

## HKC 细胞损伤前后对草酸钙晶体吞噬能力的差异

谈 金 邓穗平 欧阳健明\*

(暨南大学生物矿化与结石病防治研究所,暨南大学化学系,广州 510632)

**摘要:** 采用人类肾脏近端小管上皮细胞系(HKC)建立氧化性损伤模型,研究损伤前后 HKC 调控草酸钙(CaOxa)结晶的差异。采用 CCK-8 法检测 HKC 的细胞活性;利用激光共聚焦显微镜观察 HKC 损伤后表达的晶体粘附分子骨桥蛋白(OPN);采用倒置显微镜观察 HKC 的形态变化;采用扫描电子显微镜(SEM)观察 HKC 微结构及其诱导的晶体;采用 X 射线衍射分析(XRD)表征晶体的组分。在 CaOxa 过饱和溶液中,正常 HKC 主要诱导形成二水草酸钙(COD)晶体,而损伤 HKC 则同时诱导了 COD 和一水草酸钙(COM)晶体。正常 HKC 对 COD 晶体有较强的吞噬能力,而损伤 HKC 的这种能力较弱;HKC 损伤后表达 OPN,促进 CaOxa 晶体的成核和聚集,从而增加了肾结石形成的危险性。

**关键词:** 草酸钙;细胞调控;肾结石;生物矿化

**中图分类号:** R69; R329; O614.23\*1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-4861(2010)12-2131-07

## Difference of Endocytosis to Calcium Oxalate Crystals by HKC Cells before and after Injury

TAN Jin DENG Sui-Ping OUYANG Jian-Ming\*

(Institute of Biomineralization and Lithiasis Research, Jinan University, Guangzhou 510632)

**Abstract:** An oxidative injury model of human kidney proximal tubule epithelial cell line (HKC) was used to investigate the difference of crystallization of calcium oxalate (CaOxa) modulated by HKC before and after injury. Cell viability was examined by using Cell Counting Kit (CCK-8) assay; the change of expression of crystal adherent molecule osteopontin (OPN) on HKC after injury was observed by laser confocal microscope; the morphological change of HKC was observed by inverted microscope; the microstructure of HKC and the crystals induced by HKC were observed by means of scanning electron microscopy (SEM); the crystal component was characterized by X-ray diffraction (XRD). Calcium oxalate dihydrate (COD) crystals were mainly induced from CaOxa supersaturated solution by normal HKC, while COD crystals and calcium oxalate monohydrate (COM) crystals were simultaneously induced by injured HKC. The endocytosis of normal HKC to COD crystals was strong, but weak for injured HKC. After expression of OPN, the injured HKC can promote nucleation and aggregation of CaOxa crystals. It increases the risk of urolithiasis formation.

**Key words:** calcium oxalate; cell modulation; kidney stones; biomineralization

对肾结石矿物与肾小管上皮细胞之间相互作用的研究已经较为广泛<sup>[1-2]</sup>。尽管普遍认为晶体对肾小管上皮细胞具有损伤作用,但是也有一些研究结

果表明晶体对肾小管上皮细胞影响不大<sup>[3]</sup>。

McMartin 等<sup>[4]</sup>报导,一水草酸钙(COM)晶体可引起人近端肾小管细胞、大鼠近端肾小管细胞的坏

收稿日期:2010-07-12。收修改稿日期:2010-08-17。

国家自然科学基金资助项目(No.20971057)。

\*通讯联系人。E-mail:toyjm@jnu.edu.cn, Tel:020-85223353

第一作者:谈 金,男,26 岁,硕士研究生;研究方向:生物无机化学。

死。Schepers 等<sup>[3]</sup>认为,COM 晶体对猪和犬的近端肾小管细胞(LLC-PK<sub>1</sub> 和 MDCK-II)具有毒害作用,但是对鼠和犬的集合管细胞(RCCD<sub>1</sub> 与 MDCK-I)没有毒害作用。近端肾小管细胞能迅速粘附晶体,随后内吞晶体,1 d 后内吞晶体的细胞从细胞层中脱落;但是,集合管细胞与 COM 晶体共同孵育一段时间后,既没有粘附也不会内吞 COM 晶体,集合管细胞的形貌也没有发生改变。上述结果说明,COM 晶体对肾脏中不同部位或不同类型肾小管细胞的作用不同。

例如,对于犬肾小管上皮细胞(MDCK),实际上还可细分为两种细胞株:MDCK-I 和 MDCK-II,这两种细胞的性质互不相同;而在早期的研究中,并没有对此加以区分,因此导致以 MDCK 作为研究对象所得到的结论不一致。Verkoelen 等<sup>[4]</sup>报导,MDCK 与 COM 晶体作用后没有检测到细胞的损伤,COM 晶体粘附到 MDCK 后被细胞内吞,随后从细胞层中被除去;而 Thongboonkerd 等<sup>[5]</sup>报导,COM 晶体能够损伤 MDCK;Khan 等<sup>[6]</sup>亦报导了 COM 晶体可以损伤 MDCK,导致 20%~30%的细胞脱落,且部分脱落细胞中内吞有晶体。

