

赭曲霉毒素 A 对外培养人肾小管 上皮细胞凋亡的作用

崔晋峰 邢凌霄* 李增宁 张祥宏 丁涛 王俊灵 严霞

(河北医科大学病理研究室, 石家庄 050017)

摘要 探讨赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OA) 对外培养的人肾小管上皮细胞 (HKC) 凋亡的影响。体外培养 HKC, 给予不同浓度 OA 处理 24 h 后, 分别采用流式细胞定量检测术 (FCM) 检测细胞的凋亡率, 应用免疫细胞化学染色 (SP 法) 和免疫蛋白印迹 (Western 印迹) 方法, 观察凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达以及 JNK 的表达水平和磷酸化水平 (p-JNK)。FCM 检测结果表明, 经 OA 处理 24 h, HKC 的凋亡率明显升高。SP 法和 Western 印迹结果表明, OA 处理组 HKC caspase-3 的表达以及 JNK 的磷酸化水平 (p-JNK) 均明显高于空白对照组和溶剂对照组, 但各组间细胞 JNK 的表达水平无明显变化。OA 处理可促进体外培养的人肾小管上皮细胞发生凋亡, JNK 激活以及 caspase-3 可能参与 OA 诱导 HKC 凋亡的过程。

关键词 赭曲霉毒素 A; 人肾小管上皮细胞; 凋亡; JNK

赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OA) 是自然界中的一种真菌毒素, 主要由赭曲霉和青霉菌属的某些菌株产生, 广泛存在于谷物和食品中^[1-3]。目前已有研究表明, OA 具有肾脏毒性、肝脏毒性和免疫毒性, 尤其是其肾脏毒性比较明显, 主要表现为肾小管变形退化、进行性的肾纤维化和肾功能的损害, 也因此被认为是巴尔干肾病和慢性间质性肾炎的主要病因之一^[4]。c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 家族, 又称作应激激活蛋白激酶 (SAPK) 家族是促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 超家族成员之一, 以 JNK 为中心的 JNK 信号转导通路可被细胞因子、生长因子、应激等多种因素激活。一旦被激活, 胞浆中的 JNK 移位到细胞核, 通过对转录因子 c-Jun、ATF-2、Elk-1 等的磷酸化促进基因的表达及新蛋白质的合成, 进而促进或引起细胞凋亡。目前, 有关 OA 肾毒性机制的研究多集中在 OA 和 DNA 形成 DNA 加合物导致 DNA 的损伤、断裂以及 OA 抑制线粒体的氧化呼吸链方面, 而有关 JNK 在 OA 诱导人肾小管上皮细胞 (HKC) 凋亡中作用的研究未见报道。

本研究采用流式细胞定量检测术 (FCM)、免疫细胞化学染色 (SP 法) 和免疫蛋白印迹方法, 观察 OA 处理对 HKC 凋亡率、凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达以及对 JNK 的表达水平和磷酸化水平 (p-JNK) 的影响。

1 材料与方

1.1 材料

OA 购自德国 Alpha 公司, 用 100% 乙醇将其溶解, 4 °C 保存备用。

1.2 实验分组与处理

选择对数生长期的 HKC, 随机分为空白对照组、溶剂对照组和 1 μmol/L OA、5 μmol/L OA 处理组。实验组加入 OA, 使其终浓度分别为 1 μmol/L 和 5 μmol/L, 对照组给予等体积生理盐水, 溶剂对照组加入 100% 乙醇, 培养 24 h 收集细胞进行检测。

1.3 FCM 检测 HKC 凋亡率

离心收集 HKC, 溴化乙啶染色。采用美国 Beckman Coulter 公司生产的 Epics-XL II 型流式细胞仪进行 DNA 测量, 以二倍体峰前出现亚二倍体峰判定细胞凋亡并计算凋亡率。仪器激发光源为 15 mW 氩离子激光器, 激发波长为 480 nm, 工作功率 300 mW, 所获数据输入 HP-300Consort30 计算机, 应用 Beckman Coulter 公司提供的相应软件程序进行资料处理。

