

大黄酸和大黄素在体外对人肾小管上皮细胞的毒性作用研究

笪红远^{1,2}, 江振洲¹, 王翠芬¹, 张陆勇¹, 刘国卿¹

(1. 中国药科大学药学院, 江苏 南京 210009; 2. 国家药品审评中心, 北京 100038)

摘要:目的 在体外比较大黄酸和大黄素作用于人肾小管上皮细胞(HK-2)的毒性表现和差异,并初步探讨其肾毒性机制。方法 采用MTT法观察细胞生长抑制作用;透射电镜观察细胞内超微结构变化;流式细胞仪观察细胞凋亡情况;检测乳酸脱氢酶(LDH)和N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)释放水平。结果 大黄酸和大黄素均可明显抑制HK-2细胞增殖;电镜观察可见细胞核不规则,出现了染色质的浓缩和边集;流式细胞仪观察大黄酸和大黄素均能诱导细胞凋亡;大黄素组LDH和NAG释放水平均高于大黄酸组。结论 大黄酸和大黄素均能诱导HK-2细胞凋亡,具有明显的细胞毒性作用,并且大黄素对HK-2细胞的毒性作用强于大黄酸。

关键词: 大黄素; 大黄酸; 人肾小管上皮细胞(HK-2); 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)01-0102-04

大黄酸(rhein)属单萜类1,8-二羟基蒽衍生物,是大黄、何首乌、虎杖等多种中药的有效成分之一。大黄素(emodin)是从大黄属、蓼属、鼠李属和番泻叶等中药中分离得到的活性成分。研究发现,两种中药有效成分都具有广泛而相似的药理活性^[1,2],如抗肿瘤、抗炎、以及调节肾功能等作用。已有研究表明,大黄酸可影响细胞增殖动力学和细胞周期并对体外培养的细胞的增殖抑制作用随时间延长而增大^[3]。大黄素是酪氨酸蛋白激酶抑制剂,能够抑制与细胞增殖、转化和分化的信号通路有关致癌基因的活性,影响细胞信号传导通路^[4,5]。同时,大黄素具有诱导细胞凋亡的作用,此结论首先是通过狼疮性肾炎病人肾纤维细胞实验而被证实^[6]。对肾脏作用方面,研究发现大黄酸可以抑制糖尿病大鼠肾脏高代谢,明显减少尿蛋白,控制肾脏的肥大^[7]。大黄素可以抑制人肾成纤维细胞、肾小球系膜细胞和肾小管上皮细胞的增殖^[8],阻止肾间质纤维化^[9]。又有研究表明,大黄总蒽醌(游离苷元有大黄酸、大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄素甲醚等)对SD大鼠毒性反应的靶器官可能主要在肾脏,特别是肾近曲小管^[10]。高剂量大黄总蒽醌可致大鼠肾功能不全,可能是由于产生促红细胞生成素的肾小管上皮细胞或间质细胞被破坏所致^[11]。而关于大黄酸和大黄素对人的肾毒性研究目前尚未有详细报道。本实验通过不同剂量大黄酸和大黄素对人肾小管上皮细胞的作用对比,探讨它们体外肾毒性方面的差别,并从细胞水平进行了初步研究。

1 材料

1.1 细胞、试剂与药品:人肾小管上皮细胞(HK-2,购自北京协和生物技术所细胞库),1:1 DEM/F12 (Gibco), PBS (KCl 0.2 g、KH₂PO₄ 0.2 g、NaCl 8.0 g、Na₂HPO₄·12H₂O 2.08 g, pH 7.4),胎牛血清(FBS),胰蛋白酶(南京生兴生物技术有限公司),乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所),N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)试剂盒(南京建成生物工程研究所),BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天)。大黄酸标准品(质量分数>98%,批号0757-200206),大黄素标准品(质量分数>98%,2批号0756-200110)均购自中国药品生物制品检定所。MTT(南京生兴生物技术有限公司);顺铂(齐鲁制药有限公司);二甲基亚砜为国产分析纯。

