

# 金丝桃苷对过氧化氢诱导的 A549 细胞氧化损伤的保护作用

高健美<sup>1</sup>, 李德芬<sup>1</sup>, 牛爽<sup>2</sup>, 李柯<sup>2</sup>, 陈娜娜<sup>1</sup>, 李海波<sup>2\*</sup>

(1. 遵义医学院药学院, 贵州遵义 563000; 2. 辽宁中医药大学基础医学院, 沈阳 110000)

**[摘要]** 目的:研究金丝桃苷对过氧化氢( $H_2O_2$ )诱导的 A549 细胞氧化损伤的保护作用,并探讨其相关的作用机制。方法:体外培养 A549 细胞,采用  $H_2O_2$  ( $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 作用 24 h,建立 A549 细胞氧化损伤模型,分为空白组,模型组 ( $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} H_2O_2$ ),阳性药 ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} N$ -乙酰半胱氨酸)组和不同浓度金丝桃苷 ( $1, 10, 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组。采用噻唑蓝 (MTT) 法检测细胞活力,通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法检测活性氧 (ROS),丙二醛 (MDA) 含量,乳酸脱氢酶 (LDH),过氧化氢酶 (CAT),谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性。通过罗丹明 123 染色法检测细胞线粒体膜电位改变。采用蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测沉默信息调节因子 3 (Sirt3),异柠檬酸脱氢酶 2 (IDH2) 和锰超氧化物歧化酶 (MnSOD) 蛋白表达。结果:与模型组比较,金丝桃苷显著提高细胞存活率 ( $P < 0.01$ ),降低 LDH 的外漏,ROS 和 MDA 含量 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),明显增加 CAT, SOD, GSH-Px 活性 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。金丝桃苷能够显著提高线粒体膜电位,上调 Sirt3, IDH2 和 MnSOD 蛋白表达 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。结论:金丝桃苷能够保护  $H_2O_2$  诱导的 A549 细胞氧化损伤,其作用可能与提高清除 ROS 能力,调控 Sirt3 线粒体途径相关。

**[关键词]** 金丝桃苷; A549 细胞; 氧化损伤; 线粒体

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)11-0128-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017110128

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170309.1012.004.html>

**[网络出版时间]** 2017-03-09 10:12

## Protective Effect of Hyperoside on $H_2O_2$ -induced Oxidative Damage of A549 Cells

GAO Jian-mei<sup>1</sup>, LI De-fen<sup>1</sup>, NIU Shuang<sup>2</sup>, LI Ke<sup>2</sup>, CHEN Na-na<sup>1</sup>, LI Hai-bo<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China;

2. College of Basic Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect of hyperoside on  $H_2O_2$ -induced oxidative damage of A549 cells. **Method:** *In vitro* oxidative stress damage model was established by treating A549 cells with  $H_2O_2$  ( $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 24 h. Cells were divided into blank group, model group ( $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} H_2O_2$ ), positive drug group (*N*-acetyl cysteine  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), hyperoside groups ( $1, 10, 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Cell viability was determined by thiazolyl blue (MTT) assay. Contents of reactive oxygen (ROS) and malondialdehyde (MDA), lactic dehydrogenase (LDH), catalase (CAT), glutathion peroxidase (GSH-Px) and superoxide dismutase (SOD) activity were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. The membrane potential changes of mitochondria were detected by Rhodamine 123 staining, and the protein expression levels of sirtuin 3 (Sirt3), isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) and MnSOD were determined by Western blot technology. **Result:** As compared with model group, hyperoside could significantly enhance the cell viability ( $P < 0.01$ ), decrease LDH activity, contents of ROS and MDA, and increase GSH-Px and SOD activities ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). Moreover, hyperoside markedly improved mitochondrial membrane potential, and Western blot showed that

**[收稿日期]** 20161208(034)

**[基金项目]** 贵州省科学技术基金联合基金项目(黔科合 LH 字[2015]7540 号)

**[第一作者]** 高健美, 博士, 副教授, 从事中药抗氧化及抗脑缺血研究, Tel:0851-28642337, E-mail:gaojianmei@zmc.edu.cn

**[通讯作者]** \*李海波, 博士, 教授, 从事中药抗氧化研究, Tel:024-31207308, E-mail:735658485@qq.com

hyperoside could significantly up-regulate the protein expression levels of Sirt3, IDH2 and MnSOD ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Hyperoside could protect  $H_2O_2$ -induced oxidative damage of A549 cells, and its protective effects may be related with increase in ROS removal ability and regulation of Sirt3 mitochondrial pathway.

