

- 19(2): 100.
- [12] Ohtsubo M, Roberts JM. Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts [J]. *Science*, 1993, 259(5103): 1908-1912.
- [13] Jeffrey, PD, Russo AA, Polyak K, et al. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclin A-CDK2 complex[J]. *Nature*, 1995, 376: 313-320.
- [14] Knoblich JA, Lehner CF. Synergistic action of Drosophila cyclins A and B during the G2-M transition[J]. *The EMBO Journal*, 1993, 12: 65-74.
- [15] Pagano MR, Pepperkok, Fulvia Verde, et al. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle[J]. *The EMBO Journal*, 1992, 11: 961-971.
- [16] Deniaud A, Hoebeke J, Briand JP, et al. Peptido-targeting of the mitochondrial transition pore complex for therapeutic apoptosis induction[J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(34): 4501-4511.
- [17] Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis [J]. *Oncogene*, 2003, 22(53): 8590-8607.
- [18] 段小娴, 欧盛敬, 李瑗, 等. 树鼯实验肝癌形成过程中 p53 和 bcl-2 蛋白表达及其与细胞凋亡之间的关系[J]. *中国肿瘤临床*, 2004, 31(18): 1057-1059.
- [19] Kariya S, Ogawa Y, Yoshida S, et al. X-irradiation enhances the expression of Bcl-2 in HL-60 cells: the resulting effects on apoptosis and radiosensitivity[J]. *Int J Mol Med*, 1999, 3(2): 145-152.
- [20] Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, et al. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(9): 1423-1433.
- [21] Sharpe JC, Arnoult D, Youle RJ. Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1644(2-3): 107-113.
- [22] Liao NF, Kuo CD, Yang YC, et al. Resveratrol enhances radio-sensitivity of human non-small cell lung cancer NCI-H838 cells accompanied by inhibition of nuclear factor-kappa B activation [J]. *Radiat Res(Tokyo)*, 2005, 46(4): 387-393.
- [23] Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, et al. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cell[J]. *Blood*, 1998, 92(3): 996-1002.

(编辑: 邓响潮)

甘草提取物对小鼠肝脏核因子 E2 相关因子 2 及其下游基因表达的影响

龚 慧^{1,2}, 颜 苗^{1,2}, 李焕德^{1,2}, 江 沛^{1,2}, 李瑞丰^{1,2}, 孙 莉^{1,2} (1. 中南大学湘雅二医院临床药学研究室, 湖南 长沙 410011; 2. 中南大学药学院, 湖南 长沙 410013)

摘要: **目的** 考察甘草提取物对核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)信号通路及其下游基因尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1(UGT1A1)、 γ 谷氨酰半胱胺酸合成酶(γ GCS)、多药耐药相关蛋白 1(MRP1)和多药耐药相关蛋白 2(MRP2)的影响。**方法** 12 只小鼠随机分为对照组和甘草提取物组(150 mg·kg⁻¹)。给药后 24 h 处死取肝组织, 采用 qRT-PCR 技术检测小鼠肝中 Nrf2、UGT1A1、 γ GCS、MRP1 和 MRP2 mRNA 的表达; Western blot 技术测定 Nrf2 蛋白的表达。**结果** 与对照组比较, 甘草提取物显著诱导了小鼠肝脏中 Nrf2 mRNA 和蛋白的表达, 同时 Nrf2 下游基因 UGT1A1、 γ GCS、MRP1 和 MRP2 mRNA 的表达也显著提高(均 $P < 0.05$)。**结论** 甘草提取物诱导了小鼠肝脏中 II 相解毒酶 UGT1A1、 γ GCS 及转运体 MRP1、MRP2, 其机制可能与上调 Nrf2 转录因子的表达, 激活 Nrf2 细胞信号转导通路有关。

关键词: 甘草; 核因子 E2 相关因子 2; 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1A1; γ 谷氨酰半胱胺酸合成酶; 多药耐药相关蛋白 1; 多药耐药相关蛋白 2

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)02-0135-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.006

Effects of Licorice Extract on Expression of Mice Hepatic Nuclear Factor E2 -related Factor 2 and Its Downstream Genes

GONG Hui^{1,2}, YAN Miao^{1,2}, LI Huande^{1,2}, JIANG Pei^{1,2}, LI Ruifeng^{1,2}, SUN Li^{1,2} (1. Clinical Pharmacy Institute,

