

# 甘草内生菌对顺铂诱导 HEK293 细胞损伤的保护作用及机制研究

张楠<sup>1</sup>,张尚龙<sup>1</sup>,连小龙<sup>3</sup>,  
杨志军<sup>1</sup>,马趣环<sup>1</sup>,叶礼巧<sup>1</sup>,邓毅<sup>1,2\*</sup>,杨秀娟<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>甘肃中医药大学;<sup>2</sup>甘肃省中药药理与毒理学重点实验室,兰州 730000;<sup>3</sup>青海大学,青海 810000

**摘要:**基于体外实验建立顺铂诱导肾细胞损伤模型,探讨甘草内生菌对顺铂诱导人胚肾 293 (HEK293) 细胞损伤的减毒作用机制。通过 MTT 法检测甘草内生菌、顺铂及两者联合用药对 HEK293 细胞存活率的影响,流式细胞术检测不同干预下 HEK293 细胞凋亡率的变化,Q-PCR 及 Western blot 法检测凋亡相关指标 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 及内质网应激通路 (GRP78、CHOP) mRNA 和蛋白表达的变化。结果表明,顺铂诱导 HEK293 细胞损伤,具有时间和剂量依赖性。甘草内生菌能够明显降低顺铂损伤模型细胞凋亡率,通过下调 Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、GRP78、CHOP mRNA 和蛋白表达,上调 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达发挥对顺铂诱导肾细胞损伤的保护作用。综上,甘草内生菌能够改善顺铂诱导的 HEK293 细胞损伤,其作用机制可能是通过调控 Bcl-2 家族、Caspase 家族凋亡蛋白及内质网应激通路蛋白来实现抗凋亡作用,减轻细胞损伤。

**关键词:**甘草内生菌;顺铂;HEK293 细胞;凋亡;内质网应激

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)12-2127-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.12.012

## Protective effect and mechanism of endophytic bacteria of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch against cisplatin-induced damage of HEK293 cells

ZHANG Nan<sup>1</sup>,ZHANG Shang-long<sup>1</sup>,LIAN Xiao-long<sup>3</sup>,  
YANG Zhi-jun<sup>1</sup>,MA Qu-huan<sup>1</sup>,YE Li-qiao<sup>1</sup>,DENG Yi<sup>1,2\*</sup>,YANG Xiu-juan<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Gansu University of Traditional Chinese Medicine;<sup>2</sup>Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology of traditional Chinese Medicine in Gansu Province,Lanzhou 730000,China;<sup>3</sup>Qinghai University,Qinghai 810000,China

**Abstract:**The model of cisplatin-induced kidney cell damage was established based on *in vitro* experiment to investigate the attenuated mechanism of *Glycyrrhiza uralensis* endophyte on cisplatin-induced human embryonic kidney 293 (HEK293) cell damage. MTT assay was used to detect the effects of *Glycyrrhiza uralensis* endophyte, cisplatin and the combination of two drugs on the survival rate of HEK293 cells. The apoptosis rate of HEK293 cells was detected by flow cytometry, the mRNA and protein expressions of Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 and endoplasmic reticulum stress pathway (GRP78, CHOP) were detected by Q-PCR and Western blot. The results showed that cisplatin induced HEK293 cell damage in a time- and dose-dependent manner. *Glycyrrhiza uralensis* endophyte could significantly reduce the apoptosis rate of cisplatin-damaged model by down-regulating the mRNA and protein expressions of Bax, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, GRP78, and CHOP, up-regulating the mRNA and protein expression of Bcl-2 exerts a protective effect on cisplatin-induced renal cell injury. In conclusion, *Glycyrrhiza uralensis* endophyte could significantly reduce the apoptosis rate of cisplatin-damaged model, have anti-apoptotic effects on cisplatin-induced HEK293 cell damage, and the mechanism may be through regulation of apoptotic proteins of Bcl-2 family, Caspase family and endoplasmic reticulum stress pathway proteins to achieve anti-apoptotic effects and reduce cell damage.

收稿日期:2023-03-13 接受日期:2023-10-11

基金项目:国家自然科学基金(地区)项目(81960723);甘肃省中医药管理局(GZKP-2022-37);甘肃省自然科学基金(21JR11RA145);兰州市科技计划(2022-3-21)

\*通信作者 Tel:86-015101232622;E-mail:dengyi@gszy.edu.cn, yangxiujuan@163.com

**Key words:** *Glycyrrhiza uralensis* endophytes; cisplatin; HEK293 cells; apoptosis; endoplasmic reticulum stress

顺铂(cisplatin, CP)作为临床常用的抗肿瘤药物,疗效显著但毒副作用较强。主要表现为肾毒性、肝毒性、耳毒性及心脏毒性等,且尤以肾损伤较为严重<sup>[1-4]</sup>。具有时间-剂量依赖性<sup>[5]</sup>。CP引起的肾毒性可能涉及多方面的致病机制,包括线粒体功能障碍、诱导细胞凋亡、氧化应激等<sup>[6]</sup>。因此如何能够有效降低CP毒副作用成为扩大CP临床用药剂量的首要问题,寻找合适的治疗方案或药物协同CP减毒增效成为目前研究的主要方向。

