

甲嘎松汤调控 Nrf2, Bach1 表达保护氧化应激肝细胞

廖嘉仪¹, 熊天琴^{1*}, 康萨·索朗其美², 泽仁·达瓦², 李红侠¹, 谭庆龙¹, 赵玉民¹, 林曦¹

(1. 广州中医药大学 中药学院, 国家中医药管理局 中药药理三级科实验室, 广州 510006;

2. 西藏藏医学院, 拉萨 850000)

[摘要] 目的:研究甲嘎松汤对氧化应激损伤 L-02 的影响,并从 Nrf2/Bach1-ARE 抗氧化酶途径研究其抗氧化的机制。

方法:MTT 法评价建立葡萄糖氧化酶肝损伤细胞模型的方法。实验共分 9 组,分别为空白组,模型组,20% 甲嘎松汤含药血清组,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 全反式视黄酸 (ATRA) 组,80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 染料木黄铜 (Genstein) 组,80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 叔丁基对苯二酚 (*t*-BHQ) 组,*t*-BHQ + 20% 甲嘎松汤含药血清组,ATRA + 20% 甲嘎松汤含药血清组,Genstein + 20% 甲嘎松汤含药血清组,以正常培养液或含 *t*-BHQ,ATRA,Genstein 的培养液干预 L-02 细胞 12 h,再用 20% 甲嘎松汤含药血清培养液预保护 12 h,最后采用 100 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖氧化酶制备氧化损伤模型。MTT 法测定细胞活性,测定培养上清的丙氨酸氨基转移酶 (ALT),天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性,丙二醛 (MDA) 含量,谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性,利用免疫荧光法和 Western blot 法观察细胞内核因子相关因子 (Nrf2) 和转录因子 BTB-CNC 异体同源体 (Bach1) 的分布及核内两者的表达量。**结果:**与空白组比较,模型组 ALT,AST 活性及 MDA 含量明显升高,GSH-Px 活性明显降低 ($P < 0.01$),细胞核内 Nrf2 及 Bach1 的表达明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,甲嘎松汤能升高氧化损伤以及 3 种干预剂下的细胞活性和 GSH-Px 活性,降低 ALT,AST 活性及 MDA 含量 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);可协同 *t*-BHQ 升高核内 Nrf2 表达,抑制 ATRA 降低核内 Nrf2 表达,抑制 Genstein 升高核内 Nrf2 表达,均具有统计学差异 ($P < 0.01$);在 3 种干预剂作用下,甲嘎松汤可促进 Bach1 出核 ($P < 0.01$)。**结论:**甲嘎松汤可保护葡萄糖氧化酶诱导氧化应激损伤肝细胞,其抗氧化保肝作用与调节 Nrf2 与 Bach1 表位位置以及核内蛋白水平有关。

[关键词] 甲嘎松汤; 氧化应激; 人肝细胞; 细胞内核因子相关因子; 转录因子 BTB-CNC 异体同源体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)03-0118-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015030118

Jiagang Decoction Contained Serum Protect Liver Cells from Oxidative Damage via Regulating Nrf2 and Bach1 Protein Expression LIAO Jia-yi¹, XIONG Tian-qin^{1*}, KANGSA · Suolangqimei², ZEREN · Dawa², LI Hong-xia¹, TAN Qin-long¹, ZHAO Yu-min¹, LIN Xi¹ (1. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, State Administration of Traditional Chinese Medicine Three-level Pharmacology of Chinese Medicine Research Laboratory, Guangzhou 510006, China; 2. Tibet Traditional Medical College, Tibet 850000, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the effects of Jiagang decoction (JGSD) on oxidative damaged liver cells and to explore its possible Nrf2/Bach1-ARE-antioxidant enzymes pathway mechanism. **Method:** The liver injury cells model was induced by 100 $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose oxidase (GO) and evaluated by MTT. The experiment included 9 groups: the control group, the model group, 20% JGSD contained serum group, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ all-trans retinoic acid (ATRA) group, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ genstein group, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ tert-butylhydroquinone (*t*-BHQ) group, *t*-BHQ + 20% JGSD contained serum group, ATRA + 20% JGSD contained serum group, genstein + 20% JGSD contained serum group. The activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), malonaldehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px) were tested. The location in cells and nucleus protein levels of Nrf2 and Bach1 were tested by immunofluorescence and Western blot. **Result:** Compared to the control

[收稿日期] 20140620(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202997);广东省科技计划项目(2011B031700075);广东省自然科学基金项目(S2011010003925);广州中医药大学科学研究基金项目(2004D25)

