

· 论 著 ·

低氧对新生猪 G₁/S 期肾小管 上皮细胞增殖周期的影响

沈青¹, 姚裕家², 熊英², 王峥², 杨欣伟¹, 曹玉红¹, 张国成¹, 潘凯丽¹

(1. 第四军医大学西京医院儿科, 陕西 西安 710032; 2. 四川大学华西二附院儿科, 四川 成都 610041)

〔摘 要〕 目的 围生期肾小管上皮细胞(RTEs)急性损伤是否与窒息所致肾组织早期低氧环境直接相关, 始终是国内外学术界争论的焦点。该实验以处于细胞增殖周期关键性调控点 G₁/S 界面的 RTEs 作为体外低氧损伤的靶细胞, 进行低氧对 G₁/S 细胞增殖周期影响的研究, 拟探讨低氧与 RTEs 急性损伤的关系。**方法** 以新生猪 G₁/S 期 RTEs 作为研究对象, 采用氰化钠体外低氧损伤制成细胞缺氧模型(缺氧组), 同时设干预组(斑蝥素+氰化钠)和未处理对照组。应用流式细胞术 DNA 检测法, 比较缺氧组、干预组和对对照组细胞在恢复 0, 60, 120, 180 min G₁/S 期细胞分布率以及凋亡细胞比率, 同时应用免疫细胞化学比较三组细胞 p21 的表达。**结果** 恢复 0, 60 min, 缺氧组 S 期细胞分布率明显低于干预组(1.4%±2.5% vs 98.3%±1.6%; 0.5%±0.9% vs 99.0%±1.0%; $P<0.01$); 在恢复 120, 180 min 缺氧组凋亡细胞的比率(33.6%±0.8%, 37.5%±1.2%)明显高于干预组(20.9%±1.7%, 22.5%±1.1%)和对对照组(25.6%±1.1, 23.6%±1.4%)(均 $P<0.01$); G₁ 期细胞分布率与相应细胞内 p21 的表达呈正线性关系($r=0.64$, $P<0.01$), 而与凋亡细胞比率则无相关关系($r=0.342$, $P>0.05$)。**结论** 围生期 RTEs 急性损伤与低氧密切相关, 其机制可能与低氧抑制 G₁/S 期 RTEs 增殖周期的转化, 增加 S 期细胞凋亡相关。

[中国当代儿科杂志, 2004, 6(4): 265—268]

〔关 键 词〕 肾小管上皮细胞; 低氧; 新生猪
〔中图分类号〕 R-33 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008—8830(2004)04—0265—04

Effect of hypoxia on cell cycle of G₁/S renal tubular epithelial cells of the newborn pig

Qing SHEN, Yu-Jia YAO, Ying XIONG, Zheng WANG, Xin-Wei YANG, Yu-Hong CAO, et al. Department of Pediatrics, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China (Email: mailsq@fmmu.edu.cn)

Abstract: Objective It is still unexplained whether hypoxia of renal tissues induced by asphyxia is closely related to acute renal tubular epithelial cells (RTEs) injury. This paper aims to study the effect of hypoxia on G₁/S transition in neonatal pig's RTEs in vitro so as to explore the relationship between hypoxia and acute RTEs injury. **Methods** A hypoxic cell model of G₁/S transition of RTEs in neonatal piglets was established by sodium cyanide exposure. Some of the hypoxic G₁/S cells received cantharidin and were used as the Intervention group. The non-hypoxic and non-interfered G₁/S cells were used as the Control group. Cell distribution rate and cell apoptosis rate of G₁ and S phases were determined by flow cytometry 0, 60, 120 and 180 minutes after cessation of hypoxia. The cell p21 expression was measured by immunocytochemistry. **Results** The cell cycle distribution rate of the S phase in the Hypoxic group 0 and 60 minutes after cessation of hypoxia (1.4%±2.5% and 0.5%±0.9%) were lower than those of the Intervention group (98.3%±1.6% and 99.0%±1.0%) ($P<0.01$). The cell apoptosis rates in the Hypoxic group 120 and 180 minutes after cessation of hypoxia (33.6%±0.8% and 37.5%±1.2%) were higher than those of the Intervention group (20.9%±1.7% and 22.5%±1.1%) and the Control group (25.6%±1.1% and 23.6%±1.4%) ($P<0.01$). The cell distribution rate of the G₁ phase had a positive liner correlation with cell p21 expression of the same term ($r=0.64$, $P<0.01$), but it was not related to the cell apoptosis rate.

