

芍药甘草汤及其拆方 对 H_2O_2 诱导损伤小肠上皮细胞的保护作用

张娴*, 黄羽, 曾星

(广州中医药大学第二附属医院中心实验室, 广州 510006)

[摘要] 目的: 研究芍药甘草汤及其拆方对 H_2O_2 诱导损伤大鼠小肠上皮细胞的保护作用。方法: 实验设空白对照组, H_2O_2 模型组, 白芍 (Paeoniae Radix, PR) 组, 甘草 (Licorice, L) 组, 白芍甘草不同比例组。药物组在药物作用 24 h 后, 与模型组一起加入 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 作用 2 h, 空白对照组正常培养, 用 MTT 方法检测细胞活性, Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡。RT-qPCR 检测 Caspase-3 和 Bax mRNA 表达。结果: 与空白对照组比较, 在 H_2O_2 损伤后, 模型组细胞 MTT 检测吸光度 (A) 明显降低, 存活细胞明显减少, 凋亡增高, Caspase-3 表达明显增高, Bax mRNA 无明显变化; 与 H_2O_2 模型组比较, PR $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, PR $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, L $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, L50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, PR $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ /L $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, PR $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, PR $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 A 明显增高, 细胞凋亡明显减轻, Caspase-3 表达明显降低。结论: 白芍, 甘草单用, 以及白芍与甘草配伍均对 H_2O_2 诱导损伤的小肠上皮细胞有保护作用, 其机制可能与抑制 Caspase-3 mRNA 的表达相关。

[关键词] 芍药甘草汤; 拆方; H_2O_2 诱导损伤; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0259-04

Shaoyao Ganchao Tang and its Disassembled Formula Protects IEC-6 Cells from H_2O_2 -induced Damage

ZHANG Xian*, HUANG Yu, ZENG Xing

(Second affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** The present study was designed to observe the effect of Paeonia Licorice Tang (PR/L) and its disassembled formula Shaoyao (PR), Ganchao (L) on damage of rat IEC-6 cells induced by H_2O_2 , and also to investigate the potential mechanism. **Method:** IEC-6 cells were cultured with blank control medium, PR/L, PR, or L of the fixed dosages previously for 24 h, and then stimulated with $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 for 2 h. Cell survival was measured by MTT assay. Cell apoptosis was evaluated by using flow cytometry with Annexin V / PI staining. Expression of Caspase-3 mRNA was detected by RT-qPCR. **Result:** Compared with the controls, the H_2O_2 model showed decrease in survival and expression of Caspase-3 mRNA, and increase in apoptosis. Compared with the H_2O_2 model, after treatment of PR $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ or $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, Ganchao of $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ or $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, or both PR and L for 24 h, cell damage and cell apoptosis were reduced significantly, and expression of Caspase-3 mRNA and protein was both increased. **Conclusion:** Shaoyao, Ganchao, and Shaoyao Ganchao Tang can protect IEC-6 cells from damage by H_2O_2 , which may be due to the decrease in Caspase-3 expression.

[Key words] Shaoyao Ganchao Tang; disassembled formula; H_2O_2 -induced damage; cell apoptosis

芍药甘草汤为常用的经典名方, 源于医圣张仲景的《伤寒论》, 主治筋脉挛急、腕腹疼痛等症, 常用

[收稿日期] 20120210(165)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81001563)

[通讯作者] * 张娴, 博士, 助理研究员, 从事中药药理研究, Tel: 020-39318670, E-mail: zhangx07@yahoo.com.cn

于肠道疾病。近有研究发现白芍和甘草的有效部位均有抗氧化作用^[1-2],但未见有关复方相关研究和比较。本文以大鼠小肠上皮细胞 IEC-6 为研究对象,并用强氧化剂 H₂O₂ 诱导细胞损伤,观察芍药、甘草、以及芍药甘草不同配伍对细胞损伤的作用,初步探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 药物与试剂 白芍颗粒(Paeoniae Radix, PR, 批号 1010077)和甘草颗粒(Licorice, L, 批号 1102121)购于江阴天江药业有限公司;DMEM 培养基、胎牛血清、0.25% 胰酶消化液、Annexin V/PI 双标凋亡流式试剂盒购于美国 Invitrogen 公司;四氮甲基唑蓝(MTT)购于 Sigma 公司;30% H₂O₂ 购于广州化学试剂厂;逆转录试剂盒,荧光定量 PCR 试剂盒购于 Takara 公司。

