检测细胞成活数,免疫组化法检测NF-κB p65蛋白表达情况,RT-PCR检测ICAM-1 mRNA转录,ELISA法检测ICAM-1蛋白表达情况。**结果** PD处理组各对应时间点HK2细胞数量明显增多于H/R组,统计学差异显著($P<0.05$)。PD处理组NF-κB p65蛋白阳性表达,ICAM-1 mRNA转录及ICAM-1蛋白表达均明显低于对照组,有统计学差异($P<0.05$)。PD处理组与PDTC组各对应时间点的各项检测指标比较均无显著统计学差异($P>0.05$)。**结论** PD对H/R诱导的HK2细胞损伤具有一定的保护作用。

关键词: 白藜芦醇苷;缺氧复氧;HK2;核因子-κB;细胞间黏附分子-1

中图法分类号: R285.5;R364.4;R692.602 **文献标识码:** A

Protective effect of polydatin on hypoxia/re-oxygenation induced HK2 cell injury

HU Yu-hang[1], WANG Xing-yong[1], HE Su-rong[2], YANG Ting-fang[1], XU Jing[1], XIONG Yi[1], ZHOU Hai-yin[1], HE Rong[1] ([1]ICU, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014; [2]Department of Pediatrics, Chongqing First People's Hospital, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To study the protective effect of polydatin (PD) on hypoxia/re-oxygenation induced HK2 cell injury *in vitro*. **Methods** Human kidney proximal tubular epithelial cell line HK2 cell was used as target cell. The cells were divided into 4 groups: control group, model group, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) group and PD group. Except the control group, the cells in the other three groups were exposed to hypoxia for 24 h, 30 min before which PD and PDTC were respectively added to the culture media of PDTC group and PD group, then to normoxia for 6 h. Cell survival was assessed by MTT, the protein expression of nuclear factor-κB (NF-κB) p65 was measured by immunohistochemistry, the mRNA and protein expressions of ICAM-1 were measured by RT-PCR and ELISA respectively. **Results** The HK2 survival cells were significantly more in PD treatment group than those in model group ($P<0.05$). The NF-κB p65 expressions, ICAM-1 mRNA transcriptions and protein expressions of HK2 cells, were significantly decreased in PD treatment group compared with those in control group ($P<0.05$). There were no significant differences of the parameters mentioned above were found between the PDTC group and the PD group ($P>0.05$). **Conclusion** Polydatin has a protective effect on hypoxia/re-oxygenation induced HK2 cell injury, presumably *via* inhibiting the activation of NF-κB, downregulating the ICAM-1 mRNA transcription and protein expression on the surface of HK2 and finally reducing the adhesion of polymorphonuclear neutrophils.

Key words: polydatin; hypoxia/re-oxygenation; HK2; nuclear factor-κB; ICAM-1

白藜芦醇苷(polydatin, PD)是中药虎杖的一种有效成分,为多酚植物,其结构为3,4',5-三羟基芪-3-β-单-D-葡萄糖苷,在保护心肌细胞、血管平滑肌细胞、抗血小板聚集、改善微循环、抗氧自由基和抗炎症介质等方面具有明确的作用。但在体外试验中PD是否具有通过阻断缺氧所诱导的肾小管细胞内信号传导,继而

基金项目: 重庆市卫生局科研基金(20042186)
Supported by the Bureau of Public Health of Chongqing (20042186)
作者简介: 胡语航,女,四川省巴中市人,硕士研究生,主要从事MODS基础与临床方面的研究。E-mail:huyu5440066@163.com
通信作者: 王兴勇,E-mail:wxy9918@vip.sina.com
收稿日期: 2008-01-18;**修回日期:** 2008-03-20

