

蟾蜍灵对小鼠足细胞阿霉素模型 nephrin 和 p38 表达的影响

李善文 施会敏 张爱青 甘卫华

(南京医科大学第二附属医院 儿肾科 江苏 南京 210003)

【摘要】目的: 探讨蟾蜍灵(bufofin)对阿霉素损伤足细胞 nephrin 和 p38 表达的影响。方法: 体外培养正常足细胞并进行分组: 对照组、蟾蜍灵组、阿霉素诱导组和阿霉素诱导 + 蟾蜍灵组。制备阿霉素损伤足细胞模型, 蟾蜍灵按一定梯度浓度范围干预足细胞, MTT 法确定其作用于足细胞的安全、有效剂量。倒置显微镜观察足细胞形态, 实时荧光定量 PCR 检测足细胞 nephrin 和 p38 基因相对表达水平。结果: MTT 法提示蟾蜍灵浓度 10^{-8} mol/L 足细胞成活率在 90% 以上。阿霉素诱导组、阿霉素诱导 + 蟾蜍灵组、蟾蜍灵组, 倒置显微镜下观察足细胞形态与对照组相比无明显改变。实时荧光定量 PCR 检测足细胞 nephrin mRNA 相对表达, 蟾蜍灵组较对照组无明显变化, 阿霉素诱导组 nephrin mRNA 表达与对照组相比显著下降 ($P < 0.05$), 阿霉素 + 蟾蜍灵组 nephrin mRNA 表达仍下降, 但与阿霉素组比较明显升高 ($P < 0.05$)。实时荧光定量 PCR 检测 p38 mRNA 表达, 各组较对照组表达均升高 ($P < 0.05$), 阿霉素诱导组升高最显著, 阿霉素诱导 + 蟾蜍灵组较阿霉素诱导组表达明显降低 ($P < 0.05$)。结论: 蟾蜍灵可能通过调控足细胞 nephrin 的表达减缓阿霉素对足细胞的损害, 此调节过程可能与足细胞 p38 的表达变化有关。

【关键词】蟾蜍灵; 足细胞; nephrin; p38

【中图分类号】R 692 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2015.05.002

Effects of bufofin on the expression of nephrin and p38 in podocytes of mice induced by adriamycin

LI Shanwen, SHI Huimin, ZHANG Aiqing, GAN Weihua

Department of Pediatric Nephrology, Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210003, China

【Abstract】Objective: To observe the effect of bufofin on expression of nephrin and p38 in podocytes of mice induced by adriamycin. **Methods:** Mouse podocytes were initially *in vitro* cultured and divided into four groups: namely control group, bufofin group, adriamycin induced group and bufofin plus adriamycin induced group. Mouse models with injured podocytes were induced with adriamycin, and then treated with bufofin in gradient dose fashion to determine the safety and effective dose by MTT assay. Inverted microscope was used to observe the morphology of the podocytes, and real time PCT was performed to detect the relatively expressed level of nephrin protein and p38 in the podocytes. **Results:** MTT assay indicated that bufofin in dose of 10^{-8} mol/L led to survival rate of podocytes over 90% and microscopy showed no significant difference in cellular morphology between groups induced with adriamycin, adriamycin plus bufofin and bufofin treatment and control group. Nephrin mRNA expression in the podocytes was not significant, yet notably decreased in adriamycin induced group as compared with the controls ($P < 0.05$), and nephrin mRNA expression was further down-regulated in adriamycin + bufofin group and contrarily increased significantly in adriamycin induced group ($P < 0.05$). Expression of p38 mRNA increased in all groups except the controls ($P < 0.05$), and was robust in adriamycin induced group, yet decreased significantly in adriamycin plus bufofin models compared with adriamycin induced group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Bufofin may have a protective effect on the impaired podocytes induced by adriamycin through increasing the cellular nephrin protein expression. The potential mechanism may be associated with the regulation of p38 expression in the podocytes.

【Key words】 bufofin; podocyte; nephrin; p38

目前认为蛋白尿是肾功能恶化的独立危险因素, 而足细胞损伤是产生蛋白尿的关键因素。足细胞是肾脏的一种固有细胞, 当其损伤持续或加重时, 可以导致肾小球硬化^[1]。由 podocin、nephrin、CD2AP 等多种蛋白质分子组成裂孔隔膜复合体

(SD), 是足细胞的重要组成部分, 这一结构在维持肾小球滤过功能中起关键作用^[2-3]。1974 年由 Rodewald 和 Kamovsky 首次提出 SD 概念, nephrin 是 SD 的主要结构蛋白, 主要功能包括细胞信号转导、维持细胞形态和稳定滤过屏障等^[4-6]。我们前期