1.4 免疫细胞化学方法检测 caspase-3、JNK 的表达水平以及磷酸化水平

取 HKC, 消化, 按 1×10^4 个 / 孔接种于事先放入灭菌盖玻片的 6 孔板中, 更换培养基后, 按上述分组处理。继续培养 24 h, 生理盐水洗涤, 4% 多聚甲醛固定 30 min。按常规 SP 方法进行免疫细胞化学染色。

收稿日期: 2007-11-12 接受日期: 2007-12-18

河北省自然科学基金资助项目 (No. C2006000832)

* 通讯作者。Tel: 0311-86265561, E-mail: xinglingxiao@hebm.edu.cn

以细胞胞浆内出现棕黄色颗粒状免疫反应阳性产物为 caspase-3 和 JNK 免疫细胞化学阳性的判定标准,以细胞胞浆及胞核内出现棕黄色颗粒状免疫反应阳性产物为 p-JNK 免疫细胞化学阳性的判定标准,排除边缘细胞,随机选取 10 个高倍视野,计数每高倍视野阳性细胞百分数,取平均值作为标记指数(LI), $LI = (\text{视野中阳性细胞数}) / (\text{视野中阳性细胞数} + \text{阴性细胞数}) \times 100\%$ 。

1.5 Western 印迹方法分析 caspase-3、JNK 的表达水平以及磷酸化水平

将收集的各组细胞分别用 PBS 洗涤,加入预冷的细胞总蛋白裂解液,提取细胞总蛋白,考马斯亮蓝方法进行蛋白质定量。15% SDS-PAGE,电转移于 PVDF 膜上,5% 脱脂奶封闭过夜。一抗(1:100) 37 °C 温育 4 h,二抗(1:2 000) 37 °C 温育 2 h, DAB 显色。Snygene 全自动凝胶成像分析系统分析 caspase-3、JNK 的表达水平以及磷酸化水平。

1.6 统计学处理

各项数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS12.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 FCM 检测细胞凋亡率

OA 处理组细胞凋亡率明显高于对照组(表 1)。经 OA 处理 24 h 后,1 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理组细胞凋亡率分别为(3.85 \pm 0.29)% 和(4.86 \pm 0.51)%,均较对照组和溶剂对照组明显增加($P < 0.05$),但在两个 OA 处理组之间凋亡率没有明显不同。

2.2 Caspase-3 的表达水平

免疫细胞化学检测结果显示,OA 处理组 HKC caspase-3 阳性表达率明显高于溶剂对照组(图 1,表 2)。Western 印迹检测结果显示,对照组与 OA 处理组在 32 kDa 位置均出现了棕色的 caspase-3 免疫反应阳性条带。结合扫描条带密度定量结果显示,OA 处理组 caspase-3 的相对表达量均高于溶剂对照组(图 2)。结果表明 OA 处理可以促进体外培养 HKC caspase-3 的表达。

表 1 OA 处理后 HKC 凋亡率 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组	凋亡率 (%)
空白对照组	1.23 \pm 0.05
溶剂对照组	1.27 \pm 0.13
1 $\mu\text{mol/L}$ OA 处理组	3.85 \pm 0.29*
5 $\mu\text{mol/L}$ OA 处理组	4.86 \pm 0.51*

单因素方差分析,与溶剂对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.3 JNK 的表达水平和磷酸化水平

免疫细胞化学检测结果显示,OA 处理组 HKC JNK 的磷酸化水平较对照组明显增强(图 3,表 2),而 JNK 的表达水平与对照组相比没有明显的改变(表 2)。

p-JNK、JNK 的相对分子质量均为 54 kDa、46 kDa。经 SDS-PAGE、Western 杂交后各泳道均在 54 kDa、46 kDa 出现了浅棕色的阳性条带。以 β 肌动蛋白(42 kDa)作为内参照物,采用图像分析系统对杂交条带进行灰度扫描,结果显示 OA 处理组 JNK 的表达水平没有明显的改变,而 JNK 的磷酸化水平与对照组相比则明显增强(图 4)。这表明,给予 OA 处理可以增强体外培养 HKC JNK 磷酸化水平, JNK 活性增强;但对 HKC JNK 的表达没有影响。

