

# 人白蛋白对 HK-2 细胞凋亡的作用

张林<sup>1</sup> 刘伏友<sup>2△</sup> 彭佑铭<sup>2</sup> 段绍斌<sup>2</sup> 刘虹<sup>2</sup> 李瑛<sup>2</sup>

(1 长沙市四医院肾内科 湖南长沙 410006; 2 中南大学湘雅二医院肾脏病研究所 湖南长沙 410011)

**摘要** 目的 探讨人白蛋白对体外培养的 HK-2 细胞凋亡的作用。方法 本实验研究对象为 HK-2 细胞株,将培养的 HK-2 细胞与 20g/L 的人白蛋白共同孵育 0、4、6、8 小时后,用 Hoechst33258 染色检测细胞凋亡。不同浓度(0g/L、5 g/L、10 g/L、20g/L 和 30g/L)的人白蛋白与体外培养的 HK-2 分别共同孵育 0、4、6、8 小时后,流式细胞仪检测细胞凋亡。结果 :Hoechst33258 染色结果显示:培养基对照组未见明显细胞凋亡;20g/L 白蛋白与 HK-2 细胞共同孵育 4、6、8 小时,与对照组比较,均可见 HK-2 细胞荧光强度增加,有着典型凋亡形态的细胞增多,且随着人白蛋白与 HK-2 细胞作用时间的延长,细胞凋亡的程度和数目也增多。流式细胞仪检测结果显示:与对照组比较, HK-2 细胞的凋亡率随着人白蛋白与 HK-2 细胞作用的浓度和时间增加而显著性增高,细胞凋亡率在 8h 组为(9.15± 0.15%),在 30g/L 组为(9.35± 0.46%),均为最高。结论 :人白蛋白以时间和剂量依赖方式诱导肾小管细胞凋亡,以 30g/L 作用浓度和 8 小时作用时间的人白蛋白诱导 HK-2 细胞凋亡的作用最显著。

**关键词** 人白蛋白;HK-2 细胞;凋亡

中图分类号 :R586.9 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2012)26-5041-04

## Effects of Human Albumin on the Apoptosis of HK-2 Cells

ZHANG Lin<sup>1</sup>, LIU Fu-you<sup>2△</sup>, PENG You-ming<sup>2</sup>, DUAN Shao-bin<sup>2</sup>, LIU Hong<sup>2</sup>, LI Ying<sup>2</sup>

(1 Department of Nephrology, The fourth hospital of Changsha, Changsha 410006, China;

2 Institute of Nephrology, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects of human albumin on the apoptosis of renal tubular epithelial HK-2 cells *in vitro*. **Methods:** HK-2 cells were incubated with various concentrations(0g/L, 5g/L, 10 g/L, 20 g/L, 30g/L) of human albumin for 0h, 4h, 6h and 8h. The apoptosis of HK-2 cells were evaluated by Hoechst33258 fluorescence stained cytopins and flow cytometry. **Results:** No significant apoptosis was observed in the control group treated by normal culture medium, but the fluorescence intensity and number of typical apoptotic cells increased in the cells treated with 20g/L human albumin for 4, 6 and 8 hours, and they increased gradually when the time extended. The flow cytometry results showed that the rates of apoptosis in HK-2 cells rose significantly along with increasing concentrations of human albumin and prolonging of incubation time, which was the highest at concentration of 30g/L and for 8h (respectively 9.15± 0.15% and 9.35± 0.46%). **Conclusions:** Human albumin induced the apoptosis of HK-2 cells in a dose and time-dependent manner. It got the most significant effect when it lasted for 8h at concentration of 30g/L.

**Key words:** Human albumin; Renal tubular epithelial cells; Apoptosis

**Chinese Library Classification(CLC):** R586.9 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2012)26-5041-04

### 前言

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis)几乎是所有慢性肾脏疾病进展到终末期肾衰竭的共同途径和主要基础病理改变。目前认为,细胞外基质产生和降解失衡以及成纤维细胞的增生是肾间质纤维化的主要发病机制<sup>[1]</sup>,尽管成纤维细胞是肾间质纤维化发生过程中的主要效应细胞,但肾小管上皮细胞对肾间质纤维化的发生、发展具有重要作用。肾小管细胞转分化(transdifferentiation of renal tubular epithelial cells, TEMT)可以引起成纤维细胞的聚集<sup>[2]</sup>。一般认为,肾小管上皮细胞具有较强的自身修复能力,肾小管损伤后可立即启动修复机制,肾小管上皮细胞增殖、再生使小管结构和功能重建,并通过凋亡清除

