

· 药理 ·

甘草酸通过RNA结合蛋白HuR调控p21表达对IEC-6细胞抗凋亡作用的影响

肖婷婷, 罗敏, 曾星, 黄羽, 张娴*
(广州中医药大学 第二临床医学院, 广州 510120)

[摘要] 目的:研究甘草酸(GA)通过RNA结合蛋白人类抗原R(HuR)调控p21转录后表达,探讨GA对肿瘤坏死因子- α (TNF- α)/放线菌酮(CHX)诱导的小肠上皮细胞凋亡的抵抗作用机制。方法:采用大鼠小肠隐窝上皮细胞株(IEC-6),实验分空白组,GA(60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组,TNF- α +CHX组和GA+TNF- α +CHX组,分别用生物素标记RNA与蛋白结合实验(Biotin pull down)和RNA-免疫共沉淀(RNA IP)分析RNA结合蛋白HuR与p21 mRNA的外源性和内源性结合;构建含p21 3'-UTR-ARE的荧光素酶报告质粒,用双荧光素酶报告基因系统检测HuR对p21的转录后调控影响;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测HuR及p21 mRNA水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测HuR及p21蛋白表达水平。采用TNF- α +CHX诱导细胞凋亡,实时细胞功能分析仪检测细胞凋亡,免疫共沉淀(CO-IP)检测p21蛋白与半胱氨酸蛋白酶-3前体蛋白(proCaspase-3)结合。结果:与空白组比较,GA处理后,能升高细胞浆内HuR蛋白的表达($P<0.05$);GA能促进HuR与p21 mRNA 3'-UTR的结合($P<0.05$);GA通过HuR升高了p21 mRNA和蛋白表达水平($P<0.05$),同时增高对荧光素酶报告基因的表达($P<0.01$),沉默HuR后GA对p21 mRNA和蛋白的上调表达作用消失,GA能促进p21与proCaspase-3的结合($P<0.05$),部分降低TNF- α +CHX诱导的IEC-6细胞凋亡。结论:GA能促进HuR向细胞浆内转位,促进HuR与p21 mRNA结合并调节其表达,增高荧光素酶表达活性以促进p21的翻译表达,增高p21与proCaspase-3的结合,从而提高IEC-6细胞的抗凋亡能力。

[关键词] 甘草酸; RNA结合蛋白人类抗原R(HuR); p21; 小肠上皮细胞; 凋亡

[中图分类号] R2-0;R289;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)12-0085-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201238

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200407.2007.004.html>

[网络出版日期] 2020-4-8 9:29

Glycyrrhizic Acid Protect IEC-6 Cells from Apoptosis Via HuR Mediated Posttranscription of p21

XIAO Ting-ting, LUO Min, ZENG Xing, HUANG Yu, ZHANG Xian*

(The Second Clinical Medical School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of glycyrrhizic acid (GA) from tumor necrosis factor- α +actinomycetes ketone (TNF- α +CHX) induced apoptosis in rat small intestine crypt epithelial cell line (IEC-6) via AU rich element mRNA binding protein HuR mediated posttranscription of p21 and the potential mechanism. **Method:** The cultured IEC-6 cells were observed. The experiment was divided into blank group, GA (60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, TNF- α +CHX group and GA+TNF- α +CHX group. Cytoplasmic and nuclear HuR were measured by Western blot. The interaction of HuR and p21 mRNA was detected by biotin pull down and RNA IP. Luciferase activity was measured after transfection with construct with p21 3'-UTR cloned into downstream of luciferase reporter. Cell apoptosis was detected by real-time dynamic cell analyzer, p21 and

[收稿日期] 20200206 (009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473440)

[第一作者] 肖婷婷,在读硕士,从事中药分子药理研究,E-mail:1394614377@qq.com

[通信作者] *张娴,博士,副研究员,硕士生导师,从事中药分子药理研究,E-mail:zhangx07@aliyun.com

cysteine proteinase-3 precursor protein (proCaspase-3) association was analysed by CO-IP. **Result:** After GA treatment for 48 h, cytoplasmic HuR protein expression increased ($P < 0.05$), the binding between HuR and p21 mRNA expression up regulated ($P < 0.05$), luciferase activity increased ($P < 0.01$), and p21 mRNA and protein expression also increased ($P < 0.05$), while these results were abolished by HuR silencing with siRNA. GA enhanced p21 and procaspase3 interaction ($P < 0.05$), and attenuated TNF- α +CHX induced apoptosis in IEC-6 cells. **Conclusion:** GA protected IEC-6 cells from TNF- α /CHX induced apoptosis via HuR mediated p21 posttranscription, which due to GA enhanced HuR binding to endogenous and recombinant p21 mRNA and increased p21 interaction with proCaspase3.

[Key words] glycyrrhizic acid; AU rich element mRNA binding protein HuR; p21; intestinal epithelial cells; apoptosis

