

五味子乙素对顺铂损伤 HK-2 细胞 P21 和 Caspase-3 表达的影响

田妮¹, 谭小月², 张大宁³, 张勉之^{4*}

1. 天津医科大学, 天津 300070

2. 南开大学医学院, 天津 300071

3. 天津市中医药研究院, 天津 300022

4. 天津市公安医院, 天津 300050

摘要: 目的 观察五味子乙素(SchB)对顺铂(CDDP)诱导的人类近端肾小管上皮细胞(HK-2)损伤中 P21 和 Caspase-3 表达的影响。方法 取离体培养 HK-2 细胞, 随机分为 5 组: 对照组细胞未经任何处理, CDDP 组加入 50 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 处理 24 h, SchB 预保护组(CDDP+SchB): 分别加入终浓度为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ SchB 预处理 2 h 后, 其余操作同 CDDP 组。CCK-8 试剂盒检测各组细胞活性; AnnexinV-FITC/PI 双标记流式细胞仪检测各组细胞凋亡率; 倒置显微镜观察各组细胞形态; Western blotting 检测各组细胞中 P21 和 Caspase-3 蛋白表达。结果 与对照组相比, CDDP 组细胞活性明显降低, 细胞凋亡率、P21 和 Caspase-3 蛋白表达量显著增加, 细胞体积明显缩小, 相互连接消失。SchB 预保护组较 CDDP 组细胞活性显著增加, 细胞凋亡率、Caspase-3 蛋白表达量显著减少, P21 蛋白表达量显著增加, 细胞形态损伤明显减轻, 体积略微缩小, 相互间连接断裂减少。结论 SchB 对 CDDP 诱导的 HK-2 细胞损伤有保护作用, 其机制可能与其上调 P21 和下调 Caspase-3 的表达有关, 且其保护作用呈剂量依赖性。

关键词: 五味子乙素; HK-2 细胞; 顺铂; P21; Caspase-3; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)05-0951-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.05.019

Effects of schisandrin B on P21 and Caspase-3 expression in HK-2 cells injured by CDDP

TIAN Ni¹, TAN Xiao-yue², ZHANG Da-ning³, ZHANG Mian-zhi⁴

1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Medical School of Nankai University, Tianjin 300071, China

3. Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300022, China

4. Tianjin Gonggan Hospital, Tianjin 300050, China

Abstract: Objective To explore the effect of schisandrin B (SchB) on P21 and Caspase-3 expression in cisplatin induced human proximal renal tubular epithelial (HK-2) cells injured by CDDP *in vitro*. **Methods** HK-2 cells were randomly divided into five groups: control group (untreated), CDDP group (treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ CDDP for 24 h), SchB pretreat groups (CDDP + SchB, cells were pretreated with 5, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$ SchB for 2 h, and the rest of the operation was the same as CDDP group). CCK-8 kit was used to detect the cell viability of five groups. Flow cytometry was used to detect the apoptotic rate of five groups. The morphology of cells was observed by inverted microscope. The protein expression of P21 and Caspase-3 was assessed by Western blotting assay. **Results** Compared with the control group, the cell viability decreased, and the apoptosis increased, the protein expression of P21 and Caspase-3 was up-regulated in HK-2 cells after treated with 50 $\mu\text{mol/L}$ CDDP. Cell volume was reduced, and the mutual connection disappeared. Compared with the CDDP group, the cell viability increased and the apoptosis was decreased, the expression of Caspase-3 was down-regulated and the expression of P21 was up-regulated in HK-2 cells after pretreated with 5, 10, and 20 $\mu\text{mol/L}$ SchB. Cell morphological damage lightened, the volume slightly decreased, and the mutual connection reduced. **Conclusion** SchB has a protective effect on HK-2 cells damage induced by cisplatin. The mechanism may be related to up-regulation of P21 and down-regulation of Caspase-3 expression, and its protective effect is dose dependent.

