

黄敏,程珂,马春松,等.6-姜烯酚对斑马鱼肝脏细胞炎症通路和抗氧化作用的影响[J].华中农业大学学报,2022,41(1):202-209.

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.01.020

6-姜烯酚对斑马鱼肝脏细胞炎症通路和抗氧化作用的影响

黄敏¹,程珂¹,马春松¹,王猛¹,王春芳^{1,2}

1.华中农业大学水产学院,武汉 430070;

2.长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心/湖北省池塘健康养殖工程实验室,武汉 430070

摘要 为探究 6-姜烯酚对鱼类的免疫调节作用,用不同浓度的 6-姜烯酚孵育斑马鱼肝脏细胞 48 h 后,检测其生长率、胞内活性氧(ROS)水平、抗氧化酶活性,并进行抗炎、抗氧化基因表达量的检测。结果显示:高浓度的 6-姜烯酚抑制肝脏细胞的增殖($P < 0.05$);6-姜烯酚抗氧化作用显著,20 $\mu\text{mol/L}$ 处理组抗氧化酶 SOD 和 GSH-PX 的活性最高($P < 0.05$),而活性氧 ROS 和脂质过氧化产物 MDA 含量最低($P < 0.05$),相关基因表达分析表明其作用机制通过抑制 *keap1* 的表达来激活 Keap1-Nrf2/HO-1-抗氧化酶信号通路;低浓度处理组 6-姜烯酚上调了斑马鱼肝脏细胞 NF- κ B 炎症通路细胞因子表达量($P < 0.05$),和对照组相比,抗炎因子表达量下降。上述结果表明,20 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-姜烯酚能够促进斑马鱼肝脏细胞的抗氧化功能,不同浓度的 6-姜烯酚均可以激活斑马鱼肝脏细胞的抗炎通路来启动非特异性免疫功能。

关键词 6-姜烯酚;斑马鱼肝脏细胞;抗氧化;抗炎通路;炎症反应;免疫应答;免疫增强剂

中图分类号 R 285.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)01-0202-08

据《中国药典》记载,生姜是姜科植物姜的新鲜根茎,具有食用和药用价值。近年来,生姜制剂已经越来越多地运用在水产行业中,如饲料添加剂^[1]、免疫增强剂^[2]、鱼病防治剂^[3]等。姜烯酚类(shogaols)是生姜中姜辣素的主要成分之一^[4],而姜烯酚中的6-姜烯酚,因其具有抗炎^[5]、抗氧化应激^[6]、抗肿瘤^[7]作用而备受关注。

6-姜烯酚的抗炎和抗氧化作用研究多以哺乳动物如大鼠^[8]、人类^[9]细胞等为模型,在鱼类中鲜有报道。在人类医学研究中,6-姜烯酚抑制了 NF- κ B 信号通路的活化,对巨噬细胞、CD4 细胞、小胶质细胞等细胞中抗炎因子如 iNOS、COX-2 和 IL-6 等的表达有抑制作用^[10-11];可以抵抗人健康肠上皮细胞受到 H₂O₂ 刺激而产生的氧化作用^[6]。关于生姜有效成分在鱼类中的相关研究,主要体现在防治鱼病如肠炎^[12]和小瓜虫病^[13],以及一些免疫学指标变化表象的观察^[14],而对于生姜的各种活性成分的效用和作用机制还鲜有探究。

斑马鱼作为一种广泛使用的模型生物,其基因与人类达到了 87% 的相似性^[15]。斑马鱼肝脏细胞

与哺乳动物表型相似,细胞功能相同,部分信号通路和受损伤机制与哺乳动物多有相似之处^[16],可作为药物检测的模式生物。本研究通过探究不同浓度 6-姜烯酚对斑马鱼肝脏细胞的增殖、抗氧化以及炎症通路相关基因表达的影响,探究 6-姜烯酚是否能影响斑马鱼肝脏细胞中免疫功能,以期 6-姜烯酚作为免疫增强剂在水产饲料中的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验细胞及试剂

斑马鱼肝脏细胞来自华中农业大学水产学院水生动物细胞保藏中心。

6-姜烯酚购自上海源叶生物科技有限公司, HPLC \geq 98%;双抗(青霉素-链霉素)、两性霉素 B、硫酸庆大霉素(50 mg/mL)购自 Omega(美国);胎牛血清(FBS)、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、Ham's F-12 营养培养基(F-12)、Leibovitz's L-15 培养基(L-15)购自 Gibco(美国);活性氧测定试剂盒(DCFH-DA)购自泛博生物化学有限

收稿日期:2021-08-05

基金项目:国家重点研发计划项目(2019YFD0900200);中央高校基本科研业务费专项(2662020SCPY005)

黄敏,E-mail:1310227874@qq.com

通信作者:王春芳,E-mail:cfwang@mail.hzau.edu.cn

公司(北京,中国);CCK-8 购自日本同仁公司;SOD(测分型)试剂盒、细胞丙二醛测定试剂盒、总蛋白测定试剂盒、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒(可见光法;钼酸铵法)购自南京建成生物工程研究所(南京,中国);组织细胞总谷胱甘肽检测试剂盒购自普里莱公司(北京);Trizol 购自 Invitrogen(美国),cDNA 合成试剂盒 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 购自 TaKaRa(日本),qPCR 试剂盒 Hieff[®] qPCR SYBR Green Master Mix(Low Rox Plus)购自 Y-assen 公司(上海,中国)。

