

基于 MDCK 细胞单层的药物早期肾毒性检测初探

郝然¹, 刘婷^{1*}, 王毅², 胡剑江², 曹春雨¹, 回连强¹, 张毅¹

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700)

[摘要] **目的:**初步探索基于犬肾小管上皮细胞(Madin-Darby canine kidney, MDCK)细胞单层的药物早期肾毒性检测方法。**方法:**将 MDCK 细胞培养于微孔滤膜上,待其形成完整的细胞单层。通过 MTT 试验分别选择对 MDCK 细胞没有明显抑制及具有明显抑制的不同质量浓度作用于细胞单层,24 h 后进行荧光素钠透过性试验以及细胞单层两侧分泌的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、 γ -谷氨酰转肽酶(γ -glutamyl transpeptidase, γ -GT)和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性检测,同时用扫描电镜观察细胞单层结构。**结果:**选择 3.13, 6.25, 12.5 mg·L⁻¹ 3 种质量浓度的马兜铃酸(aristolochic acid, AA)进行毒性检测,其对 MDCK 细胞生长的抑制率分别为-0.93%, 0.93% 和 24.30%。AA 3.13 mg·L⁻¹ 没有对细胞单层的完整性造成破坏,荧光素钠不能透过细胞单层,而 AA 6.25, 12.5 mg·L⁻¹ 在与细胞作用 30 min 后,能明显增加荧光素钠的透过($P < 0.05$, $P < 0.1$),其中 12.5 mg·L⁻¹ 造成的荧光素钠透过率增加更多。各组细胞单层两侧 ALP, γ -GT 的分泌没有明显改变,但 12.5 mg·L⁻¹ 能使 LDH 的分泌显著增加($P < 0.05$)。扫描电镜观察显示,AA 6.25, 12.5 mg·L⁻¹ 组细胞单层结构被破坏,表面出现大量小球状物体,细胞单层破损而变得不完整,有不同程度的微孔滤膜露出。**结论:**基于 MDCK 细胞单层,在 AA 对细胞生长没有明显抑制的浓度(6.25 mg·L⁻¹),可以检测到药物对细胞的毒性损伤,提示建立在微孔滤膜上的 MDCK 细胞单层体系可以用于药物肾毒性的早期检测。

[关键词] MDCK 细胞; 药物肾毒性; 早期检测

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)12-0234-05

[doi] 10.11653/syfy2013120234

[收稿日期] 20121227(671)

[基金项目] 中国中医科学院自主选题项目(ZZ2006111)

[第一作者] 郝然,助理研究员,博士,从事中药药理、毒理工作, Tel:010-84252805-2231, E-mail:jessicahao2003@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 刘婷,副研究员,硕士,从事中药药理、毒理工作, Tel:010-84252805-2231, E-mail:ltbit@163.com

可显著对抗角叉菜胶诱发的大鼠足跖炎性肿胀。

3.2 舒风宁痛胶囊 0.03, 0.1 g·kg⁻¹, ig, 7, 15 d 有显著的镇痛作用。

3.3 舒风宁痛胶囊 0.018, 0.06 g·kg⁻¹, ig, 7, 15 d 可显著对抗氧嗉酸钾诱发的大鼠鼠高尿酸血症的血尿酸的水平。0.03, 0.1 g·kg⁻¹, ig, 15 d 可显著对抗酵母膏诱发的小鼠高尿酸血症的血尿酸水平。

[参考文献]

- [1] Lopez Redondo M J, Requena L, Macia M, et al. Fingertip tophi without gouty arthritis[J]. *Dermatology*, 1993, 187(2):140.
- [2] Holingworth P, ScoR J T, Burry H C. Nonarticular gout; hyperuricemia and tophus formation without gouty arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 1983, 26(1):98.
- [3] Edwards N L. The role of hyperuricemia and gout in kidney and cardiovascular disease[J]. *Cleve Clin J Med*, 2008, 75(Suppl 5):S13.

- [4] Campion E W, Glynn R J, DeLabry L O, et al. Asymptomatic hyperuricemia. Risks and consequences in the normative aging study[J]. *Am J Med*, 1987, 82(3):421.
- [5] 刘其林, 何欢, 赵士彦, 等. 痛风灵抗炎、镇痛、抗痛风作用研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 2(2):74.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2002:202, 882, 905.
- [7] 陈小野, 张宇鹏, 蒋小丽, 等. 热板法、醋酸扭体法疼痛模型寒、热属性的初步研究[J]. *浙江中医学院学报*, 2005, 29(4):68.
- [8] 徐立, 时乐. 灌服与喂饲次黄嘌呤复制大鼠持续性高尿酸血症模型方法初探[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(12):1671.
- [9] 徐立, 时乐, 仲文欣. 尿酸酶抑制剂在大鼠急性高尿酸血症模型复制中的应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(3):142.

