

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 HgCl_2 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 Jiawei, 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, HgCl_2 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, 临床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]。竺红远等^[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 (碧云天生物技术有限公司); 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 real-plex 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 Doc™ 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 °C、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 3×10^4 个的细胞悬液, 每孔 200 μ L 接种入 96 孔板, 37 °C、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 μ mol/L 的大黄酸, 10 μ mol/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 μ L, 继续培养 4 h 后吸出 MTT, 加入 DMSO 溶液 150 μ L, 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 8×10^5 个。24 h 后开始给药, 设置正常对照组、10 μ mol/L HgCl₂ 组和不同浓度大黄酸给药组 (10, 25, 50, 100, 200 μ mol/L), 另设置不加细胞的溶剂对照组、不同浓度大黄酸的溶剂对照组 (10, 25, 50, 100, 200 μ mol/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 - 溶剂对照组绝对吸收度) / 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 1.2×10^5 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 μ mol/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 °C 预冷 PBS 洗涤细胞两次, 结合液 195 μ L 重悬细胞, 细胞悬液中加入 Annexin V-FITC 5 μ L, PI 染液 10 μ L, 25 °C 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 p -硝基苯胺 (p -nitroaniline, pNA) 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 $\mu\text{mol/L}$ 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 $^{\circ}\text{C}$,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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $c_{\rho\text{NA}}$ ($\mu\text{mol/L}$) 为通过标曲计算的 ρNA 浓度; $V(\text{mL})$ 为反应体系体积; $t(\text{h})$ 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 cm^2 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 $\mu\text{mol/L}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 10 min \rightarrow 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s)。结果处理采用相对定量中的 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 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: GAAGGCTGGGGCTCATTT
Fas	Forward: ACACTCACCAGCAACACCAAGT
	Reverse: CCTTTCCTCTCACCCAAACAAT
FasL	Forward: GGAAGTGGCAGAACTCCGTGA
	Reverse: AGATCAGAGCGGTTCATATGTGTC
FADD	Forward: GCTCCATCTGGCTGTTTGTTC
	Reverse: GGGAGTCAAGAGCATTGTGGCTA
Caspase-3	Forward: AGCAATAAATGAATGGGCTGAG
	Reverse: GTATGGAGAAATGGGCTGTAGG
Caspase-8	Forward: AG TGAA TCACAGACTTG
	Reverse: ATCAGAAGGGAAGACAAG

2.7 Western blot 检测蛋白表达

取 HK-2 细胞接种于 25 cm^2 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 $\mu\text{mol/L}$ 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 $^{\circ}\text{C}$,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 \times)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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{mol/L}$ 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 $\mu\text{mol/L}$ 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。10 $\mu\text{mol/L}$ HgCl_2 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 IC_{50} 分别为 151.3、71.7 和 28.6 $\mu\text{mol/L}$ 。

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。

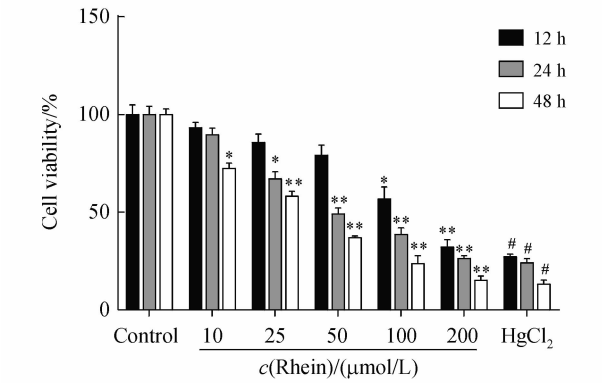


Figure 1 Effect of rhein on cell viability in HK-2 cells cell viability was determined by MTT assay ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs control group

