

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20220929

· 论 著 ·

坏死性凋亡对肾小管上皮细胞晶体黏附的影响及聚乙二醇的干预作用

万 洋, 彭泳涵, 高小峰*

海军军医大学(第二军医大学)第一附属医院泌尿外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 考察坏死性凋亡抑制剂及分子量为 4 000 的聚乙二醇(PEG-4000)对小鼠肾小管上皮细胞 TCMK-1 表面一水草酸钙(COM)晶体黏附沉积的影响。**方法** 分别用 400、800 $\mu\text{g/mL}$ COM 作用于 TCMK-1 细胞, 或先用受体相互作用的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(RIPK)3 抑制剂 GSK-872 预处理后再加入 400、800 $\mu\text{g/mL}$ COM 处理 TCMK-1 细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h 后在倒置相差显微镜下观察细胞表面晶体黏附情况, 用 CCK-8 法检测细胞增殖活性, 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)探针法检测细胞氧化应激水平, 蛋白质印迹法检测坏死性凋亡相关蛋白 RIPK1、RIPK3、磷酸化混合谱系激酶结构域样蛋白(p-MLKL)的表达, 电感耦合等离子体发射光谱法(ICP)检测细胞表面晶体黏附量。将 TCMK-1 细胞分为 3 组, 分别用 800 $\mu\text{g/mL}$ COM、先用 PEG-4000 溶液再加入 800 $\mu\text{g/mL}$ COM、先用 800 $\mu\text{g/mL}$ COM 再加入 PEG-4000 溶液处理细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 12 h 后在倒置相差显微镜下观察细胞表面晶体黏附情况, CCK-8 法检测细胞增殖活性、DCFH-DA 探针法检测细胞氧化应激水平, ICP 检测细胞表面晶体黏附量。**结果** 400 $\mu\text{g/mL}$ COM 作用时, 与 COM 处理组相比, GSK-872 预处理组中 TCMK-1 细胞晶体黏附量减少、细胞增殖活性增强($P<0.05$)、氧化应激水平降低($P<0.05$); 800 $\mu\text{g/mL}$ COM 作用时, 与 COM 处理组相比, GSK-872 预处理组中 TCMK-1 细胞晶体黏附量无明显变化、细胞增殖活性增强($P<0.05$)、氧化应激水平降低($P<0.05$)、RIPK3 和 p-MLKL 表达减少($P<0.05$)。与 COM 处理组相比, PEG-4000 预处理组 TCMK-1 细胞晶体黏附量明显减少、细胞增殖活性增强、氧化应激水平降低(P 均 <0.05), 而后加入 PEG-4000 组与 COM 处理组相比晶体黏附量、细胞增殖活性、氧化应激水平均无明显变化(P 均 >0.05)。**结论** 用 GSK-872 抑制坏死性凋亡可以一定程度减少 COM 在细胞表面黏附沉积, 但在较高的晶体负荷下晶体可在细胞表面聚集形成不定型沉淀。在培养基中使用 PEG-4000 预处理能够使 COM 微晶粒在悬液中保持悬浮稳定, 减少晶体聚集沉积及细胞黏附和细胞氧化应激损伤; 但充分接触 COM 晶体后的 TCMK-1 细胞再加入 PEG-4000 不能逆转晶体细胞黏附聚集沉淀。

[关键词] 肾小管上皮细胞; 草酸钙结石; 坏死性凋亡; GSK-872; 聚乙二醇**[中图分类号]** R 692.4**[文献标志码]** A**[文章编号]** 2097-1338(2023)04-0394-08

Effect of necroptosis on crystal adhesion of renal tubular epithelial cells and the intervention of polyethylene glycol

WAN Yang, PENG Yong-han, GAO Xiao-feng*

Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To explore the effect of necroptosis inhibitor and polyethylene glycol with a molecular weight of 4 000 (PEG-4000) on the adhesion and deposition of calcium oxalate monohydrate (COM) on the surface of transformed C3H mouse kidney 1 (TCMK-1) cells. **Methods** TCMK-1 cells were separately treated with 400 or 800 $\mu\text{g/mL}$ COM or pretreated with receptor-interacting serine/threonine-protein kinase (RIPK) 3 inhibitor GSK-872 before 400 or 800 $\mu\text{g/mL}$ COM treatment. After incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 12 h, the crystal adhesion of TCMK-1 cells was observed under the phase inverted microscope. The cell proliferation activity was detected by cell counting kit 8 (CCK-8) method, the cell oxidative stress level was detected by 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe method, the expression of necroptosis-related proteins RIPK1, RIPK3, and phospho-mixed lineage kinase domain-like protein (p-MLKL) was detected by Western blotting, and the crystal adhesion of TCMK-1 cells was detected by inductively coupled plasma emission spectroscopy (ICP). TCMK-1 cells were divided into 3 groups and separately treated with 800 $\mu\text{g/mL}$ COM, PEG-4000 solution followed by 800 $\mu\text{g/mL}$ COM, or 800 $\mu\text{g/mL}$ COM followed by PEG-4000 solution. After incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 12 h, the crystal adhesion of TCMK-1 cells was observed under the phase inverted microscope. The cell proliferation activity was detected by CCK-8 method, the oxidative stress level was detected by DCFH-DA probe method, and the surface crystal

[收稿日期] 2022-12-13 **[接受日期]** 2023-03-07**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(8197032203)。Supported by General Program of National Natural Science Foundation of China (8197032203)。**[作者简介]** 万 洋, 硕士生。E-mail: 526403507@qq.com