[责任编辑 何伟]

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130412.0938.003.html>

[网络出版时间] 2013-04-12 9:38

Preliminary Research on Early Detection of Drug Nephrotoxicity Based on MDCK Cells Monolayer

HAO Ran¹, LIU Ting^{1*}, WANG Yi², HU Jian-jiang², CAO Chun-yu¹, HUI Lian-qiang¹, ZHANG Yi¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Medical Experimental Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To study a detection method for drug early nephrotoxicity based on Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells monolayer. **Method:** MDCK cells were cultured on microporous membrane to form a complete monolayer. Then the cells were treated with different drug concentration which had obviously inhibition on MDCK or not selected by MTT test. After 24 h, the cells were detected with fluorescein sodium permeability test and investigated by scanning electron microscope. At the same time, the activity of alkaline phosphatase (ALP), γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) and lactate dehydrogenase (LDH) that secreted by both sides of the cell layer were also detected. **Result:** We choose three concentration of aristolochic acid (AA) to detect its toxicity, they were 3.13, 6.25, 12.5 mg \cdot L⁻¹. And their inhibition on MDCK cell were -0.93%, 0.93% and 24.30%. AA 3.13 mg \cdot L⁻¹ could not disrupt the integrity of cell monolayer, and fluorescein sodium also can not penetrate the monolayer. AA 6.25, 12.5 mg \cdot L⁻¹ could obviously increase the permeation of fluorescein sodium after 30 min ($P < 0.05, P < 0.1$), especially for AA 12.5 mg \cdot L⁻¹. In either side of the cell layer, there showed no difference with ALP or γ -GT secretion. However, AA 12.5 mg \cdot L⁻¹ could increase LDH leakage on both sides of monolayer evidently ($P < 0.05$). In SEM detection, cells treated with AA 6.25, 12.5 mg \cdot L⁻¹ emerged a large number of small spherical objects in surface, and the monolayer became incomplete. **Conclusion:** Based on MDCK monolayer, AA toxicity can be detected at the concentration which has no obviously inhibition on cells. It suggests that MDCK monolayer system established on microporous membrane could be used for early detection of drug nephrotoxicity.

[Key words] MDCK cells; drug nephrotoxicity; early detection

MDCK 细胞作为一种肾小管上皮细胞,已被广泛应用于药物肾毒性的研究,如抗肿瘤药顺铂、NPC-14686、环磷酰胺及其异构体异环磷酰胺的肾毒性等^[1-2]。近年来也有研究者应用 MDCK 细胞进行了中药肾毒性的研究。刘庆^[3]等报道,MDCK II 细胞系对几种有肾毒性和无肾毒性的中药反应不同,证实该细胞系可用于中药成分的体外肾毒性评价研究。将细胞接种在具有微孔的聚碳酸酯膜或聚乙烯膜上,是近些年被广泛采用的一种细胞培养方法。与塑料培养板上的细胞相比较,生长在微孔膜上的细胞单层更接近体内状态,培养基可分布至细胞的两侧。这种培养方式能改善细胞分化,扩大分析细胞的生物应用,可以实现针对细胞某一侧或在细胞两侧间的物质表达、分泌、运输或与细胞间相互作用等的研究。本研究将 MDCK 细胞接种在微孔

膜上,以具有肾毒性的中药成分马兜铃酸为工具药,探索在此细胞模型进行药物早期毒性检测的可行性。

1 材料

1.1 细胞 MDCK 细胞,购自中国协和医科大学基础医学研究所细胞中心。

1.2 试剂与药物 DMEM (Dulbeco's modified Eagle's medium) 高糖培养基(货号 86075, Gibco 公司),胎牛血清(货号 GTB0060, HyClone 公司),酸性磷酸酶(ALP)试剂盒,批号 0108162AD02、 γ -谷氨酰转氨酶(γ -GT)试剂盒(批号 010811AD07)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(批号 110111BD02),均为北京万泰德瑞诊断技术有限公司,马兜铃酸(AA,由中国中医科学院中药研究所化学室制备,其中 AA I 的含量为 74.8%)。

