

大黄素诱导人肾上皮 HK-2 细胞凋亡及内质网应激的介导作用

关翠雯, 金 晶, 朱少华, 王奕菲, 黄芝瑛*

中山大学药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 研究大黄素诱导人肾小管上皮 HK-2 细胞凋亡的作用及其机制是否与内质网应激有关。方法 不同浓度大黄素处理 HK-2 细胞不同时间。MTT 法检测细胞存活率, 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP)、转录激活因子 3 (ATF3) 和 X 盒结合蛋白 1 (XBP1) 的基因表达, Western blotting 法检测 caspase-3、GRP78、CHOP、真核生物启动因子 2 α (eIF2 α) 的蛋白表达。结果 大黄素以浓度相关方式降低 HK-2 细胞存活率, 诱导 caspase-3 剪切。RT-PCR 检测表明, 大黄素能诱导内质网相关基因 GRP78、CHOP、ATF3 基因表达, Western blotting 检测结果进一步证实大黄素能诱导 GRP78、CHOP 的蛋白表达。大黄素还明显诱导 eIF2 α 磷酸化和 XBP1 mRNA 剪切。在大黄素给药之前给予内质网应激干扰药 4-苯基丁酸和 salubrinal, 能增加 HK-2 细胞的存活率。结论 大黄素能诱导 HK-2 凋亡, 内质网应激参与了大黄素诱导 HK-2 细胞凋亡的作用。

关键词: 大黄素; 内质网应激; HK-2 细胞; 细胞凋亡; 细胞存活率

中图分类号: R285.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)12-1621-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.12.019

Induction of apoptosis in human renal tubular epithelial HK-2 cells by emodin and mediation of endoplasmic reticulum stress

GUAN Cui-wen, JIN Jing, ZHU Shao-hua, WANG Yi-fei, HUANG Zhi-ying

School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To investigate the induction of apoptosis in human renal tubular epithelial HK-2 cells by emodin and whether endoplasmic reticulum (ER) stress is involved in its mechanism. **Methods** HK-2 cells were cultured and treated with various concentration of emodin at different time points. The cell viability was determined by MTT assay. The gene expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78), CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP), activating transcription factor 3 (ATF3), and X-box binding protein 1 splicing (XBP1s) was evaluated by quantitative real-time PCR. The protein expression of caspase-3, GRP78, CHOP, and eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α) was detected by Western blotting. **Results** The viability of HK-2 cells was decreased by emodin in a dose-dependent manner, and the apoptosis of the cells was associated with caspase-3 shear activation. The treatment with emodin in HK-2 cells caused the increase in eIF2 α phosphorylation, XBP1 mRNA splicing, the gene expression of GRP78, CHOP, and ATF3, and the protein expression of GRP78 and CHOP. The pretreatment with 4-phenylbutyric acid and salubrinal significantly increased the viability of HK-2 cells, indicating the role of ER stress in emodin-induced apoptosis. **Conclusion** Emodin induces the apoptosis in HK-2 cells and ER stress is involved in emodin-induced apoptosis.

Key words: emodin; endoplasmic reticulum stress; HK-2 cells; apoptosis; cell viability

大黄素 (emodin) 是中药大黄中的主要有效成分, 系蒽醌类化合物^[1]。大量研究表明大黄素有多种药理活性, 如免疫抑制、抗癌、抗炎、抗动脉粥样硬化等^[2-3]。但美国“国家毒理学规划 (NTP)”研究发现长期服用大黄素可致大鼠肾小管透明小滴

生成, 诱发肾病和肾小管色素沉积等^[4]。体外实验也表明大黄素能诱导人肾上皮细胞 (HK-2 细胞) 凋亡^[5-6], 但大黄素导致肾毒性的机制尚未清楚。内质网应激可介导细胞凋亡, 参与某些常见肾毒性药物所导致的肾小管上皮细胞的凋亡^[7-10]。本实验探

收稿日期: 2012-10-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102886)

作者简介: 关翠雯 (1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物毒理。Tel: 13432033639 E-mail: guancw23@163.com

*通信作者 黄芝瑛 Tel: (020)39943025 E-mail: hzhiying@mail.sysu.edu.cn

网络出版时间: 2013-06-13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20130613.0903.001.html>

讨大黄素诱导 HK-2 细胞凋亡的作用及其与内质网应激的关系,为明确大黄素毒性的作用机制及其合理用药提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

