

枸杞多糖对 BaP 诱导人绒毛外滋养层细胞凋亡和侵袭的影响

张翠翠, 李永川, 孙文萍

(青海红十字医院产科, 青海 西宁 810000)

摘要:目的 研究枸杞多糖对苯并芘 (BaP) 诱导人绒毛外滋养层细胞凋亡和侵袭的影响和机制。方法 用 BaP 诱导人绒毛膜滋养层细胞, 以枸杞多糖干预, 流式细胞术检测细胞凋亡, Transwell 小室检测细胞侵袭和迁移, Western blot 检测细胞中 MMP-9、Bax、Bcl-2、p65 蛋白表达。用 p65 激活剂处理人绒毛膜滋养层细胞, 探讨 p65 激活剂对枸杞多糖影响人绒毛膜滋养层细胞凋亡和侵袭的作用。结果 与对照组比较, 模型组细胞凋亡率升高, 细胞侵袭能力下降, 细胞中 Bax、p65 蛋白表达升高 ($P<0.05$), MMP-9、Bcl-2 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 枸杞多糖各剂量组细胞凋亡率降低 ($P<0.05$), 细胞侵袭能力增强 ($P<0.05$), Bax、p65 蛋白表达降低 ($P<0.05$), MMP-9、Bcl-2 蛋白表达升高 ($P<0.05$), 并呈剂量依赖性。p65 激活剂可以逆转枸杞多糖对 BaP 诱导人绒毛膜滋养层细胞凋亡和侵袭的影响。结论 枸杞多糖具有拮抗 BaP 诱导的人绒毛膜滋养层细胞凋亡, 促进细胞侵袭的作用, 其机制可能与 p65 有关。

关键词: 枸杞多糖; 人绒毛膜滋养层细胞; 凋亡; 侵袭; 苯并芘 (BaP); p65

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)04-1318-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.04.054

近年来, 空气污染导致的胚胎发育异常已经成为国内外研究的热点。苯并芘 (BaP) 广泛存在于空气和水中, 属于多环芳烃类化合物, BaP 是一种常见的空气污染物, 能够引发早产、胎儿生长受限等不良妊娠^[1-2]。绒毛滋养层细胞是胎盘功能发挥和胚胎成功着床的主要因素, 而其过度凋亡和侵袭受阻是不良妊娠发生的关键^[3]。枸杞多糖是枸杞的有效成分, 是由酸性杂多糖、多肽、蛋白质组成的复合多糖, 具有抗氧化、抗衰老、增强免疫力等功效^[4]。研究表明, 枸杞多糖能够保护生殖系统, 可减轻氧化损伤并促进绒毛滋养层细胞生长和分泌人绒毛膜促性腺激素^[5]。目前, 枸杞多糖对 BaP 诱导人绒毛膜滋养层细胞凋亡和侵袭的影响尚不明确。本实验以人绒毛膜滋养层细胞为体外研究对象, 通过流式细胞术、Transwell 小室探讨枸杞多糖对 BaP 诱导人绒毛膜滋养层细胞凋亡和侵袭能力的影响, 以期对枸杞多糖在不良妊娠中的作用提供参考。

1 材料

1.1 细胞 人绒毛膜滋养层细胞购自上海弘顺生物科技有限公司。

1.2 试剂与药物 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体购自深圳市豪地华拓生物科技有限公司; B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 抗体购自武汉艾美捷科技有限公司; 膜联蛋白 V-FITC (Annexin V-FITC)/碘化丙啶 (PI) 细胞凋亡检测试剂盒购自上海雅吉生物科技有限公司; 苯并芘 (BaP) 购自无锡美赞化学品有限公司; 基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 抗体、p65 抗体购自武汉友联特生物技术有限公司; p65 激

活剂佛波酯 (PMA) 购自美国 Sigma 公司。枸杞多糖 (纯度 90%) 购自北京索莱宝科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞分组与处理 人绒毛膜滋养层细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 细胞培养液中, 培养条件为 37 ℃、5% CO₂。人绒毛膜滋养层细胞分为对照组、模型组及枸杞多糖低、中、高剂量组, 对照组细胞不做处理; 模型组细胞用含 20 μmol/L BaP 的细胞培养液进行培养; 枸杞多糖低、中、高剂量组细胞分别用含 20 μmol/L BaP 和 80、160、240 μg/mL 枸杞多糖的细胞培养液进行培养。