[**Key words**] hyperoside; A549 cells; oxidative damage; mitochondria

氧化应激是导致多种肺部疾病及临床高氧治疗呼吸衰竭和缺氧性疾病引起肺损伤的主要原因之一。肺脏是氧化损伤的主要靶器官,寻找和开发减轻或治疗氧化应激导致的肺损伤药物迫在眉睫<sup>[1-2]</sup>。有研究证实自由基清除剂可以通过清除过多自由基,抑制脂质过氧化来减少上皮细胞的损伤,从而保护氧化应激导致的肺损伤<sup>[3-4]</sup>。沉默信息调节因子 3(Sirt3)是一种依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的去乙酰化酶,属于进化上高度保守的 Sirtuin 家族成员之一。维持和调节线粒体的正常生理功能,对于缓解和降低因氧化应激负荷引起的疾病发生具有重要意义<sup>[5-6]</sup>。但是,Sirt3 是否参与氧化应激导致的肺损伤尚不清楚。金丝桃苷又名槲皮素-3-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃半乳糖苷,是从藤黄科植物贯叶连翘中提取的一种黄酮醇苷类化合物,是含有多个酚羟基的黄酮醇苷类化合物,以往研究表明金丝桃苷具有抗炎、抗氧化、提高机体免疫力、抗脑缺血再灌注损伤等药理作用<sup>[7-9]</sup>。但是其对肺上皮细胞氧化损伤的抗氧化作用研究尚未见报道。肺 II 型上皮细胞是氧化损伤的主要靶标,由于肺 II 型上皮细胞分离获取较难,而且在体外难以传代<sup>[10]</sup>。因此本实验选择具有 II 型肺泡上皮细胞相似的形态以及生化特性人肺腺癌肺泡上皮细胞 A549 作为研究对象,探讨金丝桃苷是否通过调控 Sirt3 蛋白表达发挥对肺泡上皮细胞氧化损伤的保护作用,为临床防治氧化应激所致肺损伤提供药理学依据。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人肺腺癌细胞 A549(批号 SCSP-503)购自中科院上海细胞库。

**1.2 药物及试剂** 金丝桃苷(成都普思生物科技股份有限公司,批号 PS000510,纯度  $\geq 98\%$ );过氧化氢( $H_2O_2$ ,美国 Sigma 公司,批号 H1009);噻唑蓝(MTT)及罗丹明 123(美国 Sigma 公司,批号分别为 M2128, R8004);活性氧(ROS)检测试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号 20150118);乳酸脱氢酶(LDH),丙二醛(MDA),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20141220,20150109,20150306);Anti-Sirt3,异柠檬酸脱氢酶 2(IDH2),锰超氧化物歧化酶

(MnSOD)和  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab86671, ab84726, ab13533, ab8226)。

**1.3 仪器** Midi40 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);IX73 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司);DDY-10 型三恒电泳仪,Trans-Blot SD 型半干转印槽,全自动电泳凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 A549 细胞的培养** 将 A549 细胞接种于含 10% 胎牛血清,2% 谷氨酰胺的 RPMI1640 培养液培养液中,在 37 °C 5%  $CO_2$  培养箱中培养。

**2.2 建立 A549 细胞氧化损伤模型<sup>[2]</sup>** 取处于对数生长期的 A549 细胞,以  $1 \times 10^5$  个/mL 细胞密度,每孔 100  $\mu$ L 接种于 96 孔培养板中,在 37 °C 5%  $CO_2$  培养箱中培养 12 h 后,分别加入浓度为 50, 100, 200, 400, 800  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>  $H_2O_2$  分别作用 24 h 后,每孔加入 MTT(5 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 25  $\mu$ L,继续培养 4 h 后,弃上清,每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L 溶解,酶标仪 492 nm 处检测吸光度  $A$ ,并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{药物处理组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