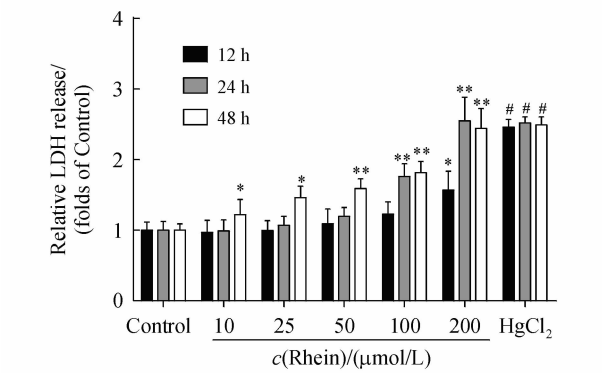


Figure 2 Effect of rhein on LDH release in HK-2 cells LDH release was determined by commercial kits ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs control group

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于对照组显著增加 ($P < 0.05$)。

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 活性相较于对照组显著性提高 ($P < 0.05$)。

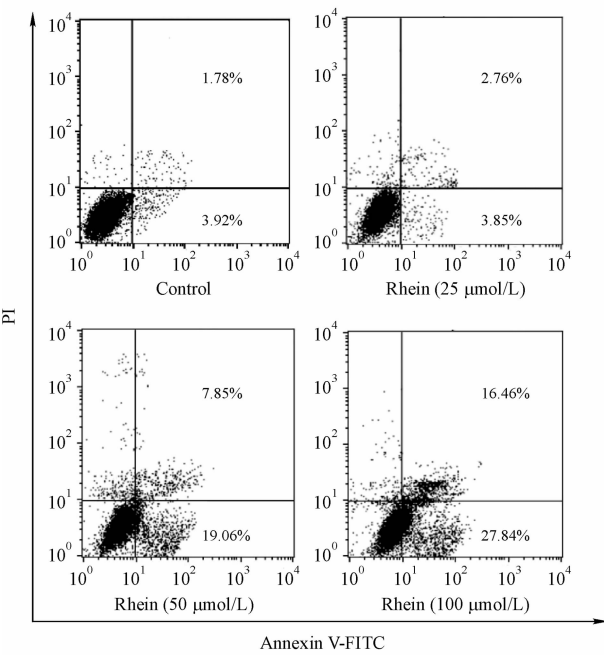


Figure 3 Effect of various concentrations of rhein on apoptosis rate in HK-2 cells for 24 h, apoptosis rate were determined by Annexin V / PI staining

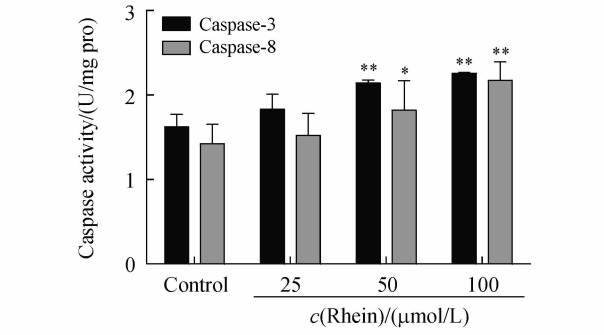


Figure 4 Effect of various concentrations of rhein on caspase-3, caspase-8 activity in HK-2 cells treated for 24 h, caspase activity was determined by commercial kits ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

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 ($P < 0.05$)。

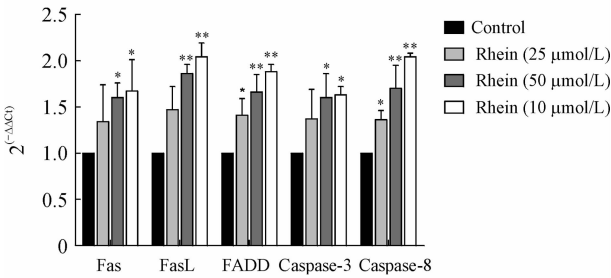


Figure 5 Gene expression of Fas, FasL, FADD, caspase-3, -8 in HK-2 cells treated with rhein for 24 h, mRNA expression was determined by Real-Time qPCR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