另外,由于不同的研究小组采用不同类型或不同来源的晶体进行研究,亦导致所得到的结论不一致。例如,Aihara 等<sup>[2]</sup>研究了不同浓度的磷酸钙与 LLC-PK<sub>1</sub> 和 MDCK-I 的相互作用,发现两类细胞与磷酸钙晶体接触后都产生细胞损伤现象,从而促进了晶体的粘附和结石的发展。Escobar 等<sup>[7]</sup>发现,来自肾结石中的草酸钙(CaOxa)晶体、磷酸钙晶体对大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E)的损伤程度较小,而人工合成的上述晶体对细胞的损伤程度较大。

此外,在以往文献里,大多数情况是采用预先制备好的 COM 种晶与细胞作用,对二水草酸钙(COD)晶种与细胞作用的研究很少,目前仅见 Lieske 等<sup>[8]</sup>的报道,他们采用非洲绿猴肾上皮细胞(BSC-1)与 COD 晶体相互作用,发现 COD 晶体的(100)晶面能够选择地快速粘附在 BSC-1 细胞上。

因此,研究细胞与尿石晶体的相互作用时,必须确定细胞的种类、晶体类型、晶体来源、以及体系中 CaOxa 溶液的过饱和度等。

HKC 是分化良好的人类肾脏近端小管上皮细胞,存活时间长、易于传代培养,是研究肾毒性的一种有重要价值的体外细胞模型。HKC 细胞具有肾小管上皮细胞特有的结构和功能,能表达近端肾小管

特异性标志酶如碱性磷酸酶 (AP)、 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶 ( $\gamma$ -GT)及上皮细胞分化的标志物细胞角蛋白。

基于此,本文研究了 HKC 与 CaOxa 饱和溶液的相互作用,观察了 CaOxa 晶体在正常 HKC 与损伤 HKC 上的成核、生长以及与 HKC 的相互作用,期望为进一步了解结石形成的细胞机制提供新的启示。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

人类近端肾小管上皮细胞系(HKC)来自 Johns Hopkins 大学医学院 Racusen 博士,由第二军医大学上海长征医院肾内科梅长林教授惠赠。培养液 DMEM-F12(Gibco,美国),新生牛血清(Gibco,新西兰),青霉素(华北制药股份有限公司),链霉素(大连美罗大药厂),细胞增生分析试剂盒(CCK-8)(日本同仁化学研究所),细胞培养板(Iwaki,日本)。丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。其它试剂如 NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaHCO<sub>3</sub> 均为分析纯。

在 D-Hanks 平衡液中制备草酸钾储液(20 mmol·L<sup>-1</sup>)、氯化钙储液(20 mmol·L<sup>-1</sup>),pH 值调至 7.4。使用前配制  $c_{\text{Ca}^{2+}}=c_{\text{C}_2\text{O}_4^{2-}}=0.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 CaOxa 饱和溶液。

### 1.2 仪器

XL-30 型环境扫描电子显微镜 (ESEM, Philips 公司),样品喷金处理,测量电压为 20 kV。酶标仪(Safire2, Tecan,瑞士),在酶标仪上测量吸光度值,测试波长为 450 nm(检测 CCK-8)或者 532 nm(检测 MDA)。日本理学 D/max 2400(Rigaku)X 射线衍射仪,Cu 靶, $K\alpha$  射线,石墨单色器,40 kV,30 mA,扫描范围 5°~60°。倒置显微镜为倒置荧光显微镜(IX51)(日本奥林巴斯公司)。激光共聚焦荧光显微镜(510 META DUO SCAN,CARL ZEISS,德国)。

### 1.3 HKC 培养

HKC 用含 10%新生小牛血清的 DMEM-F12 培养液培养,同时加入 100 U·mL<sup>-1</sup> 青霉素和 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  链霉素。培养条件为 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度。HKC 传代采用胰蛋白酶消化法。细胞达 80%融合后,吸除培养液,用 D-Hanks 平衡液洗涤 HKC 2 次,加入 0.25%胰酶消化液,置于 37 °C 培养箱中 3~5 min 后,在倒置显微镜下观察 HKC 的消化程度,当细胞变圆,细胞之间出现孔隙且不再连接成片,表

明此时细胞消化适度,加入含 10%新生小牛血清的 DMEM-F12 培养液终止消化,并吹打细胞脱离瓶壁形成单细胞悬液;离心 3 min( $1\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ),弃去上清液,再加入含 10%新生牛血清的 DMEM-F12 培养液,吹打细胞形成单细胞悬液,备用。

