

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00921

霉酚酸酯与雷帕霉素对多囊肾囊肿衬里上皮细胞增殖和凋亡影响的比较

张 彤,付莉莉,梅长林*

第二军医大学长征医院肾内科,解放军肾脏病研究所,上海 200003

[摘要] 目的:观察霉酚酸酯(MMF)对多囊肾囊肿衬里上皮细胞增殖和凋亡的影响,并与雷帕霉素(RAPA)比较。方法:采用原代培养的人多囊肾囊肿衬里上皮细胞,用不同浓度 MMF 和 RAPA 分别作用 48 h 和 72 h。MTT 法检测细胞增殖情况;流式细胞术检测细胞周期变化;Annexin V-FITC 流式细胞术测定细胞凋亡率;透射电镜观察细胞超微结构改变。结果:MMF 和 RAPA 均能抑制囊肿衬里上皮细胞增殖,呈明显的量效和时效关系。作用 48 h 后 MMF 使细胞阻滞在 S 期,RAPA 使细胞阻滞在 G₀/G₁ 期。MMF 和 RAPA 均可诱导细胞凋亡,最大凋亡率分别为(5.53±0.27)%和(4.36±0.10)%;电镜下可见典型的凋亡改变。结论:MMF 与 RAPA 相比同样能明显抑制囊肿衬里上皮细胞增殖,诱导细胞凋亡,但其对细胞增殖的抑制作用较 RAPA 弱。

[关键词] 霉酚酸酯;雷帕霉素;多囊肾;囊肿衬里上皮细胞;细胞增殖;细胞凋亡

[中图分类号] R 692 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)08-0921-04

Comparison between effects of mycophenolate mofetil and rapamycin on proliferation and apoptosis of cyst-lining epithelial cells of ADPKD patients

ZHANG Tong, FU Li-li, MEI Chang-lin*

Department of Nephrology, Kidney Institute of PLA, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effect of mycophenolate mofetil(MMF) on proliferation and apoptosis of cyst-lining epithelial cells in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), and to compare its effect with that of rapamycin (RAPA) *in vitro*. **Methods:** Primary cultured cyst-lining epithelial cells were treated with MMF and RAPA at different concentrations(0, 0.005, 0.05, 0.5, 5 μg/ml) for 48 h or 72 h. The inhibitory effects of them on the cells were evaluated by MTT assay; the cell cycle distribution and apoptotic ratio were determined by flow cytometry. The morphological changes of cyst-lining epithelial cells were observed under transmission electron microscope. **Results:** Both MMF and RAPA significantly inhibited the proliferation of cyst-lining epithelial cells in a dose- and time-dependent manner. After 48 h treatment, the cells were blocked at S phase by MMF and at G₀/G₁ phase by RAPA. Both drugs induced cell apoptosis, with the maximal apoptotic rate being (5.53±0.27)% for MMF and (4.36±0.10)% for PAPA. Typical morphological changes of apoptotic cells were observed under electron microscope. **Conclusion:** MMF can effectively inhibit proliferation and induce apoptosis of cyst-lining epithelial cells, but its inhibitory effect is weaker than that of RAPA.

[KEY WORDS] mycophenolate mofetil; rapamycin; polycystic kidney disease; cyst-lining epithelial cell; cell proliferation; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(8):921-924]

常染色体显性多囊肾病(ADPKD)是人类最常见的单基因遗传性肾脏疾病,通过药物抑制囊肿生长,延缓肾功能进展是目前治疗 ADPKD 的主要研究方向^[1]。临床研究发现肾移植术后应用免疫抑制剂的多囊肾病患者,肾脏体积未进一步增大^[2]。在

多囊肾动物模型中,免疫抑制剂雷帕霉素(RAPA)可抑制肾脏增大及囊肿生长,保护肾功能^[3]。应用免疫抑制剂治疗多囊肾病日益引起人们关注,国外已开始进行 RAPA 治疗 ADPKD 的多中心临床试验,但是其长期应用的不良反应不容忽视^[4]。近年来用于临床的新型免疫抑制剂霉酚酸酯(MMF)具有独特的高效、低毒的免疫抑制作用,目

[收稿日期] 2008-01-16 **[接受日期]** 2008-05-12

[基金项目] 国家自然科学基金(30570867, 30330640, 30271523)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30570867, 30330640, 30271523)。

