

何首乌醇提物对人正常肝细胞 L02 的毒性作用及其机制

鲍依琪, 沈芳, 李杨蕾, 陈冬铭, 陆红*
(浙江中医药大学药学院, 杭州 311400)

[摘要] **目的:** 探究何首乌醇提物(PME)对人正常肝细胞 L02 的毒性损伤和作用机制,为何首乌合理安全用药提供依据。**方法:** 以 PME(5,10,20 g·L⁻¹)作用于 L02 细胞,噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活性;Hoechst 33342 染色法观察细胞核形态;Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)双染法检测细胞凋亡率;相关试剂盒检测细胞中乳酸脱氢酶(LDH)释放率、超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量;JC-1 法检测细胞线粒体膜电位(MMP)变化;流式细胞术检测活性氧(ROS)水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 前体(proCaspase-9)及半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 前体(proCaspase-3)的表达水平。**结果:** 与空白组比较,L02 细胞在 PME 作用下存活率下降,呈时间浓度依赖性;Hoechst 33342 染色后荧光下可见细胞核皱缩,碎裂,染色质凝集;Annexin V-FITC/PI 双染法结果表明 PME 20 g·L⁻¹组凋亡率上升;PME 20 g·L⁻¹组 LDH 释放率显著增加($P < 0.01$),细胞内 ROS 水平显著上升($P < 0.01$),SOD 活力显著下降($P < 0.01$),PME 5,10,20 g·L⁻¹组 MMP 明显降低($P < 0.05$)。与空白组比较,随着 PME 给药组浓度增加,PME 10,20 g·L⁻¹组 proCaspase-3,proCaspase-9 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$),PME 5,10,20 g·L⁻¹组 Bax 蛋白表达水平明显升高($P < 0.01$),PME 20 g·L⁻¹组 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。**结论:** PME 对 L02 细胞存在毒性损伤作用,可一定程度破坏肝细胞的结构,促进 ROS 水平升高,诱导氧化应激,激活线粒体途径,活化凋亡通路相关蛋白引起肝细胞损伤,提示 ROS 介导的线粒体通路参与了 PME 诱导肝细胞凋亡的过程。

[关键词] 何首乌; 肝脏毒性; 细胞凋亡; 活性氧; 线粒体途径

[中图分类号] R22;R242;R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)10-0023-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20201022

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200207.1000.002.html>

[网络出版时间] 2020-02-07 11:33

Toxicity and Mechanism of Polygoni Multiflori Radix Alcohol Extract on L02 Cells

BAO Yi-qi, SHEN Fang, LI Yang-lei, CHEN Dong-ming, LU Hong*

(College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311400, China)

[Abstract] **Objective:** To study the toxic effect of Polygoni Multiflori Radix alcohol extract (PME) on L02 cells and the mechanism of ROS inducing apoptosis via mitochondria pathway, so as to provide a basis for the rational and safe administration of Polygoni Multiflori Radix in clinic. **Method:** The 4, 5-dimethyl-2-thiazolyl-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assay was used to detect the cell viability of PME at different concentrations (5, 10, 20 g·L⁻¹). Nuclear morphology was observed by Hoechst 33342 staining. The apoptosis rate of cells was detected by Annexin V-FITC/PI. The release rate of lactate dehydrogenase (LDH), the activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of malondialdehyde (MDA) in the cells were detected by kit instruction. The changes of mitochondrial membrane potential (MMP) and reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry. The relative protein expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X (Bax), cysteinyl aspartate proteinase-9 (proCaspase-9) and cysteinyl aspartate proteinase-3 (proCaspase-3) in

[收稿日期] 20190918(016)

[基金项目] 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划项目(2017R410051)

