

基于Nrf2/TXNIP信号通路探讨葛根芩连汤含药血清对非酒精性脂肪性肝炎的影响

魏悦¹, 盛军庆², 程子文¹, 罗小泉¹, 宋针珍¹, 吴爱兰¹, 曹岚^{1*}, 章常华^{1*}

(1. 江西中医药大学药学院, 实验动物科技中心, 中药资源与民族药研究中心, 南昌 330004;

2. 南昌大学生命科学学院, 南昌 330031)

[摘要] 目的:探讨葛根芩连汤(GGQLT)含药血清对游离脂肪酸(FFA)诱导人肝癌细胞HepG2非酒精性脂肪性肝炎(NASH)体外模型的影响。方法:建立HepG2细胞NASH体外模型,使用不同体积分数的GGQLT含药血清及白藜芦醇干预细胞。利用油红O染色检测各组细胞内脂质沉积;采用流式细胞术检测各组细胞内活性氧(ROS)水平;通过试剂盒检测各组细胞内谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和甘油三酯(TG)、丙二醛(MDA)含量。采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组HepG2细胞内核转录因子(NF)_{E2}相关因子2(Nrf2)、血红素加氧酶-1(HO-1)、醌氧化还原酶1(NQO1)、Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)、NF- κ B、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)的mRNA表达情况。运用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组细胞Nrf2、TXNIP的蛋白表达情况。结果:FFA诱导引起细胞内脂质大量堆积。与正常组比较,模型组抗氧化酶GSH-Px和SOD的活性显著降低($P<0.01$),TG、ROS和MDA含量明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,GGQLT各剂量组和白藜芦醇组均可不同程度地升高细胞内SOD的活性($P<0.05$, $P<0.01$),明显降低细胞内ROS、MDA水平($P<0.05$, $P<0.01$);GGQLD高、中剂量组和白藜芦醇组可显著升高GSH-Px的活性($P<0.01$),GGQLD中、低剂量组和白藜芦醇组明显降低TG的含量($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较,GGQLT高、中剂量组和白藜芦醇组可显著上调Nrf2、HO-1、NQO1的mRNA表达水平($P<0.01$),GGQLT各剂量组、白藜芦醇组可明显下调TXNIP蛋白表达水平和Keap1、NF- κ B的mRNA表达水平($P<0.05$, $P<0.01$)。Nrf2-小分子干扰核糖核酸(siRNA)转染细胞后发现,与相应剂量药物的阴性对照(NC)-siRNA组比较,其Nrf2-siRNA组细胞内Nrf2表达显著下调($P<0.01$);GGQLT和白藜芦醇对TXNIP、IL-1 β 的抑制作用被减弱。结论:FFA诱导HepG2细胞内产生ROS和炎症因子,GGQLT可提高细胞的抗炎、抗氧化能力,其作用机制可能与调节Nrf2/TXNIP信号通路相关,进而达到改善NASH的目的。

[关键词] 葛根芩连汤; 含药血清; 非酒精性脂肪性肝炎(NASH); 氧化应激; 炎症因子; 核转录因子(NF); 硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)

[中图分类号] R22;R28;R96;TS193 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)20-0008-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220254

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220126.1854.005.html>

[网络出版日期] 2022-01-28 7:49

Effect of Gegen Qinliantang-medicated Serum on Nonalcoholic Steatohepatitis Based on Nrf2/TXNIP Signaling Pathway

WEI Yue¹, SHENG Junqing², CHENG Ziwen¹, LUO Xiaoquan¹, SONG Zhenzhen¹,

WU Ailan¹, CAO Lan^{1*}, ZHANG Changhua^{1*}

(1. Research Center for Traditional Chinese Medicine Resources and Ethnic Minority Medicine,

Laboratory Animal Science and Technology Center, School of Pharmacy,

[收稿日期] 2021-10-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774194);江西省自然科学基金重点项目(20192ACBL20027);江西省教育厅科技计划重点项目(GJJ190636);江西省教育厅科技计划一般项目(GJJ213111)

[第一作者] 魏悦,在读硕士,从事中药及天然产物药理研究,E-mail:2206943189@qq.com

[通信作者] *章常华,教授,博士生导师,从事中药及天然产物药理研究,E-mail:zhangch305@126.com;

*曹岚,副教授,硕士生导师,从事中药资源、质量标准及民族药研究,E-mail:19960248@jxutcm.edu.cn

Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Gegen Qinliantang (GGQLT)-medicated serum on free fatty acid (FFA)-induced nonalcoholic steatohepatitis (NASH) *in vitro* model of human hepatoma cells HepG2. **Method:** NASH model of HepG2 cells was established *in vitro*, and the cells were intervened with different volume fractions of GGQLT-medicated serum and resveratrol. Intracellular lipid deposition in each group was detected by oil red O staining, the level of reactive oxygen species (ROS) in each group were detected by flow cytometry, the levels of glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), triglyceride (TG) and malondialdehyde (MDA) in each group were detected by kits. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to measure the mRNA expression levels of nuclear transcription factor (NF) E₂-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), quinone oxidoreductase 1 (NQO1), Kelch-like epichlorohydrin-associated protein-1 (Keap1), NF- κ B, thioredoxin interacting protein (TXNIP), interleukin-1 β (IL-1 β) in HepG2 cells of each group. The protein expression of Nrf2, TXNIP in cells of each group was detected by Western blot. **Result:** FFA induced large accumulation of intracellular lipids. Compared with the normal group, the activities of GSH-Px and SOD were significantly decreased ($P < 0.01$) and the contents of TG, ROS and MDA were significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the model group. Compared with the model group, all GGQLT groups and resveratrol group could elevate intracellular SOD activity to different degrees ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and significantly reduce the levels of intracellular ROS and MDA ($P < 0.05$, $P < 0.01$), GGQLD high- and medium-dose groups and resveratrol group significantly elevated GSH-Px activity ($P < 0.01$), GGQLD medium- and low-dose groups and resveratrol group significantly decreased TG content ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, GGQLT high- and medium-dose groups and resveratrol group could significantly upregulate the mRNA expression levels of Nrf2, HO-1 and NQO1 ($P < 0.01$), all GGQLT groups and resveratrol group could significantly downregulate the TXNIP protein expression level, as well as significantly downregulate the mRNA expression levels of Keap1, NF- κ B ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Nrf2-siRNA transfection of cells revealed that Nrf2 expression was significantly downregulated ($P < 0.01$) in the Nrf2-siRNA group of cells by comparing with NC-siRNA group at the corresponding dose of drugs, and the inhibitory effects of GGQLT and resveratrol on TXNIP, IL-1 β were attenuated. **Conclusion:** FFA induces the production of ROS and inflammatory factors in HepG2 cells, and GGQLT can improve the anti-inflammatory and antioxidant capacities of cells, and its mechanism may be related to the regulation of Nrf2/TXNIP signaling pathway, so as to improve NASH.

