

# 丹酚酸 B 对三氧化二砷诱导 HepaRG 人肝细胞损伤的保护作用

孙佳富<sup>1</sup>, 孙潇<sup>2</sup>, 罗云<sup>2</sup>, 高晔<sup>1</sup>, 王姗<sup>2</sup>, 南凤尾<sup>2</sup>, 孙晓波<sup>2\*</sup>, 孙桂波<sup>2\*</sup>

(1. 哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076; 2. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193)

**[摘要]** 目的: 探讨丹酚酸 B 对三氧化二砷 ( $As_2O_3$ ) 诱导的 HepaRG 人肝细胞损伤的保护作用及其机制。方法: 采用  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} As_2O_3$  孵育 24 h 建立 HepaRG 人肝细胞损伤模型。实验设置空白组、模型组 ( $As_2O_3$   $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 单给药组 (丹酚酸 B  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 丹酚酸 B 高浓度组 (丹酚酸 B  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + As_2O_3$   $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 丹酚酸 B 中浓度组 (丹酚酸 B  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + As_2O_3$   $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 丹酚酸 B 低浓度组 (丹酚酸 B  $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + As_2O_3$   $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。丹酚酸 B 预孵育 2 h, 弃去含药培养基, 继续用  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} As_2O_3$  孵育 24 h; 实验终止, 通过噻唑蓝 (MTT) 比色法检测细胞存活率, Hoechst33342 荧光染色观察细胞凋亡, Annexin V-FITC/碘化丙啶 (PI) 双染色流式细胞术定量检测细胞凋亡率, JC-1 荧光染色观察线粒体膜电位, 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax), 蛋白激酶 B (Akt), 磷酸化 Akt (p-Akt) 表达对丹酚酸 B 的肝脏保护作用机制。结果:  $As_2O_3$  浓度依赖性的降低 HepaRG 细胞的存活率 ( $P < 0.01$ ); 丹酚酸 B 单独作用 2 h 对正常细胞活力无影响; 丹酚酸 B ( $5, 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 预孵育 2 h 可显著增加由  $As_2O_3$  引起的细胞存活率下降 ( $P < 0.01$ )。  $As_2O_3$  导致肝细胞凋亡比例显著上升 ( $P < 0.01$ ), 丹酚酸 B ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 预孵育可降低细胞凋亡率 ( $P < 0.01$ );  $As_2O_3$  孵育 24 h 引起线粒体膜电位下降, 丹酚酸 B 可维持线粒体膜电位, 提示丹酚酸 B 的抗凋亡作用与其抑制凋亡线粒体通路有关; 与  $As_2O_3$  组比较, 丹酚酸 B 预处理升高了 Bcl-2/Bax 水平 ( $P < 0.01$ ), 增加了 p-Akt/Akt 水平 ( $P < 0.01$ )。结论: 丹酚酸 B 对  $As_2O_3$  诱导的肝细胞损伤具有保护作用, 其作用机制与维持线粒体功能、抑制肝细胞凋亡有关。

**[关键词]** 丹酚酸 B; 三氧化二砷; 肝细胞损伤; 肝保护

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)08-0068-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200821

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200107.1050.001.html>

**[网络出版时间]** 2020-01-07 13:25

## Protective Effect of Salvianolic Acid B on Arsenic Trioxide-induced HepaRG Human Hepatocyte Injury

SUN Jia-fu<sup>1</sup>, SUN Xiao<sup>2</sup>, LUO Yun<sup>2</sup>, GAO Ye<sup>1</sup>, WANG Shan<sup>2</sup>, NAN Feng-wei<sup>2</sup>,  
SUN Xiao-bo<sup>2\*</sup>, SUN Gui-bo<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;  
2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect of salvianolic acid B on HepaRG hepatocyte injury induced by arsenic trioxide ( $As_2O_3$ ) and its mechanism. **Method:** HepaRG cells were incubated with  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} As_2O_3$  for 24 h to induce hepatocyte injury. The cells were divided into control group, model group, salvianolic acid B  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group, salvianolic acid B  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + As_2O_3$  group, salvianolic acid B

