

Fas 途径参与大黄酸诱导 HK-2 细胞凋亡

孙 浩, 杨加培, 毛 勇, 王丹丹, 于 锋*

(中国药科大学临床药学教研室, 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 211198)

摘要 探讨大黄酸对人肾小管上皮细胞系 HK-2 的毒性作用及毒性作用机制。以 HgCl₂ 为阳性对照, 通过 MTT 法检测细胞活力, LDH 释放实验检测细胞毒性, Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率, Real-Time qPCR 检测 Fas, FasL, FADD, caspase-3, caspase-8 的 mRNA 表达, Western blot 检测 Fas, FasL, 胞浆 Cyt-c, caspase-3, caspase-8, caspase-9 蛋白表达。实验结果显示: 大黄酸可剂量依赖性地抑制 HK-2 细胞活力, 增加 LDH 释放和细胞凋亡率, 使 Fas, FasL, FADD, caspase-3, caspase-8 的 mRNA 表达显著性上调, Fas, FasL, 胞浆 Cyt-c 蛋白表达量显著升高, caspase-8 原型表达显著降低, caspase-3, caspase-8 裂解片段表达显著增加, caspase-9 表达无变化。结果证明: 大黄酸体外对 HK-2 细胞具有毒性作用, 其毒性作用机制可能是通过 Fas 途径诱导 HK-2 细胞凋亡。

关键词 大黄酸; HK-2 细胞; 细胞毒性; Fas; 凋亡

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)04-0469-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150414

Involvement of Fas-dependent pathway in rhein-induced apoptosis of HK-2 cells

SUN Hao, YANG Jiapei, MAO Yong, WANG Dandan, YU Feng*

Department of Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (China Pharmaceutical University), Ministry of Education, Nanjing 211198, China

Abstract To investigate the effect and mechanism of cytotoxicity by rhein in human renal tubular epithelial HK-2 cells, HgCl₂ was chosen as positive control. Cell viability was determined by MTT assay. LDH release assay was used to evaluate cell membrane damage. The activity of caspase-3, and -8 was measured by assay kit. Real-Time qPCR was employed to determine the mRNA expressions of Fas, FasL, FADD, caspase-3 and caspase-8. The protein expressions of Fas, FasL, cytoplasmic cytochrome C, caspase-3, caspase-8, caspase-9 were detected by Western blot. The results demonstrated that rhein inhibited cell viability and increased LDH release in a dose-dependent manner. The activity of caspase-3 and caspase-8 was significantly enhanced by rhein. The mRNA expression of Fas, FasL, FADD, caspase-3, caspase-8 was remarkably up-regulated by rhein. Rhein also elevated protein expressions of Fas, FasL, cytoplasmic cytochrome C, cleaved caspase-3, caspase-8 and reduced expressions of Pro caspase-8. There was no significant difference in caspase-9 expression. These results indicate that rhein has a cytotoxic effect and apoptosis-inducing effect in HK-2 cells. The Fas-dependent pathway is involved in rhein-induced apoptosis.

Key words rhein; HK-2 cell; cytotoxicity; Fas; apoptosis

大黄酸(1,8-二羟基-3-羧基蒽醌,rhein), 属于大黄蒽醌类衍生物, 是何首乌、大黄、虎杖等中药的主要有效成分之一^[1]。大黄酸药理作用包括抗炎、抗菌、抗氧化、防止肝脏纤维化、保肝降血糖降血脂等, 临幊上开发用于治疗骨关节炎、糖尿病肾

病以及协同抗肿瘤^[2]。大黄酸可诱导多种肿瘤细胞凋亡, 如人类肺癌细胞(A-549)^[3]、人类鼻咽癌细胞(NPC)^[4]、人肝癌细胞(HepG2)^[5]等, 机制涉及线粒体途径、Fas 途径等。

在美国“国家毒理学规划”项目的一项研究

中^[6],科研人员发现大鼠长期灌胃给药大黄总蒽醌及大黄素,可导致肾矿化、肾小管透明小滴产生、肾小管色素沉积等肾功能病变。张陆勇等^[7]研究发现:SD大鼠长期灌胃大黄总蒽醌可引起肾脏近曲小管毒性,同时有文献报道大黄总蒽醌对肾脏具有急性毒性作用^[8]。肾小管上皮细胞的凋亡是药物肾毒性的机制之一,如马兜铃酸I(aristolochic acid I, AA I)可通过诱导肾小管上皮细胞凋亡产生肾毒性^[9]。笪红远等^[10]观察到大黄酸对肾小管上皮细胞有毒性作用,并发现大黄酸可诱导肾小管上皮细胞凋亡,然而具体机制尚不明确。因此,本研究采用人肾小管上皮细胞系(HK-2)作为实验模型,进一步研究大黄酸对其毒性作用,并初步探讨大黄酸对其凋亡作用机制。