多功能酶标仪, Thermo 公司; Lightcycle 2.0 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 仪, Roche 公司; CO₂ 培养箱, Thermo 公司; Mini-PROTEAN3 电泳系统、Mini Trans-Blot 转移系统, Bio-Rad 公司; 凝胶成像系统, UVItec 公司。

1.2 药品与试剂

大黄素(质量分数>98%), 中国药品生物制品检定所, 批号 110756-200110; DMEM/F12 培养基, 美国 Gibco 公司; 毒胡萝卜素、4-苯基丁酸、噻唑蓝 (MTT) 及二甲基亚砷 (DMSO), 均购于美国 Sigma 公司; salubrinal, 美国 Santa Cruz 公司; 胎牛血清, 美国 Hyclone 公司; 蛋白酶抑制剂 cocktail、ProteoJETTM 细胞裂解液, 美国 Fermenta 公司; Trizol 试剂、PrimeScript[®] RT 试剂盒、SYBR[®] Premix Ex TaqTM, Takara 公司; 引物由大连宝生物工程有限公司设计合成; 兔抗 caspase-3 抗体、兔抗 Bip [葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)] 单克隆抗体、兔抗真核生物启动因子 2α (eIF2α) 抗体、兔抗磷酸化真核生物启动因子 2α (p-eIF2α) 抗体、鼠抗 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP) 抗体、兔抗 β-actin 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 二抗, 美国 CST 公司。其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 细胞

人肾小管上皮 HK-2 细胞, 由中山大学附属第

一医院肾病重点实验室余学清教授课题组惠赠。

2 方法

2.1 MTT 法检测 HK-2 细胞存活率

取对数生长期 HK-2 细胞, 按 2×10^3 /孔接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 大黄素各组分别加入 3.125、6.25、12.5、25、50、100 μmol/L 的大黄素, 对照组加入 0.5% DMSO; 空白组无细胞, 加入 0.5% DMSO 处理。作用 24 h 后, 吸去上清液, 每孔加入 180 μL DMEM/F12 和 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL), 避光培养 4 h 后小心吸去上清液, 每孔加入 DMSO 150 μL, 振荡溶解结晶, 酶标仪测定 490 nm 波长处的吸光度 (A) 值。计算细胞存活率和半数抑制浓度 (IC₅₀)。实验重复 3 次。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{大黄素}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2 RT-PCR 检测内质网应激相关基因的表达

取对数生长期 HK-2 细胞, 按 25×10^4 /孔接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后, 分别加入不同浓度 (6.25、12.5、25、50 μmol/L) 大黄素和毒胡萝卜素 200 nmol/L 处理 24 h, 或者以 50 μmol/L 大黄素处理 1、3、6、9、12、24 h, 提取 RNA, 检测 GRP78、CHOP、转录激活因子 3 (ATF3)、剪切 X 盒结合蛋白 1 (XBP1s) 基因表达水平。Trizol 一步法提取总 RNA, 检测其纯度与浓度, 取 1 μg RNA 逆转录成 cDNA。逆转录体系和 PCR 扩增体系及反应条件均按照试剂盒说明书设定。经 GAPDH 内参校正, 求得目的基因的相对表达水平; 与对照组相比, 检测其基因的变化情况。引物序列见表 1。

2.3 Western blotting 法检测 caspase-3 剪切与内质网应激相关蛋白的表达

取对数生长期 HK-2 细胞, 按 6×10^5 /孔接种于

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Primer sequence of real-time PCR

基因	引物序列	产物长度 / bp
GRP78	正向: 5'-GAACACAGTGGTGCCTACCAAGAA-3'	142
	反向: 5'-TCCAGTCAGATCAAATGTACCCAGA-3'	
CHOP	正向: 5'-AATCAGAGCTGGAACCTGAGGA-3'	74
	反向: 5'-TGCTTTCAGGTGTGGTGTATG-3'	
ATF3	正向: 5'-CTCCTGGGTCACTGGTGTTT-3'	268
	反向: 5'-AG GCACTCCGTCTTCTCCTT-3'	
XBP1s	正向: 5'-CCGCAGCAGGTGCAGG-3'	70
	反向: 5'-GAGTCAATACCGCCAGAATCCA-3'	
GAPDH	正向: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	168
	反向: 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'	

