

人参皂苷 20(s)-Rg3 对 llc-pk1 细胞中顺铂所致肾毒性的保护作用

吴胜斌 王应灯

(上海交通大学医学院附属第九人民医院肾脏内科, 上海, 200011)

摘要 目的:探讨人参皂苷 20(s)-Rg3 对 llc-pk1 细胞中顺铂所致肾毒性的保护作用。方法:通过基于细胞的肾脏保护试验,研究了发酵黑参(FBG)及其活性成分人参皂苷 20(S)-Rg3 对猪肾(LLC-PK1)细胞中顺铂(化疗药物)诱导的损伤的保护作用。结果:由顺铂诱导的细胞活力降低,再使用 FBG 提取物和人参皂苷 20(S)-Rg3 依赖剂量后明显恢复。用 FBG 提取物或人参皂苷 20(S)-Rg3 处理后会降低顺铂诱导升高与磷酸化 c-Jun N-末端激酶(JNK), p53 和裂解的半胱天冬酶-3 升高的蛋白。通过用 FBG 和人参皂苷 20(S)-Rg3 的共同处理,由于顺铂的诱导导致凋亡 LLC-PK1 细胞升高的百分比显著降低。结论:人参皂苷 20(s)-Rg3 可改善 LLC-PK1 的细胞毒性,人参皂苷 20(S)-RG3 可能是通过阻断 JNK-P53-caspase-3 信号级联反应来介导这种作用的重要组成部分。

关键词 顺铂;人参皂苷 20(S)-Rg3;llc-pk1 细胞;c-Jun N-末端激酶;肾毒性;发酵黑参;丝裂原活化蛋白激酶;细胞外调节蛋白激酶;磷酸脱氢酶;甘油醛-3-磷酸脱氢酶

Protective Effects of Ginsenoside 20 (s)-Rg3 on Renal Toxicity Induced by Cisplatin in llc-pk1 Cells

Wu Shengbin, Wang Yingdeng

(Department of Nephrology, the Ninth People's Hospital, School of Medicine,
Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011, China)

Abstract Objective: To discuss protective effects of ginsenoside 20 (s)-Rg3 on renal toxicity induced by cisplatin in llc-pk1 cells. **Methods:** This article studied the protective effect of fermentation of black ginseng cells (FBG) and its active component ginsenoside 20 (S)-Rg3 on porcine kidney (LLC-PK1) cells in cisplatin (chemotherapy)-induced injury based on kidney protection test. **Results:** The cisplatin induced cell viability decreased, and then FBG was used to extract and ginsenoside 20 (S)-Rg3 was restored by FBG. After the dose dependent or extract ginsenoside 20 (S) after-Rg3 treatment may reduce cisplatin induced increased phosphorylation of c-Jun and N-terminal kinase (JNK), p53 and caspase cleavage the increase of-3 protein. By using FBG and 20 ginsenosides (S) together with-Rg3, the percentage of cisplatin induced apoptosis in LLC-PK1 cells led to increased significantly. **Conclusion:** FBG and its major ginsenoside 20(S)-Rg3, ameliorated cisplatin-induced nephrotoxicity in LLC-PK1 cells by blocking the JNK-p53-caspase-3 signaling cascade.

Key Words Cisplatin; Ginsenoside 20 (S)-Rg3; llc-pk1 cell; c-Jun N-terminal kinase; Nephrotoxicity; FBG; MAPK; ERK; Phosphate dehydrogenase; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

中图分类号:R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.08.045

人参是最著名的中草药之一,其个体成分可增强肾功能^[1]。人参通过减弱氧化应激有效地改善了大鼠链脲佐菌素诱导的肾功能障碍^[2-4]。最近,评价人参引起的药物肾毒性的作用,以及参与这一反应的机制和活性成分,还有人参潜在的肾脏保护功效成为人们感兴趣的研究领域^[5-7]。人参可防止大鼠庆大霉素(一种氨基糖苷类抗生素)引起的肾损伤^[1]。庆大霉素诱导的肾毒性与氧化损伤有关。与

人参共同施用,通过抑制自由基形成和抗氧化系统的恢复来减少庆大霉素诱导的肾损伤。在人参的几个成分中,酚酸、黄酮,负责增加肾血流量和消除自由基,表现出对庆大霉素诱导的氧化毒性的保护作用^[8-11]。