2.2 流式细胞术测定细胞凋亡 培养 24 h 后, 收集各组细胞, 用 PBS 溶液将各组细胞密度调整为 1×10^6 /mL, 吸取 1 mL 细胞悬浮液, 1 000×g 离心 10 min, 弃上清, 在细胞中添加 500 μL Binding buffer 溶液, 充分混合, 添加 PI、Annexin V-FITC 染色液各 5 μL, 避光孵育 20 min, 用流式细胞仪检测凋亡。

2.3 Transwell 小室检测细胞侵袭能力 首先将 8 μm Transwell 小室放入 24 孔板中, 每孔中添加 300 μL 不含血清的细胞培养液, 室温孵育 30 min, 弃培养液, 用不含血清的细胞培养液调整细胞密度为 1×10^5 /mL, 在 Transwell 小室的下室中加入 500 μL 含 10% 胎牛血清的细胞培养液, 然后在上室中加入 200 μL 细胞悬液, 培养 24 h 后, 用 4% 多聚甲醛固定, 结晶紫染色 20 min, PBS 洗涤小室 3 次, 显微镜下观察细胞穿膜数目即为细胞侵袭数目, 随机选择 5 个视野, 取平均值。

收稿日期: 2020-07-30

作者简介: 张翠翠 (1983—), 女, 主治医师, 从事产科危重症研究。Tel: 18997289949, E-mail: 93685253@qq.com

2.4 Western blot 检测 MMP-9、Bax、Bcl-2、p65 蛋白表达 培养 24 h 后, 收集各组细胞, 加入细胞裂解液, 转移到 1.5 mL EP 管中, 置于冰上超声粉碎, 4 ℃ 裂解 30 min, 15 000×g 离心 10 min, 吸取上清, 即为细胞总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度。配制 5% 上层浓缩胶和 10% 下层分离胶, 每孔蛋白上样量为 30 μg, 100 V 恒压电泳, 90 V 转膜 90 min。将 PVDF 膜取出并放在 5% 牛血清白蛋白中, 常温孵育 1 h, 再依次放在一抗、二抗溶液中结合反应, ECL 显色, 使用 Image J 软件分析条带灰度值, 并计算目的蛋白相对表达。

2.5 p65 激活剂对枸杞多糖干预 BaP 诱导人绒毛膜滋养层细胞的作用 细胞分为枸杞多糖中剂量组 (20 μmol/L BaP+160 μg/mL 枸杞多糖) 和枸杞多糖中剂量+PMA 组 (20 μmol/L BaP+160 μg/mL 枸杞多糖+2 ng/mL p65 激活剂

PMA), 加药培养 24 h 后收集细胞, 流式细胞术检测细胞凋亡, Transwell 小室检测细胞侵袭, Western blot 检测 MMP-9、Bax、Bcl-2、p65 蛋白表达。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 枸杞多糖对 BaP 诱导人绒毛膜滋养层细胞凋亡的影响 与对照组比较, 模型组细胞凋亡率升高 (P<0.05); 与模型组比较, 枸杞多糖各剂量组细胞凋亡率降低 (P<0.05), 并呈剂量依赖性, 结果见图 1、表 1。由此可知, 枸杞多糖抑制 BaP 诱导人绒毛膜滋养层细胞凋亡。

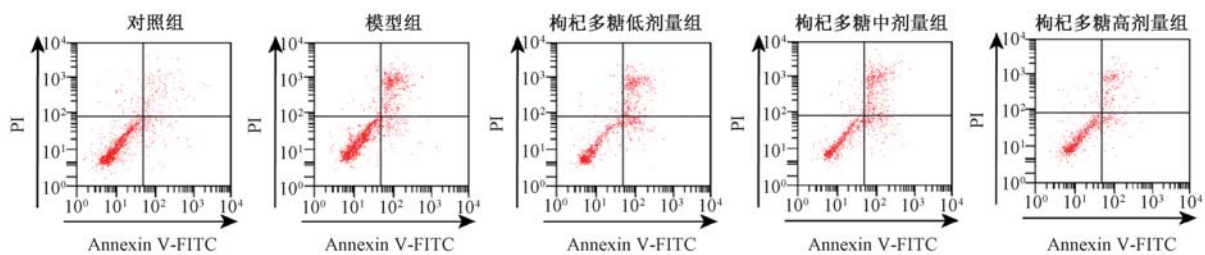


图 1 各组细胞凋亡

表 1 枸杞多糖对细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=9)

