

穿心莲内酯对乙醇诱导肝细胞氧化应激损伤的作用及机制

李旒¹, 李晶¹, 周定耕¹, 王彪¹, 曹衡玉^{2*}

(1. 南华大学附属第二医院急诊科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学附属第二医院超声医学科)

摘要: **目的** 研究穿心莲内酯(AD)对乙醇诱导肝细胞氧化应激损伤的保护作用,并探讨其作用机制。**方法** 体外培养肝细胞L-02,用0~30 μmol/L AD 孵育1 h后,采用酶学方法测定处理后谷胱甘肽巯基转移酶(GST)及其过氧化物酶(GPx)和还原酶(GR)活性变化,实时定量PCR检测其mRNA表达;同时采用Western blot分析丝裂原活化蛋白激酶家族(MAPKs)中p38, JNK和ERK以及Akt的磷酸化变化,并采用PI3K/Akt和ERK抑制剂LY294002和PD98059处理细胞,观察其在介导核转录因子Nrf2转位和GST、GPx和GR表达中的作用;MTT检测细胞活性变化。**结果** 0~30 μmol/L AD处理L-02细胞后,GST、GPx和GR的酶活性显著增高,同时其mRNA表达也明显增多。AD也能诱导ERK和Akt磷酸化,但对p38和JNK无明显影响。采用LY294002或PD98059处理细胞后,可抑制AD诱导Nrf2核转位及Akt和ERK磷酸化,同时也能明显消除AD对乙醇处理后L-02细胞毒性的保护作用。**结论** AD经PI3K/Akt和ERK上调抗氧化蛋白GST、GPx和GR的表达而发挥对乙醇毒性的保护作用。

关键词: 穿心莲内酯; 肝细胞; 乙醇

中图分类号:R575.5 文献标识码:A

Effect of Andrographolide on ethanol-induced damage in human liver cells

LI Ni, LI Jing, ZHOU Dinggeng, et al

(Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China)

Abstract: **Objective** To investigate the molecular mechanism involved in the protection exerted by Andrographolide (AD) on ethanol-induced damage in human L-02 liver cells. **Methods** The human L-02 liver cells were cultured in vitro and were treated with 0~30 μmol/L AD, the activity of glutathione-related enzymes such as glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) were measured by enzymic methods, the expression of mRNA were detected by real-time PCR. Phosphorylation of the mitogen-activated protein kinase family member of p38, JNK, ERK, and Akt were detected by Western blot. The cell viability was measured by MTT. **Results** Treatment of L-02 cells with Andrographolide increased the expression of mRNA and the activity of glutathione-related enzymes such as GPx, GR and GST. Andrographolide also induced the phosphorylation of Akt and ERK, but there was no difference in the phosphorylated levels of p38 and JNK. Further studies with PI3K and ERK specific inhibitors LY294002 and PD98059 confirmed that both molecular pathways are critical for the nuclear translocation of Nrf2, the increased enzyme expression and activity and the beneficial effect against oxidative stress induced by Andrographolide. **Conclusion** Andrographolide prevents ethanol-induced damage through the modulation of PI3K/Akt and ERK pathways involved in antioxidant enzymes GST, Gpx and GR regulation.

Key words: Andrographolide; Hepatic cell; Ethanol

长期过量饮酒是导致酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)的主要因素,也是引起肝硬化和肝功能衰竭的重要原因^[1]。ALD是一种慢性病理过程,其特征是进行性肝功能损害,随后导致脂肪肝

收稿日期:2017-04-23;修回日期:2017-06-10

基金项目:湖南省卫生厅科研基金(B2014-054)

* 通讯作者, E-mail: caohengyuhengyang@163.com.

