

网络出版时间: 2019-3-22 16:45 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190321.1437.007.html

## 白藜芦醇通过 Nrf2/ARE 信号通路降低 AA 大鼠脾脏中氧化应激反应

瞿子庭<sup>1</sup> 胡永涛<sup>1</sup> 杨孝娟<sup>1</sup> 殷瞳昕<sup>1</sup> 朱皓晨<sup>1</sup> 陈思娴<sup>1</sup> 曹威<sup>2</sup> 王高远<sup>3</sup> 陈晓宇<sup>2</sup>

**摘要** 目的 探讨白藜芦醇(Res)通过核因子NF-E2相关因子/抗氧化反应元件(Nrf2/ARE)通路对佐剂性关节炎(AA)大鼠脾脏氧化应激调节作用及机制。方法 SD大鼠50只,随机均分为5组:对照组、模型组、Res低剂量组、Res高剂量组和阳性药组,左侧足趾皮下注射弗氏完全佐剂(FCA)建立AA大鼠模型。12d后,给予相应药物灌胃并测量大鼠关节炎指数及足趾肿胀度。连续灌胃12d后处死大鼠。HE染色观察脾脏病理学改变,脾脏组织匀浆检测抗氧化能力,免疫荧光及Western blot法检测脾脏组织Nrf2、Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Keap1)、锰超氧化物歧化酶(MnSOD)蛋白表达。结果 Res处理后关节炎评分降低;HE染色显示Res处理组脾脏损伤低于模型组;氧化应激指标检测显示,Res处理组较模型组氧化应激水平减轻;免疫荧光及Western blot结果表明Res降低Nrf2的表达,升高MnSOD水平,减轻氧化应激,抑制Nrf2过度激活。结论 Res能通过Nrf2/ARE通路降低Nrf2蛋白表达,增加AA大鼠脾脏抗氧化应激蛋白的表达,减轻氧化应激。

**关键词** 白藜芦醇;佐剂性关节炎;Nrf2/ARE通路;脾脏;氧化应激

中图分类号 R 322.72

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)03-0369-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.007

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以多发性、对称性和增生性滑膜炎为特征的自身免疫病。其病理特征是炎性细胞浸润、滑膜细胞增生和血管翳形成<sup>[1]</sup>。佐剂性关节炎( adjuvant arthritis, AA)大鼠模型是RA药物治疗研究的理想动物

模型<sup>[2]</sup>。除侵犯关节外,RA患者可发生脾肿大,脾脏中辅助T细胞亚群平衡失调,文献<sup>[3]</sup>报道AA大鼠脾脏存在病理学损伤。白藜芦醇(resveratrol, Res)主要存在于葡萄、花生和虎杖中,具有抗炎、抗感染和抗肿瘤的作用<sup>[4]</sup>。氧化应激与RA的发生发展密切相关, $\alpha$ -硫辛酸是已被证实的具有显著抗氧化应激和减轻炎症作用的药物<sup>[5]</sup>。而Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)-核因子NF-E2相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件(antioxidant responsive element, ARE)信号通路是氧化应激反应的关键通路,Nrf2是该通路中的关键蛋白,具有多种生物学效应,如维持氧化和抗氧化的平衡以及抑制细胞凋亡等,但Nrf2持续激活会使组织受到更严重的氧化应激损伤<sup>[6]</sup>。该研究旨在探讨Res能否通过Keap1-Nrf2/ARE通路调节AA大鼠脾脏组织氧化应激水平,缓解AA大鼠疾病的发展进程。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

**1.1.1 实验动物** 清洁级雄性SD大鼠50只,体质量(180±20)g,由安徽医科大学实验动物中心提供,饲养于光照12h/黑暗12h,室温(25±2)℃,通风良好并可自由摄食饮水。

**1.1.2 实验试剂与仪器** Res、弗氏完全佐剂(FCA)购自美国Sigma公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒购自上海碧云天有限公司;Keap1、Nrf2、锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)等多克隆抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology公司;RM2235切片机构自德国Leica公司;高速离心机购自美国SHELLAB公司。

#### 1.2 实验方法

**1.2.1 实验动物分组及标本收集** 随机将50只SD大鼠均分为5组:对照组、模型组、Res低剂量组[5 mg/(kg·d)],Res高剂量组[100 mg/(kg·d)]和阳性药 $\alpha$ -硫辛酸治疗组[100 mg/(kg·d)]。喂