[Keywords] Gegen Qinliantang; medicated serum; nonalcoholic steatohepatitis (NASH); oxidative stress; inflammatory factors; nuclear transcription factor (NF); thioredoxin interacting protein (TXNIP)

非酒精性脂肪性肝炎(NASH)是一种慢性进行性肝病,也是非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的炎症亚型,其常伴有脂肪变性、肝细胞损伤(气球状样变)、氧化应激、炎症、纤维化等问题^[1]。据统计,目前全球NASH患病率为15%~56%^[2]。随着城市化的发展,预计我国将是NAFLD患病率增长较快的国家。油酸(OA)和棕榈酸(PA)是人体内含量较高的游离脂肪酸(FFA),也是肝脏中甘油三酯(TG)的主要成分和饮食中常见的长链脂肪酸,采用OA和PA联合造模,可模拟NASH中FFA堆积的体外脂质

代谢环境^[3]。FFA在NASH患者的肝脏中过度沉积,脂质代谢失调会导致脂毒性,细胞内产生大量活性氧(ROS)破坏抗氧化平衡,最终引起氧化应激和炎症反应^[3-4]。核转录因子(NF)E₂相关因子2(Nrf2)是与氧化应激有关的转录因子,血红素加氧酶-1(HO-1)是一种抗氧化酶^[4-5]。有研究显示,通过调控Nrf2抗氧化信号通路能够有效抑制炎症并改善NASH^[5-6]。现阶段临床仍缺乏治疗NASH的有效药物,而中医药在防治NASH方面具有潜在优势。

葛根芩连汤(GGQLT)出自《伤寒论》,是治疗NASH的经典名方^[6-7]。中医认为,NASH属“肝癖”,其证候以“邪实”为主,湿浊内生为始动因素,“湿热蕴于血分”为基本病机,可用清热利湿法;GGQLT清热燥湿、解表清里、表里兼治,故而其具有改善NASH的作用^[7-9]。白藜芦醇可通过激活Nrf2信号通路来预防炎症和氧化应激^[10],并能够有效抑制脂质积聚和炎症过程进展,从而改善NASH,故选择其作为阳性对照^[11]。本课题组前期研究表明,GGQLT能通过抗氧化应激和抗炎来减轻NASH相关的肝损伤^[8-9],但具体防治机制尚不明确。基于此,本实验拟制备GGQLT含药血清,加以小分子干扰核糖核酸(siRNA)对Nrf2进行沉默,探讨GGQLT通过Nrf2/硫氧还蛋白相互作用蛋白(TXNIP)信号通路改善NASH的分子作用机制,为中医药多靶点、多途径治疗NASH提供实验依据。

1 材料

FACS Calibur型流式细胞仪(美国BD公司),164-5050型基础电泳仪、170-3930型转膜仪(美国Bio-Rad公司),FluorChem M型凝胶成像分析仪(美国ProteinSimple公司),Varioskan Flash型多功能酶标仪(美国Thermo Fisher公司),EasyCycler 96型聚合酶链式反应(PCR)仪(德国耶拿公司),LightCycler 96型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(瑞士Roche公司),TD4型低速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司),DZKW-S-4型电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司),MDF-U33V型超低温冰箱(日本Sanyo公司),R1001-VN型旋转蒸发仪(郑州长城科工贸有限公司),Neofuge13R型台式高速冷冻离心机[力新仪器(上海)有限公司]。

葛根、黄芩、黄连、炙甘草饮片均购自江西致和堂中药饮片有限公司,批号分别为171205、171201、171203、171206,经江西中医药大学药学院邓可众副教授鉴定,均符合2020年版《中华人民共和国药典》(一部)相关项下规定;DMEM高糖培养基(美国HyClone公司,批号12100),胎牛血清(FBS,以色列BioInd公司,批号2014014),白藜芦醇[将其溶解于1 mL的二甲基亚砜(DMSO)中配成10 mmol·L⁻¹原料溶液,在每次实验前用DMEM培养基稀释成终浓度10 μmol·L⁻¹,4 °C储存]、胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化液、十二烷基硫酸钠(SDS)、蛋白酶抑制剂(PMSF)和RIPA高效裂解液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为R8350、20201102、1207G035、

20140708、30126),油红O粉末(以5 g·L⁻¹的质量浓度溶解于10 mL的异丙醇中作为储备液,4 °C储存)、OA及PA(上海希格玛高技术有限公司,批号分别为20150902、070M13581V、091M14381V),苏木素-伊红(HE)染色液(南昌雨露实验器材有限公司,批号180801),多聚甲醛溶液(北京雷根生物技术有限公司,批号0911A18),PrimeScript RT试剂盒和TB Green Premix Ex Taq[宝日生物技术(北京)有限公司,批号分别为RR420A、RR047A],TRIzol试剂和Lipofectamine 3000转染试剂盒(美国Invitrogen公司,批号分别为317904、2307436),ROS荧光探针DCFH-DA(上海碧云天生物技术有限公司,批号S0033S),丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、TG检测试剂盒(南京建成科技有限公司,批号分别为20201010、20181018、20210505、20190810),BCA蛋白定量试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号36420),脱脂奶粉(北京诺博莱德科技有限公司,批号8032502),Nrf2-siRNA和阴性对照(NC)-siRNA(上海吉玛制药技术有限公司,批号分别为25811、23398),Nrf2和TXNIP抗体[Abcam(上海)贸易有限公司,批号分别为GR3231661-23、GR3258311-8],β-肌动蛋白(β-actin)抗体(北京鼎盛生物技术有限责任公司,批号54100120),辣根过氧化物酶(HRP)二抗山羊抗兔多克隆抗体(美国Proteintech公司,批号20000217),增强化学发光法(ECL)超敏发光液(美国Millipore公司,批号1719801),蛋白上样缓冲液(×5)(北京普利莱基因技术有限公司,批号B1012)。HepG2细胞购于中国科学院上海细胞库。

