

CoCl₂ 诱导 NRK-52E 细胞 EMT 模型的建立

倪 蕾,孙晴晴,程姜瑞,魏 伟,王 春

(安徽医科大学药学科学学院,合肥 230032)

摘要 目的 二氯化钴 (CoCl₂) 体外诱导大鼠肾小管上皮细胞 (NRK-52E) 上皮-间充质转化 (EMT) 细胞模型的建立方法。

方法 体外培养 NRK-52E 细胞,随机分为空白对照组 (NC 组) 和 CoCl₂ 处理组。CoCl₂ 处理组分别进行 1、2、3、4 个循环的处理,每个循环包括 CoCl₂ 处理 9 h 后于无 CoCl₂ 培养基中恢复 3 h。采用 CCK-8 法筛选 CoCl₂ 诱导 EMT 的最佳浓度和时间;通过光学显微镜和鬼笔环肽染色观察细胞形态学变化;采用 Western blot 和免疫荧光法检测 EMT 标志蛋白的表达水平。**结果** 与 NC 组相比,100 μmol/L CoCl₂ 刺激 48 h 显著诱导细胞凋亡 ($P < 0.01$),符合后续实验要求。Western blot 结果显示,100 μmol/L CoCl₂ 处理 NRK-52E 细胞 9 h 后,于无 CoCl₂ 培养基中恢复 3 h,重复 3 个循环,缺氧诱导因子-1α (HIF-1α) 和 α-平滑肌肌动蛋白 (α-SMA) 的表达升高 ($P < 0.001$),表明细胞纤维化反应最为明显。通过光学显微镜和罗丹明标记的鬼笔环肽染色观察,100 μmol/L CoCl₂ 处理 NRK-52E 细胞 9 h 后,于无 CoCl₂ 培养基中恢复 3 h,重复 3 个循环,NRK-52E 细胞的形态学变化和细胞骨架重排最为显著,模型稳定性最佳。免疫荧光检测结果显示,与 NC 组相比,100 μmol/L CoCl₂ 处理 NRK-52E 细胞 9 h 后,于无 CoCl₂ 培养基中恢复 3 h,重复 3 个循环,纤维基质蛋白 Collagen I 的荧光强度增加 ($P < 0.001$)。**结论** 100 μmol/L CoCl₂ 处理 NRK-52E 细胞 9 h 后于无 CoCl₂ 培养基中恢复 3 h,重复 3 个循环,可成功建立体外 EMT 细胞模型。

关键词 NRK-52E 细胞;二氯化钴;上皮-间充质转化;缺氧诱导因子-1α;α-平滑肌肌动蛋白

中图分类号 R 963

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)10-1879-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.10.014

慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 是一种由多种致病因素引起的全球性健康问题^[1]。全球超过 13% 的人群患有不同程度的 CKD,其中大部分患者最终会发展为终末期肾病 (end-stage renal disease, ESRD),需依赖透析或肾脏移植维持生命,给社会和家庭带来了沉重的经济负担^[2]。肾脏损伤的常见诱因包括组织缺氧、肾毒性药物及尿路梗阻等,而肾小管间质纤维化是不同损伤诱因导致的 CKD 进展至后期的共同病理特征^[3-4]。其中,上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是纤维化的重要特征之一。在 EMT 过程中,间充质标志蛋白如 α-平滑肌肌动蛋白 (α-smooth muscle actin, α-SMA) 和纤维基质蛋白 (主要为 I 型胶原蛋白) 的表达水平显著升高^[5]。在临床上,缺氧不仅是急性肾损伤的主要诱因,也对 CKD 的进展具有重要影响。体外实验中,常用二氯化钴 [Cobalt (II) chloride, CoCl₂] 模拟缺氧环境,其机制是

通过二价钴离子诱导缺氧诱导因子-1α (hypoxia-inducible factor-1α, HIF-1α) 的表达,而反复的 CoCl₂ 诱导可触发 EMT^[5]。基于此,本研究通过 CoCl₂ 诱导大鼠肾小管上皮细胞 (rat renal tubular epithelial cells line, NRK-52E),构建了 EMT 细胞模型,旨在为临床研究肾脏纤维化的治疗提供可靠的体外研究方法^[6]。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 NRK-52E 大鼠肾小管上皮细胞系 NRK-52E 购自武汉普诺赛生命科技有限公司,用含有 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素混合液的 DMEM 培养基,在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养。

1.1.2 主要试剂和仪器 CoCl₂ (美国 Sigma 公司);Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒 (武汉贝博生物公司);α-SMA、β-actin 一抗 (美国 Affinity 公司);Collagen Type I (武汉爱博泰克公司);罗丹明标记鬼笔环肽 (上海翌圣生物公司);HIF-1α 一抗、生物素标记的山羊抗兔 IgG 二抗和 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG (美国 Proteintech 公司);

2025-07-03 接收

基金项目:安徽省重点研究与开发计划项目 (编号:2023s07020003)

作者简介:倪 蕾,女,硕士研究生;

王 春,男,副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:wang-chun@ahmu.edu.cn

自动化学发光图像分析系统(上海 Tanon 公司); BioTek Elx × 808 酶标仪(美国 BioTek 公司); 光学显微镜、激光共聚焦成像显微镜(德国 Leica 公司); 艾本德离心机(德国 Eppendorf 公司); Cytoflex 十色流式细胞仪(美国 Bectman Coulter 公司)。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 确定 CoCl_2 诱导 EMT 模型的浓度