*通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-31161721, E-mail: gxfdoc@sina.com

adhesion was detected by ICP method. **Results** At 400 $\mu\text{g/mL}$ of COM, compared with the COM treated group, the GSK-872 pretreatment group showed a decrease in TCMK-1 cell crystal adhesion, an increase in cell proliferation activity ($P<0.05$), and a decrease in oxidative stress level ($P<0.05$). At 800 $\mu\text{g/mL}$ of COM, the crystal adhesion of TCMK-1 cells in the GSK-872 pretreated group had no significant changes compared with the COM treated group, while the cell proliferation activity was increased ($P<0.05$), the oxidative stress level was decreased ($P<0.05$), and the expression of RIPK3 and p-MLKL was decreased (both $P<0.05$). Compared with the COM treated group, the crystal adhesion of TCMK-1 cells in the PEG-4000 pretreated group was significantly decreased, with enhanced cell proliferation activity and decreased oxidative stress level (all $P<0.05$). There were no significant changes in crystal adhesion, cell proliferation activity or oxidative stress levels between the PEG-4000 post-added group and the COM treated group (all $P>0.05$). **Conclusion** Inhibition of necroptosis by GSK-872 can reduce the adhesion deposition of COM in cells to a certain extent, but the crystals can aggregate on the cell surface to form amorphous precipitates under high crystal load. The pre-application with PEG-4000 in the culture medium can maintain the suspension stability of COM micrograins in suspension, with less accumulation, adhesion, deposition of crystals and less oxidative stress damage of cells. Addition of PEG-4000 to TCMK-1 cells exposed to COM could not reverse the crystal adhesion, aggregation or deposition.

[**Key words**] renal tubular epithelial cells; calcium oxalate stones; necroptosis; GSK-872; polyethylene glycol

[Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(4): 394-401]

肾结石是一种易复发性疾病,发病的结石成分主要是钙结石,以草酸钙最为常见^[1]。研究表明,草酸钙结石的重要触发事件在于磷酸钙晶体在肾髓质间质组织中形成,蚀穿肾乳头上皮形成典型的Randall斑,草酸钙晶体可能沉积于该病灶顶部,附着于肾乳头形成结石^[2]。肾结石的外科治疗通常只处理位于集合系统内的结石^[3],理论上肾髓质内的钙斑可能继续生长并促进残留结石或晶体在肾乳头上皮处黏附和聚集^[4-6]。目前尚不明确影响晶体在肾小管上皮细胞黏附聚集的靶点及药物。

研究表明,肾小管细胞损伤是促进草酸钙晶体在细胞表面黏附沉积的重要因素^[7],损伤引起的细胞膜结构及蛋白表达变化会促进草酸钙晶体在肾小管上皮细胞上的黏附沉积^[8]。晶体沉积诱导的细胞毒性涉及受体相互作用的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(receptor-interacting serine/threonine-protein kinase, RIPK) 3-混合谱系激酶结构域样蛋白(mixed lineage kinase domain-like, MLKL)介导的坏死性凋亡^[9]。坏死性凋亡是程序性死亡模式的一种,其信号通路可通过RIPK3等进行调节,有望通过调节肾组织细胞坏死性凋亡、减轻细胞损伤来干预肾脏的草酸钙晶体沉积^[10]。然而Mulay等^[11]通过构建坏死性凋亡相关的肿瘤坏死因子受体(tumour necrosis factor receptor, Tnfr) 1基因敲除和Tnfr1/Tnfr2基因双敲除小鼠的肾脏晶体沉积模型,发现其肾损伤指标低于对照组,但其肾脏晶体沉积并无差异。

尿液中草酸钙微晶体的聚集是导致晶体快速增大和结石形成的关键因素^[12-13]。从化学角度

考虑,首先是尿液中的尿石盐成核,然后这些<10 nm的晶核生长或聚集到病理性尺寸范围(约几十微米),这些微米级的晶体与受损伤的肾上皮细胞黏附后进一步长大并最终形成结石(几毫米到几十毫米)。调控草酸钙微晶的物理和化学性质,减少其在尿液中的聚集可能是预防肾结石形成的方法之一^[14-15]。聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)是一种无毒的高分子聚合物,具有良好的水溶性、润滑性、保湿性、分散性、粘接性等^[16],其具备的分散剂的特性可以使固体颗粒保持悬浮稳定、不沉淀,使整个悬浮液体系的物理和化学性质一致^[17],因此以PEG为代表的聚合物对草酸钙晶体生长聚集和结石形成的干预作用值得研究。

本研究拟通过观察RIPK3抑制剂GSK-872以及分子量为4 000的PEG(PEG-4000)对小鼠肾小管上皮细胞TCMK-1表面一水草酸钙(calcium oxalate monohydrate, COM)晶体沉积的影响,并检测其细胞增殖活性、细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平、坏死性凋亡相关分子表达及细胞表面晶体黏附量的变化,初步探究影响COM晶体在TCMK-1黏附聚集的靶点及药物,为复发性肾结石的预防和治疗提供新思路。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂 小鼠肾小管上皮细胞系TCMK-1购自美国菌种保藏中心;FBS购自美国Hyclone公司;COM晶体购自上海阿达玛斯试剂有限公司;DMEM高糖培养基购自上海泰坦科技股