**2.3 金丝桃苷预处理对细胞活力的影响** A549 细胞按照 2.2 项下方法接种于 96 孔板中,培养 12 h 后,加入 1, 10, 100  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 金丝桃苷和 100  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> *N*-乙酰半胱氨酸预处理 1 h,加入 200  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>  $H_2O_2$  继续作用 24 h 后,每孔加入 MTT(5 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 25  $\mu$ L,继续培养 4 h 后,弃上清,每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L 溶解,酶标仪 492 nm 处检测  $A$ ,并计算细胞存活率。

**2.4 细胞形态观察** 取对数生长期的 A549 细胞,以  $1 \times 10^5$  个/mL 细胞密度,每孔 100  $\mu$ L 接种于 96 孔培养板中,在 37 °C 5%  $CO_2$  培养箱中培养 12 h 后,以 2.3 项方法给药处理细胞后,在倒置显微镜下观察细胞形态。

**2.5 ROS, MDA 含量, LDH, CAT, GSH-Px 和 SOD 活性的测定** 将 A549 细胞按 2.2 项下方法接种于 96 孔细胞培养板中,药物作用 24 h 后,取上清,按照 LDH 试剂盒说明书检测各组细胞上清液中 LDH 的活性;取对数生长期的 A549 细胞接种于 6 孔培养

板中,经药物作用 24 h 后,收集细胞,超声破碎细胞,在 4 ℃ 条件下,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,收集上清,按照酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒操作检测 ROS,MDA 含量,CAT,GSH-Px 和 SOD 活性。

**2.6 线粒体膜电位检测** 将 A549 细胞按 2.2 项下方法接种于 6 孔细胞培养板中,药物作用 24 h 后,加入终质量浓度为 2 μg·L<sup>-1</sup>的罗丹明 123 染色液 400 μL,在 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中避光染色 30 min 后,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,在荧光显微镜下观察并拍照记录。

**2.7 蛋白质免疫印迹(Western blot)测定 Sirt3, IDH2 和 MnSOD 蛋白表达** 将药物作用后的 A549 细胞用 PBS 洗 3 次,加入 RIPA 细胞裂解液于冰上裂解 30 min,离心取上清,采用 BCA 试剂盒进行蛋白定量后,将蛋白变性后取 20 μg 蛋白上样,采用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后,将蛋白转印至 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后,加入相应一抗(Sirt3, 1:1 000; IDH2, 1:1 000; MnSOD, 1:1 000) 4 ℃ 封闭过夜, TBST 洗 3 次,加二抗(1:5 000)封闭液封闭 1 h,采用 ECL 发光法显色,ChemiDoc XRS+ 系统成像,扫描记录,采用 Quantity One 软件进行分析。

**2.8 统计学分析** 采用 SPSS 22.0 统计软件处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组间的两两比较采用单因素方差分析,方差齐用 LSD 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 A549 细胞存活率的影响

实验结果表明 50 ~ 800 μmol·L<sup>-1</sup>的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 A549 细胞 24 h 后能够显著降低细胞存活率并呈浓度依赖性。400 μmol·L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 使 A549 存活率降低 50% 左右( $P < 0.01$ ),实验结果重复性好,因此,确定 400 μmol·L<sup>-1</sup>的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 建立氧化应激损伤模型。见表 1。

表 1 过氧化氢对 A549 细胞活力的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on A549 cells viability( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/μmol·L <sup>-1</sup>	A	细胞存活率/%
空白	-	0.76 ± 0.01	100
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50	0.74 ± 0.01	98.08 ± 1.80
	100	0.64 ± 0.02 <sup>1)</sup>	85.27 ± 1.58 <sup>1)</sup>
	200	0.59 ± 0.03 <sup>2)</sup>	72.42 ± 2.45 <sup>2)</sup>
	400	0.38 ± 0.01 <sup>2)</sup>	51.22 ± 1.72 <sup>2)</sup>
	800	0.13 ± 0.02 <sup>2)</sup>	17.51 ± 2.92 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 金丝桃苷预处理对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 A549 氧化损伤细胞存活率的影响** 与模型组比较,1 ~ 100 μmol·L<sup>-1</sup>金丝桃苷预处理后,细胞存活率明显上升( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 金丝桃苷预处理对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 A549 氧化损伤细胞活力的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