组别	凋亡率/%
对照组	7.88±0.62
模型组	26.72±2.31 [*]
枸杞多糖低剂量组	19.66±1.23 ^{&}
枸杞多糖中剂量组	13.01±1.05 ^{&#}
枸杞多糖高剂量组	9.92±0.71 ^{&#Δ}

注:与对照组比较, * P<0.05; 与模型组比较, & P<0.05; 与枸杞多糖低剂量组比较, # P<0.05; 与枸杞多糖中剂量组比较, Δ P<0.05。

3.2 枸杞多糖对 BaP 诱导人绒毛膜滋养层细胞侵袭的影响 与对照组比较, 模型组细胞侵袭数减少 (P<0.05); 与模型组比较, 枸杞多糖各剂量组细胞侵袭数增加 (P<0.05), 并呈剂量依赖性, 结果见表 2。由此可知, 枸杞多糖促进 BaP 诱导人绒毛膜滋养层细胞侵袭。

表 2 枸杞多糖对细胞侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=9)

组别	侵袭数/个
对照组	152.34±12.05
模型组	59.67±6.31 [*]
枸杞多糖低剂量组	72.14±6.52 ^{&}
枸杞多糖中剂量组	96.32±5.21 ^{&#}
枸杞多糖高剂量组	134.74±11.20 ^{&#Δ}

注:与对照组比较, * P<0.05; 与模型组比较, & P<0.05; 与枸杞多糖低剂量组比较, # P<0.05; 与枸杞多糖中剂量组比较, Δ P<0.05。

3.3 枸杞多糖对 BaP 诱导人绒毛膜滋养层细胞 MMP-9、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 与对照组比较, 模型组细胞 MMP-9、Bcl-2 蛋白表达降低 (P<0.05), Bax 蛋白表达升高 (P<0.05); 与模型组比较, 枸杞多糖各剂量组细胞

MMP-9、Bcl-2 蛋白表达升高 (P<0.05), Bax 蛋白表达降低 (P<0.05), 并呈剂量依赖性, 见图 2、表 3。

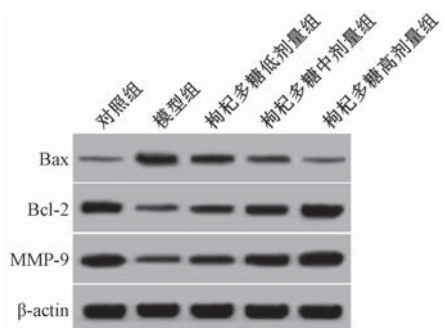


图 2 各组细胞 MMP-9、Bax、Bcl-2 蛋白表达

表 3 枸杞多糖对细胞 MMP-9、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=9)

组别	MMP-9	Bax	Bcl-2
对照组	0.96±0.09	0.32±0.04	0.70±0.08
模型组	0.40±0.03 [*]	0.72±0.07 [*]	0.38±0.04 [*]
枸杞多糖低剂量组	0.56±0.05 ^{&}	0.59±0.05 ^{&}	0.51±0.04 ^{&}
枸杞多糖中剂量组	0.69±0.06 ^{&#}	0.42±0.04 ^{&#}	0.63±0.05 ^{&#}
枸杞多糖高剂量组	0.99±0.11 ^{&#Δ}	0.30±0.03 ^{&#Δ}	0.73±0.04 ^{&#Δ}

注:与对照组比较, * P<0.05; 与模型组比较, & P<0.05; 与枸杞多糖低剂量组比较, # P<0.05; 与枸杞多糖中剂量组比较, Δ P<0.05。

3.4 枸杞多糖对 BaP 诱导人绒毛膜滋养层细胞 p65 蛋白表达的影响 与对照组比较, 模型组细胞 p65 蛋白表达升高 (P<0.05); 与模型组比较, 枸杞多糖各剂量组细胞 p65 蛋白表达降低 (P<0.05), 并呈剂量依赖性, 见图 3、表 4。