抑制白细胞黏附达到减轻肾损伤的作用,鲜见报道。本研究采用人肾小管上皮细胞株(HK2 细胞)缺氧复氧损伤模型,探讨 PD 对肾小管上皮细胞炎症损伤的保护作用。

1　材料与方法

1.1　材料

人肾小管上皮细胞株 HK2(human kidney proximal tubular epithelial cell, 美国组织物培养细胞库 ATCC No. CRL-2190)购自中国典型培养物保藏中心。特级胎牛血清(天津 TBD 公司);DMEM 培养基(美国 GIBCO 公司);吡咯烷二硫氨基甲酸(Pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC,美国 Sigma 公司);MTT 试剂(美国 Amresco 公司);ICAM-1 ELISA 试剂盒(晶美生物工程有限公司);兔抗人 NF-κB P65 多克隆抗体(美国 Labvision 公司);大鼠抗兔二抗试剂盒(晶美生物工程有限公司);RT-PCR 试剂盒(杭州博日科技有限公司);PD 结晶(南方医科大学病理生理教研室)。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养及缺氧复氧(hypoxia/re-oxygenation, H/R)损伤模型的建立　　HK2 细胞常规培养于含 10% 特级胎牛血清的 DMEM 培养基中。当覆盖瓶底面积达 70% ~ 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化离心,完全培养基重悬,调整适宜细胞浓度,5% CO_2,37 ℃孵箱中培养 12 ~ 24 h 贴壁。处理前用无糖无血清 DMEM 培养基冲洗细胞后再加入无糖无血清 DMEM 培养基[1]。按下列分组进行处理:① 正常对照组:置培养板于 5% CO_2,37 ℃孵箱中;② H/R 组:置培养板于缺氧仓内,打开进出口阀门,调节气体减压阀和流量表,以 2 L/min 的速度充入混合气体(95% N_2 与 5% CO_2)5 min,缺氧仓内氧浓度仪示 O_2 浓度稳定至 0.1% ~0.2%,同时关闭进出口阀,再一起放入 37 ℃孵箱内。缺氧 24 h 后取出,更换新鲜无糖 DMEM 培养基,放入 5% CO_2,37 ℃孵箱中继续培养 6 h;③ PDTC 组:缺氧复氧前 30 min 每孔中加入 PDTC(NF-κB 的特异性抑制剂,终浓度为 50 μmol/L);④ PD 处理组:缺氧复氧前 30 min 每孔中加入 PD(终浓度为 0.5 mmol/L)。

1.2.2　MTT 法测定细胞增殖　　HK2 细胞按分组每孔 1.0×10^4 个接种于 96 孔培养板中,给予 H/R 处理后,490 nm 处用酶标仪测定各孔吸光度值[$D(490)$],设复孔,重复 5 次。

1.2.3　RT-PCR 检测 ICAM-1mRNA 的表达　　首先采用 RNA 提取试剂盒按说明书操作抽提细胞总 RNA,再逆转录成cDNA,以适量 cDNA 为模板,在 *Taq* DNA 聚合酶催化下行 PCR 扩增。

引物设计参照文献[2],上游:5′-CAGTCACCTATGGCAACGAC-3′,下游:5′-ATTCAGCGTCACCTTGGCTC-3′。β-actin 上游:5′-CTACAATGAGCTGCGTGTGG-3′,下游:5′-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3′。PCR 扩增条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃ 变性 0.5 min,60 ℃退火 0.5 min,72 ℃延伸 1 min,共 34 个循环,最后 72 ℃延伸 5 min。终产物分别为 243 bp 和 527 bp。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,应用 Quantity One 凝胶成像分析系统拍照并对各扩增带进行光密度扫描。

1.2.4　ELISA 法检测细胞培养上清液 ICAM-1 的含量　　每孔加入待测样品 100 μl,在酶标仪波长 450 nm 处测定吸光度值。

1.2.5　免疫组化检测 NF-κB p65 的表达　　用4 ℃的丙酮制作细胞爬片。按照免疫组化试剂盒说明书操作步骤进行 NF-κB p65 免疫组化检测,显色,封片,拍照。通过 Image-Pro Plus 5.0 软件进行图片平均光密度比值的分析。

1.3　统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理,各间采用单因素方差分析,用 LSD 检验进行两两比较。

2　结果

2.1　HK2 细胞缺氧复氧形态学观察

倒置相差显微镜下观察 HK2 细胞生长状况:正常对照组细胞贴壁良好,呈扁平梭形,细胞数量较多,折光性好;H/R 组细胞数量明显减少,细胞贴壁率、折光性下降,细胞中颗粒增多,连接松散,细胞间可见较多细胞碎片;PDTC 组、PD 处理组与正常对照组比较形态改变不明显(图 1)。