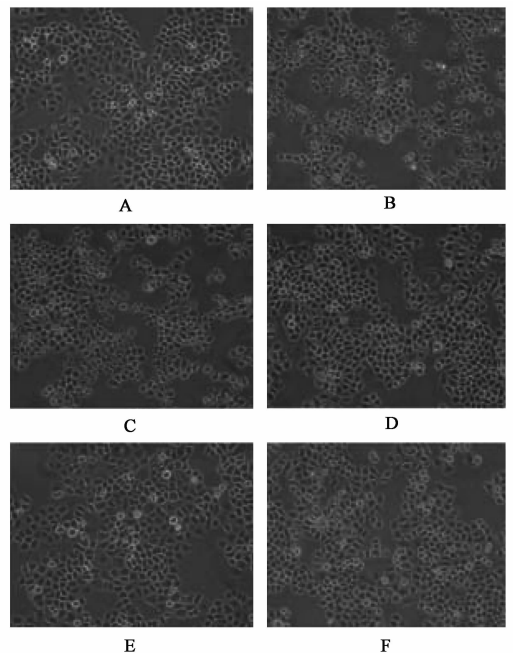
Table 2 Effect of hyperoside pretreatment on A549 cells viability induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/μmol·L <sup>-1</sup>	A	细胞存活率/%
空白	-	0.80 ± 0.02	100
模型	-	0.38 ± 0.02 <sup>2)</sup>	47.47 ± 1.48 <sup>2)</sup>
金丝桃苷	1	0.51 ± 0.02 <sup>4)</sup>	63.58 ± 3.59 <sup>4)</sup>
	10	0.68 ± 0.03 <sup>4)</sup>	84.92 ± 1.97 <sup>4)</sup>
	100	0.75 ± 0.02 <sup>4)</sup>	93.24 ± 1.52 <sup>4)</sup>
N-乙酰半胱氨酸	100	0.67 ± 0.04 <sup>4)</sup>	82.71 ± 3.31 <sup>4)</sup>

注:与空白组比较<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 3 ~ 5 同)。

#### 3.3 金丝桃苷预处理对 A549 细胞形态的影响

空白组正常 A549 细胞排列规则整齐,大小均一。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(400 μmol·L<sup>-1</sup>)模型组细胞大小不规整,数量减少,部分悬浮于培养液中。金丝桃苷(浓度分别为 1,10,100 μmol·L<sup>-1</sup>)预处理组细胞形态数量增加,状态接近正常组细胞。见图 1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 金丝桃苷 1 μmol·L<sup>-1</sup>组; D. 金丝桃苷 10 μmol·L<sup>-1</sup>组; E. 金丝桃苷 100 μmol·L<sup>-1</sup>组; F. N-乙酰半胱氨酸组(图 2,3 同)

图 1 金丝桃苷预处理对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 A549 细胞形态学的影响(× 200)

Fig. 1 Effect of hyperoside pretreatment on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced morphological changes in A549 cells(× 200)

**3.4 金丝桃苷预处理对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 A549 细胞 LDH 活性及 ROS 和 MDA 含量的影响** LDH 活性能够反映细胞氧化损伤后的死亡情况,ROS 和脂质过氧化物 MDA 含量能够反映细胞内氧化应激的损伤程度。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400 μmol·L<sup>-1</sup>) 模型组较空白组 LDH 活性,ROS 及 MDA 含量显著增高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较,金丝桃苷 (1, 10, 100 μmol·L<sup>-1</sup>) 预处理组明显降低 LDH 活性,ROS 及 MDA 含量

( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 3。

**3.5 金丝桃苷预处理对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 A549 细胞 CAT, GSH-Px 和 SOD 活性的影响** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400 μmol·L<sup>-1</sup>) 模型组较空白组 CAT, GSH-Px 和 SOD 活性明显增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较,金丝桃苷 (1, 10, 100 μmol·L<sup>-1</sup>) 预处理组不同程度的升高 CAT, GSH-Px 和 SOD 的活性 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 4。