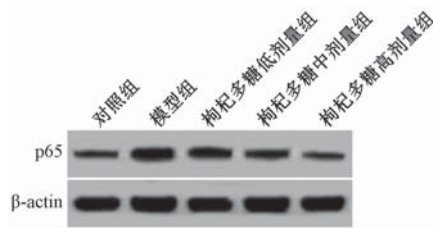


图 3 各组细胞 p65 蛋白表达

表 4 枸杞多糖对细胞 p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	p65
对照组	0.46±0.06
模型组	0.98±0.10*
枸杞多糖低剂量组	0.76±0.07 ^{&}
枸杞多糖中剂量组	0.59±0.05 ^{&#}
枸杞多糖高剂量组	0.43±0.04 ^{&#△}

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[&] $P<0.05$;与枸杞多糖低剂量组比较,[#] $P<0.05$;与枸杞多糖中剂量组比较,[△] $P<0.05$ 。

3.5 PMA 逆转枸杞多糖对 BaP 诱导人绒毛膜滋养层细胞 p65 蛋白表达的影响 各剂量枸杞多糖对人绒毛膜滋养层细胞均有作用,选择中剂量初步探讨其作用机制。与枸杞多糖中剂量组比较,枸杞多糖中剂量+PMA 组细胞 p65 蛋白表达升高 ($P<0.05$),结果见图 4、表 5。由此可知,PMA 逆转枸杞多糖对人绒毛膜滋养层细胞 p65 蛋白表达影响。

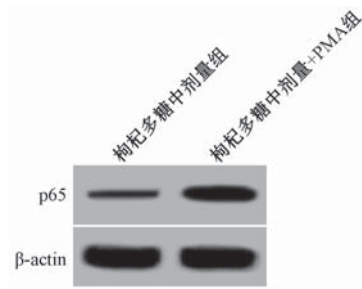


图 4 PMA 对细胞 p65 蛋白表达的影响

表 5 PMA 逆转枸杞多糖对细胞 p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	p65
枸杞多糖中剂量组	0.56±0.08
枸杞多糖中剂量+PMA 组	0.78±0.09*

注:与枸杞多糖中剂量组比较,* $P<0.05$ 。

3.6 PMA 逆转枸杞多糖对 BaP 诱导人绒毛膜滋养层细胞凋亡率、侵袭数以及 MMP-9、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 与枸杞多糖中剂量组比较,枸杞多糖中剂量+PMA 组细胞凋亡率、细胞侵袭数及细胞中 Bax、MMP-9 蛋白表达均降低 ($P<0.05$),Bax 蛋白表达升高 ($P<0.05$),见图 5、表 6。

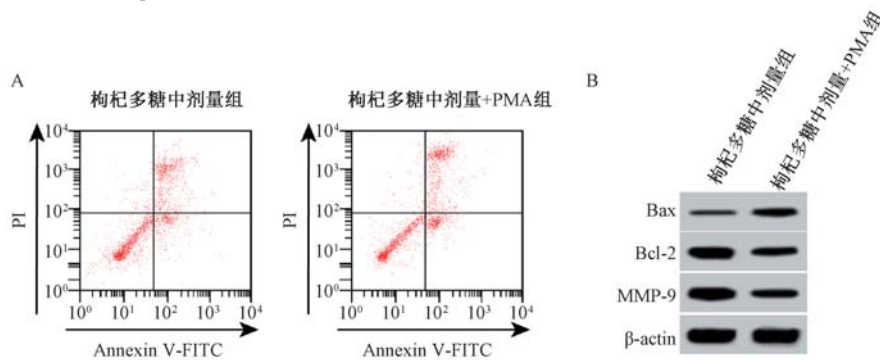


图 5 各组细胞凋亡 (A) 和 MMP-9、Bcl-2、Bax 蛋白表达 (B)

表 6 PMA 对细胞凋亡率、侵袭数及 MMP-9、Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	凋亡率/%	侵袭数/个	MMP-9	Bax	Bcl-2
枸杞多糖中剂量组	12.54±1.13	95.21±6.35	0.73±0.09	0.45±0.06	0.74±0.06
枸杞多糖中剂量+PMA 组	19.62±1.52*	63.47±5.28*	0.55±0.05*	0.58±0.05*	0.52±0.07*

