

## 葛根芩连汤抑制 TNF- $\alpha$ 诱导的 Caco-2 细胞氧化损伤配伍规律研究

林 川<sup>1</sup>, 董文敏<sup>2</sup>, 张倩芸<sup>1</sup>, 刘王振祖<sup>1</sup>, 梁 琨<sup>1</sup>, 王新宏<sup>1</sup>, 安 骞<sup>1\*</sup>

1. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203

2. 复旦大学附属浦东医院, 上海 201200

**摘要:** **目的** 探讨葛根芩连汤缓解肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 诱导的人结肠癌 Caco-2 细胞氧化应激损伤作用及其配伍规律。**方法** 将 Caco-2 细胞随机分为对照组、TNF- $\alpha$  (80  $\mu\text{g/L}$ ) 组、小檗碱 (6.73  $\mu\text{g/mL}$ ) 组及葛根芩连汤配伍组 (全方组、去甘草组、去葛根组、葛根甘草组和黄芩黄连组, 18.75  $\mu\text{g/mL}$ )。除对照组外, 其余各组细胞给予 TNF- $\alpha$  预处理 2 h, 再给予相应药物处理 24 h。MTT 检测 Caco-2 细胞活力; 流式细胞术检测细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平; 比色法检测细胞中总超氧化物歧化酶 (total superoxide dismutase, T-SOD) 活性和丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平; qRT-PCR 和 Western blotting 分别检测核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、还原型辅酶 I/II 醌氧化还原酶 1 [NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, NQO1] 和血红素氧合酶-1 (heme oxygenase 1, HO-1) mRNA 和蛋白表达; 荧光显微镜观察 Nrf2 蛋白入核情况。**结果** 5.0~25.0  $\mu\text{g/mL}$  的含药培养基和 10~80  $\mu\text{g/L}$  的 TNF- $\alpha$  对 Caco-2 细胞活性无明显影响。与 TNF- $\alpha$  组比较, 各给药组 Caco-2 细胞 ROS 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 除去葛根组和黄芩黄连组外, 其余各组 MDA 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), GSH 水平明显升高 ( $P < 0.01$ ); 除去葛根组外, 其余各给药组 Nrf2 基因表达明显升高 ( $P < 0.01$ ), 全方组和去甘草组 NQO1 基因表达明显升高 ( $P < 0.05$ 、0.01), 全方组和葛根甘草组 HO-1 基因表达明显升高 ( $P < 0.05$ 、0.01); 除黄芩黄连组外, 其余各组 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达显著升高 ( $P < 0.01$ ); 除去葛根组和黄芩黄连组外, 其余各组 NQO1 蛋白水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01), Nrf2 蛋白入核明显增加 ( $P < 0.05$ 、0.01)。**结论** 缺少葛根对葛根芩连汤抑制 Caco-2 细胞氧化应激损伤有较大影响。

**关键词:** 葛根芩连汤; 葛根; 配伍规律; 氧化应激; 结肠癌细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)20-6492-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.20.021

## Combination rule of Gegen Qinlian Decoction on inhibiting oxidative damage stimulated by TNF- $\alpha$ in Caco-2 cells

LIN Chuan<sup>1</sup>, DONG Wen-min<sup>2</sup>, ZHANG Qian-yun<sup>1</sup>, LIU Wang-zhenzu<sup>1</sup>, LIANG Kun<sup>1</sup>, WANG Xin-hong<sup>1</sup>, AN Rui<sup>1</sup>

1. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

2. Pudong Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201200, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of Gegen Qinlian Decoction (葛根芩连汤) on relieving tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )-induced oxidative stress injury in human colon cancer Caco-2 cells and its compatibility. **Methods** Caco-2 cells were randomly divided into control group, TNF- $\alpha$  (80  $\mu\text{g/L}$ ) group, berberine (6.73  $\mu\text{g/mL}$ ) group and Gegen Qinlian Decoction compatibility group [Gegen Qinlian group (GD), Gancao (*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*) absent group (WGC), Gegen (*Puerariae Lobatae Radix*) absent group (WG), *Puerariae Lobatae Radix-Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* group (GG), Huangqin (*Scutellariae Radix*)-Huanglian (*Coptidis Rhizoma*) group (QL), 18.75  $\mu\text{g/mL}$ ]. Except for the control group, cells in other groups were pretreated with TNF- $\alpha$  for 2 h, and then treated with corresponding drugs for 24 h. Caco-2 cell viability was detected by MTT; Intracellular reactive oxygen species (ROS) level were detected by flow cytometry; Total superoxide dismutase (T-SOD) activity and malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) levels were detected by colorimetry; qRT-PCR and Western blotting were used to detect nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and heme oxygenase-1 (HO-1) mRNA and protein expressions; Fluorescence

收稿日期: 2022-07-15

基金项目: 上海市科技创新行动计划自然科学基金资助项目 (19ZR1451900)

