

## 云南松松塔提取物含药血清 对乙醇损伤大鼠肝细胞的抗氧化作用

郭美仙, 李冬梅, 刘光明, 沈磊, 刘晓波\*

(大理学院 药学与化学学院, 云南省昆虫生物医药研发重点实验室, 云南 大理 671000)

**[摘要]** **目的:**研究云南松松塔提取物含药血清对乙醇损伤大鼠肝细胞的抗氧化作用进行研究。**方法:**取SD大鼠10只,随机分为正常组和云南松松塔提取物组( $1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),每组5只,每天ig 2次,连续3 d,于末次ig 8 h后制备含药血清。取新生大鼠处死,无菌条件下,取肝脏分离正常肝细胞进行培养,将预培养的肝细胞分为正常组、模型组、空白组、3个不同质量分数云南松松塔提取物含药血清组(25%, 50%, 100%),用不同质量分数的云南松松塔提取物含药血清对体外培养的大鼠正常肝细胞进行预处理,1 h后,除正常组,空白组外,其余组加入 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙醇诱导损伤,继续培养8 h后,MTT法检测大鼠肝细胞存活率,酶标法检测培养液中丙氨酸氨基转移酶(ALT),超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA),还原型谷胱甘肽(GSH)含量。**结果:**与正常组比较,受损大鼠肝细胞经5%和10%含药血清处理后,存活率明显增大,细胞培养液中ALT活性和MDA含量明显降低,SOD活性和GSH含量明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论:**云南松松塔提取物含药血清对乙醇损伤大鼠肝细胞有一定的抗氧化作用。

**[关键词]** 云南松松塔; 含药血清; 大鼠肝细胞; 抗氧化作用

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0103-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200103

**Anti-oxidation Effect of Drug-containing Serum with *Pinus yunnanensis* on Damaged Rat Hepatocytes Induced by Ethanol** GUO Mei-xian, LI Dong-mei, LIU Guang-ming, SHEN Lei, LIU Xiao-bo\* (College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Yunnan Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical, Dali 671000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study anti-oxidation effect of drug-containing serum with *Pinus yunnanensis* on the damaged rat hepatocytes induced by ethanol. **Method:** Ten SD rats were selected and randomly divided into normal group and *P. yunnanensis* group ( $1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), with 5 rats in each group, twice ig daily for continuous 3 days, and the drug-containing serum was prepared 8 hours after the last ig medication. The neonatal rats were sacrificed and their normal hepatocytes were separated under sterile conditions for culture. The pre-cultured hepatocytes were divided into normal group, model group, negative group, 3 drug-containing serum groups of *P. yunnanensis* (25%, 50%, 100%). The normal hepatocytes were pre-treated with different concentrations of drug-containing serum for 1 h. All the other groups except normal group and negative group received ethanol ( $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for wound inducing. 8 h after injury, MTT method was used to measure cellular survival rate, and the levels of alanine aminotransferase (ALT), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and glutathione (GSH) in culture medium were measured. **Result:** Compared with the normal group, the hepatocytes in injured rats had significantly higher survival rate, significantly reduced ALT activity and MDA content in culture medium, and significantly increased SOD activity and GSH content ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) after treatment with 5% and 10% drug-containing serum. **Conclusion:** The drug-containing serum with *P. yunnanensis* has anti-oxidation effect on the damaged rat hepatocytes induced by ethanol.

**[Key words]** *Pinus yunnanensis*; medicated serum; rat hepatocytes; anti-oxidation effect

**[收稿日期]** 20140918(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81260632);云南省自然科学基金项目(2012FD036)

**[第一作者]** 郭美仙,实验师,从事中药药理学研究,Tel:0872-2257412,E-mail:yndllyo@126.com

**[通讯作者]** \* 刘晓波,硕士,副教授,从事中药药理学研究,Tel:0872-2257412,E-mail:yndlxb@126.com

目前,全世界范围内酒精的消费量呈上升趋势,这使得酒精性肝病的发病率和致死率也明显增加<sup>[1]</sup>。大量研究已证实,氧化应激与脂质过氧化在酒精性肝病的发生发展中起着十分重要的作用<sup>[2]</sup>。迄今为止,尚无治疗酒精性肝病的特效药物,在所有针对重症酒精性肝病的临床治疗试验中有关糖皮质激素的研究最多,但激素治疗患者死亡率仍然较高,特别是那些合并肾功能损害的患者;并且,合并急性感染、胃肠道出血、胰腺炎、血糖难以控制的糖尿病者为应用皮质激素的禁忌症。为此,仍需积极寻找能够替代激素,并且可有效治疗酒精性肝病的药物<sup>[3]</sup>。

