

缺氧复氧后肾小管上皮细胞肿瘤坏死因子 α 的表达及胡黄连提取物对其的作用

杨永红, 张文博, 袁鹏英, 王亚平

(北京军区总医院肾内科, 北京 100700)

【摘要】 目的 观察缺氧复氧后肾小管上皮细胞肿瘤坏死因子 α (TNF α) 的表达及胡黄连提取物对其的影响。方法 建立人肾小管上皮细胞缺氧复氧损伤模型, 分别用不同浓度胡黄连提取物 (10 μ g/mL、100 μ g/mL、1 000 μ g/mL) 进行预处理, 采用流式细胞术检测不同组细胞内氧化应激水平, ELISA 法检测细胞上清 TNF α 蛋白表达、RT-PCR 法测定细胞 TNF α mRNA 表达。结果 缺氧复氧后肾小管上皮细胞内氧化应激水平提高, 细胞 TNF α 蛋白和 mRNA 表达上调, 且随缺氧时间的延长, 细胞内氧化应激水平逐渐升高, TNF α 表达逐渐增强; 胡黄连提取物呈剂量关系抑制细胞内氧化应激水平, 同时呈剂量关系抑制 TNF α 表达的上调。结论 缺氧复氧导致肾小管上皮细胞内氧化应激增强, 进而诱导 TNF α 表达上调; 胡黄连提取物可以通过抑制细胞内氧化应激抑制 TNF α 的上调。

【关键词】 缺氧复氧; 肾小管上皮细胞; 肿瘤坏死因子; 胡黄连提取物

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013)10-0031-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.010.007

Expression of TNF α in renal tubular epithelial cells with hypoxia-reoxygenation and effect of *Picrorhiza scrophlariiflora* Pennell on it

YANG Yong-hong, ZHANG Wen-bo, YUAN Peng-ying, WANG Ya-ping

(Department of Nephrology, General Hospital of Beijing Military Region. Beijing 100700, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the mechanism of expression of TNF α in renal tubular epithelial cells with hypoxia-reoxygenation (H/R) and to evaluate the effects of extracts of *Picrorhiza scrophlariiflora* Pennell on it. **Methods** Cultured human renal epithelial HK2 cells were divided into five groups: normal control group, H/R group, 10 μ g/mL extracts of *Picrorhiza scrophlariiflora* Pennell + H/R group, 100 μ g/mL extracts of *Picrorhiza scrophlariiflora* Pennell + H/R group, and 1 000 μ g/mL extracts of *Picrorhiza scrophlariiflora* Pennell + H/R group. Flow cytometry was used to detect the oxidative stress and expressions of TNF α protein. Real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of TNF α mRNA. **Result** The oxidative stress in renal tubular epithelial cells was induced by H/R. TNF α protein was increased after H/R. TNF α mRNA was increased after H/R. Oxidative stress in the renal tubular epithelial cells was inhibited by extracts of *Picrorhiza scrophlariiflora* Pennell in a dose-dependent manner. TNF α protein was inhibited by extracts of *Picrorhiza scrophlariiflora* Pennell in a dose-dependent manner. TNF α mRNA was inhibited by extracts of *Picrorhiza scrophlariiflora* Pennell in a dose-dependent manner. **Conclusions** Extracts of *Picrorhiza scrophlariiflora* Pennell protects renal epithelial cells against TNF α by inhibiting

【作者简介】 杨永红 (1972 -), 男, 副主任医师, 副教授, 研究方向: 急慢性肾功能衰竭。

【通讯作者】 王亚平, E-mail: wyp2288@163.com。

oxidative stress after H/R injury.

