

文章编号:1001-6880(2016)5-0673-07

EGCG 对高糖诱导的 HK-2 细胞氧化应激损伤的保护作用

代春美*,宋雨泽,杨伟,胡相卡,陈香

辽宁医学院,锦州 121001

摘要:探究表没食子儿茶素没食子酸脂(EGCG)对高糖诱导的人肾小管上皮细胞HK-2氧化应激损伤的保护作用及其相关机制。用EGCG干预可以显著提高HK-2细胞抗氧化能力,抑制高糖诱导的细胞内ROS水平升高,提高细胞活力($P < 0.05$),并呈现剂量依赖效应。同时,研究发现EGCG能显著诱导HK-2细胞Nrf2核转位,并且其下游的Ⅱ相解毒酶HO-1蛋白表达水平也相应提高,Nrf2 mRNA的表达含量也相应升高($P < 0.05$)。说明EGCG可能通过激活Nrf2/ARE通路,发挥对高糖诱导的HK-2细胞氧化应激损伤的保护作用。

关键词:EGCG;高糖;Nrf2/ARE信号通路;氧化应激

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.5.006

EGCG Protects HK-2 Cells Damage Induced by High Glucose against Oxidative Stress

DAI Chun-mei*, SONG Yu-ze, YANG Wei, HU Xiang-ka, CHEN Xiang

Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the protective effect and mechanisms of epigallocatechin gallate (EGCG) against oxidative stress of HK-2 cells induced by high glucose. The results showed that EGCG intervention can improve the antioxidant capacity of HK-2 cells significantly, suppress the ROS levels in cells induced by high glucose, improve the cell vitality in a dose-dependent effect ($P < 0.05$). Meanwhile, it was shown that EGCG can also cause nuclear accumulation of Nrf2 in association with downstream activation of Nrf2 mediated oxidative response genes such as HO-1, and the expression level of Nrf2 mRNA increased accordingly also ($P < 0.05$). Hence, it was concluded that EGCG may protect against the oxidative damage of HK-2 cells induced by high glucose via the activation of Nrf2/ARE signal pathway.

Key words: EGCG; high glucose; Nrf2/ARE signal pathway; oxidative stress

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病患者的最主要、最常见的并发症之一,最终会导致慢性肾功能衰竭,是糖尿病患者致残和死亡的重要原因之一。DN的发病机制非常复杂,越来越多的研究表明,高糖环境下肾脏细胞产生的氧化应激损伤可能是其发病的重要机制之一,具体表现为患者在患有DN的同时可引起脂质过氧化物增多、抗氧化酶活性下降等^[1,2]。因此尽量减少由高糖引起的活性氧(reactive oxygen species, ROS)生成和清除过量的ROS是糖尿病肾病抗氧化应激的有效策略。

Nrf2/ARE通路是新近发现的迄今为止最为重要的机体内源性抗氧化和氧化应激损伤的防御性应

答传导通路^[3]。研究表明,当机体暴露于ROS时,机体自身能诱导出一系列保护性蛋白,以缓解细胞所受的损害。这一系列反应是由这些保护性基因上游调节区的抗氧化反应元件ARE来调控的。研究发现,核因子NF-E2相关因子(Nrf2)是ARE的激活因子^[4]。Nrf2是细胞氧化应激应答的关键蛋白,是机体内抗氧化蛋白的普遍的调控因子,可以说Nrf2是机体内源防御ROS的基础。

表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)最初是从我国绿茶中提取的主要成分,前人研究表明由于EGCG分子结构中的抗氧化基团使其具有显著的体外抗氧化作用。而近年来发现EGCG对于Nrf2/ARE通路的干预作用重新赋予了EGCG抗氧化作用新的意义,尤其在肝、肺、胰腺等器官内作用显著^[5-8],但EGCG在高糖环境肾小管上皮细胞(HK-2)的氧化应激干预作用未见报道。本实验以HK-2

收稿日期:2016-01-04 接受日期:2016-03-07

基金项目:辽宁省教育厅一般科学项目(L2014322);中国博士后科学基金项目(2015M571251)