**[收稿日期]** 20190826(013)

**[基金项目]** 国家科技重大专项(2017ZX09301069)

**[第一作者]** 孙佳富, 在读硕士, 从事心血管药理学方向研究, E-mail:1002269060@qq.com

**[通信作者]** \* 孙桂波, 研究员, 博士生导师, 从事中药药理学方向研究, E-mail:sunguibo@126.com;

\* 孙晓波, 研究员, 博士生导师, 从事中药药理学方向研究, E-mail:sun-xiaobo@163.com

5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  + As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> group, and salvianolic acid B 2.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  + As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> group. HepaRG cells were preincubated with salvianolic acid B for 2 h and then incubated with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for 24 h. At the end of the incubation, cell viability was detected by thiazolyl blue tetrazolium bromide assay, apoptosis was observed by Hoechst33342 fluorescence staining, apoptosis rate was detected by annexin V-FITC/propidium iodide double staining flow cytometry, and mitochondrial membrane was observed by JC-1 fluorescence staining. Western blot was used to detect the protective effect of expressions of relevant proteins Bcl-2, Bax, Akt, p-Akt on salvianolic acid B in the liver. **Result:** As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> concentration-dependently reduced the survival rate of HepaRG cells ( $P < 0.01$ ), salvianolic acid B had no effect on normal cell viability for 2 h, pre-incubation with salvianolic acid B (5, 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 2 h significantly increased the decreased cell survival rate caused by As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ( $P < 0.01$ ). As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> significantly increased hepatocytes apoptosis rate ( $P < 0.01$ ), while pre-incubation with salvianolic acid B (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) decreased apoptosis rate ( $P < 0.01$ ). Incubation with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for 24 h caused decrease of mitochondrial membrane potential, pre-incubation with salvianolic acid B maintained mitochondrial membrane potential, indicating that the anti-apoptotic effect of salvianolic acid B were related to the mitochondrial pathway modulation. Western blot analysis showed that salvianolic acid B promoted the ratio of Bcl-2/Bax and promoted p-Akt/Akt compared with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Salvianolic acid B has a protective effect on hepatocyte injury induced by As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and its mechanism is related to maintenance of mitochondrial function and inhibition of hepatocyte apoptosis.

**[Key words]** salvianolic acid B; arsenic trioxide; liver cell injury; liver protection

三氧化二砷(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)是我国传统中药砒霜的主要有效成分,也是目前国内外治疗急性早幼粒细胞白血病(AML)以及复发的最有效的药物之一,临床治愈率达到80%以上<sup>[1]</sup>。近年来As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>被尝试用于其他肿瘤如卵巢癌、胃癌、肝胆癌、肺癌等的治疗并取得了很好的疗效,提示其具有良好的应用前景<sup>[2-3]</sup>。然而,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>属剧毒药物,临床上治疗安全窗口小,在治疗过程中易出现严重不良反应,包括心脏毒性、肝脏毒性、体液潴留、皮疹等,限制了其临床应用<sup>[4]</sup>。肝脏是As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>的主要代谢器官,在其代谢过程中可高浓度潴留,极易造成肝脏损伤<sup>[5]</sup>。临床研究显示,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>单独应用或联合全反式维甲酸治疗白血病均可引起肝损伤,主要表现为消化道反应、黄疸、腹水、肝区疼痛等。甘戈等<sup>[6]</sup>通过文献检索收集27例As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>致严重不良反应的报道,其中肝衰6例,占10.7%,4例死于急性肝衰竭。严重不良反应多发生在用2周内,多数既往存在肝脏病史,其中40~49岁,≥60岁患者所占比例较高。另外,体外研究显示As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对肝细胞具有毒性,可引起正常肝细胞凋亡。因此,减轻As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>肝毒性对未来扩大其临床应用范围具有十分重要的意义<sup>[7-12]</sup>。丹酚酸B(Sal B)是丹参的主要水溶性有效成分之一,本课题组前期研究显示丹酚酸B可降低As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>引起的心脏毒性,并增强其抗肿瘤活性<sup>[13-15]</sup>。因此,本实验

采用As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>致HepaRG人肝细胞损伤模型研究丹酚酸B的As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>所产生的肝细胞毒性是否具有保护作用,并对其可能的作用机制进行探讨。

