

猕猴桃水提物诱导二相酶产生及抗氧化的机制研究

运晨霞¹, 李可成², 王坤^{1*}, 朱博¹, 肖艳芬¹, 余晓玲¹, 韦海宏¹, 黄燕¹, 吴光¹

(1. 广西中医学院微生物与免疫学教研室, 南宁 530001;

2. 柳州市人民医院检验科, 广西柳州 545000)

[摘要] 目的: 本实验以人胃腺癌细胞株 SGC-7901 为模型, 用猕猴桃水提物含药血清进行干预, 探讨猕猴桃水提物诱导二相酶产生及抗氧化的机制。方法: 取正常 SD 大鼠随机分为猕猴桃水提物高、中、低剂量组(用猕猴桃水提物溶液 46.8, 31.2, 15.6 g·kg⁻¹ ig)和正常对照组(ig 给予生理盐水)。连续 14 d, 每天 ig 2 次, 于末次给药 1 h, 腹主动脉取血制备猕猴桃水提物含药血清。取对数生长期的 SGC-7901 细胞, 在不同时间段分别给予相应的含药血清进行干预。用免疫组化法检测 SGC-7901 细胞内活化状态的核因子相关因子 2(Nrf2)的细胞定位; RT-PCR 法检测猕猴桃水提物高剂量组含药血清对 SGC-7901 细胞内二相酶 mRNA 水平的影响。结果: 免疫组化法染色观察结果显示与正常对照组相比, 猕猴桃水提物含药血清低、中、高剂量组均可提高 Nrf2 细胞核内的表达水平, 颜色从浅黄色变为棕黄色。经积分统计学分析差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。RT-PCR 检测结果显示与正常对照组相比较, 猕猴桃水提物可明显诱导二相酶谷氨酰半胱氨酸合成酶催化亚单位(GCLC)基因的表达($P < 0.05$), 且诱导谷胱甘肽-S-转移酶(GST)-P1 和 GST-T1 基因表达作用差异有高度显著性($P < 0.01$), 但对二相酶 GST-M1 和醌氧化还原酶(NQO1)基因水平影响不大。结论: 猕猴桃水提物可促使 Nrf2 进入核内, 导致二相酶的表达增加, 具有诱导细胞解毒抗氧化作用。

[关键词] 猕猴桃水提物; 抗氧化作用; 核因子相关因子 2; 二相酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0201-04

Study on the Antioxidant Mechanism of *Actinidia chinensis* Aqueous Extract via Inducing the Produce of Phase 2 Enzymes

YUN Chen-xia¹, LI Ke-cheng², WANG Kun^{1*}, ZHU Bo¹, XIAO Yan-fen¹,

YU Xiao-ling¹, WEI Hai-hong¹, HUANG Yan¹, WU Guang¹

(1. Department of Microbiology and Immunology, Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China; 2. Clinical Laboratory, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou 545000, China)

[收稿日期] 20111010(003)

[基金项目] 广西教育厅一般项目(200810LX004)

[第一作者] 运晨霞, 医学硕士, 副教授, 从事中药抗肿瘤免疫药理研究, Tel: 13768889539, E-mail: 305358474@qq.com

[通讯作者] *王坤, 教授, 从事中药免疫药理研究, Tel: 13978815716, E-mail: Wangkk1022@sina.com

[9] 禹良艳, 华永庆, 朱敏, 等. 四物汤及其组成药对对大鼠卵巢颗粒细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 141.

[10] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 251.

[11] 高月. 血虚证实质及四物汤反证研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(4): 58.

[12] 路晓钦, 高月. 四物汤及其三味药组方对 γ 射线照射致血虚证小鼠造血系统的影响[J]. 中国实验方剂学

杂志, 2001, 7(6): 35.

[13] 李宗铎, 李文超. 妇康丸微粒与药粉药理作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2002, 8(6): 36.

[14] 马增春, 高月. 四物汤对环磷酰胺所致血虚证小鼠造血细胞作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(5): 13.