1.3 仪器 站立式 Millicell 插入式培养皿(聚碳酸酯膜, 3 μm 孔径, 有效生长面积 0.6 cm², Millipore 公司), Millicell-ERS 电阻仪(Millipore 公司, 美国), VarioskanFlash 多功能酶标仪(Thermo 公司, 美国), 东芝 TBA-40 FR 全自动生化分析仪(日本), 日立 S-3400N 扫描电镜(日本)。

2 方法

2.1 MDCK 细胞的培养 MDCK 细胞用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液常规培养至 30 代以上。以 5 × 10⁴ 个/mL 密度接种于插入式培养皿内, 细胞生长支持物为具有 3 μm 孔径的聚碳酸酯膜(PCF 膜), 培养皿内、外分别加入 400, 600 μL 的含血清培养液进行培养, 当细胞跨膜电阻值 > 200 Ω·cm² 时表明已形成完整的细胞单层, 可用于试验。

2.2 AA 对 MDCK 细胞增殖作用的影响 将 MDCK 细胞以 5 × 10⁴ 个/mL 的密度接种于 96 孔板上, 每孔 160 μL, 细胞生长至第 4 天时加药。AA 以 0.5% DMSO 助溶, 终质量浓度分别为 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25 mg·L⁻¹, 同时设培养液中含 0.5% DMSO 的空白对照组。药物与细胞作用 24 h 后, 吸去上清液, 每孔加入 100 μL 1 g·L⁻¹ 的 MTT 溶液, 37 °C 培养 4 h 后, 轻轻弃去上清液, 200 μL DMSO/孔, 570 nm 波长处测定 A, 计算药物对 MDCK 细胞的抑制率, 选择 AA 对 MDCK 细胞没有明显抑制及具有明显抑制的不同质量浓度进行下述毒性检测。

$$\text{细胞抑制率} = (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{给药孔}}) / A_{\text{对照孔}} \times 100\%$$

2.3 AA 对 MDCK 细胞单层荧光素钠透过性的影响 生长在 PCF 膜上的 MDCK 细胞, 当检测细胞跨膜电阻 > 200 Ω·cm² 时, 弃去细胞两侧的培养液, 用 Hank's 液轻轻漂洗 2 次, 然后在细胞两侧加入含不同浓度 AA 的无血清培养液, AA 终质量浓度分别为 3.13, 6.25, 12.5 mg·L⁻¹, 24 h 后进行荧光素钠通透性试验。

吸去细胞两侧的药液, 用 Hanks 液轻轻漂洗 2 次。于插入式培养皿内加入 200 mg·L⁻¹ 的荧光素钠 400 μL, 皿外加入 Hanks 液 600 μL, 在 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 h 分别吸取皿外液体, 同时用等量的 Hanks 液补足。各取样液在 490 nm 波长测定吸光度(A), 同时测定荧光素钠溶液的标准曲线, 计算各时间点的荧光素钠累计透过率(B%) 和累计透过的增加率(C%)。

$$\text{荧光素钠累计透过率} = \text{某时间段内累计透过膜的荧光素钠量} / \text{加入的荧光素钠总量} \times 100\%$$

$$\text{荧光素钠累计透过增加率} = (\text{AA 各组荧光素钠累计透过率} - \text{对照组荧光素钠累计透过率}) / \text{对照组荧光素钠累计透过率} \times 100\%$$

2.4 AA 对 MDCK 细胞两侧 LDH, ALP, γ-GT 分泌的影响 将 AA 终质量浓度 3.13, 6.25, 12.5 mg·L⁻¹ 与生长在插入式培养皿中的 MDCK 细胞共培养 24 h 后, 吸取细胞两侧的培养液, 全自动生化分析仪测定 LDH, ALP, γ-GT 的活性, 结果以“U·L⁻¹”表示。

2.5 AA 对 MDCK 细胞单层形态学的影响 同 2.4 将 AA 与 MDCK 细胞培养 24 h 后, 吸去细胞两侧的培养液, Hanks 液轻轻漂洗 2 次, 用 4% 戊二醛在 4 °C 固定 2 h 后, PBS 清洗后再用 1% 锇酸固定液室温固定 1 h。经梯度脱水, 冷冻干燥, 用双面导电胶带将样品固定于样品台, 喷金, 入扫描电镜进行形态学观察。