## 1 材料

**1.1 细胞** HepaRG人肝细胞购于中国科学院细胞库。

**1.2 药物与试剂** 1640细胞培养基(美国HyClone公司,批号AD21582265);As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>注射液(伊泰达亚砷酸氯化钠注射液,黑龙江哈尔滨医大药业有限公司,国药准字H19990191);生理盐水注射液(山东华鲁制药有限公司,国药准字He7022750);噻唑蓝(MTT,美国Sigma公司,批号725C059);青霉素-链霉素,(1×)磷酸盐缓冲液(PBS,美国Gibco公司,批号分别为1902420,8118102);胰酶(Trypsin,美国Solabio公司,批号20190329);二甲基亚砷(DMSO,国药集团化学试剂有限公司,批号20181010);抗蛋白激酶B(Akt),磷酸化Akt(p-Akt)抗体(美国CST公司,批号分别为20,24);抗B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体(美国Abcam公司,批号均为GR3271671-1);β-肌动蛋白(β-actin),辣根过氧化物酶偶联山羊抗兔体[柏奥易杰(北京)科技有限公司,批号分别为80910124,80910101];FITC-Annexin V/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒,Hoechst 33342(美国Invitrogen公司,批号分别为1947895,919784);JC-1(碧云天公司,

批号 C2005); 细胞蛋白抽提试剂, BCA 蛋白定量试剂盒, SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒, 电泳缓冲液, 转膜缓冲液, TBST, 高灵敏度化学发光检测试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司, 批号分别为 01385/40320, 50150, 50344, 30422, 1428/60333, 40417, 03781/20402)。

**1.3 仪器** CKX31SF 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司); Heraeus BB15 型二氧化碳细胞培养箱(美国 Thermo Scientific 公司); ZHJH-C1115B 型超净工作台(上海智成分析仪器制造有限公司); Advantage A10 型超纯水仪(美国 Merck Millipore 公司); TDL-5013 型台式离心机(上海安亭科学化学仪器厂); MQX 200 型微孔板扫描酶标仪(美国 BioTek Instrument 公司); DM4000B 型荧光正置显微镜(德国 Leica 公司); Labofuge 400R 型低温离心机(德国 Thermo Electron 公司); FACS Calibur™ 型流式细胞仪(美国 BD 公司); 迷你转膜仪, ChemiDOC™ XRS + 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); DYY-7C 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** HepaRG 人肝细胞培养于含 10% FBS 的 1640 培养基中, 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 条件下细胞培养箱中培养。细胞密度达到 80% ~ 90% 时, 采用 0.25% 胰酶/0.02% EDTA 消化细胞、传代, 取对数生长期的细胞用于后续实验。

**2.2 MTT 比色法检测细胞活力** 取生长状态良好细胞, 胰酶消化, 以  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu$ L, 孵育 24 h 后分组, 每组 6 个复孔。分组给药处理结束后, 每孔加入  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 溶液 100  $\mu$ L, 37 °C 孵育 4 h, 每孔中加入 DMSO 100  $\mu$ L, 微孔板震荡器震荡 3 min, 使甲臜结晶充分溶解, 在微孔板扫描酶标仪测 570 nm 处吸光度  $A$ , 细胞存活率 =  $(A_{\text{给药组}} - A_{\text{溶剂}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{溶剂}}) \times 100\%$ 。

**2.3 检测 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用 HepaRG 肝细胞的活力** 将 HepaRG 肝细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔接种 96 孔板中, 在含有 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 恒温孵育箱中培养 24 h。空白组使用无血清培养基液处理, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组分别用含有终浓度为 80, 40, 20, 10, 5, 2.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 无血清培养基作用 24 h。

**2.4 检测丹酚酸 B 预孵育 2 h HepaRG 肝细胞的活力** 将 HepaRG 肝细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔接种 96 孔板中, 在含有 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 恒温孵育箱中培养 24 h。空白组使用无血清培养基液处理, 丹酚酸 B 预孵育组(丹酚酸 B) 将含有终浓度为 100, 50, 25, 12.5,

6.25, 3.125  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丹酚酸 B 的无血清培养液作用 2 h, 更换为无血清培养液继续培养 24 h。

