

# 姜油树脂对辐射后间充质干细胞 Nrf2 及其靶基因表达的影响

李晴 王璐 徐畅 王彦 杜利清 王芹 杨福军 孙元明 刘强

**【摘要】目的** 探索姜油树脂对辐射后间充质干细胞中核转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2)及其下游靶基因表达变化的影响。**方法** 采用 MTT、实时 PCR 以及 Western Blot 检测不同浓度姜油树脂、不同时间点处理后 Nrf2 及其下游靶基因血红素加氧酶(HO1)和还原型辅酶 I 醌类氧化还原酶(NQO1)的表达变化。**结果** 姜油树脂对辐射后间充质干细胞中 Nrf2 基因本身的影响并不大,但在给予姜油树脂 24 h 后,  $10^{-5}$  和  $10^{-4}$  g/ml 姜油树脂联合照射组下游靶基因 HO1 和 NQO1 的 mRNA 及蛋白水平均有所上升。**结论** 姜油树脂不影响 Nrf2 的转录和表达,但可提高其下游抗氧化基因的表达,发挥辐射防护作用。

**【关键词】** 姜油树脂; 辐射; 核转录因子 E2 相关因子 2; 血红素加氧酶; 还原型辅酶 I 醌类氧化还原酶

**Ginger oleoresin induced expression of Nrf2 and its target genes in mesenchymal stem cells after radiation** Li Qing, Wang Lu, Xu Chang, Wang Yan, Du Liqing, Wang Qin, Yang Fujun, Sun Yuanming, Liu Qiang. Tianjin Key laboratory of Radiation Medicine and Molecular Nuclear Medicine, Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Liu Qiang, Email: liuqiang@irm-cams.ac.cn

**【Abstract】 Objective** To explore ginger oleoresin induced the change of expression of nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2(Nrf2) and its target genes in mesenchymal stem cells after radiation damage. **Methods** A combined approach include MTT, real time-PCR and Western blot were used to test the changes on expression level of Nrf2 and its downstream genes, including heme oxygenase-1(HO1) and NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1(NQO1). **Results** The results showed that ginger oleoresin has little effect on Nrf2. However, the expression of HO1 and NQO1 increased in the  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  g/ml ginger oleoresin group when incubated 24 h after radiation. **Conclusions** Ginger oleoresin has no effect on the transcription and expression of Nrf2, but can increase the expression of the target antioxidant genes of Nrf2. Ginger oleoresin may be a potential protective agent in the future.

**【Key words】** Ginger oleoresin; Radiation; Nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2; Heme oxygenase-1; NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1

电离辐射会直接或间接产生过多的活性氧,最终造成细胞功能异常、死亡和基因突变等<sup>[1]</sup>。核转录因子 E2 相关因子 2(nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2, Nrf2)在细胞抗氧化保护作用

中起着中枢调节作用<sup>[2]</sup>。其在电离辐射引起的应激反应中起到非常重要的作用<sup>[3]</sup>。姜油树脂是一种以 CO<sub>2</sub> 超临界萃取法于姜科植物中提取出来的一种酚类混合物。已有研究证实,其中的成分之一姜黄素可以抑制紫外线导致的氧化损伤<sup>[4]</sup>。有研究指出,姜黄素发挥药理作用的重要分子机制为激活 Nrf2,进而活化其下游一系列抗氧化酶及 II 相解毒酶,如血红素加氧酶(heme oxygenase-1, HO1)、还原型辅酶 I 醌类氧化还原酶[NAD(P)H:

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2015.05.008

**基金项目:** 国家自然科学基金(31300695, 31170804); 天津市自然科学基金(13JCYBJC23500, 13JCQNJC11600); 中国医学科学院放射医学研究所发展基金(1554)

**作者单位:** 300192 天津, 中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所, 天津市放射医学与分子核医学重点实验室

**通信作者:** 刘强(Email: liuqiang@irm-cams.ac.cn)

quinone oxidoreductase 1, NQO1] 等, 这些酶类发挥作用, 成为电离辐射自由基清除的有效途径<sup>[5]</sup>。本研究通过探讨姜油树脂对电离辐射所造成间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)中 Nrf2 及其下游靶基因的表达影响来进一步明确其分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂、仪器

