

大黄酸通过 MAPK 信号转导通路诱导 HK-2 细胞凋亡

杨加培, 孙浩, 王丹丹, 毛勇, 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] 目的:研究大黄酸诱导人肾小管上皮细胞系 HK-2 细胞凋亡作用及其凋亡机制。方法:将密度为 4×10^4 个/mL 的 HK-2 细胞悬液接种于 96 孔板,培养 24 h 后分别加入不同浓度大黄酸(0, 25, 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)作用 12, 24, 48 h, MTT 法检测大黄酸对 HK-2 细胞活性的抑制作用;利用 Hoechst 33258 染色法和流式细胞术检测大黄酸诱导 HK-2 细胞凋亡情况;实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)检测细胞原癌基因 c-jun, 活化转录调控因子 2 (ATF-2), 半胱天冬氨酸酶 3 (Caspase-3) 基因表达水平;Western blotting 检测细胞磷酸化 c-jun 氨基末端激酶 (p-JNK), c-jun 氨基末端激酶 (JNK), 磷酸化 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p-p38 MAPK), p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 和活化型半胱天冬氨酸酶 3 (Cleaved Caspase-3) 蛋白的变化,并利用 JNK 抑制剂 SP600125, p38 抑制剂 SB203580 进一步验证 JNK 和 p38 所介导的丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号转导通路在 HK-2 细胞凋亡中的作用。结果:大黄酸能够呈剂量依赖性和时间依赖性抑制 HK-2 细胞活性。大黄酸作用下 HK-2 细胞凋亡率明显增加。大黄酸作用于 HK-2 细胞 c-jun, ATF-2 及 Caspase-3 基因的 mRNA 均明显上调;p-p38, p-JNK 及 Cleaved Caspase-3 蛋白表达显著性增加, JNK 和 p38 总蛋白表达无明显变化。JNK 特异性抑制剂 SP600125 与 p38 特异性抑制剂 SB203580 均能显著降低大黄酸诱导的 HK-2 细胞的凋亡率。结论:大黄酸能够诱导 HK-2 细胞凋亡,其作用机制可能是通过影响 MAPK 信号转导通路实现的。

[关键词] 大黄酸; HK-2 细胞; 细胞凋亡; 丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路; c-jun 氨基末端激酶; p38 丝裂原活化蛋白激酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)15-0147-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015150147

MAPK Signal Transduction Pathway involves in Rhein-induced Apoptosis in HK-2 Cells YANG Jia-pei, SUN Hao, WANG Dan-dan, MAO Yong, YU Feng* (*Department of Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education, Nanjing 211198, China*)

[Abstract] **Objective:** To investigate the apoptotic effect of rhein on human proximal tubular epithelial cell line (HK-2) and the underlying mechanisms. **Method:** HK-2 cells were seeded in 96-well plates at an initial density of 4×10^4 cells/mL for 24 h, and then the four different concentration of rhein (0, 25, 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) were applied to test cells for 12, 24, 48 h respectively. MTT assay was used to detect the viability of HK-2 cells. Rhein-induced apoptosis in HK-2 cells was evaluated by Hoechst 33258 staining and Flow cytometry. The expression of proto-oncogene c-jun (c-jun), activating transcription factor 2 (ATF-2) and cysteine proteinases with specificity for aspartic acid residues 3 (Caspase-3) mRNA was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The changes of phosphorylated c-jun N-terminal kinase (p-JNK), c-jun N-terminal kinase (JNK), phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38 MAPK), p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and Cleaved Caspase-3 protein were detected by Western blotting. The specific inhibitors of JNK and p38 MAPK were applied for identifying the roles of the corresponding signal pathways in rhein-induced apoptosis of HK-2 cells. **Result:** Rhein inhibited the viability of HK-2 cells in a dose- and time-dependent manners. The apoptosis rate of HK-2 cells in rhein groups was apparently increased. The RT-qPCR

[收稿日期] 20150105(023)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30572193)

[第一作者] 杨加培,在读硕士,从事心血管药理学研究, Tel:13236567626, E-mail:jiapeiyangcpu@163.com

[通讯作者] *于锋,教授,博士生导师,从事心血管药理学研究, Tel:13809045501, E-mail:yufengcpu@163.com

found that the expression of c-jun, ATF-2, Caspase-3 mRNA was significantly increased in rhein-treated groups. The results of Western blotting showed that there was no significant change in p38 and JNK protein, but an increasing trend in p-p38, p-JNK and Cleaved Caspase-3 was observed. After treatment with SP600125 (an inhibitor of JNK) and SB203580 (an inhibitor of p38) respectively, the apoptosis rates of rhein on HK-2 cells were significantly weak. **Conclusion:** Rhein induces apoptosis involving MAPK signal transduction pathway in HK-2 cells.