[第一作者] 廖嘉仪,在读硕士生,从事中药作用机制及物质基础研究,Tel:18312026439,E-mail:515577128@qq.com

[通讯作者] *熊天琴,博士,教授,从事中药作用机制及物质基础研究,Tel:15989169711,E-mail:xiongtq020@gzucm.edu.cn

group, ALT, AST and MDA contents increased, GSH-Px activity and cell proliferation decreased, and levels of Nrf2 and Bach1 increased in the model group ($P < 0.01$). The above indexes had good improvement in JGSD-contained groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Moreover, there was coordinated effects between JGSY and the other three agents on Nrf2 expression ($P < 0.01$). Meanwhile, JGSD could promote the Bach1 export from cell nuclear ($P < 0.01$). **Conclusion:** JGSD could protect GO-induced cells damage from oxidative stress, and its antioxidation mechanism is related to regulating Nrf2 and Bach1 protein levels in nuclear.

[Key words] Jiagasong decoction; oxidative stress; L-02; NF-E2-related factor 2; BTB and CNC homology 1

甲嘎松汤 (Jiagasong decoction, JGSD) 是一味藏族药成方, 又名“三味干姜散”, 组成药物为干姜、豆蔻、肉豆蔻, 被收录入《卫生部药品标准·藏药》中, 用于小儿肝炎, 寒性肝炎, 肝肿大等^[1]。甲嘎松汤对多种小鼠急性肝损伤均具有保护作用, 可提高给药组肝脏组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽 (GSH) 活性, 证实甲嘎松汤可抗氧化应激而发挥保肝作用^[2]。“Nrf2-ARE-抗氧化酶”通路是一种机体内源性抗氧化保护系统, 与肝脏氧化应激、炎性、纤维化形成有着密切关系, 对维持肝脏功能的稳定以及阻止肝脏疾病的发生有重要的作用^[3]。国内对抗氧化的药物机制多集中于抗氧化酶正性调控“Keap1-Nrf2-ARE”通路上, 但与 Nrf2 同为 CNC 家族的 Bach1 的核内表达也影响着抗氧化酶的产生。转录因子 BTB-CNC 异体同源体 (Bach1) 为核因子相关因子 (Nrf2) 的阻遏剂, 具有与 Nrf2 同似结构, 但缺乏活性部位, 与 Nrf2 竞争 Nrf2/Bach1-ARE 下调抗氧化酶基因的转录^[4-6], Nrf2 与 Bach1 二者的细胞分布及核内表达量对于调节肝脏抗氧化酶具有重要意义。甲嘎松汤保肝机制可能与维持 Nrf2 在细胞内的动态平衡有关^[2], 但是其作用环节及深入机制尚不清楚, 为了进一步探讨 Nrf2 与 Bach1 在肝细胞氧化损伤过程中的变化以及甲嘎松汤的保肝机制, 本实验借助 Nrf2 入核促进剂叔丁基对苯二酚 (tert-butylhydroquinone, t-BHQ), Nrf2 入核抑制剂全反式视黄酸 (all-trans retinoic acid, ATRA) 以及 Bach1 出核抑制剂染料木黄铜 (Genistein)^[7-11], 观察其对 Nrf2, Bach1 蛋白的影响, 从抗氧化酶的正负调控因子两方面阐明甲嘎松汤保肝机制。

1 材料

1.1 动物及细胞株 SD 雄性大鼠, SPF 级, 体重 180 ~ 220 g, 购于广州中医药大学实验动物中心, 合格证号 SCXK (粤) 2008-0020; 正常人肝细胞株 L-02, 购于中山大学细胞库。

1.2 药物及试剂 干姜、豆蔻、肉豆蔻饮片, 经广州

中医药大学祝晨蓀教授按照《中国药典》(2010 年版) 规定的质量标准鉴定, 并获得每批药材指纹图谱, 符合标准要求^[12]。染料木黄铜 (Genstein), 叔丁基对苯二酚 (t-BHQ), 全反式视黄酸 (ATRA) 和 MTT (美国 Sigma 公司, 批号分别为 20110311, 20101215, 20110517, 20120111); 胎牛血清 (美国 Hyclone 公司), 兔抗 Nrf2 多克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号 bs-1074R), 兔抗 Bach1 多克隆抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号 14018-1-AP); 丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST), 丙二醛 (MDA), 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 试剂盒 (南京建成生物工程有限公司, 批号均为 20130723)。