Nrf2 抗体、NQO1 抗体、HO1 抗体(美国 Abcam 公司), 鼠抗- $\beta$ -tubulin、兔抗(武汉博士德公司)。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)。MTT(上海碧云天生物技术有限公司)。MSCs 用含 10%胎牛血清(美国 Gibco 公司)的 DMEM-F12 培养基于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度恒温培养箱中传代培养。应用放射源为 <sup>137</sup>Cs  $\gamma$  射线(Gammacell-40, 加拿大原子能有限公司)的辐射装置对 MSCs 进行照射, 剂量率为 1.02 Gy/min, 源靶距 15 cm。依据本实验室的前期研究结果, 采用的吸收剂量为 4 Gy。

### 1.2 MTT 实验

取指数生长期细胞进行下游试验, 将细胞悬液浓度调整为  $3 \times 10^4$  个/ml, 以每孔 100  $\mu$ l 接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 换为含 0、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-3}$  g/ml 姜油树脂的新鲜培养基, 每组设 12 个复孔, 继续培养 24、48、72 h 后每孔加入 10  $\mu$ l MTT, 4 h 后吸弃培养基, 每孔加入 150  $\mu$ l 二甲基亚砜, 置于微型振荡器震荡混匀 10 min, 采用酶标仪于 492 nm 波长处测定各孔吸光度(A)值。细胞存活率(%)=实验组 A 值/对照组 A 值 $\times 100\%$ , 实验重复 3 次, 取平均值。

### 1.3 实时 PCR 检测 mRNA 水平变化

MSCs 分为 2 组: 未照射组和照射组, 这两组又分别分为 4 个亚组, 依次为 0 (不作任何处理)、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$  g/ml 姜油树脂处理组和 0 (单纯照

射组)、 $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$  g/ml 姜油树脂处理联合照射组。用处于指数期的 MSCs 进行试验, 采用 Trizol 试剂提取总 RNA, 测定 RNA 浓度, 之后使用逆转录试剂盒, 将 mRNA 逆转录为 cDNA, 然后使用实时 PCR 试剂 Rox 进行 PCR, 25  $\mu$ l 体系。以 GAPDH 作为内参基因来校正目的基因的表达, 引物由上海生工生物有限公司合成(表 1)。

### 1.4 Western Blot 检测蛋白水平变化

MSCs 分为 2 组: 未照射组和照射组, 这两组又分别分为 3 个亚组, 依次为 0 (不作任何处理)、 $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$  g/ml 姜油树脂处理组和 0 (单纯照射组)、 $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$  g/ml 姜油树脂联合照射组。在 24 h 处理的实验条件下, 收集指数生长期细胞, 每  $1 \times 10^6$  个 MSCs 中加入 100  $\mu$ l 蛋白裂解液, 于 4℃下裂解 30 min, 之后 13000 r/min 离心 10 min (离心半径为 7 cm), 上清收集于 1.5 ml EP 管中, 采用二喹啉甲酸法进行蛋白定量。取 25  $\mu$ g 蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 通过湿转的转膜方法将蛋白样本转移至聚偏二氟乙烯膜上, 设置 110 V, 130 min, 含 1%牛血清白蛋白的封闭液封闭 1 h, 一抗 4℃下过夜, TBST 洗膜 5 次, 每次 5 min, 加入对应二抗室温孵育 1 h, 室温 TBST 洗膜 4 次, 每次 10 min, 增强化学发光法检测, 凝胶成像系统显影。

### 1.5 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析, 各组数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组数据比较采用两独立样本 *t* 检验,  $P < 0.05$  表示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