变性、脂肪肝及纤维化,最后可引起肝硬化,部分患者可能进一步发展为肝失代偿和肝细胞癌^[2]。ALD 的发病机制复杂,目前认为乙醇摄入所导致的脂质过氧化以及炎症反应是导致肝细胞损伤的重要因素^[3]。在 ALD 的早期,临床治疗目标是逆转肝脂肪变性。但从长远角度来看,戒酒后再配合饮食调节是防治 ALD 的重要途径。研究表明多种来源于自然界的天然植物提取物对乙醇所致的肝细胞损伤具有保护作用。穿心莲内酯(Andrographolide, AD)是从中药穿心莲中提取出来的一种二萜类化合物。现代药理学研究表明,AD 具有多种生物学活性,包括抗氧化应激、抗炎症以及抗病毒、抗血小板活性,并对多种毒性物质所致的肝损伤具有保护作用^[4-5]。本课题组的前期研究表明,AD 可能通过激活 Nrf2 上调 HO-1 表达而拮抗乙醇所致肝细胞损伤^[6]。但除此之外是否还具有其他保护机制目前仍不明确。本研究旨在进一步探讨穿心莲内酯对乙醇诱导肝细胞氧化应激损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 穿心莲内酯(AD,货号 90281)、LY294002、PD98059 购自 Sigma (St.Louis, CA)。Anti-AKT 及磷酸化-AKT (p-AKT), anti-ERK1/2 及磷酸化-ERK1/2 (p-ERK), anti-JNK1/2 及磷酸化 JNK1/2 (p-JNK), anti-p38 及磷酸化 p38 抗体购自 Cell Signaling Technology。Anti-GPx, anti-GR, 抗多聚 ADP 多聚酶 (anti-PARP) 及抗生长因子受体结合蛋白 2 (anti-GRB2) 购自 Santa Cruz。RNA 提取试剂盒购自 Qiagen, 实时定量 PCR 所用引物由上海生工合成, dNTPs 及逆转录酶购自 Promega, Taq 酶购自 Roche。

1.2 细胞培养与处理 人肝细胞细胞株 L-02 (ATCC, Manassas, VA) 采用含有 10% 胎牛血清, 1% 葡萄糖, 1% 谷氨酰胺, 100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI-1640 基中, 置于含 5% CO₂ 的恒温培养箱中 37 $^{\circ}$ C 条件下培养。

1.3 谷胱甘肽巯基转移酶 (GST) 及其过氧化物酶 (GPx)、还原酶 (GR) 活性测定 细胞处理结束后用 PBS 漂洗并于 800 rpm 离心 5 min 获取细胞沉淀, 随后加入悬浮缓冲液 (含 20 mmol/L Tris, 5 mmol/L EDTA 和 0.5 mmol/L 巯基乙醇) 2 mL, 经超声并于 3 000 rpm 条件下离心 15 min, 获取上清用于 GPx 和 GR 活性测定。GPx 和 GR 活性测定参照

参考文献提供的方法进行^[7-8]。GSH 的测定按照 Biovision 公司提供的试剂盒进行 (GST Fluorometric Activity Assay Kit, CA)。在该试剂盒中提供了一种染料 monochlorobimane (MCB), 它能与谷胱甘肽特异结合, 非结合状态的 MCB 不发出任何荧光, 当其与氧化或还原状态的 GSH 结合后, 在 380 nm 激发波长下可发蓝色荧光, 通过测定荧光强度间接测定 GSH 活性。

1.4 RNA 提取与实时定量 PCR 采用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 并将其逆转录为 cDNA。加入 10 mmol/L 正向和反向引物以及 SYBR 后 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 实时定量 PCR 于 ABI 7500 上进行扩增。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 随后进入以下 40 个循环: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min。本研究所用的引物如下: GPx, forward 5'-CCTCAAGTACGTCGACCTG-3', reverse 5'-TAGGAGTTGCCAGACTGCTG-3'; GR, forward 5'-CAGTGGGACTCACGGAAGAT-3', reverse 5'-TTCCTGCAACAGCAAAACC GST-3'; β -actin, forward 5'-ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA-3', reverse 5'-CGG AAC CGCTCA TTG CC-3'。结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