使用 0.25% 胰酶将 NRK-52E 细胞消化下来,取 96 孔培养板,每孔加入 100 μL 含有 5×10^3 个 NRK-52E 细胞的悬液,继续在细胞培养箱(37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2)中培养 24 h,等待细胞密度达到 80% ~ 85%。将原本 96 孔板中的培养基弃去,用 PBS 作为溶剂配制成不同浓度的 CoCl_2 (50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$)和溶剂对照组处理不同时间(0、6、12、24、48 h)。加药继续培养时间点到达前 1 h,将 96 孔板放入细胞超净台中,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,放回细胞培养箱继续培养 1 h,最后使用自动酶标仪在 450 nm 处测量每孔吸光度。每次设置 3 个平行组进行检测,重复实验 3 次。

1.2.2 CoCl_2 对 NRK-52 细胞凋亡的影响 使用 0.25% 胰酶将 NRK-52E 细胞消化下来,取 6 孔培养板,每孔加入 2 mL 含有 2×10^4 个 NRK-52E 细胞的悬液,继续在细胞培养箱(37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2)中培养 24 h,等待细胞密度达到 80% ~ 85%。将原本 6 孔板中的培养基弃去,每孔加入 2 mL 含有 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 的培养基,分别继续培养不同时间(0、6、12、24、48 h)。在加药后继续培养到相应时间点,用不含 EDTA 胰酶消化收集细胞,1 000 r/min、4 $^\circ\text{C}$,离心 5 min;用冷 PBS 洗涤 2 次;再用 400 μL $1 \times$ Annexin V 结合液重新悬浮细胞,再加入 5 μL Annexin V-FITC 染色液轻混后 4 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 15 min;最后加入 5 μL PI 染色液 4 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 3 min;用流式细胞仪 488 nm 波长检测荧光,以确定细胞凋亡。各组均重复实验 3 次。

1.2.3 光学显微镜和罗丹明标记鬼笔环肽染色观察 NRK-52E 细胞形态及细胞骨架的变化 使用 0.25% 胰酶将 NRK-52E 细胞消化下来,取 6 孔培养板,每孔加入 2 mL 含有 2×10^4 个 NRK-52E 细胞的悬液,继续在细胞培养箱(37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2)中培养 24 h,等待细胞密度达到 80% ~ 85%。100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 9 h 后于无 CoCl_2 培养基中恢复 3 h 为 1 个循环组、2 个循环组、3 个循环组及 4 个循环组,用光学显微镜观察各组 NRK-52E 细胞形态变化。使用 0.25% 胰酶将 NRK-52E 细胞消化下来,取用无

水乙醇消毒过的 14 mm 细胞爬片铺放在 24 孔培养板,事先用移液器加入 20 μL 的无菌 PBS 缓冲液,便于爬片更好地吸附在 24 孔培养板的板底。每孔加入 500 μL 含有 5×10^3 个 NRK-52E 细胞的悬液,继续在细胞培养箱(37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2)中培养 24 h,等待细胞密度达到 60% ~ 80%。分组为 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 9 h 后于无 CoCl_2 培养基中恢复 3 h 为 1 个循环、2 个循环、3 个循环及 4 个循环。培养至相应时间,用 4% 多聚甲醛固定 10 min,0.25% Triton X-100 通透 5 min,每孔加入 200 μL 100 nmol/L 罗丹明鬼笔环肽工作液,避光条件下室温孵育 30 min。用含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂封片、干燥、激光共聚焦成像显微镜拍照,采集图像。

1.2.4 免疫荧光化学方法检测 Collagen I 在 NRK-52E 细胞中表达水平 使用 0.25% 胰酶将 NRK-52E 细胞消化下来,取用无水乙醇消毒过的 14 mm 细胞爬片铺放在 24 孔培养板,事先用移液器加入 20 μL 的无菌 PBS 缓冲液,便于爬片更好地吸附在 24 孔培养板的板底。每孔加入 500 μL 含有 5×10^3 个 NRK-52E 细胞的悬液,继续在细胞培养箱(37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2)中培养 24 h,等待细胞密度达到 60% ~ 80%。分组为 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 9 h 后于无 CoCl_2 培养基中恢复 3 h 为 1 个循环、2 个循环、3 个循环及 4 个循环。培养至相应时间,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,0.5% BSA 室温封闭 15 min,0.25% Triton X-100 通透 5 min,加入 Collagen I 一抗(1 : 200),4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜;Alexa Fluor 488 标记的山羊抗兔 IgG(1 : 200)避光,室温孵育 2 h。用含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂封片、干燥、激光共聚焦成像显微镜拍照,采集图像。

1.2.5 NRK-52E 细胞 EMT 模型的建立 通过实验确定 CoCl_2 最佳终浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$,并采用 Western blot 法验证了 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 NRK-52E 细胞 9 h 后,于无 CoCl_2 培养基中恢复 3 h,重复 3 个循环可显著诱导细胞纤维化反应。具体建模操作如下:首先,使用 0.25% 胰酶消化 NRK-52E 细胞,接种于 6 孔培养板中,每孔加入 2 mL 含有 2×10^4 个 NRK-52E 细胞的悬液,置于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中培养 24 h,待细胞密度达到 70% ~ 80%。100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 9 h 后于无 CoCl_2 培养基中恢复 3 h 为 1 个循环组、2 个循环组、3 个循环组及 4 个循环组。集各组细胞,加入预冷的细胞裂解液(RIPA:蛋白酶抑制:磷酸酶抑制剂=98:1:1)提取蛋白,采用 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋

白,转膜,5%脱脂奶粉室温封闭,加入一抗(α -SMA和HIF-1 α ,比例为1:1 500)4℃孵育过夜,二抗按1:10 000孵育2 h,通过发光成像分析仪显影,最后使用Image J软件对蛋白条带进行分析。

