

## 蟾蜍灵对体外庆大霉素诱导的大鼠肾小管上皮细胞自噬的影响

丁 玲,施会敏,张爱青,甘卫华\*

(南京医科大学第二附属医院儿科,江苏 南京 210003)

**[摘要]** 目的:观察蟾蜍灵对体外庆大霉素诱导的大鼠肾小管上皮细胞自噬的影响。方法:体外培养大鼠肾小管上皮细胞,分为正常对照组、庆大霉素组(2 mg/mL)、蟾蜍灵组( $1 \times 10^{-8}$  mol/L)、庆大霉素+蟾蜍灵组(庆大霉素 2 mg/mL+蟾蜍灵  $1 \times 10^{-8}$  mol/L)。应用透射电镜观察各组大鼠肾小管上皮细胞的自噬水平;Western blot 检测庆大霉素及蟾蜍灵对肾小管上皮细胞自噬标志蛋白 LC3 II、P62 及肾损伤分子 1(kidney injury molecule-1, KIM1)表达的影响。结果:透射电镜下观察:与对照组相比,庆大霉素组自噬相关形态指标自噬体、自噬泡等数量明显增加;蟾蜍灵干预后,细胞自噬体数量较庆大霉素组明显减少。Western blot 结果显示,与对照组相比,庆大霉素组自噬标志蛋白 LC3 II、P62、KIM1 的蛋白相对表达量均升高( $P < 0.05$ ),蟾蜍灵干预后,LC3 II、P62 及 KIM1 蛋白相对表达量较庆大霉素组下降( $P < 0.05$ )。结论:庆大霉素可促进大鼠肾小管上皮细胞发生自噬,提高 KIM1 蛋白的表达;蟾蜍灵可部分缓解庆大霉素诱导的肾小管上皮细胞自噬的增加及 KIM1 蛋白表达量的提高,提示这可能是其发挥肾脏保护作用的机制之一。

**[关键词]** 蟾蜍灵;庆大霉素;肾小管上皮细胞;自噬;肾损伤分子 1

**[中图分类号]** R729

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)09-1120-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170910

## Effects of bufalin on autophagy induced by gentamicin in rat renal tubular epithelial cells *in vitro*

Ding Ling, Shi Huimin, Zhang Aiqing, Gan Weihua\*

(Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the effects of bufalin on autophagy induced by gentamicin(GM) in rat renal tubular epithelial cells (NRK52e) *in vitro*. **Methods:** NRK52e cells were cultured *in vitro* and divided into 4 groups: the control group, the GM group (2 mg/mL), the bufalin group( $1 \times 10^{-8}$  mol/L) and the GM+bufalin group(GM 2 mg/mL+bufalin  $1 \times 10^{-8}$  mol/L). The autophagy of NRK52e cells was observed by transmission electron microscopy. Effects of GM and bufalin on the expression of autophagy-related protein LC3 II and P62, and kidney injury molecule-1(KIM1) protein were examined by Western blot. **Results:** Transmission electron microscopy showed that the number of autophagosomes in the GM group was significantly increased compared with the control group, and the number of autophagosomes of the bufalin group was less than that in the GM group. Western blot showed that the relative expressions of LC3 II, P62 and KIM1 protein were significantly increased in the GM group compared with the control group (all  $P < 0.05$ ), however, the relative expressions of LC3 II, P62 and KIM1 protein were decreased in the bufalin group than those in the GM group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Gentamicin could activate the autophagy of NRK52e cells and up-regulate the expression of KIM1 protein, while bufalin could partially inhibit GM-induced NRK52e cell's autophagy and the up-regulated expression of KIM1 protein. It may be the mechanisms by which bufalin acts the renoprotection.

**[Key words]** bufalin; gentamicin; renal tubular epithelial cells; autophagy; KIM1

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(09): 1120-1123]

肾小管上皮细胞损伤是多种原因引起的急性肾

损伤(acute kidney injury, AKI)最主要的病理特点之一,可表现为肾小管上皮细胞活化、增生、凋亡、坏死、管型形成等<sup>[1]</sup>。庆大霉素(gentamicin, GM)属于氨基糖甙类抗生素,可引起肾小管损伤导致 AKI,因此具有肾毒性,是体外模拟 AKI 模型的常用药物。由于 AKI 在临床常见,寻找缓解 AKI 的有效治疗药物