【Key words】 Hypoxia-reoxygenation; Renal tubular epithelial cells; TNF α ; Extracts, *Picrorhiza scrophulariiflora* Pennell

我们在以往的动物实验中发现,大鼠肾脏缺血再灌注后肾组织丙二醛含量增高,谷胱甘肽过氧化物酶减少,在肾小管 MCP-1、TNF α 等炎症因子表达明显增高,同时发现胡黄连提取物可以降低此过程中的氧化应激水平,抑制 TNF α 、MCP-1 等表达。我们用缺氧复氧损伤肾小管上皮细胞模型模拟缺血再灌注,观察到缺氧复氧后肾小管上皮细胞氧化应激明显升高,MCP-1 表达明显增高^[1]。我们拟在细胞水平进一步观察胡黄连提取物对缺氧复氧后肾小管上皮细胞的保护作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人肾小管上皮细胞(HK2)购自中科院上海细胞库,人 TNF α ELISA 试剂盒为 Santa Cruz 公司产品,Trizol 试剂为 Gibco 公司产品,Taq DNA 聚合酶和 M-MLV 逆转录酶为 Promega 公司产品,TNF α 引物由上海博亚公司合成,二氢二氯荧光素(DCFH)购自 Sigma 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司,胰蛋白酶购自 Sigma 公司。胡黄连提取物原料购于北京同仁堂,将生药粉碎,95%乙醇提纯,2次过滤蒸馏,冷冻干燥制成胡黄连提取物。

1.2 制备缺氧复氧细胞模型

取第3~4代人肾小管上皮细胞(HK2),显微镜下计数调节细胞浓度为 1×10^6 /mL,用含 10% 血清的 RPMI 1640 培养液在 37℃、95% O₂、5% CO₂ 环境中培养 12 h,然后更换培养液为无糖 Hank's 液,将细胞放入持续 95% N₂、5% CO₂ 平衡的孵育箱中分别培养 0.5 h、1 h、2 h,再用含 5% 血清的 RPMI 1640 培养液在 95% O₂、5% CO₂ 培养 24 h。取缺氧复氧细胞 2 h 模型,分别用不同浓度(10 μ g/mL、100 μ g/mL、1 000 μ g/mL) 胡黄连提取物进行干预,分组如下:①正常对照组 ②单纯缺氧复氧组 ③10 μ g/mL 胡黄连提取物组 ④100 μ g/mL 胡黄连提取物组 ⑤1 000 μ g/mL 胡黄连提取物组。正常对照组在 37℃、95% O₂、5% CO₂ 环境中持续培养 24 h。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 流式细胞术检测细胞内氧化应激水平^[2]:采用氧化敏感的荧光探针二氢二氯荧光素(DCFH)染色,收集细胞前 30 min 加入 0.1 μ mol/L DCFH 孵

育,用 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞(1×10^6),冷 PBS 冲洗 3 次,将收集细胞离心沉淀,弃上清液,加入 0.5 mL 固定缓冲液(FACS 缓冲液 0.3 mL,2% 多聚甲醛 0.2 mL)重悬混匀,4℃避光保存,流式细胞术检测细胞平均荧光强度。每个样本至少测量 10 000 个细胞。

1.3.2 ELISA 法检测细胞上清 TNF α 蛋白:按时收集各组细胞(1×10^6 /mL),加入细胞裂解液,制成蛋白溶液,按操作说明检测细胞上清中 TNF α 的浓度,同时测蛋白溶液的蛋白浓度,计算每孔的蛋白数量,然后将测得的蛋白浓度除以相应各组细胞的蛋白总量平衡各组细胞数量的差异。

1.3.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测细胞 TNF α mRNA 表达:提取总 RNA,逆转录后取 2 μ L 逆转录产物进行 PCR 扩增,PCR 条件为:93℃变性 1 min,57℃退火 30 s,72℃延伸 2 min。TNF α mRNA 两条引物为:Sense Primer 5'-CTC CAC CCA TGT GCT CCT CAC 3', Anti-sense Primer 5'-CCC AAA GTA GAC CTG CCC AGA 3'。内参照采用 β -actin,取 PCR 扩增产物 10 μ L 在 2% 琼脂糖凝胶中电泳,用溴化乙锭染色,采用凝胶成像分析系统进行半定量。

1.4 统计学方法

所有数据分析由统计软件 SPSS 11.5 完成。所有数据均代表 5 次以上重复试验的结果,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数的比较用 One-Way ANOVA,多重比较用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧复氧后 HK2 细胞内氧化应激变化及胡黄连提取物对其的影响

