

JNK 信号传导通路在赭曲毒素 A 体外诱导人肾小管上皮细胞凋亡中的作用

李增宁, 邢凌霄, 崔晋峰, 申海涛, 丁 涛, 严 霞, 王俊灵, 张祥宏*
(河北医科大学病理学研究室, 河北 石家庄 050017)

摘要:目的 探讨赭曲毒素 A(OA) 诱导人肾小管上皮细胞(HKC) 凋亡的作用机制。方法 体外培养 HKC, 随机分为空白对照组、溶剂(0.04% 乙醇)对照组、OA $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组及 c-Jun 氨基端激酶(JNK) 阻断剂 SP600125 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 预处理 + OA 组。细胞处理 24 h 后, 分别采用流式细胞仪检测细胞的凋亡率, 免疫细胞化学染色和 Western 蛋白印迹法检测凋亡相关蛋白天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶(caspase)3 蛋白的表达以及 JNK 的磷酸化水平(p-JNK)。结果 OA 组细胞凋亡率明显高于溶剂对照组[(4.24 ± 0.17)% vs (1.06 ± 0.14)%], SP600125 预处理 + OA 组 HKC 凋亡率[(2.44 ± 0.38)%] 明显低于 OA 组。OA 组 caspase 3 蛋白的表达和 p-JNK 水平明显升高, SP600125 预处理 + OA 组 caspase 3 蛋白的表达和 p-JNK 水平较 OA 组明显降低。结论 OA 可能通过激活 JNK, 上调 caspase 3 蛋白的表达而诱导 HKC 凋亡。

关键词: 赭曲毒素 A; c-Jun 氨基端激酶; 细胞凋亡; 信号传导; 丝裂原激活蛋白激酶类; 细胞, 培养的

中图分类号: R99

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2008)04-0291-05

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2008.04.008

赭曲毒素 A(ochratoxin A, OA) 是自然界中的一种真菌毒素, 主要由赭孢类和青霉属的某些菌株产生, 广泛存在于谷物和食品中^[1-2]。1993年

国际癌症研究中心将 OA 列为可能的人类致癌物。研究发现, 我国部分地区居民 OA 的日暴露量明显高于国际标准^[3]。许多报道显示, OA 有广泛的细胞毒性作用, 肾脏是其主要的靶器官。目前, 有关 OA 肾毒性机制的研究多集中在 OA 和 DNA 形成 DNA 加合物以及 OA 抑制线粒体的氧化呼吸链方面, 而对于其诱导细胞凋亡机制的研究较少。本研究通过体外培养人肾小管上皮细胞(human kidney tubular epithelial cells, HKC), 采用流式细胞定量检测技术、免疫细胞化学染色和 Western 蛋白印迹法观察 HKC 凋亡率、天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶(caspase)3 蛋白的表达以及 c-Jun 氨基端激酶(c-Jun NH₂ terminal kinase, JNK)的磷酸化水平(p-JNK), 探讨 JNK 信号传导通路在 OA 致 HKC 凋亡中的作用。

1 材料与方 法

1.1 细胞和试剂

HKC 为解放军总医院陈香美教授惠赠; 小鼠抗人 p-JNK 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司); 小鼠抗人 caspase 3 单克隆抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 抗体(北京中山试剂公司); OA 购自德国 Alfa 公司, 乙醇溶解, 生理盐水稀释成终浓度为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的工作液, 乙醇终浓度为 0.04%, 4℃ 保存; 特异性 JNK 阻断剂 SP600125(美国 Sigma 公司), 二甲亚砜溶解, 4℃ 保存, 临用时稀释至终浓度为 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.2 实验分组和处理

选择对数生长期的 HKC(传代 24 h 后)随机分为空白(生理盐水)对照组、溶剂(0.04% 乙醇)对照组、OA $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组和 SP600125 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 预处理 30 min + OA $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组。继续培养 24 h 后收集细胞进行检测。

1.3 流式细胞仪检测 HKC 凋亡率

按文献^[4]方法离心收集 HKC, 于 70% 乙醇固

来稿日期: 2007-12-11 接受日期: 2008-03-28

基金项目: 河北省自然科学基金项目(C2006000832)

作者简介: 李增宁(1969-), 男, 河北省石家庄市人, 医学博士, 主要从事营养与食品卫生学研究; 张祥宏(1957-), 男, 河北省石家庄市人, 教授, 主要从事肿瘤病因与肿瘤病理研究。

* 联系作者 E-mail: zhangxianghong2008@163.com
Tel: (0311)86265561

定, PBS 洗涤, 调整细胞密度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 溴化乙啶染色。用 Epics-XL II 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司)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。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 公司的相应软件程序进行数据处理。