1.2 培养基的配制

斑马鱼肝脏细胞培养基:L-15 48%、DMEM 32%、F-12 15%、FBS 4%、双抗 1%。

6-姜烯酚复合培养基:6-姜烯酚粉末用 L-15 溶液溶解稀释,配制成 0、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-姜烯酚复合培养基。浓度设置参考 6-姜酚(40 $\mu\text{mol/L}$)作用于小鼠巨噬细胞^[17]、6-姜烯酚(10~45 $\mu\text{mol/L}$)作用于子宫内膜癌细胞的浓度^[18]。

1.3 6-姜烯酚孵育斑马鱼肝脏细胞

用斑马鱼肝脏细胞培养基混匀稀释细胞(密度约为 5×10^5 个/mL)并加到细胞培养板中于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱(含 5% CO_2)中培养过夜,待斑马鱼肝脏细胞贴壁后将原培养基吸出,向每孔中加入 100 μL (96 孔板)或 400 μL (24 孔板)的含有不同浓度 6-姜烯酚的复合细胞培养基(浓度分别为 0、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$),置于培养箱中继续培养,每隔 24 h 换液 1 次,直至孵育 48 h。

1.4 生长率检测

将本文“1.3”中的 96 孔细胞培养板中溶液吸出后,加入不含 FBS 和双抗的培养基并向每孔加入 10 μL CCK8 溶液,将培养板放在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内孵育 3 h,用酶标仪 Infinite M200 NanoQuant (Tecan, 瑞士)测定 450 nm 处的吸光度。

1.5 活性氧(reactive oxygen species,ROS)检测

将 DCFH-DA 与不含 FBS 和双抗的培养基按 1:1 000 比例稀释,28 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内孵育 20 min。用 PBS 洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。用多功能酶标仪 SpectraMax[®] i3x(Molecular Devices, 美国)使用 488 nm 激发波长,525 nm 发射波长,检测荧光强度,实验过程全程避光。用荧光显微镜(Leica DMi8, 德国)拍摄各浓度组荧光强度照片。

1.6 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测

将板内培养基吸出,加入胰酶消化细胞,按照 SOD 试剂盒(测分型)说明书中的方法操作,于酶标仪 Infinite M200 NanoQuant (Tecan, 瑞士)波长 550 nm 处测定各处理组的吸光度值。

1.7 丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量检测

消化收集 24 孔板细胞,按照试剂盒说明书操作,同时测定蛋白浓度,于酶标仪 Infinite M200 NanoQuant (Tecan, 瑞士)波长 530 nm 处测定各处理组的吸光度值。

1.8 谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)活性检测

消化收集 24 孔板细胞,超声破碎细胞取上清,按照试剂盒说明书操作,同时测定蛋白浓度,于酶标仪 Infinite M200 NanoQuant (Tecan, 瑞士)波长 340 nm 处测定各处理组的吸光度值。

1.9 过氧化氢酶(catalase, CAT)活性检测

消化收集 24 孔板细胞(100 μL 每孔),超声破碎细胞取上清,其余步骤同本文“1.8”,测定波长 405 nm 处各处理组的吸光度值。

1.10 总 RNA 提取和相关基因的表达分析

在 T25 细胞培养瓶中加入 1 mL TRIzol 裂解细胞,收集裂解液于 1.5 mL EP 管中,每管加入 0.2 mL 氯仿,室温振荡孵育 2~3 min,11 304 r/min 离心 15 min。小心吸取离心后上层无色液体(RNA)移入新的 EP 管中,加入等体积异丙醇,混匀,室温下孵育 15 min,11 304 r/min 离心 15 min。去上清,获得沉淀加入 75%乙醇 1 mL,漩涡振荡 30 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 8 937 r/min 离心 5 min。去上清,沉淀在通风橱静置干燥 3~5 min,加入 20 μL DEPC 水溶解。获得的 RNA 经过质检之后用于 cDNA 的合成,操作方法参照 PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase 试剂盒说明书进行。得到的 cDNA 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

用荧光定量 qPCR 法,以 $\beta\text{-actin}$ 为内参基因,检测斑马鱼相关基因在细胞中的相对表达情况。qPCR 使用 QuantStudio[™] 6 Flex Real-TimePCR System (Thermo Fisher Scientific, 美国)平台,反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,(55~60 $^{\circ}\text{C}$) 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,40 个循环。反应体系为:Hieff[™] qPCR SYBR[®] Green Master Mix(Low Rox Plus) 10 μL ,上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.4 μL (引物序列见表 1),cDNA 2 μL ,加无菌蒸馏水至 20 μL 。结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法分析。

表 1 试验所用引物序列

基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
<i>β-actin</i>	F: CACCACCACAGCCGAAAGAG
<i>β-actin</i>	R: ACCGCAAGATTCCATACCA
<i>nrf2</i>	F: TCGGGTTTGTCCCTAGATG
<i>nrf2</i>	R: AGGTTTGGAGTGTCCGCTA
<i>keap1</i>	F: CCAACGGCATAGAGGTAGTTAT
<i>keap1</i>	R: CCTGTATGTGGTAGGAGGGTT
<i>il-6</i>	F: TCAACTTCTCCAGCGTGATG
<i>il-6</i>	R: TCTTTCCCTCTTTTCTCCTG
<i>nfkb</i>	F: GGCAGGTGGCGATAGTGTT
<i>nfkb</i>	R: CATTCTTCAGTCTCTTGCG
<i>ho-1</i>	F: ATGCCCTTGTTCAGTCAGC
<i>ho-1</i>	R: GGACTTGGAGCACTTCTTCGG
<i>il-10</i>	F: CATTGTGGAGGGCTTTC
<i>il-10</i>	R: GGTTC AAGTCATCGTTG
<i>tnf-α</i>	F: GCTGGATCTTCAAAGTCGGGTGTA
<i>tnf-α</i>	R: TGTGAGTCTCAGCACACTTCCATC

