

藏药蕨麻对原代培养小鼠肝细胞酒精损伤保护作用研究

罗慧英^{1,2}, 曹茸茸¹, 黄亚红¹ (1.甘肃中医药大学药学院药理教研室, 兰州 730000; 2.甘肃省中药药理与毒理重点实验室, 兰州 730000)

摘要: **目的** 研究藏药蕨麻对原代培养酒精损伤肝细胞的保护作用。**方法** 原代肝细胞经分离纯化培养后, MTT 法评价藏药蕨麻对酒精损伤肝细胞存活率的影响; 荧光染色法测定藏药蕨麻对酒精损伤肝细胞活性氧物质(ROS)含量、细胞内钙离子浓度的影响; 流式细胞仪检测藏药蕨麻对酒精损伤肝细胞凋亡的影响; 免疫印迹法检测藏药蕨麻对 Bcl-2 和 Bax 表达的影响。**结果** 经酒精损伤后, 肝细胞存活率降低; 细胞内 ROS 含量和钙离子浓度增高; 凋亡抑制基因 Bcl-2 减弱、促凋亡基因 Bax 表达增强。藏药蕨麻可明显提高细胞存活率; 降低细胞内 ROS 含量和钙离子浓度; 改善凋亡情况, 增强 Bcl-2 表达, 抑制 Bax 表达, 且作用呈剂量依赖性。**结论** 藏药蕨麻对原代培养小鼠肝细胞酒精损伤具有一定的保护作用。**关键词:** 藏药蕨麻; 原代培养肝细胞; 酒精性肝损伤

中图分类号: R285.4 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2016)09-1130-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.09.009

Protective Effect of Tibetan Medicine *Potentilla Anserina* L. on Ethanol-induced Damage in Prime Liver Cell of Mice

LUO Huiying^{1,2}, CAO Rongrong¹, HUANG Yahong¹ (1. Department of Pharmacology, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology for Traditional Chinese Medicines of Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the protective effect of Tibetan medicine *Potentilla anserina* L. on ethanol-induced damage in mice prime liver cell. **METHODS** After isolation, purification and culture of primary hepatocytes, the livability of cell was evaluated by MTT; fluorescence microscopy were used to evaluate the contents of reactive oxygen species (ROS) and concentration of Ca²⁺; flow cytometry was used to detect the cell apoptosis; the expression of Bcl-2 and Bax were detected by Western blotting. **RESULTS** After damaged by alcohol, the cell livability decreased, the contents of ROS and concentration of Ca²⁺ increased, the expression of Bcl-2 decreased while that of Bax increased. *Potentilla anserina* could increase the cell livability, decreased the intracellular ROS content and Ca²⁺ concentration ameliorate the apoptosis, increase the expression of Bcl-2, and decrease the expression of Bax. **CONCLUSION** Tibetan medicine *Potentilla Anserina* L. has protective effect on ethanol-induced damage in prime liver cell of mice.

KEY WORDS: *Potentilla anserina* L.; prime hepatic cell; ethanol-induced liver damage

随着人们生活水平的提高, 酒精性肝损伤及与酒精相关的疾病逐年增加。蕨麻是蔷薇科鹅绒委陵菜 *Potentilla anserina* L. 膨大的块根, 具有健脾益胃、益气补血、生津止渴、收敛止血、止咳利痰的功效, 现代药理学研究表明, 蕨麻具有保肝、抗氧化、抗缺氧、抗疲劳、抗寒等药理作用^[1]。笔者前期实验证明, 藏药蕨麻可通过减少自由基的产生, 增强对自由基及其代谢产物的清除能力, 从而抑制脂质过氧化, 起到对酒精性肝损伤的保护作用^[2]。本研究旨在进一步探讨藏药蕨麻对原代培养肝细胞酒精损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

藏药蕨麻 *Potentilla anserina* L. (兰州惠仁堂药业股份有限公司, 批号: 20150709) 水煎 2 次, 合并滤液, 浓缩至 250 mL (相当于生药含量为 2 g·mL⁻¹), 临用前用蒸馏水稀释为所需浓度, 微孔滤膜过滤灭菌。DGFH-DA 试剂、Fluo 3-AM 试剂、Annexin V-FITC-PI 凋亡试剂盒均购自美国 Sigma 公司 (批号分别为 P2175, P3357, P0216); BX51 型荧光显微镜 (Olympus); AD340 酶标仪 (美国贝克曼库尔特); Cell Lab Quanta SC 型流式细胞分析仪 (Beckman coulter cell); DMI3000B 型倒置