3 讨论

许多研究表明,OA 具有明显肾脏毒性,短期实验显示 OA 可引起肾小管萎缩、坏死、间质纤维化、肾小球透明变性;长期动物实验显示 OA 可以引起实验动物肾脏肿瘤的发生。OA 被认为是巴尔干肾病的主要致病因素之一,它是一种病因未明的慢性肾脏疾病,主要病理表现为肾小管变形退化、进行性肾纤维化和肾功能损害^[2]。OA 在自然界中广泛存在,其肾脏的毒性与严重肾脏疾病的发生发展密切相关。研究发现, F344 雄性大鼠给予一定剂量 OA 后,肾脏的病理改变主要表现在肾小管结构破坏、出现凋亡细胞、可以见到巨大核的小管细胞^[5]。所以,探讨 OA 的肾毒性对进一步认识其致病机制,有效预防 OA 的肾毒性具有重要意义。

细胞凋亡是细胞生物生命活动过程中不可缺少的组成部分,贯穿于生物全部生命活动中。普遍认为 caspase-3 是细胞凋亡信号途径中最关键的效应酶,在细胞凋亡过程中处于核心位置,凋亡的最后实施是通过 caspase-3 的激活而实现,因此 caspase-3 被称为“死亡蛋白”^[6]。多种刺激因素启动的信号通路最终通过激活 caspase-3 而诱导细胞凋亡。本研究中 FCM 检测结果表明,1 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ OA 处理 HKC 24 h 后,细胞凋亡率增加,同时通过 SP 法及 Western 印迹发现给予 OA 处理后 HKC caspase-3 表达增加,结果提示 OA 有促进 HKC 凋亡的作用。

MAPK 信号转导通路主要包括细胞外信号调节酶(ERK1/2)通路、JNK 通路和 p38 通路。大量研究证实,很多刺激可以诱导不同类型的细胞发生凋亡,而细胞对刺激的反应中均有 JNK 信号转导通路的激活^[7,8]。因此,人们认为 JNK 信号转导通路与细胞凋

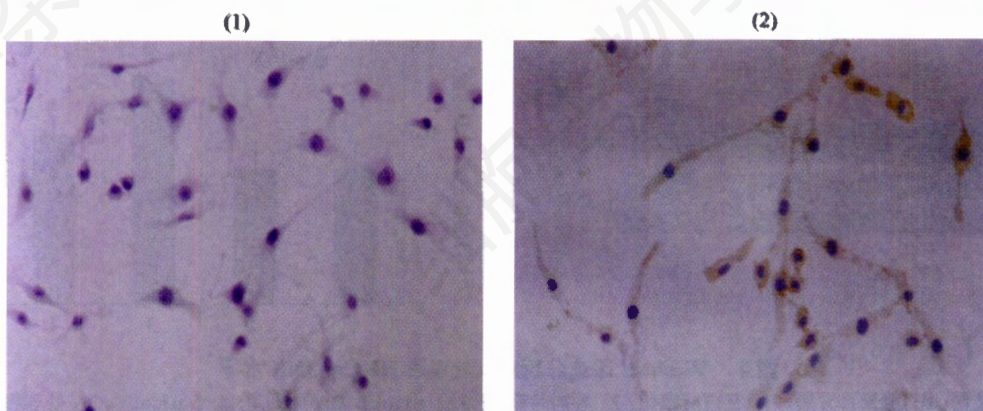


图1 免疫细胞化学染色检测 OA 处理后 HKC caspase-3 的表达(SP 法, 200×)