*通讯作者 E-mail:springdaidai@163.com

细胞为载体,通过高糖诱导氧化应激模型,探究EGCG对细胞自身抗氧化能力及在Nrf2/ARE通路的作用,以期加深对EGCG抗氧化药理机制的认识以及对中药抗氧化成分研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

EGCG提取物(98%)购自南京广润生物制品有限公司(批号:GR-132-131102);葡萄糖购自辽宁民康制药有限公司(国药准字:H21023922;批号:A130988)。DMEM低糖培养基、胎牛血清购自Hyclone;胰蛋白酶、双抗购自Thermo;DMSO购自Sigma;MTT细胞毒性检测试剂盒、活性氧(ROS)测试试剂盒、脂质氧化(MDA)检测试剂盒、谷胱甘肽(GSH)含量测定试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)活性测定试剂盒均购自南京建成生物研究所。RIPA裂解液、PMSF、BCA蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究所;兔抗人Nrf2抗体、兔抗人HO-1抗体、二抗山羊抗兔抗体购自武汉博士德公司;Trizol试剂、一步法RT-PCR试剂盒购自北京鼎国生物公司;其余试剂为分析纯。

1.2 细胞系

人近曲小管上皮细胞HK-2细胞株购于北京协和细胞中心。

1.3 仪器

CO_2 培养箱,美国Thermo Fisher;超净工作台,江苏华达公司;分光光度计,上海光谱仪器;多功能酶标仪,美国Becton Dickinson公司;台式离心机,上海安亭;低温高速离心机,美国Thermo Fisher;倒置显微镜,日本Olympus公司;荧光显微镜,日本Olympus公司;低温冰箱,中科美菱;梯度PCR仪,美国Bio-Rad;凝胶图像分析系统,美国Bio-Rad;低温高速离心机,Thermo X1;电子天平,上海皖衡;核酸浓度测定仪,美国QUAWELL TECHNOLOGY;凝胶电泳仪,美国Bio-Rad。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养及分组

将HK-2细胞接种于 25 cm^2 培养瓶中,用含10%胎牛血清的DMEM低糖(5.5 mmol/L)培养基培养,另加入1%青霉素、链霉素100 KU/L,置于 $5\% \text{ CO}_2$ 、 37°C 条件下传代培养。至80%融合后,1:3传代。根据需要,后续实验按照培养液糖分含量进行分组。正常组(CON):DMEM低糖培养基,葡

萄糖含量为 5.5 mmol/L 。高糖模型组(HG):加入葡萄糖,使培养液中糖分总含量达到 40 mmol/L 。EGCG低剂量干预组(EL):高糖 40 mmol/L 加EGCG $100\text{ }\mu\text{g/L}$ 。EGCG中剂量干预组(EM):高糖 40 mmol/L 加EGCG $200\text{ }\mu\text{g/L}$ 。EGCG高剂量干预组(EH):高糖 40 mmol/L 加EGCG $400\text{ }\mu\text{g/L}$ 。

1.4.2 MTT检测细胞存活率

取对数生长期的细胞,以每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$, 5×10^3 个细胞接种于96孔板中,按照1.4.1分组方法加入低糖培养液(5.5 mmol/L)和EGCG(0 、 100 、 200 、 $400\text{ }\mu\text{g/L}$)置于 $5\% \text{ CO}_2$ 、 37°C 培养箱中培养24 h后更换高糖(40 mmol/L)无血清培养基继续孵育24 h;同时正常对照组和无细胞培养基对照组(本底)。MTT试剂盒检测细胞活性,于 570 nm 测定吸光度OD并进行比较计算。每组设置6个复孔,每次平行检测两块板,共重复3次。实验结果以细胞存活率表示,细胞存活率 = $(\text{OD}_{\text{实验}} - \text{OD}_{\text{本底}}) / (\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{本底}}) \times 100\%$ 。