1.2 仪器:二氧化碳孵箱(Heraeus,德国);微孔板测读仪(Tecan,瑞士);荧光倒置显微镜(Olympus,日本);电子分析天平(Sartorius,德国);HH-4数显恒温水浴锅(国华电器有限公司);超净工作台(吴县市实验动物器材厂);透射电子显微镜(JEM2000,日本);流式细胞仪(BD,美国)。

2 方法

2.1 MTT法检测大黄酸、大黄素对HK-2细胞增殖的影响:HK-2细胞置于含10% FBS的DF12培养基(含链霉素0.18 g/L、氨苄青霉素0.1 g/L, pH 7.2~7.4)中,37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。细胞呈贴壁生长,每1~2天换液1次。取处

收稿日期:2008-06-21

基金项目:国家中医药管理局中医药科学技术研究专项资助项目(国中医药科 2004ZX05);科技部“十五”重大专项(863计划)资助项目(2002AA2Z3113)

*通讯作者 刘国卿 Tel: (025) 83271500 E-mail: lyzhang@cpu.edu.cn

于对数生长期的 HK-2 细胞,用胰蛋白酶消化制成细胞悬液,细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,接种于 96 孔板中,每孔 180 μL 。常规培养 24 h 后,弃去培养基,加入新鲜培养基。对照组:加入完全培养基。大黄酸组:每组加入大黄酸,使其终浓度分别为 10、20、40、80、100 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。大黄素组:每组加入大黄素,使其终浓度分别为 10、20、40、80、100 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。阳性对照组:加入顺铂终浓度为 50 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 。溶剂对照组:加入 0.5% DMSO。每组均为 8 个孔。加药后分别培养 12、24、48 h,采用 MTT 染色,在微孔板测读仪于波长 510 nm 处测定各孔的吸光度 (A) 值,观察细胞的生长状况并计算细胞存活率。

细胞存活率 = 药物组 A 值 / 对照组 A 值 $\times 100\%$

2.2 形态学观察

2.2.1 相差显微镜下的形态学变化:HK-2 细胞经 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的大黄酸或大黄素处理 24 h 后,相差显微镜下观察并照相。

2.2.2 透射电子显微镜下的形态学变化:HK-2 细胞经 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的大黄酸或大黄素处理 24 h 后,收集处理后的细胞于离心管中,1 000 r/min 离心 5 min。用 PBS 洗两遍。弃去上清,加 2.5% 戊二醛。进行脱水,包埋,切片,染色处理后,上机观察。

2.3 大黄酸、大黄素对 LDH 渗出和 NAG 酶活力的影响:取处于指数生长期,状态良好的 HK-2 细胞,调细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,接种于 24 孔细胞培养板中,每孔 1 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,分别加入不同浓度的大黄素和大黄酸,对照组加入 0.5% DMSO,分别再培养 12、24 h 后,吸出各组上清液备用。按照试剂盒说明书操作,用分光光度法检测上清液中 LDH、NAG 酶活力。

2.4 大黄酸、大黄素对 HK-2 细胞凋亡和坏死的鉴别 (Annexin V/PI 双染色法):将正常培养和给药培养 24 h 后的 HK-2 细胞先用 0.25% 的胰酶消化离心,将细胞密度调至约 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液,用 PBS 洗 2 次,加入 100 μL 结合缓冲液和 FITC 标记的 Annexin-V (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 10 μL ,室温避光 30 min,再加入 PI (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 5 μL ,避光反应 5 min 后,加入 400 μL 结合缓冲液,立即用 FACSscan 进行流式细胞术定量检测 (一般不超过 1 h),同时以不加 Annexin-V-FITC 及 PI 的一管作为阴性对照。

2.5 统计分析:数据资料用 SPSS 13.0 软件进行统计,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 大黄酸、大黄素对 HK-2 细胞增殖的影响:溶剂对照在最高浓度时 (0.5% DMSO) 对 HK-2 细胞无明显生长抑制效应,细胞存活率均在 98% 以上,无统计学差异 ($P > 0.05$)。10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的大黄酸、大黄素对 HK-2 细胞生长抑制作用不太明显,浓度高于 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 则表现出一定的抑制作用,在 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 条件下,均具有较为明显的抑制细胞增殖的作用,并且随着孵育时间延长,抑制作用逐渐增强。可见大黄酸、大黄素均对 HK-2 细胞有生长抑制效应,且具有一定的时间和浓度依赖性。结果见表 1。在同等条件下,大黄素对 HK-2 细胞的生长抑制效应明显强于大黄酸。100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 大黄素引起 HK-2 细胞死亡太多,所以随后所检测的指标均采用 20、40、80 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 3 个浓度,同等条件下,若不加特殊说明,均指大黄酸、大黄素作用 24 h。

