DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.036
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
84 2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

# 论著

文章编号:1000-5404(2002)01-0084-02

## 牛磺酸和茵陈素对顺铂引起的原代培养肾小管上皮细胞内游离 $Ca^{2+}$ 浓度变化的影响

周世文,刘世杰 (第三军医大学附属新桥医院临床药理基地,重庆 400037)

提 要:目的 研究牛磺酸、茵陈素对顺铂引起的原代培养肾小管上皮细胞(PTC)内游离 $Ca^{2+}$ 浓度变化的影响。方法 在体外培养PTC、顺铂与PTC共同保温24 h,牛磺酸、茵陈素分别提前与PTC作用24 h,然后再加入顺铂(26 μmol·$L^{-1}$)共同保温24 h。采用Fura-2/AM测细胞内游离 $Ca^{2+}$ 浓度。结果 顺铂(13,26,52 μmol·$L^{-1}$)升高PTC细胞内游离 $Ca^{2+}$ 浓度,牛磺酸(1,10 g·$L^{-1}$)和茵陈素(4,8 mg·$L^{-1}$),可拮抗顺铂导致的PTC细胞内游离 $Ca^{2+}$ 浓度超载。结论 顺铂可引起原代培养肾小管上皮细胞内 $Ca^{2+}$ 超载,牛磺酸、茵陈素能拮抗顺铂导致的细胞内 $Ca^{2+}$ 超载,起到细胞保护作用。

关键词:顺铂;牛磺酸;茵陈素;肾小管上皮细胞;细胞内游离 $Ca^{2+}$ 浓度
中图法分类号:R284.1;R322.61;R979.19 文献标识码:A

## Effect of taurine and scoparoneon on cisplatin-induced cytosolic free [ $Ca^{2+}$ ] i overload in primary cultured rabbit proximal tubular cells

ZHOU Shi-Wen, LIU Shi-jie (Department of Clinical Pharmacology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

**Abstract:** Objective To study cisplatin-induced cytosolic free [ $Ca^{2+}$ ] i overload in primary culture of proximal tubular cells (PTC), and the preventing effect of taurine and scoparoneon in this event. Methods After proximal tubular cells (PTC) were isolated from New Zealand rabbits and cultured, some of them were incubated with cisplatin (0, 6.5, 13, 26, 52 μmol/L) for 24 h to induce cytosolic free [ $Ca^{2+}$ ]. And others were cultured in the mediums with taurine or scoparoneon for 24 h, and then for another 24 h after cisplatin (26 μmol/L) addition. Cytosolic free [ $Ca^{2+}$ ] i overload was measured with Fura-2/AM. Results ① Cisplatin (13, 26, 52 μmol/L) increased the concentration of $Ca^{2+}$ in PTC; ②Taurine (1, 10 g/L) and scoparoneon (4, 8 mg/L) significantly decreased cisplatin-induced cytosolic free [ $Ca^{2+}$ ] i overload respectively. Conclusion Cisplatin can induce cytosolic free [ $Ca^{2+}$ ] i overload in PTC, which can be prevented by taurine and scoparoneon.

**Key words:** cisplatin; taurine; scoparoneon; kidney proximal tubular cells; cytosolic free [ $Ca^{2+}$ ] i

顺铂在临床上广泛用于肿瘤的治疗。长期应用顺铂有明显的肾毒性。病人血清肌酐和尿素氮明显升高,并有明显的蛋白尿,严重的肾毒性限制了顺铂的应用。因此,国内外学者作了大量的工作,研究顺铂的肾损伤机制和寻找防治措施。目前,国内外多数的学者认为顺铂主要损伤近曲小管细胞[1],在细胞内有多个靶点。如伤害线粒体,抑制ATPase活力[2]等。有人发现顺铂导致大鼠皮质regucalcine(一种 $Ca^{2+}$ 结合蛋白,可缓冲细胞游离 $Ca^{2+}$)mRNA表达下降,同时,皮质内 $Ca^{2+}$ 浓度上升。因此,顺铂可能导致细胞内 $Ca^{2+}$ 超载,从而损伤肾脏[3]。牛磺酸可拮抗细胞内 $Ca^{2+}$ 超载,对 $Ca^{2+}$ 超载引起的损伤如缺血再灌注损伤有保护作用。茵陈素可减轻与顺铂有相似药理作用的DNA交联剂如环磷酰胺、氮芥的毒副作用。因此,本实验的目的是研究顺铂是否导致肾小管上皮细胞 $Ca^{2+}$ 超载,探讨牛磺酸、茵陈素对顺铂导致的肾小管上皮细胞 $Ca^{2+}$ 超载的药理作用。