1.4.3 细胞内ROS含量检测

取对数生长期的细胞,以细胞数 $2 \times 10^5/\text{孔}$ 接种于6孔板中,按照1.4.1分组方法加入低糖培养液(5.5 mmol/L)和EGCG(0 、 100 、 200 、 $400\text{ }\mu\text{g/L}$)置于 $5\% \text{ CO}_2$ 、 37°C 培养箱中培养24 h后更换高糖(40 mmol/L)无血清培养基继续孵育24 h;同时设置正常对照组和无细胞培养基对照组(DMSO)。按照建成公司活性氧检测试剂盒说明书,装载DCFH-DA探针,调制探针浓度为 $1:500$, 37°C 条件下孵育40 min。用胰酶消化细胞,加入培养基终止消化,制成细胞悬液, 1000 g 离心,PBS洗涤,离心收集细胞沉淀物称重,后用PBS重悬,于多功能酶标仪检测,激发波长 500 nm 、发射波长 525 nm 。以上实验重复4次。

1.4.4 细胞内脂质氧化产物(MDA)检测

取对数生长期的细胞,以细胞数 $2 \times 10^5/\text{孔}$ 接种于6孔板中,按照1.4.1分组方法每孔分别加入低糖培养液(5.5 mmol/L)和EGCG(0 、 100 、 200 、 $400\text{ }\mu\text{g/L}$)置于 $5\% \text{ CO}_2$ 、 37°C 培养箱中培养24 h后,更换高糖(40 mmol/L)无血清培养基继续孵育24 h;同时设置正常对照组和无细胞培养基对照组。将各孔细胞裂解,离心,取上清,BCA法测定蛋白浓度。按照碧云天脂质氧化测定试剂盒说明书测定MDA含量,用酶标仪于 530 nm 处测定吸光度,测定结果以 nmol/mg 蛋白表示。以上实验重复4次。

1.4.5 细胞内谷胱甘肽(GSH)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性检测

取对数生长期的细胞,以细胞数 2×10^5 /孔接种于6孔板中,按照1.4.1分组方法每孔分别加入低糖培养液(5.5 mmol/L)和EGCG(0、100、200、400 μg/L)置于5% CO₂、37℃培养箱中培养24 h后,更换高糖(40 mmol/L)无血清培养基继续孵育24 h;同时设置正常对照组和无细胞培养基对照组。各组细胞消化,离心,弃上清,生理盐水300 μL重新制备细胞悬液,超声破碎,离心收集上清液,按照建成公司GSH测定试剂盒说明书。取0.5 mL上清液处理后进行显色反应,分光光度计420 nm处测定OD值并按照说明书给出公式计算细胞GSH含量。同理收集上清液按照建成SOD说明书测定细胞SOD活性。以上实验重复4次。

1.4.6 Western Blot法检测Nrf2、HO-1蛋白表达

采用碧云天RIPA裂解液加PMSF 100 mM裂解后收集各组细胞,4℃ 12000 rpm离心5 min。收集上清液。BCA试剂盒测定蛋白浓度。各组计算含50 ng蛋白的溶液体积于10% SDS聚丙烯酰胺凝胶,逐孔上样。40 V电压电泳4~5 h后,60 V电压转膜2 h,5% BSA液封闭1 h。加入Nrf2一抗后孵育过夜,洗涤后加入二抗室温孵育1 h,洗涤、曝光、显影。同此处理内参β-actin。通过凝胶成像和化学发光分析系统进行灰度分析。同此方法检测细胞HO-1蛋白表达。

表1 高糖及EGCG干预对HK-2细胞活性的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of EGCG on cells viability in HK-2 cells exposed to high glucose ($n=6, \bar{x} \pm s$)

分组 Group	给药剂量 Dose(μg/L)	正常组百分率 % of CON
正常组 Control group		100 * *
高糖组 High glucose group		61.38 ± 8.88
高糖+EGCG低剂量组 High glucose with EGCG low dose group	100	65.00 ± 5.81
高糖+EGCG中剂量组 High glucose with EGCG middle dose group	200	72.65 ± 7.83 *
高糖+EGCG高剂量组 High glucose with EGCG high dose group	400	88.68 ± 5.25 * *

注:与高糖组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

Note: compared with HG group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$.