近年来,随着中医药的发展,通过联合中药实现增效减毒的方式成为一大研究热点。甘草作为“解毒圣药”,性味甘平,功能补脾益气,调和诸药<sup>[7,8]</sup>,其活性成分可缓解中毒症状,降低死亡率,对药物和毒物具有显著的解毒作用<sup>[9-11]</sup>。内生菌属于药用微生物资源范畴<sup>[12]</sup>,是指生活在健康植物组织和器官内部的真菌或细菌,与宿主在长期进化过程中,发生基因重组并获得宿主植物的基因,产生与宿主相同或相似的药用活性成分<sup>[13]</sup>,Man等<sup>[14]</sup>研究发现,甘草内生菌株具有与宿主相同的生理作用,能够代谢出与甘草相似的皂苷类、黄酮类活性成分,具有抑菌、抗氧化的药理作用。Yang等<sup>[15]</sup>研究发现,甘草内生菌发酵液具有与宿主水煎液、总黄酮及总皂苷相似的止咳作用。本课题组前期实验研究证实,甘草内生菌具有抑菌<sup>[16]</sup>、抗炎<sup>[17]</sup>、祛痰<sup>[18]</sup>、抗肿瘤<sup>[19]</sup>等多种药理作用,可代谢出与宿主甘草相似的甘草酸铵、甘草苷及甘草素<sup>[20]</sup>,因而甘草内生菌可能具有与甘草相似的解毒作用。前期减毒实验证明,甘草能有效减轻CP引起的肾毒性。但甘草内生菌对CP所致的肾毒性并未见系统的机制研究。

因此,本文旨在通过体外实验建立CP诱导HEK293细胞损伤模型,探讨甘草内生菌对CP损伤HEK293细胞的保护作用及其机制。以期为甘草内生菌与CP联合应用实现增效减毒提供依据,为甘草内生菌的解毒作用提供理论参考,进一步扩充甘草内生菌的药理作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验药物

甘草经甘肃中医药大学中药鉴定教研室李硕副教授鉴定为*Glycyrrhiza uralensis* Fisch的根和根茎,甘草内生菌(JTZB055)为本课题组从同期甘草中分离纯化所得,经16S rDNA测序结果鉴定显示

JTZB055属于内生细菌芽孢杆菌属;顺铂(北京索莱宝科技有限公司,批号:SC5170-20 mg)。

### 1.2 细胞株

人胚肾HEK293细胞购自于武汉普诺赛生命科技有限公司。用含10%胎牛血清、1%双抗的DMEM高糖完全培养基,于5%CO<sub>2</sub>,37℃培养箱中培养,待长至瓶底约85%时,用含EDTA 0.25%胰蛋白酶消化传代培养,待用。

### 1.3 主要试剂

DMEM高糖培养基(Cytiva公司,批号:AH29027412);胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司,批号:21030707);噻唑蓝(北京索莱宝科技有限公司,批号:917Q051);胰蛋白酶、青链霉素(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:GP2211017、GA22020011094);二甲基亚砜(DMSO,北京索莱宝科技有限公司,批号:1121E0331);β-actin(武汉Abbkine公司,批号:ATVMA0302);Bcl-2、Caspase-9、GRP78及CHOP抗体(北京博奥森公司,批号:bs-0032R、bs-0049R、bs-1219R、bs-20669R);Bax、Caspase-3、Caspase-8及山羊抗兔二抗(Abmart公司,批号:ab32503、ab32351、ab108333、abs20040ss);BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:20211213)。

### 1.4 主要仪器

酶标仪(BioTek Instruments, Inc);倒置荧光显微镜成像(麦克奥迪实业集团有限公司);191L气套式CO<sub>2</sub>培养箱(美国精骐有限公司);超净工作台(AIRTHCH公司);流式细胞仪(Beckman);微量分光光度计(赛默飞世尔科技(中国)有限公司);荧光定量PCR仪(加拿大枫岭生物技术有限公司);化学发光成像系统(美国Azure Biosystems公司)。

### 1.5 方法

#### 1.5.1 甘草内生菌代谢产物萃取粉末的制备

将甘草内生细菌JTZB055于营养琼脂培养基上复苏,挑取单个菌落,接种到普通营养肉汤培养液中,在37℃、220 r/min恒温振荡器中培养5 d,收集发酵液,抽滤,滤液水浴加热蒸干成甘草内生菌发酵液粉末,于4℃冰箱保存,备用。发酵液粉末用水溶解成水溶液后依次用乙酸乙酯和正丁醇萃取,萃取3次,合并萃取液,以旋转蒸发仪回收溶剂至50 mL后,水浴干燥成粉末,于4℃冰箱保存,备用<sup>[21]</sup>。

### 1.5.2 MTT 法检测 CP 对 HEK293 细胞存活率的影响

取对数生长期细胞,用 0.25% 胰酶消化后调整细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/mL,向 96 孔板中加入不同浓度的 CP(1、2、4、8、16、32、64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),每组设置 5 个复孔,同时设空白对照组,在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度条件下细胞培养箱中培养 24 h 后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 10  $\mu\text{L}$ ,继续培养 4 h 后吸弃孔内培养上清液,每孔再加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ,振荡 10 min,使结晶物充分溶解。酶标仪测量各组在 570 nm 处的吸光度(A),按以下公式计算细胞存活率<sup>[22]</sup>。

$$\text{存活率} = (\text{加药组 A 值} - \text{调零组 A 值}) / (\text{对照组 A 值} - \text{调零组 A 值}) \times 100\%$$

### 1.5.3 MTT 法检测甘草内生菌对 HEK293 细胞存活率的影响

取对数生长期细胞,用 0.25% 胰酶消化后调整细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/mL,向 96 孔板中加入不同浓度的 JTZB055(1.25、2.5、5、10、20、40、80、160、320、640  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),每组设置 5 个复孔,同时设空白对照组,在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度条件下细胞培养箱中培养 24 h 后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 10  $\mu\text{L}$ ,继续培养 4 h 后吸弃孔内培养上清液,每孔再加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ,振荡 10 min,使结晶物充分溶解。酶标仪测量各组在 570 nm 处的吸光值,并按照“1.5.2”所述方法检测细胞存活率。

### 1.5.4 MTT 检测甘草内生菌对 CP 所致 HEK293 细胞损伤模型的影响

取对数生长期细胞,用 0.25% 胰酶消化后调整细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/mL,以每孔 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板,进行分组:①对照组:DMEM 培养基;②CP 组:4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CP;③CP + JTZB055 组:加入 2.5、5、10、20、40、80、160、320、640  $\mu\text{g}/\text{mL}$  JTZB055,4 h 后

