

基于Keap1/Nrf2/HO-1通路汉黄芩素7-O- β -D-乙基葡萄糖醛酸苷体外抗氧化应激作用研究

黎浩¹, 胡蕴然², 杨慧^{3, 4*}, 柳航^{3, 4}, 葛卫红^{1, 3, 4*}

1. 南京中医药大学 鼓楼临床医学院, 江苏 南京 210029

2. 中国药科大学南京鼓楼医院, 江苏 南京 210009

3. 南京大学医学院附属鼓楼医院 药学部, 江苏 南京 210008

4. 南京大学医学院附属鼓楼医院 南京临床药学中心, 江苏 南京 210008

摘要: 目的 探讨汉黄芩素7-O- β -D-乙基葡萄糖醛酸苷(WODE)对脂多糖(LPS)诱导的小鼠巨噬细胞(RAW264.7)的抗氧化应激作用及机制。方法 MTS法检测WODE(2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0、160.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对RAW264.7细胞活力的影响; 体外培养RAW264.7细胞, WODE(10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)或地塞米松(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 阳性药)预处理1 h, 再给予LPS刺激24 h(造模过程不再加药), 对照组不加LPS和受试物, 模型组只给予LPS刺激; 荧光探针检测胞内活性氧(ROS)水平; Griess反应测定细胞上清液中NO生成量; ELISA检测细胞上清液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)的分泌; 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测细胞内诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)、环氧化酶-2(COX-2)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、醌氧化还原酶1(NQO-1)、超氧化物歧化酶-1(SOD-1)的mRNA表达水平; Western blotting法检测细胞核因子E2相关因子2(Nrf2)和血红素加氧酶-1(HO-1)蛋白表达水平; 免疫荧光染色法检测细胞内Kelch ECH相关蛋白1(Keap1)表达水平。结果 与对照组比较, WODE浓度小于40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率没有明显变化; 浓度大于80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率下降, 但未见统计学差异。与模型组比较, WODE 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组ROS水平显著降低($P<0.01$); 20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组NO释放显著降低($P<0.05$ 、 0.01); 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组iNOS mRNA表达水平显著降低($P<0.01$); 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组COX-2和20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组IL-1 β mRNA表达水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01); 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组TNF- α 和IL-6的释放受到显著抑制($P<0.01$); 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组NQO-1 mRNA表达水平显著升高($P<0.01$), 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组SOD-1 mRNA表达水平显著升高($P<0.01$); 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组Keap1蛋白表达水平显著降低($P<0.01$); 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组HO-1蛋白和mRNA表达水平显著提高($P<0.05$ 、 0.01); 20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组Nrf2蛋白和40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组Nrf2 mRNA表达水平显著增加($P<0.01$)。结论 WODE对LPS诱导的RAW264.7细胞的氧化应激具有抑制作用, 其作用机制可能与调控Keap1/Nrf2/HO-1信号通路相关。

关键词: 汉黄芩素7-O- β -D-乙基葡萄糖醛酸苷; 抗氧化应激; RAW264.7细胞; Keap1/Nrf2/HO-1信号通路; 活性氧

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2023)04-0772-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.04.010

Anti-oxidative stress effect of wogonin 7-O- β -D-ethylglucuronide *in vitro* by Keap1/Nrf2/HO-1 pathway

LI Hao¹, HU Yunran², YANG Hui^{3, 4}, LIU Hang^{3, 4}, GE Weihong^{1, 3, 4}

1. Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

2. China Pharmaceutical University Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing 210029, China

3. Department of Pharmacy, Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China

4. Nanjing Medical Center of Clinical Pharmacy, Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China

Abstract: **Objective** To investigate the anti-oxidative stress effect and mechanism of WODE on lipopolysaccharide (LPS) -induced mouse macrophages (RAW264.7 cells). **Methods** The effects of different concentrations of WODE (2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0,

收稿日期: 2022-12-14

基金项目: “十三五”南京市卫生青年人才培养第三层次项目(QRX17132); 2022年度“南京市中医药科技专项”(ZYYB202203)

第一作者: 黎浩(1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为药理学。E-mail: 849836789@qq.com

