

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.15.003

胃饥饿素对 HK-2 细胞缺氧/复氧损伤后的保护作用及机制*

王莉芳¹, 冯正平², 李晓春¹, 张金山³

(1. 陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710062; 2. 西北濒危药材资源开发国家工程实验室·药用资源与天然药物化学教育部重点实验室·陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安 710062; 3. 空军军医大学解剖与组织胚胎学教研室, 陕西 西安 710062)

摘要:目的 探讨胃饥饿素(ghrelin)对 HK-2 细胞缺氧/复氧的保护作用及机制。方法 以 HK-2 细胞为研究对象, 建立缺氧/复氧模型, 模拟肾缺血再灌注损伤过程。胃饥饿素预处理后, 采用 CCK-8 试剂盒检测不同质量浓度胃饥饿素(0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1 600 ng/mL)对缺氧/复氧及正常 HK-2 细胞活力的影响。将细胞分为正常对照组(N 组), 缺氧/复氧损伤组(H/R 组), 胃饥饿素(400 ng/mL)预处理组+缺氧/复氧损伤组(ghrelin+H/R 组)。造模成功后, 采用原位末端转移酶标记(TUNEL)试剂盒检测细胞凋亡, 蛋白质印迹法(WB)检测各组细胞外调节蛋白激酶(ERK)及磷酸化细胞外调节蛋白激酶(p-ERK)、P38 促分裂素原活化蛋白激酶(P38)及磷酸化 P38 促分裂素原活化蛋白激酶(p-P38)的表达。结果 缺氧 4 h, 复氧 12 h 能有效诱导 HK-2 细胞缺氧/复氧损伤模型; 与胃饥饿素质量浓度为 0 ng/mL 时相比, 质量浓度为 12.5, 25, 50 ng/mL 时对缺氧/复氧损伤的 HK-2 细胞无影响; 胃饥饿素质量浓度为 100, 200, 400, 800 ng/mL 预处理能有效提高细胞活力($P < 0.01$), 质量浓度为 1 600 ng/mL 时 HK-2 细胞的活力开始降低; 胃饥饿素质量浓度大于 800 ng/mL 对正常 HK-2 细胞活力有影响($P < 0.05$); 与 N 组相比, H/R 组细胞凋亡明显, ERK, p-ERK, P38 及 p-P38 表达无差异; 与 H/R 组相比, ghrelin+H/R 组细胞凋亡水平下降, ERK, p-ERK, P38 表达无差异, p-P38 表达增高。结论 胃饥饿素预处理能对 HK-2 细胞缺氧/复氧损伤起到保护作用, 可能是通过激活 P38 信号通路发挥其功能。

关键词: 胃饥饿素; HK-2 细胞; 缺氧/复氧模型; P38 信号通路

中图分类号: R965; R977.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)15-0011-04

Protective Effect and Mechanism of Ghrelin on Hypoxia/Reoxygenation Injury in HK-2 Cells

WANG Lifang¹, FENG Zhengping², LI Xiaochun¹, ZHANG Jinshan³

(1. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710062; 2. National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest China·The Key Laboratory of Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, The Ministry of Education·College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi, China 710062; 3. Department of Human Anatomy and Histology and Embryology, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, China 710062)