云南松,又名青松、飞松、长毛松,主要分布于我国西南地区,在云南全省几乎都有分布<sup>[4]</sup>。松塔是其球果,《本草纲目》记载了松塔具有祛痰、止咳、平喘、祛风、润肠、安神等功效。现代研究表明松塔具有抗癌、抗氧化、抗炎、抗病毒、抗突变和增强免疫力等<sup>[5-9]</sup>活性。有报道云南松松塔中含有黄酮、莽草酸和木质素等抗氧化活性物质<sup>[10-12]</sup>。刘光明等<sup>[13]</sup>研究表明云南松松塔中含有抗癌、抗 HIV 的活性物质。林牧等<sup>[14]</sup>研究发现云南松松塔球提取物具有抑突变作用。

国内外尚未见云南松松塔对酒精性肝损伤保护作用的研究报道,因此,本实验以云南松松塔中含有抗氧化物质为基础,研究云南松松塔提取物含药血清对乙醇损伤大鼠肝细胞的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** SD 大鼠,清洁级,雌雄各半,200~220 g。由昆明医学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(滇)2011-0004。适应性饲养 3 d。

**1.2 药物及试剂** 由大理学院生药学副教授周浓鉴定为云南松松塔(*Pinus yunnanensis*)。取 2 kg 云南松松塔粗粉,95%乙醇浸泡(2次,24 h/次),将 2 次浸出液混合,回收乙醇,得到 35.5 g 提取物,冷冻干燥后,称取 5 g 溶于 50 mL 生理盐水中,配制成 10%的云南松提取物混悬液<sup>[10]</sup>。胎牛血清(杭州四季青公司,批号 110629),DMEM(美国 Hyclone 公司,批号 1873),胰蛋白酶消化液(批号 20120913),青-链霉素混合液(批号 20121009),DMSO(批号 20110912),MTT(批号 M8180),IV 型胶原酶(批号 C8160),以上试剂均购于美国 Solarbio 公司,丙氨酸氨基转移酶测定试剂盒(ALT,批号 20130219),超氧化物歧化酶测定试剂盒(SOD,批号 20120908),丙二醛测定试剂盒(MDA,批号 20120811),还原型谷胱甘肽测定试剂盒(GSH,批号 20100924),试剂

盒均由南京建成生物工程研究所生产。

**1.3 仪器** SW-CJ-1FD 型超净工作台(新加坡 ESCC 公司),ES-315 型高压灭菌锅(TOMY 公司),3-111 型培养箱(Thermo 公司),AE-21 型倒置生物数码显微镜(德国 Motic 公司),Synergy HT 型多功能酶标仪(美国 Bio Tek 公司)。

## 2 方法

**2.1 含药血清制备** 取 SD 大鼠 10 只,随机分为正常组和 10% 云南松松塔提取物组(PYE),每组 5 只。禁食不禁水 12 h 后,按 10 mL·kg<sup>-1</sup> ig,每天 2 次,共 6 次。于末次 ig 8 h 后,用乙醚麻醉动物,在无菌条件下,由腹主动脉采血,血液静置 30 min 后离心(3 000 r·min<sup>-1</sup>,15 min),取血清,将同组大鼠血清混匀,56 °C 水浴灭活 30 min 后过滤除菌,即云南松松塔含药血清(以下简称“含药血清”),-80 °C 冰箱保存<sup>[15]</sup>。

