

乙酸铅诱发人肾小管上皮细胞线粒体损伤的体外研究

雷义¹, 金文达², 陈锋³

摘要: [目的] 研究铅对人肾小管上皮细胞(human kidney cells, HK-2)线粒体的损伤作用,并探讨其可能的作用机制。[方法] 以不同浓度的乙酸铅处理体外培养的 HK-2 细胞,罗丹明 123(rhodamine 123, Rh123)及 10-壬基吖啶橙(10-nonyl acridine orange, NAO)结合荧光化学发光仪分别检测细胞线粒体膜电位及心磷脂水平,细胞免疫荧光法结合流式细胞术检测线粒体细胞色素 c(cytochrome c, Cyt c)释放情况,加甘露醇观察铅对心磷脂及 Cyt c 变化的影响。[结果] 乙酸铅能造成 HK-2 细胞线粒体膜电位剂量及时间依赖性下降,荧光强度从正常对照组的 4.56 ± 0.25 下降到 $400 \mu\text{mol/L}$ 组的 2.90 ± 0.26 或从正常对照组的 4.44 ± 0.20 下降到 12 h 组的 2.34 ± 0.50 ,与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。乙酸铅能明显造成 HK-2 细胞线粒体心磷脂 NAO 荧光强度时间及剂量依赖性下降,荧光强度从正常对照组的 2.45 ± 0.18 下降到 $400 \mu\text{mol/L}$ 组的 0.91 ± 0.18 或从正常对照组的 2.52 ± 0.01 下降到 24 h 组的 1.50 ± 0.05 ,与正常对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。乙酸铅能诱发线粒体 Cyt c 释放,剂量及时间依赖性地降低细胞内 Cyt c 荧光强度。 $50 \mu\text{mol/L}$ 甘露醇能使 NAO 荧光强度从 1.38 ± 0.14 恢复至 2.30 ± 0.15 ,将 Cyt c 荧光强度从 9.49 ± 0.31 恢复至 14.20 ± 0.39 ,明显抑制铅对心磷脂的氧化及 Cyt c 的释放。[结论] 铅可能早期通过 HK-2 细胞线粒体膜电位溃散,造成线粒体功能损害,进一步加强线粒体心磷脂的氧化损伤,促使 Cyt c 释放,造成线粒体的结构损伤。

关键词: 乙酸铅; HK-2 细胞; 线粒体; 细胞色素 c

An In Vitro Study on the Mitochondria Damage of Human Kidney Cells Induced by Lead Acetate
LEI Yi¹, JIN Wen-da², CHEN Feng³ (1.Liuyang Center for Disease Control and Prevention, Liuyang, Hunan 410300, China; 2.Shaoyang Center for Disease Control and Prevention, Shaoyang, Hunan 422000, China; 3. Institute of Environmental Medicine, School of Public Health, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China) • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To explore the possible mechanism of mitochondria damage in human kidney cells (HK-2 cells) induced by lead acetate *in vitro*. [Methods] Cultured HK-2 cells were exposed to different level of lead acetate. Mitochondrial membrane potential (MMP) and diphosphatidyl glycerol were detected by rhodamine 123 (Rh123) and 10-nonyl acridine orange (NAO). The release of cytochrome c (Cyt c) from mitochondria was detected by flow cytometry combined with immunofluorescence. Changes of diphosphatidyl glycerol and Cyt c were observed with mannitol treatment. [Results] After exposed to lead acetate, MMP was descended in a dose- and time-dependent manner in HK-2 cells, significantly down from 4.56 ± 0.25 in normal control group to 2.90 ± 0.26 in $400 \mu\text{mol/L}$ exposure group and from 4.44 ± 0.20 in normal control group to 2.34 ± 0.50 in 12 h exposure group ($P < 0.05$). The NAO fluorescence intensity (propidium iodide) of diphosphatidyl glycerol was declined in a dose- and time-dependent manner, significantly down from 2.45 ± 0.18 in normal control group to 0.91 ± 0.18 in $400 \mu\text{mol/L}$ exposure group and from 2.52 ± 0.01 in normal control to 1.50 ± 0.05 in 24 h exposure group ($P < 0.05$). Lead acetate induced Cyt c releasing from mitochondria and reduced the fluorescence intensity of Cyt c in a dose- and time-dependent manner. The treatment with $50 \mu\text{mol/L}$ mannitol recovered the fluorescence intensity of NAO to 2.30 ± 0.15 from 1.38 ± 0.14 and that of Cyt c to 14.20 ± 0.39 from 9.49 ± 0.31 . [Conclusion] Mitochondrial dysfunction could be induced by early exposure to lead acetate in HK-2 cells. And then, oxidative damage of diphosphatidyl glycerol would be enhanced, and the release of Cyt c from mitochondria could be induced. Finally, structural damage of mitochondria could be observed in HK-2 cells.

