

基础研究

五味子乙素对H₂O₂损伤人肝细胞Fas通路的影响蔡晶¹,黄巧冰²,迟德彪³南方医科大学¹南方医院药材科,²基础医学院,³药学院,广东 广州 510515

摘要:目的 建立H₂O₂诱导氧化的L02人肝细胞模型,从细胞凋亡调控因子FAS、具有死亡功能区的Fas相关蛋白(fas associated death domain protein, FADD)和Caspase-8的表达变化来研究五味子乙素(Sch B)对L02细胞的可能作用机制。方法 用实时荧光定量PCR法检测FAS、FADD和Caspase-8 mRNA的变化,流式细胞术检测细胞凋亡率,ELISA法检测FAS蛋白含量,Western blotting检测FADD蛋白变化和分光光度法检测Caspase-8活性。结果 在5~15 μmol/L剂量范围内,Sch B可剂量依赖性抑制H₂O₂引起的FAS、FADD的表达和Caspase-8的活化。结论 Sch B可部分抑制H₂O₂诱导的L02细胞凋亡,其作用机制可能是通过影响了FAS-FADD-Caspase-8通路。

关键词:五味子乙素;L02细胞;凋亡相关分子Fas;Fas相关死亡结构域蛋白;半胱氨酸蛋白酶-8

中图分类号:R931 文献标志码:A 文章编号:1673-4254(2012)04-0583-03

doi: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.04.033 <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1627.R.20120407.1711.003.html>

Effect of schisandrin B on H₂O₂-induced apoptosis of human hepatocytes *in vitro*: role of Fas pathwayCAI Jing¹, HUANG Qiaobing², CHI Debiao³Department of Pharmacy, Nanfang Hospital¹, School of Basic Medical Sciences², School of Pharmaceutical Sciences³, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the role of Fas pathway in H₂O₂-induced apoptosis of L02 human hepatocytes and the effect of schisandrin B on Fas pathway. **Methods** Real-time quantitative PCR was used to detect the expressions of FAS, fas associated death domain protein (FADD) and caspase-8 mRNA in L02 cells exposed to H₂O₂. Flow cytometry was employed to assess the cell apoptosis. ELISA, Western blotting and spectrophotometric assay were performed to determine the expressions of FAS protein, FADD protein and caspase-8 activity. **Results** Within the dose range of 5-15 mol/L, schisandrin B dose-dependently inhibited FAS and FADD expressions and caspase-8 activation. **Conclusion** Schisandrin B can partially inhibit H₂O₂-induced L02 cell apoptosis possibly by affecting the FAS-FADD-caspase-8 pathway.

Key words: schisandrin B; L02; FAS; fas associated death domain protein; caspase-8

氧化应激在正常机体内即存在,通常机体内有一系列的保护机制来保护细胞免受损伤,但多种有害刺激也可以打破氧化应激的平衡状态,最终导致细胞凋亡、病理损伤等。在氧化应激等因素的诱导下,细胞基因表达变化和各种酶的活性改变是通过多种信号通路相互影响而致^[1]。其中,具有死亡功能区的Fas相关蛋白(fas associated death domain protein, FADD)是多种死亡受体诱导的细胞凋亡信号传导通路的中间环节,也是一些死亡受体如TNF受体超家族成员Fas介导凋亡的必需蛋白。Fas、FADD、Caspase-8等均是介导凋亡的重要因子。因此,本研究采用H₂O₂制得肝细胞氧化应激模型,通过观察肝组织中FADD及其介导的信号转导通路相

关标志物以及细胞凋亡率的表达情况,探讨FADD及相关分子在Sch B对被氧化的肝细胞Fas通路的影响作用。

1 试剂与细胞

1.1 试剂

Sch B,购自中国药品生物制品检定所。DMEM培养基,Gibco;胎牛血清,杭州市四季青生物工程材料有限公司,特级,无支原体;Hepes:25 g/瓶,纯度99%,FARCO化学品供应公司,进口分装,香港;胰蛋白酶(Sigma,美国);二甲基亚砜(DMSO),Sigma;Trizol,(Invitrogen,美国);RNA酶抑制剂,大连宝生物工程有限公司;逆转录酶XL(AMV),大连宝生物工程有限公司;RT-PCR引物,上海英骏生物技术公司合成;Taq酶、dNTP,北京鼎国生物技术有限责任公司;oligo(dT)18, GeneCopoeia™,美国;琼脂糖,上海YITO生物器材企业有限公司;溴化乙锭,上海博彩生物工程公司产品;荧光探针PI,Molecular Probes Ins,美国。人凋亡相关因

