

枸杞多糖对顺铂诱导人胚肾细胞凋亡的影响

郭培培, 高丽萍*, 冷洪涛, 郭卓雨, 鲁 政

(北京联合大学应用文理学院, 生物活性物质与功能食品北京市重点实验室, 北京 100191)

摘 要: 目的: 研究枸杞多糖(LBP)对顺铂(CDDP)所致人胚肾细胞(HEK293)凋亡的影响, 并探讨其可能机理。方法: 体外培养HEK293, 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法观察LBP对CDDP诱导HEK293细胞生长的影响, 流式细胞仪检测LBP对CDDP诱导HEK293细胞凋亡率的变化; Western blotting检测LBP对CDDP诱导HEK293细胞凋亡相关基因 *Bax*、*Bcl-2* 蛋白表达的影响。结果: LBP能够拮抗CDDP诱发的细胞毒性, 并且随着质量浓度的不同而产生变化。流式细胞仪检测表明随着LBP质量浓度的增加, 细胞凋亡率随之减少; Western blotting表明, 加入LBP后能够使 *Bax* 基因的表达减少而 *Bcl-2* 基因的表达增加。结论: LBP对CDDP诱导人胚肾细胞凋亡有抑制的作用, 其作用机理可能与其下调 *Bax* 及上调 *Bcl-2* 蛋白表达有关。

关键词: 顺铂; 枸杞多糖; 人胚肾细胞; 细胞凋亡

Effect of Polysaccharides from *Lycium barbarum* on Cisplatin-Induced Apoptosis of Human Embryonic Kidney Cells

GUO Pei-pei, GAO Li-ping*, LENG Hong-tao, GUO Zhuo-yu, LU Zheng

(Beijing Municipal Key Laboratory of Biologically Active Substances and Functional Food,
College of Arts and Sciences, Beijing Union University, Beijing 100191, China)

Abstract: This study aimed to explore the effect of polysaccharides from *Lycium barbarum* (LBP) on the cisplatin-induced apoptosis of human embryonic kidney cells and to investigate its possible mechanism. MTT method was used to observe the effect of LBP and cisplatin on the cell viability of HEK293 cells. CDDP-induced apoptosis was analyzed by flow cytometry and Western blotting was applied to determine the expression of apoptotic gene *Bax* and anti-apoptosis gene *Bcl-2*. LBP was able to antagonize cisplatin-induced cytotoxicity in a concentration-dependent manner. Flow cytometry revealed that increasing LBP concentrations led to a decrease in the apoptosis rate and pro-apoptotic *Bax* gene expression while anti-apoptotic gene *Bcl-2* expression was enhanced. LBP demonstrated a preventive effect on cisplatin-induced injury in EK293 cells. The mechanism may be related to its capacity of enhancing anti-apoptotic gene *Bcl-2* expression and inhibiting proapoptotic gene *Bax* expression.

Key words: cisplatin; LBP; HEK293; apoptosis

中图分类号: R318.0

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)07-0284-05

顺铂(*cis*-diamminedichloroplatinum, CDDP)是近些年临床上广泛应用的化疗药物, 对多种肿瘤具有较好的治疗效果, 但CDDP具有明显的毒副作用, 肾毒性是其临床应用受限制的主要因素, 目前有关CDDP肾毒性的机理还不十分清楚, 研究表明^[1], CDDP诱导的肾小管细胞凋亡在肾毒性中发挥着重要的作用, 枸杞多糖(*Lycium barbarum* polysaccharides, LBP)是枸杞的主要功能成分之一, 是酸性杂多糖蛋白质复合物, 分子质量为22~25kD, 具有良好的抗氧化、抗疲劳、抗辐射、降血糖等作用, 实验证明LBP能够有效的调节免疫、抗肿瘤, 抑制细胞凋亡并且对肾脏具有保护

