

棒曲霉毒素对人胚肾细胞增殖与诱导其凋亡的研究

张百刚^{1, 2}, 彭晓丽¹, 李光辉¹, 徐云凤¹, 夏效东¹

(1. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 陕西杨凌 712100)

(2. 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃兰州 730050)

摘要: 本文研究了棒曲霉毒素抑制人胚肾细胞增殖与诱导其凋亡的作用。不同浓度的棒曲霉毒素作用于人胚肾细胞 293 后, 采用乳酸脱氢酶释放检测棒曲霉毒素对细胞增殖的抑制作用。通过扫描电镜和荧光显微镜观察了细胞形态学的变化, Annexin V-EGFP/PI 标记检测细胞凋亡率, JC-1 线粒体膜电位荧光探针检测了细胞线粒体膜电位的变化。实时荧光定量 PCR 测定了线粒体相关基因 FIS1、ASL、SLC25A6、COX17 的表达水平。结果表明, 棒曲霉毒素可显著抑制人胚肾细胞 293 增殖并诱导凋亡, 具有明显的量效关系, 2.5、5、7.5、10 和 15 μM 棒曲霉毒素对人胚肾细胞 293 的抑制率分别为 8.1%、18.2%、31.0%、42.2% 和 63.1%; 5 μM 棒曲霉毒素处理 0、3、10、24 h, 细胞的存活率分别为 94.2%、78.1%、47.4%。5 μM 和 10 μM 的棒曲霉毒素处理 8h 后, 细胞凋亡率分别为 16.4% 和 20.1%。线粒体膜电位和线粒体相关基因的表达水平的变化表明棒曲霉毒素可能通过线粒体途径引起人胚肾细胞 293 凋亡。

关键词: 棒曲霉毒素; 细胞增殖; 凋亡; 人胚肾细胞

文章编号: 1673-9078(2015)3-12-17

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.003

Effects of Patulin on the Proliferation and Apoptosis of Human Embryonic Kidney Cells

ZHANG Bai-gang^{1,2}, PENG Xiao-li¹, LI Guang-hui¹, XU Yun-feng¹, XIA Xiao-dong¹

(1. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

(2. College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: To study the mechanism of patulin on the proliferation and apoptosis of human embryonic kidney cells, HEK293 cells were cultured and treated with different concentrations of patulin *in vitro*. The effect of patulin on cell proliferation level was examined by LDH cytotoxicity assay. The morphological changes in patulin-treated HEK293 cells were observed using scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. The cell apoptosis rate was detected by Annexin V-EGFP/PI double staining. The mitochondrial membrane potential was measured by a JC-1 probe. The expression levels of the mitochondrial related genes FIS1, ASL, SLC25A6, and COX17 were measured by real-time fluorescent quantitative PCR. The results showed that PAT inhibited the growth of HEK293 cells in a dose-dependent manner and resulted in apoptosis in HEK293 cells. Treatments with 2.5, 5, 7.5, 10, and 15 μM PAT for 8 h resulted in significant decreases in cell viability by 8.1%, 18.2%, 31.0%, 42.2%, and 63.1%, respectively. When treated with 5 μM patulin for 0, 3, 10, and 24 h, the cell survival rates were 94.2%, 78.1%, and 47.4%, respectively. After treatment with 5 and 10 μM PAT for 8 h, the number of apoptotic cells increased in a dose-dependent manner by 16.4% and 20.1%. The changes in the expression levels of mitochondrial membrane potential and mitochondrial genes indicate that patulin may cause HEK293 apoptosis through mitochondrial pathways.