姜油树脂对 MSCs 的细胞毒性见表 2,  $10^{-6}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-4}$  g/ml 浓度的姜油树脂在 72 h 内对 MSCs 没有细胞毒性(24 h:  $t=7.12$ 、 $8.09$ 、 $12.51$ ,  $P > 0.05$ ; 48 h:  $t=3.78$ 、 $6.18$ 、 $2.93$ ,  $P > 0.05$ ; 72 h:  $t=1.86$ 、 $2.97$ 、 $3.75$ ,  $P > 0.05$ ), 而  $10^{-3}$  g/ml 浓度的姜油树脂从 24 h 开始会显著降低 MSCs 的细胞活力( $t=56.71$ 、 $60.13$ 、 $78.09$ ,  $P < 0.01$ )。所以后续实验放弃使用对细胞具有毒性的剂量浓度  $10^{-3}$  g/ml 姜油树脂。

表 1 实时 PCR 反应所用引物

Table 1 Primers in real time-PCR

基因名称	上游引物序列	下游引物序列
Nrf2	5'TCAGCGACGAAAGAGTATGA 3'	5'CCACTGTTTCTGACTGGATGT 3'
HO1	5'AGAGGGAATTCTCTTGGCTGGCTT3'	5'ATGCCATAGGCTCCTTCTCTCTT3'
NQO1	5'AGGAAGAGCTAATAAATCTCTTCTT TGCTG3'	5' TCATATTGCAGATGTACGGTGTG- GATTTAT3'
GAPDH	5'TGACTTCAACAGCGACACCCA3'	5'CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA3'

表2 姜油树脂对间充质干细胞存活率的影响(%,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effects of ginger oleoresin on mesenchymal stem cells viability(%,  $\bar{x} \pm s$ )

姜油树脂浓度 (g/ml)	时间 (h)		
	24	48	72
0	100.00	100.00	100.00
10 <sup>-6</sup>	108.10±3.84	100.80±4.87	98.53±0.66
10 <sup>-5</sup>	109.90±5.01	103.40±6.38	97.51±4.44
10 <sup>-4</sup>	118.90±5.12	98.14±4.09	97.15±5.68
10 <sup>-3</sup>	24.18±4.06	20.68±4.17	15.13±1.23

2.2 实时 PCR 检测不同时间点细胞中各基因的表达  
用姜油树脂分别处理 6、12、24、48 h 后进行实时 PCR, 结果如图 1。4 个时间段中的 Nrf2 基因的 mRNA 水平变化不是很明显, 但在 24 h 时, 10<sup>-5</sup>、10<sup>-4</sup> g/ml 姜油树脂联合照射组中下游的 HO1、NQO1 的 mRNA 表达水平分别高于 10<sup>-5</sup>、10<sup>-4</sup> g/ml 姜油树脂处理组 (HO1:  $t=14.58$ 、 $13.86$ ,  $P<0.05$ ; NQO1:  $t=25.23$ 、 $27.65$ ,  $P<0.01$ ) 和单纯照射组 (HO1:  $t=19.89$ ,  $P<0.05$ ; NQO1:  $t=19.59$ ,  $P<0.05$ ), 差异具有统计学意义。

2.3 Western Blot 检测不同处理后细胞中蛋白水平的变化

如图 2, 其中以骨架蛋白  $\beta$ -tublin 作为内参蛋白, 各组间蛋白水平的变化与转录水平的变化一致: Nrf2 蛋白变化不是很明显, 而 10<sup>-5</sup>、10<sup>-4</sup> g/ml