[第一作者] 鲍依琪, 硕士, 从事中药药理与毒理研究, E-mail: baoyq@qq.com

[通信作者] * 陆红, 硕士, 教授, 从事中药药理与毒理研究, E-mail: luhong@zcmu.edu.cn

the PME-administered group were detected by Western blot. **Result:** After treatment with PME at the concentration of 5, 10, 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, the survival rate of L02 cells were decreased in a concentration and time-dependend manner. After treatment with PME for L02 cells, nucleus shrinkage, fragmentation and chromatin condensation were observed under fluorescence after Hoechst 33342 staining. Annexin V-FITC/PI double staining showed a upward cell apoptosis rate in PME 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ group. Compared with the normal control group, the release rate of LDH was significantly increased ($P < 0.01$), the intracellular ROS level was significantly increased ($P < 0.01$), and the SOD activity was significantly decreased ($P < 0.01$), while the MMP rate was significantly decreased in PME 5, 10, 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ groups ($P < 0.05$). With the increase in the concentration of PME, proCaspase-3, proCaspase-9, Bcl-2 protein showed a significantly downward trend in PME 10, 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ groups ($P < 0.01$), while the expression of Bax protein was significantly up-regulated in PME 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The study illustrated that PME have toxic effects on L02 cells, which may destroy the structure of hepatocytes to a certain extent, promote ROS levels, induce oxidative stress, activate the mitochondrial pathway, and then activate apoptosis-related proteins to cause cells damage. It is suggested that ROS-mediated mitochondrial pathway was involved in PME-induced apoptosis.

[**Key words**] Polygoni Multiflori Radix; hepatotoxicity; apoptosis; reactive oxygen species; mitochondrial pathway

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* 的干燥块根,味苦、甘、涩,微温,具有截疟、消痈、解毒、润肠通便的作用^[1]。现代药理学研究表明,何首乌在抗炎、抗氧化、抗肿瘤、降血脂及提高免疫力等方面均有良好功用^[2]。何首乌作为补益类中药,其毒性鲜少记载于历代中医古籍文献中,故临床常出现使用周期过长、使用剂量过大等问题^[3]。近年来国内外关于何首乌肝毒性的报道逐渐增多,临床出现急慢性肝炎、肝功能异常、药物性肝炎等损害性疾病^[4-5],从而引发了国内外学者对何首乌用药安全性问题的高度关注。迄今为止,国际上已有中国、美国、日本等 30 多个国家和地区报道了何首乌的肝损伤问题^[6]。何首乌的醇提工艺已被广泛应用于何首乌成方制剂中,已有文献证实何首乌醇提物可引起大鼠肝脏一定程度的损伤^[7],且何首乌醇提物对 L02 细胞的毒性大于水提物^[8],由此提示何首乌的肝脏毒性物质可能集中在醇提物中。另外,高效液相色谱(HPLC)检测发现何首乌醇提物中主要活性成分为大黄素等蒽醌类物质^[9-10]。体外研究证明,大黄素在治疗浓度下存在一定肝脏毒性^[11-13]。因此,何首乌肝毒性的机制研究具有重要意义。目前,国内外对何首乌毒理作用相关机制的探究较少。本研究采用不同浓度何首乌醇提物(PME)作用于人正常肝细胞 L02 建立细胞毒性模型,探究 PME 对肝细胞的毒性作用及相关机制,为何首乌临床合理应用提供科学实验依据。

1 材料

1.1 药材 生何首乌饮片购于浙江中医药大学名中医馆,由浙江中医药大学药学院陆红教授鉴定为蓼科植物何首乌 *P. multiflorum* 的干燥块根。取何首乌饮片 250 g 粉碎,用 9 倍量 60% 乙醇加热回流提取 2 次,每次 60 min,16 层纱布滤过,合并滤液,浓缩至含生药 1 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,22 μm 滤膜滤过除菌,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,临用前用培养基稀释至所需浓度。研究证实,何首乌醇提物中主要活性成分为大黄素等蒽醌类物质^[9-10]。