Key words: schisandrin B; HK-2 cells; cisplatin; P21; Caspase-3; apoptosis

收稿日期: 2016-11-14

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究计划 (14JCYBJC28200)

作者简介: 田妮 (1989—), 女, 硕士研究生, 主要从事急性肾损伤研究。Tel: 18920381778 E-mail: tianni1217@yeah.net

*通信作者: 张勉之 (1973—), 男, 肾内科博士, 中医学博士后, 副院长, 博士生导师, 主要从事中西医结合肾脏病的基础与临床研究。

Tel: (022)23309319 E-mail: zhangmianzhi@vip.sina.com

顺铂 (CDDP) 是当前临床上最有效和最常用的抗肿瘤药物之一, 广泛用于治疗膀胱癌、卵巢癌、头颈部鳞癌、睾丸癌、非小细胞肺癌等多种实体肿瘤^[1]。然而 CDDP 化疗却受肿瘤细胞抵抗和严重的不良反应如肾毒性、耳毒性、神经毒性和致吐作用等因素的限制, 其中, 肾毒性是最主要的限制因素^[2]。

五味子乙素 (schisandrin B, SchB) 为五味子中 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 量最高的联苯环辛烯类木脂素^[3], 大量基础研究表明 SchB 具有抗氧化、抗肿瘤、降糖、抗炎等多种药理作用^[4-5]。已有研究表明, SchB 对 CDDP 所致鼠的急性肾损伤具有保护作用^[6-7]。本研究拟从体外水平检测 SchB 对 CDDP 诱导的肾小管上皮细胞损伤的保护作用, 并观察其对 P21 和 Caspase-3 表达的影响, 初步探讨其可能机制, 以期减轻 CDDP 化疗中的不良反应提供研究思路。

1 材料

1.1 细胞

人类近端肾小管上皮细胞 (HK-2) 购自美国模式培养物集存库 (ATCC), 中国科学院干细胞库编号 SCSP-511。

1.2 药品与试剂

SchB (质量分数 $\geq 99\%$), 上海融禾医药科技发展有限公司, 批号 140926; CDDP, 齐鲁制药有限公司, 批号 H20023460; DMEM/F12 培养基、胎牛血清、胰酶, 美国 Gibco 公司; 二甲基亚砜 (DMSO)、RIPA 蛋白裂解液, 美国 Sigma 公司; CCK-8 试剂盒, 日本 Dojindo 公司; AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒, 美国 BD 公司; 兔抗 P21 多克隆抗体、鼠抗 β -actin 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗, 美国 Santa Cruz 公司; 兔抗 Caspase-3 多克隆抗体, 美国 CST 公司。

1.3 仪器

倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 流式细胞仪, 美国 BD 公司; 细胞培养箱、台式高速低温离心机、酶标仪, 美国 Thermo 公司, SDS-PAGE 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; 全自动化学发光图像分析系统, 上海天能公司。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测 HK-2 细胞活性

在 96 孔板培养细胞, 每孔 5 000 个细胞, 细胞贴壁后, 换无血清培养基培养 16 h 使细胞周期

同步化, 对照组细胞未经任何处理, CDDP 组加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 CDDP 处理 24 h, SchB 预保护组 (CDDP+SchB) 分别加入终浓度为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ SchB 预处理 2 h 后, 其余操作同 CDDP 组。处理完成后每孔加 CCK-8 试剂 10 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 选择 450 nm 波长, 在酶标仪上测定各孔的吸光度 (A) 值, 并计算细胞活性。实验重复 3 次。

$$\text{细胞活性} = (A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2 AnnexinV-FITC/PI 双标记流式细胞仪检测细胞凋亡率

待细胞在 6 孔板中培养至对数生长期, 换无血清培养基培养 16 h 使细胞周期同步化, 细胞分组及药物处理同“2.1”项, 胰酶消化收集各组细胞, 2 000 r/min 离心 5 min, 用 PBS 洗涤细胞 2 次 (2 000 r/min 离心 5 min), 用 500 μL 缓冲液重悬细胞后, 先加入 5 μL AnnexinV-FITC 染色液混匀后, 再加入 5 μL PI 染色液, 混匀后室温避光孵育 10 min。筛网滤过后, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率。FlowJo 软件计算分析各组细胞 AnnexinV-FITC 和 PI 染色细胞百分比。

