

镉对肾小管上皮细胞钙黏蛋白的影响

裴秀丛, 徐兆发

(中国医科大学公共卫生学院环境卫生教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 探讨镉对原代培养的肾小管上皮细胞毒作用的早期环节。方法 采用筛网分离法分离 Wistar 大鼠肾小管上皮细胞, 分别用 10、20 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 CdCl_2 溶液培养细胞 0、1、2 和 4 h, 测定细胞活力、细胞内 ALP 活性、GSH 含量、细胞外液 LDH 活性及上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)表达。结果 不同浓度的 CdCl_2 作用培养细胞后, 可造成细胞内 ALP 活性下降, 并表现出明显的剂量-反应关系和时间-反应关系; 50 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 作用细胞 2 h 时, 细胞外液 LDH 活性已明显高于对照组; 4 h 时细胞内 GSH 含量与对照组比较显著下降; 而 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 CdCl_2 作用细胞 2 h, 即可使肾小管上皮细胞钙黏蛋白在胞浆表达减少。结论 在肾小管上皮细胞没有发生氧化损伤时, Cd^{2+} 就可干扰肾小管上皮细胞钙黏蛋白依赖的黏附连接; 镉对肾小管上皮细胞钙黏蛋白依赖的黏附连接的损伤可能是镉毒性的最早表现之一。

关键词: 镉; 肾小管上皮细胞; 上皮细胞钙黏蛋白

中图分类号: O614.24 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)05-0266-03

Effects of Cd on E-cadherin in the proximal tubules in vitro

PEI Xiurong XU Zhao-fa

(School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract Objective The objective of present study is to explore the early event in the toxicity of Cd on renal tubular epithelial cells in vitro. **Method** Meshwork separation method was used to isolate primary proximal tubular cells from Wistar rats. The cultured cells were exposed to different levels of CdCl_2 (10 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$ and 50 $\mu\text{mol/L}$) for 0-4h respectively, then measuring cell viability, cellular activity of ALP, cellular contents of GSH, extracellular activity of LDH and E-cadherin expression in renal tubular cells. **Result** It was showed that CdCl_2 might significantly reduce cellular ALP activity, which presented certain dose-effect and time-effect relationships. For 2h-exposure to 50 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 , the LDH activity in media increased and for 4h-exposure to 50 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 might reduce the cellular GSH content, while only 2h-exposure to 10 $\mu\text{mol/L}$ of CdCl_2 could induce the lower expression of E-cadherin in plasma of renal cells. **Conclusion** These results suggest that even before the occurrence of oxidative damage Cd could disturb E-cadherin-dependent adhesion junction in proximal tubular cells in vitro; therefore, it is reasonable to conclude that one of the earliest effects of Cd on renal tubular cells is to damage E-cadherin-mediated adhesion junction.

Key words: Cadmium; Renal tubular epithelial cells; E-cadherin

镉可严重损伤多个器官如肺、肾、睾丸等^[1]。虽然镉的毒作用已被阐明,但其作用的细致环节仍待深入。最近发现 Cd^{2+} 破坏特定上皮细胞和内皮细胞间连接可能是 Cd^{2+} 毒作用的一个重要机制^[2]。E-cadherin(E-cad, 上皮细胞钙黏蛋白)是典型的钙黏蛋白亚族的一员,是分布于肾小管上皮的主要黏附分子。研究表明 Cd^{2+} 能干扰 LLC-PK₁、MDCK 等细胞的 E-cad, E-cad 是 Cd^{2+} 产生细胞毒性的早期靶部位^[3,4]。关于 Cd^{2+} 对大鼠原代肾小管上皮细胞 E-cad 影响的报道尚少。本实验拟采用经济、简便的筛网分离法原代培养肾小管上皮细胞,研究不同剂量的 Cd 在不同时间对原代培养的大鼠肾小管上皮细胞 E-cad 的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂及药品

氯化镉 ($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$) 优级纯,上海试剂二厂出品,用 D-ME/F-12 配制。DMEM 和 F12 购于 GIBCO 公司。胎牛血清购于天津浩洋公司。四甲基偶氮唑盐 (MTT) 购于 Sigma 公司。胰蛋白酶购于华美公司。兔抗鼠单克隆抗体 E-cad (BA0475) 购于武汉博士德公司。SP 免疫组织化学超敏试剂盒、DAB 显色剂、多聚赖氨酸购于福州迈新公司。

1.2 原代肾小管上皮细胞的分离和培养^[5]