Key words: patulin; cell proliferation; apoptosis; human embryonic kidney cells

棒曲霉毒素(patulin, 简称 PAT) 又称展青霉素, 化学

收稿日期: 2014-07-31

基金项目: 国家自然科学基金 (31201286); 中央高校基本科研创新一般项目 (2014YB021)

作者简介: 张百刚 (1981-), 男, 博士研究生, 讲师, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 彭晓丽 (1982-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 真菌毒素的细胞毒理机制; 夏效东 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食源性致病微生物

名称为 4-羟基-4H-咪唑并 (3,2-C) 吡嗪-2 (6H)-酮, 是最常见的真菌毒素之一。PAT 主要由曲霉属和青霉属等共 3 属 16 种真菌产生^[1]。PAT 主要污染水果及其制品, 尤其是腐烂的苹果、苹果汁、苹果酒、山楂、梨、番茄和山楂片等, 另外国外研究者还在蔬菜、面粉、小麦、大麦、存储奶酪、发霉的面包以及饲料中检出 PAT^[2]。动物实验表明, 棒曲霉毒素可引起急性毒性如呕吐、反胃以及肠胃紊乱。此外, PAT 还会产生遗传毒性、致癌性、胚胎毒性和神经毒性等毒性效应

[3-4]。近年来,在许多国家如美国、意大利、西班牙和德国等都有 PAT 造成苹果汁污染的报道^[5]。WHO 和美国的 FDA 对 PAT 在食品中的检测限量都定为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 欧盟和日本已经将婴儿食品中的这一标准提高到 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。然而,超过此限量仍然会产生一定的危害^[6-8]。所以,研究 PAT 的毒性作用与毒性机制,对于保护食品安全和人类健康具有意义。

一些学者研究了 PAT 对实验动物的致突变性、致癌性、发育和生殖棒曲霉素的毒性和免疫毒性^[6]。有人发现 PAT 可引起某些实验动物肾脏、肠组织和免疫系统严重受损^[9]。在某些动物实验中, PAT 还表现出诱变性和潜在的致癌和致畸作用^[10]。但由于 PAT 对人的致癌性证据不足, PAT 被国际癌症研究机构归为 3 类物质。

即使 PAT 的对人类的遗传毒性尚未得到确切的评估,长期摄入含有低剂量 PAT 的食品也可能产生严重的问题。目前,对棒曲霉素的研究主要集中在食品中棒曲霉素的检测技术上^[11],而对其引起人细胞毒性的研究还很少。本研究拟探讨棒曲霉素对人胚肾细胞 HEK293 的增殖抑制和凋亡诱导作用机制,为进一步阐明棒曲霉素的细胞毒性机制提供更多的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株及试验试剂

人胚肾细胞株 HEK293 由第四军医大学惠赠。棒曲霉素购自 Sigma 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司;DMEM 培养基购自 Gibco 公司;胰蛋白酶、青霉素、链霉素、Hoechst33342、吖啶橙(AO)、溴化乙锭(EB)、碘化丙啶(PI)、LDH 细胞毒性检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒均购于碧云天生物技术研究所;RNA 提取试剂盒、SuperRT 二步法 RT-PCR 试剂盒购于北京康为世纪生物科技有限公司;二甲基亚砜(DMSO)、多聚甲醛、Triton X-100 均为分析纯。

1.1.2 实验仪器

BC-J160S 水套 CO_2 培养箱、湘仪 TDZ5-WS 多孔板离心机;Biorad680 多功能酶标仪;CR22GIII 高速冷冻离心机;TE2000 荧光倒置显微镜;JSM-6360LV 扫描电镜;Beckman Altra 流式细胞仪;伯乐 iQ5 多色实时定量 PCR 仪。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将 HEK293 细胞接种于培养瓶中,10%的新生牛血清 DMEM 培养液(青霉素、链霉素各 100 U/L)在 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 的条件下进行培养,待细胞长至 80%~90% 满时,0.25% 胰蛋白酶消化传代,每 3 d 传代一次。实验所用的细胞均处于对数生长期生长良好的细胞。

