

姜油树脂通过 Nrf2 通路介导的辐射防护作用

李晴 徐畅 王彦 杜利清 王芹 王璐 刘强

(北京协和医学院 中国医学科学院放射医学研究所 天津 300192)

摘要 采用MTT(Methyl thiazolyl tetrazolium)实验检测姜油树脂对间充质干细胞的细胞毒性; 流式细胞术检测细胞中活性氧(ROS)的变化; 彗星实验检测细胞 DNA 受损情况; 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)以及 Western Blot 检测核因子 E2 相关因子 2 (Nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2)及其下游典型的抗氧化基因(如 HO1、NQO1)的表达变化。结果表明, 姜油树脂能降低辐射所诱发的活性氧水平, 能减少辐射所造成的 DNA 损伤, 并能明显提高发挥辐射防护作用的抗氧化酶、脱毒酶的 mRNA 及蛋白表达水平。提示姜油树脂可以通过降低辐射诱发的氧化损伤发挥辐射防护作用, 其作用机制与 Nrf2 有关。

关键词 姜油树脂, 间充质干细胞, 核因子 E2 相关因子 2(Nrf2), 辐射防护

中图分类号 TL71

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2015.rj.33.040201

电离辐射可直接引起 DNA 单双链断裂和染色体损伤, 间接使细胞产生过多的活性氧(Reactive oxygen species, ROS), 进而引起细胞衰老和死亡等细胞损伤^[1]。核因子 E2 相关因子 2 (Nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2)是调控细胞氧化应激的核心转录因子^[2], 在电离辐射引起的氧化应激反应中起到非常重要的作用^[3-4], Nrf2 活化进而与抗氧化反应元件(Antioxidant response element, ARE)这种顺式作用元件结合增强, 最终增强一系列抗氧化酶及 II 相解毒酶的表达, 包括血红素加氧酶(Heme oxygenase-1, HO1)、还原型辅酶 I 醌类氧化还原酶[NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1, NQO1]等, 诱导抗氧化系统的表达升高, 降低细胞内的活性氧水平, 成为电离辐射自由基清除的有效通路^[5-6]。

姜油树脂是从姜科植物中以 CO₂ 超临界萃取法提取出来的一种酚类混合物, 含有多种酚类和酯类等不饱和物质, 其本身就具有一定的自由基吸附作用, 此外, 已有研究证实其含有的姜黄素可以抑制紫外线导致的氧化损伤^[7], 其发挥药理作用的重要分子机制为活化 Nrf2^[8], 进而活化 Nrf2 通路, 帮助细胞抵御氧化应激。本研究利用间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)探讨姜油树脂对电离辐射的防护作用, 为该天然化合物开发成为一种

有效的辐射防护药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

ROS 检测试剂盒、MTT (上海碧云天生物技术有限公司), Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司), FastStart Universal SYBR Green Master(Rox) (瑞士 Roche 公司)。Nrf2 抗体、HO1 抗体、NQO1 抗体 (美国 Abcam 公司), β -tubulin、兔抗、鼠抗 (武汉博士德公司)。

1.2 细胞培养与照射

间充质干细胞(MSCs)由国家工程研究中心赠送, 用含 10%胎牛血清 (美国 Gibco 公司)的 DMEM-F12 于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度恒温培养箱中传代培养。应用放射源为 Gammacell-40 ¹³⁷Cs γ -射线 (加拿大原子能有限公司)的辐照装置对 MSCs 进行照射, 剂量率为 1.02 Gy/min, 源靶距 15 cm。本实验所用的吸收剂量为 4 Gy。

1.3 MTT 实验

取对数生长期的细胞, 调整细胞浓度至 3×10^4 个/mL, 以每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中, 每组设

基金资助: 国家自然科学基金项目(31300695, 31170804)资助

第一作者: 李晴, 女, 1990 年 9 月出生, 2013 年毕业于山东师范大学生物科学专业, 现为中国医学科学院放射医学研究所放射医学专业硕士研究生

通讯作者: 刘强, 博士, 教授, E-mail: liuqiang@irm-cams.ac.cn

收稿日期: 初稿 2015-05-25; 修回 2015-06-08

12 个平行孔, 细胞贴壁后, 换为含 0、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 和 10^{-3} g/mL 姜油树脂新鲜培养基, 培养相应时间后每孔加入 10 μ L MTT(5 mg/mL), 37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 吸弃培养基, 每孔加 150 μ L DMSO, 摇床震荡混匀 5 min, 酶标仪 492 nm 波长测定各孔吸光值。