**2.5 检测丹酚酸 B 预孵育 2 h 对 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 致 HepaRG 肝细胞的损伤** 将 HepaRG 肝细胞以  $1 \times 10^4$  个/孔接种 96 孔板中, 在含有 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 恒温孵育箱中培养 24 h。空白组使用无血清培养基处理, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组用无血清培养基培养 2 h, 加入终浓度为  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用 24 h, 丹酚酸 B 单给药组用  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  丹酚酸 B 作用 2 h, 换成无血清培养基继续培养 24 h。丹酚酸 B 预给药组(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + 丹酚酸 B) 将相应浓度丹酚酸 B 作用 2 h, 换为  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用 24 h。

**2.6 Hoechst33342 荧光染色法检测细胞凋亡** HepaRG 肝细胞以  $2 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中, 培养 24 h。分组及给药时间同 2.5 项。给药结束后去除培养基, PBS 清洗细胞 2 次, 加入含  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Hoechst33342 的 1640 培养基 1 mL。放入培养箱中, 37 °C 染色 15 min。磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 ~ 3 次, 荧光显微镜下观察细胞荧光并采用摄像系统同步拍照。

**2.7 流式细胞术检测细胞凋亡率** HepaRG 肝细胞以  $2 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中, 24 h 后进行实验。分为空白组, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组, 丹酚酸 B ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 单给药组, 丹酚酸 B (2.5, 5, 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 预给药组(As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> + 丹酚酸 B), 药物作用时间同 2.5 项。给药结束后, 胰酶消化收集细胞,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min。弃上清, 用预冷的 PBS 清洗 2 次, 染色缓冲液重悬细胞, 分别加入 Annexin V-FITC 5  $\mu\text{L}$ 。室温下避光孵育 30 min, 上机前 5 min 加入 PI 5  $\mu\text{L}$ , 流式细胞仪检测细胞凋亡率, Cellquest Pro 软件分析处理数据。

**2.8 JC-1 荧光染色法检测线粒体膜电位** 细胞接种、分组给药同 2.7 项。给药终止, 去除培养液, PBS 清洗细胞 2 次, 加入含  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  JC-1 的 1640 培养基 1 mL。放入培养箱中, 37 °C 染色 15 min。PBS 洗 2 ~ 3 次, 20 倍荧光显微镜下观察细胞荧光并采用摄像系统同步拍照, 采用 Image J 图像分析软件处理图片。

**2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达** 细胞接种、分组给药同 2.7 项。给药终止, PBS 清洗 2 次, 胰酶消化收集细胞, 每组  $1 \times 10^6$  个细胞。在蛋白抽提试剂中加入适量蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)在细胞中加入适量蛋白抽提试剂, 吹打均匀后, 冰上放置 20 min, 让细胞充分裂解。

14 000 × g 离心 15 min, 取上清测并用 BCA 蛋白定量试剂盒说明书操作测定蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶分离蛋白, 湿转法转膜后, 室温封闭 2 ~ 3 h, 加入一抗 p-Akt, Akt, Bcl-2, Bax (1 : 1 000), 4 °C 过夜。TBST 洗涤 3 次, 每次 15 min。加入二抗 (1 : 2 000), 室温孵育 1 h, 用高灵敏度化学发光检测试剂盒配制显影液显影, ChemiDOC™ XRS + 型凝胶成像系统曝光成像。使用 Image J 软件分析目的条带灰度值, 计算其比值。

**2.10 统计学方法** 实验均重复 3 次, 所有数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 GraphPad Prism 5 软件进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 及丹酚酸 B 对细胞活力的影响** 与空白组比较, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 2.5 ~ 80 μmol·L<sup>-1</sup> 组细胞活力显著降低 ( $P < 0.01$ ), As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用 24 h 可剂量依赖性抑制 HepaRG 肝细胞活力。与空白组比较, 丹酚酸 B 0 ~ 100 μmol·L<sup>-1</sup> 单独预孵育 2 h 对细胞活力无明显影响。据此及文献 [16] 报道, 采用 5 μmol·L<sup>-1</sup> As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用 24 h 进行随后实验。见表 1, 2。

