

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.28.025

## 缺氧-复氧肾小管上皮细胞损伤的信号传导机制

胡语航<sup>1</sup>, 王兴勇<sup>2△</sup>

(1. 四川省妇幼保健院重症医学科, 成都 610045; 2. 重庆医科大学附属儿童医院 400014)

**[摘要]** **目的** 探讨肾小管上皮细胞在缺氧-复氧(H-R)损伤后的信号传导机制。**方法** 将不同方法处理的人近曲肾小管上皮细胞(HK-2)分为对照组、模型组和 PDTC 组,模型组和 PDTC 组再分别分成缺氧 6、12、24 h 组、缺氧 24 h 后分别复氧 6、12、24 h 组;检测细胞成活率、NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)mRNA 及蛋白表达情况。**结果** 与对照组比较,模型组随缺氧时间延长细胞数量逐渐减少,24 h 达高峰( $P < 0.05$ ),复氧后细胞数量略有增加;随缺氧时间延长 NF- $\kappa$ B p65 阳性蛋白表达增多,复氧 6 h 组达高峰( $P < 0.05$ ); ICAM-1 mRNA 及蛋白表达随 H-R 时间延长渐增高( $P < 0.05$ )。PDTC 组中 NF- $\kappa$ B p65 蛋白和 ICAM-1 mRNA 及蛋白表达较模型组有明显下降( $P < 0.05$ )。**结论** H-R 诱导 HK-2 细胞中 NF- $\kappa$ B p65 的活化,从而上调 ICAM-1 mRNA 及蛋白表达。

**[关键词]** HK-2; 缺氧/复氧; 核因子- $\kappa$ B; 细胞间黏附分子-1**[中图分类号]** R459.7**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)28-3962-03

## Progression on signal transduction pathway mechanism of HK-2 cells injury induced by hypoxia-reoxygenation

Hu Yuhang<sup>1</sup>, Wang Xingyong<sup>2△</sup>

(1. Sichuan Provincial Hospital for Women and Children, ICU, Chengdu 610045, China;

2. Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the signal transduction pathway mechanism of human renal tubular epithelial cell damage induced by hypoxia-reoxygenation. **Methods** Human renal tubular epithelial cell line HK-2 cell was used as target cell. The experiment are divided into the control group, the model group and PDTC group. Each group was further divided into 6 subgroups according to the times of hypoxia or/and reperfusion(H6, H12, H24, R6, R12 and R24). Detected the cell survival, the protein expression of nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)protein65, the mRNA and protein expression of ICAM-1 respectively. **Results** Compare with control group, cell survival were significantly decreased and dropped the lowest in group H24( $P < 0.05$ )which induced by Hypoxia. H/R up-regulates NF- $\kappa$ B protein65, and the mRNA and protein expression of ICAM-1 of the cell increased significantly( $P < 0.05$ ). In addition, expression of NF- $\kappa$ B protein65 and ICAM-1 which induced by H-R were remarkably reduced in the PDTC group( $P < 0.05$ ). **Conclusion** H/R induced NF- $\kappa$ B activation and increased ICAM-1 mRNA and protein expression, this effect can be inhibit by PDTC. It suggested that H/R induces ICAM-1 mRNA and protein expression in HK-2 cells through activation of NF- $\kappa$ B.

**[Key words]** HK-2; Hypoxia-reoxygenation; Nuclear factor- $\kappa$ B; ICAM-1

人体遭受各种打击包括创伤、窒息、严重感染后均容易导致缺氧缺血性肾损伤,缺氧后肾脏损伤的严重程度,是决定患者预后好坏的重要因素<sup>[1]</sup>。但目前尚不清楚,缺氧性肾损伤后促进肾小管上皮细胞活化表达细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的途径和机制。因此,本实验探讨缺氧-复氧(hypoxia-reoxygenation, H-R)诱导的人肾小管上皮细胞损伤机制并且检测其 ICAM-1 表达情况,为治疗肾缺血再灌注损伤提供新的临床思路和治疗靶点。