Abstract: **Objective** To explore the protective effect and mechanism of ghrelin on hypoxia/reoxygenation of HK-2 cells. **Methods** A hypoxia/reoxygenation model was established with HK-2 cells as the research object to simulate the renal ischemia-reperfusion injury process. After pretreatment of ghrelin, CCK-8 kits were used to detect the effects of different concentrations of ghrelin on hypoxia/reoxygenation and normal HK-2 cell viability. Respectively, ghrelin concentration of 0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 and 1 600 ng/mL. HK-2 cells were divided into three groups: normal control group(N), hypoxia/reoxygenation injury group(H/R), ghrelin(400 ng/mL) pretreatment group + hypoxia/reoxygenation injury group(ghrelin+H/R). Apoptosis was detected by TdT-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) kit, and the expressions of extracellular regulated protein kinase(ERK), phosphorylated extracellular regulated protein kinase(p-ERK), P38 kinase-activated protein kinase(P38) and phosphorylated P38 kinase-activated protein kinase(p-P38) were detected by Western Blot(WB). **Results** The H/R injury model in HK-2 cells was effectively induced by 4 h of hypoxia and 12 h of reoxygenation. Compared with Ghrelin concentration of 0, concentration of 12.5, 25 and 50 ng/mL had no significantly effect on HK-2 cells injured by H/R injury. Pretreatment with ghrelin concentration of 100, 200, 400 and 800 ng/mL could significantly increased cell viability($P < 0.01$). However, the viability of HK-2 cells was reduced when the ghrelin concentration was 1 600 ng/mL. Ghrelin significantly affected the viability of normal HK-2 cells when the concentration was greater than 800 ng/mL($P < 0.05$). Compared with the N group, the H/R group had obvious apoptosis, but there was no difference in the expression of ERK, p-ERK, P38 and p-P38 protein. Compared with the H/R group, the apoptosis level of ghrelin+H/R group was decreased, and there was no difference in the expression of ERK, p-ERK, P38 protein, but the expression of p-P38 protein was significantly increased. **Conclusion** Ghrelin pretreatment may protect hypoxia/reoxygenation injury of HK-2 cells by activating the P38 signaling pathway.

Key words: ghrelin; HK-2 cells; hypoxia/reoxygenation model; P38 signaling pathway

胃饥饿素(ghrelin)是从胃中分离发现的, 由 28 个多肽^[1], 是内源性生长激素促分泌素受体(GHSR)^[2], 具有广泛的组织分布, 通过 GHSR 发挥多种生物学作用,

*基金项目: 国家自然科学基金[81272176]; 陕西省重点研发计划项目[2017SF-228]。

第一作者: 王莉芳, 女, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向为药理学和毒理学, (电子信箱)923016320@qq.com。

在肾脏中也有分布。有研究表明,外源性注射胃饥饿素对急性肾损伤有预防作用^[3-4]。急性肾损伤易出现在肾缺血再灌注,称为肾缺血再灌注损伤(IRI)。肾脏的损伤从缺血开始,恢复灌注后组织会进一步处理损伤,包括中性粒细胞的聚集,游离自由基的产生和细胞因子的激活等^[5]。IRI过程中缺氧会导致不正常的信号传导,引起一系列病理改变,导致肾功能严重受损^[6-7]。本研究中采用HK-2细胞建立缺氧/复氧损伤模型,在体外模拟肾缺血再灌注损伤过程,观察胃饥饿素对IRI的影响及其作用机制,通过CCK-8、原位末端转移酶标记(TUNEL)法、蛋白质印迹(WB)法观察在胃饥饿素作用下HK-2细胞的活力、凋亡情况及相关信号通路蛋白表达情况,为进一步在预防肾损伤领域应用胃饥饿素提供依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:3131型三气培养箱(美国Thermo公司);MCO-18AIC型二氧化碳培养箱(日本SANYO公司);1300 SERIES A2型生物安全柜(美国Thermo公司);Do X6型全自动化学发光图像分析系统(上海天能公司)。

试剂:胃饥饿素(美国Sigma-Aldrich公司,批号为G3902);细胞外调节蛋白激酶(ERK)兔一抗(批号为4695T),细胞外调节蛋白激酶磷酸化(p-ERK)兔一抗(批号为4370T),P38促分列素原活化蛋白激酶(P38)兔一抗(批号为8690T),磷酸化P38促分列素原活化蛋白激酶p-P38兔一抗(批号为4511T),均购自美国CST公司;TUNEL试剂盒(瑞士ROCH公司,批号为11684817910); β -actin兔一抗(批号为ab8227),HRP标记抗兔二抗(批号为ab6721),均购自Abcam公司;其他试剂均为国产分析纯。

细胞:HK-2细胞购自中科院细胞所。

1.2 细胞培养

将HK-2细胞株加入DMEM/F12培养液(含10%胎牛血清)中进行培养,再将其置培养箱内(37℃,5%CO₂),培养箱需维持饱和湿度等适宜的培养条件,在无菌条件下开始进行传代培养。当细胞铺满玻片壁后,用0.25%浓度的胰酶传代,同步化24h后细胞进入指数生长期,细胞每3~5d可传代1次。

