

虫草多糖 CPS-A 对血管紧张素Ⅱ诱导肝 L02 细胞损伤的保护作用

查正其¹, 陈秋利², 王玉峰³, 祝慧¹, 王莹¹, 尹鸿萍^{1*}, 乐龙^{4**}

(¹中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009; ²南京中医药大学药学院, 南京 210046;

³威海人生集团股份有限公司, 威海 264200; ⁴中国药科大学工学院, 南京 211198)

摘要 探讨虫草多糖 CPS-A 对 Ang II 诱导的人肝 L02 细胞损伤的保护作用。MTT 法考察 Ang II、CPS-A 对 L02 细胞增殖的影响, Ang II 刺激 L02 细胞后, 考察 CPS-A 对 L02 细胞的损伤保护作用; PCR、Real-Time PCR 和 Western blot 法检测 IL-6、IL-1 β 、AT1R、AT2R、NF- κ B p65、TNF α 等因子 mRNA 和蛋白质的表达水平。结果表明: Ang II、CPS-A 有效抑制 L02 细胞增殖的浓度分别为 1×10^{-5} mol/L 和 200 μ g/mL, PCR、Real-Time PCR 和 Western blot 结果显示, CPS-A 可以显著下调 IL-6、IL-1 β 、TNF α 、NF- κ B 和 AT₁R 的表达。CPS-A 对 Ang II 诱导的 L02 细胞损伤具有很好的保护作用。

关键词 虫草多糖; L02 细胞; 血管紧张素Ⅱ; 炎症

中图分类号 R285.5 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)04-0490-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170415

引用本文 查正其, 陈秋利, 王玉峰, 等. 虫草多糖 CPS-A 对血管紧张素Ⅱ诱导肝 L02 细胞损伤的保护作用 [J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(4):490–495.

Cite this article as: ZHA Zhengqi, CHEN Qiuli, WANG Yufeng, et al. Protective effects of *Cordyceps sinensis* polysaccharide CPS-A on angiotensin II-induced injury of liver L02 cells [J]. *J China Pharm Univ*, 2017, 48(4):490–495.

Protective effects of *Cordyceps sinensis* polysaccharide CPS-A on angiotensin II-induced injury of liver L02 cells

ZHA Zhengqi¹, CHEN Qiuli², WANG Yufeng³, ZHU Hui¹, WANG Ying¹, YIN Hongping^{1*}, YUE Long^{4**}

¹School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ²College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046; ³Weihai Rensheng Group Co., Lt. d, Weihai 264200; ⁴School of Engineering, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract This study aimed at the molecular mechanism of *Cordyceps sinensis* polysaccharide-A (CPS-A) on angiotensin (Ang II)-induced injury of L02 cells. The effect of AngII and CPS-A on the proliferation of L02 cells was analyzed by MTT assay. PCR, Real-Time PCR and Western blot were also employed to determine the expression of IL-1 β , AT1R, AT2R, NF- κ B p65, TNF α and other inflammatory factors at mRNA and protein levels. The results showed that Ang II and CPS-A could inhibit the proliferation of L02 cells by 1×10^{-5} mol/L and 200 μ g/mL, respectively. PCR, Real-Time PCR and Western blot showed that CPS-A could significantly down-regulate IL-1 β , TNF α , NF- κ B and AT1R. CPS-A has a good protective effect on AngII-induced L02 cell injury.

Key words *Cordyceps sinensis* polysaccharide-A (CPS-A); L02 cells; angiotensin II; inflammation

This study was supported by Jiangsu Science and Technology Research Project (No. S152001)

收稿日期 2017-03-14 通信作者 * Tel: 025-83271108 E-mail: yinhongping63@hotmail.com

** Tel: 13701582692 E-mail: 526560844@qq.com

基金项目 江苏省科技攻关项目资助(No. S152001)