#### 1.4 细胞的损伤和损伤程度检测

(1) 损伤 HKC 的活性检测:采用 CCK-8 法检测 HKC 的损伤<sup>[9]</sup>,以细胞活性反映 HKC 的损伤程度。

按细胞浓度为  $1\times 10^4\text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $100\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{hole}^{-1}$  接种于 96 孔培养板,加入含 10%新生牛血清的 DMEM-F12 培养液孵育 24 h,改用无血清 DMEM-F12 培养液孵育 12 h,使细胞同步化。将 HKC 分两组,每组均设 3 个平行复孔。① 对照组:只加入无血清培养液;② 损伤组:加入含有  $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ H}_2\text{O}_2$  的无血清培养液,分别作用 HKC 细胞 0、0.5、1、1.5、2 h。然后,两组细胞改用新鲜的无血清培养液,每孔加入  $10\text{ }\mu\text{L}$  的 CCK-8,于  $37^\circ\text{C}$  下孵育 4 h 后,用酶标仪在  $450\text{ nm}$  处测量吸光度 ( $A$ ),各个条件下的 HKC 平行测定 3 个重复孔,求  $A$  值的平均值。

$$\text{Cell Viability} = \frac{A_{\text{exp.}}}{A_{\text{contr.}}} \times 100\%$$

(2) HKC 损伤前后丙二醛(MDA)含量检测:按照上面方法损伤细胞后,将细胞悬浮液移入 EP 管内,在  $4^\circ\text{C}$  离心 10 min。取上清液,采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒,用硫代巴比妥酸(TBA)法测量 MDA 的含量,严格按照试剂盒说明书操作,比色法测定。

(3) HKC 损伤前后表达的骨桥蛋白(OPN)检测:将培养瓶中 70%~80%融合生长的 HKC 经胰酶消化后,取  $1\text{ mL}$ (浓度  $1\times 10^5\text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$ )细胞悬浮液接种于预先铺有盖玻片的 6 孔细胞培养板中,在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h 后,改用无血清 DMEM/F12 培养液孵育 12 h,使细胞同步化。按照上面方法损伤细胞后,从孔板中取出盖玻片,用  $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 PBS 洗 3 次,每次 5 min。4%甲醛/0.1%戊二醛固定 10 min,PBS 洗 3 次(5 min $\times$ 3)。加入含有羊血清的 1%牛血清白蛋白(BSA)封闭液,在  $37^\circ\text{C}$  条件下孵育 20 min。甩掉多余血清,滴加 OPN 抗体(sc-20788,Santa Cruz) (1:150),于  $37^\circ\text{C}$  下孵育 1 h,PBS 洗 3 次(5 min $\times$ 3)。滴加 FITC 标记羊抗兔 IgG 抗体(sc-2012,Santa Cruz)(1:100),放于暗处,在  $37^\circ\text{C}$  下孵育 30 min,PBS 充分冲洗 3 次(5 min $\times$ 3)。使用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 封闭液(sc-24941,

Santa Cruz)封片。对照组以免血清代替 OPN 抗体。于激光共聚焦荧光显微镜下观察并拍摄照片。

#### 1.5 HKC 诱导 CaOxa 晶体生长及晶体的 SEM 和 XRD 检测

按细胞浓度为  $1\times 10^5\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $1\,000\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{hole}^{-1}$  接种于 12 孔培养板内,孔板底部预先平铺有大小合适的盖玻片。用含 10%新生牛血清的 DMEM-F12 培养液孵育 24 h 后,改用无血清 DMEM-F12 培养液孵育 12 h,使细胞同步化。将 HKC 分为 4 组,每组均设 3 个平行复孔。① 空白对照组:加入无血清培养液;②  $\text{H}_2\text{O}_2$  组:每孔加入含  $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ H}_2\text{O}_2$  的无血清培养液,作用 1 h;③ CaOxa 组:加入含  $0.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CaOxa}$  过饱和溶液的无血清培养液,置于  $37^\circ\text{C}$  下分别孵育 0、0.33、3、6、12、24 h;④  $\text{H}_2\text{O}_2$ +CaOxa 组:加入含  $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ H}_2\text{O}_2$  的无血清培养液, $37^\circ\text{C}$  下孵育 1 h 后,吸除培养液,用 D-Hanks 清洗细胞 2 次,加入含  $0.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CaOxa}$  过饱和溶液的无血清培养液,置于  $37^\circ\text{C}$  下分别孵育 0、0.33、3、12、24 h。