1.3 建立细胞缺氧/复氧损伤模型

采用体外细胞培养,缺氧/复氧模型模拟缺血再灌注模型。将正常培养的HK-2细胞置0.25%浓度的胰酶消化,计数后按 2×10^4 个/孔接种于96孔板中。于第2天将96孔板置三气培养箱内(37℃,5%CO₂,1%O₂),分别培养0,1,2,3,4h,移至正常培养箱内(37℃,5%CO₂)12h。

1.4 CCK-8法检测细胞活力

将质量浓度为0,12.5,25,50,100,200,400,800,

1600 ng/mL的胃饥饿素加入 2×10^4 个/孔的96孔板中,每组平行4个。于正常培养箱内(37℃,5%CO₂)孵育2h,置三气培养箱中(37℃,5%CO₂,1%O₂)培养4h,于正常培养箱内(37℃,5%CO₂)孵育12h。每孔加入新鲜配制的含10 μ L的毒性检测液CCK-8,将培养板在培养箱孵育3h,用酶标仪测定450 nm波长处的吸光度(A)值。

1.5 试验分组

将正常培养的HK-2细胞置0.25%浓度的胰酶消化,计数后按 1×10^5 个/孔接种于预先放置爬片的24孔板中。第2天将细胞分为3组,正常组(N组)细胞正常培养16h;缺氧/复氧损伤组(H/R组)不做处理的细胞于正常培养箱内(37℃,5%CO₂)孵育2h,将孔板置三气培养箱内(37℃,5%CO₂,1%O₂)培养4h,然后移至正常培养箱内(37℃,5%CO₂)12h;胃饥饿素预处理组+缺氧/复氧损伤组(ghrelin+H/R组)将质量浓度为400 ng/mL的胃饥饿素加入24孔板中,正常培养箱内(37℃,5%CO₂)孵育2h,置三气培养箱内(37℃,5%CO₂,1%O₂)培养4h,移至正常培养箱内(37℃,5%CO₂)12h。

1.6 TUNEL法检测细胞凋亡

各组细胞培养时加入细胞爬片,按1.5项下方法培养。将各组爬片置4%多聚甲醛固定,以Streptavidin工作液覆盖孵育样品,DAPI复染封片。200倍显微镜下观察,细胞核呈黄色为阳性的凋亡细胞。

1.7 WB法检测蛋白表达

用RIPA裂解液提取各组细胞总蛋白,30 μ g的蛋白样品在10%SDS-PAGE凝胶上分离,并转移到PVDF膜上;PVDF膜用5%脱脂牛奶封闭2h;PVDF膜在4℃温度下与一抗孵育过夜,再用1:2000辣根过氧化物酶结合的二级抗体室温下孵育1h;蛋白条带以化学发光法显色获得。

1.8 统计学处理

采用Graphpad Prism 5统计学软件分析。试验数据经单因素方差分析(One-way ANOVA),组间比较采用Tukey's Multiple Comparisons Test。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞缺氧/复氧损伤模型的建立

HK-2细胞置三气培养箱(37℃,5%CO₂,1%O₂)缺氧1,2,3h后,正常培养箱(37℃,5%CO₂)复氧12h均不能有效影响细胞活力,缺氧4h正常培养箱(37℃,5%CO₂)复氧12h,细胞活力显著降低($P < 0.01$)。表明HK-2细胞置三气培养箱中(37℃,5%CO₂,1%O₂)缺氧4h,置正常培养箱(37℃,5%CO₂)复氧12h,能有效诱导其缺氧/复氧损伤模型。详见图1。