基金项目: 江苏省高校自然科学基金项目(12KJB320002); 南京医科大学科技发展基金面上项目(2011NJMU146)

收稿日期: 2015-02-03

作者简介: 李善文(1982-), 女, 主治医师, 硕士 (电话) 15252458878 (电子信箱) seven_2001@163.com;

张爱青, 男, 主治医师 (电子信箱) njaiqing@njmu.edu.cn, 通讯作者。

的体内试验提示: 蟾蜍灵干预阿霉素肾病模型大鼠, 可通过影响 nephrin 的表达和分布以达到减轻蛋白尿, 保护肾脏的作用^[7]。本课题从细胞水平进一步验证 nephrin 的表达及分布变化, 并通过对 MAPK 信号转导通路关键分子的检测, 进一步探讨蟾蜍灵改善阿霉素诱导的足细胞损伤的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 小鼠足细胞系 MPC5 为美国 Mundel 教授(Albert Einstein college of Medicine, New York) 惠赠; 蟾蜍灵、 γ -干扰素(pepro Tech 英国)、胎牛血清(Hyclone 美国)、1640 培养基(Gibco 美国)、I 型胶原(Sigma) 培养瓶(NUNC 丹麦)、恒温孵育箱; 胰蛋白酶(Gibco, 美国); TRIzol Reagent(Invitrogen, 美国); DNA Maker(TaKaRa, 日本); 电子显微镜(Olympus, 日本); 梯度 PCR 仪(Eppendorf, 德国)。

1.2 足细胞培养及分组

1.2.1 足细胞培养 小鼠足细胞系 MPC5, 用含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液, 于 5% CO₂ 恒温孵育箱培养。足细胞复苏后于 33℃ 在重组小鼠 γ -干扰素诱导下传代增生, 接种到涂有 I 型胶原的培养皿内, 并于 37℃ 培养 14 d 使其分化成熟后进行实验。

1.2.2 MTT 比色法检测足细胞活性 足细胞分化成熟后用 0.25% 胰酶消化, 使其分散后以 8000 个/孔的密度接种于 96 孔板(每孔加入 80 μ L), 用培养基补至 100 μ L/孔。放入含 5% CO₂ 的 37℃ 培养箱中培养至细胞单层铺满孔底。将配好的蟾蜍灵加入各孔, 使每孔蟾蜍灵终浓度为 10⁻⁷ mol/L、10⁻⁸ mol/L、10⁻⁹ mol/L, 设 8 个复孔; 以 0 μ mol/L 组为空白对照孔, 以培养基、MTT 和二甲基亚砷(DMSO) 为调零孔; 放入培养箱继续培养 24 h, 每孔加入 10 μ L MTT 溶液, 继续培养 4 h 后终止, 吸去上清, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砷, 置摇床振荡 10 min, 使结晶物充分溶解后, 在 492 nm 波长下应用 DG-5032 型酶联免疫检测仪检测各孔的 OD 值。足细胞活性 = (造模/干预组 OD 值 - 调零 OD 值) / (对照 OD 值 - 调零 OD 值) \times 100%。

1.2.3 足细胞分组及处理 将分化成熟的小鼠足细胞分为 4 组: 对照组、蟾蜍灵组、阿霉素诱导组和阿霉素诱导 + 蟾蜍灵组。对照组: 正常足细胞; 蟾蜍灵组: 加入蟾蜍灵作用 24 h; 阿霉素诱导组: 1 μ mol/mL 阿霉素处理 24 h 后模型稳定^[8]; 阿霉素诱导 + 蟾蜍灵组: 同时加入 1 μ mol/mL 阿霉素和蟾蜍灵作用 24 h。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测足细胞 nephrin 和 p38 基因相对表达水平检测 在六孔板中接种 4 \times 10⁵ 个/孔的细胞悬液, 按照分组及作用时间加入蟾蜍灵、阿霉素。收集细胞时用 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次, 每孔中加入 1 mL TRIzol RNA 提取液, 按照说明书步骤提取细胞总 RNA, 紫外分光光度仪测定 260 nm、280 nm 的吸光度值, 重复 3 次, 计算 A260/A280 比值, 根据 A260 值计算 RNA 浓度。将 RNA 逆转录为 cDNA 后加入引物扩增特异性片段, 加入目的基因和内参引物, 扩增出目的基因, 引物序列见表 1。扩增反应总体积为 25 μ L, 扩增条件: 95℃ 30 s 预变性, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s PCR 反应, 72℃ 30 s 退火, 延伸 35 个循环后, 实时连续测定基因扩增过程中产生的荧光。相对定量采用 $\Delta\Delta$ Ct 法, 以 GAPDH 作为内参照, 对照组作为基准, 基准值为 1, 蟾蜍灵组、阿霉素组、蟾蜍灵 + 阿霉素组 mRNA 的表达量均表达成基准值 1 的 n 倍^[9]。