收稿日期:2012-01-02

基金项目:广东省高等学校科技创新团队(06CXTD003)

作者简介:蔡晶,博士,药师,E-mail: wantoflyinsky@gmail.com

通讯作者:迟德彪,博士,副教授,电话:020-61648487, E-mail: chidb666@fimmu.com

子(FAS/CD95) ELISA 酶免试剂盒,上海研域;兔抗人 Fas死亡结构域相关蛋白抗体,HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体,上海丽臣生物公司;Caspase-8 活性检测试剂盒,南京碧波公司,其余试剂均为分析纯级。

1.2 细胞

L02,人肝细胞株,购自上海细胞所。

2 方法

2.1 H₂O₂诱导肝细胞损伤的作用模型的建立与实验分组

参照文献方法^[2],取对数生长期人肝 L02 细胞,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,调整细胞密度为 5×10^5 /ml,将细胞悬液加入 96 孔和 6 孔培养板中,置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养至细胞全部贴壁,供试验用。根据以往实验结果,设 H₂O₂ 模型组(终浓度为 0.4 mmol/L)、Sch B 高浓度组, Sch B 中浓度组, Sch B 低浓度组,终浓度分别为 15、10、5 μmol/L,每组设 6 个复孔。高、中、低浓度组分别加入 H₂O₂(终浓度为 0.4 mmol/L)和相应浓度的 Sch B,共同培养 6 h 后,收集培养上清,检测 FAS、FADD 和 Caspase-8 mRNA 量、蛋白含量和四组凋亡率。

2.2 流式细胞术检测细胞凋亡率

以细胞刮刮下细胞后离心收集。收集细胞沉淀用预冷的 PBS 洗涤 2 次,细胞沉淀用 70%在 -20 °C 预冷的乙醇固定,置于 4 °C 冰箱冷藏保存 24 h;固定后的细胞再次用含 1%新生牛血清的 PBS 洗涤 2 次,弃上清,加入 0.4 ml PBS 和 RNase A 至终浓度 100 μg/ml, 37 °C 水浴温育 1 h;加入碘化丙啶至终浓度 50 μg/ml,摇匀,4 °C 避光孵育 1 h。将细胞经 100 目尼龙网过滤至流式细胞术专用塑料管中,置于流式细胞仪测定各处理组细胞凋亡率。

2.3 RT-PCR 检测 FAS、FADD 和 Caspase-8 mRNA

将细胞按 2×10^5 的密度接种于 6 孔板培养,一共分为 4 组,包括 H₂O₂ 模型组、Sch B 高剂量组、Sch B 中剂量组和 Sch B 低剂量组,1 孔/组。最后同时开始提取各组细胞的总 RNA。实验重复 3 次。

反应条件为:1×(95 °C, 3 min), 45×(95 °C, 10 s); 55 °C 25 s; 72 °C, 10 s), 1×(95 °C, 1 min), 1×(55 °C, 35 s), 1×(95 °C, 35 s),产物由 Mx3005P[®] QPCR System 分析。所有引物序列来源于 NCBI,以 Oligo 6.44 和 Primer premier 5.0 自行设计。

GAPDH NC_000012

Upper primer:5'-TGGCACCGTCAAGGCTGAGA-3'

Lower primer:5'-CACTCACTCCTGGAAGATGG-3'

PCR product length: 73 bp

FAS NG_027966

Upper primer:5'-TCCAAAAGTGTTAATGCC-3'

Lower primer:5'-TCCCTTGAGTTGATGTCAGT-3'