目前对开发方法已经进行了研究,可使用热加工来提高人参转换为达玛烷型皂苷的药理功效。按照这个概念,已经准备了黑参作为原料人参来进行

基金项目:上海市自然科学基金项目(09ZR417400)

作者简介:吴胜斌(1969.12—),男,硕士,主治医师,研究方向:中西医结合治疗慢性肾脏病的基础和临床研究,E-mail:yanyu180@163.com

通信作者:王应灯(1973.07—),男,博士,副主任医师,研究方向:中西医结合治疗慢性肾脏病的基础和临床研究,E-mail:sfd201101@163.com

热加工和发酵。虽然一些对于人参的研究集中在其对糖尿病的保护作用^[3],但还不清楚黑参对药物诱导的肾毒性的影响。

本研究旨在研究黑参及其活性成分人参皂苷 20(S)-Rg3 对猪肾(LLC-PK1)细胞中顺铂(化疗药物)诱导的损伤的肾脏保护作用。此外,我们着重评估丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)作为黑参在肾脏保护作用中的重要影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 猪肾(LLC-PK1)细胞(美国,美国典型培养物保藏中心)。

1.1.2 药物 人参皂苷 20(S)-Rg3(中国,长春市凯瑞化学试剂经销站);顺铂(美国,美国 Sigma 公司)。

1.1.3 试剂与仪器 DMEM 培养基(美国,美国 Sigma 公司);胎牛血清(美国,Thermo 公司);p38-促分裂素原活化蛋白激酶试剂盒(美国,美国 Sigma 公司);Ez-Cytox 试剂(美国,美国 Sigma 公司);磷酸化-p38 试剂盒,p44/42(美国,美国 Abcam 公司)促分裂素原活化蛋白激酶-细胞外信号调节激酶试剂盒(美国,美国 Abcam 公司);放射免疫沉淀测定缓冲液(美国,美国 Sigma 公司);磷酸化-p44/42, c-Jun-N-末端激酶试剂盒(JNK)(美国,美国 Abcam 公司);化学发光预先蛋白质印迹检测试剂(美国,美国 R&D 公司);Tali 凋亡试剂盒(美国,美国 Invitrogen 公司);磷酸化末端激酶试剂盒(美国,美国 Abcam 公司);p53,裂解的半胱天冬酶-3 试剂盒(美国,美国 Abcam 公司);甘油醛-3-磷酸脱氢酶试剂盒(GAPDH)(美国,美国 Abcam 公司)和辣根过氧化物酶缀合的抗兔抗体试剂盒(美国,美国 Abcam 公司)。

细胞培养箱(美国,Thermo 公司);酶标仪(美国,Bio-Rad 公司);凝胶成像仪(美国,Bio-Rad 公司);Tali 图像的细胞仪(美国,Thermo 公司);Fusion Solo 化学发光系统(法国,法国 VILBER 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 人参干粉提取物由北京同仁堂吉林人参有限责任公司提供。四年生白参是从大连富生制药有限公司购买的。人参的真实性是根据成分配方确定的。黑参在 85 ℃ 下通过 9 个循环反复蒸煮白参 8 h 并在 50 ℃ 下干燥 48 h 制备。为了制备人参提取物,将黑参粉碎成粉末,并用 10 倍体积的蒸馏水,在 80 ℃ 72 h 萃取 1 次,然后过滤

并冷却。人参提取物用酵母菌(丹麦格林纳拉勒曼德)在 34 ℃ 下发酵 25 h。发酵后,将黑参提取物在 85 ℃ 灭菌 22 h,然后冻干。本研究使用的黑参提取物中的人参皂苷 Rg2, Rg3, Rh1, Rh2 和 Rf 分别为 2.86 mg/mL, 24.52 mg/mL, 12.62 mg/mL, 0.63 mg/mL 和 1.32 mg/mL^[12]。