**[基金项目]** 南京医科大学科技发展基金面上项目(2014NJMU135),江苏省高校自然科学研究面上项目(15KJD320005)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: weihuagan@njmu.edu.cn

十分重要。本课题组前期研究发现,蟾蜍灵(Bufalin)作为中药蟾酥的主要成分,可通过抑制系膜细胞增殖、降低蛋白尿、调控细胞自噬水平等发挥一定程度的肾脏保护作用<sup>[2-4]</sup>。Bufalin 是否能够通过自噬途径影响 AKI 的进程尚不清楚。因此,本文拟研究 Bufalin 对体外 GM 诱导的肾小管上皮细胞自噬及肾损伤分子 1(kidney injury molecular-1,KIM1)表达的影响,探讨 Bufalin 在 AKI 过程中的作用,为临床相关疾病的诊治提供一定的理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

正常大鼠肾小管上皮细胞株 NRK52e 购自中国典型培养物保藏中心(CCTCC);胎牛血清、0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶、DMEM/F12 培养液(Gibco 公司,美国);GM、Bufalin(Sigma 公司,美国); $\beta$ -actin 抗体(Bioworld 公司,美国),P62 抗体、微管相关蛋白 1 轻链 3 (micro-tubule associated protein1 light chain 3,MAP1LC3,LC3)抗体、KIM1 抗体(Sigma 公司,美国),辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗、HRP 标记的羊抗小鼠二抗(CST 公司,美国),蛋白 Marker (Thermo 公司,加拿大);倒置显微镜(Olympus 公司,日本),透射电子显微镜(JEO 公司,日本)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

大鼠肾小管上皮细胞 NRK52e 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液(含青霉素 100 U/mL,链霉素 100  $\mu$ g/L)中,置于 37  $^{\circ}$ C 含 5%  $\text{CO}_2$  培养箱内培养,每 2 d 换液,待细胞生长至 80%~90% 融合时使用 0.25% 的胰酶消化传代,取第 4~8 代细胞用于实验。

#### 1.2.2 实验分组

使用胰酶消化处于对数生长期的细胞,以  $2 \times 10^5$  个/孔密度接种于 6 孔板,待细胞生长至 60%~70% 融合时用无血清培养液继续培养 24 h,使细胞生长同步化。实验分组如下:①正常对照组;②GM 组:2 mg/mL 的 GM 处理<sup>[5]</sup>;③Bufalin 组:  $1 \times 10^{-8}$  mol/L 的 Bufalin 处理<sup>[6]</sup>;④GM+ Bufalin 组:同时加入 GM 2 mg/mL 和 Bufalin  $1 \times 10^{-8}$  mol/L 处理。

#### 1.2.3 透射电镜检测细胞自噬水平

细胞生长同步化后,根据实验分组处理细胞。24 h 后使用 PBS 洗涤细胞 3 次,加入 0.25% 胰酶消化,于 1 500 r/min 离心 10 min 使细胞成团,小心吸

去上清后加入 2.5% 戊二醛固定 2 h,送电镜室包埋、切片、染色,使用透射电镜观察自噬体。

#### 1.2.4 Western blot 检测自噬标志蛋白 LC3-II、P62 及 KIM1 的蛋白表达水平

细胞生长同步化后,根据实验分组处理细胞。24 h 后使用 PBS 洗涤细胞 3 次,按 100:1 加入蛋白裂解液(100  $\mu$ L)和蛋白酶抑制剂(1  $\mu$ L),冰上裂解 30 min,4  $^{\circ}$ C、15 000 r/min 离心 10 min 后吸取上清,加入上样缓冲液,于 100  $^{\circ}$ C 水浴变性 10 min。应用二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。按照每组 30  $\mu$ g 蛋白上样量进行 SDS-PAGE 电泳,将电泳分离的样本转移至固相载体 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉溶液于室温下封闭 2 h,加入 LC3、P62、KIM1 及  $\beta$ -actin 一抗(工作液浓度 1:1 000)后于 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,用 1 $\times$ TBST 漂洗一抗,并加入相应的 HRP 标记的二抗(工作液浓度 1:5 000),室温孵育 2 h 后用 1 $\times$ TBST 漂洗,增强化学发光法(enhanced chemiluminescence,ECL)显色,于凝胶成像系统曝光并显影。以  $\beta$ -actin 作为内参进行灰度值分析,计算目的蛋白的相对表达量。

#### 1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件,所有计量数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间差异比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和  $q$  检验,方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