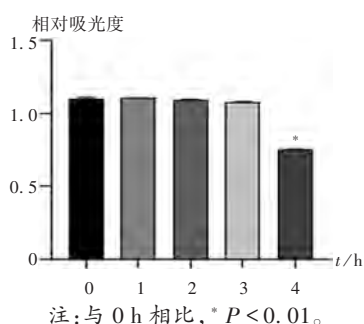


图1 细胞缺氧/复氧损伤模型的建立

2.2 不同质量浓度对细胞活力的影响

CCK-8 试验结果表明,采用质量浓度为 12.5, 25, 50 ng/mL 的胃饥饿素预处理 2 h 后,对缺氧/复氧损伤的 HK-2 细胞无明显影响。但胃饥饿素质量浓度为 100, 200, 400, 800 ng/mL 预处理能有效提高细胞活力 ($P < 0.01$),且当质量浓度为 1 600 ng/mL 时, HK-2 细胞的活力开始降低,表明胃饥饿素质量浓度为 1 600 ng/mL 时不利于 HK-2 细胞的生存。详见图 2。

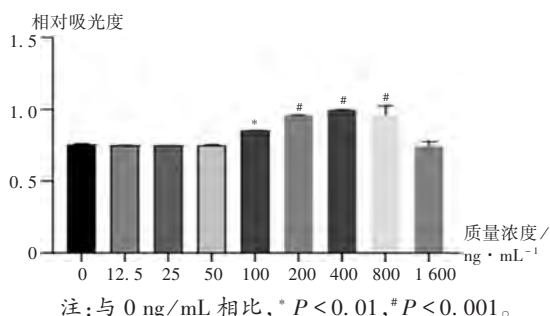


图2 不同质量浓度胃饥饿素对缺氧/复氧损伤 HK-2 细胞的影响

为进一步验证胃饥饿素对正常 HK-2 细胞的影响,将不同质量浓度的胃饥饿素加入正常 HK-2 细胞中,且置正常培养箱 (37°C , 5% CO_2) 孵育 16 h。每孔加入新鲜配制的含 10 μL 的毒性检测液 CCK-8,将培养板在培养箱孵育 3 h,用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度,结果见图 3。可见,质量浓度为 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 ng/mL 的胃饥饿素均不影响 HK-2 细胞的生长,但胃饥饿素质量浓度为 800, 1 600 ng/mL 时, HK-2 细胞的活力显著降低 ($P < 0.05$)。表明胃饥饿素质量浓度大于 800 ng/mL 不利于 HK-2 细胞的生存。

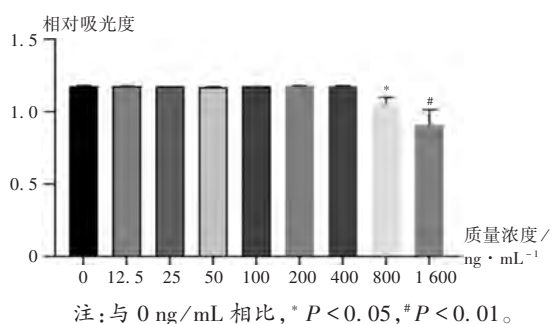
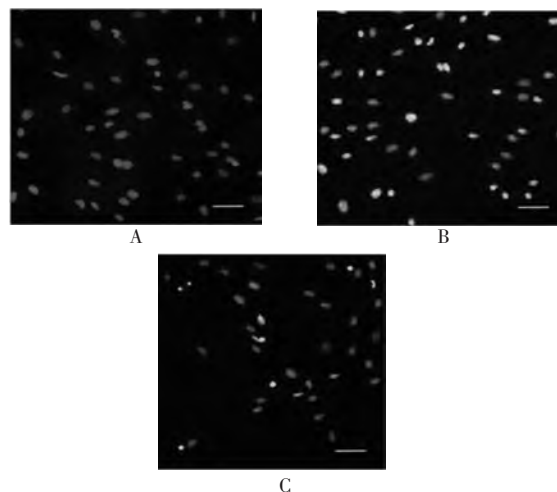


图3 不同质量浓度胃饥饿素对正常 HK-2 细胞的影响

2.3 对缺氧/复氧损伤的 HK-2 细胞凋亡的影响

TUNEL 试验结果显示, N 组 HK-2 细胞未明显凋亡,但 H/R 组中 HK-2 细胞出现大量凋亡,但胃饥饿素 (400 ng/mL) 预处理后, HK-2 细胞凋亡明显减少。表明胃饥饿素能有效抑制由缺氧/复氧损伤诱导的 HK-2 细胞的凋亡,详见图 4。