表 1 小鼠 GAPDH、p38、nephrin 引物序列

mRNA	引物序列	产物大小
GAPDH sense	5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'	222 bp
GAPDH antisense	5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3'	
p38 sense	5'-CGACCACGTTTCAGTTTCTCA-3'	181 bp
p38 antisense	5'-AGCCACGTAGCCTGTCATCT-3'	
nephrin sense	5'-GATGCGGACTACGAGTGCC-3'	87 bp
nephrin antisense	5'-GGGGAAGTACGAGGAGAGG-3'	

1.3 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析和 *q* 检验, 方差不齐时采用 Dunnett T3 检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蟾蜍灵对小鼠足细胞的毒性试验 MTT 实验结果显示, 不同浓度的蟾蜍灵(10⁻⁷ mol/L、10⁻⁸ mol/L、10⁻⁹ mol/L) 对小鼠足细胞作用 24 h 后, 足细胞活力均在 90% 以上, 提示这 3 种浓度蟾蜍灵作用于足细胞 24 h 后均无明显毒性作用。结合前期实验结果, 本研究选用 10⁻⁸ mol/L 浓度的蟾蜍灵作为干预浓度。

2.2 蟾蜍灵对小鼠足细胞形态的影响 足细胞在 γ -干扰素、33℃ 生长、增殖, 细胞呈铺石路样, 细胞体较小, 细胞核呈圆形或卵圆形, 以双核多见。足细胞转化成熟时细胞体变大, 有突起伸出, 相邻足细胞间形成相互连接, 细胞核较大, 以单核多见。阿霉素诱导组、阿霉素诱导 + 蟾蜍灵组、蟾蜍灵组, 光镜下观察细胞形态与对照组相比无明显改变(见图 1)。

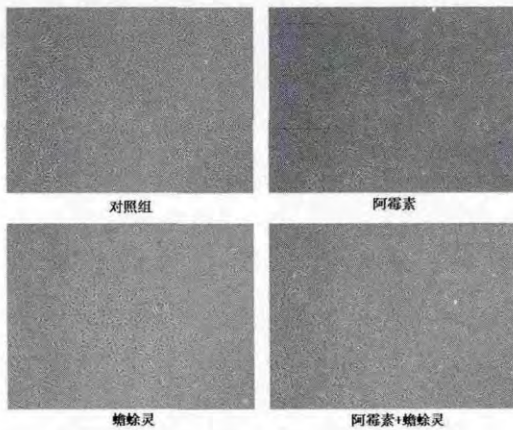
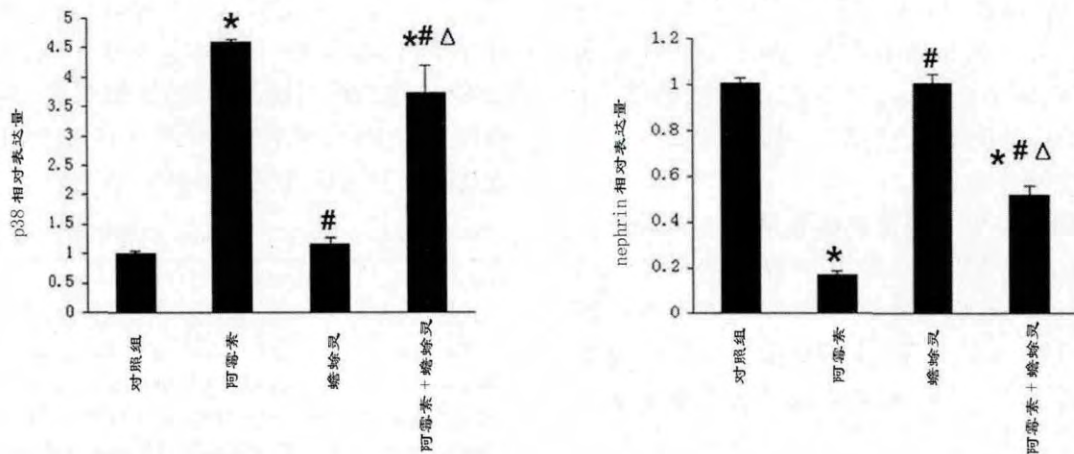