*共同通信作者: 葛卫红, 主任药师, 博士生导师, 主要研究方向为临床药理学、药事管理。E-mail: glg6221230@163.com

杨慧, 药师, 主要研究方向为抗炎免疫药理学。E-mail: yanghui@njglyy.com

and $160.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the viability of RAW264.7 cells were detected by MTS assay. RAW264.7 cells were cultured *in vitro*, wogonin 7-*O*- β -*D*-ethyl glucuronide ($10, 20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) or dexamethasone ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, positive drug) was pretreated for one hour, and then LPS was administered for 24 hours (no drug was added during the modeling process). The control group was not given LPS and the test substance, while the model group was only given LPS stimulation. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were detected by fluorescent probe. The production of NO was determined by Griess reaction. The secretion of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in the cell supernatant was detected by ELISA. The mRNA expression levels of inducible nitric oxide synthase (*iNOS*), cyclooxygenase-2 (*COX-2*), *IL-1 β* , quinone oxidoreductase 1 (*NQO-1*), superoxide dismutase 1 (*SOD-1*) were detected by qRT-PCR. The protein expression levels of nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) were detected by Western blotting. The expression of Kelch ECH-related protein 1 (Keap1) protein was detected by immunofluorescence staining. **Results** Compared with control group, there was no significant change in cell survival rate when wogonin 7-*O*- β -*D*-ethyl glucuronide concentration was less than $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the cell survival rate decreased when the concentration greater than $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, but there was no statistical difference. Compared with the model group, the ROS level in wogonin 7-*O*- β -*D*-ethyl glucuronide $10, 20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group was significantly lower ($P < 0.01$), the NO release was significantly decreased in $20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group ($P < 0.05, 0.01$), the expression level of *iNOS* mRNA in $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group significantly decreased ($P < 0.01$), *COX-2* in $10, 20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group and *IL-1 β* mRNA expression level in $20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), TNF- α and IL-6 release in $10, 20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group were significantly inhibited ($P < 0.01$), the expression level of *NQO-1* mRNA in $10, 20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group was significantly increased ($P < 0.01$), the expression level of *SOD-1* mRNA in $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group significantly increased ($P < 0.01$), the expression level of Keap1 protein in $10, 20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group significantly decreased ($P < 0.01$), the protein and mRNA expression levels of HO-1 protein in $10, 20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), Nrf2 protein expression in $10, 20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group and *Nrf2* mRNA expression in $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group was significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion** Wogonin 7-*O*- β -*D*-ethyl glucuronide inhibited LPS-induced oxidative stress in RAW264.7 cells, which might be related to the regulation of Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway.

Key words: wogonin 7-*O*- β -*D*-ethylglucuronide; anti-oxidative stress; RAW264.7 cells; Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway; reactive oxygen species

正常细胞的氧化还原反应维持在动态平衡状态。活性氧(ROS)和亲电试剂的过量产生打破了细胞氧化还原平衡,导致氧化应激。ROS是一类高活性分子,包括 O_2^- 、 H_2O_2 和 $\text{HO}^\cdot$,是有氧氧化过程中必要且不可避免的副产物。ROS在低浓度时参与调节细胞信号传导和免疫反应,但在较高浓度时可激发自由基连锁反应,破坏细胞生物大分子如蛋白质、脂质和DNA,从而扰乱多种信号通路,增加炎症、干扰线粒体功能、触发细胞凋亡、解除自噬,影响多种生物学过程,诱发一系列疾病,如心血管疾病、肾脏病、糖尿病和炎症相关疾病等^[1-8]。

巨噬细胞是动物体内常见的固有免疫细胞,通过吞噬作用直接杀灭病原体,在免疫系统中发挥重要作用^[8]。巨噬细胞产生少量ROS可帮助机体抵御病原体入侵,具体机制可能涉及直接抗菌活性、氧化还原调节免疫信号和诱导炎症小体活化等^[8-10]。同时,巨噬细胞对ROS非常敏感,过量的ROS诱导氧化应激会直接或间接影响巨噬细胞的功能,甚至导致巨噬细胞死亡。巨噬细胞因其在动物免疫系统的重要性及其对ROS水平的敏感性,是筛选天然抗氧化应激药物的理想细胞模型。而细菌分泌的脂多糖(LPS)可激活巨噬细胞,释放

ROS和多种促氧化介质,使巨噬细胞处于氧化应激状态,故LPS激活的巨噬细胞常用来筛选天然抗氧化应激药物。

汉黄芩素 7-*O*- β -*D*-乙基葡萄糖醛酸苷(wogonin 7-*O*- β -*D*-ethylglucuronide, WODE)是天然黄酮类化合物,广泛存在于多种植物的花、叶和根皮中。WODE首次于2015年由Wang等^[11]从黄芩中分离得到。先前研究表明,黄酮类化合物具有多种药理作用,如抗氧化应激、抗炎、抗肿瘤、抗心血管疾病等^[12-13]。黄酮类化合物主要在肠道中消化吸收,肠道菌群在黄酮类化合物代谢中发挥重要作用。含糖苷的黄酮类化合物可以通过肠道微生物转化产生一些特定的产物,如环分裂和还原代谢产物,这些产物往往表现出更强的抗氧化能力^[12]。WODE是由汉黄芩素的苯环A的6位被葡萄糖醛酸乙酯取代而得,为含糖苷的黄酮类化合物(图1),故其经肠道菌群代谢后可能会产生抗氧化活性更强的特定产物,具有更高的开发利用价值。先前的研究表明WODE具有抗氧化应激的生物活性^[11],但缺乏具体机制的研究。前期研究表明汉黄芩素在LPS刺激的巨噬细胞中的抗氧化应激活性与Kelch ECH相关蛋白1(Keap1)/核因子E2相关因子2(Nrf2)/血

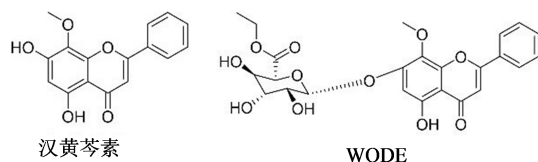


图1 WODE与汉黄芩素结构

Fig. 1 Structures of WODE and wogonin

红素加氧酶-1(HO-1)通路有关^[14],该通路是细胞对抗氧化应激的内在防御机制。因此,本研究借鉴上述研究思路,探讨WODE是否通过Keap1/Nrf2/HO-1通路抑制LPS激活的巨噬细胞的氧化应激,为WODE的进一步开发应用提供参考。