1 材料

1.1 细胞、药品和试剂

人肾小管上皮细胞系HK-2(江苏省药物研究所惠赠);大黄酸(批号110757-200206,纯度99%,中国药品生物制品检定所);HgCl₂粉末(美国Sigma公司);一抗兔抗caspase-3, caspase-8, caspase-9, Fas, FasL, cytochrome c, β-actin)抗体,人抗兔二抗(美国Cell Signaling Technology公司);MTT粉末、乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒、caspase-3, caspase-8活性检测试剂盒、Annexin V-FITC细胞凋亡试剂盒、细胞线粒体分离试剂盒(碧云天生物技术研究所);Trizol总RNA提取试剂(生兴生物技术有限公司);逆转录试剂盒、扩增反应试剂盒(生工生物工程股份有限公司)。

1.2 仪器

Versa Max多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);FAC Scan流式细胞仪(美国Becton Dickinson Biosciences公司);Mastercycler ep realplex实时荧光定量PCR仪(德国Eppendorf公司);垂直蛋白电泳仪、半干式转膜仪、Chemi DocTM成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

HK-2细胞常规培养于含10%胎牛血清的DMEM/F₁₂培养基中,37℃、5%CO₂培养,细胞单层贴壁生长,正常情况下为短梭形或铺路石形,长

满至80%左右时,以胰酶消化传代,所有实验均在细胞对数生长期进行。

2.2 MTT法测HK-2细胞存活率

收集对数期HK-2细胞,反复吹打成密度约为每毫升3×10⁴个的细胞悬液,每孔200μL接种入96孔板,37℃、5%CO₂条件培养过夜。待细胞贴壁,吸出培养基,加入浓度分别为10, 25, 50, 100, 200 μmol/L的大黄酸, 10 μmol/L HgCl₂和溶剂对照,并设置不加细胞的溶剂空白组,继续培养12, 24, 48 h,每孔加入质量浓度为5 g/L的MTT溶液20 μL,继续培养4 h后吸出MTT,加入DMSO溶液150 μL,10 min后在490 nm处测定吸收度(A),计算细胞存活率($A_{\text{test}}/A_{\text{control}} \times 100\%$),并由拟合出的量效曲线计算IC₅₀。

2.3 乳酸脱氢酶(LDH)释放检测

收集对数期HK-2细胞悬液,调整细胞浓度,接种到12孔板,使每孔细胞数量8×10⁵个。24 h后开始给药,设置正常对照组、10 μmol/L HgCl₂组和不同浓度大黄酸给药组(10, 25, 50, 100, 200 μmol/L),另设置不加细胞的溶剂对照组、不同浓度大黄酸的药物对照组(10, 25, 50, 100, 200 μmol/L)。大黄酸作用12, 24, 48 h后,取培养液上清液测定。按乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒说明书处理样品,在490 nm处测定吸收度,计算:LDH相对释放量=(给药组绝对吸收度-药物对照组绝对吸收度)/正常对照组绝对吸收度。

2.4 Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡

收集对数期生长的HK-2细胞,调整细胞浓度为每毫升1.2×10⁵个细胞,接种于6孔板中,每孔细胞悬液2.5 mL。细胞贴壁后给药,设置对照组和浓度分别为25, 50, 100 μmol/L的大黄酸给药组。给药24 h后,胰酶消化并离心收集细胞,用4℃预冷PBS洗涤细胞两次,结合液195 μL重悬细胞,细胞悬液中加入Annexin V-FITC 5 μL, PI染液10 μL, 25℃避光孵育20 min,流式细胞仪上机检测。

2.5 caspase-3和caspase-8活性检测

将ρ-硝基苯胺(ρ-nitroaniline, ρNA)标准品用裂解液稀释成不同浓度梯度,酶标仪测定405 nm处吸收度,绘制标准曲线。取HK-2细胞接种于25 cm²培养瓶中,细胞贴壁后开始给药。设5个