1.3 统计学处理 用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析。数值结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CoCl₂ 诱导 EMT 模型的浓度确定 CCK-8 结果显示,与0 h相比,50 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂ 刺激的 NRK-52E 细胞在24 h和48 h活性明显下降(0 h组:均数 = 10.5,标准差 = 2.1;24 h组:均数 = 15.3,标准差 = 1.8; $t = 18.99$, $P < 0.01$; $F = 25.6$, $P < 0.01$);与0 h组相比,100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂ 刺激的 NRK-52E 细胞在24 h和48 h活性明显下降(24 h组:均数 = 18.7,标准差 = 2.0; $t = 19.23$, $P < 0.01$; $F = 37.5$, $P < 0.01$);与0 h组相比,100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂ 刺激的 NRK-52E 细胞在12 h活性明显下降(12 h组:均数 = 16.8,标准差 = 1.9; $t = 17.14$, $P < 0.01$; $F =$

22.3, $P < 0.01$)。100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂ 刺激48 h的细胞活力符合后续实验要求。见图1。

2.2 CoCl₂ 对 NRK-52 细胞凋亡的影响 用流式细胞仪进行细胞凋亡率的检测。与0 h相比,100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂ 刺激在12 h处已出现明显的细胞凋亡率上升(0 h组:均数 = 12.5,标准差 = 2.0;12 h组:均数 = 18.3,标准差 = 2.0; $t = 5.99$, $P < 0.01$; $F = 15.6$, $P < 0.01$),随着刺激时间的增加,细胞凋亡率持续升高。刺激48 h后细胞存活率在50%左右符合后续实验要求。见图2。

2.3 NRK-52E 细胞 EMT 模型的建立 通过Western blot 分析显示,CoCl₂能诱导 NRK-52E 细胞纤维化反应,其中100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂ 处理 NRK-52E 细胞9 h后,于无 CoCl₂ 培养基中恢复3 h,重复3个循环组的诱导效果最为显著。与NC组相比,该处理组HIF-1 α 和 α -SMA的表达显著升高,差异有统计学意义(NC组:均数 = 9.0,标准差 = 1.8;3个循环处理组(HIF-1 α):均数 = 16.5,标准差 = 2.0;3个循环处理组(α -SMA):均数 = 20.2,标准差 = 1.9; $t = 5.235$, $P < 0.001$; $F = 48.9$, $P < 0.001$)。此外,该处理组模型稳定性最佳,适合用于后续实验研究。见图3。

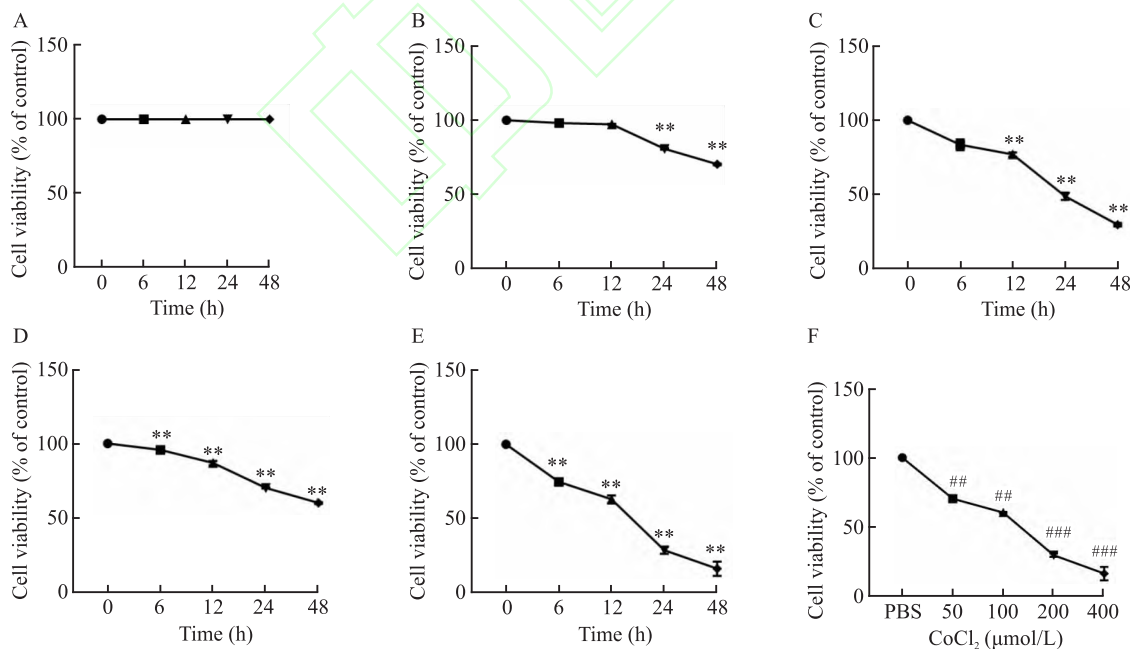


图1 CoCl₂ 诱导 EMT 模型的浓度确定($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig.1 Determination of the concentration of CoCl₂ in the EMT induction model ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

A: Cell viability at different time point after the treatment with PBS; B-E: Cell viability at different time point after the stimulation with 50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂; F: Cell viability at 48 h after the stimulation with different concentrations of CoCl₂; * $P < 0.01$ vs 0 h group; # $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs PBS group.