1.2.2 检测指标与方法 评估对顺铂所致肾细胞损伤的保护作用:使用 LLC-PK1 细胞评估对抗氧化肾细胞损伤的保护作用^[12-13]。LLC-PK1 细胞从美国典型培养物保藏中心购买,并在空气含 5% 的 CO₂ 和 37 ℃ 的环境中培养含 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素和 4 mmol/L L-谷氨酰胺的 DMEM 培养基。将每空 1 × 10⁵ 个细胞接种在 96 孔培养板中,并使其粘附 2 h。然后,将试验样品、自由基供体 25 μmol/L 顺铂或两者均加入培养基中。培养 24 h 后,除去含有测试样品、自由基供体或两者的培养基。在 37 ℃ 将细胞在无血清培养基(90 mL/孔)和 Ez-Cytox 试剂(10 mL/孔)中培养 2 h。通过使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度来测定细胞活力。

蛋白印迹分析:全细胞提取物制备按照制造商的说明使用放射免疫沉淀测定缓冲液,以 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟作为辅助。蛋白质(全细胞提取物,20 mg/泳道)在预制 4-15 迷你 PROTEAN TGX 凝胶电泳分离后涂抹到聚偏氟乙烯(PVDF)膜,并利用表位特异性原发性和继发性抗体进行分析。使用增强的化学发光预先蛋白质印迹检测试剂和 Fusion Solo 化学发光系统以显现结合的抗体。

基于图像的流式细胞仪测定:LLC-PK1 细胞用于基于图像的凋亡测定系统。所有测定均按照用于操作 Tali 图像的细胞仪的指南进行。细胞在 37 ℃, 5% CO₂ 的环境下用样品处理 24 h。使用 TrypLE 试剂通过胰蛋白酶处理后收获细胞,并使用 Tali 凋亡试剂盒进行染色。对样本进行独立划分和分析并按照制造商推荐的协议使用 Tali 图像和流动细胞仪厂家。通过用膜联蛋白 V Alexa Fluor 488 缀合物染色测定细胞群的凋亡部分。碘化丙啶(PI)用于从凋亡细胞(Annexin V 阳性/PI 阴性)分化死细胞(膜联蛋白 V 阳性/PI 阳性或膜联蛋白 V 阴性/PI 阳性)。由 Tali 式细胞仪测出存活的、凋亡的和死亡的细胞群的百分比与来自同一样品独立运行的流式细胞仪上的数据是类似的^[14-15]。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。用多重比较检验和方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在本研究中,我们试图确定黑参提取物及其活性人参皂苷 20(S)-Rg3 的肾脏保护作用以及所涉及的机制,以确定其治疗潜力。我们进行了基于细胞的肾脏保护试验,以评估黑参提取物和人参皂苷 20(S)-Rg3 对 LLC-PK1 细胞的保护作用。使用 LLC-PK1 细胞系建立肾细胞保护试验条件,该细胞系通常用于评估肾毒性^[16-17]。用 25 μmol/L 的顺铂治疗后,控制 LLC-PK1 细胞存活率降低到 60%。使用黑参及人参皂苷 20(S)-RG3 后,由顺铂导致降低得细胞存活率明显恢复(图 1)。黑参提取物和人参皂苷 20(S)-Rg3 分别控制在 500 mg/mL 和 250 mg/mL 水平改善了顺铂导致的肾毒性。

正常的 MAPK 信号转导的失调与急性与慢性肾脏疾病有关^[18]。在本研究中,我们试图确定 MAPKs-p53-caspase 凋亡级联在介导黑参和人参皂苷 20(S)-Rg3 对肾细胞中氧化细胞毒性的保护作用

中所扮演的成分。如图 2 所示,顺铂治疗 24 h 后,观察磷酸化氨基末端激酶在用黑参及人参皂苷 20(S)-RG3 处理后下降。然而,p-ERK 和 p-P38 没有明显的变化(数据未显示)。

顺铂诱导的肾毒性依赖于 DNA 损伤诱导的细胞凋亡。p53 的蛋白水平在使用顺铂治疗后显著增加,而经高浓度的黑参及人参皂苷 20(S)-RG3 治疗后大幅减少。类似地,用黑参和人参皂苷 20(S)-Rg3 处理后,升高的切割的半胱天冬酶-3 水平也降低了。图 3 显示黑参提取物和人参皂苷 20(S)-Rg3 对 LLC-PK1 细胞凋亡的影响。如图 3A 所示,使用顺铂治疗后,被红绿荧光染色的凋亡及死亡细胞的数量增加了,其数量在经黑参尤其是与 人参皂苷 20(S)-RG3 联合治疗后降低。用黑参和人参皂苷 20(S)-Rg3 进行联合治疗后,顺铂治疗诱导的凋亡 LLC-PK1 细胞升高百分比明显降低(图 3B)。