收稿日期: 2013-11-01

作者简介: 龚慧, 女, 硕士研究生, 研究方向: 临床中药学。Email: feelgonghui@126.com。通讯作者: 李焕德, 教授, 博士生导师, 研究方向: 临床中药学。Email: lihuande1953@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81202985); 中央高校基本科研业务管理费中南大学青年教师助推项目(2012QNZT151)。

Xiangya Second Hospital of Central South University, Changsha 410011 Hunan, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410013 Hunan, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of licorice extract on the expression of mice hepatic nuclear factor E2-related factor 2(Nrf2) and its downstream genes of UDP- glucuronyl transferase 1A1(UGT1A1), gamma glutamyl-cysteine synthase(γ GCS), multidrug-resistance associated protein 1(MRP1) and multidrug-resistance associated protein 2(MRP2) in mice. **Methods** Twelve mice were randomly divided into control group and the licorice extract group($150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Mice were sacrificed to take the liver 24 hours after the medication. qRT-PCR was used to measure the expression of Nrf2, UGT1A1, γ GCS, MRP1 and MRP2 mRNA in mice liver. Western blotting methos was used to measure the protein expression of Nrf2. **Results** Compared to the control group, licorice extract significantly induced mRNA expression of Nrf2, UGT1A1, γ GCS, MRP1, MRP2 and the protein expression of Nrf2 ($P < 0.05$). **Conclusion** Licorice extract induces the expression of phase II detoxifying enzymes UGT1A1 and γ GCS as well as transporters MRP1 and MRP2. Its mechanism may be related with the induction of Nrf2 transcription factors and with the activation of Nrf2 cellular signal transduction pathways.

Keywords: Radix Glycyrrhizae; Nuclear factor E2-related factor 2; UDP- glucuronyl transferase 1A1; Gamma glutamyl-cysteine synthase; Multidrug-resistance associated protein 1; Multidrug-resistance associated protein 2

甘草具有调和诸药、解毒的作用,《神农本草经》将其列为“上品”,认为甘草可以缓解其他药物的毒性和烈性。目前,关于甘草与有毒中药共煎之后化学成分变化的研究较多^[1-2],而对药物体内过程影响的研究较少。II相解毒酶和转运体是决定药物体内过程的关键因素,它们的抑制或诱导作用是中药配伍应用时产生药动学相互作用的主要机制^[3]。核因子E2相关因子2(Nrf2)是碱性亮氨酸拉链核转录因子家族成员,在肝脏、肾脏、皮肤、肺、消化道等处高度表达,能与抗氧化反应元件(ARE)相互作用,调控ARE依赖的II相解毒酶和药物转运体的转录活性,在细胞的防御保护中发挥主要作用^[4]。因此,本文考察了甘草提取物对小鼠肝脏中Nrf2、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶1A1(UGT1A1)、 γ 谷氨酰半胱胺合成酶(γ GCS)、多药耐药相关蛋白1(MRP1)和多药耐药相关蛋白2(MRP2)表达的影响,从Nrf2信号转导通路调控的角度进一步阐述甘草与有毒中药的配伍减毒机制。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂 甘草水提取物,批号:20101011,购于西安瑞鸿生物技术有限公司,经本课题组测定^[5],甘草酸含量为10.75%;逆转录试剂盒,北京康为世纪公司,批号:03012013;Nrf2、UGT1A1、 γ GCS、MRP1、MRP2、 β -actin引物,上海生工生物工程公司;SYBGREEN PCR Master Mix,美国

Applied Biosystems Inc.,批号:4344463;ECL化学发光液,美国advansta公司,批号:121212-09;Nrf2抗体,美国Santa Cruz公司,批号:sc-722; β -actin抗体,美国proteintech公司,批号:sc-47778;碱性磷酸酶标记羊抗鼠IgG,美国Santa Cruz公司,批号:sc-2005;碱性磷酸酶标记羊抗兔IgG,北京康为世纪公司,批号:1313K。

1.2 动物 SPF级ICR小鼠12只,体质量18~22 g,雄性,购于湖南省斯莱克景达实验动物有限公司(许可证号:SCXK(湘)2011-0003)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物给药及取样 参考相关文献^[6-8]将12只小鼠随机分为对照组和甘草提取物组,每组6只。预实验发现 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量下小鼠肝脏组织中Nrf2蛋白表达显著增加,故甘草提取物组给药剂量设为 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。适应性喂养1周后,禁食不禁水12 h,灌胃给予药物或生理盐水,24 h后处死,迅速取出肝脏,置于液氮中保存。