作者简介: 林 川, 男, 硕士研究生, 从事药物分析与体内过程研究。Tel: 19821726781 E-mail: 3325892608@qq.com

\*通信作者: 安 骞, 女, 博士, 教授, 从事药物分析与体内过程研究。Tel: (021)51322183 E-mail: anruimw@126.com

microscope was used to observe nuclear penetration of Nrf2 protein. **Results** 5.0—25.0  $\mu\text{g/mL}$  drug-containing medium and 10—80  $\mu\text{g/L}$  TNF- $\alpha$  had no significant effect on the viability of Caco-2 cells. Compared with TNF- $\alpha$  group, ROS level in Caco-2 cells of each administration group were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Except for WG group and QL group, MDA level in the other groups were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and GSH level was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Nrf2 gene expression was significantly increased in all drug-administered groups except WG group ( $P < 0.01$ ), and NQO1 gene expression was significantly increased in GD group and WGC group ( $P < 0.05, 0.01$ ), HO-1 gene expression was significantly increased in GD group and GG group ( $P < 0.05, 0.01$ ). Except for QL group, protein expressions of Nrf2 and HO-1 in other groups were significantly increased ( $P < 0.01$ ); Except for WG group and QL group, NQO1 protein expression was significantly increased in the other groups ( $P < 0.05, 0.01$ ), and Nrf2 protein into the nucleus was significantly increased ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** The lack of *Puerariae Lobatae Radix* has a negative effect on the inhibition of oxidative stress injury of Caco-2 cells by Gegen Qinlian Decoction.

**Key words:** Gegen Qinlian Decoction; *Puerariae Lobatae Radix*; compatibility of medicines; oxidative stress; colon cancer cells

氧化应激是体内氧化与抗氧化作用失衡的一种状态, 倾向于氧化, 中性粒细胞炎性浸润, 蛋白酶分泌增加, 产生大量氧化中间产物。氧化应激是自由基在体内产生的一种负面作用, 是导致衰老和疾病的一个重要因素。葛根芩连汤出自《伤寒论》, 为医圣张仲景的名方之一。方中葛根为君, 以其甘辛而凉, 主入阳明经, 外解肌表之邪、内清阳明之热, 使表解里和; 臣以黄芩、黄连苦寒清热, 坚阴止利; 佐使以甘草甘缓和中, 调和诸药; 四药合用, 外疏内清, 表里同治。研究表明, 葛根芩连汤对氧化应激损伤有一定的缓解作用<sup>[1-2]</sup>。本课题组前期从化学成分<sup>[3]</sup>、入血成分<sup>[4]</sup>、在人结肠癌 Caco-2 细胞模型中的吸收特征<sup>[5]</sup>、对肝脏细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 具体亚型酶活性的影响<sup>[6]</sup>、肠外翻吸收<sup>[7-9]</sup>、在体肠道灌流吸收及对急性肠炎大鼠肠道菌群多样性的影响<sup>[10-11]</sup>等方面对葛根芩连汤的配伍机制进行了大量研究。本研究以人肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 为刺激因素<sup>[12-13]</sup>, 激活 Caco-2 细胞炎症反应, 观察葛根芩连汤及不同配伍组对 Caco-2 细胞的影响, 以及对氧化应激相关细胞因子和通路的作用, 以阐释葛根芩连汤抗氧化应激作用机制及其配伍的合理性, 为更全面地揭示该复方配伍规律的研究奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 细胞

Caco-2 细胞购自赛百慷生物技术股份有限公司。

### 1.2 药材

葛根、黄芩、黄连和炙甘草饮片均购自上海康桥中药饮片有限公司, 批号分别为 201016、201103、201118、201109, 经上海中医药大学倪梁红副教授鉴定分别为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根、唇形科植物黄芩 *Scutellaria*

*baicalensis* Georgi 的干燥根、毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch 的干燥根茎和豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎, 符合《中国药典》2020 年版规定。

### 1.3 药品与试剂

小檗碱 (质量分数  $\geq 98\%$ , 批号 Y18N8S48598) 购自上海源叶生物科技有限公司; MEM 培养基 (批号 20210706)、青链霉素混合液 (批号 20211119)、0.25% 胰蛋白酶 (批号 2021060105) 均购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 2217479CP) 购自美国 Gibco 公司; MTT (批号 CR2107085)、 $\beta$ -actin 抗体 (批号 AC2102050A)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 CR2104079) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; TNF- $\alpha$  (批号 021825) 购自 PeproTech 公司; 总超氧化物歧化酶 (total superoxide dismutase, T-SOD) 测定试剂盒 (批号 20201231)、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 测定试剂盒 (批号 20210106)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测定试剂盒 (批号 20210105) 购自南京建成生物工程研究所; 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (批号 01152120319)、总 RNA 抽提试剂 Trizol (批号 030221211216)、ECL 化学发光试剂盒 (批号 031519190503)、Triton X-100 (批号 120921220118)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, 批号 091720210121) 购自碧云天生物技术公司; ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (批号 027E1280LB)、HiScript<sup>®</sup> II Q RT SuperMix for qPCR (批号 017E2232BA) 购自诺唯赞公司; RIPA 裂解液 (批号 R1001221)、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 B1001231) 购自上海翊圣生物公司; 核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid

2-related factor 2, Nrf2) 抗体(批号 00102781)、还原型辅酶 I/II 醌氧化还原酶 1[NAD(P)H quinone oxidoreductase 1, NQO1]抗体(批号 10017852)、血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 抗体(批号 00083458) 购自 Proteintech 公司; 浓缩型正常山羊血清(批号 17G04A09)、荧光(Cy3) 标记的羊抗兔 IgG 抗体(批号 BST16L31C17G32) 购自武汉博士德生物工程有限公司。