**1 材料与方**

**1.1 材料** 人近端肾小管上皮细胞株(HK-2)购自中国典型培养物保藏中心。吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC, NF- $\kappa$ B p65 的特异性抑制剂)购自美国 Sigma 公司。

**1.2 方法**

**1.2.1 细胞培养** HK-2 细胞常规种植于培养基(含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12)中。每周传 1~2 代。处理前用无血清 DMEM/F12 培养基培养 24 h,使细胞转 G<sub>0</sub> 期。

**1.2.2 H-R 损伤模型的建立** 按下列分组进行处理,对照组:置培养板于正常孵箱中培养;缺氧组:置培养板于充有

95% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 混合气体的密闭容器后再一起放入正常孵箱内,分别缺氧 6、12、24 h;复氧组:各组均于缺氧 24 h 后取出,分别放入正常孵箱中继续培养 6、12、24 h;PDTC 组:每孔中加入 PDTC(终浓度为 50  $\mu$ mol/L)后各组再进行相应 H-R 处理。倒置相差显微镜下观察 HK-2 细胞形态。

**1.2.3 检测 NF- $\kappa$ B p65 的表达** 细胞爬片采用 4  $^{\circ}$ C 的丙酮进行制作,并采用免疫组织化学检测 NF- $\kappa$ B。用 Image-Pro Plus 6.0 软件对其平均光密度比值进行细致的统计与分析。

**1.2.4 ICAM-1 mRNA 表达的检测** 提取各组细胞总 RNA,通过逆转录方式生成 cDNA,再以适量 cDNA 为模板,PCR 扩增在 TaqDNA 聚合酶催化下进行。其扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,并进行光密度扫描获得光密度(OD)值。本实验参照文献[2]进行引物设计。

**1.2.5 ICAM-1 蛋白的测定** 采用 ELISA 法,各孔分别加入各组细胞培养上清液 100  $\mu$ L,在酶标仪波长 450 nm 处测定 OD 值。

**1.2.6 细胞增殖的测定** 采用 MTT 法,将 HK-2 细胞接种于培养板中,同时给予相应 H-R 处理,测定各标本在波长 490

nm 处 OD 值。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS20.0 软件对资料进行相应的统计分析,各组间采用单因素方差分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,进行 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 H-R 后 HK-2 细胞形态学改变** 各模型组细胞数量明显减少,并且随缺氧时间的延长,出现明显的下降趋势,表现为培养基中细胞贴壁性差,折光性下降,悬浮细胞数量明显增加。尤其以缺氧 24 h 组上述改变达高峰;复氧后细胞数量较缺氧虽有所增加,但较对照组折光性减弱,细胞状态欠佳。对照组中,细胞呈扁平梭状,形态良好,贴壁和折光性较好。

**2.2 细胞增殖** 随着缺氧时间的延长,模型组与对照组比较在各时间点活细胞数量明显减少,缺氧 24 组达最低值,与对照组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。PDTC 组与其对应时间点 H-R 组(缺氧 6、12、24 h 组,复氧 6、12、24 h 组)比较,有明显的保护作用,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见表 1。

**表 1 不同 H-R 处理组对 HK-2 细胞成活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, \%$ )**

H-R		对照组	模型组	PDTC 组
缺氧	6 h	0.51±0.12	0.44±0.11 <sup>a</sup>	0.48±0.12
	12 h	0.51±0.13	0.41±0.12 <sup>a</sup>	0.46±0.15 <sup>b</sup>
	24 h	0.51±0.12	0.38±0.10 <sup>a</sup>	0.43±0.12 <sup>b</sup>
复氧	6 h	0.51±0.15	0.39±0.11 <sup>a</sup>	0.44±0.11 <sup>b</sup>
	12 h	0.51±0.11	0.42±0.13 <sup>a</sup>	0.47±0.11 <sup>b</sup>
	24 h	0.53±0.12	0.42±0.13 <sup>a</sup>	0.48±0.14 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与同时时间点对照组比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ,与同时时间点模型组比较。