2.6 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, *t* 检验进行组间比较, *P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 AA 对 MDCK 细胞增殖作用的影响 AA 在 6.25 mg·L⁻¹ 及以下质量浓度对 MDCK 细胞生长没有显著影响, 12.5, 25 mg·L⁻¹ 的 AA 可以明显抑制 MDCK 细胞的生长, 抑制率分别达 24.05% 和 49.60%。故选择 3.13, 6.25, 12.5 mg·L⁻¹ 3 个质量浓度进行下一步的毒性检测实验。见表 1。

表 1 AA 对 MDCK 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	A	抑制率/%
空白对照	-	1.07 ± 0.04	-
AA	0.39	1.11 ± 0.03	-3.74
	0.78	1.09 ± 0.03	-1.87
	1.56	1.11 ± 0.04	-3.74
	3.13	1.08 ± 0.05	-0.93
	6.25	1.06 ± 0.05	0.93
	12.50	0.81 ± 0.07 ¹⁾	24.30
	25.00	0.54 ± 0.06 ¹⁾	49.53

注: 与空白对照比较¹⁾ *P* < 0.01。

3.2 AA 对 MDCK 细胞单层荧光素钠透过率的影响 空白对照组在 150 min 内的荧光素钠累计透过率随着时间延长而逐渐增加, 均 < 5%; AA 3.13 mg·L⁻¹ 组在 150 min 内, 各个时间点的累计透过率虽较空白对照组略高, 但均同样 < 5%。AA 6.25 mg·L⁻¹ 在 30 min 时, 累计透过率显著增大, 与空白对照比较有明显差异 (*P* < 0.05)。AA 6.25 mg·L⁻¹ 在

60,90 min 以及 AA $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 在 60,90,120 min 的累计透过率与对照组比较有增加趋势 ($P < 0.1$); 其余时间点的累计透过率也较对照组有不同程度的增加,但无明显的统计学意义;AA $6.25, 12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组的荧光素钠累计透过率的增加百分率均在

100% 以上,其中 AA $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组的增大更为显著。上述结果提示,AA $3.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对 MDCK 细胞单层的完整性未造成影响, $6.25, 12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 AA 可造成细胞单层完整性不同程度的破坏,其中以 $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ AA 影响更为严重。见表 2。

表 2 AA 对 MDCK 细胞单层荧光素钠透过率 B(C) 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

%

组别	n	剂量 /mg·L ⁻¹	B(C)				
			30 min	60 min	90 min	120 min	150 min
空白对照	2	-	0.17 ± 0.000 7(-)	0.67 ± 0.55(-)	1.67 ± 0.95(-)	2.50 ± 1.73(-)	3.18 ± 1.89(-)
AA	3	3.13	0.39 ± 0.13(129.41)	2.05 ± 0.69(205.97)	2.40 ± 0.50(43.71)	3.03 ± 0.17(21.2)	3.23 ± 0.39(1.57)
	3	6.25	0.52 ± 0.21 ²⁾ (205.88)	6.51 ± 1.25 ¹⁾ (871.64)	6.96 ± 1.58 ¹⁾ (316.77)	6.91 ± 1.90(176.40)	6.77 ± 2.10(112.89)
	3	12.50	0.64 ± 0.81(276.47)	9.25 ± 3.91 ¹⁾ (1 280.60)	10.61 ± 4.91 ¹⁾ (535.33)	11.01 ± 5.15 ¹⁾ (340.40)	11.17 ± 5.19(251.26)

注: B. 荧光素钠累计透过率; C. 荧光素钠累计透过的增加率; 与空白对照比较¹⁾ $P < 0.1$, ²⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 AA 对 MDCK 细胞两侧 LDH, ALP, γ -GT 分泌的影响 正常 MDCK 细胞管腔 (AP) 和基底 (BL) 两侧分泌的 LDH 活性没有明显差异, 而 ALP, γ -GT 的分泌呈现极性, 主要在细胞的管腔一侧分泌, 细胞两侧的酶活力比 (AP/BL) 均 > 3 , 其中 γ -GT 的极性分

布更为显著, 酶活力比达到了 15 倍以上。与空白对照组比较, AA 各剂量组细胞两侧的 ALP, γ -GT 的酶活性没有显著改变, AA $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组可引起细胞两侧分泌 LDH 活性总量的增加, 提示药物对细胞造成了损伤, 导致细胞内 LDH 的外漏。见表 3。

表 3 AA 对 MDCK 细胞 LDH, ALP, γ -GT 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