1.2 试剂 RPMI 1640 培养液(美国 Gibco 公司,批号 8118043);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,批号 20170221);噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 822A054);聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100)(Biosharp 公司,批号 9002-93-1);乳酸脱氢酶活力(LDH)定量测定试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号 E1020);Hoechst 33342 染色液,AnnexinV-FITC 细胞凋亡试剂盒,线粒体膜电位(MMP),活性氧(ROS)检测试剂盒,总超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)检测试剂盒,BCA 蛋白浓度测定试剂盒,SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液,牛血清白蛋白(BSA)(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 C1025,C1063,C2006,S0033,S0101,S0131,P0012,P0015L,ST023);化学发光(ECL)发光液(美国 Bio-Rad 公司,批号 170-5060); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号 sc-47778);半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9 前体

(proCaspase-9) 抗体 (英国 Abcam 公司, 批号 ab32068); 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 前体 (proCaspase-3), B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bax), Bcl-2 抗体 (美国 CST 公司, 批号分别为 #9665, #5023, #4223); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (安诺论生物技术有限公司, 批号 YM3029)。

1.3 仪器 IMT-2-21 型奥林帕斯倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); UNIVERSAL 320/320R 型低温高速离心机 (德国 Hettich 公司); B5060EU 型二氧化碳培养箱 (德国 Heraeus 公司); FACs Calibur 型流式细胞仪 (美国 Becton-Dicknson 公司); iMark™ 型全波长多功能酶标仪, PowerPac Basic 型凝胶电泳仪, Mini-PROTEAN Tetra System 型转膜仪, ChemiDoc XPS 型全自动凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人正常肝细胞 L02 购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 (编号为 GNHU-6), RPMI 1640 完全培养基 (含 10% 胎牛血清, 1% 链-青霉素), 在 37 °C 5% CO₂ 恒温培养箱中, 饱和湿度环境下培养。倒置显微镜下观察细胞的生长情况, 待细胞生长至对数生长期 (融合度达 80% 以上) 用于实验。

2.2 MTT 比色法检测细胞活力 取对数生长期 L02 细胞, 胰蛋白酶消化后用培养液制成单细胞悬液, 计数, 调整细胞密度为 2×10^4 个/mL, 以每孔体积 100 μ L 接种于 96 孔板, 按 2.1 项下条件培养至对数期, 弃旧培养基, 给药组分别加入 PME (5, 10, 20 $g \cdot L^{-1}$), 另设一组细胞空白组和一组溶剂调零组, 100 μ L 每孔, 每组 6 个复孔, 分别作用 24, 48 h。之后每孔加 5 $g \cdot L^{-1}$ MTT 溶液 20 μ L, 继续孵育 4 h, 弃培养液, 每孔加入二甲基亚砷 (DMSO) 150 μ L, 振荡 10 min 使结晶物充分溶解, 酶标仪于 490 nm 处测定各孔吸光度 A_{490nm} , 实验重复 3 次。计算细胞存活率和半数致死浓度 (IC₅₀)。细胞存活率 = $(A_{490nm} \text{给药组} - A_{490nm} \text{调零组}) / (A_{490nm} \text{空白组} - A_{490nm} \text{调零组}) \times 100\%$ 。

2.3 Hoechst 33342 染色检测细胞核形态 取生长状态良好的对数期 L02 细胞, 胰蛋白酶消化后制成单细胞悬液并计数, 以每孔 5×10^4 个/mL 接种于 12 孔板中, 按 2.1 项下条件培养至对数期, 弃旧培养基, 加入 5, 10, 20 $g \cdot L^{-1}$ PME, 培养 24 h, 弃旧培养基, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 2 遍, 加入 10 $mg \cdot L^{-1}$ Hoechst 33342 染色液 0.5 mL, 37 °C 染色 30 min, PBS 清洗 3 遍, 每次 5 min, 无菌环境下将

