

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.35.003

低浓度哇巴因对负鼠肾小管上皮细胞增殖的影响*

闫小飞^{1,2} 宁启兰¹ 李冬民¹ 杨旭东¹ 曹伟^{2△}

(1 西安交通大学基础医学院 陕西 西安 710061; 2 陕西省人民医院肿瘤外科 陕西 西安 710068)

摘要 目的:用低血清培养液来模拟肾脏供血不足的营养不良状态,研究低浓度哇巴因对低血清培养下 OK 细胞(负鼠肾小管上皮细胞)增殖的影响。方法:用低浓度哇巴因(1-30nM)处理 0.2%血清培养下 OK 细胞,MTT 实验和 Brdu 掺入法检测哇巴因对 OK 细胞增殖的影响;Western blot 检测 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化水平;用 LY294002 和 PD98059 分别抑制 PI3K/Akt 和 ERK1/2 蛋白激酶活性,观察抑制 PI3K/Akt 和 ERK1/2 对哇巴因促进 OK 细胞增殖的影响。结果:低浓度哇巴因(1-30nM)促进 OK 细胞的增殖,上调 OK 细胞中 Akt 和 ERK1/2 磷酸化水平。用 LY294002 和 PD98059 特异抑制 Akt 和 ERK1/2 的活化能够抑制哇巴因的促增殖作用。结论:低浓度哇巴因(1-10nM)能够促进 OK 细胞的增殖,PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路参与哇巴因对 OK 细胞促增殖作用的调节。

关键词:哇巴因;OK 细胞;细胞增殖;PI3K/Akt;ERK1/2

中图分类号:R-33;R692.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)35-6810-04

Low Doses of Ouabain Stimulate Kidney Tubular Cell Proliferation under Serum Deprivation Condition Via Activation of PI3K/Akt and ERK1/2*

YAN Xiao-fei^{1,2}, NING Qi-lan¹, LI Dong-min¹, YANG Xu-dong¹, CAO Wei^{2,△}

(1 Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China;

2 Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of physiologic concentration ouabain on OK cell proliferation and to analyze its mechanism. **Methods:** OK cells cultured under 0.2% Low Serum Culture Medium were treated with 1-30nM ouabain. Brdu incorporation assay and MTT methods were used to detect OK cell proliferation; Western blot was used to determine the phosphorylation of Akt and ERK of OK cells; LY294002, the PI3K/Akt specific inhibitor, and PD98059, the ERK1/2 specific inhibitor, were used for interfering PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathway and observed their effect on ouabain induced OK cell proliferation. **Results:** Low dose ouabain (1-30nM) stimulated OK cell growth. Ouabain could increase the phosphorylation of Akt and ERK in OK cells. The increase of OK cells proliferation by ouabain was inhibited by PI3K inhibitor LY294002 or ERK1/2 inhibitor PD98059. **Conclusion:** Low dose ouabain promoted OK cell growth. PI3K/Akt and ERK1/2 pathway have some effect on regulating this effect.

Key words: Ouabain; OK cell; Proliferation; PI3K/Akt; ERK1/2

Chinese Library Classification: R-33; R692.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)35-6810-04

前言

肾小管细胞的损伤是多种肾脏疾病的最终促成因素。生理条件下,肾小管细胞保持低度增殖活性,可以维持正常坏死脱落细胞的更新。当肾脏受损后,由于大量细胞坏死,肾小管细胞必须提高增殖活性,才能尽快重建肾小管结构和功能^[1-3]。深入研究肾小管细胞增殖活性的调节机制,寻找加快肾小管细胞再生、修复的药物,对于急性肾功能衰竭的治疗具有重要意义。

钠钾 ATP 酶是一种存在于细胞膜上的载体蛋白,它通过水解 ATP 供能,实现钠离子的向外转运与钾离子的向内转运,从而维持细胞膜电位,保持细胞内离子平衡^[4]。然而,近年来研究表明钠钾 ATP 酶通过与哇巴因(ouabain)等强心苷甾醇结合,激活细胞内一系列信号级联反应,促进正常细胞肥大或增

殖,调节肿瘤细胞的凋亡^[5-7]。本研究拟观察生理浓度的哇巴因对低血清培养条件下 OK 细胞(负鼠肾小管上皮细胞)的生长和增殖的影响,探讨其机制,为寻找肾小管细胞再生药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