加入 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CP。每组设置 5 个复孔,同时设空白调零孔(只含有 DMEM 培养基)。将 96 孔板继续  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度条件下细胞培养箱培养 24 h,并按照“1.5.2”所述方法检测细胞存活率。

### 1.5.5 细胞形态学观察

取对数生长期细胞用 0.25% 胰酶消化,调整细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/mL,分组铺在 6 孔板中,分为对照组(Con)、模型组(CP)、JTZB055 组(JT)、CP + JTZB055 高剂量组(CPJT-H)、CP + JTZB055 中剂量组(CPJT-M)、CP + JTZB055 低剂量组(CPJT-L)。倒置显微镜下观察各组细胞形态,对比各组细胞形态状况差异。

### 1.5.6 流式细胞术检测凋亡率

取对数生长期细胞 HEK293 细胞,用 0.25% 胰酶进行消化,收集细胞悬液,细胞计数仪计数,将细胞密度调整为  $1 \times 10^5$  个/mL 个细胞,按照“1.5.5”分组加入 6 孔板。加入预冷的 PBS 缓冲液清洗 2 遍,加入 200  $\mu\text{L}$  结合液重悬细胞,沉淀中加入 5  $\mu\text{L}$  PI 和 5  $\mu\text{L}$  A-V 染色液混匀,  $4^\circ\text{C}$  避光冰浴放置 10 ~ 15 min。在流式细胞仪上进行检测,激发波长为 488 nm 和 535 nm。每个样品检测  $5 \times 10^4$  个/mL 个细胞,每组试验重复 3 次。CellQuest 软件分析细胞凋亡率,结果用平均凋亡率表示。

### 1.5.7 荧光定量 PCR 检测 mRNA 水平

前期处理如“1.5.5”,根据总 RNA 提取试剂盒操作提取总 RNA,微量分光光度计进行 RNA 浓度、纯度检测,根据反转录试剂盒反转为 cDNA,后运用扩增程序两步法在 PCR 仪上进行扩增,引物序列见表 1。由 PCR 分析仪采集的目的基因和内参基因的 CT 值,计算  $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{目的}} - \text{CT}_{\text{内参}}$ ,  $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{实验组}} - \Delta\text{CT}_{\text{对照组}}$ ,最后使用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  方法计算,得出基因相对表达量。

表 1 引物设计序列及长度

Table 1 Primer sequence and length

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature( $^\circ\text{C}$ )	长度 Length(bp)
Bax	F:CGGGTTGTCGCCCTTTTCTA	60.32	108
	R:GAGGAAGTCCAATGTCAGCC	60.80	
Bcl2	F:GGAGGATTGTGCCCTTCTTTG	59.18	157
	R:GCATCCCAGCCTCCGTTATC	60.60	
CASP3	F:AGAACTGGACTGTGCCATTGAG	60.55	164

续表 1 (Continued Tab. 1)

基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'-3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	长度 Length (bp)
CASP8	R;CACAAAGCGACTGGATGAACC	59.80	223
	F;GGGTAATGACAATCTCGGACT	59.57	
CASP9	R;GAAGCTCTTCAAAGGTCGTGGT	60.81	236
	F;CGCCATATCTAGTTTGCCCA	57.75	
GRP78	R;TCCGGAGGAAATTAAGCAAC	56.51	148
	F;ACCGCTGAGGCTTATTTGGG	60.39	
DDIT3	R;CTGCCGTAGGCTCGTTGAT	59.86	294
	F;GGTACCTATGTTTCACCTCCTGG	60.12	
$\beta$ -actin	R;CTGTGCCACTTTCCTTTCATTCT	59.43	317
	F;CACCCAGCACAATGAAGATCAAGAT	61.60	
	R;CCAGTTTTTAAATCCTGAGTCAAGC	58.85	

### 1.5.8 Western blot 法检测凋亡蛋白表达水平

前期处理如“1.5.5”,培养 24 h 后弃掉旧培养液,用预冷 PBS 清洗三次,1 500 r/min 于 4 °C 低温离心机离心 15 min 后,弃上清。每孔加入 200  $\mu$ L 配置好的裂解液,冰上裂解 30 min,刮下细胞转移至新的预冷 EP 管中,放置冰上静止 30 min 裂解,12 000 r/min 于 4 °C 低温离心机离心 15 min 后,保留上清液为蛋白样本于新的预冷 EP 管中,弃去沉淀。BCA 法测定蛋白浓度,SDS-PAGE 胶电泳,每孔 10  $\mu$ g 上样,然后将蛋白转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h;孵育一抗,4 °C 过夜,TBST 清洗后室温孵育二抗 1 h;TBST 清洗后 ECL 发光液成像,采用 Image J 软件对条带进行灰度值分析,目的蛋白条带光密度值与内参蛋白条带光密度值的比值,即为目的蛋白的相对表达量。

### 1.5.9 统计学方法

应用 SPSS 26.0 统计学软件进行分析,实验数

据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA),两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$  被认为差异具有统计学意义。并采用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度的 CP 在 24 h、48 h、72 h 对 HEK293 的影响

如图 1 所示,与 Con 组相比,随着 CP 给药浓度及给药时间的增加,HEK293 细胞的存活率逐渐降低 ( $P < 0.01$ ),且 CP 诱导的 HEK293 细胞损伤呈时间-剂量依赖性。因此选用 24 h 作为 CP 给药模型时间,通过 SPSS 软件分析得出 CP 对 HEK293 细胞的  $IC_{50}$  值为 3.394  $\mu$ g/mL,故后续实验选用 4  $\mu$ g/mL 作为 HEK293 损伤模型浓度。