#### 1.4 仪器

SW-CJ-1FD 型超净工作台(苏州集团安泰空气技术有限公司); FlexStation3 型多功能酶标仪(Molecular Devices 公司); cytoFLEX 型流式细胞仪(Beckman Coulter 公司); BioPhotometer D30 型核酸蛋白检测仪, Mastercycler pro 型梯度 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司); StepOnePlus 型 qRT-PCR 仪(美国 ABI 公司); PowerPac Basic 型电泳仪及 Mini Transblot 型湿转印槽(美国 Bio-Rad 公司); AI 600 型超灵敏多功能成像仪(美国 GE 公司); BX53 型生物显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 2 方法

### 2.1 葛根芩连汤的制备

设置全方(GQ)组、去甘草(WGC)组(葛根、黄芩、黄连)、去葛根(WG)组(黄芩、黄连、甘草)、葛根甘草(GG)组、黄芩黄连(QL)组, 将葛根、黄芩、黄连、甘草按照 5:3:2:2 的比例混合(各组中缺味药材按 0 计算), 分别加 10 倍量水, 葛根先煎 20 min, 余药共煎 30 min, 煎煮 2 次, 滤过, 合并滤液, 采用液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)测定成分及含量<sup>[1,3]</sup>, GQ 组、WGC 组和 GG 组葛根素质量分数分别为 4.86、3.78 和 3.14 mg/g, GQ 组、WGC 组、WG 组和 QL 组小檗碱质量分数分别为 6.76、0.73、6.91 和 1.79 mg/g。滤液于 60 °C 旋转蒸发浓缩, 放至室温后于 -20 °C 冰箱预冻, 转入冻干机, 真空冷冻干燥, 取出并碾压得到冻干粉。以二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解冻干粉<sup>[14]</sup>, 经微孔滤膜滤过, 使用时以培养基稀释。

### 2.2 细胞培养

Caco-2 细胞用含 20% FBS 和 1% 青链霉素混合液的 MEM 培养基<sup>[15-16]</sup>, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养, 待细胞融合至对数生长期时进行后续实验。

### 2.3 葛根芩连汤及配伍对 Caco-2 细胞存活率的影响

取处于对数生长期的 Caco-2 细胞, 以  $5 \times 10^3$

个/孔接种至 96 孔板, 培养过夜。设置对照组、GQ 组、WGC 组、WG 组、GG 组和 QL 组, 各给药组分别以 5.0、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的相应药物处理 24 h, 对照组给予等体积培养基培养 24 h。每孔加入 10  $\mu\text{L}$  MTT, 37 °C 培养 4 h; 弃去培养基, 加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 振荡 10 min, 采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度(A)值, 计算细胞存活率。

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

### 2.4 TNF- $\alpha$ 对 Caco-2 细胞存活率的影响

取处于对数生长期的 Caco-2 细胞, 以  $5 \times 10^3$  个/孔接种至 96 孔板, 培养过夜。设置对照组和 TNF- $\alpha$  组, TNF- $\alpha$  组分别以 10、20、40、80、100  $\mu\text{g}/\text{L}$  的 TNF- $\alpha$  处理 26 h, 对照组给予等体积培养基培养 26 h。按“2.3”项下方法测定各组 A 值, 计算细胞存活率。

### 2.5 细胞内 ROS 含量的测定

取处于对数生长期的 Caco-2 细胞, 以  $2 \times 10^5$  个/孔接种至 6 孔板, 培养过夜。设置对照组、TNF- $\alpha$  组、小檗碱组 and 葛根芩连汤及其配伍组, TNF- $\alpha$  组给予 80  $\mu\text{g}/\text{L}$  TNF- $\alpha$  处理 26 h, 各给药组给予 80  $\mu\text{g}/\text{L}$  TNF- $\alpha$  预处理 2 h 后, BBR 组给予 6.73  $\mu\text{g}/\text{mL}$  小檗碱<sup>[2,17]</sup>, 葛根芩连汤及其配伍组分别给予 18.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$  药液<sup>[2]</sup>, 与 TNF- $\alpha$  共同作用 24 h, 对照组给予等体积培养基培养 26 h, 按照试剂盒说明书检测细胞内 ROS 水平。

### 2.6 细胞 T-SOD 活性和 MDA、GSH 水平的检测

取处于对数生长期的 Caco-2 细胞, 按“2.5”项下方法分组并给药, 收集细胞, 按照试剂盒说明书检测 T-SOD 活性和 MDA、GSH 水平。

### 2.7 qRT-PCR 检测 Nrf2、NQO1 和 HO-1 mRNA 表达

取处于对数生长期的 Caco-2 细胞, 按“2.5”项下方法分组并给药, 收集细胞, 用预冷的 PBS 洗涤。按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析<sup>[17]</sup>。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成, 引物序列见表 1。

### 2.8 Western blotting 检测 Nrf2、NQO1 和 HO-1 蛋白表达

取处于对数生长期的 Caco-2 细胞, 按“2.5”项下方法分组并给药, 收集细胞, 用预冷的 PBS 洗涤。加入 100  $\mu\text{L}$  含 1% 磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 提取细胞总蛋白。采用 BCA 蛋白定

