

# PI3K介导的Nrf2磷酸化激活在槲皮素抑制山岗橐吾碱肝细胞毒性中的作用

郝占霞, 师良, 陆宾\*, 季莉莉

(上海中医药大学中药研究所 中药标准化教育部重点实验室,  
上海市复方中药重点实验室, 上海 201203)

**[摘要]** **目的:**观察磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide-3-kinase, PI3K)介导的核转录因子E<sub>2</sub>相关因子2(nuclear factor E<sub>2</sub>-related factor 2, Nrf2)激活在槲皮素(queracetin, Quer)抑制山岗橐吾碱(clivorine, Cliv)诱导的人正常肝L-02细胞毒性中的作用。**方法:**L-02细胞与Quer(1, 10, 25, 50 μmol·L<sup>-1</sup>)预孵15 min后,再与Cliv(50 μmol·L<sup>-1</sup>)孵育48 h,采用噻唑蓝(thiazolam blue, MTT)比色法检测细胞存活率。检测细胞内的活性氧(reactive oxygen species, ROS)和还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH),并进一步通过双荧光素酶报告基因法检测Nrf2的核转位激活。蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Nrf2和PI3K的磷酸化。实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)分析Nrf2下游基因血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, Hmox1), NADPH醌氧化还原酶-1(NADPH:quinone oxidoreductase-1, Nqo1),谷氨酰-半胱氨酸连接酶催化亚基(catalytic subunit of glutamate-cysteine ligase, Gclc)和谷氨酰-半胱氨酸连接酶调节亚基(modifier subunit of glutamate-cysteine ligase, Gclm)mRNA的表达。**结果:**与空白组比较,Quer(10, 25, 50 μmol·L<sup>-1</sup>)能明显逆转Cliv降低的L-02细胞存活率( $P < 0.05$ ),且能逆转Cliv降低的L-02细胞内GSH含量( $P < 0.05$ ),升高ROS水平( $P < 0.01$ )。Quer能诱导PI3K的磷酸化( $P < 0.05$ ),Quer可以诱导Nrf2的磷酸化和转录激活( $P < 0.05$ )。Quer能使Nrf2下游mRNA表达水平提高( $P < 0.05$ ),PI3K抑制剂LY294002(LY)能阻断Quer对Hmox1 mRNA表达的升高作用( $P < 0.01$ )。**结论:**Quer通过诱导Nrf2磷酸化激活逆转了Cliv诱导的肝细胞毒性,PI3K在Quer诱导的Nrf2磷酸化激活中发挥了重要作用。

**[关键词]** 槲皮素; 磷脂酰肌醇-3-激酶; 核转录因子E<sub>2</sub>相关因子2; 肝毒性; 山岗橐吾碱

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5; R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)05-0112-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190423

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181101.1208.003.html>

**[网络出版时间]** 2018-11-05 15:23

## Effect of PI3K-mediated Nrf2 Phosphorylated Activation in Quercetin in Inhibiting Clivorine-induced Hepatotoxicity

HAO Zhan-xia, SHI Liang, LU Bin\*, JI Li-li

(Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines under Ministry of Education,  
Shanghai Key Laboratory for Compound Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica,  
Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of phosphoinositide-3-kinase (PI3K)-mediated nuclear factor E<sub>2</sub>-related factor 2 (Nrf2) phosphorylated activation in quercetin (Quer) in prohibiting clivorine (Cliv)-induced cytotoxicity in L-02 cells. **Method:** Human normal liver L-02 cells were pre-incubated with Quer (1, 10,