份有限公司; GSK-872 购自美国葛兰素史克公司; 兔源磷酸化混合系列激酶结构域样蛋白 (phospho-mixed lineage kinase domain-like, p-MLKL) 单克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; CCK-8 试剂盒、ROS 检测试剂盒、增强型二辛可酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒、兔源 RIPK1 多克隆抗体、兔源 RIPK3 多克隆抗体、兔源 GAPDH 单克隆抗体均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 细胞培养 TCMK-1 细胞用含 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素的高糖 DMEM 完全培养基于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养。每 2~3 d 换液 1 次, 培养至细胞融合度为 80% 时用含 0.25% EDTA 的胰酶消化、传代。

1.3 镜下观测 实验一: 将细胞接种于 6 cm 培养皿, 常规培养 24 h 后吸弃原培养基并用 PBS 洗涤, 设置 A1、A2、A3、A4、B1、B2、B3、B4、C1、C2、C3、C4 组, A1~A4 组加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基, B1~B4 组加入含 20 μmol/L GSK-872 和 10% FBS 的 DMEM 培养基, C1~C4 组加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 放入培养箱孵育 30 min, 吸弃培养基并用 PBS 洗涤; A1~A4 组、B1~B4 组分别加入 4 mL 含质量浓度 200、400、600、800 μg/mL COM 的 DMEM 培养基, C1~C4 组加入等体积 DMEM 培养基, 在摇床上 80 r/min 振荡 15 min。放入培养箱 37 °C 孵育 12 h 后弃去晶体, 用不含钙、镁的 PBS 洗涤细胞 3 次, 再加入 PBS 铺底, 在倒置相差显微镜下观察 TCMK-1 细胞表面的晶体黏附情况。

实验二: 将细胞接种于 6 cm 培养皿, 常规培养 24 h 后吸弃原培养基并用 PBS 洗涤备用。配制 500 g/L 的 PEG-4000 水溶液备用。设置 a、b、c 组, a 组培养皿中加入 4 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 加入 COM 至 800 μg/mL, 摇床上 80 r/min 振荡 15 min。b 组培养皿中加入 4 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 加入 400 μL PEG-4000 溶液充分振荡混匀, 再加入 COM 至 800 μg/mL, 摇床上 80 r/min 振荡 15 min。c 组培养皿中加入 4 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 加入 COM 至 800 μg/mL, 摇床上 80 r/min 振荡 15 min, 再向培养基中加入 400 μL PEG-4000 溶液, 充分混匀。培养箱孵育 12 h 后弃去晶体, 用不含钙、镁的 PBS 洗涤细胞 3 次, 再加入 PBS 铺底, 在倒置相差显微镜下观察 TCMK-1 细胞表面的晶体黏附情况。

1.4 CCK-8 法测定细胞增殖活性 实验一: 按照每孔 100 μL 培养基、2×10³ 个细胞进行 96 孔细胞培养板铺板, 设置 A、B、C 组, 每组重复 7 孔, 放入细胞培养箱培养 8 h。吸弃培养基并用 PBS 洗涤。A 组每孔加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基, B 组每孔加入含 20 μmol/L GSK-872 和 10% FBS 的 DMEM 培养基, C 组每孔加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基。放入培养箱孵育 30 min 后, 吸弃各孔培养基并用 PBS 洗涤。A、B 组每孔加入 100 μL 含 400 μg/mL COM 的 DMEM 培养基, C 组每孔加入等体积的 DMEM 培养基。将培养板振荡混匀后放入培养箱孵育 12 h。吸弃各孔培养基, 于每孔加入 10 μL CCK-8 检测工作液, 孵育 2 h 后用酶标仪测定 450 nm 波长处光密度 (D_{450}) 值。将上述 CCK-8 方法中 COM 浓度换为 800 μg/mL 且其余步骤不变再次进行实验。

实验二: 按照每孔 100 μL 培养基、2×10³ 个细胞进行 96 孔细胞培养板铺板, 设置 a、b、c 组, 每组重复 7 孔, 放入细胞培养箱培养 8 h。吸弃培养基并用 PBS 洗涤。a 组每孔加入 100 μL 含 10% FBS 和 800 μg/mL COM 的 DMEM 培养基, 振荡混匀。b 组每孔加入 100 μL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 并加入 10 μL PEG-4000 溶液振荡混匀, 再加入 COM 至 800 μg/mL, 振荡混匀。c 组每孔加入 100 μL 含 10% FBS 和 800 μg/mL COM 的 DMEM 培养基, 振荡混匀, 再向培养基中加入 10 μL PEG-4000 溶液振荡混匀。各组放入培养箱孵育 12 h。吸弃各孔培养基, 于每孔加入 10 μL CCK-8 检测工作液, 孵育 2 h 后用酶标仪测定 D_{450} 值。

1.5 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 探针法检测细胞 ROS 实验一: 按照每孔 100 μL 培养基、2×10³ 个细胞进行 96 孔黑底细胞培养板铺板, 设置 A、B、C 组, 每组重复 7 孔, 放入细胞培养箱培养 8 h。吸弃培养基并用 PBS 洗涤。A 组每孔加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基, B 组每孔加入含 20 μmol/L GSK-872 和 10% FBS 的 DMEM 培养基, C 组每孔加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基。放入培养箱孵育 30 min 后, 吸弃培养基并用 PBS 洗涤。A、B 组每孔加入 100 μL 含 400 μg/mL COM 的 DMEM 培养基, C 组每孔加入等体积的 DMEM 培养基, 将培养板振荡混匀后放入培养箱孵育 12 h。吸弃各孔培养基, 于每孔加入 50 μL 含 10 mmol/L DCFH-DA 的无血清培养基, 放入细胞培养箱内孵育