作用^[2-4]。前期的研究显示枸杞多糖可明显抑制CDDP诱发的肾毒性^[5], 但其作用机制不明, 本研究采用CDDP诱发人胚肾细胞(HEK293)损伤, 通过检测LBP对HEK293细胞凋亡率、凋亡相关基因 *Bax*、*Bcl-2* 的影响, 探讨LBP在CDDP诱导HEK293细胞凋亡的作用及其作用机理。

1 材料与方法

1.1 试剂与药品

CDDP(注射用粉剂, 批号906015CF, 临用前用生

收稿日期: 2012-04-25

基金项目: 北京联合大学人才强校计划人才资助项目(20111101); 北京市人才强教深化计划项目(PHR201107150)

作者简介: 郭培培(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为功能性食品生化作用。E-mail: guopeipei29@126.com

*通信作者: 高丽萍(1962—), 女, 教授, 博士, 研究方向为功能性食品生化作用。E-mail: gaolip62@163.com

理盐水配制) 山东齐鲁制药厂; LBP(纯度 $\geq 90\%$, DMEM溶解后过滤除菌避光保存) 南京泽朗医药科技有限公司; 新生牛血清、DMEM培养液 美国Gibco公司; Bcl-2、Bax、 β -actin抗体、HRP标记山羊抗兔、山羊抗小鼠IgG(二抗) Santa Cruz-中杉金桥生物技术公司; 细胞凋亡检测试剂盒 宝赛生物制品; 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

FACS Calibur流式细胞仪 美国BD公司; Bio-Rad电泳仪 美国Bio-Rad公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

HEK293细胞由北京师范大学生命科学学院提供; 培养基为含双抗(100U/mL青霉素、100 μ g/mL链霉素)及10%新生牛血清的DMEM(含丙酮酸钠), 于37 $^{\circ}$ C、含5%CO₂的孵育培养箱中培养。取处于指数生长期的细胞用于实验。

1.3.2 CDDP对HEK293的毒性作用

将 1×10^5 个/mL 100 μ L处于对数生长的HEK293细胞接种到96孔板中, 待细胞生长至融合状态时, 加入不同浓度CDDP(终浓度分别为0、0.016、0.03125、0.0625、0.125、0.25、0.5、1、2、4mmol/L), 每组设6个复孔, 在37 $^{\circ}$ C、含5%CO₂的孵育培养箱中培养24h后, 向培养基中加入MTT, 终质量浓度为0.5g/L, 37 $^{\circ}$ C培养箱中培养4h, 弃上清并加入溶解液DMSO(100 μ L/孔), 摇匀10min, 检测(测定波长570nm, 参比波长630nm)吸光度(A)。细胞抑制率的计算方法为式(1)。

$$\text{细胞抑制率}/\% = (1 - \frac{A_{\text{实验}}}{A_{\text{对照}}}) \times 100 \quad (1)$$

1.3.3 LBP对CDDP所致细胞毒性的保护作用

将细胞数量调整为 1×10^5 个/mL后, 每孔100 μ L进行铺板, 37 $^{\circ}$ C、含5% CO₂的孵育培养箱中培养至融合状态进行实验。细胞分组为: 空白对照组(CDDP终浓度0mmol/L、LBP终质量浓度0g/L)、CDDP模型组: 以0.074mmol/L CDDP在37 $^{\circ}$ C、含5% CO₂的孵育培养箱中培养24h方法造模、CDDP+LBP组: 在加CDDP前24h加入不同质量浓度的LBP(终质量浓度分别为: 1.563、3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400、600、800、1000、1200、1600、2000mg/L)。每组设6个复孔, 采用MTT法(测定波长570nm, 参比波长630nm)测定吸光度(A), 计算细胞存活率变化。细胞存活率的计算方法为式(2)。

$$\text{细胞存活率}/\% = \frac{A_{\text{实验}}}{A_{\text{对照}}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.4 LBP对CDDP所致细胞凋亡的影响