PCR product length:45 bp

FADD NG_027966

Upper primer:5'-AACTCAGACGCATCTACCTCC-3'

Lower primer:5'-ACTCCGGTGCCTGATTCACTA-3'

PCR product length: 79 bp

Caspase 8 NG_007497.1

Upper primer:5'-GCCTCCCTCAAGTTCCT-3'

Lower primer:5'-CCTGGAGTCTCTGGAATAACA-3'

PCR product length: 91 bp

结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 来表示(ΔCt 为目的基因 Ct 值减去 GAPDH 的 Ct 值, $\Delta\Delta Ct$ 为用药组的 Ct 值减去对照组的 Ct 值)实验重复 3 次,取其平均值半定量最后的表达水平。

2.4 ELISA 法检测 FAS 蛋白含量

将细胞按 2×10^5 的密度接种于 96 孔板中培养,一共分为 4 组,包括 H₂O₂ 模型组、Sch B 高剂量组、Sch B 中剂量组和 Sch B 低剂量组,每组 3 孔。按照说明书操作,通过酶标仪($\lambda=450$ nm)测定其吸光值,考察 FAS 蛋白的含量。

2.5 Western blotting 检测 FADD 蛋白

将细胞按 2×10^5 的密度接种于 6 孔板中培养,一共分为 4 组,包括 H₂O₂ 模型组、Sch B 高剂量组、Sch B 中剂量组和 Sch B 低剂量组,每组 1 孔。最后同时开始提取各组细胞的蛋白。实验重复 3 次。

2.6 分光光度法检测 Caspase-8 活性

分组同 2.4。按照说明书操作,通过酶标仪 D_{405 nm} 测定其吸光值,考察 Caspase-8 的活化程度。

2.7 数据统计方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件经方差齐性检验后行独立样本 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学显著差异。

3 结果

3.1 Sch B 处理对肝细胞凋亡率的影响

高、中、低 3 个剂量组的 Sch B 分别与细胞共同孵育后,凋亡率分别为 $(21.40 \pm 0.56)\%$ 、 $(25.50 \pm 1.60)\%$ 和 $(26.53 \pm 1.29)\%$,与 H₂O₂ 模型组凋亡率 $(36.17 \pm 0.70)\%$ 相比,细胞凋亡率均有所下降,且剂量越高,细胞凋亡率越低($P < 0.01$),这种干预作用越明显,提示 Sch B 的存在可能影响了被 H₂O₂ 损伤的肝细胞凋亡状况。

3.2 Sch B 处理对肝细胞 FAS、FADD 和 Caspase-8 mRNA 的影响

在表 1 中显示,在给与不同浓度的 Sch B 处理后,各组 FAS、FADD、Caspase-8 mRNA 相对表达量均存在显著性差异。结果表明,在 H₂O₂ 氧化的 L02 细胞中,不同浓度的 Sch B 可以降低上述 3 种基因的相对表达量,且呈一定的剂量依赖性。当 Sch B 处理浓度为 5、10、15 μmol/L

时,三者表达量以15 μmol/L处理浓度下的表达量为最低。

表1 Sch B处理对FAS、FADD和Caspase-8 mRNA的影响

Tab.1 Effect of schisandrin B on FAS/FADD/caspase-8 mRNA expressions (Mean±SD, n=3)

组别	FAS	FADD	Caspase-8
模型组	1.17±0.15	1.21±0.06	1.21±0.06
高浓度组	1.37±0.21**	1.43±0.31**	1.45±0.10**
中浓度组	1.35±0.20**	1.37±0.35**	1.39±0.20**
低浓度组	1.30±0.36**	1.33±0.10**	1.34±0.21**

与模型组比较, **P<0.01

3.3 Sch B处理对肝细胞FAS含量的影响

与模型组D_{450 nm}相比(2.09±0.12), Sch B高中低3个剂量的处理组D_{450 nm}均有所降低,分别为1.07±0.03(P<0.01)、1.56±0.07(P<0.01)、1.72±0.09(P<0.05),且随着剂量的增加而降低得更为明显。提示Sch B可能对FAS产生了一定的影响,且这个影响作用可能与Sch B的浓度有一定的关系。

