

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.17.002

肾损伤分子-1 在肾小管上皮细胞缺氧损伤中的保护作用*

霍文谦, 张克勤[△]

(第三军医大坪医院野战外科研究所泌尿外科, 重庆 400042)

[摘要] **目的** 观察肾损伤分子-1(KIM-1)对肾小管上皮细胞缺氧损伤时增殖及凋亡的影响,证实 KIM-1 对肾缺氧损伤的保护作用。**方法** 以人近端肾小管上皮细胞 HK-2 为研究对象,用 pcDNA-hKIM-1 质粒转染 HK-2 细胞,获得稳定表达 KIM-1 的 pcDNA-hKIM-1-HK2 细胞株。观察 pcDNA-hKIM-1-HK2 细胞(A 组)和 KIM-1 抗体预处理 pcDNA-hKIM-1-HK2 细胞(C 组)在缺氧损伤后细胞活力、凋亡指标及凋亡相关信号分子表达,以未转染缺氧 HK-2 细胞(B 组)作为对照。**结果** A 组细胞活力指数高于 B 组(0.427 ± 0.046 vs. 0.210 ± 0.036 , $P < 0.05$),细胞凋亡数量及流式细胞仪检测的缺氧早、晚期凋亡指数明显低于 B 组($P < 0.05$)。A 组细胞缺氧时磷酸化 ERK、磷酸化 Akt 表达较 C 组明显升高($P < 0.05$)。**结论** KIM-1 对肾小管上皮细胞缺氧损伤具有保护作用,其机制与激活 PI3K-Akt/PKB 和 ERK 信号通路抑制凋亡有关。

[关键词] 肾损伤分子 1;肾小管上皮细胞;缺氧损伤;保护效应

[中图分类号] R699.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)17-2308-03

KIM-1 protects renal tubular epithelial cells from hypoxic injury*

Huo Wenqian, Zhang Keqin[△]

(Department of Urology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University)

[Abstract] **Objective** To demonstrate the protective effect of Kidney injury molecule-1(KIM-1) on kidney hypoxic injury by observing the effect of KIM-1 on the proliferation and apoptosis of HK2 cells following hypoxic injury. **Methods** Human proximal kidney tubular epithelial cells (HK-2) were used in this study. The pcDNA-hKIM-1 plasmids were transfected into HK2 cells for obtaining pcDNA-hKIM-1-HK2 cell strain that stably expressed KIM-1. Cell viability, apoptosis and expression of apoptosis related signal molecules of pcDNA-hKIM-1-HK2(group A) and pcDNA-hKIM-1-HK2 pretreated by KIM-1 antibody(group C) were observed after hypoxic injury, and compared with the untransfected HK2(group B). **Results** The proliferation ability of group A was higher than the group B(0.427 ± 0.046 vs. 0.210 ± 0.036 , $P < 0.05$). The number of apoptotic cells and the apoptosis index determined by flow cytometry at early, middle and late hypoxic stages were obviously lower in the group A than in group B($P < 0.05$). The expression of phosphorylated ERK and phosphorylated Akt in group A increased significantly comparing with group C($P < 0.05$). **Conclusion** KIM-1 can protect renal tubular epithelial cells from hypoxic injury, and KIM-1 may suppress apoptosis through the activation of PI3K-Akt/PKB and ERK signal pathways.

[Key words] kidney injury molecule-1; renal tubular epithelial cells; hypoxic injury; protective effect

肾损伤分子-1(kidney injury molecule-1, KIM-1)的发现为诊断肾缺氧损伤提供了理想的特异性预警分子,也带来了新的治疗靶点。新近研究发现 KIM-1 不仅是一种诊断肾损伤的特异性标志物,还可能作为一种保护性分子参与了肾损伤修复过程,因为 KIM-1 与某些增殖标志物共表达,另外 KIM-1 可能通过吞噬凋亡小体减轻肾小管梗阻^[1]。但迄今关于 KIM-1 在肾小管上皮细胞缺氧损伤中的保护作用尚无直接证据。本研究通过建立 pcDNA-hKIM-1-HK2 细胞株,观察 KIM-1 在 HK-2 细胞缺氧损伤中的效应,从而提供 KIM-1 对肾小管缺氧损伤保护作用的直接证据。