2018-09-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81373421);安徽省自然科学基金青年项目(编号:1808085QH241);国家级大学生创新创业训练计划项目(编号:201710366015);安徽医科大学“早期接触科研”项目(编号:2017-ZQKY-19)

作者单位:安徽医科大学<sup>1</sup>第一临床医学院、<sup>2</sup>组胚教研室,合肥 230032

<sup>3</sup>安徽医科大学第一附属医院骨科,合肥 230022

作者简介:瞿子庭,男,本科生;

王高远,男,主治医师,责任作者,E-mail: wanggaoyuan2858@sina.com;

陈晓宇,男,博士,教授,责任作者,E-mail: cxyayd@163.com

食 1 周后 , 对照组大鼠皮下注射 0.1 ml 生理盐水至左足趾 , 其余大鼠注射 0.1 ml FCA 以诱发炎症 , 建立 AA 大鼠模型。12 d 后 , 对照组和模型组给予等体积 0.5% 羧甲基纤维素钠 , Res 处理组给予相应剂量药物灌胃 ; 阳性药组给予  $\alpha$ -硫辛酸灌胃。每 4 d 称重 1 次并根据大鼠体重调整用药剂量 , 连续给予灌药 12 d 后处死大鼠 , 取大鼠脾脏转移至液氮中冷藏备用。另取脾脏固定在 4% 多聚甲醛中供病理学检查。

**1.2.2 整体模型建立以及关节炎指数和肿胀程度测定** 造模后 , 每 3 d 用排水法测定大鼠左踝关节致炎前后容积变化并监测各组大鼠继发侧关节炎指数 , 病理评分分为 4 个等级 : 0 分 : 正常 ; 1 分 : 踝关节红斑和轻微肿胀 ; 2 分 : 踝关节或手掌红斑 , 轻微肿胀 ; 3 分 : 踝关节或手掌红斑及中度肿胀 ; 4 分 : 踝关节严重肿胀 , 评分最高 12 分。

**1.2.3 HE 染色及病理学损伤检测** 取出固定的脾脏组织 , 脱水 , 包埋并切片 , 制备组织厚度为 4  $\mu$ m 的切片。取各组切片经脱蜡、苏木精-伊红 (HE) 染色、封片处理后 , 镜下观察病理学损伤。

**1.2.4 组织匀浆氧化应激指标的检测** 从液氮中冷冻的各组脾组织取样 , 制成组织匀浆。以 14 000 r/min 离心 15 min 并取上清液 , 根据试剂盒说明书检测 MDA 含量和 SOD 活力单位。

**1.2.5 免疫荧光检测大鼠脾脏中 Nrf2 蛋白的表达** 取出固定的脾脏组织 , 脱水 , 包埋并切片 , 制备组织厚度为 4  $\mu$ m 的切片。抗原修复液修复 , 3%  $H_2O_2$  灭活内源性过氧化物酶 , 封闭液封闭 60 min , 滴加 Nrf2 (1 : 100) 多克隆抗体 4  $^{\circ}C$  孵育过夜。第 2

天取出复温 , 用 PBS 冲洗 3 次 , 加入荧光二抗 , 在黑暗条件下孵育 30 min , 细胞用 DAPI 染色 5 ~ 10 min 并在荧光显微镜下拍照。

**1.2.6 Western blot 法检测蛋白的表达** 取冻存的脾脏组织 , 提取组织蛋白。根据 BCA 试剂盒测定各组的蛋白质含量 , 调整蛋白质浓度并加入上样缓冲液。SDS-PAGE 电泳分离 90 min ; 200 mA 恒流 2 h 转至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 1 h , PBST 洗去封闭液 , 加入 Nrf2、Keap1、MnSOD 等一抗 (1 : 300) , 4  $^{\circ}C$  孵育过夜。用 PBST 在摇床上洗涤后 , 将膜放入通用二抗中并在室温下在摇床上温育 1 h。ECL 显色并使用 Image J 软件进行分析。