20 min, 取出后用无血清细胞培养基洗涤细胞 3 次, 以 488 nm 为激发波长、525 nm 为发射波长用荧光酶标仪检测。将上述 DCFH-DA 探针法中 COM 浓度换为 800 $\mu\text{g/mL}$ 且其余步骤不变再次进行实验。

实验二: 按照每孔 100 μL 培养基、 2×10^3 个细胞进行 96 孔黑底细胞培养板铺板, 设置 a、b、c 组, 每组重复 7 孔, 放入细胞培养箱培养 8 h。吸弃培养基并用 PBS 洗涤。a 组每孔加入 100 μL 含 10% FBS 和 800 $\mu\text{g/mL}$ COM 的 DMEM 培养基, 震荡混匀。b 组每孔加入 100 μL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基, 先加入 10 μL PEG-4000 溶液振荡混匀, 再加入 COM 至 800 $\mu\text{g/mL}$, 振荡混匀。c 组每孔加入 100 μL 含 10% FBS 和 800 $\mu\text{g/mL}$ COM 的 DMEM 培养基, 振荡混匀, 再加入 10 μL PEG-4000 溶液, 振荡混匀。将培养板放入培养箱孵育 12 h。吸弃各孔培养基, 于每孔加入 50 μL 含 10 mmol/L DCFH-DA 的无血清培养基, 放入细胞培养箱内孵育 20 min, 取出后用无血清细胞培养基洗涤细胞 3 次, 以 488 nm 为激发波长、525 nm 为发射波长用荧光酶标仪检测。

1.6 蛋白质印迹法检测坏死性凋亡特异性分子 RIPK1、RIPK3、p-MLKL 的表达 取 1.3 节实验一中镜下观测后的细胞, 用 RIPA 裂解液充分裂解后提取总蛋白质, BCA 法测定蛋白质浓度。按照每孔 30 μg 的上样量进行 SDS-PAGE, 转膜, 采用 5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 室温封闭 2 h 后, 加入一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日

加入 HRP 标记的二抗于室温孵育 1 h, 然后进行 ECL 反应, 使用化学发光成像仪曝光显影。

1.7 COM 晶体黏附量的测定 取 1.3 节实验一和实验二中镜下观测后的细胞, 将培养皿放置在小烧杯中, 加入 5 mL 浓 HNO_3 和 1.0 mL HClO_4 , 在电磁炉上消化至溶液透明, 继续加热至溶液即将蒸干时关闭电源, 利用余热将溶液烘干, 自然冷却后加入 3 mL 超纯水, 混合均匀, 同时设空白组 (即 5 mL 浓 HNO_3 与 1.0 mL HClO_4 的混合溶液), 利用电感耦合等离子体发射光谱法 (inductively coupled plasma emission spectroscopy, ICP) 准确测定钙离子的浓度, 并换算成 COM 晶体的黏附量。

1.8 统计学处理 应用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 Tukey 法。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 镜下观察 TCMK-1 细胞表面的 COM 晶体黏附情况 倒置相差显微镜下可见, 在 200、400、600、800 $\mu\text{g/mL}$ COM 处理后, 各组 TCMK-1 细胞表面晶体黏附随晶体浓度增加而明显增多 (图 1)。COM 浓度为 200、400 $\mu\text{g/mL}$ 时, GSK872 预处理组镜下细胞表面晶体黏附明显少于单纯 COM 处理组; 当 COM 浓度为 800 $\mu\text{g/mL}$ 时, GSK872 预处理组多数晶体聚集形成不定型沉淀并滞留于细胞表面, 与单纯 COM 处理组无明显差异。

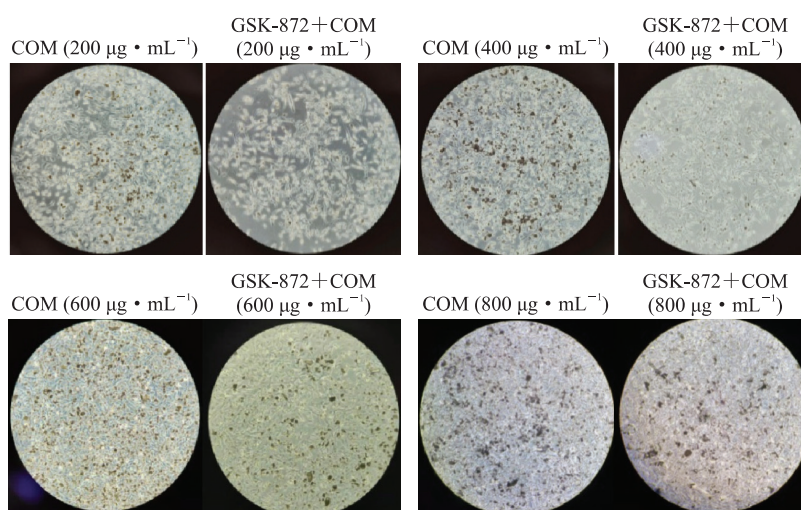


图 1 倒置相差显微镜下观测 GSK-872 预处理对不同浓度 COM 作用的 TCMK-1 细胞表面晶体黏附的影响 (100 $\times$)

Fig 1 Effect of GSK-872 pretreatment on TCMK-1 cell-crystal adhesion treated with different concentrations of COM observed under phase inversed microscope (100 $\times$)

GSK-872: A potent and specific inhibitor of receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3; COM: Calcium oxalate monohydrate; TCMK-1: Transformed C3H mouse kidney 1.