U·L⁻¹

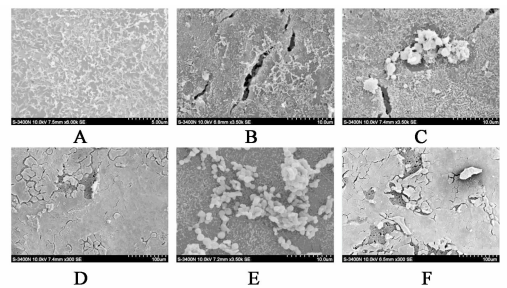
组别	剂量 /mg·L ⁻¹	LDH		ALP		γ -GT	
		AP/BL	AP + BL	AP/BL	AP + BL	AP/BL	AP + BL
空白对照	-	1.53 ± 0.31	14.47 ± 1.97	3.94 ± 0.56	6.35 ± 0.51	15.81 ± 6.04	4.92 ± 0.45
AA	3.13	1.90 ± 0.60	15.31 ± 0.94	3.13 ± 1.34	2.82 ± 0.46	13.35 ± 3.76	4.16 ± 0.51
	6.25	1.43 ± 0.36	13.84 ± 0.73	3.61 ± 0.86	5.91 ± 0.38	14.54 ± 0.93	4.34 ± 0.29
	12.5	1.43 ± 0.46	20.74 ± 4.38 ¹⁾	4.10 ± 0.80	7.71 ± 0.89	16.33 ± 6.60	4.66 ± 0.86

注: 与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.4 AA 对 MDCK 细胞形态学的影响 通过扫描电镜观察显示, 空白对照组 MDCK 融合呈片状生长, 细胞结构紧密, 在顶端可见树枝状的细小微绒毛; AA $3.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组与空白对照组相比, 细胞结构上未见明显差别 (细胞单层上的裂纹系因制片过程中冷冻干燥所致); AA $6.25, 12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞单层表面出现大量的小球状物体, 细胞单层变得不完整, 有的地方因细胞脱落而有微孔滤膜显露, 提示药物对 MDCK 细胞造成了不同程度的毒性损伤, 见图 1。

4 讨论

中药的肾脏毒性研究一直是目前医药界关注的热点问题。有关肾毒性中药的发现大多来源于临床, 传统实验研究中对毒性的判定主要是通过动物实验, 虽然其能够比较综合全面的反映药物对机体的影响, 但肾脏巨大的储备与代偿功能常会掩盖其功能障碍的迹象, 造成早期诊断的困难。近几年, 药



A. 空白对照 ($\times 6.0 \text{ K}$); B. AA $3.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\times 3.5 \text{ K}$);
C. AA $6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\times 3.5 \text{ K}$); D. AA $6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\times 300$);
E. AA $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\times 3.5 \text{ K}$); F. AA $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($\times 300$)

图 1 扫描电镜下观察 AA 对 MDCK 的影响

物的安全性评价已由传统的单一整体动物试验发展到体内体外试验相结合、高剂量测试向低剂量测试转变、低通量向高通量筛选转变和群体研究向个体研究转变的新模式, 选用体外模型研究药物毒性问题被越来越广泛的采用^[4-6]。

目前, 检测药物对细胞是否具有毒性的最常用

方法是噻唑蓝(MTT)法,其原理是活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物并沉积在细胞内^[7]。卢永科^[8]等利用 MTT 试验建立了基于原代培养的肝、肾细胞的药物短期毒性筛选方法,证实此方法灵敏便捷,且能清晰地反映不同药物肾毒性的差异。