将HEK293细胞(3×10^4 个/mL)3mL接种到6孔板中, 待细胞生长至融合状态时, 按实验分成4

组: A组(HEK293组)、B组(HEK293+CDDP组)、C组(HEK293+CDDP+LBP组(12.5mg/L))和D组(HEK293+CDDP+LBP组(25mg/L)), 在加入CDDP 24h之前加入LBP, 之后加入终浓度为0.074mmol/L的CDDP, 37 $^{\circ}$ C、含5% CO₂的孵育培养箱中培养24h, 终止培养, 消化细胞并收集。

1.3.4.1 HEK293细胞凋亡率检测

采用流式细胞仪根据AnnexinV-FITC凋亡检测试剂盒进行检测, PBS清洗后在10000r/min离心5min, 以PBS洗涤2次, 弃上清; 用4 $^{\circ}$ C PBS重悬, 然后加入200 μ L结合缓冲液(Binding Buffer), 加入10 μ LAnnexin V-FITC轻轻混匀, 避光室温反应15min, 再加入300 μ LBinding Buffer(总反应体积500 μ L)和5 μ LPI染色(终质量浓度50 μ g/mL), 以300目尼龙网滤过, 上流式细胞仪检测, 每份样品检测 5×10^5 个细胞, 每组重复3次, CellQuest及Motifit软件分析细胞周期分布及凋亡(annexinV-FITC阳性, PI阴性)。

1.3.4.2 Western blotting法检测Bcl-2、Bax基因蛋白的表达

提取LBP和CDDP作用后的HEK293细胞的总蛋白, 采用Bio-Rad法测定蛋白含量。取总蛋白50 μ g作SDS-PAGE电泳、转膜, 电流等于胶面积 $\times 0.55$ 。膜用5%脱脂乳粉封闭1h, TBST洗3次, 加入抗Bcl-2(1:1000)、Bax(1:1000)、 β -actin(1:500), 4 $^{\circ}$ C过夜。TBST洗3次, 加入二抗(1:10000), 脱色摇床摇1h, TBST洗3次。ECL工作液显色曝光后X光片, 拍照, 用凝胶图像分析软件扫描, 测定蛋白条带的灰度值。结果用实测值与内参 β -actin的比值(A%)表示, 实验重复3次^[6]。

1.4 统计学处理

采用SPSS12.0 软件进行统计分析结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析判断LBP对CDDP毒性影响, 检验显著性水平 $\alpha=0.05$ 或 $\alpha=0.01$ 。相关分析采用Spearman等级相关进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 CDDP对HEK293细胞的毒性作用

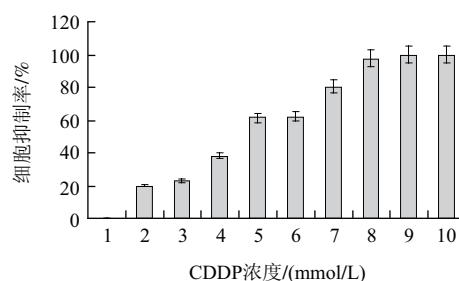


图1 CDDP对HEK293细胞死亡率的影响

Fig.1 Effect of cisplatin on viability of HEK293 cells

由图1可见,使用终浓度为0、0.016、0.03125、0.0625、0.125、0.25、0.5、1、2、4mmol/L的CDDP孵育HEK293细胞24h后造成CDDP细胞毒性,随着CDDP浓度增大,细胞抑制率不断升高,且加药组各组抑制率与正常组(CDDP终浓度为0mmol/L)相比,有极显著差异($P<0.01$),CDDP对HEK293细胞的半数致死浓度(IC_{50})为 (0.072 ± 0.020) mmol/L。