**[收稿日期]** 20180713(017)

**[基金项目]** 上海中医药大学预算内科研课题项目(18LK013);上海市曙光计划项目(13SG43)

**[第一作者]** 郝占霞,在读硕士,从事中药药理学与毒理学研究,E-mail:1448480416@qq.com

**[通信作者]** \*陆宾,实验师,从事中药药理学与毒理学研究,Tel:021-51322517,E-mail:272547150@qq.com

25, 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 15 min, and then incubated with Cliv (50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 48 h. The cell viability was evaluated by thiazolam blue (MTT) assay. Cellular reactive oxygen species (ROS) and reduced glutathione (GSH) were detected. The transcriptional activation of Nrf2 was measured by dual-luciferase reporter assay. The phosphorylation of Nrf2 and PI3K was measured by Western blot, and downstream genes, including heme oxygenase 1 (Hmox1), NADPH: quinone oxidoreductase 1 (Nqo1), catalytic subunit of glutamate-cysteine ligase (Gclc), modifier subunit of glutamate-cysteine ligase (Gclm), were measured by Real-time PCR. **Result:** Quer (10, 25, 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) reversed Cliv-induced decreased cell viability ( $P < 0.05$ ), GSH ( $P < 0.05$ ) and ROS levels ( $P < 0.01$ ). Quer induced phosphorylation of PI3K ( $P < 0.05$ ). Quer induced phosphorylation and subsequent transcriptional activation of Nrf2 ( $P < 0.05$ ), and enhanced mRNA expressions of Nrf2 downstream genes ( $P < 0.05$ ). The increased Hmox1 mRNA expression was reduced by PI3K inhibitor LY294002 (LY) ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Quer alleviates Cliv-induced hepatotoxicity by inducing Nrf2 phosphorylated activation, and PI3K plays an important role in regulating Quer-induced Nrf2 phosphorylated activation.

[ **Key words** ] quercetin; phosphoinositide-3-kinase; nuclear factor E<sub>2</sub>-related factor 2; hepatotoxicity; clivorine

药物性肝损伤 (DILI) 是指药物本身及其产生的代谢产物导致的肝脏损伤。药物使用后出现的不可预测的肝损伤仍然是临床和药物开发中面临的一个重要问题<sup>[1]</sup>。吡咯里西啶类生物碱 (PAs) 是已知的毒性最强的肝毒性天然产物, 山岗橐吾碱 (Cliv) 是分离自菊科植物鹿蹄橐吾 *Ligularia hodgsonii* 的一种 PAs<sup>[2-5]</sup>。因此针对 Cliv 诱导肝损伤的保护及其机制值得深入研究。槲皮素 (Quer) 是一种在高等植物中广泛分布, 具有多种生物活性的黄酮类化合物, 具有抗氧化、抗炎、增强免疫力、抗癌等活性功能<sup>[6-8]</sup>。有研究发现, 黄酮类物质对活性氧 (ROS) 具有清除作用<sup>[9]</sup>。Quer 广泛存在于植物的花、叶和果实中, 许多中草药如槐米、侧柏叶、高良姜、款冬花、桑寄生、三七、银杏等均含有 Quer<sup>[10]</sup>。有研究表明, Quer 在体内和体外均具有抗氧化能力<sup>[11-12]</sup>, 研究证实 Quer 在体外可通过直接清除活性氧自由基、螯合金属离子、抑制低密度脂蛋白 (LDL) 及 DNA 氧化损伤发挥其抗氧化作用; 同时有体内实验的结果表明 Quer 可由小肠吸收后进入体内<sup>[13-15]</sup>。实验室前期研究发现, Quer 能够拮抗 Cliv 诱导的肝损伤<sup>[4]</sup>, 所以本研究针对 Quer 拮抗 Cliv 肝毒性的机制做进一步的探讨。

核转录因子 E<sub>2</sub> 相关因子 2 (Nrf2) 是体内重要的抗氧化应激转录因子, 可以通过与抗氧化反应元件 (ARE) 结合从而调节编码一些重要的抗氧化蛋白, 是迄今为止发现的最为重要的内源性抗氧化应激通路, 在氧应激损伤、肿瘤等多种生理病理状态下起重要的调控作用<sup>[16-20]</sup>。实验室前期研究发现, Nrf2 在 Quer 拮抗 Cliv 和四氯化碳诱导的肝毒性中

均有重要作用<sup>[4,21-22]</sup>。已有研究发现磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 能诱导 Nrf2 的磷酸化及后续核转位激活<sup>[14,23]</sup>, 但 PI3K 在 Quer 保护 Cliv 诱导的肝损伤中是否参与尚不清楚。本研究在体外细胞上考察 PI3K 是否参与调控 Quer 诱导的 Nrf2 磷酸化激活, 同时探讨在 Quer 抑制 Cliv 肝细胞毒性中是否有重要参与作用。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人正常肝细胞株 L-02, 购自中国科学院细胞库, 传至 10 代。