2.3 Western blotting 检测 P21 和 Caspase-3 蛋白表达

待细胞在 6 孔板中培养至对数生长期, 换无血清培养基培养 16 h 使细胞周期同步化, 细胞分组及药物处理同“2.1”项, 接种于 6 孔板中的各组细胞以预冷的 PBS 液洗 2 次, 加入 50 μL 预冷蛋白裂解液, 细胞刮刀收集样本于 1.5 mL EP 管中, 冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。2,2-联喹啉-4,4-二甲酸二钠 (BCA) 法蛋白定量、配样, 100 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min 变性后上样。经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 将目的蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 用等渗盐溶液加 Tris-HCl 缓冲液 (TBST) 冲洗后分别加入 1:1 000 稀释的兔抗 P21、Caspase-3、 β -actin 的抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入 1:5 000 稀释的辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, ECL 发光液显色, 全自动化学发光图像分析系统曝光。以 β -actin 为内参, 检测 P21、Caspase-3 蛋白的表达。采用 ImageJ 软件分析灰度值。

2.4 倒置显微镜观察 HK-2 细胞形态

待细胞在 6 孔板中培养至对数生长期, 换无血清培养基培养 16 h 使细胞周期同步化, 细胞分组及

药物处理同“2.1”项，于倒置显微镜下观察并拍照，后用计数工具进行计数处理。

2.5 统计学方法

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 20.0 统计软件分析数据，组间比较采用单因素方差分析，多重比较采用 LSD 法。

3 结果

3.1 对 HK-2 细胞活性的影响

与对照组相比，CDDP 组细胞活性明显降低，SchB 预保护组较 CDDP 组细胞活性显著增加 ($P < 0.01$)，且随浓度的升高，细胞活性逐渐增强，表现出浓度依赖性。结果见图 1。

3.2 对 CDDP 诱导的细胞凋亡的影响

与对照组相比，CDDP 组细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.001$)；SchB 预保护组显著降低凋亡率并呈剂量依赖性，中、高剂量组与 CDDP 组比较差异显著 ($P < 0.01$)。结果见图 2 和图 3。

3.3 对细胞形态及数目的影响

与对照组相比，CDDP 组细胞数目明显减少 ($P < 0.001$)，SchB 预保护组细胞数目显著增加并呈

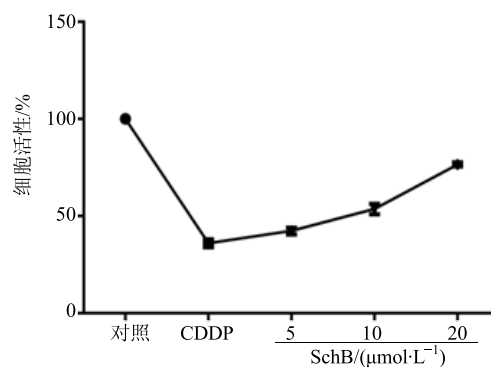


图 1 SchB 对 CDDP 损伤的 HK-2 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of SchB on cell viability of HK-2 cells injured by CDDP ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

剂量依赖性，中、高剂量组与 CDDP 组比较差异显著 ($P < 0.001$)。正常的 HK-2 细胞光镜下呈多边形鹅卵石样，体积较大，细胞紧密连接，可见融合。CDDP 50 $\mu\text{mol/L}$ 作用于 HK-2 后镜下可见细胞体积明显缩小，相互连接消失。SchB 预保护组，镜下可见细胞形态的损伤明显减轻，体积略微缩小，相互间连接断裂减少，见图 4。