虫草是特殊的复型真菌,隶属于麦角菌科、虫草属^[1]。多糖是虫草的主要活性成分之一,结构复杂多样。目前许多研究已经发现,虫草多糖具有抗肿瘤、抗氧化、免疫调节、抗炎、降血糖等多种生物活性^[2-3]。免疫药理学研究结果表明,虫草多糖能引起 T 细胞、NK 细胞、单核细胞和巨噬细胞的活化、增殖,并分泌各种淋巴因子^[4-5]。肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 是机体重要的体液调节系统,国内外学者发现,在心肌、血管平滑肌、肾、肝脏等多种器官组织中均有肾素及血管紧张素原的基因表达,共同参与对靶器官的调节^[6-10]。RAS 的主要成分为血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II), Ang II 是重要的致炎因子,介导炎性介质的分泌,参与组织炎症过程^[11]。Ang II 受体有两个亚型,即 AT1 受体和 AT2 受体^[12]。血管紧张素 II 1 型受体 (angiotensin II type 1 receptor, AT₁R) 可以介导吞噬细胞中的血管内皮生长因子 (VEGF)、白介素 1β (IL-1β)、肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、纤溶酶原激活物抑制因子 1 (PAI-1) 及肾上腺髓质激素的生成。AT₁R 的激活可以诱导肿瘤转化生长因子 β (TGF-β) 的表达,引起机体免疫抑制作用^[13]。核转录因子 NF-κB 是一种参与基因转录的多显性转录因子,可以将信息从胞浆传至细胞核内诱导免疫炎症相关基因的表达。研究表明,多糖能够作用于细胞膜上的 TLR 样受体,通过激活 NF-κB 进而调节 TNF-α、IL-1β 等炎症因子的表达,产生炎症反应或免疫调节活性^[2]。本研究在提取、分离纯化以及结构鉴定得到虫草多糖 CPS-A 的基础上,进一步考察 CPS-A 作用于 Ang II 诱导的人肝细胞 HL-7702 (L02) 损伤模型,观察 CPS-A 抑制细胞增殖及其 Ang II 所致损伤的保护作用。

1 材 料

1.1 试 剂

虫草多糖 (CPS-A): 由虫草头孢菌粉 (江苏神华药业) 采取酸醇法提取、分离纯化所得^[1]; 血管紧张素 II (Ang II, 美国 Aladdin 公司); DMEM 高糖培养基 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司); 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 溶液、二甲亚砜溶液 (DMSO, 美国 Amresco 公司); TRIzol 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); BU-

Superscript 逆转录试剂盒 (美国 Biouniquer 公司); 2 × Taq Master Mix (南京诺唯赞生物科技有限公司); Prestained 50bp-I DNA Ladder (上海捷瑞生物工程有限公司); 2 × UltraSYBR Mixture (江苏康为世纪生物科技有限公司); QuantiNova™ SYBR Green PCR (德国 KitQiagen 公司); 蛋白预染 Marker (美国 Thermo 公司); 细胞核和胞质蛋白提取试剂盒、牛血清白蛋白 (BSA, 上海生工生物工程有限公司); BCA 试剂盒、ECL 试剂盒 (碧云天生物技术研究所); AT₁R、IL-6、IL-1β、TNF-α、NF-κB 抗体 (美国 Cell Signaling 公司); 山羊抗兔 IgG-HRP 二抗 (武汉博士德生物工程有限公司)。

1.2 仪 器

琼脂糖凝胶电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); AH-2 型显微镜 (日本 Olympus 公司); Epoch 酶标仪 (美国 Bio Tek 公司); LXJ21 型离心机 (上海医用分析仪器厂); 定量 PCR 扩增仪 (美国 Applied Biosystems 公司)。

1.3 细 胞

人肝细胞 HL-7702 (L02) 购买自复旦 IBS 细胞资源中心。

2 方 法

2.1 细胞培养

L02 细胞采用 DMEM 高糖培养基培养 (含 10% 胎牛血清, 1 mL 青霉素/链霉素混合液), 放置于含 5% 浓度的 CO₂ 培养箱中 37 ℃ 恒温恒湿培养。

2.2 MTT 法考察 CPS-A 及 Ang II 对 L02 细胞增殖的影响

分别考察 CPS-A、Ang II 对 L02 细胞生长, CPS-A 对 Ang II 诱导的 L02 细胞损伤的影响。L02 细胞经复苏培养后传代至新的平皿中, 继续培养 12 h 至细胞汇合度长至 80% 左右, 稍倾斜吸弃旧培养基, 加入胰酶 1 mL 消化细胞, 轻柔荡洗细胞表面, 将死细胞及细胞代谢物吸去。加入胰酶 2 mL, 37 ℃ 消化 2 min, 加入新鲜培养基 3 mL 终止消化, 轻轻吹下细胞, 转移至离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 加培养基 5 mL 重悬。在显微镜下使用血球计数板对细胞计数, 加入适量培养基稀释至每毫升 2 × 10⁴ 个, 96 孔板铺板, 37 ℃ 培养。过夜贴壁后加入不同药物刺激 24 和 48 h