**1.2 药材** Quer (Sigma 公司, 批号 Q0125), Cliv 分离自菊科橐吾属植物鹿蹄橐吾, 纯度  $\geq 99.5\%$ <sup>[2]</sup>。

**1.3 试剂** 噻唑蓝 (MTT, Sigma 公司, 批号 M2128); 胎牛血清 (FBS), RPMI 1640 培养基, Opti MEM 培养基 (美国 Life Technology 公司, 批号分别为 1715752, 1852897, 1615114); 还原型谷胱甘肽 (GSH)/氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 20180507); Dual-Luciferase Assay System (美国 Promega 公司, 批号 0000152359); Attractene Transfection Reagent, RNeasy mini kit 试剂盒 (德国 Qiagen 公司, 批号分别为 145044910, 148036243);  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin), 磷酸化 PI3K (p-PI3K) 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为 #4967, #4228); Pierce BCA Protein Assay 试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司, 批号 SK258363); 磷酸化 Nrf2 (p-Nrf2, 美国 GeneTex 公司, 批号 EP1809Y); PI3K 抗体 (美国 Santa Cruz 公司, 批号 sc-1637); ECL (美国 Millipore 公司, 批号 1726101); PrimerScript™ Master Mix, SYBR green

premix 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司, 批号分别为 AK5301, AH71742A)。

**1.4 仪器** HERAcell 150 型恒温培养箱 (美国 Thermo 公司); Synergy H4 型酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); QuantStudio 6 Flex 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); FluorChen 型蛋白成像仪 (美国 Protein Simple 公司); Mini PROTEAN 型蛋白电泳仪, Mini Trans-Blot 型蛋白转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 药物配制** Quer 用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解, 配制成  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的母液; Cliv 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 配制; 加药时用无血清的 RPMI 1640 培养液按比例稀释至所需浓度, 并确保 DMSO 在培养液中的终体积分数不超过 0.1%。

**2.2 细胞培养** 将人正常肝 L-02 细胞接种于含 10% 灭活胎牛血清,  $10 \text{ 万 U} \cdot \text{L}^{-1}$  青霉素和  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  链霉素的 RPMI 1640 培养液中, 在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$   $5\% \text{ CO}_2$  培养箱中培养, 取对数生长期的细胞用于实验。

**2.3 MTT 比色法检测细胞增殖** 将细胞接种于 96 孔板, 待细胞贴壁生长状态良好时先加入不同浓度的 Quer ( $1, 10, 25, 50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 15 min 后再加入 Cliv ( $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); 在 PI3K 抑制剂实验中, 先加入 LY ( $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 预孵 2 h 后, 加入 Quer ( $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 预孵 15 min, 加入 Cliv ( $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ); 空白组加入含等量 DMSO 的细胞培养液。培养 48 h, 加入  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT  $10 \text{ } \mu\text{L}$ , 于培养箱放置 4 h, 加入三联剂 ( $10\% \text{ SDS}-5\% \text{ 异丁醇}-0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}$ ) 使形成的蓝紫色结晶甲瓚充分溶解 12 h 以上。使用酶标仪在 570 nm 和 630 nm 处读取吸光度  $A$ 。细胞存活率 =  $A_{\text{给药组}}/A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

**2.4 ROS 含量测定** 在细胞中加入 Quer ( $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 预孵 15 min, 加入 Cliv ( $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。48 h 后收集细胞沉淀, 加细胞裂解液充分裂解。避光 10 min, 离心取上清, 测得荧光值, 激发光 485 nm, 发射光 525 nm 和蛋白浓度, 以空白组进行标准化校准得到 ROS 含量<sup>[24]</sup>。

**2.5 细胞内 GSH, GSSG 含量测定** 在细胞中加入 Quer ( $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 预孵 15 min, 加入 Cliv ( $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。培养 48 h 收集细胞沉淀, 参照试剂盒说明书测定 GSH, GSSG 含量, 并计算 GSH/GSSG。

**2.6 双荧光素酶报告基因** 将 Nrf2 报告基因、

正常组和 Cliv 组的核酸质粒和 Attractene 转染试剂分别用不含 FBS, 青、链霉素的 Opti-MEM 培养基, 按说明书稀释。将被稀释后的核酸质粒与 Attractene 转染试剂 1:1 混合, 室温静置 20 ~ 30 min, 制备成转染复合物铺入 96 孔板。同时调整细胞密度为  $3 \times 10^4$  个/孔, 用含 5% FBS 的 Opti-MEM 培养液接种到上述 96 孔板内。培养 16 ~ 24 h 更换培养液 (含 0.5% FBS 的 Opti-MEM 培养液培养), 通过荧光显微镜观察 Cliv 组质粒中的绿色荧光蛋白来确定转染效率。转染后的细胞在适当的时间加入 Quer 和 Cliv, 之后通过 Dual-Luciferase Assay System 测定 luciferase 活性。在空白组和药物组分别测定 Firefly/Renilla 来获得 luciferase 值。