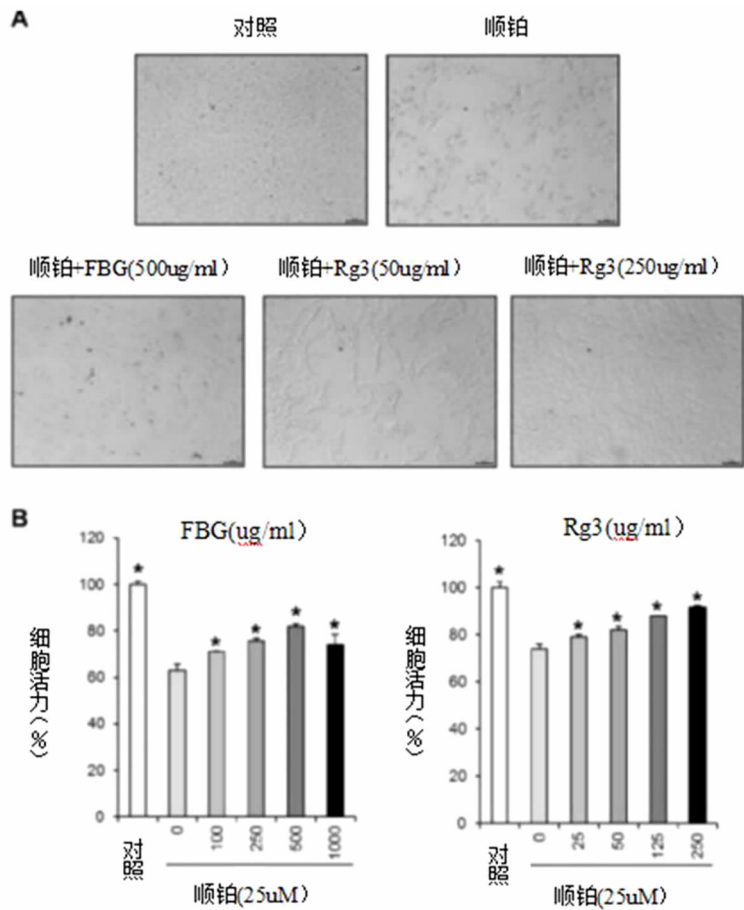


图 1 人参和人参皂苷 20(S)-Rg3 对顺铂诱导的肾细胞损伤的保护作用

注:(A)25 μM 顺铂治疗后黑参和人参皂苷 20(S)-Rg3 的肾脏保护作用的代表显微图像。(B)用顺铂治疗(25 μM)LLC-PK1 细胞后黑参和人参皂苷 20(S)-Rg3 的保护测定。LLC-PK1 细胞用各种浓度的黑参和人参皂苷 20(S)-Rg3 预处理 2 小时,然后进一步用 25 μM 的顺铂治疗 24 小时。使用 MTT 测定法评估细胞活力。与顺铂观察组比较,* P < 0.05。FBG(发酵黑参);MTT,3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物