后显微镜下观察细胞形态。后每孔加入MTT(5 mg/mL) $20\text{ }\mu\text{L}$,继续培养4 h。将板倾斜,用1 mL注射器吸弃上清液,注意不要扰动细胞。每孔加DMSO $150\text{ }\mu\text{L}$,振摇5 min,570 nm处读取吸收度。

2.3 PCR检测相关因子mRNA的表达情况

取浓度为每毫升 2×10^4 个细胞铺6孔板,37 °C培养待细胞汇合度长至80%左右时,分组给予CPS-A刺激。继续培养12 h后,除空白组外,Ang II模型组、CPS-A给药组分别加入终浓度为 $1\times10^{-4}\text{ mol/L}$ 的Ang II,37 °C孵育24 h。TRIzol试剂盒提取细胞总RNA,并将mRNA逆转录为cDNA。普通PCR按照94 °C预变性3 min;94 °C变性30 s,56 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,循环30次;72 °C延伸5 min的反应条件,琼脂糖凝胶电泳检测NF-κB p65、IL-6、IL-1β、AT₁R以及AT₂R的mRNA的表达情况。

2.4 Western blot检测相关因子蛋白质表达

细胞经胰酶消化后,收集细胞悬液, 1000 r/min 离心5 min。RIPA蛋白裂解液裂解细胞,4 °C振荡30 min后 14000 r/min 离心10 min;将上清液吸入

预冷的干净EP管中,BCA法测定蛋白质浓度。所提取的蛋白质经SDS-PAGE凝胶电泳后,湿法100 V,4 °C转膜1.5 h,将蛋白质转移至PVDF膜上,5%的脱脂奶粉(TBST配制)室温封闭1 h。PBST洗涤3次,每次10 min,后加入一抗(小鼠抗人IL-6、IL-1β、AT₁R、NF-κB p65、TNFα抗体,1:1000 PBST稀释),室温振摇孵育2 h,反应结束后,弃抗体,PBST清洗3次,每次10 min。加入二抗(HRP标记山羊抗小鼠抗体,1:5000 PBST稀释),常温孵育1 h。PBST清洗3次,每次10 min。增强化学发光法(ECL)将两种显色底物1:1等体积混匀,将PVDF膜用滤纸擦干,将显色液均匀滴在膜上,在凝胶成像仪下曝光,拍照。

2.5 Real-Time PCR检测相关基因的表达量

利用表1所示7对引物组合,采用实时定量PCR扩增仪检测相关基因的表达量。扩增程序为95 °C预变性10 min,95 °C预变性15 s,60 °C退火/延伸30 s,50个热循环,溶解曲线测定为从60 °C到95 °C。每个试验设置3个重复复孔,数据用Stepone软件进行分析,基因相对定量按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。

Table 1 Sequences of primers used for Real-Time PCR

| Gene | Forward primer 5'→3' | Reverse primer 5'→3' |
|-------------------|----------------------|-----------------------|
| GAPDH | ATGGTGGTGAAGACGCCAGT | GCACCGTCAAGGCTGAGAAC |
| IL6 | GTGAAAGCAGCAAAGAGGC | CATTGTGCTTGGGTCAAG |
| IL-1β | ATGGCTTATTACAGTGGCA | GTAGTGGTGGTCGGAGATT |
| NF-κB | CCTCCCTCCAGCTAGATT | AGGCTTCACAGGACCAGAC |
| TNF-α | GGGGATTATGGCTCAGGTC | CGAGGCTCCAGTGAATTCCG |
| AT ₁ R | TCCTCGCCAATGATTCCAGC | TCAAATATCAAACCCGCGCC |
| AT ₂ R | GCTCGCCGGGCCAACATGC | GGCTTGACACCCACGCTCTGA |

2.6 数据分析

所有数据由GraphPad Prism 5.0软件计算完成。多组均数间的比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)Turkey法进行比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CPS-A及Ang II对L02细胞增殖的影响