[Key words] rhein; HK-2 cells; apoptosis; mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway; c-jun N-terminal kinase; p38 mitogen-activated protein kinase

大黄酸(rhein,简称RH)属单萜核类1,8-二羟基蒽醌衍生物,是大黄、何首乌等多种中药中蒽醌类化合物的重要组成部分,具有电化学氧化还原性质。以往的药理学研究证明,大黄酸在调节肾功能、抗肿瘤、抗菌消炎、降糖调脂、保肝、泻下等多方面具有活性^[1-2],尤其在治疗糖尿病肾病、抗肿瘤方面表现更加突出^[3-4],成为近年来研究的热点。然而,随着研究的不断深入,实验显示大黄酸可能具有肾脏毒性作用,其机制可能与其诱导肾小管上皮细胞凋亡有关^[5-6]。

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联是真核生物细胞内重要的信号转导通路。目前研究最深入且最重要的MAPK通路有3条:c-jun氨基末端激酶(c-jun N-terminal kinase, JNK/SAPK) MAPK通路,p38 MAPK通路和细胞外信号调节蛋白激酶(ERK) MAPK通路,其中JNK, p38 MAPK通路的激活主要是促进细胞的凋亡^[7-8],ERK通路的激活则主要促使细胞存活、抑制细胞凋亡。已有研究表明MAPK信号转导通路的激活是肾脏损伤的重要机制之一^[9],但其是否参与大黄酸诱导的肾脏损伤过程尚未见报道。因此本实验从细胞水平初步探讨大黄酸是否能够在体外诱导肾小管上皮细胞HK-2凋亡,其凋亡机制是否与MAPK信号转导通路相关,以期明确大黄酸对肾脏的毒性及其毒性机制。

1 材料

1.1 细胞株 人正常肾小管上皮细胞系HK-2(江苏省药物研究所惠赠)。

1.2 药物及试剂 大黄酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号110757-200206),DMEM/F12培养基(美国Gibco公司,批号8114402),胎牛血清(FBS,美国Gibco公司,批号1414426),细胞凋亡-Hoechst染色试剂盒(碧云天生物技术研究,批号C0003),Annexin V-FITC细胞凋亡试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号G003-2),总RNA提取试剂盒、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,批号A617KA3880, 252201312,

00183446),一抗p-JNK, p-p38, Cleaved Caspase-3(美国Cell Signaling Technology公司,批号0011, 0010,0006),一抗JNK, p38(沈阳万类生物科技有限公司,批号WLN006,WL01174), β -actin抗体和二抗兔抗(美国Bioworld公司,批号AA24142, AB03141),JNK特异性抑制剂SP600125,p38特异性抑制剂SB203580(碧云天生物技术研究,批号S1876,S1863)。

1.3 仪器 Series 8000 WJ型CO₂培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司),DMIL LED DFC425c型倒置荧光显微镜(德国Leica公司),VersaMAX™型多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司),FACScan型流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司),Mastercycler ep realplax型实时荧光定量PCR仪(德国Eppendorf公司),Mini-Protean 3型垂直电泳槽,ChemiDoc™型成像系统(美国Bio Rad Laboratories公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 正常人肾小管上皮细胞系HK-2用含10%FBS的D/F12培养基,于37℃5%CO₂培养箱内培养。当细胞长满至培养瓶80%左右,消化传代,维持该细胞系。

2.2 检测细胞活力 取对数生长的HK-2细胞,消化成单细胞悬液,调整密度至 4×10^4 个/mL,接种于96孔板,每孔200 μ L。培养24 h后给药。实验分为5组:溶剂空白组,对照组,25, 50, 100 μ mol·L⁻¹大黄酸组。培养12, 24, 48 h后,吸除孔内液体,加入20 μ L质量浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的MTT溶液,继续培养4 h,加入DMSO充分溶解,用酶标仪在490 nm处测定吸光度A,计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = \frac{(A_{\text{给药组}} - A_{\text{溶剂空白组}})}{(A_{\text{对照组}} - A_{\text{溶剂空白组}})} \times 100\%$$