作者简介:周世文(1956-),男,云南省罗平县人,硕士,教授,主要从事药物药理学和药物毒理学研究,发表论文70余篇。电话:(023)68755311

收稿日期:2001-02-18;修回日期:2001-10-12

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验动物、药物、试剂和主要仪器

1月龄的新西兰大白兔,雌雄不拘,体重(200±50)g,由第三军医大学实验动物中心提供。顺铂(Cisplatin)系山东齐鲁制药厂生产,牛磺酸(Taurine,含量大于90%)系南京制药厂生产,茵陈素(Scoparoneon,含量大于90%)系四川中药研究所万尧德老师惠赠。PRMI1640培养基购于美国Gibco公司,β-甘油磷酸钠购于瑞士Flank公司,小牛血清购于华西医科大学,Fura-2/AM购于美国Sigma公司,巴比妥钠,硝酸钙,硫酸镁、硫化胺,氯化钙和硫酸镁及其它普通试剂,均为国产分析纯。$CO_2$ 孵箱美国SHEL-LAB公司出品,荧光光度计540型为日本岛津公司出品。

#### 1.2 近端肾小管上皮细胞(PTC)分离和培养

参照田劲[4]方法,无菌条件下分离兔肾皮质,过216、172、108 μm筛网,最后收获172 μm和108 μm筛网上的肾小管,镜检肾小管纯度90%以上,分装于125 ml培养瓶中,置37 ℃,5% $CO_2$ 中培养,培养基采用含10%小牛血清的PRMI1640培养基。

#### 1.3 实验分组

取顺铂浓度6.5、13、26、52 μmol·$L^{-1}$ 与培养的原代肾小管上皮细胞在37 ℃,5% $CO_2$ 中培养24 h,以研究顺铂对培养的原代肾小管上皮细胞 $Ca^{2+}$ 浓度的影响。药物保护组顺铂浓度为26 μmol·$L^{-1}$,培养的肾小管细胞提前与各保护药物牛磺酸组

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(0.1、1、10 g·$L^{-1}$), 茵陈素(0.4、4、8 mg·$L^{-1}$)培养 24 h, 再加入顺铂 26 μmol·$L^{-1}$, 共同作用 24 h 后, 倒弃培养基, 测 $Ca^{2+}$ 浓度。

### 1.4　细胞内游离 $Ca^{2+}$ 的测定

参考 Zhenmin 等[5] 的方法进行。

### 1.5　统计学处理

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用方差分析, 进行组间比较, 以 $P<0.05$ 为相差显著, $P<0.01$ 为相差非常显著。

## 2　结果

### 2.1　顺铂对培养的 PTC 内游离 $Ca^{2+}$ 的影响

顺铂浓度 6.5 μmol·$L^{-1}$ 不影响细胞内游离 $Ca^{2+}$ 浓度($P>0.05$), 当但浓度上升至 13 μmol·$L^{-1}$ 时, 可显著升高 PTC 内游离 $Ca^{2+}$ 浓度($P<0.01$), 且随顺铂浓度增加, 细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度越高, 有明显的剂量—效应关系, 结果见表 1。

表 1　顺铂对 PTC 游离 $Ca^{2+}$ 浓度的影响($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of cisplatin on cytosolic free [$Ca^{2+}$] i in primary cultured PTC($n=4$ $\bar{x}\pm s$)

| Cisplatin(μmol·$L^{-1}$) | [$Ca^{2+}$] i(nmol·$L^{-1}$) |
|---|---|
| 0 | 112±5 |
| 6.5 | 123±8 |
| 13 | 179±8 ** |
| 26 | 230±6 ** |
| 52 | 320±17 ** |

**: $P<0.01$ *vs* Cisplatin 0 μmol·$L^{-1}$

### 2.2　牛磺酸、茵陈素对顺铂引起培养的 PTC 内游离 $Ca^{2+}$ 的影响

在药物保护组中, 牛磺酸 0.1 g·$L^{-1}$ 组细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度与顺铂组相比, 没有显著差异($P>0.05$), 1 g·$L^{-1}$ 和 10 g·$L^{-1}$ 较顺铂组显著下降($P<0.01$); 茵陈素 0.4 mg·$L^{-1}$ 不影响细胞内 $Ca^{2+}$($P>0.05$), 但 4 mg·$L^{-1}$ 和 8 mg·$L^{-1}$ 可明显降低细胞内 $Ca^{2+}$($P<0.01$), 结果见表 2。

表 2　牛磺酸和茵陈素对顺铂引起 PTC 游离 $Ca^{2+}$ 超载的影响($n=4$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of taurine and scoparoneon on cisplatin-induced cytosolic free [$Ca^{2+}$] i overload in PTC($n=4$ $\bar{x}\pm s$)

| Groups | Drug concentration(·$L^{-1}$) | [$Ca^{2+}$] i(nmol·$L^{-1}$) |
|---|---|---|
| Control | 0 | 112±5 |
| Cisplatin | 26 μmol | 230±6 |
| Taurine | 0.1 g | 223±6 |
| | 1 g | 202±9 ** |
| | 10 g | 147±10 ** |
| Scoparoneon | 0.4 mg | 226±9 |
| | 4 mg | 172± 6 ** |
| | 8 mg | 121±14 ** |