**2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白表达** 在细胞中加入 Quer ( $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 于不同时间点收集细胞沉淀; 在 PI3K 抑制剂实验中, 先加入 LY ( $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 预孵 2 h 后, 加入 Quer ( $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 培养 48 h, 收集细胞沉淀, 提取蛋白, 用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定蛋白浓度, 蛋白变性。蛋白通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 并转移到硝酸纤维素膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭硝酸纤维素膜, 将硝酸纤维素膜孵育 p-Nrf2, p-PI3K, PI3K,  $\beta$ -actin (1:1 000) 抗体过夜。洗去一抗后, 与二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗去过量抗体。最后用 ECL 溶液进行反应, 置于凝胶成像仪中曝光。蛋白的含量通过  $\beta$ -actin 来校准。

**2.8 Real-time PCR 检测 mRNA 表达** 在细胞中先加入 LY ( $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 预孵 2 h 后, 加入 Quer ( $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 预孵 15 min 后加入 Cliv ( $50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 培养 48 h, 收集细胞, 细胞总 RNA 用 RNeasy mini kit 试剂盒抽提, 得到的 RNA 用 PrimerScript™ Master Mix 进行逆转录, 合成 cDNA。得到的 cDNA 用 SYBR green premix 试剂, StepOne Plus 仪器进行 Real-time PCR 扩增, PCR 扩增条件:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  30 s,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  5 s,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  34 s, 共 40 个循环,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  15 s,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  1 min,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  15 s, 退火温度  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 。扩增完成后, 根据溶解曲线来确定每个扩增反应的准确性。以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示 mRNA 相对表达量。引物序列由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 见表 1。

**2.9 统计学分析** 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 用统计软件 SPSS 16.0 中的单因素方差分析进行处理, 组间两两比较采用 LSD- $t$  检验, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列	长度/bp
血红素加氧酶(Hmox1)	上游 5'-TGCGGTGCAGCTCTTCTG-3'	18
	下游 5'-GCAACCCGACAGCATGC-3'	17
NADPH 醌氧化还原酶 1(Nqo1)	上游 5'-TGGCTAGGTATCATTCAACTC-3'	21
	下游 5'-CCTTAGGGCAGGTAGATTTCAG-3'	21
谷氧酰-半胱氨酸连接酶催化亚基(Gclc)	上游 5'-GGCGATGAGGTGGAATAC-3'	18
	下游 5'-AAAGGGTAGGATGGTTGG-3'	19
谷氨酰-半胱氨酸连接酶调节亚基(Gelm)	上游 5'-ATCAAATCTTCATCATCAAC-3'	21
	下游 5'-GATTAATCCATCTTCAATAGG-3'	22
甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)	上游 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3'	20
	下游 5'-AGGTCCACCCTGACACGTT-3'	20

### 3 结果

**3.1 Quer 对 Cliv 诱导的肝细胞毒性和氧化应激损伤的影响** 与空白组比较,50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 Cliv 能明显降低 L-02 细胞存活率 ( $P < 0.05$ ),与 Cliv 组比较,预孵 10,25,50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 Quer + Cliv 均能明显逆转 Cliv 降低的 L-02 细胞存活率 ( $P < 0.05$ ),且 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 Quer 能逆转 Cliv 诱导的肝细胞 ROS 水平的上升 ( $P < 0.01$ )。与空白组比较,Cliv 明显降低 L-02 细胞的 GSH 水平及 GSH/GSSG ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),与 Cliv 组比较,Quer + Cliv 能明显升高 L-02 细胞的 GSH 及 GSH/GSSG 水平 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 2,3。

表 2 Quer 对 L-02 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of Quer on survival rate of L-02 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	存活率/%
正常	-	100
Cliv	50	61.44 $\pm$ 2.03 <sup>1)</sup>
Quer	1	100.90 $\pm$ 1.46
	10	99.59 $\pm$ 1.62
	25	100.79 $\pm$ 1.56
	50	105.59 $\pm$ 1.05
	Quer + Cliv	1 + 50
	10 + 50	67.01 $\pm$ 2.72 <sup>3)</sup>
	25 + 50	71.26 $\pm$ 5.05 <sup>3)</sup>
	50 + 50	78.82 $\pm$ 0.41 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与 Cliv 组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 3 同)。