DCFH 可以自由通过细胞膜进入 HK2 细胞内,转入细胞后被各种活性氧(ROS)氧化,转化为可以发出荧光的 2,7-二氯荧光素,可以用通过细胞的线形门的百分率来表示 HK2 细胞内的氧化应激水平。结果显示:正常情况下 HK2 细胞内基本无荧光表达,经过缺氧复氧处理后 HK2 细胞内荧光表达明显升高,并且随着缺氧时间的延长, HK2 细胞内荧光表达逐渐升高(表 1)。

表 1 缺氧不同时间后 HK2 细胞的变化(%)

Tab.1 Changes of HK2 cells after hypoxia at different time points (expressed in percentage)

组别 Groups	数量 Number	百分率 (%)
正常对照组 Normal control group	8	1.63 ± 0.52
缺氧 0.5 h 组 Hypoxia 0.5 hour group	8	78.73 ± 2.05 [△]
缺氧 1 h 组 Hypoxia 1 hour group	8	84.65 ± 2.11 [△]
缺氧 2 h 组 Hypoxia 2 hours group	8	94.18 ± 1.66 [△]

[△] 与对照组相比 $P < 0.05$ 。[△] Compared with the control group, $P < 0.05$.

用 10 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 胡黄连提取物预处理后,各组百分率较单纯缺氧复氧组下降(表 2)。

表 2 不同浓度胡黄连提取物干预后百分率变化

Tab.2 Changes of HK2 cells after treatment with extracts of *Picrorhiza scrophlariiflora* Pennell in different doses (expressed in percentage)

组别 Groups	数量 Number	百分率 (%)
正常对照组 Normal control group	8	1.63 ± 0.52
单纯缺氧复氧组 Hypoxia reoxygenation group	8	94.32 ± 0.35 [△]
10 $\mu\text{g/mL}$ 提取物组 10 $\mu\text{g/mL}$ extracts group	8	91.23 ± 0.31 ^{△▲}
100 $\mu\text{g/mL}$ 提取物组 100 $\mu\text{g/mL}$ extracts group	8	89.17 ± 0.63 ^{△▲}
1 000 $\mu\text{g/mL}$ 提取物组 1 000 $\mu\text{g/mL}$ extracts group	8	84.95 ± 0.72 ^{△▲}

[△] 与对照组相比 $P < 0.05$; [▲] 与单纯缺氧复氧组相比 $P < 0.05$ 。[△] Compared with the control group, $P < 0.05$. [▲] Compared with the hypoxia-reoxygenation group, $P < 0.05$.

2.2 缺氧复氧后 HK2 细胞 $\text{TNF}\alpha$ 变化及胡黄连提取物对其的影响

正常 HK2 细胞上清 $\text{TNF}\alpha$ 表达很低,经过缺氧复氧处理后明显升高,并且随着缺氧时间的延长,细胞上清 $\text{TNF}\alpha$ 表达逐渐升高(表 3)。

用 10 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 胡黄连提取物预处理后,各组细胞上清 $\text{TNF}\alpha$ 较单纯缺氧复氧组下降(表 4)。

表 4 不同浓度胡黄连提取物干预后细胞上清 $\text{TNF}\alpha$ 变化Tab.4 Changes of $\text{TNF}\alpha$ concentration in the culture supernatant after treatment with different dose extracts of *Picrorhiza scrophlariiflora* Pennell

组别 Groups	数量 Number	$\text{TNF}\alpha$ 浓度 (pg/ μg) $\text{TNF}\alpha$ concentration (pg/ μg)
正常对照组 Normal control group	8	30.16 ± 3.36
单纯缺氧复氧组 Hypoxia reoxygenation group	8	413.08 ± 63.85 [△]
10 $\mu\text{g/mL}$ 提取物组 10 $\mu\text{g/mL}$ extracts group	8	113.59 ± 9.03 ^{△▲}
100 $\mu\text{g/mL}$ 提取物组 100 $\mu\text{g/mL}$ extracts group	8	103.32 ± 7.16 ^{△▲}
1 000 $\mu\text{g/mL}$ 提取物组 1 000 $\mu\text{g/mL}$ extracts group r	8	69.52 ± 8.00 ^{△▲}

[△] 与对照组相比 $P < 0.05$, [▲] 与单纯缺氧复氧组相比 $P < 0.05$ 。[△] Compared with the control group $P < 0.05$. [▲] Compared with the hypoxia reoxygenation group, $P < 0.05$.表 3 缺氧不同时间后细胞上清 $\text{TNF}\alpha$ 变化Tab.3 Changes of $\text{TNF}\alpha$ concentration in the culture supernatant after hypoxia for different time