2.2　MTT 比色分析

H/R 组与正常对照组相比,活细胞数量明显减少[(0.394 ± 0.084) *vs* (0.513 ± 0.121), $P < 0.05$]。PDTC 组(0.462 ± 0.089)、PD 处理组(0.457 ± 0.104)活细胞数量与 H/R 组[(0.394 ± 0.084)相比明显增多,差异显著($P < 0.05$)。PD 处理组与 PDTC 组比较无显著差异($P > 0.05$)。

2.3　PD 对 H/R 诱导 HK2 细胞 NF-κB 表达的影响

HK2 细胞正常对照组中仅见少量 NF-κB p65 在细胞质中呈弱阳性表达。余各组可见细胞质及胞核中均有 NF-κB p65 阳性表达,阳性表达产物棕黄色颗粒渐增多且加深(图 2)。H/R 组 NF-κB p65 阳性与正常对照组比较,表达的染色强度和范围达最大[(0.301 ± 0.058) *vs* (0.127 ± 0.033), $P < 0.05$]。PDTC 组(0.205 ± 0.052)、PD 处理组(0.218 ± 0.061)NF-κB p65 阳性表达较 H/R 组(0.301 ± 0.058)均明显下降,差异有显著性($P < 0.05$)。PD 处理组与 PDTC 组比较,差异不具有显著性($P > 0.05$)。

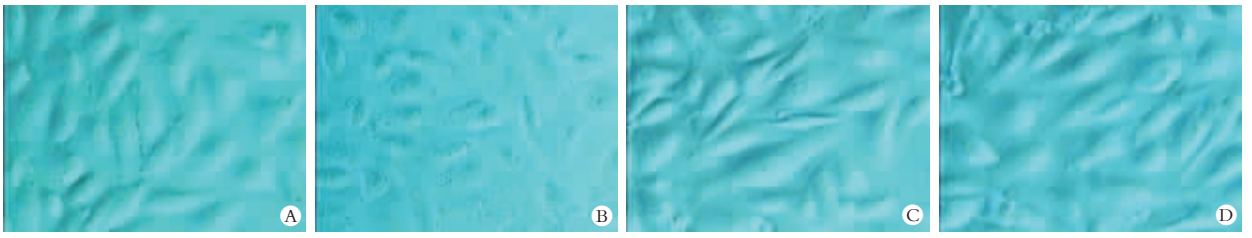
2.4　PD 对 H/R 诱导 HK2 细胞 ICAM-1 mRNA 及蛋白表达的影响

RT-PCR 半定量检测发现,基础状态下 HK2 细胞表达 ICAM-1 mRNA 的量极低(图 3)。与正常对照组比较,H/R 组 ICAM-1 mRNA 及蛋白表达明显上调,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。而加入 PDTC 及 PD 干预后,H/R 诱导 HK2 细胞 ICAM-1 mRNA 及蛋白表达量明显减少,与 H/R 组比较,差异显著($P < 0.05$)。PD 处理组与 PDTC 组比较,差异不显著($P > 0.05$,表 1、图 3)。