**: $P<0.01$ *vs* cisplatin group

## 3　讨论

游离灌注肾脏, 肾切片, 悬浮肾小管也可用于研究药物的毒副作用, 但所需药物浓度高, 且存活时间短。细胞系如 LLC-$PK_1$ 虽然存活时间长, 所需药物浓度低, 但缺乏一些肾近端小管细胞的分化特征, 相比之下, 原代细胞培养更能体现近端小管的不同分化特点, 因此, 采用原代肾小管上皮细胞培养研究药物的肾细胞毒性, 使实验数据更具有说服力。

肾细胞内游离 $Ca^{2+}$ 浓度的上升, 被认为是缺血和毒性因素造成急性肾功能衰竭的原因之一[6]。我们实验观察到, 顺铂可导致 PTC 内 $Ca^{2+}$ 浓度的超载, 这可能与顺铂的以下作用有关: ①损害线粒体导致呼吸率下降, 细胞内 ATP 耗竭; ②细胞膜 $Ca^{2+}$-ATPase 和 $Na^+$ $K^+$-ATPase 活力下降, 因而, 细胞外排 $Ca^{2+}$ 能力下降; ③线粒体重吸收 $Ca^{2+}$ 的能力下降; ④能抑制肾皮质细胞钙结合蛋白(Regucallin)mRNA 的转录, Regucallin 在缓冲细胞内钙方面起着重要作用。因此, 顺铂因导致细胞外排 $Ca^{2+}$ 下降和细胞内缓冲 $Ca^{2+}$ 的能力下降, 造成[$Ca^{2+}$] i 上升, 异常升高的[$Ca^{2+}$] i 又加剧了这些过程, 形成恶性循环。

实验表明, 牛磺酸和茵陈素可降低顺铂导致的 PTC 内 $Ca^{2+}$ 超载。牛磺酸可能作用于膜的磷脂双分子层通过调节膜与 $Ca^{2+}$ 的结合, 控制细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度[7]。杨忠等[8] 研究发现, 在体外培养的神经元中加入牛磺酸, 能明显降低神经细胞的死亡率, 对神经细胞有保护作用。茵陈素可拮抗顺铂导致的细胞内游离 $Ca^{2+}$ 浓度的升高, 减轻 $Ca^{2+}$ 超载对细胞的损伤, 从而保护顺铂引起的原代肾小管上皮细胞损伤。但是, 关于茵陈素拮抗细胞内 $Ca^{2+}$ 超载机制还有待进一步研究。牛磺酸和茵陈素对顺铂引起的肾小管上皮的细胞 $Ca^{2+}$ 超载有明显的拮抗作用, 这对保护细胞外源性毒性损伤有重要的应用价值。

## 参考文献:


[1] Brady H R, Kone B C, Stromski M E, *et al*. Mitochondrial injury: An early event in cisplatin toxicity to renal proximal tubule[J]. Am J Physiol, 1990, 258(5): F1 181—F1 187.

[2] Brady H R, Zeidel M L, Kone B C, *et al*. Differential action of cisplatin on renal proximal tubule cell and inner medullary collecting duct cells[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1993, 265(3): 1 421—1 428.

[3] Kurata H, Yamaguchi M. Suppressed expression of calcium-binding protein regucalcin mRNA in the renal cortex of rats with chemically induced kidney damage[J]. Mol Cell Biochem, 1995, 151(1): 558.

[4] 田　劲, 陈香美, 黎磊石. 冬虫夏草, 大黄及肾大部切除大鼠血清对肾小管上皮细胞生长的影响[J]. 中西医结合杂志, 1991, 11(9): 547—549.

[5] Zhenmin N L, Smogorzewski M, Massry S G, *et al*. Elevated cytosolic calcium of adipocytes in chronic renal failure[J]. Kidney Int, 1995, 47(6): 1 624—1 629.

[6] Laina A, Schwartz D. Renal tubular cellular and molecular events in acute renal failure[J]. Nephron, 1994, 68(3): 416—4180.

[7] 王　冬, 佟利家, 汤键, 等. 牛磺酸对离体灌注大鼠心脏钙超载的作用[J]. 北京医科大学学报, 1992, 24(3): 189—190.

[8] 杨　忠, 蔡文琴. 牛横酸减轻兴奋性氨基酸对培养新生大鼠小脑皮层神经元的损害[J]. 第三军医大学学报, 1996, 18(1): 22—25.


(编辑　王　红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net