OK 细胞系由本实验室保存。DMEM 培养基、胰酶、胎牛血清购于 Thermo Scientific (Thermo Scientific)公司。哇巴因、BrdU、BrdU 抗体、四甲基偶氮唑盐(MTT)、LY294002 和 PD98059 购于 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO 63103, USA)。p-AKT 抗体、t-AKT 抗体、p-ERK 抗体和 t-ERK 抗体购于 Cell Signaling 公司(Danvers, MA 01923, USA)。HPR 标记的山羊抗鼠和山羊

* 基金项目:国家自然科学基金青年项目(81200545)

作者简介:闫小飞(1978-),女,博士,讲师,主要研究方向:肿瘤与细胞生物学

△通讯作者:曹伟,电话:13809188500, E-mail: 13809188500@163.com

(收稿日期:2014-06-22 接受日期:2014-07-20)

抗兔二抗购于 Santa Cruz(Santa Cruz, CA95060, USA)。

1.2 细胞的体外培养

OK 细胞接种在含有 10%胎牛血清、100 IU/mL 青霉素和 100 IU/mL 链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37℃、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养。每 2-3 天更换培养基,当细胞贴壁汇合达 90 %时传代。药物处理细胞前 1 小时,更换为含 0.2 %胎牛血清的 DMEM 培养液(低血清培养液)。

1.3 MTT 法

将细胞按 1×10^5 /mL 接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μ L, CO₂ 培养箱中培养过夜,血清饥饿 24 小时。不同浓度哇巴因处理后,每孔加入 10 μ L MTT 溶液(5 μ g/mL),继续孵育 4 小时,弃去培养板中的液体,每孔加入 150 μ L DMSO,振荡 10 min 使结晶物充分溶解后在酶联免疫检测仪(BIO-RAD,美国)上以 570 nm 波长测定吸收值。

1.4 BrdU 法检测细胞增殖

取对数生长期的细胞接种于铺有载玻片的 6 孔板中培养过夜,血清饥饿 24 小时后,更换为含有哇巴因的细胞培养液继续培养 24 小时。加入 15 μ M BrdU 继续培养 3 小时,弃去培养液,PBS 洗涤 3 次后,4% 多聚甲醛固定细胞。采用抗 BrdU 单克隆抗体,免疫组化染色,显示增殖细胞。

1.5 Western blot 检测蛋白表达

PBS 洗涤细胞 3 次,加入预冷的 RIPA 细胞裂解液,冰上裂解,12000 $\times$ g 离心 10 min,收集上清,取 20 μ g 蛋白行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,10 %脱脂奶粉封闭,4℃ 特异性单克隆抗体孵育过夜,再用 HRP 标记的相应二抗室温孵育 1 小时,以上各步骤间用 TBST 洗膜 5 min,共 3 次。增强 ECL 显影液显影。用 Image J 分析软件测定图像条带灰度值,计算蛋白相对含量。

1.6 钠钾 ATP 酶纯化及活性检测

钠钾 ATP 酶纯化方法参考文献 11。简单步骤如下,将 OK 细胞悬浮在含有 25 mmol/L 咪唑,250 mmol/L 蔗糖,1 mmol/L EDTA (pH 7.4) 的裂解液中,反复匀浆裂解。6000 $\times$ g 离心 15 min 后,收集上清,再次进行离心,15 000 $\times$ g 离心 30 min,获得的上清 148 000 $\times$ g 离心 90 min,收集沉淀。将沉淀溶解在含有 0.4 mg/mL SDS,2 mM ATP 的裂解液中,室温平衡 30min,采用蔗糖密度梯度(15%,28.8%,37.3%)离心法,148 000 $\times$ g 离心 120 min,沉淀中含有大量钠钾 ATP 酶。在 pH7.4 环境下,将纯化的钠钾 ATP 酶与不同浓度的哇巴因 37℃ 孵育 30min 后,加入 3mM MgATP,37℃ 孵育 30 min,钠钾 ATP 酶水解 ATP 产生的 Pi 用磷钼酸比色法进行检测。颜色深浅反映钠钾 ATP 酶活性大小。

1.7 统计学方法

计量资料用均数 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,组间比较采用两因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 低浓度哇巴因促进 OK 细胞增殖

Peter Kometiani 等人曾报道过低于 100 nM 的哇巴因不引起细胞内 Na⁺ 离子浓度的升高,高于 500 nM 的哇巴因强烈抑制钠钾 ATP 酶的离子泵功能,改变细胞内 Na⁺ 离子浓度^[8]。我