2.3 Hoechst 33258染色检测细胞凋亡 取无菌盖玻片置于6孔板内,将HK-2细胞消化制成单细胞悬液,调整密度至 1.6×10^5 个/mL,接种于6孔板,

每孔 2.5 mL, 制备细胞爬片。培养 24 h 后给药。实验分为 4 组: 对照组及给药组 (药物浓度 25, 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。给药 24 h 后, 固定液固定, Hoechst 33258 染色液染色, 将细胞爬片置于荧光显微镜下观察。

2.4 Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡率 将 1.6×10^5 个/mL 密度的 HK-2 细胞接种于 6 孔板, 每孔 2.5 mL。培养 24 h 后给药。分组及给药处理同

2.3, 给药 24 h 后消化收集细胞, 制备密度为 1.0×10^5 个/mL 的单细胞悬液, 取 1 mL 细胞悬液离心, 弃上清, 加入染色结合液重悬, 然后分别加入 Annexin V-FITC, 碘化丙啶染色液, 室温避光孵育 15 min 后置于冰浴中, 随即进行流式细胞仪检测。

2.5 c-jun, ATF-2, Caspase-3 mRNA 表达检测 将细胞接种于培养皿, 待细胞生长至 80% 左右给药, 分组及给药处理同 **2.3**。给药 24 h 后收集细胞, 用 Trizol 试剂裂解细胞提取总 RNA, 以 GAPDH 作为内参, 利用反转录 PCR 技术分别检测 Caspase-3 mRNA 及 JNK, p38 的下游转录因子 c-jun, ATF-2 mRNA 的表达。PCR 引物序列: c-jun 正向引物 5'-GCAGCCCAAACCTACCTCAC-3', 反向引物 5'-TAGCCATAAGGTCCGCTCTC-3'; ATF-2 正向引物 5'-CTTTGACCCAGCAACATCCT-3', 反向引物 5'-CTCTTCTCCGACGACCACTT-3'; Caspase-3 正向引物 5'-AGCAATAAATGAATGGGCTGAG-3', 反向引物 5'-GTATGGAGAAATGGGCTGTAGG-3'。数据处理采用相对定量中的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算结果来表示各个基因表达的水平。

2.6 p-JNK, JNK, p-p38, p38, Cleaved Caspase-3 蛋白表达检测 将细胞接种于培养瓶中, 细胞生长至 80% 左右给药, 分组及给药处理同 **2.3**。给药 24 h 后收集细胞, 加入细胞裂解液裂解, 提取蛋白并定量, 取适量体积蛋白用 SDS-PAGE 电泳分离, 电转移至 NC 膜, 5% BSA 常温封闭 2 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下与 β -actin, p-JNK, JNK, p-p38, p38, Cleaved Caspase-3 抗体杂交过夜, TBST 溶液清洗, 孵育二抗常温杂交 2 h, TBST 溶液清洗后加上 ELC 发光液, 放入凝胶成像仪中曝光, 使用 Gel-Pro analyzer 4.0 软件对条带进行定量分析, 得出各条带积分吸光度 IA, 以 β -actin 作为内参进行校正。

$$\text{蛋白相对表达量} = \frac{(\text{目的蛋白}_{\text{给药组}} \text{ IA} / \beta\text{-actin}_{\text{给药组}} \text{ IA})}{(\text{目的蛋白}_{\text{对照组}} \text{ IA} / \beta\text{-actin}_{\text{对照组}} \text{ IA})}$$

2.7 Annexin V/PI 双染检测 SP600125, SB203580 对细胞凋亡率的影响 将 1.6×10^5 个/mL 密度的

HK-2 细胞接种于 6 孔板, 每孔 2.5 mL, 培养 24 h 后给药。实验分 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄酸组, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄酸与 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SP600125 共孵育组, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 大黄酸与 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SB203580 共孵育组。后续操作同 **2.4**。