组,分别为溶剂对照组,空白对照组,大黄酸浓度分别为25,50,100 μmol/L的给药组。给药24 h,胰酶消化收集细胞,按照每毫升 2×10^6 个细胞加入裂解液100 μL的比例加入裂解液,冰浴裂解15 min。于4 °C,24 000 r/min离心15 min,取上清液,立即测定 caspase-3 和 caspase 活性。按照反应体系加入检测缓冲液,反应体系为检测缓冲液80 μL,待测样10 μL,Ac-DEHD-ρNA(2 mmol/L)10 μL(caspase-3)、Ac-IEHD-ρNA(2 mmol/L)10 μL(caspase-8)。混匀后水浴锅37 °C孵育60~120 min,肉眼观察颜色变化明显时用酶标仪测405 nm处的吸收度。最终计算酶活力单位。酶活力单位 = $c_{\rho\text{NA}} \times V/t$ 其中 $c_{\rho\text{NA}}$ (μmol/L)为通过标曲计算的 ρNA 浓度;V(mL)为反应体系体积;t(h)为反应时间)。

2.6 Real-Time qPCR 检测相关基因表达

取HK-2细胞接种于25 cm²培养瓶中,细胞贴壁后开始给药。设4个组,包括空白对照组,以及大黄酸浓度分别为25,50,100 μmol/L的给药组。给药24 h,用Trizol RNA提取试剂提取总RNA;用逆转录试剂盒将RNA逆转录为单链cDNA;将逆转录好的模板cDNA与对应引物、SYBR qPCR Mix通过实时定量PCR方法扩增,执行扩增过程中用到的对应正反引物如表1所示;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH)作为每次扩增过程中的内参对照基因。测得结果为Ct值,即每个反应管内的荧光信号达到所设定的阈值时所经历的反应循环数。所有样品按试剂盒说明书进行,经过40个扩增循环(95 °C 10 min → 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s)。结果处理采用相对定量中的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算方法来表示mRNA表达改变情况。

Table 1 Real-Time qPCR primer sequence

mRNA		Primer sequence (5'→3')
GADPH	Forward:	GAGGAGGCATTGCTGATGAT
	Reverse:	GAAGGCTGGGCTCATTT
Fas	Forward:	ACACTCACAGCAACACCAAGT
	Reverse:	CCTTCTCTTCACCCAAACAT
FasL	Forward:	GGAAGTGGCAGAACCTCGTGA
	Reverse:	AGATCAGAGCGGTCTCCATATGTGTC
FADD	Forward:	GCTCCATCTGGCTTGTGTTCA
	Reverse:	GGGAGTCAAGAGCATTTGTGGCTA
Caspase-3	Forward:	AGCAATAATGAATGGGCTGAG
	Reverse:	GTATGGAGAAATGGGCTGTAGG
Caspase-8	Forward:	AG TGAA TCACAGACTTG
	Reverse:	ATCAGAAGGAAAGACAAG

2.7 Western blot 检测蛋白表达

取HK-2细胞接种于25 cm²培养瓶中,细胞贴壁后开始给药。设4个组:空白对照组、25,50,100 μmol/L大黄酸给药组。药物处理24 h,PBS洗两遍,提取细胞蛋白:每瓶细胞加入含1 mmol/L PMSF的裂解液200 μL,冰上静置5 min,使用细胞刮刀收集细胞至离心管中,冰浴15 min,4 °C,12 000 r/min,离心5 min,取上清液为总蛋白。使用细胞线粒体分离试剂盒将线粒体分离,按上述蛋白提取步骤获得胞浆蛋白,用于检测胞浆 Cyt-c。使用BCA蛋白浓度试剂盒测定每组蛋白浓度,调整蛋白样品浓度,配制成含20% SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5×)的蛋白溶液,沸水浴5 min,充分变性蛋白。10% SDS-PAGE电泳分离,蛋白转移至NC膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭2 h;孵育一抗(5% 脱脂奶粉1:1 000稀释),4 °C过夜,室温TBST溶液洗3遍,每次10 min;孵育二抗(TBST溶液1:10 000稀释),室温孵育2 h;二抗杂交结束后,室温TBST溶液洗3遍,每次10 min。NC膜上滴加ECL发光液,放入凝胶成像仪中曝光。使用软件Gel-Pro Analyzer 4对曝光结果进行定量分析,使用β-actin作为内参进行校正。