**2.2 大鼠正常肝细胞的分离和培养** 断头处死新生大鼠,75%乙醇浸泡 5 s,无菌条件下取肝脏,置于装有 4 °C PBS 液的培养皿内,洗净血污去除被膜和血管纤维;剪成 1~3 mm<sup>3</sup> 组织块,再用 PBS 液冲洗 2 次;转移至青霉素小瓶内,加入 0.025% 的 IV 型胶原酶 5 mL;于 37 °C 培养箱中消化 2~3 h,每 15 min 摇动 1 次,每隔 1 h 吹打 1 次;消化完全的组织用吸管轻轻将细胞吹散,离心(800 r·min<sup>-1</sup>,5 min),用 PBS 液洗 2 次,弃悬液,加入 5 mL 完全 DMEM 培养液(简称“完培”,配方:5%胎牛血清,5 mL·L<sup>-1</sup>谷氨酰胺,1%双抗,2.8 g·L<sup>-1</sup>碳酸氢钠,4.8 g·L<sup>-1</sup>HEPES,10 mL·L<sup>-1</sup>丙酮酸钠,)吹打混匀,置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养<sup>[16]</sup>。

**2.3 云南松松塔提取物含药血清对乙醇体外诱导大鼠肝细胞损伤的影响** 将培养好的且存活率 > 85% 的大鼠正常肝细胞,用“完培”配成 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL 细胞悬液,96 孔板种板(80 μL/孔),设正常组、模型组、空白组、3 个不同浓度云南松松塔提取物含药血清组,每组设 6 个复孔;另设 6 个“调零孔”,加入“完培”(80 μL/孔)。37 °C 培养至 80% 细胞贴壁时,“调零孔”、正常组和模型组加入“完培”(10 μL/孔),空白组加入 100% “含 NS 血清”(10 μL/孔),实验组分别依次加入 25%,50%,100% 的“含药血清”(10 μL/孔);37 °C 培养 1 h 后,“调零孔”和正常组加入蒸馏水(10 μL/孔),其余各组加入 100 mmol·L<sup>-1</sup> 乙醇(10 μL/孔)。37 °C 培养 8 h 后,取培养液,酶标法检测 ALT(波长 510 nm),SOD(波长 450 nm)活性和 MDA(波长 530 nm),GSH(波长 420 nm)含量;

去培养液后,所有孔加入 0.5% MTT(100 μL/孔), 37 °C 孵育 4 h 后,所有孔加入 100 μL 三联液(10% SDS-5% 异丁醇-0.12% HCl), 37 °C 孵育 12 h,用酶标仪在 570 nm 处检测吸光度 A,计算肝细胞存活率<sup>[17]</sup>。实验重复 3 次。

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对乙醇损伤大鼠肝细胞存活率的影响** 与正常组比较,模型组 A 明显减小,有统计学差异( $P < 0.01$ ),肝细胞存活率为 48.94%,表明造模成功。与模型组比较,“含药血清”终质量分数为 5.0% 时, A 增大,肝细胞存活率为 59.90%,有统计学差异( $P < 0.05$ );“含药血清”终质量分数为 10.0% 时, A 明显增大,肝细胞存活率为 65.35%,有统计学差异( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 云南松松塔提取物对大鼠肝细胞存活率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Table 1 Effects of *Pinus yunnanensis* extract on survival rate of liver cell in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	药物质量分数/%	A	存活率/%
正常	-	0.473 ± 0.065	-
模型	-	0.237 ± 0.029 <sup>2)</sup>	48.94 ± 9.41
空白	-	0.242 ± 0.046 <sup>2)</sup>	50.47 ± 8.88
PYE	2.5	0.249 ± 0.044 <sup>2)</sup>	52.71 ± 9.28
	5.0	0.296 ± 0.060 <sup>2,3)</sup>	59.90 ± 12.15 <sup>3)</sup>
	10.0	0.323 ± 0.057 <sup>1,4)</sup>	65.35 ± 11.56 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

**3.2 对乙醇损伤大鼠肝细胞培养液中 ALT 活性和 MDA 含量的影响** 与正常组比较,模型组 ALT 活性和 MDA 含量均明显升高,均有统计学差异( $P < 0.01$ ),表明造模成功。与模型组比较,“含药血清”终浓度为 5.0% 时,ALT 活性和 MDA 含量均明显降低,均有统计学差异( $P < 0.05$ );“含药血清”终浓度为 10.0% 时,ALT 活性和 MDA 含量均明显降低,均有统计学差异( $P < 0.01$ )。见表 2。