### 2.2 不同浓度的甘草内生菌在 24、48、72 h 对 HEK293 细胞存活率的影响

如图 2 所示,不同浓度的甘草内生菌处理 HEK293

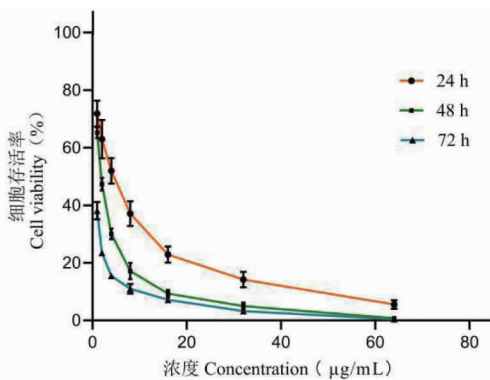


图 1 不同浓度 CP 对 HEK293 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 1 Effects of different concentrations of CP on survival rate of HEK293 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

细胞 24、48、72 h 后对细胞的存活率有不同的影响。随着给药时间的增加,甘草内生菌对 HEK293 细胞的增殖作用逐渐降低,且在 72 h 时对细胞具有抑制作用。因此选用 24 h 作为药物作用时间,当甘草内生菌浓度在 640  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,对细胞具有杀伤作用,

可能是高浓度的甘草内生菌对 HEK293 细胞具有一定细胞毒作用。当甘草内生菌浓度  $< 320 \mu\text{g}/\text{mL}$  时,对细胞增殖具有一定的促进作用,且甘草内生菌浓度在 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,与 Con 组相比,HEK293 细胞存活率最高( $P < 0.01$ )。

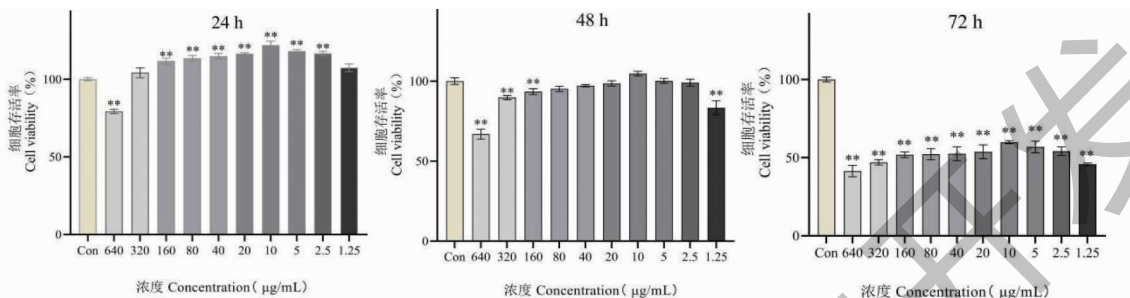


图2 不同浓度甘草内生菌对 HEK293 细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 2 Effects of different concentrations of *G. uralensis* endophytes on the survival rate of HEK293 cells( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

注:与 Con 组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。Note: Compared with control, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ 。

### 2.3 不同浓度的甘草内生菌对 HEK293 损伤模型存活率的影响

如图 3 所示,当甘草内生菌浓度高于 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,对 CP 所致的 HEK293 细胞损伤无明显的保护作用,当甘草内生菌浓度在 10 ~ 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围时,与 CP 组相比,HEK293 细胞的存活率显著升高( $P < 0.01$ )。实验结果显示当甘草内生菌浓度在 10、5、2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时细胞损伤均明显改善,且浓度

为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,显著改善 CP 诱导的 HEK293 细胞损伤,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。为了进一步筛选出最佳减毒浓度,实验选用 Con 组、CP 组(4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、JT 组(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、CPJT-H 组(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、CPJT-M 组(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、CPJT-L 组(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )等六组进行进一步的验证,探讨甘草内生菌对 CP 诱导的 HEK293 细胞凋亡的保护作用机制。

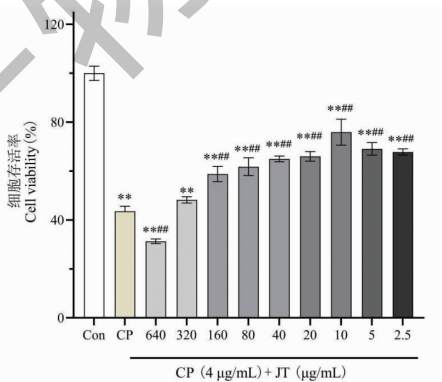


图3 不同浓度的甘草内生菌对 HEK293 损伤模型存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 3 Effects of different concentrations of *G. uralensis* endophytes on the survival rate of HEK293 injury model( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

注:与 Con 相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与 CP 组相比, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , 下同。Note: Compared with Con, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with CP, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , the same below.

### 2.4 倒置显微镜观察细胞形态学变化

如图 4 所示,显微镜结果发现 Con 组细胞均匀生长,细胞贴壁牢固呈梭形或多角形分布。与 Con 比较, JT 组无明显差别,细胞轮廓清晰,贴壁较稳均

匀生长,且 JT 组细胞较空白组生长数量有所增加。CP 组细胞形态改变多呈圆形生长,细胞多数呈漂浮状态,贴壁性较差,与 Con 组相比数量明显减少。与 CP 组相比,联合高中低剂量组细胞皱缩形态明显减