**2.3 H-R 诱导的 HK-2 细胞中 NF- $\kappa$ B p65 的表达** 对照组仅见 NF- $\kappa$ B p65 在细胞质中呈弱阳性及少量表达。各模型组 HK-2 细胞的细胞质及细胞核中的 NF- $\kappa$ B p65 均有明显的阳性表达,而以复氧 6 h 组最为明显。复氧 12、24 h 组 NF- $\kappa$ B p65 阳性表达较复氧 6 h 组下降。NF- $\kappa$ B p65 的表达在 PDTC 组与其对应 H-R 组(缺氧 6、12、24 h 组,复氧 6、12、24 h 组)比较明显减少 ( $P < 0.05$ ),见表 2。

**表 2 不同 H-R 处理组 HK-2 细胞 NF- $\kappa$ B p65 阳性表达情况 ( $\bar{x} \pm s$ )**

H-R		对照组	模型组	PDTC 组
缺氧	6 h	0.13±0.02	0.15±0.04 <sup>a</sup>	0.14±0.04
	12 h	0.12±0.03	0.21±0.04 <sup>a</sup>	0.15±0.05 <sup>b</sup>
	24 h	0.13±0.04	0.29±0.04 <sup>a</sup>	0.16±0.04 <sup>b</sup>
复氧	6 h	0.12±0.03	0.30±0.06 <sup>a</sup>	0.21±0.04 <sup>b</sup>
	12 h	0.13±0.02	0.27±0.05 <sup>a</sup>	0.19±0.04 <sup>b</sup>
	24 h	0.13±0.03	0.26±0.06 <sup>a</sup>	0.18±0.04 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与同时时间点对照组比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ,与同时时间点模型组比较。

**2.4 H-R 诱导 HK-2 细胞 ICAM-1 mRNA 及蛋白表达** 对照组 HK-2 细胞表达 ICAM-1 mRNA 的量极低。与对照组比较,经 H-R 诱导后各模型组 ICAM-1 mRNA 及蛋白表达量明显上调,自缺氧 12 h 组开始差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),复氧 24 h 组扩增条带亮度及宽度达高峰,与对照组比较差异有

统计学意义 ( $P < 0.05$ )。而 PDTC 组 ICAM-1 mRNA 及蛋白表达量明显减少,与模型组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。表 3、4。

**表 3 不同 H-R 处理组 HK-2 细胞 ICAM-1 mRNA 表达情况 ( $\bar{x} \pm s$ )**

H-R		对照组	模型组	PDTC 组
缺氧	6 h	0.14±0.03	0.16±0.04 <sup>a</sup>	0.14±0.03
	12 h	0.14±0.03	0.17±0.04 <sup>a</sup>	0.14±0.03 <sup>b</sup>
	24 h	0.12±0.04	0.21±0.05 <sup>a</sup>	0.17±0.04 <sup>b</sup>
复氧	6 h	0.13±0.03	0.27±0.06 <sup>a</sup>	0.17±0.03 <sup>b</sup>
	12 h	0.15±0.02	0.35±0.05 <sup>a</sup>	0.16±0.04 <sup>b</sup>
	24 h	0.15±0.03	0.40±0.06 <sup>a</sup>	0.17±0.04 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与同时时间点对照组比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$  与同时时间点模型组比较。

**表 4 不同 H-R 处理组 HK-2 细胞 ICAM-1 蛋白表达情况 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/mL}$ )**

H-R		对照组	模型组	PDTC 组
缺氧	6 h	953.5±106.7	1 025.3±188.6 <sup>a</sup>	920.6±244.7
	12 h	960.2±114.5	1 336.7±165.1 <sup>a</sup>	1 241.5±196.4 <sup>b</sup>
	24 h	948.7±115.7	1 714.9±188.5 <sup>a</sup>	1 322.6±191.9 <sup>b</sup>
复氧	6 h	963.5±109.8	2 029.5±154.8 <sup>a</sup>	1 367.6±113.1 <sup>b</sup>
	12 h	955.5±104.6	2 261.4±182.7 <sup>a</sup>	1 394.8±198.7 <sup>b</sup>
	24 h	947.9±126.5	2 334.6±160.2 <sup>a</sup>	1 482.9±198.1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与同时时间点对照组比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ,与同时时间点模型组比较。

