

黄芩汤通过Nrf2信号通路对Caco-2细胞 抗氧化应激作用的机制

冯雪¹, 刘雅清¹, 刘滨^{1,2}, 马旭冉¹, 王敦方¹, 杨伟鹏^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:以Caco-2细胞为载体,结合基因干扰(RNAi)技术,通过体外实验进一步验证黄芩汤基于核因子E₂相关因子2(Nrf2)通路发挥的抗氧化应激作用。方法:将处于对数生长期的Caco-2细胞,经siRNA转染,构建siRNA Caco-2细胞;将正常Caco-2细胞和siRNA Caco-2细胞与不同浓度的黄芩汤共同孵育后,提取RNA和蛋白,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)技术检测血红素氧合酶-1(HO-1)、醌氧化还原酶1(NQO1)、谷胱甘肽巯基转移酶(GST)、接头蛋白Kelch样ECH相关蛋白1(Keap1)及Nrf2 mRNA和蛋白的表达;同时,采用比色法和探针法检测各组细胞中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活力及丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)的表达水平。结果:与空白组比较,仅有黄芩汤400 mg·L⁻¹组与萝卜硫素(SFN)组可降低正常Caco-2细胞内ROS、MDA含量(P<0.01);而黄芩汤各剂量组与SFN组细胞内SOD与GSH-Px活力均有增加的趋势,且黄芩汤400 mg·L⁻¹组和SFN组与空白组比较差异有显著统计学意义(P<0.01);同时,各组细胞HO-1、GST、Keap1、NQO1和Nrf2蛋白及mRNA的表达量均有明显升高的趋势(P<0.05, P<0.01)。经转染后,与空白组比较,模型组细胞内MDA和ROS的含量升高,而GSH-Px和SOD的活力及HO-1、GST、Keap1和NQO1蛋白及mRNA的表达量均有不同程度地降低(P<0.05, P<0.01),与药物孵育后,与模型组比较,SFN组细胞内SOD活力和SFN组、黄芩汤各给药组GSH-Px活力显著升高(P<0.01),黄芩汤400 mg·L⁻¹组、200 mg·L⁻¹组和SFN组细胞内SOD和GSH-Px活力均有升高的趋势(P<0.01),黄芩汤400 mg·L⁻¹组和SFN组MDA有降低的趋势,且各给药组ROS均有降低(P<0.01);HO-1、GST、Keap1、NQO1和Nrf2的蛋白及mRNA表达均有不同程度增加(P<0.05, P<0.01)。结论:黄芩汤可以通过调控Nrf2通路发挥抗氧化应激的作用。

[关键词] 黄芩汤; 氧化应激; Caco-2细胞; RNA干扰; 核因子E₂相关因子2(Nrf2)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)07-0029-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20230205

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230105.1757.004.html>

[网络出版日期] 2023-01-06 12:26:54

Anti-oxidative Stress Effect and Mechanism of Huangqintang on Caco-2 Cells Through Nrf2 Signaling Pathway

FENG Xue¹, LIU Yaqing¹, LIU Bin^{1,2}, MA Xuran¹, WANG Dunfang¹, YANG Weipeng^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To verify the anti-oxidative stress effect of Huangqintang based on the nuclear factor E₂-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway by using Caco-2 cells as a carrier and RNA interference (RNAi) technology with *in vitro* experiments. **Method:** The Caco-2 cells in the logarithmic growth phase were transfected with siRNA to construct siRNA Caco-2 cells. After normal Caco-2 cells and siRNA Caco-2 cells were incubated with Huangqintang of different doses, RNA and protein were extracted. Real-time fluorescence

[收稿日期] 2022-09-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473592, 82074328);中国中医科学院中药研究所自主申报项目(ZXKT20033)

[第一作者] 冯雪, 博士, 助理研究员, 从事中药药理学、中药新药及保健食品研发, E-mail: 15227180242@163.com

[通信作者] * 杨伟鹏, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事中药药理学研究, E-mail: wpyang@icmm.ac.cn

quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were used to detect the mRNA and protein expression of heme oxygenase-1 (HO-1), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1), glutathione S-transferase (GST), Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), and Nrf2. Meanwhile, the activities of superoxide dismutase (SOD) and GSH-Px, as well as the expression levels of malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS), were detected by the colorimetric method and the probe method. **Result:** Compared with the results in the normal group, only the 400 mg·L⁻¹ Huangqintang group and the sulforaphane (SFN) group could reduce the content of ROS and MDA in Caco-2 cells ($P<0.01$), while the activities of SOD and GSH-Px in the cells of the Huangqintang groups and the SFN group showed an upward trend. Furthermore, there were significant differences in the 400 mg·L⁻¹ Huangqintang group/the SFN group and the normal group ($P<0.01$). Meanwhile, the protein and mRNA expression levels of HO-1, GST, Keap1, NQO1, and Nrf2 showed an upward trend in all groups ($P<0.05$, $P<0.01$). After transfection, compared with the normal group, the model group showed increased content of MDA and ROS, blunted activities of GSH-Px and SOD, and reduced protein and mRNA expression of HO-1, GST, Keap1, and NQO1 ($P<0.05$, $P<0.01$). After drug incubation, compared with the model group, the SFN group showed potentiated SOD activity, and the SFN group and the Huangqintang groups showed enhanced GSH-Px activity ($P<0.01$). Moreover, the activities of SOD and GSH-Px in the 400 and 200 mg·L⁻¹ Huangqintang groups and the SFN group showed an upward trend ($P<0.01$), and the content of MDA in the 400 mg·L⁻¹ Huangqintang group and the SFN group showed a downward trend. ROS decreased in all groups with drug intervention ($P<0.01$), and the protein and mRNA expression of HO-1, GST, Keap1, NQO1, and Nrf2 increased to varying degrees ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Huangqintang can play an anti-oxidative stress role by regulating the Nrf2 pathway.