**1.3 统计学处理** 用 SPSS 17.0 软件进行统计分析 , 资料以  $\bar{x} \pm s$  表示 , 两组间差异比较采用 *t* 检验 , 多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) , 以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 大鼠 AA 模型的建立** 整体实验结果显示 : 相比对照组 , 模型组大鼠足趾肿胀程度明显增加 , 而 Res 处理组足趾肿胀程度减轻 ; 关节炎评分结果显示 : 注射 FCA 3 d 后 , 大鼠足趾肿胀度即有明显升高 , 且随着造模时间延长 , 大鼠继发侧足趾肿胀度和关节炎指数均逐渐升高。第 12 天 , 模型组大鼠继发侧足趾肿胀度和关节炎指数与对照组比较差异有统计学意义 (*t* = 6.885 , *P* < 0.01 ; *t* = 19.96 , *P* < 0.01)。上述结果表明 AA 大鼠模型建立成功。Res 处理后的大鼠足趾肿胀度和关节炎指数降低 , 且随给药时间的延长逐渐降低。见图 1。

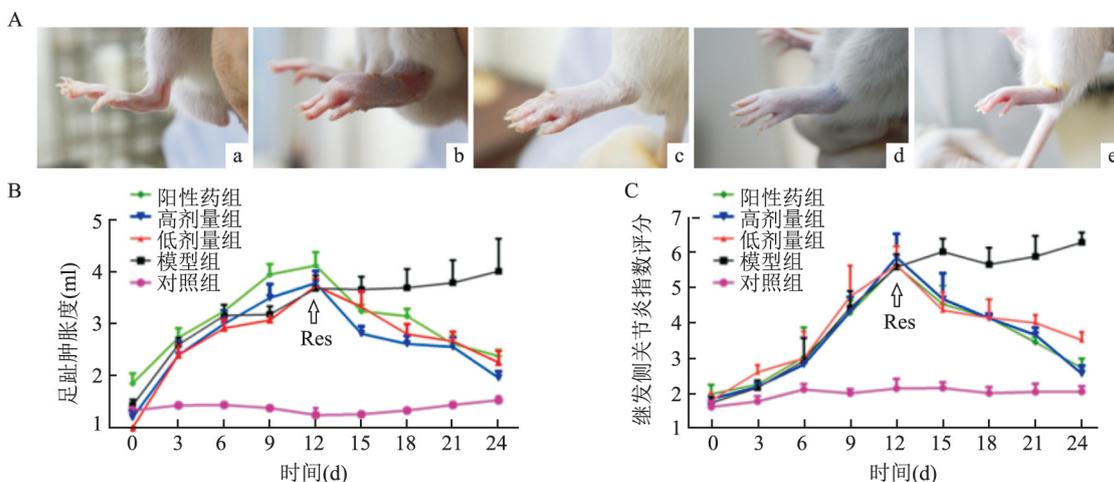


图 1 SD 大鼠 AA 关节炎模型的建立

A: AA 大鼠原发侧的足趾变化 ; a: 对照组 ; b: 模型组 ; c: Res 低剂量组 ; d: Res 高剂量组 ; e: 阳性药组 ; B: Res 对 AA 大鼠足肿胀度的作用 ; C: Res 对 AA 大鼠关节炎指数评分的作用