与浓度为 800 $\mu\text{g/mL}$ COM 处理组相比,预加入 PEG-4000 使 COM 处理的 TCMK-1 细胞表面晶体黏附明显减轻,而加入 COM 后再加入 PEG-4000 处理的 TCMK-1 细胞表面晶体黏附无明显改变(图 2)。

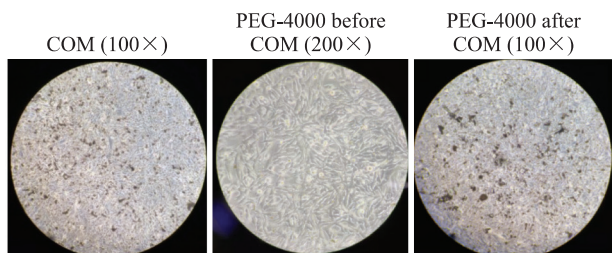


图 2 倒置相差显微镜下观测 COM 干预前后加入 PEG-4000 对 TCMK-1 细胞表面晶体黏附的影响

Fig 2 Effect of adding PEG-4000 on TCMK-1 cells before and after COM treatment observed under phase inverted microscope

COM: Calcium oxalate monohydrate; TCMK-1: Transformed C3H mouse kidney 1; PEG: Polyethylene glycol.

2.2 GSK-872 及 PEG-4000 对 COM 处理的 TCMK-1 细胞增殖的影响 CCK-8 检测结果(图 3)显示,与空白对照组相比,400、800 $\mu\text{g/mL}$ COM 处理 12 h 时 TCMK-1 细胞的增殖活性均受到抑制,而使用 GSK-872 预处理组相比对应浓度的 COM 处理组 TCMK-1 细胞的增殖活性均增强(P 均 <0.05)。

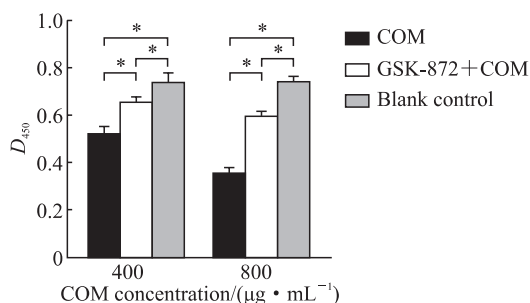


图 3 CCK-8 法检测 GSK-872 预处理对不同浓度 COM 作用的 TCMK-1 细胞增殖活性的影响

Fig 3 Effect of GSK-872 pretreatment on proliferation activity of TCMK-1 cells treated with different concentrations of COM detected by CCK-8

* $P<0.05$. $n=7$, $\bar{x}\pm s$. CCK-8: Cell counting kit 8; GSK-872: A potent and specific inhibitor of receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3; COM: Calcium oxalate monohydrate; TCMK-1: Transformed C3H mouse kidney 1.

CCK-8 检测结果显示,预加入 PEG-4000 组细胞增殖活性(光密度值 0.659 ± 0.029)较 COM 处理组(0.365 ± 0.011)增高($P<0.05$),而加入 COM

后再加入 PEG-4000 处理组细胞增殖活性(光密度值 0.342 ± 0.012)与 COM 处理组(0.365 ± 0.011)相比差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 GSK-872 及 PEG-4000 对 COM 处理的 TCMK-1 细胞 ROS 的影响 DCFH-HA 探针法检测结果显示,与空白对照组相比,400、800 $\mu\text{g/mL}$ COM 处理细胞 12 h 时 TCMK-1 细胞的 ROS 水平均升高;与 COM 处理组相比,预加入 GSK-872 降低了 COM 诱导细胞产生的 ROS 水平(P 均 <0.05 ,图 4)。

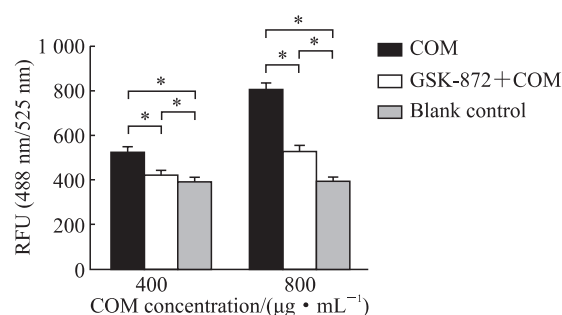


图 4 DCFH-DA 探针法检测 GSK-872 预处理对不同浓度 COM 作用的 TCMK-1 细胞 ROS 水平的影响

Fig 4 Effect of GSK-872 pretreatment on ROS levels of TCMK-1 cells treated with different concentrations of COM detected by the DCFH-DA probe method

* $P<0.05$. $n=7$, $\bar{x}\pm s$. DCFH-DA: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; GSK-872: A potent and specific inhibitor of receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3; COM: Calcium oxalate monohydrate; TCMK-1: Transformed C3H mouse kidney 1; ROS: Reactive oxygen species; RFU: Relative fluorescence unit.