1 材料

1.1 细胞

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞(RAW264.7),购于中国医学科学院细胞库。

1.2 药物及主要试剂

WODE由本课题组自制,质量分数>98%;地塞米松(Dex),购于上海全宇生物科技动物药业有限公司,批号为220420;DMEM培养基、胎牛血清(FBS)和磷酸盐缓冲溶液(PBS),购于Gibco公司,货号分别为8118251、16000-044、8117302;LPS试剂,购于SIGMALDRICH公司,货号为L2630-10MG;MTS试剂盒,购于上海泽叶生物科技有限公司,货号为ZY140634;一氧化氮(NO)检测试剂盒,购于中国索莱宝公司,货号为BC1475;白细胞介素(IL)-6和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA试剂盒,购于美国Biolegend公司,货号分别为430904、432604;Keap-1、HO-1和Nrf2抗体,购于美国CST公司,货号分别为#8047、#42966、#12721;磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体购于中国国瑞泰科技有限公司,货号为Ab1019t-hrp;二抗[生物素化抗兔IgG(H+L)抗体]和三抗(KPL过氧化物酶标记链霉亲和素),购于美国Serecare公司,货号分别为5260-0038、5270-0029;二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH₂-DA)探针、4%多聚甲醛固定剂、山羊血清、Triton-X 穿透剂和FITC标记的二抗,购于中国索莱宝公司,货号分别为4091-99-0、P1110、SL038、P1080、SF131;DAPI,购于生物工程上海有限公司,货号为E607303。

1.3 主要仪器

Evous M7000 激光共聚焦荧光显微镜、Varioskan Luk酶标仪(美国赛默飞公司);SW-CJ-2D超净工作台(苏州净化设备有限公司);3503-2 CO₂培养箱(美国希尔顿制造股份有限公司);5200凝胶

显微成像系统(上海天能生命科学有限公司);LightCycler 480II实时荧光定量PCR仪(德国罗氏公司);Centrifuge 5424R低温高速离心机(德国艾本德公司);XD-202倒置荧光显微镜(江南永新生物公司);蛋白电泳仪和转膜仪(北京百晶生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

RAW264.7细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,置于37℃、5%CO₂的饱和湿度培养箱中培养,取对数生长期的细胞用于实验。

2.2 MTS法检测RAW264.7细胞存活率

RAW264.7细胞以 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度接种于96孔板贴壁培养1h后,用WODE(0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0、160.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)孵育24h。随后加入MTS溶液(10%),避光培养2~4h后用酶标仪检测490nm处的吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{WODE}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 Griess法或ELISA法检测RAW264.7细胞NO、IL-6和TNF- α 分泌

将细胞以每孔 1×10^5 的密度接种于96孔板中,贴壁培养1h后,用WODE(10、20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)或Dex(1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,阳性药)预处理1h,再给予LPS(1 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)刺激24h(造模过程不再加药),对照组不加LPS和受试物,模型组只给予LPS刺激。收集培养上清液进行分析,Griess法检测上清液中NO水平,ELISA法检测上清液中TNF- α 和IL-6浓度。

2.4 荧光探针检测RAW264.7细胞内ROS生成

将细胞以每孔 4×10^5 的密度接种于24孔板中,贴壁1h后,药物预处理方式同“2.3”项,然后用LPS(500 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,因为不同指标对LPS的敏感性不同,根据预试验结果,本研究不同实验选择了不同的LPS浓度)刺激24h,对照组不加LPS和受试物,模型组只给予LPS刺激。使用3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DCFH₂-DA在37℃避光染色30min。设置空白组,在对照组的基础上不加入DCFH₂-DA。使用倒置荧光显微镜检测并采集图像,随后用Image J软件分析图像的平均荧光强度。

2.5 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测RAW264.7细胞中氧化应激相关基因mRNA表达

将RAW264.7细胞以每孔 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ 的密度接种于6孔板中,药物预处理方式同“2.3”项,加入LPS(10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)处理24h,对照组不加LPS和受试物,模型组只给予LPS刺激。然后使用Trizol试

剂提取细胞总 RNA, 微量紫外分光光度计检测 RNA 浓度。使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。随后使用实时荧光定量 PCR 仪并按照 Top Green qPCR Super Mix 说明书进行 qRT-PCR 分析。qRT-PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 30 s; 94 °C 变性 5 s,

60 °C 变性 30 s, 45 个循环; 95 °C 融化 5 s, 60 °C 融化 1 min, 1 个循环; 50 °C 冷却 30 s, 1 个循环。扩增完毕后采用差异倍数 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 mRNA 的相对表达水平, 至少进行 3 次平行实验。引物序列见表 1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因	上游基因(5'→3')	下游基因(3'→5')
<i>GAPDH</i>	GTGGGAATGGGTCAGAAGGA	CTTCTCCATGTCGTCCCAGT
<i>IL-1β</i>	TCGCAGCAGCACATCAACAAGAG	AGGTCCACGGGAAAAGACACAGG
<i>iNOS</i>	ACTACTGCTGGTGGTGACAA	CCTGAAGGTGTGGTTGAGTTC
<i>Keap1</i>	CCGCAGAATGTACTATCCAGAG	CGCTCCACACTGTTCAACTG
<i>HO-1</i>	ACAGGTTGACAAGAAGAGGCTAA	CCTGAAGGTGTGGTTGAGTTC
醌氧化还原酶1(<i>NQO-1</i>)	GCCGAACACAAGAAGCTGGAAG	GGCAAATCCTGCTACGAGCACT
<i>Nrf2</i>	CAGCATAGAGCAGGACATGGAG	GAACAGCGGTAGTATCAGCCAG
环氧化酶(<i>COX</i>)-2	CATCCCCTTCCTGCGAAGTT	CATGGGAGTTGGGCAGTCAT
超氧化物歧化酶(<i>SOD</i>)-1	GGTGAACCAGTTGTGTTGTCAGG	ATGAGGTCCTGCACTGGTACAG