坏死、变异和老化的细胞,当损伤因素持续存在或细胞丧失自身修复能力时,组织结构发生不可逆损伤且功能丧失,则发展为慢性肾间质纤维化。

研究表明,持续性蛋白尿与肾间质损伤的发生有关,近端肾小管细胞通过受体介导的细胞内吞作用摄取白蛋白,并诱导表达多种细胞因子诱导肾小管细胞凋亡。白蛋白过度重吸收与肾小管上皮细胞增殖/凋亡失衡、表型转分化以及炎细胞浸润有密切关系。各种触发细胞凋亡的因素均能触发肾小管上皮细胞凋亡,但肾小管细胞凋亡能否被白蛋白诱导,且凋亡的机制和规律如何均尚未完全阐明。为进一步探讨白蛋白对肾小管细胞的作用和影响,本研究采用体外培养人近端肾小管上皮细胞株 HK-2,观察不同浓度白蛋白对 HK-2 细胞凋亡的作用,以期为进一步研究肾间质纤维化的发生机制及临床上肾间质纤维化的防治提供新的思路。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

作者简介 张林,男,硕士研究生,主治医师,主要从事肾脏纤维化和腹膜纤维化的研究

△通讯作者:刘伏友, E-mail:lfy410@yahoo.com.cn

(收稿日期:2012-03-20 接受日期:2012-04-10)

人近端肾小管上皮细胞株 (HK-2) 购自美国 ATCC 细胞库。标准胎牛血清 (Gibco 公司) RPMI-1640 培养基 (Gibco 公司) 人白蛋白 (北京市天坛生物制品股份有限公司) Annexin V FITC kit (晶美生物工程有限公司) 细胞凋亡 Hoechst 染色试剂盒 (碧云天生物试剂公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HK-2 于含 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养基中培养。培养条件为 5% 的 CO<sub>2</sub>、37℃ 孵育。每二至三天换液一次, 当细胞生长至 95% 融合, 用 PBS 洗一次 25cm<sup>2</sup> 的培养瓶中加入 1 mL 的 0.25% 胰酶, 37℃ 培养箱中消化 5min, 轻拍培养瓶使细胞脱落, 然后加入 10% 胎牛血清 RPMI-1640 培养液终止消化, 1:2-1:3 传代。细胞生长成片时用于实验。

1.2.2 Hoechst33258 染色检测凋亡 A. 取普通洁净盖玻片于 70% 乙醇中浸泡 5 分钟或更长时间, 无菌超净台中吹干或用细胞培养级 PBS 或 0.9% NaCl 洗涤三遍, 再用细胞培养液洗涤一遍。将盖玻片置于六孔板内, 种入细胞培养过夜, 使其达到 50%~80% 融合。B. 用人白蛋白处理细胞后, 弃培养液, 加入 0.5mL 固定液固定 10 分钟或更长时间 (可 4℃ 过夜)。C. 去固定液, 用 PBS 或 0.9% NaCl 洗涤两遍, 每次 3 分钟, 吸尽液体。洗涤时最好用摇床, 也可手动晃动数次。D. 加入 Hoechst 33258 染色液 0.5mL, 染色 5 分钟。也宜用摇床, 或手动摇晃数次。E. 用 PBS 或 0.9% NaCl 洗两遍, 每次 3 分钟。F. 滴一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 盖上贴有细胞的盖玻片, 尽量避免气泡。使细胞接触封片液, 切勿弄反。G 荧光显微镜可检测到呈蓝色的细胞核。激发波长在 350nm 左右, 发射波长在 460nm 左右。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 A. 收集经上述处理消化后的 HK-2 细胞, 用 PBS 洗涤一次, 800 r/min 的转速离心 5min, 调整至每样本细胞数为 10<sup>6</sup> 个。用去离子水按 1:4 稀释结合缓冲液 (4 mL 结合缓冲液 + 12 mL 去离子水), 4℃ 预冷的 PBS 洗涤细胞两次, 细胞用 250 μL 结合缓冲液重新悬浮, 调节浓度为 1 × 10<sup>6</sup> /mL, 取 100 μL 的细胞悬浮于 5mL 流式管中, 加入 10 μL 20ug/mL 的碘化丙锭溶液和 5 μL Annexin V / FITC, 混匀后在室温下避光孵育 15 分钟, 于反应管中加 400 μL PBS, 用流式细胞仪 (FACS) 进行分析。B. 收集经上述处理的 HK-2 细胞, 用 PBS 洗涤两次, 400r/min 转速离心 5min, 调整每样本细胞数为 10<sup>6</sup> 个, 每管中加入 250 μL 的 A 溶液 (胰蛋白酶缓冲液), 轻轻混匀, 室温下静置 10 分钟后, 再加入 200 μL 的 B 溶液 (胰蛋白酶抑制剂和 RNase 缓冲液), 轻轻混匀, 室温下静置 10 分钟。之后每管中加入 200 μL 预冷的 4℃ 溶液 (碘化丙锭染色溶液) 轻轻混匀, 4℃ 避光条件下静至 10 分钟后, 尼龙膜过滤, 上流式细胞仪检测。