达到预定的结晶时间后,取出盖玻片,用 D-Hanks 冲洗细胞 2 次,加入 2.5%戊二醛固定细胞 2 h,再用 1%  $\text{OsO}_4$  对细胞进行后固定,D-Hanks 冲洗 3 次,梯度乙醇(30%、50%、70%、90%、100%)脱水, $\text{CO}_2$  临界点干燥,装样并将样品喷镀包被,在 SEM 下观察细胞形态和晶体生长情况。同时对盖玻片上的晶体进行 XRD 检测,确定晶体的组分。

#### 1.6 统计学方法

实验获得的数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。实验结果采用 SPSS 13.0 软件统计分析,采用 Tukey 检验分析各实验组与对照组均数间的差异。 $P<0.05$  为有统计学意义,表示有显著性差异, $P<0.01$  表示有极显著性差异。 $P>0.05$  表示无显著性差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 $\text{H}_2\text{O}_2$ 对 HKC 的损伤及损伤程度检测

#### 2.1.1 $\text{H}_2\text{O}_2$ 对 HKC 的损伤及损伤程度检测

通过检测  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 HKC 的增殖抑制作用,来衡量  $\text{H}_2\text{O}_2$  对 HKC 的损伤程度,结果如图 1 所示。用  $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用细胞 0.5 h 后,细胞的活性为( $82.1\pm 3.1$ )%,表明 HKC 已经发生明显的损伤( $P<0.05$ );作用 1 h 后,细胞活性显著下降到( $45.0\pm 0.9$ )%;增加  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用时间,对 HKC 的损伤进一步加剧,细胞活性进一步降低;作用 2 h 后,HKC 活性

为 $(35.1\pm0.6)\%$  ( $P<0.05$ )。

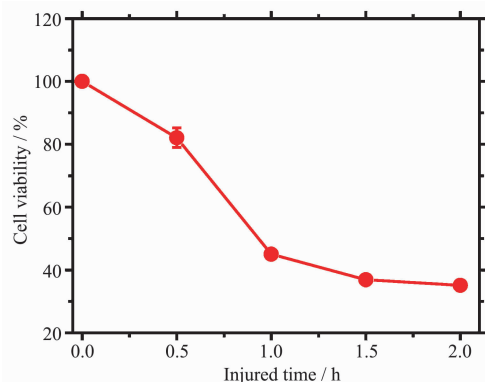


图 1 用  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  损伤 HKC 不同时间后细胞的活性变化

Fig.1 Cell viability change of HKC after exposure to  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  for different hours

### 2.1.2 HKC 损伤后的丙二醛含量增加

在生物体内,肾上皮细胞在病理情况下通过非酶反应与酶促反应产生大量的氧自由基。而生物膜

的主要成分磷脂含有不饱和脂肪酸,氧自由基对这些不饱和脂肪酸中的不饱和键具有很高的亲和力,从而产生过氧化反应,导致细胞损伤,并因此形成脂质过氧化物<sup>[10]</sup>,如醛基、酮基、羟基、羰基、氢过氧基等,其中醛类所占比例较大。丙二醛(MDA)是细胞脂质过氧化反应的终产物,其含量的多少可反映机体内脂质氧化的程度,也间接地反映出细胞受损伤的程度<sup>[11]</sup>。

表 1 为  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  作用于 HKC 不同时间后 MDA 含量的变化。可以看出: $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 HKC 细胞 0.5 h 后,MDA 含量从对照组的  $(0.38\pm0.03) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  明显上升到  $(0.86\pm0.06) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,说明  $\text{H}_2\text{O}_2$  对细胞膜造成了损伤,导致 MDA 水平上升( $P<0.05$ )。随着作用时间增加,MDA 含量增加;当作用 2 h 时,MDA 含量达到  $(1.23\pm0.03) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,表明此时对细胞膜的损伤进一步加剧。

表 1 用  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  作用 HKC 不同时间后细胞释放的 MDA 含量变化( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Content change of MDA released by HKC after exposure to  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  for different time ( $\bar{x}\pm s$ )

| Time / h                                               | 0               | 0.5               | 1                  | 1.5               | 2                 |
|--------------------------------------------------------|-----------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Content of MDA / ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | $(0.38\pm0.03)$ | $(0.86\pm0.06)^*$ | $(1.063\pm0.06)^*$ | $(1.11\pm0.08)^*$ | $(1.23\pm0.03)^*$ |

\*Data are mean $\pm$ standard deviation of three independent experiments; \* $P<0.05$  compared with control without addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  at 0 h.