1.3.2 qRT-PCR检测 见表1。根据操作说明,采用Trizol提取肝脏组织中的总RNA,逆转录以总RNA 1 μL 为模板,加入1 μL Random primer,10 μL 无菌DEPC处理水,先70℃加热5 min,迅速插入冰中冷却;再依次加入5 $\times$ Reaction buffer 4 μL , dNTP 2 μL , RNase inhibitor 1 μL , 37℃加热5 min;再加入1 μL M-MLV逆转录酶,42℃反应1.5 h;72℃反应10 min,合成cDNA链。PCR反应以总RNA 1 μg

表 1 qRT-PCR 分析中使用的引物

Table 1 Primers for qRT-PCR analysis

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
β-actin	CATCCTGCGTCTGGACCTGG	TAATGTCACGCACGATTTC
Nrf2	TAGTGCCCTGGAAGTCTCA	TTGGGATTCACGCATAGGAG
UGT1A1	CCTTCTGTTGCTGTGTTCCG	TGGAGCTGCTGAATAACTC
γ GCS	GCCACTGAGCTGGGAAGA	TCCTTGACTGCGTGGTAGA
MRP1	GAGCGGAGGTGATCAAGAG	TGATGCCATTCACTGCTGGAGGT
MRP2	CGCGTCCGCCAGTATATGA	ATAATCTTTGACTCAGTGTGGA

为模板，加入上下游引物 10 μmol·L⁻¹ 各 0.5 μL，PCR H₂O 13 μL，2× SYBGREEN PCR Master Mix 15 μL，共 30 μL 体系。PCR 条件为 95 ℃ 预变性 10 min，95 ℃ 变性 15 s，60 ℃ 退火 1 min。扩增循环数为 40。

1.3.3 Western blot 检测 剪取 0.25 g 的组织块加入玻璃匀浆器内，加 500 μL RIPA 裂解液，匀浆，冰上放置 30 min，离心分离(12000 r·min⁻¹，5 min)含蛋白的上清。依据 BCA 蛋白定量试剂盒使用说明操作，测得蛋白浓度。配制 SDS-PAGE 胶，以每泳道 50 μg 上样，经过电泳后，在合适位置切下胶块，湿法转移至 PVDF 膜。用 TBST 配制 5 % 脱脂奶粉，将膜浸入后，室温放置 1 h，加入 Nrf2 一抗(1 : 500)，4 ℃ 冰箱孵育过夜，洗涤后加入 HRP 标记的二抗(1 : 3000)室温孵育 60 min，使用 ECL 化学发光液，在暗盒内与 X 胶片曝光数秒后显影冲洗。

1.4 统计学处理方法 采用 SPSS19.0 统计软件，实验所得数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，组间比较采用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 判定为差异有统计学意义。

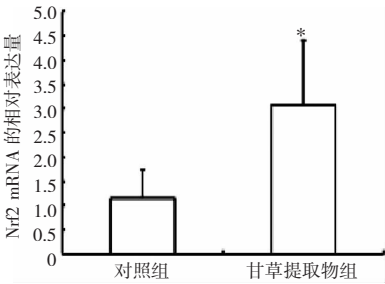
2 结果

2.1 Nrf2 mRNA 及蛋白表达检测 见图 1~图 2。与对照组比较，甘草提取物显著诱导了小鼠肝脏中 Nrf2 mRNA 及 β-actin 蛋白表达，差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

