

大黄素对体外培养 NRK 细胞水通道蛋白 2 表达的影响

刘青¹ 李锋¹ 任秦有² 王文¹ 张鹏³

摘要 目的 探讨大黄素对体外培养 NRK 细胞水通道蛋白 2 (AQP2) 表达的调节效应及机制。方法 体外培养 NRK 细胞, 分为两步实验: 第一步随机分为对照组和 5、10、20 mg/L 大黄素处理组, 采用间接免疫荧光法定性 NRK 细胞 AQP2 表达, Western blot、半定量 RT-PCR 检测药物处理 24 h 后 AQP2 蛋白及 mRNA 的表达; 第二步随机分为对照组, 20 mg/L 大黄素组, 10 mg/L 8-Bromo-cAMP 组, 20 mg/L 大黄素加 10 mg/L 8-Bromo-cAMP 组, 采用非放射性法检测药物处理 24 h 后 NRK 细胞蛋白激酶 A (PKA) 活性水平。结果 AQP2 表达于 NRK 细胞的细胞膜, 进一步的 Western blot 及半定量 RT-PCR 结果显示, 10、20 mg/L 大黄素培养液均可抑制 NRK 细胞的 AQP2 蛋白及 mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。PKA 活性结果显示, 20 mg/L 大黄素能降低 NRK 细胞的 PKA 磷酸化水平 ($P < 0.05$)。结论 大黄素可抑制 NRK 细胞 AQP2 基因转录与翻译, 提示大黄的利尿作用可能与其调节 AQP2 表达有关, 而且有可能是通过 PKA 通路调节 AQP2 的表达。

关键词 大黄素; NRK 细胞系; 水通道蛋白 2; 蛋白激酶 A

Effect and Mechanism of Emodin for Regulating Aquaporin-2 Expression in Cultured NRK Cells LIU Qing, LI Feng, REN Qin-you, et al PLA Centre of Traditional Chinese Medicine, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an (710032)

ABSTRACT **Objective** To investigate the effect and mechanism of emodin for regulating aquaporin-2 (AQP2) in NRK cells cultured *in vitro*. **Methods** Experiments on NRK cells cultured with α -DMEM medium *in vitro* were conducted in two steps. (1) Cells were randomly divided into 4 groups: the control group, and the three emodin treated groups treated with different dosages of emodin (5, 10 and 20 mg/L) respectively. After 24 h treatment, the location of AQP2 was decided by indirect immunofluorescence, and the AQP2 protein and mRNA expression levels were detected by Western blot and semiquantitative RT-PCR. (2) Cells were randomly divided into 4 groups, the control group, and the three treated groups treated respectively with 10 mg/L 8-Bromo-cAMP, 20 mg/L emodin, and 20 mg/L emodin + 10 mg/L 8-Bromo-cAMP. The activity of protein kinase A (PKA) in NRK cells after 24 h treatment was determined with non-radioactive detecting method. **Results** AQP2 was located at the cell membrane of NRK cells. Western blot and semiquantitative RT-PCR found that AQP2 protein and mRNA expressions were significantly decreased in NRK cells of groups treated by 10 mg/L and 20 mg/L emodin ($P < 0.05$). PKA activity determination showed significantly decreased phosphorylation level of PKA in NRK cells of groups treated with 20 mg/L emodin group ($P < 0.05$). **Conclusion** Emodin can inhibit the genetic transcription and the translation of AQP2 gene in NRK cells, which demonstrates that the change of AQP2 expression regulated by emodin may be correlated with the diuresis effect of rhubarb, and it is likely that the regulation is going through PKA signal pathway.

KEYWORDS emodin; NRK cells; aquaporin-2; protein kinase A

水通道蛋白 (AQPs) 是细胞膜上的一种与水的通透性有关的转运膜蛋白, 影响水的跨膜转运。肾脏在

水重吸收和尿液的排泄中起重要作用, 肾脏 AQPs 的研究发现, AQPs 表达水平直接关系到水重吸收和尿液的排泄量, 而且与很多肾脏疾病密切相关^[1]。其中 AQP2 主要表达于集合管上皮细胞管腔膜, 且存在 AVP-cAMP-PKA 信号通路^[2-4]。前期研究证实大黄的泻下作用与水通道蛋白关系密切, 动物实验证明大鼠灌服大黄后尿量增加, 且肾脏 AQP2、AQP4 的表达降低^[5-8]。本研究拟观察大黄素对体外培养 NRK 细胞