SPF级健康雄性SD大鼠20只,体质量(220±20)g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,合格证号SCXK(湘)2016-0002,饲养于温度(22±2)°C、相对湿度50%~60%的动物实验室。本文涉及的动物实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号JZLLSC2018-0054。

2 方法

2.1 GGQLT含药血清的制备^[8] 取葛根、黄芩、黄连、炙甘草饮片按8:3:3:2的比例进行混合,加8倍量水浸泡60 min,大火煮沸40 min,按此步骤重复提取2次,纱布过滤,合并2次滤液,3 000 r·min⁻¹离心25 min(离心半径12 cm,下同),使用旋转蒸发仪在80 °C将药液浓缩成生药质量浓度为1.12 g·mL⁻¹的流浸膏,于-20 °C冰箱储存备用。将大鼠20只随机

分成GGQLT组、正常组,每组10只。GGQLT组按6.72 g·kg⁻¹剂量进行灌胃,每天2次,连续7 d,正常组按照相同条件灌胃等体积蒸馏水。实验前禁食12 h,于末次给药后1 h进行腹主动脉取血,室温静置2 h,3 500 r·min⁻¹离心10 min,合并同组血清,制得空白血清和GGQLT含药血清。56 °C水浴,持续灭活30 min,用0.22 μm微孔滤膜除菌,分装于5 mL离心管,于-80 °C冰箱保存。

2.2 实验分组、造模与给药 在文献[9-12]基础上加以改进,模拟NASH体外脂质代谢环境。将PA与OA以1:2的比例溶解于10 mL的异丙醇中,制成10 mmol·L⁻¹ FFA储备液,在每次实验前用DMEM培养基稀释成1 mmol·L⁻¹ FFA造模液,于4 °C冰箱储存。HepG2细胞放入含10% FBS、1%青霉素-链霉素双抗的高糖DMEM完全培养基中,置于37 °C、5% CO₂培养箱培养。取对数生长期细胞,用胰蛋白酶消化1 min,1 000 r·min⁻¹离心3 min,弃去上清,加入完全培养基,将细胞悬液以2.0×10⁵个/mL的密度接种于6孔板,过夜(12 h)培养至细胞贴壁,吸弃原培养液,正常组加入含20%空白血清的DMEM培养基2 mL;其余各组均加入DMEM培养基1.4 mL和10 mmol·L⁻¹ FFA造模液0.2 mL;此外,模型组加入空白血清0.4 mL,GGQLT-高剂量(H)组加入含药血清0.4 mL,GGQLT-中剂量(M)组加入含药血清和空白血清各0.2 mL,GGQLT-低剂量(L)组加入含药血清0.1 mL和空白血清0.3 mL,白藜芦醇组则加入10 mmol·L⁻¹白藜芦醇母液10 μL,共同干预24 h。细胞分组情况见表1。

表1 GGQLT对NASH作用的细胞实验分组

Table 1 Cellular experimental grouping of effect of GGQLT on NASH

组别	组成	FFA/mmol·L ⁻¹
正常组	20%空白血清+80% DMEM培养基	
模型组	20%空白血清+80% DMEM培养基	1
GGQLT-H组	20% GGQLT含药血清+80% DMEM培养基	1
GGQLT-M组	10% GGQLT含药血清+10%空白血清+80% DMEM培养基	1
GGQLT-L组	5% GGQLT含药血清+15%空白血清+80% DMEM培养基	1
白藜芦醇组	10 μmol·L ⁻¹ 白藜芦醇+20%空白血清+80% DMEM培养基	1

2.3 油红O染色法观察HepG2细胞中脂质堆积情况 按照2.2项下方法接种细胞并进行分组、造模、

给药,去除细胞上清,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.0)洗涤3次,4%多聚甲醛固定15 min,油红O工作液作用10 min,弃去油红O工作液,加入60%异丙醇分色,PBS洗涤,苏木素复染30 s,水洗后光学显微镜下观察细胞内脂质堆积程度并拍照。

2.4 GSH-Px、SOD、TG、MDA水平的检测 按2.2项下方法接种细胞并进行分组、造模、给药,共同干预24 h后进行BCA蛋白定量,严格按照GSH-Px、SOD、TG和MDA试剂盒说明书进行操作。

2.5 HepG2细胞内ROS水平的检测 按2.2项下方法接种细胞并进行分组、造模、给药,收集各组细胞加入DCFH-DA,在37 °C、5% CO₂培养箱中共同孵育30 min,严格按照说明书步骤进行操作。荧光强度用流式细胞仪采集数据,使用FlowJo 10.0软件进行分析。

2.6 体外细胞转染Nrf2-siRNA siRNA序列由上海吉玛制药技术有限公司设计提供,见表2。待HepG2细胞融合度达60%左右时,以2.0×10⁵个/mL的密度接种于6孔板,将细胞分为NC-siRNA组(只转染NC-siRNA),Nrf2-siRNA组(转染特异性针对Nrf2的siRNA),按试剂盒说明书先进行转染实验,转染6 h后更换新鲜的培养基。按照表3进行细胞分组、造模(1 mmol·L⁻¹ FFA造模液)并给药(终体积分数分别为20%、10%、5%的GGQLT含药血清和10 μmol·L⁻¹白藜芦醇),共同作用24 h后进行后续实验。