1 材料与方法

1.1 材料 人近端肾小管上皮细胞 HK-2(上海复祥生物科技有限公司),pcDNA-hKIM-1 质粒(哈佛医学院 Ichimura 教授馈赠),人 KIM-1 ELISA Kit 96T(上海沪尚生物科技有限公司),鼠抗人 KIM-1 单克隆抗体(Sigma 公司),Hoechst 染色试剂盒(上海 BestBio),质粒转染试剂盒 Lipofectamine 2000(Ln-vitrogen 公司),流式细胞仪(Coulter 公司)。

1.2 方法

1.2.1 pcDNA-hKIM-1-HK2 细胞株的建立 将质粒转化到 DH5 α 感受态细胞,用质粒抽提试剂盒获得超纯质粒。HK-2 细胞在 5% CO₂、37℃ 下培养 24 h,加入质粒脂质体转染 72 h。细胞消化后按 1:4 密度传代到 6 孔板,每孔加 G418 (400 μ g/mL),每 3 天更换培养液 1 次,收集阳性细胞克隆扩大培养后继续 G418 筛选,获得稳定表达细胞株(pcDNA-hKIM-1-HK2)。

1.2.2 分组及缺氧培养 实验分 3 组,pcDNA-hKIM-1-HK2 细胞缺氧损伤组(A 组)、HK2 细胞缺氧损伤组(B 组,对照)、KIM-1 抗体处理的 pcDNA-hKIM-1-HK2 细胞缺氧培养组(C 组)。3 组细胞用胰酶消化后将细胞密度调整为 1×10^5 /mL,分别加 100 μ L 到 96 孔板中,放入 1% 氧浓度培养箱中缺氧培养 24 h。其中 C 组细胞每孔加鼠抗人 KIM-1 单克隆抗体(100 μ g/mL)1 μ L。

1.2.3 ELISA 法测定 3 组细胞 KIM-1 表达 取上述 A、B、C 组细胞,调整细胞浓度为 5×10^6 /mL。取上清离心 5 min, -70

℃ 冷藏待测。用 KIM-1 ELISA Kit 96T 试剂盒按说明操作测定 3 组细胞培养基中可溶性 KIM-1 表达。标准物的浓度与吸光度值计算出标准线的直线回归方程式,将样品的吸光度值代入方程式,计算出样品浓度(ng/L),实验结果取 3 次平均值。

1.2.4 MTT 法检测细胞活力 取 3 组缺氧细胞,加入 20 μL MTT 溶液继续缺氧培养 4 h,小心吸去孔内培养液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砷低速振荡 10 min。使用酶标仪(490 nm)测定细胞活力。数据以检测的细胞活性指数表示,实验结果取 3 次平均值。

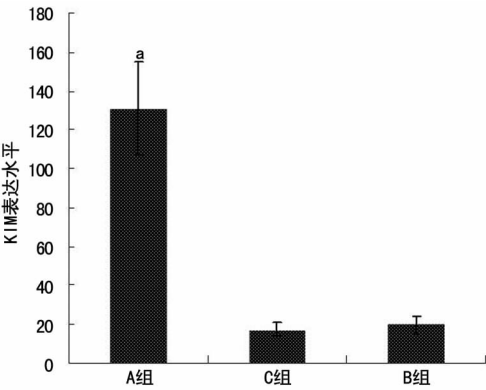
1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 取 3 组缺氧细胞用稀释的 Binding Buffer 重悬细胞,细胞浓度调整到 15×10^6 /mL,加入 5 μL Annexin V-FITC,混匀后室温孵育 15 min,加入 5 μL (0.25 μg)的 7-AAD 染色液,避光室温孵育 15 min。流式细胞仪激发波长 633 nm,最大发射波长 660 nm。凋亡数据以凋亡率表示,实验结果取 3 次平均值。