表 3 金丝桃苷预处理对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 A549 细胞 LDH 活性和 ROS 及 MDA 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/μmol·L <sup>-1</sup>	LDH/U·L <sup>-1</sup>	ROS/U·mL <sup>-1</sup>	MDA/μmol·L <sup>-1</sup>
空白	-	65.23 ± 1.13	27.20 ± 2.75	7.59 ± 1.25
模型	-	142.58 ± 1.38 <sup>2)</sup>	86.53 ± 4.39 <sup>2)</sup>	16.04 ± 2.56 <sup>2)</sup>
金丝桃苷	1	119.42 ± 1.19 <sup>4)</sup>	65.70 ± 3.93 <sup>4)</sup>	11.50 ± 0.96 <sup>3)</sup>
	10	83.38 ± 1.08 <sup>4)</sup>	42.73 ± 3.26 <sup>4)</sup>	9.05 ± 1.02 <sup>4)</sup>
	100	76.51 ± 1.26 <sup>4)</sup>	33.69 ± 4.93 <sup>4)</sup>	8.35 ± 0.68 <sup>4)</sup>
N-乙酰半胱氨酸	100	81.63 ± 1.12 <sup>4)</sup>	43.95 ± 0.55 <sup>4)</sup>	9.28 ± 2.85 <sup>4)</sup>

表 4 金丝桃苷预处理对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 A549 细胞 CAT, GSH-Px 和 SOD 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/μmol·L <sup>-1</sup>	CAT/U·mL <sup>-1</sup>	GSH-Px/U·mg <sup>-1</sup>	SOD/U·mL <sup>-1</sup>
空白	-	51.39 ± 1.29	75.63 ± 1.22	38.13 ± 0.95
模型	-	26.37 ± 0.85 <sup>2)</sup>	42.75 ± 2.47 <sup>2)</sup>	23.85 ± 1.63 <sup>2)</sup>
金丝桃苷	1	29.95 ± 0.56 <sup>3)</sup>	52.68 ± 2.32 <sup>4)</sup>	28.27 ± 0.83 <sup>3)</sup>
	10	46.38 ± 1.35 <sup>4)</sup>	68.01 ± 1.66 <sup>4)</sup>	31.61 ± 1.39 <sup>4)</sup>
	100	49.49 ± 0.41 <sup>4)</sup>	70.28 ± 2.11 <sup>4)</sup>	33.59 ± 0.32 <sup>4)</sup>
N-乙酰半胱氨酸	100	46.75 ± 0.62 <sup>4)</sup>	67.77 ± 0.73 <sup>4)</sup>	30.03 ± 1.34 <sup>4)</sup>

**3.6 金丝桃苷预处理对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 A549 氧化损伤线粒体膜电位的影响** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400 μmol·L<sup>-1</sup>) 模型组较空白组荧光强度明显降低,表明氧化损伤后线粒体膜电位降低;而金丝桃苷 (1, 10, 100 μmol·L<sup>-1</sup>) 预处理组不同程度的使荧光强度增强,表明金丝桃苷能够提高线粒体膜电位。见图 2。

**3.7 金丝桃苷预处理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 A549 细胞中 Sirt3, IDH2 和 MnSOD 蛋白表达的影响** 与空白组比较, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (400 μmol·L<sup>-1</sup>) 模型组显著下调 Sirt3, IDH2 和 MnSOD 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较,金丝桃苷不同程度上调 Sirt3, IDH2 和 MnSOD 蛋白表达 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 3, 表 5。

表 5 金丝桃苷预处理对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 A549 细胞中 Sirt3, IDH2 和 MnSOD 蛋白相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/μmol·L <sup>-1</sup>	Sirt3/β-actin	IDH2/β-actin	MnSOD/β-actin
空白	-	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.01
模型	-	0.52 ± 0.04 <sup>2)</sup>	0.63 ± 0.05 <sup>2)</sup>	0.53 ± 0.02 <sup>2)</sup>
金丝桃苷	1	0.57 ± 0.05 <sup>3)</sup>	0.78 ± 0.01 <sup>4)</sup>	0.72 ± 0.04 <sup>4)</sup>
	10	0.79 ± 0.05 <sup>4)</sup>	1.02 ± 0.02 <sup>4)</sup>	0.80 ± 0.05 <sup>4)</sup>
	100	1.01 ± 0.02 <sup>4)</sup>	1.06 ± 0.02 <sup>4)</sup>	0.83 ± 0.04 <sup>4)</sup>
N-乙酰半胱氨酸	100	0.72 ± 0.01 <sup>4)</sup>	0.87 ± 0.05 <sup>4)</sup>	0.79 ± 0.03 <sup>4)</sup>