[Keywords] Huangqintang; oxidative stress; Caco-2 cells; RNA interference; nuclear factor E₂-related factor 2 (Nrf2) pathway

黄芩汤出自《伤寒论》，由黄芩、芍药、甘草和大枣4味药组成，具有清热止痢，和中止痛之功效，现代临床多用于治疗痢疾、溃疡性结肠炎、结肠癌，肠易激综合征、急慢性结肠炎等，尤其用于治疗溃疡性结肠炎，疗效显著^[1-4]。

氧化应激在疾病的发生发展过程中起着重要作用^[5-7]，核因子E₂相关因子2(Nrf2)是抗氧化应激的中枢调节因子，正常情况下，其多存在于胞浆中，与接头蛋白Kelch样ECH相关蛋白1(Keap1)相结合，不发挥作用，当其被有害物质激活后就会转入细胞核，与抗氧化反应元件(ARE)结合，从而形成Nrf2/ARE信号通路，使下游一系列具有保护作用的Ⅱ相解毒酶基因、抗氧化酶基因和蛋白得以表达，例如醌氧化还原酶1(NQO1)、血红素氧合酶-1(HO-1)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽巯基转移酶(GST)、过氧化氢酶(CAT)等^[8-9]。Ⅱ相解毒酶和抗氧化酶是体内重要的代谢酶，他们在抗炎症、抗氧化能力、抗肿瘤、保护组织免受毒物损伤等方面起着巨大的作用。血红素氧合酶是血红素降解过程中的限速酶，在体内以3种形式存在，包括HO-1、HO-2和HO-3，其中HO-1是位于Nrf2下游的可诱

导的抗氧化酶，当体内处于应激条件下，他的表达可成倍提高，研究发现，HO-1及其代谢产物具有明显的抗氧化作用；NQO1和GST也是体内生物转化最重要的2个Ⅱ相代谢酶。SOD能够阻断氧自由基，从而保持细胞的活力。丙二醛(MDA)是脂质发生过氧化反应的产物，它能够引起核酸和蛋白质等大分子的交联聚合，具有细胞毒性，MDA的含量可反映机体内脂质发生过氧化反应的程度，从而间接反映细胞损伤程度。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)可以清除细胞内的活性氧和脂质过氧化物，保护细胞结构和功能的完整性。Nrf2/ARE信号通路是机体抗氧化应激反应中最重要的信号通路之一，能够保护机体免受氧化应激损伤。

前期的研究显示，黄芩汤可以调控Nrf2通路对溃疡性结肠炎大鼠起到抗氧化应激的作用，能够显著改善溃疡性结肠炎大鼠的精神状况、体征及排便等情况，其机制可能是由于黄芩汤激活Nrf2通路增加了HO-1、NQO-1Ⅱ相代谢酶的表达，从而降低了血清中过氧化脂(LPO)和髓过氧化物酶(MPO)的浓度并提高了CAT、SOD和GSH-Px的活性^[10]。本研究将通过体外实验进一步验证黄芩汤的抗氧化

应激作用。RNA干扰技术(RNAi)作为一项新兴的生物技术,在疾病治疗、新药研发、信号传导通路和基因功能研究中被广泛应用^[11-13]。为了进一步明确黄芩汤能够通过调控Nrf2通路发挥抗氧化应激作用,本研究还采用RNAi技术干扰Nrf2基因,观察其下游的Ⅱ相解毒酶和抗氧化酶的变化。

1 材料

1.1 细胞 Caco-2细胞由本所游云研究员提供。

1.2 试剂药材 黄芩(批号13021502)、白芍(批号12112603)、炙甘草(批号13050905)、大枣(批号12091701)购自北京同仁堂,经中国中医科学院中药研究所李先端研究员鉴定后,储存于本实验室。

DMEM培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国Gibico公司,货号分别为31330095、10100147、25200056),萝卜硫素(SFN,美国Sigma公司,批号4478-93-7),二甲基亚砜(DMSO,国药集团化学试剂有限公司,批号67-68-5),噻唑蓝(MTT,美国Sigma公司,货号M2128),T-SOD、MDA和GSH-Px试剂盒购自于(南京建成科技有限公司,货号分别为A001-1-2、A003-1-2、A005-1-2),Power SYBR® Green PCR Master Mix和cDNA合成试剂盒(日本Takara公司,批号1311432),Lipofectamine® 2000转染试剂、TRIzol试剂(美国Invitrogen公司,货号分别为12566014、15596026),兔抗鼠NQO-1、Nrf2多克隆抗体(美国Santa Cruz公司,货号分别为sc-376023、sc-722),兔抗鼠HO-1多克隆抗体(美国CST公司,货号86806),兔抗鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体(英国Abcam公司,货号ab8245),辣根酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(北京中杉金桥生物技术公司,货号ZB-2306)。

1.3 仪器 MCO-18AIC型细胞培养箱(日本三洋公司),SW-CJ-2F型垂直流洁净工作台(吴江市伟峰净化设备有限公司),BDS系列倒置生物显微镜(重庆奥拓公司),Varioskan Flash型全波长扫描多功能酶标仪(美国Thermo公司),7500型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(美国ABI公司),VILBER Fusion FX7 Spectra型凝胶成像系统(北京五洲东方科技发展有限公司),PowerPac HC型电泳仪(美国Kigen公司),TY-80A/S型脱色摇床(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司),J-30I Beckman型高效冷冻离心机(美国Beckman公司)。

2 方法

2.1 黄芩汤的制备 将黄芩汤按照黄芩-白芍-炙甘草-大枣3:2:2:2的比例配伍,加10倍体积的水浸泡

0.5 h后煎煮,煎煮1 h,滤出药液,残渣加8倍体积水继续煎煮1 h后,过滤,合并2次滤液,经浓缩干燥后得到黄芩汤粉末,其提取率约为32.86%。使用时用细胞培养基溶解黄芩汤粉末,使黄芩汤终质量浓度分别为1 250.00、625.00、312.50、156.25、78.00、39.00、19.50、9.80 mg·L⁻¹,并用0.22 μm孔径滤膜过滤除菌后加入到细胞中。