[15] 梁毅, 鲁新华, 陈如泉. 中医血虚证研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 1999, 6(1): 16.

[责任编辑 聂淑琴]

[Abstract] Objective: In this study, Human gastric cancer cell line SGC-7901 cells were used as a model and treated with the aqueous extract of actinidia chinensis medicated sera, to investigate the antioxidant mechanism via inducing the produce of phase 2 enzymes. **Method:** The normal SD rats were randomly divided into 4 groups: blank control group, high, middle and low dose groups. The actinidia chinensis aqueous extract was gavaged in different doses, respectively and water was gavaged in the blank control group and twice a day for 14 days. The blood was collected from abdominal aorta to prepare serum containing drugs, then which were given to the SGC-7901 cells separately at different time. Immunohistochemistry staining was used to detect the localization of nuclear factor-E2 related factor2 (Nrf2) in the SGC-7901 cells, RT-PCR was used to detect the mRNA level of phase 2 enzymes. **Result:** The immunohistochemistry detecting showed that the expression of the nuclear Nrf2 was increased and the area broadened significantly ($P < 0.05$) in th groups after administration with different doses of serum containing drugs in the SGC-7901 cells. The results of RT-PCR showed that the mRNA expression levels of the phase 2 enzymes glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) were induced ($P < 0.05$), and the mRNA expression levels of glutathione-S-transferase (GST)-P1 and GST-T1 were enhanced significantly ($P < 0.01$), which was no obvious effect on GST-M1 and heme oxygenase-1 (NQO1). **Conclusion:** The *Actinidia chinensis* aqueous extract can increase nuclear translocation of Nrf2 and increase the phase II enzyme mRNA expression. The *Actinidia chinensis* aqueous extract has the function of antioxidant.

[Key words] *Actinidia chinensis* aqueous extract; antioxidant; Nrf2; phase 2 enzymes

猕猴桃被推崇为“水果之王”,是防癌保健的营养佳品。已证实猕猴桃果实及其各部位提取物在体内均有抗氧化、解毒及抗肿瘤作用^[1],但对猕猴桃及其提取物抗氧化解毒的作用机制报道较少。本实验研究以胃癌 SGC-7901 细胞内 Keap 1-Nrf2-ARE 抗氧化通路为切入点,探讨猕猴桃水提物抗氧化作用的机制,为今后开发猕猴桃及其医疗保健食品提供实验依据。

1 材料

1.1 动物和细胞株 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,体重(250 ± 20)g,由广西医科大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(桂)2003-0003。人胃癌癌细胞株 SGC-7901 细胞,由广西中医学院药理学教研室提供。

1.2 药物 猕猴桃水提物,陕西瑞康生物工程有限公司,批号 200910284。

1.3 试剂 胚胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号 09000504);DMEM(high glucose, Gibco,批号 1290007);Nrf2 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号 091203);免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 20090401);总 RNA 提取试剂盒[(北京)天根生化科技有限公司,批号 20091008];RT-PCR 试剂盒(上海闪晶分子生物科技有限公司,批号 090908)。

1.4 仪器 BR4I 型 CO₂ 培养箱(Thermo 公司),TE2000-U 型倒置显微镜(Olympus 公司),Sunrise 型

酶标仪(Biocell 公司),TGL18 型高速冷冻离心机(eppendorf 公司),tgradient 型多通道 PCR 仪(BIOMETR 公司),UV-1700 型分光光度计(岛津公司),GEL DOC 2000 型凝胶成像分析系统(Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 猕猴桃水提物含药血清制备

2.1.1 猕猴桃水提物配置 根据成人(60 kg)每天摄入猕猴桃水提物的最有效剂量为 124.5 g,换算得 2.075 g·kg⁻¹。大鼠的给药剂量取成人(60 kg)剂量的 15 倍,即 31.125 g·kg⁻¹体重。使用前用蒸馏水将猕猴桃水提物调制成 1.56,3.12,4.68 g·mL⁻¹3 个浓度的药液。将 40 只 SD 大鼠随机分成 4 组,每组 10 只。