A. N 组 B. H/R 组 C. ghrelin + H/R 组

图4 胃饥饿素对缺氧/复氧损伤的 HK-2 细胞凋亡的影响

2.4 对细胞中 ERK 表达的影响

WB 试验结果表明,胃饥饿素对缺氧/复氧损伤的 HK-2 细胞中总 ERK 蛋白及磷酸化 p-ERK 蛋白表达无影响, β -actin 为内参蛋白。详见图 5。

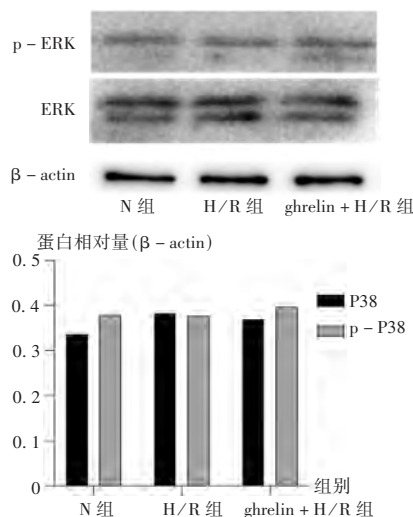


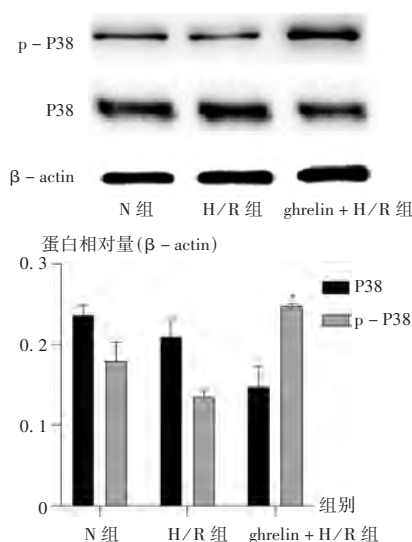
图5 胃饥饿素对缺氧/复氧损伤的 HK-2 细胞中 ERK 表达的影响

2.5 对细胞中 P38 表达的影响

WB 试验结果表明,胃饥饿素预处理后能显著增加缺氧/复氧损伤的 HK-2 细胞中磷酸化 P38 蛋白的表达。表明胃饥饿素可能是通过激活 P38 信号通路保护 HK-2 细胞缺氧/复氧的损伤。详见图 6。

3 讨论

肾缺血再灌注的发病机制包括氧自由基的毒性、细



注:与 H/R 组比较, * $P < 0.001$ 。

图6 胃饥饿素对缺氧/复氧损伤的 HK-2 细胞中 P38 表达的影响

胞凋亡、炎症反应、细胞内钙超载等,针对这些致病机制采取对应的治疗措施^[8]。

ANDREWS 等^[9]研究发现,胃饥饿素可通过减少线粒体中活性氧来发挥抗氧化作用^[9];胃饥饿素被证明可增加神经元细胞中 UCP2 蛋白的表达^[10];外源性注射胃饥饿素能刺激催乳素、促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇的分泌;胃饥饿素能通过引起啮齿动物和人类高血糖,降低胰岛素水平发挥厌食效应;胃饥饿素在心力衰竭和心肌缺血再灌注损伤中可起保护作用,在其他疾病如脓毒症和肠道缺血再灌注损伤中有有益作用^[11]。

KEIKO 等^[12]的研究发现,胃饥饿素在小鼠中能通过抗氧化应激机制保护其免受促血管生成素 II 引起的肾脏损害。胃饥饿素通过迷走神经对动物肾缺血再灌注起保护作用^[13]。提示胃饥饿素能在肾缺血再灌注损伤中起到一定作用,但其如何在这个过程发挥作用的机制尚不明确。