[作者简介] 张 彤, 硕士, 住院医师, E-mail: angel0215-5@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-63610109-73271, E-mail: chlmei1954@126.com

前尚未见关于 MMF 治疗 ADPKD 的报道,本研究通过观察 MMF 对多囊肿肾囊肿衬里上皮细胞增殖和凋亡的影响,并与 RAPA 比较,旨在从细胞水平探讨 MMF 是否同样具有治疗 ADPKD 的潜在作用。

1 材料和方法

1.1 药物和试剂 MMF 胶囊为瑞士 Roche 公司产品,内容物用二甲亚砜(DMSO)配成 10 mg/ml 母液,置-20℃备用。RAPA 片为美国 Wyeth 公司产品,用 DMSO 配成 50 μg/ml 母液,置 4℃备用。其他主要试剂包括 DMEM/F12 培养液、胎牛血清(美国 Gibco 公司),四甲基偶氮唑盐(MTT,美国 Sigma 公司),Annexin V/PI 检测试剂盒(深圳晶美)。

1.2 MTT 法检测细胞增殖活性 人原代培养多囊肿肾囊肿衬里上皮细胞由本实验室建立并保存^[5],取对数生长期细胞,按 1×10⁴/孔接种于 96 孔板,细胞生长至 70%融合时,加入无血清 DMEM 培养液同步化 24 h,弃上清,加入含不同浓度 MMF(0、0.005、0.05、0.5、5 μg/ml)和 RAPA(0、0.005、0.05、0.5、5 μg/ml)的 2%胎牛血清 DMEM/F12 培养液,每个剂量组设 4 个复孔,0 μg/ml 组为对照组,无细胞 DMEM 培养液为空白对照组,作用 48 h 和 72 h 后,每孔加入 MTT(5 mg/ml)10 μl,4 h 后,弃上清,加入 100 μl DMSO,在 492 nm 波长处酶标仪检测各孔光密度(D)值,以空白对照调零,并计算细胞生长抑制率,细胞生长抑制率(%)=(1-实验组光密度平均值/对照组光密度平均值)×100%。

1.3 应用流式细胞术测定细胞周期 取对数生长期囊肿衬里上皮细胞按 2×10⁵/孔接种于 6 孔板,孵育 24 h(37℃,5%CO₂)后,予无血清 DMEM 培养液同步 24 h,弃上清,根据预实验结果,MMF 浓度为 0~5 μg/ml 对细胞周期影响不明显,故增加 50 μg/ml 组,分别加入含不同浓度(0、0.05、0.5、5、50 μg/ml)MMF 和 RAPA 的 2%胎牛血清 DMEM 培养液,每浓度设 3 个复孔,48 h 后收集细胞连同培养液,离心后以 PBS 清洗 2 次,用 75%的预冷乙醇固定细胞,4℃过夜。离心后再以 PBS 清洗 2 次,RNA 酶消化,碘化丙啶(50 μg/ml)避光染色后,用流式细胞仪检测,Multi-Cycle 软件分析细胞周期。

1.4 应用 Annexin V-FITC 流式细胞术测定细胞凋亡率 取对数生长期囊肿衬里上皮细胞按 2×10⁵/孔接种于 6 孔板,孵育 24 h(37℃,5%CO₂)后,予无血清 DMEM 培养液同步 24 h,弃上清,分别加入含不同浓度 MMF(0、0.005、0.05、0.5、5 μg/ml)和 RAPA(0、0.005、0.05、0.5、5 μg/ml)的 2%胎牛血清 DMEM/

F12 培养液处理细胞,每浓度设 3 个复孔,48 h 后收集细胞,离心后再 PBS 清洗 2 次,加入 Annexin V-FITC(5 μl)和碘化丙啶(20 μg/ml,10 μl)避光染色 15 min,流式细胞仪检测,Modfit 软件分析结果。