1.2 细胞 大鼠小肠上皮细胞 IEC-6(p14)购于美国 ATCC 公司。

1.3 仪器 倒置显微镜(Leika 公司),酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司),FC500 流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司),7500 实时荧光定量基因扩增系统(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及分组 IEC-6 用含 10% FBS,0.1 U 胰岛素的 DMEM,37 °C,5% CO₂ 恒温培养箱培养,0.25% -EDTA 胰酶消化传代。实验设立空白对照组,H₂O₂ 模型组(H₂O₂),白芍不同剂量组(PR 500 mg·L⁻¹,PR 200 mg·L⁻¹,PR 100,PR 50 mg·L⁻¹),甘草不同剂量组(L 500 mg·L⁻¹,L 200 mg·L⁻¹,L 100 mg·L⁻¹,L 50 mg·L⁻¹,L 20 mg·L⁻¹),以及白芍甘草不同比例组(PR 200 mg·L⁻¹/L100 mg·L⁻¹,PR 100 mg·L⁻¹/L100 mg·L⁻¹,PR 100/L 50 mg·L⁻¹,PR 100 mg·L⁻¹/L 20 mg·L⁻¹)。药物组加入相应质量浓度的药物作用 24 h 后,与模型组一起加入 200 μmol·L⁻¹的 H₂O₂ 作用 2 h,空白对照组正常培养,细胞处理后进行后续实验。实验设复孔 3 个,重复 3 次。

2.2 MTT 实验检测细胞活性 细胞消化后计数,接种至 96 孔培养板,每孔 100 μL,设 5 个复孔,细胞贴壁后换为相应质量浓度的作用药物,分别培养 24 h 后加入 H₂O₂,作用 2 h 后吸去含药物的培养基,加入 100 μL DMEM 培养液及 20 μL 5% MTT 溶液,作用 4 h 后,每孔加入 100 μL DMSO 溶液,室温溶解 10 min 后,酶标仪检测 570 nm 波长处吸光度(A)。

2.3 AnnexinV/PI 标记流式检测细胞凋亡 细胞接种于 60 mm 培养皿中,按上述各组处理进行培养。作用完成后,收集细胞,300 × g 离心 5 min,弃上清。后按照说明进行细胞染色,用 1 × 结合缓冲液离心洗涤细胞 2 次,加入 5 μL Annexin-FITC 和 10 μL PI 染液,避光孵育 5 min, PBS 离心洗涤后重悬细胞,流式细胞仪检测。Annexin V、PI 染色同时出现阳性细胞(Annexin V⁺/PI⁺)为凋亡细胞,分析细胞凋亡率。

2.4 RT-qPCR 检测 Caspase-3, Bax mRNA 表达 细胞分组处理后,收集细胞用 Trizol 提取总 RNA,测定浓度后逆转录合成 cDNA,用 SYBR Green 染料法荧光定量 PCR 检测,用内参基因 GAPDH 进行校正分析 Caspase-3, Bax mRNA 表达含量。引物序列 Caspase-3 前向引物:5'-GGTATTGAGACAGACAGTGG-3',逆向引物:5'-CATGGGATCTGTTTCTT TGC-3'; Bax 前向引物:5'-CTGAGCTGACCTT GGAGCAGCC-3',逆向引物:5'-GGCCCAGTTGAAG TTGCCATCA-3'; GAPDH 前向引物:5'-GGGC TCTCTGCTCCTCCCTGTTC-3',逆向引物:5'-CGTC CGATACGGCCAAATCCGTT-3'。

2.5 数据统计分析 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析,检验水平为 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 对 H₂O₂ 诱导细胞损伤的作用