2.6 免疫荧光法检测 RAW264.7 细胞中 Keap1 蛋白表达

将细胞以每孔 4×10^5 的密度接种于 24 孔板中, 贴壁 1 h 后, 药物预处理方式同“2.3”项, 然后用 LPS ($500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 刺激 24 h, 对照组不加 LPS 和受试物, 模型组只给予 LPS 刺激。预冷的 PBS 洗涤 3 次后, 4% 多聚甲醛固定 15 min, Triton-X 室温处理 20 min, 10% 山羊血清室温封闭 30 min。一抗 (1:40) 4 °C 孵育过夜后, FITC 标记的二抗 (1:50) 室温下孵育 3 h, DAPI 室温染色 5 min。最后使用激光共聚焦荧光显微镜检测并采集图像, 随后用 Image J 软件分析图像的平均荧光强度。

2.7 Western blotting 法检测 RAW264.7 细胞中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达

将 RAW264.7 细胞以每皿 2×10^7 的密度接种于 6 个 10 cm 培养皿中, 药物预处理方式同“2.3”项, 用 LPS ($10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 处理 24 h, 对照组不加 LPS 和受试物, 模型组只给予 LPS 刺激。随后使用磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂和非变性蛋白裂解液提取细胞总蛋白。配制 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 进行电泳, 并转移至聚偏氟乙烯膜 (PVDF)。5% 脱脂奶粉室温封闭 30 min 后, 分别使用 Nrf2、HO-1 和 GAPDH 的抗体 (1:1 000 稀释) 4 °C 孵育过夜, 二抗室温下孵育 2 h, 三抗室温下孵育 1 h。然后使用 Super ECL Detection Regent 显影, 将条带曝光于凝胶成像仪。用 Image J 软件分析条

带的灰度强度。

2.8 统计分析

数据均采用 GraphPad Prim 8.0 统计软件进行分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用多组间的单因素方差 (ANOVA) 分析进行统计学分析。

3 结果

3.1 WODE 对 RAW264.7 细胞存活率的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, WODE 浓度小于 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率没有明显变化; 浓度大于 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率下降, 但未见统计学差异。选择 10、20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行后续实验。

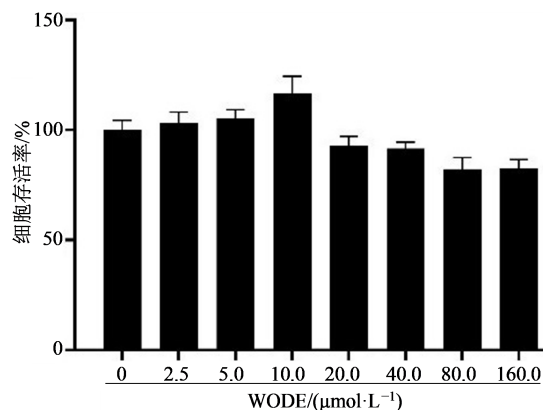


图2 WODE 对 RAW264.7 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 2 Effect of WODE on RAW264.7 cell survival rate ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2 WODE对LPS诱导的RAW264.7细胞ROS过度产生的抑制作用

如图3所示,与对照组比较,模型组细胞内ROS水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,WODE组ROS水平显著降低($P<0.01$),且作用呈浓度相关性。结果表明,WODE对ROS的过量产生具有显著的抑制作用。

3.3 WODE对LPS诱导的RAW264.7细胞中促氧化介质及细胞因子的过量表达的抑制作用

如图4所示,与对照组比较,LPS显著诱导巨噬细胞NO的产生($P<0.01$),显著促进*iNOS* mRNA表达($P<0.01$)。与模型组比较,WODE在10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时分别降低2.58%、13.54%、26.52%的NO产生,20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组差异显著($P<0.05$ 、0.01),

DEX降低41.28% NO产生($P<0.01$);且WODE给药组在40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时显著降低*iNOS* mRNA表达水平($P<0.01$)。

与对照组比较,LPS显著促进*COX-2*和*IL-1 β* mRNA表达($P<0.01$);与模型组比较,WODE 10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组*COX-2*和20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组*IL-1 β* mRNA表达水平显著降低($P<0.05$ 、0.01),且呈浓度相关性。

ELISA实验结果显示,与对照组比较,模型组TNF- α 和IL-6释放量显著增加($P<0.01$);与模型组比较,WODE组TNF- α 和IL-6的释放受到显著抑制($P<0.01$),且呈浓度相关性。结果表明WODE抑制LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞中促氧化剂及相关介质的过度表达,发挥抗氧化应激作用。