1.5 蛋白提取与 Western blot 分析 细胞处理结束后, 无菌 PBS 洗涤, 采用 Pierce 提供的试剂盒提取细胞核与细胞浆蛋白。测定其蛋白浓度后, 将加入等体积的 2 \times SDS 上样缓冲液煮沸 5 min, 取 20 μ L 蛋白用于 SDS-PAGE。电泳结束后, 将其电转印到硝酸纤维素膜上。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 后, 加入相应一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 并采用 ECL 发光 (Millipore, Billerica, MA)、显影 (VL Chemi-Smart 3000, Viogene Biotek Sunnyvale, CA)。并采用 Quantitative One 软件进行灰度扫描。

1.6 MTT 检测细胞活性 采用 MTT 法分析细胞活性。即, 培养于 96 孔板中的 L-02 细胞 (1×10^5 /mL), 经 0 ~ 30 μ mol/L AD 和 10 ~ 500 mmol/L 乙醇作用 24 h 后, 弃培养上清, 加入 100 μ L MTT 溶液 (将 10 μ L 10 μ g/mL MTT 用 90 μ L 培养基稀释), 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 2 h。孵育结束后加入 100 μ L DMSO 溶液, 充分震荡以溶解甲瓩, 并于 570 nm 波长处测定其吸光度 (μ Quant, Bio-Tek), 并计算细胞相对活性 (相对活性 = 处理组吸光度 / 对照组吸光度 $\times 100\%$)。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计量数据用均数 \pm 标准差表示, 多组间比

较采用方差分析,组间比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AD 上调乙醇处理后肝细胞中 GPx, GR 和 GST 活性

在前期研究当中已经证实 AD 处理能增强

乙醇处理后肝细胞的活性,并能下调细胞内 ROS 的水平^[6]。考虑到氧化应激是 ALD 发生的重要因素,因此对肝细胞内抗氧化/解毒功能的相关酶类的活性进行了检测。结果如图 1 所示,给予 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和 30 $\mu\text{mol/L}$ AD 孵育 24 h 后,随着 AD 浓度的增强,GPx、GR 和 GST 的酶活性逐渐增高。

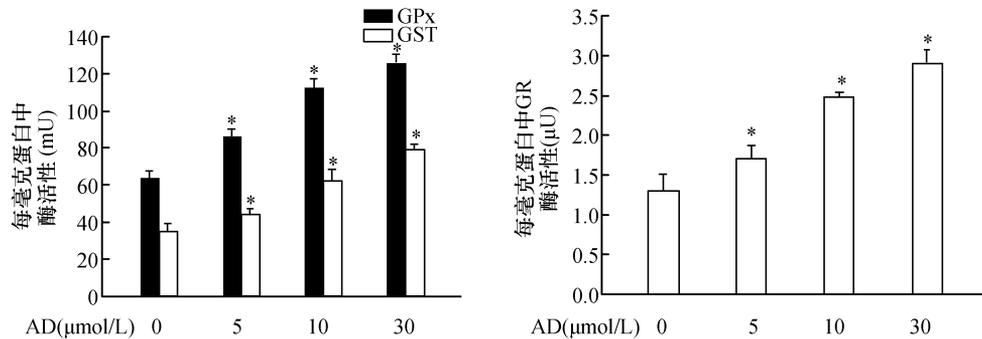


图 1 不同浓度 AD 上调 GPx、GR 和 GST 的酶活性

A: 不同浓度 AD 对 GPx 和 GST 酶活性的影响; B: 不同浓度 AD 对 GR 酶活性的影响 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, * $P < 0.05$

2.2 AD 促进肝细胞中 GPx, GR 和 GST mRNA 表达

采用实时定量 PCR 检测了其表达水平。结果显示, AD 处理后, GPx, GR 和 GST mRNA 表达水平随之增高(图 2)。以上结果示 5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和 30 $\mu\text{mol/L}$ AD 能影响 GPx, GR 和 GST mRNA 和蛋白表达。