**3 讨 论**

急性缺血性肾损伤的病理发生过程主要包括小管上皮细胞损害、白细胞聚集活化及血液动力学改变等方面。本实验通过对 H-R 处理的肾小管上皮细胞的细胞形态学观察发现,随着缺氧时间的延长,细胞贴壁率及折光性逐渐减少,并且细胞数量逐渐减少,这与肾缺血性损伤的组织学改变是一致的。本实验显示缺血 24 h 组上述改变最为明显。

NF- $\kappa$ B 是一种多效可诱导的核转录因子,可以调控任何含有  $\kappa$ B 位点的基因转录<sup>[1]</sup>,缺氧导致肾小管上皮细胞损伤的机制尚不明确,可能<sup>[2-4]</sup>是通过激活细胞内 NF- $\kappa$ B 活性并表达,调控 NF- $\kappa$ B 信号传导通路中的下游因子,包括 ICAM-1、白细胞介素 1、16、18、肿瘤坏死因子等多种炎性因子、细胞因子的表达,加重炎性反应。本试验结果证实了这一观点:在 H-R 诱导后 HK-2 细胞 NF- $\kappa$ B p65 活性随缺氧时间延长而逐渐增强,并于复氧 6 h 达高峰。给  $\beta$  其特异性抑制剂 PDTC 阻断 NF- $\kappa$ B 活化后,各组与对照组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。本实验证实缺氧可作为始动因素激活 NF- $\kappa$ B 在 HK-2 细胞中的表达,且在缺氧 6 h 达高峰。

缺氧刺激后,靶器官细胞 ICAM-1 产生增加,表达明显,致使中性粒细胞游走、吞噬和浸润,导致强烈的免疫炎症反应<sup>[1-3,4-7]</sup>。已有学者证实<sup>[8]</sup>ICAM-1 的激活及过度表达参与了急性缺血性肾损伤的病理生理过程,并通过介导白细胞与内皮细胞的黏附,导致靶器官的内皮细胞充血、水肿和局部的微循环障碍,最终导致内皮损伤<sup>[9]</sup>。免疫炎症反应的刺激激活了细胞内的 ICAM-1、单核白细胞和巨噬细胞导致组织细胞的损

伤<sup>[10-13]</sup>,损伤的组织细胞进一步激活靶细胞导致炎症因子包括 ICAM-1,肿瘤坏死因子,白细胞介素等“瀑布样”释放增多,形成恶性循环,加重已经损伤的内皮细胞。

缺氧作为始动因素,NF- $\kappa$ B 被活化、ICAM-1 表达增多、ICAM-1 介导中性白细胞黏附,三者互相促进,互为因果,导致靶细胞损伤<sup>[14]</sup>。本研究证实 H-R 损伤诱导 HK-2 细胞的 ICAM-1 的激活和表达呈时间依赖性,即随着时间的延长,细胞损伤加重,ICAM-1 的激活和表达增加。与对照组比较,采用 PDTC 处理后,H-R 处理的 HK-2 细胞 ICAM-1 mRNA 表达无改变。因此,H-R 性肾损伤机制可能是由于 H-R 诱导的 HK-2 细胞内 NF- $\kappa$ B 活性升高,促进肾小管上皮细胞的 ICAM-1 mRNA 转录及蛋白表达上调,进一步促进炎症因子释放而加重肾小管内皮细胞的损伤。

#### 参考文献

- [1] Combe C,Burton CJ. Hypoxia induces intercellular adhesion molecule-1 on cultured human tubular cells[J]. *Kidney int*,1997,51(6):1703-1709.
- [2] Taekema-Roelvink ME,Kooten C,Kooij SV, 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] Christman JW,Sadikot RT,Blackwell TS. The role of nuclear factor kappa B in pulmonary disease [J]. *Chest*,2000,117:1482-1487.
- [4] Hayden MS,Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling[J]. *Cell*,2008,132(3):344-362.
- [5] Latanich CA,Toledo-Pereyra LH. Searching for NF-kappaB based treatments of ischemia reperfusion injury[J]. *J Invest Surg*,2009,22(4):301-315.
- [6] 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.