2.8 统计分析

每个实验独立重复3次,计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用SPSS 19.0软件进行统计,多组数据组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间均数比较采用t检验, $P < 0.05$ 表示统计有显著性差异。

3 结 果

3.1 大黄酸对HK-2细胞存活率的影响

MTT实验结果如图1所示,HK-2细胞存活率随大黄酸浓度增加而递减。给药12 h时,大黄酸浓度大于100 μmol/L可显著抑制HK-2细胞存活率;给药24 h时,大黄酸浓度大于10 μmol/L可显著抑制HK-2细胞的存活率;给药48 h时,各浓度大黄酸均可显著抑制HK-2细胞的存活率。10 μmol/L HgCl₂可显著抑制HK-2细胞的存活率。大黄酸作用于HK-2细胞12,24,48 h时IC₅₀分别为151.3、71.7和28.6 μmol/L。

3.2 大黄酸对HK-2细胞乳酸脱氢酶(LDH)释放的影响

LDH释放实验结果如图2所示,给药12 h时,

当大黄酸浓度大于 200 $\mu\text{mol/L}$ LDH 释放显著增加;给药 24 h 时,当大黄酸浓度大于 100 $\mu\text{mol/L}$ 时 LDH 释放显著增加;给药 48 h 时,当大黄酸浓度大于 10 $\mu\text{mol/L}$ 时 LDH 释放显著增加。10 $\mu\text{mol/L}$ HgCl_2 可使 LDH 释放显著增加。

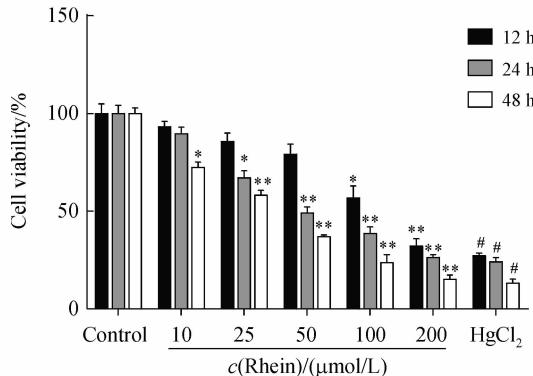


Figure 1 Effect of rhein on cell viability in HK-2 cells cell viability was determined by MTT assay ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs control group

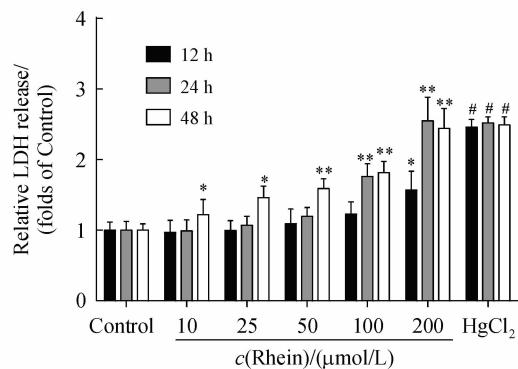


Figure 2 Effect of rhein on LDH release in HK-2 cells LDH release was determined by commercial kits ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs control group

3.3 大黄酸对 HK-2 细胞凋亡率影响

由图 3 可知,随着大黄酸浓度的增加,右上象限和右下象限细胞数量显著增加,说明细胞凋亡率随着大黄酸浓度增加而增加。经统计分析,空白对照组、大黄酸 25 $\mu\text{mol/L}$ 组,50 $\mu\text{mol/L}$ 组和 100 $\mu\text{mol/L}$ 组的凋亡率分别为 $(4.59 \pm 0.97)\%$ 、 $(7.06 \pm 1.42)\%$ 、 $(27.24 \pm 2.77)\%$ 和 $(44.79 \pm 2.64)\%$,其中 25 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组比无显著差异,50 $\mu\text{mol/L}$ 组、100 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞凋亡率相较对照组显著增加($P < 0.05$)。

3.4 大黄酸对 caspase-3, caspase-8 活性的影响

caspase 活性检测结果如图 4 所示,大黄酸作

用 24 h 后,caspase-3, caspase-8 活性均有浓度依赖性增高的趋势。25 $\mu\text{mol/L}$ 组对 caspase 活性影响无统计学意义,50 $\mu\text{mol/L}$ 组、100 $\mu\text{mol/L}$ 组可检测到 caspase-3, caspase-8 活性相较对照组显著性提高($P < 0.05$)。