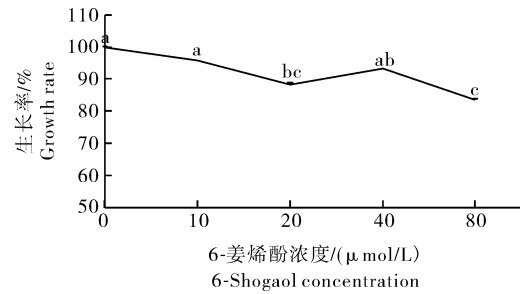
1.11 统计学处理

所有获得的原始数据以“平均值(Mean)±标准误差(SE)”表示,并采用 SPSS 22.0 软件进行显著性分析。Shapiro-willksp's 检验用于正态分布检验,Leven's 进行方差齐性检验,单因素方差分析法(One-Way ANOVA)进行方差分析,若组间差异显著($P < 0.05$),用 LSD 法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 6-姜烯酚对斑马鱼肝脏细胞生长率的影响

如图 1 所示,与未用 6-姜烯酚孵育的空白组相比,经过 6-姜烯酚孵育后的细胞生长率受到抑制,且随着浓度提高,抑制作用越强($P < 0.05$)。



设定 6-姜烯酚 0 浓度组生长率为 100%,不同字母表示组间有显著性差异($P < 0.05$)。The growth rate of 6-shogaol with a concentration of 0 was set as 100%. There are significant differences between the different letter representations ($P < 0.05$).

图 1 不同浓度 6-姜烯酚孵育斑马鱼肝脏细胞的生长率

Fig.1 The growth rate of zebrafish liver cells under different concentrations of 6-shogaol incubation

2.2 6-姜烯酚对斑马鱼肝脏细胞 ROS 的影响

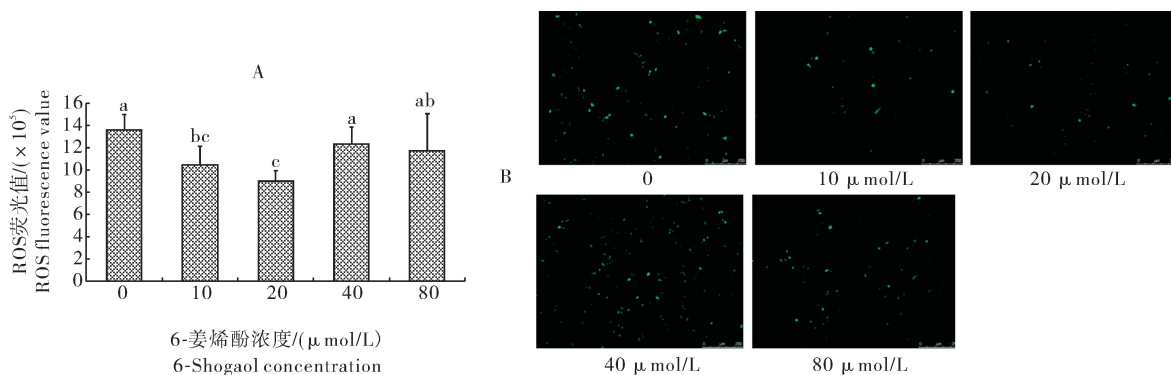
如图 2A 所示,与未用 6-姜烯酚孵育的空白组相比,经过 6-姜烯酚孵育后的细胞 ROS 荧光值在 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 6-姜烯酚处理组显著降低($P < 0.05$),其余浓度处理组 ROS 荧光值也有一定下降,但与未添加 6-姜烯酚的对照组相比无统计学意义,图 2B 中荧光的强度表示 ROS 含量。

2.3 6-姜烯酚对斑马鱼肝脏细胞 SOD 活性的影响

如图 3 所示,与未用 6-姜烯酚孵育的空白组相比,经过 6-姜烯酚孵育后的肝脏细胞中 SOD 活性升高,在 20 $\mu\text{mol/L}$ 时达到高峰($P < 0.05$)。

2.4 6-姜烯酚对斑马鱼肝脏细胞 MDA 含量的影响

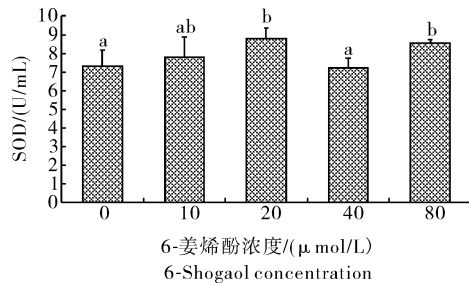
如图 4 所示,经过 6-姜烯酚孵育后的斑马鱼肝脏细胞与未用 6-姜烯酚孵育的组相比,其 MDA 含



A: 斑马鱼肝脏细胞内 ROS 荧光值,不同字母表示 ROS 荧光值有显著性差异($P < 0.05$); B: 斑马鱼肝脏细胞 ROS 产生情况,绿色荧光代表含有 ROS 的细胞。A: ROS fluorescence values in the cells of zebrafish liver, and different letters indicate significant differences in ROS fluorescence values ($P < 0.05$); B: Production of ROS in zebrafish liver cells. Green fluorescence represents cells containing ROS.