1.4 免疫细胞化学方法检测 caspase 3 的表达和 p-JNK 的水平

取 HKC, 消化, 按每孔 1×10^4 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。以细胞浆内出现棕黄色颗粒为 caspase 3 免疫阳性的判定标准, 以胞浆及胞核内出现棕黄色颗粒为 p-JNK 免疫阳性的判定标准。在 3~4 张爬片中随机选取 10 个高倍视野, 计数每个视野阳性细胞百分数(阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$), 取平均值。

1.5 Western 蛋白印迹法测定 caspase 3 的表达和 p-JNK 的水平

将收集的细胞用 PBS 洗涤, 加入预冷的细胞总蛋白裂解液, 提取细胞总蛋白, 考马斯亮蓝方法蛋白定量。经 15% SDS-PAGE, 电转移于 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶封闭过夜。小鼠抗人 p-JNK 或 caspase 3 单克隆抗体(1:100)37°C 孵育 4 h, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体(1:2000)37°C 孵育 2 h, DAB 显色。Snygene 全自动凝胶成像分析系统分析 caspase 3 的表达以及 p-JNK 的水平。

1.6 统计学处理

结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS12.0 统计软

件进行多组均数间比较, 方差齐性检验后进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 赭曲毒素 A 对 HKC 凋亡率的影响

图 1 结果显示, 与空白对照组的凋亡率($0.98 \pm 0.05\%$)和溶剂对照组的凋亡率($1.06 \pm 0.14\%$)相比, OA 处理组 HKC 凋亡率明显增高[($4.24 \pm 0.17\%$), $n=3$, $P<0.05$]。SP600125 预处理 + OA 组 HKC 的凋亡率为($2.44 \pm 0.38\%$), 高于空白对照组和溶剂对照组($P<0.05$), 但较 OA 组有所降低($P<0.05$)。提示 OA 促进 HKC 凋亡, SP600125 预处理可以部分抑制 OA 引起的 HKC 凋亡。

2.2 赭曲毒素 A 对 HKC caspase 3 蛋白表达的影响

免疫细胞化学检测结果显示, OA 处理组细胞 caspase 3 蛋白阳性表达率较溶剂对照组明显增加, SP600125 预处理 + OA 组细胞 caspase 3 蛋白阳性表达率高于溶剂对照组, 但较 OA 处理组有所降低(图 2)。Western 蛋白印迹检测结果显示, 各组在 32 ku 位置均出现了 caspase 3 蛋白免疫反应阳性条带。定量分析表明, OA 处理组 caspase 3 蛋白表达高于溶剂对照组, 而 SP600125 预处理 + OA 组 caspase 3 蛋白的相对含量低于 OA 处理组(图 3)。提示, OA 处理可以促进体外培养 HKC 中 caspase 3 的表达, 而 SP600125 可以部分抑制 OA 引起的 caspase 3 表达。

2.3 赭曲毒素 A 对 HKC JNK 磷酸化的影响

免疫细胞化学检测结果显示(图 4), OA 处理组细胞 p-JNK 水平高于溶剂对照组, 而 SP600125 预处理 + OA 组细胞 p-JNK 水平低于 OA 处理组。Western 蛋白印迹结果显示(图 5), SP600125 预处理后

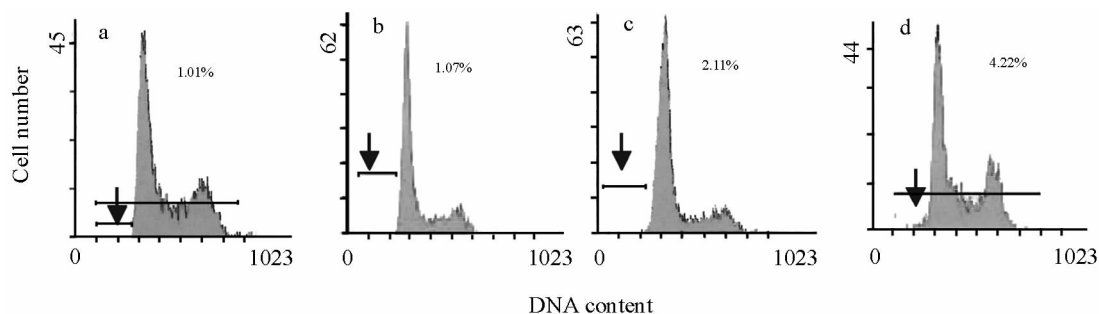


Fig 1. Effect of ochratoxin A (OA) on apoptosis rates of human kidney tubular epithelial cells (HKC). HKC were exposed to $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ OA for 24 h with or without SP600125 pretreatment for 30 min. a: Control group; b: solvent (0.04% ethanol) group; c: SP600125 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + OA group; d: OA $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ group. ↓: Subdiploid apoptosis peak.