图1 蟾蜍灵对小鼠足细胞形态的影响



* $P < 0.05$ vs 对照组; # $P < 0.05$ vs 阿霉素组; Δ $P < 0.05$ vs 蟾蜍灵组

图2 阿霉素和蟾蜍灵对 MPC 细胞 p38 及 nephrin mRNA 的影响

3 讨论

蛋白尿是肾病综合征的主要临床表现,目前认为足细胞损伤是产生蛋白尿的主要因素之一。阿霉素肾病模型是一种研究体内外足细胞损伤的经典工具^[10]。nephrin 表达的变化是足细胞损伤的主要标志物之一。有研究证实,在阿霉素肾病大鼠模型中,nephrin 表达下调,是蛋白尿产生的主要机制^[11]。

蟾蜍灵是从传统中药蟾酥中分离提取的单体成分之一。目前认为,蟾蜍灵可通过诱导凋亡、抑制增殖,对体外培养的多种肿瘤细胞发挥抗肿瘤作用^[12-13]。本课题组前期研究发现蟾蜍灵还可以抑制脂多糖诱导的肾脏系膜细胞增殖、减轻系膜细胞外基质的分泌,可以阻断高糖对肾脏系膜细胞的直接促纤维化作用^[14-15]。在动物模型实验中我们又发现蟾蜍灵能够降低阿霉素肾病大鼠 24 h 尿蛋白和血脂水平,减轻足细胞病变^[7]。本研究发现在体外蟾蜍灵对阿霉素引起的足细胞 nephrin 表达下降起一定的缓解作用,进一步证实蟾蜍灵在维持足细胞裂孔隔膜的完整性,减轻肾小球滤过屏障的损

伤发挥作用。MAPK 信号通路也是足细胞内重要的信号转导路径,该通路的激活与足细胞损伤、蛋白尿的产生密切相关^[16]。p38 和 JNK 是 MAPK 信号通路的关键分子,有研究报道 nephrin 可通过改变 p38 和 JNK 的表达激活 MAPK 信号通路^[17]参与足细胞损伤。本实验中实时荧光定量 PCR 检测 p38 表达,结果发现 p38 表达与 nephrin 表达的变化相似。提示蟾蜍灵对足细胞的保护作用可能与 MAPK 信号通路 p38 表达变化有关。

总之,本实验提示在体外蟾蜍灵可调节足细胞 nephrin 的表达,缓解足细胞损伤,此过程可能与 MAPK 信号通路的激活有关。结合前期体内实验结果,提示蟾蜍灵可减缓阿霉素模型中足细胞损害,可能的机制为通过激活 MAPK 信号通路上调 nephrin 表达,从而维持足细胞裂孔隔膜的完整性,减轻肾小球滤过屏障的损伤,但其具体机制仍有待于进一步实验证实。

【参考文献】

- [1] 陈意志, 赵学智, 吴俊, 等. 从局灶节段性肾小球硬化的哥伦比亚病理分型到足细胞病的分类 [J]. 中华肾脏病杂志, 2009, 25(9): 734-738.
- [2] Cheng Huifang, Harris RC. The glomerulus—a view from the outside the podocyte [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(9): 1380-1387.
- [3] LOwik MM, Groenen PJ, Levchenko EN, *et al.* Molecular genetic analysis of podocyte genes in focal segmental glomerulosclerosis—a review [J]. *Eur J Pediatr*, 2009, 168(11): 1291-1304.
- [4] Perysinaki GS, Moysiadi DK, Beasias G, *et al.* Podocytin slit diaphragm proteins, nephrin and podocin, are affected at early stages of lupus nephritis and correlate with disease histology [J]. *Lupus*, 2011, 20(8): 781-791.
- [5] Kato T, Mizuno S, Kamimoto M. The decreases of nephrin and nuclear WT1 in podocytes may cause albuminuria during the experimental sepsis in mice [J]. *Biomed Res*, 2010, 31(6): 363-369.
- [6] Quack I, Woznowski M, Potthoff SA, *et al.* PKC alpha mediates beta-arrestin2-dependent nephrin endocytosis in hyperglycemia [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(15): 12959-12970.
- [7] 郑君, 龚晶, 张爱青, 等. 蟾蜍灵对阿霉素肾病大鼠蛋白尿的影响及机制研究 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2011, 31(11): 1605-1609.
- [8] 周晓菊, 李宇宁, 李卫国, 等. 苦参碱对阿霉素损伤足细胞的干预作用及 mTOR 的表达 [J]. 临床儿科杂志, 2013, 31(8): 757-761.
- [9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C_T} (T) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [10] 李卫国. Desmin 和 TGF-β1 在阿霉素损伤足细胞的表达及活性维生素 D 的干预作用 [J]. 中华肾脏病杂志, 2012, 28(8): 645-646.
- [11] 孙雯, 朱智, 愈建, 等. 槐杞黄颗粒对阿霉素肾病大鼠肾组织 nephrin 和 podocin 表达的影响 [J]. 中西医结合学报, 2011, 9(5): 546-552.
- [12] Takai N, Ueda T, Nishida *et al.* Bufalin induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells [J]. *Int J Mol Med*, 2008, 21(5): 637-643.
- [13] Han Keqi, Huang Guang, Gu Wei, *et al.* Anti-tumor activities and apoptosis-regulated mechanisms of bufalin on the orthotopic transplantation tumor model of human hepatocellular carcinoma in nude mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(24): 3374-3379.
- [14] 李善文, 甘卫华, 陈荣华, 等. 蟾蜍灵对大鼠肾小球系膜细胞增殖和细胞外基质分泌的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(14): 506-509.
- [15] 曾智凤, 甘卫华, 龚晶, 等. 蟾蜍灵对高糖诱导大鼠系膜细胞过表达纤维连接蛋白和结缔组织生长因子的影响 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2011, 31(10): 1421-1424.
- [16] Koshikawa M, Mukoyama M, Mori K, *et al.* Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation in podocyte injury and proteinuria in experimental nephrotic syndrome [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(9): 2690-2701.
- [17] Huber TB, Kottgen M, Schilling B, *et al.* Interaction with podocin facilitates nephrin signaling [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(45): 41543-41546.

