

抗霉素诱导肾小管上皮细胞铁死亡的实验研究^{*}武汉市中西医结合医院 陈芳 胡韬韬 陈丹 陈菁 黄晓丽 梁鸿卿 熊飞 邹荣^{*}, 武汉 430022

摘要 目的:观察抗霉素诱导肾小管上皮细胞发生铁死亡(ferroptosis)的现象,初步探讨铁死亡参与急性肾损伤的病理生理机制。方法:以1、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 抗霉素A(antimycin A)干预人近曲小管上皮细胞(HK-2)2、4、8、16、24h。MTT法检测细胞存活率,乳酸脱氢酶检测细胞活性,透射电镜检测细胞线粒体形态,Western blot检测凋亡关键蛋白(caspase3)活化,流式细胞术检测细胞内活性氧(ROS)。结果:HK-2细胞存活率随着抗霉素作用剂量和时间的增加而下降($P<0.01$)。2.5 $\mu\text{mol/L}$ 抗霉素A干预HK-2细胞2h后,细胞上清液乳酸脱氢酶(LDH)释放明显增加($P<0.01$),电镜观察发现铁死亡特征性改变,细胞线粒体膜密度增加,线粒体嵴减少,细胞内ROS含量明显增加($P<0.05$)。与抗霉素模型组相比,铁螯合剂去铁胺(deferoxamine)、铁死亡特异性拮抗剂Ferrostatin-1预处理HK-2细胞能明显减少抗霉素A损伤后LDH的释放、线粒体损伤及ROS的产生($P<0.05$),且该过程不伴有caspase3活化。结论:在缺氧诱导肾小管上皮细胞损伤过程中,铁死亡可能是肾小管上皮细胞较早出现的损伤方式;抑制细胞铁死亡的发生可以减轻缺氧对肾小管上皮细胞的损害。

关键词 铁死亡;急性肾损伤;抗霉素A;去铁胺

中图分类号 R692.6 文献标识码 A DOI 10.11768/nkjwzzzz20180418

Experimental study on ferroptosis of renal tubular epithelial cells induced by antimycin A CHEN Fang, HU Tao-tao, CHEN Dan, CHEN Jing, HUANG Xiao-li, LIANG Hong-qing, XIONG Fei, ZOU Rong^{*}. Wuhan Integrated TCM & Western Medicine Hospital, Wuhan 430022, China

Abstract Objective: To investigate the occurrence and molecular mechanisms of antimycin A-induced ferroptosis in renal tubular epithelial cells (HK-2). Methods: MTT assay was used to detect cell viability rate after treatment with 1, 2.5, 5.0, and 10.0 $\mu\text{mol/L}$ antimycin A. The leakage of lactate dehydrogenase (LDH) was measured by LDH kit. The mitochondrion injury was observed by the electron microscopy. The activity of caspase-3 was measured by Western blotting. The LDH C11-BODIPY fluorescent probe was used to test the production of lipid ROS by flow cytometry. Results: MTT assay showed that antimycin A markedly increased the death of HK-2 cells in a certain period of time and concentration. The leakage of LDH distinctly increased after treatment with antimycin A in HK-2 cells. After treatment with antimycin A for 2 h, the characteristic mitochondrion injuries such as small mitochondria with condensed mitochondrial membrane densities and reduction of mitochondria crista were observed. The production of ROS detected by C11-BODIPY fluorescence probe was also increased ($P<0.05$). The pre-treatment with deferoxamine or ferrostatin-1 prevented the LDH leakage, mitochondria injuries and ROS increase without activation of caspase-3 ($P<0.05$). Conclusion: Ferroptosis participated in the hypoxia injuries in renal tubular epithelial cells induced by antimycin A, which may be therapeutically targeted by ferroptosis inhibition.