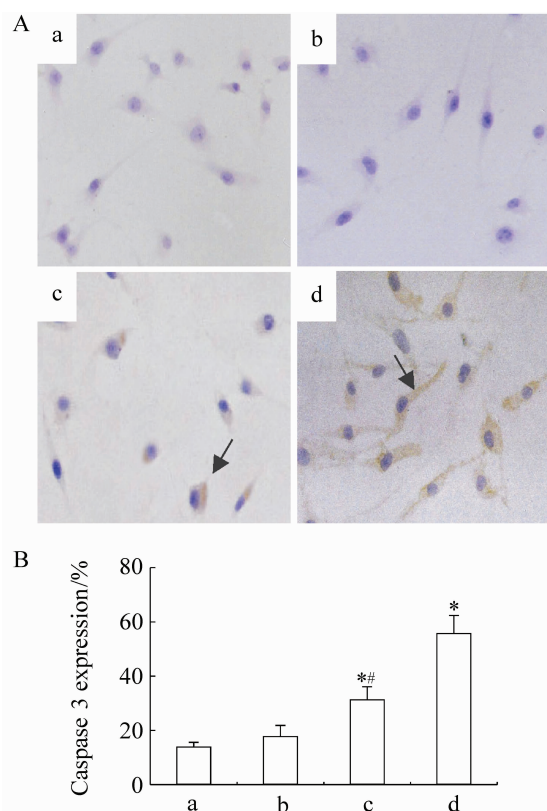


Fig 2. Effect of OA on caspase 3 expression in HKC analyzed by immunocytochemical staining. A: typical immunocytochemical staining result ($\times 400$). \uparrow : The brown granules were located in the cytoplasm as caspase 3 positive expression. B: the quantitation of caspase 3 expression. Positive rate in 1 field was calculated as the number of positive cells/total number of cells $\times 100\%$. a: Control group; b: solvent group; c: SP600125 + OA group; d: OA group. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$ (10 high-power fields in 3 to 4 pieces of slices). ^{*} $P < 0.05$, compared with solvent group; ^{##} $P < 0.05$, compared with OA group.

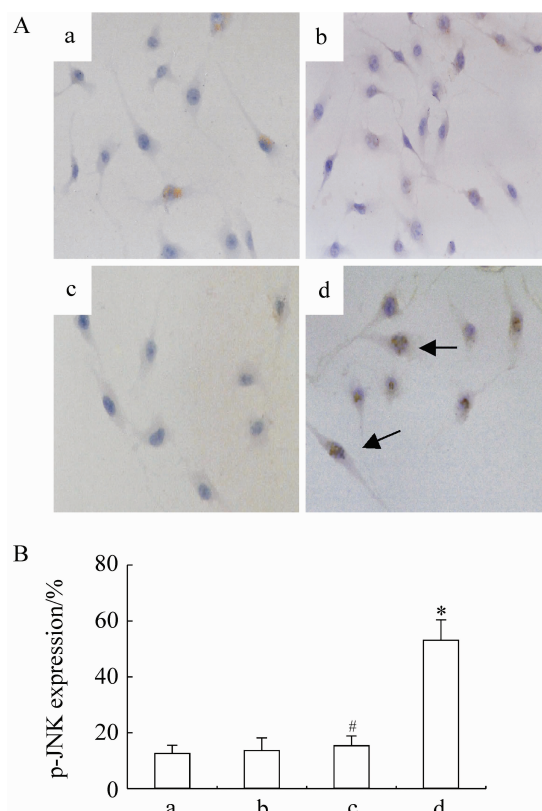


Fig 4. Effect of OA on phospho-c-Jun NH₂ terminal kinase (p-JNK) expression in HKC analyzed by immunocytochemical staining. A: typical immunocytochemical staining result ($\times 400$). \uparrow : The brown granules were located in the cytoplasm and nucleus as p-JNK expression. B: the quantitation of p-JNK expression. Positive rate in 1 field was calculated as the number of positive cells/total number of cells $\times 100\%$. a: Control group; b: solvent group; c: SP600125 + OA group; d: OA group. $\bar{x} \pm s$, $n = 10$ (10 high-power fields in 3 to 4 pieces of slices). ^{*} $P < 0.05$, compared with solvent group; [#] $P < 0.05$, compared with OA group.