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30572385)

作者单位: 1. 第四军医大学西京医院中医科暨全军中医内科中心 (西安 710032); 2. 第四军医大学唐都医院中医科; 3. 第四军医大学西京医院肾脏内科

通讯作者: 李 锋, Tel: 029 - 84775347, E-mail: lifeng@fmmu.edu.cn

AQP2 表达的影响,以期从细胞分子水平探讨大黄利尿的药理学机制。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞株 NRK 细胞株(中国科学院上海细胞库)。

1.2 药物 大黄素标准品(批号:110756, 20 mg/支,中国药品生物制品检定所)。

1.3 试剂及仪器 AQP2 兔抗多克隆抗体(sc-28629)、actin 兔抗多克隆抗体(se-1616,美国 SANTA CRUZ 公司);Trizol® Reagent (15596-026,美国 IN-VITROGEN 公司);RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (K1612)、PepTag® Assay for Non-Radioactive Detection of Protein Kinase C or cAMP-Dependent Protein Kinase 试剂盒(V5340)(美国 Fermentas 公司);GoTaq® Green Master Mix 两步法 RT-PCR 试剂盒(M7122,美国 PROMEGA 公司);8-Bromo-cAMP (203800,德国 Merck 公司);辣根酶标记山羊抗兔 IgG (ZB-2301)、FITC 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(ZF-0311)(北京中山金桥生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 NRK 细胞的培养 NRK 细胞系来源于正常大鼠肾细胞,培养呈上皮样生长,于 10% 小牛血清的高糖 DMEM 培养液中,于 37 ℃、饱和湿度、5% CO₂ 条件下培养,每 24 h 更换培养液。细胞长满瓶底约 80%,用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化 3~5 min,按 1:4 分瓶传代。

2.2 细胞爬片的制备 取 8 mm×8 mm 的盖玻片,依次浓硫酸、无水酒精浸泡,高温高压消毒备用。将消化好的细胞用含 10% 小牛血清的高糖 DMEM 培养液稀释,吹打成浓度为 5×10^4 /mL 细胞悬液,用吸管吸取细胞悬液,滴加到预置于培养皿中的盖玻片上,待 4~6 h 后,镜下观察细胞已贴壁,加入含 10% 小牛血清的高糖 DMEM 培养液。

2.3 药物处理

2.3.1 大黄素药物处理 NRK 细胞 体外培养 NRK 至对数生长期,分组为对照组,大黄素处理组,大黄素处理组按高、中、低浓度分为 20、10、5 mg/L 组;对照组不给予药物处理,培养 24 h 后,消化收集细胞进行 Western blot 检测及 RT-PCR 检测。

2.3.2 大黄素及蛋白激酶 A(PKA)激动剂 8-Bromo-cAMP 处理 NRK 细胞 体外培养 NRK 细胞至对数生长期,分组为对照组,PKA 激动剂 10 mg/L 8-

Bromo-cAMP 组,20 mg/L 大黄素组,20 mg/L 大黄素加 10 mg/L 8-Bromo-cAMP 组,对照组不给予药物和 PKA 激动剂处理。培养 24 h 后,消化收集细胞进行 PKA 活性检测。

2.4 AQP2 的间接免疫荧光检测 取已固定的细胞爬片,用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4)漂洗细胞 5 min×3 次;滴加 2 g/L TritonX-100,37 ℃ 保湿孵育 10 min, PBS 漂洗 10 min×3 次;滴加 30 mL/L H₂O₂, 37 ℃ 保湿孵育 10 min, PBS 漂洗 5 min×3 次;滴加 5% 山羊血清的 PBS 溶液,37 ℃ 保湿孵育 30 min;用 1% 山羊血清的 PBS,按 1:500 稀释的兔抗 AQP2 抗体,4 ℃ 过夜,次日复温 1 h, PBS 冲洗 5 min×3 次;加入 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 抗体,37 ℃ 保湿孵育 30 min, PBS 冲洗 5 min×3 次;甘油缓冲液封片,荧光显微镜下观察照相。阳性部位显示绿色荧光,阴性对照用 PBS 代替 AQP2 抗体。