小肠是消化吸收、分泌排泄和免疫防疫的重要器官,是多种疾病尤其是多器官功能不全乃至多脏器功能衰竭(MODS)的发生和转归的中心。小肠上皮由单层柱状上皮细胞组成,具有隐窝和绒毛结构,自我更新周期短,分化迁移路线明确,应用于细胞增殖、分化、凋亡等生理现象的研究^[1]。生理状态下,小肠隐窝上皮细胞可不断增殖,向绒毛上皮移行,并伴随分化、成熟和衰老而在绒毛顶端脱落,以此维持正常的肠黏膜结构和功能^[2]。在应激状态下,小肠黏膜上皮能快速修复和适应,其隐窝细胞增殖,引起肠黏膜生长,重建黏膜完整性^[3],此外,导致基因的表达发生急剧的变化并直接决定细胞的生存和死亡,但其调控机制仍不甚了解。本研究采用的IEC-6细胞来源于新生的正常大鼠小肠,具有正常的未分化的肠上皮隐窝细胞的特征,为研究黏膜修复提供了合适的体外模型,并广泛应用于肠上皮细胞损伤的相关研究^[4-5]。文献表明,人类抗原R(HuR)是一种广泛表达的RNA结合蛋白,可在转录后水平调节基因表达^[6]。课题组前期研究证明,AU富集元件mRNA结合蛋白HuR能通过对X-连锁凋亡蛋白(XIAP),p21和p53AU富集元素(ARE)mRNA的转录后表达进行调节,从而对小肠上皮细胞有促增殖和保护作用,明确了HuR是甘草促进IEC-6细胞增殖作用的一种分子药靶^[7-9]。同时研究表明,GA对肠上皮细胞具有保护作用^[10]。本文在前期研究基础上,首先筛查了不同浓度的GA对肿瘤坏死因子- α +放线菌酮(TNF- α +CHX)诱导的IEC-6细胞凋亡的保护作用,发现GA在60,120,240 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度对早期细胞凋亡有一定的保护作用,为进一步研究其机制,选用GA(60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)浓度作用于IEC-6细胞,主要研究GA对HuR及其靶基因p21的转录后表达调控,并通过双荧光素酶报告基因系统检测HuR对p21转录后调控影响,探讨

GA通过HuR转录后调控基因表达对TNF- α +CHX诱导的小肠上皮细胞凋亡的可能分子药理机制,为进一步研究甘草在肠黏膜修复方向的药理机制提供新思路。

1 材料

1.1 药物与试剂 GA(美国Fluka公司,批号A0267975);TNF- α (美国RD公司,批号20150227);放线菌酮(CHX), β -肌动蛋白(β -actin)(美国Sigma公司,批号分别为c7698,A2228-100UL);DMEM培养基,FBS胎牛血清,0.25%-EDTA胰酶(美国Gibco公司,批号2520005);预染蛋白质标准品(Marker,美国Thermo Scientific公司,批号26616);聚山梨酯-20(上海碧云天生物技术有限公司,批号ST825);蛋白酶抑制剂,逆转录试剂盒,荧光定量PCR试剂盒(美国Roche公司,批号分别为26925820,11929100,A409432);RIPA(10 \times)缓冲液(美国CST公司,批号9806);p21抗体(美国BD公司,批号556431);人类抗原R(Human antigen R, HuR),半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), β 微管蛋白(β -tubulin)和层黏连蛋白B1(Lamin B1)抗体(美国Santa Cruz公司,批号分别为sc-5261,sc-7148,sc-5274,sc-56143);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠抗体(美国Bio-Rad公司,批号170-6515);ECL发光液(美国Millipore公司,批号WBKLS0500);RNeasy Mini试剂盒,QIAquick PCR扩增试剂盒(德国Qiagen公司,批号分别为74104,28104);ImProm-II逆转录系统,GoTaq[®] Green Master Mix(美国Promega公司,批号分别为A3801,M7122);MEGAscript[®] T7试剂盒(美国Ambion公司,批号AM1334);Dynabeads[®] Biotin Binder,RNaseOUT重组核糖核酸酶抑制剂(美国Invitrogen公司,批号分别为110-47,10777-019)。

1.2 细胞 大鼠小肠隐窝上皮细胞(IEC-6),购于

美国 ATCC (American Type Culture Collection) 公司,批号 4988325,细胞传至 20 代之前使用。

1.3 仪器 VICTOR X5 型酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司);FC500 型流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);ABI 7500 型实时荧光定量基因扩增系统(美国 ABI 公司);Mini-PROTEAN® II Cell 型电泳仪,Trans-Blot 型转膜仪,Gel Doc XR+ 型凝胶成像系统和 xCELLigence® RTCA DP 型实时细胞功能分析仪(美国 Bio-Rad 公司);SUB28 型恒温水浴锅(英国 Grant 公司);3111 型二氧化碳细胞培养箱,VORTEX-GENIE2 型可调速涡旋混合器(美国 Thermo Scientific 公司);HR40- II A2 型生物安全柜(广州火元医疗器械有限公司);DT5-3 型低速台式离心机(北京时代北利离心机有限公司);5424 R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);IC-1000 型自动细胞计数仪(美国 Countstar 公司);CKX41 型倒置生物显微镜(日本 Olympus 公司);M1000pro 型多功能酶标仪(上海帝肯贸易有限公司)。

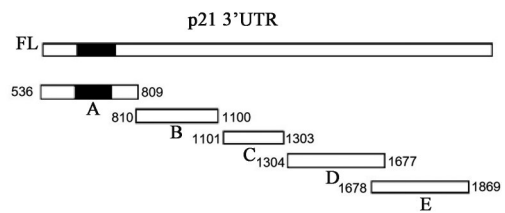
2 方法

2.1 细胞培养及分组 IEC-6 细胞用含 10% FBS 和牛胰岛素的 DMEM,37 °C 5% CO₂ 恒温培养箱培养,0.25%-EDTA 胰酶消化传代。实验设立空白组,甘草酸组,TNF-α+CHX 组,甘草酸+TNF-α/CHX 组。甘草酸组在加入 60 μmol·L⁻¹ 药物作用 48 h 后,与模型组一起加入 TNF-α/CHX(10 μg·L⁻¹/20 mg·L⁻¹) 作用 2 h,空白组正常培养,细胞处理后进行后续实验。