## 1.3 统计学处理

统计资料采用 SPSS17.0 统计软件包, 每组实验分别重复 2~3 次。实验结果用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用 One-Way ANOVA 和多组间 q 检验在 GraphpadInstat 统计软件中进行统计学处理。当 P < 0.05 时认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 人白蛋白对 HK-2 细胞形态的影响

正常培养的 HK-2 细胞在显微镜下体积较大, 呈近立方形

或卵圆形, 胞浆饱满, 折光性强, 细胞间紧密连接, 逐渐相互融合成片, 并可见拉网现象, 细胞铺满瓶底后在相差显微镜下呈铺路石样外观 (图 1A、B), HK-2 被 20g/L 人白蛋白处理 12 小时后, 细胞体积变小、变形、细胞折光性降低, 可见胞浆中颗粒明显增多 (图 1C), 20g/L 人白蛋白处理 48 小时后, 大部分贴壁细胞出现皱缩、变圆, 并出现脱落漂浮和坏死 (图 1D)。

### 2.2 人白蛋白对 HK-2 细胞凋亡的影响

2.2.1 Hoechst33258 染色检测细胞凋亡 20g/L 人白蛋白与 HK-2 细胞共同孵育 4、6、8 小时后, Hoechst33258 染色, 用带蓝色荧光的荧光显微镜观察细胞凋亡, 结果显示培养基对照组可见细胞核淡染均质荧光, 形态正常。人白蛋白与 HK-2 细胞共同孵育 4 小时后照片, 可见少量细胞的细胞核染色质固缩, 荧光明显加强, 6 小时后可见更多细胞核染色质固缩, 荧光明显加强的细胞, 8 小时后可见细胞核膜波折、卷曲、出泡以及形成凋亡小体等现象。HK-2 细胞凋亡的程度和数目随人白蛋白作用时间的延长而增加, 提示 HK-2 细胞凋亡与人白蛋白的作用有关, 且其作用随人白蛋白作用时间的延长而增强。

2.2.2 流式细胞仪 Annexin V-PI 法检测细胞凋亡 (表 1) 20g/L 人白蛋白分别作用于 HK-2 细胞不同的时间, 结果显示 6h 组和 8h 组细胞凋亡率明显高于对照组 (P < 0.01), 8h 组细胞凋亡率最高 (9.15 ± 0.15%)。不同浓度人白蛋白作用 8 小时检测 HK-2 细胞凋亡率, 与对照组相比较, 结果显示 5g/L、10g/L、20g/L、30g/L 组细胞凋亡率均显著性增高 (P < 0.01), 30g/L 组细胞凋亡率最高 (9.35 ± 0.46%)。细胞凋亡率与人白蛋白的浓度呈依赖关系 (表 1 与表 2)。