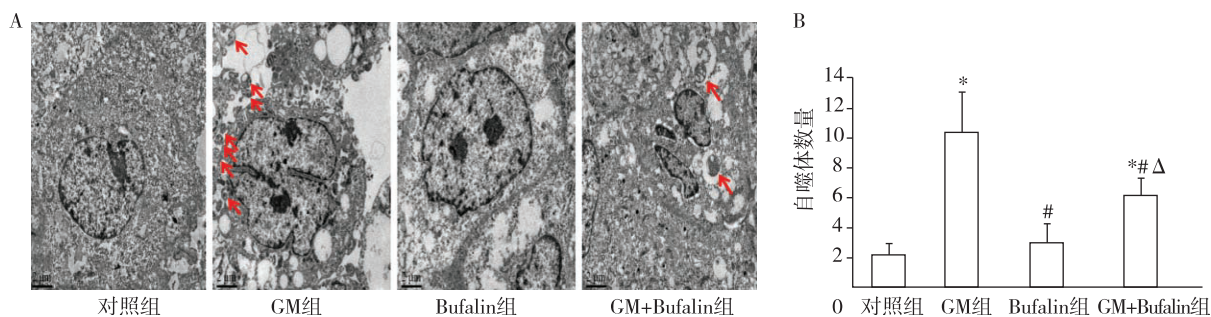
## 2 结果

### 2.1 各组大鼠肾小管上皮细胞的自噬水平变化

透射电镜下观察肾小管上皮细胞的自噬水平:对照组及 Bufalin 组肾小管上皮细胞核膜完整,染色质、细胞核及各细胞器形态结构基本正常,未见明显自噬体及自噬泡的积聚。GM 作用后细胞胞浆中可见自噬泡及自噬体,较对照组数量增加。同时给予 GM 和 Bufalin 干预后,细胞胞浆中自噬体数量较 GM 组减少(图 1)。

### 2.2 GM 及 Bufalin 对自噬标志蛋白 LC3-II、P62 及 KIM1 蛋白表达的影响

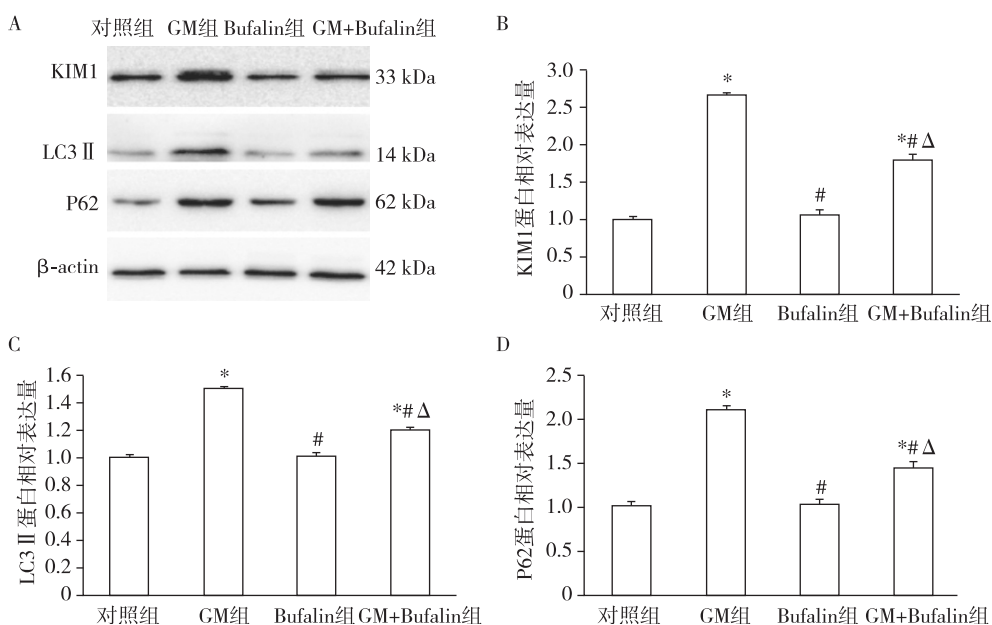
Western blot 检测蛋白表达结果显示:与对照组相比,GM 组 LC3 II 蛋白、P62 蛋白相对表达量升高( $P < 0.05$ ),同时 KIM1 蛋白相对表达量也升高( $P < 0.05$ );同时给予 GM 和 Bufalin 干预后,自噬标志蛋白 LC3 II、P62 及 KIM1 蛋白相对表达量较 GM 组下降( $P < 0.05$ ,图 2)。



