

KI 对染铅近曲肾小管上皮细胞 XIAP 表达及凋亡的影响

刘 栋 周桂凤 蒋云生 杨 波 程 新

(中南大学湘雅二医院肾内科 湖南 长沙 410011)

摘要 目的:研究碘化钾对染铅肾小管上皮细胞 XIAP 的表达及凋亡的影响,探讨其对抵抗铅导致的近曲肾小管上皮细胞损伤的可能机制。方法:应用流式细胞术检测染铅 HK-2 细胞及对照组细胞中 XIAP 的表达及凋亡情况。结果:染铅 HK-2 细胞中 XIAP 的表达明显低于对照组,且虽然铅浓度的增高而降低($p < 0.05$ / $p < 0.01$),碘化钾能够减弱上述变化($p < 0.05$ / $p < 0.01$);染铅 HK-2 细胞的凋亡率明显高于对照组,且虽然铅浓度的增高而升高($p < 0.05$ / $p < 0.01$),碘化钾能够降低染铅细胞的凋亡率($p < 0.05$ / $p < 0.01$)。结论:碘化钾能够上调染铅 HK-2 细胞中抗凋亡蛋白 XIAP 的表达,降低凋亡率,在一定程度上降低铅对细胞的损伤。

关键词:碘化钾;近曲肾小管上皮;凋亡抑制蛋白;凋亡

中图分类号:R692, R994.6 **文献标识码:**A

The Effect of KI on XIAP Expression and Apoptosis of Hk-2 cells Affected by Lead

LIU Dong, ZHOU Gui-feng, JIANG Yun-sheng, et al

(Department of Nephropathy, the Second Affiliated Hospital of Xiangya, School of Medical, the Central South University, Changsha 410013, Hunan, China)

ABSTRACT Objective: To study effect of KI on the XIAP expression and apoptosis of Hk-2 cells affected by lead, and to explore the potential mechanism of KI to cure lead-induced renal tubular damage. **Methods:** Expression of XIAP and apoptosis status of the HK-2 cells affected by lead (group A) and controls (group B) were detected by flow cytometry. **Results:** Expression of XIAP in group A was lower than that in group B ($p < 0.05$), KI could weaken the above change ($p < 0.05$); at the same time, apoptosis rate was higher in group A than in group B ($p < 0.05$), KI could depress the lead-induced apoptosis ($p < 0.05$). **Conclusion:** KI might cure the lead-induced damage by raising the expression of XIAP in HK-2 cells affected by lead, and cut down apoptosis rate.

Key words: KI; HK-2 cell; XIAP; Apoptosis

前言

铅对人体全身各个器官均可造成不同程度的损害,而肾脏是仅次于大脑的第二个铅靶器官,铅对儿童肾脏比成人更易造成伤害。但其损害机理尚不清楚,有学者认为从分子水平阐明铅对细胞的毒理,并在分子水平予以预防,有可能达到根治的目的。近年来铅的神经独立研究较多,但对肾脏细胞的毒理研究报道甚少。凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族是一种内源性的凋亡抑制因子,能抑制不同原因引起的细胞凋亡。XIAP 是 IAP 家族中最具有潜在抑制活性的蛋白。本文旨在研究铅对肾小管上皮细胞凋亡抑制因子的作用,并用 KI 对凋亡抑制蛋白 XIAP 在染铅 hk-2 细胞中的表达变化及凋亡的影响,以探讨其对铅导致的近曲肾小管上皮细胞的抗损伤作用。

1 材料和方法

1.1 材料

液 RPMI 1640 购自美国 GIBICO 公司;胎牛血清购自天津生物制品公司;醋酸铅,碘化钾均为 Sigma 公司产品。Annexin V 凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司。XIAP 单

克隆抗体及 FITC-anti IgG(鼠)购自美国 santa cruz 公司。

1.2 仪器设备主要实验仪器包括

流式细胞仪(FACS Calibur, 美国 BD 公司),相差显微镜(日本 Olympus 公司)和超速离心机(美国 Beckman 公司)等。

1.3 细胞培养

近端肾小管上皮细胞系(HK-2)购自美国 ATCC 公司,采用含 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基培养,培养条件为 5% 二氧化碳、37℃ 恒温孵箱。细胞生长至 80% 融合后,换不含胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,继续培养 24h,使细胞处于相对生长。

1.4 实验分组

上述条件下培养的细胞分为:(1)空白对照组,在正常条件下培养(2)加上终浓度为 10 μ mol/l 的醋酸铅(3)加入终浓度为 20 μ mol/l 的醋酸铅(4)加入终浓度为 50 μ mol/l 的醋酸铅,分别于培养箱内孵育 1h;(5)加入终浓度为 10 μ mol/l 的醋酸铅(6)加入终浓度为 20 μ mol/l 的醋酸铅(7)加入终浓度为 50 μ mol/l 的醋酸铅;(5)-(7)组,分别加入终浓度为 40 μ g/ml 的 KI, 37℃ 孵育 30 分钟后,加入不同浓度的醋酸铅,于培养箱内孵育 1h。然后以上各组 PBS 洗两遍,备用。