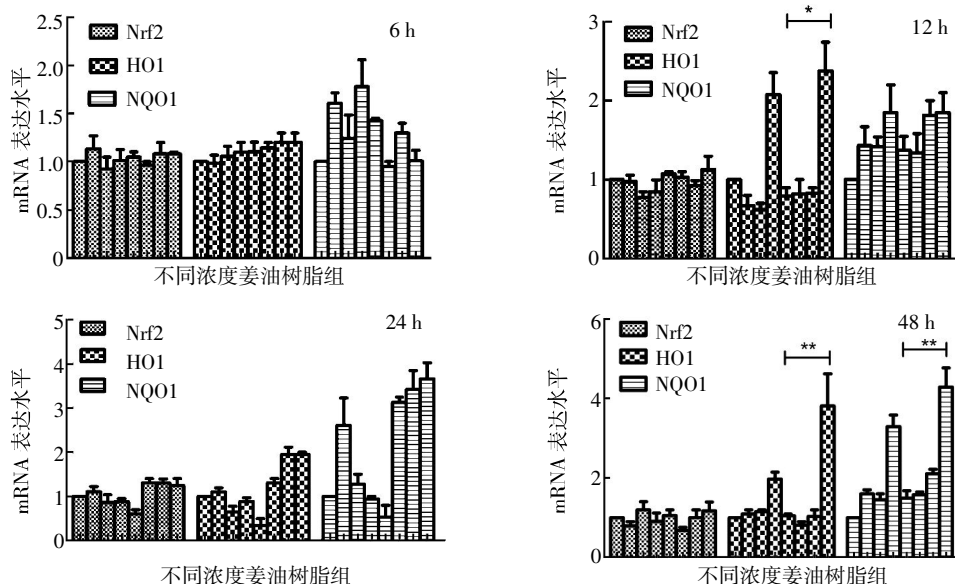


Fig.1 在照射和未照射情况下, 不同浓度的姜油树脂处理后对各基因转录水平的影响 图中, 8 个组别依次为 0(不作任何处理)、10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-4</sup> g/ml 姜油树脂处理组和 0(单纯照射组)、10<sup>-6</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-4</sup> g/ml 姜油树脂处理联合照射组; Nrf2: 核转录因子 EI 相关因子 2; HO1: 血红素加氧酶; NQO1: 还原型辅酶 I 醌类氧化还原酶; \*  $t=13.57$ ,  $P<0.05$ ; \*\*  $t=39.12$ 、 $42.16$ ,  $P<0.01$ 。

Fig.1 Expression level of genes after different ginger oleoresin treats with or without radiation

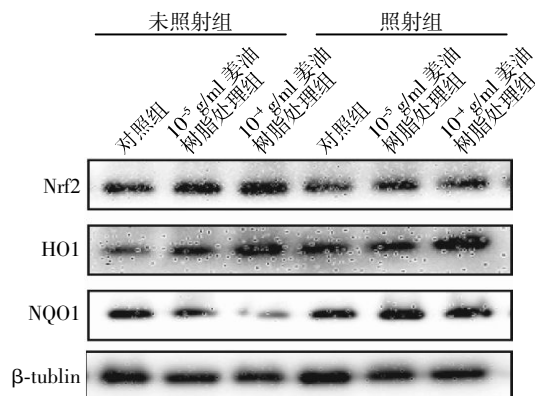


Fig.2 在照射和未照射情况下, 经不同浓度姜油树脂处理后各组间细胞中蛋白水平的变化 图中, Nrf2: 核转录因子 EI 相关因子 2; HO1: 血红素加氧酶; NQO1: 还原型辅酶 I 醌类氧化还原酶。

Fig.2 The level of protein in every groups after different ginger oleoresin treats with or without radiation

姜油树脂联合照射组中的 HO1、NQO1 蛋白水平明显升高。

### 3 讨论

电离辐射一方面会直接导致生物大分子的损伤, 造成 DNA 链的断裂、蛋白酶失活或者破坏细胞内膜的结构, 另一方面射线会间接作用于水分子, 继而作用于生物大分子, 引起其物理和化学变化, 最终导致细胞死亡<sup>[6-7]</sup>。电离辐射会产生大量