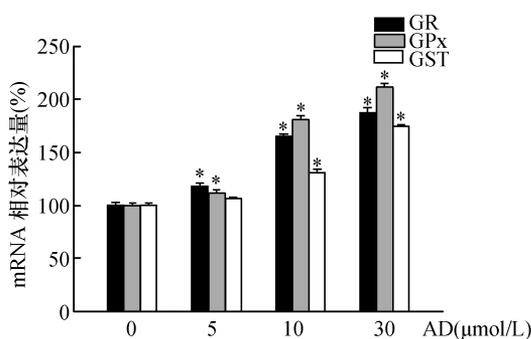


图 2 不同浓度 AD 上调 GPx、GR 和 GST mRNA 表达

与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 相比, * $P < 0.05$

2.3 AD 促进 L-02 细胞中 Akt 和 ERK 磷酸化

Western blot 结果显示,不同浓度 AD 处理 1 h 后,细胞内 Akt 和 ERK 的磷酸化水平随着 AD 浓度的递增而增加,而 p38 和 JNK 的磷酸化水平无明显变化(图 3)。

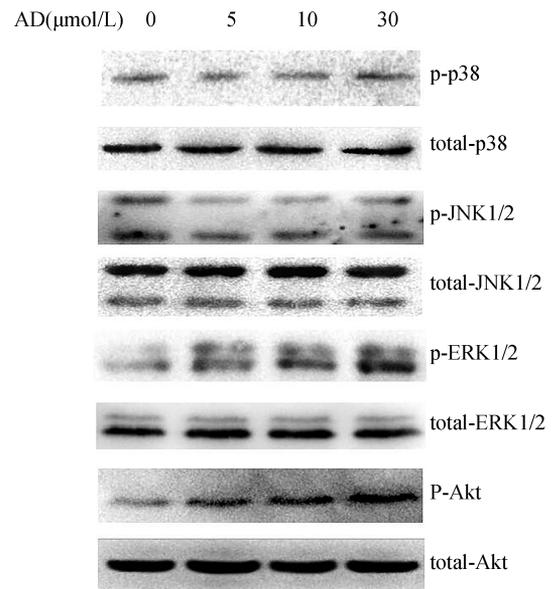


图 3 不同浓度 AD 诱导 Akt 和 ERK 磷酸化

2.4 AD 经 PI3K/Akt 和 ERK 途径诱导 Nrf2 核转位 采用 LY294002 或 PD 98059 预处理细胞 1 h 后,细胞核内 Nrf2 含量明显低于未处理组,而内参 PARP 保持恒定(图 4)。

2.5 AD 经 PI3K/Akt 和 ERK 促进 GPx, GR 和 GST 表达 实时定量 PCR 结果也显示, LY294002 和 PD98059 预处理细胞 1 h 后,可明显逆转 AD 对 GPx,

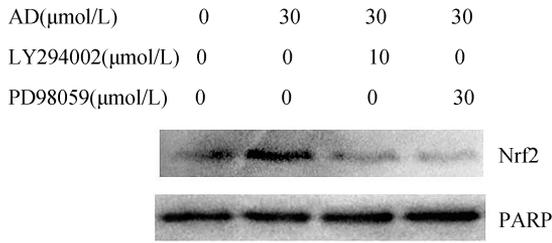


图 4 PI3K/Akt 和 ERK 抑制剂对 Nrf2 核转位的影响

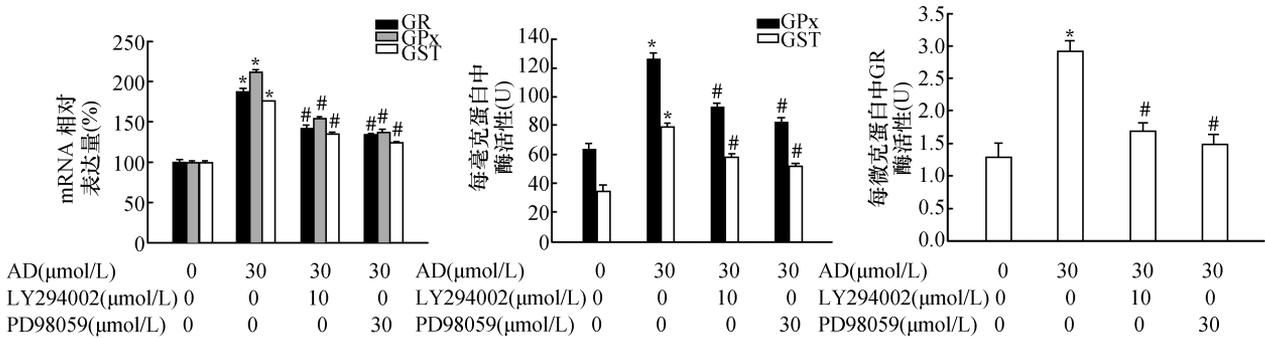


图 5 PI3K/Akt 和 ERK 抑制剂对 GPx, GR 和 GST 表达的影响
与对照组(0 μmol/L AD)比较, * :P<0.05; 与 30 μmol/L AD 比较, #:P<0.05