表2 siRNA的引物序列

Table 2 Primer sequences of siRNA

引物	序列(5'-3')
NC-siRNA	上游 UGAAGAUC AAGAUC AUUG
	下游 GCAAUGAUCUUGAUCUUC
Nrf2-siRNA	上游 CAGAAGUUGACAAUUAUCATT
	下游 UGAUAAUUGUCAACUUCUGTT

注:引物长度均为21 bp;合成总量均为2.5 nmol;纯化方式均为高效液相色谱法(HPLC)

2.7 基因表达检测 按照2.2和2.6项下方法接种细胞并进行分组、造模、给药。向6孔板每孔中加入TRIzol试剂1 mL,提取各组HepG2细胞总RNA,并参考PrimeScript RT试剂盒和TB Green Premix Ex Taq说明书进行逆转录互补脱氧核糖核酸(cDNA)和Real-time PCR反应。取cDNA 2 μL,加入上、下游引物各0.4 μL,反应条件为95 °C预变性30 s;95 °C变性5 s,60 °C退火30 s,40个循环;60 °C延伸

表3 GGQLT对NASH作用的转染实验分组

Table 3 Grouping of transfection experiments of effect of GGQLT on NASH

组别	组成	FFA/mmol·L ⁻¹
正常+NC-siRNA组	20%空白血清+80% DMEM培养基	
模型+NC-siRNA组	20%空白血清+80% DMEM培养基	1
GGQLT-H+NC-siRNA组	20% GGQLT含药血清+80% DMEM培养基	1
GGQLT-H+Nrf2-siRNA组	20% GGQLT含药血清+80% DMEM培养基	1
GGQLT-M+NC-siRNA组	10% GGQLT含药血清+10%空白血清+80% DMEM培养基	1
GGQLT-M+Nrf2-siRNA组	10% GGQLT含药血清+10%空白血清+80% DMEM培养基	1
GGQLT-L+NC-siRNA组	5% GGQLT含药血清+15%空白血清+80% DMEM培养基	1
GGQLT-L+Nrf2-siRNA组	5% GGQLT含药血清+15%空白血清+80% DMEM培养基	1
白藜芦醇+NC-siRNA组	10 μmol·L ⁻¹ 白藜芦醇+20%空白血清+80% DMEM培养基	1
白藜芦醇+Nrf2-siRNA组	10 μmol·L ⁻¹ 白藜芦醇+20%空白血清+80% DMEM培养基	1

1 min,缓慢上升至95 °C,1个循环后结束,绘制溶解曲线。以β-actin作为内参,检测Nrf2、HO-1、TXNIP、醌氧化还原酶1(NQO1)、NF-κB、白细胞介素-1β(IL-1β)、Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)的表达水平,根据2^{-ΔΔC_t}计算目的基因相对表达量。所有引物均购自生工生物工程(上海)股份有限公司,引物序列见表4。

表4 GGQLT对NASH作用时基因表达检测的引物序列

Table 4 Primer sequences for gene expression detection during action of GGQLT on NASH

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Nrf2	上游 TCCAAGTCCAGAAGCCAAACTGAC	139
	下游 GGAGAGGATGCTGCTGAAGGAATC	
Keap1	上游 ATTCAGCTGAGTGTTACTACCC	111
	下游 CAGCATAGATACAGTTGTGCAG	
HO-1	上游 CCTCCCTGTACCACATCTATGT	93
	下游 GCTCTTCTGGGAAGTAGACAG	
NQO1	上游 TAGAGACGGCGTTTCACCATGTTG	83
	下游 ACTTTGGGAGGCTGAGGTAGGC	
NF-κB	上游 TATTTGAAACACTGGAAGCACG	219
	下游 CCGGAAGAAAAGCTGTAAACAT	
IL-1β	上游 GCCAGTGAAATGATGGCTTATT	85
	下游 AGGAGCACTTCATCTGTTTAGG	
TXNIP	上游 GTTCAGAAGATCAGGCCTTCTA	84
	下游 TCCAGGAACGCTAACATAGATC	
β-actin	上游 TGGGCATGGGTCAGAAGGAT	144
	下游 CGTCCCAGTTGGTGACGATG	

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 按照2.2和2.6项下方法接种细胞并进行分组、造模、给药,检测HepG2细胞中Nrf2、TXNIP的蛋白表达水平,

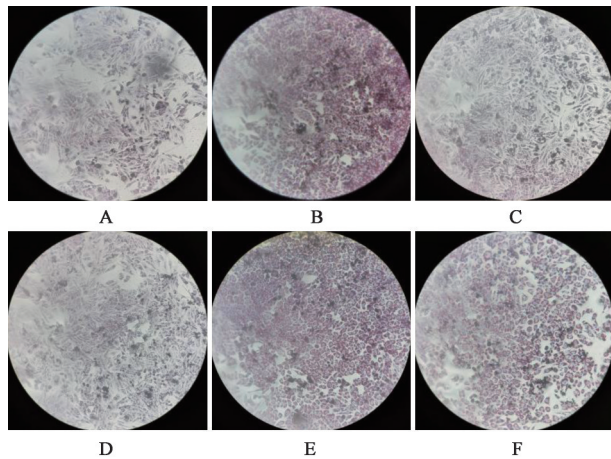
收集各组细胞,加入RIPA裂解液(含1% PMSF)1 mL,于温度4 °C下1万r·min⁻¹离心30 min(离心半径13 cm),收集上清并使用BCA试剂盒绘制标准曲线,计算蛋白浓度。向样品中加入蛋白上样缓冲液(×5),100 °C水浴5 min,分装于2 mL离心管中,置于-20 °C冰箱备用。取蛋白30 μg进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),转移蛋白至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,加入Nrf2、TXNIP抗体(1:1 000)和β-actin抗体(1:1万),4 °C孵育过夜,加入山羊抗兔二抗(HRP标记,1:1万),室温孵育2 h,ECL显色,凝胶成像分析仪摄像,测量条带。通过Image J 1.8.0软件计算各组条带灰度值,β-actin作为内参蛋白,各条带与内参的比值即为各蛋白的相对表达量。