各组细胞置于荧光倒置显微镜下, 仔细观察细胞核形态。

2.4 Annexin-V/PI 双染法检测细胞凋亡 取生长状态良好的对数期细胞, 以每孔 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中, 按 2.1 项下条件培养至对数期, 弃旧培养基, 加入 5, 10, 20 $g \cdot L^{-1}$ PME, 培养 24 h。收集 6 孔板细胞, 用 4 °C 预冷 PBS 清洗 2 次, 胰蛋白酶消化细胞, 1 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清, 收集细胞。按 AnnexinV-FITC 细胞凋亡试剂盒说明操作, 加入荧光溶液, 轻轻混匀。置于冰浴中避光孵育 20 min, 孵育过程中重悬细胞 2~3 次。随即采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.5 LDH 释放率的测定 细胞培养及加药同 2.3 项, 培养 24 h, 消化细胞, 按照 LDH 试剂盒说明进行操作, 室温放置 3 min, 于 440 nm 波长处测定。细胞 LDH 释放率 = 细胞培养基中测定的酶活力单位 / (细胞裂解液测定的酶活力单位 + 细胞培养基测定的酶活力单位) $\times 100\%$ 。

2.6 细胞内 ROS 水平的测定 细胞培养及加药同 2.4 项, 培养 24 h, 同时设立活性氧阳性对照组, 加入 Rosup ($50 g \cdot L^{-1}$) 1 μ L, 37 °C 细胞培养相内孵育 30 min。收集细胞, PBS 洗涤贴壁细胞 1 次, 消化, 轻轻吹打细胞, 转移至离心管中, 1 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清。按照 ROS 试剂盒说明进行操作, 随即采用流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平。

2.7 细胞线粒体膜电位 (MMP) 测定 细胞培养及加药同 2.4 项, 培养 24 h。收集细胞, MMP 试剂盒说明进行操作, 随即采用流式细胞仪检测。

2.8 SOD 酶活力和 MDA 含量的测定 细胞培养及加药同 2.4 项, 培养 24 h, 收集细胞, 提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。按照 MDA 检测试剂盒测定说明操作, 使用酶标仪测得各组样品溶液的 A, 根据标准曲线计算, 通过单位质量的蛋白含量来表示最初样品中的 MDA 含量 ($\text{mmol} \cdot g^{-1}$)。按照 SOD 活性检测试剂盒 (WST-8 法) 说明操作, 使用酶标仪测得各组样品溶液的 A, 根据样品的蛋白浓度和稀释倍数, 将 SOD 活力单位换算为 $U \cdot mg^{-1}$ 蛋白。实验重复 3 次。

2.9 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测细胞内凋亡相关蛋白表达 PME (5, 10, 20 $g \cdot L^{-1}$) 作用细胞 24 h 后, 提取各组细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白样品, 上样 40 μ g, 经 12% SDS-PAGE 胶电泳分离, 湿法转膜, 封闭 (用 $1 \times$ TBST 配置的

5% 脱脂奶粉) 2 h, 4 ℃ 敷一抗过夜 (Bcl-2, Bax, proCaspase-9, proCaspase-3, β -actin 1 : 1 000; GAPDH 1 : 5 000), TBST 洗 3 次, 每次 10 min。加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗室温孵育 2 h (羊抗鼠抗体 1 : 5 000; 羊抗兔抗体 1 : 5 000), TBST 洗 3 次, 每次 10 min。滴加 ECL 发光液, 采用全自动凝胶成像分析系统采集图像, 采用 Image J 软件分析各组条带的积分吸光度 IA , 蛋白的相对表达水平用内参蛋白 (β -actin 和 GAPDH) 表达量来校正。目的蛋白相对表达量 = $IA_{目的蛋白} / IA_{内参蛋白}$ 。

2.10 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析统计, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数的两两比较采用单因素方差分析, 方差齐性采用 LSD 法, 方差不齐采用 Dunnett's 法, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 PME 对 L02 细胞存活率的影响 与空白组比较, 作用 24 h, PME 10, 20 $g \cdot L^{-1}$ 组对 L02 细胞的抑制作用显著 ($P < 0.01$); 作用 48 h, PME 5, 10, 20 $g \cdot L^{-1}$ 组对 L02 细胞均有显著抑制作用 ($P < 0.01$)。PME 对 L02 细胞的 IC_{50} 为 12.29 $g \cdot L^{-1}$ (24 h)。见表 1。

