

人参皂苷 Rb1 激活 Nrf2/ARE 通路对术后疲劳综合征老年大鼠骨骼肌氧化应激损伤的影响

毛翔宇 庄成乐 陈伟哲 刘 舒 朱 江 吴天添 张昌静 陈必成 余 震

摘 要 **目的** 研究人参皂苷 Rb1 激活 Nrf2/ARE 通路来减轻术后疲劳综合征老年大鼠骨骼肌氧化应激损伤,探讨人参皂苷 Rb1 的抗疲劳机制。**方法** 以 70% 中段小肠切除用以制备术后大鼠疲劳综合征模型。老年 SD 大鼠随机分为对照组、模型组和人参皂苷 Rb1 干预组,每组再分别按时间点分为术后 6h,第 1、3、7 天组。在术后对应时间点进行旷场实验检测行为学变化后取骨骼肌,分光光度法测超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量,RT-PCR 检测 Nrf2 及下游 II 相解毒酶基因 Nqo1 表达。Western blot 检测 Nrf2 核转位情况。**结果** 旷场实验显示,相比于对照组,模型组术后穿越格子数降低(第 1、3 天, $P < 0.05$),休息时间增加(第 1、3、7 天, $P < 0.05$);相比于模型组,干预组穿越格子数术后增加(第 1、3 天, $P < 0.05$)。相比于对照组,模型组 SOD 活性在术后增加(第 3、7 天, $P < 0.05$),MDA 含量增加(第 1、3、7 天, $P < 0.05$);相比于模型组,干预组 SOD 活性术后增加(第 3、7 天, $P < 0.05$),MDA 含量术后降低(第 3、7 天, $P < 0.05$)。RT-PCR 结果表明,相比于对照组,模型组 Nrf2 术后表达增加(第 1、3 天, $P < 0.05$),Nqo1 术后表达有上升倾向(第 1、3 天, $P > 0.05$);相比于模型组,干预组 Nrf2 术后表达增加(6h、第 1 天、第 3 天, $P < 0.05$),Nqo1 表达增加(6h、第 1 天, $P < 0.05$)。Western blot 结果表明,相比于对照组,模型组核内 Nrf2 术后表达增加(6h、第 1、3、7 天, $P < 0.05$);相比于模型组,干预组核内 Nrf2 术后表达增加(6h、第 1 天、第 3 天, $P < 0.05$)。**结论** 通过激活 Nrf2/ARE 通路,人参皂苷 Rb1 能减轻老年大鼠术后疲劳综合征骨骼肌氧化应激所致损伤,这可能是其抗术后疲劳的一种机制。

关键词 人参皂苷 Rb1 术后疲劳综合征 Nrf2/ARE 信号通路 老年大鼠 氧化应激

[中图分类号] R393 [文献标识码] A

Effects of Ginsenoside Rb1 on the Oxidative Stress in the Skeletal Muscles of Elderly Rats with Postoperative Fatigue Syndrome via Nrf2 - ARE Activation. Mao Xiangyu, Zhuang Chengle, Chen Weizhe, et al. Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To investigate the effects of ginsenoside Rb1 on the oxidative stress in the skeletal muscles of elderly rats with postoperative fatigue syndrome (POFS) via the activation of Nrf2/ARE signal pathway and the antifatigue mechanism of ginsengsides Rb1. **Methods** We chose resection of 70% of the "middle" small intestine as the rat model for POFS. Elderly male SD rats were randomly divided into control group (group C), POFS model group (group P) and ginsengsides Rb1 intervention group (group G), and each group were divided into subgroups by postoperative 6 hours and 1, 3, 7 days. The skeletal muscles were removed at each time point after open field test (OFT) to detect the activities of superoxide dismutase (SOD) and the contents of malonaldehyde (MDA), to detect the levels of nuclear factor erythroid2 - related factor (Nrf2), and the phase II detoxifying enzyme gene NADP(H): (quinine oxidoreductase1 (Nqo1) mRNA by Real-time PCR. Nrf2 translocation was detected by Western blot. **Results** In open-field test, compared with group C, total journey of group P decreased (day 1, day 3, $P < 0.05$), resting time increased (day 1, day 3, day 7, $P < 0.05$). Compared with the group P, total journey of group G increased (day 1, day 3, $P < 0.05$). Compared with the group C, the activities of superoxide dismutase (SOD) of group P increased (day 3, day 7, $P < 0.05$) and the contents of malonaldehyde (MDA) increased (day 1, day 3, day 7, $P < 0.05$). Compared with the group P, the SOD of group P increased (day 3, day 7, $P < 0.05$) and MDA decreased (day 3, day 7, $P < 0.05$). Compared with group C, level of Nrf2 mRNA of group P increased (day 1, day 3, $P < 0.05$), level of Nqo1 mRNA of group P had an upward trend (day 1, day 3, $P > 0.05$) without statistical significance. Compared with the group P, level of Nrf2 mRNA of group G increased (6h, day 1, day 3, $P < 0.05$), level of Nqo1 mRNA of group G increased (6h, day 1, $P < 0.05$). Compared with the group C,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171857)