## 3 讨论

蛋白尿是大多数慢性肾脏疾病 (CKD) 患者共同的临床表现。尿蛋白可以引起肾小管间质损伤, 从而导致肾间质纤维化。大量研究表明肾间质纤维化是引起终末期肾功能衰竭的最终通道。肾小管间质病变程度及肾功能损伤的速度与蛋白尿的量和持续时间密切相关<sup>[3-4]</sup>。细胞凋亡是由基因控制的细胞自主的有序性死亡, 又称程序性死亡 (programmed cell death), 是真核细胞的一种特殊死亡方式。近年来, 细胞凋亡一直是生物学领域各专业的研究热点。肾脏疾病时肾小管和肾间质细胞增殖与凋亡之间的失衡可能与肾小管萎缩和肾小管间质纤维化有关。在动物模型中有研究表明蛋白超负荷可以引起小管细胞的凋亡, 当蛋白负荷刺激的强度尚不足以引起细胞坏死时, 凋亡是导致肾小管细胞损伤的普遍机制。因此, 我们推测凋亡可能是白蛋白诱导小管细胞损伤的机制之一。大量研究表明肾小管细胞凋亡与缺血、再灌注、肾毒素、阻塞、炎症和移植排斥等多种因素有关。体外实验发现可以诱导肾小管细胞凋亡的因素包括 ATP 缺乏、血清不足、类固醇及刺激性 Fas 抗体<sup>[5]</sup>。一些研究表明 Bcl-2 原癌基因是目前最受关注的抑制细胞凋亡基因, 其主要作用是通过抵抗多种形式的细胞死亡, 延长细胞寿命促进细胞生存, 起到抑制细胞凋亡的作用。促凋亡相关基因 Bax、caspase-3、8、9、Fas / Fas-L 在肾间质纤维化的过程中也起着重要作用, Fas / Fas-L 在肾小管上皮细胞的高表达、细胞内 Bcl-2 与 Bax 比值失调、Caspase-3 活性增加均与凋亡发生有关, 而肾小管上皮细胞的过度凋亡可能是肾小管萎缩的原因, 并参与了肾

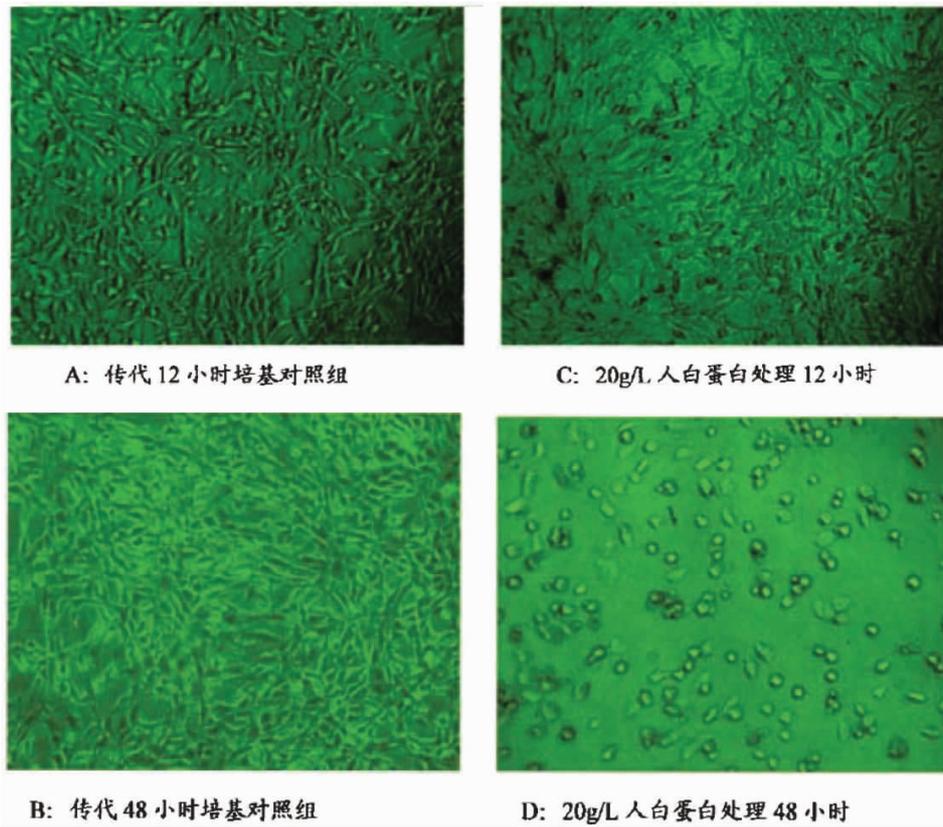


图 1 人白蛋白对 HK-2 细胞形态的影响

Fig.1 The effect of human albumin on morphology of HK-2 cells

A: culture medium for 12h; C: 20 g/L human albumin for 12h; B: culture medium for 48h; D: 20 g/L human albumin for 48h