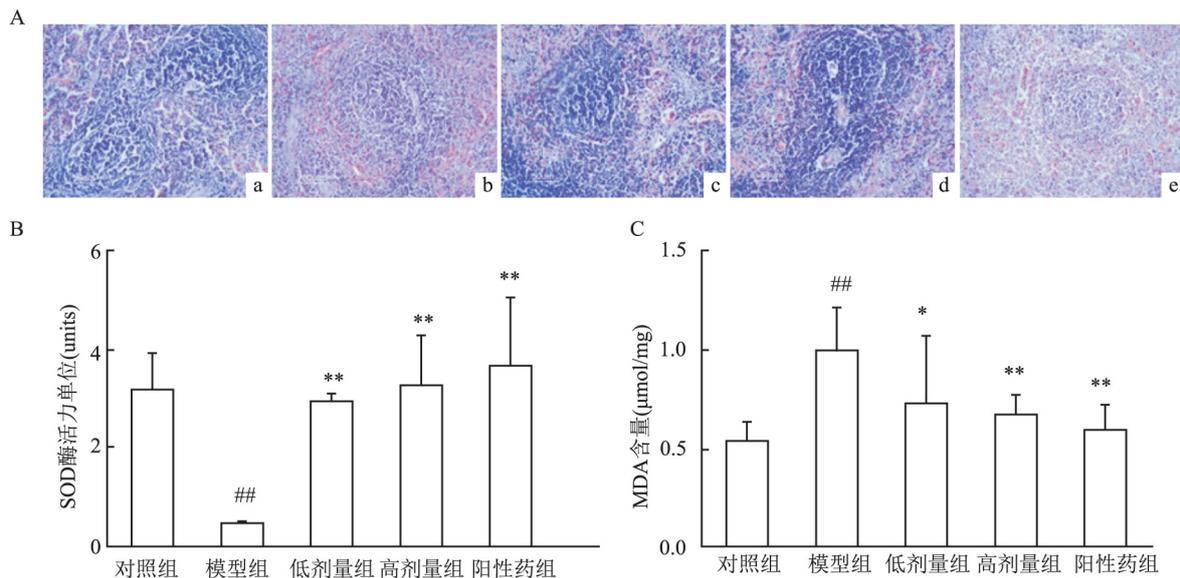


图2 AA大鼠脾脏损伤及氧化应激变化

A: AA大鼠脾脏病理改变 HE×200; a: 对照组; b: 模型组; c: Res低剂量组; d: Res高剂量组; e: 阳性药组; B、C: AA大鼠的脾脏匀浆SOD、MDA的变化; 与对照组比较: ##*P*<0.01; 与模型组比较: \**P*<0.05, \*\**P*<0.01

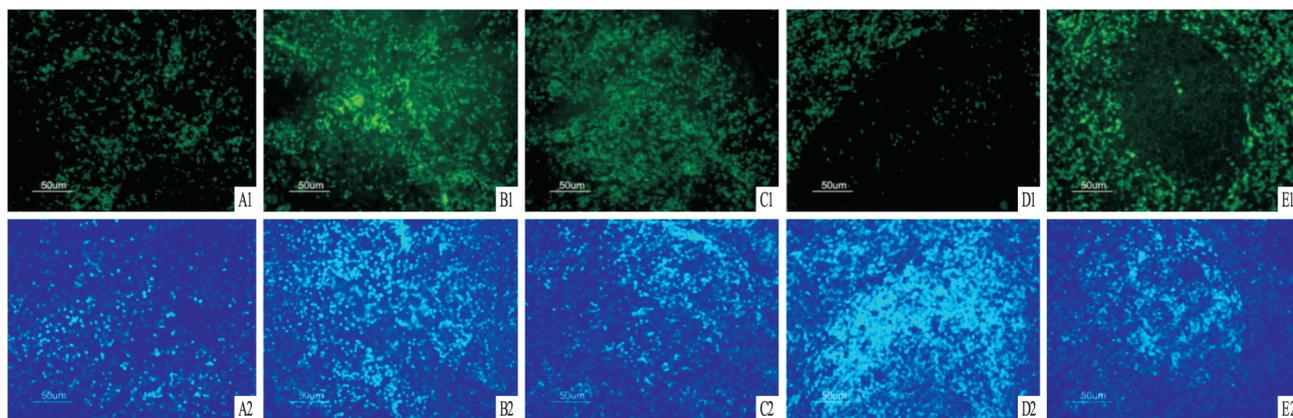


图3 大鼠脾脏中Nrf2蛋白的表达 免疫荧光×400

A: 对照组; B: 模型组; C: Res低剂量组; D: Res高剂量组; E: 阳性药组; 1: 荧光染色显示Nrf2蛋白表达; 2: DAPI复染确定核的位置分布

**2.2 AA大鼠脾脏组织存在损伤与氧化应激** 脾脏HE染色显示对照组脾脏组织形态较为清晰,可见白髓及红髓区。相比对照组,模型组脾脏组织结构模糊,红髓髓窦扩张,存在淤血,红髓髓索变窄。相比模型组,Res处理组脾脏形态结构有明显改善,红髓、白髓分界较清晰,红髓区可见少量淤血,生发中心较明显,细胞分布均匀。阳性药物治疗组效果更好。氧化应激指标检测显示,相比对照组,模型组大鼠脾脏匀浆中MDA含量明显增加( $t = 6.394, P < 0.01$ ),SOD酶的活力单位明显降低( $t = 5.044, P < 0.01$ );相比模型组,Res和阳性药组大鼠脾脏MDA含量显著降低( $t = 2.218, P < 0.05$ ;  $t = 4.513, P < 0.01$ ;  $t = 5.333, P < 0.01$ ),SOD酶的活力单位显著

