



斑蝥素对G₁/S期肾小管上皮细胞ATP的调节

斑蝥素是芫菁科药用甲虫主要成分,其药理机制主要与抑制细胞磷酸蛋白酶相关,具有稳定缺氧损伤肾细胞肌动蛋白骨架系统[1][2]及促进细胞周期进程[3]的作用,然而其相关机制尚不明确。为此,本研究根据细胞ATP代谢与肌动蛋白骨架系统的密切关系[4],以G₁/S界面肾小管上皮细胞(RTECs)作为氰化钠体外化学缺氧的靶细胞,观察斑蝥素对RTECs缺氧后能量代谢的影响,旨在阐明斑蝥素稳定细胞肌动蛋白骨架系统的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

新生猪G₁/S界面RTECs的获取参照文献[5]。DME/F-12、斑蝥素(Sigma);低糖DMEM、1:250胰蛋白酶(Gibco);胎牛血清(天津生物制品研究所);ATP、ADP、AMP钠盐(华美公司产品,进口分装);牛血清白蛋白(华美公司产品)。HClO₄、G-250CBB、乙腈(上海生化公司,分析纯)。BCM-100型生物洁净工作台、WJ-6C型CO₂培养箱(日本平泽产品);倒置显微镜(Olympus, Nippon);低温低速离心机、普通离心机、高效液相色谱仪(贝克曼);C-18反相色谱柱(5 mm ODS, 250 mm×4.6 mm孔径)。

1.2 实验方法

1.2.1 G₁/S RTECs缺氧模型建立 将G₁/S界面细胞分为3组,即(1)缺氧组:将G₁/S期细胞悬浮于10 mmol/L的NaCN的DME/F-12培养液中;(2)实验组:将诱导的G₁/S细胞悬浮于含斑蝥素0.2 mmol/L和10 mmol/L的NaCN的DME/F-12培养液中;(3)空白对照组:将诱导的G₁/S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和生理盐水0.1 ml。同时将3组细胞置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养1 h,弃去原培养液,PBS洗2次,迅速储存在-20 °C冰箱中1 h,然后转移到-80 °C冰箱中备用。

1.2.2 各组细胞ATP含量的检测[6] 应用HClO₄/KC1O₄提取细胞核苷酸池。采用定量进样-校正曲线进行ATP\ADP\AMP标准品混合液反相高效液相定量分析,应用外标法将各组细胞ATP所得峰面积与标准峰面积相比,结果再用每样品中细胞蛋白质含量进行标定(mmol/g蛋白质)。

1.3 统计学处理

ATP峰面积所对应ATP的含量用均数±标准差表示。样本间ATP含量均数的比较应用SPSS统计软件,进行单因素方差分析,两两均数的比较采用Dunnett检验。

2 结果

2.1 ATP标准品定性与定量结果

由AMP\ADP\ATP各标准品及标准品混合液的色谱图显示AMP峰在色谱图的位置(t_R值平均为12.56±

0.32)、ADP峰的位置(t_R 值平均为11.25±0.27)和ATP峰的位置(t_R 值平均为5.89±0.70)。根据标准品混合液加样量的不同(2.5、5、10、20、30、40、50 ml), ATP色谱图单位面积与ATP的标准含量具有线性关系($P<0.01$, $r=0.999$)。

根据内加法和重复性试验原理, 在样本中加入10 ml的ATP、ADP、AMP标准品混合液, 结果显示ATP色谱峰高在 t_R 为5.95±0.44处明显增高, 提示为样本细胞ATP的色谱图的位置。内加法与外标法检测结果基本一致。

2.2 各对照组细胞胞质ATP定量结果

应用外标法所检测ATP结果, 经过细胞蛋白质含量的标定, 实验组细胞内ATP的含量明显高于缺氧组和空白对照组[分别为(14.50±0.26)、(4.25±0.11)和(8.58±0.13) mmol/g蛋白, $F=2414.068$, $P=0.001$], 其中实验组与缺氧组比较统计结果为 $q_1=10.248$ 、 $P_1=0.001$, 实验组与对照组比较统计结果为 $q_2=5.92$ 、 $P_2=0.001$ 。