**3.2 Quer 对 Nrf2 核转位激活,PI3K 磷酸化的影响** 与空白组比较,Cliv 能降低 Nrf2 的转录激活 ( $P <$

表 3 Quer 对 L-02 细胞 ROS 水平,GSH 含量,GSH/GSSG 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of Quer on ROS levels, GSH content and GSH/GSSG in L-02 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	ROS /%	GSH / $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	GSH /GSSG
空白	-	100	35.27 $\pm$ 4.33	7.58 $\pm$ 0.97
Cliv	50	247.81 $\pm$ 64.56 <sup>2)</sup>	23.61 $\pm$ 6.74 <sup>1)</sup>	4.66 $\pm$ 0.96 <sup>2)</sup>
Cliv + Quer	50 + 50	148.57 $\pm$ 13.13 <sup>4)</sup>	35.93 $\pm$ 7.03 <sup>3)</sup>	6.54 $\pm$ 0.84 <sup>4)</sup>
Quer	50	111.30 $\pm$ 19.57	33.70 $\pm$ 8.98	7.57 $\pm$ 1.11

0.05),与 Cliv 组比较,25,50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cliv + Quer 能明显提高 Nrf2 的转录激活 ( $P < 0.05$ )。与空白组比较,L-02 细胞孵育 Quer 1,2,4 h 可诱导细胞内 Nrf2 磷酸化水平的升高 ( $P < 0.05$ ),孵育 Quer 1,2 h 可诱导细胞内 PI3K 磷酸化水平的升高 ( $P < 0.05$ )。见表 4,5,图 1。

表 4 Quer 对 Cliv 诱导的报告基因的水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Table 4 Effect of Quer on level of Cliv induced reporter gene ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Nrf2 相对 ARE luciferase (fold)
空白	-	1
Cliv	50	0.73 $\pm$ 0.14 <sup>1)</sup>
Cliv + Quer	50 + 25	1.39 $\pm$ 0.43 <sup>2)</sup>
	50 + 50	2.00 $\pm$ 0.66 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与 Cliv 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

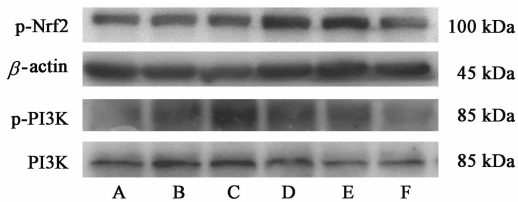
**3.3 LY 对 Cliv 诱导的肝细胞毒性和 Nrf2 核转位激活的影响** 与 Cliv + Quer 组比较,给予 PI3K 抑制

表 5 Quer 对 L-02 细胞 p-Nrf2, p-PI3K 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 5 Effect of Quer on protein expressions of p-Nrf2 and p-PI3K in L-02 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别	时间/h	p-Nrf2/ $\beta$ -actin	p-PI3K/PI3K
空白	-	1	1
Quer	0.5	1.04 $\pm$ 0.14	1.10 $\pm$ 0.17
	1	1.26 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>	1.44 $\pm$ 0.31 <sup>1)</sup>
	2	1.26 $\pm$ 0.08 <sup>1)</sup>	2.06 $\pm$ 1.07 <sup>1)</sup>
	4	1.22 $\pm$ 0.09 <sup>1)</sup>	2.31 $\pm$ 1.67
	8	0.88 $\pm$ 0.08	1.53 $\pm$ 1.08

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; Quer 浓度 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



A. 空白组; B ~ F. Quer 0.5, 1, 2, 4, 8 h 组

图 1 Quer 对 L-02 细胞 p-Nrf2 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of Quer on protein expressions of p-Nrf2 in L-02 cells

剂 LY 后, Quer 对 Cliv 导致的细胞毒性的保护作用显著降低 ( $P < 0.01$ )。与 Quer 组比较, 在给予 LY 后显著降低了 Quer 诱导的 Nrf2 磷酸化水平的升高 ( $P < 0.05$ )。见表 6, 7, 图 2。

3.4 Quer 对 Nrf2 相关 mRNA 表达的影响 与空白组比较, Cliv 可明显降低 L-02 细胞中 Nqo1, Gclm mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ), 与 Cliv 组比较, Quer

表 6 LY 对细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Table 6 Effect of LY on cell viability ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	存活率/%
空白	-	100
Cliv	50	52.13 $\pm$ 3.60 <sup>1)</sup>
Cliv + Quer	50 + 50	69.26 $\pm$ 1.33 <sup>2)</sup>
Cliv + Quer + LY	50 + 50 + 20	64.07 $\pm$ 2.00 <sup>3)</sup>