3.6 Western blot 分析蛋白表达

Western blot 条带如图 6 所示,经 β -actin 标准

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 $\mu\text{mol/L}$ 组、100 $\mu\text{mol/L}$ 表达显著性增加;caspase-8 原型在大黄酸 50 $\mu\text{mol/L}$ 组、100 $\mu\text{mol/L}$ 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 $\mu\text{mol/L}$ 组的 Fas, FasL 和 Cyt-c 蛋白相较对照组无显著性差异,而 50 $\mu\text{mol/L}$ 组、100 $\mu\text{mol/L}$ 组相较对照组均呈显著性增加($P < 0.05$)。

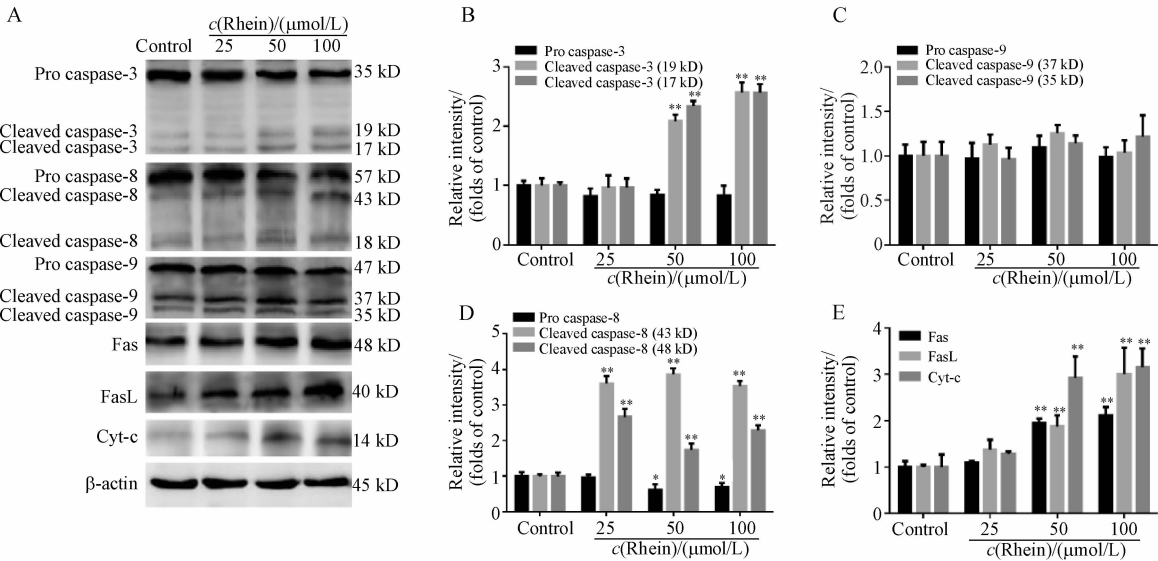


Figure 6 Apoptosis-related protein expressions in HK-2 cells treated with rhein for 24 h (A), caspase-3 (B), caspase-9 (C), caspase-8 (D), Fas, FasL, Cyt-c (E) expressions were determined by Western blot ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

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]。

本实验通过 MTT 实验,证明给药 12 h 时,大黄酸浓度大于 100 $\mu\text{mol/L}$ 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 $\mu\text{mol/L}$ 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 $\mu\text{mol/L}$ LDH 释放显著增加;给药 24 h 时,大

黄酸浓度大于 100 $\mu\text{mol/L}$ LDH 释放显著增加;给药 48 h 时,大黄酸浓度大于 10 $\mu\text{mol/L}$ LDH 释放显著增加。本实验在细胞毒性实验中设置了 10 $\mu\text{mol/L}$ HgCl_2 的阳性对照组,观察到该组 HK-2 细胞存活率显著下降,LDH 释放显著增加。MTT 实验协同 LDH 释放实验说明大黄酸对 HK-2 细胞有毒性作用,可引起 HK-2 细胞膜损坏,并呈时间-剂量依赖性。大黄酸作用 HK-2 细胞 12 h 时,100 $\mu\text{mol/L}$ 以下浓度的大黄酸对 HK-2 细胞存活率无显著性抑制作用,细胞无明显死亡现象;而作用 48 h 后,在浓度大于 10 $\mu\text{mol/L}$ 的大黄酸给药组中细胞死亡的形式以坏死为主。当大黄酸作用于 HK-2 细胞 24 h 后,100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度以下的大黄酸给药组生长率被抑制,LDH 释放又无显著性变化,故考虑在后面诱导凋亡实验中采用 24 h 的药物作用时间,并设置 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ 3 个浓度的大黄酸给药组。