表 1 不同浓度大黄酸和大黄素对 HK-2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 18$)

Table 1 Effects of emodin and Rhein at different concentration on HK-2 cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 18$)

组别	C ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	存活率 / %		
		12 h	24 h	48 h
对照	-	100	100	100
0.5% DMSO 溶剂	-	98.74 $\pm$ 1.71	98.31 $\pm$ 2.30	99.08 $\pm$ 2.34
大黄酸	10	97.33 $\pm$ 6.33	94.81 $\pm$ 7.11	99.71 $\pm$ 6.07
	20	93.11 $\pm$ 7.83	93.07 $\pm$ 4.49	90.16 $\pm$ 12.97
	40	85.26 $\pm$ 8.19	75.31 $\pm$ 5.19 *	73.09 $\pm$ 8.87 *
	80	72.85 $\pm$ 6.45 *	65.78 $\pm$ 4.69 **	61.24 $\pm$ 7.20 **
	100	71.91 $\pm$ 3.72 *	62.23 $\pm$ 6.37 **	54.15 $\pm$ 11.38 **
	100	71.91 $\pm$ 3.72 *	62.23 $\pm$ 6.37 **	54.15 $\pm$ 11.38 **
大黄素	10	98.29 $\pm$ 3.18	97.40 $\pm$ 3.29	96.44 $\pm$ 3.61
	20	94.76 $\pm$ 5.31	89.99 $\pm$ 4.05	77.63 $\pm$ 5.80 *
	40	77.26 $\pm$ 4.67 *	59.30 $\pm$ 3.58 **	47.67 $\pm$ 6.48 **
	80	50.31 $\pm$ 3.21 **	47.74 $\pm$ 4.20 **	33.63 $\pm$ 4.15 **
	100	40.37 $\pm$ 6.14 **	30.76 $\pm$ 3.97 **	28.01 $\pm$ 1.51 **
	100	40.37 $\pm$ 6.14 **	30.76 $\pm$ 3.97 **	28.01 $\pm$ 1.51 **
顺铂	20	34.85 $\pm$ 13.13 **	30.51 $\pm$ 11.05 **	23.56 $\pm$ 3.41 **

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

3.2 形态学观察结果

3.2.1 相差显微镜下的形态学变化:正常的 HK-2 细胞呈圆梭形,核与染色质比较均匀,核质比较大,用 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的大黄素处理 24 h, HK-2 细胞生长活性下降,大部分细胞表面皱缩,体积变小,变圆;部分细胞固缩、分解,偶见细胞碎片 (图 1 中箭头所示);40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的大黄酸作用于 HK-2 细胞,其形态学变化明显弱于大黄素。

3.2.2 透射电子显微镜下的形态学变化:为进一步观察大黄素诱导的 HK-2 细胞死亡的形态特征, HK-2 细胞经不同处理后,在透射电镜下观察超微

结构的变化。正常的 HK-2 细胞核呈圆形,较大,染色质均匀地分布其中,核仁明显。HK-2 经大黄素处理后,细胞核体积缩小,染色质固缩,浓聚于核膜附近,形成月牙形结构。HK-2 经大黄酸处理后,

细胞核变的不规则,出现了染色质的浓缩和边集,但是大黄素诱导 HK-2 细胞产生上述现象的细胞数和程度明显高于大黄酸。该结果初步说明大黄酸对 HK-2 细胞的毒性弱于大黄素。结果见图 2。