中皿中,培养 24 h 后,分别加入不同浓度 6.25、12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 的大黄素处理 24 h,细胞用预冷的 PBS 漂洗 2 遍,加入 40 μL 细胞裂解液(蛋白酶抑制剂-裂解液,1:100,现用现配),冰上放置 1 min,刮下细胞,收集于 1.5 mL EP 管中,冰上裂解 20 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,考马斯亮蓝法测定蛋白的量。大黄素各浓度组取 100 μg 蛋白样品,99 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min,12% SDS-PAGE 电泳分离,蛋白移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 2 h,孵育一抗(均为 1:1 000 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,次日室温孵育 HRP 标记的二抗(1:10 000 稀释)1 h。每进行下一步实验前均用 Tris 盐缓冲液(TBST)漂洗 PVDF 膜 3 次,每次 10 min。ECL plus 法曝光 X 光胶片探测印迹信号,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件扫描,分析灰度值。

取对数生长期的 HK-2 细胞,按 6×10^5 /孔接种于中皿中,培养 24 h 后,分别加入不同浓度的(6.25、12.5、25、50 $\mu\text{mol/L}$)的大黄素和阳性对照药毒胡萝卜素 200 nmol/L 处理 24 h;或者以 50 $\mu\text{mol/L}$ 大黄素处理 1、3、6、9、12、24 h,提取细胞总蛋白,检测 eIF2 α 、p-eIF2 α 、GRP78、CHOP 蛋白表达水

平。Western blotting 方法同上。

2.4 MTT 法检测内质网应激干扰药物对大黄素诱导 HK-2 细胞凋亡作用的影响

取对数生长期的细胞,按细胞数 2×10^3 /孔接种于 96 孔板中。培养 24 h 后,先给予内质网应激干扰药物 4-苯基丁酸 1 mmol/L 或 salubrinal (Sal) 20 $\mu\text{mol/L}$ 处理 2 h,再给予大黄素 50 $\mu\text{mol/L}$ 处理 24 h。MTT 法检测细胞存活率,方法同“2.1”项。

2.5 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD 法,两组之间的比较采用 t 检验。

3 结果与分析

3.1 对 HK-2 细胞存活率和 caspase-3 剪切的影响

MTT 检测结果表明,随着大黄素浓度的增高,HK-2 细胞存活率逐渐降低(图 1-A), IC_{50} 为 14.51 $\mu\text{mol/L}$ 。当 HK-2 细胞发生凋亡时,细胞内前体 caspase-3 被剪切活化,激活下游相关 caspase 途径从而导致细胞凋亡。Western blotting 检测结果显示,大黄素浓度依赖性地诱导 caspase-3 剪切,表明其诱导 HK-2 细胞凋亡。结果见图 1-B。

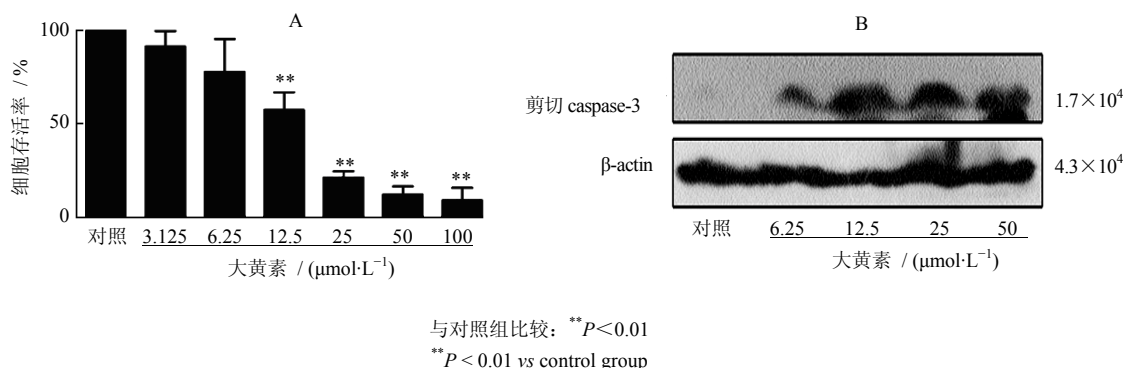


图1 大黄素对 HK-2 细胞存活率的影响 (A) 和对 HK-2 细胞 caspase-3 剪切的诱导作用 (B) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effects of emodin on cell viability (A) and caspase-3 shear activation (B) in HK-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