取出生 5 d 左右的 Wistar 大鼠若干只,75%乙醇消毒后取出肾脏,用无血清的培养液即原液 (D-ME/F-12: DMEM50%、Ham's F-12 50%等体积混合溶液) 清洗,分离出肾皮质。将洗净的肾皮质剪成 1~2 mm^3 大小的组织块,在 80 目的尼龙筛网上研磨,原液冲洗后,于 100 目的筛网上收集肾小管节段。用原

收稿日期: 2005-01-25; 修回日期: 2005-05-25

基金项目: 国家自然科学基金 (No: 30371200)

作者简介: 裴秀丛 (1975-), 女, 博士研究生, 主要从事重金属中毒机理及防治研究。

液充分冲洗筛网, 并将肾小管节段移入离心管内。用 0.2% 胰蛋白酶 37 °C 消化 30 min。加入含 15% FBS 的 D-ME/F-12 培养液终止消化, 充分吹打后, 180 g 离心 5 min, 弃去上清液, 将沉淀重悬于原液冲洗 1 次, 所得沉淀即为分离的肾小管上皮细胞, 用台盼蓝染色法检查, 细胞活力 > 90%。用 15% FBS 的 D-ME/F-12 培养液 (内含 5 μg/ml 胰岛素, 36 ng/ml 氢化考的松, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 100 mmol/L Hepes, 100 U/ml 青霉素, 100 U/ml 链霉素) 培养, 完全静止 3 d, 然后每天换液一次。培养条件: 95% O₂、5% CO₂、37 °C。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT) 测定细胞活力^[6] 细胞长成平层后, 吸去原培养液, 加入含有 CdCl₂ 的 D-ME/F-12 培养液, 染镉终浓度分别为 10、20、50 μmol/L。分别在染毒 0、1、2 和 4 h 时测定细胞活力, 每个剂量每个时点设 3 个复孔, 并设置无细胞的空白孔。实验终点时无菌条件下每孔加 MTT 溶液 20 μl, 在 CO₂ 恒温培养箱内继续孵育 4 h, 小心吸弃上清液, 每孔加入 150 μl DMSO 终止反应, 振荡 10 min 后在酶标仪上于 490 nm 处测各孔的吸光度值 (A)。

1.3.2 碱性磷酸酶 (ALP) 的测定 细胞长成平层后, 吸去原培养液, 加入含有 CdCl₂ 的 D-ME/F-12 培养液, 染镉终浓度分别为 10、20、50 μmol/L。分别在染毒 0、1、2 和 4 h 时测定 ALP 活性, 每个剂量每个时点设 3 个复孔。吸出培养液, 加 0.1% Triton X-100 100 μl, 置于 4 °C 过夜, 然后加入 0.1% 对硝基苯磷酸盐 (pNPP), 37 °C 孵育 30 min, 3 mol/L 氢氧化钠终止反应, 用酶标仪读取 OD 值 (波长 405 nm)。

1.3.3 2, 4-二硝基苯肼比色法测定乳酸脱氢酶 (LDH) 活性^[7] 染镉终浓度与测定时点同 1.3.2。实验终点从每孔吸取培养液 50 μl, 加入乳酸钠缓冲液 1.0 ml, 置 37 °C 水浴 3 min, 等分成 2 管, 一管加辅酶 I (现用现配) 0.2 ml, 另一管不加 (对照管), 置 37 °C 水浴 15 min; 对照管再加辅酶 I 和 2, 4-二硝基苯肼 1.0 ml, 实验管只加 2, 4-二硝基苯肼 1.0 ml, 置 37 °C 水浴 15 min, 加入 0.4 mol/L NaOH 10.0 ml 显色, 室温放置 5 min 后, 在 440 nm 处比色。

1.3.4 荧光法测定谷胱甘肽 (GSH)^[8] 染镉终浓度与测定时点同 1.3.2。实验终点用 0.2% 胰酶消化细胞, 用 1 ml PBS 重悬细胞, 用超声波细胞粉碎机将细胞打碎。取细胞悬液 0.2 ml, 加 10% TCA 0.2 ml, 摇匀, 室温放置 10 min 后, 4 000 r/min 离心 10 min。取清亮的上清液 0.1 ml, 加甲醛溶液 0.1 ml, 摇匀放置

5 min, 加 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 3.6 ml, 摇匀后立即加 0.1% OPA 0.2 ml (现用现配), 室温静置 40 min, 用 F2500 荧光分光光度计读取荧光值。