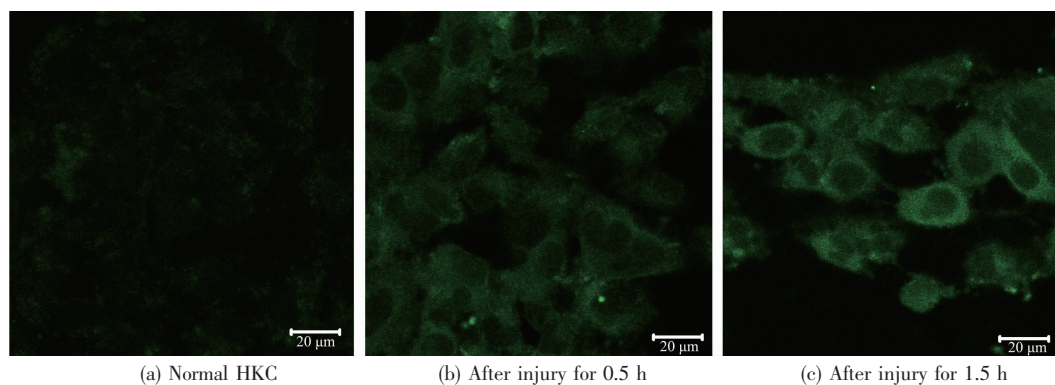
### 2.1.3 细胞损伤后骨桥蛋白(OPN)分子检测

HKC 损伤后,会表达晶体粘附分子骨桥蛋白(OPN)。图 2 为反映 HKC 损伤前后 OPN 分子表达量变化的激光共聚焦显微镜图片。可看出,对照组 HKC 周围没有或只有少量的绿色荧光(图 2a),说明没有损伤的 HKC 不表达或只表达少量的 OPN 分子。

经  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  损伤 0.5 h 后, HKC 周围

出现明显的绿光荧光(图 2b),说明 HKC 被损伤之后,表达了 OPN 分子。当损伤时间增加至 1.5 h 后,绿色荧光强度增强(图 2c),说明 HKC 损伤加剧后,导致大量 OPN 分子的表达。

正常肾上皮细胞表面具有抵抗晶体粘附的性质;但当细胞受损伤后,细胞表面的微结构发生改变,并表达大量带负电荷的物质,如透明质酸、胶原蛋白和 OPN 等<sup>[12-13]</sup>,这些负电荷的物质能够吸引钙



(a) Normal HKC

(b) After injury for 0.5 h

(c) After injury for 1.5 h

$c_{\text{H}_2\text{O}_2}=0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; OPN: Green; Bar: 20  $\mu\text{m}$

图 2 损伤前后 HKC 表面骨桥蛋白(OPN)表达量的激光共聚焦显微镜图片

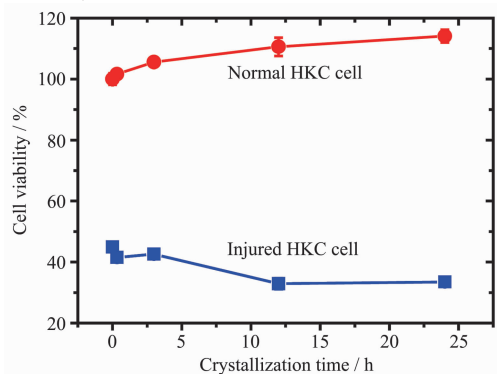
Fig.2 Laser confocal microscope images of OPN expressed on surfaces of normal and injured HKC

离子和草酸钙晶体,是潜在的晶体粘附位点,被称为晶体粘附物质。图 2 结果表明,HKC 被损伤后,表达了 OPN;从其绿色荧光强度可以看出,随着损伤强度增加,OPN 的表达量也增多。

## 2.2 损伤前后 HKC 与 $\text{CaOxa}$ 过饱和溶液的作用

### 2.2.1 损伤前后 HKC 与 $\text{CaOxa}$ 过饱和溶液作用后的活性变化

经  $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  损伤 1 h 后的 HKC 细胞,其活性为  $(45.0 \pm 0.9)\%$ (图 1);将此损伤的 HKC 再用  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaOxa}$  过饱和溶液孵育后,其活性继续降低,如图 3 所示。随着孵育时间增加到 24 h,损伤 HKC 的活性从刚开始时的  $(45.0 \pm 0.9)\%$  继续降低至  $(33.5 \pm 0.6)\%$ 。



Injured condition of HKC:  $c_{\text{H}_2\text{O}_2} = 0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , time: 1 h

图 3 正常组 HKC 和损伤组 HKC 分别与  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaOxa}$  过饱和溶液孵育不同时间后细胞的活性变化

Fig.3 Cell viability change of normal and injured HKC after incubation with  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaOxa}$  supersaturated solution for different time

相比之下,正常 HKC 用  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaOxa}$  过饱和溶液孵育后,细胞的活性略有增加;如分别孵育 3 h 和 24 h 后,其活性分别为  $(105.61.2)\%$  和  $(114.12.1)\%$ (图 3),说明细胞仍在继续生长。