图 2 不同浓度 6-姜烯酚孵育后斑马鱼肝脏细胞中 ROS 水平

Fig.2 ROS production in zebra fish liver cells after incubation of different concentrations of 6-shogaol



不同字母表示不同处理组间有显著性差异 ($P < 0.05$)。下同。
Different letters indicate significant differences among different treatment groups ($P < 0.05$). The same as below.

图3 不同浓度6-姜烯酚孵育后斑马鱼肝脏细胞的SOD活性

Fig.3 SOD activity of zebrafish liver cells after incubation of different concentrations of 6-shogaol

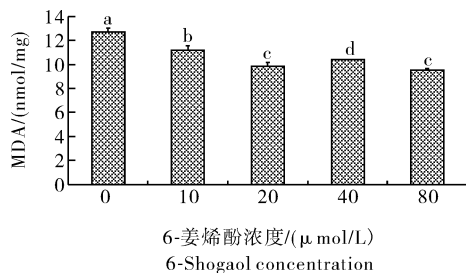


图4 不同浓度6-姜烯酚孵育后斑马鱼肝脏细胞MDA的含量

Fig.4 MDA contents in zebrafish liver cells after incubation of different concentrations of 6-shogaol

量显著下降 ($P < 0.05$), 其中 20、40 μmol/L 浓度组含量最低, 与 SOD 成负相关趋势。

2.5 6-姜烯酚对斑马鱼肝脏细胞 GSH-PX 活性的影响

如图5所示, 经过6-姜烯酚孵育后的细胞与未用6-姜烯酚孵育后的细胞相比, 除40 μmol/L浓度组外 GSH-PX 活性均显著上升 ($P < 0.05$)。

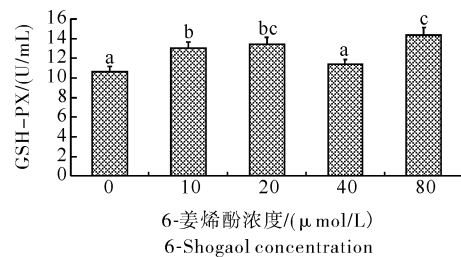


图5 不同浓度6-姜烯酚孵育后斑马鱼肝脏细胞GSH-PX活性

Fig.5 GSH-PX activity of zebrafish liver cell after incubation of different concentrations of 6-shogaol

2.6 6-姜烯酚对斑马鱼肝脏细胞CAT活性的影响

如图6所示, 经过6-姜烯酚孵育后的细胞与未用6-姜烯酚孵育后的细胞相比, CAT活性均显著上

升 ($P < 0.05$), 其中 10 μmol/L 浓度组活性显著高于其他组 ($P < 0.05$)。

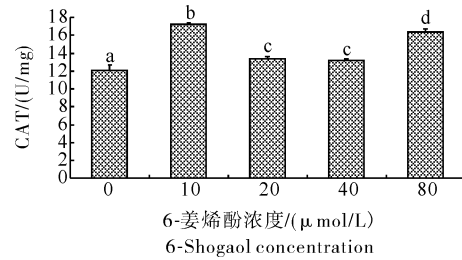


图6 不同浓度6-姜烯酚孵育后斑马鱼肝脏细胞CAT活性

Fig.6 CAT activity of zebrafish liver cells after incubation of different concentrations of 6-shogaol

2.7 6-姜烯酚对斑马鱼肝脏细胞NF-κB和Keap1-Nrf2/HO-1通路相关基因表达的影响

如图7所示, 6-姜烯酚显著上调斑马鱼肝脏细胞中 *nf-κb* 的表达量, 在 10、20 μmol/L 浓度下 *nf-κb* 表达量达到高峰 ($P < 0.05$)。炎症因子 *il-6* 和 *tnf-α* 表达都被不同浓度的6-姜烯酚影响, 其中 10 μmol/L 组和 80 μmol/L 组的 *il-6* 表达量显著上调 ($P < 0.05$), 而 *tnf-α* 表达随6-姜烯酚浓度升高而升高, 在 40 μmol/L 达到高峰 ($P < 0.05$)。6-姜烯酚显著抑制了抗炎因子 *il-10* 的表达 ($P < 0.05$)。

由图7、8可见, 6-姜烯酚显著下调肝脏细胞中 *keap1* 的表达 ($P < 0.05$), 上调 *ho-1* 的表达 ($P < 0.05$)。 *nrf2* 表达在 20 μmol/L 6-姜烯酚浓度组中显著上调 ($P < 0.05$), 40、80 μmol/L 浓度组显著下调 ($P < 0.05$)。

3 讨论

本试验结果显示6-姜烯酚会抑制斑马鱼肝脏细胞的生长率, 且随着浓度提高, 抑制细胞增殖的作用越强, 这与6-姜烯酚浓度升高抑制人类原位结肠癌细胞 HCT116 增殖的研究结果一致^[6]。Ishiguro等^[19]在6-姜烯酚于人胃癌细胞的研究中, 认为6-姜烯酚与微管蛋白中半胱氨酸残基的SH基团的特异性反应, 导致微管损伤, 细胞在G2/M期停滞, 因此, 笔者猜测这也是降低斑马鱼肝脏细胞的生长率的原因。另外, 6-姜烯酚可能通过激活p53和生成ROS导致细胞凋亡和细胞周期阻滞, 表现出对人类原代细胞生长的抑制作用^[20], 我们得到的结果与其相符。这表明, 6-姜烯酚会抑制鱼类肝细胞的增殖生长, 并随浓度的增高而抑制作用增强。