1.2.6 Western blot 检测凋亡相关信号分子 取 3 组缺氧细胞全蛋白上清液 15 μL 用于十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,一抗(分别为兔抗人 ERK1/2 抗体、磷酸化 ERK1/2 抗体、磷酸化 p38 抗体、磷酸化 JNK 抗体、Akt 抗体、磷酸化 AKT 抗体、兔抗人 β-actin 抗体)孵育 90 min,二抗(HRP 标记的山羊抗兔 IgG)孵育 60 min,加入 DAB 显色液,37 ℃ 避光显色。用 Olympus AX70 图像分析系统进行积分光密度值分析,观察 A 组和 C 组与 B 组相比的相对积分光密度值变化。实验结果取 3 次平均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件分析数据,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用配对 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

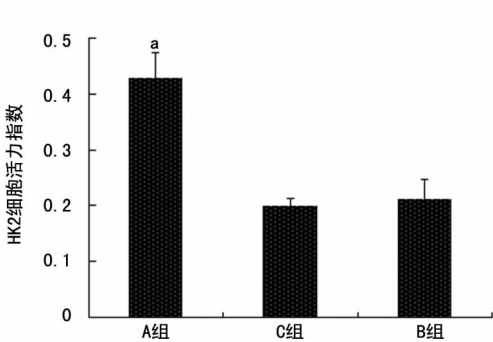
2.1 ELISA 法检测细胞 KIM-1 表达结果 3 组细胞缺氧损伤后培养基中可溶性 KIM-1 表达检测结果见图 1。A 组细胞 KIM-1 浓度[(130.88±23.92)ng/L]与 B 组细胞[(19.78±4.60)ng/L]比较差异有统计学意义($t=13.681,P=0.002$),而 C 组细胞 KIM-1 浓度[(17.20±3.74)ng/L]与 B 组比较差异无统计学意义($t=0.407,P=0.753$)。



^a: $P<0.05$,与 B 组比较。

图 1 HK2 细胞缺氧损伤后的可溶性 KIM-1 浓度检测

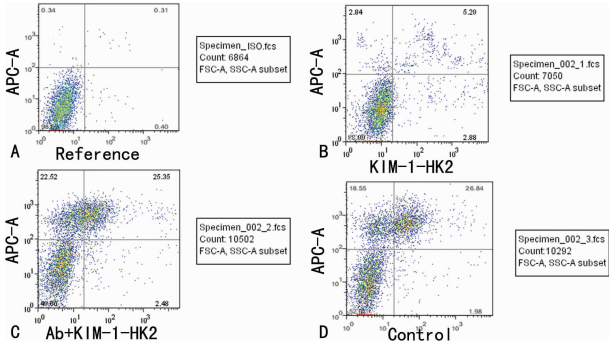
2.2 MTT 法检测细胞活力结果 3 组细胞缺氧损伤后细胞活力检测结果见图 2。A 组细胞活性指数(0.427±0.046)与 B 组(0.210±0.036)比较差异有统计学意义($t=9.423,P=0.011$),而 C 组细胞活性指数(0.198±0.015)与 B 组比较差异无统计学意义($t=0.413,P=0.720$)。



^a: $P<0.05$,与 B 组比较。

图 2 HK2 细胞缺氧损伤后的细胞活力检测(MTT 法)

2.4 流式细胞仪细胞凋亡检测 3 组细胞缺氧后流式细胞仪凋亡检测结果见图 3。结果显示:A 组细胞缺氧损伤后的早期凋亡量、晚期凋亡量及凋亡总量分别为(2.84±0.25)%、(5.29±1.27)%及(8.13±1.44)%,明显低于 B 组 HK2 细胞($t=20.280,7.958,25.301;P=0.002,0.015,0.002$)。而 C 组细胞凋亡量[(18.55±6.381)%、(26.84±6.651)%、(45.39±6.377%)]与 B 组细胞相似($t=3.851,2.807,4.725;P=0.061,0.107,0.052$)。



A:参照;B:A组;C:C组;D:B组。

图 3 HK2 细胞缺氧损伤后的凋亡检测(流式细胞术)

2.5 凋亡相关信号分子表达 3 组细胞缺氧损伤后的凋亡相关信号分子检测结果见图 4。3 组细胞 ERK、Akt 及磷酸化 p38,磷酸化 JNK 的表达量无明显变化,而磷酸化 ERK、磷酸化 Akt 表达在 A 组显著高于 B 组(5.33±1.02,4.39±1.31),且明显高于 C 组(2.10±0.86,1.88±0.47), $t=12.146,17.372,P=0.012,0.015$,提示 KIM-1 可能是通过 PI3K-Akt/PKB 通路和 ERK 通路来抑制细胞凋亡。