1.2.2 细胞增殖抑制试验

取对数生长期,状态良好的 HEK293 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化,收集细胞,调整细胞浓度为 10000 个/mL,接种于 96 孔培养板,200 μL /孔。培养 24 h 细胞完全贴壁后,将培养液更换为含 0、2.5、5、7.5、10、15 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 不同浓度 PAT 的培养液,处理 8 h,按照乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒说明,进行 LDH 检测。

对数生长期,状态良好的 HEK293 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化,收集细胞,调整细胞浓度为 10000 个/mL,接种于 96 孔培养板,200 μL /孔。培养 24 h 细胞完全贴壁后,将培养液更换为含 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PAT 的培养液,分别处理 0、3、10、24 h,按照乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒说明,进行 LDH 检测。

1.2.3 细胞凋亡形态检测

取对数生长期 HEK293 细胞,用不同浓度 PAT(0、5、10、15 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 处理 8 h,然后用含 4% 多聚甲醛的 0.01 M PBS (pH 7.4) 固定 10 min,在室温下,用 PBS 洗涤两次,室温避光条件下分别用 Hoechst33342 染色液和 5 μL 100 g/mL 的 AO-EB 染色 5 分钟, PBS 漂洗后在荧光显微镜下观察拍照^[12]。

制作细胞爬片,待对数生长期时给予不同浓度 PAT(0、5、10、15 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 处理 8 h,拿出细胞爬片用 2.5% 戊二醛在 4 $^\circ\text{C}$ 固定 2 h,用 0.1 M pH 7.2 的 PBS 缓冲液漂洗 3 次,每次 8 min。依次用 50%、70%、80%、90% 的乙醇脱水 10 min,无水乙醇脱水 2 次,每次 20 分钟。再用乙酸异戊酯置换 10 min 后置于 Quorum-Emitech K850 临界点干燥仪干燥后进行喷金和电子扫描拍照。

1.2.4 细胞凋亡率测定

取对数生长期的 HEK293 细胞,用不同浓度 PAT 处理 8 h 后,吸出细胞培养液, PBS 洗涤细胞一次,加入适量 0.25% 胰酶细胞消化液消化细胞。吸除胰酶细胞消化液。加入收集的细胞培养液,稍混匀后转移到离心管内,1000 g 离心 5 分钟,弃上清,收集细胞,按照 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明进行细胞凋亡率检测。

1.2.5 线粒体膜电位检测

用六孔板培养 HEK293 细胞,待生长至对数生长期,用不同浓度 PAT(0、5、10、15 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 处理 8 h

后,用PBS洗涤细胞,每孔加入1 mL细胞培养液和1 mL JC-1染色工作液,充分混匀,细胞培养箱中37℃孵育20分钟。孵育结束后,吸除上清,用JC-1染色缓冲液洗涤2次。每孔加入2 mL细胞培养液,按照线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)说明在荧光显微镜下进行观察测定。通常情况下,当线粒体的膜电位会完全丧失时,JC-1染色后观察应呈绿色荧光;而正常的细胞经JC-1染色后应显示红色荧光。