本研究中以人肾皮质近曲小管上皮细胞 HK-2 细胞为模型,成功建立了体外缺氧/复氧损伤模型,并模拟肾缺血再灌注损伤模型。研究结果显示,胃饥饿素能提高缺氧/复氧细胞的活力,高质量浓度的胃饥饿素对细胞活力有一定损伤,提示在使用胃饥饿素预防肾缺血再灌注损伤时应当注意选择适当的浓度进行预处理,能在缺氧/复氧细胞模型中起到保护作用。WB 检测结果显示,ERK 蛋白表达无变化,胃饥饿素预处理后,p-P38 蛋白含量有显著提升。P38 有丝分裂素激活蛋白激酶(MAPK)是与细胞增殖、分化、凋亡密切相关的细胞转导的重要通道^[14]。代谢综合征大鼠血管周围脂肪组织来源的瘦素可通过 P38 通路促进血管平滑肌细胞由收缩型转换为增殖型^[15]。故推测胃饥饿素能通过激活 P38 信号通路保护 HK-2 细胞缺氧/复氧的损伤,为进一步探讨胃饥饿素如何在肾缺血再灌注损伤中发挥作用提供了新思路。

参考文献:

- [1] KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, et al. (1999) Ghrelin is a growth - hormone - releasing acylated peptide from stomach[J]. Nature, 1999, 402(6762): 656 - 660.
- [2] DATE Y, KOJIMA M, HOSODA H, et al. Ghrelin, a Novel Growth Hormone - Releasing Acylated Peptide is Synthesized in a Distinct Endocrine Cell Type in the Gastrointestinal Tracts of Rats and Humans[J]. Endocrinology, 2000, 141(11): 4255 - 4261.
- [3] TAKEDA R, NISHIMATSU H, SUZUKI E, et al. Ghrelin improves renal function in mice with ischemic acute renal failure[J]. J Am Soc Nephrol, 6, 17(1): 113 - 121.
- [4] WANG W, BANSAL S, FALK S, et al. Ghrelin protects mice against endotoxemia - induced acute kidney injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2015, 297(297): 1032 - 1037.
- [5] FINN WF. Nephron heterogeneity in polyuric acute renal failure[J]. J Lab Clin Med, 1981, 98: 21 - 29.
- [6] VERSTEILEN AM, DI MAGGIO F, LEEMREIS JR, et al. Molecular mechanisms of acute renal failure following ischemia/reperfusion[J]. International Journal of Artificial Organs, 2004, 27(12): 1019.
- [7] KLAUSNER JM, PATERSON IS, VALERI CR, et al. Limb ischemia - induced increase in permeability is mediated by leukocytes and leukotrienes[J]. Annals of Surgery, 1988, 208(6): 755.
- [8] 陈肖蕾. 参附注射液对 HK-2 细胞缺氧再复氧损伤的改善作用及机制[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2006.
- [9] ANDREWS ZB, LIU ZW, WALLINGFORD N, et al. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals[J]. Nature, 2008, 454(7206): 846 - 851.
- [10] ANDREWS ZB, ERION DM, BEILER R, et al. Uncoupling Protein - 2 Decreases the Lipogenic Actions of Ghrelin[J]. Endocrinology, 2010, 151(5): 2078 - 2086.
- [11] WU R, DONG W, CUI X, et al. Ghrelin down - regulates proinflammatory cytokines in sepsis through activation of the vagus nerve[J]. Ann Surg, 2007, 245: 480 - 486.
- [12] KEIKO F, SHU W, HITOSHI M, et al. Ghrelin Protects against Renal Damages Induced by Angiotensin - II via an Antioxidative Stress Mechanism in Mice[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e94373.
- [13] RAJAN D, WU R, SHAH KG, et al. Human ghrelin protects animals from renal ischemia - reperfusion injury through the vagus nerve[J]. Surgery, 2012, 151(1): 37 - 47.
- [14] PARK KM, CHEN A, BONVENTRE JV. Prevention of kidney ischemia/reperfusion - induced functional injury and JNK, p38, and MAPK kinase activation by remote ischemic pretreatment[J]. J Biol Chem, 2001, 276(15): 11870 - 11876.
- [15] LI H, WANG VP, ZHANG LN, et al. Perivascular adipose tissue - derived leptin promotes vascular smooth muscle cell phenotypic switching via p38 mitogen - activated protein kinase in metabolic syndrome rats[J]. Experimental Biology and Medicine, 2014, 239(8): 954.

(收稿日期: 2019 - 12 - 12; 修回日期: 2020 - 02 - 05)