3.1.1 MTT 检测细胞活性 与对照组比较,H₂O₂ 模型组 A 明显降低,差异有统计学意义。用药物预处理后,与 H₂O₂ 模型组比较,除 PR 500 mg·L⁻¹,L 500 mg·L⁻¹ 和 PR 100 mg·L⁻¹/L 20 mg·L⁻¹ 组 A 无增高外,在用 PR 200 mg·L⁻¹,100 mg·L⁻¹,L 200, 100, 50 mg·L⁻¹ 以及 PR 200 mg·L⁻¹/L 100 mg·L⁻¹,PR 100 mg·L⁻¹/L 100 mg·L⁻¹,PR 100 mg·L⁻¹/PR 50 mg·L⁻¹ 组 A 均明显升高($P < 0.05$),提示细胞受损程度明显减轻,同时根据此结果确定 PR 200 mg·L⁻¹,100 mg·L⁻¹,L 100 mg·L⁻¹, 50 mg·L⁻¹ 以及 PR 200 mg·L⁻¹/L 100 mg·L⁻¹,PR 100 mg·L⁻¹/L 100 mg·L⁻¹,PR 100 mg·L⁻¹/PR 50 mg·L⁻¹ 组为后续药物实验组(表 1)。

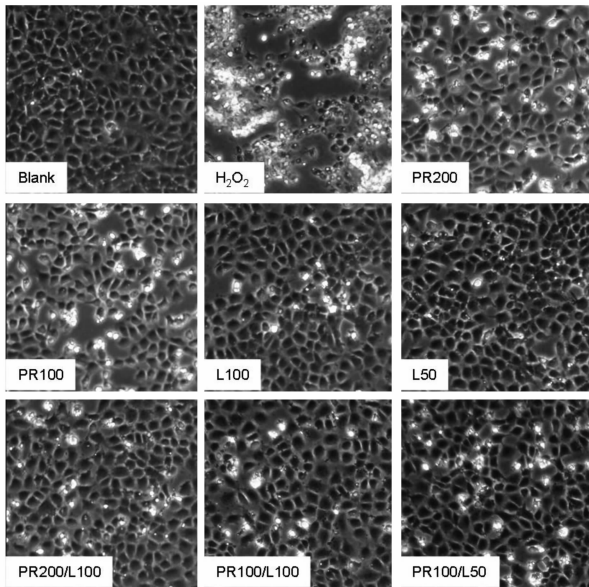
3.1.2 细胞形态观察 与空白对照组比较,模型组细胞空泡增多,细胞萎缩,细胞死亡增多,在白芍,甘草以及白芍和甘草不同比例配伍药物预处理后,细胞萎缩和死亡明显减少,其中以 L50 组效果最明显(图 1)。

3.1.3 流式细胞凋亡检测 与空白对照组比较,模

表1 芍药甘草汤不同配伍比例对 H₂O₂ 诱导细胞损伤的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	A ₅₇₀
空白	-	1.053 ± 0.013
H ₂ O ₂	-	0.246 ± 0.022
PR	500	0.294 ± 0.035
	200	0.432 ± 0.065 ¹⁾
	100	0.367 ± 0.038 ¹⁾
	50	0.349 ± 0.049 ¹⁾
L	500	0.129 ± 0.001
	200	0.397 ± 0.048 ¹⁾
	100	0.353 ± 0.001 ¹⁾
	50	0.407 ± 0.038 ¹⁾
PR/L	200/100	0.456 ± 0.002 ¹⁾
	100/100	0.455 ± 0.176 ¹⁾
	100/50	0.647 ± 0.124 ¹⁾
	100/20	0.301 ± 0.195

注:与 H₂O₂ 比较¹⁾ P < 0.05。



图中 PR, L 的剂量单位为 mg·L⁻¹

图1 芍药甘草汤不同配伍比例对 H₂O₂ 诱导细胞损伤的形态学影响

型组, Annexin V⁺/PI⁺ 凋亡细胞明显增高, PR 200 mg·L⁻¹, PR 100 mg·L⁻¹, L 100 mg·L⁻¹, L 50 mg·L⁻¹, PR 200 mg·L⁻¹/L 100 mg·L⁻¹, PR 100 mg·L⁻¹/L 100 mg·L⁻¹, PR 100 mg·L⁻¹/L 50 mg·L⁻¹, 预处理组凋亡程度均明显减轻, 凋亡率明显下降(表2)。