A: 电镜观察各组自噬现象( $\times 5000$ ), 红色箭头标示自噬体, Bufalin 组未见明显自噬体的聚积, GM 组自噬体数量较对照组增加, 同时给予 Bufalin 干预后自噬体数量较 GM 组减少, B: 各组自噬体数量比较, 与对照组比较,  $*P < 0.05$ ; 与 GM 组比较,  $#P < 0.05$ ; 与 Bufalin 组比较,  $\Delta P < 0.05$  ( $n=6$ )。

图 1 GM 及 Bufalin 对大鼠肾小管上皮细胞自噬的影响

Figure 1 Effects of bufalin and gentamicin on autophagy of rat renal tubular epithelial cells



A: Western blot 检测各组蛋白表达情况; B: 各组 KIM1 蛋白表达比较; C: 各组 LC3 II 蛋白表达水平比较; D: 各组 P62 蛋白表达水平比较。与对照组比较,  $*P < 0.05$ ; 与 GM 组比较,  $#P < 0.05$ ; 与 Bufalin 组比较,  $\Delta P < 0.05$  ( $n=6$ )。

图 2 GM 及 Bufalin 对肾小管上皮细胞 LC3 II、P62 和 KIM1 蛋白表达的影响

Figure 2 Effects of bufalin and gentamicin on LC3 II, P62 and KIM1 protein expressions of renal tubular epithelial cells

### 3 讨论

AKI 是临床常见的危重病症, 部分患者会出现慢性肾功能不全, 并最终进展为终末期肾病(end stage renal disease, ESRD), 需肾脏替代治疗<sup>[7]</sup>。因此, 人们一直在寻找 AKI 诊治及改善预后的方法。KIM1 是由受损近端肾小管上皮细胞表达的一种跨膜糖蛋白, 正常情况下, 其不能在肾组织及尿液中检测到; 但当肾缺血性或毒性损伤发生时, KIM1 表达量显著增加; 目前被认为是 AKI 的特异性生物标志物之一, 并参与肾小管上皮细胞的损伤与修复过程<sup>[8]</sup>。

GM 作为临床上常用的氨基糖苷类抗生素, 被广泛用于治疗革兰氏阴性杆菌的感染。但由于其有

肾毒性作用, 是引起 AKI 的常见原因之一<sup>[9]</sup>。Bufalin 是传统中药蟾酥的配基之一, 分子式为  $C_{24}H_{34}O_4$ , 相对分子量为 386.5 kDa, 具有强心、调节血压、免疫及抗肿瘤作用等多种生物活性<sup>[10]</sup>, 本课题组前期研究发现, Bufalin 可抑制肾小球系膜细胞增殖<sup>[2]</sup>、减轻大鼠蛋白尿水平<sup>[3]</sup>, 发挥肾脏保护作用; 并可参与应激损伤时系膜细胞自噬水平的调控<sup>[4]</sup>。但至目前, Bufalin 在 AKI 中是否具有保护作用尚不明确。

自噬是细胞维持蛋白代谢平衡、调节内环境稳定的一种方式, 可在细胞面临应激损伤时被激活, 既是细胞的一种自我保护机制, 也是与凋亡、坏死并列的一种细胞程序性死亡机制。LC3 被认为是用于检测自噬活性的特异性蛋白标志物, 自噬发生时, 位于



胞浆的 LC3 I 酶解掉小段多肽,形成 LC3 II, 结合并定位于胞内的自噬体膜上,含量与自噬体数量呈正比<sup>[11]</sup>。当自噬发生时,P62 结合泛素化蛋白,并与 LC3 偶联,使蛋白质转入自噬溶酶体后被降解,其水平随蛋白质的降解而降低;若自噬降解缺陷则 P62 聚集,因此 P62 也是一种检测自噬活性的标志蛋白<sup>[12]</sup>。