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
<i>Nrf2</i>	F: GACAATGAGGTTTCTTCGGCTACG R: GGAGAGGATGCTGCTGAAGGAATC
<i>NQO1</i>	F: CGCAGACCTTGTGATATTCCAG R: CGTTTCTTCCATCCTTCCAGG
<i>HO-1</i>	F: CAGCATGCCCCAGGATTTG R: AGCTGGATGTTGAGCAGGA
<i>β-actin</i>	F: CCTGACTGACTACCTCATGAAG R: GACGTAGCACAGCTTCTCCTTA

量试剂盒测定蛋白浓度，加入 Loading buffer 混匀，95 °C 加热使蛋白变性，分装后于 -80 °C 保存。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，封闭后，分别加入 Nrf2 (1 : 2000)、NQO1 (1 : 10 000)、HO-1 (1 : 1000) 和 β-actin (1 : 3000) 抗体，4 °C 孵育过夜；加入相应二抗 (1 : 3000)，室温孵育 2 h，显影后，用 Image J 软件分析目的条带灰度值<sup>[18]</sup>。

### 2.9 免疫荧光染色检测 Caco-2 细胞 Nrf2 入核作用

取处于对数生长期的 Caco-2 细胞，接种于细胞爬片上，按“2.5”项下方法分组并给药，24 h 后吸弃培养板中液体，加入 PBS 洗涤，于 4% 多聚甲醛中固定，加入 0.5% Triton X-100 室温通透，滴加正常山羊血清，室温封闭。吸干封闭液，滴加 Nrf2 抗体 (1 : 50)，放入湿盒，4 °C 孵育过夜。浸洗，吸干，滴加荧光 (Cy3) 标记的羊抗兔 IgG 抗体 (1 :

100)，于 37 °C 湿盒中孵育 1 h。滴加 DAPI，避光孵育染核。洗涤，吸干液体，加入含抗荧光淬灭剂的封片液封片，于荧光显微镜下观察，采集图像，使用 IPP 6.0 软件对免疫荧光照片进行分析。

### 2.10 统计学分析

实验数据采用 GraphPad Prism 统计学软件分析，计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。服从正态分布，采用单因素方差分析进行各组间差异比较。

## 3 结果

### 3.1 葛根芩连汤及配伍对 Caco-2 细胞存活率的影响

如表 2 所示，葛根芩连汤及其配伍在 5.0~25.0 μg/mL 时，Caco-2 细胞存活率基本在 80% 及以上，说明 Caco-2 细胞未受到明显影响。根据前期研究，GQ 为 18.75 μg/mL 时<sup>[2]</sup>，对 Caco-2 细胞损伤缓解作用较好，因此后续实验中葛根芩连汤及其配伍组的质量浓度设定为 18.75 μg/mL。

### 3.2 TNF-α 对 Caco-2 细胞存活率的影响

如表 3 所示，Caco-2 细胞给予 10~80 μg/L 的 TNF-α 处理时，细胞存活率均大于 80%，活性基本未见明显影响。根据前期研究<sup>[2]</sup>，80 μg/L TNF-α 显著诱导细胞内促炎细胞因子白细胞介素-1β (interleukin-1β, *IL-1β*) mRNA 的表达，因此在后续实验中选择 80 μg/L TNF-α 诱导细胞损伤。

### 3.3 葛根芩连汤及配伍对细胞内 ROS 水平的影响

如表 4 所示，与对照组比较，TNF-α 诱导后细胞内 ROS 水平明显升高 ( $P < 0.01$ )；经药物干预后，

表2 葛根芩连汤及配伍对 Caco-2 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of Gegen Qinlian Decoction and its compatibility on survival rate of Caco-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/(μg·mL <sup>-1</sup> )	细胞存活率/%	组别	剂量/(μg·mL <sup>-1</sup> )	细胞存活率/%
GQ	5.0	91.29 ± 1.49	GG	5.0	110.36 ± 1.07
	12.5	92.65 ± 0.85		12.5	103.39 ± 0.82
	25.0	79.76 ± 0.53		25.0	90.46 ± 1.22
	50.0	60.08 ± 0.51		50.0	74.03 ± 1.74
	100.0	48.23 ± 0.53		100.0	43.23 ± 0.48
	200.0	9.62 ± 0.03		200.0	13.20 ± 1.09
WGC	5.0	94.79 ± 0.33	QL	5.0	95.21 ± 1.17
	12.5	97.92 ± 1.04		12.5	95.83 ± 1.06
	25.0	80.59 ± 1.36		25.0	79.74 ± 1.43
	50.0	67.43 ± 0.55		50.0	58.20 ± 0.30
	100.0	48.02 ± 0.71		100.0	33.20 ± 0.43
	200.0	8.41 ± 0.05		200.0	9.37 ± 0.03
WG	5.0	94.65 ± 2.28			
	12.5	83.99 ± 1.71			
	25.0	80.42 ± 0.32			
	50.0	64.47 ± 0.44			
	100.0	48.34 ± 0.82			
	200.0	9.46 ± 0.17			

表3 TNF- $\alpha$ 对Caco-2细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 3 Effect of TNF- $\alpha$  on survival rate of Caco-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

TNF- $\alpha$ 剂量/( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	细胞存活率/%
10	92.67 $\pm$ 8.62
20	88.33 $\pm$ 6.43
40	90.67 $\pm$ 8.39
80	94.67 $\pm$ 6.66
100	76.33 $\pm$ 4.51