表 1 PME 对 L02 细胞的存活率影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

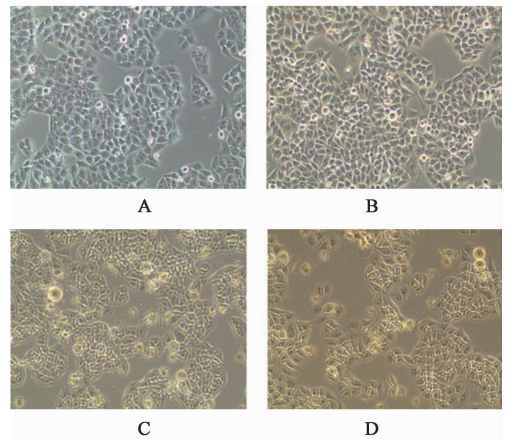
Table 1 Effect of PME on cell viability in L02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 / $g \cdot L^{-1}$	细胞存活率/%	
		24 h	48 h
空白	-	98.34 \pm 4.87	99.94 \pm 7.42
PME	5	92.71 \pm 8.25	61.59 \pm 4.41 ¹⁾
	10	61.64 \pm 9.38 ¹⁾	14.65 \pm 4.42 ¹⁾
	20	23.30 \pm 4.26 ¹⁾	14.83 \pm 2.72 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 PME 对 L02 细胞形态的影响 与空白组比较, PME 5 $g \cdot L^{-1}$ 组细胞生长状态良好, PME 10, 20 $g \cdot L^{-1}$ 组细胞数量逐渐减少, 细胞贴壁不紧密, 细胞皱缩、变圆, 甚至部分脱落。Hoechst 33342 染色后, 细胞核呈亮蓝色荧光, 与空白组比较, PME 10, 20 $g \cdot L^{-1}$ 组出现染色质皱缩, 细胞核固缩、破裂等现象。见图 1, 2。

3.3 PME 对 L02 细胞凋亡率的影响 与空白组比较, PME 作用 L02 细胞 24 h, PME 5, 10 $g \cdot L^{-1}$ 组细胞凋亡率无明显改变, PME 20 $g \cdot L^{-1}$ 组细胞凋亡率上升 ($P < 0.05$)。见表 2。



A. 空白组; B ~ D. PME 5, 10, 20 $g \cdot L^{-1}$ (图 2, 3 同)

图 1 PME 对 L02 细胞形态学和凋亡率的影响 (光学显微镜, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of PME on cell morphology and apoptosis rate in L02 cells (invert/phase contrast microscopy, $\times 100$)

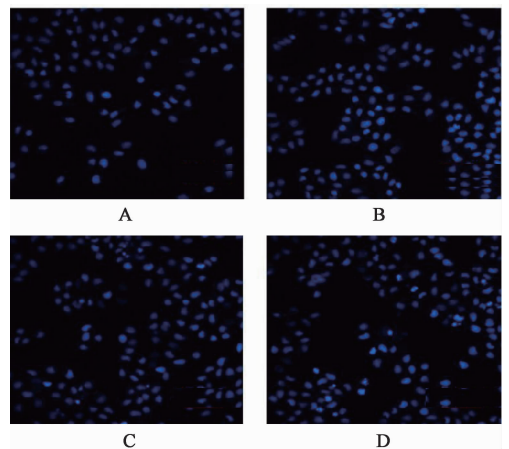


图 2 PME 对 L02 细胞形态学和凋亡率的影响 (Hoechst 33342, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of PME on cell morphology and apoptosis rate in L02 cells (Hoechst 33342, $\times 100$)