3.4 Sch B处理对肝细胞FADD蛋白的影响

图1中显示,经过缺氧处理后的L02细胞与不同剂量的Sch B共同孵育后,FADD的表达量较模型组降低。在4个实验组中,Sch B高剂量FADD的表达量最低,模型组的FADD表达量最高。

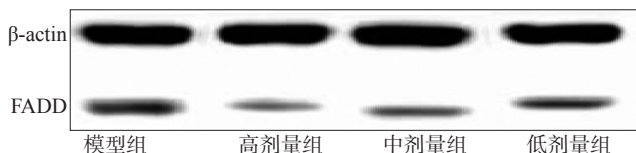


图1 Western Blotting检测肝细胞FADD蛋白的表达

Fig.1 Expression of FADD protein detected by Western blotting.

3.5 Sch B处理对肝细胞Caspase-8的影响

在给与了15、10、5 μmol/L Sch B的处理之后,细胞Caspase-8蛋白活力所对应的D_{450 nm}值随着剂量的变化而变化。模型组D_{450 nm}为1.51±0.09,与之相比,Sch B处理组均有所下降,低剂量组为1.28±0.03(P<0.01),中、高剂量组分别为1.13±0.07(P<0.05)和0.99±0.05(P<0.05),差异有统计学意义。

4 讨论

细胞凋亡在机体生长发育和衰老等许多生理病理过程中有着重要作用。许多疾病都与氧化应激有关,比如原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性甲状腺疾病、I型糖尿病等,外源性化学物质、电离辐射、病毒感染和氧化性损伤等因素均可触发凋亡^[3]。肝细胞凋亡是各种急性或慢性肝脏疾病发生发展的重要环节,过度的凋亡被证

实参与了病毒性肝炎、酒精性肝病和非酒精性肝病等诸多肝脏疾病的发生发展过程^[4-5]。

细胞内凋亡信号转导通路其中之一就是死亡受体信号通路。死亡受体是一类跨膜蛋白,属肿瘤坏死因子受体基因家族成员,包括Fas、TNFR、DR3-5等,其中最典型的Fas^[6]。死亡受体的配体与受体结合后,受体相互聚集,与细胞内的转接器蛋白FADD相互作用,FADD募集Caspase-8的活化,启动细胞的凋亡^[7]。

Sch B是五味子药用成分木脂素的高纯度活性成分之一,除了保肝降酶的作用外,还具有诱导肿瘤细胞凋亡、抗血小板活化因子等作用^[8-10]。在前期的实验中我们发现,Sch B可以降低H₂O₂对肝细胞的损伤,但是我们并不明确Sch B是通过什么方式来对细胞起到保护作用的。为了进一步了解Sch B对氧化损伤L02细胞的作用机制,因此我们选择了肝细胞膜表面数量占优势的Fas受体作为Sch B可能的作用点来进行本次试验研究。我们采用H₂O₂处理L02细胞制得氧化应激模型,应用实时荧光定量PCR法检测FAS、FADD和Caspase-8 mRNA的变化,流式细胞术检测细胞凋亡率,ELISA法检测FAS蛋白含量,Western blotting检测FADD蛋白变化和分光光度法检测Caspase-8活性,通过观察肝组织中Fas、FADD及其介导的信号转导通路相关标志物Caspase-8以及细胞凋亡率的表达情况,探讨Sch B对Fas通路相关分子的影响作用。

实验结果显示,5~15 μmol/L Sch B与H₂O₂处理过的L02细胞共同培养后,可使细胞Fas、FADD、Caspase-8表达量降低(P<0.01),且细胞凋亡率也相应降低(P<0.01),此外,这些指标的变化与Sch B的浓度有一定的剂量依赖关系。因此我们推测FAS-FADD-Caspase-8通路可能是5~15 μmol/L浓度范围内的Sch B的作用位点,从而抑制了处于氧化应激状态的肝细胞的凋亡,对受到H₂O₂氧化损伤的肝细胞显示出一定的保护效应。这一结果,对Sch B保肝护肝作用提供了依据。