2.8 统计学分析 实验数据用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据的组间比较采用单因素方差分析 Tukey 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 MTT 比色法检测细胞活力 与对照组相比, 随着大黄酸浓度的增加, 细胞活力显著下降, 并且随着药物作用时间的延长, 细胞活力也显著下降。表明大黄酸呈时间依赖性和剂量依赖性抑制 HK-2 细胞活力。见表 1。考虑到细胞死亡率和药物作用效果, 后续实验作用时间选择 24 h。

表 1 大黄酸对 HK-2 细胞活力和细胞早期凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Effects of rhein on HK-2 cells viability and early apoptotic rates ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 $/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞活力/%			24 h
		12 h	24 h	48 h	早期凋亡率 /%
对照	-	100 \pm 9	100 \pm 13	100 \pm 4	5 \pm 3
大黄酸	25	98 \pm 8	89 \pm 15 ¹⁾	53 \pm 5 ²⁾	7 \pm 1
	50	91 \pm 13 ¹⁾	71 \pm 11 ²⁾	46 \pm 4 ²⁾	18 \pm 3 ²⁾
	100	69 \pm 6 ²⁾	56 \pm 6 ²⁾	39 \pm 4 ²⁾	34 \pm 4 ²⁾

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

3.2 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡率 相比于对照组, 大黄酸 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组细胞早期凋亡率由 5% 分别上升到 18%, 34% ($P < 0.01$)。说明大黄酸可显著诱导 HK-2 细胞凋亡。见表 1。

3.3 Hoechst 33258 染色法检测细胞凋亡 细胞发生凋亡时, 细胞核浓缩聚集、碎裂, 核膜裂解, 出现凋亡小体等典型的凋亡形态, 经 Hoechst 33258 染色后凋亡细胞呈致密浓染或碎块状致密浓染, 并发出较强的荧光, 相对于正常细胞颜色发白。对照组细胞呈规则圆形或椭圆形, 发出微弱的蓝色荧光, 细胞核无明显的形态学改变; 而给大黄酸 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组即可见少量致密浓染颜色发白的凋亡细胞, 在 50, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组可见大量致密浓染凋亡细胞及碎片。结果显示大黄酸可明显引起 HK-2 细胞凋亡。

3.4 c-jun, ATF-2, Caspase-3 mRNA 表达检测 相比于对照组 c-jun, ATF-2, Caspase-3 mRNA 的表达

均随着大黄酸浓度的增加而升高,在 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组均呈显著升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 大黄酸对 c-jun, ATF-2, Caspase-3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effects of rhein on expression of c-jun, ATF-2, Caspase-3 mRNA ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度 $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	mRNA/2 ^{-$\Delta\Delta C_t$}		
		c-jun	ATF-2	Caspase-3
对照	-	1.00 \pm 0.24	1.00 \pm 0.38	1.00 \pm 0.23
大黄酸	25	1.40 \pm 0.24	1.68 \pm 0.38	1.30 \pm 0.12
	50	2.40 \pm 0.07 ²⁾	2.22 \pm 0.24 ¹⁾	2.12 \pm 0.18 ²⁾
	100	2.93 \pm 0.74 ²⁾	2.71 \pm 0.31 ²⁾	2.35 \pm 0.08 ²⁾

3.5 p-JNK, JNK, p-p38, p38, Cleaved Caspase-3 蛋白表达检测 与对照组相比,大黄酸给药组 p-JNK, p-p38, Cleaved Caspase-3 的蛋白条带颜色均有加深,而 JNK, p38 的蛋白条带无显著变化。见图 1。累积吸光度分析统计结果表明,相对于对照组, JNK, p38 蛋白的表达无显著性变化, p-JNK 和 p-p38 蛋白表达均有增加的趋势,且在 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后

表 3 大黄酸 HK-2 细胞相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effects of rhein on relative protein in HK-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	浓度 $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	蛋白相对表达量				
		p-JNK	JNK	p-p38	p38	Cleaved Caspase-3
对照	-	1.00 \pm 0.29	1.00 \pm 0.30	1.00 \pm 0.21	1.00 \pm 0.15	1.00 \pm 0.21
大黄酸	25	1.48 \pm 0.13	1.05 \pm 0.05	1.05 \pm 0.08	0.97 \pm 0.08	1.21 \pm 0.12
	50	2.98 \pm 0.41 ²⁾	1.00 \pm 0.15	1.84 \pm 0.49 ¹⁾	1.13 \pm 0.23	2.25 \pm 0.29 ²⁾
	100	2.86 \pm 0.36 ²⁾	1.15 \pm 0.12	2.33 \pm 0.17 ²⁾	0.92 \pm 0.04	2.44 \pm 0.35 ²⁾