基金项目: 甘肃省教育厅高校科研项目(2013A-078)

作者简介: 罗慧英, 女, 博士, 副教授, 硕导 Tel: (0931)8765395 E-mail: louria@163.com

相差显微镜(Leica)。

1.2 原代肝细胞分离培养

原代肝细胞分离提取采用原位灌注法^[3],调整获得的肝实质细胞悬液浓度至 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 后,接种在 25 mL 用鼠尾胶原预处理的培养瓶中,用含 10%胎牛血清的 DMEM(高糖型)培养液 37 °C,5% CO₂ 孵育箱中孵育培养 24 h 后换液,弃去未贴壁细胞后继续培养,供后续实验使用。前期的实验发现,随着孵育时间的延长,肝细胞数不断增加,在第 4 天时进入对数生长期,不同浓度的酒精对原代培养肝细胞的损伤作用呈剂量依赖性,结合前期实验结果和本实验需要,采用 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[4] 作为酒精的工作浓度。

1.3 藏药蕨麻对酒精损伤肝细胞存活率的影响

收集肝细胞,调整浓度至 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$,接种在鼠尾胶原预处理的 96 孔板上,每孔 100 μL ,24 h 后换液,吸弃未贴壁细胞后再培养 24 h,给药组加入不同浓度的蕨麻水煎液(终浓度为 0.2, 0.4, 0.8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),模型组和空白组不加药继续培养,每组设 3 个复孔。24 h 后模型组和藏药蕨麻组分别加入 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 酒精,反应 12 h 后 MTT 法检测细胞存活率。

1.4 藏药蕨麻对酒精损伤肝细胞活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)含量及 Ca²⁺浓度的影响

ROS 含量测定采用荧光探针 DCFH-DA 检测法,DCFH-DA 本身没有荧光,可以自由穿过细胞膜,进入细胞内后,可以被细胞内的酯酶水解生成 DCFH。而 DCFH 不能通透细胞膜,从而使探针很容易被装载到细胞内。细胞内的活性氧可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF,通过检测 DCF 的荧光强度就可以知道细胞内 ROS 水平。方法如下:将细胞浓度调整为 $5 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$,设空白组、模型组和蕨麻低、中、高剂量组(0.2, 0.4, 0.8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),培养 24 h 后,加入 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的酒精,培养 24 h 后离心收集细胞,PBS 洗 2 遍后与含有 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DCFH-DA 的磷酸缓冲溶液 37 °C 培养 30 min,激发波长 485 nm,发射波长 524 nm 处测定荧光强度。

细胞内钙离子浓度测定采用钙离子荧光探针 Fluo 3-AM,Fluo 3-AM 是 1 种可以穿透细胞膜的荧光染料。Fluo 3-AM 进入细胞后可以被细胞内的酯酶剪切形成 Fluo 3,从而被滞留在细胞内。Fluo

3 可以和钙离子结合,结合钙离子后可以产生较强的荧光,其荧光强度可以反应细胞内游离钙离子的浓度。方法如下:细胞按“1.2”项下方法处理 24 h 后,PBS 洗 2 遍,与 $5 \mu\text{M}$ Fluo 3 作用 30 min,洗涤收集细胞,流式细胞分析仪测定荧光强度,计算公式如下:

荧光强度(%)=(实验组荧光强度/对照组荧光强度) $\times 100\%$ 。

1.5 藏药蕨麻对酒精损伤肝细胞凋亡的影响

将细胞浓度调整至 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 后,接种于鼠尾胶原预处理的 6 孔板中培养,设空白组、模型组和蕨麻低、中、高剂量组(0.2, 0.4, 0.8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)5 组,24 h 后加入酒精(终浓度为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)孵育 24 h,消化、收集细胞,PBS 洗涤 2 遍,70%预冷乙醇 4 °C 固定过夜,PBS 洗涤 2 次,加入 500 μL Binding Buffer 悬浮细胞,加入 5 μL Annexin V-EGFP 混匀后,加入 5 μL PI,混匀,室温避光反应 15 min 后,流式细胞仪激发波长 488 nm、发射波长 530 nm 处测定细胞凋亡率,Annexin V-EGFP 的绿色荧光通过 FITC 通道(FL1)检测,PI 红色荧光通过 PI 通道(FL3)检测。