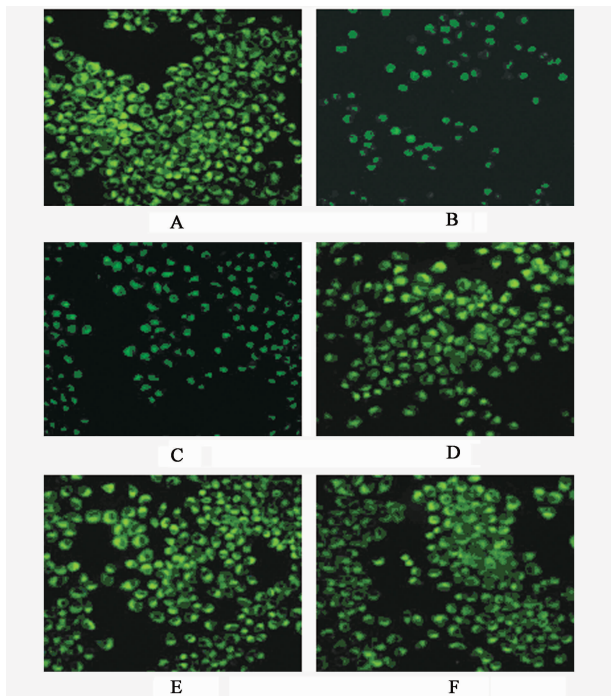


图 2 金丝桃苷预处理对  $H_2O_2$  诱导的 A549 细胞线粒体膜电位的影响(荧光显微镜,  $\times 200$ )

Fig. 2 Effect of hyperoside pretreatment on  $H_2O_2$ -induced mitochondrial membrane potential changes in A549 cells( fluorescence microscope,  $\times 200$ )

损伤的作用。

线粒体是机体能量代谢和 ROS 产生与消除的重要场所,氧化应激可引起线粒体内 ROS 蓄积,导致线粒体功能障碍<sup>[15]</sup>。而线粒体内 SOD 是以  $Mn^{2+}$  为辅基,称为 MnSOD 或称 SOD2,能够催化超氧负离子氧化还原生成水与分子氧,是线粒体内清除过多 ROS 的关键酶<sup>[16]</sup>。本文研究结果表明金丝桃苷能够抑制 ROS 增加导致的线粒体膜电位降低和功能障碍。同时,金丝桃苷能够增强 MnSOD 活力,进一步增强清除自由基的能力。本研究结果表明, $H_2O_2$  导致线粒体膜电位降低,线粒体功能异常,而金丝桃苷能够清除过多的 ROS,恢复线粒体功能。

近年来研究发现,沉默信息调节因子家族成员之一的 Sirt3 定位于线粒体基质,能够通过其去乙酰化活性激活脂肪酸  $\beta$ -氧化过程中的 IDH2,调节线粒体代谢酶的乙酰化水平,增强抗氧化酶活力,提高机体对 ROS 的清除能力<sup>[17-18]</sup>。本文研究结果显示, Sirt3 在氧化应激诱导的 A549 细胞氧化损伤发挥着重要作用。金丝桃苷能够上调 Sirt3 蛋白表达,进而活化其下游 IDH2 蛋白,增加 MnSOD 活力。Sirt3 亦能够直接或间接的提高 CAT, GSH-Px 和 SOD 的活力增强清除 ROS 的能力,发挥抗氧化应激作用。

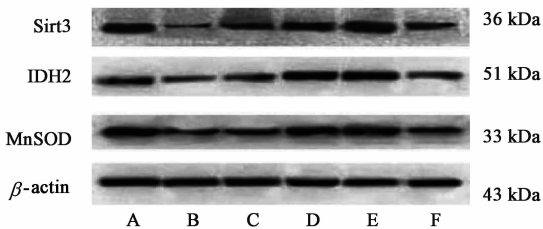
综上所述,金丝桃苷对  $H_2O_2$  诱导的 A549 细胞氧化损伤的具有保护作用,其作用与提高抗氧化酶系统,维持线粒体功能,调控 Sirt3 信号通路有关。为临床进一步应用金丝桃苷防治氧化应激导致的肺损伤提供药理学依据。