1.2.6 线粒体相关基因表达检测

不同浓度(0、5、7.5、10、15)的PAT处理HEK293细胞8h后,收集细胞,用康为世纪RNA提取试剂盒提取RNA,操作步骤按照试剂盒说明进行。提取的总RNA经1%琼脂糖凝胶电泳和超微量核酸蛋白检测仪检测纯度和质量。提取的RNA经qRT-PCR的M-MLV第一链合成试剂盒反转录为cDNA,通过荧光实时定量PCR检测线粒体中与凋亡相关的基因FIS1、ASL、SLC25A6、COX17 mRNA表达水平,以 β -actin为内参。PCR引物序列如下: β -actin(450 bp)上游引物:5'-CTACAA TGAGCTGCGTGTGG-3';下游引物:5'-TAGTCTTTC TCCAGG GAGGA-3'。FIS1(188 bp)上游引物:5'-AA AGGGAGCAAGGAGGAACA-3';下游引物:5'-ATGC CCACGAGTCCATCTTT-3'。ASL(180 bp)上游引物:5'-ACTGCACCAAGGAATTCAGC-3';下游引物:5'-TGTTGTAGGTGCTGGGAAGT-3'。SLC25A6(221 bp)上游引物:5'-TCATTCGCTACTTCCCCACT-3';下游引物:5'-CTCTGTGCCTGACTTCCCA-3'。COX17(213 bp)上游引物:5'-TAGATTTGG CTGTCTCC GCT-3';下游引物:5'-CTCTCATGC ATTCCTTGTT GG-3'。反应体系为25 μ L: 12.5 μ L 2 \times PCR MasterMix, 2 μ L上游引物, 2 μ L下游引物, 1 mL cDNA, 7.5 μ L双蒸水,将上述所加的样品混匀,离心,利用实时荧光定量PCR仪进行扩增。反应条件:95℃,预变性5 min; 95℃,变性30s; 55℃,退火30s; 72℃,延伸30s; 循环40次; 72℃,终延伸5 min。由扩增曲线得到的Ct值计算目的基因与内参(β -actin)的 Δ Ct(目的基因Ct-内参Ct),然后计算3个对照组样本 Δ CT的平均值;计算目的基因与内参的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,进行单因素分析。

1.2.7 数据分析

所有的实验均重复三次,数据均以平均值 \pm 标准差(SE)表示。计量资料经方差齐性检验为方差齐性,两组间差异采用t检验,多组资料应用单因素方差分析。P<0.05时被认为结果具有统计学显著性。

2 结果与讨论

2.1 PAT抑制HEK293细胞的LDH检测

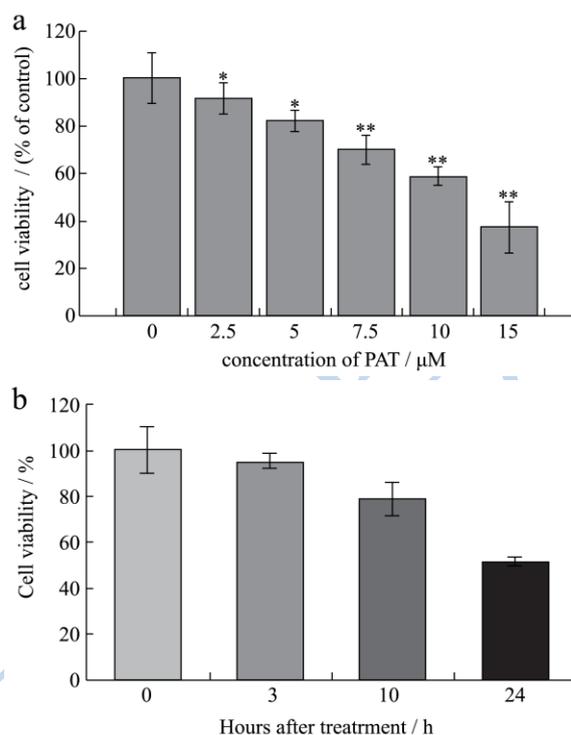


图1 PAT对HEK293细胞的抑制作用

Fig.1 Inhibition effect of PAT on HEK293 cells

注: a: 不同浓度PAT对HEK293细胞增殖的抑制, b: 5 μ M PAT处理后不同时间HEK293细胞的存活率; *: P<0.05; **: P<0.01。

各种浓度的PAT对HEK293细胞的抑制作用如图1所示,由图可见,PAT对HEK293细胞的生长具有抑制作用,且随着浓度增大抑制作用加强。2.5 μ M~15 μ M的PAT对HEK293细胞的抑制率分别为8.1%、18.2%、31.0%、42.2%、63.1%。用5 μ M的PAT处理不同时间(0、3、10、24 h),细胞的存活率分别为94.2%、78.1%、47.4%,可以看出随着处理时间延长,PAT对HEK293细胞的生长抑制作用加强。这就说明,PAT对HEK293细胞的抑制作用具有浓度依赖性和时间依赖性,而且PAT在较小的浓度和较短的时间就会产生较强的毒性效应。