2.2 细胞培养 将人结肠癌Caco-2细胞置于含有10%胎牛血清、100 g·L⁻¹链霉素、100 U青霉素和1% MEM NEAA的DMEM培养液中,于37℃、5% CO₂培养箱中培养。

2.3 MTT比色法检测黄芩汤对Caco-2细胞活性的影响 Caco-2细胞生长至对数生长期后,将其接种于96孔培养板中,细胞浓度为4×10³个/孔,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养,24 h后,更换含黄芩汤粉末的培养基,使黄芩汤终质量浓度分别为1 250.00、625.00、312.50、156.25、78.00、39.00、19.50、9.80 mg·L⁻¹,每个浓度设置3个重复,同时设置空白组、溶剂组及调零孔,继续培养24 h后,每孔加入质量浓度为5 g·L⁻¹的MTT 20 μL,培养4 h后,吸出培养液,加入DMSO 200 μL,振荡10 min,用酶标仪检测各孔在490 nm处的吸光度A。

$$\text{细胞抑制率}=(1-A_{\text{实验组}}/A_{\text{空白组}})\times 100\%$$

2.4 MTT比色法检测SFN对Caco-2细胞活性的影响 SFN是目前公认的Nrf2通路的激活剂,能够平衡氧化应激状态,本实验中采用SFN作为阳性药物,探究黄芩汤对Caco-2细胞中抗氧化应激相关酶和Ⅱ相解毒酶的影响。设置SFN浓度为0、5、10、15、20、30 μmol·L⁻¹,其余操作同2.3项。

2.5 siRNA Caco-2细胞的构建

2.5.1 siRNA Caco-2细胞的构建 根据Genebank中Nrf2的序列,按照Tuschl设计原则设计合成3对siRNA序列,Nrf2 siRNA、GAPDH阳性对照siRNA及阴性对照siRNA均由上海吉玛制药有限公司合成。其靶位及序列见表1。

siRNA的转染:将Caco-2细胞接种于6孔板中,细胞密度为2×10⁵个/孔,当细胞铺满每孔的70%~80%时即可转染。准确吸取Lipofectamine 2000 5 μL,加入Opti-MEMI Reduced Serum Medium 50 μL稀释,轻轻混匀,室温孵育5 min;另准确吸取FAM-siRNA 10 μL,加入Opti-MEMI Reduced Serum Medium 50 μL稀释,轻轻混匀,将稀释的Lipofectamine 2000与稀释的siRNA混合,于室温下静置20 min,形成siRNA-转染试剂混合物;将此混

表1 siRNA靶位及序列

Table 1 siRNA target site and sequence

靶位名称	序列(5'-3')
GAPDH 阳性对照	上游 UGACCUCAACUACAUGGUUTT
	下游 AACCAUGUAGUUGAGGUCATT
阴性对照	上游 UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	下游 ACGUGACACGUUCGGAGAATT
Nrf2-homo-2113	上游 GCACCUUAUAUCUCGAAGUTT
	下游 ACUUCGAGAUUAAGGUGCTT
Nrf2-homo-821	上游 CCCGUUUGUAGAUGACAAUTT
	下游 AUUGUCAUCUACAAACGGGTT
Nrf2-homo-1385	上游 GCCCAUUGAUGUUUCUGAUTT
	下游 AUCAGAAACAUCAUGGGCTT

合物加入6孔板中,轻轻振摇混匀后,置于培养箱中继续培养6h即可。

2.5.2 siRNA Caco-2细胞中Nrf2 mRNA和蛋白的表达 将Caco-2细胞分为空白组、GAPDH阳性对照组、阴性对照siRNA组、Nrf2-homo-2113组、Nrf2-homo-821组和Nrf2-homo-1385组,按上述方法转染后,更换正常培养基,继续培养36h,提取RNA,经反转录后,采用Real-time PCR测定Nrf2 mRNA的表达。同时将Caco-2细胞按上述方法转染和培养之后,提取总蛋白,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Nrf2蛋白的表达情况。

2.6 试剂盒检测Caco-2细胞中SOD、MDA、GSH-Px及ROS的水平 将处于对数生长期的Caco-2细胞接种于6孔板中,使细胞密度为 2×10^5 个/孔,将其置于恒温 37°C 、 5% CO_2 培养箱中培养18~24h,之后每孔加入不同浓度黄芩汤,培养36h后,按试剂盒要求测定SOD、GSH-Px活力和MDA、ROS含量。

同时将处于对数生长期的Caco-2细胞接种于6孔板中,调整细胞密度为 1×10^5 个/孔。按照2.5.1项方法构建siRNA Caco-2细胞,采用不同浓度的黄芩汤干预siRNA Caco-2细胞36h,去除上清液,按相同方法测定SOD、GSH-Px活力和MDA、ROS含量。

ROS的检测方法:将活性氧荧光探针DCFH-DA以无血清培养液按照1:1 000的比例稀释,使其终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将Caco-2细胞按上述方法培养后,去除培养液,加入DCFH-DA稀释液1 mL,继续孵育20 min,采用无血清细胞培养液洗涤细胞3次,调整细胞密度,酶标仪检测各组细胞的 A^{14} 。