细胞凋亡是由基因控制的细胞程序性死亡,机制较为复杂,目前主要发现 3 条途径涉及凋亡过程:内源性线粒体途径、外源性死亡受体途径以及内质网应激途径^[12]。在内源性线粒体途径中,凋亡启动时线粒体功能紊乱,线粒体完整性被破坏,Cyt-c 释放到细胞胞浆中,然后与胞质中凋亡蛋白激活因子(apoptosis protein active factor, Apaf-1)结合为聚合体,导致 caspase-9 原型活化分裂,从而激活下游其他 caspase 激酶,如 caspase-3^[13]。Fas 受体所介导的细胞凋亡是外源性死亡受体途径中最重要的一种,并且有研究发现 Fas 受体参与肾小管上皮细胞的损伤与凋亡^[14]。Fas 作为细胞表面的死亡受体,可与天然配体 FasL 相结合,向细胞内传递与凋亡有关的信号^[15],使 Fas 受体位于胞内的死亡域形成三聚体活化形式,募集连接蛋白 FADD,形成 FasL-Fas-FADD 死亡诱导信号复合物(death inducing signaling complex, DISC),DISC 可激活下游的原型 caspase-8,释放裂解后的活性片段 p10、p18^[16],从而继续激活下游的其他 caspase 激酶(如 caspase-3, caspase-6),引起细胞凋亡发生^[17]。caspase-3 是下游级联反应中的最为关键的限速酶,是多种凋亡通路的共同下游靶点,是细胞凋亡的重要执行者^[18]。本研究通过 Annexin V-FITC/PI 实验,发现当大黄酸浓度为 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,凋亡率相较于对照组显著增加。接

着,本研究通过试剂盒检测 HK-2 细胞中总 caspase-3, caspase-8 激酶活性,发现两种 caspase 激酶活性亦随大黄酸浓度增加而递增,其中 caspase-8 作为 caspase-3 的上游部分,即参与了线粒体途径,又涉及死亡受体途径。本研究继续通过 Real-Time qPCR 方法测定了 Fas, FasL, FADD, caspase-3, caspase-8 的 mRNA 的表达情况。结果证明了 caspase-3 和 caspase-8 的 mRNA 表达随大黄酸浓度增加而递增,这与 caspase 活性检测结果可互相印证;同时, FasL, Fas, FADD 的 mRNA 表达亦随大黄酸浓度增加而递增。最后,本实验通过 Western blot 方法检测了与凋亡相关蛋白的表达情况。结果发现大黄酸 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 组 Fas 和 FasL 的表达情况相较于对照组表达显著增多, 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 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 组表达显著性增加; caspase-8 原型在大黄酸 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 组表达显著性降低, 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,同时发现释放进入胞浆的 Cyt-c 随大黄酸浓度升高而增加。综上所述,大黄酸可能促使 FasL 和 HK-2 细胞表面的 Fas 受体相结合,从而启动细胞凋亡程序。同时,虽然 Cyt-c 从线粒体释放进入胞浆,但是并未导致 caspase-9 活化分裂,所以线粒体途径并非大黄酸导致 HK-2 细胞凋亡的主导途径。

通过对上述实验结果的分析,可证明大黄酸体外对 HK-2 细胞有毒性作用,说明大黄酸有潜在的肾毒性,其毒性作用机制可能是通过 Fas 途径所诱导 HK-2 细胞凋亡作用。

参考文献

- [1] Xiong XF. On the main active ingredient of TCM-rhubard in pharmacology[J]. *Clin J Chin Med* (中医临床研究), 2014, 6(10): 143–146.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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 Bcl-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, Herrnring 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, Pforr 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.