1.4 流式细胞术实验

实验分为 4 组: 正常对照组(Control, Ctrl)、加药组(Treat, Trt): 单纯加入 10^{-4} 的姜油树脂、照射组(Irradiation, IR): 4 Gy γ -射线照射、加药联合照射组(Trt+IR): 10^{-4} 姜油树脂作用 2 h 后, 4 Gy γ -射线照射。间充质干细胞经过不同处理后 24 h, 按照 1:1000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10 μ mol/L, 每个处理组加入 1 mL, 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内孵育 20 min, 用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次, 以除去未进入细胞内的 DCFH-DA。之后可以用荧光倒置显微镜观察荧光亮度, 并上流式仪检测, 结果显示为荧光相对强度对数值。

1.5 单细胞凝胶电泳(彗星)实验

实验分组同 1.4 节。细胞接受 4 Gy γ -射线辐照 24 h 后分别收集细胞。制作正常熔点凝胶: 取 5×10^5 个/mL 细胞悬液 20 μ L 与 60 μ L 低熔点凝胶(7.5%)混匀后滴于第一层上; 碱性裂解液中 4 $^{\circ}$ C 2.5 h 裂解; 电泳液中 4 $^{\circ}$ C 20 min 解旋; 4 $^{\circ}$ C 20 min 电泳(30 V, 40 mA); 4 $^{\circ}$ C 20 min 中和。溴化乙锭(EB, 2 μ g/mL)染色 30 s, 超纯水漂洗后于荧光显微镜绿色激发光下观察并随机拍照; 用 CASP 软件分析细胞, 包括尾长、尾距及尾部 DNA 百分含量。

1.6 RT-PCR 检测 mRNA 水平变化

用处于对数生长期的 MSCs 进行试验, Trizol 试剂提取总 RNA, 按照逆转录试剂盒说明书操作逆转录 mRNA 为 cDNA, 然后 Real-time PCR 试剂 ROX, 25 μ L 体系进行试验。引物由上海生工生物有限公司设计合成, 见表 1。

表 1 Real-time PCR 反应所用引物
Table 1 Primers in RT-PCR

基因名称 Gene	上游引物序 Forward primers	下游引物序列 Reverse primers
Nrf2	5'TCAGCGACGGAAAGAGTATGA 3'	5'CCACTGGTTTCTGACTGGATGT 3'
HO1	5'AGAGGGAATTCTCTTGGCTGGCTT3'	5'ATGCCATAGGCTCCTTCCTCCTTT3'
NQO1	5'AGGAAGAGCTAATAAATCTCTTCTTTGCTG3'	5'TCATATTGCAGATGTACGGTGTGGATTAT3'
GAPDH	5'TGACTTCAACAGCGACACCCA3'	5'CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA3'

1.7 Western blot 检测蛋白水平变化

采用指数生长的 MSCs 进行试验, 用蛋白裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法进行蛋白定量。取 20 g 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 采用半干转的转膜方法转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上(110 V, 130 min), 1%BSA 封闭 1 h, 一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜, 使用 TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min, 加入相应二抗室温孵育 1 h, 室温 TBST 洗膜 3 次, 每次 15 min, ECL 化学显色法检测, 凝胶成像系统显影。

1.8 统计学分析

各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析, 两组数据比较采用独立样本 t 检验, $p < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 检测姜油树脂对 MSCs 的细胞毒性

不同浓度的姜油树脂对 MSCs 细胞生长的影响见图 1。

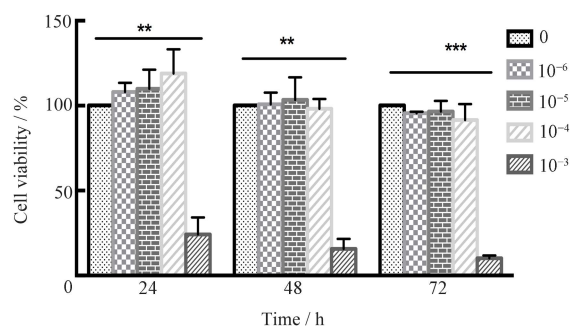


图 1 间充质干细胞的细胞活力, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n = 3$
Fig.1 Cell viability of MSCs, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n = 3$