与 COM 处理组 TCMK-1 细胞 ROS 水平(808.1 ± 20.5)相比,预加入 PEG-4000 使 COM 处理的 TCMK-1 细胞 ROS 水平(438.9 ± 11.9)降低($P<0.05$),而加入 COM 后再加入 PEG-4000 处理的 TCMK-1 细胞 ROS 水平(823.7 ± 14.3)差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 GSK-872 对 COM 处理的 TCMK-1 细胞坏死性凋亡相关蛋白表达的影响 蛋白质印迹法检测结果(图 5)显示,与空白对照组比较,800 $\mu\text{g/mL}$ COM 处理 12 h 时细胞坏死性凋亡相关蛋白 RIPK1、RIPK3、p-MLKL 表达增加;与 COM 处理组比较,GSK-872 预处理组的细胞 RIPK1 表达差异无统计学意义(0.678 ± 0.020 vs 0.698 ± 0.015 , $P>0.05$),RIPK3 (0.155 ± 0.021 vs 0.641 ± 0.029)及 p-MLKL (0.451 ± 0.103 vs 1.162 ± 0.137)表达均减少(P 均 <0.05)。

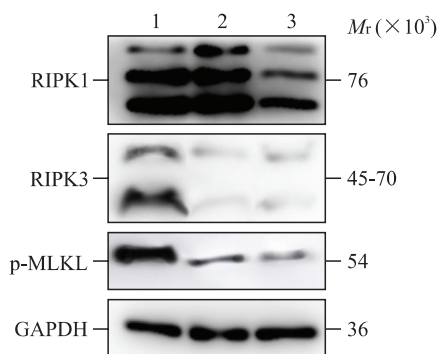


图5 GSK-872 预处理对 800 µg/mL COM 处理的细胞坏死性凋亡相关蛋白表达的影响

Fig 5 Effect of GSK-872 pretreatment on the expression of necroptosis-related proteins in cells treated with 800 µg/mL COM

1: COM group; 2: GSK-872+COM group; 3: Blank control group. GSK-872: A potent and specific inhibitor of RIPK3; COM: Calcium oxalate monohydrate; RIPK: Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase; p-MLKL: Phospho-mixed lineage kinase domain-like; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

2.5 GSK-872 及 PEG-4000 对 COM 处理的 TCMK-1 细胞表面晶体黏附量的影响 结果如图 6 所示, COM 浓度为 400 µg/mL 时, 与 COM 处理组相比, GSK-872 预处理组晶体黏附量减少 ($P<0.05$); COM 浓度为 800 µg/mL 时, 两组晶体黏附量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

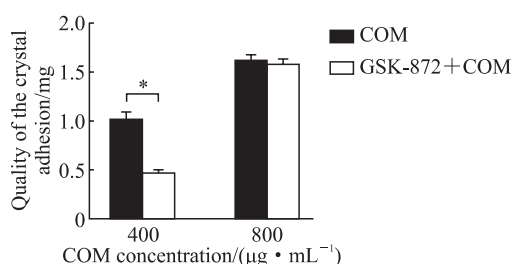


图6 ICP 检测 GSK-872 预处理对不同浓度 COM 作用的 TCMK-1 细胞表面晶体黏附量的影响

Fig 6 Effect of GSK-872 pretreatment on TCMK-1 cell-crystal adhesion treated with different concentrations of COM detected by ICP

* $P<0.05$. $n=7$, $\bar{x}\pm s$. ICP: Inductively coupled plasma emission spectroscopy; GSK-872: A potent and specific inhibitor of receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3; COM: Calcium oxalate monohydrate; TCMK-1: Transformed C3H mouse kidney 1.

COM 浓度为 800 µg/mL 时, 与 COM 处理组 [(1.643 ± 0.032) mg] 相比, 预加入 PEG-4000 使

COM 处理的 TCMK-1 细胞的晶体黏附量 [(0.405 ± 0.040) mg] 减少 ($P<0.05$), 而加入 COM 后再加入 PEG-4000 处理的 TCMK-1 细胞的晶体黏附量 [(1.678 ± 0.026) mg] 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

有研究认为晶体的细胞毒性涉及 RIPK3-MLKL 介导的坏死性凋亡, 作为调控坏死性凋亡的重要靶点, 抑制 RIPK3 可防止细胞晶体性损伤^[9]。

尿液中草酸钙微晶体的过饱和析出和聚集是导致晶体快速增大和结石形成的重要因素, 减少其在尿液中的聚集可能是预防肾结石形成的方法之一。PEG 因具有高结构灵活性、生物相容性、两亲性、高水化能力等物理、化学特性以及公认的安全性, 成为载入《中华人民共和国药典》及美国 FDA 批准使用的多用途聚合物^[18]。分子量 100~700 的 PEG 在室温下为液态, 分子量 1 000~2 000 的 PEG 为软固态, 分子量 >2 000 的 PEG 为硬结晶固态或玻璃态, 熔点约为 63 °C^[19]。但这并不妨碍 PEG 的生物安全性, 它在水中具有高溶解度^[20], 且在所有 pH 值下都保持电中性, 在生物环境中保持惰性, 蛋白质吸附差, 细胞活化和黏附性低, 细胞摄取差, 炎症程度可忽略不计^[21]。短期和长期毒性研究、致突变性试验、大鼠致畸试验和人体临床试验均表明 PEG 通过口服和非口服途径是安全的^[22]。通过腹腔注射、皮下注射、肌肉注射及静脉注射进入小鼠血液中的分子量为 6 000 的 PEG (PEG-6000) 几乎在 10 h 内被完全清除, 且 PEG-6000 在体内清除速度明显较更大分子量的 PEG 快^[23]。人体每日可接受各种分子量的 PEG 摄入量高达 10 mg/kg 体重 (来自 WHO 关于食品添加剂的评价)^[24]。PEG 的罕见不良反应包括静脉和口服给药后过敏或过敏性休克^[25]。美国 FDA 发布的非活性成分数据库 (Inactive Ingredient Database) 列出了 PEG 在口服、局部和静脉制剂中的用途, 还描述了该特定组合物中使用的 PEG 的最大浓度。另外, PEG-4000 及其复方制剂作为轻泻剂在临床中被长期广泛应用, 进一步佐证了它的化学稳定性和生物安全性。同时具备分散剂特性的 PEG-4000 可能在水溶液中通过其分散稳定作用抑制草酸钙微晶体的聚集和生长, 并使其保持悬浮稳定^[26]。本研究中 PEG-4000 水溶液稀释后作用于细胞及 COM 的实际质量分数约为 5%, 略小于复方聚乙二醇散中 6% 的使用浓