2.5 AQP2 蛋白的 Western blot 检测 用全蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白,充分震荡裂解;冰上放置 1 h;4 ℃ 离心(12 000 g, 20 min);收集上清液。利用 BCA 法进行总蛋白定量。采用 SDS-PAGE 凝胶不连续缓冲系统进行电泳。取蛋白样品各 30 μg,经上样缓冲液处理后上样,其中分离胶 12%,电压 140 V;浓缩胶 5%,电压 100 V。硝酸纤维素膜 100 V 电转膜 120 min。转膜后丽春红染色 2~3 min,观察转膜效果。将转好的膜放入含有 0.5% Tween-20 的 PBST 中,洗膜 5 min;然后封入含有 50 g/L 脱脂奶的塑料袋中,室温缓慢摇动 60 min;用 50 g/L 脱脂奶的 PBST 溶液稀释一抗,其中 AQP2 1:500, actin 1:2 000;将膜封入塑料袋中,加入一抗稀释液,4 ℃ 过夜;PBST 洗膜 5 min×3 次;加入 PBST 稀释好的辣根酶标记山羊抗兔 IgG(1:2 000),37 ℃ 缓慢摇动 60 min;化学发光法成像。利用 Image-Pro Plus 软件进行电泳条带的平均灰度值测定,以 AQP2/actin 的吸光度比值作为该蛋白表达的相对水平。

2.6 AQP2 mRNA 的 RT-PCR 检测 用 Trizol 法提取细胞总 RNA,测定 RNA 浓度及 OD_{260/280} 比值,以 OD_{260/280} 值在 1.8~2.0 为合格;-80 ℃ 低温保存。AQP2 基因序列由美国 ncbi 网站查询获得,其引物通过美国 Primer 5.0 软件完成设计,由上海生工合成。其中 AQP2 上游引物:5'-TCCACAACAACGCCACAGC-3';下游引物:5'-GCACTTCACGTTCTCCCA-3',退火温度 60 ℃,扩增长度 393 bp;内参引物采用 β-actin,其中上游引物:5'-TGGATTCTGTGTCTATCCATGAAAC-3';下游引物:5'-TAAACGCAGCTCAGTAA-

CAGTCCG-3′, 退火温度 60 ℃, 扩增长度 346 bp。反转录及 PCR 扩增均按说明书进行, 退火温度 60 ℃, 共 40 个循环。取 9 μL 产物, 加 loading buffer 1 μL, 在加入溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳条件为 90 V 恒压, 约 40 min。电泳结束后, 自动电泳凝胶成像分析仪扫描成像。利用 Image-Pro Plus 软件进行电泳条带的平均灰度值测定, 取目的条带与其对应的内参 β-actin 条带的平均灰度比值作为基因表达的相对水平。

2.7 NRK 细胞的 PKA 活性检测 采用非放射性 PKA 活性检测试剂盒检测药物处理过的 NRK 细胞 PKA 活性水平。收集细胞, 加入 1 mL 预冷的 PKA 提取缓冲液, 4 ℃ 离心 (14 000 g, 5 min), 保存上清液。按照试剂盒说明进行, 琼脂糖凝胶电泳 (100 V, 15 min), 拍照。用剃刀片把带负电荷的磷酸化条带从胶上切下来, 大约 250 μL, 95 ℃ 溶化, 取 125 μL, 加 75 μL 溶胶液, 50 μL 冰乙酸, 快速涡旋振荡后转移至 96 孔板, 在 570 nm 波长读取光度值, 用不含 A₁ 短肽的液态琼脂糖做空白清零。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析和 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 AQP2 在 NRK 上的分布 (图 1) 免疫荧光染色结果显示 NRK 细胞存在 AQP2, 呈强绿色荧光, 主要分布在细胞膜。

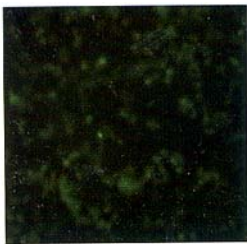
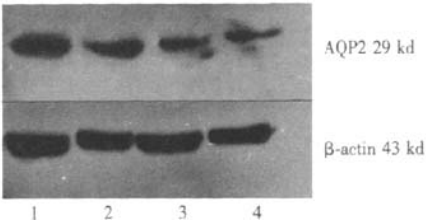