Key words Ferroptosis; Acute kidney injury; Antimycin A; Deferoxamine

肾小管上皮细胞死亡脱落是急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)发生发展的中心环节,既往研究证实肾小管上皮细胞以坏死、凋亡、自噬等多种死亡方式参与急性肾损伤^[1]。铁死亡(ferroptosis)是在神经细胞损伤中发现的一种新的细胞死亡方式,它的标志性特征是 Fe^{2+} 依赖及活性氧(ROS)产生。肾小管上皮细胞因富含线粒体及细胞 Fe^{2+} ,具有高代谢活性,对缺氧极其敏感,在线粒体铁参与的氧化

磷酸化过程中,伴随着ATP的生成,细胞会同步产生ROS^[2]。因此,我们推测在缺氧引起的肾小管上皮细胞损伤过程中,除了既往发现的坏死、凋亡等死亡方式^[3~5],是否存在新的死亡方式——铁死亡。为了证实该科学问题,寻找AKI治疗的新靶点,本研究通过抗霉素诱导肾小管上皮细胞缺氧损伤,观察该病理过程中是否有铁死亡的参与及其可能存在的干预靶点。

材料与方法

试剂 人近曲小管上皮细胞(HK-2)购自中科院上海细胞生物研究所。噻唑蓝(MTT)购自武

^{*}基金项目:国家自然科学基金 81600530;武汉市卫生和计划生育委员会科研项目(WX16C36)

^{*}通信作者:邹荣, E-mail: little-nightelf@hotmail.com

汉生命技术有限公司, Amersco 分装, 二甲基亚砜 (DMSO) 购自 Sigma 公司; Antimycin A 购至 Abcam 公司; 铁死亡抑制剂 (Ferrostatin-1, Fer-1) 购自 Selleck Chemical; PBS 购自北京中杉生物技术有限公司; DMEM/F12 培养液购自 Gibco 公司; 胰蛋白酶购自 Amersco 公司; 细胞内活性氧检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司。

MTT 法检测各组细胞存活率 HK-2 细胞培养于含 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养液中, 常规培养传代。实验时计数细胞, 以细胞 3×10^6 /瓶均匀接种于 50 mL 培养瓶中, 以无血清无糖 DMEM/F12 培养液 + 不同浓度 (1, 2.5, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$) antimycin A 干预 HK-2 细胞, 作用 2, 4, 8, 16, 24 h 后每孔加入 5 mg/mL 的 20 μL MTT 溶液, 充分反应后弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 混匀后用酶联免疫法检测仪 490 nm 波长下测每孔光密度值 (OD 值), 实验重复 3 次, 按照下列公式计算: 存活率 = (实验组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) / (正常组 OD 值 - 空白对照 OD 值) $\times 100\%$ 。

细胞乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测 将适量 HK-2 细胞接种到 96 孔细胞培养孔板中, 使待检测时细胞密度不超过 80% ~ 90%。分别加入 1, 2.5, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ antimycinA 干预细胞 2, 4, 8, 16, 24 h, 并设置适当对照。药物刺激完毕后, 吸出细胞上清液约 150 μL , 严格按乳酸脱氢酶检测试剂盒使用说明操作, 然后在 450nm 处测定吸光度。

透射电镜检测细胞线粒体形态 细胞分组: ①正常对照组; ②抗霉素模型组: HK-2 细胞加入 2.5 $\mu\text{mol/L}$ antimycinA 干预 2 h; ③去铁胺干预组: 80 $\mu\text{mol/L}$ 去铁胺预处理细胞后加入 2.5 $\mu\text{mol/L}$ antimycinA 干预 2 h; ④Fer-1 干预组: 1 $\mu\text{mol/L}$ Fer-1 预处理细胞后加入 2.5 $\mu\text{mol/L}$ antimycinA 干预 2 h。干预结束后消化并收集各组细胞, 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 10 mL PBS 混匀, 1000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 ~ 20 min, 离心后弃上清液。缓慢滴加 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 2.5% 戊二醛 2 mL, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定后送武汉中科院病毒研究所电镜室制备细胞切片, 透射电镜观察线粒体形态并拍照。