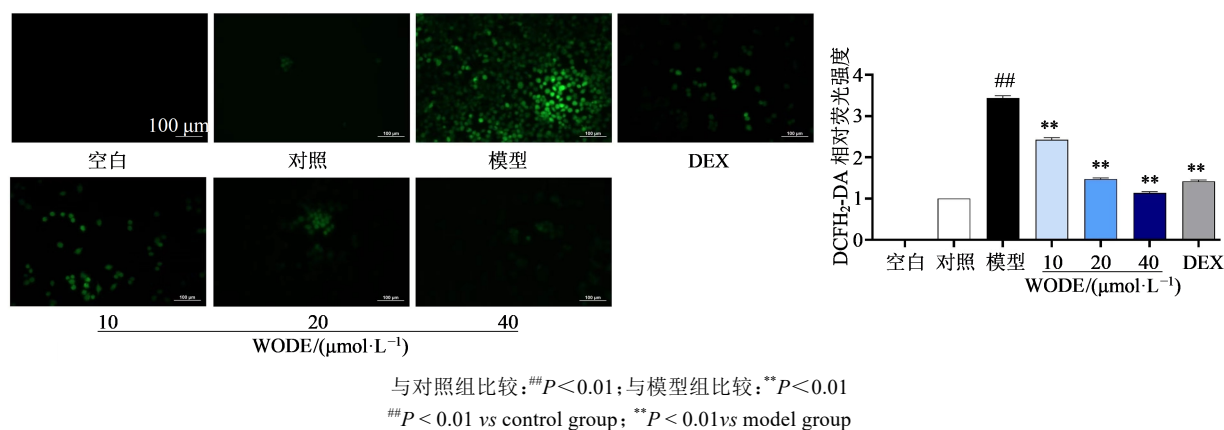


图3 WODE对RAW264.7细胞内ROS表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 3 Effect of WODE on expression levels of intracellular ROS level in RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

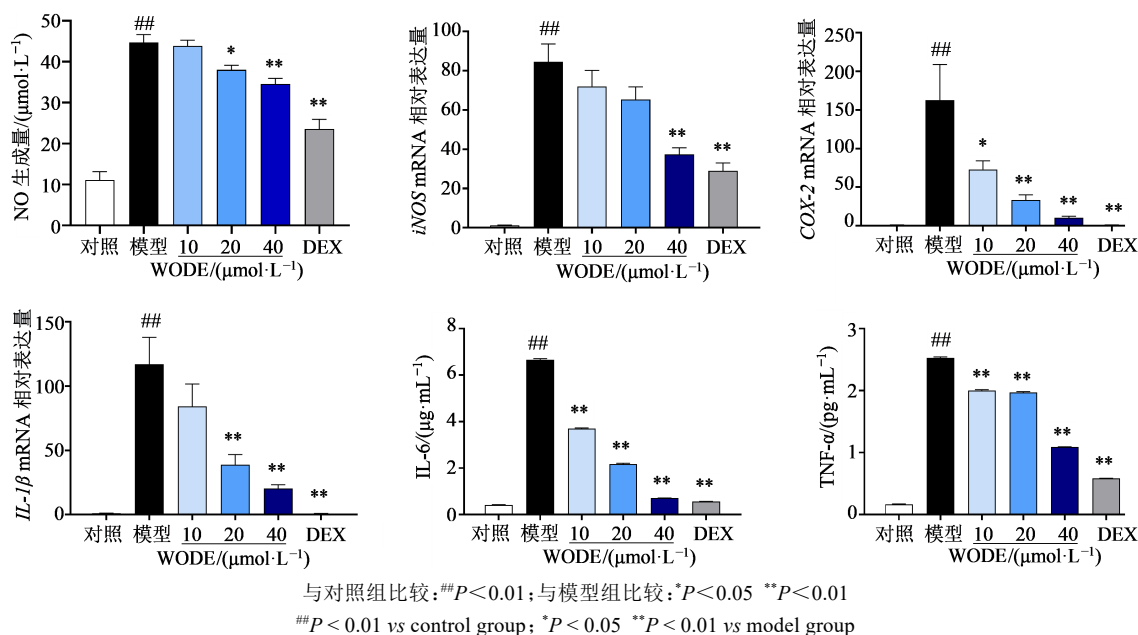


图4 WODE对LPS诱导的RAW264.7细胞促氧化介质及细胞因子释放的抑制作用($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 4 Inhibition of WODE on release of LPS-induced pro-oxidative mediator and cell cytokines in RAW264.7 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

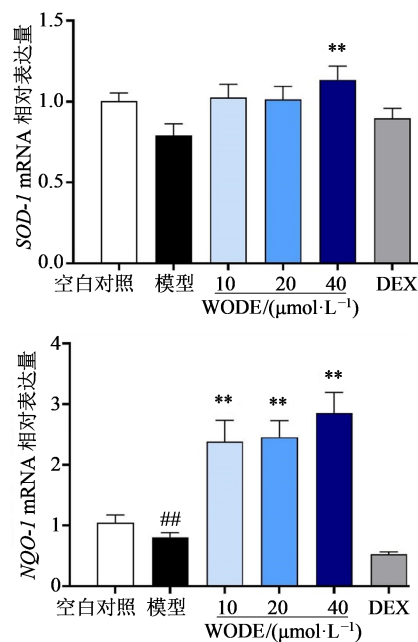
3.4 WODE对LPS诱导的RAW264.7巨噬细胞抗氧化介质的影响

如图5所示,与对照组比较,LPS显著降低RAW264.7细胞中*NQO-1*的mRNA表达水平($P < 0.01$)并使*SOD-1*的mRNA表达水平呈降低趋势;与模型组比较,WODE各给药组以浓度相关的方式显著提高了*NQO-1* mRNA表达水平($P < 0.01$),并且以浓度相关的方式提高了*SOD-1* mRNA表达水平且浓度为 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时具有显著性差异($P < 0.01$);DEX组也提高了*NQO-1*、*SOD-1* mRNA水平,但没有显著性差异。结果表明WODE增加LPS诱导的RAW264.7细胞中抗氧化介质的表达,且呈浓度相关性。