表4 葛根芩连汤及配伍对Caco-2细胞内ROS水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of Gegen Qinlian Decoction and its compatibility on ROS level in Caco-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	平均荧光强度
对照	—	9 959.70 $\pm$ 105.13
TNF- $\alpha$	—	39 305.17 $\pm$ 597.59**
小檗碱	6.73	15 060.37 $\pm$ 213.24##
GQ	18.75	13 791.20 $\pm$ 250.71##
WGC	18.75	14 952.63 $\pm$ 337.08##
WG	18.75	24 399.47 $\pm$ 1 181.25###&&
GG	18.75	14 613.03 $\pm$ 1 001.75##
QL	18.75	19 338.10 $\pm$ 639.55###&&

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与 TNF- $\alpha$  组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ ;

与 GQ 组比较: & $P < 0.05$  && $P < 0.01$ , 下表同

\*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs TNF- $\alpha$  group;

& $P < 0.05$  && $P < 0.01$  vs GQ group, same as below tables

表5 葛根芩连汤及配伍对Caco-2细胞中T-SOD活性和MDA、GSH水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of Gegen Qinlian Decoction and its compatibility on T-SOD activity and MDA, GSH levels in Caco-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	MDA/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	T-SOD/( $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	GSH/( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )
对照	—	0.43 $\pm$ 0.29	49.99 $\pm$ 5.28	141.31 $\pm$ 13.69
TNF- $\alpha$	—	1.90 $\pm$ 0.29**	30.10 $\pm$ 2.52**	44.57 $\pm$ 7.36**
小檗碱	6.73	1.09 $\pm$ 0.18##	41.03 $\pm$ 5.78	89.02 $\pm$ 4.92##
GQ	18.75	0.97 $\pm$ 0.15##	41.18 $\pm$ 5.37	106.05 $\pm$ 6.79##
WGC	18.75	0.97 $\pm$ 0.14##	30.50 $\pm$ 2.64	88.02 $\pm$ 11.54##
WG	18.75	1.96 $\pm$ 0.22&&	30.27 $\pm$ 5.36	58.87 $\pm$ 9.65&&
GG	18.75	0.96 $\pm$ 0.17##	38.57 $\pm$ 5.12	98.53 $\pm$ 8.08##
QL	18.75	1.91 $\pm$ 0.32&&	41.05 $\pm$ 5.22	43.70 $\pm$ 7.58&&

表6 葛根芩连汤及配伍对Caco-2细胞Nrf2、NQO1和HO-1 mRNA表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effect of Gegen Qinlian Decoction and its compatibility on Nrf2, NQO1 and HO-1 mRNA expressions in Caco-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	mRNA 相对表达量		
		Nrf2	NQO1	HO-1
对照	—	1.00	1.00	1.00
TNF- $\alpha$	—	0.70 $\pm$ 0.07	0.64 $\pm$ 0.12**	0.46 $\pm$ 0.38**
小檗碱	6.73	2.45 $\pm$ 0.32##	0.82 $\pm$ 0.05	0.89 $\pm$ 0.09
GQ	18.75	2.48 $\pm$ 0.28##	1.44 $\pm$ 0.10##	1.07 $\pm$ 0.08##
WGC	18.75	1.68 $\pm$ 0.19###&&	0.89 $\pm$ 0.15##&&	0.53 $\pm$ 0.07&&
WG	18.75	1.18 $\pm$ 0.19&&	0.82 $\pm$ 0.16&&	0.48 $\pm$ 0.08&&
GG	18.75	1.23 $\pm$ 0.28#&&	0.83 $\pm$ 0.08&&	0.94 $\pm$ 0.16#
QL	18.75	1.66 $\pm$ 0.19###&&	0.84 $\pm$ 0.06&&	0.51 $\pm$ 0.07&&

Caco-2 细胞内 ROS 水平均显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与 GQ 组比较, WG 组和 QL 组细胞内 ROS 水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。

### 3.4 葛根芩连汤及配伍对细胞内 T-SOD 活性和 MDA、GSH 水平的影响

如表 5 所示, 与对照组比较, TNF- $\alpha$  组细胞中 MDA 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), T-SOD 活性和 GSH 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与对照组比较, 小檗碱组、GQ 组、WGC 组和 GG 组 MDA 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), GSH 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与 GQ 组比较, WG 组和 QL 组 MDA 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), GSH 水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。

### 3.5 葛根芩连汤及配伍对细胞内 Nrf2、NQO1 和 HO-1 mRNA 表达的影响

如表 6 所示, 与对照组比较, TNF- $\alpha$  组 Nrf2 mRNA 表达呈下降趋势, NQO1 和 HO-1 mRNA 表达水平均明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与 TNF- $\alpha$  组比较, 小檗碱组、GQ 组、WGC 组、GG 组和 QL 组 Nrf2 mRNA 表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01), GQ 组和 WGC 组 NQO1 mRNA 表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01), GQ 组和 GG 组 HO-1 mRNA 表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01); 与 GQ 组比

较, WGC组、WG组、GG组和QL组 *Nrf2* 和 *NQO1* mRNA 表达水平均明显降低 ( $P < 0.01$ ), WGC组、WG组和QL组 *HO-1* mRNA 表达水平均明显降低 ( $P < 0.01$ )。