如图1-A所示,Ang II对L02细胞生长有一定的抑制作用。当Ang II浓度为 $1\times10^{-5}\text{ mol/L}$ 时,能够显著性抑制L02细胞增殖($P < 0.05$),Ang II浓度为 $1\times10^{-4}\text{ mol/L}$ 时,能够极显著性抑制L02细胞活力($P < 0.01$),故本实验选用 $1\times10^{-4}\text{ mol/L}$

作为Ang II的刺激浓度。从损伤作用时间来看,48与24 h损伤差异程度不大,选用损伤作用时间为24 h。给予虫草多糖CPS-A作用后,如图1-B所示,质量浓度低于 $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的CPS-A对L02的生长没有抑制作用,当其质量浓度达到 $200\text{ }\mu\text{g/mL}$,孵育48 h时,对L02生长有显著性抑制作用,故而本实验选择25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 作为CPS-A给药的低、中、高浓度,根据实验室前期研究,选择预保护的给药方式,预保护时间12 h。图1-C结果显示,CPS-A对Ang II诱导的L02细胞损伤具有保护作用。 $1\times10^{-4}\text{ mol/L}$ 的Ang II对L02有极显著的抑制增殖作用($P < 0.01$),在给予CPS-A预保护12 h之后, $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的CPS-A能够起到显著性的保护

作用($P < 0.05$) $,$ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CPS-A 能够起到极显著性的保护作用($P < 0.01$)。结合图 1-A 和图

1-B 实验结果,本实验选择 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为 CPS-A 给药的低、中、高浓度。

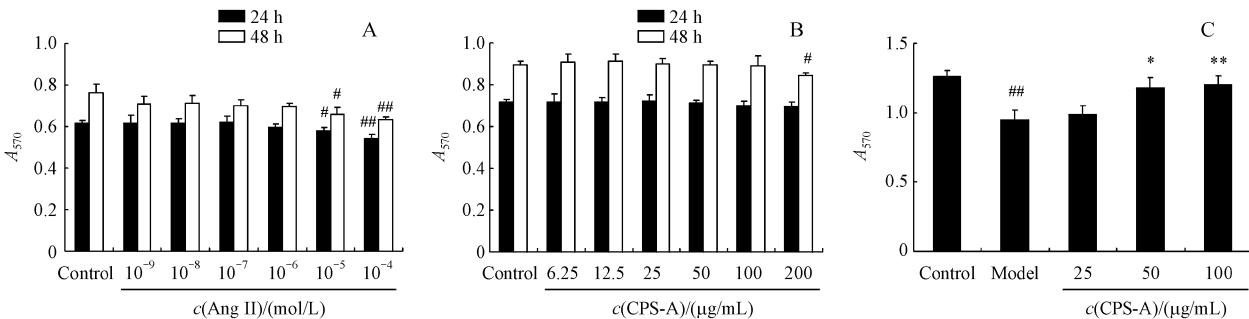


Figure 1 (A) Effects of angiotensin II (Ang II) on L02 proliferation assessed by MTT assay; (B) Effects of *Cordyceps sinensis* polysaccharide-A (CPS-A) on L02 proliferation assessed by MTT assay; (C) Effects of CPS-A on Ang II-induced L02 proliferation assessed by MTT assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$). $^{##}P < 0.01$ vs control group; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs model group

3.2 NF- κ B p65、IL-6、IL-1 β 、AT₂R 以及 AT₁R 的 mRNA 表达

如图 2 所示,AT₂R 受体的基础水平较低,Ang II 刺激后调控效果不明显,故在之后的实验中不再进行研究。相对于空白组,IL-6,AT₁R 表达量有明显的增加,经过 Ang II 的刺激之后的基因表达均有明显的差异,p65 和 IL-1 β 因子的表达差异不明显。

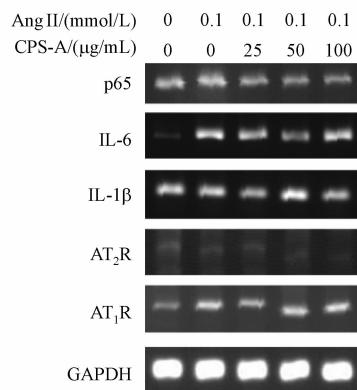


Figure 2 mRNA expressions of CPS-A on Ang II-induced L02. The mRNA expression of IL-6, IL-1 β , AT₁R, AT₂R and NF- κ B p65 in Ang II-induced L02, standardized by GAPDH