参考文献:

- [1] Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress[J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9(1): 49-89.
- [2] Ikeyama S, Kusumoto K, Miyake H, et al. A non-toxic heat shock protein 70 inducer, geranylgeranylacetone, suppresses apoptosis of cultured rat hepatocytes caused by hydrogen peroxide and ethanol[J]. J Hepatology, 2001, 35(1): 53-61.
- [3] 杨莉莉,李明. 凋亡细胞清除障碍与自身免疫性疾病[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2011, 5(23): 7046-48.
- [4] Bortolami M, Kotsafti A, Cardin R, et al. Fas / FasL system, IL-1beta expression and apoptosis in chronic HBV and HCV liver disease[J]. J Viral Hepat, 2008, 15(7): 515-22.

(下转592页)

- transforming growth factor-beta1-mediated growth suppression[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(2): 490-9.
- [9] 周明玉. TGF- β 1 刺激肝星状细胞的活化与肝纤维化的研究进展[J]. *贵州医药*, 2008, 32(8): 751-3.
- [10] Flisiak R, Pytel-Krolczuk B, Prokopowicz D. Circulating transforming growth factor beta(1) as an indicator of hepatic function impairment in liver cirrhosis[J]. *Cytokine*, 2000, 12(6): 677-81.
- [11] 罗瑞虹. 转化生长因子 β_1 与肝纤维化[J]. *国外医学:内科分册*, 2000, 27(10): 348-50.
- [12] 孙丽娟, 曹慧玲, 王玉梅, 等. 肝病患者血清TGF- β 1检测的临床意义[J]. *放射免疫学杂志*, 2006, 19(4): 3.
- [13] Deng CL, Song XW, Liang HJ, et al. Chronic hepatitis B serum promotes apoptotic damage in human renal tubular cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(11): 1752-6.
- [14] 廖山婴, 王启仪, 陈惠新. 慢性乙型病毒性肝炎患者血清TGF水平与肝纤维化, HBV DNA载量的关系[J]. *新医学*, 2008, 39(10): 642-4.
- [15] 朱桂芬, 吕宜光, 韩光. 慢性乙型肝炎患者肝组织纤维化程度与病毒复制水平相关性[J]. *中外健康文摘*, 2007, 4(1): 51.
- [16] 李成忠, 万谟彬, 曾民德, 等. 非创伤性诊断指标优势组合对肝纤维化诊断价值的初步研究[J]. *中华肝脏病杂志*, 2001, 9(5): 261-3.
- [17] 王薇, 孙公凯, 杨世忠. 慢性乙型肝炎的现代研究进展[J]. *海南医学院学报*, 2011, 17(6): 861-4.
- [18] 马陈斌. 恩替卡韦对慢性乙肝患者血清中HBVDNA载量与TGF- β_1 的影响[D]. 遵义医学院, 2010.

(编辑:陈望忠)

(上接585页)

- [5] Colmenero J, Bataller R, Sancho-Bru P, et al. Hepatic expression of candidate genes in patients with alcoholic hepatitis: correlation with disease severity[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(2): 687-97.
- [6] Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, et al. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis[J]. *Cell*, 1995, 81(4): 505-12.
- [7] Li H, Wojtaszek JL, Greene LH. Analysis of conservation in the Fas-associated death domain protein and the importance of conserved tryptophans in structure, stability and folding [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1794(4): 583-93.
- [8] Chiu PY, Ko KM. Time-dependent enhancement in mitochondrial glutathione status and ATP generation capacity by schisandrin B treatment decreases the susceptibility of rat hearts to ischemia-reperfusion injury[J]. *Biofactors*, 2003, 19(1-2): 43-51.
- [9] 贾建军, 王自能, 刘革修, 等. 肿瘤浸润性树突状细胞在子宫内膜癌中的凋亡及其Fas、FasL表达意义[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 30(10): 1693-6.
- [10] Li L, Lu Q, Shen Y, et al. Schisandrin B enhances doxorubicin-induced apoptosis of cancer cells but not normal cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71(5): 584-95.

(编辑:陈望忠)