表 1　H/R 诱导 HK2 细胞 ICAM-1m RNA 光密度比值与 ICAM-1 蛋白浓度表达情况

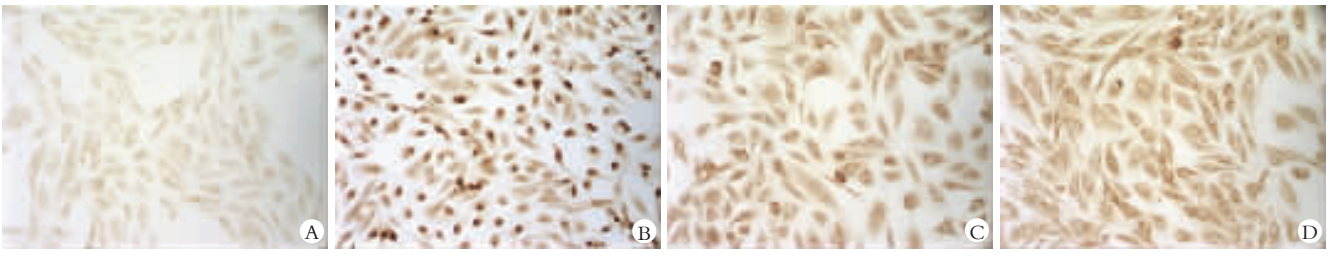
组别	光密度比值	蛋白浓度(pg/ml,ELISA)
正常对照组	0.14 ± 0.03	963.52 ± 109.81
H/R 组	0.29 ± 0.06[a]	2029.54 ± 154.80[a]
PDTC 组(50 μmol/L)	0.17 ± 0.03[b]	1367.64 ± 113.04[b]
PD 处理组(0.5 mmol/L)	0.18 ± 0.05[bc]	1425.39 ± 222.72[bc]

a:$P < 0.05$,与对照组比较;b:$P < 0.05$,与 H/R 组比较;c:$P > 0.05$,与 PDTC 组比较



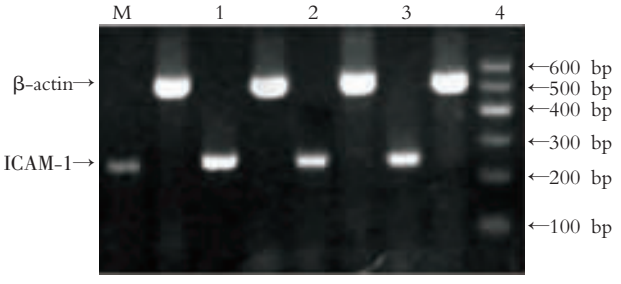
A：正常对照组；B：H/R 组；C：PDTC 组；D：PD 处理组

图 1 各组 HK2 细胞镜下形态学比较 （倒置相差显微镜 ×400）



A：正常对照组；B：H/R 组；C：PDTC 组；D：PD 处理组

图 2 免疫组化法检测各组 HK2 细胞 NF-κB p65 的表达 （SABC ×400）



M：标准；1：正常对照组；2：H/R 组；3：PDTC 组；4：PD 处理组

图 3 RT-PCR 方法检测 H/R 诱导 HK2 细胞 ICAM-1 mRNA 表达

3 讨论

肾小管上皮细胞对缺氧具有高度易感性，它既是缺氧损伤的靶细胞之一，也是缺氧损伤进展的主要参与者[3]。多形核白细胞黏附和其他炎症细胞浸润在急性缺血性肾损伤的发病机制中扮演重要角色，炎症细胞的激活和黏附分子的释放是组织损伤的关键反应。

NF-κB 是 1 种多效可诱导的核转录因子，能调节多种基因的表达和细胞因子的产生，广泛存在于真核细胞中。众多研究表明，它的活化与体内脏器缺血再灌注损伤有密切的关系。静息状态下，无活性的 NF-κB 大多以 P65-50-IκB 三聚体的形式存在于细胞质中，其中 IκB 起着抑制性亚单位的作用，当细胞受到刺激时，可使 IκB 基团磷酸化而降解，P65-50 二聚体即进入细胞核内与相应的基因结合而促进转录，其活化过程受到活性氧代谢产物的调节。NF-κB 可以调控任何含有 κB 位点的基因转录[4]，其下游基因包括黏附分子（ICAM-1、VCAM-1），细胞因子及其受体（IL-1、6、8，TNF-α）等。Combe 等[3]证明缺氧作为 1 个刺激因子可能通过激活 NF-κB 这一途径介导 ICAM-1 的合成及表达。在缺血再灌注所致炎症反应过程中，白细胞在血管内皮细胞表面滚动、黏附和穿越内皮移行至炎症部位是多形核白细胞（polymorphonuclear neutrophils，PMNs）激活和致炎的重要步骤，其分子基础是 PMNs 及血管内皮细胞表面的黏附分子相互作用及细胞因子对黏附分子表达的调节。国内外研究证实缺氧后肾小管上皮细胞可以产生 ICAM-1，促进局部炎症细胞浸润，激发肾小管间质的免疫炎症反应[3,5-7]。有资料表明 CD11/CD18 整合素和 ICAM-1 在缺血再灌注肾损伤的发病机制中具有重要作用[8]。NF-κB 活化、ICAM-1 mRNA 表达增多、ICAM-1 介导的 PMNs 黏附的时间进程关系提示它们之间存在一定的因果关系[9]。