2.2 LBP对HEK293细胞存活率的影响

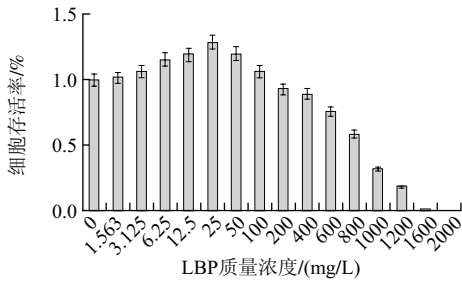
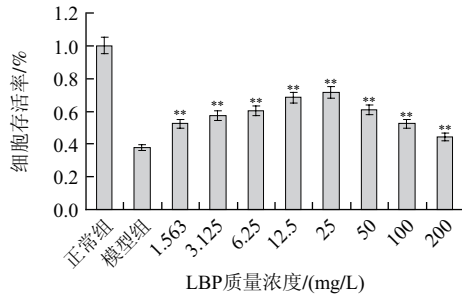


图2 LBP对HEK293细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of LBP on viability of HEK293 cells

由图2可知,使用LBP终质量浓度分别为0、1.563、3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400、600、800、1000、1200、1600、2000mg/L时,培养液孵育细胞,观察LBP对细胞生长的影响,可见随着LBP质量浓度增大,细胞存活率升高,在LBP质量浓度为25mg/L时达到最高,此后随着LBP质量浓度增大,细胞存活率降低,显示LBP质量浓度过大对细胞生长起抑制作用。其中,LBP终质量浓度为6.25、12.5、25、50mg/L时,与空白对照组细胞相比较,LBP可极显著引起细胞存活率升高($P<0.01$),可见低质量浓度LBP对细胞的增殖有一定促进作用。本实验显示这种促进作用受限于LBP的某个质量浓度范围内。当LBP终质量浓度为600mg/L以上时,对细胞产生毒作用,与空白对照组比较差异极显著。当LBP终质量浓度为2000mg/L细胞存活率为0。根据存活率求抑制率,得到LBP对HEK293细胞的 IC_{50} 为854.6mg/L。