注:与枸杞多糖中剂量组比较,* $P<0.05$ 。

4 讨论

环境污染是影响人类生殖系统正常功能的重要原因,其可诱发子宫内膜异位症、月经紊乱、多囊卵巢综合征等疾病^[6]。绒毛滋养层细胞成功侵入子宫内膜是成功妊娠的基础^[7]。BaP 是一个典型的多环芳烃类化合物,可诱导 DNA 损伤、畸形和突变^[8]。BaP 处理可以诱导人绒毛膜滋养层细胞过度凋亡和侵袭能力下降,所以常作为体外研究绒毛滋养层细胞损伤的诱导因子^[9]。Bax 和 Bcl-2 均属于 Bcl-2 蛋白家族成员,分别在细胞凋亡过程中发挥促进和抑制作用^[10]。MMP-9 是细胞侵袭促进因子,其水平的高低与

细胞侵袭能力正相关^[11]。本实验结果表明,BaP 处理后的人绒毛膜滋养层细胞凋亡率升高,细胞侵袭能力下降,细胞中 Bax 蛋白表达升高,Bcl-2、MMP-9 蛋白表达下降,说明 BaP 抑制人绒毛膜滋养层细胞侵袭并诱导细胞凋亡,提示成功构建了人绒毛膜滋养层细胞体外损伤模型。

枸杞是我国传统中药,具有明目、补肝肾等功效。枸杞多糖是枸杞的关键活性成分,具有抗肿瘤、抗氧化、调节免疫力、降血脂、抗辐射等作用^[12-14]。研究显示,枸杞多糖具有保护生殖系统的作用,可以降低生殖系统损伤,枸杞多糖灌胃后,实验性高血压妊娠小鼠胎盘明显改

善^[15-17]。本实验发现,枸杞多糖能够降低 BaP 处理后的人绒毛膜滋养层细胞凋亡,促进人绒毛膜滋养层细胞侵袭,降低细胞中促凋亡蛋白 Bax 的表达,增加细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促细胞转移蛋白 MMP-9 的表达,提示枸杞多糖可以抑制 BaP 诱导人绒毛膜滋养层细胞凋亡并促进细胞侵袭。

p65 是 NF- κ B 信号激活的必需调控因子,其表达升高标志着 NF- κ B 信号激活水平升高^[18-21]。研究显示, NF- κ B 参与人绒毛膜滋养层细胞损伤,在细胞损伤发生时过度激活,而下调其激活水平可以促进人绒毛膜滋养层细胞侵袭并降低细胞凋亡发生^[22]。本实验表明,枸杞多糖可以降低 BaP 处理后的人绒毛膜滋养层细胞中 p65 蛋白表达,而 p65 激活剂可以逆转枸杞多糖对人绒毛膜滋养层细胞凋亡和侵袭的作用。

综上所述,枸杞多糖可能通过降低 BaP 诱导人绒毛膜滋养层细胞凋亡、促进细胞侵袭而发挥保护作用,其机制可能与 p65 有关。目前对于枸杞多糖调控 p65 下游机制和体内作用还不清楚,仍需进一步探讨。

参考文献:

- [1] Miller C N, Stewart E J, Snow S J, *et al.* Ozone exposure during implantation increases serum bioactivity in HTR-8/SVneo trophoblasts[J]. *Toxicol Sci*, 2019, 168(2): 535-550.
- [2] Slotkin T A, Skavicus S, Ko A, *et al.* The developmental neurotoxicity of tobacco smoke can be mimicked by a combination of nicotine and benzo [a] pyrene: effects on cholinergic and serotonergic systems [J]. *Toxicol Sci*, 2018, 167(1): 293-304.
- [3] Rao H Y, Bai Y X, Zhang F M, *et al.* The role of SATB1 in HTR8/SVneo cells and pathological mechanism of preeclampsia [J]. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2019, 32 (12): 2069-2078.
- [4] Tang R, Chen X Y, Dang T T, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharides extend the mean lifespan of *Drosophila melanogaster*[J]. *Food Funct*, 2019, 10(7): 4231-4241.
- [5] Li J, Ding Z J, Yang Y, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharides protect human trophoblast HTR8/SVneo cells from hydrogen peroxideinduced oxidative stress and apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(3): 2581-2588.
- [6] Kamai E M, McElrath T F, Ferguson K K. Fetal growth in environmental epidemiology: mechanisms, limitations, and a review of associations with biomarkers of non-persistent chemical exposures during pregnancy [J]. *Environ Health*, 2019, 18 (1): 43-72.
- [7] Jiang K Y, Wong L P, Chen Y M, *et al.* Soluble inflammatory mediators induce transcriptional re-organization that is independent of DNA methylation changes in cultured human chorionic villous trophoblasts [J]. *J Reprod Immunol*, 2018, 128(8): 2-8.
- [8] 连立芬,陈亚琼,侯海燕,等.山奈酚对 BaP 引起的人绒毛膜外滋养层细胞 HTR8/SVneo 凋亡的影响[J]. *国际妇产科学杂志*, 2014, 41(6): 674-676; 715.
- [9] 刘丽媛. 苯并 (a) 芘 (BaP) 对绒毛外滋养层细胞 HTR-8/SVneo 侵袭和迁移的影响及其机制探讨[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.
- [10] Rahmani M, Nkwocha J, Hawkins E, *et al.* Cotargeting BCL-2 and PI3K induces BAX-dependent mitochondrial apoptosis in AML cells[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(11): 3075-3086.
- [11] Conrad C, Götte M, Schlomann U, *et al.* ADAM8 expression in breast cancer derived brain metastases; functional implications on MMP-9 expression and transendothelial migration in breast cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2018, 142(4): 779-791.
- [12] 黄振华,邓向亮,张凯敏,等.枸杞多糖对免疫抑制小鼠红细胞免疫功能的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34 (2): 214-217.
- [13] Lakshmanan Y, Wong F Y, Yu W Y, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharides rescue neurodegeneration in an acute ocular hypertension rat model under pre- and posttreatment conditions [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(6): 2023-2033.
- [14] Deng X L, Luo S, Luo X, *et al.* Fraction from *Lycium barbarum* polysaccharides reduces immunotoxicity and enhances antitumor activity of doxorubicin in mice [J]. *Integr Cancer Ther*, 2018, 17(3): 860-866.
- [15] 颜 玲,朱诗平,边 璐,等.枸杞多糖与性腺损伤的修复[J]. *暨南大学学报 (自然科学与医学版)*, 2019, 40(2): 95-100.
- [16] 潘正军,刘 畅,张 燕,等.枸杞多糖对高血压孕鼠肾脏胎盘及胎鼠肾脏结构的影响[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(6): 1528-1531.
- [17] 潘正军,张晓蕾,周建武,等.枸杞多糖对实验性高血压妊娠小鼠血压和胎鼠发育的影响[J]. *生殖与避孕*, 2009, 29(2): 70-72; 112.
- [18] Ge W L, Yue Y, Xiong S D. POM121 inhibits the macrophage inflammatory response by impacting NF- κ B P65 nuclear accumulation[J]. *Exp Cell Res*, 2019, 377(1-2): 17-23.
- [19] Suzuki K, Nagaoka M, Igarashi K, *et al.* MPMBP, a novel bisphosphonate with an antioxidant side chain, stimulates bone formation through inhibition of NF- κ B nuclear translocation [J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2019, 153(1): 4-10.
- [20] Xie Z A, Yu H J, Sun X W, *et al.* A novel diterpenoid suppresses osteoclastogenesis and promotes osteogenesis by inhibiting Irf1-mediated and I κ B α -mediated p65 nuclear translocation[J]. *J Bone Miner Res*, 2018, 33(4): 667-678.
- [21] Huo X F, Zhang X, Yu C H, *et al.* Aspirin prevents NF- κ B activation and CDX2 expression stimulated by acid and bile salts in oesophageal squamous cells of patients with Barrett ' s oesophagus[J]. *Gut*, 2018, 67(4): 606-615.
- [22] 洪国敏. 姜黄素抑制脂多糖诱导的人绒毛外滋养细胞 miR-155 表达及细胞凋亡[D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.