表 1 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Effect of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on cell viability ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度/μmol·L <sup>-1</sup>	细胞活力
空白	-	1.00 ± 0.05
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	80	0.26 ± 0.02 <sup>1)</sup>
	40	0.40 ± 0.02 <sup>1)</sup>
	20	0.44 ± 0.02 <sup>1)</sup>
	10	0.48 ± 0.03 <sup>1)</sup>
	5	0.53 ± 0.05 <sup>1)</sup>
	2.5	0.89 ± 0.05 <sup>1)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

表 2 丹酚酸 B 对细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of salvianolic acid B on cell viability ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度/μmol·L <sup>-1</sup>	细胞活力
空白	-	1.00 ± 0.07
丹酚酸 B	100	1.05 ± 0.10
	50	1.06 ± 0.06
	25	1.08 ± 0.07
	12.5	1.01 ± 0.08
	6.25	1.00 ± 0.08
	3.125	1.01 ± 0.08

**3.2 丹酚酸 B 预孵育 2 h 对 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 致 HepaRG 肝细胞活力下降的影响** 与空白组比较, 5 μmol·L<sup>-1</sup>

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组肝细胞活力显著下降 ( $P < 0.01$ )。与 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组比较, 丹酚酸 B 5, 10 μmol·L<sup>-1</sup> 预孵育 2 h 可显著提高细胞存活率 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 丹酚酸 B 预孵育 2 h 对 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 致 HepaRG 肝细胞活力下降的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of preincubation with salvianolic acid B for 2 h on decreased activity of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- induced HepaRG hepatocytes ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	丹酚酸 B 浓度 /μmol·L <sup>-1</sup>	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 浓度 /μmol·L <sup>-1</sup>	细胞活力
空白	-	-	1.00 ± 0.08
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	5	0.76 ± 0.06 <sup>1)</sup>
丹酚酸 B	10	5	0.99 ± 0.05 <sup>2)</sup>
	5	5	0.96 ± 0.10 <sup>2)</sup>
	2.5	5	0.84 ± 0.03
	1.25	5	0.76 ± 0.07

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.3 丹酚酸 B 对细胞凋亡的影响** 空白组与单给药组肝细胞形态及大小较均一, 细胞核椭圆形, 完整清晰, 体积较大, 荧光染色呈匀质状。与空白组比较, 5 μmol·L<sup>-1</sup> As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组细胞可见核固缩, 荧光染色呈高亮; 染色质浓缩、边集、形成碎块状和凋亡小体等细胞凋亡的特征性改变。丹酚酸 B (5, 10 μmol·L<sup>-1</sup>) 预孵育组细胞核形态接近正常, 少量细胞有特征性凋亡的改变, 凋亡细胞的比例显著减少。见图 1。

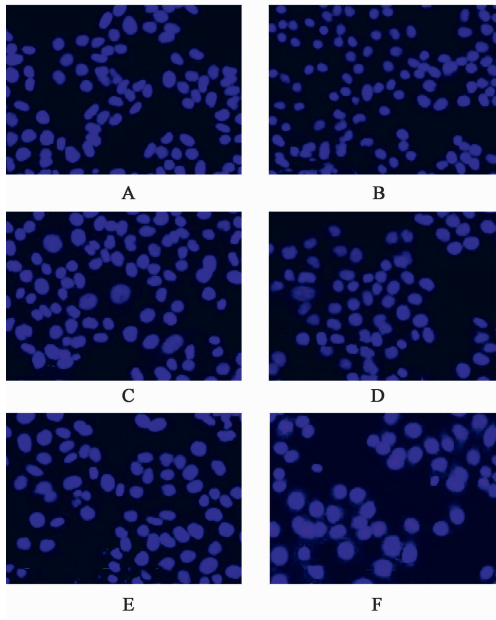
**3.4 流式细胞术检测细胞凋亡率丹酚酸 B 的抗凋亡作用** 与空白组比较, 5 μmol·L<sup>-1</sup> As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 模型组凋亡细胞显著升高 ( $P < 0.01$ ); 丹酚酸 B 单给药组凋亡细胞比例与空白组比较无统计学差异; 与 5 μmol·L<sup>-1</sup> As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组比较, 10 μmol·L<sup>-1</sup> 丹酚酸 B 预处理明显降低凋亡细胞 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 丹酚酸 B 对细胞凋亡率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of salvianolic acid B on apoptosis rate of cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	丹酚酸 B 浓度 /μmol·L <sup>-1</sup>	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 浓度 /μmol·L <sup>-1</sup>	凋亡率 /%
空白	-	-	5.32 ± 0.80
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	5	10.34 ± 0.40 <sup>1)</sup>
丹酚酸 B	10	-	6.49 ± 1.48
	10	5	6.55 ± 1.70 <sup>2)</sup>
	5	5	7.82 ± 1.60