2.9 统计学分析 实验结果采用SPSS 18.0软件进行分析,数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组之间计量资料比较采用t检验,P<0.05表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 脂质堆积情况观察 由图1可知,与正常组比较,模型组细胞可见大量红色脂滴;与模型组比较,GGQLT各给药组及白藜芦醇组细胞周围的红色脂滴均有不同程度的减少。

3.2 GGQLT对细胞中TG、MDA、ROS、GSH-Px、SOD水平的影响 与正常组比较,模型组MDA、TG含量和ROS水平均明显增加(P<0.05, P<0.01),而GSH-Px和SOD活性则均显著下降(P<0.01)。与模型组比较,GGQLT各剂量组、白藜芦醇组细胞内MDA含量和ROS水平均明显降低(P<0.05, P<0.01)。与模型组比较,GGQLT-M组、GGQLT-L组和白藜芦醇组能明显减少细胞内的TG含量(P<



注: A. 正常组; B. 模型组; C. GGQLT-H组; D. GGQLT-M组; E. GGQLT-L组; F. 白藜芦醇组(图2同)

图1 GGQLT对HepG2细胞脂质堆积情况的影响(油红O, ×200)
Fig. 1 Effect of GGQLT on lipid accumulation of HepG2 cells (oil red O, ×200)

0.05, $P < 0.01$), GGQLT-H组、GGQLT-M组和白藜芦醇组能显著增强细胞内GSH-Px的活性($P < 0.01$), GGQLT各剂量组和白藜芦醇组细胞内SOD活性明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。见表5。

3.3 GGQLT对FFA处理后HepG2细胞Nrf2信号通路和TXNIP的影响 与正常组比较,模型组细胞内Nrf2的mRNA水平表达显著下调($P < 0.01$),Nrf2的蛋白水平表达下调,但差异无统计学意义;TXNIP的蛋白水平显著上调($P < 0.01$)。与模型组比较,

GGQLT各给药组和白藜芦醇组可显著上调Nrf2的蛋白和mRNA表达水平($P < 0.01$),明显下调TXNIP的蛋白水平($P < 0.05, P < 0.01$);GGQLT-H组、GGQLT-M组和白藜芦醇组可显著上调HO-1的mRNA表达水平($P < 0.01$);GGQLT各给药组和白藜芦醇组可显著上调NQO1的mRNA表达水平($P < 0.01$),明显下调Keap1的mRNA表达($P < 0.05, P < 0.01$),显著下调NF- κ B的mRNA表达($P < 0.01$)。说明GGQLT对Nrf2通路具有激活作用,可能通过提高细胞的抗氧化能力来改善炎症。见表6和图2。

3.4 Nrf2-siRNA对Nrf2、TXNIP、IL-1 β 表达水平的影响 与正常+NC-siRNA组比较,模型+NC-siRNA组细胞内Nrf2的蛋白水平、TXNIP的蛋白和mRNA表达水平、IL-1 β 的mRNA表达水平均显著升高($P < 0.01$),说明脂质和ROS堆积能够引起细胞内氧化应激及炎症反应。与模型+NC-siRNA组比较,GGQLT各剂量+NC-siRNA组和白藜芦醇+NC-siRNA组能够显著升高Nrf2的蛋白水平($P < 0.01$),明显降低TXNIP蛋白和mRNA表达水平、IL-1 β 的mRNA表达水平($P < 0.05, P < 0.01$)。Nrf2-siRNA转染细胞后发现,Nrf2-siRNA消除了GGQLT对TXNIP、IL-1 β 的下调作用,siRNA特异性沉默Nrf2后,与GGQLT相应剂量+NC-siRNA组比较,GGQLT各剂量+Nrf2-siRNA组Nrf2蛋白表达显著

表5 GGQLT对HepG2细胞内TG、MDA、ROS、GSH-Px、SOD水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of GGQLT on levels of TG, MDA, ROS, GSH-Px and SOD in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$	TG/ $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$	GSH-Px/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	ROS/%
正常组	3.820 \pm 1.909 ¹⁾	0.104 \pm 0.025 ²⁾	839.767 \pm 22.838 ²⁾	48.920 \pm 0.210 ²⁾	82.200 \pm 0.989 ¹⁾
模型组	21.405 \pm 1.646	0.238 \pm 0.012	85.813 \pm 30.339	38.075 \pm 0.555	91.550 \pm 0.919
GGQLT-H组	2.813 \pm 0.115 ²⁾	0.179 \pm 0.025	388.543 \pm 64.645 ²⁾	49.707 \pm 2.317 ¹⁾	80.300 \pm 0.707 ²⁾
GGQLT-M组	5.626 \pm 0.230 ¹⁾	0.153 \pm 0.016 ²⁾	426.922 \pm 60.375 ²⁾	48.806 \pm 0.916 ²⁾	78.850 \pm 0.919 ²⁾
GGQLT-L组	7.090 \pm 1.694 ¹⁾	0.160 \pm 0.025 ¹⁾	213.889 \pm 80.030	42.662 \pm 0.302 ¹⁾	80.950 \pm 0.070 ²⁾
白藜芦醇组	5.979 \pm 0.006 ¹⁾	0.111 \pm 0.045 ¹⁾	595.613 \pm 36.622 ²⁾	46.405 \pm 0.925 ¹⁾	71.700 \pm 0.282 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05, ^{2)}$ $P < 0.01$ (表6同)