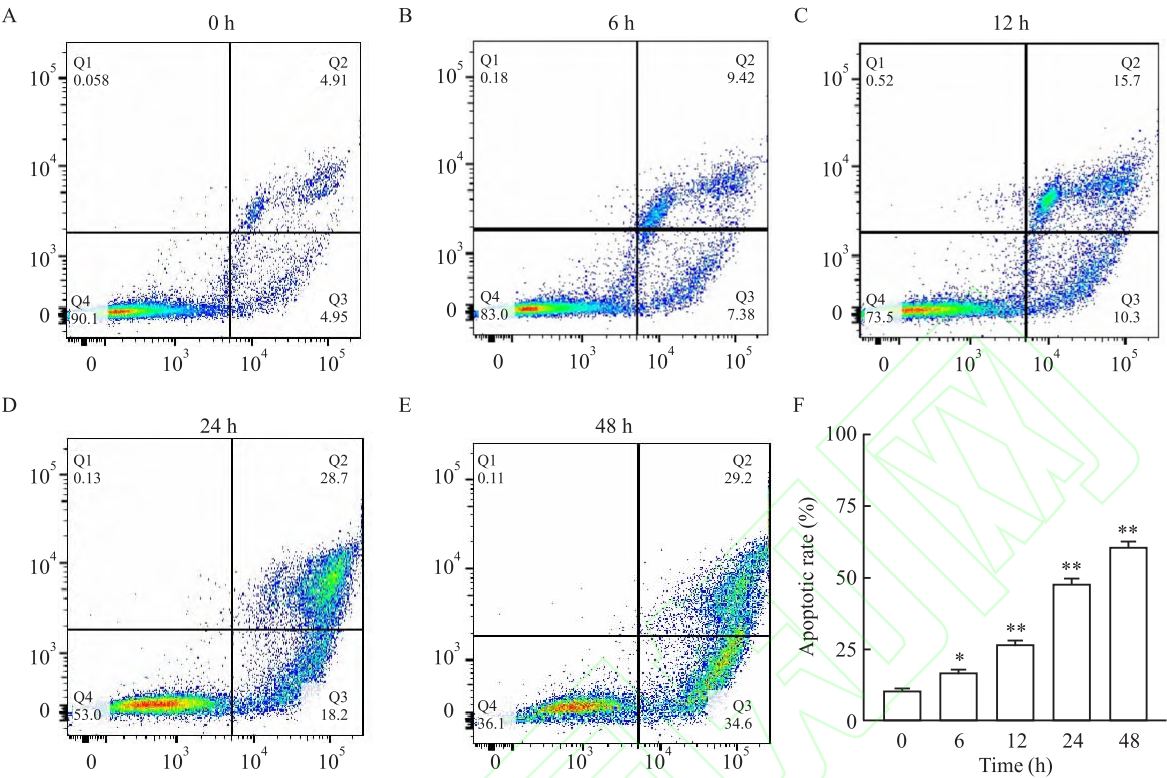


图2 CoCl₂对NRK-52细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.2 The effects of CoCl₂ on the apoptosis of NRK-52 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A-E; The effects of 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂ stimulation on the apoptosis of NRK-52E at 0,6,12,24 and 48 h; F; Analysis of the apoptosis of NRK-52E at different time points after the stimulation with 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl₂; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 h group.

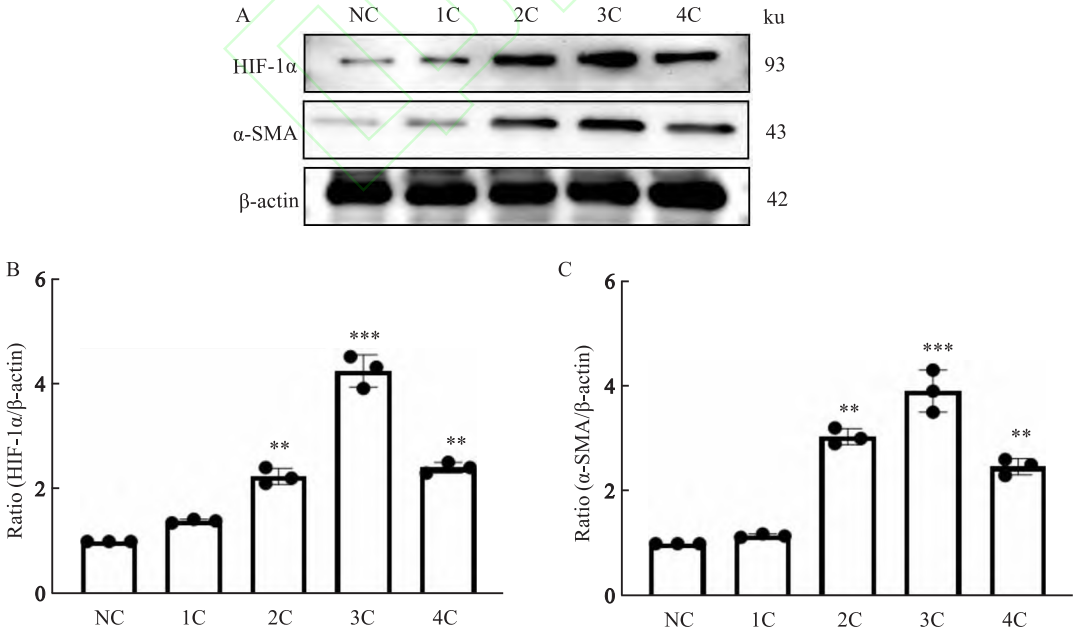


图3 NRK-52E细胞EMT模型的建立($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig.3 Establishment of NRK-52E cell EMT model ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

A; Western blot analysis of HIF-1 α and α -SMA protein expression in NRK-52E cells induced by different CoCl₂ treatment cycles; B; Quantitative analysis of HIF-1 α expression in NRK-52E cells induced by different CoCl₂ treatment cycles; C; Quantitative analysis of α -SMA expression in NRK-52E cells induced by different CoCl₂ treatment cycles; 1C:1 cycle; 2C:2 cycles; 3C:3 cycles; 4C:4 cycles; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs NC group.