1.6 藏药蕨麻对酒精损伤肝细胞 Bcl-2 和 Bax 表达的影响

免疫印迹用于测定细胞质中 Bax 和 Bcl-2 表达,方法如下:细胞按“1.2”项下方法处理 24 h 后,PBS 洗 2 遍,收集细胞,重悬至均化缓冲液中,冰浴中搅拌均匀化,10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 去除细胞核物质,得上清为细胞质,15%的聚丙烯酰胺凝胶溶解,转印在硝化纤维膜上,以 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉于 37 °C 封闭 1 h 后,依次加入兔抗鼠 Bcl-2、抗 Bax 抗体(4 °C 过夜)及羊抗兔 IgG(37 °C 孵育 1 h)。用凝胶成像系统 ECL 发光成像,并用 Lab Image 软件分析。

1.7 统计学处理

所有实验数据用 SPSS 13.5 处理,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 藏药蕨麻对酒精损伤肝细胞存活率的影响

肝细胞经酒精损伤后,细胞存活率明显降低,与模型组相比,藏药蕨麻(0.2, 0.4, 0.8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)能显著增加酒精损伤后肝细胞存活率,且作用呈剂量依赖性。结果见表 1。

表 1 藏药蕨麻对酒精损伤原代培养肝细胞存活率的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Effect of *Potentilla anserina* on the cell viability in alcohol damaged primary hepatocytes ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	吸光度(OD 值)	细胞存活率/%
对照组	-	0.652 2 \pm 0.145 1	-
模型组	-	0.289 9 \pm 0.045 1	44.45% \pm 0.754 4
蕨麻低剂量组	0.2	0.290 7 \pm 0.035 5	44.57% \pm 1.204 0
蕨麻中剂量组	0.4	0.418 4 \pm 0.215 2	64.15% \pm 0.884 5 ¹⁾²⁾
蕨麻高剂量组	0.8	0.536 2 \pm 0.188 7	82.21% \pm 1.652 3 ¹⁾²⁾³⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与蕨麻低剂量组比较, ²⁾ $P<0.05$; 与蕨麻中剂量组比较, ³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with low dose group, ²⁾ $P<0.05$; compared with middle dose group, ³⁾ $P<0.05$.

2.2 藏药蕨麻对酒精损伤肝细胞 ROS 含量、 Ca^{2+} 浓度的影响

经酒精损伤后, 肝细胞中 DCF 荧光信号明显增强, 代表 ROS 产生增加($P<0.05$)。与对照组相比, 藏药蕨麻(0.2, 0.4, 0.8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)能显著降低酒精损伤后细胞内 DCF 信号, 提示其可以减少 ROS 的产生($P<0.05$); 同时, 经酒精损伤后细胞内 Ca^{2+} 浓度也增加($P<0.05$), 提示酒精损伤可能会造成肝细胞内钙离子超载, 藏药蕨麻(0.2, 0.4, 0.8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

可有效缓解这种情况, 且作用与剂量呈正比。结果见表 2。

表 2 藏药蕨麻对酒精损伤原代培养肝细胞 ROS 含量、 Ca^{2+} 浓度的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effect of *Potentilla anserina* on the concentrations of ROS and Ca^{2+} in alcohol damaged primary hepatocytes ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	ROS 含量/%	Ca^{2+} 浓度/%
对照组	-	-	-
模型组	-	73.56 \pm 1.112	67.06 \pm 1.433
蕨麻低剂量组	0.2	68.21 \pm 0.314 ¹⁾	55.61 \pm 3.012 ¹⁾
蕨麻中剂量组	0.4	60.44 \pm 2.115 ¹⁾²⁾	40.77 \pm 3.525 ¹⁾²⁾
蕨麻高剂量组	0.8	51.24 \pm 0.311 ¹⁾²⁾³⁾	32.27 \pm 1.239 ¹⁾²⁾³⁾

注: 与模型组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与蕨麻低剂量组比较, ²⁾ $P<0.05$; 与蕨麻中剂量组比较, ³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with low dose group, ²⁾ $P<0.05$; compared with middle dose group, ³⁾ $P<0.05$.