3.3 IL-6、IL-1 β 、AT₁R、NF- κ B p65、TNF α 相关因子蛋白质的表达情况

如图 3 所示,给予 Ang II 刺激后(Model 组),IL-6,IL-1 β ,TNF- α ,NF- κ B 和 AT₁R 的蛋白表达水平均有极显著增加($P < 0.01$),而用低、中、高浓度的 CPS-A 预保护细胞 12 h 后再加入 Ang II 刺激的

给药组,炎性因子蛋白表达量均得到显著的下调,随着低、中、高浓度组给药剂量的增大,炎性因子蛋白表达量下降显著。实验结果表明,Ang II 可以造成相关炎性因子的蛋白表达量显著性升高,CPS-A 可以抑制这种由 Ang II 引起的相关组分的高表达。

3.4 IL-6,IL-1 β ,TNF- α ,AT₁R 和 NF- κ B 相关基因的表达

如图 4 所示,IL-6,IL-1 β ,TNF- α ,AT₁R 和 NF- κ B 基因的 mRNA 表达水平均有显著增加,与空白组相比分别增加 33.6%、21.6%、25.5%、27.5% 和 74.5%。表明 Ang II 可以造成相关基因 mRNA 表达量升高,CPS-A 可以抑制由 Ang II 引起的相关基因 mRNA 的高表达。以上实验结果表明,CPS-A 可以减少 L02 中 Ang II 造成的炎性因子的表达量,表明 CPS-A 对 L02 细胞具有保护损伤活性。

4 讨 论

研究表明,虫草多糖对肝脏具有保护作用,主要保护化学性肝损伤、免疫性肝损伤和肝纤维化等^[14]。目前多数认为虫草多糖对肝脏的保护作用主要是通过抗脂质过氧化、改善人体细胞和体液免疫功能,以及增强肝细胞的吞噬能力,越来越多的研究表明在各种氧化应激引起的细胞损伤过程中,虫草及其单体成分具有抗氧化活性,能增强超氧化物歧化酶(SOD)的活性,增强氧利用率,促进 ATP 形成,能够增强活性氧消除能力等^[15]。