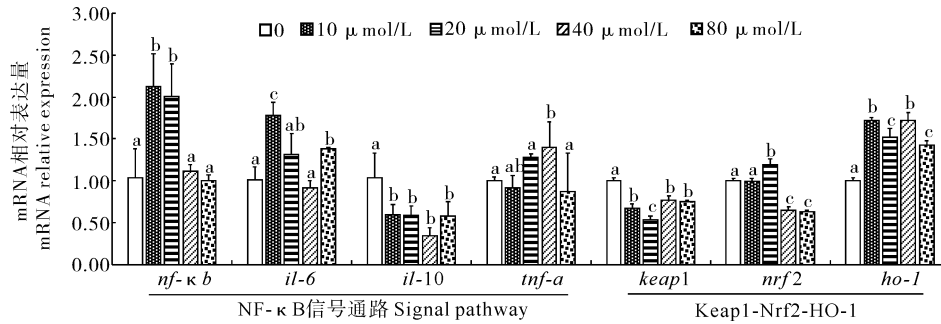


图 7 6-姜烯酚孵育后斑马鱼肝脏细胞 NF- κ B 炎症通路和 Keap1-Nrf2/HO-1 抗氧化通路中相关基因的表达

Fig.7 mRNA expression of the key genes in NF- κ B and Keap1-Nrf2/HO-1 pathways in zebrafish liver cells after incubation with different concentrations of 6-shogaol

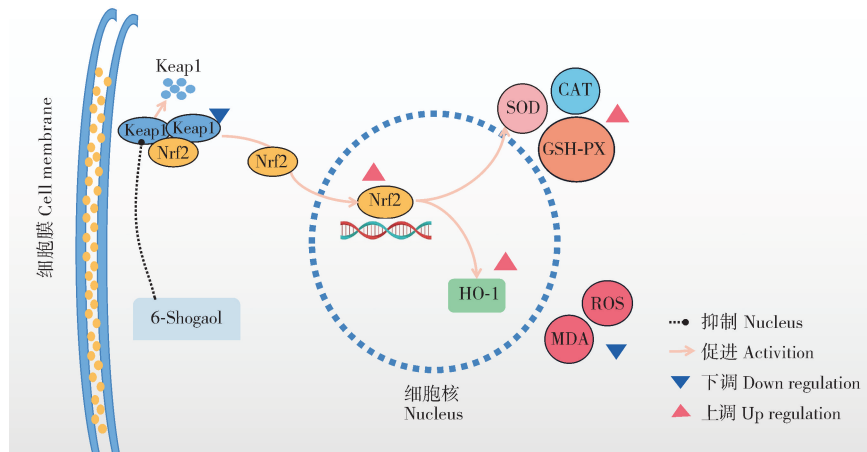


图 8 6-姜烯酚对 Keap1-Nrf2/HO-1 抗氧化信号通路的影响机制图

Fig.8 The action mechanism of 6-shogaol on the Keap1-Nrf2/HO-1 antioxidant pathway

氧化应激反应是指在接收到各种有害刺激后,体内产生氧自由基 ROS 等物质的细胞和组织氧化损伤过程。肝脏是体内的主要代谢器官,当机体长时间受到氧化应激时,大量的氧自由基 ROS 在肝细胞内蓄积,会损伤细胞物质、影响细胞功能、破坏细胞的结构等,从而引发多种肝脏疾病^[17]。MDA 常用于反映细胞和组织的脂质过氧化程度,也是我们判定机体是否氧化应激的重要指标。水生生物高不饱和脂肪酸含量高于哺乳动物,且生活的水生环境因素变化过大,均会导致体内 ROS 和 MDA 含量易升高,易产生氧化应激^[21]。本试验中低浓度的 6-姜烯酚可以减少细胞内产生的 ROS,但随着 6-姜烯酚浓度的升高,细胞的 ROS 含量增多。这种情况在抑制子宫内腺癌细胞生长的研究^[22]中也同样出现。由此可见,细胞对 6-姜烯酚的浓度有一定的耐受范围,超过这个范围,细胞将会产生氧化应激反应。但综合上述 ROS 和 MDA 的试验结果,我们认为在本试验浓度范围内,6-姜烯酚可以促进斑马鱼肝脏细

胞的抗氧化作用,同时因为 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组的 ROS 含量最低并且脂质过氧化程度也最低,因此认为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-姜烯酚能够更好地促进斑马鱼肝脏细胞的抗氧化作用。

SOD、GSH-PX、CAT 都是体内重要的酶促体系成员。SOD 是氧化防御系统的抗氧化物酶,专一清除超氧阴离子,将体内 ROS 分解成 H_2O_2 ,常作为抗氧化和免疫指标来进行监测^[23]。 H_2O_2 极易穿过细胞膜且半衰期较长,是一种重要的 ROS,能够引发细胞的氧化应激,有报道指出,6-姜烯酚对 H_2O_2 诱导的人健康肠上皮细胞 NCM460 具有抗氧化作用^[6]。而 H_2O_2 能被 CAT 和 GSH-PX 氧化成水,从而防止以烃基自由基的形式存在^[24]。有研究表明,6-姜烯酚可以通过调节经典瞬时受体电位通道 5 (TRPC5) 和瞬时受体电位离子通道 A1 (TRPA1) 电流来调节细胞的抗氧化能力^[25]。此外,SOD 的活性会随着氧化应激的产生而增加,从而发挥细胞的抗氧化作用^[26]。本试验中 6-姜烯酚孵育的斑马鱼