3.5 WODE对Keap1/Nrf2/HO-1信号通路的影响

如图6所示,与对照组比较,模型组胞内Keap1蛋白表达水平显著提高($P < 0.01$);与模型组比较,WODE给药组Keap1蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$),且呈浓度相关性。

如图7所示,与对照组比较,模型组HO-1蛋白水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,WODE给药组HO-1蛋白和mRNA表达水平显著提高($P < 0.05, 0.01$);DEX组也提高了HO-1总蛋白和mRNA水平,但是没有显著性差异。与对照组比较,模型组RAW264.7细胞中Nrf2的蛋白和mRNA表达水平显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,WODE

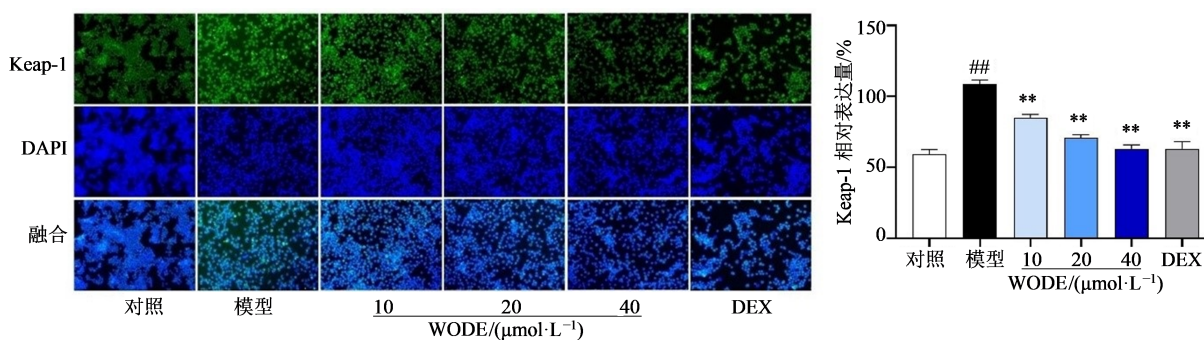


与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{**}P < 0.01$
 $^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{**}P < 0.01$ vs model group

图5 WODE对RAW264.7细胞*SOD-1*和*NQO-1* mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 WODE influenced mRNA expression of *SOD-1* and *NQO-1* in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

20、 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 Nrf2 蛋白和 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 Nrf2 mRNA 表达水平显著增加($P < 0.01$)。结果表明WODE抗氧化应激的机制与其调控Keap1/Nrf2/HO-1信号通路有关。



与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{**}P < 0.01$
 $^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{**}P < 0.01$ vs model group

图6 WODE对RAW264.7细胞Keap1表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of WODE on expression of Keap1 level in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

WODE是含糖苷的黄酮类单体,最初于2015年由Wang等^[11]从黄芩中分离得到。WODE在肠道内由肠道菌群代谢,其代谢产物可能具有更强抗氧化活性,因此具有进一步开发利用的价值。前期研究已证实WODE具有抗氧化应激的能力,因此本研究

旨在阐述WODE抗氧化应激的具体分子机制,为进一步开发利用奠定基础。

基于LPS诱导的RAW264.7细胞作为氧化应激模型,本研究探讨了WODE对ROS的分泌、抗氧化应激介质(*NQO-1*和*SOD-1*)的mRNA表达,促氧化介质(NO、iNOS和COX-2)和细胞因子(TNF- α 、IL-6

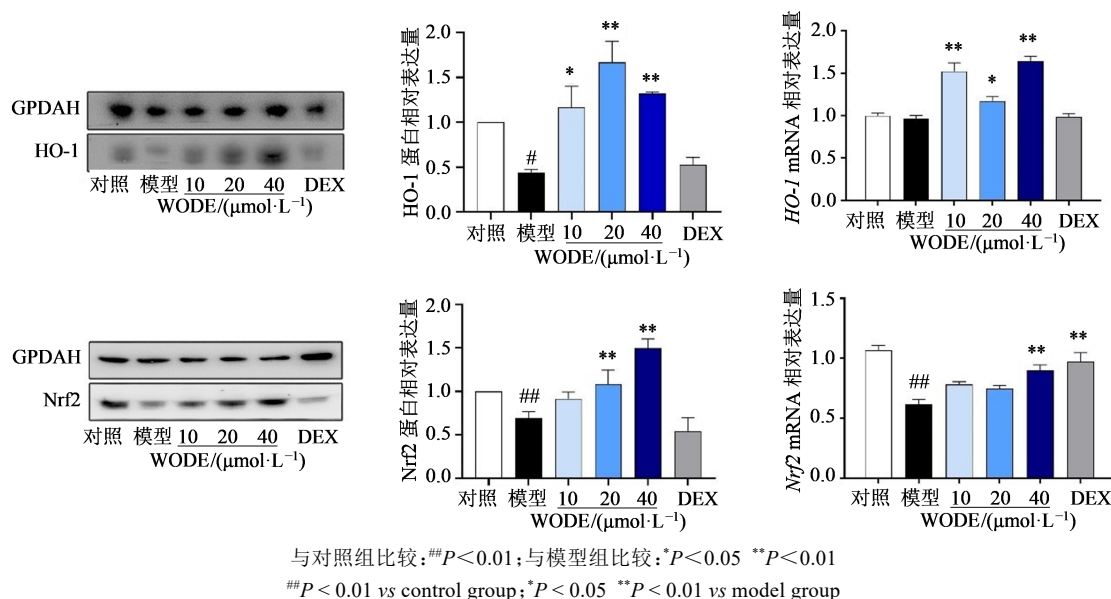


图7 WODE对RAW264.7细胞Keap1/Nrf2/HO-1信号通路的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 7 Effect of WODE on pathway of Keap1/Nrf2/HO-1 in RAW264.7 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