2.7 Real-time PCR检测HO-1、NQO1、GST、Keap1和Nrf2 mRNA的表达 将处于对数生长期的Caco-2细胞接种于6孔板中,细胞密度为 2×10^5 个/孔,于 37°C 、 5% CO_2 的培养箱中培养18~24h,之后于每孔加入不同浓度的黄芩汤,继续培养36h后,提取RNA,经逆转录后,应用Real-time PCR方法检测NQO1、HO-1、GST、Keap1、Nrf2 mRNA的表达水平。反应总体积为 $20 \mu\text{L}$,PCR扩增程序为 95°C 预变性30 s; 95°C 变性5 s, 60°C 扩增34 s,40个循环; 95°C 变性15 s, 60°C 扩增1 min, 95°C 变性15 s。于每个退火步骤之后,进行荧光数据采集, $60\sim 95^\circ\text{C}$ 绘制溶解曲线,采用自动分析软件进行实验数据分析。同时取处于对数生长期的Caco-2细胞,接种于6孔板中,使细胞密度为 1×10^5 个/孔。构建siRNA Caco-2细胞,采用不同浓度的黄芩汤干预构建好的siRNA Caco-2细胞36h,去除上清液,按相同方法测定HO-1、NQO1、GST、Keap1和Nrf2 mRNA的表达情况。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计并合成,引物序列见表2。

表2 引物序列

Table 2 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
HO-1	上游 CAGTCTTCGCCCTGTCTAC	464
	下游 CTTGGTGTCTATGGGTCAGCA	
NQO1	上游 CGGAGTGGCATTCTGCATTT	121
	下游 CCAGGCGTTTCTTCCATCCT	
GST	上游 GCCATCCTGTGCTACATTGC	111
	下游 CAGCTGATTGGAGACGTCCAT	
Keap1	上游 TCGTCTCCTTTATGCCGTGG	91
	下游 CATTGCGCACTCGTTCTCT	
Nrf2	上游 CAGCTTTTGGCGCAGACATT	212
	下游 AGCTCCTCCAAACTTGCTC	
GAPDH	上游 CTGCACCACCAACTGCTTAG	73
	下游 CATGAGTCTTCCACGATACCA	

2.8 Western blot检测HO-1、NQO1、GST、Keap1蛋白表达 将处于对数生长期的Caco-2细胞接种于6孔板中,每孔2 mL,使细胞密度为 2×10^5 个/孔,在 37°C 、 5% CO_2 的培养箱中培养18~24h后,于每孔加入不同浓度的黄芩汤,继续培养36h,提取总蛋白,将收集的细胞裂解后提取总蛋白质,并测定总蛋白含量,之后样品采用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,转膜后与一抗[HO-1(1:1 000),NQO1

(1:200), GST(1:1 000), Keap1(1:1 000)] 孵育过夜, 再与二抗(1:5 000) 孵育 2 h 后显影, 分析图像, 并进行目的条带灰度值分析。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行数据统计学分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间计量资料数据比较采用单因素方差分析(One-way ANOVO), 两两比较采用 SNK, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芩汤和 SFN 对 Caco-2 细胞活性的影响 随着黄芩汤的浓度升高, Caco-2 细胞的抑制率先上升, 后下降, 之后再升高。当黄芩汤的质量浓度为 $39.0 \sim 1\ 000.0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其抑制率为负, 表明此浓度范围内黄芩汤不会抑制 Caco-2 细胞的生长。在 $39.0 \sim 312.5\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 抑制率下降, 在 $312.5 \sim 1\ 000.0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 抑制率又升高, 质量浓度为 $312.5\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时抑制率最低, 本着节约药物和成本的原则, 最终选用质量浓度为 400、200、100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的黄芩汤进行接下来的实验研究。见图 1。

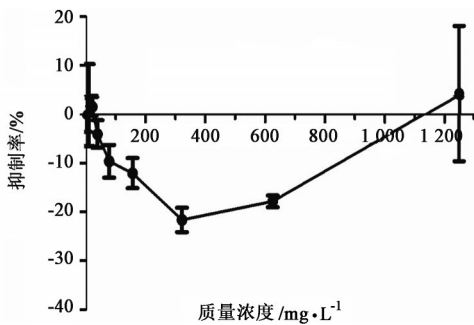


图 1 黄芩汤对于 Caco-2 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of Huangqintang on Caco-2 cell activity ($\bar{x} \pm s, n=3$)

按相同方法, 对 SFN 的浓度进行了筛选。当 SFN 的浓度为 $5\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其抑制率为负, 表明此浓度的 SFN 不抑制 Caco-2 细胞的增殖, 因此, 最后选用 $5\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SFN 进行接下来的实验研究。见图 2。

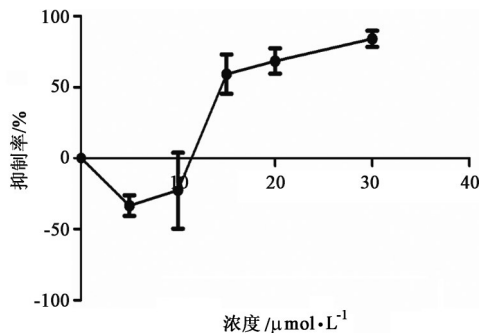


图 2 SFN 对细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of SFN on cell activity ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2 siRNA Caco-2 细胞中 Nrf2 mRNA 和蛋白的表达 与空白组比较, 靶向 Nrf2 的 3 个 siRNA 转染组细胞中 Nrf2 mRNA 的表达量均明显降低, 并且 Nrf2-821、Nrf2-2113 组差异有统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与 GAPDH 阳性对照组比较, 各组差异有明显著统计学意义 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与空白组比较, 3 种 siRNA 片段对 Nrf2 mRNA 抑制率分别 60.55%、70.83% 和 45.33%, Nrf2-821 siRNA 片段对 Nrf2 的抑制率最高, 故最后选用 Nrf2-821 siRNA 片段对靶基因进行干扰。见表 3。