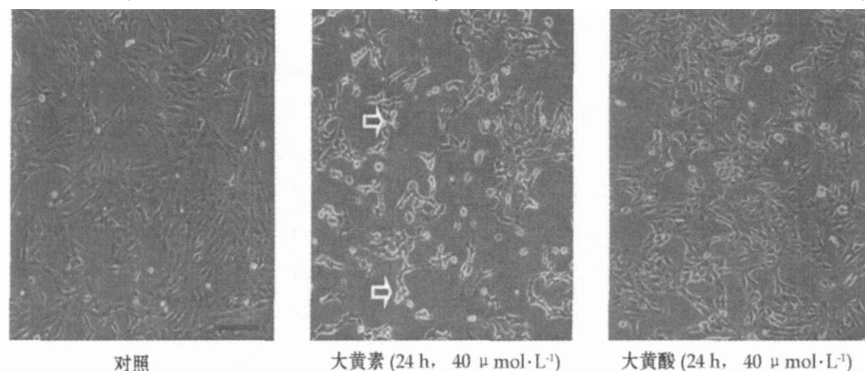


图 1 大黄素和大黄酸对 HK-2 细胞形态学变化的影响

Fig. 1 Effects of emodin and rhein on morphological changes of HK-2 cells

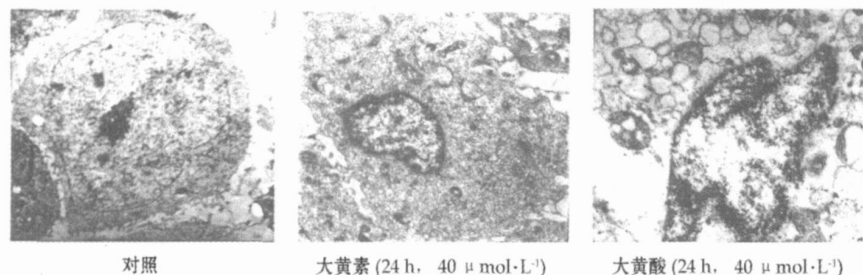


图 2 大黄素和大黄酸对 HK-2 细胞超微结构改变的影响

Fig. 2 Effects of emodin and rhein on microstructure changes of HK-2 cells

3.3 LDH、NAG 酶活性检测结果:不同浓度的大黄素、大黄酸分别作用于 HK-2 细胞 12 和 24 h 后,通过检测细胞上清液中 LDH 和 NAG 的酶活力显示对细胞的损伤程度,结果可见大黄素明显增加细胞释放 LDH 和 NAG,并与药物的浓度和药物的作用时间呈正相关,经大黄酸处理后的细胞释放的 LDH 与对照组比较无显著性差异,NAG 的释放只是在浓度高于 40 $\mu\text{mol/L}$,作用时间长于 24 h 才可见显著增加,并且其程度明显弱于大黄素组。上述结果表明大黄素对 HK-2 有一定的毒性,而大黄酸对 HK-2 的毒性较为轻微。结果见表 2。

3.4 大黄酸、大黄素对 HK-2 细胞凋亡和坏死的影响:细胞周期的紊乱与凋亡的诱导关系密切^[12],为进一步探讨大黄素、大黄酸引起的 HK-2 细胞生长抑制是否与细胞凋亡有关,本研究用 Annexin V/PI 染色区分早期凋亡^[13]与中晚期凋亡(坏死)。结果见表 3。HK-2 细胞在大黄素(40 $\mu\text{mol/L}$)的作用下主要表现为早期凋亡,早期凋亡细胞的比例在 24 h 达到约 33%,因此大黄素诱导 HK-2 细胞

表 2 大黄酸和大黄素对 HK-2 细胞漏出 LDH 及 NAG 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 18$)

Table 2 Effects of emodin on leakage of LDH and NAG from HK-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 18$)