1.5 透射电镜观察细胞超微结构的改变 细胞按 2×10⁵/孔接种于 6 孔板,观察细胞贴壁且生长良好后,分别加入含 5 μg/ml MMF 或 RAPA 的 2%胎牛血清 DMEM/F12 培养液,每组 2 个复孔,以非药物处理组为对照。48 h 后消化、收集细胞,PBS 洗涤后用 2.5%戊二醛前固定,1%锇酸后固定,然后经包埋、超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅染色后,用 H-800 透射电镜(日本 Hitachi)观察。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 *t* 检验比较均值,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MMF 和 RAPA 对囊肿衬里上皮细胞增殖的抑制作用 不同浓度(0.005、0.05、0.5、5 μg/ml)MMF 作用于囊肿衬里上皮细胞 48 h 后,均能显著抑制细胞增殖,细胞生长抑制率分别为(8.1±2.1)%、(11.2±2.7)%、(22.7±2.2)%和(24.1±2.3)%;作用 72 h 后细胞生长抑制率分别为(8.5±1.6)%、(17.9±4.2)%、(32.3±2.7)%和(34.0±2.4)%。不同浓度(0.005、0.05、0.5、5 μg/ml)RAPA 作用 48 h 后,囊肿衬里上皮细胞的增殖明显受到抑制,细胞生长抑制率分别为(24.8±1.6)%、(25.0±0.3)%、(30.8±1.5)%和(35.2±1.4)%;作用 72 h 后抑制率分别为(25.3±1.6)%、(25.3±2.0)%、(32.2±2.5)%和(39.3±1.3)%。与 MMF 相比,RAPA 对细胞增殖的抑制作用更强,差异具有统计学意义(图 1)。

图 1 MMF 和 RAPA 对囊肿衬里上皮细胞生长的抑制作用
Fig 1 Growth inhibition of cyst-lining epithelial cells by MMF and RAPA

* *P*<0.05, ** *P*<0.01 vs MMF 48 h group;△ *P*<0.05,△△ *P*<0.01 vs MMF 72 h group;*n*=4, $\bar{x} \pm s$

2.2 MMF 和 RAPA 对囊肿衬里上皮细胞细胞周期的影响 MMF 浓度为 0~5 $\mu\text{g/ml}$ 时作用 48 h 后对细胞周期影响不明显,而浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$ 时,作用 48 h 后 S 期细胞明显增加, G_2/M 期细胞减少,表明 MMF 能使囊肿衬里上皮细胞细胞周期阻滞在 S 期。见表 1。RAPA 作用 48 h 后,随浓度增加, G_0/G_1 期细胞逐渐增多,S+ G_2/M 期细胞逐渐减少,表明 RAPA 能使囊肿衬里上皮细胞细胞周期阻滞在 G_0/G_1 期。见表 2。

表 1 不同浓度 MMF 作用 48 h 对细胞周期的影响

Tab 1 Influence of MMF on cell cycle after 48 h treatment

($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Concentration $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	Cell cycle		
	G_0/G_1	S	G_2/M
0	37.16 \pm 0.53	44.0 \pm 2.92	18.84 \pm 2.41
0.05	37.43 \pm 1.57	44.12 \pm 2.21	18.45 \pm 2.53
0.5	39.28 \pm 2.72	44.25 \pm 1.43	16.47 \pm 3.57
5	37.66 \pm 0.41	45.64 \pm 3.07	16.70 \pm 2.66
50	25.56 \pm 7.65	58.86 \pm 5.88*	15.58 \pm 1.79*

* $P < 0.05$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ group

2.3 MMF 和 RAPA 诱导囊肿衬里上皮细胞凋亡 经 Annexin V-FITC 流式细胞术检测,不同浓度(0.05、0.5、5 $\mu\text{g/ml}$)MMF 作用 48 h 后,囊肿衬里上皮细胞的凋亡率分别为(1.87 \pm 0.16)%、(4.55 \pm 0.39)%、(5.53 \pm 0.27)%、均显著高于 0 $\mu\text{g/ml}$

组的(0.52 \pm 0.09)%($P < 0.01$);不同浓度(0.05、0.5、5 $\mu\text{g/ml}$)RAPA 作用 48 h 后,囊肿衬里上皮细胞的凋亡率分别为(1.82 \pm 0.08)%、(2.17 \pm 0.14)%、(4.36 \pm 0.10)%、与 0 $\mu\text{g/ml}$ 组的(0.51 \pm 0.07)%相比差异显著($P < 0.01$)。但是同浓度 MMF 和 RAPA 相比,诱导细胞凋亡率间无显著差异($P > 0.05$)。