增高( $t = 26.210, P < 0.01$ ;  $t = 3.600, P < 0.01$ ;  $t = 3.103, P < 0.01$ ),但药物处理组间SOD酶的活力单位没有随药物浓度的增加而降低,各组数据差异无统计学意义( $F = 0.414, P > 0.05$ )。见图2。

**2.3 免疫荧光检测大鼠脾脏中Nrf2蛋白表达情况**

免疫荧光结果显示,对照组大鼠脾脏Nrf2蛋白表达较少,模型组大鼠脾脏Nrf2蛋白表达显著增加;相比模型组,Res和阳性药组Nrf2蛋白表达减少。在Res和阳性药组,相比于周围红髓,脾脏组织的淋巴小结Nrf2蛋白表达较弱,而红髓处免疫荧光明显增强,见图3。

**2.4 Western blot测定大鼠脾脏中氧化应激相关蛋白** Western blot结果显示,模型组脾脏相比对照

组 其蛋白 Nrf2 ( $t = 7.159, P < 0.01$ ) 和 MnSOD ( $t = 6.850, P < 0.01$ ) 的表达增加, Keap1 ( $t = 16.670, P < 0.01$ ) 表达降低。灰度比值半定量分析表明, 相比模型组大鼠, Res 高剂量组脾脏组织中 Keap1 ( $t = 10.240, P < 0.01$ )、MnSOD ( $t = 6.217, P < 0.01$ )、Nrf2 ( $t = 12.660, P < 0.01$ ) 差异有统计学意义, 各浓度 Res 处理组间表达差异无统计学意义, 相比模型组, 阳性药组 Nrf2 表达降低, 也呈下降趋势, Keap1、MnSOD 表达增加。见图 4。

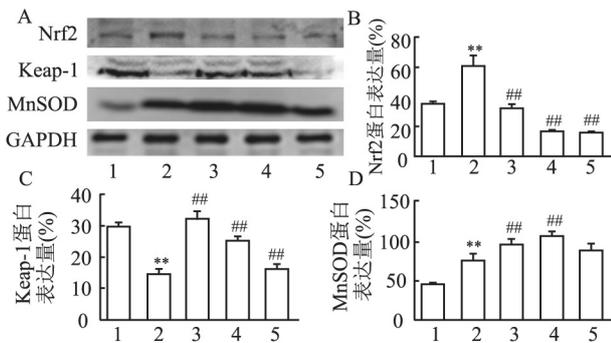


图 4 Western blot 测定大鼠脾脏组织匀浆 Nrf2、Keap1、MnSOD 蛋白表达

A: Nrf2、Keap1、MnSOD 蛋白的 Western blot 结果; B、C、D: Nrf2、Keap1、MnSOD 蛋白表达; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: Res 低剂量组; 4: Res 高剂量组; 5: 阳性药组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较: ##  $P < 0.01$

### 3 讨论

本研究采用 FCA 制备 AA 模型, FCA 诱导炎症后的病理变化与 RA 较为相近<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8]</sup>表明, AA 大鼠滑膜呈现炎细胞浸润, 关节部位表现为关节囊肿胀或粘连, 病理学表现为滑膜细胞异常增生, 血管翳形成及软骨和骨破坏。本研究 AA 大鼠在致炎后的 7~12 d 出现关节肿胀程度升高, 炎症进一步发展, 踝关节肿胀程度及关节炎指数证明 AA 模型建立成功, HE 染色结果表明 Res 能够减轻脾脏的病理损伤。此外, RA 可逐渐累及其他组织脏器, 如心、肝、脾等, 表现为多系统、多脏器受损。

Res 是虎杖的一种提取物, 具有抗炎和抗脂质过氧化等生物学作用<sup>[9]</sup>。本研究在 AA 大鼠基础上观察脾脏的病变特点。脾脏损伤主要表现为脾组织结构模糊、红髓髓窦扩张淤血等。相比模型组, Res 和阳性药组脾脏组织的病理学变化减轻, 大鼠脾脏组织匀浆检测中, MDA 含量的降低和 SOD 活力单位的升高表明大鼠脾脏的抗氧化应激增强, 证实了 Res 的调节作用。