Western blot 检测凋亡相关蛋白表达 各组细胞结束干预后, 提取细胞总蛋白, 聚氨基丙烯酸正丁酯 (BCA) 法测定蛋白浓度。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 将蛋白转到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 37 $^{\circ}\text{C}$ 1h, 兔抗人活化 caspase3 抗体 (Anti-active Caspase-3 抗体, ab2302, Abcam) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗膜后用辣根过氧

化物酶 (HRP) 标记羊抗兔 IgG 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 增强化学发光法 (ECL) 显色成像。以 β -actin 为内参, 应用图像分析软件对特异性条带做吸光度 (A) 定量分析蛋白相对表达量。

流式细胞仪检测细胞内活性氧 (ROS) 各组细胞结束干预后弃去旧培养基, 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 清洗, 加入含有荧光探针 2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA) 的无血清培养基, 在培养箱中孵育 20 min, 避免光照, 冷 PBS 清洗 2 次后收集细胞, 加入 PBS 轻轻混匀细胞, 流式细胞仪上检测 (激发波长 488 nm; 发射波长 525 nm) ROS 含量。

统计学处理 采用 SPSS17.0 统计学软件, 计量资料 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

抗霉素 A 诱导 HK-2 细胞损伤模型的建立 抗霉素 A 诱导 HK-2 细胞的损伤呈现时效和量效关系。随着抗霉素作用剂量和时间的增加, 细胞的存活率呈下降趋势, 与正常对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。2.5 $\mu\text{mol/L}$ 抗霉素 A 作用 HK-2 细胞 24h 后细胞存活率下降至 $51.70\% \pm 6.30\%$, 接近 IC₅₀ 值, 见图 1。因此我们选择 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 抗霉素 A 作为造模的最佳浓度。

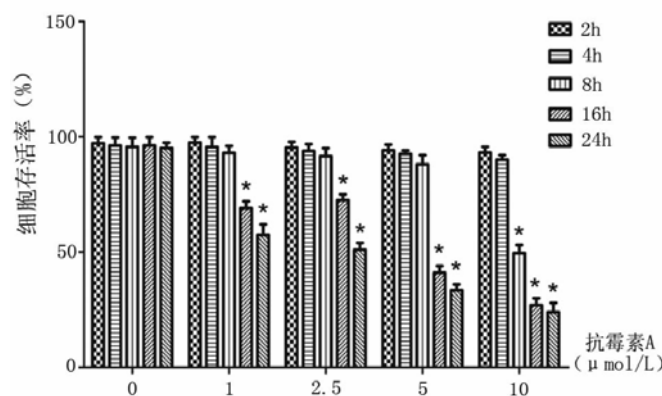


图1 抗霉素 A 诱导 HK-2 细胞损伤

抗霉素 A 损伤 HK-2 细胞释放 LDH 的检测 用不同浓度抗霉素 A (0, 1, 2.5, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$) 干预 HK-2 细胞, 从 2 h 开始细胞出现明显损伤, 细胞上清液 LDH 释放明显增加, 与正常对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。随着干预时间的延长 (4, 8, 16, 24 h), 细胞上清液中 LDH 含量显著升高, 与正常对照组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 2。

电镜检测抗霉素 A 损伤 HK-2 细胞线粒体的变化 用 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 抗霉素 A 干预肾小管上皮细胞