**3.3 对乙醇损伤大鼠肝细胞培养液中 SOD 活性和 GSH 含量的影响** 与正常组比较,模型组 SOD 活性和 GSH 含量均明显降低,均有统计学差异( $P < 0.01$ ),表明造模成功。与模型组比较,“含药血清”质量分数为 5.0% 时,SOD 活性和 GSH 含量均明显升高,均有统计学差异( $P < 0.05$ );“含药血清”终质

表 2 云南松松塔提取物对大鼠肝细胞培养液中 ALT 活性和 MDA 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effects of *P. yunnanensis* extract on ALT activity and MDA content of rat liver cells in culture medium ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	药物质量分数/%	ALT /U·L <sup>-1</sup>	MDA /μmol·L <sup>-1</sup>
正常	-	3.15 ± 0.57	7.44 ± 1.55
模型	-	5.75 ± 0.44 <sup>2)</sup>	26.43 ± 3.74 <sup>2)</sup>
空白	-	5.49 ± 0.76 <sup>2)</sup>	24.96 ± 4.35 <sup>2)</sup>
PYE	2.5	5.18 ± 0.57 <sup>2)</sup>	22.97 ± 3.20 <sup>2)</sup>
	5.0	4.64 ± 0.58 <sup>2,3)</sup>	19.88 ± 2.76 <sup>2,3)</sup>
	10.0	3.89 ± 0.45 <sup>1,4)</sup>	14.93 ± 2.54 <sup>2,4)</sup>

量分数为 10.0% 时,SOD 活性和 GSH 含量均明显升高,均有统计学差异( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 云南松松塔提取物对大鼠肝细胞培养液中 SOD 活性和 GSH 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effects of *P. yunnanensis* extract on SOD activity and GSH content of rat liver cells in culture medium ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	药物质量分数/%	SOD/U·mL <sup>-1</sup>	GSH/μmol·L <sup>-1</sup>
正常	-	26.75 ± 2.87	51.23 ± 7.98
模型	-	12.69 ± 1.72 <sup>2)</sup>	21.31 ± 4.37 <sup>2)</sup>
空白	-	13.44 ± 1.72 <sup>2)</sup>	23.03 ± 4.85 <sup>2)</sup>
PYE	2.5	14.98 ± 2.15 <sup>2)</sup>	25.26 ± 5.86 <sup>2)</sup>
	5.0	16.90 ± 2.25 <sup>2,3)</sup>	28.97 ± 6.14 <sup>2,3)</sup>
	10.0	18.97 ± 2.04 <sup>2,4)</sup>	31.00 ± 5.52 <sup>2,4)</sup>

### 4 讨论

“血清药理学”是近年来开展的中药实验方法中的一种新的体外实验方法,它将受试药物经口给予动物后,取其血清作为药物源加入离体反应系统中研究其药理作用<sup>[18]</sup>。最大的优点表现在实验结果与在体实验结果的一致性以及体外实验的易操作性。这种方法比较接近药物的体内过程,其原有成分或在体内转化为活性成分,或代谢后失活,或没有被吸收入体内,或通过第二信使而间接起作用都可以通过血清药理学反映出来,理论上更具备科学性、真实性<sup>[19]</sup>。

许多化学物质或药物均可在体外引起肝细胞损伤。将乙醇直接加入肝细胞的培养液中,肝细胞膜受损通透性增加,表现为细胞内酶的外溢,培养液中 ALT 与 AST 活性升高;肝细胞膜发生脂质过氧化,MDA 含量升高,SOD 活性和 GSH 含量下降<sup>[2,16]</sup>。因此,ALT 活性和 MDA 含量的高低反映了细胞过

氧化损伤的程度;SOD活性和GSH含量的高低可以反应机体抗氧化能力的强弱。所以,通过检测肝细胞培养液中ALT,SOD活性及MDA,GSH含量的高低,可以判断肝脏被氧化损伤的程度和药物抗氧化损伤的效果。