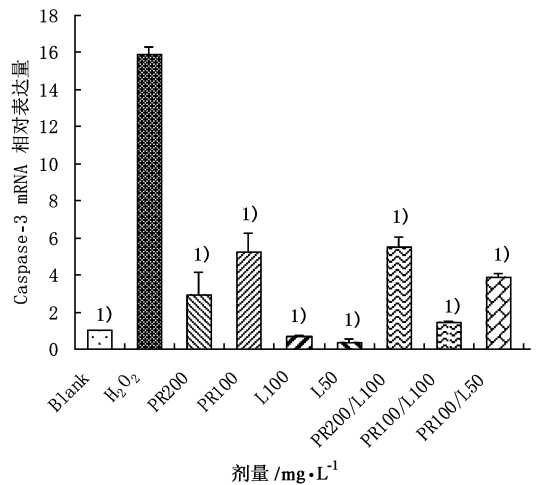
3.2 对 H₂O₂ 诱导细胞损伤 Caspase-3 和 Bax mRNA 表达影响 与空白对照组比较, 模型组细胞

表2 芍药甘草汤不同配伍比例对 H₂O₂ 诱导细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	细胞凋亡率/%
空白	-	0.23 ± 0.15
H ₂ O ₂	-	17.77 ± 2.07 ¹⁾
PR	200	6.26 ± 0.50 ²⁾
	100	5.73 ± 1.22 ¹⁾
	50	2.33 ± 1.01 ²⁾
L	100	3.3 ± 1.25 ¹⁾
	50	2.33 ± 1.01 ²⁾
PR/L	200/100	5.33 ± 1.25 ²⁾
	100/100	3.3 ± 0.5 ²⁾
	100/50	3.9 ± 0.3 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ P < 0.05; 与 H₂O₂ 组比较²⁾ P < 0.01。

凋亡相关基因 Caspase-3 mRNA 表达明显升高, Bax mRNA 无明显变化。与 H₂O₂ 模型组比较, 各药物处理组 PR 200, PR 100, L 100, L 50, PR 200/L100, PR 100/L 100, PR 100/L 50 mg·L⁻¹ 的 Caspase-3 mRNA 均明显降低(P < 0.05), 其中 L 100, L 50 和 PR 100/L 100 mg·L⁻¹ 组尤其显著(图2); 与 H₂O₂ 模型组比较, PR 200, PR 100, L 50, PR 100/L 100 mg·L⁻¹ 组 Bax mRNA 减低(P < 0.05), L 100, PR 200/L 100, PR 100/L 50 mg·L⁻¹ 组 Bax mRNA 有降低趋势, 但无统计学意义(图3)。



与 H₂O₂ 比较¹⁾ P < 0.05(图3同)

图2 芍药甘草汤不同配伍比例对 H₂O₂ 诱导细胞 Caspase-3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

中药复方是主要临床使用形式, 但为阐明中药复方的配伍组成原理及作用机制, 优化方药配伍, 常进行拆方研究。芍药甘草汤源于医圣张仲景的《伤

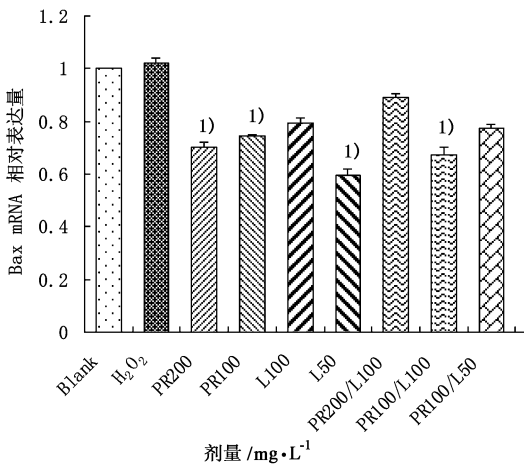


图 3 芍药甘草汤不同配伍比例对 H_2O_2 诱导细胞 Bax mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

寒论》,原方芍药与甘草的比例为 1:1,在临床常用于肠道疾病。现代研究发现其有镇痛、抗炎、抗氧化作用,在对单味药及有效成分的研究发现芍药中的丹皮酚、白芍总苷,甘草中的黄酮类化合物均抗氧化作用^[3-6],但未见有关复方相关研究和比较。