的活性氧,因此,抗氧化一直是辐射防护研究的主要方向。

有研究表明,在体内多种细胞中,Nrf2 信号通路具有抗氧化应激损伤作用<sup>[8]</sup>。正常条件下,Nrf2 和位于胞浆中的抑制蛋白 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1 一起被固定在胞质内,通过泛素连接酶被泛素化,而维持在一个较低的表达水平<sup>[9-10]</sup>。当细胞受到一些外源或内源性的氧化刺激时,Nrf2 发生变构或者被磷酸化而活化,转移至细胞核内与抗氧化反应元件结合,通过这种顺式作用启动其下游抗氧化酶及Ⅱ相解毒酶的表达<sup>[11-12]</sup>。上述研究绝大多数都集中在 Nrf2 的抗氧化方面,而针对辐射防护的研究较少,因此,本研究的重点在于探索姜油树脂对辐射后 MSCs Nrf2 基因及其靶基因表达的影响,初步明确姜油树脂辐射防护作用的机理,为其作为天然辐射防护剂提供理论依据。

为研究姜油树脂在 MSCs 受到辐射损伤后能否激活 Nrf2 通路,本研究在确定了对 MSCs 无毒性作用的姜油树脂浓度的基础上,将姜油树脂与 MSCs 共培养后进行照射,照后不同时间观察 Nrf2 及其下游基因的表达水平,结果发现,姜油树脂并未对 Nrf2 的转录和表达产生明显影响,而对其下游靶基因的表达产生了明显的促进作用。众所周知,电离辐射可以导致细胞内活性氧明显增加,进而造成细胞的氧化损伤。姜油树脂明显促进了 HO1 和 NQO1 等抗氧化基因的激活和表达,将明显降低辐射诱导的氧化损伤,进而产生辐射防护作用。

综上所述,姜油树脂虽然未对 Nrf2 的表达产生影响,但可能对 Nrf2 在细胞核内或核外的分布产生了影响,即发生了由胞浆到细胞核内的移位过程,进而激活其下游抗氧化靶基因的转录和翻译,发挥其抗氧化作用。上述假说有待在进一步的实验研究中进行验证。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 郭月凤,张慧芳,杨彪,等.急性辐射损伤的生物剂量估算方法[J].辐射研究与辐射工艺学报,2012,30: 135-141.
- [ 2 ] Que LL, Wang HX, Cao BS, et al. The regulation and functions of transcription factor Nrf2 in cancer chemoprevention and chemoresistance[J]. J Chin Pharm Sci, 2011, 20(1): 5-19.
- [ 3 ] Kannan S, Jaiswal AK. Low and high dose UVB regulation of transcription factor NF-E2-Related factor 2[J]. Cancer Res, 2006, 66(17): 8421-8429.
- [ 4 ] Phillips J, Moore-Medlin T, Sonavane K, et al. Curcumin inhibits UV radiation-induced skin cancer in SKH-1 mice[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2013, 148(5): 797-803.
- [ 5 ] Singh S, Khar A. Biological effects of curcumin and its role in cancer chemoprevention and therapy[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2006, 6(3): 259-270.
- [ 6 ] 王崇道,强亦忠.电离辐射所致自由基对机体的损伤与自由基清除剂的研究[J].中华放射医学与防护杂志,2002,22(6): 461-463.
- [ 7 ] Wu JL, Wu C, Lei C, et al. Chemical- and irradiation-induced mutants of indica rice IR64 for forward and reverse genetics[J]. Plant Mol Biol, 2005, 59(1): 85-97.
- [ 8 ] 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.
- [ 9 ] Liew PL, Hsu CS, Liu WM. Prognostic and predictive Values of Nrf2, Keap1, p16 and E-cadherin expression in ovarian epithelial carcinoma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5): 5642-5649.
- [ 10 ] Lee YJ, Lee DM, Lee SH. Nrf2 expression and apoptosis in quercetin-treated malignant mesothelioma cells[J]. Mol Cells, 2015, 38(5): 416-425.
- [ 11 ] Kanamori M, Higa T, Sonoda Y, et al. Activation of the NRF2 pathway and its impact on the prognosis of anaplastic glioma patients [J]. Neuro Oncol, 2015, 17(4): 555-565.
- [ 12 ] Brown RH, Reynolds C, Brooker A, et al. Sulforaphane improves the bronchoprotective response in asthmatics through Nrf2-mediated gene pathways[J]. Respir Res, 2015, 15(16): 106.

(收稿日期: 2015-08-12)