们检测哇巴因对钠钾 ATP 酶活性影响发现,1-30 nM 哇巴因能够增强钠钾 ATP 酶,0.5-10 μ M 显著抑制钠钾 ATP 酶活性(Fig.1A)。因此,在实验中,我们采用 1-30 nM 低浓度哇巴因和 0.5-10 μ M 高浓度哇巴因处理 OK 细胞 24 小时后,采用 MTT 法检测哇巴因对细胞的作用。结果显示,1-30 nM 低浓度哇巴因显著促进 OK 细胞增殖,其处理组 OD 值同对照组(0 nMol/L)相比,有显著性差异($P < 0.01$),其中 10 nM 哇巴因干预后,OK 细胞增值率大约为 155% (图 1B),因此,我们后续实验中选择 10 nM 为最佳实验浓度。与低浓度哇巴因刺激细胞增殖的作用恰恰相反,高浓度哇巴因(0.5-10 μ M)处理组 OD 值显著降低,显示其对 OK 细胞具有毒性(图 1A)。BrdU 免疫染色再次证实,经 10 nM 哇巴因处理 24、48 和 72 h 后,哇巴因促进了 OK 细胞的增殖,其 BrdU 阳性细胞数目明显高于对照组 ($P < 0.01$) (图 1C,图 1D)。

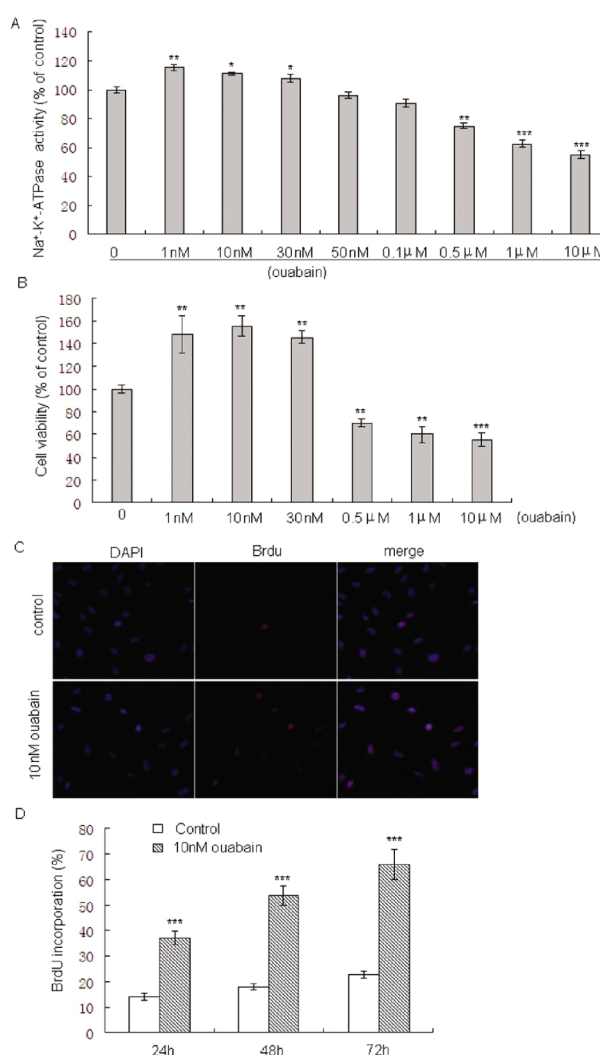


图 1 哇巴因促进 OK 细胞增殖

注:(A) MTT 法测定哇巴因对 OK 细胞的作用;(B) 哇巴因处理细胞 24 h 后 BrdU 免疫染色结果;(C) 哇巴因处理不同时间对 OK 细胞的促增殖作用。

Fig. 1 Ouabain promoted OK cell proliferation

Note: (A) Phosphomolybdate colorimetric assay for Na⁺-K⁺-ATPase activity. (B) MTT assay was used detecting the effects of ouabain on OK cells. (C) BrdU staining of cells treated by 10 nM ouabain for 24 h. (D) Proliferative effects of ouabain treated OK cells for 24, 48 and 72 h.

Mean $\pm$ SEM, n = 8, ** $P < 0.01$ vs 0 nmol/L.

