

· 短篇论著 ·

中介素对大鼠近端肾小管上皮细胞缺氧
复氧模型的保护作用

周芸 李荣山 乔晞 崔晓燕 白波 邵珊

中介素 (IMD) 是 2004 年发现的降钙素基因相关肽 (CGRP) 超家族成员, 在肾脏有很高的表达和分泌, 可增加肾血流量、尿量, 降低肾血管阻力^[1]。IMD 可通过环磷酸腺苷 (cAMP) 蛋白激酶 A (PKA) 途径减轻心脏缺血再灌注 (I/R) 损伤^[2]。本研究以大鼠近端肾小管上皮细胞 NRK-52E 缺氧复氧 (H/R) 模型模拟在体 I/R, 探讨 IMD 对肾脏 I/R 损伤的作用。

一、材料与方法

1. 实验材料: NRK-52E 由中山大学附属第一医院余学清教授惠赠; 分别稳定转染 pIRES2-EGFP (空质粒) 和 pIRES2-EGFP-IMD (IMD 质粒) 的细胞株由本实验室前期制备^[3]。

2. 主要试剂: DMEM-F12 培养基 (美国 Gibco), 胎牛血清 (杭州四季青), 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒 (南京建成), cAMP ELISA 检测试剂盒 (美国 ADL), 细胞丙二醛 (MDA)、活性氧 (ROS) 比色法定量检测试剂盒 (上海杰美医药)。

3. 细胞培养: NRK-52E 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基中, 培养条件为 37℃、5% CO₂、95% 空气。

4. 实验分组及缺氧复氧模型建立: 分为对照组 (常规培养), 缺氧复氧模型组 (H/R 组, 正常细胞)、空质粒组 (空质粒细胞株)、IMD 质粒组 (IMD 质粒细胞株) 共 4 组。

缺氧复氧模型制备方法: 将模型组各组细胞中加入已预充氮气 30 min 的无氧液中, 置入培养条件为 37℃、5% CO₂、95% 氮气的孵箱中, 缺氧培养 1 h; 取出细胞, PBS 洗涤, 换完全培养基, 改变培养条件为 37℃、5% CO₂、95% 空气, 培养 1.5 h, 收集细胞及培养液上清。

5. 检测指标及方法: 比色法分别检测缺氧前、缺氧后和复氧后培养上清液 LDH 含量; ELISA 法检测复氧后培养上清液 cAMP, 比色法检测复氧后细胞 MDA、ROS。

6. 统计学分析: 采用 SPSS 13.0 软件包进行统计学处理, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间资料比较采用 *t* 检验或单因素方差分析。

二、结果

1. IMD 对 NRK-52E 细胞缺氧复氧损伤的影响: 与对照组相比, 各模型组在缺氧 1 h 后培养液上清 LDH 含量显著增加 ($P < 0.05$), 各模型组间 LDH 比较差异无统计学意义; 复氧后各模型组 LDH 含量进一步上升, 与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 组间比较, IMD 质粒组 LDH 上升幅度较小, 与复氧后 H/R 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2. H/R 后各组细胞培养液上清 cAMP 含量: 与对照组相比, 各模型组在 H/R 后培养液上清 cAMP 含量均显著增加 ($P < 0.01$); 与 H/R 组比较, IMD 质粒组 cAMP 增加了 26.75% ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组细胞培养液上清 LDH、cAMP 含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	LDH (U/L)			cAMP (nmol/L)
	缺氧前	缺氧后	复氧后	
对照组	587.27±127.59	—	—	0.253±0.031
H/R 组	570.24±132.95	882.14±141.53 ^a	1564.58±278.59 ^b	2.157±0.254 ^b
空质粒组	563.74±110.88	964.35±173.42 ^a	1674.27±358.96 ^b	1.674±0.124 ^b
IMD 质粒组	611.32±124.35	1124.56±237.58 ^b	1288.53±241.58 ^{bc}	2.734±0.047 ^{bc}

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与复氧后 H/R 组相比, ^c $P < 0.05$

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2010.05.018

基金项目: 国家自然科学基金 (30771004); 山西省科技攻关项目 (20080311061-6)

作者单位: 030001 太原, 山西医科大学第一医院综合科 (周芸、崔晓燕); 山西医科大学第二医院肾内科 (李荣山、乔晞、白波、邵珊)

通信作者: 李荣山, Email: rongshanli@yahoo.com.cn

3. H/R 后各组细胞 MDA 与 ROS 的含量: 与对照组比较, 各模型组除 IMD 质粒组外, MDA 和 ROS 均显著增加 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与 H/R 组比较, IMD 质粒组 MDA 和 ROS 有所下降 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 H/R 后各组细胞 MDA 与 ROS 含量($\bar{x} \pm s$)