图 1 表明, 和对照组 (即 0 姜油树脂组) 相比, 高于 10^{-4} g/mL 姜油树脂对 MSCs 的生长有非常明显的抑制作用($p<0.01$)。而 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} g/mL 姜油树脂对间充质干细胞几乎没有细胞毒性($p>0.05$)。所以采用 10^{-4} g/mL 姜油树脂作为后续实验浓度。

2.2 流式细胞术检测活性氧变化

DCFH-DA(2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐)是一种可以透过细胞膜的探针, 进入细胞后被细胞内酯酶水解生成 DCFH, 而细胞内的活性氧(ROS)可以氧化无荧光的 DCFH 为有荧光的 DCF。经过不同处理后的间充质干细胞流式检测结果如图 2 和表 2 所示。从中可以看出, 照射后的间充质干细胞内活性氧水平明显升高($p<0.05$), 说明照射造成了细胞内的氧化应激; 而姜油树脂联合照射组细胞内的活性氧水平有所下降($p<0.05$), 显示姜油树脂可以发挥辐射防护作用, 降低细胞内的活性氧水平。

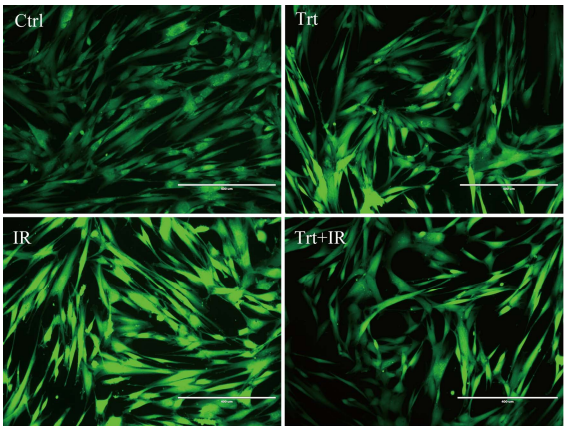


图 2 经不同方法处理后间充质干细胞(MSCs)的活性氧(ROS)图像
Fig.2 The ROS images of MSCs after different treatment methods

表 2 姜油树脂对辐射导致的间充质干细胞(MSCs)活性氧(ROS)的影响
Table 2 Effects of ginger oleoresin on ROS induced by radiation ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别 Groups	活性氧水平 ROS level
Ctrl	101.70±1.72
Trt	159.00±13.96
IR	248.40±10.13 ^a
Trt+IR	130.70±4.99 ^b

注: ^a 与对照组相比较, $p<0.05$; ^b 与照射组相比, $p<0.05$ 。
Note: ^a compared with control, $p<0.05$; ^b compared with IR, $p<0.05$.

2.3 姜油树脂对间充质干细胞 DNA 断裂的影响

彗星实验测定结果如表 3 所示。可以看出, 照射后的尾部 DNA 含量、尾长和尾距均较对照组明显增加($p<0.01$)。表明照射可以造成细胞的 DNA 损伤。而在姜油树脂联合照射组中, 彗星细胞各指标有明显降低, 与照射组相比差异明显($p<0.05$), 说明姜油树脂预处理确实可以帮助细胞进行 DNA 修复, 发挥辐射防护作用。

表 3 姜油树脂对辐射诱发间充质干细胞(MSCs)彗星细胞的影响

Table 3 Effects of ginger oleoresin on comet cells induced by radiation ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别 Groups	计数细胞数 Counting cells	尾部 DNA 含量 Tail DNA / %	尾长 Tail length / μ m	尾距 Tail moment / μ m
Ctrl	200	9.20±1.13	43.73±1.98	5.45±1.27
Trt	200	11.60±4.12	52.98±3.92	6.55±0.53
IR	200	38.11±0.89 ^a	100.7±0.03 ^a	16.75±1.65 ^a
Trt+IR	200	19.50±2.60 ^b	50.25±3.41 ^b	8.57±0.77 ^b

注: ^a 与对照组相比较, $p<0.05$; ^b 与照射组相比, $p<0.05$ 。
Note: ^a compared with control, $p<0.05$; ^b compared with IR, $p<0.05$.