2.2 细胞形态变化

由图2的扫描电镜照片可看出,随着PAT浓度增大,HEK293细胞逐渐发生变形、破裂直至解体。当处理浓度达到15 μ M时,细胞膜及核膜完全崩溃,细胞内容物外泄,细胞器消失,细胞发生裂解成为碎片。由图3荧光显微镜照片可看出,不同浓度PAT处理细胞后,对照组染色质均匀,无浓缩、边集现象,细胞

核染色均一, 无明显亮蓝色。而 PAT 处理后出现细胞核染色质明显凝集、固缩, 并有核碎裂出现、凋亡小体。随着浓度增大, 凋亡细胞和死亡细胞数目增大。当 PAT 浓度为 15 μM 时, AO 和 EB 双染照片表明大多数细胞已呈凋亡或死亡状态, Hoechst33342 细胞核染色照片表明大多数的细胞呈现致密浓染或者碎块状致密浓染。表明随着浓度增大, PAT 对 HEK293 细胞的凋亡或者死亡诱导效应增强。

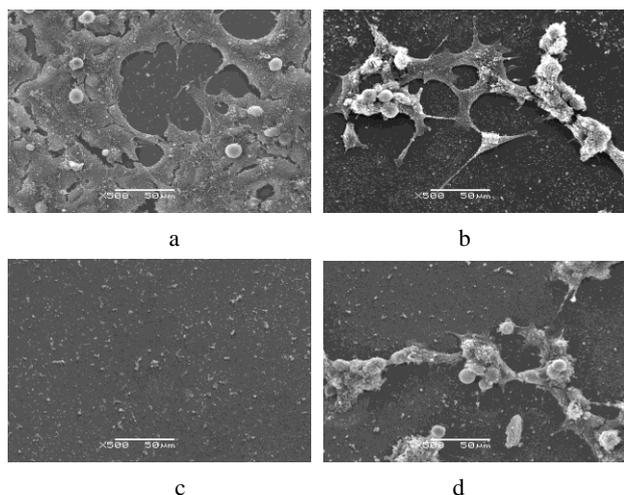


图 2 不同浓度 PAT 处理 HEK293 的扫描电镜图

Fig.2 Observation of HEK293 cells treated with PAT at concentrations of 5, 10, and 15 μM for 8 h by SEM

注: a: 对照; b: 5 μM PAT; c: 10 μM PAT; d: 15 μM PAT。

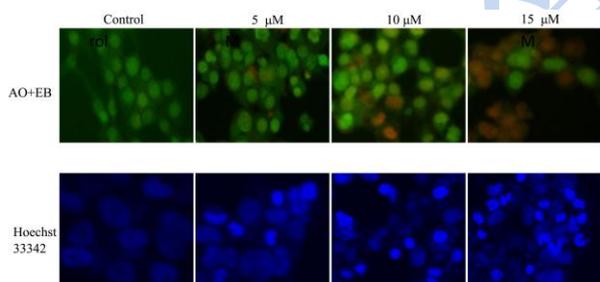


图 3 不同浓度 PAT 处理 HEK293 细胞后 Hoechst33342 荧光染色照片

Fig.3 HEK293 cells were stained with Hoechst 33342 after being treated with PAT at concentrations of 5, 10, and 15 μM for 8 h

2.3 细胞凋亡率检测

由图 4 可看出随着 PAT 浓度增大, 细胞凋亡率提高, PAT 浓度为 5 μM 时, 凋亡率为 16.4%, 当 PAT 浓度达到 10 μM 时, 凋亡率为 20.1%。说明 PAT 对诱导 HEK293 细胞凋亡有一定的促进作用, 且这种诱导作用具有浓度依赖性, 即随着 PAT 浓度的增加, HEK293 细胞的凋亡率也增加。