2.2 UGT1A1、γGCS、MRP1 及 MRP2 的 mRNA 表达 见图 3。与对照组比较，甘草提取物显著诱导了小鼠肝脏组织中 UGT1A1、γGCS、MRP1 和 MRP2 mRNA 的表达(*P* < 0.05)。

3 讨论

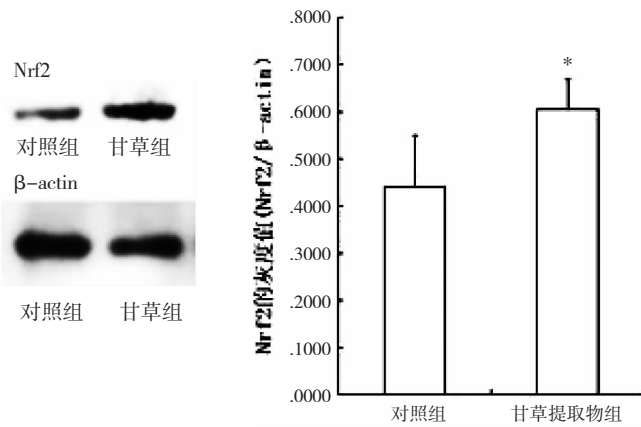
Nrf2 是调控细胞对抗外来异物和氧化损伤的关键转录因子，在药理学和毒理学研究领域越来越受到重视^[9]。研究发现 Nrf2 基因敲除小鼠胃中 GST 和 NQO1 的水平较 Nrf2 野生型小鼠降低了 50 %~80 %，



注：与对照组比较，**P* < 0.05。

图 1 两组小鼠肝脏中 Nrf2 mRNA 的相对表达量(*n*=6)

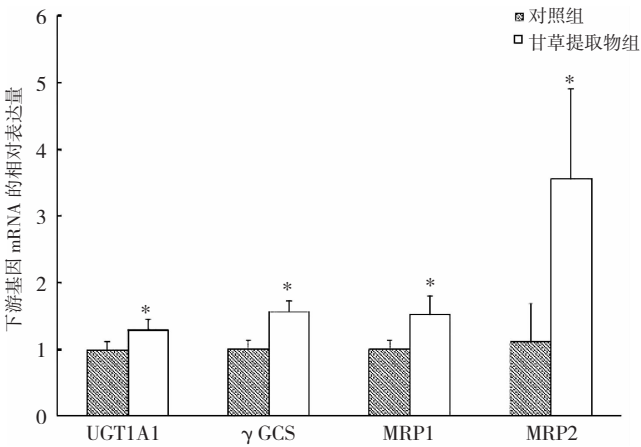
Figure 1 Relative mRNA expression of Nrf2 in livers of the 2 groups



注：与对照组比较，**P* < 0.05。

图 2 小鼠肝脏 Nrf2 和 β-actin 蛋白相对表达量(*n*=6)

Figure 2 The expression of Nrf2 and β-actin protein in livers of mice



注：与对照组比较，**P* < 0.05。

图 3 两组小鼠肝脏中 UGT1A1、γGCS、MRP1 和 MRP2 mRNA 的相对表达量(*n*=6)

Figure 3 Relative mRNA expression of UGT1A1、γGCS、MRP1 and MRP2 in livers of the 2 groups

给予小鼠苯并芘(Bp)后，Nrf2 基因敲除小鼠胃中的 BP-DNA 加合物较野生型小鼠多，而提前给予 Nrf2

诱导剂奥替普拉可以降低野生型小鼠细胞内 BP-DNA 加合物水平,提示 Nrf2 可以通过调控 ARE 依赖的基因表达,加快 BP-DNA 加合物的处置,从而保护机体免受 Bp 有毒物质的损害^[10-11]。因此本研究考察了甘草提取物对小鼠肝脏组织中 Nrf2 表达量的影响。研究结果显示,甘草提取物同时诱导了 Nrf2 的 mRNA 表达和蛋白表达($P < 0.05$)。有文献报道^[12-13],部分 Nrf2 的激活剂,如 tBHQ,未提高 Nrf2 的转录表达,而是通过抑制 Nrf2 蛋白降解,以增加其稳定性来激活 Nrf2 信号通路。

有毒物质在体内一般经历 I 相和 II 相代谢两个过程。一般认为,II 相代谢反应是真正的解毒途径,它生成药物的非活性形式从而促进其排出体外。葡萄糖醛酸结合反应是最常见的 II 相代谢反应,在 II 相生物转化中占 35 % 以上^[14],由葡萄糖醛酸转移酶(UGTs)催化完成。UGT1A1 是其中重要亚型,催化葡萄糖醛酸与内源性化学物质(如胆红素、胆汁酸等)或外源性物质(如药物)发生结合反应,增加其水溶性,促进体内排泄,是人体解毒的重要途径之一^[15]。 γ GCS 是 GSH 合成的限速酶,它的数量和活性调控着 GSH 的合成速度,在机体解毒方面起着重要作用^[16]。本研究数据显示,甘草提取物在转录水平显著诱导了 II 相代谢酶 UGT1A1 和 γ GCS,促进毒物在体内的代谢,有利于解毒。