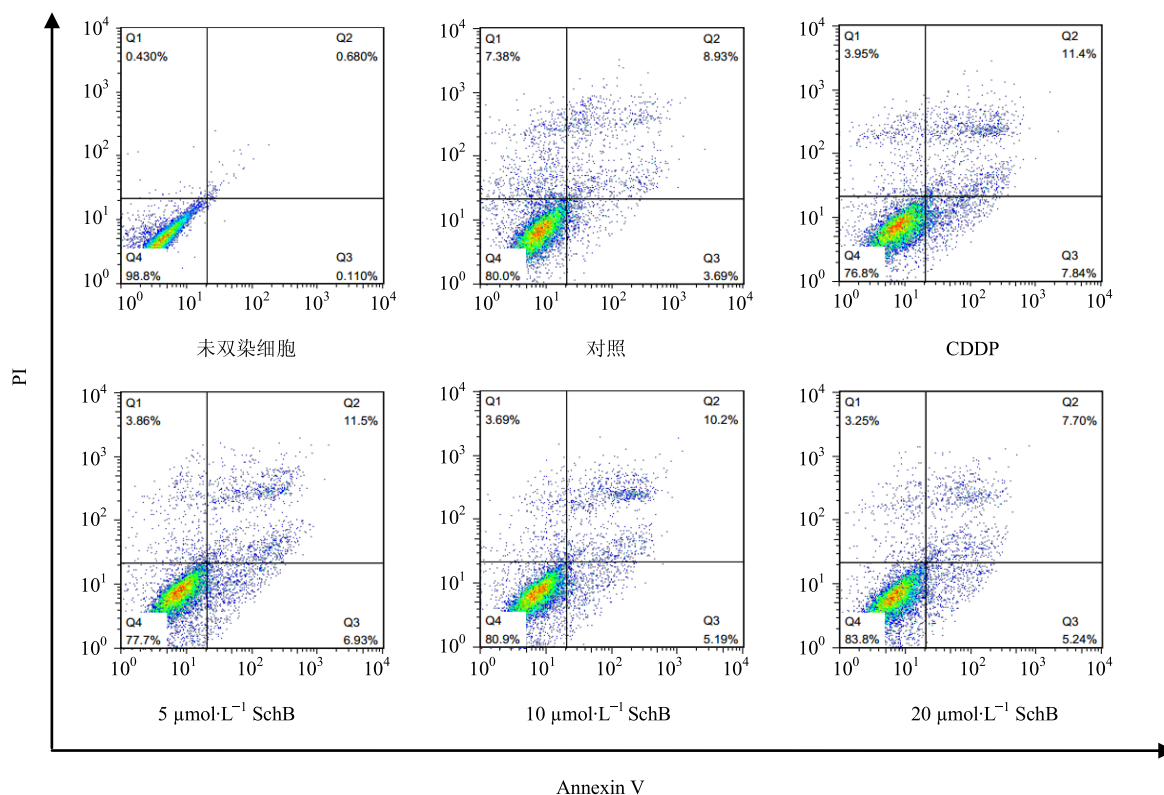
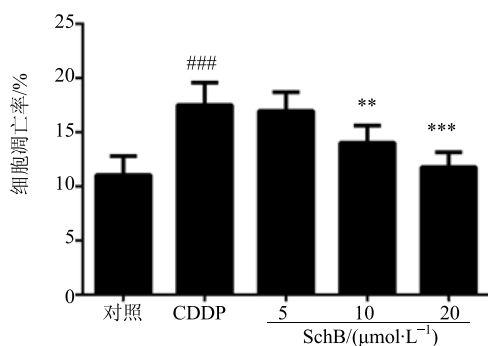