表 2 PME 对 L02 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of PME on apoptosis rate in L02 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	凋亡率/%
空白	-	16.09 \pm 1.06
PME	5	19.44 \pm 2.21
	10	26.54 \pm 3.65
	20	39.18 \pm 1.03 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.4 PME 对 L02 细胞 LDH 释放率的影响 与空白组比较, PME 5, 10 $g \cdot L^{-1}$ 组细胞 LDH 释放率无明显改变, PME 20 $g \cdot L^{-1}$ 组细胞 LDH 释放率显著上升 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 PME 对 L02 细胞 LDH,SOD,MDA,ROS,MMP 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of PME on LDH,SOD,MDA,ROS,MMP levels in L02 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	LDH/%	SOD/ $U \cdot mg^{-1}$	MDA/ $mmol \cdot g^{-1}$	ROS/%	MMP/%
空白	-	25.12 ± 1.02	0.90 ± 0.02	9.71 ± 1.89	81.16 ± 4.05	90.76 ± 6.76
PME	5	27.46 ± 1.58	0.92 ± 0.12	8.61 ± 2.51	120.00 ± 6.75	56.96 ± 12.39 ¹⁾
	10	27.39 ± 0.71	0.70 ± 0.07	13.87 ± 1.14	159.54 ± 3.01	55.42 ± 3.39 ¹⁾
	20	34.35 ± 1.24 ²⁾	0.36 ± 0.11 ²⁾	13.99 ± 2.40	400.80 ± 4.75 ²⁾	17.91 ± 4.37 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

3.5 PME 对 L02 细胞内 ROS,SOD 和 MDA 的影响

与空白组比较,PME 5,10 $g \cdot L^{-1}$ 组细胞内 ROS 含量无明显改变,PME 20 $g \cdot L^{-1}$ 组细胞内 ROS 含量显著升高($P < 0.01$);PME 5,10 $g \cdot L^{-1}$ 组细胞内 SOD 酶活力无明显改变,PME 20 $g \cdot L^{-1}$ 组细胞内 SOD 酶活力显著降低($P < 0.01$);PME 5,10,20 $g \cdot L^{-1}$ 组细胞内 MDA 含量变化无显著性差异。见表 3。

3.6 PME 对 L02 细胞 MMP 的影响

与空白组比较,PME 5,10,20 $g \cdot L^{-1}$ 组细胞 MMP 均明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

3.7 PME 对细胞内 proCaspase-9, proCaspase-3, Bax 和 Bcl-2 蛋白相对表达水平的影响

与空白组比较,PME 5 $g \cdot L^{-1}$ 组 Bax 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$);PME 10 $g \cdot L^{-1}$ 组 proCaspase-9, proCaspase-3 蛋白表达水平显著下降($P < 0.01$), Bax 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$);PME 20 $g \cdot L^{-1}$ 组 proCaspase-9, proCaspase-3, Bcl-2 蛋白

表达水平明显下降($P < 0.05, P < 0.01$),PME 5, 10,20 $g \cdot L^{-1}$ 组 Bax 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。见图 3,表 4。

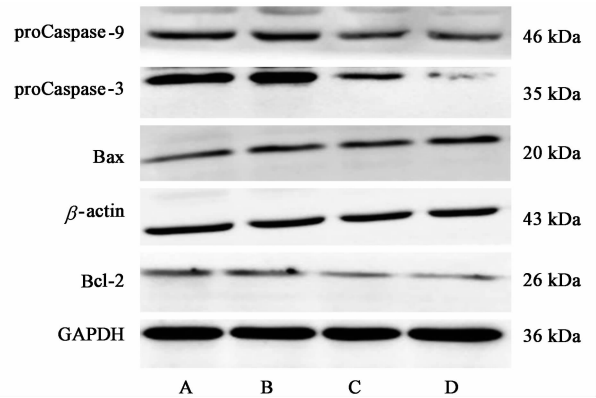


图 3 PME 对 L02 细胞 proCaspase-9, proCaspase-3, Bax 及 Bcl-2 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of PME on relative expression levels of proCaspase-9, proCaspase-3, Bax and Bcl-2 proteins in L02 cells