Key Words: lead acetate; HK-2 cells; mitochondria; cytochrome c

[作者简介] 雷义(1980—),男,硕士生;研究方向:金属毒物毒理学特性;E-mail: leiyi107@gmail.com

[作者单位] 1.浏阳市疾病预防控制中心,湖南 浏阳 410300; 2.邵阳市疾病预防控制中心,湖南 邵阳 422000; 3.南华大学公共卫生学院环境医学研究所,湖南 衡阳 421001

肾脏是机体重要的排泄器官,也是大多数重金属作用的主要靶器官。铅可干扰肾脏的代谢,导致其结构和功能的改变^[1]。但目前铅致肾脏损害的研究多处于机体整体水平,其作用机制尚未完全阐明。本研究拟通过观察铅对体外培养的人肾小管上皮细胞(human kidney cells, HK-2)线粒体的损伤作用,探讨铅

致人体肾毒性的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

HK-2 细胞购自中国医学科学院细胞中心。乙酸铅(纯度为 99.999%)、罗丹明 123(rhodamine 123, Rh123)和 Digitonin 均购自美国 Sigma 公司, 10-壬基吖啶橙(10-nonyl acridine orange, NAO)购自美国 Molecular Probes 公司, 细胞色素(cytochrome c, Cyt c)鼠抗人单克隆抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司, FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 购自中山金桥公司。主要的仪器有 FACSCalibur 流式细胞仪(美国 Becton Dickson 公司)、Fluoroskan Ascent FL 荧光化学发光仪(芬兰 Thermo Labsystem 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HK-2 细胞进行常规细胞培养、传代。在 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养 4 d 后对细胞进行传代。培养液为含体积分数为 10% 的胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM/F12 1:1 培养液。

1.2.2 实验分组 实验分正常对照组(0 μmol/L 乙酸铅处理组)及 50、100、200、400 μmol/L 乙酸铅处理组。甘露醇干扰组是在加入 200 μmol/L 乙酸铅的同时加入 50 μmol/L 的甘露醇。Cyt c 的检测还包括空白对照组(无细胞空白本底对照组)。各组执行相同的培养和处理过程。

1.2.3 线粒体膜电位及心磷脂氧化损伤的检测 线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)、心磷脂氧化损伤剂量效应关系的观察是以不同剂量的铅分别处理细胞 6、24 h。200 μmol/L 铅处理细胞 0、3、6、12、24 h 观察心磷脂氧化损伤的时间效应关系; MMP 测定的时间效应关系的实验处理时间是 0、3、6、9、12 h。分别以 10 μmol/L 的 Rh123 染色工作液、35 μmol/L 的 NAO 避光温育处理细胞 15~20 min, 荧光化学发光仪测定 MMP、心磷脂的水平^[2-3]。

1.2.4 细胞免疫检测 Cyt c 的释放 参考 WATERHOUSE 等^[4]的实验方法。剂量效应关系的观察是以不同剂量的铅分别处理细胞 12 h; 200 μmol/L 铅处理细胞 0、3、6、12、24 h 观察时间效应关系。

1.3 统计分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件分析, 用单因素方差分析进行多个样本均数间的比较, 组内两两比较应用 LSD 法, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 铅对 HK-2 细胞线粒体功能的影响

以 0、50、100、200、400 μmol/L 的铅处理 HK-2 细胞 6 h, 镜下细胞形态和密集度变化不大, 但随着剂量的增加, Rh123 碘化丙锭(propidium iodide, PI)染色荧光强度逐渐下降, 呈现明显的量效关系, 单因素方差分析提示各组之间差异有统计学意义($F=71.31, P<0.01$), 两两比较提示各铅处理组与正常对照组间差异有统计学意义($P<0.01$, 表 1), 提示铅能剂量依赖性地降低 HK-2 细胞线粒体膜电位。以 0、50、100、200、