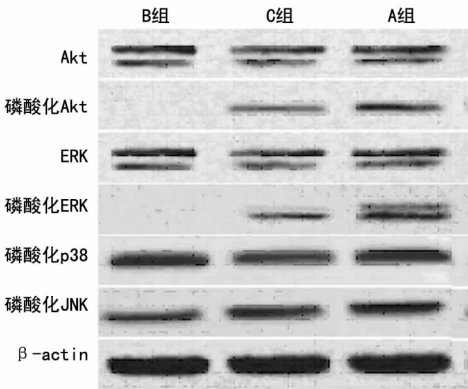


图 4 HK2 缺氧损伤的凋亡相关信号分子检测结果

3 讨 论

KIM-1 是最新发现的一种跨膜蛋白,特异性表达于损伤

后的近端小管上皮细胞,因此 KIM-1 一直被认为是诊断急性肾损伤的特异性标志物^[1-2]。研究发现 KIM-1 是一种新的免疫球蛋白超家族上皮黏附分子,可能作为功能分子参与了细胞迁移、增殖和去分化^[3-4]。Ichimura 等^[1]证实 KIM-1 是一种非骨髓来源的磷脂酰丝氨酸受体,使上皮细胞转化为吞噬细胞,借助吞噬受体吞噬小管凋亡细胞以促进修复。此外,可溶性 KIM-1 的 Ig 域可抑制整合素去极化从而抑制细胞脱落并避免脱落细胞间及其与纤连蛋白间黏附,减少管型形成^[1,5-6]。而且 KIM-1 主要表达于分裂期小管细胞并与 Pax-2 共表达,预示表达 KIM-1 的小管上皮细胞不是通过具有干细胞分化功能前体的选择性克隆扩增实现修复,而是与残存细胞的自我增殖有关^[7-8]。

虽然 KIM-1 被确定参与了肾损伤及修复的过程,但机制尚未完全阐明。本研究发现 KIM-1 过表达可促进细胞增殖对抗缺氧损伤,与文献报道的 KIM-1 与细胞增殖标记物共阳性吻合。本研究结果不仅说明 KIM-1 是细胞增殖修复的标志,而且是作为一种功能分子直接参与了肾小管上皮缺氧损伤后的自我修复。Bailly 等^[9]发现肝细胞生长因子 HGF(一种已知的肾上皮细胞修复因子)在吞噬凋亡细胞的小管上皮细胞中表达上调,推测 KIM-1 可能具有再生功能促进损伤细胞的替代或修复。因此,虽然具体机制不清,但本研究结果结合 KIM-1 在去分化的近端小管上皮细胞的特异性表达以及与细胞修复因子共表达,作者认为 KIM-1 可能通过调节肾小管上皮表型转化,促进上皮去分化以实现增殖修复功能。

诸多免疫球蛋白超家族上皮细胞黏附分子除了调节上皮细胞表型变化、迁移、增殖外,还具有抗凋亡作用^[10]。比如 T 细胞免疫球蛋白域黏蛋白-1 (TIM-1)可促进 T 细胞增殖并保护 T 细胞免受 Fas 介导的凋亡,胰腺导管癌细胞 L1 样细胞黏附分子(L1CAM)可对抗化疗药物引起的细胞凋亡、ICAM-3 抑制粒细胞凋亡,ICAM-1 及 VCAM-1 抗血管内皮凋亡等^[11-13]。另有研究发现:一种免疫球蛋白超家族上皮细胞黏附分子 CD146 可促进血管上皮细胞增殖,其在肾小管上皮的表达可对抗缺氧损伤凋亡,促进细胞的增殖和细胞间的同型黏附,在维持肾小管完整性和调节细胞渗透性等方面可能发挥着重要作用^[14]。本研究发现,pcDNA-hKIM-1-HK2 细胞在缺氧损伤后的凋亡量明显低于 HK2 细胞,这提示 KIM-1 作为新的免疫球蛋白超家族上皮黏附分子同样具有独立的抗缺氧凋亡作用,这种作用持续存在于损伤的早期及晚期。已知真核生物的细胞凋亡在后期主要是通过 caspases 途径来调节细胞凋亡,caspases 家族通过调节凋亡信号和凋亡抑制信号间的相互作用最终实现促进或抑制细胞凋亡,抑制细胞凋亡的生存通路包括 NF κ B 通路、PI3K-Akt/PKB 通路、ERK 通路^[15]。本研究结果提示虽然还可能存在其他通路,但 KIM-1 激活 PI3K-Akt/PKB 通路和 ERK 通路抑制细胞凋亡途径参与了缺氧损伤保护机制。