2.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 HuR 与 p21 蛋白的表达 用 PIERCE 蛋白提取试剂盒分步提取细胞浆和细胞核蛋白,RIPA 提取细胞总蛋白,蛋白提取后用 BCA 测定浓度,SDS-PAGE 电泳后转膜,5% BSA 封闭 1 h,一抗 4 °C 孵育过夜,TBS 洗涤 3 次,HRP 二抗孵育 1 h 后洗涤,用 ECL 显影成像,再用 Image J 进行灰度分析。

2.3 Biotin pull down 分析 HuR 与 p21 mRNA 的结合

2.3.1 Biotin 标记的 p21 mRNA 探针制备 采用 RT-PCR 方法制备含 T7 启动子序列(TAATACGACTCACTATAGGGAGA) p21 mRNA 3'-UTR 全长及不同片段的 DNA 模板,后切胶回收纯化,后用 T7 酶体外转录反应体系和 Biotin-11-CTP 合成 Biotin 标记的 p21 RNA 探针,用纯化柱纯化,即含 p21 mRNA 3'-UTR 不同片段的 RNA 探针,p21 mRNA 3'-UTR 全长及不同片段探针见图 1,引物序列见表 1。



A.p21 3'-UTR-F1 片段;B.p21 3'-UTR-F2 片段;C.p21 3'-UTR-F3 片段;D.p21 3'-UTR-F4 片段;E.p21 3'-UTR-F5 片段

图 1 Biotin pull down 检测的 p21 mRNA 3'-UTR mRNA 分段

Fig. 1 p21 mRNA 3'-UTR segments by Biotin pull down

表 1 Biotin pull down 引物序列

Table 1 Biotin pull down primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度 /bp
p21 3'-UTR-F1	上游 AGTGCCACGGGAGGCTC 下游 CAGCTTGGGTTGAGAAGGAC	273
p21 3'-UTR-F2	上游 TGTTTCTGATCCTGGCGGGATGG 下游 TAACCGGGCATCTTTGTTCT	290
p21 3'-UTR-F3	上游 GACCTAAGCGTACCGTCCAG 下游 GTGGCGAGGGAAAGGATG	202
p21 3'-UTR-F4	上游 TCAGTGGACCAGAAGGGAAC 下游 GGCCAGACCCACTAAGTGCT	373
p21 3'-UTR-F5	上游 AACCCCAAACACCCCTGT 下游 TCATCTAGAAGTATTTATTGAGACCA	191

2.3.2 RNA 探针及蛋白质外源性结合 细胞培养处理后提取蛋白,定量后与制备好的 RNA 探针孵育 30 min 后与链霉素标记的磁珠孵育 30 min,后用 PBS 洗涤孵育后的磁珠,4 °C,12 000 r·min⁻¹(离心半径 8 cm)离心 15 min 后加入上样缓冲液,在 95 °C 变性 5 min,4 °C,12 000 r·min⁻¹离心 5 min 后,吸出上清,用于 Western blot 检测与 p21 RNA 探针结合的 HuR 的含量。

2.4 RNA IP 分析 HuR 与 p21 mRNA 内源性结合 细胞处理后收获细胞蛋白,用抗 HuR 抗体免疫沉淀多聚核糖体上 HuR 与 p21 mRNA 的内源性结合,同时用 IgG 作阴性对照,将沉淀所得的 mRNA 先逆转录得到 cDNA,后用 RT-PCR 扩增。

2.5 双荧光素酶报告基因检测 采用双荧光素酶报告基因检测系统,将 HuR 靶基因 p21 的 3'-UTR 结合序列克隆插入萤火虫荧光素酶报告基因下游,构建萤火虫荧光素酶报告基因重组质粒,与海肾萤光素酶报告基因的参比质粒一起转染入不同处理组 IEC-6 细胞,48 h 后收获细胞,裂解蛋白,检测报告基

因的表达,用海肾萤光素酶活性参比较正,由此分析不同处理因素通过HuR对p21不同插入片段对报告基因表达的调节活性。

2.6 细胞活性实时检测 细胞接种于E-plate 16孔板,置于37℃,5% CO₂,饱和湿度培养,不同浓度GA处理48 h,细胞生长至80%~90%时,加入TNF-α+CHX作用,实时细胞功能分析仪实时检测细胞活性。

2.7 CO-IP检测p21与proCaspase-3结合 细胞用GA处理后用IP裂解液提取处理,进行蛋白定量后取蛋白裂解液500 μg加入Agarose A及同种属的IgG抗体0.5 μg于4℃摇转仪反应2 h预处理样品以消除非特异性,后4℃,12 000 r·min⁻¹离心5 min取上清。上清与抗体偶联的Agarose A反应过夜,反应6 h后,4℃,12 000 r·min⁻¹离心5 min,弃上清,留沉淀。用预冷的裂解液洗涤,4℃,12 000 r·min⁻¹离心10 min后收集沉淀,加入上样缓冲液,100℃变性5 min,然后冰浴冷却至室温后进行Western blot检测。

2.8 统计学处理方法 采用SPSS 20.0软件对所得数据进行统计处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。如果数据满足方差齐性,两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LSD检验;若不满足方差齐性,采用Dunnett T检验分析组间差异,P<0.05为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 GA对大鼠IEC-6细胞浆、细胞核和总细胞内HuR蛋白表达的影响 与空白组比较,IEC-6细胞浆内甘草酸组的HuR蛋白表达明显升高(P<0.05);细胞核内甘草酸组HuR蛋白表达稍有降低,但无统计学意义;总细胞内HuR蛋白表达无明显差异。见图2,表2。