### 3.6 葛根芩连汤及配伍对细胞内 Nrf2、NQO1 和 HO-1 蛋白表达的影响

如图1和表7所示, 与对照组比较, TNF- $\alpha$ 组NQO1蛋白表达呈下降趋势, Nrf2和HO-1蛋白表达水平均明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与TNF- $\alpha$ 组比较, 小檗碱组、GQ组、WGC组、WG组和GG组Nrf2和HO-1蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 小檗碱组、GQ组、WGC组和GG组NQO1蛋白表达水平显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ ); 与GQ组比较, QL组Nrf2、NQO1和HO-1蛋白表达水平均明显降低 ( $P < 0.05, 0.01$ )。

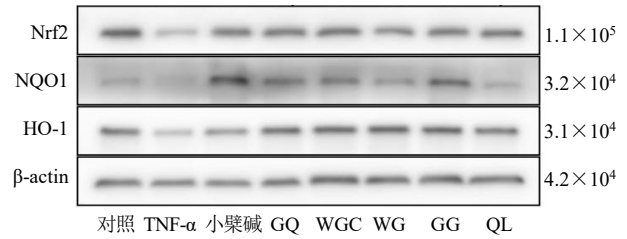


图1 各组 Nrf2、NQO1 和 HO-1 蛋白表达情况

Fig.1 Nrf2, NQO1 and HO-1 protein expressions in each group

### 3.7 葛根芩连汤及配伍对 Nrf2 蛋白入核影响

如图2和表8所示, 与对照组比较, TNF- $\alpha$ 组细胞核内Nrf2蛋白阳性表达呈下降趋势; 与TNF- $\alpha$ 组比较, 小檗碱组、GQ组、WGC组和GG组细胞核内Nrf2蛋白阳性表达明显增加 ( $P < 0.05, 0.01$ )。

表7 葛根芩连汤及配伍对 Caco-2 细胞 Nrf2、NQO1 和 HO-1 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 7 Effect of Gegen Qinlian Decoction and its compatibility on Nrf2, NQO1 and HO-1 protein expressions in Caco-2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	蛋白相对表达量		
		Nrf2	NQO1	HO-1
对照	—	1.20 ± 0.11	0.81 ± 0.26	1.14 ± 0.06
TNF- $\alpha$	—	0.40 ± 0.09**	0.33 ± 0.04	0.39 ± 0.18**
小檗碱	6.73	1.02 ± 0.27##	1.46 ± 0.12##	0.99 ± 0.21##
GQ	18.75	1.26 ± 0.17##	1.21 ± 0.18##	1.14 ± 0.06##
WGC	18.75	1.04 ± 0.11##	0.95 ± 0.11#	0.98 ± 0.17##
WG	18.75	0.90 ± 0.22##	0.74 ± 0.23	0.92 ± 0.17##
GG	18.75	0.93 ± 0.10##	0.97 ± 0.31#	1.07 ± 0.06##
QL	18.75	0.76 ± 0.14&	0.44 ± 0.26&&	0.67 ± 0.12&&

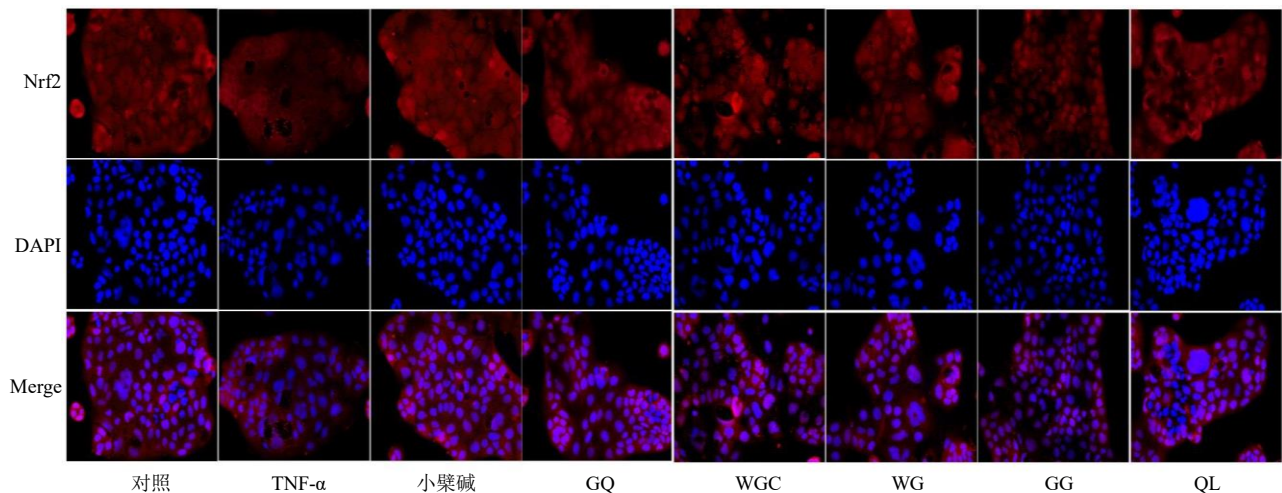


图2 各组 Caco-2 细胞中 Nrf2 蛋白入核情况 ( $\times 400$ )

Fig. 2 Nuclear entry of Nrf2 protein in Caco-2 cells of each group ( $\times 400$ )