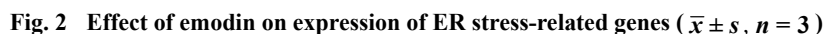
3.2 对 HK-2 细胞内质网应激相关基因表达的影响

RT-PCR 检测结果显示,大黄素诱导 GRP78 基因的表达,表达水平与时间呈正相关,但无浓度相关性(图 2-A)。大黄素可诱导 CHOP 和 ATF3 基因的表达,表达水平随时间和浓度的增加而提高(图 2-B 和 2-C)。大黄素还诱导 XBP1 mRNA 的剪切,使 XBP1s mRNA 表达水平在给药后 1、3、6 h 提高,随后下降,24 h 又明显提高(达到峰值);而且大黄素在低浓度范围(6.25~25 $\mu\text{mol/L}$)使 XBP1s 基因表达水平呈浓度相关性,而在高浓度(50 $\mu\text{mol/L}$)

时却明显降低(图 2-D)。

3.3 对 HK-2 细胞内质网应激相关蛋白表达的影响

大黄素能诱导 HK-2 细胞 GRP78 蛋白的表达,并呈时间和浓度相关性;也以浓度相关方式诱导 CHOP 蛋白表达,并且在 0~12 h 呈时间相关性,12 h 时 CHOP 蛋白表达达到峰值,随后略有下降;还明显诱导 HK-2 细胞 eIF2 α 磷酸化,并呈浓度相关性。大黄素对 HK-2 细胞相关蛋白表达与给药时间的相关性和与浓度的相关性分别见图 3-A 和 3-B。



内质网负责细胞内蛋白质的合成、折叠、装配、

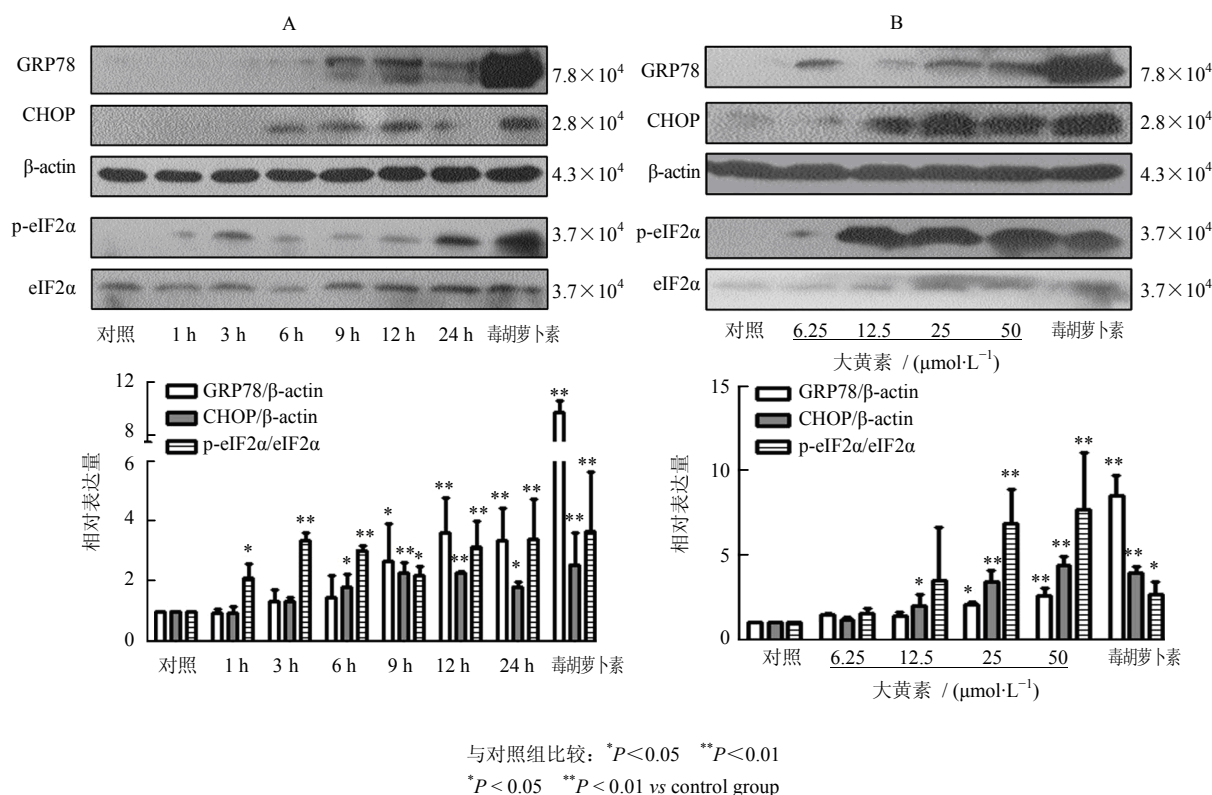


图 3 大黄素对内质网应激相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Fig. 3 Effect of emodin on expression of ER stress-related proteins ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