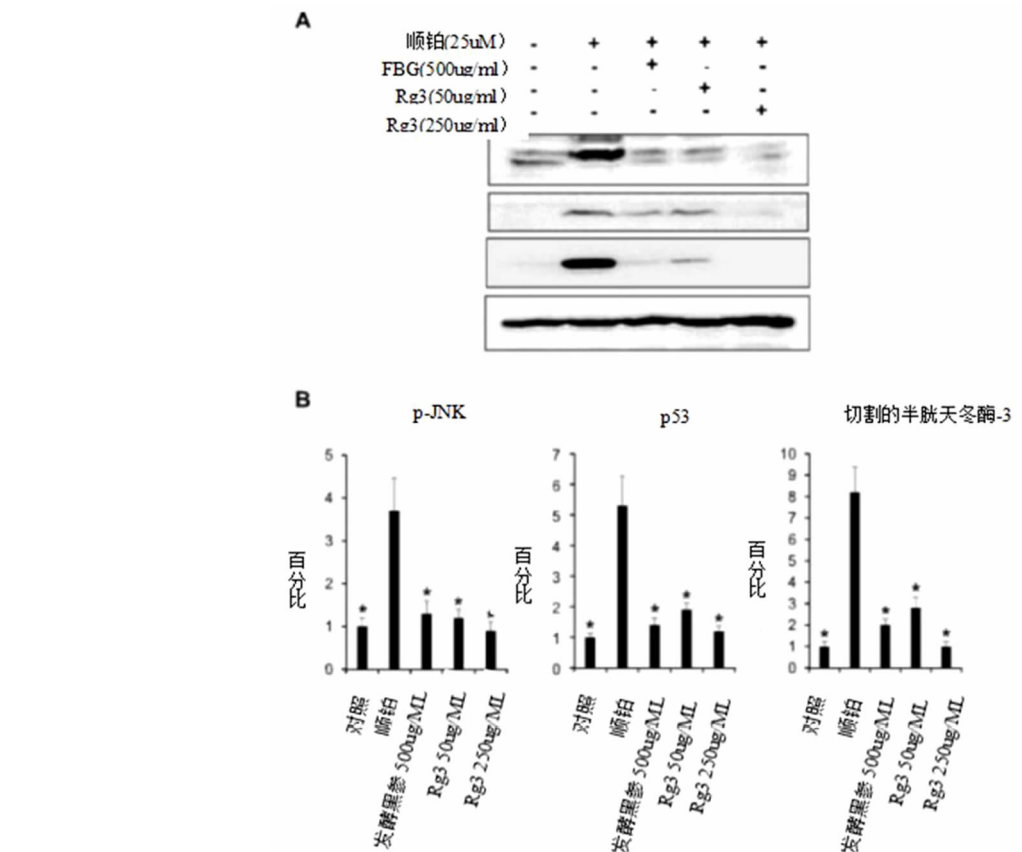


图2 所述的 c-Jun N-末端激酶;p53;半胱天冬蛋白酶-3 的信号传导途径介导了黑参
和人参皂苷 20(S)-Rg3 对抗 LLC-PK1 细胞毒性的保护作用

注:(A) Western 印迹分析结果显示用黑参和人参皂苷 20(S)-Rg3, 含或不含不同浓度的顺铂来处理 24 h, LLC-PK1 细胞中磷酸化(p)-JNK、JNK、p53、切割的半胱天冬酶-3 和磷酸脱氢酶的水平。(B)来自 Western 印迹分析的 p-JNK, p53 和切割的半胱天冬酶-3 的定量结果。使用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离全细胞裂解物(20 mg), 转移到 PVDF 转移膜上, 并用所述抗体进行探测。使用增强的化学发光检测系统可视化蛋白质。与顺铂观察组比较, 差异有统计学意义, * $P < 0.05$ 。ERK(细胞外信号调节激酶);FBG(发酵黑参);磷酸脱氢酶;甘油醛-3-磷酸脱氢酶