〔收稿日期〕 2003—08—05; 〔修回日期〕 2003—11—25
〔作者简介〕 沈青(1963—), 男, 博士, 副主任医师。主攻方向: 小儿肾脏病。
〔通讯作者〕 姚裕家, 四川大学华西二附院儿科, 邮编: 610041。

Conclusions Acute RTEs injury in the perinatal period is closely related to hypoxia. The possible mechanism is that hypoxia may restrain the advance of G_1/S transition and increase cell apoptosis rate of the S phase.

[Chin J Contemp Pediatr, 2004, 6(4): 265—268]

Key words: Renal tubular epithelial cell; Hypoxia; Neonatal pig

窒息是引发围生期急性肾损伤的主要危险因素^[1],其中,肾小管上皮细胞(RTEs)增殖周期紊乱(增殖抑制和凋亡增加)、肾小管发育障碍是其导致急性肾损伤的主要改变,但其损伤机制仍不明确,围生期 RTEs 对低氧是否敏感,窒息所致肾组织缺氧早期低氧与急性肾损伤的关系尚存在争议^[2]。为此,该实验在既往成功建立新生猪 RTEs 体外同步化培养的基础上,以新生猪 G_1/S 期 RTEs 细胞为低氧损伤的靶细胞,研究低氧对新生猪 G_1/S RTEs 增殖周期的影响,探讨低氧与围生期急性肾损伤的关系,为临床早期干预提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

采用机械碾磨加酶消化法进行新生猪 RTEs 体外原代和传代培养,应用形态学(光镜和电镜)、Pan-CK 和 CK-18 免疫细胞化学、酸性磷酸酶和碱性磷酸酶组织化学、细胞纯度半定量 CK-18 流式细胞术进行细胞来源和纯度的鉴定;应用二次过量胸苷同步化法进行新生猪 RTEs 体外同步化培养,采用流式细胞术 DNA 直方图进行鉴定,以 G_1/S 新生猪 RTEs 作为研究对象^[3]。

1.2 主要试剂及仪器

胸苷、DME/F-12、斑蝥素(Sigma);DMEM(GiBco);氰化钠(上海化学试剂公司);胎牛血清(天津生物制品研究所);CYCLE TEST™ PLUS DNA 试剂盒(BD);p21 单克隆抗体、生物素化二抗、SABC、DAB 显色试剂盒(博士德公司产品)。主要仪器包括万级层流工作室、BCM-100 型生物洁净工作台、WJ-6C 型 CO_2 培养箱(日本平泽产品)、倒置显微镜(Olympus, Nippon)、低温低速离心机、FACSCan 流式细胞仪(BD 公司产品)、Mias 2000 图像分析系统(四川大学研制)。

1.3 实验方法

应用经典的氰化钠体外细胞化学缺氧模式,进行新生猪 G_1/S 期 RTEs 缺氧模型的制作^[4]。预实验结果显示,10 mM 氰化钠终浓度组镜下细胞生长情况和细胞计数与未处理组无显著差异,台盼兰染色细胞存活均达 95% 以上,故将此浓度作为实验剂

量。将新生猪 G_1/S 期 RTEs 细胞(每培养瓶细胞数约为 4.56×10^6 个)分为 3 组:①缺氧组:将诱导的 G_1/S 期细胞悬浮于 10 mM 的 NaCN 的 DME/F-12 培养液中;②干预组:将诱导的 G_1/S 期细胞悬浮于含斑蝥素 0.2 μM 和 10 mM 的 NaCN 的 DME/F-12 培养液中;③对照组:将诱导的 G_1/S 期细胞悬浮于 DME/F-12 培养液中,含配制斑蝥素所用的稀释液 0.1 ml,生理盐水 0.1 ml。同时将各组细胞置于 37℃,5% CO_2 培养箱中培养 1 h,弃去原培养液,PBS 洗 2 次,加入新鲜培养液,分别收集恢复 0, 60, 120, 180 min 的 3 组细胞 1 瓶, PBS 洗 2 次, 0.25% 胰酶消化, 10% FCS 的 DMEM 终止消化,离心去上清,加 PBS 10 ml 冲洗并离心去上清 2 次,用 PBS 制成单个细胞悬液,计数调定为 1×10^6 个/ml 的细胞悬液,备用。