2.2 高糖及EGCG干预对HK-2细胞内ROS水平的影响

实验结果显示,高糖模型组细胞24 h后,ROS水

1.4.7 RT-PCR法检测Nrf2基因mRNA的表达

Trizol法提取细胞总RNA,按鼎国公司一步法RT-PCR试剂盒说明进行操作。人Nrf2基因:前引物序列CACATTCCCAAACAAGATGC,后引物序列TCTTTTTCAGCGAGGAGAT,产物长度374 bp。退火温度57℃,33个循环;内参β-actin基因:前引物序列CTCCATCCTGGCCTCGCTGT,后引物序列GCT-GTCACCTTCACCGGTCC。产物长度268 bp。退火温度55℃,35个循环。产物在凝胶成像系统中扫描结果、拍照,分析电泳带吸光度,计算目的基因与内参β-actin之比值,即得目的基因mRNA表达量。

1.4.8 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行分析,数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间显著性检验采用单因素方差分析和LSD法。与肾损伤组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 高糖及EGCG干预对HK-2细胞活性的影响

高糖(40 mmol/L)作用于HK-2细胞24 h后,细胞存活率下降为空白对照组的61%,表明高糖在40 mmol/L的浓度下,对HK-2细胞具有明显的毒性;而预先给予EGCG达到200 μg/L以上时,细胞活力与高糖模型组相比有明显升高($P < 0.01$),并呈剂量依赖关系(见表1)。

平明显升高,而预先给予EGCG(100、200、400 μg/L)干预的组,细胞内ROS水平逐步降低,并与EGCG呈剂量依赖关系(见表2)。

表 2 高糖及 EGCG 干预对 HK-2 细胞内 ROS 水平的影响($n=5, \bar{x} \pm s$)Table 2 Effect of EGCG on ROS activity in HK-2 cells exposed to high glucose ($n=5, \bar{x} \pm s$)

分组 Group	给药剂量 Dose(μg/L)	正常组相对量 n/ CON
正常组 Control group		1 * *
高糖组 High glucose group		2.03 ± 0.12
高糖 + EGCG 低剂量组 High glucose with EGCG low dose group	100	1.83 ± 0.18 *
高糖 + EGCG 中剂量组 High glucose with EGCG middle dose group	200	1.65 ± 0.26 * *
高糖 + EGCG 高剂量组 High glucose with EGCG high dose group	400	1.27 ± 0.06 * *

注:与高糖组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: compared with HG group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.3 高糖及 EGCG 干预对 HK-2 细胞脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的影响

实验结果显示,高糖模型组细胞内 MDA 浓度水平明显升高($P < 0.01$),而预先给予 EGCG(100、200、400 μg/L)干预的组,细胞内 MDA 水平呈下降

趋势,并呈剂量依赖关系。此结果说明高糖可以诱发 HK-2 细胞氧化应激反应,而经过 EGCG 提前诱导的细胞可以减缓氧化应激,脂质氧化的发生(见表 3)。

表 3 高糖及 EGCG 干预对 HK-2 细胞脂质过氧化产物 MDA 含量的影响($n=5, \bar{x} \pm s$)Table 3 Effect of EGCG on MDA content in HK-2 cells exposed to high glucose ($n=5, \bar{x} \pm s$)

分组 Group	给药剂量 Dose(μg/L)	MDA 含量 MDA content (nmol/mg)
正常组 Control group		1.74 ± 0.27 * *
高糖组 High glucose group		5.98 ± 0.59
高糖 + EGCG 低剂量组 High glucose with EGCG low dose group	100	5.68 ± 0.76
高糖 + EGCG 中剂量组 High glucose with EGCG middle dose group	200	3.87 ± 0.50 * *
高糖 + EGCG 高剂量组 High glucose with EGCG high dose group	400	2.95 ± 0.25 * *

注:与高糖组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: compared with HG group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.4 高糖及 EGCG 干预对 HK-2 细胞内 GSH 含量和 SOD 活性的影响