### 2.2.2 正常 HKC 对 COD 晶体的内吞作用

图 4 为正常 HKC 与  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{CaOxa}$  过饱和溶液孵育不同时间后诱导生成的晶体的 SEM。可以看出,孵育 0.33 h 后, $\text{CaOxa}$  晶体就已经在 HKC 表面成核生长(图 4a),这些晶体具有 COD 的典型形貌四角双锥形。

倒置显微镜观察表明,孵育 3 h 后,HKC 开始覆盖在其诱导的 COD 晶体表面上,表明此时 HKC 已经开始内吞晶体。SEM 进一步显示,被 HKC 覆盖后的 COD 晶体,会在 HKC 的不断作用下逐渐分解成尺寸较小的微晶(图 4b 中箭头所示);且随着孵育时间的增加,越来越多的 COD 晶体被分解形成尺寸更小的微晶(图 4c、4d 中箭头所示)。在此过程中,正常 HKC 的活性变化不大。该结果与 Lieske 等<sup>[8]</sup>研究 BSC-1 细胞与 COD 晶体相互作用的结果相似。

尽管有一些文献报导<sup>[14-15]</sup>, $\text{CaOxa}$  晶体对培养的肾小管上皮细胞产生损伤作用。但是,在这些文献里采用的  $\text{CaOxa}$  晶体均为 COM 晶体。COM 晶体与 COD 晶体对肾细胞的病理学行为不同,COD 晶体是肾结石成分的另外一种矿物相,其含量比 COM 晶体少<sup>[16]</sup>;加上 HKC 还可以内吞一部分 COD 晶体,因此,总体来看,COD 晶体对肾细胞生长的影响不大。即:相比 COM 晶体,在尿液中形成较多的 COD 晶体被认为有利于减少形成结石的风险<sup>[17]</sup>。

正常 HKC 能够抵御由一定量  $\text{CaOxa}$  晶体所造成的损伤,这可能是由于正常 HKC 诱导生成的主要为 COD 晶体、且晶体尺寸较小、数量较少所致。Lieske 等<sup>[18-20]</sup>报导,COM 晶体在 15 s 内即可粘附在 BSC-1 细胞上面,随后被 BSC-1 细胞内吞,且被内吞的 COM 晶体没有对 BSC-1 细胞的生长产生不利影响,反而促进 BSC-1 细胞的增殖。

一般认为,与远端肾小管上皮细胞(如 MDCK I)和集合管细胞(如 RCCD<sub>1</sub>)相比,近端肾小管上皮

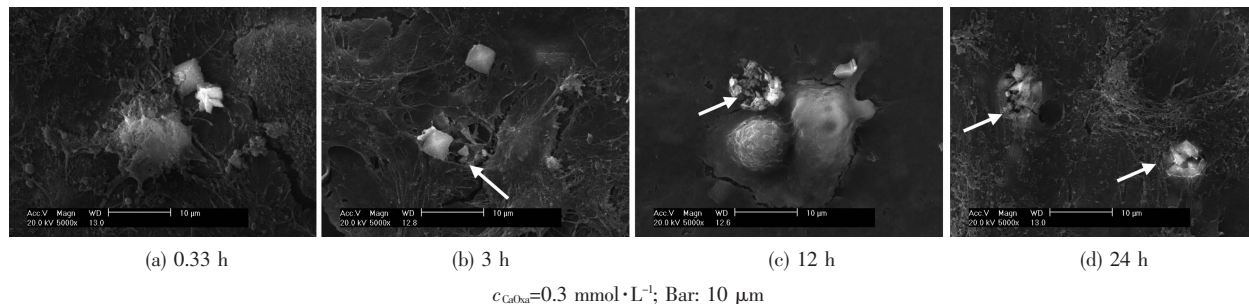


图 4 正常 HKC 与  $\text{CaOxa}$  过饱和溶液孵育不同时间后诱导形成的晶体的 SEM

Fig.4 SEM images of crystals induced by normal HKC after incubation with  $\text{CaOxa}$  supersaturated solution for different time

细胞(如 LLC-PK<sub>1</sub>)对粘附在其表面的晶体的内吞能力较强,且是一种主动摄取的过程,因此,没有观察到 MDCK I 与 RCCD<sub>1</sub> 对晶体的内吞现象。这是肾脏上皮细胞的一种保护性机制,可以除去细胞表面潜在的晶体成核和生长位点。从图 4c 和图 4d 可以看到,COD 晶体被 HKC 内吞,这正是 HKC 对肾结石形成的防御机制<sup>[21]</sup>。

### 2.3 损伤的 HKC 对 COD 晶体的内吞能力减弱

损伤的 HKC 与  $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{CaOxa}$  过饱和

溶液孵育不同时间后,其诱导生成的晶体形貌如图 5 所示。可以看出,在 0.33 h 内,便有较多的草酸钙晶体在损伤的 HKC 表面形成(图 5a);但一直孵育到 24 h (图 5d),均很少发现损伤 HKC 内吞晶体的现象。这与细胞内蛋白激酶的活性有关。蛋白激酶在细胞的内吞作用中起着重要调控作用<sup>[22]</sup>,细胞受到损伤后,蛋白激酶的活性降低,从而减弱了细胞的内吞作用。