图 1 FITC 标记 NRK 细胞的 AQP2 表达 (×100)

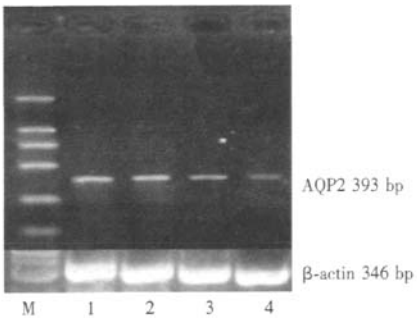
2 NRK 细胞 AQP2 蛋白的表达 (图 2) 与对照组 (0.73 ± 0.10) 比较, 5 mg/L 大黄素组 (0.69 ± 0.09) 的 AQP2 表达差异无统计学意义 (*P* > 0.05); 10、20 mg/L 大黄素组 (分别为 0.52 ± 0.09、0.45 ± 0.08) NRK 的 AQP2 表达降低, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。

3 NRK 细胞 AQP2mRNA 的表达 (图 3) 与对照组 (0.68 ± 0.08) 比较, 5 mg/L 大黄素组 (0.65 ± 0.05) NRK 的 AQP2mRNA 表达差异无统计学意义



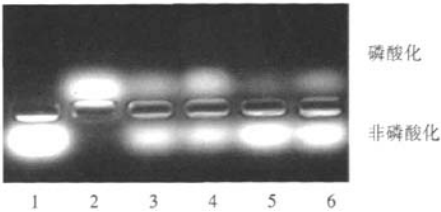
注: 1: 对照组; 2: 5 mg/L 大黄素组; 3: 10 mg/L 大黄素组; 4: 20 mg/L 大黄素组

图 2 不同浓度大黄素含药培养液处理的 NRK 细胞 AQP2 蛋白的 Western blot 结果 (*P* > 0.05); 10、20 mg/L 大黄素组 (分别为 0.49 ± 0.07、0.46 ± 0.10) NRK 的 AQP2 mRNA 表达降低, 差异有统计学意义 (*P* < 0.01)。



注: M: marker; 1: 对照组; 2: 5 mg/L 大黄素组; 3: 10 mg/L 大黄素组; 4: 20 mg/L 大黄素组

图 3 不同浓度大黄素含药培养液处理的 NRK 细胞 AQP2 mRNA RT-PCR 结果 4 大黄素及 8-Bromo-cAMP 对 NRK 细胞的 PKA 活性的调节 (图 4) 对照组、10 mg/L 8-Bromo-cAMP 组、20 mg/L 大黄素组、20 mg/L 大黄素加 10 mg/L 8-Bromo-cAMP 组 NRK 细胞的 PKA 活性分别为 0.88 ± 0.11、1.63 ± 0.05、0.62 ± 0.09、1.20 ± 0.24。各組间比较, 差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。



注: 1: 阴性对照组; 2: 阳性对照组; 3: 对照组; 4: 10 mg/L 8-Bromo-cAMP 组; 5: 20 mg/L 大黄素组; 6: 20 mg/L 大黄素加 10 mg/L 8-Bromo-cAMP 组

图 4 药物处理后 NRK 细胞的 PKA 活性结果

讨 论

大黄味苦、性寒, 归胃、脾、大肠、肝、心包经; 具泻

下攻积、清热泻火、止血解毒、活血祛瘀等多种功效。《本草求真》载：“大黄，……腹痛里急，黄疸水肿，积聚留饮宿食，心腹痞满，二便不通”，《医学衷中参西录》曰：“降肠胃实热以通燥结，其香窜透窍之力，又兼利小便”，可见大黄利尿作用早有记载，但其利尿效应及机制研究较少。我们前期体内实验证实大黄能使大鼠的尿量明显增多，且大鼠肾脏 AQP2、AQP4 的表达下降^[8]。

成年人每天产生原尿约 180 L，而终尿约为 1.5 L，即原尿中 99% 的水分在通过肾小管时被重吸收至血液，这就要求肾小管细胞膜对水有极大的通透性。现代研究证实：这种通透性是由 AQPs 所介导的^[9]。在肾脏表达的至少有 AQP1、2、3、4、6、7、8、11。AQP2 在肾脏主要表达于集合管主细胞的管腔膜及主细胞囊泡内^[2]，AQP2 突变可引起肾性尿崩症^[10,11]。AQP2 受血管加压素 (AVP) 调节^[3]，AVP 与 V2 受体结合后激活 AC-cAMP-PKA 信号传导途径。PKA 是第 2 信使 cAMP 依赖的蛋白激酶，参与调节细胞的分化、增殖、新陈代谢和基因转录^[4]。