细胞内 GSH 含量和 SOD 活性可以反应细胞抗氧化能力的水平,实验结果显示高糖(40 mmol/L)作用于 HK-2 细胞 24 h 后,胞内 GSH 和 SOD 水平均明显下降($P < 0.05$,表 4 和表 5),而预先给予 EGCG 干预的组,细胞内 GSH 和 SOD 水平均随着 EGCG 剂量的增加而逐渐上升;上述结果表明,高糖可明显降低 HK-2 细胞的抗氧化能力,而 EGCG(100、200、400 μg/L)对高糖致 HK-2 细胞的抗氧化能力降低有提高作用。

2.5 Western Blot 法检测高糖及 EGCG 干预对 Nrf2 核转位及其下游靶基因 HO-1 蛋白表达影响

与正常组相比,高糖模型组细胞中 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平提高;EGCG 干预低、中、高剂量组 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平高于模型组及正常组。以上结果提示,在正常培养条件下,Nrf2 蛋白微量表达;在高糖干预下,细胞中 Nrf2 蛋白及其下游蛋白 HO-1 表达开始增加,而 EGCG 干预可以显著提高 Nrf2、HO-1 的蛋白表达。其变化趋势一致并与 EGCG 呈剂量依赖性关系(结果见图 1 和表 5)。

表 4 高糖及 EGCG 干预对 HK-2 细胞内 GSH 含量、SOD 活性的影响($n=5, \bar{x} \pm s$)Table 4 Effect of EGCG on SOD activity and GSH concentration in HK-2 cells exposed to high glucose($n=5, \bar{x} \pm s$)

分组 Group	给药剂量 Dose($\mu\text{g}/\text{L}$)	GSH 含量 GSH content(mg/L)	SOD 活性 SOD activity(U/mg)
正常组 Control group		$19.32 \pm 2.49^{* *}$	$1.92 \pm 0.18^{* *}$
高糖组 High glucose group		9.82 ± 1.51	0.92 ± 0.24
高糖 + EGCG 低剂量组 High glucose with EGCG low dose group	100	$11.32 \pm 2.27^*$	$1.27 \pm 0.35^*$
高糖 + EGCG 中剂量组 High glucose with EGCG middle dose group	200	$15.60 \pm 1.90^{* *}$	$1.44 \pm 0.09^*$
高糖 + EGCG 高剂量组 High glucose with EGCG high dose group	400	$17.15 \pm 2.25^{* *}$	$1.78 \pm 0.16^{* *}$

注:与高糖组比较, $^* P < 0.05$, $^{* *} P < 0.01$ 。Note: compared with HG group, $^* P < 0.05$, $^{* *} P < 0.01$.表 5 高糖及 EGCG 干预对 Nrf2 核转位及其下游靶基因 HO-1 蛋白表达的影响($n=4, \bar{x} \pm s$)Table 5 Effect of high glucose and EGCG on the protein expression of Nrf2 and HO-1 in HK-2 cells($n=4, \bar{x} \pm s$)

分组 Group	给药剂量 Dose($\mu\text{g}/\text{L}$)	Nrf2 相对含量 Nrf2 relative content	HO-1 相对含量 HO-1 relative content
正常组 Control group		$0.09 \pm 0.03^{* *}$	$0.02 \pm 0.01^{* *}$
高糖组 High glucose group		0.48 ± 0.04	0.28 ± 0.04
高糖 + EGCG 低剂量组 High glucose with EGCG low dose group	100	$0.58 \pm 0.06^*$	0.39 ± 0.07
高糖 + EGCG 中剂量组 High glucose with EGCG middle dose group	200	$0.87 \pm 0.04^{* *}$	$0.61 \pm 0.06^{* *}$
高糖 + EGCG 高剂量组 High glucose with EGCG high dose group	400	$1.11 \pm 0.10^{* *}$	$0.90 \pm 0.04^{* *}$

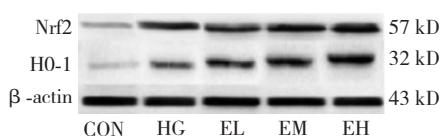
注:与高糖组比较, $^* P < 0.05$, $^{* *} P < 0.01$ 。Note: compared with HG group, $^* P < 0.05$, $^{* *} P < 0.01$.