轻,贴壁能力有所恢复,且 CPJT-H 组效果最好。提示一定浓度下甘草内生菌对 HEK293 细胞有一定的

促进作用,且 CPJT-H 组可以一定程度缓解 CP 诱导的 HEK293 细胞的受损形态,改善细胞的生长状况。

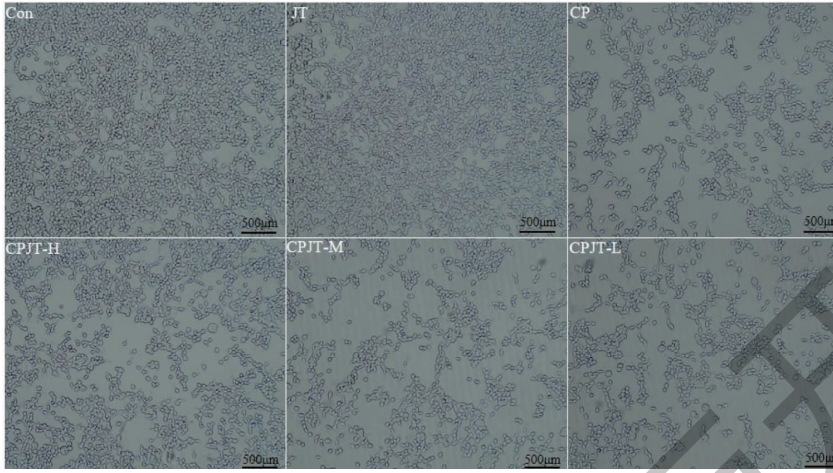


图 4 各组药物作用下 HEK293 细胞形态 ( $\times 100$ )

Fig. 4 Cell morphology of HEK293 under drug action in each group ( $\times 100$ )

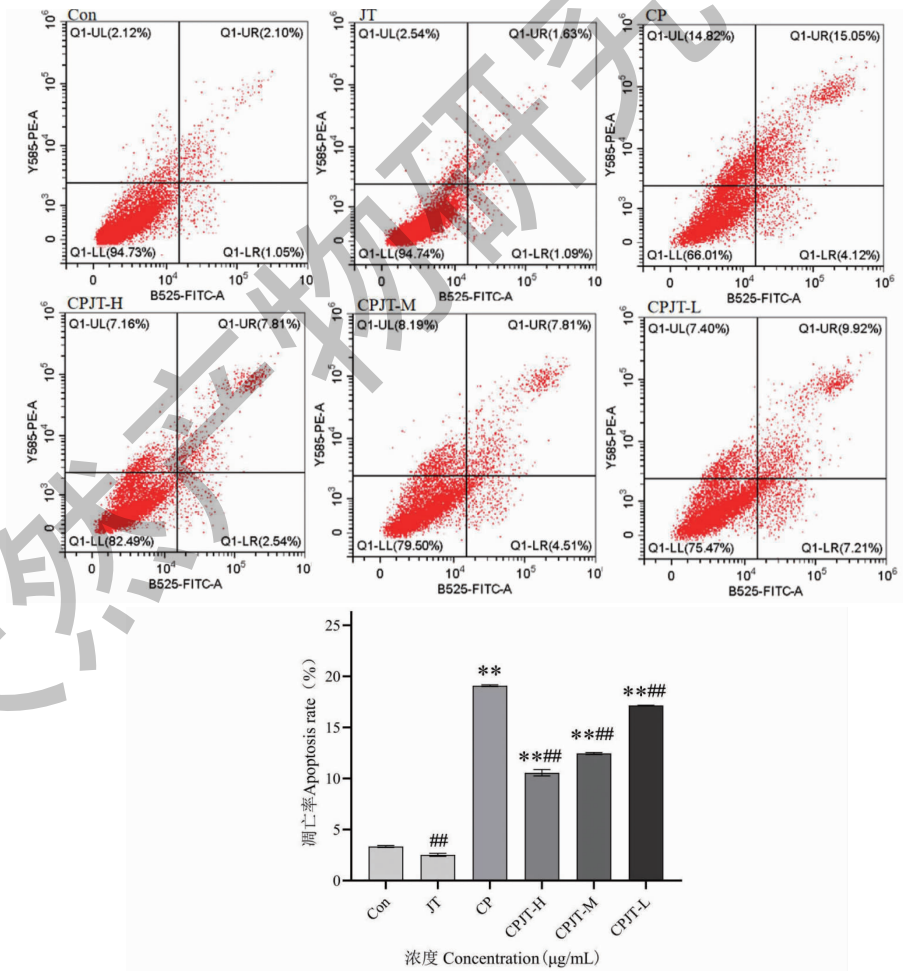


图 5 各药物组作用 24 h 后 HEK293 细胞的凋亡率

Fig. 5 Apoptosis rate of HEK293 cells after 24 h of treatment in each drug group

## 2.5 流式细胞凋亡率检测

流式细胞术检测发现,与 Con 组相比,CP 组凋亡率显著上升,凋亡比例增加,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ),提示 CP 诱导 HEK293 细胞凋亡。与 CP 组相比,CPJT-H、CPJT-M、CPJT-L 药物组干预治疗 CP 组后,细胞凋亡率显著降低( $P < 0.01$ ),且 CPJT-H 组效果最为显著,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。结果表明(见图 5),JT 组( $10 \mu\text{g/mL}$ )可以促进 HEK293 细胞的增殖,有效改善 CP 诱导的 HEK293 细胞凋亡。

## 2.6 荧光定量 PCR 检测 mRNA 水平表达的影响

各组药物作用 24 h 后,提取总 RNA,逆转录后

进行定量 PCR 扩增检测目的基因,以  $\beta$ -actin 基因为内参,在 mRNA 水平检测各目的基因相对表达情况。实验结果发现,各个溶解曲线未出现多峰现象,相应扩增曲线未发现有非特异性扩增及引物二聚体。与 Con 组相比,CP 组显著上调 HEK293 细胞中 Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、GRP78 及 CHOP mRNA 表达水平( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),下调 Bcl-2 mRNA 表达水平,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。与 CP 组相比,CPJT-H 组 Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、GRP78 及 CHOP mRNA 表达水平降低( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),Bcl-2 mRNA 表达水平升高,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )(见图 6)。