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院胃肠外科(毛翔宇、庄成乐、陈伟哲、刘舒、朱江、吴天添、张昌静),外科学实验室(陈必成); 200072 上海,同济大学附属第十医院(上海市第十人民医院)普外科(余震)

通讯作者:余震,电子信箱:yuzhen0577@gmail.com.cn

nucleus protein of Nrf2 of group P increased (6h, day 1, day 3, day 7, $P < 0.05$). Compared with the group P, nucleus protein of Nrf2 of group G increased (6h, day 1, day 3, $P < 0.05$). **Conclusion** Ginsenoside Rb1 could reduce the oxidative stress mediated injury in the skeletal muscles in elderly rats with POFS via Nrf2/ARE signal pathway, which may be one of the mechanisms against POFS.

Key words Ginsenoside Rb1; Postoperative fatigue syndrome; Nrf2/ARE signal pathway; elderly rat; Oxidative stress

术后疲劳综合征 (postoperative fatigue syndrome, POFS) 为手术后常见的一种并发症, 多发生于腹部大手术, 它的产生对患者的术后康复速度和质量的很大影响^[1]。老年患者因其特殊的生理代谢状态以及较高的慢性疾病发生率使其抵御有害刺激的能力相对较弱。通过临床观察, 笔者发现这类人群腹部大手术后疲劳感甚为突出, 术后康复时间增加, 质量下降^[3]。基于此, 减轻老年人 POFS, 加速术后恢复一直是外科领域研究的突出点。本课题组前期研究表明, 人参皂苷 Rb1 可以通过降低骨骼肌氧化应激损伤并提高抗氧化酶活性及增强骨骼肌能力而产生抗术后疲劳效果, 但其具体机制并不为人所知^[3]。Nrf2/ARE 是至今发现的最重要的一条抗氧化通路, 激活该通路可使机体产生相应抗的氧化酶和 II 相药物代谢酶, 从而加强细胞清除活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的能力, 保持氧化还原平衡, 减低氧化损伤。有研究报道, 在人多巴胺能细胞中, 通过激活 Nrf2/ARE, 人参皂苷 Rb1 能降低 6-OHDA 所致的氧化应激损伤^[5]。因此, 本研究在前期研究的基础上, 欲进一步探究 Nrf2/ARE 通路在人参皂苷 Rb1 减轻 POFS 老年大鼠骨骼肌氧化应激损伤中的具体效应, 挖掘人参皂苷 Rb1 的抗疲劳机制。

材料与方法

1. 材料: (1) 药物与试剂: 人参皂苷 Rb1 (纯度 $\geq 98.0\%$) (同田生物技术有限公司), MDA、SOD 试剂盒 (建成生物工程有限公司), RT、SYBR Green 试剂盒 (TOYOBO 公司), Trizol (life technology 公司), 兔抗 Nrf-2 GAPDH lamin B1 多克隆抗体 (Abcam 公司), 山羊抗兔 IgG/HRP 二抗 (Biosharp 公司), 兔二步法检测试剂盒和 DAB 显色试剂盒 (中杉金桥有限公司), 其余试剂购于金山试剂有限公司, 均为分析纯。(2) 动物: SPF 级老年雄性 SD 大鼠, 体重 650 ~ 750g, 购自维通利华实验动物有限公司, 饲养于温州医科大学外科学实验室至 22 个月龄。本研究通过温州医科大学伦理委员会审核, 全程遵守《实验动物管理条例》。