本研究结果显示:与对照组相比,GM 组可见数量明显增多的自噬体,自噬相关的蛋白标志物 LC3 II 及 P62 的表达量升高,且 AKI 的标志蛋白 KIM1 的表达量亦升高;GM 与 Bufalin 同时处理后,胞浆内自噬体数量较 GM 组明显减少,自噬标志蛋白 LC3 II 及 P62 的表达量较 GM 组下降,KIM1 的表达量亦降低。提示 GM 刺激后可引起肾小管上皮细胞自噬的激活,这可能是 GM 引起 AKI 的机制之一;Bufalin 可部分缓解 GM 诱导的肾小管上皮细胞自噬的增加,可能是其发挥肾脏保护作用的机制之一;且 KIM1 可能参与 AKI 过程中自噬水平的调控。与本研究类似,Zhang 等<sup>[13]</sup>报道,利用顺铂处理的小鼠模型中,肾小管上皮细胞内 KIM1 蛋白表达量显著升高;Kaushal 等<sup>[14]</sup>研究发现激活自噬能够保护顺铂导致的肾损伤;Pallet 等<sup>[15]</sup>发现,在环孢素诱导的肾小管细胞损伤中,细胞自噬水平增加。作为一把双刃剑,自噬在肾损伤过程中发挥着不同的作用。结合本研究结果,提示在 GM 引起的 AKI 过程中伴随着自噬水平的变化,Bufalin 可发挥一定程度的肾脏保护作用,这为临床相关疾病的发生机制研究及诊治提供了新思路;但 KIM1 在 AKI 引起自噬水平变化中的调节作用仍需进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Kimura M, Asano M, Abe K, et al. Role of atrophic changes in proximal tubular cells in the peritubular deposition of type IV collagen in a rat renal ablation model[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, 20(8):1559-1565
- [2] Wang B, Zhang A, Zheng J, et al. Bufalin inhibits platelet-derived growth factor-BB-induced mesangial cell proliferation through mediating cell cycle progression[J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34(7):967-973
- [3] Zheng J, Gong J, Zhang A, et al. Attenuation of glomerular filtration barrier damage in adriamycin-induced nephropathic rats with bufalin: an antiproteinuric agent [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2012, 129(3/5):107-114
- [4] 施会敏,殷勤,李善文,等. 蟾蜍灵对醛固酮诱导的大鼠系膜细胞自噬的影响[J]. *江苏医药*, 2016, 42(17):1861-1863
- [5] 廖晓辉,张玲,刘杞. 重组大鼠肝再生增强因子对肾小管上皮细胞增殖及凋亡的影响[J]. *中华肾脏病杂志*, 2005, 21(12):747-751
- [6] 李善文,甘卫华,陈荣华,等. 蟾蜍灵对脂多糖诱导的大鼠肾小球系膜细胞凋亡的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2009, 29(5):674-677
- [7] Dellepiane S, Marengo M, Cantaluppi V. Detrimental cross-talk between sepsis and acute kidney injury: new pathogenic mechanisms, early biomarkers and targeted therapies[J]. *Crit Care*, 2016, 20(1):61
- [8] Nan-Ya K, Kajihara M, Kojima N, et al. Usefulness of urinary kidney injury molecule-1(Kim-1) as a biomarker for cisplatin-induced sub-chronic kidney injury[J]. *J Appl Toxicol*, 2015, 35(2):124-132
- [9] He LY, Peng XF, Zhu JF, et al. Protective effects of curcumin on acute gentamicin-induced nephrotoxicity in rats[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2015, 93(4):275-282
- [10] Corteggio A, Florio J, Roperto F, et al. Expression of gap junction protein connexin 43 in bovine urinary bladder tumours[J]. *J Comp Pathol*, 2011, 144(1):86-90
- [11] Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting[J]. *Autophagy*, 2007, 3(6):542-545
- [12] Lippai M, Löw P. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy[J]. *Biomed Res Int*, 2014(1):832704
- [13] Zhang J, Goering PL, Espandiani P, et al. Differences in immunolocalization of Kim-1, RPA-1, and RPA-2 in kidneys of gentamicin-, cisplatin-, and valproic acid-treated rats: potential role of iNOS and nitrotyrosine [J]. *Toxicol Pathol*, 2009, 37(5):629-643
- [14] Kaushal GP, Kaushal V, Herzog C, et al. Autophagy delays apoptosis in renal tubular epithelial cells in cisplatin cytotoxicity[J]. *Autophagy*, 2008, 4(5):710-712
- [15] Pallet N, Bouvier N, Legendre C, et al. Autophagy protects renal tubular cells against cyclosporine toxicity [J]. *Autophagy*, 2008, 4(6):783-791

[收稿日期] 2017-02-23