然而,对于药物早期毒性的检测,MTT 法尚存在一定的局限性。理论上,药物可造成单个肾小管上皮细胞坏死、凋亡、非致命性伤害和未受伤害 4 种不同的后果^[9]。其中,非致命性损害,可致肾小管上皮细胞极性丧失及单向离子转运功能受损,细胞与细胞间、细胞与细胞基质间黏附能力下降^[10]。继而细胞间隙加大,完整细胞单层的屏障作用减弱,可造成原本不能透过细胞层的物质漏出。本研究中,在 AA 6.25, 12.5 mg·L⁻¹ 剂量下,荧光素钠经 MDCK 细胞单层的透过率明显增加,且呈现剂量依赖性,表明细胞单层的完整性受到破坏,提示药物对细胞产生了一定的毒性,且其损伤程度随药物剂量的增加而加大,呈现一定的毒性-剂量关系。扫描电镜观察结果也显示,这 2 个剂量组的细胞单层表面出现大量的小球状物体,其可能是受损细胞在电镜制片过程中产生皱缩或形成的细胞碎片。此外,细胞单层变得不完整,有的地方因细胞脱落而有微孔滤膜显露,AA 12.5 mg·L⁻¹ 剂量组明显严重于 AA 6.25 mg·L⁻¹ 剂量组。因而电镜结果进一步证实了 AA 对 MDCK 细胞单层造成了毒性损伤。值得注意的是,在 MTT 试验中,AA 6.25 mg·L⁻¹ 并没有表现出对 MDCK 细胞生长的抑制,但我们利用微孔滤膜培养的细胞单层模型,通过荧光素钠通透性检测和电镜观察到该剂量的 AA 能够在一定程度上引起肾小管上皮细胞的损伤,提示该检测方法比 MTT 法更为灵敏。Obatomi^[11] 等认为,细胞内酶的漏出是肾小管受损最为敏感的标志之一。ALP, γ -GT 是肾小管上皮细胞分泌的特异性酶,药物等造成的肾小管毒性损伤,可表现为 ALP 和 γ -GT 等酶的漏出增加^[12-13]。笔者在对细胞单层两侧的酶学检测中,并没有发现 AA 各剂量组对 ALP 和 γ -GT 的分泌造成影响,仅在 AA 12.5 mg·L⁻¹ 剂量组细胞两侧分泌的 LDH 活性较对照组明显增高。LDH 是细胞损伤的一种非特异性的标志酶,它的升高提示细胞膜受到破坏。有文献报道认为^[9],受损近端肾小管的 LDH 检测敏感性高于 ALP,这与笔者的结果相符合。同时,这一结果也提示相对于荧光素钠通透性试验等细胞单层完整性的检测而言,活性酶的漏出检测并

不是判断肾小管毒性损伤更为灵敏的指标。

药物肾毒性的机制十分复杂,是通过影响细胞内外环境,引起细胞结构、功能等方面的改变,导致细胞损伤。本研究通过对细胞结构(细胞单层完整性)与细胞功能(活性酶的分泌)两方面的观察,初步证实建立在微孔滤膜上的 MDCK 细胞单层,可以用于药物肾毒性的早期检测,且较某些传统方法具有更高的灵敏性,值得进一步探索。

[参考文献]

- [1] Ludwig T, Riethmuller C, Gekle M, et al. Nephrotoxicity of platinum complexes is re-lated to basolateral organic cation transport [J]. *Kidney Int.* 2004,66(1):196.
- [2] Jan C R, Wang J L, Chou K J, et al. NPC-14686, a novel anti-inflammatory agent, increased intracellular Ca²⁺ concentrations in MDCK renal tubular cells [J]. *Int J Immunopharmacol*, 2000,22(11):915.
- [3] 刘庆,王旗,杨秀伟,等. 基于 MDCK II 细胞的中药成分体外肾毒性评价 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2007,21(6):521.
- [4] 戴伟,顾光,高芑,等. 原代肝、肾细胞培养在保健食品原料毒性筛选中的应用 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2010,22(3):233.
- [5] 闫长会. 肾近端小管细胞系在药物肾毒性评价中的应用 [J]. *国外医学:药学分册*, 2003,30(4):234.
- [6] 回连强,高双荣,刘婷,等. 款冬花及其总生物碱的肝脏毒性 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(4):238.
- [7] 杨吉成,宋礼华,周建华,等. *医用细胞工程* [M]. 2 版. 上海:上海交通大学出版社, 2003:129.
- [8] 卢永科,李秋娟,宫德正,等. 利用原代培养细胞进行药物短期毒性筛选方法的建立 [J]. *卫生毒理学杂志*, 2003,17(2):112.
- [9] 王金泉,刘志红. 细胞凋亡与肾小管上皮细胞损伤 [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 1997,6(3):249.
- [10] Kroshian V M, Sheridan A M, Lieberthal W. Functional and cytoskeletal change induced by sublethal injury in proximal tubular cell [J]. *Am J Physiol*, 1994,266:F21.
- [11] Obatomi D K, Bach P H. Exposure of fresh rat renal fragments and continuous cell lines to atractyloside [J]. *Arch Toxicol*, 1996,71(1/2):93.
- [12] Van der Harst M R, Bull S, Laffont C M, et al. Gentamicin nephrotoxicity-a comparison of *in vitro* findings with *in vivo* experiments in equines [J]. *Vet Res Commun*, 2005,29(3):247.
- [13] 张娜,谢鸣. 龙胆泻肝汤中美木通配伍的肾毒性研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2006,12(5):58.

[责任编辑 何伟]