图 1 高糖及 EGCG 干预对 Nrf2 核转位及其下游靶基因 HO-1 蛋白表达的影响

Fig. 1 The protein expression of Nrf2 and HO-1 in HK-2 cells intervened by high glucose and EGCG analyzed by western blot

2.6 RT-PCR 法检测高糖及 EGCG 干预 Nrf2 基因 mRNA 表达的影响

与正常组相比,高糖模型组细胞中 Nrf2 mRNA 表达水平高于正常组;EGCG 干预低、中、高剂量组 Nrf2 mRNA 表达水平高于模型组及正常组。以上结果提示,在正常培养条件下,Nrf2 mRNA 微量表达;在高糖干预下,细胞中 Nrf2 mRNA 表达开始增加,

而 EGCG 干预可以显著提高 Nrf2 mRNA 的表达。其变化趋势一致并与 EGCG 呈剂量依赖性关系(结果见图 2 和表 6)。

3 小结与讨论

糖尿病肾病(DN)的发病机制目前尚未阐明。近年来大量的研究表明,氧化应激在 DN 发生过程中扮演着重要的角色。高血糖作为糖尿病并发症发生的启动因素,导致器官内 ROS 大量增加,非酶的糖基化蛋白和葡萄糖的自身氧化也相应增加,机体

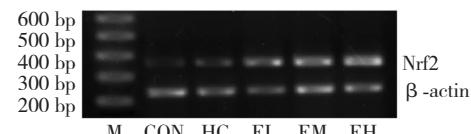


图 2 高糖及 EGCG 干预 Nrf2 基因 mRNA 表达的影响

Fig. 2 The mRNA expression of Nrf2 in HK-2 cells exposed to high glucose analyzed by RT-PCR

表 6 高糖及 EGCG 干预 Nrf2 基因 mRNA 表达的影响($n=4, \bar{x} \pm s$)Table 6 Effect of high glucose and EGCG on mRNA expression of Nrf2 in HK-2 cells ($n=4, \bar{x} \pm s$)

分组 Group	给药剂量 Dose($\mu\text{g}/\text{L}$)	Nrf2 mRNA 相对含量 Nrf2 mRNA relative content
正常组 Control group		$0.10 \pm 0.05^{* *}$
高糖组 High glucose group		0.47 ± 0.06
高糖 + EGCG 低剂量组 High glucose with EGCG low dose group	100	$0.91 \pm 0.07^{* *}$
高糖 + EGCG 中剂量组 High glucose with EGCG middle dose group	200	$1.03 \pm 0.11^{* *}$
高糖 + EGCG 高剂量组 High glucose with EGCG high dose group	400	$1.43 \pm 0.10^{* *}$

注:与高糖组比较, $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$ 。Note: compared with HG group, $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$.

氧化应激水平增高, 最终导致肾脏细胞的损伤^[9,10]。高糖刺激是糖尿病肾病发生发展的始动因素之一, 高糖也会诱发氧化应激, 产生活性氧(ROS)。过量的 ROS 不仅可以直接攻击脂质、蛋白质和 DNA, 导致肾脏损害, 还可作为高糖刺激信号通路的上游信号分子, 通过激活细胞内多种信号转导通路和转录因子来介导高糖对肾组织的损伤作用, 参与糖尿病肾病的发生发展^[11]。本实验关注的 Nrf2/ARE 通路也可由此激活来对抗氧化应激损伤。本实验首先证实高糖环境对于 HK-2 的细胞毒性, 而后证实在高糖环境下 HK-2 细胞内 ROS 水平升高, 通过 MDA 浓度检测证明细胞内脂质过氧化水平升高, 通过细胞 GSH 含量和 SOD 活性的测定证实了细胞内源抗氧化能力的下降。氧化应激在 DN 的发生发展中的作用确切, 因此抗氧化也成为 DN 治疗的新靶点且越来越受到重视。