组别 Groups	数量 Number	$\text{TNF}\alpha$ 浓度 (pg/ μg) $\text{TNF}\alpha$ concentration (pg/ μg)
正常对照组 Normal control group	8	30.16 ± 3.36
缺氧 0.5 h 组 Hypoxia 0.5 hour group	8	70.46 ± 7.50 [△]
缺氧 1 h 组 Hypoxia 1 hour group	8	211.14 ± 12.02 [△]
缺氧 2 h 组 Hypoxia 2 hours group	8	324.49 ± 14.46 [△]

[△] 与对照组相比 $P < 0.05$ 。[△] Compared with the control group, $P < 0.05$.

2.3 缺氧复氧后 HK2 细胞 $\text{TNF}\alpha$ mRNA 变化及胡黄连提取物对其的影响

正常 HK2 细胞 $\text{TNF}\alpha$ mRNA 表达很低,经过缺氧复氧处理后明显升高,并且随着缺氧时间的延长, $\text{TNF}\alpha$ mRNA 表达逐渐升高(图 1,表 5)。

用 10 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、1000 $\mu\text{g/mL}$ 胡黄连提取物预处理后,各组细胞上清 $\text{TNF}\alpha$ 较单纯缺氧复氧组下降(图 2,表 6)。

3 讨论

临床中急性肾损伤常发生于心脏外科、创伤科、产科、ICU 等,并且发生率呈增长趋势。缺血再灌注是急性肾损伤的常见原因之一,其可能的机制比较多,本实验以缺氧复氧的细胞模型模拟缺血再灌注,流式细胞术检测结果显示,在经过缺氧复氧处理后肾小管上皮细胞的氧化应激水平明显升高,提示细胞内各种活性氧(ROS)的含量增加。ROS 可以通过几方面对组织造成损伤:(1)直接损伤细胞组织,如过氧化多价不饱和脂肪酸而损伤各种生物膜,攻击蛋白质和 DNA 分子等;(2)通过过氧化作用产生更多具有活性氧的代谢物,放大氧自由基的损伤作用;(3)通过激活细胞内或者细胞外液中潜在的化学趋化因子如 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-1 等^[3,4],使中性

表 5 缺氧不同时间后 TNF α mRNA 变化
Tab. 5 Changes of TNF α mRNA in the cells after hypoxia for different time

组别	数量	光密度比值
Groups	Number	Optical density ratio
正常对照组 Normal control group	8	1.0 $\pm$ 0.0
缺氧 0.5 h 组 Hypoxia 0.5 hour group	8	1.40 $\pm$ 0.03 [△]
缺氧 1 h 组 Hypoxia 1 hour group	8	1.72 $\pm$ 0.11 [△]
缺氧 2 h 组 Hypoxia 2 hour group	8	2.14 $\pm$ 0.10 [△]

[△] 与对照组相比, $P < 0.05$ 。

[△] Compared with the control group, $P < 0.05$.

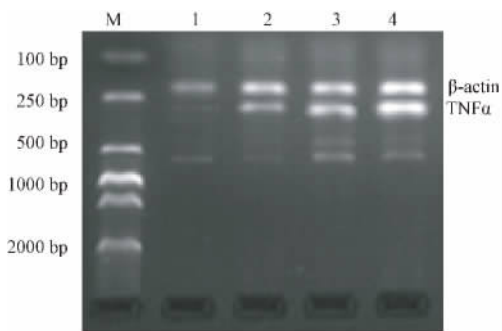
表 6 不同浓度胡黄连提取物干预后 TNF α mRNA 变化

Tab. 6 Changes of TNF α mRNA in the cells after treatment with different dose extracts of *Picrohiza scrophlariiflora* Pennell