3 讨论

急性肾小管坏死是临床常见的急危重症, 急性缺血缺氧肾损伤是其主要的发病危险因素之一[7]。肾小管细胞肌动蛋白微丝骨架系统发生坍塌是急性缺血缺氧肾损伤早期小管细胞病理改变之一, 与细胞ATP代谢障碍密切相关[4]。那么, 斑蝥素稳定低氧状态下肾小球内皮细胞和RTECs肌动蛋白骨架系统的作用[1][2][8]是否与斑蝥素调节ATP的能量代谢相关, 尚未见文献报道。本研究结果显示, 实验组细胞缺氧后ATP的含量均较缺氧组和对照组高, 提示斑蝥素具有防止新生猪 G_1/S 细胞低氧损伤后细胞内ATP消耗的功能。ATP的黏附、水解及磷酸的释放对于F-actin的聚合与解聚、细胞内的分布及其相关的细胞功能具有关键性作用。其中, 磷酸蛋白酶通过使磷酸化蛋白质脱磷酸化, 消耗ATP, 导致细胞肌动蛋白微丝骨架系统解聚和再分布。因此, 斑蝥素稳定缺氧下细胞肌动蛋白微丝骨架系统可能与斑蝥素具有抑制磷酸蛋白酶的作用[9]相关, 抑制细胞内ATP的消耗, 防止因缺氧所致的RTECs的损伤。

氰化物体外化学缺氧是细胞缺氧模型的经典方法。氰化物通过开放胞膜受体离子通道, 使胞外 Ca^{2+} 按电化学梯度进入细胞[10], 最终导致线粒体 Ca^{2+} 超载, 激活氧自由基系统, 使线粒体通透性转变孔(MPTP)由低阻抗转化为高阻抗, 开放MPTP通道, 消耗大量的ATP。斑蝥素具有抑制内质网 Ca^{2+} 的释放[11], 减少线粒体 Ca^{2+} 负荷的作用。而线粒体对肌动蛋白的聚合与功能具有关键性调节作用[12]。因此, 斑蝥素可能通过调节线粒体能量代谢功能, 达到稳定缺氧条件下细胞肌动蛋白微丝骨架的功能和结构。

由上我们推论, 斑蝥素稳定低氧条件下RTECs肌动蛋白骨架系统可能与抗细胞内ATP代谢紊乱密切相关。但是, 斑蝥素曾因作为壮阳药品被人们长期服用后发现具有肾毒性, 为此, 斑蝥素稳定细胞肌动蛋白微丝骨架系统, 防止RTECs缺氧损伤作用还有待于进一步深入研究和论证。

参考文献:

[1] Loktionova SA, Kabakov AE. Protein phosphatase inhibitors and heat preconditioning prevent Hsp27 dephosphorylation, F-actin disruption and deterioration of morphology in ATP-depleted endothelial cells[J]. FEBS Lett, 1998, 433(3): 294-300.

[2] 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): H2147-58.

[3] Sakoff JA, Ackland SP, Baldwin ML, et al. Anticancer activity and protein phosphatase 1 and 2A inhibition of a new generation of cantharidin analogues[J]. Invest New Drugs, 2002, 20(1): 1-11.

[4] 罗正茂, 林沁, 张训, 等. 缺血性急性肾衰肾小管上皮细胞微丝的改变及其机制[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(6): 559-62.

Luo ZM, Lin Q, Zhang X, et al. Alternation of the microfilament in renal tubular

epithelial cells in ischemic acute renal failure and mechanism[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(6): 559-62.

[5] 沈青, 杨存明, 张国成, 等. 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): 510-2.

Shen Q, Yang CM, Zhang GC, et al. Effects of excess thymidine on expression of cyclin [J]. J Fourth Mil Med Univ, 2003, 24(6): 510-2.

[6] Huang QH, Lau SS, Monks TJ. Induction of gadd153 mRNA by nutrient deprivation is overcome by glutamine[J]. Biochem J, 1999, 341(1): 225-31.

[7] 钟先阳, 罗仁, 雷作熹. 大鼠失血性休克再灌注肾损伤的实验研究[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(5): 403-5.

Zhong XY, Luo R, Lei ZX. Renal ischemic-reperfusion injury following hemorrhagic shock in rats: an experimental study[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(5): 403-5.