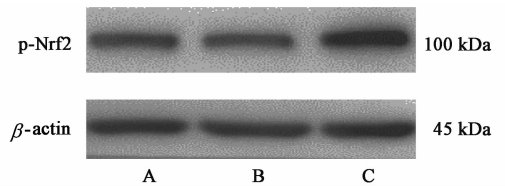
注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ; 与 Cliv 组比较<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ; 与 Cliv + Quer 组比较<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

表 7 LY 对 L-02 细胞 p-Nrf2 的蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 7 Effect of LY on protein expressions of p-Nrf2 in L-02 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	p-Nrf2/ $\beta$ -actin
空白	-	1
Quer	50	1.88 $\pm$ 0.73 <sup>1)</sup>
Quer + LY	50 + 20	1.15 $\pm$ 0.17 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; 与 Quer 组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。



A. 空白组; B. Quer + LY 组; C. Quer 组

图 2 LY 对 L-02 细胞内 p-Nrf2 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of LY on protein expressions of p-Nrf2 in L-02 cells

(50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 能明显提高 Hmx1, Nqo1, Gclc, Gclm mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ), 与 Cliv + Quer 组比较, 预孵 LY 可逆转 Quer 诱导的细胞内 Hmx1 mRNA 表达的升高 ( $P < 0.01$ )。见表 8。

表 8 Quer 对 L-02 细胞 Hmx1, Nqo1, Gclc, Gclm mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 8 Effect of Quer on expressions of Hmx1, Nqo1, Gclc and Gclm genes in L-02 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Hmx1	Nqo1	Gclc	Gclm
空白	-	1	1	1	1
Cliv	50	1.04 $\pm$ 0.26	0.89 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>	1.08 $\pm$ 0.17	0.70 $\pm$ 0.10 <sup>1)</sup>
Cliv + Quer	50 + 50	1.71 $\pm$ 0.10 <sup>2)</sup>	1.23 $\pm$ 0.23 <sup>2)</sup>	1.39 $\pm$ 0.10 <sup>2)</sup>	0.95 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>
Cliv + Quer + LY	50 + 50 + 20	0.81 $\pm$ 0.22 <sup>3)</sup>	1.46 $\pm$ 0.46	1.70 $\pm$ 0.40	1.04 $\pm$ 0.03

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ; 与 Cliv 组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ; 与 Cliv + Quer 组比较<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

Cliv 是吡咯里西啶类生物碱, 近年来, 关于 PAs 引起肝损伤的报道日益增多<sup>[25]</sup>。PAs 对肝脏的毒性已经成为国际上关注的新热点, 找到有效拮抗 PAs 引起的药物性肝损伤的药物迫在眉睫。研究表

明, 氧化应激损伤在 Cliv 诱导的肝毒性中有重要的参与作用<sup>[26]</sup>, Quer 作为一种黄酮类化合物, 具有很强的抗氧化应激能力<sup>[27]</sup>。GSH 作为细胞内主要的抗氧化剂、细胞信号调节器, 具有还原过氧化氢、清除 ROS 和含氮自由基的作用, 其反应后可生成

GSSG,所以 GSH/GSSG 可以反映细胞内 GSH 的耗竭程度。GSH 的耗竭会导致内源性清除 ROS 的能力下降,打破机体正常氧化与抗氧化的动态平衡,最终诱导氧化应激损伤。本研究结果显示  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Cliv 可诱导 L-02 细胞内 ROS 水平明显升高,同时降低细胞内 GSH 含量以及 GSH/GSSG,提示 Cliv 可诱导细胞产生明显的氧化应激损伤。而 Quer 能降低细胞 ROS 水平,同时提高细胞内 GSH 含量,提示 Quer 可拮抗 Cliv 诱导的氧化应激损伤。