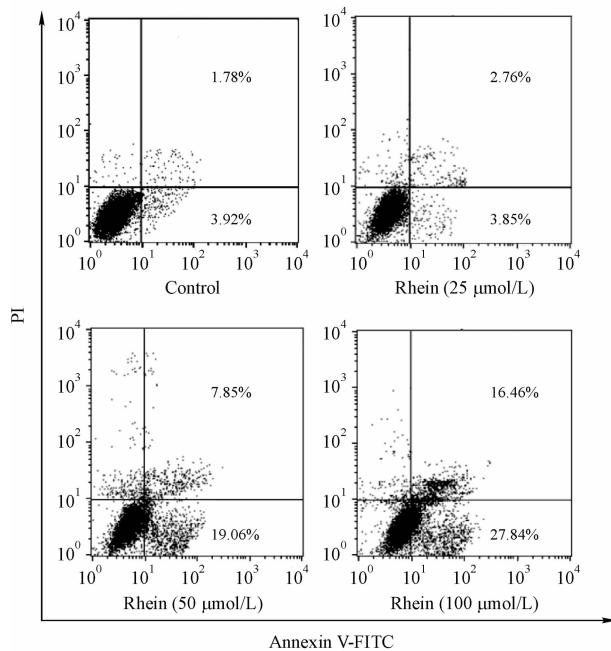


Figure 3 Effect of various concentrations of rhein on apoptosis rate in HK-2 cells for 24 h, apoptosis rate were determined by Annexin V/PI staining

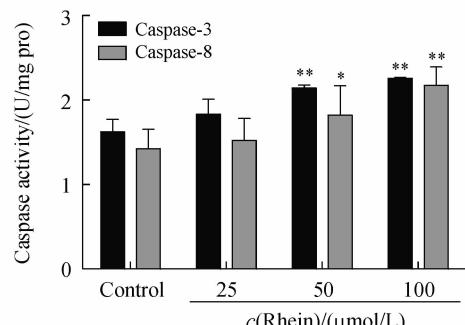


Figure 4 Effect of various concentrations of rhein on caspase-3, caspase-8 activity in HK-2 cells treated for 24 h, caspase activity was determined by commercial kits ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

3.5 Real-Time qPCR 分析相关凋亡基因表达

Real-Time qPCR 分析结果如图 5 所示,在大黄酸作用 24 h 后,相比于正常对照组,Fas, FasL, caspase-3 基因表达在 50 $\mu\text{mol/L}$ 组、100 $\mu\text{mol/L}$ 组显著上调($P < 0.05$);FADD, caspase-8 基因表达在 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ 组均显著上调($P < 0.05$)。

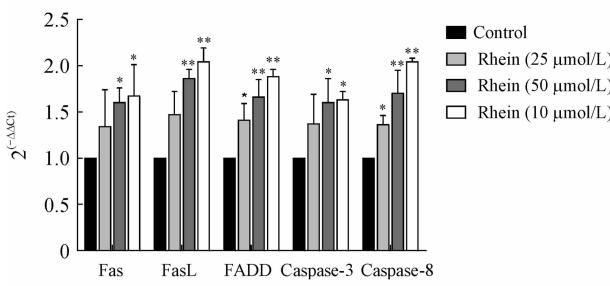


Figure 5 Gene expression of Fas, FasL, FADD, caspase-3, -8 in HK-2 cells treated with rhein for 24 h, mRNA expression was determined by Real-Time qPCR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