1.3.5 E-cad 的免疫组化 (SP 法) 检测 E-cadherin 的蛋白表达 实验步骤按试剂盒说明书进行。阴性对照采用 0.01 mol/L PBS 液代替一抗, 其他步骤不变。

1.4 统计分析

实验所得数据以平均值 ± 标准差表示, 用 SPSS 软件单因素方差分析方法 (ANOVA) 进行组间差异的显著性检验, 两组间比较用 *q* 检验 (Student-Newman-Keuls, SNK 法)。

2 结果

2.1 细胞活力

染镉 1 h、2 h 和 4 h, 各剂量 CdCl₂ 对肾小管上皮细胞活力的影响与对照组比较虽有变化, 但统计学差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2 细胞内 ALP 活性

对照组各时点的肾小管上皮细胞内 ALP 活性差异无显著性。10、20 和 50 μmol/L CdCl₂ 分别在 4 h、2 h 和 1 h 与对照组比较 ALP 活性的下降差异有显著性 ($P < 0.05$); 染毒 1 h 和 0 h 比较, 50 μmol/L 染镉组 ALP 活性已产生明显差异 ($P < 0.05$); 细胞内 ALP 活性的下降表现出明显的剂量-反应关系和时间-反应关系。

2.3 细胞外培养液中 LDH 活性

对照组各时点的肾小管上皮细胞外培养液中 LDH 活性差异无显著性。10 μmol/L 和 20 μmol/L 染镉组所有测定点的 LDH 活性与对照组比较差异均无显著性; 50 μmol/L CdCl₂ 作用细胞 2 h 时 LDH 活性明显高于对照组 ($P < 0.05$), 4 h 差异更显著 ($P < 0.01$)。50 μmol/L 染镉组 4 h 与 2 h 比较 LDH 活性差异有显著性 ($P < 0.01$)。

2.4 细胞内 GSH 含量

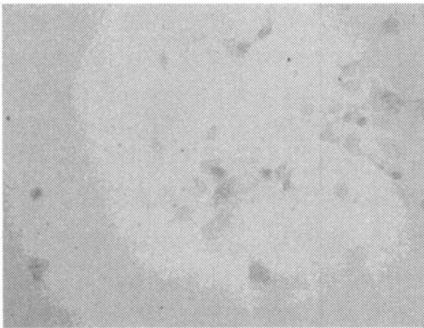
10 μmol/L 和 20 μmol/L 染镉组所有测定点的肾小管上皮细胞 GSH 含量与对照组比较差异均无显著性。50 μmol/L CdCl₂ 作用细胞 4 h 时细胞内 GSH 含量明显低于对照组 ($P < 0.05$)。

2.5 E-cad 的蛋白表达

本实验对照组肾小管上皮细胞 E-cad 蛋白在胞浆内有表达, 细胞轮廓清晰, 为鹅卵石形, 细胞的圆顶清晰可见 (图 1A)。10 μmol/L CdCl₂ 作用细胞 2 h, 与对照组比较 E-cad 蛋白在胞浆内表达减少, 细胞形态有所改变, 轮廓不清晰, 部分细胞的圆顶消失 (图 1B)。



A 对照组 (未染镉) × 400



B 10 μmol/L CdCl₂ 暴露 2h × 400

图 1 Cd²⁺ 对肾小管上皮细胞 E-cad 蛋白表达的影响

3 讨论

已有报道分离的鼠肾小管上皮悬浮或贴壁细胞是体外研究肾损伤的好模型。本实验选用经济、方便的筛网分离法原代培养大鼠的肾小管上皮细胞,研究镉在体外的毒作用。ALP 主要定位于肾小管上皮细胞的刷状缘处,染镉后,随着微绒毛的肿胀、脱落,ALP 活性也同时表现出明显降低。本实验细胞内 ALP 活性的下降呈现出明显的剂量-反应和时间-反应关系。50 μmol/L CdCl₂ 作用肾小管上皮细胞 4 h,并不影响细胞活力,而细胞内 ALP 活性、GSH 含量和培养液中 LDH 活性已发生明显变化,提示在此条件下镉已对肾小管上皮细胞产生了急性损伤。10 μmol/L CdCl₂ 作用肾小管上皮细胞 2 h,部分细胞的黑圆顶消失。细胞中黑圆顶的形成是肾细胞的特性之一,被认为与盐溶液跨膜转运、膜的极化和细胞间连接有关,是主动转运的标志。细胞染镉后黑圆顶的数量减少可反映镉对细胞形态的影响。