2. 方法: (1) 动物分组与模型制备: 96 只大鼠被随机分为 3 组, 分别为假手术对照组, POFS 模型组和人参皂苷 Rb1 干预组, 每组再按时间点分为术后 6h, 第 1、3、7 天 4 小组, 共 12 组。对照组大鼠进腹腔后翻动肠袢后关腹, 模型组和干预组大鼠行 70% 中段小肠切除以制作 POFS 大鼠模型^[7]。(2) 给药: 干预组大鼠术前 3 天知道取材当天, 以 4ml/kg 体重比, 每

日腹腔内注射 1 次的人参皂苷 Rb1 (生理盐水稀释至 3.75g/L)。对照组和模型组则腹腔内注射相同比例生理盐水。(3) 疲劳评估: 采用旷场实验^[8]。实验装置大小为 150cm × 150cm × 60cm, 内面黑色的木制无盖方箱, 底部划为 30cm × 30cm 的方格。实验在安静, 微光的房间进行。将大鼠放于中心方格并开始记录其经过的格子数, 直立次数、修饰时间、休息时间, 整个过程历时 3min。(4) 标本采集: 各组完成旷场实验后, 按照 3.5ml/kg 体重予 2% 戊巴比妥钠腹部皮下注射, 麻醉完成后立即取左下肢腓肠肌若干并于 4℃ 预冷的生理盐水清洗干净, 滤纸吸干, 分装于液氮中, 30min 后转至 -80℃ 超低温冰箱保存。(5) 指标测定: 1) 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量检测: 取出部分待测骨骼肌组织, 称重。以质量体积比 1:9 加生理盐水, 制备 10% 组织匀浆, 2000r/min 离心 10min 后取上清液。然后根据试剂盒说明书, 用生理盐水将上清液按不同指标稀释成最佳测试浓度并检测。匀浆蛋白浓度的测定采用 BCA 测定法。2) RT-PCR 检测骨骼肌 Nrf2 及 Nqo1 mRNA 表达水平: 取出部分待测骨骼肌组织, 称重, Trizol 等提取 RNA, 紫外分光光度法测 RNA 量及其纯度, 按照反转录试剂盒操作步骤行反转录 (RT) 反应。所得 cDNA 于 RT-PCR 仪上进行反应。 β -actin 引物序列: 正义引物 5'-GACAGGATGCAGAAGGAGATTACT-3', 反义引物 5'-TGATCCACATCTGCTGGAAGGT-3'; Nrf2 引物序列: 正义引物 5'-ATGAGTCGCTTGCCCTGG-3', 反义引物 5'-CTT-GTTTCCGTATTAAGACACTGTAA-3'; Nqo1 引物序列: 正义引物 5'-CTTGCTTTCCATCACCACCG-3', 反义引物 5'-GACGCTTCTTCCACCCTTCC-3'。反应条件为: 95℃ 1min; 40 个循环 (95℃ 15s, 60℃ 15s, 72℃ 45s), 总延伸结束后, 进行融解曲线分析, 产物电泳。统计 $\Delta\Delta Ct$ 值并比较各组 mRNA 的表达情况。3) Western blot 检测: 取出部分待测骨骼肌组织, 根据核蛋白试剂盒提取核蛋白, RIPA 法提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。每孔上样 30 μ g, 8% SDS-PAGE 电泳后, 转膜, 封闭。膜于 5% 脱脂牛奶中的一抗于 4℃ 孵育过夜。然后洗膜并将其置入二抗稀释液中室温孵育 1h。ECL 试剂加入后曝光, 显影, 定影, 凝胶成像分析仪分别测算目的蛋白与内参蛋白灰度值, 并将其比值作为蛋白表达量。

3. 统计学方法: SPSS 19.0 统计软件进行统计分析, 实验数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较用单因素方差分析, 组间的两两比较, 方差齐性采用 LSD 检验, 方差不齐采用 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 人参皂苷 Rb1 干预对 POFS 老年大鼠行为学的影响: 相比于对照组, 模型组于术后第 1、3 天穿越

格子数降低 ($P < 0.05$), 第 7 天开始恢复, 第 1、3、7 天休息时间增加 ($P < 0.05$)。相比于模型组, 干预组于术后第 1、3 天穿越格子数开始增加 ($P < 0.05$), 第 7 天恢复至模型组水平。