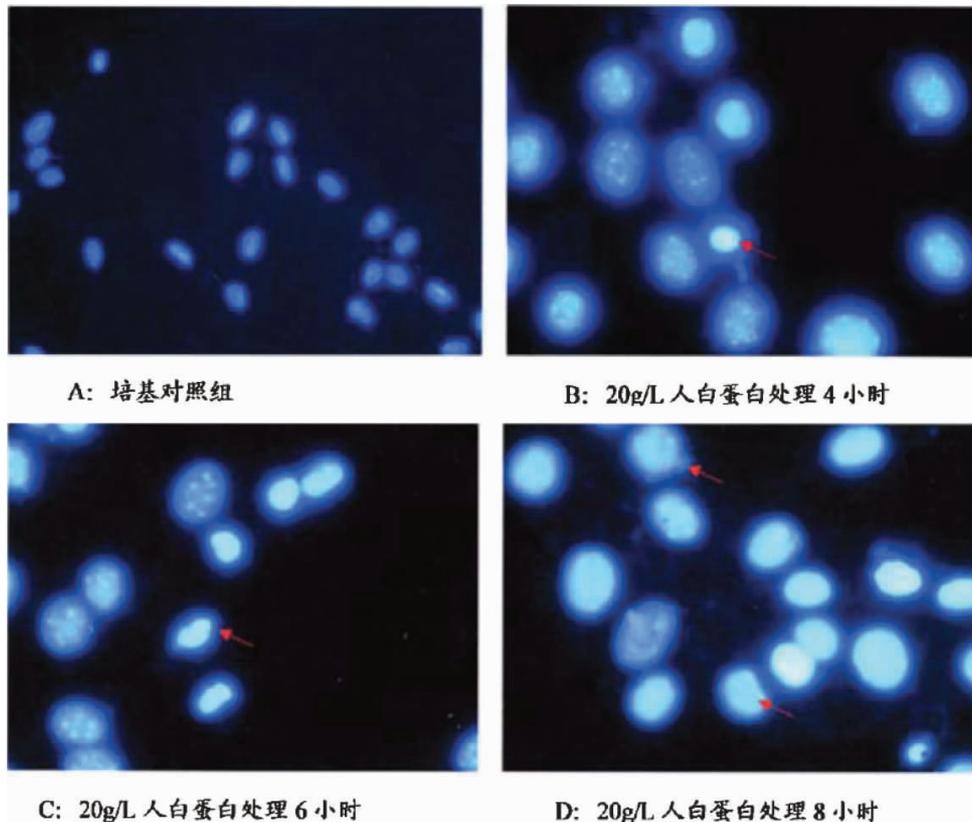


图 2 Hoechst33258 染色检测人白蛋白诱导细胞凋亡图片

Fig.2 Imaging of apoptotic cells induced by human albumin through Hoechst33258 staining

A: culture medium control; B: 20 g/L human albumin treating for 4h; C: 20 g/L human albumin treating for 6h; D: 20 g/L human albumin treating for 8h

表 1 20g/L 人白蛋白在作用于 HK-2 细胞不同时间后细胞凋亡率的比较(% n=3)

Table 1 Comparison of rates of apoptosis in HK-2 cells induced by human albumin 20g/L for different times(% , n=3)

组别 Groups	细胞凋亡率 Apoptosis rates
0h 组 Group	0.69± 0.02
4h 组 Group	1.06± 0.11
6h 组 Group	4.75± 0.37**
8h 组 Group	9.15± 0.15**

Note:\*\* P<0.01 VS 0 hours group.

表 2 不同浓度的人白蛋白作用于 HK-2 细胞 8 小时后细胞凋亡率的比较(% n=3)

Table 2 Comparison of rates of apoptosis in HK-2 cells induced by different concentrations of human albumin for 8 hours(% , n=3)

组别 Groups	细胞凋亡率 Apoptosis rates
0g/L 组 Group	0.98± 0.12
5g/L 组 Group	2.49± 0.03**
10g/L 组 Group	5.18± 0.15**
20g/L 组 Group	9.07± 0.64**
30g/L 组	19.35± 1.46**

Note:\*\* P<0.01 VS 0g/L hours group.