组别	MDA($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	ROS(A)
对照组	3.582 \pm 0.141	0.085 \pm 0.007
H/R 组	10.215 \pm 3.854 ^b	0.134 \pm 0.012 ^a
空质粒组	7.623 \pm 1.874 ^b	0.136 \pm 0.008 ^a
IMD 质粒组	5.634 \pm 1.218 ^c	0.093 \pm 0.013 ^c

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 H/R 组比较, ^c $P < 0.05$

三、讨论

肾脏 I/R 损伤是多因素共同作用的结果, 这一过程中氧自由基生成增加尤为重要。氧自由基和单线态氧等体内有氧代谢的产物组成局部 ROS。I/R 时增多的 ROS 可激活白细胞, 使血管活性因子表达增加, 引起内皮细胞肿胀和破坏, 血栓形成, 血管收缩; 使脂质过氧化、蛋白质变性、DNA 断裂等, 从而导致细胞坏死和凋亡^[4]。

肾脏 I/R 时, 近端肾小管上皮细胞是 ROS 的主要来源^[5]。已知与 IMD 同源的肾上腺髓质素(ADM)能通过 cAMP 途径减少 ROS 的产生^[6]。研究发现, IMD1~53 可保护心脏 I/R 损伤, 并使心肌细胞内 cAMP 水平升高^[2]; 同样通过 cAMP 途径抑制大脑内皮细胞的氧化损伤^[7]。

LDH 是衡量细胞膜是否完整的指标, 本研究结果显示, 各组细胞在缺氧后 LDH 均上升, 复氧后上升更加显著, 符合 H/R 模型变化规律。同时发现, 不同组别在缺氧后和复氧后 LDH 上升幅度有所差别, 尽管缺氧后的组间差异无统计学意义, 但复氧后 IMD 质粒组 LDH 上升幅度显著低于其他组, 说明转染 IMD 质粒的细胞具有一定抗 H/R 损伤作用。各模型组 cAMP 在 H/R 后, 与对照组相比, 均出现明显上升, 其中以 IMD 质粒组最为显著, 提示在 H/R 后 cAMP 的上升可能是一种代偿反应, 而高表达 IMD 使 cAMP 水平得到进一步增加, 与文献中 IMD 可通

过增加 cAMP 保护心脏, 减轻 I/R 损伤和大脑内皮细胞氧化损伤一致^[2,7], IMD 直接导致了 NRK-52E 内 cAMP 增高。ROS 和 MDA 的检测结果显示, 造模后 H/R 组和空质粒组均显著上升, 但 IMD 质粒组这种上升趋势被抑制, 提示高表达的 IMD 使 ROS、MDA 这些氧化损伤指标上升幅度变小, 进一步证实 IMD 具有细胞保护作用。

本研究初步发现 IMD 对 NRK-52E 的 H/R 损伤具有保护作用, 具体机制需深入研究。IMD 作为 CGRP 超家族的新成员, 其家族成员 ADM 已被大量文献证实具有强大的心肾保护作用, 并具有潜在的临床应用前景。越来越多的研究也发现 IMD 对许多组织器官特别是心肾组织具有保护作用, 因此, IMD 极有可能是一种新的内源性抗损伤保护物质, 并可能作为心肾疾病防治的新靶点。

参 考 文 献

[1] Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, et al. Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator. FEBS Lett, 2004, 556: 53-58.

[2] Yang JH, Qi YF, Jia YX, et al. Protective effects of intermedin/adrenomedullin2 on ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. Peptides, 2005, 26: 501-507.

[3] 周芸, 李荣山, 乔晞, 等. 中介素真核表达质粒的构建及其在大鼠近端肾小管上皮细胞中的表达. 中国药物与临床, 2009, 9: 4-7.

[4] 陈瑗, 周玫. 自由基医学基础与病理生理. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 3-52.

[5] Donnahoo KK, Shames BD, Harken AH, et al. Review article: the role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. J Urol, 1999, 162: 196-203.

[6] Yoshimoto T, Fukai N, Sato R, et al. Antioxidant effect of adrenomedullin on angiotensin II-induced reactive oxygen species generation in vascular smooth muscle cells. Endocrinology, 2004, 145: 3331-3337.

[7] Chen L, Kis B, Hashimoto H, et al. Adrenomedullin 2 protects rat cerebral endothelial cells from oxidative damage in vitro. Brain Res, 2006, 1086: 42-49.

(收稿日期: 2009-09-08)

(本文编辑: 杨克魁)

• 读者·作者·编者 •

关于投稿提供伦理委员会批准文件及受试对象知情同意书的通告

根据中华医学会杂志社的相关规定, 当论文的主体是以人为研究对象的试验时, 作者应该说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制定的伦理学标准, 并提供该委员会的批准文件及受试对象的知情同意书。

本刊编辑部