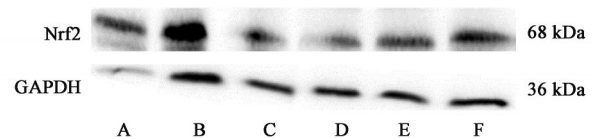
表 3 转染 siRNA Nrf2 于 Caco-2 细胞后各组 Nrf2 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Expression of Nrf2 mRNA in Caco-2 cells after transfection with siRNA Nrf2 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Nrf2
GAPDH 阳性对照组	1.00±0.05 ²⁾
阴性对照 siRNA 组	0.33±0.01 ⁴⁾
Nrf2-homo-2113 组	0.09±0.02 ^{1, 4)}
Nrf2-homo-821 组	0.07±0.01 ^{2, 4)}
Nrf2-homo-1385 组	0.13±0.01 ⁴⁾
空白组	0.24±0.03

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 GAPDH 阳性组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)

Caco-2 细胞经转染后, 与空白组比较, 靶向 Nrf2 的 3 个 siRNA 转染组细胞中 Nrf2 蛋白的表达量均降低, 且 Nrf2-821 组与空白组比较差异具有明显著统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3、表 4。



注: A. GAPDH 阳性对照组; B. 阴性对照 siRNA 组; C. Nrf2-homo-2113 组; D. Nrf2-homo-821 组; E. Nrf2-homo-1385 组; F. 空白组

图 3 转染 Caco-2 细胞后各组 Nrf2 蛋白的表达

Fig. 3 Expression of Nrf2 protein in each group after transfection of Caco-2 cells

表 4 转染 Caco-2 细胞后各组 Nrf2 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Expression of Nrf2 protein in each group after transfection of Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Nrf2/GAPDH
GAPDH 阳性对照组	2.51±0.25
阴性对照 siRNA 组	1.88±0.11
Nrf2-homo-2113 组	1.22±0.05 ⁴⁾
Nrf2-homo-821 组	0.97±0.09 ^{1, 4)}
Nrf2-homo-1385 组	1.61±0.03 ³⁾
空白组	1.81±0.11

3.3 黄芩汤对 Caco-2 细胞中 SOD、MDA、GSH-Px 和 ROS 的影响 与空白组比较, SFN 组与黄芩汤 400 mg·L⁻¹ 组 SOD 活性显著增加 ($P < 0.01$), 各给药组 GSH-Px 活性显著升高, 差异有统计学意义 ($P <$

0.01), 且 100、200、400 mg·L⁻¹ 剂量组呈现依次升高的趋势, SFN 组与黄芩汤 400 mg·L⁻¹ 组显著降低 MDA 和 ROS 水平, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 5。

表 5 黄芩汤对 Caco-2 细胞的 SOD、MDA、GSH-Px、ROS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Huangqintang on SOD, MDA, GSH-Px and ROS of Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹	GSH-Px/U·g ⁻¹	ROS
空白组		6.53±0.99	37.59±1.12	26.97±0.30	6.35±0.08
SFN 组		13.22±1.21 ²⁾	15.48±0.43 ²⁾	73.41±1.71 ²⁾	3.15±0.10 ²⁾
黄芩汤组	400	13.17±0.56 ²⁾	21.51±0.77 ²⁾	49.34±0.69 ²⁾	5.46±0.06 ²⁾
	200	8.50±1.46	59.44±1.81	45.34±0.60 ²⁾	8.05±0.21
	100	8.78±1.01	47.91±1.12	30.96±0.69 ²⁾	6.40±0.41

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 7 和表 9 同)

对于转染后的细胞而言,与空白组比较,模型组 SOD 和 GSH-Px 的活力明显下降,MDA 和 ROS 含量显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,加入药物孵育之后, SFN 组显著升高 SOD 活力 ($P < 0.01$)。

SFN 组与黄芩汤 400 mg·L⁻¹ 组显著降低 MDA 含量 ($P < 0.01$), 各给药组 GSH-Px 的活力均显著增加 ($P < 0.01$), 各给药组的 ROS 含量均显著降低 ($P < 0.01$)。见表 6。

表 6 黄芩汤对 Nrf2 siRNA 的 Caco-2 细胞 SOD、MDA、GSH-Px、ROS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Huangqintang on SOD, MDA, GSH-Px and ROS of Caco-2 cells of Nrf2 siRNA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	MDA/μmol·L ⁻¹	GSH-Px/U·g ⁻¹	ROS
空白组		6.51±0.76	25.73±3.06	25.56±0.69	2.19±0.09
模型组		3.83±2.93	35.84±0.76 ²⁾	17.77±1.06 ²⁾	9.14±0.24 ²⁾
SFN 组		9.34±1.97 ⁴⁾	10.02±1.61 ⁴⁾	41.96±0.94 ⁴⁾	4.96±0.09 ⁴⁾
黄芩汤组	400	7.73±0.99	22.76±1.53 ⁴⁾	25.69±0.87 ⁴⁾	2.48±0.05 ⁴⁾
	200	5.73±3.10	69.30±1.61 ⁴⁾	23.69±1.18 ⁴⁾	3.81±0.08 ⁴⁾
	100	3.17±0.11	73.46±0.93 ⁴⁾	29.18±1.00 ⁴⁾	1.14±0.08 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 8 和表 10 同)

3.4 黄芩汤对 HO-1、NQO1、GST、Keap1 的影响

3.4.1 黄芩汤对 Caco-2 细胞中 HO-1、NQO1、GST、Keap1 和 Nrf2 mRNA 表达的影响 与空白组比较, 各给药组 GST mRNA 增加差异无统计学意义, SFN 组与黄芩汤 400、200 mg·L⁻¹ 组 HO-1 mRNA 表达明

显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$), 黄芩汤 400、200 mg·L⁻¹ 的 NQO1 mRNA 表达明显增加 ($P < 0.05$), 黄芩汤 400、100 mg·L⁻¹ 组 Keap1 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.01$), 黄芩汤 200 mg·L⁻¹ 组 Nrf2 mRNA 表达显著升高 ($P < 0.01$)。见表 7。