表 4 PME 对 L02 细胞 proCaspase-9, proCaspase-3, Bax 及 Bcl-2 蛋白相对表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of PME on relative expression levels of proCaspase-9, proCaspase-3, Bax and Bcl-2 proteins in L02 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	proCaspase-9/ β -actin	proCaspase-3/ β -actin	Bax/ β -actin	Bcl-2/GAPDH
空白	-	0.83 ± 0.06	1.23 ± 0.08	0.62 ± 0.04	0.39 ± 0.09
PME	5	0.74 ± 0.07	1.12 ± 0.13	0.73 ± 0.01 ²⁾	0.38 ± 0.11
	10	0.53 ± 0.03 ²⁾	0.61 ± 0.09 ²⁾	0.74 ± 0.03 ²⁾	0.26 ± 0.08
	20	0.48 ± 0.08 ²⁾	0.18 ± 0.02 ²⁾	0.91 ± 0.01 ²⁾	0.19 ± 0.07 ¹⁾

4 讨论

何首乌作为传统补益良药,始载于宋代古籍《开元天宝》,中医药古籍文献鲜少记载其毒性,但随着何首乌致肝损伤的临床报道增多,人们对其用药安全性产生了高度关注。唐朝时何首乌出现酒浸酒服的使用方法,后被应用至今。据统计,现代何首乌成方制剂中醇提工艺占 43.06%^[14]。有研究证实,何首乌醇提物对小鼠肝脏损伤大于水提物^[15]。何首乌醇提工艺已广泛运用于临床,因此对何首乌醇提物肝毒性及机制进行研究具有重要意义。

氧化应激(OS)是指体内氧化作用与抗氧化作用失衡,引起细胞膜中不饱和脂肪酸发生脂质过氧化,产生大量氧化产物,从而对机体产生损伤作用的过程。MDA 被认为是细胞氧化损伤产物,SOD 为抗氧化酶,在细胞抗氧化过程中发挥重要作用,两者皆为氧化应激指标^[16]。研究发现,氧化应激和细胞凋亡的关系密切,氧化损伤被证实是细胞凋亡的诱因之一。细胞凋亡是细胞在一系列内源性基因调控下发生的自然或生理性死亡过程,是多细胞有机体维持内环境稳定、控制细胞衰老、调控机体发育的重要

机制^[17]。肝细胞凋亡即为自身程序性细胞死亡,是肝损伤发展的一个重要因素。线粒体途径是细胞凋亡的主要途径之一,细胞氧化应激产生过量 ROS,后者可诱导促凋亡基因 Bcl-2 表达下调,抑凋亡基因 Bax 表达上调,二者比例失调,导致线粒体膜通透性改变,跨膜电位丢失,即 MMP 降低,释放细胞色素 C (cytC),随后 cytC 与凋亡蛋白酶活化因子 (Apaf-1) 形成复合体,使凋亡起始分子 proCaspase-9 自我剪切活化并激活下游的凋亡执行分子 Caspase-3 等,最终引起细胞凋亡^[18]。

通过研究结果分析发现,PME 可明显降低 L02 细胞存活率,促进 L02 细胞凋亡。与空白组比较,随着药物浓度升高,L02 细胞体积逐渐变小,出现贴壁不牢,漂浮于培养基中的现象,染色后荧光显微镜观察到细胞核固缩甚至部分出现破碎现象,细胞内 LDH 释放率明显增加。提示 PME 对 L02 细胞具有一定的毒性损伤作用。另外,与空白组比较,随着药物质量浓度升高,L02 细胞内 ROS 水平明显升高,SOD 酶活力明显下降,MDA 含量升高,说明 PME 致 L02 细胞毒性损伤与 ROS 介导 OS 机制密切相关。随着给药浓度升高,MMP 明显下降,proCaspase-9, proCaspase-3, Bcl-2 蛋白表达明显下调, Bax 蛋白表达明显上调。说明 PME 可能通过依赖于 Caspase 的线粒体途径诱导肝细胞凋亡。