和 IL-1 β) 的表达, 以及 Keap1、Nrf2 和 HO-1 的 mRNA 和蛋白表达水平的影响。

正常水平的 ROS 在免疫系统中发挥重要作用^[15], 但过量的 ROS 破坏细胞蛋白质、脂质和 DNA 等生物大分子, 引起氧化应激, 诱发一系列疾病^[1-8]。Lin 等^[16]的研究结果表明, 姜黄素可以通过抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 ROS 过量表达来减轻氧化应激。因此, 缓解 ROS 的过量表达是研究药物抗氧化应激作用的一种策略。本研究结果表明, WODE 显著降低了细胞内过量的 ROS 水平, 这表明 WODE 可能通过下调 ROS 的水平来缓解氧化应激。

NO 是一种自由基和弱氧化剂, 参与血压调节、血管舒张、调节免疫系统等多种基本生理功能。NO 的合成依赖于 NO 合酶(NOS)的 3 种异构体——内皮型 NOS(eNOS)、诱导型 NOS(iNOS)和神经元型 NOS(nNOS), 其中 iNOS 诱导产生的 NO 最多。由 iNOS 表达增强引起的 NO 过量产生会促进氧化应激, 造成组织损伤, 因此降低 NO 和 iNOS 的表达可以抑制氧化应激^[17-19]。Kim 等^[20-22]研究结果表明, 短毛独活根提取物可以通过抑制 NO 和 iNOS 的过量产生来缓解氧化应激。因此, 药物降低 NO 和 iNOS 的过量表达可以表明该药物具有抗氧化应激能力。本研究结果表明, WODE 能降低 LPS 刺激的 RAW264.7 细胞中 iNOS 的 mRNA 过量表达, 并且以剂量相关的方式抑制 NO 的过量产生, 可能通过降低 NO 和 iNOS 的过量表达来发挥抗氧化应激作用。

巨噬细胞可分泌多种促氧化细胞因子(TNF- α 、

IL-6、IL-1)和相关介质(COX-2), 增强宿主对细菌、寄生虫和病毒的防御。IL-1 β 和 IL-6 具有很强的促氧化活性, 可诱导产生多种促氧化介质。TNF- α 是一种促炎细胞因子, 主要由巨噬细胞和单核细胞产生, 参与正常的免疫反应, 促进氧化应激。此外, COX-2 作为一种强效酶, 可诱导氧化应激和炎症, 促进前列腺素的合成^[21-22]。已有研究表明金色草素、姜黄素、汉黄芩素可以通过抑制上述促氧化剂的分泌来缓解 LPS 刺激 RAW264.7 细胞产生的氧化应激^[16, 23-24]。因此, 上述促氧化剂水平的下调可作为研究药物抗氧化应激活性的策略。而本研究也发现, WODE 可下调 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 TNF- α 、IL-6 的产生及 IL-1 β 、COX-2 的 mRNA 表达, 表明 WODE 可能通过降低 TNF- α 、IL-6、IL-1、COX-2 的分泌发挥抗氧化应激作用。

HO-1 是 II 相代谢的限速酶和解毒酶之一, 其诱导的下游信号因子可缓解多种器官的氧化应激。同时其催化血红素分解产生的胆绿素可清除 ROS^[25-28]。SOD-1 是金属蛋白, 通过其歧化催化作用控制超氧化物的浓度来保护细胞免受氧化应激, 而 NQO-1 是细胞内保护性还原酶, 保护细胞免受外界醌类物质和氧化损伤^[29-30]。Nrf2 是维持细胞内稳态的关键转录因子, 在正常情况下被 Keap1 锚定在细胞质中, 是 SOD-1、NQO-1、HO-1 上游调节蛋白。而在氧化应激状态下, Keap1 失活, Nrf2 表达增多并迁移入细胞核, 进而诱导 SOD-1、NQO-1、HO-1 表达, 最终导致防御系统的激活^[30]。上述过程为

Keap1/Nrf2/HO-1 信号通路的激活,可以调节细胞的氧化还原状态,维持细胞氧化还原的动态平衡^[25-26]。Park 等^[31]研究结果表明,马钱苷通过上调 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平抑制 LPS 刺激的 RAW 264.7 细胞氧化应激。因此,增强 Nrf2、HO-1 的表达可作为研究药物抗氧化应激的策略。在本研究中, WODE 提高了 Nrf2、HO-1 的 mRNA 和蛋白表达水平以及 HO-1 调控的其他下游抗氧化酶(SOD-1 和 NQO-1)的 mRNA 水平,同时下调了 Keap1 的蛋白表达水平,表明 WODE 可能通过下调 Keap1 表达并上调 Nrf2 表达,导致 HO-1、SOD-1 和 NQO-1 等抗氧化介质产生增加,从而发挥抗氧化应激作用。