3.6 Western blot 分析蛋白表达

Western blot 条带如图 6 所示,经 β -actin 标准

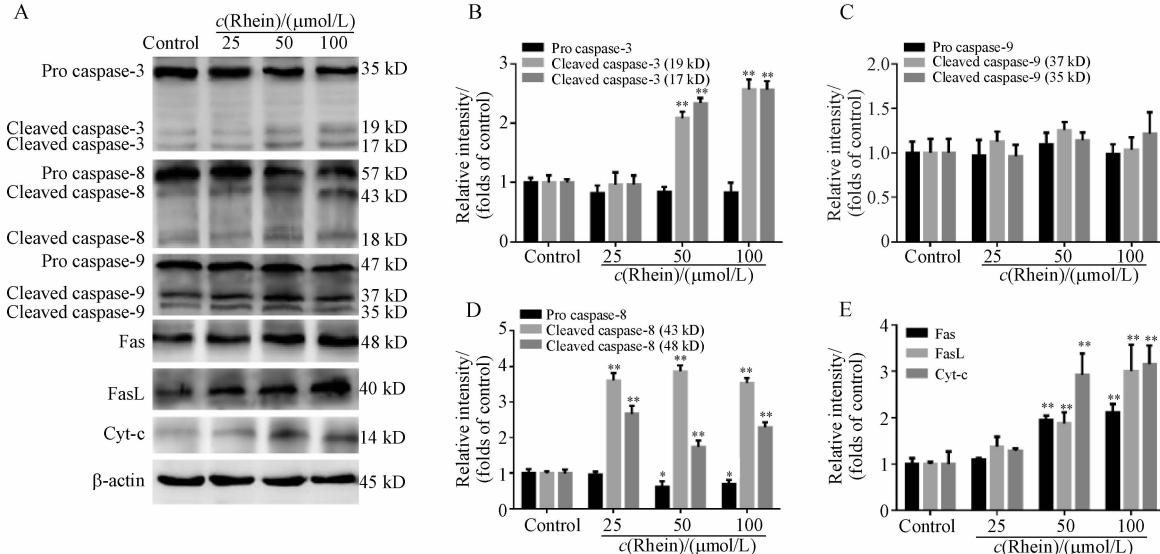


Figure 6 Apoptosis-related protein expressions in HK-2 cells treated with rhein for 24 h (A), caspase-3 (B), caspase-9 (C), caspase-8 (D), Fas, FasL, Cyt-c (E) expressions were determined by Western blot ($\bar{x} \pm s, n=3$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

大黄酸是大黄、虎杖、何首乌、芦荟等传统中药的主要有效成分^[2],大黄酸胶囊作为治疗糖尿病肾病特效药已进入临床Ⅱ期试验。然而大黄蒽醌类化合物有潜在肾毒性,可引起大鼠肾小管病理性改变,研究发现大黄酸对人肾小管上皮细胞系 HK-2 具有毒性作用^[6-8],故大黄酸潜在的肾毒性和相关机制亟待阐明。同时,相关文献发现肾小管上皮细胞损伤和再生过程中的凋亡现象,证明肾小管上皮细胞凋亡是药物肾毒性中的重要机制之一^[11]。

定量分析。结果(图 6)显示 caspase-3 原型无显著性变化,而 caspase-3 剪切片段(19 kD, 17 kD)在大黄酸 50 μ mol/L 组、100 μ mol/L 表达显著性增加; caspase-8 原型在大黄酸 50 μ mol/L 组、100 μ mol/L 表达显著性降低, caspase-8 剪切片段(43 kD, 18 kD)在各大黄酸组表达均增加;caspase-9 原型和剪切片段与对照组比无显著性差异;Fas, FasL, Cyt-c 蛋白表达经 β -actin 标准定量分析后,结果如图 6-C 所示,发现大黄酸 25 μ mol/L 组的 Fas, FasL 和 Cyt-c 蛋白相较对照组无显著性差异,而 50 μ mol/L 组、100 μ mol/L 组相较对照组均呈显著性增加($P < 0.05$)。

本实验通过 MTT 实验,证明给药 12 h 时,大黄酸浓度大于 100 μ mol/L 可显著抑制 HK-2 细胞存活率;给药 24 h 时,大黄酸浓度大于 10 μ mol/L 可显著抑制 HK-2 细胞的存活率;给药 48 h 时,各浓度大黄酸均可显著抑制 HK-2 细胞的存活率。通常细胞死亡的类型包括凋亡和坏死。当细胞坏死时,细胞膜结构破损,乳酸脱氢酶(LDH)大量释放,故细胞 LDH 释放情况可当作衡量细胞坏死的指标。本实验检测了大黄酸对细胞上清培养液中 LDH 释放的影响,结果发现给药 12 h 后,大黄酸浓度大于 200 μ mol/L LDH 释放显著增加;给药 24 h 时,大