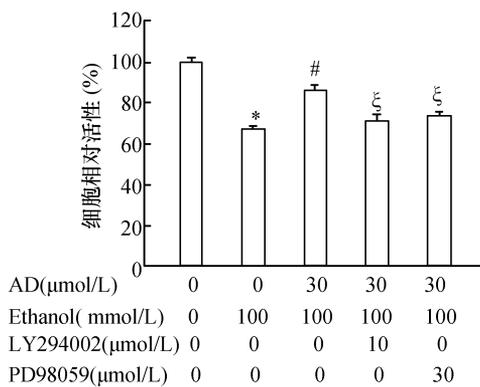


图 6 PI3K/Akt 和 ERK 抑制剂抑制 AD 对乙醇所致毒性的保护作用

与对照组(0 μmol/L AD)比较, * :P<0.05; 与 100 mmol/L 乙醇比较, #:P<0.05; 与 30 μmol/L AD+乙醇比较, § :P<0.05

3 讨 论

AD 是从中草药植物穿心莲中提取出来的一种二萜类化合物, 现有的研究证实 AD 具有抗氧化应激损伤的作用, 其机制可能与清除自由基有关。本文作者前期研究也发现, AD 可能通过激活 Nrf2 上调 HO-1 表达而发挥对乙醇所致肝细胞损伤的保护作用^[6]。在本研究中, 对 AD 参与细胞保护作用的

GR 和 GST 的诱导效应(图 5A)。此外, LY294002 和 PD98059 处理也能明显削弱 AD 对 GPx, GR 和 GST 活性的影响(图 5B、C)。

2.6 AD 激活 PI3K/Akt 和 ERK 发挥对乙醇所致细胞毒性 MTT 结果显示, AD 可明显改善乙醇处理后的细胞毒性作用。而在 AD 处理前先将细胞用 LY294002 或 PD98059 预处理 1 h 后, 结果显示均可逆转 AD 的保护效应(图 6)。

抗氧化相关酶类的表达进行了探讨。细胞内源性抗氧化谷胱甘肽及其相关酶类如 GR、GPx 和 GST 在拮抗各种氧自由基损伤中发挥重要作用。GST 和 GPx 主要参与清除过氧化物^[9-10], 而 GR 主要参与氧化型谷胱甘肽的再生^[11]。因此谷胱甘肽相关酶类在氧化应激损伤中发挥重要作用。本研究也发现, AD 处理后细胞内 GPx、GR 以及 GST 的酶活性、mRNA 及蛋白表达水平明显增高, 这表明 AD 能调节 GSH 相关酶基因的表达, 这也意味着 AD 处理后可能同时诱导这些抗氧化相关基因而拮抗氧化应激损伤。