表8 各组 Caco-2 细胞中 Nrf2 蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 8 Nrf2 protein expression in Caco-2 cells of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	平均荧光强度
对照	—	0.48 ± 0.05
TNF- $\alpha$	—	0.31 ± 0.09
小檗碱	6.73	0.67 ± 0.10 <sup>##</sup>
GQ	18.75	0.56 ± 0.02 <sup>#</sup>
WGC	18.75	0.56 ± 0.05 <sup>#</sup>
WG	18.75	0.54 ± 0.04
GG	18.75	0.57 ± 0.12 <sup>#</sup>
QL	18.75	0.49 ± 0.20

#### 4 讨论

研究发现,葛根芩连汤可上调 Nrf2 信号通路缓解 TNF- $\alpha$  诱导 Caco-2 细胞氧化应激损伤和溃疡性结肠炎大鼠病理损伤<sup>[1-2]</sup>。本课题组在动物实验中初步探讨了葛根芩连汤抗氧化应激作用的配伍规律,发现组方中缺少君药葛根或仅有臣药黄芩和黄连对减轻氧化应激损伤作用有较大影响<sup>[1]</sup>。因此,本研究以 TNF- $\alpha$  诱导 Caco-2 细胞氧化损伤,进一步探讨葛根芩连汤抗氧化应激作用的配伍规律。

TNF- $\alpha$  可以激活炎症反应,引起氧化应激损伤,导致 ROS 产生大量增加<sup>[19-20]</sup>。ROS 的增加会引起细胞内的脂质、蛋白质和核酸氧化,进而造成细胞氧化应激损伤,甚至会导致细胞毒性。MDA 为 ROS 与细胞膜上饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的终产物<sup>[21]</sup>,其含量可以间接反映脂质过氧化程度。本研究结果显示,葛根芩连汤及不同配伍组均可以显著降低 TNF- $\alpha$  引起的 ROS 含量增加,但去葛根组和黄芩黄连组降低 ROS 含量的作用比全方组弱且有显著性差异。去葛根组和黄芩黄连组对 TNF- $\alpha$  诱导的 MDA 含量增加无明显降低作用。前期动物实验<sup>[1]</sup>中,去葛根组对大鼠血清中 MDA 含量的降低明显弱于全方组。表明全方中君药葛根对于降低氧化物含量起重要作用。

SOD 可以清除机体内产生的超氧化阴离子和自由基<sup>[22]</sup>,GSH 可以保护细胞膜结构和功能免受过氧化氢的氧化损伤<sup>[23]</sup>。SOD 活性和 GSH 水平降低会导致自由基堆积<sup>[24]</sup>。本研究结构显示,给予药物干预后,TNF- $\alpha$  引起的 T-SOD 活性和 GSH 水平下降得到了改善,但去甘草组和去葛根组 T-SOD 活性与对照组相比具有显著性差异,去葛根组和黄芩黄连组对 GSH 的作用明显低于全方组。前期动物实验<sup>[1]</sup>中,去葛根组大鼠血清中 T-SOD 活性明显低于

对照组,黄芩黄连组 GSH 活性与全方组相比具有显著性差异,与本研究结果基本一致。提示葛根芩连汤能够促进抗氧化酶活性,其中君药葛根的作用较大。

Nrf2 是机体抵抗氧化应激的关键调控因子,Nrf2 的激活可以抑制氧化应激和炎症反应,减少细胞凋亡<sup>[12,23-24]</sup>。NQO1 同时也是辅酶 Q (泛醌)和维生素 E 的还原酶,可通过维持辅酶 Q 和维生素 E 的还原状态来发挥抗氧化应激作用<sup>[1-2]</sup>。HO-1 是血红素生成胆绿素、一氧化碳和铁离子的限速酶<sup>[22-23]</sup>。NQO1 和 HO-1 是体内重要的 II 相解毒酶和抗氧化剂,在体内发挥着重要的抗氧化作用。本研究结果显示,葛根芩连汤及配伍对 TNF- $\alpha$  引起的 Nrf2、NQO1 和 HO-1 mRNA 和蛋白表达降低均有一定的恢复作用。其中对 mRNA 的促进作用,其他配伍组均弱于全方组,黄芩黄连组 Nrf2、NQO1 和 HO-1 蛋白表达明显低于全方组,与动物实验结果基本一致<sup>[1]</sup>。在此基础上,进一步研究药物对 Nrf2 蛋白入核的影响,发现去葛根组和黄芩黄连组对 TNF- $\alpha$  导致的 Nrf2 蛋白入核减少没有明显改变。上述结果证实缺少葛根的配伍组激活 Nrf2 信号通路作用较弱。

本课题组前期研究发现,对于 TNF- $\alpha$  诱导的氧化应激损伤,葛根素、黄芩苷、小檗碱和甘草苷均具有一定的抑制作用,其中葛根素和小檗碱的抗氧化应激作用相对较好<sup>[2]</sup>。本研究以小檗碱为阳性对照药物,质量浓度为 6.73  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,但去葛根组和黄芩黄连组中所含小檗碱仅有 0.13 和 0.03  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,因此去葛根组和黄芩黄连组尽管含小檗碱成分,由于含量低导致其抗氧化应激作用与全方组相比有明显差异,同时这 2 个配伍组又不含有葛根素,这也是抗氧化应激作用弱的又一原因。