我们前期研究发现 PD 能明显降低内毒素休克大鼠肺组织中磷脂酶 A_2 活性，改善肺系数和肺通透指数，减少支气管肺泡灌洗液中蛋白含量，明显改善肺组织病理变化[10]；PD 能减轻脂质过氧化反应，降低缺血脑组织中 NDA 含量，提高体内 SOD、GSH-Px、CAT 活性，抑制或减轻脑水肿形成，保护细胞膜功能，减轻缺血神经元功能损害，对局灶性脑缺血损伤具有明显的保护作用[11]。

本研究表明现单纯 H/R 组细胞数量明显减少，细胞贴壁率、折光性下降，细胞中颗粒增多，连接松散，细胞间可见较多细胞碎片；NF-κB p65 阳性表达的染色强度和范围呈强阳性；ICAM-1 mRNA 及蛋白表达量明显上调。PD 处理组活细胞数量、NF-κB p65 阳性表达、ICAM-1 mRNA 及蛋白表达量与 H/R 组比较均明显下降，而 PD 处理组与 PDTC 组比较，各项检测指标均无显著性差异。提示 PD 可能通过抑制 H/R 损伤

早期 HK2 细胞中 NF-κB 的活化,进而下调 ICAM-1 等诸多炎性介质的过度表达,减轻 H/R 诱导的肾小管上皮细胞损伤及 PMNs 的聚集浸润。提示 PD 对 H/R 诱导的肾小管上皮细胞损伤可能具有一定的保护作用,其作用机制可能与其抑制 NF-κB 的活化,下调 HK2 细胞中 ICAM-1 mRNA 及蛋白的过度表达,减少白细胞的浸润有关。

参考文献:

[1] Basnakian A G, Ueda N, Hong X, *et al*. Ceramide synthase is essential for endonuclease-mediated death of renal tubular epithelial cells induced by hypoxia-reoxygenation[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2005, 288(2): F308 - F314.

[2] Taekema-Roelvink M E, Kooten C, Kooij S V, *et al*. Proteinase 3 enhances endothelial monocyte chemoattractant protein-1 production and induces increased adhesion of neutrophils to endothelial cells by upregulating intercellular cell adhesion molecule-1[J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(5): 932 - 940.

[3] Combe C, Burton C J, Dufourco P, *et al*. Hypoxia induces intercellular adhesion molecule-1 on cultured human tubular cells[J]. Kidney Int, 1997, 51(6): 1703 - 1709.

[4] Christman J W, Sadikot R T, Blackwell T S. The role of nuclear factor-kappa B in pulmonary diseases[J]. Chest, 2000, 117(5): 1482 - 1487.

[5] Xie J, Guo Q. Apoptosis antagonizing transcription factor protects renal tubule cells against oxidative damage and apoptosis induced by ischemia-reperfusion[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(12): 3336 - 3346.

[6] 陈建粮. 细胞间粘附分子 1 表达的调控[J]. 国外医学:免疫学分册, 2000, 23(5): 272 - 274.

[7] Zhou T, Sun G Z, Zhang M J, *et al*. Role of adhesion molecules and dendritic cells in rat hepatic/renal ischemia-reperfusion injury and anti-adhesive intervention with anti-P-selectin lectin-EGF domain monoclonal antibody[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(7): 1005 - 1010.

[8] Tian X F, Yao J H, Li Y H, *et al*. Effect of nuclear factor kappa B on intercellular adhesion molecule-1 expression and neutrophil infiltration in lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(3): 388 - 392.

[9] Mizuno S, Nakamura T. Prevention of neutrophil extravasation by hepatocyte growth factor leads to attenuations of tubular apoptosis and renal dysfunction in mouse ischemic kidneys[J]. Am J Pathol, 2005, 166(6): 1895 - 1905.