2.4 RT-PCR 检测不同处理后细胞中各基因的表达变化

不同处理后细胞中各基因的表达结果如图 3 所示。间充质干细胞在 4 个分组中的 Nrf2 基因的 mRNA 水平变化不是很明显, 但是姜油树脂联合照射组中其下游的 HO1、NQO1 的 mRNA 表达水平高于单纯加入姜油树脂组和照射组, 差异具有统计学意义($p<0.05$)。

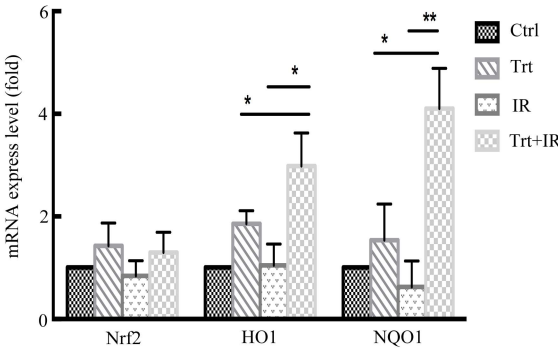


图 3 不同处理后各基因转录水平: * $p<0.05$; ** $p<0.01$; $n=3$
Fig.3 Expression level in different groups: $p<0.05$; ** $p<0.01$; $n=3$

2.5 Western Blot 检测不同处理后细胞中蛋白水平的变化

不同处理后, 细胞中蛋白水平的变化结果如图 4 所示。间充质干细胞的 4 个分组中蛋白水平的变化和转录水平的变化相一致, 为各组间 Nrf2 蛋白变化不是很明显, 而姜油树脂联合照射组中的 HO1 和 NQO1 的蛋白水平高于单纯加入姜油树脂组和照射组。

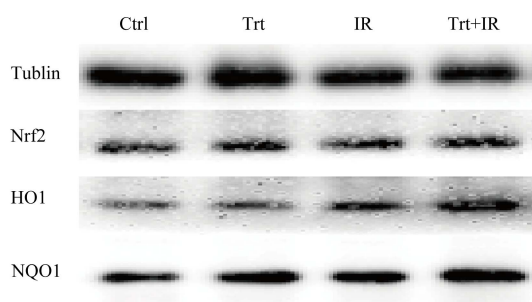


图 4 不同处理后细胞中蛋白水平的变化
Fig.4 The level of protein in different groups

3 讨论

电离辐射会导致细胞氧化应激、DNA 单双链断裂, 以及影响多种细胞内信号转导通路, 那么抗氧化则是对抗电离辐射损伤的一种重要手段^[9-10]。本研究发现, 10^{-4} g/mL 姜油树脂预处理可显著降低电离辐射后细胞内的 ROS 水平, 减少辐射造成的细胞 DNA 损伤。表明抑制 ROS 产生、降低 DNA 损伤可能是姜油树脂发挥辐射防护作用的重要机制^[11]。

如今 Nrf2 信号通路已被广泛认可为自由基清除的主要转录调控通路^[12]。细胞在正常状态下, Nrf2 与位于胞质内的抑制蛋白 Keap1 相互结合, 从而被锚定在胞质内, 并通过泛素-蛋白酶体途径被降解。Keap1 是富含巯基基团的蛋白质, 是可感受细胞内氧化还原状态的传感器。当细胞在电离辐射或其他有害条件刺激下, Keap1 上巯基的修饰使其构象发生改变, 引起 Keap1/Nrf2 复合物游离, 释放出 Nrf2, 转运到细胞核内与另一转录因子肌腱纤维瘤蛋白结合, 以二聚体的形式特异性结合到 ARE 上, 促使包括 II 相解毒酶基因和抗氧化蛋白基因的转录^[13-14]。本研究发现, 不管是单独姜油树脂预处理和照射还是两者的联合作用均不能使 Nrf2 转录、翻译水平升高。而在姜油树脂联合照射组中, 由 Nrf2 调控的典型抗氧化酶(HO1)及 II 相解毒酶(NQO1)的 mRNA、蛋白水平均比照射组高。提示姜油树脂发挥辐射防