以上研究结果表明,葛根芩连汤及不同配伍对 TNF- $\alpha$  诱导的氧化应激损伤均有一定的抑制作用。综合细胞实验和动物实验<sup>[1]</sup>结果,方中缺少君药葛根对抗氧化应激作用有明显影响。然而葛根芩连汤抑制氧化应激损伤的配伍规律及其药效物质基础还有待通过在体实验进一步验证。本课题组将进一步开展葛根芩连汤抗氧化应激损伤的有效成分研究,深入探讨葛根芩连汤配伍规律的物质基础。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 林川,王菲,王鸿卿,等. 葛根芩连汤及配伍调控 Nrf2/NQO1 信号通路抑制溃疡性结肠炎大鼠氧化应激

- 损伤 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(13): 19-27.
- [2] Lin C, Zhou Z H, Zhang L J, *et al.* Gegen Qinlian Decoction relieves ulcerative colitis via adjusting dysregulated Nrf2/ARE signaling [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 2934552.
- [3] 王婷婷, 安靓, 梁琨, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap 高分辨质谱的葛根芩连汤的化学成分分析 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1498-1507.
- [4] 张艺竹, 安靓, 袁瑾, 等. 基于药代动力学参数分析比较葛根芩连汤的不同配伍肠吸收特性 [J]. 药学学报, 2013, 48(10): 1611-1617.
- [5] 顾青青, 邵以诺, 安靓, 等. 葛根芩连汤有效成分对黄芩苷在 Caco-2 细胞模型中吸收转运的影响 [J]. 中成药, 2015, 37(4): 694-699.
- [6] 陈烨, 袁瑾, 王新宏, 等. 葛根芩连汤及不同配伍对肝细胞色素 P450 酶的影响 [J]. 中成药, 2013, 35(8): 1593-1598.
- [7] 张华, 安靓, 徐冉驰, 等. 葛根芩连汤及不同配伍组中生物碱类成分的肠外翻吸收研究 [J]. 中成药, 2012, 34(4): 620-625.
- [8] 张华, 安靓, 徐冉驰, 等. UPLC 快速测定葛根芩连汤肠外翻囊样品中 6 个黄酮类成分含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(1): 15-19.
- [9] 张华, 安靓, 徐冉驰, 等. 葛根芩连汤及不同配伍组中黄酮类成分的肠外翻吸收研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(23): 3332-3337.
- [10] 陈阳, 陆杰, 朱思敏, 等. 基于高通量测序技术研究葛根芩连汤及其配伍对急性肠炎大鼠肠道菌群多样性的影响 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1406-1417.
- [11] 安靓, 张华, 张艺竹, 等. 采用在体单向肠灌流模型研究葛根芩连汤不同配伍组主要指标成分的肠吸收特性 [J]. 药学学报, 2012, 47(12): 1696-1702.
- [12] 秦劲晨, 王爱梅, 李若瑜. 茯苓酸对 TNF- $\alpha$  诱导 SH-SY5Y 细胞炎症氧化应激反应和凋亡的拮抗作用研究 [J]. 中国中医药科技, 2019, 26(6): 854-858.
- [13] 郑晓珂, 刘彩霞, 翟英英, 等. 卷柏中穗花杉双黄酮对 TNF- $\alpha$  诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 药学学报, 2013, 48(9): 1503-1509.
- [14] 王雪纯, 陈丽, 曹旭梅, 等. 落地生根冻干粉对 HepG2 细胞增殖及凋亡的影响 [J]. 中药材, 2022, 45(3): 726-731.
- [15] 陈晓雷, 陈思如, 修光辉, 等. 高迁移率族蛋白 B1 在脂多糖诱导的 Caco-2 细胞上皮屏障损伤中的作用 [J]. 中华急诊医学杂志, 2021, 30(3): 287-292.
- [16] 何萍萍, 郑雅君, 郑明静, 等. 红毛藻多糖对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 Caco-2 细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 食品科学, 2021, 42(17): 113-120.
- [17] Lu J Z, Ye D, Ma B L. Constituents, pharmacokinetics, and pharmacology of Gegen-Qinlian Decoction [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 668418.
- [18] Chen Y R, Zhang P, Chen W R, *et al.* Ferroptosis mediated DSS-induced ulcerative colitis associated with Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Immunol Lett*, 2020, 225: 9-15.
- [19] Wang X H, Dai C, Wang J, *et al.* Therapeutic effect of neohesperidin on TNF- $\alpha$ -stimulated human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(10): 741-749.
- [20] 贺佳林, 胡瑞成, 戴爱国. COPD 大鼠肺组织和骨骼肌中 ROS、MDA、IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量变化 [J]. 国际呼吸杂志, 2020, 40(20): 1537-1542.
- [21] He M H, Pan H, Chang R C C, *et al.* Activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway contributes to the protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharides in the rodent *Retina* after ischemia-reperfusion-induced damage [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e84800.
- [22] Weerachayaphorn J, Mennone A, Soroka C J, *et al.* Nuclear factor-E2-related factor 2 is a major determinant of bile acid homeostasis in the liver and intestine [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 302(9): G925-G936.
- [23] Hu T X, Wei G, Xi M M, *et al.* Synergistic cardioprotective effects of Danshensu and hydroxysafflor yellow A against myocardial ischemia-reperfusion injury are mediated through the Akt/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(1): 83-94.
- [24] Li J Q, Ichikawa T, Janicki J S, *et al.* Targeting the Nrf2 pathway against cardiovascular disease [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2009, 13(7): 785-794.

[责任编辑 李亚楠]