3.6 SP600125, SB203580 对细胞凋亡率的影响 SP600125 是 JNK 高选择性抑制剂,可以显著性抑制 JNK 介导的 c-jun 磷酸化;SB203580 是一种常用的 p38 MAPK 抑制剂,它可以通透细胞抑制 p38 MAPK 的磷酸化。实验结果表明,与 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 大黄酸组相比,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 大黄酸与 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SP600125 共孵育组,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 大黄酸与 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SB203580 共孵育组细胞早期凋亡率从 34% 分别下降至 23%, 25% ($P < 0.05$)。

4 讨论

细胞凋亡,又称程序性细胞死亡(PCD),是生物体内细胞的主动消亡过程。凋亡发生时,细胞的染色质浓缩、边缘化,核膜破裂,DNA 降解,产生凋亡小体等典型的凋亡形态^[10]。在细胞凋亡过程中

增加呈显著性差异 ($P < 0.05$);Cleaved Caspase-3 蛋白表达随着大黄酸浓度的增加不断升高,在 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时呈极显著性差异 ($P < 0.01$)。见表 3。

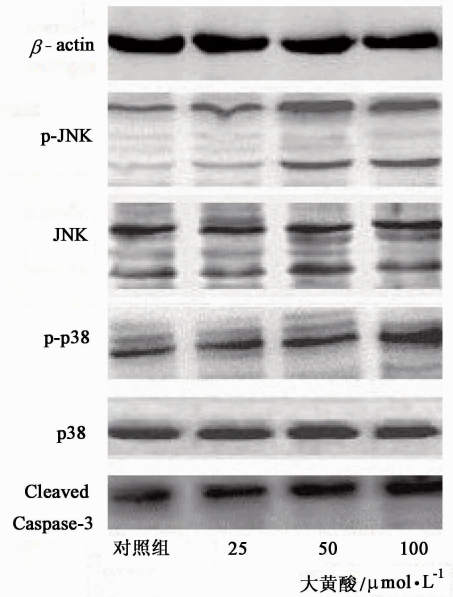


图 1 大黄酸对 HK-2 细胞相关蛋白表达的影响

Fig.1 Effects of rhein on expression of relative protein in HK-2 cells

Caspases 家族发挥着重要的作用,其中 Caspase-3 的激活是一切凋亡通路的共同途径, Caspase-3 被激活后进入核内激活核酸内切酶从而切割 DNA,导致细胞凋亡^[11]。实验显示,大黄酸可诱导多种细胞发生凋亡,包括肿瘤细胞^[4]等。近期研究证据表明大黄酸可能具有肾毒性,其机制可能是诱导肾小管上皮细胞凋亡^[5-6]。本实验用 MTT, Hoechst 33258 染色, Annexin V/PI 染色检测大黄酸对 HK-2 细胞的毒性作用。MTT 结果显示大黄酸作用于 HK-2 细胞的细胞活力随着作用时间、药物浓度的增加而下降,呈时间、浓度依赖性,表明大黄酸对 HK-2 细胞具有增殖毒性。在 Hoechst 33258 染色实验中给药组出现呈致密浓染或呈碎块状致密浓染、发出较强荧光的凋亡细胞,且凋亡细胞随着药物浓度的增加而增

多,提示大黄酸呈剂量依赖性地引起 HK-2 细胞凋亡。Annexin V/PI 双染结果显示早期凋亡细胞随着药物浓度的增加而递增。以上结果表明,大黄酸在体外能够显著诱导 HK-2 细胞凋亡。