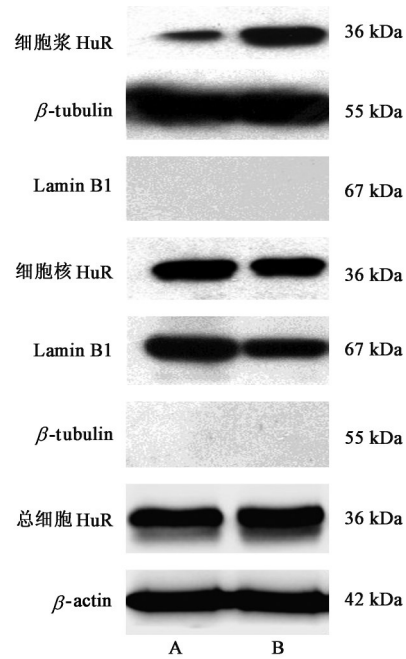
3.2 GA对大鼠IEC-6细胞HuR和p21 mRNA 3'-UTR结合的影响 Biotin pull down检测HuR蛋白与p21 3'-UTR不同片段针的结合,结果显示p21 3'-UTR-F1片段与HuR蛋白有特异性结合。

表2 GA对IEC-6细胞浆、细胞核、总细胞内HuR蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of GA on HuR protein in cytoplasm, nucleus and total cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞浆 HuR/ β -tubulin	细胞核 HuR/Lamin B1	总细胞 HuR/ β -actin
空白	-	0.28±0.27	2.08±0.15	0.99±0.03
甘草酸	60	0.62±0.39 ¹⁾	1.88±0.20	1.06±0.04

注:与空白组比较¹⁾P<0.05(表3同)。

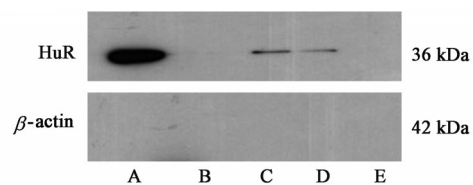


A. 空白组;B. 甘草酸组(图4~6同)

图2 IEC-6细胞浆、细胞核和总细胞内HuR蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of HuR protein in rat IEC-6 cytoplasm, nucleus and total cells

与空白组比较,甘草酸组p21 3'-UTR F1片段中HuR蛋白表达明显升高[(设空白组1.00,甘草酸组1.75±0.79, P<0.05)];RNA IP检测HuR蛋白与p21 mRNA的结合,与空白组比较,甘草酸组与HuR蛋白结合的p21 mRNA表达明显上调(空白组1.00,甘草酸组1.70±0.03, P<0.05)。见图3~5。



A. p21 3'-UTR-F1组;B. p21 3'-UTR-F2组;C. p21 3'-UTR-F3组;D. p21 3'-UTR-F4组;E. p21 3'-UTR-F5组

图3 Biotin pull down检测的与p21 mRNA 3'-UTR不同片段结合的HuR蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of HuR protein binding to p21 mRNA 3'-UTR segments detected by Biotin pull down

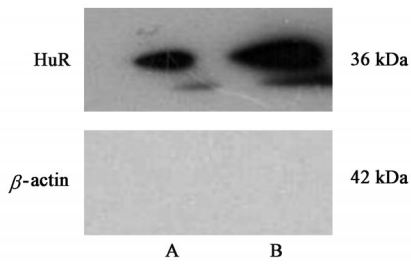


图4 Biotin pull down检测的GA作用IEC-6细胞后与p21 mRNA 3'-UTR F1结合的HuR蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of HuR protein binding to p21 mRNA 3'-UTR F1 in GA treated IEC-6 cells

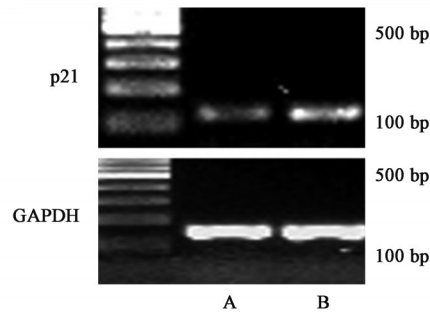


图5 RNA IP检测GA作用IEC-6细胞后与HuR蛋白结合的p21 mRNA表达电泳
Fig. 5 Electrophoresis of GA on expression of p21 mRNA binding to HuR protein in IEC-6 cells by RNA IP

3.3 GA通过HuR对大鼠IEC-6细胞p21 mRNA和蛋白表达的影响 与空白组比较,甘草酸组p21 mRNA表达明显上调($P < 0.05$),甘草酸组p21蛋白表达明显升高($P < 0.05$);而转染siRNA后,与空白+siRNA-NC组比较,空白+siHuR组p21 mRNA表达明显下调($P < 0.05$),HuR蛋白和p21蛋白表达明显降低($P < 0.05$),甘草酸组p21 mRNA表达明显上调($P < 0.05$),HuR蛋白和p21蛋白表达明显增加升高($P < 0.05$);与甘草酸组比较,甘草酸+siHuR组p21 mRNA表达明显下调($P < 0.05$),HuR蛋白和p21蛋白表达明显降低($P < 0.05$)。见图6,7,表3,4。

3.4 GA通过HuR和p21 mRNA 3'-UTR的相互作用对大鼠IEC-6细胞荧光素酶报告基因的表达影响 转染pGL3-p21 mRNA 3'-UTR F1(pLuc-F1)重

表4 沉默HuR后GA对p21 mRNA及蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of GA on expression of p21 mRNA after silencing of HuR($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	p21 mRNA	HuR/GAPDH	p21/GAPDH
空白+siRNA-NC	-	1.17±0.29	2.20±0.86	0.80±0.25
空白+siHuR	0.05	0.54±0.31 ¹⁾	1.04±0.58 ¹⁾	0.49±0.27 ¹⁾
甘草酸	60	2.55±1.82 ¹⁾	1.77±0.51 ¹⁾	0.88±0.27 ¹⁾
甘草酸+siHuR	60+0.05	1.43±0.38 ²⁾	1.00±0.19 ²⁾	0.55±0.20 ²⁾