1.3 仪器 CO₂ 培养箱 (北京五洲东方科技发展有限公司), SW-CJ-2FD 型双人单面净化工作台 (苏州净化设备有限公司), XDS-1B 型倒置显微镜 (重庆光学仪器厂), RT-2100C 型酶联分析仪 (深圳雷杜生命科学股份有限公司), J1000 型精密电子天平 (美国双杰兄弟有限公司-常熟双杰测试仪器厂), 96 孔培养板 (美国 Nest 公司), 0.22 μm 的微孔滤器 (美国 Millipore 公司), DMI6000B 型倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司), 垂直电泳仪及转移系统 (美国 Bio-Rad 公司), X 射线摄影暗匣 (上海跃进医用光学器械厂), 脱色摇床 (美国 Rotomix 公司)。

2 方法

2.1 甲嘎松汤含药血清 (JGSD) 制备 大鼠 20 只, 随机分为 2 组, 分别为甲嘎松汤 (生药 0.66 g·kg⁻¹) 和空白。按标准制备甲嘎松汤 (干姜-肉豆蔻-豆蔻 6:4:5) 药液, 终质量浓度为生药 0.066 g·mL⁻¹, 10 mL·kg⁻¹ ig 给药; 空白组 ig 等剂量的蒸馏水, 每日给药 2 次, 早晚各 1 次, 连续给药 3 d。于末次给药后 1 h, 10% 水合氯醛麻醉动物, 腹主动脉取血, 分离血清, 组内血清混合, 56 °C 灭活 30 min, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 分装, -20 °C 保存备用。临用前用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基按照体积

比稀释成20%含药血清。

2.2 L-02 细胞培养 将细胞接种于25 cm²培养瓶中,培养基为10%胎牛血清的RPMI-1640,放于5% CO₂,湿度95%,37℃条件的培养箱中培养。待细胞生长达培养瓶底面积的80%~90%融合后用PBS洗涤2次,加入0.25%的胰蛋白酶适度消化,待细胞变圆变亮但并未脱离瓶底,吸出消化液,加入含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液,吹打成单个细胞悬液,按1:3比例传代。

2.3 L-02 氧化损伤细胞模型建立 参考文献[13],细胞接种于96孔板,过夜后换培养基内葡萄糖氧化酶(GO)造模剂,设置GO不同活性单位为0,5,10,20,40,50,60,80,100,120,160,200 U·L⁻¹,作用于细胞2 h后,进行MTT试验,确定GO制备L-02氧化损伤模型的最佳条件,每组设置6个复孔。

存活率 = 实验组/空白组 × 100%

2.4 分组以及药物处理 共分9组,分别为空白组,模型组,20% JGSD组,5 μmol·L⁻¹ ATRA,80 μmol·L⁻¹ Genstein组,80 μmol·L⁻¹ t-BHQ组,t-BHQ + 20% JGSD组,ATRA + 20% JGSD组,Genstein + 20% JGSD组。空白组加入20%空白血清培养24 h后,换10% FBS培养液作用2 h;模型组加入20%空白血清培养24 h后,换100 U·L⁻¹ GO完全培养液作用2 h;20% JGSD组加入20%空白血清培养12 h后,换20% JGSD培养液作用12 h,以100 U·L⁻¹ GO造模2 h;5 μmol·L⁻¹ ATRA,80 μmol·L⁻¹ Genstein组,80 μmol·L⁻¹ t-BHQ组按组别加入各含药20%空白血清培养液12 h后,换20%空白血清培养12 h后,以100 U·L⁻¹ GO造模2 h。t-BHQ + 20% JGSD组,ATRA + 20% JGSD组,Genstein + 20% JGSD组加入各含药20%空白血清培养液12 h后换20% JGSD培养液12 h,最后造模2 h。

2.5 L-02 的细胞活性测定 取对数生长期L-02细胞,以1 × 10⁴个/孔接种于96孔板,培养过夜后,弃去孔内液体,按实验设计分组给药处理后,每孔加入50 μL RPMI-1640培养液,再加入5 g·L⁻¹的MTT溶液20 μL,5% CO₂,湿度95%,37℃条件的培养箱中继续孵育4 h,终止培养。弃去孔内上清液,每孔加入150 μL DMSO,震荡使蓝紫色结晶物全部溶解,在490 nm下测定每孔的吸光度A。按以下公式计算含药血清对L-02的保护率。

保护率 = (被测组 A₄₉₀ - 模型组 A₄₉₀) / (空白组 A₄₉₀ - 模型组 A₄₉₀) × 100%

2.6 ALT, AST, MDA, GSH-Px 检测 收集各组

细胞处理后培养液上清,-20℃保存。ALT,AST,MDA,GSH-Px检测操作步骤,按照试剂盒说明书进行。

2.7 免疫荧光检测 Nrf2, Bach1 在细胞中的位置 明胶固定盖玻片,以密度1 × 10⁶个细胞每孔接种于6孔板中,按照按实验设计分组给药处理后,将细胞爬片取出,4%多聚甲醛固定细胞,10%正常山羊血清封闭30 min,兔抗Nrf2一抗(1:50),室温湿盒孵育过夜,FITC标记的羊抗兔二抗(1:50),室温湿盒孵育30 min。避光加入DAPI 5 min,进行细胞核染色,最后加入80%甘油封片,于显微镜下观察,拍照。