护作用的可能机制是 Nrf2 本身的转录、翻译水平并没有发生太大变化, 只是发生了一个由胞内转移到核内的移位过程, 进而上调具有抗氧化和解毒作用的 II 相酶表达, 降低细胞内氧化水平, 此机制有待进一步验证。

综上所述, 姜油树脂可以通过激活 Nrf2 信号通路达到辐射防护作用, 具有开发为一种有效的辐射防护天然药物的价值。

参考文献

- 1 Riley P A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation [J]. International Journal of Radiation Biology, 1994, **65**(1): 27-33.
- 2 Que L, Wang H, Cao B, *et al.* The regulation and functions of transcription factor Nrf2 in cancer chemoprevention and chemoresistance [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences (in china), 2011, **20**(1): 5-19.
- 3 Hirota A, Kawachi Y, Yamamoto M, *et al.* Acceleration of UVB-induced photoageing in Nrf2 gene-deficient mice [J]. Experimental Dermatology, 2011, **10**(8): 664-668.
- 4 Kannan S, Jaisual A K. Low and high UVB regulation of transcription factor NF-E2-related factor 2 [J]. Cancer Research, 2006, **66**(17): 8421-8429.
- 5 Huang H C, Nguyen T, Pickett C B. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by Protein Kinase C Regulates Antioxidant Response Element-mediated Transcription [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, **277**(45): 42769-42774.
- 6 Natarajan V T, Singh A, Kumar A A, *et al.* Transcriptional upregulation of Nrf2-dependent phase II detoxification genes in the involved epidermis of vitiligo vulgaris [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2010, **130**(12): 2781-2789.
- 7 Phillips J, Moore-Medlin T, Sonavane K, *et al.* Curcumin inhibits UV radiation-induced skin cancer in SKH-1 mice [J]. Otolaryngology Head and Neck Surgery, 2013, **148**(5): 797-803.
- 8 Shishodia S, Singh T, Chaturvedi M M. Modulation of transcription factors by Curcumin [J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2007, **595**: 127-148.
- 9 Wu J L, Wu C, Lei C, *et al.* Chemical- and irradiation-induced mutants of indica rice IR64 for forward and reverse genetics [J]. Plant Molecular Biology, 2005, **59**(1): 85-97.
- 10 Kawachi Y, Xu X, Taguchi S, *et al.* Attenuation of

- UVB-induced sunburn reaction and oxidative DNA damage with no alterations in UVB-induced skin carcinogenesis in Nrf2 gene-deficient mice [J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2008, **128**(7): 1773-1779.
- 11 Fan Z L, Wang Z Y, Zuo L L, *et al.* Protective effect of anthocyanins from lingonberry on radiation-induced damages [J]. *International Journal of Environmental Research & Public Health*, 2012, **9**(12): 4732-4743.
- 12 Yu X, Kensler T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention [J]. *Mutation Research/fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2005, **591**(591): 93-102.
- 13 Itoh K. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1997, **236**(2): 313-322.
- 14 Shibata T, Kokubu A, Gotoh M, *et al.* Genetic alteration of Keap1 confers constitutive Nrf2 activation and resistance to chemotherapy in gallbladder cancer [J]. *Gastroenterology*, 2008, **135**(4): 1358-1368.

Radioprotective effects of ginger oleoresin through Nrf2 pathway

LI Qing XU Chang WANG Yan DU Liqing WANG Qin WANG Lu LIU Qiang

(Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China)

ABSTRACT The cell toxicity of different concentration of ginger oleoresin on mesenchymal stem cells (MSCs) was judged by MTT(Methyl thiazolyl tetrazolium). Flowing cytometry experiment was taken to observe the change of reactive oxygen species (ROS). Comet assay was used to detect the DNA damage. RT-PCR and Western Blot were used to detect the expression level of nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2) protein and two typically recognized Nrf2 downstream genes, heme oxygenase-1 (HO-1) and NAD (P) H quinine oxidoreductase 1 (NQO1). The results showed that ginger oleoresin can reduce the level of ROS and the DNA damage of MSCs, induced by irradiation, and increase the expression of HO1 and NQO1 in mRNA and protein levels, which suggests that ginger oleoresin can reduce the oxidative damage of radiation, performing the role of radioprotective. Its mechanism may be related to Nrf2.

KEYWORDS Ginger oleoresin, Mesenchymal stem cells (MSCs), Nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2), Radioprotective

CLC TL71