注:与空白+siRNA-NC组比较¹⁾ $P < 0.05$;与甘草酸组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

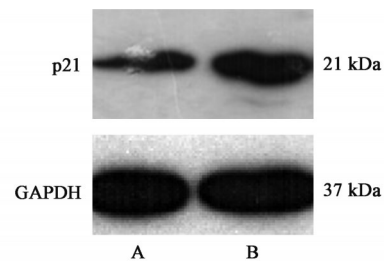
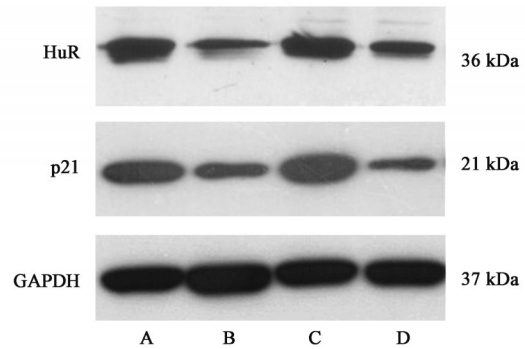


图6 GA作用的IEC-6细胞p21蛋白表达电泳
Fig. 6 Electrophoresis of p21 protein in GA treated IEC-6 cells



A. 空白+siRNA NC组;B. 空白+siHuR组;C. 甘草酸组;D. 甘草酸+si-HuR组
图7 沉默HuR后GA作用的IEC-6细胞p21蛋白表达电泳
Fig. 7 Electrophoresis of p21 protein in GA-induced IEC-6 cells after silencing of HuR

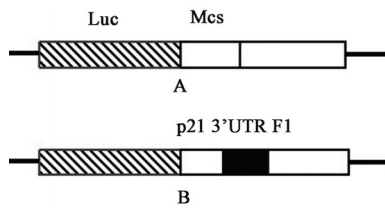
表3 GA对p21 mRNA及蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of GA on expression of p21 mRNA and protein ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	p21 mRNA	p21/GAPDH
空白	-	0.90±0.17	0.29±0.09
甘草酸	60	1.68±0.55 ¹⁾	0.51±0.06 ¹⁾

组质粒后,与甘草酸+质粒pluc-vector组比较,甘草酸+质粒pluc-F1组的荧光素酶活性显著升高($P < 0.01$);而转染siRNA后,与甘草酸+质粒pluc-F1+siRNA-NC组比较,甘草酸+质粒pluc-F1+siHuR组的荧光素酶活性显著降低($P < 0.01$)。见图8,表5,6。

3.5 GA对TNF- α +CHX诱导的大鼠IEC-6细胞形态的影响 空白组IEC-6细胞生长状态良好,形态



A. 质粒 pLuc vector; B. 质粒 pLuc F1

图8 空白质粒 (pLuc vector) 和含 pGL3-p21 mRNA 3'-UTR-F1 的重组质粒 (pLuc-F1)

Fig. 8 Construction of blank plasmid and pGL3-p21 mRNA 3'-UTR-F1 recombinant plasmid (pLuc-F1)

表5 GA对质粒 pLuc-F1 荧光素酶报告基因的表达活性影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of GA on expression of pLuc-F1 luciferase reporter gene ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	荧光素酶活性
空白+质粒 pLuc-vector	2 ²⁾	24.00±10.04
空白+质粒 pLuc-F1	2 ²⁾	26.75±7.75
甘草酸+质粒 pLuc-vector	60+2 ²⁾	8.45±0.04
甘草酸+质粒 pLuc-F1	60+2 ²⁾	79.75±4.75 ¹⁾

注:与甘草酸+质粒 pLuc-vector组比较¹⁾ $P<0.01$; ²⁾质量浓度单位为 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表6 沉默HuR后GA对质粒 pLuc-F1 荧光素酶报告基因的表达活性影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of HuR silencing on expression activity of pLuc-F1 luciferase reporter gene induced by GA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	荧光素酶活性
空白+质粒 pLuc-F1+siRNA-NC	2 ²⁾ +0.05	21.08±9.60
空白+质粒 pLuc-F1+siHuR	2 ²⁾ +0.05	11.40±1.98
甘草酸+质粒 pLuc-F1+siRNA-NC	60+2 ²⁾ +0.05	40.60±1.97
甘草酸+质粒 pLuc-F1+siHuR	50+2 ²⁾ +0.05	8.60±4.80 ¹⁾

注:与甘草酸+质粒 pLuc-F1+siRNA-NC组比较¹⁾ $P<0.01$; ²⁾质量浓度单位为 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