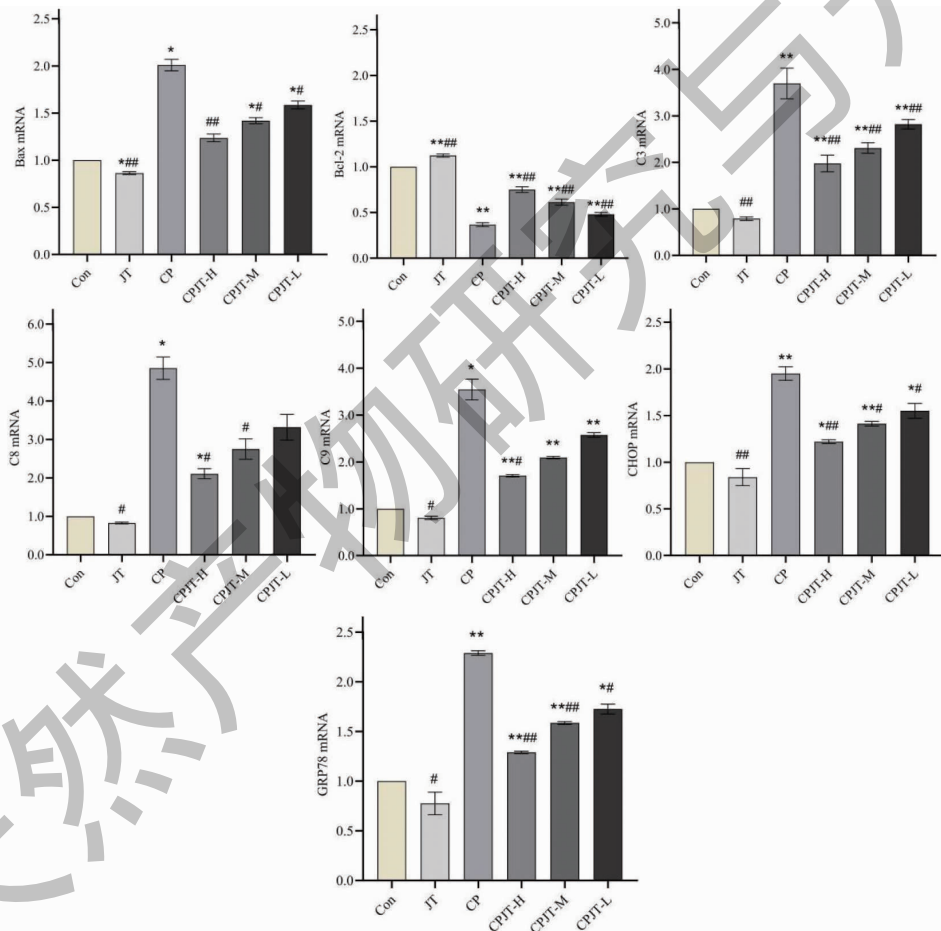


图 6 不同药物组作用 HEK293 细胞 24 h mRNA 表达水平( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 The 24 h mRNA expression of HEK293 cells was affected by different drug groups( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 2.7 Western blot 法检测相关凋亡蛋白的影响

Western blot 结果显示(见图 7),与 Con 组相比,CP 组中促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、GRP78、CHOP 的表达量显著升高( $P < 0.01$ ),抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达量下调( $P < 0.01$ )。

甘草内生菌治疗组干预模型组后,与 CP 组相比,促凋亡蛋白的表达量显著降低( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),Bcl-2 蛋白表达量上调( $P < 0.01$ ),且 CPJT-H 组效果最为显著( $P < 0.01$ )。提示甘草内生菌可能通过调节 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、