2.3 LBP对CDDP诱导HEK293细胞存活率的影响



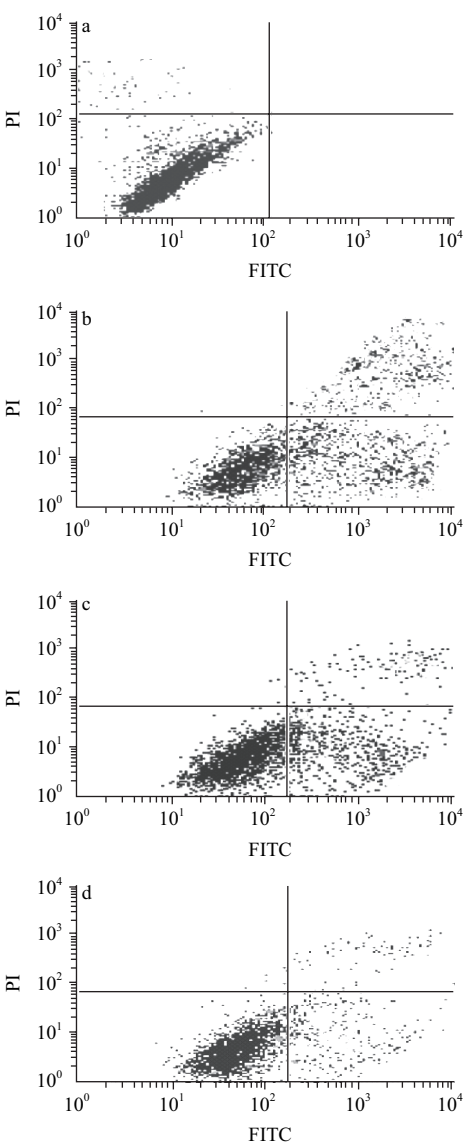
**.与CDDP模型组相比,差异极显著($P<0.01$)。

图3 LBP对CDDP诱导HEK293细胞存活率的影响

Fig.3 Effect of LBP on cisplatin-induced cytotoxicity in HEK293 cells

由图3可知,用不同质量浓度LBP 预处理24h后,再加入CDDP,CDDP的终浓度0.074mmol/L时,观察LBP对CDDP所致细胞毒性的影响,可见细胞存活率随着LBP质量浓度升高而产生变化。结果显示,终质量浓度为12.5、25、50mg/L的LBP可显著降低CDDP对HEK293细胞的抑制作用,提高细胞的存活率,且25mg/L细胞存活率最高,LBP对CDDP所致细胞毒性具有明显的保护作用。

2.4 LBP对CDDP诱导HEK293细胞凋亡的影响



A.空白对照组; B.CDDP模型组; C. CDDP+12.5mg/L LBP; D. CDDP+25mg/L LBP。

图4 LBP对CDDP所致HEK293细胞凋亡率的影响

Fig.4 Effect of LBP on cisplatin-induced apoptosis in HEK293 cells

由图4、表1可见,加入25mg/L LBP后CDDP诱导的HEK293细胞与模型组的细胞比中晚期凋亡率下降了 $(18.90\pm2.77)\%$ 。与空白对照组比较,CDDP组无论是早期凋亡细胞率还是中晚期细胞凋亡率都有显著提高。在

加入不同质量浓度的LBP后,早期、中晚期凋亡细胞率均下降,提示LBP参与调控CDDP诱导的细胞凋亡。

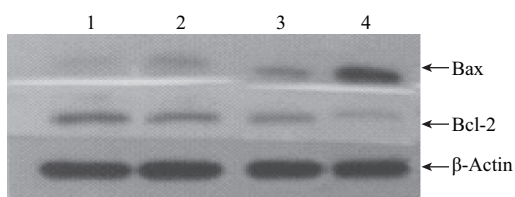
表1 不同组别HEK293细胞凋亡率变化

Table 1 Comparison of apoptosis rates of HEK293 in different groups

组别	早期凋亡率	中晚期凋亡率	死亡率
空白对照组	2.58±0.43	2.85±0.64	0.22±0.03
CDDP模型组	16.69±5.64**	23.57±3.25**	7.31±0.63**
CDDP+12.5mg/L LBP	6.35±1.23 ^{△△}	17.69±5.22 ^{△△}	4.02±0.35 ^{△△}
CDDP+25mg/L LBP	3.29±0.77 ^{△△}	5.38±0.48 ^{△△}	0.95±0.07 ^{△△}

注: **与空白对照组比较,有极显著性差异($P < 0.01$); ^{△△}与模型组比较,有极显著性差异($P < 0.01$)。下同。

2.5 LBP对CDDP诱导HEK293细胞Bcl-2、Bax蛋白表达的影响



1. 空白对照组; 2. CDDP+25mg/L LBP组;
3. CDDP+12.5mg/L LBP组; 4. CDDP模型组。

图5 LBP对CDDP诱导HEK293细胞Bax与Bcl-2蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of LBP on Bax and Bcl-2 protein expression in cisplatin-pretreated HEK293 cells

表2 不同组别HEK293细胞蛋白表达灰度值变化

Table 2 Comparison of grey value of HEK293 protein expression in different groups

凋亡基因	空白对照组	CDDP模型组	CDDP+12.5mg/L LBP组	CDDP+25mg/L LBP组
Bcl-2	34.20±6.34	15.95±3.26**	19.26±3.79 ^{△△}	30.60±6.64 ^{△△}
Bax	14.34±2.64	44.68±7.45**	23.23±4.22 ^{△△}	16.50±2.97 ^{△△}