Nrf2 是调节抗氧化应激反应的重要转录因子,其通过与 ARE 相互作用调节编码抗氧化蛋白的表达。在静息状态下,Nrf2 与 Keap1 偶联并与细胞浆肌动蛋白结合被锚定在胞浆,当受到氧应激刺激时,Nrf2 与 Keap1 解偶联并转移入核<sup>[28-29]</sup>,与抗氧化元件 ARE 结合,启动 ARE 调控下游基因,增强机体抵御氧化应激损伤的能力。而实验室前期研究也已发现,Nrf2 在 Quer 保护 Cliv 引起的肝毒性中有重要的参与作用。但是 Quer 是如何调控 Nrf2 转录活性的具体机制尚不清楚,有待进一步研究。有报道显示,Nrf2 的磷酸化介导了其转录激活,从而调控下游抗氧化酶表达发挥抗氧化应激的能力<sup>[30-31]</sup>。通过分析了 Nrf2 的蛋白磷酸化水平发现,Quer 在 1,2,4 h 能激活 Nrf2 的磷酸化,说明 Quer 激活了 Nrf2 的磷酸化提高了其转录活性。研究表明,Nrf2 的磷酸化激活受多条信号通路调控。其中,PI3K 的磷酸化激活能正向调控 Nrf2 的转录激活<sup>[22-23]</sup>。但是 PI3K 是否在 Quer 保护 Cliv 诱导的肝损伤中有参与作用尚不清楚。本研究结果显示 Quer 可诱导 L-02 细胞中 PI3K 磷酸化水平的升高,而 PI3K 抑制剂 LY 可显著逆转 Quer 升高的 Nrf2 磷酸化水平,提示 PI3K 在 Quer 诱导的 Nrf2 磷酸化激活中有重要调控作用。Nrf2 核转位会调控下游抗氧化基因表达,而这些基因编码的 II 相解毒酶可增强机体的抗氧化应激能力<sup>[32]</sup>。其中 Gclc 和 Gelm 是 GSH 合成过程中的限速酶谷氨酰半胱氨酸连接酶(GCL)的两个催化亚基<sup>[33]</sup>;血红素加氧酶 1(Hmox1)能催化血红素降解,产生的产物都有抗氧化损伤功能<sup>[34]</sup>;醌氧化还原酶 Nqo1 能够充当辅酶 Q(泛醌)的还原酶,使其保持在还原状态从而保护细胞膜组织不被氧自由基损伤<sup>[35]</sup>。本研究分析了 Nrf2 下游 Hmox1,Nqo1,Gclc,Gelm mRNA 表达,Quer 能在 mRNA 水平提高 L-02 细胞中 Hmox1,Nqo1,Gclc,Gelm 的表达,而 LY

能阻断 Quer 对 Hmox1 mRNA 表达的升高作用。提示 PI3K 可能在 Quer 诱导 Nrf2 激活介导的下游 Hmox1 基因表达中有一定的调控作用。

本实验结果表明,Quer 对 Cliv 诱导的肝细胞毒性有显著的拮抗作用,其机制可能是通过升高 PI3K 磷酸化水平,继而诱导 Nrf2 的磷酸化及后续核转位激活,从而调控下游抗氧化基因特别是 Hmox1 的表达,提高机体的抗氧化应激能力,最终抵御 Cliv 诱导的肝细胞毒性。本研究为临床对抗 PAs 的肝毒性提供了一定的科学基础和研究思路。

#### [参考文献]

- [1] Wink S, Hiemstra S W, Huppelschoten S, et al. Dynamic imaging of adaptive stress response pathway activation for prediction of drug induced liver injury[J]. Arch Toxicol, 2018, 3:1-18.
- [2] Kuhara K, Takanashi H, Hirano I, et al. Carcinogenic activity of clivorine, a pyrrolizidine alkaloid isolated from Ligularia Dentata[J]. Cancer Lett, 1980, 10(2): 117-122.
- [3] JI L L, ZHAO X G, CHEN L, et al. Pyrrolizidine alkaloid clivorine inhibits human normal liver L-02 cells growth and activates p38 mitogen-activated protein kinase in L-02 cells[J]. Toxicol, 2002, 40(12): 1685-1690.
- [4] JI L L, SHENG Y C, ZHENG Z Y, et al. The involvement of p62-Keap1-Nrf2 antioxidant signaling pathway and JNK in the protection of natural flavonoid quercetin against hepatotoxicity[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 85:12-23.
- [5] 蒋萍,杨阳,季莉莉,等. 黄芩素对 4 种肝损伤物质造成肝细胞毒性的拮抗作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012,18(6):145-148.
- [6] Kawabata K, Mukai R, Ishisaka A. Quercetin and related polyphenols: new insights and implications for their bioactivity and bioavailability[J]. Food Funct, 2015, 6(5):1399-1417.
- [7] 李韶静,廖应芬,杜青. 槲皮素纳米载药系统的研究与应用[J]. 中国中药杂志,2018,43(10):1978-1984.
- [8] 朱玲玲,张洋,窦勤玲,等. 槲皮素对 U937 细胞迁移和侵袭能力及 MMP-2,MMP-9 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(16):146-151.
- [9] Amaral S, Mira L, Nogueira J M F, et al. Plant extracts with anti-inflammatory properties—a new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure-antioxidant activity relationships[J]. Bioorg Med Chem, 2009, 17(5):