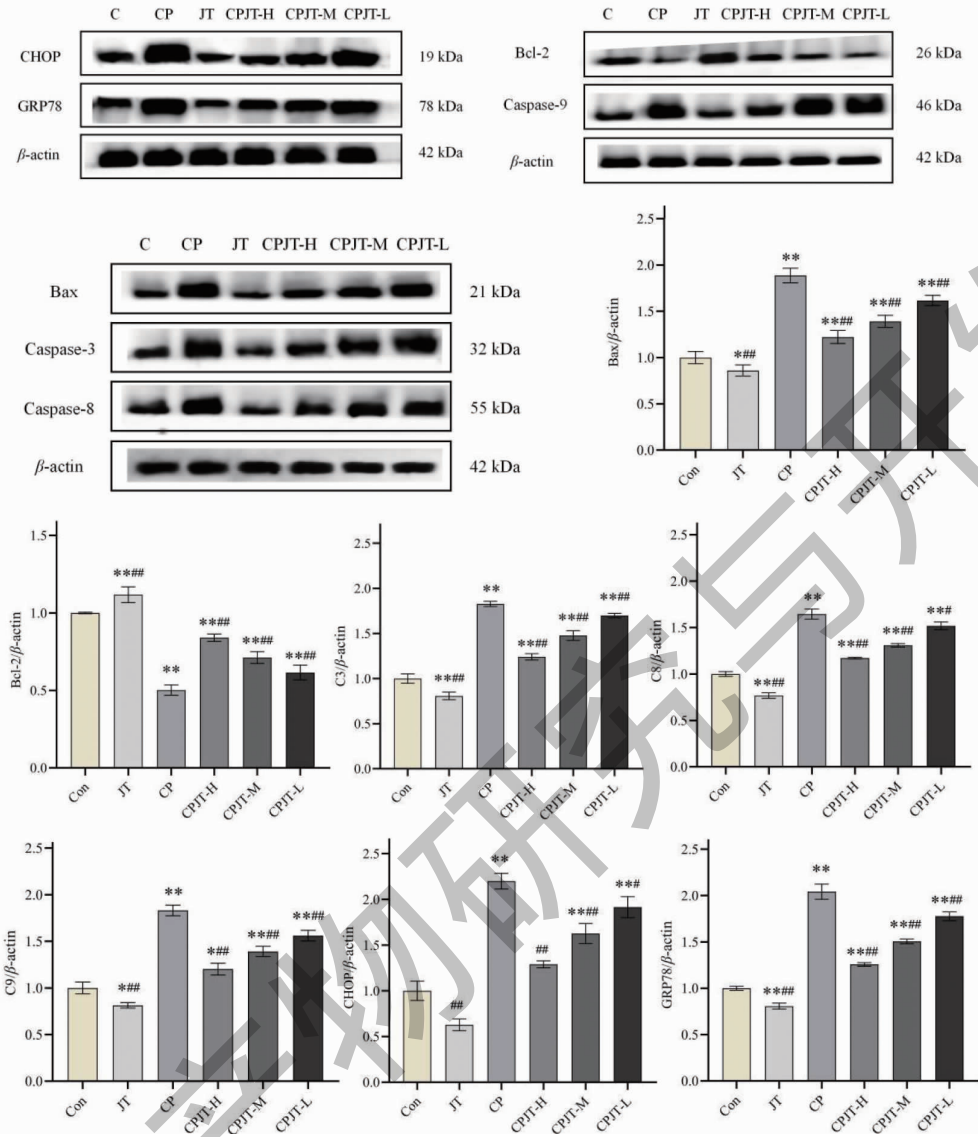


图7 各组药物作用 HEK293 细胞 24 h 后蛋白的相对表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 The relative expression level of protein in HEK293 cells after 24 h of drug treatment in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

GRP78、CHOP 蛋白表达改善 CP 诱导的 HEK293 细胞损伤。

### 3 讨论与结论

肾脏作为机体的主要排泄器官, CP 主要通过肾脏排泄, 在肾近端小管积聚, 形成高浓度、长时间的蓄积状态, 促进 ROS 的生成并抑制其代谢酶降解, 造成 ROS 在体内的大量蓄积, 进而诱导细胞凋亡, 造成肾脏损伤<sup>[23]</sup>。甘草具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、清除自由基的药理作用, 可减少 ROS 生成, 改善细胞凋亡状态<sup>[24, 25]</sup>。甘草内生菌与甘草共生, 属于药用微生物资源, 具有与宿主甘草相似的药理活性, 能够降低马钱子引起的肾脏损伤, 亦具有改善顺铂肾

毒性的潜在活性<sup>[6]</sup>。本研究通过 MTT 法对不同药物干预组进行吸光度测定, 结果表明, CP 诱导的 HEK293 细胞损伤具有时间剂量依赖性, 与 CP 组比较, 甘草内生菌治疗组显著改善细胞损伤, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。倒置显微镜下观察发现, 联合用药组细胞皱缩形态明显减轻, 贴壁能力有所恢复, 与文献报道一致。流式细胞术检测发现与 Con 组相比, CP 组凋亡率显著升高 ( $P < 0.01$ ), 与 CP 组相比, 联合治疗组凋亡率降低, 且 CPJT-H 组效果最为显著 ( $P < 0.01$ )。与 MTT 实验结果一致, 进一步提示甘草内生菌对 CP 诱导的 HEK293 细胞损伤具有保护作用。



细胞凋亡过程非常复杂,可分为内源性途径、外源性途径及内质网应激途径。Bcl-2 家族在细胞凋亡中起关键作用,包括抗凋亡蛋白如 Bcl-2 和促凋亡蛋白如 Bax<sup>[26]</sup>。Bcl-2 在线粒体凋亡途径中具有主要调控作用,可通过激活下游基因造成细胞凋亡<sup>[27]</sup>。Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 是 Caspase 家族中的主要成分,在细胞凋亡中常作为重要指标来检测细胞凋亡的程度<sup>[28]</sup>。GRP78 及 CHOP 则是内质网应激的标志蛋白,是内质网应激介导细胞凋亡的重要组成部分<sup>[29]</sup>。通过考察 Bcl-2 家族、Caspase 家族以及内质网应激凋亡蛋白探讨甘草内生菌对 CP 诱导 HEK293 细胞凋亡的保护作用机制,实验结果显示,与 Con 组相比,CP 干预后使 Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、GRP78、CHOP 的 mRNA 及蛋白相对表达量上调 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), Bcl-2 的 mRNA 及蛋白相对表达量降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与 CP 组相比,甘草内生菌各治疗药物组干预后,对 CP 诱导的 HEK293 细胞损伤均有一定程度的改善作用。其中 CPJT-H 组的 Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、GRP78、CHOP 的 mRNA 及蛋白相对表达量明显降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), Bcl-2 的 mRNA 及蛋白相对表达量升高 ( $P < 0.01$ )。

综上,甘草内生菌能降低 CP 诱导的 HEK293 细胞的凋亡,并通过抑制促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、GRP78、CHOP 的表达并促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,从而减轻 CP 诱导肾毒性作用,为甘草内生菌与 CP 联用减毒提供依据,扩充甘草内生菌的药理作用。

#### 参考文献

- 1 Cao SS, Gong S, Yan M, et al. preventive effects of Danshen on cisplatin-induced hepatotoxicity [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2017, 33: 144-145.
- 2 Nematabkhsh M, Ashrafi F, Pezeshki Z, et al. A histopathological study of nephrotoxicity, hepatotoxicity or testicular toxicity; which one is the first observation as side effect of cisplatin-induced toxicity in animal model [J]. Nephrothol, 2012, 1: 190-193.
- 3 Chen Y, Ling X, Xu LM, et al. Research progress in the protective effect of traditional chinese medicine on cisplatin-induced nephrotoxicity and its mechanism [J]. Oncol Pharm (肿瘤药理学), 2020, 10: 21-26.
- 4 Zhang N, Yan X, Lian XL, et al. Prevention and treatment of cisplatin-induced Liver and kidney damage by active compo-