2.8 Western blot 法检测 L-02 中 Nrf2, Bach1 的胞核蛋白含量 细胞接种于6孔板,按组别给药造模处理完后,收集清洗细胞,按照胞浆蛋白-核蛋白抽提试剂盒说明,提取各组细胞的胞核蛋白,BCA法蛋白定量。取25 μg蛋白进行凝胶电泳,将电泳产物转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF),含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液室温封闭1 h,Nrf2或Bach1一抗(Nrf2,1:1 000;Bach1,1:800),室温孵育1.5 h,清洗后辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 800)室温孵育1 h,清洗后ECL显色,扫描胶片,利用Image J图像处理软件分析目标条带的平均灰度值。

相对蛋白质水平 = 目的蛋白条带的灰度值/内参蛋白条带的灰度值

2.9 统计学分析 采用SPSS 17.0统计分析软件处理,所得实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析ANOVA统计。以P < 0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 GO 对 L-02 细胞存活率的影响 GO能引起肝细胞氧化应激损伤且具有剂量依赖性,正常组的存活率为(100.00 ± 1.52)%,5,10,20 U·L⁻¹组细胞存活率分别为(91.00 ± 7.51)%,(85.83 ± 1.69)%,(82.29 ± 3.54)%,与正常组没有统计学意义。40,50 U·L⁻¹组细胞存活率分别为(78.19 ± 4.48)%,(71.05 ± 6.15)%,与0 U·L⁻¹组有统计学意义(P < 0.05)。GO活性单位从60 U·L⁻¹增加到120 U·L⁻¹的过程中,细胞存活率急剧下降(P < 0.01)。60,80,100,120 U·L⁻¹组细胞存活率分别为(66.69 ± 3.81)%,(60.19 ± 2.53)%,(51.85 ± 5.19)%,(48.53 ± 4.2)%。当活性单位大于120 U·L⁻¹时,细胞存活率下降缓慢,160,200 U·L⁻¹组细胞存活率分别为(47.37 ± 3.39)%,(46.63 ±

6.16)%。根据实验结果,选取实验存活率最接近 50%的 100 U·L⁻¹ GO 建立肝细胞氧化应激模型。见图 1。

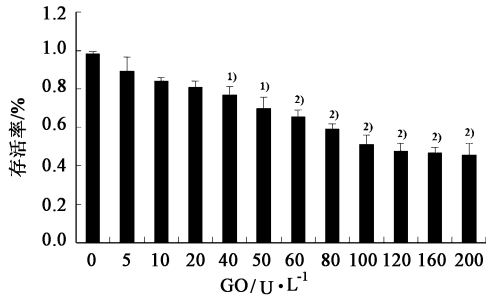


图 1 不同活性单位 GO 对细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig.1 Effects of different concentrations GO on cell activity ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 对氧化应激损伤 L-02 细胞活性的影响 与空白组比较,模型组的细胞活性明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, *t*-BHQ, JGSD, *t*-BHQ + JGSD, Gensitein + JGSD, ATRA + JGSD 组有效的提高细胞活性 ($P < 0.05$)。ATRA, Gensitein 有降低细胞活性的趋势,但无统计学意义。见表 1。

3.3 对培养上清液 ALT, AST, MDA, GSH-Px 的影响 与空白组比较,模型组 ALT, AST 活性及 MDA 含量明显升高, GSH-Px 活性明显下降 ($P < 0.01$);

表 1 JGSD 和干预剂对氧化损伤细胞的活性影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of JGSD contained serum and agents on cell proliferation induced by glucose oxidase ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A	保护率/%
空白	-	0.479 ± 0.021	-
模型	-	0.300 ± 0.007 ²⁾	-
JGSD	20% ⁵⁾	0.367 ± 0.002 ³⁾	37.43
<i>t</i> -BHQ	80	0.386 ± 0.034 ³⁾	48.04
<i>t</i> -BHQ + JGSD	80 + 20% ⁵⁾	0.411 ± 0.022 ⁴⁾	62.01
ATRA	5	0.273 ± 0.015	-15.08
ATRA + JGSD	5 + 20% ⁵⁾	0.368 ± 0.002 ³⁾	37.99
Gensitein	80	0.272 ± 0.002	-15.64
Gensitein + JGSD	80 + 20% ⁵⁾	0.329 ± 0.002	16.20