肝脏细胞的 SOD 活性显著升高,与 ROS 荧光值水平成负相关,说明 6-姜烯酚可以通过增强抗氧化酶 SOD 的活性,使肝细胞内 ROS 含量降低而发挥抗氧化作用。本试验中 GSH-PX 活性和 MDA 含量也呈负相关,表明 6-姜烯酚可提高 GSH-PX 的活力以减轻细胞的脂质过氧化程度从而发挥其抗氧化作用。CAT 在 6-姜烯酚的孵育下活性提高,但和 SOD 并不表现出同步性,因为两者在功能上具有相对的独立性,黄周英等^[27]和 Yang 等^[28]的研究中也观察到类似状况。80 $\mu\text{mol/L}$ 处理组的 GSH-PX 和 CAT 酶活显著升高,细胞的脂质过氧化程度也因此显著降低,由此可知 6-姜烯酚对细胞抗氧化系统具有综合的影响作用。

Keap1-Nrf2/Are 信号通路是氧化应激的重要通路。当有外源物刺激时,Keap1 半胱氨酸残基还原状态可能发生改变,导致 Nrf2 易位^[29]。Nrf2 是重要抗氧化因子,Nrf2 与 Keap1 解离后进入细胞核与氧化反应元件结合,调控 HO-1、SOD、GSH-PX 等抗氧化酶基因表达^[30]。HO-1 是一种重要的抗氧化酶,其副产物和还原产物具有抵御过氧化物、超氧化物自由基和清除 ROS 活性的作用^[31]。有研究报道,6-姜烯酚通过诱导 Nrf2 和 HO-1 来增强抗氧化防御机制^[32]。在本试验中,经过 6-姜烯酚处理的斑马鱼肝脏细胞中 *keap1* 显著下调,*nrf2* 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 6-姜烯酚浓度组显著上调,*ho-1* 显著上调,结合上述酶活和 ROS 含量受到 6-姜烯酚影响的试验结果,说明 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 6-姜烯酚能够显著促进 Keap1 与 Nrf2 解离,抑制 *keap1* 基因的表达,促进 Nrf2 的核转位,在转录水平上激活 Nrf2/HO-1 信号通路,促进 SOD、GSH-PX 等活性增强,从而发挥其抗氧化作用。在本试验 40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组中,斑马鱼肝细胞 *nrf2* 基因的表达量受到抑制,SOD、GSH-PX 活性相比于其他浓度组下降,而 ROS 含量也随之上升,这一系列的数据清晰表明了 6-姜烯酚对 Nrf2、GSH-PX、SOD 和 ROS 的调控作用。

NF- κ B 信号通路存在于各类型的细胞中,与肿瘤、炎症、免疫等生理功能密切相关。NF- κ B 通路的激活对于细胞免疫因子的表达有重要作用。有研究表明^[33],NF- κ B 信号通路在脂多糖的处理下活化,炎症因子表达量上调,导致草鱼头肾白细胞的炎症反应加剧。激活 NF- κ B 磷酸化 p65 亚基,使 TNF- α 、IL-1 β 、COX-2 等炎症因子释放,细胞的增殖和修复过程被激活,但过度活化会导致炎症反应^[34]。先前有学者研究过 6-姜烯酚对于癌症细胞

或者经过 LPS 等物质刺激的细胞的抗炎作用,发现 6-姜烯酚可通过抑制 I κ B α 磷酸化和蛋白酶降解从而导致 p65 核转移的迟缓,随后抑制 NF- κ B 转录活动,抑制细胞增殖和转移^[35]。从本试验结果来看,6-姜烯酚对斑马鱼肝脏细胞 NF- κ B 信号通路具有激活作用,促进了炎症因子的表达以及抑制了抗炎因子 *il-10* 的表达,该结果与上述人类中的研究结果存在不一致的地方。

综上所述,我们证实了 6-姜烯酚具有显著的抗氧化作用,而高浓度 6-姜烯酚能够抑制细胞生长,同时我们推测高浓度的 6-姜烯酚会造成氧化应激。而 6-姜烯酚的抗氧化作用通过抑制 *keap1* 基因的表达,解离 Nrf2 进行核转位,从而激活 Nrf2/HO-1 信号通路,提高 SOD、GSH-PX、CAT 等抗氧化酶的活性,降低斑马鱼肝脏细胞的 ROS 水平和 MDA 含量从而增强肝细胞的抗氧化机制;同时,6-姜烯酚会使斑马鱼肝脏细胞炎症因子表达量上调,抗炎因子下调,存在一定的炎症促发潜力。