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。



A. 空白组; B. 单给药组; C.  $As_2O_3$  组; D. 丹酚酸 B 高浓度组; E. 丹酚酸 B 中浓度组; F. 丹酚酸 B 低浓度组(图 2, 3 同)

图 1 丹酚酸 B 预孵育 2 h 对  $As_2O_3$  致 HepaRG 肝细胞细胞凋亡的影响 (Hoechst33342,  $\times 20$ )

Fig. 1 Effect of preincubation with salvianolic acid B for 2 h on apoptosis of  $As_2O_3$  HepaRG hepatocytes (Hoechst33342,  $\times 20$ )

**3.5 丹酚酸 B 预孵育对 HepaRG 肝细胞线粒体膜电位的影响** JC-1 是一种广泛用于检测线粒体膜电位的荧光探针,线粒体膜电位较高时可产生红色荧光,线粒体膜电位下降时产生绿色荧光。线粒体膜电位下降是细胞凋亡早期的特征。与空白组比较, $As_2O_3$  组导致 HepaRG 肝细胞线粒体膜电位下降,绿色荧光细胞比例显著增加。与  $As_2O_3$  组比较,丹酚酸 B 可显著抑制线粒体膜电位的下降,提示丹酚酸 B 的抗凋亡作用可能与其稳定线粒体功能有关。见图 2。

**3.6 丹酚酸 B 预孵育对相关蛋白表达的影响** 与空白组比较, $As_2O_3$  降低了 Bcl-2/Bax, p-Akt/Akt 水平 ( $P < 0.01$ ); 与  $As_2O_3$  组比较,丹酚酸 B 增加 Bcl-2/Bax, p-Akt/Akt 水平 ( $P < 0.01$ )。结果表明,丹酚酸 B 可以上调抗凋亡蛋白表达水平并下调促凋亡蛋白的表达,从而发挥抗细胞凋亡的作用。见图 3, 表 5。

#### 4 讨论

$As_2O_3$  诱导的细胞凋亡既是其发挥抗肿瘤作用的主要机制,也是  $As_2O_3$  产生毒性的主要原因之一<sup>[17]</sup>。本研究发现, $As_2O_3$  导致 HepaRG 肝细胞