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; ⁵⁾ 体积分数(表 2)。

与模型组比较,GO 可使 ALT, AST 活性及 MDA 含量增大,抗氧化酶 GSH-Px 活性明显下降 ($P < 0.01$), 经 *t*-BHQ, JGSD 保护后, ALT, AST 活性及 MDA 含量明显下降, GSH-Px 明显上升 ($P < 0.01$), 而 Gensitein 与 ATRA 没有体现出保护细胞的作用。但 Gensitein 或 ATRA 与 JGSD 联用时,与模型组比较,细胞损伤指标 AST 活性及 MDA 含量较低 ($P < 0.05$), GSH-Px 含量明显增大 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 JGSD 与干预剂对细胞 ALT, AST, MDA, GSH-Px 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of JGSD contained serum and agents on ALT, AST, MDA, GSH-Px ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

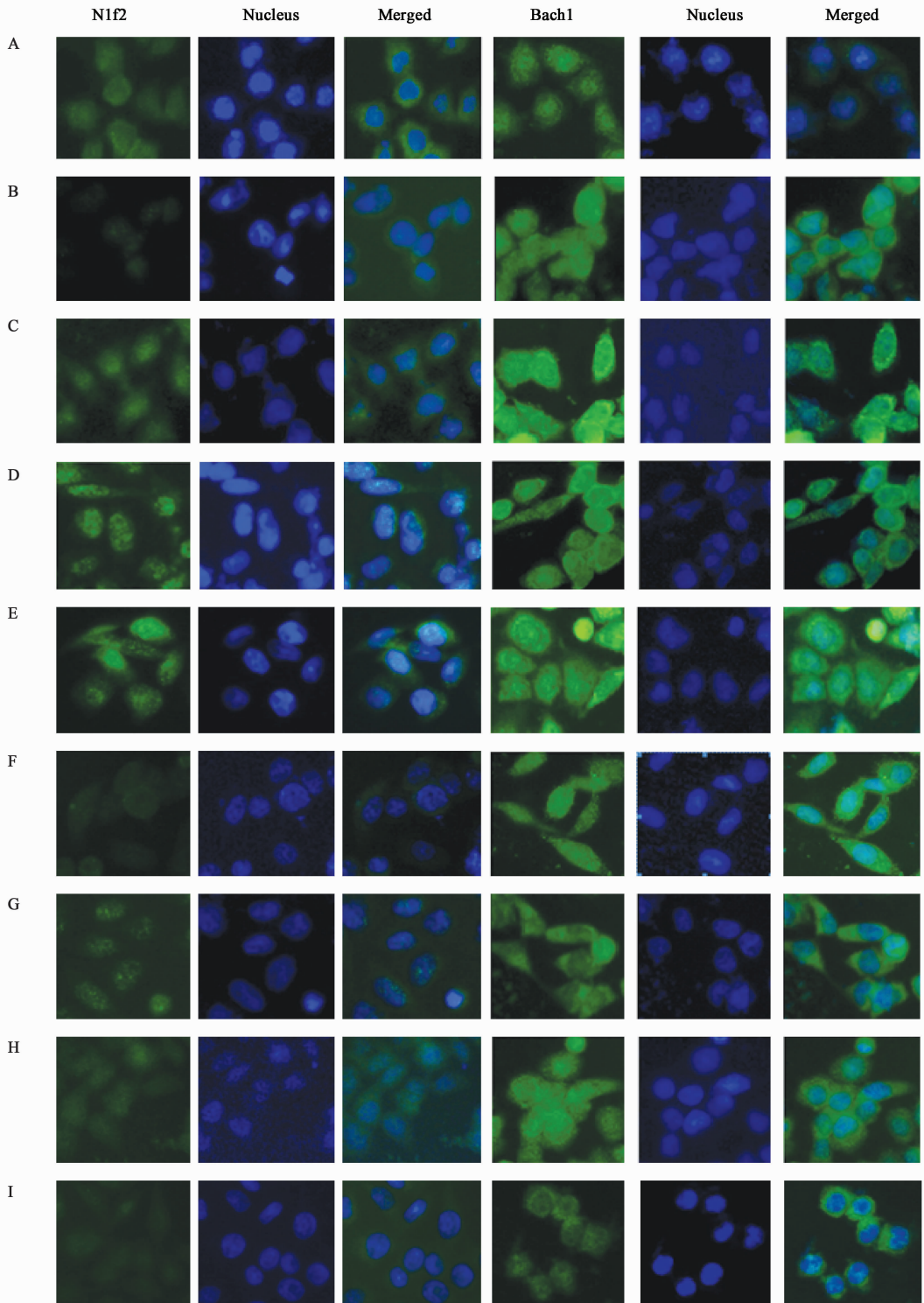
组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ALT/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	MDA/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	GSH-Px/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	0.961 ± 0.092	1.253 ± 0.112	5.027 ± 0.158	57.143 ± 1.065
模型	-	3.420 ± 0.097 ²⁾	4.067 ± 0.728 ²⁾	11.613 ± 0.204 ²⁾	25.000 ± 0.753 ²⁾
JGSD	20% ⁵⁾	2.947 ± 0.072 ⁴⁾	2.998 ± 0.088 ⁴⁾	6.694 ± 0.486 ⁴⁾	45.834 ± 0.652 ⁴⁾
<i>t</i> -BHQ	80	2.946 ± 0.507 ³⁾	3.022 ± 0.602 ³⁾	6.506 ± 0.167 ⁴⁾	44.841 ± 3.074 ⁴⁾
<i>t</i> -BHQ + JGSD	80 + 20% ⁵⁾	1.970 ± 0.486 ⁴⁾	2.011 ± 0.937 ⁴⁾	5.860 ± 0.674 ⁴⁾	56.151 ± 2.859 ⁴⁾
ATRA	5	3.686 ± 0.159	4.087 ± 0.164	12.339 ± 0.169	26.389 ± 0.896
ATRA + JGSD	5 + 20% ⁵⁾	2.858 ± 0.091 ⁴⁾	3.136 ± 0.088 ³⁾	9.946 ± 0.391 ³⁾	46.627 ± 0.896 ⁴⁾
Gensitein	80	4.100 ± 0.145	4.040 ± 0.077	12.635 ± 0.349	26.786 ± 1.249
Gensitein + JGSD	80 + 20% ⁵⁾	3.449 ± 0.109	3.808 ± 0.334 ³⁾	10.081 ± 0.864 ³⁾	41.865 ± 2.184 ³⁾