2.4 PAT 对线粒体膜电位的影响

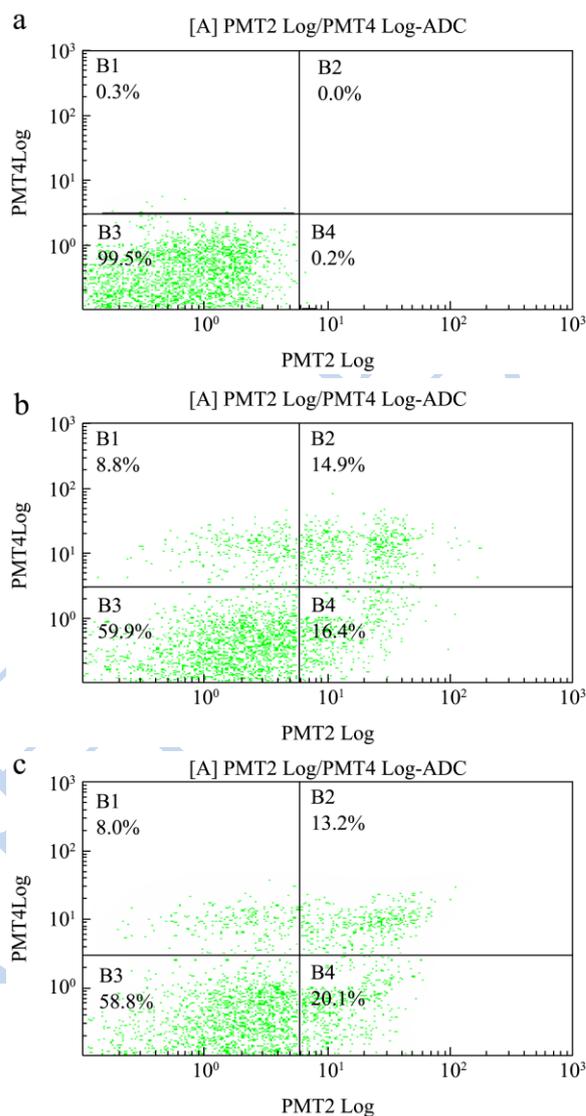


图 4 PAT 对 HEK293 细胞凋亡率的影响

Fig. 4 Effect of PAT on apoptosis rate of HEK293 cells

Note: a: control; b: 5 μM PAT; c: 10 μM PAT.

PAT 对线粒体膜电位的影响如图 5 所示, 当 PAT 浓度为 5 μM 时, 荧光显微镜下观测到细胞的膜电位仍基本正常, 随着 PAT 浓度的增大, 代表线粒体膜电位的红绿光比值逐渐降低, 说明 PAT 处理细胞后引起了细胞线粒体膜电位的下降和膜通透性增加。当 PAT 浓度达到 15 μM 时, 细胞膜电位照片已基本呈现绿色荧光。这说明 PAT 可能是通过线粒体途径引起 HEK293 细胞凋亡, 且具有浓度依赖性。

2.5 PAT 对线粒体相关基因表达的影响

由图 6 可以看出, Fis1 基因随着 PAT 浓度的增大呈缓慢下降趋势, 当 PAT 浓度增大到 15 μM 时, 基因表达量急剧下降, 这可能是高浓度的 PAT 产生的活性

氧使Fis1基因下调,这也说明了氧化损伤是细胞凋亡的机制之一。ASL基因在PAT浓度为5 μM 时表达上调,但PAT浓度继续增大时一直呈下调趋势,说明精氨酸琥珀酸裂解酶活性受到抑制,生成L-精氨酸的途径被抑制,造成细胞的氧化损伤。SLC25A6属于线粒体转运蛋白质家族,在PAT浓度较低时变化并不明显,但当PAT浓度增大到15 μM 时,SLC25A6基因的表达量下降比较明显,可能是高浓度的PAT造成细胞ATP合成降低、氧化应激增加。线粒体铜伴侣蛋白COX17的表达量随PAT浓度的增大呈先下降后增高的趋势,说明在低于7.5 μM 时,PAT浓度的增大会影响COX17,进而影响SOD的合成,而随着PAT浓度继续增大,COX17过表达,活性氧ROS大量产生,造成氧化损伤。