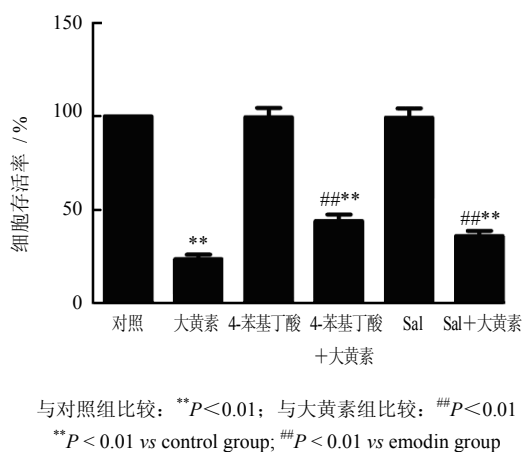


图 4 4-苯基丁酸和 Sal 对 HK-2 细胞存活率的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Fig. 4 Effects of 4-phenylbutyrate or Sal on HK-2 cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

修饰及转运, 当未折叠蛋白或错误折叠蛋白在内质网内蓄积将引发内质网应激^[11]。而内质网应激与多种疾病相关, 如糖尿病、神经退行性疾病、心脏疾病等^[12]。未折叠蛋白应答 (UPR) 能激活一系列反应来促进内质网功能恢复正常, 但当 UPR 不足以克服内质网应激, 致使内质网功能持

续紊乱, 细胞启动凋亡程序^[13]。内质网应激包括 3 条细胞通路: 蛋白激酶样内质网激酶 (PERK) 通路、肌醇需求酶 1 (IRE1) 通路和转录激活因子 6 (ATF6) 通路, 3 条通路相互联系^[14]。GRP78 是内质网应激的一个中心调节分子和标志物^[15]。CHOP 是 3 条信号通路下游的一个共同因子, 在内质网应激诱导的细胞凋亡中发挥重要作用^[16]。激活 PERK 通路可诱导 eIF2 α 磷酸化, 阻止 mRNA 翻译, 从而减少蛋白质的合成, 降低内质网内蛋白质负荷^[17]。激活 IRE1 通路会诱导 XBP1 的 mRNA 剪切成具有转录活性的 XBP1s^[18]。毒胡萝卜素能诱导内质网应激^[10], 本实验将其作为阳性对照药。本研究结果发现, 大黄素诱导内质网应激相关基因 GRP78、CHOP 和 ATF3 基因和蛋白表达以及 eIF2 α 磷酸化, 表明大黄素能激活 PERK-eIF2 α -ATF4-ATF3-CHOP 通路。当蛋白折叠能力缺陷, 并且内质网中的不稳定状态不能通过自适性 UPR 解决时, 过长或过强的内质网应激将引发 HK-2 细胞凋亡。

IRE1-XBP1 通路在内质网应激下既能促细胞生存, 也能促细胞凋亡^[18-19]。应激条件下 XBP1s

能促细胞生存,但过长和过强的应激反应会诱导细胞凋亡^[19]。以大黄素处理 HK-2 细胞,在起始阶段 XBP1 mRNA 剪切成 XBP1s mRNA,保护细胞;随着应激时间增长,XBP1s mRNA 减少,保护作用减弱;24 h XBP1s mRNA 达到峰值,内质网应激时间过长,XBP1s 不再保护细胞,反而促进细胞凋亡^[19]。本实验表明,大黄素在低浓度范围内(6.25~12.5 $\mu\text{mol/L}$),XBP1 mRNA 剪切成 XBP1s mRNA,保护细胞^[18];但高浓度(50 $\mu\text{mol/L}$)时,内质网应激过强,XBP1s 的保护作用降低,启动细胞凋亡。