3.4 免疫荧光检测 Nrf2, Bach1 细胞中的位置变化

空白组 Nrf2 表达较弱,GO 造模后主要集中在细胞核内。*t*-BHQ 与 JGSD 有加剧 Nrf2 核内聚集的趋势,尤以 *t*-BHQ + JGSD 组明显。ATRA 降低 Nrf2 表达的作用明显,而 Gensitein 与 Gensitein + JGSD 对 Nrf2 分布的影响不明显。正常情况下, Bach1 以核内表达居多,经过葡萄糖氧化损伤后 Bach1 有增多

且向细胞浆中转移的趋势。*t*-BHQ 有加快损伤细胞 Bach1 胞浆定位的作用, ATRA 对 Bach1 的影响不明显, Gensitein 有加剧 Bach1 在细胞核内聚集的趋势。而各干预剂与甲嘎松汤含药血清联用时, Bach1 胞浆聚集明显。见图 2。

3.5 对细胞核内蛋白 Nrf2, Bach1 表达的影响 与空白组比较,GO 增加了核内 Nrf2, Bach1 的表达



A. 空白组; B. 模型组; C. 20% JGSD 组; D. t -BHQ $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; E. t -BHQ $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 20% JGSD 组; F. ATRA $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; G. ATRA $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 20% JGSD 组; H. Gensitein $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; I. Gensitein $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 20% JGSD 组 (图 3 同)

图 2 JGSD 与干预剂对 Nrf2 与 Bach1 在细胞内表达分布的影响 (荧光共聚焦, $\times 400$; 绿色为目的蛋白表达, 蓝色为细胞核)

Fig. 2 Effect of JiaGaSontang contained serum on Nrf2 and Bach1 distribution in damaged L-02 cells (Confocal fluorescence, $\times 400$; Green as protein expression, blue as the nucleus)

($P < 0.01$)。JGSD 可使核内 Nrf2 表达增多、Bach1 表达减小 ($P < 0.01$) ; t -BHQ 可同时增大核内 Nrf2,

Bach1 的表达 ($P < 0.01$) ; ATRA 可减少核内 Nrf2 表达、增大 Bach1 表达 ($P < 0.01$) ; Genistein 可同时增

大核内 Nrf2, Bach1 的表达 ($P < 0.01$), 尤于 Bach1 的变化明显。JGSD 可协同 *t*-BHQ 升高 Nrf2 核内表达, 抑制其升高核内 Bach1 表达的作用; 改变 ATRA