Keap1-Nrf2/ARE 通路是氧化应激反应中的关键通路, 其中 Nrf2 为机体降低活性氧、减轻氧化应激重要转录因子, Keap1 是调节 Nrf2 活性的细胞抗氧化途径的调节蛋白。正常情况下 Nrf2 在胞质中与抑制因子 Keap1 结合, 处于失活状态, 无法进入细胞核发挥转录活性, 当受到 ROS 刺激时, Keap1 构象改变后与 Nrf2 解离<sup>[10]</sup>。激活的 Nrf2 进入细胞核并与小 Maf 蛋白形成异源二聚体, 其与 ARE 结合并促进下游靶基因的表达, 介导一系列抗氧化应激酶的产生, 如 MnSOD、血红素氧合酶 1 (HO-1) 等, 提高机体抗氧化能力<sup>[11]</sup>。在氧化还原平衡恢复后 Nrf2 返回胞质中, 经泛素-蛋白酶体途径降解或通过负反馈调节使其消耗后维持正常水平<sup>[12]</sup>。已有研究<sup>[8]</sup>表明 RA 患者体内存在氧化应激, 但关于 Keap1-Nrf2/ARE 通路在 RA 发生发展中影响的研究尚少。

Western blot 结果显示, AA 大鼠脾脏组织中 Nrf2 和 MnSOD 的表达显著增加, 处于高氧化应激状态, Keap1-Nrf2/ARE 通路异常激活。相比对照组, 模型组脾脏组织 Keap1 蛋白表达明显减少, 对 Nrf2 的抑制能力减弱。Nrf2 和 MnSOD 表达增加, 表明脾脏处于氧化应激状态, 过度激活 Keap1-Nrf2/ARE 通路会加重脾脏中的氧化应激。给予 Res 处理后, Nrf2 蛋白表达减少, 呈下降趋势, Keap1 和 MnSOD 表达增加, Keap1 大量表达导致从 Keap1 解离的 Nrf2 减少, 进而抑制 Keap1-Nrf2/ARE 通路过度激活, 起到对脾脏组织的保护作用<sup>[13]</sup>。而有研究<sup>[14]</sup>则表明, Res 可上调 Nrf2 的表达。本研究免疫荧光结果显示, 相比对照组, 模型组大鼠脾脏中 Nrf2 蛋白表达明显增加, 表明模型组脾脏组织存在 Nrf2 过度激活。相比模型组, Res 和阳性药组 Nrf2 蛋白表达减弱, 氧化应激程度减轻。值得关注的是, 在 Res 和阳性药组中, 相比于周围红髓, 白髓淋巴小结 Nrf2 蛋白表达明显较弱, 提示和红髓相比, 白髓氧化应激程度较轻。白髓主要由 B 淋巴细胞组成, 而红髓主要含有大量 T 淋巴细胞, Th 细胞的免疫功能障碍在 RA 发病机制中起重要作用, B 淋巴细胞通过递呈抗原、产生自身抗体和分泌细胞因子等与 RA 发生发展密切相关<sup>[15]</sup>。免疫荧光结果提示 Res 可能通过调节淋巴细胞及相关因子的表达来减轻 AA 大鼠脾脏损伤。

综上所述, AA 大鼠存在脾脏功能的受损, Res 可减轻 AA 大鼠病理损伤, 同时改善其脾脏功能, 其机制可能与调节 Keap1-Nrf2/ARE 信号通路异常激活, 下调 MDA 水平, 上调抗氧化蛋白 MnSOD 表达