表6 GGQLT对HepG2细胞内Nrf2信号通路和TXNIP水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of GGQLT on Nrf2 signaling pathway and TXNIP level in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Nrf2	Keap1	HO-1	NQO1	NF- κ B	Nrf2/ β -actin	TXNIP/ β -actin
正常组	1.008 \pm 0.154 ²⁾	1.000 \pm 0.043 ¹⁾	1.005 \pm 0.107 ¹⁾	1.000 \pm 0.041	1.000 \pm 0.043 ²⁾	0.605 \pm 0.035	0.653 \pm 0.121 ²⁾
模型组	0.593 \pm 0.024	1.148 \pm 0.021	0.694 \pm 0.017	0.855 \pm 0.086	1.148 \pm 0.021	0.562 \pm 0.029	1.430 \pm 0.147
GGQLT-H组	1.251 \pm 0.038 ²⁾	0.979 \pm 0.016 ²⁾	1.705 \pm 0.039 ²⁾	2.251 \pm 0.088 ²⁾	0.866 \pm 0.063 ²⁾	1.049 \pm 0.061 ²⁾	0.676 \pm 0.130 ²⁾
GGQLT-M组	1.495 \pm 0.059 ²⁾	0.891 \pm 0.020 ²⁾	7.393 \pm 0.460 ²⁾	2.240 \pm 0.057 ²⁾	0.953 \pm 0.036 ²⁾	0.900 \pm 0.060 ²⁾	1.019 \pm 0.106 ¹⁾
GGQLT-L组	1.155 \pm 0.077 ²⁾	1.015 \pm 0.045 ¹⁾	0.735 \pm 0.014	1.914 \pm 0.230 ²⁾	1.103 \pm 0.072 ²⁾	0.905 \pm 0.055 ²⁾	0.897 \pm 0.137 ¹⁾
白藜芦醇组	1.255 \pm 0.069 ²⁾	1.036 \pm 0.046 ¹⁾	0.970 \pm 0.063 ²⁾	1.635 \pm 0.187 ²⁾	1.036 \pm 0.046 ²⁾	0.746 \pm 0.046 ²⁾	0.757 \pm 0.175 ²⁾

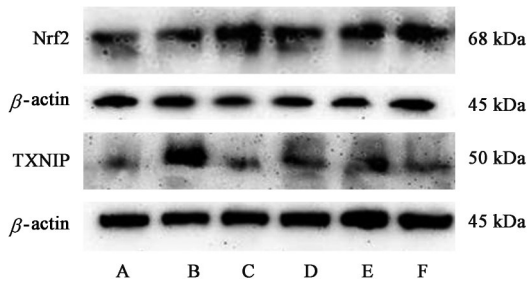


图2 GGQLT对HepG2细胞内Nrf2、TXNIP蛋白表达的影响
Fig. 2 Effect of GGQLT on expression of Nrf2 and TXNIP in cells

降低 ($P<0.01$), 说明 Nrf2 被有效沉默, Nrf2-siRNA 的沉默效率 76.6%。与 GGQLT 相应剂量 +NC-siRNA 组比较, GGQLT 各剂量 +Nrf2-siRNA 组的

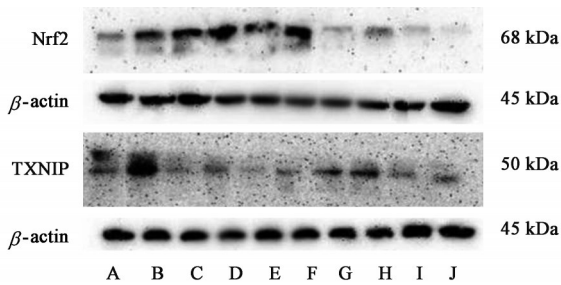
TXNIP 蛋白表达均显著升高 ($P<0.01$)。与 GGQLT-H+NC-siRNA 组比较, GGQLT-H+Nrf2-siRNA 组 TXNIP 的 mRNA 表达显著升高 ($P<0.01$)。与白藜芦醇+NC-siRNA 组比较, 白藜芦醇+Nrf2-siRNA 组 TXNIP 的 mRNA 表达显著升高 ($P<0.01$)。说明 GGQLT 和白藜芦醇下调 TXNIP 的作用被 Nrf2-siRNA 减弱。与 GGQLT-M+NC-siRNA 组比较, GGQLT-M+Nrf2-siRNA 组 IL-1 β 的 mRNA 表达明显升高 ($P<0.05$); 与白藜芦醇+NC-siRNA 组比较, 白藜芦醇+Nrf2-siRNA 组 IL-1 β 的 mRNA 表达显著升高 ($P<0.01$), 说明 GGQLT 和白藜芦醇对炎症因子的抑制作用被 Nrf2-siRNA 减弱。见表 7 和图 3。

表7 Nrf2-siRNA对HepG2细胞中Nrf2、TXNIP蛋白和TXNIP、IL-1 β mRNA表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Nrf2-siRNA on expression of Nrf2, TXNIP protein and TXNIP, IL-1 β mRNA in HepG2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	Nrf2/ β -actin	TXNIP/ β -actin	TXNIP	IL-1 β
正常+NC-siRNA组	0.358 \pm 0.008 ²⁾	1.173 \pm 0.105 ²⁾	1.000 \pm 0.052 ²⁾	1.009 \pm 0.191 ²⁾
模型+NC-siRNA组	0.610 \pm 0.021	1.544 \pm 0.013	1.294 \pm 0.038	9.255 \pm 0.256
GGQLT-H+NC-siRNA组	0.882 \pm 0.064 ²⁾	0.631 \pm 0.024 ²⁾	1.000 \pm 0.035 ²⁾	6.236 \pm 0.792 ¹⁾
GGQLT-H+Nrf2-siRNA组	0.302 \pm 0.023 ⁴⁾	0.864 \pm 0.038 ⁴⁾	1.339 \pm 0.080 ⁴⁾	9.477 \pm 1.066
GGQLT-M+NC-siRNA组	1.248 \pm 0.084 ²⁾	0.818 \pm 0.043 ²⁾	1.631 \pm 0.115 ¹⁾	6.415 \pm 0.408 ²⁾
GGQLT-M+Nrf2-siRNA组	0.439 \pm 0.029 ⁴⁾	1.041 \pm 0.040 ⁴⁾	1.119 \pm 0.086	8.846 \pm 0.086 ³⁾
GGQLT-L+NC-siRNA组	0.986 \pm 0.047 ²⁾	0.470 \pm 0.027 ²⁾	1.105 \pm 0.050 ²⁾	5.337 \pm 0.313 ²⁾
GGQLT-L+Nrf2-siRNA组	0.173 \pm 0.009 ⁴⁾	0.638 \pm 0.033 ⁴⁾	1.200 \pm 0.045	6.169 \pm 0.120
白藜芦醇+NC-siRNA组	1.242 \pm 0.116 ²⁾	0.616 \pm 0.029 ²⁾	1.023 \pm 0.029 ²⁾	2.838 \pm 0.055 ²⁾
白藜芦醇+Nrf2-siRNA组	0.141 \pm 0.007 ⁴⁾	0.497 \pm 0.022 ⁴⁾	1.229 \pm 0.069 ⁴⁾	5.410 \pm 0.265 ⁴⁾