表 7 黄芩汤对 Caco-2 细胞 HO-1、NQO1、GST、Keap1、Nrf2 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Huangqintang on mRNA of HO-1, NQO1, GST, Keap1 and Nrf2 in Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	HO-1	NQO1	GST	Keap1	Nrf2
空白组		1.04±0.04	1.04±0.01	1.03±0.04	1.04±0.05	1.03±0.03
SFN 组		2.17±0.11 ²⁾	1.47±0.19	1.21±0.22	1.31±0.23	1.21±0.13
黄芩汤组	400	1.38±0.21 ¹⁾	1.65±0.26 ¹⁾	1.40±0.05	2.10±0.34 ²⁾	1.07±0.04
	200	2.17±0.17 ²⁾	1.68±0.12 ¹⁾	1.28±0.24	1.39±0.11	1.39±0.14 ²⁾
	100	1.06±0.05	1.38±0.04	1.19±0.18	2.16±0.30 ²⁾	1.08±0.04

转染后的 Caco-2 细胞中,与空白组比较,各模型组 GST、HO-1、NQO1、Nrf2 mRNA 表达明显降低

($P < 0.05, P < 0.01$);加入 SFN 与黄芩汤后,与模型组比较,各组 GST、HO-1、NQO1、Nrf2 mRNA 表达均

有所增加,其中,各给药组中HO-1和NQO1 mRNA的含量均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$), GST和Nrf2 mRNA的含量仅SFN组差异有统计学意义($P<0.05$)。见表8。

表8 黄芩汤对Nrf2 siRNA的Caco-2细胞HO-1、NQO1、GST、Keap1、Nrf2 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 8 Effect of Huangqintang on mRNA expression of HO-1, NQO1, GST, Keap1 and Nrf2 in Caco-2 cells of Nrf2 siRNA ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	HO-1	NQO1	GST	Keap1	Nrf2
空白组		1.05±0.05	1.03±0.03	1.00±0.02	1.03±0.06	1.04±0.02
模型组		0.54±0.03 ²⁾	0.77±0.10 ¹⁾	0.73±0.04 ²⁾	1.17±0.16	0.33±0.01 ²⁾
SFN组		0.91±0.08 ⁴⁾	1.28±0.06 ⁴⁾	0.89±0.06 ³⁾	0.61±0.01 ⁴⁾	0.50±0.13 ³⁾
黄芩汤组	400	0.85±0.08 ⁴⁾	1.36±0.06 ⁴⁾	0.85±0.08	0.92±0.26	0.41±0.03
	200	0.72±0.05 ³⁾	1.13±0.07 ⁴⁾	0.75±0.02	0.98±0.05	0.34±0.01
	100	0.83±0.04 ⁴⁾	1.17±0.07 ⁴⁾	0.83±0.03	1.29±0.21	0.39±0.03

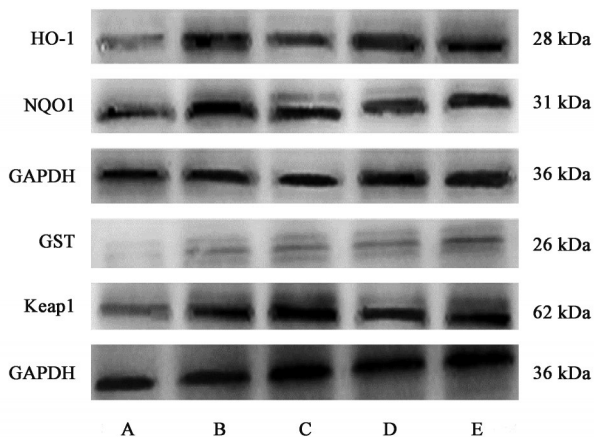
3.4.2 黄芩汤对Caco-2细胞中HO-1、NQO1、GST和Keap1蛋白表达的影响 与空白组比较, SFN或黄芩汤共孵育之后, 细胞内的HO-1、NQO1、GST和Keap1的表达水平均有不同程度地增加, 其中, SFN组HO-1、GST和Keap1的表达差异有统计学意义($P<0.01$), 黄芩汤400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组HO-1和Keap1蛋白

表达差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$), 而黄芩汤200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组HO-1、Keap1的表达水平差异有统计学意义($P<0.01$), 黄芩汤100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组中HO-1、NQO1和Keap1的表达水平均有明显提高($P<0.05$, $P<0.01$), 在黄芩汤各给药组中未发现剂量依赖性。见表9及图4。

表9 黄芩汤对Caco-2细胞HO-1、NQO1、GST、Keap1蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 9 Effect of Huangqintang on protein expression of HO-1, NQO1, GST and Keap1 in Caco-2 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	HO-1	NQO1	GST	Keap1
空白组		0.63±0.14	0.81±0.17	0.61±0.09	0.53±0.03
SFN组		1.24±0.09 ²⁾	1.19±0.15	1.42±0.11 ²⁾	0.81±0.11 ²⁾
黄芩汤组	400	0.98±0.13 ¹⁾	1.27±0.21	0.86±0.10	1.12±0.09 ²⁾
	200	1.94±0.13 ²⁾	1.28±0.14	0.77±0.12	0.87±0.07 ²⁾
	100	1.63±0.12 ²⁾	1.44±0.27 ¹⁾	0.73±0.07	0.74±0.03 ¹⁾



注:A.空白组;B.SFN组;C~E.黄芩汤400、200、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图4 各组Caco-2细胞HO-1、NQO1、GST、Keap1蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of HO-1, NQO1, GST and Keap1 protein expression in Caco-2 cells of each groups

Caco-2细胞经转染后,与空白组比较,模型组细胞内HO-1、NQO1、GST和Keap1 4种蛋白的表达水平均显著下降($P<0.01$)。当转染后的Caco-2细

胞与药物共孵育之后,与模型组比较,黄芩汤400、200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 均能明显提高HO-1蛋白表达水平($P<0.05$, $P<0.01$),黄芩汤400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 组能显著提高NQO1蛋白表达($P<0.01$),黄芩汤各剂量组均能明显升高GST和Keap1蛋白的表达($P<0.05$, $P<0.01$),与此同时, SFN组均能显著提高4种蛋白的表达水平($P<0.01$)。见表10及图5。