规则;与空白组比较, TNF- α +CHX 组 IEC-6 细胞贴

表7 GA对TNF- α +CHX诱导的IEC-6细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

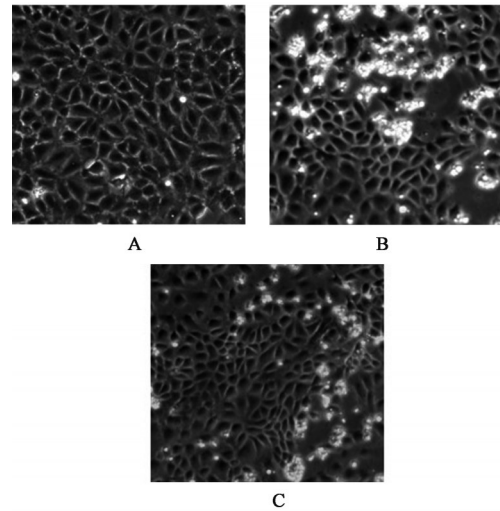
Table 7 Effect of GA on TNF- α +CHX-induced IEC-6 cell viability ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
空白	-	0.89±0.01	0.89±0.02	0.89±0.02	0.90±0.03	0.91±0.03
TNF- α +CHX	0.01 ³⁾ +20 ³⁾	0.74±0.04 ¹⁾	0.76±0.02 ¹⁾	0.72±0.02 ¹⁾	0.65±0.03 ¹⁾	0.68±0.04 ¹⁾
甘草酸+TNF- α +CHX	60+0.01 ³⁾ +20 ³⁾	0.80±0.00	0.80±0.00 ²⁾	0.76±0.00 ²⁾	0.71±0.01 ²⁾	0.72±0.01
	120+0.01 ³⁾ +20 ³⁾	0.79±0.01	0.79±0.01	0.77±0.01 ²⁾	0.71±0.01 ²⁾	0.70±0.01
	240+0.01 ³⁾ +20 ³⁾	0.83±0.03 ²⁾	0.81±0.03	0.79±0.04	0.74±0.05	0.76±0.05

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与TNF- α +CHX组比较²⁾ $P<0.05$; ³⁾质量浓度单位为 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.7 CO-IP 检测 GA 对大鼠 IEC-6 细胞 p21 与 proCaspase-3 结合的影响 与空白组比较, TNF- α +CHX 组 p21 (IB Caspase-3) 和 proCaspase-3 (IB p21) 的蛋白表达无明显差异, 表明 TNF- α +CHX 对 p21

壁细胞明显减少, 漂浮细胞增多, 与周围细胞脱离; 与 TNF- α +CHX 组比较, 甘草酸+TNF- α +CHX 组细胞形态多数正常, 漂浮细胞明显减少, 细胞间连接较好。见图9。



A. 空白组; B. TNF- α +CHX 组; C. 甘草酸+TNF- α +CHX 组 (图 10, 11 同)

图9 GA对TNF- α +CHX诱导后IEC-6细胞形态的影响(倒置荧光显微镜, $\times 100$)

Fig. 9 Effect of GA on morphology of IEC-6 cells induced by TNF- α +CHX (inverted fluorescence microscopy, $\times 100$)

3.6 GA对TNF- α +CHX诱导的大鼠IEC-6细胞活性的影响 与空白组比较, 实时动态细胞功能分析仪检测1, 2, 3, 4, 5 h TNF- α +CHX 组 IEC-6 细胞活性显著降低 ($P<0.01$); 与 TNF- α +CHX 组比较, 2, 3, 4 h 甘草酸 ($60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)+TNF- α +CHX 组 IEC-6 细胞活性升高 ($P<0.05$), 3, 4 h 甘草酸 ($120 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)+TNF- α +CHX 组 IEC-6 细胞活性明显升高 ($P<0.05$), 1 h 甘草酸 ($240 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)+TNF- α +CHX 组 IEC-6 细胞活性明显升高 ($P<0.05$), 5 h 未见明显差异。见表7。

与 proCaspase-3 结合无明显影响;甘草酸+TNF- α +CHX 组 p21 (IB Caspase-3) 和 proCaspase-3 (IB p21) 的蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$), 表明 GA 能增强 p21 与 proCaspase-3 的结合。Input 中, 与空白组比

较, TNF- α +CHX 组 p21 和 proCaspase-3 蛋白表达无明显差异;甘草酸+TNF- α +CHX 组 p21 和 proCaspase-3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。见图 10, 11, 表 8。

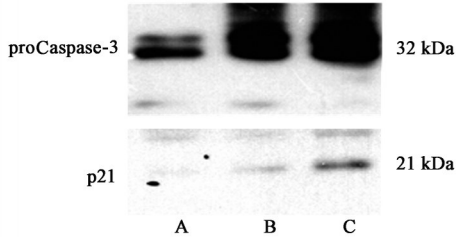


图 10 CO-IP 检测 GA 对 p21 与 proCaspase-3 结合的蛋白表达电泳
Fig. 10 Electrophoresis of GA binding to p21 and proCaspase-3 protein by CO-IP

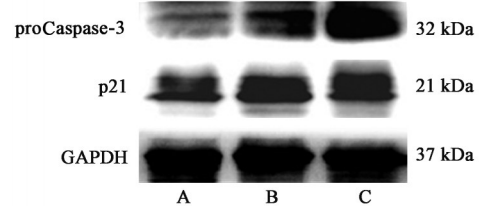


图 11 GA 作用于 TNF- α +CHX 诱导的 IEC-6 细胞 p21 和 proCaspase-3 蛋白表达电泳 (Input)
Fig. 11 Electrophoresis of p21 and proCaspase-3 protein expression in TNF- α +CHX-induced IEC-6 cells (Input)