MAPK 是真核细胞内广泛存在的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它可以被不同的细胞外刺激激活。其基本组成包括 MAPK kinase kinase (MKKK), MAPK kinase (MKK), MAPK,这 3 种激酶依次激活构成了一个保守的三级级联反应。MAPK 被激活后,磷酸化下游核转录因子、蛋白激酶等多种底物,调节相关基因的表达,进而参与细胞生长、分化、凋亡、对环境的应激适应等多种生理过程^[7]。目前,研究最为深入且与细胞凋亡关系最密切的 MAPK 通路主要是 JNK 和 p38 MAPK,它们主要由炎症刺激、细胞因子、环境刺激、氧化应激和生长因子等所激活^[12],研究表明 JNK 促进细胞凋亡机制主要是诱导 FasL 表达、调控凋亡相关基因的差异表达和激活 Caspases 家族,c-jun 是其最主要的下游底物;p38 MAPK 可以通过增强 c-myc 表达,磷酸化 p53,参与 Fas/FasL 介导的凋亡,诱导 Bax 转位等机制诱导细胞凋亡,ATF-2 是其主要的下游底物^[13]。实验中 PCR 检测结果显示 c-jun mRNA, ATF-2 mRNA 以及 Caspase-3 mRNA 的表达均显著性上调。Western blotting 测得给药组 JNK, p38 蛋白表达与对照组相比无显著性变化,但 p-JNK, p-p38, Cleaved Caspase-3 蛋白表达均明显增加,这说明大黄酸在诱导 HK-2 细胞凋亡时,JNK, p38 磷酸化水平增加进而激活了 JNK, p38 MAPK 信号转导通路;同时 Cleaved Caspases-3 升高意味着凋亡的发生,这与前面结果相一致。随后分别加用 JNK, p38 特异性抑制剂 SP600125, SB203580 进一步检测细胞凋亡,发现 2 种抑制剂均能够显著降低大黄酸诱导的 HK-2 细胞凋亡率,这进一步表明 JNK, p38 MAPK 的激活参与了大黄酸诱导的 HK-2 细胞凋亡过程。

综上所述,本实验证明大黄酸能够抑制 HK-2 细胞增殖并诱导其凋亡,且首次证明其凋亡机制可能是通过激活 JNK, p38 MAPK 信号转导通路进而活化 Caspases-3 实现的。然而大黄酸是否还能够通过其他途径诱导 HK-2 细胞凋亡,是否能够直接导致肾脏器官损伤,还需进一步研究。

[参考文献]

[1] 冯素香,谢新年,李建生,等. 固相萃取-高效液相

色谱法测定大黄酸血药浓度及在大鼠体内的药动学规律[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 140-143.

- [2] 李晓红,李蒙,陶艳蓉. 大黄酸及其衍生物药理作用研究新进展[J]. 现代药物与临床, 2010, 25(6): 417-421.
- [3] 曹贺,杜娟,孙伟新,等. 大黄酸衍生物的制备及其抗糖尿病肾病活性研究[J]. 中国药物化学杂志, 2011, 21(3):189-194.
- [4] Lin S, Fujii M, Hou D X. Rhein induces apoptosis in HL-60 cells via reactive oxygen species-independent mitochondrial death pathway [J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 418(2):99-107.
- [5] Yan M, Zhang L Y, Sun L X, et al. Nephrotoxicity study of total rhubarb anthraquinones on Sprague Dawley rats using DNA microarrays [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 107(2):308-311.
- [6] 王青秀,吴纯启,杨红莲,等. 大黄中游离蒽醌对 HK-2 细胞系的毒性作用研究[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(3):189-192.
- [7] Kyriakis J M, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation [J]. Physiol Rev, 2001, 81(2):807-869.
- [8] 周丽,胡富勇,徐新云. MAPK 信号调节通路及其在细胞凋亡中的研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2010(10):2655-2657.
- [9] Ma F Y, Liu J, Nikolic-Paterson D J. The role of stress-activated protein kinase signaling in renal pathophysiology [J]. Braz J Med Biol Res, 2009, 42(1):29-37.
- [10] Wyllie A H, Kerr J F R, Currie A R. Cell death: the significance of apoptosis [J]. Int Rev Cytol, 1980, 68(1):251-306.
- [11] Porter A G, Jänicke R U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis [J]. Cell Death Differ, 1999, 6(2): 99-104.
- [12] Sui X, Kong N, Ye L, et al. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents [J]. Cancer Lett, 2014, 344(2):174-179.
- [13] 梁先敏,杨克敌. Caspase 和 JNK/SAPK, p38MAPK 与细胞凋亡 [J]. 国外医学:卫生学分册, 2008, 35(1):5-10.

[责任编辑 聂淑琴]