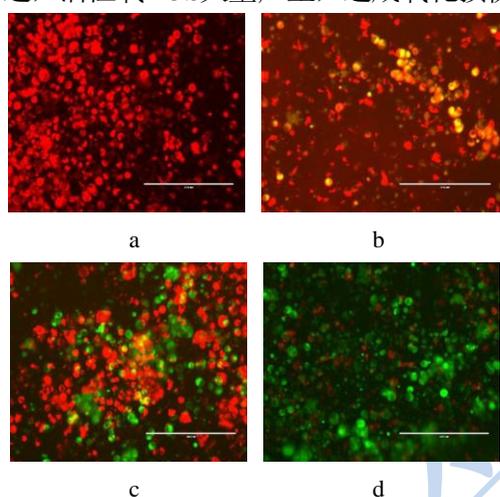


图5 不同浓度 PAT 对 HEK293 细胞线粒体膜电位的影响

Fig.5 Mitochondrial membrane of HEK293 cells treated with PAT at concentrations of 5, 10, and 15 μM for 8 h by JC-1

Note: a: control; b: 5 μM PAT; c: 10 μM PAT; d: 15 μM PAT.

3 结论

棒曲霉素可显著抑制人胚肾细胞HEK293的生长、增殖,并呈现剂量和时间效应关系。棒曲霉素会使HEK293细胞发生形态学改变,进而诱导HEK293细胞发生凋亡,表现出典型的凋亡细胞特征。棒曲霉素引起了HEK293细胞线粒体膜电位的下降,从而使HEK293细胞发生凋亡。棒曲霉素对HEK293细胞线粒体相关基因的表达具有较大影响,这说明棒曲霉素诱导HEK293细胞凋亡与线粒体相关信号通路有关。本研究尽管是体外的细胞株研究,随着对棒曲霉素毒性作用和机制的深入研究,为进一步揭示棒曲霉素对人体的毒性作用机理和作用,将深入PAT在体内对人胚的肾原基发育的影响,将对于制定棒曲霉素在食品中的限量标准及发展生物技术对棒曲霉素的控制将具有重要意义。