1.5 流式细胞仪检测 XIAP 蛋白表达含量

收集 5×10^5 个细胞,4℃, 70% 乙醇固定 30 分钟后,加含

• 基金项目:湖南省自然科学基金资助项目(SS2107)

作者简介:刘栋,(1972-),男,汉族,博士研究生。研究方向:铅性肾病。

Email:liudong030@163.com

(收稿日期:2006-08-03 接受日期:2006-09-01)

1%的 Tween20 穿透缓冲液洗 2 次。加 XIAP 单克隆抗体(1:100)50 μ l,4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时,PBS 洗 2 次,加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG(1:100)50 μ l,4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟,PBS 洗 2 次,上机测定。各组均作复管检测(n=3),未处理细胞不加抗体作为阴性对照,未处理细胞加抗体作为空白对照组。

1.6 凋亡检测

按试剂盒操作要求进行,简要过程如下:胰蛋白酶消化获取各组 1 $\times$ 10⁶ 细胞,用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 洗涤 2 次,1000r/sec 离心 5min,弃上清,用结合缓冲液悬浮细胞,分别加入 Annexin-V-FITC 和 PI 混匀,避光 4 $^{\circ}$ C 反应 30min,再加入适量结合缓冲液,立即于流式细胞仪(FACSCalibur, CELLQUES 软件,美国 BD 公司)获取 20000 个细胞进行分析。Annexin-V 和 PI 均阴性者为正常细胞,均阳性或 PI 单阳性者为坏死的细胞,Annexin-V 单阳性者为凋亡细胞。结果以凋亡细胞占全部细胞的百分比表示。

1.7 统计学分析

数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{X}\pm S$)表示,使用 SPSS10.0 统计学软件,采用单因素方差分析和卡方检验,以 $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 XIAP 蛋白表达

XIAP 蛋白表达,见图一。表达量以流式细胞仪检测到的荧光强度表示,各组的荧光强度均减去阴性对照组本底,见表一。XIAP 蛋白表达量与染铅的浓度成反比,加 KI 后 XIAP 蛋白表达量均较相应染铅组为高,提示 KI 对铅的损伤有保护作用。

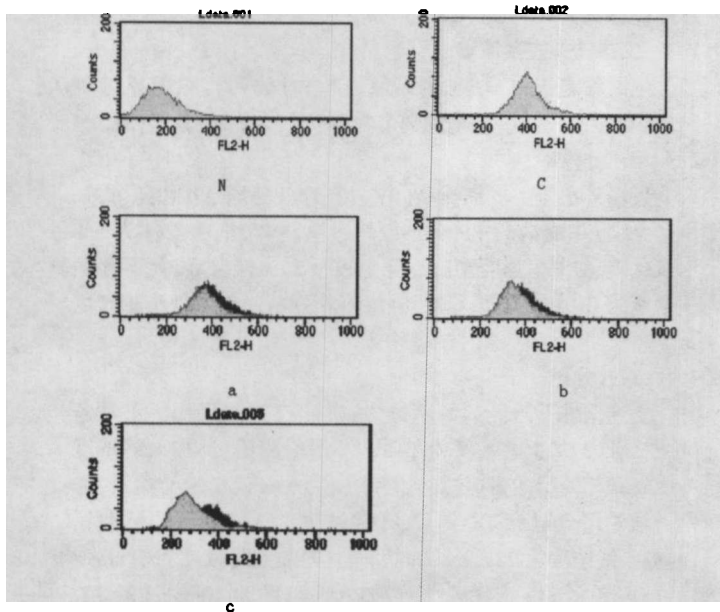


图 1: XIAP 蛋白表达检测结果, N 为阴性对照, C 为空白对照组, a 为 10 μ mol/l 的醋酸铅组, b 为 20 μ mol/l 的醋酸铅组, c 为 50 μ mol/l 的醋酸铅组,绿色为碘化钾干预组,红色为碘化钾加干预组。

Figure 1: protein expression of Xiap: N was negative control; C was blank control; a was the group incubated with 10 μ mol/l lead acetate; b was the group incubated with 20 μ mol/l lead acetate; c was the group incubated with 50 μ mol/l lead acetate. Green: KI group; Red: KI plus Interference group