综上所述,PME 对 L02 细胞具有一定毒性损伤,同时可能通过 ROS 介导线粒体通路诱导 L02 细胞凋亡。本研究初步阐明了 PME 的毒性作用及机制,说明 PME 存在一定的肝脏毒性,为中药何首乌安全合理应用提供了科学的实验依据。

[参考文献]

[1] 全云云,周忆梦,刘美辰,等. 斑马鱼模型筛选何首乌肝毒性的物质基础[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6):52-57.

[2] 于瑞丽,门伟婕,周昆,等. 何首乌毒性物质基础及肝毒性机制研究进展[J]. 中国药物警戒, 2019, 16(8):496-503.

[3] 陶丽宇,高月求,王建茹,等. 何首乌的临床应用及其相关肝损伤的研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(11):194-198.

[4] ZHU J, NIU M, WANG J B, et al. Predictors of poor outcomes in 488 patients with herb-induced liver injury [J]. Turk J Gastroenterol, 2019, 30(1):47-58.

[5] 徐男,时海燕,李晓宇,等. 何首乌制剂不良反应研究进展与成因分析[J]. 中国实验方剂学杂志,

2017, 23(4):208-214.

[6] 涂灿,葛斐林,郭玉明,等. 何首乌相关肝损伤临床特征及用药合理性分析[J]. 中国药物警戒, 2019, 16(5):270-276.

[7] 李勇,曾菊芳,杨娜,等. 何首乌醇提物对大鼠的肝毒性研究[J]. 药物评价研究, 2019, 42(7):1318-1323.

[8] ZHANG R C, LIU B, SUN Z X. Effects of extract of *Polygonum multiflorum* on cell cycle arrest and apoptosis of human liver cell line L02 [J]. Chin J Integr Med, 2010, 8(6):554-561.

[9] 冯婧怡,王文刚,王爱平,等. 何首乌毒性的研究进展[J]. 中国药房, 2014, 25(43):4116-4119.

[10] LIN L, LIN H, ZHANG M, et al. A novel method to analyze hepatotoxic components in *Polygonum multiflorum* using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. J Hazard Mater, 2015, 299:249-259.

[11] LIU Z, WEI F, CHEN L J, et al. *In vitro* and *in vivo* studies of the inhibitory effects of emodin isolated from *Polygonum cuspidatum* on Coxsackievirus B4 [J]. Molecules, 2013, 18(10):11842-11858.

[12] 秦欢,鄢素琪,周姗姗,等. 大黄素体外抗人巨细胞病毒药效实验研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(6):822-826,847.

[13] 贾歌,刘畅,庞晶瑶,等. 何首乌及其成分对人正常肝细胞凋亡的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2015, 22(11):46-49.

[14] 赵新妹,李晓宇,孙蓉,等. 何首乌不同炮制品醇提物对小鼠急性毒性实验比较研究[J]. 中国药物警戒, 2017, 14(10):603-606,610.

[15] 李奇,赵奎君,赵艳玲,等. 大剂量何首乌醇提物致大鼠多脏器损伤研究展[J]. 环球中医药, 2013, 6(1):1-7.

[16] YANG K, ZHANG H, LUO Y, et al. Gypenoside X VII prevents atherosclerosis by attenuating endothelial apoptosis and oxidative stress: insight into the ealphan-mediated PI3K/Akt pathway [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2):E77.

[17] 郜然然,周慧,吴也可,等. 中医药通过 mTOR 途径调节细胞凋亡与自噬的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(4):218-224.

[18] 杨涛,费振海,钟兴明. Caspase 家族与细胞凋亡的研究进展 [J]. 浙江医学, 2018, 40(18):2083-2087,2091.

[责任编辑 张丰丰]