减少核内 Nrf2, 增加 Bach1 的作用; 抑制 Genistein 升高核内 Nrf2, Bach1 的表达, 尤于降低 Bach1 的作用明显。见图 3。

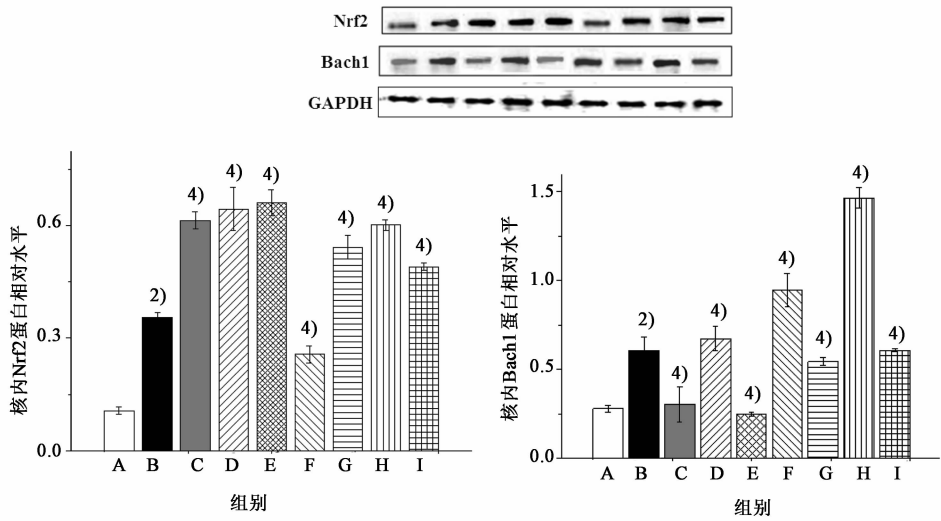


图 3 JGSD 与干预剂对核内蛋白 Nrf2 与 Bach1 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effects of JGSD and agents on the nucleus protein expression of Nrf2 and Bach1 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

4 讨论

在临床及动物研究中发现, 患有肝损伤的机体常伴有脂质过氧化物的产生以及抗氧化酶系统的减弱, 过量的活性氧代谢物会造成细胞膜和线粒体膜的脂质过氧化损伤, 直接或间接导致肝细胞坏死或凋亡^[14]。因此, 提高抗氧化酶系统活性、清除过量过氧化物已成为治疗肝损伤的途径之一。“Keap1-Nrf2-ARE 通路”是调控 II 相酶及抗氧化酶产生, 激活该通路成为改善氧化损伤的研究热点。氧化应激可使 Nrf2 负性调控因子 Bach1 的酪氨酸 486 磷酸化, 从而快速出核, 让位于 Nrf2 结合 ARE 诱导抗氧化酶的产生, 在抗氧化过程中 Bach1 负性调控也有着十分重要的作用^[6]。

本研究发现肝细胞受氧化损伤后, Nrf2 和 Bach1 核内表达均增加。甲噁松汤含药血清可降低受损肝细胞 ALT, AST, MDA 的含量, 升高 GSH-Px 的活性, 明显的提高 GO 损伤细胞的细胞活性, 即其有维持模型细胞通透性, 降低脂质过氧化物, 提高抗氧化系统的作用, 而其抗氧化保肝的作用与促进 Nrf2 入核、Bach1 出核有关。

另外, 本实验验证了 *t*-BHQ 可促进 Nrf2 进入细胞核、ATRA 可抑制 Nrf2 进入细胞核及 Genistein 可抑制 Bach1 移出细胞核的报道^[7-11], 同时发现 ATRA 与 Genistein 没有改变肝损伤细胞 Bach1 主要分布于核内的状态, Genistein 同时抑制 Nrf2 的出核。

ATRA 和 Genistein 所诱导的核内 Bach1 或 Bach1 与 Nrf2 核内同时的高表达, 没有使 GSH-Px 活性升高, 不能发挥治疗损伤细胞的作用。笔者推测 Nrf2 与 Bach1 相互影响, 而 Nrf2 的核内低表达以及 Bach1 聚集于细胞核内不利于抗氧化损伤。甲噁松汤含药血清与 3 种干预剂联用时, 更进一步的提高了 *t*-BHQ 预作用后核内 Nrf2 的表达, 提高 ATRA 干预后核内 Nrf2 的表达, 降低 Genistein 预作用后核内表达过高的 Nrf2, 均下降了 3 种干预剂核内 Bach1 的表达, 使 Nrf2 主要分布于细胞核内, Bach1 主要分布于细胞浆内, 且两者在核内维持在一定的水平从而增强 GSH-Px 活性, 提高细胞活性, 达到保护氧化损伤肝细胞的作用。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准·藏药. 第一册[S]. 1995:257.
- [2] 熊天琴, 李红侠, 陈元元, 等. 甲噁松汤对肝损伤的保护作用研究[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(1): 132-135.
- [3] 邵洛林, 郭建强, 许伟华. Nrf2 在肝细胞中作用的研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2009, 29(6): 381-383.
- [4] Liu D, Duan X, Dong D, et al. Activation of the Nrf2 pathway by inorganic arsenic in human hepatocytes and the role of transcriptional repressor Bach1[J]. Oxid Med Cell Longev, 2013, 17(5): 1-10.