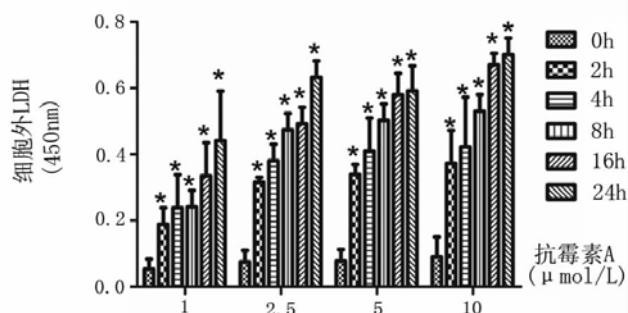


图2 抗霉素A损伤HK-2细胞释放LDH的检测

2 h 后,电镜观察发现铁死亡特征性改变——线粒体变小,线粒体双层膜密度增高,线粒体嵴减少或消失,部分伴有线粒体外膜断裂。给予 80 μmol/L 去铁胺或 1 μmol/L Fer-1 预处理细胞能显著减轻抗霉素诱导的早期线粒体损伤,见图 3。

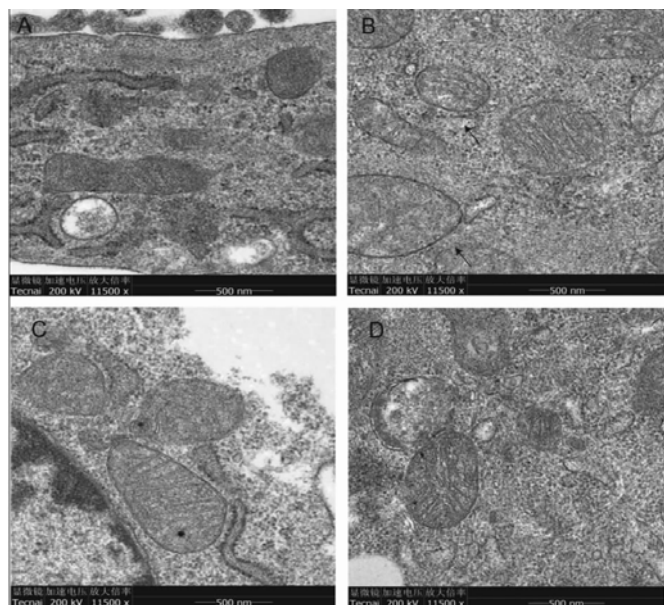


图3 电镜检测细胞线粒体的变化

去铁胺对抗霉素A损伤HK-2细胞的保护作用

LDH 检测提示,去铁胺能明显减少抗霉素A损伤后 HK-2 细胞 LDH 的释放,与抗霉素模型组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。Fer-1 预处理细胞也能减少抗霉素A损伤后 HK-2 细胞 LDH 的释放,与抗霉素模型组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 4。

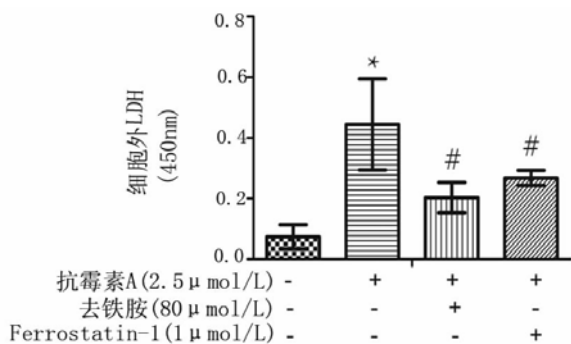


图4 去铁胺对抗霉素A损伤HK-2细胞的保护作用

ROS 活性 与正常对照组相比,抗霉素模型组细胞内 ROS 荧光强度明显增强($P < 0.05$),表明抗霉素可诱导 HK-2 细胞产生大量的 ROS;80 μmol/L 去铁胺预处理细胞可明显降低荧光强度,Fer-1 预处理细胞与去铁胺有类似的抑制 ROS 产生的效应。与抗霉素模型组对比,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 5。