间质纤维化的发生机制<sup>[6-7]</sup>。目前,肾小管细胞凋亡是否可以被白蛋白诱导发生仍存在争论,有研究表明白蛋白在培养的小鼠近端小管细胞中,是存活因子<sup>[8-11]</sup>,然而这些研究在实验中用的白蛋白浓度较低(5g/L),孵化时间较短(小于等于 6h)<sup>[12-15]</sup>。此外,检测细胞凋亡方法的敏感性也可能与实验结果相关<sup>[16]</sup>。我们的研究采用相应于临床蛋白尿范围的白蛋白浓度 10-30g/L,人白蛋白干预体外培养的细胞长达 8 小时,采用形态学和流式细胞仪检测的方法证明了人白蛋白可以以剂量和时间依赖性方式诱导体外培养的肾小管上皮细胞发生凋亡。尽管蛋白尿诱导肾小管上皮细胞发生凋亡的作用机理尚未明确,但已在多个方面给了我们重要的启示,这必将推进人们对肾间质纤维化的认识,为继续深入研究肾小管损伤和肾间质纤维化的关系,为干预肾小管上皮细胞转分化和细胞凋亡提供新的方法和途径,并为临床蛋白尿的治疗提供新的思路 and 手段。

#### 参考文献(References)

- [1] Liu Youhua, Nat Rev Nephrol. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis[J]. Nature Reviews Nephrology, 2011, 7(12): 684-696
- [2] Liu Youhua. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(2): 212-222
- [3] Zoja C, Garcia PB, Remuzzi G. The role of chemokines in progressive renal disease[J]. Front Biosci, 2009, 14: 1815-1822
- [4] Gorriz JL, Martinez-Castelao A. Proteinuria: detection and role in native renal disease progression [J]. Transplant Rev (Orlando), 2012, 26(1): 3-13
- [5] Keane W. Proteinuria: its clinic important and role in progressive renal disease[J]. Am J Kidney Dis, 2000, 35: S97-S105
- [6] Liu J, Liu YP, Habeeb SS, et al. Acute CdMT injection is not a good model to study chronic Cd nephropathy: comparison of chronic CdCl<sub>2</sub> and CdMT exposure with acute CdMT injection in rats [J]. Toxicol Appl Pharm, 1998, 153:48-58
- [7] Yang B, Johnson TS, Thomas CL, et al. Express of apoptosis related genes in experiment chronic renal scarring [J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12: 275-288
- [8] Truong LD, Chol YJ, Tsao CC, et al. Renal cell apoptosis in chronic obstructive uropathy: the roles of caspases [J]. Kidney Int, 2001, 60: 924-934
- [9] Amélie Dendooven, David A. Ishola Jr, Tri Q. Nguyen, et al. Oxidative stress in obstructive nephropathy [J]. International Journal of Experimental Pathology, 2011, 92(3): 202-210
- [10] Alexey Girshovich, Christophe Vinsonneau, Joelle Perez, et al. Ureteral obstruction promotes proliferation and differentiation of the renal urothelium into a bladder-like phenotype [J]. Kidney International, 2012 Apr 18. doi: 10.1038/ki, 2012, 110
- [11] Truong LD, Gaber L, Eknayan G. Obstructive Uropathy[J]. Experimental Models for Renal Diseases, 2011, 169:311-326
- [12] Zhou TB, Qin YH, Zhou C, et al. Less expression of prohibitin is associated with increased Caspase-3 expression and cell apoptosis in renal interstitial fibrosis rats[J]. Nephrology (Carlton), 2012, 17(2): 189-196
- [13] Cvorisec D. Early diagnosis of endemic nephropathy[J]. Clinica Chimica Acta, 2000, 297:85-91
- [14] Kanauchi M, Akai Y, Hashimoto T. Transferrinuria in type 2 diabetic patients with early nephropathy and tubulointerstitial injury [J]. Eur J Int Med, 2002, 13: 190-193
- [15] Adam S, Alyabya MA, Alfarhan AH. Response of Najdi sheep to oral administration of Citrullus colocynthis fruits, Nerium oleander leaves or their mixture[J]. Small Ruminant Res, 2001, 40: 239-244
- [16] Saeed Ozmaie, Mehdi Sakha, Ahmad Asghari. Propranolol Hydrochloride and Activated Charcoal as a Treatment of Experimental Oleander Poisoning in Sheep [J]. Advances in Environmental Biology, 2011, 5(6): 1401-1405