组别	C ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	LDH/(U $\cdot \text{L}^{-1}$)		NAG/(U $\cdot \text{L}^{-1}$)	
		12 h	24 h	12 h	24 h
对照	-	101.25 $\pm$ 24.14	117.13 $\pm$ 20.39	3.76 $\pm$ 0.50	3.91 $\pm$ 0.57
大黄素	20	121.14 $\pm$ 30.06	142.51 $\pm$ 11.79	5.10 $\pm$ 0.60 *	5.82 $\pm$ 0.59 *
	40	208.51 $\pm$ 27.15 *	230.51 $\pm$ 10.36 *	6.91 $\pm$ 0.21 *	7.84 $\pm$ 0.73 **
	80	282.88 $\pm$ 38.87 **	306.13 $\pm$ 16.55 **	9.29 $\pm$ 0.34 **	9.98 $\pm$ 0.89 **
大黄酸	20	117.90 $\pm$ 23.72	115.11 $\pm$ 21.12	4.01 $\pm$ 0.34	5.13 $\pm$ 0.50
	40	123.61 $\pm$ 26.51	126.13 $\pm$ 32.07	4.10 $\pm$ 0.77	5.42 $\pm$ 0.51 *
	80	145.52 $\pm$ 23.72	131.71 $\pm$ 24.98	4.68 $\pm$ 0.39	7.07 $\pm$ 0.58 **

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

主要产生早期凋亡,高浓度时,中晚期凋亡细胞的比例也有一定增加;同样条件下,大黄酸诱导 HK-2 细胞主要产生早期凋亡的作用较弱。

4 讨论

大黄为常用中药,具有泄下、抗菌、抗肿瘤、调血脂等作用^[14,15]。大黄的化学名称是 3-甲基-1,3,8-三羟基蒽醌,是大黄总蒽醌中的一个主要活性成

表 3 大黄酸和大黄素对 HK-2 细胞凋亡的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effects of emodin and rhein on apoptosis
of HK-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	C ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	早期凋亡 细胞/%	晚期凋亡和 坏死细胞/%	存活细胞/ %
对照	-	6.21 $\pm$ 1.46	6.45 $\pm$ 1.67	87.33 $\pm$ 4.10
大黄素	20	8.79 $\pm$ 2.53	10.33 $\pm$ 2.74 *	76.60 $\pm$ 8.67
	40	33.16 $\pm$ 3.83 **	17.25 $\pm$ 3.53 *	45.42 $\pm$ 5.92 **
	80	86.22 $\pm$ 7.09 **	11.72 $\pm$ 1.87 *	1.02 $\pm$ 0.04 **
大黄酸	20	8.89 $\pm$ 2.51	12.30 $\pm$ 2.63 *	72.02 $\pm$ 9.76
	40	10.32 $\pm$ 2.71 *	14.89 $\pm$ 5.91 *	66.51 $\pm$ 7.62 *
	80	10.83 $\pm$ 2.10 *	15.46 $\pm$ 6.27 *	66.39 $\pm$ 8.63 *

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

分。据报道,动物亚急性毒性实验和长期毒性实验结果显示,大黄素可导致大鼠肾小管出现病理性改变。但大黄素引起肾毒性的机制还不清楚。因而本研究以人肾小管上皮细胞(HK-2)为对象,评价大黄素的细胞毒作用,并与大黄酸进行比较。本实验用MTT法、形态学方法、PI和Annexin V/PI染色等多种检测手段评价了大黄素和大黄酸对HK-2细胞毒作用,结果表明大黄素可抑制HK-2细胞生长,出现核浓缩、染色体边集等现象,同时早期凋亡细胞比率明显升高,而大黄酸的毒性作用强度明显弱于大黄素。

本实验观察到大黄素诱导HK-2细胞凋亡的现象。在凋亡的发展过程中,最明显的实验证据是细胞形态学的变化。与细胞坏死时染色质和细胞器肿胀、胞膜破裂和胞质溶酶体释放等引起炎症反应的细胞学特征不同,凋亡的共同特征是细胞皱缩变小,细胞核的形态改变尤为突出,染色质致密聚集成斑状及聚集在核膜周边,但不引起炎症反应。在另外的研究中选用Hoechst 33258作为荧光探针,在荧光显微镜下观察到大黄素作用下HK-2细胞核出现不均匀亮度的蓝色荧光,核染色质呈现凝集、边缘化等凋亡的典型变化。在本研究中,透射电镜下更清楚地看到了这一最具特征性的形态学变化。