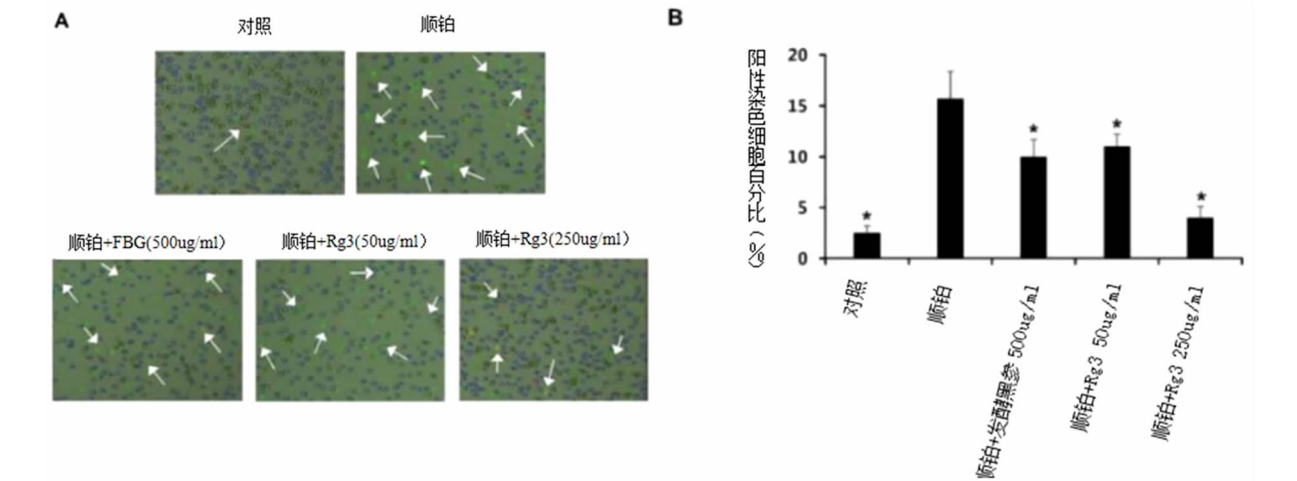


图3 黑参及人参皂苷 20(S)-Rg3 对 LLC-PK1 细胞凋亡的影响

注:(A)凋亡检测的代表性图像。(B)膜蛋白 V 阳性染色细胞的百分比。用红绿荧光对死亡和凋亡细胞进行染色。使用基于 Tali 图像的细胞仪测定细胞凋亡。与顺铂观察组比较, 差异有统计学意义, * $P < 0.05$ 。FBG(发酵黑参)

3 讨论

人参皂苷是三萜烷磺酸衍生的 30 碳糖苷, 是人参的主要活性成分。人参皂苷抑制正常大鼠肾细胞中斑蝥素诱导的细胞毒性。人参皂苷经预处理降低

了大鼠血清肌酐,尿蛋白,血尿素氮和组织学变化的增加^[19]。这些结果可能反映了某些人参皂苷可改善药物性肾毒性肾功能不全。

顺铂诱导的肾损伤与自由基和氧化应激的形成有关,这种损伤可激活 MAPKs^[20-22]。用抗氧化剂和胱天蛋白酶抑制剂治疗可以缓解顺铂相关肾毒性的作用。有相当多的证据表明该蛋白激酶、p53 和半胱天冬酶途径在凋亡途径的调控以及炎症反应过程中发挥重要作用。本研究结果表明 JNK-p53-caspase-3 信号级联在介导黑参皂苷 20(S)-Rg3 对培养的 LLC-PK1 细胞中氧化细胞毒性的保护作用方面起关键作用。

人参通过减轻包括超氧化物歧化酶,谷胱甘肽过氧化物酶,过氧化氢酶和谷胱甘肽 S-转移酶在内的抗氧化酶的活性以及谷胱甘肽的水平,显示出对顺铂诱导的肾毒性的保护作用。这种效应从而降低了氧化应激、生化指标的改变、组织学改变、基因组 DNA 损伤、以及表达 TNF- α 、白细胞介素 6、肿瘤抑制基因 p53 等指标。人参皂苷 F11 经预处理降低了顺铂诱导的血尿素氮和肌酐水平的升高,改善了组织病理学损伤。进一步的研究表明,F11 抑制 p53 的活化,反转了 B 细胞淋巴瘤 2 相关 X 蛋白/B 细胞淋巴瘤-2 的比例,顺铂诱导的抗氧化和自由基水平反过来抑制了肾小管细胞凋亡^[23-24]。然而,人参皂苷 20(S)-Rg3 的效果和作用机制到目前为止尚未确定。

总之,我们的研究表明,人参皂苷 20(s)-Rg3 可改善 LLC-PK1 的细胞毒性,人参皂苷 20(S)-RG3 可能是通过阻断 JNK-P53-caspase-3 信号级联反应来介导这种作用的重要组成部分。

参考文献

- [1]程慧,宋新波,张丽娟. 人参皂苷 Rg3 与 Rh2 的研究进展[J]. 药物评价研究,2010,33(4):307-311.
- [2]王修银,成文利,饶子亮. 十全大补汤对链脲佐菌素模型小鼠学习记忆及抗氧化的研究[J]. 当代医学,2009,15(28):1-2.
- [3]安丽萍,王英平,刘晓梅,等. 五味子油对链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病大鼠的影响[J]. 中草药,2012,43(3):552-556.
- [4]金勇,朱勇,吴南翔. 实验性链脲佐菌素诱导的大、小鼠糖尿病动物模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(3):80-82.
- [5]孙倩. 人参皂苷 Rb1 对小鼠肠缺血再灌注致急性肾损伤保护作用中的分子机制研究[D]. 武汉:武汉大学,2014.
- [6]吴胜斌,王应灯. 人参皂苷 Rg₃ 对 H₂O₂ 诱导人肾小球系膜细胞氧化应激损伤的保护作用及其机制研究[J]. 现代药物与临床,2015,30(12):1437-1442.
- [7]曹霞,谷欣权,陈燕萍,等. 人参皂苷 Re 对肾脏缺血再灌注损伤大鼠肾功能及 ATP 酶的影响[J]. 中国实验诊断学,2009,13