2.2 凋亡检测

以百分比表示,凋亡率与染铅浓度的呈正相关,加入 KI 后,凋亡率均较相应染铅组降低。见表一。

表 1 XIAP 蛋白表达与凋亡检测

Table 1 Protein Expression of Xiap and Apoptosis

分组	XIAP 表达	凋亡(%)
(1)空白对照组	225.34 $\pm$ 30.70	0.41
(2)10 μ mol/l 的醋酸铅组	187.75 $\pm$ 20.60*	7.13*
(3)20 μ mol/l 的醋酸铅组	177.65 $\pm$ 20.55**	12.75**
(4)50 μ mol/l 的醋酸铅组	161.04 $\pm$ 15.04**	31.06**
(5)10 μ mol/l 的醋酸铅 + KI 组	214.20 $\pm$ 27.21*	5.43*
(6)20 μ mol/l 的醋酸铅 + KI 组	212.53 $\pm$ 25.65*	8.95*
(7)50 μ mol/l 的醋酸铅 + KI 组	187.52 $\pm$ 27.60**	26.3**

各组均作复管检测(n=3),未处理细胞不加抗体作为阴性对照,未处理细胞加抗体作为空白对照组各。XIAP 蛋白表达量以流式细胞仪检测到的荧光强度减去阴性对照组本底,* $p<0.05$,** $p<0.05$ 。

Notes: All group were repeated 3 times, the group without treatment was not added antibody and was negative control;

the group without treatment but added antibody was blank control. Protein Expression of Xiap was detected by flow cytometry; the fluorescence intensity should subtracted the fluorescence intensity of fluorescence negative control,* $p<0.05$,** $p<0.05$.

3 讨论

慢性进行性肾脏病变是导致慢性肾功能衰竭的主要原因。大量研究证实慢性肾脏病变的主要病理特点是肾脏正常固有的细胞的凋亡和肾小球及肾间质的纤维化,因而揭示肾细胞凋亡和纤维化机理,以终止和预防肾脏的细胞凋亡和纤维化是延缓肾功能衰竭的关键。70 年代 Bryan T 则发现慢性铅性肾病患者肾单位因纤维化而破坏,另一部分“肾单位则不留痕迹地消失”[1]。

在人类,细胞凋亡的分子机制是复杂的,受到多种因素的调控近年来,人们逐渐发现一组广泛存在于许多物种细胞内的具有凋亡抑制作用的蛋白质,被称为凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)。IAPs 最早在杆状病毒中被鉴定,进化上高度保守,在许多物种中行使阻止细胞凋亡的功能。XIAP 是 X 染色体连锁的 IAP,是 IAP 家族中最具有潜在抑制活性的蛋白其在人体内的分布最广,主要生物学功能是抑制细胞凋亡[2,3]。凋亡发生是一个复杂的由 Caspase 介导的蛋白酶级联反应过程,Caspase 是凋亡的中心执行者。XIAP 可以直接与 Caspase-9/3/7 结合,抑制 Caspase 活性,从而抑制细胞凋亡的发生[4-6]。本研究发现,染铅浓度与 XIAP 的表达呈负相关($P<0.05$),与凋亡率正相关($p<0.05$),提示铅通过抑制 XIAP 基因表达是诱导近曲肾小管上皮细胞发生凋亡可能机制。

有研究表明:KI 可通过阻断铅向细胞内扩散并与细胞内的铅结合,可以维持 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶正常活力,而且能使被铅抑制的酶恢复活力,从而使肾小管上皮细胞免受铅损害,但其具体作用不明[7,8]。本实验显示,碘化钾干扰组中,XIAP 蛋白的表达量高于同等染铅剂量组,并且凋亡率明显下降。提示其能通过上调 XIAP 蛋白的表达而降低近曲肾小管上皮细胞的凋亡从而起到保护作用。由此可推测,碘化钾对铅毒性的保护机制是多方面的:一方面,即可通过阻断铅向细胞内扩散;又能与细胞内的铅结合,保护 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶;另一方面,还能通过促进凋亡抑制蛋白的表达,降低细胞的凋亡率。可以预见,碘化钾对铅损害的治疗预防机制是个复杂的网络,更多的机制尚需进一步研究。

(下转第 29 页)

法分离培养骨髓基质细胞,利用骨髓基质细胞贴壁生长的特性,通过更换培养液的方法,逐渐去除悬浮生长的造血细胞,从而获得了均一性较高的骨髓基质细胞。该方法操作简单,减少了离心、密度分离等步骤,从而减少污染机会以及对细胞的损害,因而成功率高,本实验10只动物的原代培养中有8只一次成功。该方法缺点是红细胞干扰原代细胞的观察。