如图5、表2所示,Western blotting结果显示,HEK293细胞空白对照组Bax、Bcl-2蛋白表达的灰度值与CDDP模型组的蛋白表达值相比较,有显著性差异($P < 0.01$)。CDDP模型组的Bax、Bcl-2蛋白表达灰度值,与LBP作用CDDP诱导HEK293细胞组相比较,也有显著性差异。与CDDP模型组相比,空白组与CDDP和LBP联合组Bax蛋白表达量明显降低,而Bcl-2的蛋白表达量明显升高。并且CDDP和LBP联合组的蛋白量趋于接近于空白对照组。

3 讨论与结论

细胞凋亡是体内细胞的一种生理性调节机制,使细胞群体减少。在控制细胞增殖和分化、肿瘤的发生和生

长以及在机体的免疫调节中有重要作用,研究证明^[7-9],肾小管上皮细胞过度凋亡是急性肾小管坏死病症中肾功能异常的重要机制之一。损伤较轻时,引起细胞凋亡,损伤较重时,使细胞坏死。如果能通过药物干预,减少细胞的凋亡,就能使肾小管上皮细胞再生,从而减少病症的发生。目前,国内外研究一致认为CDDP肾毒性机制主要是由于CDDP能够诱导肾小管上皮细胞凋亡,研究表明CDDP主要是通过线粒体依赖途径诱导凋亡^[10]。

Bcl-2基因家族和凋亡调控过程密切相关,其中Bcl-2是重要的抑制凋亡基因,主要定位于核膜的胞质面与内质网及线粒体外膜,能保护膜具有稳定性,直接影响到线粒体的膜功能,通过抑制相关孔道开放抑制Cyt C释放间接阻止细胞凋亡;Bax是凋亡促进基因,与Bcl-2作用相反,可促进相关孔道开放释放出Cyt C间接诱发细胞凋亡;二者在结构上具有同源性,若Bax过表达,二者形成同源二聚体促进细胞凋亡,若Bcl-2过表达,二者形成异源二聚体抑制细胞凋亡,而且二者之间的比值变化可以调节细胞的增殖与凋亡平衡^[11-12]。Park等^[13]发现,Bcl-2表达增加能够抑制CDDP诱导的细胞凋亡。

文献[14-17]表明,LBP对胰岛细胞、肝脏细胞、肾脏细胞和心肌细胞等多种细胞有保护作用,并且LBP具有清除自由基,抗脂质过氧化,防止细胞氧化损伤的作用,本研究组前期的实验也初步证实LBP在一定程度上能通过抗氧化机制发挥保护HEK293的作用^[18]。本实验以LBP作为保护剂进一步探讨其对CDDP诱发的肾损伤的影响及机制。研究发现LBP可显著提高CDDP造成的HEK293模型细胞的存活率,提示LBP对CDDP所导致的HEK293细胞毒性具有保护作用。同时,用荧光染色流式AnnexinV-PI双标观察到LBP在CDDP诱导HEK293细胞的中期早期晚期凋亡中都有明显的抑制作用,25mg/L LBP的作用效果更为显著。此外,Western blotting方法观察到,LBP干预组与CDDP模型组相比较,Bax表达下降,Bcl-2表达有所增加($P < 0.01$),作为基因凋亡家族的两大基因,前者属于凋亡促进基因,后者属于凋亡抑制基因,二者蛋白水平高低与凋亡调控直接相关,且二者比率会影响到细胞受刺激后的生存能力^[19-20]。结合实验整体结果,可以看出LBP可以拮抗顺铂诱导的人胚肾细胞凋亡,发挥细胞保护作用,这可能是由于LBP可诱使Bcl-2表达增加,提高了细胞膜、线粒体膜等膜的稳定性,增强了细胞自身对外界的抵御能力,同时抑制相关孔道开放抑制Cyt C释放间接阻止细胞凋亡;研究发现Bax表达下降,其从反方向间接抑制了细胞凋亡;或者LBP保护机理是Bcl-2表达的增加、Bax表达的下降使得细胞内形成了二者的异源二聚体Bcl-2/Bax,改善了细胞各阶段的凋亡状态,抑制了细胞凋亡,发挥细胞保护作用。其具体机制有待更深层次的研究。