[8] 沈青, 姚裕家, 杨泽宏, 等. 斑蝥素抗肾小管上皮细胞低氧损伤研究[J]. 中华儿科杂志, 2003, 41(11): 858-9.

Shen Q, Yao YJ, Yang ZH, et al. Preventive effect of cantharidin against hypoxic damage in renal tubular epithelial cells[J]. Chin J Pediatr, 2003, 41(11): 858-9.

[9] Knapp J, Boknik P, Huke S, et al. Contractility and inhibition of protein phosphatases by cantharidin[J]. Gen Pharmacol, 1998, 31(5): 729-33.

[10] Pombo CM, Tsujita T, Kyriakis JM, et al. Activation of the ste20-like oxidant stress response kinase-1 during the initial stages of chemical anoxia-induced necrotic cell death[J]. J Biol Chem, 1997, 272(46): 29372-9.

[11] Hong SJ. Inhibition of mouse neuromuscular transmission and contractile function by okadaic acid and cantharidin[J]. Br J Pharmacol, 2000, 130(6): 1211-8.

[12] Loisel TP, Boujemaa R, Pantaloni D, et al. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins[J]. Nature, 1999, 401(6753): 613-6.

参考文献:

[1] Loktionova SA, Kabakov AE. Protein phosphatase inhibitors and heat preconditioning prevent Hsp27 dephosphorylation, F-actin disruption and deterioration of morphology in ATP-depleted endothelial cells[J]. FEBS Lett, 1998, 433(3): 294-300.

[2] 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): H2147-58.

[3] Sakoff JA, Ackland SP, Baldwin ML, et al. Anticancer activity and protein phosphatase 1 and 2A inhibition of a new generation of cantharidin analogues[J]. Invest New Drugs, 2002, 20(1): 1-11.

[4] 罗正茂, 林沁, 张训, 等. 缺血性急性肾衰肾小管上皮细胞微丝的改变及其机制[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(6): 559-62.

Luo ZM, Lin Q, Zhang X, et al. Alternation of the microfilament in renal tubular epithelial cells in ischemic acute renal failure and mechanism[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 1999, 19(6): 559-62.

[5] 沈青, 杨存明, 张国成, 等. 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): 510-2.

- Shen Q, Yang CM, Zhang GC, et al. Effects of excess thymidine on expression of cyclin [J]. J Fourth Mil Med Univ, 2003, 24(6): 510-2.
- [6] Huang QH, Lau SS, Monks TJ. Induction of gadd153 mRNA by nutrient deprivation is overcome by glutamine[J]. Biochem J, 1999, 341(1): 225-31.
- [7] 钟先阳, 罗仁, 雷作熹. 大鼠失血性休克再灌注肾损伤的实验研究[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(5): 403-5.
- Zhong XY, Luo R, Lei ZX. Renal ischemic-reperfusion injury following hemorrhagic shock in rats: an experimental study[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(5): 403-5.
- [8] 沈青, 姚裕家, 杨泽宏, 等. 斑蝥素抗肾小管上皮细胞低氧损伤研究[J]. 中华儿科杂志, 2003, 41(11): 858-9.
- Shen Q, Yao YJ, Yang ZH, et al. Preventive effect of cantharidin against hypoxic damage in renal tubular epithelial cells[J]. Chin J Pediatr, 2003, 41(11): 858-9.
- [9] Knapp J, Boknik P, Huke S, et al. Contractility and inhibition of protein phosphatases by cantharidin[J]. Gen Pharmacol, 1998, 31(5): 729-33.
- [10] Pombo CM, Tsujita T, Kyriakis JM, et al. Activation of the ste20-like oxidant stress response kinase-1 during the initial stages of chemical anoxia-induced necrotic cell death[J]. J Biol Chem, 1997, 272(46): 29372-9.
- [11] Hong SJ. Inhibition of mouse neuromuscular transmission and contractile function by okadaic acid and cantharidin[J]. Br J Pharmacol, 2000, 130(6): 1211-8.
- [12] Loisel TP, Boujemaa R, Pantaloni D, et al. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins[J]. Nature, 1999, 401(6753): 613-6.