2.2 低浓度哇巴因上调 OK 细胞中 Akt 和 ERK1/2 磷酸化水平

Khundmiri SJ 和 Choi IJ 分别报道过哇巴因处理 15 min 能够明显刺激 AKT 和 ERK1/2 蛋白磷酸化^[9,10]。因此,我们采用 1 nM 和 10 nM 哇巴因处理 OK 细胞 20 min, Western blot 检测显示 Akt 和 ERK1/2 的磷酸化水平。Image J 软件分析图像条带灰度值, 计算蛋白相对含量。结果显示 Akt 的磷酸化水平与对照组相比显著增高 ($P<0.01$), ERK1/2 的磷酸化水平与对照组相比显著上调 ($P<0.05$) (图 2)。

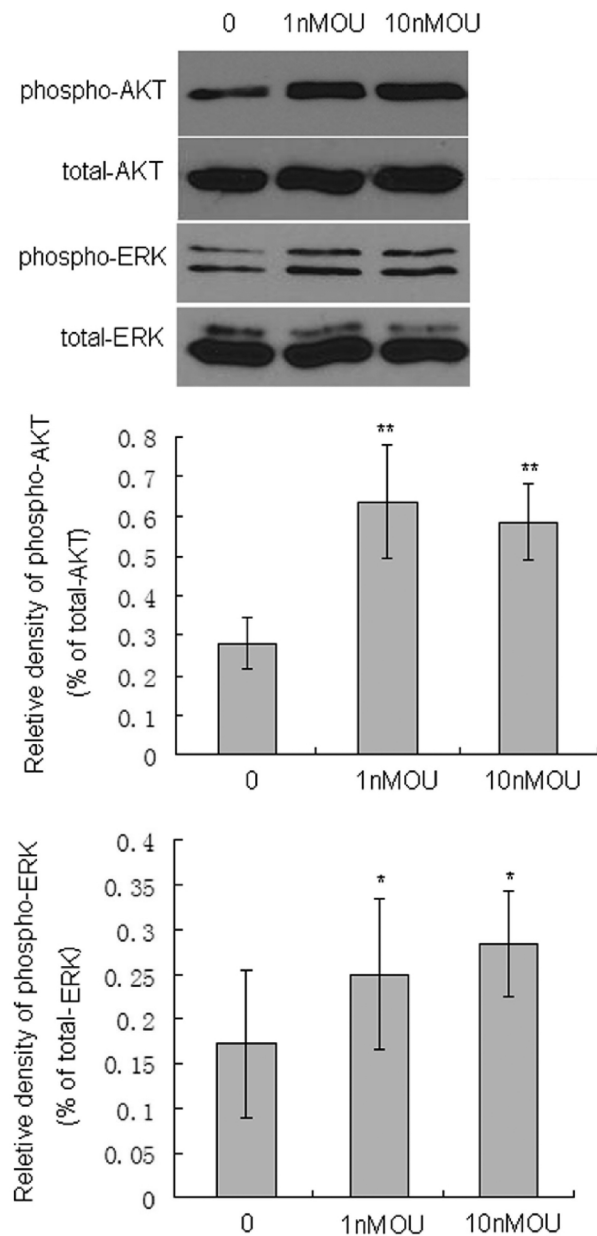


图 2 哇巴因处理后 OK 细胞中 ERK 和 Akt 磷酸化水平

Fig. 2 Effects of ouabain on phosphorylation levels of ERK and Akt

Mean $\pm$ SEM, n=6. * $P<0.05$ vs control, ** $P<0.01$ vs control

2.3 LY294002 和 PD98059 抑制哇巴因对 OK 细胞的促增殖效应

参考文献^[11]的方法, 用 LY294002 和 PD98059 分别特异 PI3K/Akt 和 ERK1/2 激酶活性。OK 细胞加入 LY294002 (15

μ M)处理 15 min 或者加入 PD98059 (30 μ M)处理 30 min 后, 加入 10 nM 哇巴因继续培养 24 h, 采用 MTT 检测哇巴因对 OK 细胞增殖的作用。结果显示, 加入哇巴因刺激了 OK 细胞的增殖, 但 LY294002 抑制哇巴因的促增殖作用。同未加入 LY294002 的哇巴因处理组相比, LY294002 抑制哇巴因的促增殖作用 ($P<0.01$); 同样, 30 μ M PD98059 也显著抑制了哇巴因的促增殖作用 ($P<0.05$) (图 3)。