Nrf2-keep1 通路是机体应对氧化应激最重要的内源性保护机制之一, 且成为治疗癌症、神经性病变、肺纤维化、糖尿病及其并发症研究的药物靶点。在临幊上以 Nrf2 为靶基因的治疗糖尿病肾病方法已经取得了良好效果^[15,16]。机体在应对 ROS 损害时具备了一套复杂的内源性氧化应激应答系统, 当暴露于 ROS 时, 机体自身能产生一系列保护性蛋白, 以缓解细胞所受的损害。这一防御机制可由一个特异的 DNA-启动子结合序列 ARE 介导的。该序列可以启动其下游多种抗氧化酶序列的表达。近年来研究表明, Nrf2 因子正是这一序列的激活因子。在正常情况下, 细胞内的 Nrf2 的表达量较低, Nrf2 与 Keapl 相偶联, 并锚定于胞质, 主要在胞质中进行依赖 Keapl 的泛素化降解和蛋白酶体降解, 从而将

Nrf2 的表达量维持在较低水平。但是当处于激活条件如 ROS 或者药物作用时, Nrf2 和 Keapl 解偶联, Nrf2 因子进入细胞核并与 ARE 序列结合, 从而激活 II 相解毒酶基因等多种抗氧化基因的转录, 以保护细胞抵抗过量 ROS 的刺激^[12,13]。Nrf2/ARE 通路是新近发现的迄今为止最为重要的内源性抗氧化应激通路, Nrf2-ARE 通路之所以重要是因为其激活后能够启动下游多种保护性基因的表达, 如重要的血红素氧合酶 HO-1(Hemeoxygenase1), “自由基清道夫”超氧化物歧化酶 SOD, 最主要的抗氧化系统谷胱甘肽系统酶 GPx、GST、 γ -GCS, 酿氧化还原酶 NQO1 等^[14]。到目前为止, 已证实经 Nrf2/ARE 信号路径调节的可编码内源性保护基因超过 200 个^[4]。Nrf2/ARE 是新近发现的迄今为止最为重要的抗氧化和化学应激的防御性转导通路。有研究表明^[17], 激活 Nrf2/ARE 通路可以诱导机体产生抗氧化酶和 II 相药物代谢酶, 从而增强细胞清除 ROS 的能力, 以此来维持细胞内氧化还原状态的平衡和降低氧化损伤。

表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是从绿茶中提取的一种主要成份, 是儿茶素中含量最高的组分, 占绿茶毛重的 9% ~ 13%, 后经研究发现多种中药成分如大黄、五倍子、没食子、柯子的鞣制成分中也含有 EGCG, 因其化学结构中多含酚羟基的特点, EGCG 具有非常强的抗氧化活性, 其抗氧化活性至少是维生素 C 的 100 多倍。许多能激活 Nrf2/ARE 通路的天然产物先后被发现, 如姜黄素、七叶苷、五味子乙素等能通过激活 Nrf2, 诱导其下游靶基因酶进而对抗氧化应激损伤^[18]。最新的研究表明在机体的某些器官中, EGCG 一方面可以依靠其强大的

抗氧化能力直接清除机体过量的自由基与活性氧,另一方面 EGCG 激活了 Nrf2/ARE 通路,通过诱导Ⅱ相解毒酶和抗氧化酶的表达增强机体自身的抗氧化能力^[19-21]。本实验首先用 EGCG 干预细胞而后再用高糖诱导 HK-2 细胞氧化应激,表明 EGCG 在面临高糖导致氧化应激时可能诱导了 Nrf2 的核转位,并诱导了其下游蛋白 HO-1 的表达,其表达量与 EGCG 呈剂量依赖性关系。也就是说,一方面,EGCG 可能依靠其本身化学结构中酚羟基强大的还原能力直接清除机体过量的自由基与活性氧,另一方面,EGCG 可能增强机体自身的抗氧化能力,激活机体 Nrf2/ARE 信号通路,提高机体内源性抗氧化蛋白含量,抵御外界的氧化应激和脂质过氧化损伤,增强 EGCG 对高糖诱导的 HK-2 细胞氧化损伤的保护作用,在后期实验中,拟对 EGCG 激活机体 Nrf2/ARE 信号通路的时效关系进行进一步探讨。