- [5] Warnatz H J, Schmidt D, Manke T, et al. The BTB and CNC homology 1 (BACH1) target genes are involved in the oxidative stress response and in control of the cell cycle[J]. J Biol Chem, 2011,286(26) :23521-23532.
- [6] Baird L, Dinkova-Kostova A T. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway[J]. Arch Toxicol, 2011, 85(4) :241-72.
- [7] James W K, Anil K J. Antioxidant-induced phosphorylation of tyrosine 486 leads to rapid nuclear export of Bach1 that allows Nrf2 to bind to the antioxidant response element and activate defensive gene expression[J]. J Biol Chem, 2010, 285(1) :153-162.
- [8] Duan X, Liu D, Xing X, et al. Tert-butylhydroquinone as a phenolic activator of Nrf2 antagonizes arsenic-induced oxidative cytotoxicity but promotes arsenic methylation and detoxication in human hepatocyte cell line[J]. Biol Trace Elem Res, 2014, 160(2) :294-302.
- [9] Wang X J, Hayes J D, Henderson C J, et al. Identification of retinoic acid as an inhibitor of transcription factor Nrf2 through activation of retinoic acid receptor alpha[J]. Proc Natl Acad Sci, 2007, 104(49) :19589-19594.
- [10] Ma W, L Yuan, H Yu, et al. Genistein as a neuroprotective antioxidant attenuates redox imbalance induced by beta-amyloid peptides 25-35 in PC12 cells [J]. Int J Dev Neurosci, 2010, 28(4) :289-295.
- [11] Liang H W, S F Qiu, J Shen, et al. Genistein attenuates oxidative stress and neuronal damage following transient global cerebral ischemia in rat hippocampus [J]. Neurosci Lett, 2008, 438(1) :116-120.
- [12] 熊天琴,赵玉民,泽仁达瓦,等. 甲嘎松汤 HPLC 特征指纹图谱[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(22) : 60-63.
- [13] 赵曙光,李强,王旭霞,等. 葡萄糖氧化酶诱导肝细胞氧化应激模型的建立[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(2) :243-245.
- [14] 赵冬梅,刘耕畴. 肝细胞损伤机制进展的研究及其对研究治肝病新药的启示[J]. 中国药理学通报, 2001, 17(6) :605-609.

[责任编辑 周冰冰]

《中国当代医药》杂志 欢迎订阅 欢迎投稿

《中国当代医药》杂志是国家卫生和计划生育委员会主管,中国保健协会、当代创新(北京)医药科学研究院主办的医药卫生专业期刊,本刊已被美国化学文摘(CA)数据库、万方数据数字化期刊群、中国核心期刊(遴选)数据库、中国知网、中国学术期刊网络出版总库、中文科技期刊数据库全文收录,系中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊。现为旬刊,国内刊号:CN11-5786/R,国际刊号:ISSN 1674-4721,邮发代号:2-515,定价:每期20元,通过本刊发行部订阅全年36期杂志优惠价为540元。

主要栏目:综述、论著、实验研究、临床研究、药理与毒理、药品鉴定、药物与临床、新药评价、麻醉与镇痛、医学检验、病理分析、影像与介入、中医中药、护理研究、制剂与技术、医药教育、调查研究、工作探讨等50多个栏目。根据全国继续医学教育委员会的《继续医学教育学分授予与管理办法》学分授予标准,在本刊发表的论文可获得国家级继续教育学分。本刊出版周期短,来稿无论录用与否均在短期内告知作者。对省、部级以上部门立项的科研论文以及本刊订户的论文予以优先刊登。本刊订户凭订阅单复印件投稿,同等条件优先录用。欢迎各医药单位、院校、厂家刊登广告。

社址:北京市朝阳区通惠家园惠润园(壹线国际)5-3-602 邮编:100025

投稿热线:010-59679076 59679077 发行热线:010-59679533 传真:010-59679056

投稿信箱:ddy@vip.163.com 网址:www.dangdaiyiyao.com