生理状态下机体内活性氧的产生和清除处于动态平衡状态,但在病理状态下活性氧大量生成而超过抗氧化系统的清除能力,则形成氧化应激状态。各种原因导致的缺血缺氧、感染、理化因素均可导致小肠上皮细胞氧化应激,活化丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK等)信号途径,通过线粒体途径,内质网途径等导致细胞凋亡^[7-8]。Caspase-3 是各种途径导致的细胞凋亡过程的关键效应蛋白酶,是多种凋亡刺激信号传递的终末汇聚点。研究表明, H_2O_2 诱导的氧化应激中 Caspases-3 活性升高,并和凋亡比率成正相关,降低应激水平或抑制 Caspases-3 活性可以明显减少细胞凋亡的发生^[9]。

本文用强氧化剂 H_2O_2 诱导损伤小肠上皮细胞 IEC-6,观察芍药,甘草,以及芍药甘草汤复方对细胞损伤的作用,初步探讨其可能作用机制。在 H_2O_2 刺激后,细胞出现空泡,细胞萎缩,活性明显下降,Caspase-3 表达显著升高,凋亡明显增加,符合氧化应激细胞的病理表现。在用芍药甘草汤或芍药,甘草单独预处理 24 h 后,细胞形态学情况明显改善,活性增高,Caspase-3 表达显著下降至接近正常细胞

水平,Bax 表达也同时有降低趋势,其中 PR 200,PR 100,L 50,PR 100/L 100 $mg \cdot L^{-1}$ 组明显低于模型组。细胞凋亡程度明显减轻,表明芍药甘草汤,或白芍,甘草单独使用均有明显的抗氧化作用,能抑制 H_2O_2 诱导的细胞凋亡。其作用机制可能是部分通过抑制 Caspase-3 的表达来实现的。在比较芍药、甘草和芍药甘草汤之间的差异发现,芍药 100 ~ 200 $mg \cdot L^{-1}$ 甘草在 50 ~ 200 $mg \cdot L^{-1}$ 均有较好的保护作用,芍药、甘草在复方中以 100:100 $mg \cdot L^{-1}$ 的配伍保护作用最优,另外在比较各组的作用中,单用甘草在维持细胞形态(L50),保护细胞活性(L50)和抑制 Caspase-3 表达(L50 ~ L100 $mg \cdot L^{-1}$)和细胞凋亡(L50 $mg \cdot L^{-1}$)的作用最强。这为芍药甘草汤的抗氧化应激应用和进一步研究提供实验依据。

[参考文献]

- [1] 张雪燕,韩涛,孟莉. 芍药甘草汤在溃疡性结肠炎中的应用[J]. 辽宁中医学院学报,2004,6(4):280.
- [2] 凤良元,鄢顺琴,吴慷清,等. 芍药甘草汤镇痛作用及机理的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(1):23.
- [3] 张改平,杨建雄. 甘草提取物对鼠肝线粒体氧化损伤的保护作用[J]. 生物加工过程,2011,9(1):50.
- [4] 方芳,吴永贵,董婧,等. 白芍总苷对糖尿病大鼠肾组织氧化应激的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2008,22(3):199.
- [5] 孙蓉,武栋栋,张作平,等. 过氧化氢诱导 PC12 细胞凋亡及芍药苷的保护作用[J]. 中国药理学杂志,2006,41(22):1710.
- [6] 李佳,宋新波,余保林,等. 甘草抗氧化作用的研究进展[J]. 中国中医药杂志,2008,6(3):61.
- [7] Zhou Y, Wang Q, Evers B M, et al. Oxidative stress-induced intestinal epithelial cell apoptosis is mediated by p38 mapk[J]. Biochem Biophys Res Commun,2006,350(4):860.
- [8] Taha R, Seidman E, Mailhot G, et al. Oxidative stress and mitochondrial functions in the intestinal Caco-2/15 cell line[J]. PLoS ONE, 2010,5(7): e11817.
- [9] 廖永晖,汤雨,千年松,等. 氧化应激与细胞凋亡[J]. 新乡医学院学报,2011,28(1):110.

[责任编辑 何伟]