WODE 具有良好的抗氧化应激作用,其作用机制可能与调控 Keap1/Nrf2/HO-1 通路有关。本研究的局限性在于缺乏对 Nrf2 核转位的探讨,需要对机制进行更深入的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Daenen K, Andries A, Mekahli D, et al. Oxidative stress in chronic kidney disease [J]. *Pediatr Nephrol*, 2019, 34(6): 975-991.
- [2] Senoner T, Dichtl W. Oxidative stress in cardiovascular diseases: Still a therapeutic target ? [J]. *Nutrients*, 2019, 11(9): 2090.
- [3] Klaunig J E. Oxidative stress and cancer [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(40): 4771-4778.
- [4] Lambeth J D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(3): 181-189.
- [5] Ighodaro O M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 656-662.
- [6] Grom A A, Mellins E D. Macrophage activation syndrome: Advances towards understanding pathogenesis [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2010, 22(5): 561-566.
- [7] Jaganjac M, Milkovic L, Zarkovic N, et al. Oxidative stress and regeneration [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 181: 154-165.
- [8] Herb M, Schramm M. Functions of ROS in macrophages and antimicrobial immunity [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(2): 313.
- [9] West A P, Brodsky I E, Rahner C, et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS [J]. *Nature*, 2011, 472(7344): 476-480.
- [10] Li Q, Qiu Z Y, Wang Y, et al. Tea polyphenols alleviate hydrogen peroxide-induced oxidative stress damage through the Mst/Nrf2 axis and the Keap1/Nrf2/HO-1 pathway in murine RAW264.7 cells [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(6): 1473.
- [11] Wang M H, Li L Z, Sun J B, et al. A new antioxidant flavone glycoside from *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Nat Prod Res*, 2014, 28(20): 1772-1776.
- [12] Maleki S J, Crespo J F, Cabanillas B. Anti-inflammatory effects of flavonoids [J]. *Food Chem*, 2019, 299: 125124.
- [13] Wen K M, Fang X C, Yang J L, et al. Recent research on flavonoids and their biomedical applications [J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(5): 1042-1066.
- [14] Fang W J, Zhou X P, Wang J K, et al. Wogonin mitigates intervertebral disc degeneration through the Nrf2/ARE and MAPK signaling pathways [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 65: 539-549.
- [15] Yang B W, Chen Y, Shi J L. Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine [J]. *Chem Rev*, 2019, 119(8): 4881-4985.
- [16] Lin X, Bai D, Wei Z, et al. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway [J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0216711.
- [17] Guerby P, Tasta O, Swiader A, et al. Role of oxidative stress in the dysfunction of the placental endothelial nitric oxide synthase in preeclampsia [J]. *Redox Biol*, 2021, 40: 101861.
- [18] Yao C C, Narumiya S. Prostaglandin-cytokine crosstalk in chronic inflammation [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(3): 337-354.
- [19] Saini R, Singh S. Inducible nitric oxide synthase: An asset to neutrophils [J]. *J Leukoc Biol*, 2019, 105(1): 49-61.
- [20] Kim H N, Kim J D, Yeo J H, et al. Heracleum moellendorffii roots inhibit the production of pro-inflammatory mediators through the inhibition of NF-kappaB and MAPK signaling, and activation of ROS/Nrf2/HO-1 signaling in LPS-stimulated RAW264.7 cells [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 310.
- [21] Hu F L, Lou N, Jiao J Y, et al. Macrophages in pancreatitis: Mechanisms and therapeutic potential [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110693.
- [22] Hu Y, Yang X F, Wu S D, et al. COX-2 in liver fibrosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 506: 196-203.
- [23] Khan N M, Haseeb A, Ansari M Y, et al. Wogonin, a plant derived small molecule, exerts potent anti-inflammatory and chondroprotective effects through the activation of ROS/ERK/Nrf2 signaling pathways in human Osteoarthritis chondrocytes [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 106: 288-301.
- [24] Ren J, Su D, Li L, et al. Anti-inflammatory effects of

- Aureusidin in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via suppressing NF-kappaB and activating ROS and MAPKs-dependent Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020, 387: 114846.
- [25] Ahmed S M, Luo L, Namani A, et al. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863 (2): 585-597.
- [26] Zhang X Y, Ding M, Zhu P, et al. New insights into the nrf-2/HO-1 signaling axis and its application in pediatric respiratory diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 3214196.
- [27] Lu M C, Ji J A, Jiang Z Y, et al. The Keap1-Nrf2-ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: An update [J]. *Med Res Rev*, 2016, 36(5): 924-963.
- [28] Liu G, Wu Y X, Jin S H, et al. Itaconate ameliorates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-induced acute lung injury through the Nrf2/ARE pathway [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(8): 712.
- [29] Policar C, Bouvet J, Bertrand H C, et al. SOD mimics: From the tool box of the chemists to cellular studies [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2022, 67: 102109.
- [30] Saha S, Buttari B, Panieri E, et al. An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation [J]. *Molecules*, 2020, 25(22): 5474.
- [31] Park C, Lee H, Kwon C Y, et al. Loganin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative response through the activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway in RAW264.7 macrophages [J]. *Biol Pharm Bull*, 2021, 44(6): 875-883.

[责任编辑 兰新新]