参考文献

- Yamagishi S, Fukami K, Ueda S, et al. Molecular mechanisms of diabetic nephropathy and its therapeutic intervention. *Curr Drug Targets*, 2007, 8: 952-959.
- Goh SY, Cooper ME. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93: 1143-1152.
- Yu X, Kensler T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention. *Mutat Res*, 2005, 591: 93-102.
- Li H(李航), Duan HJ(段惠军). Nrf2/ARE pathway and downstream antioxidant genes. *Chin Pharm Bull*(中国药理学通报), 2011, 27: 300-303.
- Liu R(刘瑞). A study on the regulating of pulmonary fibrosis by ROS-mediated antioxidative defense system with Nrf2 as the core. Xi'an: The Fourth Military Medical University (第四军医大学), PhD. 2008.
- Walters DM, Cho HY, Kleeberger SR. Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for Nrf2. *Antioxid Redox Signal*, 2008, 10: 321-332.
- AU Wells. Antioxidant therapy in idiopathic pulmonary fibrosis: hope is kindled. *Eur Respir J*, 2006, 27: 664-666.
- Wu S(吴硕), Ma XB(马兴彬), Zhou CJ(周成军), et al. Nuclear translocation of Nrf2 in hepatocytes of mice with hepatic fibrosis. *World Chin J Dig*(世界华人消化杂志), 2013, 21: 739-744.
- Forbes JM, Cooper ME, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*, 2008, 57: 1446-1454.
- Piwkowska A, Rogacka D, Audzeyenka I, et al. High glucose concentration affects the oxidant-antioxidant balance in cultured mouse podocytes. *J Cell Biochem*, 2011, 112: 1661-1672.
- Shang GG(尚果果). The protective effect and mechanism of activated NRF2 antioxidative stress signaling pathway in diabetic nephropathy. Shanghai: Fudan University(复旦大学), PhD. 2014.
- Hu R, Saw CL, Yu R, et al. Regulation of Nrf2 signaling for cancer chemoprevention: antioxidant coupled with anti-inflammatory. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13: 1679-1698.
- Baird L, Dinkova Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol*, 2011, 85: 241-272.
- Liu W(刘薇), Wang HX(王红霞), Wang LK(王立魁), et al. COX-2 and Nrf2/ARE signaling pathways in anti-inflammation and antioxidation *in vivo* and *in vitro*. *Chin Bul Life Sci*(生命科学), 2011, 10: 1027-1033.
- Zhang M(张敏). Resveratrol ameliorated diabetic nephropathy by activating Nrf2 pathway. Shanghai: Fudan University(复旦大学), PhD. 2012.
- Zhang YL(张艳磊). The effect of dendrobium nobile lindl polysaccharides on oxidative stress and expression of Nrf2 in rat glomerular mesangial cellcultured in high glucos. Guiyang: Zunyi Medical University(遵义医学院), MSc. 2012.
- 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. *FEBS Lett*, 2005, 579: 3029-3036.
- Li M(李梅), Jin J(金晶), Li J(李佳), et al. Schisandrin B protects against nephrotoxicity induced by cisplatin in HK-2 cells via Nrf2-ARE activation. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2012, 47: 1434-1439.
- Tkachev VO, Menshchikova EB, Zenkov NK. Mechanism of the Nrf2/Keap1/ARE signaling system. *Biochemistry (Moscow)*, 2011, 76: 407-422.
- HK Na, YJ Surh. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46: 1271-1278.
- Han ZX(韩知峡). The study on antagonism of EGCG against microcystin-LR-induced oxidative damage and the participation of phase I enzyme, phase II enzyme and Nrf2. Chongqing: The Third Military Medical University(第三军医大学), MSc. 2010.