- 5 nents of Gancao: a review [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2023, 39: 125-128.
- 6 Wu YL, Fan KK, Chai CZ, et al. Advance of active ingredients of traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of cisplatin-induced nephrotoxicity [J]. Strait Pharm J (海峡药理学), 2019, 31: 1-4.
- 7 Yan X, Deng Y, Ma J, et al. Research advance in mechanism of cisplatin toxic injury and the its prevention and treatment mechanism of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Exp Tradit Med Form (中国实验方剂学杂志), 2021, 27: 233-242.
- 8 Liu WJ, Li LQ, Tang JH, et al. Diversity and antibacterial activity of endophytic fungi from licorice [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2021, 33: 256-267.
- 9 Li BL, Kang JM, Tian YR, et al. Research progress on newly discovered chemical constituents and pharmacological effects of Glycyrrhiza Radix et Rhizoma [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2021, 52: 2438-2448.
- 10 Pastorino G, Cornara L, Soares S, et al. Liquorice (*Glycyrrhiza glabra*): a phytochemical and pharmacological review [J]. Phytother Res, 2018, 32: 2323-2339.
- 11 He Y, Ci X, Xie Y, et al. Potential detoxification effect of active ingredients in liquorice by upregulating efflux transporter [J]. Phytomedicine, 2019, 56: 175-182.
- 12 Tserga E, Nandwani T, Edvall NK, et al. The genetic vulnerability to cisplatin ototoxicity: a systematic review [J]. Sci Rep, 2019, 9: 3455.
- 13 Rao XL, Shen DL, Li J, et al. Isolation of endophytic bacteria from *Glycyrrhiza* and identifying of antagonistic bacteria [J]. Microbiol Chin (微生物学通报), 2007, 34: 700-704.
- 14 Man Q, Yang ZJ, Deng Y, et al. Research progress of identification, pharmacological action and active ingredients of endophytes isolated from *Glycyrrhiza uralensis* [J]. Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志), 2018, 34: 1125-1128.
- 15 Man Q, Deng Y, Yang ZJ, et al. Comparative study on antitussive effect of effective strains of endophytic bacteria of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. and host decoction, total brass and total saponins [J]. Tradit Chin Med Res (中医研究), 2016, 29: 64-68.
- 16 Yang ZJ, Deng Y, Man Q, et al. Comparative study on antitussive and expectorant effects between *Glycyrrhiza* Decoction and endophytic [J]. Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志), 2017, 33: 1143-1148.
- 17 Zhao N. Comparative study on antimicrobial activity between the Gansu wild and cultivated licorice endophyte fermentation product and the host plant and its medicinal ingredient [D]. Lanzhou: Gansu University Traditional Chinese Medicine (甘

- 肃中医药大学), 2016.
- 17 Yang ZJ, Deng Y, Man Q, et al. Anti-inflammatory effects in the metabolites of endophytes *Glycyrrhiza uralensis* [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药理学), 2018, 35: 633-637.
- 18 Man Q, Deng Y, Yang ZJ, et al. Comparative study on the intervention effect of endophytic bacteria isolated from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* on rats with phlegm turbidity obstructing in the lung [J]. Chin J Modern Appl Pharm (中国现代应用药理学), 2017, 34: 161-165.
- 19 Yang ZJ, Deng Y, Yang XJ, et al. Content determination of ammonium glycyrrhetate, liquiritin and liquiritigenin in the fermentation products of endophytes from *Glycyrrhiza uralensis* by RP-HPLC [J]. J Gansu Univ Chin Med (甘肃中医药大学学报), 2018, 35: 30-35.
- 20 Shah A, Rather MA, Hassan QP, et al. Discovery of anti-microbial and anti-tubercular molecules from *Fusarium solani*; an endophyte of *Glycyrrhiza glabra* [J]. J Appl Microbiol, 2017, 122: 1168-1176.
- 21 Yan X, Ma J, Zhang N, et al. Establishment of nephrotoxicity model induced by total alkaloids of *Strychni Semen* and comparison of attenuated effects of endophytes metabolites from *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* [J]. Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志), 2022, 38: 121-126.
- 22 Wang JJ, Yuan PC, Xu HS, et al. Study on apoptosis of SGC-7901 cells induced by extracellular polysaccharide of *Fusarium gramineosum* and its mechanism [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2022, 34: 1204-1212.
- 23 Li J, Yu K, He YX, et al. Protective effect of royal jelly on cisplatin induced HEK-293 cell damage and its mechanism [J]. J Toxicol (毒理学杂志), 2020, 34: 241-245.
- 24 Wang W, Hu X, Zhao Z, et al. Antidepressant-like effects of liquiritin and isoliquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in the forced swimming test and tail suspension test in mice [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2008, 32: 1179-1184.
- 25 Koyama M, Shirahata T, Hirashima R, et al. Inhibition of UDP-glucuronosyltransferase (UGT)-mediated glycyrrhetic acid 3-O-glucuronidation by polyphenols and triterpenoids [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2017, 32: 218-223.
- 26 Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis [J]. Genes Dev, 1999, 13: 1899-1911.
- 27 Tsukahara S, Yamamoto S, Shwe TT, et al. Inhalation of low-level formaldehyde increases the bcl-2/Bax expression ratio in the hippocampus of immunologically sensitized mice [J]. Neuroimmunomodulation, 2006, 13: 63-68.
- 28 Liu D, Zhang H, Zhang HX, et al. Ginsenoside F<sub>2</sub> interferes with Caspase cascade to inhibit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis [J]. Mod Food Sci Technol (现代食品科技), 2020, 36: 11-16.
- 29 Limonta P, Moretti RM, Marzagalli M, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in the anticancer activity of natural compounds [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20: 961.