本研究进一步用Annexin V/PI双染细胞流式定量检测了大黄素、大黄酸作用后活细胞、早期凋亡和中晚期凋亡细胞比例的动态变化。HK-2的活细胞数在大黄素作用24 h内逐渐下降,这一时期内细胞死亡的主要形式是早期凋亡。随着大黄素作用时间的延长,活细胞数进一步下降,此时细胞死亡的形式除早期凋亡外还有中晚期凋亡(坏死),LDH渗

出率实验结果也与这一结果相一致。LDH是一种糖酵解酶,存在于机体所有组织细胞的胞质内,其中以肾脏中的量较高。LDH释放率升高是细胞膜损伤的标志。细胞在发生坏死或中晚期凋亡时,LDH渗出率均升高,因此,在大黄素的作用下部分HK-2细胞是出现了原发性的细胞坏死还是继发于早期凋亡的中晚期凋亡,本实验很难鉴别。但该研究结果明确表明大黄素主要诱导HK-2细胞发生了凋亡。

综上所述,本实验结果充分说明大黄素对HK-2细胞具有毒性作用,大黄酸也有较轻的毒性作用,大黄素比大黄酸具有更强的体外肾毒性。大黄素的细胞毒作用可能主要通过其诱导凋亡所介导。

参考文献:

- [1] 林文琴,杨潇,荆河,等. 大黄素对肝移植排斥反应相关细胞因子的影响[J]. 中草药, 2008, 39(12): 1853-1855.
- [2] 笪红远,曾文,江振洲,等. 大黄酸对小鼠淋巴瘤L5178 Y细胞TK基因的致突变作用[J]. 中草药, 2008, 39(12): 1858-1860.
- [3] 徐丽敏,陈学荣,毛舒和,等. 大黄素和大黄酸对Color-16细胞株的影响[J]. 中华皮肤科杂志, 2000, 21(1): 47-48.
- [4] Jayasuriya H, Koonchanok N M, Geahlen R L, et al. Emodin, a protein tyrosine kinase inhibitor from polygonum cuspidatum[J]. J Nat Prod, 1992, 55(5): 696-698.
- [5] Zhang L, Chang C J, Bacus S S, et al. Suppressed transformation and induced differentiation of HER-2/neu overexpressing breast cancer cells by emodin[J]. Cancer Res, 1995, 55(17): 3890-3896.
- [6] 刘冠贤,叶任高,贾志明,等. 大黄素对狼疮性肾炎成纤维细胞生物学行为的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(30): 196-198.
- [7] Brosius F C, Qu X, Lin Z, et al. Increased GLUT1 and extracellular glucose levels reduce mesangial cell MAP kinase and JNK activities[J]. J Am Soc Nephrol, 1998, 8(3): 629A-631A.
- [8] Kuo Y C, Meng H C, Tsai W J. Immune responses in human mesangial cells regulated by emodin from polygonum hypoleucum Ohwi[J]. Life Sci, 2001, 68(11): 1271-1286.
- [9] 陈高翔,屈燧林,方勤. 依那普利及大黄素对人肾成纤维细胞的影响[J]. 中国航天医药杂志, 2000, 2(4): 3-5.
- [10] 张陆勇,江振洲,濮存海,等. 大黄总蒽醌对SD大鼠灌胃给药的长期毒性研究[J]. 中国生化药物杂志, 2004, 25(4): 206-209.
- [11] 李静,王亚平. 促红细胞生成素与红细胞生成的调控[J]. 国外医学:临床生物化学与检验学分册, 2001, 22(5): 239-241.
- [12] Eastman A, Rigas J R. Modulation of apoptosis signaling pathways and cell cycle regulation[J]. Semin Oncol, 1999, 26: 7-16.
- [13] Fadok V A, Bratton D L, Frasch S C, et al. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes[J]. Cell Death Differ, 1998, 5: 551-562.
- [14] Lee H Z. Effects and mechanisms of emodin on cell death in human lung squamous cell carcinoma[J]. British J Pharmacol, 2001, 134: 11-20.
- [15] Dong H, Lu F E, Gao Z Q, et al. Effects of emodin on treating murine nonalcoholic fatty liver induced by high caloric laboratory chow[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11: 1339-1344.