2. 人参皂苷 Rb1 干预对 POFS 老年大鼠骨骼肌 SOD 活性和 MDA 含量的影响: 相比于对照组, 模型组 SOD 活性于术后第 1 天有增加趋势, 第 3、7 天明显增加 ($P < 0.05$), MDA 含量于术后 6h 有增加趋势, 于第 1、3、7 天明显增加 ($P < 0.05$); 相比于模型组, 干预组 SOD 活性于术后 6h, 第 1 天有增高趋势, 并于第 3、7 天开始明显增高 ($P < 0.05$), MDA 含量术后 6h 基本一致, 第 1 天有降低趋势, 并于第 3、7 天明显下降 ($P < 0.05$)。

3. 人参皂苷 Rb1 对 Nrf2 及其下游靶基因 Nqo1 mRNA 表达水平的影响: 相比于对照组, 模型组大鼠骨骼肌 Nrf2 mRNA 表达量于第 1、3 天时增加, 第 7 天时恢复至对照组水平, 下游靶基因 Nqo1 mRNA 在 6h 时表达量降低 ($P < 0.05$), 并于第 1、3 天时有增加趋势 ($P > 0.05$), 第 7 天恢复至对照组水平。相比于模型组, 干预组 Nrf2 mRNA 表达水平于术后 6h 及第 1、3 天时增高 ($P < 0.05$), 第 7 天恢复至模型组水平, 而 Nqo1 mRNA 于术后 6h 及第 1 天明显增加 ($P < 0.05$), 第 3、7 天时恢复至模型组水平, 结果见表 1。

表 1 人参皂苷 Rb1 对 POFS 大鼠骨骼肌 Nrf2 及 Nqo1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	时间	Nrf2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	Nqo1 ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
对照	术后 6h	1.07 ± 0.44	1.02 ± 0.23
	术后第 1 天	1.06 ± 0.37	1.05 ± 0.37
	术后第 3 天	1.05 ± 0.35	1.05 ± 0.31
	术后第 7 天	1.06 ± 0.48	1.03 ± 0.26
模型	术后 6h	0.97 ± 0.34	0.62 ± 0.25 [*]
	术后第 1 天	3.30 ± 0.84 [*]	1.34 ± 0.46
	术后第 3 天	1.61 ± 0.48 [*]	1.45 ± 0.48
	术后第 7 天	0.99 ± 0.25	1.04 ± 0.25
人参皂苷 Rb1 干预	术后 6h	1.53 ± 0.49 [#]	1.06 ± 0.32 [#]
	术后第 1 天	5.72 ± 1.37 [#]	2.67 ± 0.76 [#]
	术后第 3 天	2.45 ± 0.70 [#]	1.41 ± 0.57
	术后第 7 天	0.95 ± 0.37	0.94 ± 0.26

与对照组同期相比, ^{*} $P < 0.05$; 与模型组同期相比, [#] $P < 0.05$

4. 人参皂苷 Rb1 对骨骼肌 Nrf2 活化与转位的影响: 相比于对照组, 模型组大鼠骨骼肌核内 Nrf2 蛋白术后各个时间点表达量均增加 ($P < 0.05$), 总 Nrf2 蛋白于术后 6h, 第 1、3 天表达量明显增加 ($P < 0.05$), 第 7 天时恢复至对照组水平; 相比于模型组,

干预组核内 Nrf2 蛋白术后 6h, 第 1、3 天表达量明显增加 ($P < 0.05$), 第 7 天恢复至模型组水平; 总 Nrf2 蛋白术后 6h, 第 1 天表达量开始增加 ($P < 0.05$), 第 3、7 天时恢复至模型组水平。结果见图 1、图 2。