(08):1025-1027.

- [8]石艳,王陆飞,罗萍,等. 庆大霉素诱导急性肾损伤大鼠模型肾损伤分子-1 的表达[J]. 中国生物制品学杂志,2010,23(07):700-703.
- [9]孙雪峰. Prohibitin 的组蛋白乙酰化修饰介导庆大霉素诱导肾损伤的机制研究[D]. 长春:吉林大学,2014.
- [10]向丽,林波,张玮,等. 保肾颗粒对庆大霉素所致大鼠急性肾功能衰竭的保护作用[J]. 中药药理与临床,2014,30(04):104-108.
- [11]Chiou YY, Lee YC, Chen MJ. Cyclosporine-based immunosuppressive therapy for patients with steroid-resistant focal segmental glomerulosclerosis: a meta-analysis[J]. Curr Med Res Opin,2017,33(8):1389-1399.
- [12]Curthoys NP, Gstraunthaler G. pH-responsive, gluconeogenic renal epithelial LLC-PK1-FBPase⁺ cells: a versatile in vitro model to study renal proximal tubule metabolism and function[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2014,307(1):F1-F11.
- [13]Lee D, Choi YO, Kim KH, et al. Protective effect of α -mangostin against iodoxanol-induced apoptotic damage in LLC-PK1 cells[J]. Bioorg Med Chem Lett,2016,26(15):3806-9.
- [14]汪艳,肖媛,刘伟,等. 流式细胞仪检测高等植物细胞核 DNA 含量的方法[J]. 植物科学学报,2015,33(01):126-131.
- [15]吴建勇,赵德璋. 流式细胞仪检测细胞凋亡的几种方法的比较[J]. 重庆医科大学学报,2010,35(09):1386-1389.
- [16]颜焯,李玉玲,赵日升,等. 人参皂甙对急性肾衰大鼠的肾保护作用与外周肾小管上皮细胞氮能机制[J]. 大连医科大学学报,2009,31(04):279-282.
- [17]焦今文,赵新卫,邓博雅,等. p38 ~ (MAPK) 对卵巢癌顺铂耐药作用及机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志,2012,19(16):1221-1226.
- [18]孙家跃. 顺铂肾毒性机制及防护方法的研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析,2010,10(05):478-480.
- [19]Stallone G, Di PS, Schena A, et al. Early withdrawal of cyclosporine A improves 1-year kidney graft structure and function in sirolimus-treated patients[J]. Transplantation,2003,75(7):998-1003.
- [20]焦今文,赵新卫,邓博雅,等. p38 ~ (MAPK) 对卵巢癌顺铂耐药作用及机制的探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志,2012,19(16):1221-1226.
- [21]查全斌,张华,唐金海,等. 紫杉醇顺铂对 HCC1937 人乳腺癌细胞 MAPK 信号通路影响[J]. 中国肿瘤临床,2012,39(19):1397-1400.
- [22]邢奋丽,唐辉,邓毅,等. 顺铂导致螺旋神经节细胞凋亡中 pp38MAPK 和 pERK 信号蛋白的作用[J]. 听力学及言语疾病杂志,2014,22(4):399-402.
- [23]查全斌,张华,唐金海,等. 紫杉醇顺铂对 HCC1937 人乳腺癌细胞 MAPK 信号通路影响[J]. 中国肿瘤临床,2012,39(19):1397-1400.
- [24]罗景慧,杨迎暴,安田日出夫,等. N-乙酰半胱氨酸影响 p38 有丝分裂原活化蛋白激酶对顺铂诱导急性肾损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报,2011,27(2):229-233.

(2017-11-03 收稿 责任编辑:杨觉雄)