度建议。

本研究结果显示,与400、800 $\mu\text{g/mL}$ COM处理组相比,预加入RIPK3特异性抑制剂GSK-872可减轻400、800 $\mu\text{g/mL}$ COM处理下TCMK-1细胞损伤。预加入GSK-872可以使400 $\mu\text{g/mL}$ COM处理的细胞表面晶体黏附量明显减少,但不能减少800 $\mu\text{g/mL}$ COM处理的细胞表面晶体黏附量。PEG-4000相关的实验显示,与800 $\mu\text{g/mL}$ COM处理组相比,预加入PEG-4000能够减轻COM处理组TCMK-1的细胞损伤,并降低细胞表面晶体黏附量。在加入800 $\mu\text{g/mL}$ COM之后再加入PEG-4000时,细胞表面晶体黏附及细胞损伤相比COM处理组没有明显差异。

实验结果说明RIPK3特异性抑制剂GSK-872对于坏死性凋亡通路的调控作用明显,并验证了坏死性凋亡是草酸钙晶体刺激下主要的细胞损伤方式之一。实验发现在较低浓度晶体处理下抑制细胞坏死性凋亡能够降低细胞表面对晶体的黏附作用,但不能完全消除细胞-晶体黏附作用。这可能与细胞损伤的分子机制多样性有关,仅通过少数位点的抑制很难消除细胞损伤以及细胞膜对晶体的黏附作用,GSK-872选择性抑制了细胞坏死性凋亡,同时也会启动细胞凋亡等细胞死亡模式。

实验通过检测细胞增殖能力、ROS水平、坏死性凋亡相关蛋白表达及细胞表面晶体黏附量表明,COM浓度达到800 $\mu\text{g/mL}$ 时,预使用GSK-872仍旧能够减轻晶体性细胞损伤、减少ROS产生的水平,但是细胞表面晶体黏附总量没有明显差异。可能的解释为,当晶体密度达到一定程度时晶体颗粒间依靠静电作用等相互吸引并聚集形成不定型沉淀,这些滞留下来的不定型沉淀吸引了大量微晶颗粒并且占据的空间远大于单晶颗粒,成为影响晶体黏附量的主要因素。

预加入PEG-4000能够使晶体在悬液体系中保持悬浮稳定并降低细胞的晶体性损伤,细胞表面晶体黏附聚集明显减少。另外在加入COM之后再加入PEG-4000,细胞表面晶体黏附相比COM处理组没有减少,细胞损伤无明显差异,说明PEG-4000在晶体与细胞接触作用之前起到分散作用,而没有逆转已经形成的晶体-细胞黏附的作用。

以PEG-4000为代表的聚合物或生物材料可能对肾结石的防治研究有所帮助,其影响细胞表面晶体黏附聚集的作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] ASOUEH F, TALEBI S, JAYEDI A, MARX W, NAJAFI M T, MOHAMMADI H. Associations of total protein or animal protein intake and animal protein sources with risk of kidney stones: a systematic review and dose-response meta-analysis[J]. *Adv Nutr*, 2022, 13: 821-832.
- [2] WINFREE S, WEILER C, BLEDSOE S B, GARDNER T, SOMMER A J, EVAN A P, et al. Multimodal imaging reveals a unique autofluorescence signature of Randall's plaque[J]. *Urolithiasis*, 2021, 49: 123-135.
- [3] LILDAL S K, ANDREASSEN K H, BAARD J, BREHMER M, BULTITUDE M, ERIKSSON Y, et al. Consultation on kidney stones, Copenhagen 2019: aspects of intracorporeal lithotripsy in flexible ureterorenoscopy[J]. *World J Urol*, 2021, 39: 1673-1682.
- [4] CHANTHICK C, THONGBOONKERD V. Hyaluronic acid promotes calcium oxalate crystal growth, crystal-cell adhesion, and crystal invasion through extracellular matrix[J/OL]. *Toxicol In Vitro*, 2022, 80: 105320. DOI: 10.1016/j.tiv.2022.105320.
- [5] NOONIN C, PEERAPEN P, YOODEE S, KAPINCHARANON C, KANLAYA R, THONGBOONKERD V. Systematic analysis of modulating activities of native human urinary Tamm-Horsfall protein on calcium oxalate crystallization, growth, aggregation, crystal-cell adhesion and invasion through extracellular matrix[J/OL]. *Chem Biol Interact*, 2022, 357: 109879. DOI: 10.1016/j.cbi.2022.109879.
- [6] STREEPER N M, GALIDA M, BOLTZ S, LI S, NAKADA S Y, RAFFIN E P, et al. Is stone-free status after surgical intervention for kidney stones associated with better health-related quality of life? — A multicenter study from the North American stone quality of life consortium[J]. *Urology*, 2021, 148: 77-82.
- [7] YE Q L, WANG D M, WANG X, ZHANG Z Q, TIAN Q X, FENG S Y, et al. Sirt1 inhibits kidney stones formation by attenuating calcium oxalate-induced cell injury[J/OL]. *Chem Biol Interact*, 2021, 347: 109605. DOI: 10.1016/j.cbi.2021.109605.
- [8] LI X R, CHEN S Y, FENG D M, FU Y Q, WU H, LU J Z, et al. Calcium-sensing receptor promotes calcium oxalate crystal adhesion and renal injury in Wistar rats by promoting ROS production and subsequent regulation of PS ectropion, OPN, KIM-1, and ERK expression[J]. *Ren Fail*, 2021, 43: 465-476.
- [9] MULAY S R, DESAI J, KUMAR S V, EBERHARD J N, THOMASOVA D, ROMOLI S, et al. Cytotoxicity of crystals involves RIPK3-MLKL-mediated necroptosis[J/OL]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10274. DOI: 10.1038/ncomms10274.
- [10] MENG Y X, HORNE C R, SAMSON A L, DAGLEY