表 8 GA 对 TNF- α +CHX 诱导的 IEC-6 细胞 p21 和 proCaspase-3 蛋白表达的影响 (CO-IP) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of GA on expression of p21 and proCaspase-3 proteins induced by TNF- α +CHX in IEC-6 cells (CO-IP) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	p21 (IB Caspase-3)	proCaspase-3 (IB p21)	p21/GAPDH	proCaspase-3/GAPDH
空白	-	1.00	1.00	0.54 \pm 0.04	0.90 \pm 0.12
TNF- α +CHX	0.01 ²⁾ +20 ³⁾	1.02 \pm 0.08	1.08 \pm 0.07	0.73 \pm 0.04	1.12 \pm 0.15
甘草酸+TNF- α +CHX	60+0.01 ³⁾ +20 ³⁾	1.60 \pm 0.16 ¹⁾	1.39 \pm 0.05 ¹⁾	1.14 \pm 0.06 ¹⁾	1.53 \pm 0.20 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; ²⁾质量浓度单位为 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

4 讨论

肠上皮具有快速自我更新能力,肠隐窝由隐窝细胞内陷而成,其中包括肠干细胞、绒毛及其分化细胞。而肠上皮细胞的增殖,迁移,分化和衰老之间的动态平衡则受多种因素调节的影响。其中, RNA 结合蛋白 (RBPs) 能结合靶标 mRNA, 形成复合物通过共转录和转录后调节 RNA 的表达, 这对肠道损伤后的修复更新至关重要^[11]。

RBPs 通过与其靶 mRNA 结合形成核糖核蛋白 (RNP) 复合物并能以多种方式在转录后调节基因表达中起作用^[12]。RBPs 可以调节已转录的 mRNAs, 尤其能在微环境变化中快速有效的改变基因表达^[13]。单个 RBP 可以结合数百个靶标, 并且几个 RNP 结合而相互作用有助于识别细胞和应激反应^[14]。

HuR (ELAVL1) 作为一种 RBP, 主要定位于细胞核中, 在应激条件下, HuR 可从细胞核内向细胞浆内转移, 从而调节其靶标的稳定性并促进翻译。在正常和应激细胞中, HuR 被认为是一些 mRNAs 的转录后调节因子^[15]。例如, 当 Rko 细胞受到紫外辐射时, HuR 通过增强 p21 mRNA 的稳定性来调节氧化应激诱导的 p21 表达^[16]。HuR 主要在与靶基因 mRNA 3'非翻译区 (3'-UTR) 特异性结合 AU 富集元

素 (AREs)^[17]。而 HuR 的靶 mRNAs 包括 p21, p53^[18], cyclin A, cyclin B1^[19] 和 c-myc^[20]。此外, HuR 在细胞中的定位以及 HuR 与 mRNA 的结合受多种转录后调节机制影响, 包括磷酸化, 甲基化和 Caspase 酶在细胞凋亡过程中介导的剪切作用^[21]。在大多数情况下, HuR 能增强抗凋亡分子的表达而抑制促凋亡分子的表达^[22]。

p21 是一种细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂, 在细胞周期和细胞凋亡过程的调节中起关键作用, p21 的表达缺失增强了地塞米松诱导的 Caspase-3 活化和 ROS 产生, 并促进了 MC3T3-E1 细胞的凋亡^[23]。p21 可促进平滑肌细胞有丝分裂并具有抗凋亡作用^[24]。研究表明 p21 的表达可由 RNPC1 和 ELR 通过调节 p21 mRNA 的稳定性而实现的^[25]。而位于 mRNA 的 3'-UTR 的 ARES (AU-rich elements) 的典型特征即在富含 U 的区域含有重复 AUUUA 的序列, 或者是重复的较长 U 序列, 也就是这种特征性序列在调节 mRNA 的稳定性中发挥了重要作用。p21 mRNA 序列的 3'-UTR 也存在 AUUUA 这样的序列, 课题组前期研究证实 p21 mRNA 和 HuR 的结合可以通过和 3'-UTR 的结合实现, 并促进 p21 蛋白表达^[8]。

细胞凋亡是由 Caspase-3, Caspase-6 和 Caspase-7

激活介导的细胞程序性死亡。若不清除凋亡细胞,它们会发生继发性坏死而致细胞溶解和炎症。研究显示 Caspase-3 剪切 Asp270 后, GSDMD 相关蛋白 DFNA5 产生坏死的 DFNA5-N 片段,其靶向质膜诱导继发性坏死/焦磷酸化^[26]。其中, Caspase-3 被认为是一种重要的效应蛋白酶,在凋亡过程中可被剪切和激活^[27]。

GA 是补气类中药甘草中重要的有效成分,以 18-H 的两种均具有生理活性的差向异构体(α 体和 β 体)存在。研究证明,GA 具有抗肿瘤、抗氧化应激^[28]及抗凋亡、保护上皮细胞^[10]的作用。此外,GA 对一些 HuR 的目的基因如 p21^[29], p53^[30]的表达均有促进作用。甘草在分子水平上对 IEC-6 细胞发挥其增殖作用,并可以通过 HuR 转录后调节 mRNA 表达^[31]。

本文主要研究 GA 对 TNF- α +CHX 诱导凋亡小肠上皮细胞的保护作用机制。结果表明,GA 能使 HuR 从细胞核向细胞浆内转位,通过与 p21 mRNA 的结合使 p21 mRNA 的稳定性及蛋白表达均增高,而增高表达的 p21 与 proCaspase-3 结合,能阻断 proCaspase-3 的剪切,减少 Caspase-3 的生成,从而抵抗 TNF- α +CHX 诱导的凋亡,对小肠上皮细胞产生保护作用。

[参考文献]

[1] 宁宇,王锋超,刘登群,等. 在体分离小鼠小肠隐窝、绒毛上皮细胞的生化完整性研究[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(14): 2610-2612.

[2] 王锋超. 电离辐射与内毒素致小肠上皮细胞损伤机制的实验研究[D]. 重庆:第三军医大学, 2006.