MRP 属于 ATP 结合盒式转运体(ATP-binding-cassette transporter, ABC 转运体)超家族,分为 MRP1、MRP2 等亚型。MRP1、MRP2 在体内主要介导结合物(如:葡萄糖醛酸结合物、谷胱甘肽结合物)转运入胆汁或尿液中,将胆汁和血液中的有毒物质及相关代谢产物迅速去除,从而起到解毒的作用。由于 MRP1、MRP2 在体内介导的结合物与 II 相代谢酶 UGT1A1 和 γ GCS 密切相关,继而对此两个转运体也进行了考察。本研究显示,甘草提取物可以提高 MRP1、MRP2 mRNA 的表达,促进毒物在体内的排泄。

综上所述,甘草提取物可能通过诱导 Nrf2,实现对 UGT1A1、 γ GCS、MRP1 和 MRP2 表达的调控,从而加速毒物在体内的代谢和排泄的过程,达到减少毒物毒性的效果。

参考文献:

[1] 郭盛,唐于平,宿树兰,等.近年来中药配伍减毒的现代研究进

展[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(10):74.

- [2] 杨明,刘小彬,黄庆德. 附子甘草配伍解毒增效机理探析[J]. 时珍国医国药,2003,14(4):197.
- [3] 高月,马增春,张伯礼. 中药大品种二次开发的安全性关注及再评价意义[J]. 中国中药杂志,2012,37(1):1-4.
- [4] Shen G, Kong AN. Nrf2 plays an important role in coordinated regulation of Phase II drug metabolism enzymes and Phase III drug transporters[J]. Biopharm Drug Dispos, 2009, 30(7): 345-355.
- [5] 邓阳,丁雯雯,颜苗,等. HPLC 法测定甘草制剂中甘草酸的含量[J]. 湖南中医杂志,2013,29(8):126-129.
- [6] Tao J, Zhe PH, Jefferson YC, et al. Nrf2 protects against As(III)-induced damage in mouse liver and bladder [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2009, 240: 8-14.
- [7] Jia WY, Jing Liu, Xiang-Zhen Kong, et al. Induction of activation of the antioxidant response element and stabilization of Nrf2 by 3-(3-pyridylmethylidene)-2-indolinone(PMID) confers protection against oxidative stress-induced cell death[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2012, 259: 227-235.
- [8] Melinda SY, Quynh TT, Patri ck MD, et al. Genetic versus chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid-treated mice [J]. Carcinogenesis, 2009, 30(6): 1024-1031.
- [9] Paul J, Alice L, Luca F, et al. An overview of transcriptional regulation in response to toxicological insult[J]. Arch Toxicol, 2013, 87(1): 49-72.
- [10] Ramos-Gomez M, Kwak MK, Dolan PM, et al. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 3410-3415.
- [11] Ramos-Gomez M, Dolan PM, Itoh K, et al. Interactive effects of nrf2 genotype and oltipraz on benzo[a]pyrene-DNA adducts and tumor yield in mice[J]. Carcinogenesis, 2003; 24: 461-467.
- [12] Hu Q, Zhang DD, Wang L, et al. Eriodictyol-7-O-glucoside, a novel Nrf2 activator, confers protection against cisplatin-induced toxicity[J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(6): 1927-1932.
- [13] Du Y, Villeneuve NF, Wang XJ, et al. Oridonin confers protection against arsenic-induced toxicity through activation of the Nrf2-mediated defensive response[J]. Environ Health Perspect, 2008, 116(9): 1154-1161.
- [14] shii Y, Nurrochmad A, Yamada H. Modulation of UDP-glucuronosyltransferase activity by endogenous compounds[J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2010, 25(2): 134-148.
- [15] Court MH. Interindividual variability in hepatic drug glucuronidation: studies into the role of age, sex, enzyme inducers, and genetic polymorphism using the human liver bank as a model system[J]. Drug Metab Rev, 2010, 42(1): 209-224.
- [16] Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathionein lung inflammation[J]. Eur Respir J, 2000, 16(3): 534-554.

(编辑:邓响潮)