- L F, YOUNG S N, SANDOW J J, et al. Human RIPK3 C-lobe phosphorylation is essential for necroptotic signaling[J/OL]. *Cell Death Dis*, 2022, 13: 565. DOI: 10.1038/s41419-022-05009-y.
- [11] MULAY S R, EBERHARD J N, DESAI J, MARSCHNER J A, KUMAR S V R, WEIDENBUSCH M, et al. Hyperoxaluria requires TNF receptors to initiate crystal adhesion and kidney stone disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28: 761-768.
- [12] SUN X Y, OUYANG J M, GAN Q Z, LIU A J. Renal epithelial cell injury induced by calcium oxalate monohydrate depends on their structural features: size, surface, and crystalline structure[J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2016, 12: 2001-2014.
- [13] HEWAGAMA S P, HEWAWASAM R P. Antiuro lithiatic potential of three Sri Lankan medicinal plants by the inhibition of nucleation, growth, and aggregation of calcium oxalate crystals *in vitro*[J/OL]. *Sci World J*, 2022, 2022: 8657249. DOI: 10.1155/2022/8657249.
- [14] HE J Y, DENG S P, OUYANG J M. Morphology, particle size distribution, aggregation, and crystal phase of nanocrystallites in the urine of healthy persons and lithogenic patients[J]. *IEEE Trans Nanobioscience*, 2010, 9: 156-163.
- [15] AKHTAR K, HAQ I U. Chemical modulation of crystalline state of calcium oxalate with nickel ions[J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 418: 12-16.
- [16] KOLATE A, BARADIA D, PATIL S, VHORA I, KORE G, MISRA A. PEG—a versatile conjugating ligand for drugs and drug delivery systems[J]. *J Control Release*, 2014, 192: 67-81.
- [17] ELISTRATOVA A A, GUBAREV A S, LEZOV A A, VLASOV P S, SOLOMATINA A I, LIAO Y C, et al. Amphiphilic diblock copolymers bearing poly(ethylene glycol) block: hydrodynamic properties in organic solvents and water micellar dispersions, effect of hydrophobic block chemistry on dispersion stability and cytotoxicity[J/OL]. *Polymers (Basel)*, 2022, 14: 4361. DOI: 10.3390/polym14204361.
- [18] HARRIS J M, CHESS R B. Effect of pegylation on pharmaceuticals[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2: 214-221.
- [19] THOMAS A, MÜLLER S S, FREY H. Beyond poly(ethylene glycol): linear polyglycerol as a multifunctional polyether for biomedical and pharmaceutical applications[J]. *Biomacromolecules*, 2014, 15: 1935-1954.
- [20] PASUT G, VERONESE F M. State of the art in PEGylation: the great versatility achieved after forty years of research[J]. *J Control Release*, 2012, 161: 461-472.
- [21] IBRAHIM M, RAMADAN E, ELSADEK N E, EMAM S E, SHIMIZU T, ANDO H, et al. Polyethylene glycol (PEG): the nature, immunogenicity, and role in the hypersensitivity of PEGylated products[J]. *J Control Release*, 2022, 351: 215-230.
- [22] WEBSTER R, DIDIER E, HARRIS P, SIEGEL N, STADLER J, TILBURY L, et al. PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies[J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35: 9-16.
- [23] YAMAOKA T, TABATA Y, IKADA Y. Fate of water-soluble polymers administered via different routes[J]. *J Pharm Sci*, 1995, 84: 349-354.
- [24] D'SOUZA A A, SHEGOKAR R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2016, 13: 1257-1275.
- [25] BIGINI P, GOBBI M, BONATI M, CLAVENNA A, ZUCCHETTI M, GARATTINI S, et al. The role and impact of polyethylene glycol on anaphylactic reactions to COVID-19 nano-vaccines[J]. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16: 1169-1171.
- [26] PHAM LE KHANH H, NEMES D, RUSZNYÁK Á, UJHELYI Z, FEHÉR P, FENYVESI F, et al. Comparative investigation of cellular effects of polyethylene glycol (PEG) derivatives[J/OL]. *Polymers*, 2022, 14: 279. DOI: 10.3390/polym14020279.
- [本文编辑] 尹 茶