参考文献 References

- [1] 王一福.投喂中草药对尖吻鲈生长、酶活性及免疫因子基因表达的影响研究[D].天津:天津农学院,2020.WANG Y F. Effects of Chinese herbal medicine on growth, enzyme activity and gene expression of immune factors of *Lates calcarifer* [D]. Tianjin: Tianjin Agricultural University, 2020 (in Chinese with English abstract).
- [2] KORNİ F M M, KHALİL F. Effect of ginger and its nanoparticles on growth performance, cognition capability, immunity and prevention of motile *Aeromonas septicaemia* in *Cyprinus carpio* fingerlings [J]. Aquaculture nutrition, 2017, 23 (6): 1492-1499.
- [3] 林国文.生姜制剂防治大黄鱼刺激隐核虫病研究[J].水产科技情报,2020,47(6):329-331.LIN G W. Prevention of parasite *Cryptocaryon irritans* in infected large yellow croaker *Pseudosciaena crocea* by ginger [J]. Fisheries science & technology information, 2020, 47(6): 329-331 (in Chinese).
- [4] CONNELL D W, MCLACHLAN R. Natural pungent compounds: IV. Examination of the gingerols, shogaols, paradols and related compounds by thin-layer and gas chromatography [J]. Elsevier, 1972, 67(1): 29-35.
- [5] 惠毅,李京涛,魏海梁,等.从 Notch 和 TLR4/NF- κ B 信号通路研究 6-姜烯酚治疗溃疡性结肠炎的作用机制[J].中国药学杂志,2020,55(16):1331-1338. HUI Y, LI J T, WEI H L, et al. Study on the action mechanism of 6-shogaol in the treatment of ulcerative colitis from the signaling pathway of notch and TLR4/NF- κ B [J]. Chinese pharmaceutical journal, 2020, 55 (16): 1331-1338 (in Chinese with English abstract).

- [6] 王宇锋,陈超,杨银学,等.6-姜烯酚对 H_2O_2 诱导 NCM460 和 HCT116 氧化损伤的作用研究[J].现代食品科技,2017,33(12):6-15.WANG Y F, CHEN C, YANG Y X, et al. Effects of 6-shogaol on H_2O_2 -induced oxidative damage in NCM460 and HCT116[J]. Modern food science and technology, 2017, 33(12):6-15(in Chinese with English abstract).
- [7] WOZNIAK M, MAKUCH S, WINOGRAD K, et al. 6-Shogaol enhances the anticancer effect of 5-fluorouracil, oxaliplatin, and irinotecan via increase of apoptosis and autophagy in colon cancer cells in hypoxic/aglycemic conditions[J]. BMC complementary medicine and therapies, 2020, 20(3):394-424.
- [8] AFZAL M, KAZMI I, QUAZI A M, et al. 6-Shogaol attenuated ethylene glycol and aluminium chloride induced urolithiasis and renal injuries in rodents[J]. Saudi journal of biological sciences, 2021, 28(6):3418-3423.
- [9] NONAKA K, BANDO M, SAKAMOTO E, et al. 6-Shogaol inhibits advanced glycation end-products-induced IL-6 and ICAM-1 expression by regulating oxidative responses in human gingival fibroblasts [J/OL]. Molecules, 2019, 24(20):3705 [2021-08-05]. <https://doi.org/10.3390/molecules24203705>.
- [10] LEVY A S A, SIMON O R. Six-shogaol inhibits production of tumour necrosis factor alpha, interleukin-1 beta and nitric oxide from lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages [J]. The West Indian medical journal, 2009, 58(4):295-300.
- [11] YOCUM G T, HWANG J J, MIKAMI M, et al. Ginger and its bioactive component 6-shogaol mitigate lung inflammation in a murine asthma model[J]. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology, 2020, 318(2):L296-L303.
- [12] 谢钢,海波.巧用生姜可治多种鱼病[J].渔业致富指南,2006(6):37.XIE G, HAI B. Correct use of ginger can treat a variety of fish diseases[J]. Fishery guide to be rich, 2006(6):37(in Chinese).
- [13] 朱广凯.防治鱼病巧用生姜[J].渔业致富指南,2011(11):60. ZHU G K. Use ginger skillfully to prevent fish disease[J]. Fishery guide to be rich, 2011(11):60(in Chinese).
- [14] 王一福,周胜杰,杨其彬,等.生姜对尖吻鲈生长特性及免疫酶的影响[J].饲料工业,2020,41(2):46-51.WANG Y F, ZHOU S J, YANG Q B, et al. Effects of ginger on growth performance and immune enzymes of sea bass (*Lates calcarifer*) [J]. Feed industry, 2020, 41(2):46-51(in Chinese with English abstract).
- [15] KETTLEBOROUGH R N W, BUSCH-NENTWICH E M, HARVEY S A, et al. A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function [J]. Nature, 2013, 496(7446):494-497.
- [16] MENKE A L, SPITSBERGEN J M, WOLTERBEEK A P M, et al. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish[J]. Toxicologic pathology, 2011, 39(5):759-775.
- [17] PRUCHNIAK M P, ARAZNA M, DEMKOW U. Biochemistry of oxidative stress[J]. Advances in experimental medicine and biology, 2016, 878:9-19.
- [18] 袁牧,王昌留,王一斐,等.超氧化物歧化酶的研究进展[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2016,25(6):550-558. YUAN M, WANG C L, WANG Y F, et al. Progress in the research of superoxide dismutase[J]. Chinese journal of histochemistry and cytochemistry, 2016, 25(6):550-558(in Chinese with English abstract).
- [19] ISHIGURO K, ANDO T, WATANABE O, et al. Specific reaction of α, β -unsaturated carbonyl compounds such as 6-shogaol with sulfhydryl groups in tubulin leading to microtubule damage[J]. FEBS letters, 2008, 582(23/24):3531-3536.
- [20] NAJAFI D S, RAHGOZAR S, TALEI D. 6-Shogaol induces apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia cells by targeting p53 signaling pathway and generation of reactive oxygen species [J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2021, 25:6148-6160.
- [21] 王秋举,鞠雪,罗莎,等.L-肉碱对 H_2O_2 诱导氧化应激 FHM 细胞的影响[J].南京农业大学学报,2016,39(3):467-472. WANG Q J, JU X, LUO S, et al. Effects of L-carnitine on H_2O_2 -induced oxidative stress in FHM cells [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2016, 39(3):467-472(in Chinese with English abstract).
- [22] MA R H, NI Z J, ZHANG F, et al. 6-Shogaol mediated ROS production and apoptosis via endoplasmic reticulum and mitochondrial pathways in human endometrial carcinoma Ishikawa cells [J/OL]. Journal of functional foods, 2020, 74:104178 [2021-08-05]. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104178>.
- [23] ZHANG Q L, LI F H, WANG B, et al. The mitochondrial manganese superoxide dismutase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*: cloning, distribution and expression [J]. Developmental & comparative immunology, 2007, 31(5):429-440.
- [24] PARIHAR M S, JAVERI T, HEMNANI T, et al. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature [J]. Journal of thermal biology, 1997, 22(2):151-156.
- [25] KIM Y S, HONG C, LEE S, et al. Effects of ginger and its pungent constituents on transient receptor potential channels [J]. International journal of molecular medicine, 2016, 38(6):1905-1914.
- [26] WIJERATNE S S K, CUPPETT S L, SCHLEGEL V. Hydrogen peroxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells. [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2005, 53(22):8768-8774.
- [27] 黄周英,陈奕欣,左正宏,等.三丁基锡对文蛤消化腺脂质过氧化及抗氧化酶活性的影响[J].厦门大学学报(自然科学版),2006,45(1):102-105. HUANG Z Y, CHEN Y X, ZUO Z H, et al. Effects of tributyltin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity of digestive gland in hard clam *Meretrix meretrix* [J]. Journal of Xiamen University (natural science edition), 2006, 45(1):102-105(in Chinese with English abstract).
- [28] YANG X B, JIN Y F, WU B. Effects of cerium on the antioxidant enzyme activity and MDA content in *Hyriopsis cumingii*