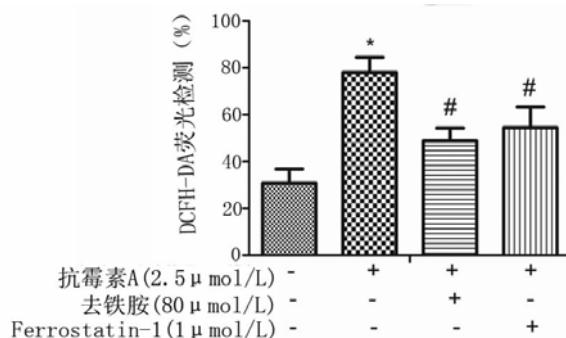


图5 各组细胞内 ROS 检测

caspase3 酶活性 caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,活化的 caspase3 裂解相应蛋白底物诱导细胞凋亡。与正常对照组相比,2.5 μmol/L 抗霉素A干预2 h 后 caspase3 没有明显活化($P > 0.05$),提示 HK-2 细胞此时尚未进入凋亡损伤途径。2.5 μmol/L 抗霉素A干预4 h 后 caspase3 活性升高,提示 HK-2 细胞可能已有部分进入凋亡损伤途径($P < 0.05$),见图 6。

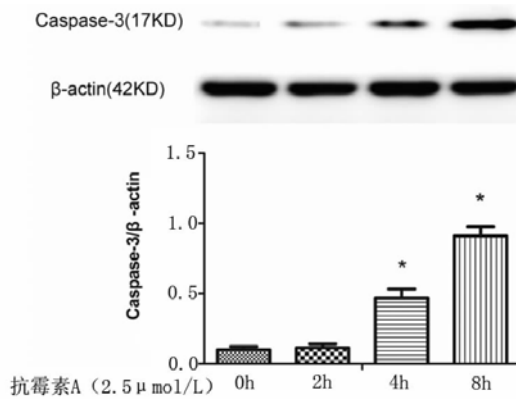


图6 各组细胞 casDase3 活化检测

讨论

肾小管上皮细胞损伤及血管功能障碍是 AKI 的主要病理表现,缺氧引起的肾小管上皮细胞损伤及死亡是 AKI 的重要发病基础。既往研究已经证实肾小管上皮细胞可以坏死、凋亡、自噬等多种死亡方式参与肾损伤^[3~5]。2012 年,Dixon 等^[6]发现了一种依赖铁离子及活性氧(ROS)而产生的新型细胞死亡方式——铁死亡)。在形态学方面,铁死亡主

要表现为特异性的线粒体皱缩、膜密度增加、线粒体嵴减少或消失,在生化方面,目前的研究认为铁死亡主要依赖于铁过载和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPx4)的活性下降,从而产生细胞质和脂质的 ROS 聚积。肾小管上皮细胞富含线粒体及细胞内铁,是活性氧和铁离子功能极其活跃的部位^[7],对缺氧极其敏感,故在缺氧条件下,肾小管上皮细胞极有可能以铁死亡方式参与肾损伤。

目前对于铁死亡的机制研究多集中在肿瘤性疾病及神经系统疾病方面^[8-10],认为细胞膜上的胱氨酸/谷氨酸转运体(System Xc-)抑制引起胞内谷胱甘肽(GSH)水平下降,从而间接降低 GPx4 的活性;或者,一些小分子物质,如(1S, 3R)-RSL、DPI7 等直接抑制 GPx4 的活性。但铁死亡在肾脏方面的研究还很少,有动物实验表明,通过 GPx4 基因敲除可诱发细胞铁死亡,从而引起小鼠的急性肾衰竭及过早死亡,另外,以(1S, 3R)-RSL(GPx4 抑制剂)处理人肾近端小管上皮原代细胞或细胞系(HK-2)亦可诱发细胞铁死亡^[11],证实了肾小管上皮细胞铁死亡的存在,且 GPx4 在其中可能起着至关重要的作用。但以上研究并未涉及到缺氧环境,故在缺氧条件下,肾小管上皮细胞是否会出现铁死亡以及以何种机制诱发铁死亡尚不清楚,为了更好地进行 AKI 的机制研究,寻找新的治疗靶点,我们拟构建肾小管上皮细胞缺氧损伤模型,观察有无铁死亡的发生。