黃酸濃度大于 $100 \mu\text{mol/L}$ LDH 釋放顯著增加；給藥 48 h 時，大黃酸濃度大于 $10 \mu\text{mol/L}$ LDH 釋放顯著增加。本實驗在細胞毒性實驗中設置了 $10 \mu\text{mol/L HgCl}_2$ 的陽性對照組，觀察到該組 HK-2 細胞存活率顯著下降，LDH 釋放顯著增加。MTT 實驗協同 LDH 釋放實驗說明大黃酸對 HK-2 細胞有毒性作用，可引起 HK-2 細胞膜損壞，並呈時間-劑量依賴性。大黃酸作用 HK-2 紡織 12 h 時， $100 \mu\text{mol/L}$ 以下濃度的大黃酸對 HK-2 紡織存活率無顯著性抑制作用，細胞無明顯死亡現象；而作用 48 h 後，在濃度大於 $10 \mu\text{mol/L}$ 的大黃酸給藥組中細胞死亡的形式以壞死為主。當大黃酸作用於 HK-2 紡織 24 h 後， $100 \mu\text{mol/L}$ 濃度以下的大黃酸給藥組生長率被抑制，LDH 釋放又無顯著性變化，故考慮在後面誘導凋亡實驗中採用 24 h 的藥物作用時間，並設置 $25, 50, 100 \mu\text{mol/L}$ 3 個濃度的大黃酸給藥組。

細胞凋亡是由基因控制的細胞程序性死亡，機制較為複雜，目前主要發現 3 条途徑涉及凋亡過程：內源性線粒體途徑、外源性死亡受體途徑以及內質網應激途徑^[12]。在內源性線粒體途徑中，凋亡啟動時線粒體功能紊亂，線粒體完整性被破壞，Cyt-c 釋放到細胞胞漿中，然後與胞質中凋亡蛋白激活因子（apoptosis protein active factor, Apaf-1）結合為聚合體，導致 caspase-9 原型活化分裂，從而激活下游其他 caspase 激酶，如 caspase-3^[13]。Fas 受體所介導的細胞凋亡是外源性死亡受體途徑中最重要的一種，並且有研究發現 Fas 受體參與腎小管上皮細胞的損傷與凋亡^[14]。Fas 作為細胞表面的死亡受體，可與天然配體 FasL 相結合，向細胞內傳遞與凋亡有關的信號^[15]，使 Fas 受體位於胞內的死亡域形成三聚體活化形式，募集連接蛋白 FADD，形成 FasL-Fas-FADD 死亡誘導信號複合物（death inducing signaling complex, DISC），DISC 可激活下游的原型 caspase-8，釋放裂解後的活性片段 p10、p18^[16]，從而繼續激活下游的其他 caspase 激酶（如 caspase-3, caspase-6），引起細胞凋亡發生^[17]。caspase-3 是下游級聯反應中的最為關鍵的限速酶，是多種凋亡通路的共同下游靶點，是細胞凋亡的重要執行者^[18]。本研究通過 Annexin V-FITC/PI 實驗，發現當大黃酸濃度為 50 和 $100 \mu\text{mol/L}$ 時，凋亡率相較對照組顯著增加。接

着，本研究通過試劑盒檢測 HK-2 紡織中總 caspase-3, caspase-8 激酶活性，發現兩種 caspase 激酶活性亦隨大黃酸濃度增加而遞增，其中 caspase-8 作為 caspase-3 的上游部分，即參與了線粒體途徑，又涉及死亡受體途徑。本研究繼續通過 Real-Time qPCR 方法測定了 Fas, FasL, FADD, caspase-3, caspase-8 的 mRNA 的表達情況。結果證明了 caspase-3 和 caspase-8 的 mRNA 表達隨大黃酸濃度增加而遞增，這與 caspase 活性檢測結果可互相印證；同時，FasL, Fas, FADD 的 mRNA 表達亦隨大黃酸濃度增加而遞增。最後，本實驗通過 Western blot 方法檢測了與凋亡相關蛋白的表達情況。結果發現大黃酸 50 和 $100 \mu\text{mol/L}$ 組 Fas 和 FasL 的表達情況相較對照組表達顯著增多，caspase-3 原型無顯著性變化，而 caspase-3 剪切片段（ $19 \text{ kD}, 17 \text{ kD}$ ）在大黃酸 50 和 $100 \mu\text{mol/L}$ 組表達顯著性增加；caspase-8 原型在大黃酸 50 和 $100 \mu\text{mol/L}$ 組表達顯著性降低，caspase-8 剪切片段（ $43 \text{ kD}, 18 \text{ kD}$ ）在各大黃酸組表達均增加；caspase-9 原型和剪切片段與對照組比無顯著性差異，同時發現釋放進入胞漿的 Cyt-c 隨大黃酸濃度升高而增加。綜上所述，大黃酸可能促使 FasL 和 HK-2 紡織表面的 Fas 受體相結合，從而啟動細胞凋亡程序。同時，雖然 Cyt-c 從線粒體釋放進入胞漿，但是並未導致 caspase-9 活化分裂，所以線粒體途徑並非大黃酸導致 HK-2 紡織凋亡的主導途徑。