2.4 光学显微镜和罗丹明标记鬼笔环肽染色观察 NRK-52E 细胞形态及细胞骨架的变化 通过光学显微镜观察 NRK-52E 细胞形态,与 NC 组相比,在 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 NRK-52E 细胞 9 h 后,于无 CoCl_2 培养基中恢复 3 h,重复 3 个循环后细胞形态变化明显,细胞形态由鹅卵石样形态往梭形变化,细胞间黏附力下降,细胞间隙增宽,极性消失,排列紊乱,部分细胞体积增大,部分细胞胞体伸长,呈现成纤维化表型。而 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 NRK-52E 细胞 9 h 后,于无 CoCl_2 培养基中恢复 3 h,重复 4 个循环后,能明显观察到大部分细胞丧失正常形态。通过丹明标记鬼笔环肽染色结果可知,100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 NRK-52E 细胞 9 h 后,于无 CoCl_2 培养基中恢复 3 h,重复 3 循环后细胞形态变化明显,与 NC 组相比,部分细胞肌动蛋白应力纤维则是杂乱无章的,重组为更粗和更成束的应力纤维,部分细胞呈纺

锤或梭形,呈现出明显 EMT 的特征。而 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 NRK-52E 细胞 9 h 后,于无 CoCl_2 培养基中恢复 3 h,重复 4 个循环后,大部分细胞丧失正常形态。见图 4。

2.5 免疫荧光化学方法检测 Collagen I 在 NRK-52E 细胞中荧光表达水平 通过免疫荧光染色检测 Collagen I 的荧光表达,与 NC 组相比,在 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 9 h 后于无 CoCl_2 培养基中恢复 3 h 处理 1 个循环,Collagen I 荧光强度差异无统计学意义;与 NC 组相比,100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 NRK-52E 细胞 9 h 后,于无 CoCl_2 培养基中恢复 3 h,重复 3 个循环,Collagen I 荧光强度差异有统计学意义 (NC 组:均数 = 8.0,标准差 = 1.5;3 个循环处理组:均数 = 14.2,标准差 = 1.7; $t = 4.533, P < 0.001; F = 42.3, P < 0.001$)。见图 5。

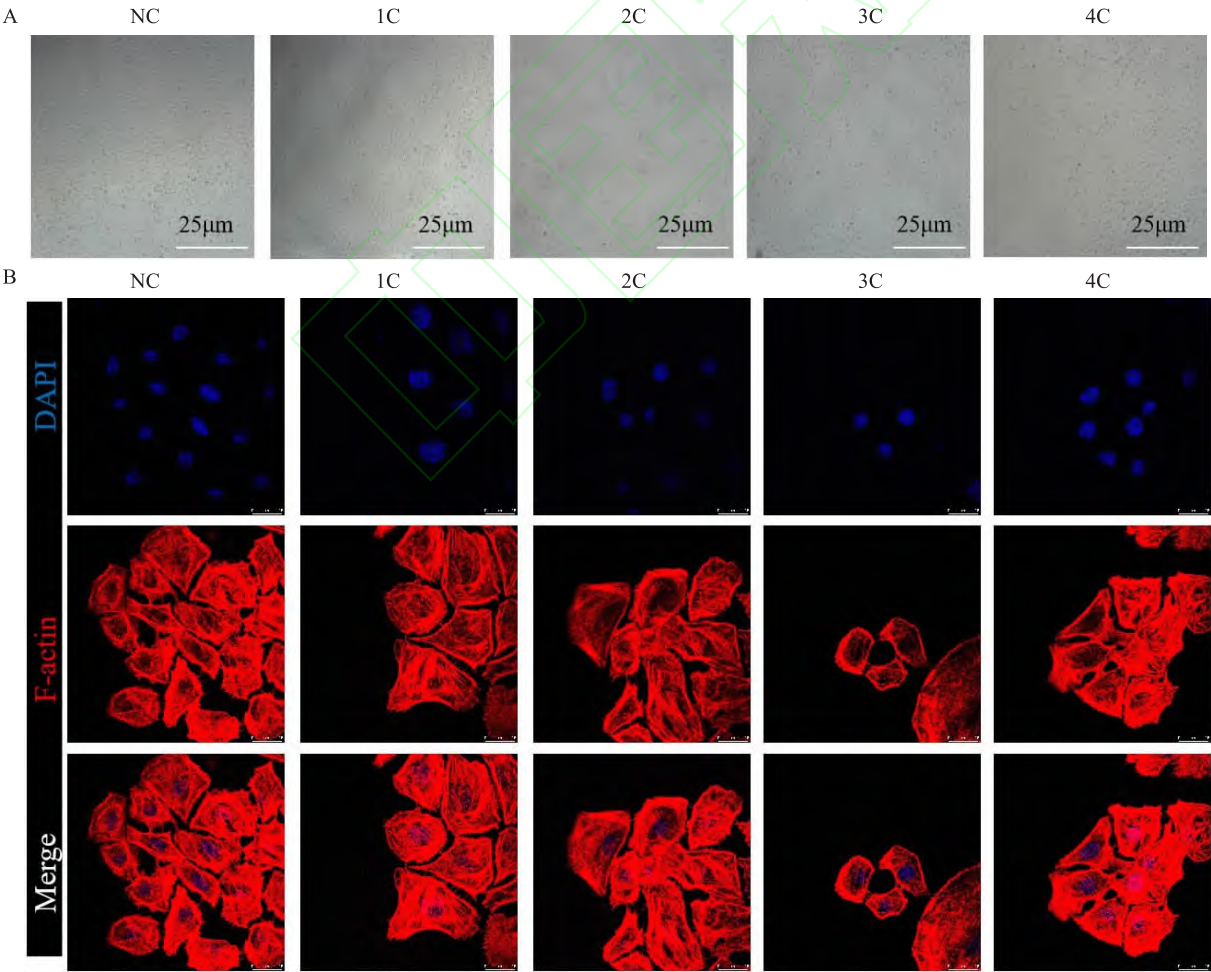


图 4 光学显微镜和罗丹明标记鬼笔环肽染色观察 NRK-52E 细胞形态及细胞骨架的变化 ($n = 3$)