[10] Shu S Y, Wang X Y, Ling Z Y, *et al*. Effect of polydatin on phospholipase A2 in lung tissues in rats with endotoxic shock[J]. Chin J Traumatol, 2004, 7(4): 239 - 243.

[11] 黄　斌, 王兴勇, 匡凤梧, 等. 白藜芦醇苷对大鼠局灶性脑缺血的保护作用[J]. 中国急救医学, 2005, 25(3): 192 - 193.

(编辑　吴培红)

(上接 2119 页)

采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

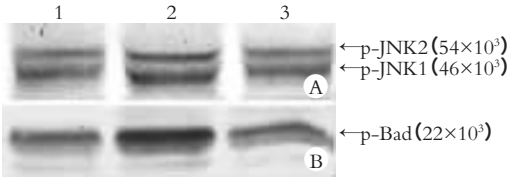
2　结果

2.1　海马 CA1 区组织中 JNK1/2 和 Bad(ser128)的磷酸化情况

Western blot 检测的结果显示:缺氧缺血后第 3 天 JNK1/2 和 Bad(ser128)的磷酸化水平 B 组明显高于 A 组($P<0.05$);C 组明显低于 B 组($P<0.05$,图 1)。

2.2　海马 CA1 区神经元数量

光镜观察焦油紫染色方法检测的结果显示:缺氧缺血后第 20 天海马 CA1 区 1 mm 距离内神经元数量 B 组(25.2 ± 11.4)明显少于 A 组(208.1 ± 18.5)($P<0.05$);C 组(136.8 ± 13.7)明显多于 B 组($P<0.05$),但少于 A 组($P<0.05$)。



A:JNK1/2 的磷酸化情况;B:Bad(128)的磷酸化情况。1:正常对照组;2:缺氧缺血非刺激组;3:丰富环境刺激组

图 1　Western blot 分别显示各组大鼠脑海马 CA1 区组织中 JNK1/2 和 Bad(ser128)的磷酸化情况

3　讨论

脑海马 CA1 区是对缺氧缺血最为敏感而发生大量细胞凋亡的区域之一[3]。本实验证实了丰富环境刺激组海马 CA1 区神经元数量明显多于缺氧缺血非刺激组,说明在大鼠比较幼小时的早期给予丰富环境刺激可以起到抑制海马 CA1 区神经元凋亡的作用。本研究结果证明:脑缺血再灌注激活 JNK,JNK 活性激活与神经元凋亡有关[1]。JNK 的天然底物是 c-Jun,它已被生物学家看成细胞杀手。Bad 上有一位点是丝氨酸 128 位点(ser 128),JNK1/2 可以直接作用于这个位点且有协同效应,即 JNK1/2 磷酸化的升高可以促使 Bad(ser128)磷酸化升高,进而促进细胞凋亡[3]。在实验中我们使用免疫印迹方法检测各组大鼠脑海马组织中 JNK1/2 和 Bad(ser128)磷酸化水平,发现刺激组的磷酸化水平明显低于非刺激组,因而推测 JNK 信号通路可能介导了丰富环境刺激对神经元的修复作用。是否与 JNK 通路以外的其他信号通路也有关,还有待于进一步证实。

关键词: 缺氧缺血性脑损伤;丰富环境;海马;JNK1/2;Bad(ser128)

中图法分类号: R741.02　　**文献标识码:** B

参考文献:

[1] Zhang Q G, Wu D N, Han D, *et al*. Critical role of PTEN in the coupling between PI3K/Akt and JNK1/2 signaling in ischemic brain injury[J]. FEBS Lett, 2007, 581(3): 495 - 505.

[2] Sale A, Putignano E, Cancedda L, *et al*. Enriched environment and acceleration of visual system development[J]. Neuropharmacology, 2004, 47(5): 649 - 660.

[3] Wang X T, Pei D S, Xu J, *et al*. Opposing effects of Bad phosphorylation at two distinct sites by Akt1 and JNK1/2 on ischemic brain injury[J]. Cell Signal, 2007, 19(9): 1844 - 1856.

(编辑　龙　亮)