2.1.2 含药血清制备 正常对照组(给予生理盐水,20 mL·kg⁻¹,ig);猕猴桃水提物低、中、高剂量组(给予猕猴桃水提物 15.6,31.2,46.8 g·kg⁻¹,ig)。每天给药 2 次,间隔 12 h,连续给药 14 d。末次给药后 1 h 采血(灌药前禁食不禁水 12 h)。以乙醚麻醉,腹主动脉采血,室温下静置 4 h,3 000 r·min⁻¹离心 30 min,分离取上清液即含药血清。将血清置 56 °C 水浴灭活 30 min。最后用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌分装标记,置 -20 °C 冰箱保存备用。

2.2 细胞培养 取对数生长期 SGC-7901 细胞接种于含 10% 胎牛血清、0.03% 谷氨酰胺、青、链霉素的最终浓度为 100 u·mL⁻¹ 的 DMEM 培养液中(pH

7.2), 37 °C 5% CO₂ 条件下培养,隔日换液。

2.3 猕猴桃水提物含药血清对 SGC-7901 细胞 Nrf2 细胞定位的影响 将 SGC-7901 细胞接种于 6 孔培养板中,每组设 3 个复孔。置 37 °C 5% 的 CO₂ 培养箱内孵育 48 h,至细胞近 80% 汇合时进行实验。弃原培养液,加入无血清培养液,培养 12 h,实验细胞随机分为猕猴桃提取物含药血清高、中、低剂量组和正常对照组,在不同时间段分别给予相应的血清 100 mL·L⁻¹ 进行干预。用免疫组化法检测 Nrf2 信号蛋白在细胞内的定位。

2.4 猕猴桃水提物含药血清对 SGC-7901 细胞内二相酶 mRNA 水平的影响

2.4.1 含药血清量的确定 根据 2.3 项下的实验结果,表明实验猕猴桃水提物高剂量组含药血清为最有效用量,作用时间段在 120 min,实验细胞分组如下:正常对照组:正常大鼠血清 100 mL·L⁻¹;猕猴桃水提物含药血清高剂量组:高剂量含药血清 100 mL·mL⁻¹。

2.4.2 引物序列设计 用 Premier 5.0 软件设计,由上海生工生物工程有限公司合成,以 β -actin 作内参照,引物的详细资料见表 1。

2.4.3 RT-PCR 按试剂盒说明书操作。

2.4.4 RT-PCR 结果判断及半定量分析:将 RT-PCR 产物 15 μ L 进行电泳,用 GelDoc2000 凝胶电泳成像分析系统对电泳结果进行扫描,使用 AlphaEase FC 软件对各组 RT-PCR 产物的电泳条带进行灰度分析,以目的基因产物灰度值与内参 β -actin 灰度值的比值来反映目的基因的相对表达水平。

表 1 二相酶引物

引物名称	核苷酸序列
β -actin	F:5'-CCACCGCAAATGCTTCTAAAC-3'
	R:5'-GGGCGTTCGCTCCAACAT-3'
GCLC	F:5'-GGGTCTCTCTCGGGCCTCGG-3'
	R:5'-CTGTGCGTGGACGGGCACTT-3'
GST-P1	F:5'-CCGCGGGACCCTCCAGAAGA-3'
	R:5'-GCGGCATGGTGGCGAAGACT-3'
GST-T1	F:5'-TCCGGTCAGGTCGGTCGGTC-3'
	R:5'-CGCAGACTCGTGTGCTGCCA-3'
GST-M1	F:5'-GCCCAAGTGCTTGGACGCCT-3'
	R:5'-GGAGGCAGGTGCTGGGATGC-3'
NQO1	F:5'-AAGGACCCTTCCGGAGTGGCA-3'
	R:5'-GGCCTCTTGAGCCCAGTCCG-3'