Fig.4 NRK-52E cells were stained with rhodamine to observe the morphology and cytoskeleton changes under optical microscope ($n = 3$)
A: Optical microscopy images of NRK-52E cells undergoing morphological changes during different CoCl_2 stimulation cycles (scale bar = 25 μm);
B: Laser confocal observation of rhodamine-labeled phalloidin-stained cytoskeletal changes in NRK-52E cells (scale bar = 25 μm), blue indicating DAPI staining, red representing rhodamine-labeled phalloidin; 1C: 1 cycle; 2C: 2 cycles; 3C: 3 cycles; 4C: 4 cycles.

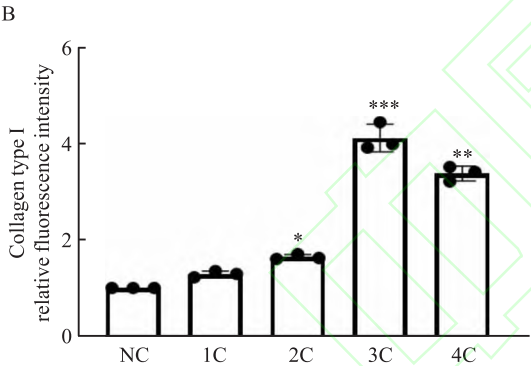
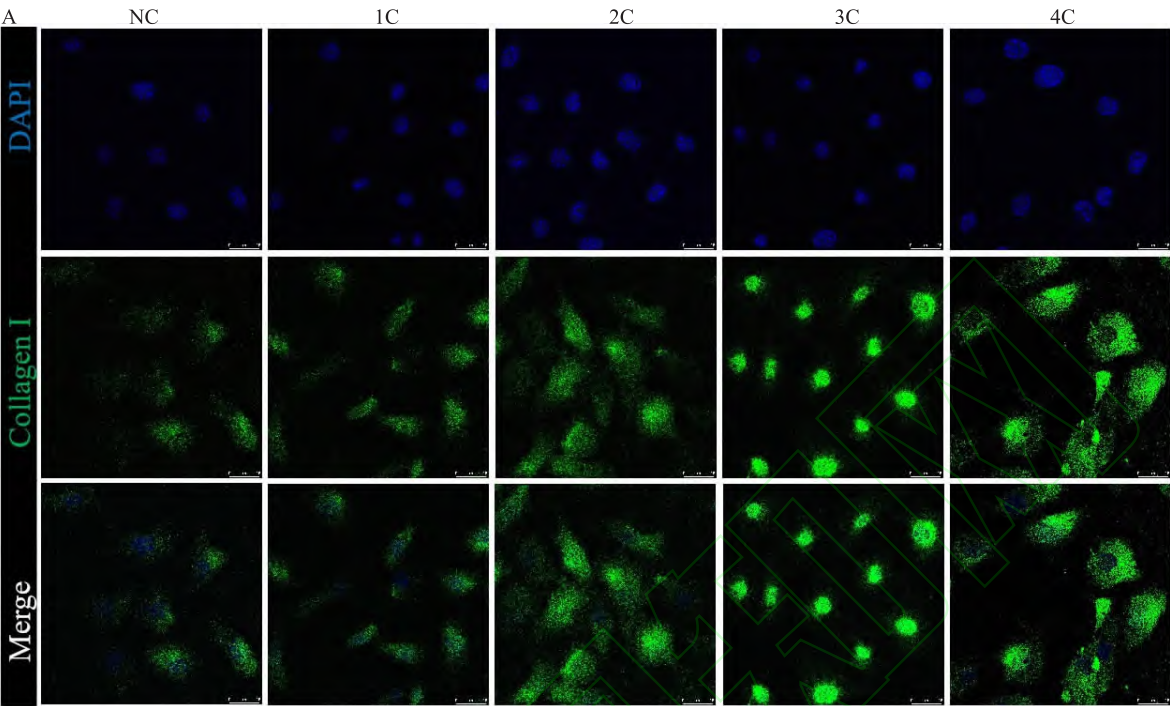


图5 免疫荧光化学方法检测 Collagen I 在 NRK-52E 细胞中荧光表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Immunofluorescence chemiluminescence assay for the detection of Collagen I fluorescence expression in NRK-52E cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

A: Laser-focused observation of fluorescent expression of Collagen I (scale bar = 25 μm); Blue: DAPI staining; Green: Collagen I positive staining; B: Quantitative analysis of relative fluorescence intensity of Collagen I; 1C: 1 cycle; 2C: 2 cycles; 3C: 3 cycles; 4C: 4 cycles; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs NC group.