综上所述,本研究证实了 KIM-1 在近端小管上皮缺氧损伤中的保护作用,结合文献本研究认为 KIM-1 可能通过影响近端小管上皮的表型变化,促进细胞增殖实现修复。同时,KIM-1 具有独立对抗小管上皮细胞缺氧凋亡作用,这种功能可能与促进细胞的增殖和同型黏附,维持肾小管完整性和调节细胞渗透性有关。

参考文献

[1] Ichimura T, Bonvent RJ, Bailly V, et al. Kidney injury

molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury[J]. J Biol Chem, 1998,273(7):4135-4142.

- [2] Brian RL. Molecular markers of kidney injury[J]. Urologic Oncology, 2013,31(5):682-685.
- [3] Lim AI, Tang SC, Lai KN, et al. Kidney injury molecule-1: More than just an injury marker of tubular epithelial cells? [J]. J Cell Physiol, 2013,228(5):917-924.
- [4] Van Timmeren MM, Van Den Heuvel MC, Bailly V, et al. Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease[J]. J Pathol, 2007,212(2):209-217.
- [5] Borza CM, Chen XW, Mathew S, et al. Integrin alpha 1 beta 1 Promotes Caveolin-1 Dephosphorylation by Activating T cell Protein-tyrosine Phosphatase [J]. J Biol Chem, 2010,285(51):40114-40124.
- [6] Stefano A, Gabriela C. Regulation of T cell trafficking by the T cell immunoglobulin and mucin domain 1 glycoprotein[J]. Trends Mol Med, 2014,20(12):675-684.
- [7] Zhang BH, Bonventre JV. Shedding of the urinary biomarker kidney injury molecule-1(KIM-1) is regulated by MAP kinases and juxtamembrane region[J]. J Am Soc Nephrol, 2007,18(10):2704-2714.
- [8] Katja B, Marcus JM. Mechanisms of epithelial repair and regeneration after acute kidney injury[J]. Semin Nephrol, 2014,34(4):394-403.
- [9] Bailly V, Zhang Z, Meier W, et al. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration[J]. J Biol Chem, 2002,277(42):39739-39748.
- [10] Yuanxing L, Haofeng J, Yu Z, et al. Recipient T cell TIM-3 and hepatocyte galectin-9 signalling protects mouse liver transplants against ischemia-reperfusion injury[J]. J Hepatol, 2015,62(3):563-572.
- [11] Uchida Y, Ke B, Freitas MC, et al. The emerging role of T cell Ig mucin-1 (TIM-1) in the mechanism of liver ischemia and reperfusion injury in the mouse[J]. Am J Transplant, 2010,51(4):1363-1372.
- [12] Prozialeck WC, Edwards JR. Cell adhesion molecules in chemically-induced renal injury [J]. Pharmacol Ther, 2007,114(1):74-93.
- [13] Muerkoester SS, Werbing V, Sipos B, et al. Drug-induced expression of the cellular adhesion molecule L1CAM confers anti-apoptotic protection and chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma cells[J]. Oncogene, 2007,26(19):2759-2768.
- [14] Boneberg EM, Illges H, Legler DF, et al. Soluble CD146 is generated by ectodomain shedding of membrane CD146 in a calcium-induced, matrix metalloproteinase-dependent process[J]. Microvasc Res, 2009,78(3):325-331.
- [15] Rodrigue-Gervais IG, Saleh M. Caspases and immunity in a deadly grip [J]. Trends Immunol, 2013,34(2):41-49.

(收稿日期:2014-10-18 修回日期:2015-02-26)