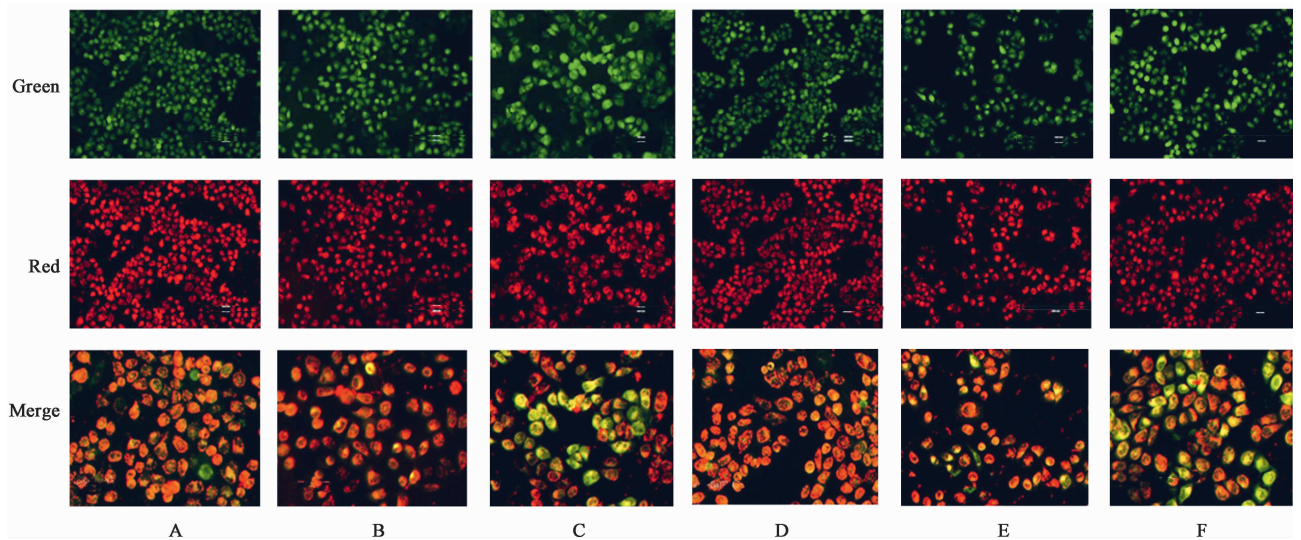


图 2 丹酚酸 B 预孵育对 HepaRG 肝细胞线粒体膜电位的影响 (JC-1 荧光染色法,  $\times 20$ )

Fig. 2 Effect of preincubation with salvianolic acid B on mitochondrial membrane potential of HepaRG (JC-1 fluorescence staining,  $\times 20$ )

活力下降,并引起肝细胞凋亡发生率显著升高。

肝细胞凋亡异常增多是药物产生肝脏毒性的重要病理机制之一,其可直接导致肝细胞数量减少,肝功能受损<sup>[18]</sup>,因此抑制肝细胞的凋亡是考察肝脏保护药物药效的指标之一。丹酚酸 B 预孵育提高肝细胞活力,并剂量依赖性的降低细胞凋亡的比例,从

而降低  $As_2O_3$  产生的肝脏毒性,发挥肝脏保护作用。

细胞凋亡的内源性途径,即线粒体途径在细胞凋亡过程中起中心作用<sup>[19]</sup>。生理情况下,线粒体将呼吸氧化过程中产生的能量以电化学势能存储于线粒体内膜,在内膜两侧造成质子及其他离子浓度的不对称分布而形成线粒体膜电位。线粒体膜电位是

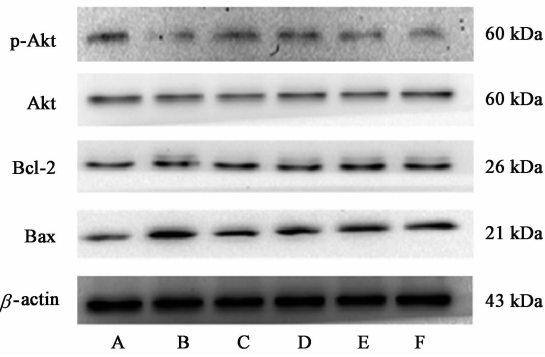


图 3 HepaRG 肝细胞 p-Akt, Akt, Bcl-2 及 Bax 蛋白表达电泳  
Fig.3 Protein expression electrophoresis of p-akt, Akt, Bcl-2 and Bax in HepaRG hepatocytes

表 5 丹酚酸 B 预孵育对相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 5 Effect of preincubation with salvianolic acid B on expressions of related proteins ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	丹酚酸 B 浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Bcl-2 /Bax	p-Akt /Akt
空白	-	-	1.03 ± 0.04	1.00 ± 0.06
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	5	0.62 ± 0.04 <sup>1)</sup>	0.76 ± 0.06 <sup>1)</sup>
丹酚酸 B	10	-	1.13 ± 0.15	1.15 ± 0.06
	10	5	0.96 ± 0.02 <sup>3)</sup>	0.99 ± 0.09 <sup>3)</sup>
	5	5	0.90 ± 0.05 <sup>2)</sup>	0.98 ± 0.06 <sup>2)</sup>
	2.5	5	0.71 ± 0.06	0.80 ± 0.04

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,  
<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