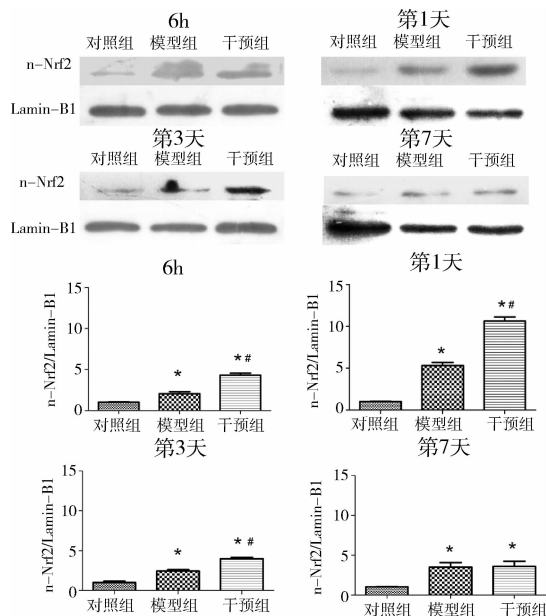


图 1 人参皂苷 Rb1 对核内 nrf2 蛋白表达的影响

与对照组同期比较, ^{*} $P < 0.05$; 与模型组同期比较, [#] $P < 0.05$

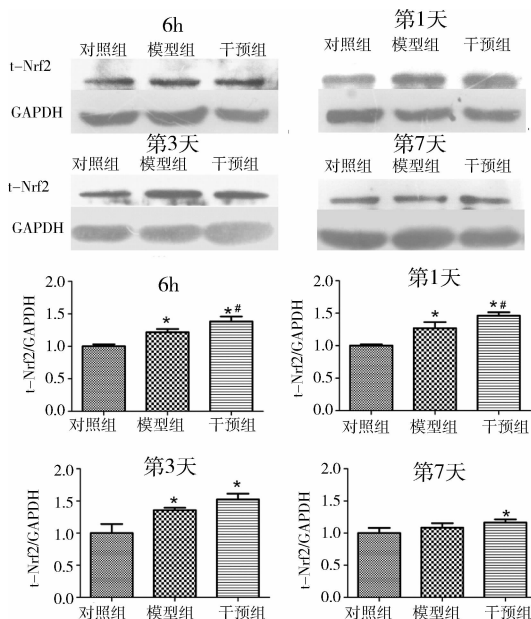


图 2 人参皂苷 Rb1 对总 nrf2 蛋白表达的影响

与对照组同期比较, ^{*} $P < 0.05$; 与模型组同期比较, [#] $P < 0.05$

讨 论

术后疲劳综合征其按部位分为外周疲劳和中枢疲劳, 其中外周疲劳主要表现为骨骼肌功能下降^[8]。

有研究发现,骨骼肌 ROS 的过度生成使得骨骼肌运动功能降低,它是骨骼肌疲劳的重要产生原因^[9]。MDA 是机体内脂质过氧化的代谢产物,是间接反映氧自由基对机体的损伤程度的重要指标。而 SOD 作为其中一种重要的抗氧化酶,其活力则间接说明机体抗氧化能力的强弱。本课题组前期研究结果显示,POFS 大鼠骨骼肌存在着显著的氧化应激性导致的损伤,而通过提高抗氧化酶活性,减轻氧化应激损伤等作用,人参皂苷 Rb1 增强了骨骼肌功能从而发挥其抗疲劳的作用^[3]。

本实验研究结果表明,模型组大鼠术后穿越格子数减少,休息时间增加;干预组大鼠穿越格子数增加,表明老年大鼠在小肠切除术后出现记忆力学习力减退的症状,处于显著的疲劳状态,与临床上术后病人出现的体力下降,倦怠不适等疲劳症状较为相似,而人参皂苷 Rb1 则可明显改善上述症状。模型组大鼠 MDA 含量在术后增加,SOD 活性同时增加,干预组大鼠较模型组 MDA 含量明显降低,SOD 活性则明显增加。这说明大鼠术后骨骼肌抗氧化应激能力下降并伴随明显的氧化应激所致的损伤,而人参皂苷 Rb1 则对此种氧化损伤具有明显保护作用。这与本课题组前期研究结果相似。

Nrf2 是一种重要的转录因子,它能促使细胞活性氧降低并抵御有害的外来刺激。在生理状态下,胞质中的 Kelch 样 ECH 联合蛋白 1 (Keap1) 联结在 Nrf2 上,使之失活,而 Nrf2 再被诱导激活后,其与 Keap1 分离并转入细胞核,识别并结合一系列抗氧化反应元件 (ARE),ARE 能启动下游相应的 II 相解毒酶基因等的表达,这类基因的表达上升能诱导细胞内一些重要抗氧化物质 (如 SOD、CAT、GSH 等) 的表达,这进而提升了外源性毒性物质和自由基的清除与代谢^[11]。而作为 Nrf2 驱动的重要下游靶基因之一,NAD(P)H 醌氧化还原酶 (Nqo1) 是抗氧化应激损伤的代表性组成部分^[12]。