4 讨论

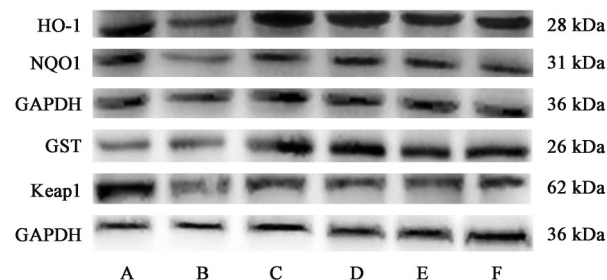
Caco-2细胞是一种功能和结构均类似于小肠上皮的人克隆结肠腺癌细胞。氧化应激造成的损伤在溃疡性结肠炎的发生发展过程中起着非常重要的作用^[15-17]。关于溃疡性结肠炎的治疗,现在临床上已经有多种手段,但若能够较好地改善肠上皮细胞抗氧化应激损伤,也许能为溃疡性结肠炎的治疗提供更多的方法。

口服中药复方是目前临床上用于治疗溃疡性结肠炎的常用方法之一,常用的复方有四君子汤、

表 10 黄芩汤对 Nrf2 siRNA 的 Caco-2 细胞 HO-1、NQO1、GST、Keap1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 Effect of Huangqintang on HO-1, NQO1, GST and Keap1 protein expression of Caco-2 cells with Nrf2 siRNA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	HO-1	NQO1	GST	Keap1
空白组		3.09±0.26	2.15±0.12	2.50±0.10	2.10±0.05
模型组		1.05±0.03 ²⁾	0.90±0.07 ²⁾	1.14±0.03 ²⁾	0.88±0.04 ²⁾
SFN 组		3.26±0.08 ⁴⁾	1.92±0.14 ⁴⁾	2.23±0.03 ⁴⁾	1.81±0.04 ⁴⁾
黄芩汤组	400	1.52±0.04 ³⁾	1.43±0.04 ⁴⁾	2.47±0.15 ⁴⁾	1.63±0.07 ⁴⁾
	200	1.67±0.11 ⁴⁾	1.23±0.04	1.73±0.03 ³⁾	1.22±0.09 ³⁾
	100	1.23±0.09	1.12±0.07	2.42±0.10 ⁴⁾	1.34±0.07 ⁴⁾



注: A. 空白组; B. 模型组; C. SFN 组; D~F. 黄芩汤 400、200、100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 5 各组 Nrf2 siRNA 的 Caco-2 细胞 HO-1、NQO1、GST、Keap1 蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of HO-1, NQO1, GST and Keap1 protein expression of Caco-2 cells with Nrf2 siRNA

乌梅丸和黄芩汤等。黄芩汤作为张仲景的经典名方,已经被广泛用于溃疡性结肠炎等疾病的治疗中。在前期的研究中发现,黄芩汤在一定程度上能够抑制炎症反应,并且能够调控肠道菌群的丰度,但对肠上皮细胞抗氧化应激的影响还未见报道^[18-20]。Nrf2 通路是抗氧化应激最重要的通路之一,若能进一步明确黄芩汤能够通过调控 Nrf2 通路发挥抗氧化应激作用,则可更进一步明确黄芩汤对溃疡性结肠炎的作用机制。

中药复方成分和作用机制都非常复杂,也常见具有双向调节作用,例如桂枝汤对体温具有双向调节作用^[21],或者调节作用与剂量相关,例如人参对神经系统的作用时小剂量兴奋,大剂量抑制。本次实验黄芩汤剂量在 $39.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下体现的是对细胞生长的抑制作用,具体原因有待进一步研究, $39 \sim 1\,000.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对于细胞没有抑制作用,不影响细胞正常活性, $39.0 \sim 312.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 随剂量增加对细胞增殖有一定的促进作用, $312.5 \sim 1\,000.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 随剂量增加对细胞增殖促进作用逐渐降低,但不影响细胞正常活性,体现了调节作用与剂量关系,也为笔者进行后续细胞实验的剂量选择提供了依据。

在氧化应激损伤的各项指标中,各给药组的

SOD 和 GSH-Px 的活力均高于空白组, SFN 组与黄芩汤 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 MDA 和 ROS 的含量均低于空白组,说明黄芩汤能够增强 SOD 和 GSH-Px 的活力,抑制 MDA 和 ROS 的合成,保护肠上皮细胞氧化应激损伤。本实验的结果也显示,黄芩汤能够促进细胞内 Nrf2 通路下游 NQO1、HO-1、GST 蛋白及 mRNA 的表达。综合以上分析,可以推测黄芩汤可以保护细胞免受氧化应激损伤。

在本实验中,某些指标的检测结果显示未体现剂量依赖性,高、中、低剂量组 mRNA 与 Western blot 蛋白表达结果可能不一致,其可能原因如下:中药复方成分复杂,各成分相互影响,中药药效量效关系不明显或缺乏良好的量效关系,是中药研究中客观存在的问题。由于中药的成分复杂,作用复杂,加上样本数有限,在体外实验中未能出现明显的量效关系是可以理解的。此外,由于 mRNA 表达实验和 Western blot 蛋白表达实验虽然细胞的培养条件相同,但并非同一批次的实验,样品处理方法也有差异,虽然二者结果表达不一致,但作用趋势相同,其结果仍可体现黄芩汤中剂量组对于 Keap1 mRNA 和蛋白表达均有促进的趋势。

RNAi 技术是由双链小 RNA 诱导的细胞内同源 mRNA 特异性降解的现象,能够使靶基因高效降解,从而阻断其表达。RNAi 能够特异性的关闭某些基因的表达,被广泛应用于疾病的发病机制、新药的研发以及基因治疗领域。