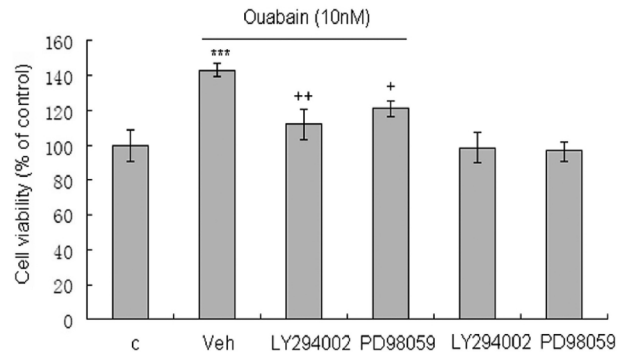


图 3 LY294002 和 PD98059 抑制哇巴因对 OK 细胞增殖的促进作用

Fig. 3 Proliferative effect of ouabain on OK cell proliferation was

inhibited by LY294002 and PD98059

Mean $\pm$ SEM, n=8. * $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs control;

+ $P<0.05$, ++ $P<0.01$ vs ouabain treated group

3 讨论

肾小管上皮细胞增殖抑制在慢性肾功能衰竭发病中发挥重要作用^[12]。肾脏损伤时, 肌酐等代谢产物聚积, 通过诱导肾小管上皮细胞增殖抑制, 促进肾小管萎缩, 加剧肾功能衰竭^[13]。寻找加快肾小管细胞再生、修复的药物, 对于急性肾功能衰竭的治疗可能具有重要意义。

强心苷是一类具选择性强心作用的药物。近年来的研究结果显示, 除了经典的抑制 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、增强心肌收缩力的功能之外, 强心苷类药物还通过结合钠钾 ATP 酶, 激活细胞内一系列信号级联反应, 促进正常细胞肥大或增殖^[14,15]。哇巴因是一种代表性的内源性强心苷类固醇。实验证实哇巴因能够促进多种正常细胞增殖, 包括肾小管来源上皮细胞的增殖^[16,17]。本研究结果显示, 高浓度的哇巴因 (1-10 μ M) 具有细胞毒性作用, 抑制细胞增殖, 降低细胞活性。这可能与高浓度哇巴因抑制 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性, 干扰细胞内离子平衡有关系。因为 Peter Kometiani 等人曾证实 500 nM 以上的哇巴因具有明显的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性的抑制作用, 10 nM 的哇巴因没有明显的酶活性抑制作用^[8]。与高浓度哇巴因的细胞毒性作用相反, 低浓度哇巴因 (1-10 nM) 能够促进 OK 细胞的增殖。我们用低血清培养液来模拟肾脏供血不足的营养不良状态, MTT 和 Brdu 掺入试验均证实哇巴因对 OK 细胞显示促增殖作用。哇巴因除过抑制 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶的离子泵功能之外, 还可以激活 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶信号通路, 活化 Akt、ERK1/2 等多种蛋白激酶^[18]。PI3K/AKT、ERK1/2 在调节多种细胞增殖中发挥作用^[19]。本研究结果显示, 哇巴因也上调 OK 细胞中 Akt 和 ERK1/2 磷酸化水平, 抑制 Akt 和 ERK1/2 的活化同时抑制了哇巴因的促增殖作用, 说明

PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路调控哇巴因对 OK 细胞的促增殖作用。细胞增殖是通过细胞周期运转来实现的,细胞周期又受到细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)和 CDK 抑制剂(CDIs)的协同调节。其中,细胞周期素 D1 对细胞周期G1/S 的转换至关重要。目前已知,细胞周期素 D1 转录依赖于 ERK 的持续激活和核内滞留,ERK 过度活化加速了细胞有丝分裂进程,促进细胞增殖^[20]。而 Akt 通过直接磷酸化抑制 GSK3 β 的激酶活性从而阻止 Cyclin D1 的降解,从而增进 Cyclin D1 在细胞中的表达,促进细胞增殖^[21]。哇巴因对 OK 细胞的增殖作用,有可能通过激活 Akt 和 ERK1/2,从而干预细胞周期,促进细胞增殖。

本研究用低血清培养液模拟肾脏供血不足的营养不良状态,观察生理剂量的哇巴因对肾小管上皮细胞增殖的影响,探索其作用机制。从研究结果显示,低浓度哇巴因(1-10 nM)促进 OK 细胞的增殖。低浓度哇巴因促进 OK 细胞增殖与激活 Akt 和 ERK1/2 磷酸激酶有关。抑制 Akt 和 ERK1/2 的活化能够抑制哇巴因的促增殖作用。PI3K/Akt 和 ERK1/2 信号通路参与调控哇巴因对 OK 细胞的促增殖效应。

参考文献(References)