1.4 G_1/S 期细胞分布率和凋亡细胞比率的检测

采用流式细胞 DNA 直方图检测方法,检测缺氧后恢复 0, 60, 120, 180 min 3 组细胞增殖周期时相的分布率和凋亡细胞的比率。

1.5 细胞 p21 免疫细胞化学染色

细胞 p21 单抗免疫细胞化学染色按说明书进行,用 Mias 2000 图像分析系统进行平均目标灰度值分析,灰度值愈高,则 p21 表达愈低。

1.6 统计学处理

细胞周期 G_1/S 时相的分布率和凋亡细胞比率用平均百分率±标准差表示,p21 表达的目标灰度值用均数±标准差表示,应用国际通用 SPSS(vol. 10. 0)统计软件进行单因素的方差分析。两变量之间的关系应用线性回归分析或相关分析。

2 结果

2.1 缺氧组和干预组与对照组 G_1/S 期细胞分布率

恢复 0 min 和恢复 60 min,干预组以 S 期细胞为主,S 期细胞的分布率显著高于缺氧组和对照组($P < 0.01$),而缺氧组和对照组则以 G_1 期细胞为主,两组 G_1 期细胞分布率差异无显著性($P > 0.05$);恢复 120 和 180 min,缺氧组 G_1 期细胞分布率均高于干预组和对照组($P < 0.01$),S 期细胞的分布率明显低于

干预组和对照组 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 缺氧组、干预组和对照组凋亡细胞比率

在恢复 0,60 min 时,三组细胞凋亡率差异无显

著性 ($P > 0.05$),恢复 120,180 min,缺氧组凋亡细胞比率明显高于干预组和对照组,其差异有显著性 ($P < 0.01$),见表 2。

表 1 缺氧组、干预组和对照组各时间段 G₁、S 期细胞分布率

Table 1 Distribution rate of G₁ and S phase cells in the Hypoxic, Intervention and Control groups ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	恢复 0 min		恢复 60 min		恢复 120 min		恢复 180 min	
	G ₁	S	G ₁	S	G ₁	S	G ₁	S
对照组	99.5±0.9	0.5±0.9	96.6±3.2	3.6±3.3	0.6±0.6 ^a	99.4±0.6 ^b	1.1±0.5 ^a	97.6±0.9 ^b
缺氧组	98.6±2.5	1.4±2.5	99.5±0.9	0.5±0.9	42.1±9.2	55.6±6.0	3.6±0.5	90.1±2.0
干预组	1.7±1.6 ^a	98.3±1.6 ^a	0.7±0.6 ^a	99.0±1.0 ^a	1.1±0.5 ^a	98.0±0.7 ^b	0.9±0.7 ^a	96.6±1.1 ^b

注: a 与缺氧组比较 $P < 0.0$; b 与缺氧组比较 $P < 0.05$

表 2 缺氧组、干预组和对照组各时间段凋亡细胞比率结果

Table 2 Percentage of apoptotic cells in the Hypoxic, Intervention and Control groups ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	恢复 0 min	恢复 60 min	恢复 120 min	恢复 180 min
对照组	15.5±0.8	20.5±1.2	25.6±1.1 ^a	23.6±1.4 ^a
缺氧组	17.2±1.6	20.5±1.0	33.6±0.8	37.5±1.2
干预组	19.3±0.7	18.3±1.1	20.9±1.7 ^a	22.5±1.1 ^a