400 μmol/L 的铅分别处理 HK-2 细胞 24 h 和 12 h, 高剂量组细胞的形态和密集度较正常细胞组均有所改变, 且随着剂量的增加, 反映线粒体心磷脂氧化损伤的 NAO 荧光强度逐渐下降, 细胞内 Cyt c 的荧光强度逐渐减弱, 呈现明显的时效关系, 单因素方差分析提示各组之间差异均有统计学意义($F=22.41, P<0.01$; $F=198.18, P<0.01$), 两两比较提示各铅处理组与正常对照组间差异有统计学意义($P<0.01$, 表 1)。

表 1 不同剂量铅对线粒体功能指标的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

剂量(μmol/L)	MMP(Rh123 PI)	心磷脂(NAO PI)	Cyt c
阴性对照	—	—	3.71 ± 0.52
0	4.56 ± 0.25	2.45 ± 0.18	16.39 ± 0.46
50	4.25 ± 0.28*	2.16 ± 0.21*	13.08 ± 0.42*
100	4.19 ± 0.21*	1.74 ± 0.19*	10.40 ± 0.73*
200	4.02 ± 0.17*	1.38 ± 0.14*	9.49 ± 0.31*
400	2.90 ± 0.26*	0.91 ± 0.18*	7.65 ± 0.34*

[注]*: 与正常对照组比较, $P<0.05$ 。

200 μmol/L 铅处理细胞 0、3、6、9、12 h, 暴露 12 h 后, 细胞的形态和密集度较正常细胞组有稍许改变, 且随着时间的延长, Rh123 荧光强度逐渐下降, 呈现明显的时间效应关系, 单因素方差分析提示各组之间差异有统计学意义($F=58.80, P<0.01$), 两两比较提示各铅处理组与正常对照组间差异有统计学意义($P<0.01$, 表 2), 提示铅能时间依赖性地降低 HK-2 细胞线粒体膜电位。NAO 及细胞内 Cyt c 的荧光强度也随着染毒时间的延长而逐渐减弱, 单因素方差分析提示各组之间差异有统计学意义($F=93.39, P<0.01$; $F=318.99, P<0.01$), 两两比较提示各铅处理组与正常对照组间差异有统计学意义($P<0.01$, 表 2)。

表 2 不同时间的铅接触对线粒体功能指标的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

时间(h)	MMP(Rh123 PI)	心磷脂(NAO PI)	Cyt c
阴性对照	—	—	4.11 ± 0.32
0	4.44 ± 0.20	2.52 ± 0.01	16.82 ± 0.41
3	4.10 ± 0.48*	2.36 ± 0.03*	15.73 ± 0.47*
6	3.95 ± 0.27*	1.99 ± 0.04*	15.29 ± 0.63*
9	3.75 ± 0.13*	—	—
12	2.34 ± 0.50*	1.81 ± 0.15*	13.29 ± 0.49*
24	—	1.50 ± 0.05*	8.48 ± 0.52*

[注]*: 与正常对照组比较, $P<0.05$ 。

2.2 甘露醇对铅诱发的 HK-2 细胞线粒体功能的影响

以 200 μmol/L 铅+50 μmol/L 甘露醇干预处理 HK-2 细胞, 能明显增强线粒体心磷脂荧光强度(2.30 ± 0.15)及细胞内 Cyt c 荧光强度(14.20 ± 0.39)。其与 200 μmol/L 铅处理组比较, 两项的差异均有统计学意义($P<0.01$); 与正常对照组比较, 线粒体心磷脂荧光强度的差异无统计学意义($P=0.054$)。

3 讨论

铅是一种使用普遍且广泛存在于环境中的重金属。铅对人体的慢性毒性作用长期以来引人关注。因经肾脏排泄是人体内铅排出的主要途径, 血铅浓度过高可造成肾脏功能及器质性的

损害。铅对肾脏早期的功能损害是可逆的,其损害的程度与体内铅负荷密切相关^[1]。前期的研究表明,铅损害肾脏的机制可能与铅通过氧化应激诱发肾小管上皮细胞的凋亡有关,过度凋亡的结局是细胞坏死^[5]。但铅究竟是如何引起人肾小管上皮细胞凋亡及其线粒体在其中的作用,有待进一步探讨。

线粒体在细胞凋亡发生中起中心作用^[6]。线粒体膜电位的稳定是维持线粒体结构和功能的重要基础。本研究结果显示,铅能降低 HK-2 细胞线粒体膜电位的荧光强度,提示铅能时间、剂量依赖性致 HK-2 细胞线粒体膜电位溃散,其结果将直接导致线粒体能量合成障碍,进一步损害线粒体的功能。心磷脂位于线粒体内膜。由于其不饱和酰基链的特性,加上它接近线粒体活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生的部位,心磷脂极容易受到 ROS 的氧化攻击。本研究结果提示,铅能明显增强 HK-2 细胞线粒体心磷脂的氧化水平,这也进一步加强了前期研究结果(铅能增强 HK-2 细胞 ROS 的产生)的可信度^[5]。心磷脂明显减少,最终造成线粒体的严重损伤^[7]。