组别	数量	光密度比值
Groups	Number	Optical density ratio
正常对照组 Normal control group	8	1.0 $\pm$ 0.0
单纯缺氧复氧组	8	2.16 $\pm$ 0.09 [△]
Hypoxia reoxygenation group		
10 μ g/mL 提取物组	8	1.82 $\pm$ 0.12 ^{△▲}
10 μ g/mL extracts group		
100 μ g/mL 提取物组	8	1.47 $\pm$ 0.04 ^{△▲}
100 μ g/mL extracts group		
1 000 μ g/mL 提取物组	8	1.35 $\pm$ 0.05 ^{△▲}
1 000 μ g/mL extracts group		

[△] 与对照组相比 $P < 0.05$; [▲] 与单纯缺氧复氧组相比 $P < 0.05$ 。

[△] Compared with the control group, $P < 0.05$, [▲] Compared with the hypoxia reoxygenation group, $P < 0.05$.



1. 正常对照组; 2. 缺氧 0.5 h 组; 3. 缺氧 1 h 组; 4. 缺氧 2 h 组。

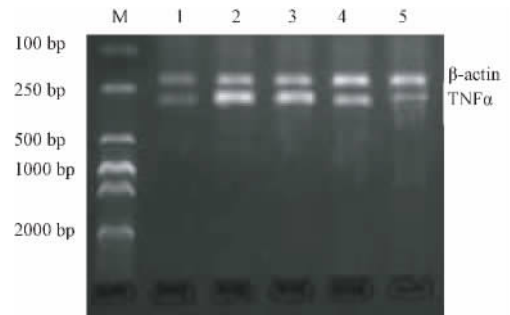
图 1 缺氧不同时间 HK2 细胞 TNF α mRNA 的变化

The change of TNF α mRNA in cells after hypoxia at different time.

1. Normal control group; 2. Hypoxia 0.5 hour group;
 3. Hypoxia 1 hour group; 4. Hypoxia 2 hours group.

Fig. 1 Changes of TNF α mRNA in the cells after hypoxia for different time

粒细胞等粘附在损伤组织同时释放氧化酶进一步损伤组织。本实验流式细胞术和 RT-PCR 结果显示,肾小管上皮细胞经过缺氧复氧处理后 TNF α 蛋白和 mRNA 表达水平分别提高,肾小管上皮细胞 TNF α 的高表达即可以直接损伤上皮细胞,也可以



1. 正常对照组; 2. 单纯缺氧复氧组; 3. 10 μ g/mL 胡黄连提取物组; 4. 100 μ g/mL 胡黄连提取物组; 5. 1000 μ g/mL 胡黄连提取物组。

图 2 胡黄连提取物对缺氧复氧后 HK2 细胞 TNF α mRNA 表达的影响

1. Normal control group, 2. Hypoxia reoxygenation group, 3. 10 μ g/mL extracts group 4. 100 μ g/mL extracts group, 5. 1 000 μ g/mL extracts group.

Fig. 2 Changes of TNF α mRNA in the cells after treatment with different dose extracts of *Picrohiza scrophlariiflora* Pennell

放大氧化作用,促进炎症反应。ROS 增多及 TNF α 高表达均可以直接或者间接导致肾小管上皮细胞凋亡或者死亡。以上结果与我们前期动物实验及进一步的细胞实验结果相吻合。

实验结果表明,经胡黄连提取物预处理后,缺氧复氧后肾小管上皮细胞的氧化应激水平得到不同程度的抑制,同时抑制了 TNF α 的表达,另外我们同期的实验结果显示胡黄连提取物还可以减少缺氧复氧后凋亡细胞和死亡细胞的数量,提示胡黄连提取物可能通过阻断或抑制细胞内氧化应激反应等途径保护肾小管上皮细胞。以上结果也与我们动物实验相关实验结果吻合。多数学者认为胡黄连提取物的多种保护作用可能主要与其保护细胞内抗氧化酶的活性、清除氧自由基、提高机体的抗氧化能力有关。近几年研究发现,印度胡黄连提取物富含 apocynin,中文译名为香英兰乙酮、夹竹桃麻素等,可以特异性抑制还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶的活性。NADPH 氧化酶大量存在于包括中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核巨噬细胞在内的吞噬细胞膜上^[9],NADPH 氧化酶被激活生成大量活性氧,进而形成多种氧代谢物参与氧化应激反应,即氧爆发或者呼吸爆发。最近研究表明,NADPH 氧化酶也是包括肾小管上皮细胞、肾小球系膜细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞、成纤维细胞等非吞噬细胞产生活性氧的重要来源^[9]。