3 结果

3.1 猕猴桃水提物含药血清对 SGC-7901 细胞内 Nrf2 细胞定位的影响 免疫组织化学结果判定:免疫组化染色后阳性反应产物为出现位于细胞核的棕黄色细颗粒状染色。从图 1 可以看出,正常大鼠血清对照组在 10,30,60,120 min 各时间段细胞浆中都出现棕黄色细颗粒状染色,这说明在未受到刺激时,Nrf2 被 Keap1 以 Keap1-Nrf2 复合物的形式控制在胞浆中。与正常对照组相比猕猴桃水提物含药血清低、中剂量组在 10,30,60,120 min 各时间段细胞核均出现黄色细颗粒状染色,尤其是高剂量组在 60 min 和 120 min 时细胞核完全被黄色细颗粒状颜色充满。

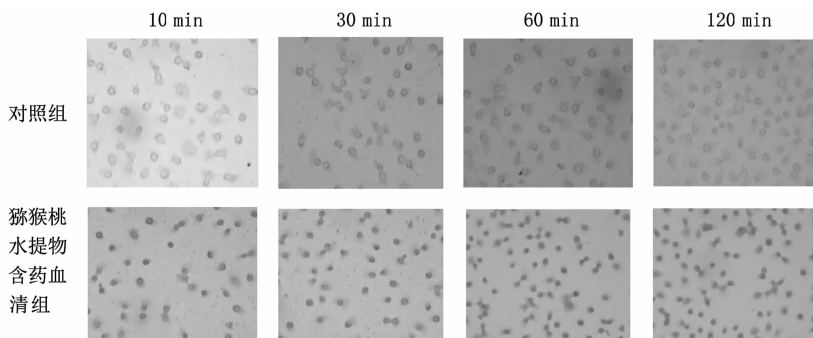
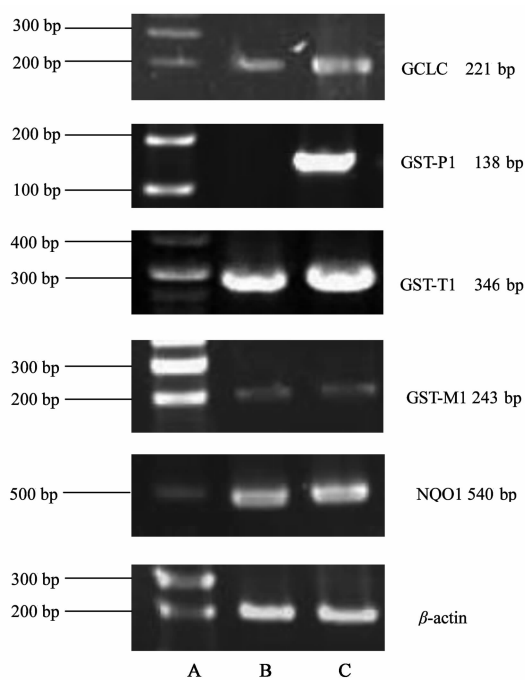


图 1 猕猴桃水提物 15.6 g·kg⁻¹ 含药血清对 SGC-7901 细胞内 Nrf2 细胞定位的影响

3.2 猕猴桃水提物含药血清对 SGC-7901 细胞内二相酶 mRNA 水平的影响 在本实验用猕猴桃水提物含药血清来处理该类细胞,用半定量 RT-PCR 来测定二相酶基因的转录水平,以看家基因 β -actin 为参照。对样本检测的结果表明,与正常对照组相比

较,猕猴桃水提物对二相酶 GCLC 基因的诱导作用差异有显著性 ($P < 0.05$),且 GST-P1 和 GST-T1 诱导作用差异有高度显著性 ($P < 0.01$),而二相酶 GST-M1 和 NQO1 基因则差异没有显著性,见图 2 和表 2。



A. Marker; B. 正常对照组; C. 猕猴桃水提物含药血清组

图 2 猕猴桃水提物对二相酶 mRNA 水平的影响

表 2 猕猴桃水提物含药血清对 SGC-7901 细胞内各二相酶 mRNA 表达的影响 (与 β -actin 灰度值比值) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