- liver[J].Reservoir fisheries,2008,28(3):16-18.
- [29] KOBAYASHI M, YAMAMOTO M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species[J]. Advances in enzyme regulation, 2006, 46(1):113-140.
- [30] 胡流芳,王迎,任汝静,等. Keap1-Nrf2/ARE 信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(1): 146-152, 166. HU L F, WANG Y, REN R J, et al. Anti-oxidative stress actions and regulation mechanisms of Keap1-Nrf2/ARE signal pathway[J]. Journal of international pharmaceutical research, 2016, 43(1): 146-152, 166 (in Chinese with English abstract).
- [31] GONZÁLEZ-BURGOS E, CARRETERO M E, GÓMEZ-SER-RANILLOS M P. Diterpenoids isolated from *Sideritis* species protect astrocytes against oxidative stress via Nrf2[J]. Journal of natural products, 2012, 75(10):1750-1758.
- [32] BAK M J, OK S, JUN M, et al. 6-Shogaol-rich extract from ginger up-regulates the antioxidant defense systems in cells and mice[J]. Molecules, 2012, 17(7):8037-8055.
- [33] ZHENG H O, GUO Q, DUAN X Z, et al. L-arginine inhibited apoptosis of fish leukocytes via regulation of NF- κ B-mediated inflammation, NO synthesis, and anti-oxidant capacity[J]. Biochimie, 2019, 158:62-72.
- [34] SETIA S, NEHRU B, SANYAL S N. Activation of NF- κ B: bridging the gap between inflammation and cancer in colitis-mediated colon carcinogenesis[J]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2014, 68(1):119-128.
- [35] ANNAMALAI G, SURESH K. 6-Shogaol attenuates inflammation, cell proliferation via modulate NF- κ B and AP-1 oncogenic signaling in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced oral carcinogenesis[J]. Biomedicine & pharmacotherapy, 2018, 98:484-490.

Effects of 6-shogaol on inflammation response and antioxidant capacity in zebrafish liver cells

HUANG Min¹, CHENG Ke¹, MA Chunsong¹, WANG Meng¹, WANG Chunfang^{1,2}

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt/Hubei Provincial Engineering Laboratory for Pond Aquaculture, Wuhan 430070, China

Abstract In order to explore the immune-regulation function of 6-shogaol in fish, the growth rate, the production of intracellular reactive oxygen (ROS) and lipid peroxidation (MDA), the antioxidant enzyme activity, and the expression of key genes in the inflammatory and antioxidant pathways were detected in zebrafish liver cells incubated with different concentrations of 6-shogaol for 48 h. The results showed that high concentrations of 6-shogaol inhibited the proliferation of liver cells ($P < 0.05$). The antioxidant effect of 6-shogaol was significant, with the highest activity of antioxidant enzyme SOD and GSH-PX, and lowest production of ROS and MDA in the 20 μ mol/L treatment group ($P < 0.05$). The gene expression analysis showed that the mechanism of action might be due to the activation of Keap1-Nrf2/HO-1-antioxidant enzyme signaling pathway by inhibiting the *keap1* expression. 6-shogaol increased the expression of inflammatory cytokine genes in the NF- κ B inflammatory pathway (*tnf- α* , *il-1 β* , *il-6*) in zebrafish liver cells ($P < 0.05$). While in contrast to the control group, 6-Shogaol down-regulated the expression of anti-inflammatory cytokine *il-10*. The above results showed that 20 μ mol/L 6-shogaol can promote the antioxidant function and 6-shogaol can activate the anti-inflammatory pathways of zebrafish liver cells to initiate immune response.

Keywords 6-shogaol; zebrafish liver cells; antioxidant capacity; anti-inflammatory pathways; inflammatory response; immune response; immunopotentiator

(责任编辑:边书京)