注:与模型+NC-siRNA组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与相应药物相应剂量+NC-siRNA组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$



注: A. 正常+NC-siRNA组; B. 模型+NC-siRNA组; C. GGQLT-H+NC-siRNA组; D. GGQLT-M+NC-siRNA组; E. GGQLT-L+NC-siRNA组; F. 白藜芦醇+NC-siRNA组; G. GGQLT-H+Nrf2-siRNA组; H. GGQLT-M+Nrf2-siRNA组; I. GGQLT-L+Nrf2-siRNA组; J. 白藜芦醇+Nrf2-siRNA组

图3 Nrf2-siRNA对HepG2细胞中Nrf2、TXNIP蛋白表达的影响
Fig. 3 Effect of Nrf2-siRNA on protein expression of Nrf2 and TXNIP in HepG2 cells

4 讨论

NASH 是 NAFLD 的炎症亚型^[13]。肝细胞内 FFA 堆积导致的脂毒性是 NASH 形成的关键因素,

在脂质代谢过程中, FFA 氧化生成的 ROS 会进一步破坏抗氧化平衡, 使肝细胞更容易受到氧化应激的影响^[14-16]。本课题组前期研究明确表明, GGQLT 可以改善 NASH 的肝脂肪变性和损伤, 其可能的机制涉及调节炎症细胞因子和抗氧化应激^[17], 但抗氧化应激的作用机制尚不清晰, 故本研究采用 OA 和 PA 联合造模, 模拟 NASH 中 FFA 堆积的体外代谢环境, 观察 GGQLT 对 FFA 诱导 HepG2 细胞所致氧化应激与炎症的影响。结果发现模型组内脂质大量堆积, 而 GGQLT 能够显著抑制细胞内脂质沉积, 说明 FFA 能够成功诱导 HepG2 细胞脂肪变性, 且 GGQLT 具有一定改善脂质沉积的能力。同时, MDA 作为一种脂质过氧化产物, 是氧化应激(即脂质过氧化)最常用的生物标志物^[18]。而 SOD 是一种氧自由基清除剂, 通过将超氧自由基转化为过氧化氢, 再由过氧化氢酶和 GSH-Px 转化为水^[15]。在本研究中, HepG2 细胞暴露于 FFA 后, 模型组细胞内

TG、MDA 和 ROS 的含量升高,抗氧化酶 GSH-Px、SOD 的活性降低,而 GGQLT 可降低细胞内 TG、MDA、ROS 的含量,并增强 GSH-Px、SOD 的活性,提示 GGQLT 能够通过增强抗氧化酶的活性、减少 ROS 的生成来提高 HepG2 细胞的抗氧化水平。

Nrf2 是一种重要的氧化还原敏感性转录因子,在急性、慢性氧化应激和炎症条件下,通过调节细胞保护蛋白和酶的基因表达来激活或者预防氧化、炎症性疾病,从而降低 ROS 水平、减轻炎症和改善细胞死亡^[19]。Nrf2 从其细胞质抑制剂 Keap1 中分离,并易位到细胞核中,然后在许多 II 期酶的启动子区域与抗氧化反应元件(ARE)结合,包括 HO-1 和 NQO1 等下游靶点^[15]。本研究的 Real-time PCR 和 Western blot 结果显示,GGQLT 和白藜芦醇能够上调 Nrf2 蛋白和 mRNA 的表达水平,并进一步上调 Nrf2 下游抗氧化靶基因 HO-1、NQO1 的 mRNA 表达水平,同时 Keap1、NF- κ B 的 mRNA 表达水平及 TXNIP 的蛋白表达水平则被 GGQLT 和白藜芦醇显著下调。抗氧化作用在维持肝功能方面是不可避免的,这种抗氧化作用主要受 Nrf2 的活性调控,Nrf2 的激活可增强细胞的抗氧化能力。该结果提示 GGQLT 能够提高 HepG2 细胞的抗氧化能力,并通过激活 Nrf2 通路,从而降低炎症水平、减轻氧化损伤,以达到改善 NASH 的目的。

氧化应激状态下 Nrf2 与 Keap1 分离易位到细胞核,会导致 80 种不同抗氧化基因和代谢基因的表达,如硫氧还蛋白(Trx),以缓解各种刺激引起的氧化损伤^[20]。随着细胞内 ROS 的大量增多,TXNIP 与 Trx 解离,进而导致 IL-1 β 的分泌,引发严重的炎症反应^[21]。IL-1 β 是一种经典的促炎因子,在 NASH 的发病机制中具有重要作用,并且 IL-1 β 的水平与肝纤维化的形成密切相关^[22]。为进一步验证 GGQLT 是否是通过 Nrf2 来降低 ROS 水平及 IL-1 β 的生成,从而抑制炎症以改善 NASH,本研究通过 siRNA 沉默 Nrf2 的表达。结果显示,与正常+NC-siRNA 组比较,模型+NC-siRNA 组中 TXNIP 的蛋白表达水平和 IL-1 β 的 mRNA 表达水平均显著升高。其中,模型+NC-siRNA 组较正常+NC-siRNA 组 Nrf2 的表达升高,猜测是由于细胞内氧化还原状态处于动态平衡,氧化应激状态下 Nrf2 表达受到多方面因素的影响,而本研究中 siRNA 沉默组的细胞培养基中加有转染试剂 Lipofectamine 3000,该试剂具有细胞毒性,会对细胞造成一定程度的刺激,故使得模型+NC-siRNA 组 Nrf2 的表达升高,且已有研究证实模