二相酶	mRNA 相对灰度	
	正常对照	15.6 g·kg ⁻¹ 猕猴桃水提物含药血清
GCLC	0.243 8 ± 0.034 1	0.319 7 ± 0.035 2 ¹⁾
GST-P1	0.006 4 ± 0.001 2	0.415 1 ± 0.027 6 ²⁾
GST-T1	0.355 4 ± 0.041 3	0.485 6 ± 0.034 1 ²⁾
GST-M1	0.217 9 ± 0.031 6	0.246 8 ± 0.031 5
NQO1	0.266 5 ± 0.028 9	0.281 7 ± 0.043 2

注:与正常对照组相比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

药物、致癌物等外来物质在体内一般经历两相代谢过程。一相代谢过程主要是在 P450 酶系的参与下,对外来物质进行氧化、还原、羟化等,使其大部分失活;二相代谢过程主要是在一些酶的催化下,将内源性极性小分子物质如葡萄糖醛酸、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 等,经共价键结合到外来物质或一相代谢活化物的分子上,使其失活、解毒。因此将参与二相代谢过程的酶统称为药物代谢二相酶 (phase 2 enzymes),如谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)、谷氨酸半胱氨酸连接酶 (GCL)、醌氧化还原酶 (NQO1) 等,它们能够保护机体免受毒性物质 (如致癌物、药物代谢活化产物等) 及一些活性物质 (如

ROS) 的侵害^[2,3]。很明显,诱导这些酶的表达,能够有效地减少外来物质引发的相关疾病及肿瘤。前期研究表明猕猴桃有很强的抗氧化、解毒及抗肿瘤作用,但它们的作用机制却不明了。本研究证实了猕猴桃水提物含药血清高剂量组可显著提高二相酶 GCLC 基因的表达 ($P < 0.05$),且诱导 GST-P1 和 GST-T1 基因表达作用差异有高度显著性 ($P < 0.01$),但对二相酶 GST-M1 和 NQO1 基因水平影响不大。

研究表明,细胞内二相酶的表达是通过转录因子 Nrf2 转录激活的。在正常情况下, Nrf2 定位于胞浆,与肌动蛋白结合蛋白 Keap1 相互作用,可通过泛素-蛋白酶体途径迅速降解。当细胞受到氧化应激的刺激时 Nrf2 与 Keap1 解离,转移至核内,激活其靶基因,导致许多抗氧化及二相酶基因的表达^[4-5]。本研究结果也表明猕猴桃水提物含药血清可诱导 Nrf2 向细胞核内迁移,尤其是高剂量组在 60 min 和 120 min 完全充满了细胞核。综上所述,猕猴桃水提物可促使 Nrf2 进入核内,导致二相酶的表达增加,具有帮助细胞解毒抗氧化作用,但猕猴桃水提物与 Nrf2 (或 Keap1) 相互作用,如何诱导 Nrf2 进入细胞核的机制还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 王晨霞,王坤. 猕猴桃抗肿瘤免疫药理研究进展[J]. 右江民族医学院学报, 2008, 30(6): 1070.
- [2] Wakabayashi N, Dinkova-Kostova A T, Holtzclaw W D, et al. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor. modified by inducers [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(7): 2040.
- [3] Dinkova-Kostova A T, Holtzclaw W D, Wakabayashi N. Keap1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein [J]. Biochemistry, 2005, 44(18): 6889.
- [4] Kobayashi A, Ohta T, Yamamoto M. Unique function of the Nrf2-Keap1 pathway in the inducible expression of antioxidant and detoxifying enzymes [J]. Methods Enzymol, 2004, 378: 273.
- [5] Nguyen T, Sherratt P J, Nioi P, et al. Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1 [J]. J Biol Chem, 2005, 280(37): 32485.

[责任编辑 聂淑琴]