表 2 不同浓度 RAPA 作用 48 h 对
囊肿衬里上皮细胞周期的影响

Tab 2 Influence of RAPA on cell cycle after 48 h treatment

($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Concentration $\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	Cell cycle		
	G_0/G_1	S	G_2/M
0	73.02 \pm 2.53	19.51 \pm 2.87	7.47 \pm 0.34
0.05	79.28 \pm 7.66	14.01 \pm 7.83	6.71 \pm 0.79
0.5	82.46 \pm 6.31	11.18 \pm 6.08	6.36 \pm 0.70
5	84.42 \pm 3.12**	9.67 \pm 2.90*	5.91 \pm 0.59*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ group

2.4 透射电镜观察 MMF 和 RAPA 诱导细胞凋亡 透射电镜观察发现,对照组细胞形态无显著变化,胞核完整,胞质饱满,细胞膜上覆盖有微绒毛。MMF 和 RAPA 作用 48 h 后,囊肿衬里上皮细胞出现典型的凋亡细胞超微改变,部分发生细胞核浓缩,染色质聚集,胞质内出现空泡、沟裂,胞质脱落,裸核形成,部分出现凋亡小体。见图 2。

图 2 MMF 和 RAPA 诱导囊肿衬里上皮细胞凋亡的透射电镜观察结果

Fig 2 Apoptosis of cyst-lining epithelial cells induced by MMF and RAPA under transmission electron microscope

A: Control group; normal cells; B: MMF-treated group; C: RAPA-treated group. The chromatin concentrated into masses and on the boundary of the membrane; D: MMF-treated group. Endoplasm net swollen and vacuolated, arrow indicates apoptosis body; E: RAPA-treated group: Naked nucleolus(indicated by arrow); Original magnification: $\times 5\ 000$

3 讨论

关于 ADPKD 发病机制的研究日益深入,细胞增殖和凋亡异常在 ADPKD 的发生发展中起着重要作用^[6]。Ecdler 等^[7]和 Tao 等^[8]发现多囊肾动物模

型 Han:SPRD 大鼠的肾小管上皮细胞存在异常增殖和凋亡,而 RAPA 可以抑制 Han:SPRD 大鼠肾脏囊肿增长,延缓疾病进展^[3]。目前尚没有关于 MMF 治疗 ADPKD 的报道,MMF 除抑制 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞增殖外,还可抑制血管平滑肌细胞、

内皮细胞和肾小球系膜细胞增殖,在非移植领域如糖尿病肾病和狼疮性肾炎等的治疗研究中都取得了一定效果^[9-10]。

本实验通过 MTT 法显示 MMF 和 RAPA 对囊肿衬里上皮细胞都具有抑制增殖的作用,这种作用具有时间和剂量依赖性,两者相比 RAPA 对细胞的增殖抑制作用更强。细胞周期是细胞生命活动的基本过程,我们通过流式细胞术观察到,MMF 将细胞周期阻滞在 S 期,使得进入 G₂ 期的细胞减少,与文献报道^[11]相同,随着药物浓度增加,这种阻滞作用越强。但是也有文献报道^[12]MMF 将细胞周期阻滞在 G₁ 期,可能与研究的细胞株不同有关,该研究为肿瘤细胞。RAPA 作用 48 h 后,处于 G₁ 期细胞增多,S 期细胞减少,并呈一定的剂量依赖性,与文献报道相同,RAPA 将细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期可能与抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)有关。mTOR 为哺乳动物 RAPA 靶蛋白,属于蛋白激酶家族,mTOR 抑制剂可阻断 T 淋巴细胞及其他细胞由 G₁ 期至 S 期的进程^[13]。本研究结果说明 MMF 和 RAPA 抑制囊肿衬里上皮细胞增殖可能与其阻滞细胞周期的有序进行有关,但是两者将细胞周期阻滞的间期不同,导致细胞周期阻滞的机制可能也有所不同,推测两者共同应用可能有协同作用。