#### [参考文献]

- [1] 常秀娟,张帅,陈健,等.热毒宁注射液抗大鼠急性肺损伤治疗作用[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(22):172-175.
- [2] 朱震,王小娟,邓哈依,等.丝素肽对过氧化氢致 A549 细胞损伤的修复作用[J].环境与职业医学,2016,33(3):233-236.
- [3] 曹建,王媛媛,胡衍辉,等.依达拉奉对肺泡 II 型上皮细胞凋亡的保护作用[J].临床麻醉学杂志,2013,29(2):185-188.
- [4] 王正冠,刘一凡,李芮冰.依达拉奉对吸入性肺损伤大鼠肺组织的保护作用[J].解放军医学院学报,2014,35(11):1151-1154.
- [5] 王国恩,翟羽佳,何蓉蓉,等. Sirt3 调节氧化应激作用[J].中国药理学通报,2012,28(10):1333-1336.
- [6] Yoon S P, Kim J. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 contributes to oxidative stress through downregulation of

图 3  $H_2O_2$  损伤的 A549 细胞中 Sirt3, IDH2 和 MnSOD 蛋白相对表达

Fig. 3 Expression of Sirt3, IDH2, MnSOD protein in A549 cells treated with  $H_2O_2$



#### 4 讨论

氧化应激是指机体在遭受各种有害刺激时,机体抗氧化系统包括 CAT, SOD, GSH-Px 会阻止 ROS 的产生或清除过多的 ROS。但是,当体内 ROS 产生过多,氧化程度超出机体对 ROS 的清除能力,即氧化系统和抗氧化系统失衡时则导致机体器官组织损伤<sup>[11-12]</sup>。 $H_2O_2$  是导致肺损伤的主要 ROS 之一,能够诱导细胞氧化损伤,致使细胞膜脂质过氧化,细胞膜完整性被破坏导致细胞功能丧失或死亡<sup>[13-14]</sup>。本实验研究结果表明,金丝桃苷能够通过提高抗氧化酶活力,升高  $H_2O_2$  诱导的 A549 细胞活力。提示金丝桃苷具有保护  $H_2O_2$  诱导的 A549 细胞氧化

- sirtuin 3 during cisplatin nephrotoxicity[J]. *Anat Cell Biol*, 2016, 49(3): 165-176.
- [ 7 ] 黄凯,耿森,王建华,等. 金丝桃苷对免疫性肝损伤小鼠的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(19): 137-141.
- [ 8 ] 胡小艳,李博文. 金丝桃苷对免疫抑制小鼠抗氧化能力和免疫功能的影响[J]. *安徽农业科学*, 2015, 43(34): 170-172.
- [ 9 ] 韩军,宣佳利,胡浩然,等. 金丝桃苷预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤作用与 PI3K/Akt 信号通路的关系[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(1): 118-123.
- [ 10 ] 焦常平,叶亚婧,张渊,等. 纳米二氧化硅诱导 A549 细胞损伤及其氧化应激机制[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 27(6): 995-999.
- [ 11 ] Kalimeris K, Briassoulis P, Ntzouvani A, et al. *N*-acetylcysteine ameliorates liver injury in a rat model of intestinal ischemia reperfusion[J]. *J Surg Res*, 2016, 206(2): 263-272.
- [ 12 ] Jagadapillai R, Rane M J, LIN X, et al. Diabetic microvascular disease and pulmonary fibrosis: the contribution of platelets and systemic inflammation[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(11): 1-14.
- [ 13 ] WANG Y, LIU Q, XU Y, et al. Ginsenoside Rg<sub>1</sub> protects against oxidative stress-induced neuronal apoptosis through myosin II A-actin related cytoskeletal reorganization[J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(11): 1341-1356.
- [ 14 ] 梁瑞峰,李开言,王晓丽,等. 降压宝蓝片含药血清对过氧化氢损伤的人脐静脉内皮细胞的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(3): 112-115.
- [ 15 ] 杨洋,刘亭,王文华,等. 参芎葡萄糖注射液对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(8): 153-158.
- [ 16 ] GAO J, ZHENG Z, GU Q, et al. Deacetylation of MnSOD by PARP-regulated SIRT3 protects retinal capillary endothelial cells from hyperglycemia-induced damage[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 472(3): 425-431.
- [ 17 ] QIAO A, WANG K, YUAN Y, et al. Sirt3-mediated mitophagy protects tumor cells against apoptosis under hypoxia[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 43390-43400.
- [ 18 ] GAO J M, LI R, ZHANG L, et al. *Cuscuta chinensis* seeds water extraction protecting murine osteoblastic MC3T3-E1 cells against tertiary butyl hydroperoxide induced injury[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 148(2): 587-595.

[责任编辑 周冰冰]