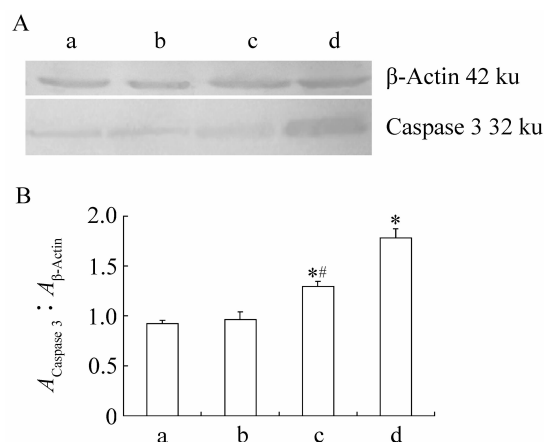


Fig 3. Effect of OA on caspase 3 expression in HKC analyzed by Western blot. A: typical Western blot. B: semi-quantitated result of Fig A. a: Control group; b: solvent group; c: SP600125 + OA group; d: OA group. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. ^{*} $P < 0.05$, compared with solvent group; ^{##} $P < 0.05$, compared with OA group.

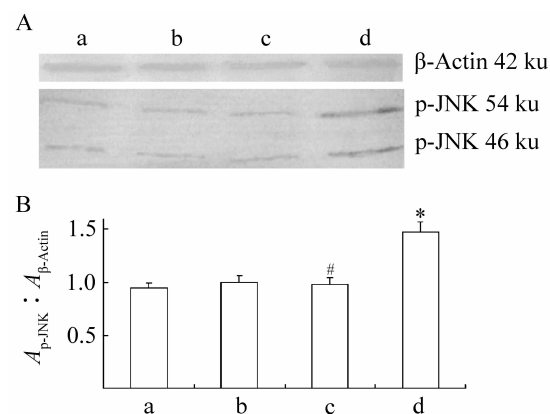


Fig 5. Effect of OA on p-JNK expression in HKC by Western blot. A: typical Western blot. B: ratio of relative density of p-JNK bands to β -actin. a: Control group; b: solvent group; c: SP600125 + OA group; d: OA group. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. ^{*} $P < 0.05$, compared with solvent group; [#] $P < 0.05$, compared with OA group.

p-JNK水平低于 OA 处理组。结果表明, OA 处理 HKC 可以激活 JNK, 使 p-JNK 水平增加。

3 讨论

OA 在自然界中广泛存在, 其肾脏毒性与严重肾脏疾病的发生发展密切相关。短期动物实验结果表明, OA 可引起肾小管萎缩、坏死、间质纤维化和肾小球透明变性^[5]; 长期动物实验结果表明, OA 可以引起肾脏肿瘤的发生^[6]。所以, 探讨其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。

细胞凋亡是生命活动过程中不可缺少的组成部分, 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。本研究结果表明, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ OA 处理 24 h 可以使体外培养的 HKC 凋亡率增加, 并见 caspase 3 蛋白表达增强。提示 OA 是通过 caspase 3 启动 HKC 凋亡。这与 Assaf 等^[7]报道的 OA 对体外培养人淋巴细胞凋亡影响的结果相一致。

JNK 家族是丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 超家族成员之一, 以 JNK 为中心的 JNK 信号传导通路可被多种因素激活。大量研究证实, JNK 激活可促进或引起细胞凋亡^[8-9], 特异地阻断 JNK 激活则可抑制细胞凋亡^[10]。有研究认为, 一些真菌毒素如伏马菌素 (fumonisin) B₁^[11]、沙曲毒素类 (satratoxins)^[12] 等都可以通过激活 JNK 信号传导通路诱导细胞的凋亡。已有报道, JNK 在促使 c-Jun 磷酸化后可激活凋亡相关蛋白激酶 caspase 家族的级联反应, 启动细胞凋亡^[13]。因此作者推测, JNK 信号传导通路可能会在 OA 致 HKC 凋亡中起作用。本研究表明, OA 使 HKC 的 JNK 活性增强; 而应用特异性 JNK 阻断剂 SP600125 预处理则明显抑制 JNK 的活化。这提示, OA 可以激活 JNK 信号传导通路。本研究还发现, SP600125 预处理在一定程度上抑制了 OA 诱导的 HKC 凋亡和 caspase 3 蛋白表达, 表明 OA 可通过活化 JNK 而激活 caspase 3, 进而诱导 HKC 凋亡。但值得注意的是, SP600125 预处理只能部分抑制 OA 诱导的 HKC 凋亡, 这可能是由于在 JNK 信号传导通路之外还有其他并行的信号通路参与凋亡的诱导, 这有待于进一步研究。