研究表明,白藜芦醇能够上调 Nrf2 表达来促进 SOD、CAT 等抗氧化酶的水平,这些反应能减轻大鼠原代肝细胞的氧化应激损伤^[12]。还有研究发现,在氟中毒早期,机体能通过启动 Nrf2/ARE 通路,增加 SOD、CAT、GSH-Px 等抗氧化酶的表达,从而提高细胞抵御氧化应激的能力,最终减少机体的氧自由基^[13]。本实验研究结果表明,在术后一定时间内,模型组大鼠骨骼肌 Nrf2 mRNA 表达显著增加,Nrf2 核蛋白与总蛋白表达量均增加,而核蛋白尤为显著,而

Nqo1 mRNA 表达有一定增加趋势,这表明了 POFS 所产生的应激状态下,机体在 Nrf2/ARE 及其下游通路被激活后抗氧化能力增强,这可能是一种机体自身的代偿性保护机制。人参是一种著名的中药,在抗疲劳、调节中枢神经及物质代谢等多方面均有显著功效^[15]。人参皂苷 Rb1 是其具有显著抗氧化作用的重要的有效成分之一。有研究显示,通过启动 Nrf2/ARE 通路,人参皂苷 Rb1 能够减少小肠缺血再灌注所致的肾脏损伤^[16]。本研究结果显示,与模型组相比,干预组大鼠骨骼肌 Nrf2 mRNA 表达于术后明显增加,Nrf2 核内蛋白与总蛋白表达量均增加,而尤以核蛋白增加较为显著,而 Nqo1 mRNA 表达明显增加,证实人参皂苷 Rb1 可上调 POFS 大鼠骨骼肌 Nrf2/ARE 通路及其下游基因的表达,发挥其抗氧化应激损伤和细胞保护的作用。

综上所述,术后一段时间内,通过激活 Nrf2/ARE 通路,人参皂苷 Rb1 能降低 POFS 老年大鼠骨骼肌氧化应激所致的损伤,从而发挥抗术后疲劳作用。

参考文献

- 1 Zargar - Shoshtari K, Hill AG. Postoperative fatigue: a review [J]. World J Surg, 2009, 33(4): 738 - 745
- 2 DeCherney AH, Bachmann G, Isaacson K, et al. Postoperative fatigue negatively impacts the daily lives of patients recovering from hysterectomy [J]. Obstet Gynecol, 2002, 99(1): 51 - 57
- 3 Tan S, Zhou F, Li N, et al. Anti-fatigue effect of ginsenoside Rb1 on postoperative fatigue syndrome induced by major small intestinal resection in rat [J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36(10): 1634 - 1639
- 4 Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, et al. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury [J]. FEBS Lett, 2005, 579(14): 3029 - 3036
- 5 Hwang YP, Jeong HG. Ginsenoside Rb1 protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing heme oxygenase-1 expression through an estrogen receptor-related PI3K/Akt/Nrf2-dependent pathway in human dopaminergic cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 242(1): 18 - 28
- 6 Zhang XD, Chen BC, Dong QT, et al. Establishment and assessments of a new model for the postoperative fatigue syndrome by major small intestinal resection in rats [J]. Scand J Gastroenterol, 2011, 46(11): 1302 - 1309
- 7 Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, et al. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2001, 25(3): 235 - 260
- 8 Christensen T, Kehlet H. Postoperative fatigue [J]. World J Surg, 1993, 17(2): 220 - 225
- 9 Allen DG, Lamb GD, Westerblad H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms [J]. Physiol Rev, 2008, 88(1): 287 - 332