细胞色素 c 是唯一位于线粒体膜间隙,并与线粒体内膜心磷脂松弛结合的正铁血红蛋白,在氧化呼吸链复合物 III 和 IV 之间发挥传递电子作用。本研究结果显示,细胞内细胞色素 c 荧光强度随着铅作用剂量增加、时间延长而逐渐降低,根据 WATERHOUSE 等^[4]的实验原理,提示铅可致 HK-2 细胞线粒体内细胞色素 c 释放逐渐增多,呈时间及剂量效应关系。细胞色素 c 的释放,是其脱离线粒体心磷脂、线粒体外膜通透性增加的结果。Cyt c 释放到胞质后可引发 caspase 活化级联,导致细胞凋亡^[8]。

使用抗氧化剂甘露醇干预,能有效地拮抗铅对 HK-2 细胞线粒体心磷脂的氧化损伤,降低 Cyt c 的释放,暗示氧化应激可能在铅诱发的 HK-2 细胞线粒体损伤中起着重要作用。铅可能早期通过降低 HK-2 细胞线粒体膜电位,造成线粒体功能损害,

进一步加强线粒体心磷脂的氧化损伤,促使 Cyt c 与线粒体心磷脂脱离,释放入胞质,最终造成线粒体的结构损伤。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] 朱彩菊, 张霞, 倪蕴娥, 等. 长期接触铅作业工人肾功能损害探讨[J]. 劳动医学, 1999, 16(4): 226-228.
- [2] KAEWSUYA P, DANIELSON N D, EKHTERAEE D. Fluorescent determination of cardiolipin using 10-N-nonyl acridine orange[J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 387(8): 2775-2782.
- [3] TALBOT J, BARRETT J N, BARRETT E F, et al. Stimulation-induced changes in NADH fluorescence and mitochondrial membrane potential in lizard motor nerve terminals[J]. J Physiol, 2007, 579(3): 783-798.
- [4] WATERHOUSE N J, TRAPANI J A. A new quantitative assay for cytochrome c release in apoptotic cells[J]. Cell Death Differ, 2003(10): 853-855.
- [5] 金文达, 雷义, 朱茂祥, 等. 醋酸铅诱导 HK-2 细胞凋亡及其机制研究[J]. 毒理学杂志, 2009, 23(5): 364-367.
- [6] DESAGHER S, MARTINOU J C. Mitochondria as the central control point of apoptosis[J]. Trends Cell Biol, 2000, 10(9): 369-377.
- [7] CHICCO A J, SPARAGNA G C. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(1): 33-44.
- [8] LU M C, TZANG B S, KUO W W, et al. More activated cardiac mitochondrial-dependent apoptotic pathway in obese Zucker rats[J]. Obesity, 2007, 15(11): 2634-2642.

(收稿日期: 2011-04-26)

(英文编审: 薛寿征; 编辑: 张晶; 校对: 王晓宇)

【精彩预告】

某机械制造企业粉尘作业人员尘肺危害现状调查

盖冰冰, 陈达民, 虞慧婷, 赵冬青

为调查某机械制造企业粉尘作业人员尘肺危害状况,对尘肺发病的风险进行评估,探讨有效的职业病防控对策。研究人员在 2009 年对粉尘作业车间进行现场职业卫生调查、对 216 名粉尘作业人员进行职业健康检查及问卷调查。结果发现,粉尘作业地点工程防护设施不完善,作业人员个人呼吸防护情况不佳。职业健康检查结果显示未发现尘肺病人,胸片有异常表现者 66 人,占总人数的 30.56%,其中观察对象有 6 人。与上年胸片对比,有 16 人肺部损害呈现加重的趋势。随着接尘工龄的延长,粉尘作业人员胸片有异常表现的比例明显增高($P < 0.001$)。该企业粉尘作业人员尘肺病发病的风险增加,应及早建立职业病防控管理体系,通过多种技术手段加强职业病预防控制。对胸片表现异常,包括出现小阴影改变,未达到观察对象标准的粉尘作业人员进行监测和动态观察,可以早期评估尘肺发病的风险。

此文将于近期刊出,敬请关注!