本实验结果显示:经含云南松松塔提取物含药血清处理后再用乙醇损伤的肝细胞,存活率明显增大,培养液中ALT活性和MDA含量明显降低,SOD活性和GSH含量明显升高,与模型组比较均有统计学差异,表明云南松松塔提取物含药血清可以减轻乙醇对大鼠肝细胞的毒性作用和过氧化损伤,可以提高大鼠肝细胞的抗氧化能力。实验结果证明:云南松松塔提取物含药血清对乙醇损伤大鼠肝细胞有一定的抗氧化作用。

云南松松塔在云南省资源丰富,有较好药用价值开发前景。本研究证实了云南松松塔提取物的确有抗氧化作用。但笔者尚未确定是哪些成分在发挥作用,以及这些成分是通过什么样的途径来发挥抗氧化作用的。因此,在以后的研究中,笔者拟计划分析“含药血清”中的成分,同时考查“含药血清”对参与肝脏炎症的发生、肝细胞的坏死和引起肝细胞凋亡的细胞因子(肿瘤坏死因子- $\alpha$ ,白介素-6等)的影响,以及相应mRNA表达的影响,来进一步探讨云南松松塔在酒精性肝损伤方面的应用价值和机制。

#### [参考文献]

[1] 厉有名. 酒精性肝病发病的流行病学特点[J]. 实用肝病杂志, 2012, 15(3): 180-182.  
[2] 李爱华, 赵刚. 酒精性肝病发病机制的研究进展[J]. 吉林医学, 2010, 31(17): 2670-2672.  
[3] 范建高, 丁晓东. 酒精性肝炎的治疗现状[J]. 中华肝病杂志, 2003, 11(11): 703-704.  
[4] 中国科学院昆明植物研究所. 云南种子植物名录. 上册[M]. 昆明: 云南人民出版社, 1984: 9.  
[5] 李艳省, 谢芳钦, 金新文, 等. 红松球果鳞片多糖抗肿瘤作用[J]. 中国公共卫生, 2010, 26(4): 390-392.

[6] 张宇, 王莉, 傅宇明, 等. 樟子松松塔抗氧化及抗炎作用研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1549-1552.  
[7] 王洪斌, 董丹, 许冰, 等. 松果提取物的体外抗腺病毒活性研究[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(3): 525-528.  
[8] 昌思思, 马志敏, 宋正蕊, 等. 松塔球提取物的抑突变性研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2010, 22(1): 59-61.  
[9] 屈东香, 陈秀杰, 刘永胜, 等. 红松松塔水提物对小鼠自然杀伤细胞活性影响[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(13): 989-991.  
[10] 李冬梅, 李莉, 吴五谊, 等. 正交试验法优选云南松松塔总黄酮的提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(1): 37-39.  
[11] 张志琴, 刘光明, 杨永寿, 等. 云南松松塔中莽草酸的提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(30): 18512-18513, 18515.  
[12] 张海珠, 周萍, 刘光明, 等. 云南松松塔中木质素分析[J]. 亚太传统医药, 2013, 9(8): 24-25.  
[13] 刘光明, 吕永俊, 李好枝, 等. 云南松松塔中抗HIV活性成分的研究初报[J]. 大理学院学报, 2009, 8(2): 69-71.  
[14] 林牧, 刘光明, 蒋锡超, 等. 蚕豆根尖微核试验研究云南松松塔球提取物抑突变性[J]. 大理学院学报, 2014, 13(2): 55-57.  
[15] 李刚, 张述禹, 王玉华, 等. 诃子提取物及含药血清对大鼠肝细胞损伤保护作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1707-1709.  
[16] 刘建文. 药理实验方法学—新技术与新方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 226-228.  
[17] 肖潇. 姜黄素对慢性酒精肝损伤保护作用的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.  
[18] 贺玉琢. 384日本汉方药“血清药理学”、“血清药化学”的研究概况[J]. 国外医学: 中医中药分册, 1998, 20(5): 3-6.  
[19] 刘振龙, 李贝. 血清药理学在中药复方研究中的应用及其评价[J]. 中华现代中西医杂志, 2007, 5(6): 418-421.

[责任编辑 周冰冰]