2.3 藏药蕨麻对酒精损伤肝细胞凋亡的影响

经流式细胞分析仪检测, 酒精损伤可造成原代肝细胞明显的凋亡改变(65.5%), 藏药蕨麻(0.2, 0.4, 0.8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)可使凋亡率由 54.1%降至 32.5%和 21.1%, 作用有明显的剂量依赖性。结果见图 1。

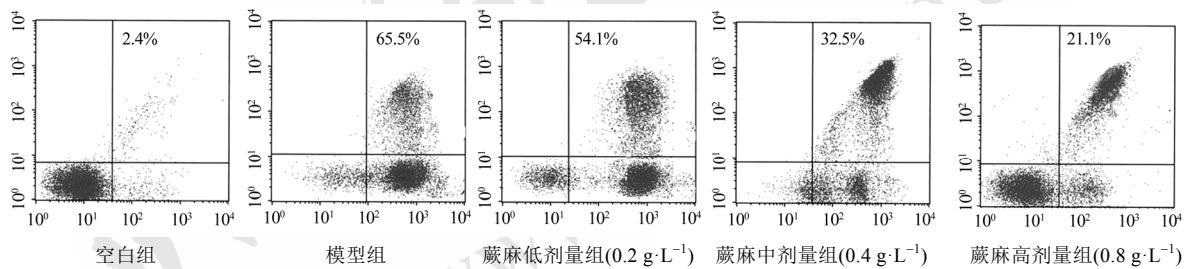


图 1 藏药蕨麻对酒精损伤原代培养肝细胞凋亡的影响

Fig. 1 Effect of *Potentilla anserina* on the cell apoptosis in alcohol damaged primary hepatocytes

2.4 藏药蕨麻对酒精损伤肝细胞 Bcl-2 和 Bax 表达的影响

根据 Western blotting 结果显示, 原代肝细胞经酒精损伤后, Bcl-2 表达明显降低, 藏药蕨麻低、中、高剂量组 Bcl-2 表达分别为 22.7%, 45%和 79%, 且作用呈剂量依赖性; 而相反的现象出现在 Bax 表达变化中, 提示藏药蕨麻对肝细胞酒精损伤的保护作用与 Bcl-2 和 Bax 表达有关。结果见图 2。

3 讨论

ROS 的产生和氧化性损伤被认为与许多疾病的发病机制有关, 线粒体功能异常、氧化还原过

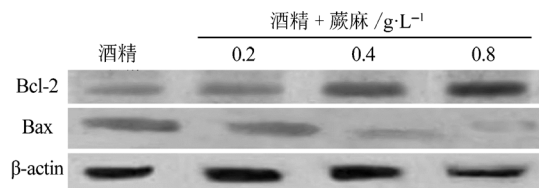


图 2 藏药蕨麻对酒精损伤原代培养肝细胞 Bcl-2 和 Bax 表达的影响

Fig. 2 Effect of *Potentilla anserina* on the expression of Bcl-2 and Bax in alcohol damaged primary hepatocytes

度, 金属以及氧化应力因子都会引起受损细胞产生 ROS^[5]。大量 ROS 可与细胞的膜磷脂、蛋白、核酸发生反应, 使细胞功能障碍和结构破坏, 增

加钙内流,形成超载,机制如下^[6-10]:①细胞膜脂质过氧化和通透性增强,细胞外 Ca^{2+} 内流。②膜 Na-K-ATP 酶失活,使细胞内 Na 升高,Na-Ca 交换增强。③线粒体膜损伤使 ATP 生成减少,后者使肌浆网钙泵活性降低,肌浆网摄取 Ca^{2+} 减少。同时钙超载又会导致 ROS 产生的进一步增加,机制如下^[8,10-12]:①钙敏感蛋白水解酶活性增高,促使黄嘌呤脱氢酶转变为黄嘌呤氧化酶,自由基生成增加。②钙依赖性磷脂酶 A2 激活,使花生四烯酸(AA)生成增加,通过环加氧酶和脂加氧酶作用产生大量 H_2O_2 和 $\text{OH}\cdot$ 。③花生四烯酸代谢产物 LT、PGE2、PAF 等具有白细胞趋化作用,吸引大量白细胞进入损伤组织,通过呼吸爆发产生自由基。④ Ca^{2+} 沉积线粒体使细胞色素氧化酶系统功能失调, O_2 经单电子还原形成氧自由基增多。⑤ Ca^{2+} 进入线粒体可使 MnSOD 和过氧化氢酶和过氧化物酶活性下降,导致氧自由基清除减少。因此,活性氧产生增多和细胞内钙超载可互为因果,形成恶性循环,使损伤进一步加重。据报道^[13],体内体外具有保护作用的物质,包括抗氧化剂、自由基清除剂等,都具有相似的抗氧化机制:①通过抑制酶活性或螯合作用,减少自由基的产生,从而减少 ROS 的产生;②直接清除 ROS;③上调和增强抗氧化系统的活性。SOD、CAT 和 GPX 是细胞主要的抗氧化体系^[14],SOD 可以将超氧化物转化为过氧化氢,然后由 CAT 和 GPX 转化为水。前期研究发现,藏药蕨麻可以增强 SOD、CAT、GPX 的活性^[2]。本研究发现,藏药蕨麻可以增加酒精损伤后肝细胞的存活率,明显减少细胞内 ROS 的产生,降低细胞内钙离子浓度,提示藏药蕨麻对酒精肝损伤的保护作用可能与增强抗氧化酶的活性,增强自由基清除能力,从而减少细胞内 ROS 的产生,减轻钙超载有关。