图 2 细胞流式仪检测各组 HK-2 细胞凋亡率

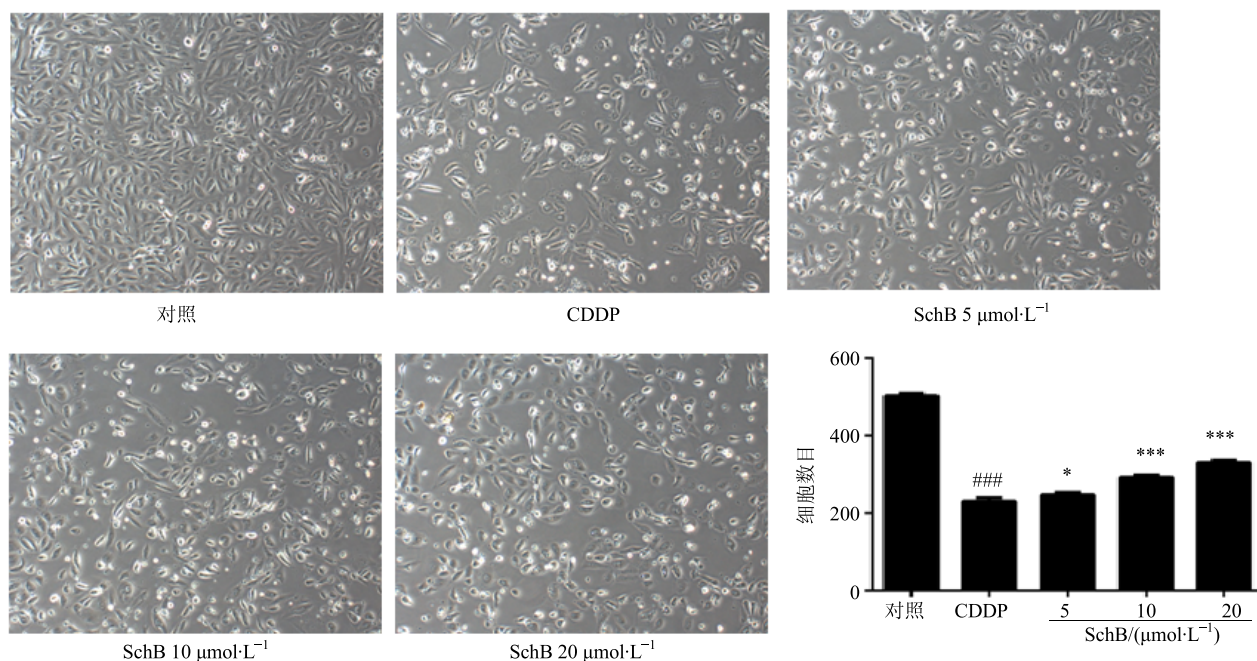
Fig. 2 Results of apoptosis ratio of HK-2 cells in each group detected by flow cytometry



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与 CDDP 组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
 ### $P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs CDDP group

图 3 SchB 对 CDDP 诱导的 HK-2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of SchB on CDDP induced apoptosis in HK-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$
 ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs model group

图 4 SchB 对各组 HK-2 细胞形态和数目的影响

Fig. 4 Effect of schisandrin B on cell morphology and number of HK-2 cells in each group

引起的肾毒性涉及 CDDP 的细胞毒作用、氧化应激、细胞凋亡及炎症反应等多种机制^[8]。近年来 CDDP 诱导的细胞凋亡成为了研究热点^[9]。CDDP 诱导肾小管上皮细胞凋亡可通过 2 种途径: 由线粒体介导的内源性途径和由死亡受体介导的外源性途径。此外, 内质网应激在 CDDP 引发的肾小管上皮细胞凋亡中也发挥一定的作用^[10]。本实验结果表明, CDDP

3.4 对 P21 蛋白表达量的影响

与对照组相比, CDDP 组 P21 表达量显著增加 ($P < 0.01$), SchB 预保护组 P21 表达量显著增加并呈剂量依赖性, 中、高剂量组与 CDDP 组比较差异显著 ($P < 0.001$), 见图 5。