本实验应用免疫荧光定性 AQP2，证实 NRK 细胞存在 AQP2 的表达，且表达于细胞膜上。与正常对照组比较，10、20 mg/L 大黄素组刺激 NRK 的 AQP2 蛋白和 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$)。可见，大黄素能下调 NRK 的 AQP2 蛋白及 mRNA 表达，结合体内实验^[8]，证明大黄的利尿作用与 AQP 有关。肾脏 AQP2 存在的调节作用可能是影响肾小管内外水分子转动的重要机制，其表达减少，可使肾小管水的重吸收减少而尿量增加，产生利尿效应。此外本研究观察药物处理后的 PKA 活性，结果提示大黄素能降低 NRK 细胞的 PKA 活性 ($P < 0.05$)，推测大黄素可能通过抑制 PKA 信号传导通路而下调 AQP2 的表达。

参 考 文 献

- [1] Schrier RW, Cadnapaphornchai MA. Renal aquaporin water channels: from molecules to human disease[J]. *Biophys Mol Biol*, 2003, 81(2): 117-131.
- [2] Fushimi K, Uchida S, Hara Y, et al. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule[J]. *Nature*, 1993, 61(12): 549-552.
- [3] Nielsen S, Chou CL, Marples D, et al. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane[J]. *Natl Acad Sci*, 1995, 92(4): 1013-1017.
- [4] Terris J, Ecelbarger CA, Nielsen S, et al. Long-term regulation of four renal aquaporins in rats[J]. *Am J Physiol*, 1996, 271(15): F414-F422.
- [5] 李锋, 王胜春, 王新, 等. 大黄泻下效应的药理学新解释[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(4): 481-484.
Li F, Wang SC, Wang X, et al. Novel exploration of cathartic pharmacology induced by rhubarb[J]. *China J Chin Mater Med*, 2008, 33(4): 481-484.
- [6] 鲍军强, 李锋, 张文生, 等. 大黄总蒽醌对大鼠远端结肠 AQP2 表达的调节效应[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(14): 1732-1735.
Bao JQ, Li F, Zhang WS, et al. Effect of total anthraquinone in rheum on aquaporin 2 expression in rat distal colon[J]. *China J Chin Mater Med*, 2008, 33(14): 1732-1735.
- [7] 张文生, 李锋, 鲍军强, 等. 大黄酸对 LoVo 细胞水通道蛋白 4 表达的调节效应[J]. *中草药*, 2008, 31(5): 702-706.
Zhang WS, Li F, Bao JQ, et al. Regulatory effects of aquaporin 4 expression by rhein in rhubarb to intestinal epithelial cell line LoVo[J]. *J Chin Med Mater*, 2008, 31(5): 702-706.
- [8] 鲍军强, 李锋, 张文生, 等. 大黄总蒽醌对大鼠肾脏 AQP2、AQP4 表达的影响[J]. *中华肾脏病杂志*, 2008, 24(8): 581-585.
Bao JQ, Li F, Zhang WS, et al. Effects of total anthraquinone in rheum on aquaporin 2, 4 expression in rat kidney[J]. *Chin J Nephrol*, 2008, 24(8): 581-585.
- [9] Marples D. Aquaporins: roles in renal function and peritoneal dialysis[J]. *Perit Dial Int*, 2001, 21(2): 212-218.
- [10] Boccalandro C, De Mattia F, Guo DC, et al. Characterization of an aquaporin-2 water channel gene mutation causing partial nephrogenic diabetes insipidus in a Mexican family: evidence of increased frequency of the mutation in the town of origin[J]. *Am Soc Nephrol*, 2004, 15(5): 1223-1231.
- [11] Gooch JL, Guler RL, Bames JL, et al. Loss of calcineurin Aalpha results in altered trafficking of AQP2 and in nephrogenic diabetes insipidus[J]. *Cell Sci*, 2006, 119(12): 2468-2476.

(收稿: 2009-04-17 修回: 2010-05-20)