注: a 与缺氧组比较 $P < 0.01$

2.3 缺氧组、干预组和对照组细胞 p21 表达

在恢复 120 min 时,干预组、缺氧组和对照组细胞 p21 平均目标灰度值分别为 152.3±2.4, 145.7±1.7,143.2±2.3,其中干预组细胞灰度值高于缺氧组和对照组,其差异均有显著性 ($P < 0.05$ 或 0.01),3 组细胞 p21 的表达均低于缺氧前 G₁/S 期细胞 ($P < 0.01$)。

2.4 细胞 p21 表达与相应 G₁ 细胞分布率和凋亡细胞比率的相关性分析

G₁ 期细胞分布率与相应细胞内 p21 表达呈线性关系(直线方程式为:G₁=685.85-4.36×p21,b=-4.36,r=0.64,P<0.01)。细胞凋亡比率与其相应细胞内 p21 表达无相关关系(r=0.342,P>0.05)。

3 讨论

围生期窒息主要病理生理特点是缺氧导致的组织细胞一系列代谢紊乱和器官损伤^[5,6],其中肾脏损伤占窒息发病率的 43%~75%。围生期急性肾损害常以 RTEs 增殖抑制和凋亡增加,肾小管发育障碍为其主要病理特点,但其病理机制尚不明确。

有人认为,围生期 RTEs 损伤与肾组织缺氧后酸中毒直接相关,对早期氧分压降低并不敏感^[2]。本研究结果显示,恢复 0,60 min,干预组以 S 期细胞为主,而缺氧组和对照组则以 G₁ 期细胞分布为主;恢复 120,180 min,缺氧组 G₁ 期细胞分布率仍高于干预组和对照组,氰化钠能导致细胞生长增殖过程中必备的胞内支架成分—F-actin 骨架系统发生紊乱^[7,8]。而斑蝥素作为蛋白磷酸酶抑制剂^[9],具有稳定低氧条件下细胞 F-actin 骨架系统的作用^[8]。

急性肾小管细胞损伤与细胞凋亡增加密切相关^[10]。体外试验显示,细胞凋亡多数发生在 G₁/S 界面^[11],然而,近年来越来越多研究显示,缺氧导致 S 期细胞凋亡增加的发生率并非少见。但机制不明确。有人认为,因 G₁/S 界面具有修复损伤蛋白质和 DNA 的抗细胞凋亡调控系统(如热休克蛋白系统等),S 期细胞凋亡增加可能与此损伤蛋白质和 DNA 修复不完善相关。本研究以新生猪 G₁/S 期 RTEs 为缺氧损伤的靶细胞,根据斑蝥素具有防止低氧状态下热休克蛋白脱磷酸化及稳定细胞 F-actin 骨架系统的抗细胞凋亡作用^[8],将其作为实验干预组。研究结果显示,在恢复 120 min 和 180 min 时,缺氧组凋亡细胞的比率明显高于干预组和对照组,此时 3 组细胞均以 S 期为主,由此提示,S 期细胞凋亡的增加可能与低氧直接损伤 G₁/S 界面细胞相关。而在恢复 0,60 min,缺氧组凋亡细胞比率与干预组和对照组的却无显著性差异,而此时,缺氧组细胞仍停留在 G₁/S 界面,而干预组细胞已进入 S 期,说明低氧仅能够延缓 G₁/S 细胞向 S 期转化,并不能增加 G₁/S 界面的细胞凋亡。由此提示:①低氧对 G₁/S 界面已形成的抗细胞凋亡系统可能无显著性影响,细胞转化调控系统可能处在抗细胞凋亡调控系统的下游;②相同的调节因子对细胞转化和

抗细胞凋亡的调节作用不仅相同,如细胞周期素依赖性激酶抑制因子(p21 等)。

p21 是关键性细胞周期素依赖性激酶的抑制因子,在肾脏急性缺血损伤中,p21 表达增加^[12],高水平的 p21 对 G₁/S 过渡的控制作用大于对发生细胞凋亡的作用^[13]。本研究结果显示,干预组细胞 p21 的表达明显低于缺氧组和对照组;且 3 组细胞 p21 的表达均低于缺氧前 G₁/S 界面细胞,细胞 p21 的表达与相应 G1 时相分布率呈正相线性关系,却与凋亡细胞比率则无相关关系,进一步验证了上述论点。