E-cad 是一种钙依赖性黏附分子,一般存在于各类上皮细胞中,在维持上皮极性、介导同型细胞连接、胚胎发育、形态发生等方面具有重要作用^[9]。E-cad 含胞外区、跨膜区和胞浆区,胞外区包括 Ca²⁺ 连接部位和分子的黏附区。E-cad 黏附功能的发挥,不仅需要 Ca²⁺ 的存在,还要受其配体-cad 的调节;E-cad 胞质区的细胞内肽段与 β-cad 和/或 γ-cad 直接结合,α-cad 则将 β-cad 和/或

γ-cad 与细胞骨架的肌动蛋白微丝相连,共同形成 E-cad/cad 复合体,可使 E-cad 集中定位于细胞与细胞间的接触部位,从而介导同种细胞的连接和维持细胞的极性。以往研究表明 E-cad 是 Cd²⁺ 干扰上皮细胞连接的靶分子^[10]。本实验 10 μmol/L CdCl₂ 作用细胞 2 h, E-cad 蛋白在胞浆内表达下降,从而亦使 E-cad/cad 复合物介导的黏附功能下降,引起一系列的变化。Ca²⁺ 可能作用于 E-cad 的胞外区 Ca²⁺ 连接部位,而干扰 E-cad 功能的正常调节,体外研究 Cd²⁺ 对合成的 E-cad 胞外区 Ca²⁺ 结合多肽异构体的影响支持了这一观点^[11]。

本实验研究了 Cd²⁺ 干扰细胞间连接与其他细胞毒性间的关系。结果表明 10 μmol/L CdCl₂ 作用细胞 2 h 能明显降低 E-cad 蛋白表达,然而细胞活力、胞内 GSH 含量和培养液中 LDH 活性此时并未发生显著变化,而细胞内 ALP 活性的显著下降是 10 μmol/L CdCl₂ 作用 4 h 时才出现的。以上结果说明细胞在没有发生氧化损伤时,Cd²⁺ 就可干扰细胞 E-cad。这支持了镉对 E-cad 的损伤是镉毒性的最早表现之一,E-cad 是 Cd²⁺ 干扰肾小管上皮细胞的相对较早的靶部位^[12]。

镉能损伤原代肾小管上皮细胞 E-cad 依赖的细胞连接,细胞连接的受损可严重影响肾小管的转运过程,镉是否也能损伤体内肾小管上皮细胞 E-cad 则需进一步探讨。

参考文献:

- [1] Bernard A, Lauwerys R. Cadmium in human population[J]. *Experientia*, 1984, 40: 143-152.
- [2] Prozialek WC. Evidence that E-cadherin may be a target for cadmium toxicity in epithelial cells[J]. *Toxicology Applied Pharmacology*, 2000, 164: 231-249.
- [3] Waalkes MP, Coogan TP, Barter RA. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium[J]. *Crit Rev Toxicol*, 1992, 22: 175-201.
- [4] Prozialek WC, Lamer PC. Cadmium (Cd²⁺) disrupts E-cad-dependent cell-cell junctions in MDCK cells[J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1997, 33: 516-526.
- [5] 薛庆善. 体外培养的原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 502-504.
- [6] 鄂征. 组织培养与分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社, 1997, 108-121.
- [7] 王庸晋. 现代临床检验学[M]. 北京: 人民军医出版, 2000, 324-325.
- [8] 张秀明, 沈琪琳, 王长虹, 等. 荧光法测定血液中脂质氧化损伤标志物及抗氧化物的研究与临床应用[J]. *河南医学研究*, 1998, 7(2): 164-168.
- [9] Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator[J]. *Science*, 1991, 251(5000): 1451-1455.
- [10] Prozialek WC, Niewenhuis RJ. Cadmium disrupts Ca²⁺-dependent cell-cell junctions and alters the pattern of E-cadherin immunofluorescence in LLC-FK1 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991b, 181: 1118-1124.
- [11] Ozawa M, Engel J, Kemler R. Single amino acid substitutions in one Ca²⁺ binding site of uvomulin abolish the adhesive function[J]. *Cell*, 1990, 63: 1033-1038.
- [12] Prozialek WC, Grunwald GB, Dey PM, et al. Cadherins and N-CAM as potential targets in metal toxicity[J]. *Toxicology Applied Pharmacology*, 2002, 182: 255-265.