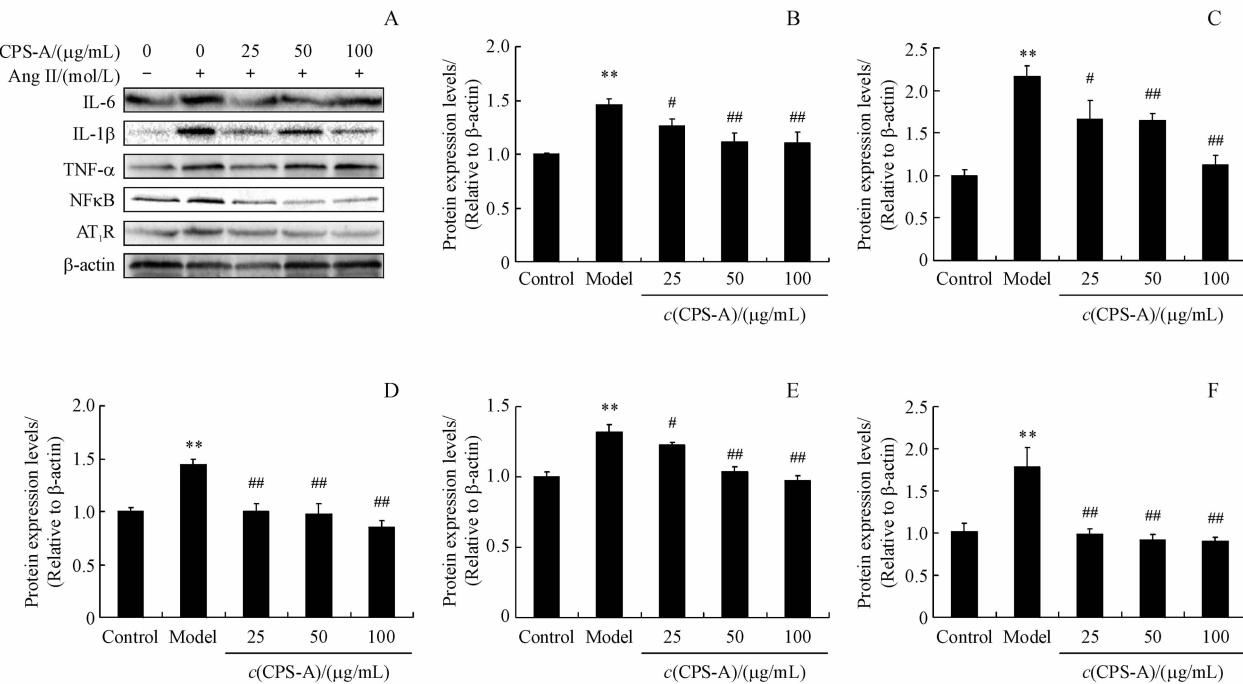


Figure 3 Effects of CPS-A on Ang II-induced apoptosis in L02 cells. (A) The protein expression of IL-6, IL-1 β , TNF- α , NF- κ B and AT₁R in Ang II-induced L02. Columns of the protein expression levels of IL-6 (B), IL-1 β (C), TNF- α (D), NF- κ B (E) and AT₁R (F) in L02 cells, standardized by β -actin ($\bar{x} \pm s, n=3$). ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs model group

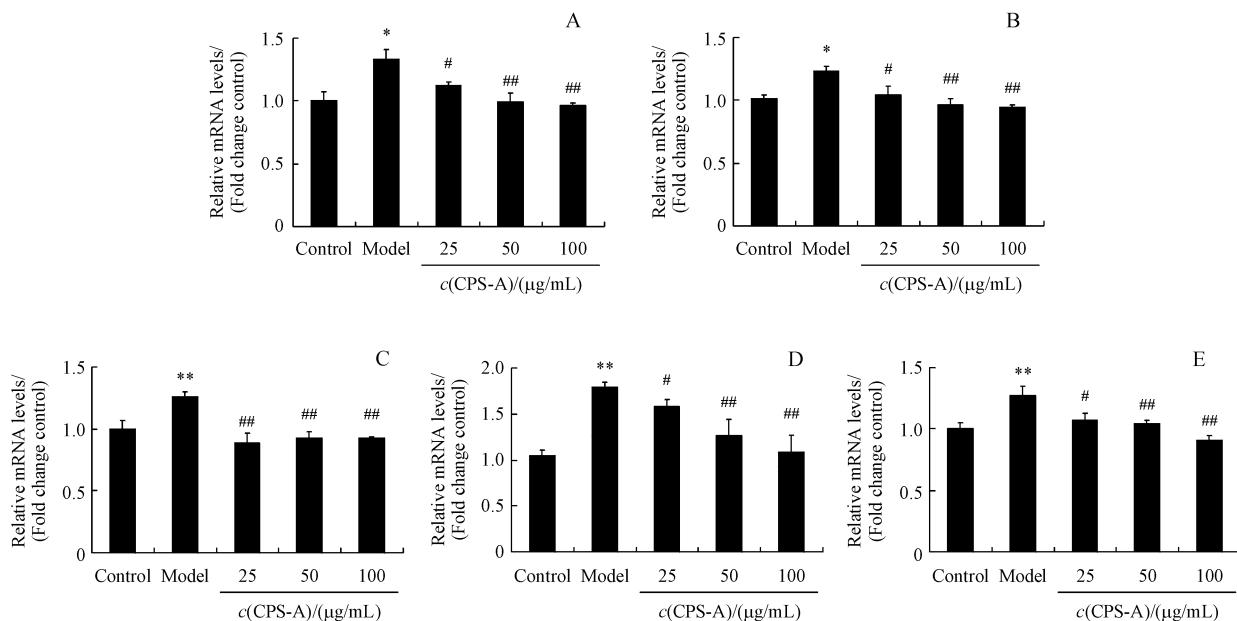


Figure 4 mRNA expressions of CPS-A on Ang II-induced L02 measured by Real-Time PCR. Columns of the mRNA expression levels of IL-6 (A), IL-1 β (B), TNF- α (C), AT₁R (D) and NF- κ B (E) in L02 cells, standardized by GAPDH ($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