综上,我们推测,围生期 RTEs 急性损伤与窒息所致肾组织早期低氧环境密切相关,其损伤机制可能与低氧导致 G₁/S 界面细胞转化抑制,S 期细胞凋亡增加相关。

(致谢:本课题在实验过程中,得到了中国医学科学院成都血研所陈强副研究员、谭卫东和胡小芳技师,四川大学华西一附院移免室程惊秋教授和杨泽宏技师的大力帮助和指导,在此一并表示衷心的感谢。)

[参 考 文 献]

[1] 董文彬,杭永伦,陈红英,唐章华,陈书琴,王兴勇,等. 窒息新生儿尿中尿酸/肌酐比值的变化及意义 [J]. 中国当代儿科杂志,2002, 4(5): 365—366.

[2] Hentschel R, Lodige B, Bulla M. Renal insufficiency in the neonatal period [J]. Clin Nephrol, 1996, 46(1): 54—58.

[3] 沈青,杨存明,张国成,姚裕家,付雪梅. 过量胸苷对细胞周期素表达的影响 [J]. 第四军医大学学报,2003, 24(6): 31—33.

[4] Sheridan AM, Schwartz JH, Kroshian VM, Tercyak AM, Laraia J, Masino S, et al. Renal mouse proximal tubular cells

are more susceptible than MDCK cells to chemical anoxia [J]. Am J Physiol, 1993, 265 (3 Pt 2): F342—F350.

[5] 郑艳,董文彬,翟雪松,唐章华,陈书琴,陈红英. 新生鼠窒息后肾组织中钙离子的变化及意义 [J]. 中国当代儿科杂志,2002, 4(5): 354—356.

[6] 宫月,刘春峰,魏克伦. 缺氧新生鼠肾组织腺嘌呤核苷酸水平变化及线粒体形态改变 [J]. 中华儿科杂志,1999, 37(2): 82—84.

[7] Sinha D, Wang Z, Price VR, Schwartz JH, Lieberthal W. Chemical anoxia of tubular cells induces activation of c-Src and its translocation to the zonula adherens [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 284(3): F488—F497.

[8] Knapp J, Boknik P, Huke S, Gombosova I, Linck B, Luss H, et al. Contractility and inhibition of protein hosphatases by cantharidin [J]. Gen Pharmacol, 1998, 31(5): 729—733.

[9] Loktionova SA, Ilyinskaya OP, Kabakov AE. Early and delayed tolerance to simulated ischemia in heat-preconditioned endothelial cells: a role for HSP27 [J]. Am J Physiol, 1998, 275(6 Pt 2): H2147—H2158.

[10] Truong LD, Sheikh-Hamad D, Chakraborty S. Cell apoptosis and proliferation in obstructive uropathy [J]. Semin Nephrol, 1998, 18(6): 641—651.

[11] Watanabe F, Shinohara K, Teraoka H. Involvement of DNA-dependent protein kinase in down-regulation of cell cycle progression [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 35(4): 432—436.

[12] Megyesi J, Safirstein RL, Price PM. Induction of p21WAF1/CIP1/SDI1 in kidney tubule cells affects the course of cisplatin—induced acute renal failure [J]. J Clin Invest, 1998, 101(4): 777—782.

[13] Megyesi J, Andrade L, Vieira JM Jr, Safirstein RL, Price PM. Coordination of the cell cycle is an important determinant of the syndrome of acute renal failure [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 283(4): F810—F816.

(本文编辑:谢岷)

• 消 息 •

中国当代儿科杂志网站开通消息

中国当代儿科杂志网站已于 2004 年 6 月 15 日起试行开通,网址:www. cjcp. org。该网站为中英文双语版面,主要栏目有现刊、过刊检索;重要会议通知;书讯;重要医学网站链接;儿科专家寻访和论坛等。该网站为免费网站,注册后可下载 PDF 格式的全文。欢迎使用,并提宝贵意见。

中国当代儿科杂志编辑部