3.5 对 cleaved Caspase-3 蛋白表达量的影响

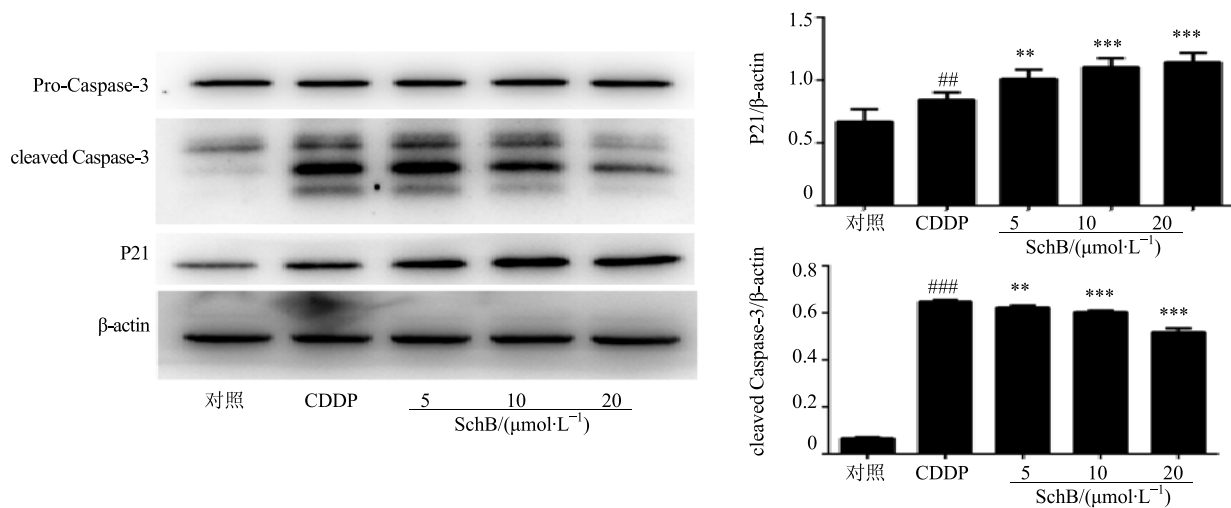
与对照组相比, CDDP 组 cleaved Caspase-3 表达量显著增加 ($P < 0.001$), SchB 预保护组 cleaved Caspase-3 表达量显著减少并呈剂量依赖性, 中、高剂量组与 CDDP 组比较差异显著 ($P < 0.001$), 见图 5。

4 讨论

细胞凋亡又称程序性细胞死亡, 是指为维护体内稳态, 由基因控制的细胞自主有序性死亡, CDDP

诱导 HK-2 细胞活性显著下降, 凋亡率显著增加。

在肾细胞 CDDP 的细胞毒性是依赖于细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (CDK2) 在体内外的激活^[11-12]。P21 基因定位于第 6 号染色体的短臂上 (6P21.2), DNA 长度为 8.6×10^4 bp, 有 3 个外显子, 是细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (CDKIs) 的家族成员, 是细胞周期的负调控因子。CDKIs 通过与细胞



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$
^{###} $P < 0.01$ ^{####} $P < 0.001$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

图 5 各组 HK-2 细胞 cleaved Caspase-3 及 P21 的表达情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Expression of cleaved Caspase3 and P21 of HK-2 cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDKs) 或细胞周期蛋白-CDK 的结合, 导致细胞周期阻滞, 从而阻断细胞的增殖。已有研究证明, P21 的过表达可使细胞周期阻滞于 G_1 期、 G_2 期或 S 期。P21 抑制 cyclinD1-C DK4 和 cyclinE-CDK2 的活性, 使视网膜母细胞瘤蛋白 (pRb 蛋白) 不能发生磷酸化, E2F 转录因子不能释放, 从而使细胞周期停滞在 G_1 期, DNA 复制受抑制, 从而使受损的细胞有充分的时间修复。尽管周期诱导产生内源性的 P21, 但是其保护作用是无效的^[13]。本实验结果表明, CDDP 组较对照组 P21 表达上调, 但其凋亡率显著增加, 与既往研究一致。而 SchB 组较 CDDP 组 P21 表达明显上调, 且呈剂量依赖性, 凋亡率显著减少, 表明细胞周期蛋白已成为肾细胞死亡的主要分子调节剂并且在周期肾毒性中起保护作用^[14]。

细胞凋亡涉及一系列蛋白, 如 Caspase 家族蛋白、Bcl-2 家族蛋白和 P53 蛋白、survivin。其中 Caspase 半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 (CysteinyI aspartate specific proteinase, Caspase) 家族是直接导致凋亡细胞解体的蛋白酶系统, 在细胞凋亡机制网络中居中心地位^[15]。Caspase 分为 3 大类: 凋亡启动因子 (apoptotic initiators)、凋亡执行因子 (apoptotic executioners) 和炎症介导因子 (inflammatory mediators), 构成了级联放大效应。凋亡执行因子在级联反应的下游, 包括 Caspase-3、