本研究检测细胞凋亡采用流式细胞术 Annexin V/PI 双染色法,这是目前定量检测凋亡的首选方法,结果显示 MMF 引起细胞周期阻滞的同时,还引起大量细胞凋亡,并随着药物浓度增加和作用时间延长,凋亡指数增加。在动物模型已证实 RAPA 可以抑制囊肿衬里上皮细胞的增殖和凋亡^[8],我们的实验再次证实 RAPA 可以诱导细胞凋亡,随浓度增加凋亡指数增加。两种药物相比,凋亡率无显著差异。凋亡最经典的检测方法是形态学观察,本实验研究通过透射电镜观察到细胞凋亡的形态学变化,细胞核边聚、染色质浓缩、核碎裂、胞质内出现沟裂和空泡,胞质脱落,部分可见典型的凋亡小体。但是对于 MMF 和 RAPA 所诱导的凋亡是否具有周期时相特异性尚无定论,并有待进一步探讨。

本实验为 MMF 治疗 ADPKD 提供了一定的实验依据,对其抑制细胞增殖、诱导细胞周期阻滞和凋亡的机制值得进一步深入研究。MMF 与 RAPA 在作用机制上存在差异,两者联合应用可能具有协同作用,从而减少用药剂量,降低不良反应,增加疗效,

这一设想有待于在多囊肾病动物模型上加以验证。

[参考文献]

- [1] Torres V E. Therapies to slow polycystic kidney disease[J]. *Nephron Exp Nephrol*,2004,98:e1-e7.
- [2] 王立明,王 炜,闵志廉,朱有华,齐 隼. 免疫抑制药物对多囊肾病治疗作用的探讨[J]. *第二军医大学学报*,1999,20:541-543.
- [3] Tao Y, Kim J, Schrier R W, Edelstein C L. Rapamycin markedly slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease[J]. *J Am Soc Nephrol*,2005,16:46-51.
- [4] Serra A L, Kistler A D, Poster D, Strucker M, Wüthrich R P, Weishaupt D, et al. Clinical proof-of-concept trial to assess the therapeutic effect of sirolimus in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: SUISSSE ADPKD study[J]. *BMC Nephrol*,2007,8:13-18.
- [5] 徐成钢,梅长林,张黎明. 多囊肾病囊肿衬里上皮细胞系的建立和鉴定[J]. *肾脏病与透析移植杂志*,2000,9:142-146.
- [6] Ibrahim S. Increased apoptosis and proliferative capacity are early events in cyst formation in autosomal-dominant polycystic kidney disease[J]. *Sci World J*,2007,7:1757-1767.
- [7] Ecder T, Melnikov V Y, Stanley M, Korular D, Lucia M S, Schrier R W, et al. Caspases, Bcl-2 proteins and apoptosis in autosomal-dominant polycystic kidney disease[J]. *Kidney Int*,2002,61:1220-1230.
- [8] Tao Y, Kim J, Stanley M, He Z, Faubel S, Schrier R W, et al. Caspase inhibition reduces tubular apoptosis and proliferation and slows disease progression in polycystic kidney disease[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2005,102:6954-6959.
- [9] Shimizu H, Takahashi M, Takeda S, Inoue S, Fujishiro J, Hakamata Y, et al. Mycophenolate mofetil prevents transplant arteriosclerosis by direct inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *Transplantation*,2004,77:1661-1667.
- [10] Utimura R, Fujihara C K, Mattar A L, Malheiros D M, Noronha I L, Zatz R. Mycophenolate mofetil prevents the development of glomerular injury in experimental diabetes[J]. *Kidney Int*,2003,63:209-216.
- [11] Cohn R G, Mirkovich A, Dunlap B, Burton P, Chiu S H, Eugui E, et al. Mycophenolic acid increases apoptosis, lysosomes and lipid droplets in human lymphoid and monocytic cell lines[J]. *Transplantation*,1999,68:411-418.
- [12] Takebe N, Cheng X, Fandy T E, Srivastava R K, Wu S, Shankar S, et al. IMP dehydrogenase inhibitor mycophenolate mofetil induces caspase-dependent apoptosis and cell cycle inhibition in multiple myeloma cells[J]. *Mol Cancer Ther*,2006,5:457-466.
- [13] Janus A, Robak T, Smolewski P. The mammalian target of the rapamycin (mTOR) kinase pathway: its role in tumourigenesis and targeted antitumour therapy[J]. *Cell Mol Biol Lett*,2005,10:479-498.

[本文编辑] 曹 静