NADPH 氧化酶的激活在缺血再灌注损伤、炎症、糖尿病、动脉硬化的病理过程中发挥着重要作用^[7,8]。我们前期实验结果证实^[9], Apocynin 可以呈剂量依赖关系降低缺氧复氧后肾小管上皮细胞氧化应激水平, 并且减少凋亡细胞及死亡细胞的数量。本实验结果与上述实验结果吻合, 说明胡黄连提取物抑制缺氧复氧后细胞氧化应激和减轻细胞损伤的作用与 apocynin 关系密切, 其通过抑制肾小管上皮细胞膜内 NADPH 氧化酶活性来降低氧化应激水平和减轻细胞损伤的可能性非常大, 其具体机制有待进一步研究。NADPH 氧化酶是一个多成分系统, 包括黄素蛋白、细胞色素 b558 和醌(Q) 等, 在生理状态下这些细胞的 NADPH 氧化酶活性很低, 在成膜结合状态时才具有催化活性, 因此在活化过程中的任一环节受损, 都可以对 NADPH 氧化酶的活性产生抑制作用。Apocynin 可以阻止 NADPH 氧化酶胞浆组分 p47phox 与 p67phox 结合成膜结合复合物^[10,11], 从而抑制 NADPH 氧化酶的激活, 借鉴此方面的相关研究结果, 我们以后会在在细胞信号转导方面进行进一步研究。

参考文献:

- [1] 杨永红, 李建华. 缺氧复氧后肾小管上皮细胞 MCP-1 表达及 N-乙酰半胱氨酸对其的干预研究 [J]. 实用医学, 2009, 9 (25): 1353 - 1355.
- [2] Bass DA, Pare JW, Dechatelet LR, et al. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: A graded response to membrane stimulation [J]. J Immunol, 1983, 130 (4): 1910 - 1917.
- [3] Long T, Liu G, Wang Y, et al. TNF- α , erectile dysfunction, and NADPH oxidase-mediated ROS generation in corpus cavernosum in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats [J]. J Sex Med. 2012, 9 (7): 1801 - 1814.
- [4] Ahmad R, Sylvester J, Ahmad M, et al. Adaptor proteins and Ras synergistically regulate IL-1-induced ADAMTS-4 expression in human chondrocytes [J]. J Immunol. 2009, 182 (8): 5081 - 5087.
- [5] Kleniewska P, Piechota A, Skibska B, et al. The NADPH oxidase family and its inhibitors [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2012, 60 (4): 277 - 294.
- [6] Thamilselvan V, Menon M, Thamilselvan S. Oxalate-induced activation of PKC- α and - δ regulates NADPH oxidase-mediated oxidative injury in renal tubular epithelial cells [J]. Am J Physiol Renal Physiol. 2009, 297 (5): F1399 - 1410.
- [7] Pandey D, Patel A, Patel V, et al. Expression and functional significance of NADPH oxidase 5 (Nox5) and its splice variants in human blood vessels [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2012, 302 (10): H1919 - 1928.
- [8] Pang T, Wang J, Benicky J, et al. Telmisartan directly ameliorates the neuronal inflammatory response to IL-1 β partly through the JNK/c-Jun and NADPH oxidase pathways [J]. J Neuroinflammation. 2012, 9: 102.
- [9] 杨永红, 李建华. Apocynin 对缺氧复氧后肾小管上皮细胞凋亡的干预研究 [J]. 武警医学, 2009, 4 (20): 337 - 340.
- [10] Mora-Pale M, Kwon SJ, Linhardt RJ, et al. Trimer hydroxylated quinone derived from apocynin targets cysteine residues of p47phox preventing the activation of human vascular NADPH oxidase [J]. Free Radic Biol Med. 2012, 52 (5): 962 - 969.
- [11] Monaghan-Benson E, Hartmann J, Vendrov AE, et al. The role of vascular endothelial growth factor-induced activation of NADPH oxidase in choroidal endothelial cells and choroidal neovascularization [J]. Am J Pathol. 2010, 177 (4): 2091 - 2102.

(修回日期) 2013-09-09