通過對上述實驗結果的分析，可證明大黃酸體外對 HK-2 紡織有毒性作用，說明大黃酸有潛在的腎毒性，其毒性作用機制可能是通過 Fas 途徑所誘導 HK-2 紡織凋亡作用。

參考文獻

- Xiong XF. On the main active ingredient of TCM-rhubarb in pharmacology [J]. *Clin J Chin Med (中医临床研究)*, 2014, 6(10): 143–146.
- Su H, Leng J, Wang SD, et al. Development of pharmacological effects of rhein and its conjugates [J]. *China Pharm (中国药业)*, 2011, 20(15): 92–94.
- Hsia TC, Yang JS, Chen GW, et al. The roles of endoplasmic reticulum stress and Ca^{2+} on rhein-induced apoptosis in A-549 human lung cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(1): 309–318.
- Lin ML, Chen SS, Lu YC, et al. Rhein induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress and Ca^{2+} -dependent

- mitochondrial death pathway in human nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Anticancer Res*, 2007, **27**(5A):3313–3322.
- [5] Du Q, Bian XL, Xu XL, et al. Role of mitochondrial permeability transition in human hepatocellular carcinoma Hep-G2 cell death induced by rhein [J]. *Fitoterapia*, 2013, **91**:68–73.
- [6] National Toxicology Program. NTP toxicology and carcinogenesis studies of EMODIN (CAS NO. 518-82-1) feed studies in F344/N rats and B6C3F1 mice [J]. *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*, 2001, **493**:1–278.
- [7] Zhang LY, Jiang ZZ, Pu CH, et al. Six-month oral toxicity study of total anthraquinone in radix et rhizoma rhei in SD rats [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2004, **25**(4):206–209.
- [8] Ren HB, Wang YY, Wang TJ. Rhubarb total anthraquinone to rat acute renal toxicity research [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med* (辽宁中医药大学学报), 2012, **14**(1):69–71.
- [9] Zhu S, Wang Y, Jin J, et al. Endoplasmic reticulum stress mediates aristolochic acid I-induced apoptosis in human renal proximal tubular epithelial cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2012, **26**(5):663–671.
- [10] Da HY, Jiang ZZ, Wang CF, et al. The toxic effects of rhein and emodin on human renal tubular epithelial cells *in vitro* [J]. *Chin Tradit Herb Drug* (中草药), 2009, **40**(1):102–105.
- [11] Du AP, Zou WZ, Yang JP. Apoptosis in injury and regeneration of tubular epithelial cells [J]. *J Beijing Med Univ* (北京医科大学学报), 1997, **29**(6):481–484.
- [12] Tang W, Wang W, Zhang Y, et al. Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced chemokine release in both TRAIL-resistant and TRAIL-sensitive cells via nuclear factor kappa B [J]. *FEBS J*, 2009, **276**(2):581–593.
- [13] Zhao YC, Gu G. Advance research of apoptosis pathway [J]. *Modern Med J* (现代医学), 2013, **41**(4):285–288.
- [14] Yu XL, Wang H, Zhang B, et al. Relationship between apoptosis of renal tubular epithelial cells and the change of expression of Bc-l 2 and Fas/FasL proteins in rats after renal ischemia/reperfusion injury [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2003, **24**(8):723–726.
- [15] Reimer T, Herrrnring C, Koczan D, et al. FasL; Fas ratio — a prognostic factor in breast carcinomas [J]. *Cancer Res*, 2000, **60**(4):822–828.
- [16] Kober A MM, Legewie S, Pförr C, et al. Caspase-8 activity has an essential role in CD95/Fas-mediated MAPK activation [J]. *Cell Death Dis*, 2011, **2**(10):e212.
- [17] Dasmahapatra G, Almenara JA, Grant S. Flavopiridol and histone deacetylase inhibitors promote mitochondrial injury and cell death in human leukemia cells that overexpress Bcl-2 [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, **69**(1):288–298.
- [18] Chen J, Mehta J L, Haider N, et al. Role of caspases in Ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells [J]. *Circ Res*, 2004, **94**(3):370–376.