骨质疏松等骨丢失性疾病在骨量减少的同时往往伴随骨髓内脂肪组织增加^[2]。实际上,所有导致骨丢失的条件如卵巢切除、制动、服用糖皮质激素等,均伴有髓内脂肪细胞的增加^[3]。成骨细胞和成脂细胞拥有一个共同的前体细胞源MSCs^[4]。MSCs向成骨与成脂细胞分化的平衡维系着髓内骨组织与脂肪组织量的平衡。一旦MSCs过多地向成脂细胞方向分化,则向成骨细胞分化的细胞数就相应减少,进而引起成骨缺陷。成骨与成脂平衡的调控机制十分复杂,有多条信号通路的参与。包括1、过氧化酶增殖体激活受体 α 通路;2、Wnt通路;3、RhoA通路;4、G蛋白偶联受体通路5、Notch/delta/Jagged通路等^[5]。

地塞米松在成骨、成脂的诱导分化中均起着重要作用,有人称之为骨髓基质细胞分化的启动因子^[6]。刘杰等^[7]实验结论:地塞米松可以从分子水平调控骨髓基质细胞分化,地塞米松浓度 1×10^{-7} mol/L时,诱导体外培养的骨髓基质细胞向脂肪细胞分化方向较强。脂肪细胞可以合成并储存甘油三酯,因此可以用油红O染色作为鉴定脂肪细胞的方法。碱性磷酸酶是诱导成骨后的关键性标志之一,并且是最早出现的成骨标志^[8]。定量检测碱性磷酸酶的活性可以衡量成骨细胞分化程度和成骨细胞的功能状态。

5 结论

本研究结果表明,采用全骨髓贴壁法可以获得去卵巢骨质疏松山羊MSCs,并且体外扩增生长良好,可以用于相关研

究。在地塞米松浓度 1×10^{-7} mol/L诱导下,去卵巢骨质疏松组MSCs向脂肪细胞分化比例明显高于对照组,在成骨诱导液诱导下,去卵巢骨质疏松组MSCs碱性磷酸酶表达量明显低于对照组,由此,可以得出结论:去卵巢骨质疏松山羊MSCs成脂分化能力增强,成骨分化能力减弱;并且其成骨能力减弱。因此,MSCs细胞分化方向改变,致成骨细胞生成减少,脂肪细胞生成增多可能是骨质疏松症的原因之一。

参考文献

- [1] Robey PG. Collagenase - treated trabecular bone fragments: a reproducible source in the osteoblastic lineage[J]. Calcif Tissue Int, 1995,56:11 - 12
- [2] Nuttall ME, Gimble JM. Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? [J]Bone. 2000,27(2):177 - 184
- [3] Martin RB, Chow BD, Lucas PA. Bone marrow fat content in relation to bone remodeling and serum chemistry in intact and ovariectomized dogs[J]. Calcif Tissue Int, 1990,46:189 - 194
- [4] Owen A. What is early intervention? Br J Psychiatry. 2003,183(2):562
- [5] Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications [J]. Current Opinion in Pharmacology, 2004,4:290 - 294
- [6] Horwitz EM, Prockop DJ. Clinical response to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta [J]. Blood, 2001,97(5):1227 - 1231
- [7] 刘杰,孙正义,曹蕾.地塞米松对骨髓基质干细胞生物学行为的影响[J].中华骨科杂志,2003,23(11):691 - 693
- [8] Sammons J, Ahmed N. The role of BMP - 6, IL - 6, and BMP - 4 in mesenchymal stem cell - dependent bone development: effects on osteoblastic differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D(3)[J]. Stem Cells, 2004,13(3):273

(图1,图2,图4-图7请见封3)

(上接第26页)

参考文献

- [1] Emmerson BT. Chronic lead nephropathy[J]. Kidney Int. 1973 Jul;4(1):1 - 5
- [2] Holcik M, Korneluk RG. XIAP, the guardian angel[J]. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Jul;2(7):550 - 556
- [3] Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, et al. X - linked IAP is a direct inhibitor of cell - death proteases[J]. Nature. 1997 Jul 17;388(6639):300 - 304
- [4] Suzuki Y, Nakabayashi Y, Nakata K, et al. X - linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase - 3 and - 7 in distinct modes[J]. J Biol Chem. 2001 Jul 20;276(29):27058 - 27063
- [5] Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, et al. Structural basis of caspase - 7 inhibition by XIAP[J]. Cell. 2001 Mar 9;104(5):769 - 780
- [6] Sun C, Cai M, Gunasekera AH, et al. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor - of - apoptosis protein XIAP[J]. Nature. 1999 Oct 21;401(6755):818 - 822
- [7] 蒋云生,夏运成,罗季安,等.碘化钾抗铅性肾细胞损害的机制探讨[J].中华劳动卫生职业病,1997,15(3):169 - 170
- [8] Nolan CV, Shaikh ZA. Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical mechanisms. Toxicology[J]. 1992,73(2):127 - 146