综合以上结果, OA 可以诱导 HKC 凋亡, 其机制

可能与激活 JNK, 进而上调 caspase 3 蛋白的表达有关。

4 参考文献:

- [1] Walker R. Risk assessment of ochratoxin: current views of the European Scientific Committee on Food, the JECFA and the Codex Committee on Food Additives and Contaminants [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2002, **504**: 249 - 255.
- [2] O'Brien E, Dietrich DR. Ochratoxin A: the continuing enigma [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2005, **35**(1): 33 - 60.
- [3] Li ZN, Kang WJ, Zhang XH, Tan DF, Wang JL, Cui JF. Determination on ochratoxin A in Chicheng of barley by reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Prev Med* (中华预防医学杂志), 2006, **40**: 359 - 361.
- [4] Zuo LF. *Flow Cytometry: Technology of Sample Preparation* (流式细胞术样品制备技术) [M] // Beijing: Huaxia Publishing House, 1991: 14 - 19.
- [5] Gagliano N, Torri C, Donetti E, Grizzi F, Costa F, Bertelli AA, et al. Ochratoxin A-induced renal cortex fibrosis and epithelial-to-mesenchymal transition: molecular mechanisms of ochratoxin A-injury and potential effects of red wine [J]. *Mol Med*, 2005, **11**(1 - 12): 30 - 38.
- [6] Marin-Kuan M, Nestler S, Verguet C, Bezençon C, Piguet D, Mansourian R, et al. A toxicogenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of ochratoxin a carcinogenicity in rat [J]. *Toxicol Sci*, 2006, **89**(1): 120 - 134.
- [7] Assaf H, Azouri H, Pallardy M. Ochratoxin A induces apoptosis in human lymphocytes through down regulation of Bcl-xL [J]. *Toxicol Sci*, 2004, **79**(2): 335 - 344.
- [8] Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway [J]. *Science*, 2000, **288**(5467): 870 - 874.
- [9] Tournier C, Dong C, Turner TK, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ. MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines [J]. *Genes Dev*, 2001, **15**(11): 1419 - 1426.
- [10] Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and-independent mechanisms [J]. *Science*, 1999, **286**

- (5443):1358-1362.
- [11] Sharma N, Suzuki H, He Q, Sharma RP. Tumor necrosis factor alpha-mediated activation of c-Jun NH₂-terminal kinase as a mechanism for fumonisin B₁ induced apoptosis in murine primary hepatocytes [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2005, **19**(6):359-367.
- [12] Yang GH, Jarvis BB, Chung YJ, Pestka JJ. Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins; relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, **164**(2):149-160.
- [13] Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases[J]. *Cell*, 2000, **103**(2):239-252.

Role of JNK signal transduction pathway on apoptosis of human kidney tubular epithelial cells induced by ochratoxin A *in vitro*

LI Zeng-Ning, XING Ling-Xiao, CUI Jin-Feng, SHEN Hai-Tao, DING Tao,
YAN Xia, WANG Jun-Ling, ZHANG Xiang-Hong*

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

Abstract: AIM To explore the role of c-Jun NH₂ terminal kinase (JNK) signal transduction pathway on ochratoxin A (OA) inducing apoptosis of human kidney tubular epithelial cells (HKC) *in vitro*. **METHODS** HKC were incubated with saline, solvent (0.04% ethanol), 1 μmol·L⁻¹ OA and JNK inhibitor SP600125 (0.5 μmol·L⁻¹) + OA, respectively, for 24 h. The apoptosis rate, the expression of caspase 3 and level of p-JNK of HKC were detected by flow cytometry, immunocytochemical staining and Western blot, respectively. **RESULTS** After OA treatment, the apoptosis rate was higher than that in solvent group [(4.24 ± 0.17)% vs (1.06 ± 0.14)%]. Pretreatment with SP600125 for 30 min decreased the apoptosis rate [(2.44 ± 0.38)%].

The expressions of caspase 3 and level of p-JNK in OA group were higher than that in solvent group, while both were lower in SP600125 + OA group than that in OA group. **CONCLUSION** The possible mechanism of apoptosis of HKC after OA treatment may be related with the activation of JNK and increasing the expression of caspase 3.

Key words: ochratoxin A; c-Jun NH₂ terminal kinase; apoptosis; signal transduction; mitogen-activated protein kinases; cells, cultured

Foundation item: The project supported by Natural Science Foundation of Hebei Province (C2006000832)

* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)