有关。此外 Res 通过何种方式来降低 Nrf2 的表达, 此方式通过影响哪些物质降低 Nrf2 的表达, Res 对 RA 的调节与淋巴细胞及相关细胞因子存在何种关系, 这些问题都有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 苏会萍, 张俊强, 曹威, 等. MnSOD-SIRT3 在佐剂性关节炎大鼠肝组织中的表达和意义 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(9): 1268-72.
- [2] Chu J, Wang X, Bi H, et al. Dihydropyridinone relieves rheumatoid arthritis symptoms and suppresses expression of pro-inflammatory cytokines via the activation of Nrf2 pathway in rheumatoid arthritis model [J]. *Int Immunopharmacol* 2018, 12(59): 174-80.
- [3] 曾聪彦, 吴凤荣, 戴卫波. 宽筋藤对类风湿性关节炎模型大鼠关节肿胀及脾脏组织病理学的影响 [J]. 中药材, 2017, 40(2): 462-5.
- [4] Chen X Y, Lu J S, An M, et al. Anti-inflammatory effect of Resveratrol on adjuvant arthritis rats with abnormal immunological function via the reduction of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 [J]. *Mol Med Rep* 2014, 9(6): 2592-8.
- [5] Li G, Fu J, Zhao Y, et al. Alpha-lipoic acid exerts anti-inflammatory effects on lipopolysaccharide-stimulated rat mesangial cells via inhibition of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway [J]. *Inflammation* 2015, 38(2): 510.
- [6] Bala A, Mondal C, Haldar P K, et al. Oxidative stress in inflammatory cells of patient with rheumatoid arthritis: clinical efficacy of dietary antioxidants [J]. *Inflammopharmacology*, 2017, 25(6): 595-607.
- [7] Chen X Y, Wang Z C, Lu J S, et al. Regulation of synoviocyte activity by resveratrol in rats with adjuvant arthritis [J]. *Exp Ther Med* 2013, 6(1): 172-6.
- [8] Datta S, Kundu S, Ghosh P, et al. Correlation of oxidant status with oxidative tissue damage in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Clin Rheumatol* 2014, 33(11): 1557-64.
- [9] 卢锦森, 马中飞, 纵何香, 等. 白藜芦醇对佐剂性关节炎大鼠血管内皮因子表达的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(7): 969-73.
- [10] Menshchikova E B, Zenkov N K, Tkachev V O, et al. Protective effect of ARE-inducing phenol antioxidant TS-43 in chronic inflammation [J]. *Bull Exp Biol Med* 2013, 155(3): 330-4.
- [11] Jing X, Ren D, Wei X, et al. Eriodictyol-7-O-glucoside activates Nrf2 and protects against cerebral ischemic injury [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013, 273(3): 672-9.
- [12] Canning P, Cooper C D O, Krojer T, et al. Structural basis for Cul3 protein assembly with the BTB-Kelch family of E3 ubiquitin ligases [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(11): 7803-14.
- [13] 孙 玥. 基于 Keap1-Nrf2/ARE 信号通路探讨中药新风胶囊改善类风湿性关节炎心肺功能的机制研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2014.
- [14] Wei Y, Jia J, Jin X, et al. Resveratrol ameliorates inflammatory damage and protects against osteoarthritis in a rat model of osteoarthritis [J]. *Mol Med Rep* 2018, 17(1): 1493-8.
- [15] Kobayashi S, Murata K, Shibuya H, et al. A distinct human CD4+ T cell subset that secretes CXCL13 in rheumatoid synovium [J]. *Arthritis Rheum* 2013, 65(12): 3063-72.

## Resveratrol reduces oxidative stress in spleen of adjuvant arthritis rats through Nrf2/ARE signaling pathway

Qu Ziting, Hu Yongtao, Yang Xiaojuan, et al

(The First Clinical Medical College of Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the regulatory effects and mechanism of resveratrol( Res) on oxidative stress in spleen of adjuvant arthritis( AA) rats via Nrf2/ARE pathway. **Methods** 50 SD rats were randomly divided into 5 groups: control group, model group, Res low dose group, Res high dose group, Freund's complete adjuvant was injected subcutaneously into left toes to induce AA model. After 12 days, the index of arthritis and the degree of toe swelling in rats were measured. After 12 days of continuous gastric perfusion, the rats were sacrificed to observe the pathological change of spleen, the spleen homogenate was used to detect the antioxidant ability, the expression of Nrf2, Keap1, MnSOD protein in spleen tissue were detected by immunofluorescence and Western blot. **Results** The arthritis score decreased after Res treatment, HE staining showed that pathological damage of spleen in the Res treated group was less than that in the model group, the oxidative stress in the Res treated group was less than that in the model group. The results of immunofluorescence and Western blot showed that Res inhibited the expression of Nrf2, increased the level of MnSOD, alleviated oxidative stress and inhibited the excessive activation of Nrf2. **Conclusion** Res can reduce the expression of Nrf2 protein through Nrf2/ARE pathway, enhance the expression of antioxidant stress protein in spleen tissue and alleviate oxidative stress.

**Key words** resveratrol; adjuvant arthritis; Nrf2/ARE pathway; spleen; oxidative stress