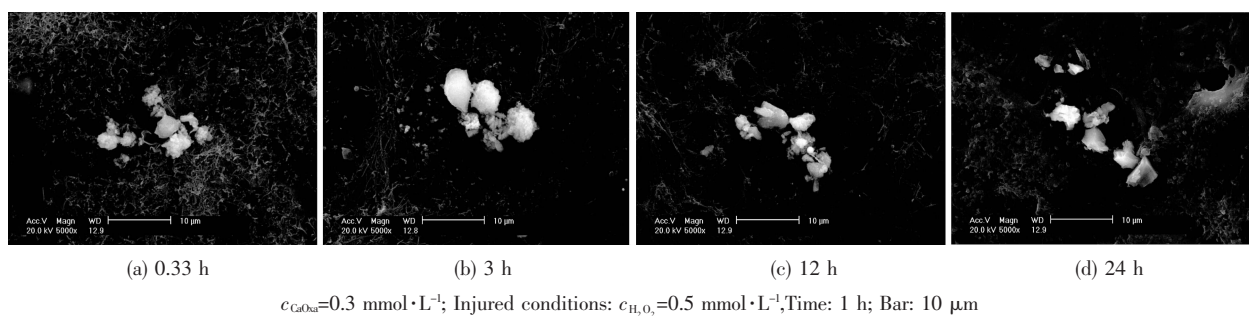
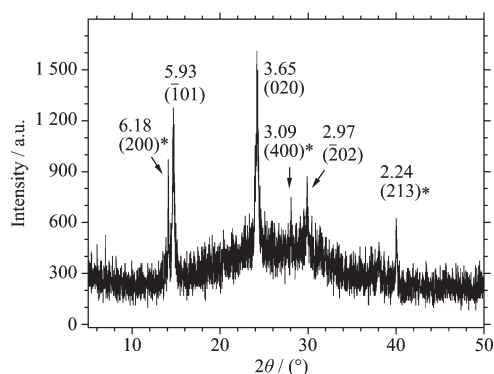


图 5 损伤 HKC 细胞与  $\text{CaOxa}$  过饱和溶液孵育不同时间后诱导的晶体 SEM

Fig.5 SEM images of crystals induced by injured HKC after incubation with  $\text{CaOxa}$  supersaturated solution for different time

在损伤 HKC 诱导生成的  $\text{CaOxa}$  晶体中,不但形成聚集的晶体簇,而且 COM 晶体的比例显著增加。图 6 为损伤 HKC 诱导生成的  $\text{CaOxa}$  晶体的 XRD 图。可以看到,XRD 图中同时出现了归属于 COM 和 COD 晶体的衍射峰,且 COM 晶体的衍射峰强度高于 COD 晶体,图中晶面间距  $d=0.618, 0.309$  和  $0.224 \text{ nm}$  分别归属于 COD 晶体的 (200)、(400) 和 (213) 晶面, $d=0.593, 0.365$  和  $0.297 \text{ nm}$  分别归属于 COM 的 ( $\bar{1}01$ )、(020) 和 ( $\bar{2}02$ ) 晶面。



$c_{\text{CaOxa}}=0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , Crystallization time: 6 h, Injured conditions:  $c_{\text{H}_2\text{O}_2}=0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , time: 1 h; The crystal faces with asterisk show COD and those without asterisk show COM

图 6 损伤 HKC 诱导形成的草酸钙晶体 XRD 图

Fig.6 XRD patterns of calcium oxalate crystals induced by injured HKC

从图 2 可以看出,HKC 受损伤后,在其表面表达 OPN。OPN 是一种带负电的分泌型的糖基化磷酸化蛋白,广泛分布于多种组织和细胞中,其相对分子质量约为  $44 \text{ kDa}$ <sup>[23]</sup>,含有约 300 个氨基酸残基,其中酸性氨基酸如天冬氨酸残基、谷氨酸残基和丝氨酸残基约占总氨基酸量的一半。因此,OPN 分子中含有丰富的酸性结构域,这些酸性结构域能与游离的  $\text{Ca}^{2+}$  相结合,并可以粘附表面带正电荷的 COM 晶体,促进晶体在细胞表面的滞留<sup>[24-25]</sup>。因此,细胞受到损伤后,细胞吞噬晶体的能力显著减弱(图 5),导致大量晶体滞留在肾小管内,引起晶体的聚集,甚至堵塞肾小管。