本实验成功构建了靶向 Nrf2 的 siRNA,并应用 Lip 2000 成功转染 Caco-2 细胞,降解了靶基因的 mRNA,阻断了靶基因的表达。实验结果显示,成功转染后,与空白组比较,3 种 siRNA 片段对 Nrf2 均产生了明显的抑制,抑制率分别 60.55%、70.83% 和 45.33%, Nrf2-821 siRNA 片段对 Nrf2 的抑制率最高,故最后选用 Nrf2-821 siRNA 片段对靶基因进行干扰。经 Real-time PCR 和 Western blot 检测,发现

转染后 Nrf2 mRNA 和蛋白的表达均显著降低,说明靶向 Nrf2 基因的 siRNA Caco-2 细胞构建成功^[22]。

siRNA Caco-2 细胞和正常细胞比较,细胞内的 MDA 和 ROS 的含量均显著升高,且细胞内 SOD 和 GSH-Px 的活力明显降低,同时细胞内 NQO1、HO-1、GST mRNA 和蛋白的表达亦显著下降,表明 Nrf2 通路在抗氧化应激中发挥着重要的作用。此外,将黄芩汤与 siRNA Caco-2 细胞共孵育之后,以上指标均有不同程度地改善,说明黄芩汤能够通过 Nrf2 通路调节 II 相解毒酶及抗氧化酶和成分分泌。综合以上研究结果分析,黄芩汤能够通过 Nrf2 通路对 Caco-2 细胞产生抗氧化应激作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 严宝飞,许晨新,陈灵,等. 基于TLR2/MyD88/NF- κ B信号通路探讨黄芩汤对溃疡性结肠炎小鼠的治疗机制[J]. 中药新药与临床药理,2022,33(6):727-735.
- [2] 宋振民,宋会群,宋沛沛. 黄芩汤联合化疗治疗结肠癌临床研究[J]. 新中医,2020,52(17):25-27.
- [3] 孙雪妹. 黄芩汤加味治疗脾胃湿热型腹泻型肠易激综合征的临床研究[D]. 兰州:甘肃中医药大学,2020.
- [4] 朱倩. 黄芩汤合四逆散加减联合西药治疗急性肠炎(肝郁脾虚夹湿热)的临床效果[J]. 临床合理用药杂志,2021,14(31):44-47.
- [5] 周玲玲,钱康,杨鹏,等. 阿尔茨海默病的线粒体氧化应激及靶向递送系统研究进展[J]. 药学报,2022,57(6):1630-1640.
- [6] 刘睿,刘晓霞,霍忠超. 氧化应激在非小细胞肺癌中的研究进展[J]. 中国临床研究,2021,34(8):1117-1119,1124.
- [7] FORMAN H J, ZHANG H. Targeting oxidative stress in disease: Promise and limitations of antioxidant therapy [J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20 (9) : 689-709.
- [8] 李越,沈磊,罗和生. Nrf2/ARE通路在炎症性肠病中的研究进展[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2016,25(7):721-723.
- [9] LIU H, JOHNSTON LJ, WANG F, et al. Triggers for the Nrf2/ARE signaling pathway and its nutritional regulation: Potential therapeutic applications of ulcerative colitis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22 (21) : 11411.
- [10] 马旭冉,王彦礼,邹迪新,等. 黄芩汤调控 Nrf2 通路对

溃疡性结肠炎大鼠氧化应激作用的影响[J]. 药学报,2019,54(4):653-659.

- [11] KIM M J, CHANG H, NAM G, et al. RNAi-based approaches for pancreatic cancer therapy [J]. Pharmaceutics,2021,13(10):1638.
- [12] STRELNIKOVA S R, KRINITSIINA A A, KOMAKHIN R A. Effective RNAi-mediated silencing of the mismatch repair MSH2 gene induces sterility of tomato plants but not an increase in meiotic recombination[J]. Genes (Basel),2021,12(8):1167.
- [13] 王菲菲,符合,任进,等. siRNA 药物研究进展[J]. 中国新药杂志,2022,31(5):427-434.
- [14] 孙伟华. 硫化氢对缺氧/再复氧大鼠心肌细胞内活性氧水平的影响[D]. 上海:复旦大学,2009.
- [15] 林川,王菲,王鸿卿,等. 葛根芩连汤及配伍调控 Nrf2/NQO1 信号通路抑制溃疡性结肠炎大鼠氧化应激损伤[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(13):19-27.
- [16] NIKKHAH-BODAGHI M, MALEKI I, AGAH S, et al. Zingiber officinale and oxidative stress in patients with ulcerative colitis: A randomized, placebo-controlled, clinical trial [J]. Complement Ther Med, 2019,43:1-6.
- [17] AJAYI B O, ADEDARA I A, FAROMBI E O. Pharmacological activity of 6-gingerol in dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in BALB/c mice[J]. Phytother Res,2015,29(4):566-572.
- [18] 王怡薇,张会会,王彦礼,等. 黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠 NF- κ B p65 调控作用研究[J]. 药学报,2015,50(1):21-27.
- [19] 苗金雪. 通过 PINK1/Parkin 线粒体自噬通路探究黄芩汤对溃疡性结肠炎大鼠的治疗作用[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2021.
- [20] MA X, WANG D, FENG X, et al. Huangqintang interference with colitis associated colorectal cancer through regulation of epithelial mesenchymal transition and cell cycle[J]. Front Pharmacol,2022,13:837217.
- [21] 王亭晔,刘玥芸,陈家旭. 桂枝汤对体温双向调节作用的研究进展[J]. 中国医药导报,2016,13(20):44-47.
- [22] ZHANG B, XIE C, ZHONG J, et al. A549 cell proliferation inhibited by RNAi mediated silencing of the Nrf2 gene [J]. Biomed Mater Eng, 2014, 24 (6) : 3905-3916.

[责任编辑 周冰冰]