- [1] Nony PA, Schnellmann RG. Mechanisms of renal cell repair and regeneration after acute renal failure[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 304(3):905-912
- [2] Price PM, Megyesi J, Safirstein RL. Cell cycle regulation: repair and regeneration in acute renal failure[J]. Kidney Int, 2004,66(2):509-514
- [3] Romagnani P, Lasagni L, Remuzzi G. Renal progenitors: an evolutionary conserved strategy for kidney regeneration [J]. Nat Rev Nephrol,2013,9(3):137-146
- [4] Blanco G, Wallace DP. Novel role of ouabain as a cystogenic factor in autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2013,305(6):F797-812
- [5] Lucas TF, Amaral LS, Porto CS, et al. Na⁺/K⁺-ATPase α 1 isoform mediates ouabain-induced expression of cyclin D1 and proliferation of rat sertoli cells[J]. Reproduction,2012,144(6):737-745
- [6] Jansson K, Nguyen AN, Magenheimer BS, et al. Endogenous concentrations of ouabain act as a cofactor to stimulate fluid secretion and cyst growth of in vitro ADPKD models via cAMP and EGFR-Src-MEK pathways[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2012, 303 (7):F982-990
- [7] Pezzani R, Rubin B, Redaelli M, et al. The anti-proliferative effects of ouabain and everolimus on adrenocortical tumor cells [J]. Endocr J, 2014, 61(1):41-53
- [8] Kometiani P, Liu L, Askari A. Digitalis-induced signaling by Na⁺/K⁺-ATPase in human breast cancer cells [J]. Mol Pharmacol, 2005,67(3):929-936
- [9] Choi IJ, Kim SY, Kwon CH, et al. Rosiglitazone inhibits proliferation of renal proximal tubular cells via down-regulation of ERK and Akt [J]. Ren Fail, 2010,32(1):103-111
- [10] Khundmiri SJ, Amin V, Henson J, et al. Ouabain stimulates protein kinase B (Akt) phosphorylation in opossum kidney proximal tubule cells through an ERK-dependent pathway [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007,293(3):C1171-1180
- [11] Zheng J, Koh X, Hua F, et al. Cardioprotection induced by Na(+)/K(+)-ATPase activation involves extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway [J]. Cardiovasc Res, 2011,89(1):51-59
- [12] Ibraghimov-Beskrovnya O. Targeting dysregulated cell cycle and apoptosis for polycystic kidney disease therapy[J]. Cell Cycle, 2007,6 (7):776-779
- [13] 胡白瑛. 肌酐产物对肾小管上皮细胞增殖的抑制作用 [J]. 山东医药, 2012,53(20):42-44
Hu Bai-ying. Creatinine product induced kidney tubular cell proliferation arrest[J]. Shandong Medical Journal, 2012,53(20):42-44
- [14] Li M, Wang Q, Guan L. Effects of ouabain on proliferation, intracellular free calcium and c-myc mRNA expression in vascular smooth muscle cells[J]. J Comp Physiol B, 2007,177(5):589-595
- [15] Tian J, Li X, Liang M, et al. Changes in sodium pump expression dictate the effects of ouabain on cell growth [J]. J Biol Chem, 2009, 284(22):14921-14929
- [16] Li J, Zelenin S, Aperia A, et al. Low doses of ouabain protect from serum deprivation-triggered apoptosis and stimulate kidney cell proliferation via activation of NF-kappaB [J]. J Am Soc Nephrol, 2006,17(7):1848-1857
- [17] Li J, Khodus GR, Kruusmgi M, et al. Ouabain protects against adverse developmental programming of the kidney [J]. Nat Commun, 2010,1:42-49
- [18] Xie Z, Askari A. Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(10):2434-2439
- [19] Qin D, Zheng XX, Jiang YR. Apelin-13 induces proliferation, migration, and collagen I mRNA expression in human RPE cells via PI3K/Akt and MEK/Erk signaling pathways [J]. Mol Vis, 2013,19: 2227-2236
- [20] Ravenhall C, Guida E, Harris T, et al. The importance of ERK activity in the regulation of cyclin D1 levels and DNA synthesis in human cultured airway smooth muscle [J]. Br J Pharmacol, 2000,131 (1):17-28
- [21] 孙晓杰, 黄常志. PI3K-Akt 信号通路与肿瘤 [J]. 世界华人消化杂志, 2006,14(3):306-311
Sun Xiao-Jie, Huang Chang-Zhi. PI3K-Akt signaling pathway and tumor[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2006,14(3):306-311