研究表明,抑凋亡基因 Bcl-2 可与促凋亡基因 Bax 形成同源蛋白二聚体,在细胞死亡信号通路上发挥分子开关的作用^[15],其比值决定了细胞的命运,如果 Bax 相对量高于 Bcl-2,则 Bax 同二聚体数量增多,从而促进细胞凋亡;如果 Bcl-2 相对量高于 Bax,则促进形成 Bcl-2/Bax 异二聚体,并使 Bcl-2 同二聚体的量增多,从而抑制细胞凋亡。本研究发现,藏药蕨麻可以增加酒精损伤后肝细胞

的存活率,减少凋亡,这可能与蕨麻增强 Bcl-2 表达,降低 Bax 表达有关。

REFERENCES

- [1] LIU Z J, BAI Y, GUO L X, et al. Research progresses on chemical constituents of the root of *Potentilla anserina* L. and its pharmacological activities [J]. *J Food Safety Quality(食品安全质量检测学报)*, 2015, 6(9): 3569-3574.
- [2] LUO H Y, HUANG Y H, YANG L. Protective effect of potentilla anserina on ethanol-induced liver damage in mice [J]. *Chin J Clin Pharm Ther(中国临床药理学与治疗学)*, 2014, 19(10): 1107-1110.
- [3] SANG J, ZHU S M, KUANG R. Comparison of MTT assay and relative growth rate method in vitro cytotoxicity test on pharmaceutical packaging material [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2015, 32(5): 571-574.
- [4] LUO H Y, LIU Y, YANG H. Protective effect of cistanchis glycosides on ethanol-induced damage in prime liver cell of mice [J]. *Chin J Clin Pharm Ther(中国临床药理学与治疗学)*, 2011, 16(8): 856-861.
- [5] KANG S W, LEE S, LEE E K. ROS and energy metabolism in cancer cells: alliance for fast growth [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(3): 338-345.
- [6] SUN Q, LONG Z, WU H, et al. Effect of alcohol on diethylnitrosamine-induced hepatic toxicity: Critical role of ROS, lipid accumulation, and mitochondrial dysfunction [J]. *Exper Toxicol Pathol*, 2015, 67(10): 491-498.
- [7] WU Q, NI X. ROS-mediated DNA methylation pattern alterations in carcinogenesis [J]. *Current Drug Target*, 2015, 16(1): 13-19.
- [8] WEBSTER K. Therapeutic potential of targeting the cell cycle [J]. *Chem Res Toxicol*, 2000, 13(10): 940-943.
- [9] PEZZUTO J M. Plant-derived anticancer agents [J]. *Biochem Pharmacol*, 1997, 53(2): 121-133.
- [10] KONSTANTINOV S M, TOPASHKA-ANCHEVA M, BENNER A, et al. Alkylphosphocholines: effects on human leukemic cell lines and normal bone marrow cells [J]. *Int J Cancer*, 1998, 77(5): 778-786.
- [11] SUBHASHINI J, MAHIPAL S V, REDDANNA P. Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia *in vitro* [J]. *Cancer Lett*, 2004, 224(1): 31-43.
- [12] YOSHIDA M, FENG W, SAIJO N, et al. Antitumor activity of daphnane-type diterpene gnidimacrin isolated from *Stellera chamaejasme* L [J]. *Int J Cancer*, 1996, 66(2): 268-273.
- [13] TSENG C J, WANG Y J, LIANG Y C, et al. Microtubule damaging agents induce apoptosis in HL 60 cells and G2/M cell cycle arrest in HT 29 cells [J]. *Toxicology*, 2002, 175(1-3): 123-142.
- [14] KANG C D, YOO S D, HWANG B W, et al. The inhibition of ERK/MAPK not the activation of JNK/SAPK is primarily required to induce apoptosis in chronic myelogenous leukemic K562 cells [J]. *Leuk Res*, 2000, 24(6): 527-534.
- [15] LI Y, SHAN F, WU J M, et al. Novel antitumor artemisinin derivatives targeting G1 phase of the cell cycle [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11(1): 5-8.

收稿日期: 2016-03-24