4-苯基丁酸和 Sal 是常用的内质网应激干扰药物,均能降低内质网应激介导的细胞凋亡^[20-21]。本实验以 4-苯基丁酸和 Sal 预处理 HK-2 细胞,结果发现这 2 种药物能增加 HK-2 细胞的存活率,表明内质网应激参与了大黄素所诱导的 HK-2 细胞凋亡。

综上所述,大黄素能诱导 HK-2 细胞凋亡,其作用机制与内质网应激有关。

参考文献

- [1] Sato M, Maulik G, Bagchi D, *et al.* Myocardial protection by protykin, a novel extract of trans-resveratrol and emodin [J]. *Free Radic Res*, 2000, 32(2): 135-144.
- [2] Huang Z, Chen G, Shi P. Emodin-induced apoptosis in human breast cancer BCap-37 cells through the mitochondrial signaling pathway [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(6): 742-748.
- [3] Kuo Y C, Meng H C, Tsai W J. Regulation of cell proliferation, inflammatory cytokine production and calcium mobilization in primary human T lymphocytes by emodin from *Polygonum hypoleucum* Ohwi [J]. *Inflamm Res*, 2001, 50(2): 73-82.
- [4] 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.
- [5] Wang C, Wu X, Chen M, *et al.* Emodin induces apoptosis through caspase 3-dependent pathway in HK-2 cells [J]. *Toxicology*, 2007, 231(2/3): 120-128.
- [6] Wang C, Jiang Z, Yao J, *et al.* Participation of cathepsin B in emodin-induced apoptosis in HK-2 cells [J]. *Toxicol Lett*, 2008, 181(3): 196-204.
- [7] Pallepatti P, Averill-Bates D A. Activation of ER stress and apoptosis by hydrogen peroxide in HeLa cells: Protective role of mild heat preconditioning at 40 degrees C [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(12): 1987-1999.
- [8] Hung J Y, Hsu Y L, Ni W C, *et al.* Oxidative and endoplasmic reticulum stress signaling are involved in dehydrocostuslactone-mediated apoptosis in human non-small cell lung cancer cells [J]. *Lung Cancer*, 2010, 68(3): 355-365.
- [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] Zhu S, Jin J, Wang Y, *et al.* The endoplasmic reticulum stress response is involved in apoptosis induced by aloe-emodin in HK-2 cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(3/4): 1149-1158.
- [11] Schroder M, Kaufman R J. ER stress and the unfolded protein response [J]. *Mutat Res*, 2005, 569(1/2): 29-63.
- [12] Kim I, Xu W, Reed J C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(12): 1013-1030.
- [13] Oyadomari S, Araki EMori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells [J]. *Apoptosis*, 2002, 7(4): 335-345.
- [14] Wolfson J J, May K L, Thorpe C M, *et al.* Subtilase cytotoxin activates PERK, IRE1 and ATF6 endoplasmic reticulum stress-signalling pathways [J]. *Cell Microbiol*, 2008, 10(9): 1775-1786.
- [15] Li J, Ni M, Lee B, *et al.* The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(9): 1460-1471.
- [16] Yamaguchi H, Wang H G. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(44): 45495-45502.
- [17] Sun G D, Kobayashi T, Abe M, *et al.* The endoplasmic reticulum stress-inducible protein Niban regulates eIF2 alpha and S6K1/4E-BP1 phosphorylation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360(1): 181-187.
- [18] Yoshida H, Nakanaka S, Sato R, *et al.* XBP1 is critical to protect cells from endoplasmic reticulum stress: evidence from Site-2 protease-deficient Chinese hamster ovary cells [J]. *Cell Struct Funct*, 2006, 31(2): 117-125.
- [19] Zeng L, Zampetaki A, Margariti A, *et al.* Sustained activation of XBP1 splicing leads to endothelial apoptosis

- and atherosclerosis development in response to disturbed flow [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(20): 8326-8331.
- [20] Luo Z F, Feng B, Mu J, *et al*. Effects of 4-phenylbutyric acid on the process and development of diabetic nephropathy induced in rats by streptozotocin: regulation of endoplasmic reticulum stress-oxidative activation [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 246(1/2): 49-57.
- [21] Komoike Y, Inamura H M. Effects of salubrinal on cadmium-induced apoptosis in HK-2 human renal proximal tubular cells [J]. *Arch Toxicol*, 2011, 86(1): 37-44.