[3] 张子理,陈蔚文. 小肠隐窝细胞株(IEC-6):中药生物活性成分筛选的药理模型[J]. 中药药理与临床, 2006, 22(3): 180-182.

[4] 曹雨诞,颜晓静,张丽,等. 醋制降低京大戟对大鼠小肠隐窝上皮细胞 IEC-6 毒性研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(6): 1069-1074.

[5] 潘杰,王晨习,郎宇璜,等. 骨桥蛋白对大鼠小肠隐窝上皮细胞生物学性状的影响[J]. 复旦学报:医学版, 2016, 43(5): 580-585.

[6] YU C, XIN W, ZHEN J, et al. HuR mediated post-transcriptional regulation of epithelial-mesenchymal transition related genes in diabetic nephropathy [J]. J Diabetes, 2014, 7(4): 562-572.

[7] 张娴. RNA 结合蛋白 HuR 对 IEC-6 细胞 XIAP 转录后调节及多胺和甘草酸的作用研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2009.

[8] 贺毅. 甘草通过 RNA 结合蛋白 HuR 对肠上皮细胞的 p21、p53 mRNA 转录后调节研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2010.

[9] 张娴,曾星,黄羽. 甘草酸通过 HuR 介导的 p21 转录后表达对小肠上皮细胞抗凋亡作用[C]//第十一次中国中西医结合实验医学学术研讨会论文集汇编. 2013.

[10] 张娴,黄羽,曾星. 甘草酸对 H₂O₂ 诱导小肠上皮细胞 DNA 损伤的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(3): 239-242.

[11] CHATTERJI P, RUSTGI A K. RNA binding proteins in intestinal epithelial biology and colorectal cancer [J]. Trends Mol Med, 2018, 24(5): 490-506.

[12] WANG Z L, LI B, LUO Y X, et al. Comprehensive genomic characterization of RNA-binding proteins across human cancers [J]. Cell Rep, 2018, 22(1): 286-298.

[13] GERSTBERGER S, HAFNER M, TUSCHL T. A census of human RNA-binding proteins [J]. Nat Rev Genet, 2014, 15(12): 829-845.

[14] SUREBAN S M, NABENDU M, PAVEL R, et al. Functional antagonism between RNA binding proteins HuR and CUGBP2 determines the fate of COX-2 mRNA translation [J]. Gastroenterology, 2007, 132(3): 1055-1065.

[15] BRENNAN C M, STEITZ J A. HuR and mRNA stability [J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(2): 266-277.

[16] WANG W, FURNEAUX H, CHENG H, et al. HuR p21 mRNA stabilization by UV light [J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(3): 760-769.

[17] YAMAN I, FERNANDEZ J, SARKAR B, et al. Nutritional control of mRNA stability is mediated by a conserved AU-rich element that binds the cytoplasmic shuttling protein HuR [J]. J Biol Chem, 2002, 277(44): 41539-41546.

[18] MAZAN-MAMCZARZ K, GALBAN S, DE SILANES I L, et al. RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(14): 8354-8359.

[19] WANG W, CALDWELL M C, LIN S, et al. HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation [J]. Embo J, 2014, 19(10): 2340-2350.

[20] MA W J, CHUNG S, FURNEAUX H. The Elav-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(18): 3564-3569.

[21] ABDELMOHSEN K, GOROSPE M.

- Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR [J]. *Wires RNA*, 2010, 1(2): 214-229.
- [22] DURIE D, LEWIS S M, LIWAK U, et al. RNA-binding protein HuR mediates cytoprotection through stimulation of XIAP translation [J]. *Oncogene*, 2011, 30(12): 1460-1469.
- [23] HAN D, GAO J, GA X, et al. P21Waf1/Cip1 depletion promotes dexamethasone-induced apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells by inhibiting the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Arch Toxicol*, 2017, 92(6): 1-14.
- [24] ZHANG C, KAVURMA M M, LAI A, et al. Ets-1 protects vascular smooth muscle cells from undergoing apoptosis by activating p21 WAF1/Cip1: ETS-1 regulates basal and inducible p21 WAF1/Cip1 transcription via distinct cis-acting elements in the p21 WAF1/Cip1 promoter [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(30): 27903-27909.
- [25] CHO S J, ZHANG J, CHEN X B. RNP1 modulates the RNA-binding activity of, and cooperates with, HuR to regulate p21 mRNA stability [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(7): 2256-2267.
- [26] ROGERS C, FERNANDES-ALNEMRI T, MAYES L, et al. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14128.
- [27] LIU B, JIAN Z, LI Q, et al. Baicalein protects human melanocytes from H₂O₂-induced apoptosis via inhibiting mitochondria-dependent caspase activation and the p38 MAPK pathway [J]. *Free Radical Bio Med*, 2012, 53(2): 183-193.
- [28] 李斌霞, 佟杰. 甘草酸药理作用及机制的研究进展 [J]. *数理医药学杂志*, 2007, 20(2): 228-231.
- [29] 李开龙, 何娅妮, 王惠明, 等. 甘草酸18 α 体对缺血再灌注损伤后肾小管上皮细胞p21蛋白表达的影响 [J]. *重庆医学*, 2008, 37(22): 2550-2552.
- [30] 李开龙, 何娅妮, 赵玲, 等. 甘草酸18 α 体上调p53的表达保护肾脏缺血再灌注损伤的实验研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(22): 2078-2081.
- [31] HE Y, ZHANG X, ZENG X, et al. HuR-mediated posttranscriptional regulation of p21 is involved in the effect of Glycyrrhiza uralensis licorice aqueous extract on polyamine-depleted intestinal crypt cells proliferation [J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(10): 1285-1293.

[责任编辑 孙丛丛]