- [7] Zhou T,Sun GZ,Zhang MJ, 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 XF,Yao JH,Li YH, et al. Effect of nuclear factor kappaB on intercellular adhesion molecule 1 expression and neutrophil infiltration in lung injury induce by intestinal ischemia/reperfusion in rats[J]. *World Gastroenterol*,2006,12(3):388.
- [9] Leslie JA,Meldrum KK. The role of interleukin-18 in renal injury [J]. *J Surg Res*,2008,145(1):170-175.
- [10] Zhang XL,Selbi W,de la Motte C, et al. Renal proximal tubular epithelial cell transforming growth factor-beta1 generation and monocyte binding[J]. *Am J Pathol*,2004,165(3):763-773.
- [11] Derin N,Ilzgut-Uysal VN,Agac A, et al. L-earnitine protects gastric mucosa by decreasing ischemia-reperfusion induced lipid peroxidation[J]. *J Physiol Pharmacol*,2004,55(3):595-606.
- [12] Wang N,Ma QJ,Chu YK, et al. Protective effect of ischemic postconditioning on liver grafts of rats in different strains [J]. *Chinese Clin Rehabil*,2005,9(18):147-149.
- [13] Kher A,Meldrum KK,Wang M, et al. Cellular and molecular mechanisms of sex differences in renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Cardiovasc Res*,2005,67(4):594-603.
- [14] 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.

(收稿日期:2016-06-16 修回日期:2016-07-28)

(上接第 3961 页)

- et al. Double sleeve uniportal video-assisted thoracoscopic lobectomy for non-small cell lung cancer[J]. *Ann Cardiothorac Surg*,2014,3(2):E2.
- [5] Gonzalez-Rivas D,Paradela M,Fernandez R, et al. Uniportal video-assisted thoracoscopic lobectomy: two years of experience[J]. *Ann Thorac Surg*,2013,95(2):426-432.
- [6] Gonzalez-Rivas D,De La Torre M,Fernandez R, et al. Video: single-incision video-assisted thoracoscopic right pneumonectomy[J]. *Surg Endosc*,2012,26(7):2078-2079.
- [7] Rocco G. One-port(uniportal)video-assisted thoracic surgical resections-a clear advance[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*,2012,144(3):27-31.
- [8] Petersen RH,Hansen HJ. Learning thoracoscopic lobectomy[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*,2010,37(3):516-520.
- [9] Tam JK,Lim KS. Total muscle-sparing uniportal video-assisted thoracoscopic surgery lobectomy[J]. *Ann Thorac*

*Surg*,2013,96(6):1982-1986.

- [10] Ivanovic J,Al-Hussaini A,Al-Shehab D, et al. Evaluating the reliability and reproducibility of the Ottawa Thoracic Morbidity and Mortality classification system[J]. *Annals of Thoracic Surgery*,2011,91(2):387-393.
- [11] Bertolaccini L,Rocco G,Viti A, et al. Geometrical characteristics of uniportal VATS[J]. *J Thorac Dis*,2013,5(Suppl 3):S214-216.
- [12] Salati M,Brunelli A,Rocco G. Uniportal video-assisted thoracic surgery for diagnosis and treatment of intrathoracic conditions[J]. *Thorac Surg Clin*,2008,18(3):305-310.
- [13] Ng CS,Rocco G,Wong RH, et al. Uniportal and single-incision video-assisted thoracic surgery: the state of the art[J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*,2014,19(4):661-666.

(收稿日期:2016-06-01 修回日期:2016-07-22)