Caspase-6 和 Caspase-7 等, 作用于其特异性底物并导致细胞凋亡。Caspase-3, 是 Caspase 家族中的最重要的凋亡执行者之一, 是细胞凋亡过程中的主要效应因子, 它的活化是凋亡进入不可逆阶段的标志。正常情况下, 胞质中的 Caspase-3 以无活性的酶原形存在, 细胞凋亡信号的出现可导致 Caspase-3 在多种蛋白水解酶的作用下, 发生裂解而活化^[16]。本实验结果表明, CDDP 组活化的 Caspase-3 蛋白表达量显著增加, 与流式细胞仪检测的细胞凋亡率的增加一致。

五味子是常用的滋补固涩类中药, 性味温和, 主产于东北和华北地区; 神农本草经列为上品, 具补益强壮之功、奏固涩生津之效, 能对人体心、肝、脾、肺、肾发挥平衡作用。SchB 是五味子属植物中的一个活性单体, 既往研究结果表明, 其具有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、抑菌、镇静、抗血管纤维化等作用, 对心脑肝肾等重要器官均具有保护作用, 而且对机体正常的细胞没有毒性作用。SchB 已成功用于治疗庆大霉素所致的中毒性肾损害, 并且可以有效预防金属汞对肾小球肾小管的损害^[17]。

本研究初步证实 SchB 可能通过下调 Caspase-3 和上调 P21 的表达减少 HK-2 细胞的凋亡, 从而对 CDDP 所致 HK-2 细胞损伤起到保护作用, 且其保护呈剂量依赖性, 但其具体机制还需经进一步研究。

参考文献

- [1] Giaccone G. Clinical perspectives on platinum resistance [J]. *Drugs*, 2000, 59(Suppl 4): 9-17.
- [2] Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies [J]. *Kidney Int*, 2008, 73(9): 994-1007.
- [3] 陶小芳, 宿树兰, 江 署, 等. 五味子药渣提取物中木脂素类成分分析及其对急性肝损伤模型大鼠的保护作用 [J]. *中草药*, 2016, 47(17): 3051-3057.
- [4] 潘 瑶, 林剑霞, 李 妍. 五味子乙素的药理作用研究概况 [J]. *吉林医药学院学报*, 2015, 36(1): 60-62.
- [5] 史 琳, 王志成, 冯叙桥. 五味子化学成分及药理作用的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2011, 34(3): 208-212.
- [6] 吴银娜, 谭小月, 张勉之. 五味子乙素对顺铂所致小鼠急性肾损伤的干预作用 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2015, 22(3): 243-247.
- [7] 原丽欣. 五味子乙素对顺铂所致大鼠肾氧化损伤的保护作用 [J]. *中国医院药学杂志*, 2014, 34(10): 825-828.
- [8] dos Santos N A, Carvalho Rodrigues M A, Martins N M, *et al.* Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update [J]. *Arch Toxicol*, 2012, 86(8): 1233-1250.
- [9] Peres L A, da Cunha A D. Acute nephrotoxicity of cisplatin: molecular mechanisms [J]. *J Bras Nefrol*, 2013, 35(4): 332-340.
- [10] Karasawa T, Steyger P S. An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2015, 237(3): 219-227.
- [11] Price P M, Safirstein R L, Megyesi J. Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 286(2): F378-F384.
- [12] Price P M, Yu F, Kaldis P, *et al.* Dependence of cisplatin-induced cell death *in vitro* and *in vivo* on cyclin-dependent kinase 2 [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(9): 2434-2442.
- [13] Price P M, Safirstein R L, Megyesi J. The cell cycle and acute kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2009, 76(6): 604-613.
- [14] Price P M, Megyesi J, Safirstein R L. Cell cycle regulation: repair and regeneration in acute renal failure [J]. *Kidney Int*, 2004, 66(2): 509-514.
- [15] Kaushal G P, Kaushal V, Hong X, *et al.* Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells [J]. *Kidney Int*, 2001, 60(5): 1726-1736.
- [16] Visconti R, D'Adamio L. Functional cloning of genes regulating apoptosis in neuronal cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 399: 125-131.
- [17] 刘 巍, 徐兆发, 杨海波, 等. 五味子乙素对汞性大鼠急性肾损伤的影响 [J]. *中国工业医学杂志*, 2011, 24(2): 89-91.