3 讨论

建立缺氧细胞模型是研究缺氧性疾病及其他导致组织缺氧的疾病的重要研究手段。众多疾病都会导致组织和细胞缺氧,而缺氧又可能促进疾病的发展^[7-8]。体外模拟缺氧环境,诱导细胞缺氧常用 CoCl_2 ,其机制是二价钴离子可诱导细胞 HIF-1 α 表达^[9-10]。HIF-1 α 是目前研究发现在缺氧环境下还能发挥活性的核转录因子,是维持细胞内氧稳态的关键因子,而 CoCl_2 反复诱导可引起 EMT。研究^[11]表明,肾小管上皮细胞受损可引起 EMT 过程,使其失去上皮细胞特有的表型,获得间质细胞表型,并且分泌大量的促纤维化因子诱导成纤维细胞,最终促进肾小管间质纤维化的发生和发展。本研究以此为依据将 NRK-52E 细胞暴露于 CoCl_2 作用条件下观察细胞在反复缺氧复氧(hypoxia and reoxygenation,

H/R)条件下的生物学变化。

细胞是生物体的基本结构和功能单位,细胞缺氧在全身各系统疾病的发生和发展中扮演着重要角色。体外培养细胞具有操作简单和重复性好等优点,因此,建立细胞缺氧性模型成为研究此类疾病的关键方法和基本手段。主要分为以下3种,化学性缺氧(CoCl_2)、物理性缺氧和混合气体培养法^[12],相比于化学性缺氧,操作简便,物理性缺氧的方法类似于体内的低张性缺氧,但其有成本较高和难以控制缺氧程度等的缺点;混合气体培养法用到的三气培养箱是最常见且理想的装置,能够精确控制各气体参数,但是在打开和关闭培养箱后,气体达到平衡所需时间较长,可能会导致缺氧环境变化,而且设备成本较高。 CoCl_2 诱导的缺氧细胞模型在众多研究领域中具有广泛应用,转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- β , TGF- $\beta 1$) 通过激活 Smad 依赖通路

可直接诱发肾小管上皮细胞发生 EMT 过程^[13-14], 而 CoCl_2 通过模拟缺氧(HIF-1 α 途径)诱发 EMT 过程,更加适用于研究缺氧微环境相关的病理过程,如肿瘤转移或纤维化^[15-16]。本模型中, CoCl_2 诱导的 α -SMA 上调速度显著快于 TGF- β 1 组,提示其可能更适合 EMT 过程研究。

通过 CCK-8 实验和流式细胞术,确定了 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 48 h 可诱导 NRK-52E 细胞凋亡,符合后续实验要求。光学显微镜、罗丹明标记鬼笔环肽染色、蛋白免疫印迹和免疫荧光检测结果提示, NRK-52E 细胞形态及细胞骨架的变化在 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 NRK-52E 细胞 9 h 后于无 CoCl_2 培养基中恢复,3 h 处理 3 个循环细胞模型中最稳定。这一结果与文献^[7]报道一致, CoCl_2 通过诱导 HIF-1 α 表达模拟缺氧环境,进而诱导 EMT 过程。HIF-1 α 和 α -SMA 的表达显著升高,提示缺氧信号通路在 EMT 过程中发挥关键作用。

与现有的 CoCl_2 刺激方法相比,本研究采用 100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 NRK-52E 细胞 9 h 后于无 CoCl_2 培养基中恢复 3 h,处理 3 个循环方法具有更高的稳定性和时间效率。然而,本研究仍存在一些局限性:首先,仅探讨了 CoCl_2 对纤维化蛋白的影响,未深入研究其下游信号通路;其次,研究仅限于细胞实验,未在动物模型中进行验证。未来研究可进一步探讨 CoCl_2 诱导的 EMT 机制。

本研究通过 CoCl_2 诱导 NRK-52E 细胞建立了稳定的 EMT 模型,揭示了 CoCl_2 对肾小管上皮细胞纤维化的影响。结果表明,100 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理 NRK-52E 细胞 9 h 后,于无 CoCl_2 培养基中恢复 3 h,重复 3 个循环可显著诱导 HIF-1 α 和 α -SMA 的表达,促进纤维基质蛋白的沉积,为肾脏纤维化的研究提供了新的实验方法。

参考文献

- [1] Adameczak M, Surma S. Metabolic acidosis in patients with CKD: epidemiology, pathogenesis, and treatment [J]. *Kidney Dis*, 2021, 7(6): 452-67. doi:10.1159/000516371.
- [2] Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(12): 684-96. doi:10.1038/nrneph.2011.149.
- [3] Kaissling B, Lehir M, Kriz W. Renal epithelial injury and fibrosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(7): 931-9. doi:10.1016/j.bbadis.2013.02.010.
- [4] Brown S, Garcia Sanchez J J, Guiang H, et al. IMPACT CKD: holistic disease model projecting 10-year population burdens[J]. *Kidney Int Rep*, 2024, 9(11): 3156-66. doi:10.1016/j.ekir.2024.08.015.
- [5] Wang Y, Wu Z, Tian J, et al. Intermedin protects HUVECs from ischemia reperfusion injury via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Ren Fail*, 2019, 41(1): 159-66. doi:10.1080/0886022X.2019.1587468.
- [6] Shen W, Huang H, Xue J, et al. Stevioside inhibits lipopolysaccharide-induced epithelial-to-mesenchymal transition of NRK-52E cells by PPAR γ activation[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2022, 44(2): 287-94. doi:10.1080/08923973.2022.2039935.
- [7] 权晶晶, 凌均桢. 二氯化钴在体外细胞缺氧研究中的应用 [J]. *国际口腔医学杂志*, 2009, 36(4): 455-8. doi:10.3969/j.issn.1673-5749.2009.04.024.
- [7] Quan J J, Ling J Q. Application of cobalt chloride in cell hypoxia *in vitro* research [J]. *Int J Stomatol*, 2009, 36(4): 455-8. doi:10.3969/j.issn.1673-5749.2009.04.024.
- [8] Wang B, Li Z L, Zhang Y L, et al. Hypoxia and chronic kidney disease[J]. *EBioMedicine*, 2022, 77: 103942. doi:10.1016/j.ebiom.2022.103942.
- [9] Roehlen N, Crouchet E, Baumert T F. Liver fibrosis: mechanistic concepts and therapeutic perspectives [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 875. doi:10.3390/cells9040875.
- [10] Liu H, Li Y, Xiong J. The role of hypoxia-inducible factor-1 alpha in renal disease [J]. *Molecules*, 2022, 27(21): 7318. doi:10.3390/molecules27217318.
- [11] Manotham K, Tanaka T, Matsumoto M, et al. Transdifferentiation of cultured tubular cells induced by hypoxia [J]. *Kidney Int*, 2004, 65(3): 871-80. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00461.x.
- [12] 刘瑞清, 袁小澎. 缺氧诱导因子-1 α 参与肝纤维化形成机制研究进展 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2021, 24(1): 145-8. doi:10.3969/j.issn.1672-5069.2021.01.038.
- [12] Liu R Q, Yuan X P. Mechanism of hypoxia inducible factor-1 α involving in liver fibrosis [J]. *J Pract Hepatol*, 2021, 24(1): 145-8. doi:10.3969/j.issn.1672-5069.2021.01.038.
- [13] Yu X Y, Sun Q, Zhang Y M, et al. TGF- β /smad signaling pathway in tubulointerstitial fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 860588. doi:10.3389/fphar.2022.860588.
- [14] Masoud G N, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(5): 378-89. doi:10.1016/j.apsb.2015.05.007.
- [15] Han S, Jin R, Huo L, et al. HIF-1 α participates in the regulation of S100A16-HRD1-GSK3 β /CK1 α pathway in renal hypoxia injury [J]. *Cell Death Dis*, 2024, 15(5): 316. doi:10.1038/s41419-024-06696-5.
- [16] 陈绍龙, 魏翔, 王怡, 等. ESM-1 在低氧环境下胃腺癌细胞中的表达及意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(1): 23-7. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.005.
- [16] Chen S L, Wei X, Wang Y, et al. Expression and significance of ESM-1 in hypoxia-induced human gastric cancer cells [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2017, 52(1): 23-7. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.005.