前期研究表明 AD 可激活核转录因子 Nrf2 而诱导 HO-1 表达。考虑到 Nrf2 的激活受上游信号通路如 MAPKs 和 Akt 的调控, 并与其丝氨酸/酪氨酸残基的磷酸化有关^[12-13], 因此随后对这些激酶进行了观察。结果发现 AD 处理可明显诱导 Akt 和 ERKs 的磷酸化, 而对 JNK, p38 无明显影响。随后通过采用 ERK 和 PI3K 特异性抑制剂 PD98059 和 LY294002 处理后, 细胞核内 Nrf2 水平明显减少, 表明 Nrf2 的激活有赖于 ERK 和 PI3K。此外, PD98059 和 LY294002 处理后, GPx, GR 和 GST 的表达及活性, 这表明 Nrf2 和 GPx, GR 和 GST 之间可能

存在某种关联。

考虑到细胞内具有保护性的酶类能拮抗氧化应激损伤,因此随后对 AD 的细胞保护作用进行了探讨。细胞毒性实验结果显示,AD 处理后能明显上调乙醇的细胞毒性。同时采用 ERK 或 PI3K 抑制剂处理后,AD 对细胞的保护效应消失,这表明 AD 抗乙醇所致的毒性与 ERK 和 PI3K 的激活有关。

总之,本研究证实 AD 能增强肝细胞的抗氧化功能,从而发挥对乙醇所致的氧化应激保护作用,这种保护作用有赖于 PI3K/Akt 和 ERK 通路的激活,随后诱导 Nrf2 核转位,后者可能通过某种未知的机制上调 GPx,GR 和 GST 的表达,最终改善乙醇对肝细胞的毒性作用。因此,AD 除了自身的自由基清除效应外,它本身也具有调控细胞内信号通路的作用,从而具有拮抗乙醇所致肝细胞毒性的潜能。

参考文献:

- [1] Almeda-Valdes P, Altamirano-Barrera A, Uribe M, et al. Metabolic features of alcoholic liver disease [J]. *Rev Recent Clin Trials*, 2016, 11(3): 220-226.
- [2] Alpert L, Hart J. The Pathology of alcoholic liver disease [J]. *Clin Liver Dis*, 2016, 20(3): 473-489.
- [3] Abenavoli L, Masarone M, Federico A, et al. Alcoholic hepatitis: pathogenesis, diagnosis and treatment [J]. *Rev Recent Clin Trials*, 2016, 11(3): 159-166.
- [4] 万君, 叶菊凤, 叶俊, 等. 穿心莲内酯对小鼠急性四氯化碳肝损伤的保护作用 [J]. *实用医学杂志*, 2014, 30(14): 2204-2207.
- [5] 欧阳德亮, 胡杨, 王又保, 等. 穿心莲内酯对胃癌 AGS 细胞增殖侵袭的影响 [J]. *中南医学科学杂志*, 2014, 42(3): 246-250.
- [6] 曹衡玉, 欧阳征仁, 尹海辉, 等. 穿心莲内酯激活 Nrf2 抑制乙醇诱导肝细胞氧化应激损伤 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(11): 2897-2902.
- [7] Günzler WA, Kremers H, Flohé L. An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1-11-1-9-) in blood [J]. *Z Klin Chem Klin Biochem*, 1974, 12(10): 444-448.
- [8] Spooner RJ, Delides A, Goldberg DM. Heat stability and kinetic properties of human serum glutathione reductase activity in various disease states [J]. *Biochem Med*, 1981, 26(2): 239-248.
- [9] Dokic I, Hartmann C, Herold-Mende C, et al. Glutathione peroxidase 1 activity dictates the sensitivity of glioblastoma cells to oxidative stress [J]. *Glia*, 2012, 60(11): 1785-1800.
- [10] Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005, 45: 51-88.
- [11] Argyrou A, Blanchard JS. Flavoprotein disulfide reductases: advances in chemistry and function [J]. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 2004, 78(6): 89-142.
- [12] 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(2): 56-67.
- [13] Zipper LM, Mulcahy RT. Erk activation is required for Nrf2 nuclear localization during pyrrolidine dithiocarbamate induction of glutamate cysteine ligase modulatory gene expression in HepG2 cells [J]. *Toxicol Sci*, 2003, 73(1): 124-134.

(本文编辑: 蒋湘莲)