- 10 Zhang H, Liu H, Davies KJ, *et al.* Nrf2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(9): 2038-2046
 - 11 Kim HJ, Zheng M, Kim SK, *et al.* CO/HO-1 induces NQO-1 expression via Nrf2 activation[J]. *Immune Netw*, 2011, 11(6): 376-382
 - 12 Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 591(1-3): 66-72
 - 13 Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity[J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 188(2): 319-333
 - 14 Ma Q, Kinneer K, Bi Y, *et al.* Induction of murine NAD(P)H:quinone oxidoreductase by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin requires the CNC (cap 'n' collar) basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2): cross-interaction between AhR (aryl hydrocarbon receptor) and Nrf2 signal transduction[J]. *Biochem J*, 2004, 377(Pt 1): 205-213
 - 15 Glenn MB, Lexell J. Ginseng[J]. *J Head Trauma Rehabil*, 2003, 18(2): 196-200
 - 16 Sun Q, Meng QT, Jiang Y, *et al.* Ginsenoside Rb1 attenuates intestinal ischemia reperfusion induced renal injury by activating Nrf2/ARE pathway[J]. *Molecules*, 2012, 17(6): 7195-7205
- (收稿日期: 2013-10-19)
(修回日期: 2013-12-10)

3-甲基腺嘌呤诱发 HeLa 细胞自噬及抑制辐照细胞自噬的双重作用

杨艳丽 刘 玲 王 豫 刘晓丹 周平坤

摘 要 目的 了解 PI₃K 抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)对电离辐射后细胞自噬的影响,初步探讨作用机制。方法 细胞增殖-毒性试剂盒 CCK-8 检测不同浓度 3-MA 处理及 ⁶⁰Co γ 射线 4Gy 照射或联合 3-MA 作用的 HeLa 细胞细胞生长变化和毒性,Annexin V-FITC/PI 双标记检测细胞凋亡,Western blot 检测自噬相关蛋白 SQSTM1/p62 表达, Lipofectamine 2000 介导转染 GFP-LC3 质粒,共聚焦显微镜检测自噬体形成。结果 3mmol/L 以上浓度 3-MA 作用 24h 对 HeLa 细胞增殖有明显的抑制作用,作用更长时间产生致死毒性效应。无论是 5mmol/L 3-MA 单独作用还是单独 4Gy 照射,均能诱发 HeLa 细胞自噬。但 3-MA 与(射线辐照联合作用时,HeLa 细胞自噬受到抑制,细胞凋亡显著增加。结论 PI₃K 抑制剂 3-MA 既诱发细胞自噬又能抑制电离辐射诱发细胞自噬,以在不同的条件下两种方式影响细胞存活。

关键词 3-甲基腺嘌呤 细胞自噬 细胞凋亡 细胞存活

[中图分类号] R393 [文献标识码] A

Dual Effects of 3-Methyladenine on HeLa Cells Autophagy: Induction by the Action Alone and Inhibition on Autophagy Induced by Ionizing Radiation. Yang Yanli, Liu Ling, Wang Yu, *et al.* University of South China, Hunan 421001, China

Abstract Objective To investigate the cell survival effect of phosphoinositide 3-kinase (PI₃K) inhibitors 3-Methyladenine (3-MA) in response to ionizing radiation (IR) and the possible mechanism. **Methods** Firstly, HeLa cells were treated with 3-MA in different concentration, cell counting Kit-8 (CCK-8) assay were used to detect the viability rate. Afterwards, HeLa cells were either treated with 5mmol/L 3-MA or not treated, then irradiated with ⁶⁰Co γ-ray, cultivated for a certain time, cell counting kit-8 (CCK-8) assay and annexin V-FITC/PI double staining were used respectively to detect the viability rate and observe apoptosis rate in order to make a clear understanding about the cell proliferation toxic-effect of 3-MA and IR. The GFP-LC3 puncta were examined under a confocal microscope after transfect GFP-LC3 by lipofectamin 2000. Western blot was performed to explore the expressions of autophagy-related proteins SQSTM1/p62. **Results** The proliferation inhibition and cytotoxicity of 3-MA were demonstrated after the treatment for more than 24h at the concentration 3mmol/L and higher. 5mmol/L 3-MA action alone can induce HeLa cells autophagy. However, 5mmol/L 3-MA can inhibit the 4Gy γ-ray-induced HeLa cell autophagy, and promote the apoptosis. **Conclusion** The cell survival

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31370843)

作者单位:421001 衡阳,南华大学公共卫生学院环境医学与放射卫生研究所(杨艳丽);100850 北京,军事医学科学院放射与辐射医学研究所(杨艳丽、刘玲、王豫、刘晓丹、周平坤)

通讯作者:周平坤,电子信箱:zhoupk@bmi.ac.cn