Establishment of the EMT model of CoCl₂-induced NRK-52E cells

Ni Lei, Sun Qingqing, Cheng Jiangrui, Wei Wei, Wang Chun

(School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To establish an *in vitro* cell model of Cobalt dichloride (CoCl₂)-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in rat renal tubular epithelial cells (NRK-52E). **Methods** NRK-52E cells were cultured *in vitro* and randomly divided into a blank control group (NC group) and a CoCl₂ treatment group. The CoCl₂ treatment group underwent 1, 2, 3, and 4 cycles of treatment, with each cycle consisting of CoCl₂ treatment for 9 h followed by recovery in CoCl₂-free medium for 3 h. The optimal concentration and time of CoCl₂-induced EMT were screened using the CCK-8 assay. Morphological changes in cells were observed using light microscopy and phalloidin staining. The expression levels of EMT marker proteins were detected by Western blot and immunofluorescence. **Results** Compared with the NC group, stimulation by 100 μmol/L CoCl₂ for 48 h significantly induced apoptosis ($P < 0.01$), meeting the requirements for subsequent experiments. Western blot results showed that the expression of hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) and α-smooth muscle actin (α-SMA) significantly increased in the 3-cycle group treated with 100 μmol/L CoCl₂ for 9 h followed by recovery for 3 h ($P < 0.001$), indicating the most pronounced fibrotic response. Observations under light microscopy and rhodamine-labeled phalloidin staining revealed that the morphological changes and cytoskeletal rearrangement of NRK-52E cells were most significant in the 3-cycle group treated with 100 μmol/L CoCl₂ for 9 h followed by recovery for 3 h, demonstrating the best model stability. Immunofluorescence results showed that compared with the NC group, the fluorescence intensity of the fibrous matrix protein Collagen I significantly increased in the 3-cycle group treated with 100 μmol/L CoCl₂ for 9 h followed by recovery for 3 h ($P < 0.001$). **Conclusion** The protocol involves treating NRK-52E cells with 100 μmol/L CoCl₂ for 9 h, following 3 h of recovery in CoCl₂-free medium. Repeating this cycle three times can establish an *in vitro* EMT model.

Key words NRK-52E cells; Cobalt(II) dichloride; epithelial-mesenchymal transition; hypoxia – inducible factor-1α; α-smooth muscle actin

Fund program Key Research and Development Program of Anhui Province (No. 2023s07020003)

Corresponding author Wang Chun, E-mail: wangchun@ahmu.edu.cn

(上接第 1878 页)

SLE serum on IL-8 secretion by neutrophils. Using PADI4-specific inhibitor GSK484 in primary neutrophils, or in PADI4-knockdown neutrophil-like HL-60 cells (dHL-60), IL-8 stimulated by N-formyl-met-leu-phe (fMLP) or immune complexes (ICs) was detected. **Results** Compared with HC, IL-8 was significantly higher expressed in neutrophils of SLE patients. Serum IL-8 levels significantly increased in lupus patients and were positively correlated with serum IgM levels. Serum from SLE patients induced neutrophils to secrete more IL-8. PADI4 inhibitor could upregulate the production of IL-8 in neutrophils. In dHL-60 cells, knockdown of PADI4 led to a significant increase in IL-8 secretion. **Conclusion** The proinflammatory cytokine IL-8 is highly expressed in neutrophils and serum of SLE patients, regulated by PADI4 and correlated with lupus serological indicators. IL-8 plays a role in the development of SLE through inflammatory responses, and PADI4/IL-8 provides new thinking for SLE monitoring and therapy.

Key words systemic lupus erythematosus; interleukin 8; peptidylarginine deiminase 4; inflammation; neutrophils; cytokine

Fund program Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2024AH050787)

Corresponding author Zhou Qiang, E-mail: zhouqiang1973@163.com