(上接第 411 页)

【参考文献】

- [1] Klein JD, Walker FJ. Purification of a protein C activator from the venom of the southern copperhead snake (*Agkistrodon contortrix contortrix*) [J]. *Biochemistry*, 1986, 25(15): 4175-4179.
- [2] 张根葆, 张毅, 孔岩, 等. 五步蛇毒蛋白 C 激活剂的纯化与活性分析 [J]. 蛇志, 2008, 20(4): 249-251.
- [3] 李曙, 张根葆, 洪云, 等. 蝮蛇毒蛋白 C 激活物改善急性心肌梗死大鼠心功能的机制研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2012, 17(2): 141-146.
- [4] 王斐, 张根葆, 黄璐, 等. 尖吻蝮蛇毒 PCA 在急性心肌梗死诊断中的应用 [J]. 皖南医学院学报, 2013, 32(5): 352-355.
- [5] Barbieri SS, Amadio P, Gianellini S, *et al.* Cyclooxygenase-2-derived prostacyclin re-regulates arterial thrombus formation by suppressing tissue factor in a sirtuin-1-dependent manner [J]. *Circulation*, 2012, 126(11): 1373-1384.
- [6] Yi X, Chi W, Wang C, *et al.* Low-molecular-weight heparin or dual antiplatelet therapy is more effective than aspirin alone in preventing early neurological deterioration and improving the 6-month outcome in ischemic stroke patients [J]. *J Clin Neurol*, 2015, 11(1): 57-65.
- [7] Docagne F, Parcq J, Lijnen R, *et al.* Understanding the functions of endogenous and exogenous tissue-type plasminogen activator during stroke [J]. *Stroke*, 2015, 46(1): 314-320.
- [8] Holy EW, Besler C, Reiner MF, *et al.* High-density lipoprotein from patients with coronary heart disease loses anti-thrombotic effects on endothelial cells: impact on arterial thrombus formation [J]. *Thromb Haemost*, 2014, 112(5): 1024-1035.
- [9] Wang J, Shen B, Guo M, *et al.* Blocking effect and crystal structure of natrin toxin, a cysteine-rich secretory protein from *Naja atra* venom that targets the BKCa channel [J]. *Biochemistry*, 2005, 44(33): 10145-10152.
- [10] 宋慧, 徐星新, 李映新, 等. 广西眼镜蛇毒蛋白 Natrin 在体外诱导人肝癌细胞 SMMC-7721 凋亡作用的研究 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(1): 118-121.
- [11] Bhattacharya S, Das T, Biswas A, *et al.* A cytotoxic protein (BF-CT1) purified from *Bungarus fasciatus* venom acts through apoptosis, modulation of PI3K/AKT, MAPK pathway and cell cycle regulation [J]. *Toxicon*, 2013, 74: 138-150.
- [12] 熊晶, 白莉, 方伟蓉, 等. 蛇毒三肽 pENW 对血管内皮的保护作用及机制探讨 [J]. 药学进展, 2011, 35(8): 367-372.