型组 Nrf2 在不同刺激状态下的表达存在趋势表达不一致的现象^[23]。与模型+NC-siRNA 组比较,GGQLT 各剂量+NC-siRNA 组和白藜芦醇+NC-siRNA 组可升高 Nrf2 蛋白表达水平,降低 TXNIP 蛋白的表达水平,并降低 IL-1 β 的 mRNA 表达水平。再次说明 GGQLT 能够激活 Nrf2 通路,并降低 ROS 相关靶点 TXNIP 的表达水平,进一步降低下游炎症因子 IL-1 β 的表达,从而起到改善 NASH 氧化应激和抑制炎症的作用。

GGQLT 各剂量组及白藜芦醇组经 Nrf2-siRNA 处理后,其对 TXNIP 和 IL-1 β 的抑制作用均受到一定程度的消除,说明 Nrf2 的表达被有效沉默。Nrf2 沉默后,与 GGQLT 相应剂量+NC-siRNA 组比较,GGQLT 各剂量+Nrf2-siRNA 组中 TXNIP 蛋白表达水平和 IL-1 β 的 mRNA 表达水平升高,说明 GGQLT 通过 Nrf2 信号通路抑制 TXNIP 的表达和 IL-1 β 的分泌。综上所述,GGQLT 可通过调节 Nrf2/TXNIP 信号通路,增加抗氧化酶的活性,减少 ROS 对细胞引起的氧化损伤,进而降低细胞内的炎症水平,提示其可能在抗氧化损伤及改善炎症方面具有良好的应用前景,可为中医药防治 NASH 提供实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SHEKA A C, ADEYI O, THOMPSON J, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: A review [J]. JAMA, 2020, 323(12):1175-1183.
- [2] POLYZOS S A, KOUNTOURAS J, MANTZOROS C S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics[J]. Metabolism, 2019, 92:82-97.
- [3] ZHANG C H, XU G L, LIU Y H, et al. Anti-diabetic activities of gegen qinlian decoction in high-fat diet combined with streptozotocin-induced diabetic rats and in 3T3-L1 adipocytes[J]. Phytomedicine, 2013, 20(3/4):221-229.
- [4] MUSSO G, CASSADER M, PASCHETTA E, et al. Bioactive lipid species and metabolic pathways in progression and resolution of nonalcoholic steatohepatitis [J]. Gastroenterology, 2018, 155(2):282-302.
- [5] CHENG Y Y, RONG J H. Therapeutic potential of heme oxygenase-1/carbon monoxide system against ischemia-reperfusion injury [J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(26):3884-3898.
- [6] 胡俊,饶紫兰,陈江木,等.水飞蓟素通过调控 Nrf2 抗

- 氧化通路抑制NLRP3炎症小体改善非酒精性脂肪性肝病[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(7):971-977.
- [7] 肖琴,施旻,曹征,等. 葛根芩连汤防治非酒精性脂肪性肝炎作用相关的差异蛋白筛选[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(6):1309-1312.
- [8] 章常华,邓可众,于梅,等. 葛根芩连汤含药血清对HepG2肝细胞胰岛素抵抗模型糖代谢的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(5):120-123.
- [9] ZHANG C H, XIAO Q, SHENG J Q, et al. Gegen Qinlian decoction abates nonalcoholic steatohepatitis associated liver injuries via anti-oxidative stress and anti-inflammatory response involved inhibition of Toll-like receptor 4 signaling pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 126:110076.
- [10] KIM E N, LIM J H, KIM M Y, et al. Resveratrol, an Nrf2 activator, ameliorates aging-related progressive renal injury[J]. Aging (Albany NY), 2018, 10(1):83-99.
- [11] JI G Y, WANG Y Q, DENG Y X, et al. Resveratrol ameliorates hepatic steatosis and inflammation in methionine/choline-deficient diet-induced steatohepatitis through regulating autophagy [J]. Lipids Health Dis, 2015, 14:134.
- [12] 罗蕾蕾,邵建国,卞兆连,等. 清脂护肝方抑制HepG2细胞脂质沉积的研究[J]. 南通大学学报:医学版, 2019, 39(4):241-245.
- [13] KONERMAN M A, JONES J C, HARRISON S A. Pharmacotherapy for nash: Current and emerging[J]. J Hepatol, 2018, 68(2):362-375.
- [14] SCHUSTER S, CABRERA D, ARRESE M, et al. Triggering and resolution of inflammation in NASH [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(6):349-364.
- [15] MA Z Y, LI C X, QIAO Y, et al. Safflower yellow B suppresses HepG2 cell injury induced by oxidative stress through the Akt/Nrf2 pathway [J]. Int J Mol Med, 2016, 37(3):603-612.
- [16] YANG J C Z, FERNÁNDEZ-GALILEA M, MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ L, et al. Oxidative stress and non-alcoholic fatty liver disease: Effects of omega-3 fatty acid supplementation [J]. Nutrients, 2019, 11(4):872.
- [17] YING Y Q, ZHANG H T, YU D, et al. Gegen Qinlian decoction ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in rats oxidative stress, inflammation, and the NLRP3 signal axis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021:6659445.
- [18] TSIKAS D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges [J]. Anal Biochem, 2017, 524:13-30.
- [19] XU D W, XU M, JEONG S S, et al. The role of Nrf2 in liver disease: Novel molecular mechanisms and therapeutic approaches [J]. Front Pharmacol, 2019, 9:1428.
- [20] LYU H M, ZHU C, WEI W, et al. Enhanced Keap1-Nrf2/Trx-1 axis by daphnetin protects against oxidative stress-driven hepatotoxicity via inhibiting ASK1/JNK and Txnip/NLRP3 inflammasome activation [J]. Phytomedicine, 2020, 71:153241.
- [21] ZHOU R B, TARDIVEL A, THORENS B, et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation [J]. Nat Immunol, 2010, 11(2):136-140.
- [22] MRIDHA A R, WREE A, ROBERTSON A A B, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental nash in mice [J]. J Hepatol, 2017, 66(5):1037-1046.
- [23] WANG X X, CHANG X H, ZHAN H B, et al. Curcumin and baicalin ameliorate ethanol-induced liver oxidative damage via the Nrf2/HO-1 pathway [J]. J Food Biochem, 2020, 44(10):e13425.

[责任编辑 刘德文]