本研究采用提取分离纯化得到的虫草多糖 CPS-A 作用于 Ang II 诱导的 L02 细胞损伤模型。研究表明,在 Ang II 刺激 L02 细胞导致抑制其增

殖的相关炎性因子及受体中表达方面,AT₂R 的 mRNA 水平表达不明显,而 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、NF- κ B 和 AT₁R 的蛋白表达水平均有极显著增加。在

给药浓度方面,随着低、中、高剂量组给药量的增加,炎性因子及受体蛋白表达量均得到显著的下调,且呈剂量依赖性。以上结果初步表明,CPS-A 可以抑制由 Ang II 引起的相关炎性因子的高表达,对于 Ang II 诱导的 L02 细胞损伤具有一定的保护作用。以本研究为基础,将 CPS-A 开发为治疗炎症导致的肝损伤疾病具有潜在意义,发挥保护作用的治疗机制有待更深入的研究。

参 考 文 献

- [1] Tang H, Wei W, Wang W, et al. Effects of cultured cordycepsmilitaris, mycelia polysaccharide A on tumor neurosis factor- α induced hepatocyte injury with mitochondrial abnormality [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, **163**:43–53.
- [2] Luo X, Duan Y, Yang W, et al. Structural elucidation and immunostimulatory activity of polysaccharide isolated by subcritical water extraction from cordycepsmilitaris [J]. *Carbohydr Polym*, 2017, **157**:794–802.
- [3] Zhu ZY, Guo MZ, Liu F, et al. Preparation and inhibition on α -d-glucosidase of low molecular weight polysaccharide from cordycepsmilitaris [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, **93** (3): 27–33.
- [4] Wang J, Nie S, Kan L, et al. Comparison of structural features and antioxidant activity of polysaccharides from natural and cultured cordycepssinensis [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2017, **26** (1): 55–62.
- [5] Xiao Y, Huang Q, Zheng Z, et al. Construction of a cordyceps-sinensis exopolysaccharide-conjugated selenium nanoparticles and enhancement of their antioxidant activities [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, **99** (1): 483–491.
- [6] Jr JJ, Ibrahim NE. Renin-angiotensin system blockade in heart failure; more to the picture than meets the eye [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2017, **69** (7): 820–822.
- [7] Karnik S S, Khuraijam D, Tirupula K, et al. Significance of Ang (1-7) coupling with MAS1 and other GPCRs to the renin-angiotensin system; IUPHAR review "X" [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, **174** (9): 737–741.
- [8] Wu J, Xie H, Yao S, et al. Macrophage and nerve interaction in endometriosis [J]. *J Neuroinflammation*, 2017, **14** (1): 53.
- [9] Cheungpasitporn W, Thongprayoon C, Mao MA, et al. The effect of renin-angiotensin system inhibitors on kidney allograft survival; a systematic review and meta-analysis [J]. *Nor Amer J Med Sci*, 2016, **8** (7): 291–296.
- [10] Zhang Y, Wang L, Song Y, et al. Renin inhibitor aliskiren exerts beneficial effect on trabecular bone by regulating skeletal renin-angiotensin system and kallikrein-kinin system in ovariectomized mice [J]. *Ost Int*, 2016, **27** (3): 1083–1092.
- [11] McMullan CJ, Borgi L, Fisher N, et al. Effect of uric acid lowering on renin-angiotensin system activation and ambulatory bp; a randomized controlled trial [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017, **12** (5): 807.
- [12] Sancho-Bru P, Ginès P. Targeting the renin-angiotensin system in liver fibrosis [J]. *Hep Int*, 2016 (5): 1–3.
- [13] Zou X, Zhang XX, Liu XY, et al. Renal kallikrein activation and renoprotection after dual blockade of renin-angiotensin system in diet-induced diabetic nephropathy [J]. *J Diabetes Res*, 2015: 310645. doi:10.1155/2015/310645.
- [14] Kloet ADD, Wang L, Ludin JA, et al. Reporter mouse strain provides a novel look at angiotensin type-2 receptor distribution in the central nervous system [J]. *Brain Struct Funct*, 2016, **221** (2): 891–912.
- [15] Ahad A, Mujeeb M, Ahsan H, et al. Nephroprotective potential of quercus infectoria galls against experimentally induced diabetic nephropathy in rats through inhibition of renal oxidative stress and TGF- β [J]. *Animal Cells Syst*, 2016, **20** (4): 1–10.