抗霉素 A(antimycin A)是一种线粒体细胞色素 bc1 抑制剂,可以通过阻断细胞的氧化磷酸化过程干扰线粒体 ATP 的生成,造成 ATP 缺失,符合缺血缺氧时的肾小管上皮细胞损伤过程,故广泛用于急性肾损伤肾小管上皮细胞相关研究^[12]。本研究以 2.5 μmol/L 抗霉素 A 干预 HK-2 细胞 2 h,细胞开始出现明显损伤,乳酸脱氢酶释放增加,细胞内 ROS 含量明显增加,电镜下显示铁死亡特征性改变——肾小管上皮细胞线粒体变小、膜密度增高,线粒体嵴减少,部分线粒体嵴甚至消失。抗霉素干预 2 h 时蛋白免疫印迹检测未发现凋亡特异性蛋白 caspase3 活性升高,干预 4h 后才检测到活化的 caspase3,提示在抗霉素诱导 HK-2 细胞的早期损伤以 ferroptosis 为主,不伴有细胞凋亡的发生。80 μmol/L 去铁胺或 1 μmol/L Fer-1 预处理细胞可显著减轻抗霉素诱导的 HK-2 细胞损伤,细胞内 ROS 水平降低,电镜下亦显示去铁胺干预组和 Fer-1 干预组线粒体损伤明

显减轻,以上表现均提示了缺氧条件下肾小管上皮细胞 ferroptosis 的发生,抑制 ferroptosis 可以有效减轻 HK-2 细胞损伤。

缺氧在 AKI 发生发展过程中起着至关重要作用,我们的研究发现抗霉素 A 干预肾小管上皮细胞 4 h 后才开始出现 caspase3 表达和酶活性升高,提示在缺氧的肾小管上皮细胞中,铁死亡可能是较早出现的细胞死亡方式,故进一步寻找其新的发病机制,尽早阻断铁死亡的进展,将对 AKI 的有效治疗提出新的方向。

参考文献

- 1 梁馨苓.急性肾损伤相关细胞学机制的新进展[J].中国血液净化,2017,16(1):1-3.
- 2 Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling[J]. Cell Signal, 2012,24(5):981-990.
- 3 Linkermann A, Brasen JH, Darding M, et al. Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013,110(29):12024-12029.
- 4 Linkermann A, De Zen F, Weinberg J, et al. Programmed necrosis in acute kidney injury[J]. Nephrol Dial Transplant, 2012,27(9):3412-3419.
- 5 Yang CC, Chen KH, Hsu SP, et al. Augmented renal prostacyclin by intrarenal bicistronic cyclo-oxygenase-1/prostacyclin synthase gene transfer attenuates renal ischemia-reperfusion injury[J]. Transplantation, 2013,96(12):1043-1051.
- 6 Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell, 2012,149(5):1060-1072.
- 7 Ye J, Li J, Yu Y, et al. L-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells via ROS-mitochondria pathway[J]. Regul Pept, 2010,161(1-3):58-66.
- 8 Sun X, Ou Z, Xie M, et al. HSPB1 as a novel regulator of ferroptotic cancer cell death[J]. Oncogene, 2015,34(45):5617-5625.
- 9 Torii S, Shintoku R, Kubota C, et al. An essential role for functional lysosomes in ferroptosis of cancer cells[J]. Biochem J, 2016,473(6):769-777.
- 10 Speer RE, Karuppagounder SS, Basso M, et al. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylases as targets for neuroprotection by "antioxidant" metal chelators: From ferroptosis to stroke[J]. Free Radic Biol Med, 2013,62:26-36.
- 11 Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice[J]. Nat Cell Biol, 2014,16(12):1180-1191.
- 12 Atkinson SJ, Hosford MA, Molitoris BA. Mechanism of actin polymerization in cellular ATP depletion[J]. J Biol Chem, 2004,279(7):5194-5199.

(2018-06-20 收稿)