1: 空白对照组; 2: 1 μmol/L OA 处理组。

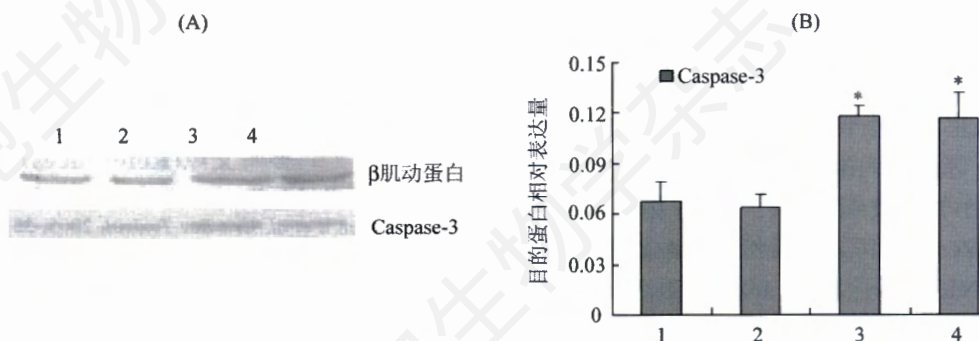


图2 Western 印迹检测 OA 处理后 HKC caspase-3 的表达

A: 蛋白质印迹条带图; B: 定量直方图。1: 空白对照组; 2: 溶剂对照组; 3: 1 μmol/L OA 处理组; 4: 5 μmol/L OA 处理组。单因素方差分析, 与溶剂对照组比较, *P<0.05。

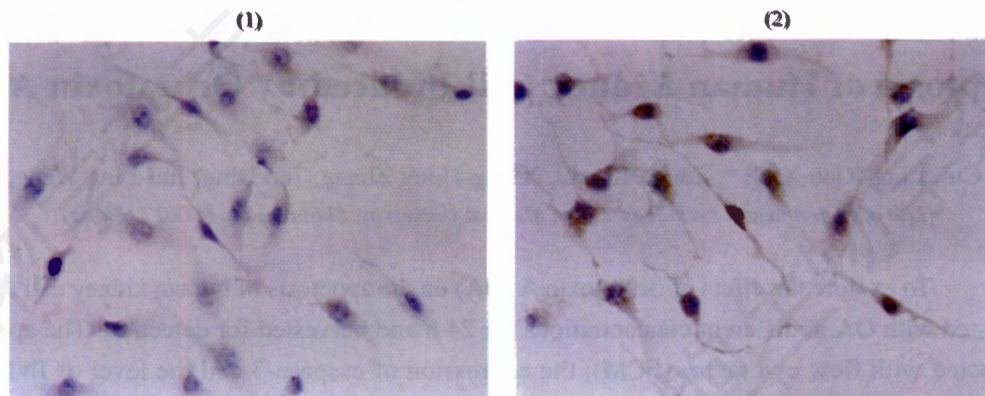


图3 免疫细胞化学染色检测 OA 处理后 HKC p-JNK 水平(SP 法, 200×)

1: 空白对照组; 2: 1 μmol/L OA 处理组。

表2 免疫细胞化学检测 OA 处理后 HKC caspase-3、JNK 及 p-JNK 水平($\bar{x} \pm s$, %, n=10)

分组	Caspase-3 的表达	p-JNK 水平	JNK 水平
空白对照组	14.31±4.24	10.19±6.85	73.33±9.21
溶剂对照组	17.88±3.18	14.84±6.29	70.98±11.22
1 μmol/L OA 处理组	54.03±9.21*	53.31±11.01*	73.24±6.97
5 μmol/L OA 处理组	60.75±9.95*	58.53±11.11*	69.69±9.90