相比表面具有较高正电荷密度的 COM 晶体,COD 晶体表面电荷密度很低,COD 表面负电荷密度较高的部位仅处在其锥体的 2 个顶端<sup>[26-27]</sup>,在这两个顶端上由于草酸根的突出而带负电。损伤的 HKC 表面由于表达了 OPN 等酸性分子而带负电,因此,COD 晶体与损伤 HKC 的作用较弱。

上述结果提示,通过研究不同晶相的  $\text{CaOxa}$  晶体与不同性质的细胞作用,有助于阐明肾结石病复杂的病理学过程。

## 3 结 论

以氧化性损伤的 HKC 体系为模型,研究了

CaOxa 过饱和溶液与 HKC 的相互作用。结果表明, CaOxa 晶体在正常 HKC 和受损伤 HKC 表面的成核和聚集行为存在差异。正常 HKC 主要诱导 COD 晶体形成, 并对 COD 晶体的内吞能力较强, 而损伤 HKC 的内吞能力减弱。损伤 HKC 促进 COM 的成核和聚集, 因此, HKC 受损伤后, 增加了草酸钙结石形成的危险性。

#### 参考文献:

- [1] Hovda K E, Guo C G, Austin R, et al. *Toxicol. Lett.*, **2010**, **192**(3):365-372
- [2] Aihara K, Byer K J, Khan S R. *Kidney Int.*, **2003**, **64**(4):1283-1291
- [3] Schepers M S J, van Ballegooijen E S, Bangma C H, et al. *Kidney Int.*, **2005**, **68**(4):1543-1553
- [4] Verkoelen C F, Romijn J C, de Bruijn W C, et al. *Kidney Int.*, **1995**, **48**:129-138
- [5] Thongboonkerd V, Semangoen T, Sinchaikul S, et al. *J. Prot. Res.*, **2008**, **7**(11):4689-4700
- [6] Thamilselvan S, Khan S R. *J. Nephrol.*, **1998**, **11**(Suppl 1):66-69
- [7] Escobar C, Byer K J, Khan S R. *BJU Int.*, **2007**, **100**:891-897
- [8] Lieske J C, Toback F G, Deganello S. *Calcif. Tissue Int.*, **1996**, **58**:195-200
- [9] Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, et al. *Nature Cell Biol.*, **2004**, **6**(8):731-740
- [10] Thamilselvan S, Khan S R, Menon M. *Urol. Res.*, **2003**, **31**:3-9
- [11] Veena C K, Josephine A, Preetha S P, et al. *Life Sci.*, **2006**, **79**:1789-1795
- [12] Khan S R, Glenton P A, Byer K J. *Kidney Int.*, **2006**, **70**:914-923
- [13] Yasui T, Fujita K, Asai K, et al. *J. Urol.*, **2002**, **9**(2):100-108
- [14] Guo C G, Cenac T A, Li Y, et al. *Toxicol. Lett.*, **2007**, **173**:8-16
- [15] Koul H K, Menon M, Chaturvedi L S, et al. *J. Biol. Chem.*, **2002**, **277**:36845-36852
- [16] HUANG Zhi-Jie(黄志杰), LI Jun-Jun(李君君), HE Jie-Yu(何节玉), et al. *Spectrosc. Spectr. Anal. (Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi)*, **2010**, **30**(7):1913-1917
- [17] Wesson J A, Ward M D. *Elements*, **2007**, **3**(6):415-421
- [18] Lieske J C, Swift H, Martin T, et al. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **1994**, **91**(15):6987-6991
- [19] Lieske J C, Walsh-Reitz M M, Toback F G. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **1992**, **262**:F622-F630
- [20] Lieske J C, Toback F G. *Am. J. Physiol.*, **1993**, **264**:F800-F807
- [21] Khan S R. *Urol. Res.*, **2006**, **34**(2):86-91
- [22] Pelkmans L, Fava E, Grabner H, et al. *Nature*, **2005**, **436**(7047):78-86
- [23] QIN Ling(秦岭), CHEN Jiang-Hua(陈江华). *Int. J. Urol. Nephrol. (Guoji Miniaoxitong Zazhi)*, **2006**, **26**(1):129-132
- [24] ZHONG Yu-Sen(钟宇森), CAI Hua-Fang(蔡华芳), LUO Yan-Xi(罗砚曦). *Chinese J. Integrated Traditional Western Nephrol. (Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Shenbing Zazhi)*, **2009**, **10**(8):741-743
- [25] Verkoelen C F. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2006**, **17**(6):1673-1687
- [26] Tunik L, Hueredi-Milhofer F, Garti N. *Langmuir*, **1998**, **14**:3351-3355
- [27] DENG Fang(邓芳), OUYANG Jian-Ming(欧阳健明). *Chem. Res. Appl. (Huaxue Yanjiu Yu Yingyong)*, **2005**, **18**(5):449-454