- 1876-1883.
- [10] 骆明旭, 罗丹, 赵万红. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2014, 23(17):12-14.
- [11] Kelly G S. Quercetin. Monograph [J]. Altern Med Rev, 2011, 16(2):172-194.
- [12] Boots A W, Haenen G R, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical [J]. Eur J Pharmacol, 2008, 585(2/3):325-337.
- [13] Hertog M G, Feskens E J, Hollman P C, et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study [J]. Lancet, 1993, 342(8878):1007-1011.
- [14] Manach C, Morand C, Texier O, et al. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin [J]. J Nutr, 1995, 125(7):1911-1922.
- [15] Hollman P C, de Vries J H, van Leeuwen S D, et al. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers [J]. Am J Clin Nutr, 1995, 62(6):1276-1282.
- [16] 李航, 段惠军. Nrf2/ARE 信号通路及其调控的抗氧化蛋白 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(3):300-303.
- [17] YU X, Kensler T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention [J]. Mutat Res, 2005, 591(1/2):93-102.
- [18] 高之心, 李元海, 鲁显福. 转录因子 NF-E<sub>2</sub> 相关因子 2-抗氧化反应元件信号路径及其肝脏保护作用进展 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2013, 34(2):182-185.
- [19] 谢晨, 陈韩英, 钟晶, 等. 紫草素通过上调 Nrf2 途径及干预胞内氧化还原平衡稳态诱导 A549 细胞凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(10):1445-1451.
- [20] 方静, 陈江, 彭君伟, 等. 基于 Nrf2 通路探讨薏苡附子败酱散治疗溃疡性结肠炎的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13):85-92.
- [21] ZHANG J Q, SHI L, XU X N, et al. Therapeutic detoxification of quercetin against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice and its mechanism [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2014, 15(12):1039-1047.
- [22] LIN M, ZHAI X, WANG G, et al. Salvianolic acid B protects against acetaminophen hepatotoxicity by inducing Nrf2 and phase II detoxification gene expression via activation of the PI3K and PKC signaling pathways [J]. J Pharmacol Sci, 2015, 127(2):203-210.
- [23] LI L, DONG H, SONG E, et al. Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/Akt signaling [J]. Chem Biol Interact, 2014, 209(1):56-67.
- [24] PANG C, ZHENG Z Y, SHI L, et al. Caffeic acid prevents acetaminophen-induced liver injury by activating the Keap1-Nrf2 antioxidative defense system [J]. Free Radic Biol Med, 2016, 91:236-246.
- [25] YANG X, LI W, SUN Y, et al. Comparative study of hepatotoxicity of pyrrolizidine alkaloids retrorsine and monocrotaline [J]. Chem Res Toxicol, 2017, 30(2):532-539.
- [26] JI L L, LIU T Y, WANG Z T. Pyrrolizidine alkaloid clivorine induced oxidative injury on primary cultured rat hepatocytes [J]. Hum Exp Toxicol, 2010, 29(4):303-309.
- [27] LIU J, WANG X, YONG H, et al. Preparation, characterization, digestibility and antioxidant activity of quercetin grafted cynanchum auriculatum starch [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 114:130-136.
- [28] Kaspar J W, Niture S K, Jaiswal A K. Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress [J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(9):1304-1309.
- [29] ZHANG D D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway [J]. Drug Metab Rev, 2006, 38(4):769-789.
- [30] Jain A K, Jaiswal A K. GSK-3 acts upstream of fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E<sub>2</sub> related factor 2 [J]. J Biol Chem, 2007, 282(22):16502-16510.
- [31] SHI L, HAO Z, ZHANG S, et al. Baicalein and baicalin alleviate acetaminophen-induced liver injury by activating Nrf2 antioxidative pathway: the involvement of ERK1/2 and PKC [J]. Biochem Pharmacol, 2018, 150:9-23.
- [32] Jaiswal A K. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression [J]. Free Radic Biol Med, 2004, 36(10):1199-1207.
- [33] Toroser D, Yarian C S, Orr W C, et al. Mechanisms of gamma-glutamylcysteine ligase regulation [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1760(2):233-244.
- [34] Choi A M, Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996, 15(1):9-19.
- [35] 夏小俊, 金中初. NQO1 酶及其被氧环境诱导表达的研究进展 [J]. 生理科学进展, 2002, 33(3):225-229.

[责任编辑 张丰丰]