单因素方差分析, 与溶剂对照组比较, *P<0.05。

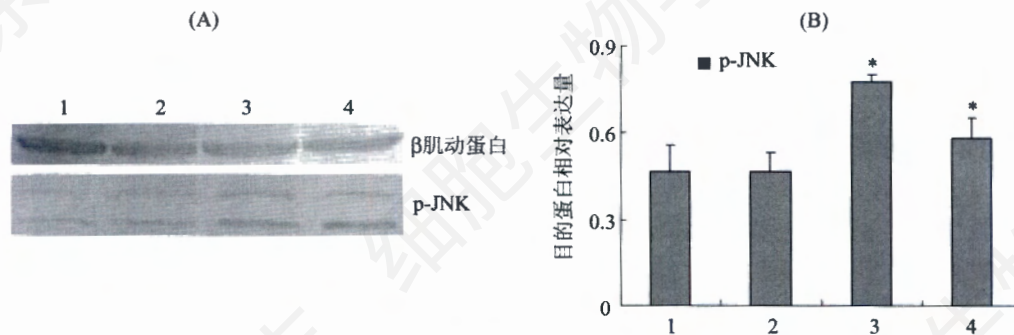


图4 Western印迹分析OA处理后HKC p-JNK水平

A: 蛋白质印迹条带图; B: 定量直方图。1: 空白对照组; 2: 溶剂对照组; 3: 1 $\mu\text{mol/L}$ OA 处理组; 4: 5 $\mu\text{mol/L}$ OA 处理组。单因素方差分析, 与溶剂对照组比较, * $P < 0.05$ 。

亡密切相关^[9]。目前有研究认为一些霉菌毒素如: 伏马菌素B1可以激活JNK信号转导通路诱导小鼠肝细胞的凋亡^[10]; 沙曲霉素通过激活JNK信号转导通路诱导U937人白血病细胞凋亡^[11]。而JNK信号转导通路在OA诱导人正常肾小管上皮细胞凋亡中作用的研究未见有报道, 因此我们推测JNK可能会在OA诱导体外培养人肾小管上皮细胞凋亡中起作用。本研究通过SP法及Western印迹发现给予OA处理后, 各处理组HKC JNK的活性增强, JNK被激活。OA处理后, JNK的磷酸化水平增强, 同时caspase-3表达也增加, 但是JNK的激活是否参与了OA引起的细胞caspase-3的表达, 我们在今后的实验中会进一步应用特异性JNK阻断剂SP600125, 深入探讨JNK信号转导通路和OA致HKC凋亡之间的关系。

综合以上结果提示, OA处理可使HKC凋亡率增高, caspase-3的表达增加, 同时JNK的磷酸化水平也相应增高。因此推测, 在OA引起体外培养人肾小管上皮细胞发生凋亡的过程中, JNK可能发挥一定作用。

参考文献(References)

- [1] Walker R. *Adv Exp Med Biol*, 2002, **504**: 249
- [2] O'Brien E *et al. Crit Rev Toxicol*, 2005, **35**: 33
- [3] Ringot D *et al. Chem Biol Interact*, 2006, **159**: 18
- [4] Vrabcheva T *et al. J Agric Food Chem*, 2004, **52**: 2404
- [5] Mally A *et al. Chem Res Toxicol*, 2005, **18**: 1242
- [6] Chang HY *et al. Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, **64**: 821
- [7] Tournier C *et al. Science*, 2000, **288**: 870
- [8] Tournier C *et al. Genes Dev*, 2001, **15**: 1419
- [9] Tian W *et al. Am J Physiol Renal Physiol*, 2000, **279**: F593
- [10] Sharma N *et al. J Biochem Mol Toxicol*, 2005, **19**: 359
- [11] Yang GH *et al. Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, **164**: 149

The Apoptosis of Human Kidney Cell Induced by Ochratoxin A *in Vitro*

Jin-Feng Cui, Ling-Xiao Xing *, Zeng-Ning Li, Xiang-Hong Zhang, Tao Ding, Jun-Ling Wang, Xia Yan

(Lab of Experimental Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract To explore the effect of ochratoxin A (OA) on the apoptosis of human kidney cell (HKC) *in vitro*, HKC were treated with OA at different concentrations for 24 h and harvested for detection. The apoptosis rate of HKC was detected with flow cytometry (FCM), the expression of caspase-3 and the level of JNK/p-JNK were determined with immunocytochemical staining and Western blot respectively. FCM analysis showed that the apoptosis rate of HKC was evaluated in OA treated group. Both caspase-3 expression and p-JNK level were significantly higher in OA treated group than that in control group or solvent control group by SP and Western blot, while the level of JNK was not changed in all the groups. OA could induce apoptosis of HKC *in vitro*. The activation of JNK and caspase-3 could take part in the process of OA induced HKC apoptosis.

Key words ochratoxin A; human kidney cell; apoptosis; JNK

Received: November 12, 2007 Accepted: December 18, 2007

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.C2006000832)

* Corresponding author. Tel: 86-311-86265561, E-mail: xinglingxiao@hebm.edu.cn