参考文献:

- [1] TAFANI M, COHN J A, KARPINICH N O, et al. Regulation of intracellular pH mediates bax activation in HeLa cells treated with staurosporine or tumornecrosis factor α [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 49569-49576.
- [2] 郭培培. 枸杞多糖的抗肿瘤作用及其机理研究现状[J]. 北京联合大学学报, 2011, 25(4): 26-29; 40.
- [3] 胡仲秋, 王利, 王保玲, 等. 枸杞多糖提取及消除羟自由基活性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(24): 93-98.
- [4] 邓自辉, 牛阳, 王荣, 等. 枸杞多糖药理作用的研究现状[J]. 临床合理用药, 2011, 4(12B): 164-165.
- [5] 张海莲, 高丽萍, 冷洪涛, 等. 枸杞多糖提取物对顺铂诱发大鼠肾毒性的影响[J]. 食品科学, 2012, 33(5): 268-271.
- [6] 禹彬, 许莉, 孙连坤, 等. 人质膜型唾液酸酶对丁酸钠诱导细胞凋亡的影响及机制[J]. 吉林大学学报, 2008, 34(1): 49-52.
- [7] 陈晓岚, 张晓娟, 范亚平, 等. 辛伐他汀对大鼠系膜细胞增殖、凋亡及细胞内半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3表达的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2006(22): 109-113.
- [8] UEDA N, KAUSHAL G P, SHAH S V. Apoptotic mechanisms in acute renal failure[J]. Am J Med, 2000, 108: 403-415.
- [9] HAUSER P, OBERBAUER R. Tubular apoptosis in the pathophysiology of renal diseases[J]. Wien Klin Wochenschr, 2002, 114: 671-677.
- [10] 杨宁, 樊均明, 甘华山. 顺铂与肾小管上皮细胞凋亡[J]. 国际泌尿系统杂志, 2006, 26(6): 848-851.
- [11] DHYAN C, GRACE C, PETER T D, et al. Bax-dependent regulation of bak by voltage-dependent nion channel2[J]. J Biol Chem, 2005, 280(5): 19051-19061.
- [12] YU X, KUBOTA H, WANG R, et al. Involvement of Bcl-2 family genes and Fas signaling system in primary and secondary male germ cell apoptosis induced by 2-bro-moprapane in rat[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2001, 174(1): 35-48.
- [13] PARK S A, PARK H J, LEE B L, et al. Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis by suppression of ERK-mediated P53 accumulation in B104 cells[J]. Brain Res Mol Brain, 2001, 93: 18-26.
- [14] 宋琦如, 王发选, 杨瑾. LBP对长波紫外线辐射暴露的人皮肤成纤维细胞的影响[J]. 环境与健康杂志, 2007, 24(8): 586-588.
- [15] 马虎飞, 王思敏, 杨章民, 等. 陕北野生枸杞多糖的体外抗氧化活性[J]. 食品科学, 2011, 32(3): 60-63.
- [16] 龚涛, 王晓辉, 赵靓, 等. 枸杞多糖抗氧化作用的研究[J]. 生物技术, 2010, 20(1): 84-86.
- [17] 严成, 严夏. 枸杞多糖提取工艺比较及体外抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(7): 183-187.
- [18] 冷洪涛, 高丽萍, 张海莲, 等. 枸杞多糖对顺铂所致人胚肾细胞毒性的拮抗作用[J]. 广东医学, 2011, 32(22): 2929-2931.
- [19] McCLINTOCK D S, SANTORE M T, LEE V Y, et al. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death[J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(1): 94-104.
- [20] XIE Z, KOYAMA T, SUZUKI J, et al. Coronary reperfusion following ischemia: different expression of Bcl-2 and bax proteins, and cardiomyocyte apoptosis[J]. Jpn Heart J, 2001, 42(6): 759-770.