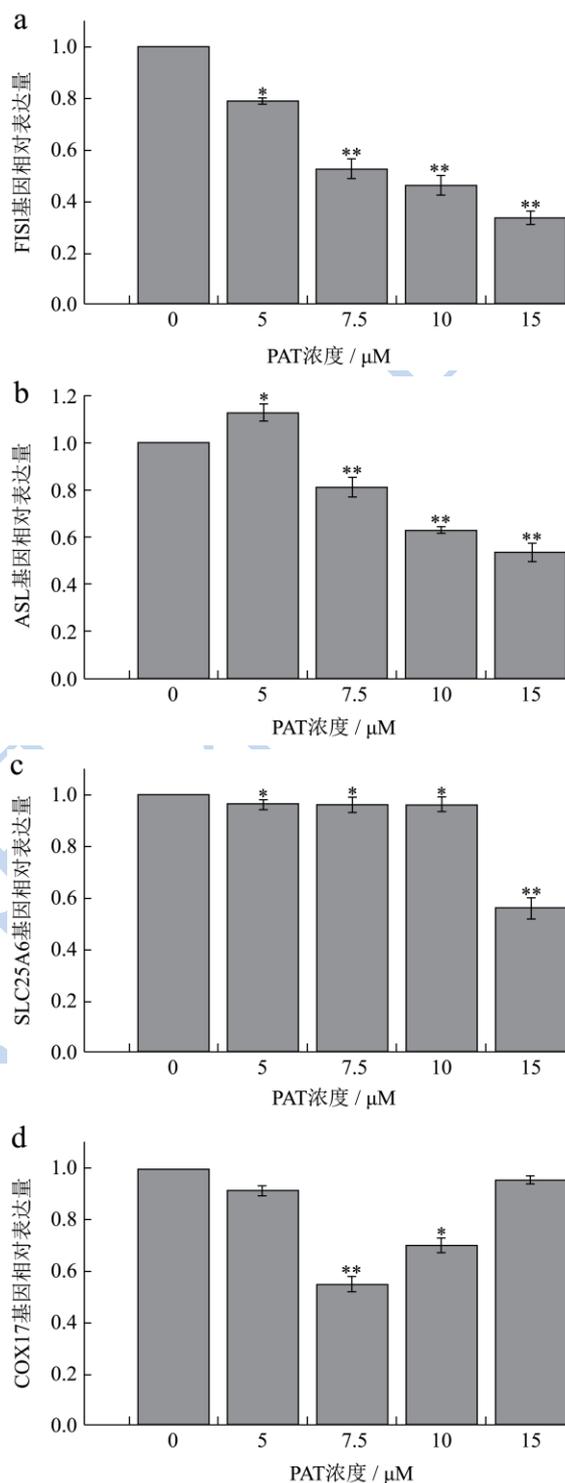


图6 不同浓度 PAT 对 HEK293 细胞线粒体相关基因的影响

Fig.6 Mitochondrial gene expression of HEK293 cells treated with various concentrations of PAT

Note: a: FIS1; b: ASL; c: SLC25A6; d: COX17.

参考文献

[1] Glaser N, H Stopper. Patulin: Mechanism of genotoxicity [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(5): 1796-1801
 [2] Vilanova L, NTeixidó, et al. The infection capacity of *P.*

- expansum* and *P. digitatum* on apples and histochemical analysis of host response [J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 157(3): 360-367
- [3] Chen J h., J I Cao, et al. T-2 toxin-induced apoptosis involving Fas, p53, Bcl-xL, Bcl-2, Bax and caspase-3 signaling pathways in human chondrocytes [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2008, 9(6): 455-463
- [4] Feng Chen, Y M, Chunyi Xue, Jingyun Ma, et al. The combination of deoxynivalenol and zearalenone at permitted feed concentrations causes serious physiological effects in young pigs [J]. Journal of Veterinary Science, 2008, 9(1): 39-44
- [5] Harris K. Bobe G, Bourquin L D. Patulin surveillance in apple cider and juice marketed in michigan [J]. Journal of Food Protection, 2009, 72(6): 1255-1261
- [6] Puel O, P Galtier, et al. Biosynthesis and toxicological effects of patulin [J]. Toxins, 2010, 2(4): 613-631
- [7] Guo X, Y Dong, et al. Patulin induces pro-survival functions via autophagy inhibition and p62 accumulation [J]. Cell Death and Disease, 2013, 4(10): e822
- [8] Kokkinidou S, J D Floros, et al. Kinetics of the thermal degradation of patulin in the presence of ascorbic acid [J]. Journal of Food Science, 2014, 79(1): T108-T114.
- [9] de Melo F T, I M de Oliveira, et al. DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin [J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(10): 3548-3555
- [10] Liu BH, T S Wu, et al. Induction of oxidative stress response by the mycotoxin patulin in mammalian cells [J]. Toxicological Sciences, 2007, 95(2): 340-347
- [11] Selmanoğlu G. Evaluation of the reproductive toxicity of patulin in growing male rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2006, 44(12): 2019-2024
- [12] Yuan L, J Wang, et al. Isoorientin induces apoptosis through mitochondrial dysfunction and inhibition of PI3K/Akt signaling pathway in HepG2 cancer cells [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2012, 265(1): 83-92