维持线粒体进行氧化磷酸化、产生三磷酸腺苷的先决条件,线粒体膜电位的稳定有利于维持正常细胞生理功能。近年来研究发现,线粒体膜电位的下降是细胞凋亡早期的标志性事件。线粒体膜电位下降可引起线粒体通透性转换孔开放,从而使质子内流入基质间隙,导致蓄积的 Ca<sup>2+</sup> 释放入细胞浆,引起线粒体功能障碍。本研究显示,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>引起线粒体膜电位下降,而丹酚酸 B 可抑制此过程,在凋亡早期阻断了线粒体膜电位的消失,维持能量合成,抑制水渗透内流及线粒体膨胀,从而维持了线粒体功能,提示丹酚酸 B 的抗凋亡作用与其抑制凋亡的线粒体通路有关。Bcl-2 家族蛋白是调节细胞凋亡过程的一类蛋白质,其可分为抗凋亡蛋白;另一类为促凋亡蛋白。正常生理状态下,Bcl-2 与 Bax 可形成异二聚体,接受到凋亡信号以后,Bax 解离下来,并与其他促凋亡蛋白形成二聚体,增强线粒体膜通透性,促使细胞色素 C 释放至细胞浆内,激活 Caspase 级联反应。因此,二者蛋白表达比值的高低与调控凋亡

密切相关,比值降低,促进细胞凋亡,比值升高抑制细胞凋亡。在本研究中,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>引起促凋亡蛋白 Bax 的表达显著增加,而抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白的表达无显著变化,因此 Bcl-2/Bax 下降。丹酚酸 B 显著抑制 Bax 表达,上调 Bcl-2/Bax,抑制 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>引起肝细胞凋亡。以上结果表明肝细胞凋亡的线粒体通路是丹酚酸 B 发挥肝脏保护作用的重要途径。Akt 可通过调节 Bcl-2 家族蛋白磷酸化抑制细胞凋亡和刺激细胞增生,是调节细胞存活的重要蛋白酶。本研究结果提示,丹酚酸 B 的抗凋亡作用与其上调 p-Akt 蛋白表达有关。综上,本研究结果提示丹酚酸 B 对 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>诱导的肝细胞损伤具有保护作用,其作用机制与维持线粒体膜电位稳定,调节 Bcl-2/Bax,并且上调细胞存活蛋白酶 p-Akt,从而抑制肝细胞凋亡有关。

[参考文献]

[ 1 ] O'DONNELL M R, APPELBAUM F R, BAER M R, et al. Acute myeloid leukemia clinical practice guidelines in oncology [ J ]. J Natl Compr Canc Netw, 2006, 4 ( 1 ): 16-36.

[ 2 ] LENGFELDER E, HOFMANN W K, NOWAK D. Impact of arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia [ J ]. Leukemia, 2012, 26 ( 3 ): 433-442.

[ 3 ] KITO M, AKAO Y, OHISHI N, et al. Arsenic trioxide-induced apoptosis and its enhancement by buthionine sulfoximine in hepatocellular carcinoma cell lines [ J ]. Biochem Bioph Res Co, 2002, 291 ( 4 ): 861-867.

[ 4 ] 李贺,熊茂明,孟翔凌,等. 三氧化二砷逆转肝癌细胞株 HepG2 /ADM 多药耐药的作用 [ J ]. 世界华人消化杂志, 2006, 14 ( 27 ): 2691-2694.

[ 5 ] ACOSTA D, SORENSEN E M, ANUFORO D C, et al. An *in vitro* approach to the study of target organ toxicity of drugs and chemicals [ J ]. In Vitro Cell Dev Biol, 1985, 21 ( 9 ): 495-504.

[ 6 ] 甘戈,孙骏,王佳域,等. 27 例三氧化二砷严重不良反应病例报告分析 [ J ]. 中国药物警戒, 2008, 5 ( 5 ): 286-290.

[ 7 ] MATHEWS V, DESIRE S, GEORGE B, et al. Hepatotoxicity profile of single agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia, its impact on clinical outcome and the effect of genetic polymorphisms on the incidence of hepatotoxicity [ J ]. Leukemia, 2006, 20 ( 5 ): 881-883.

[ 8 ] MATHEWS V, GEORGE B, CHENDAMARAI E, et al. Single-agent arsenic trioxide in the treatment of

- newly diagnosed acute promyelocytic leukemia; long-term follow-up data[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(24): 3866-3871.
- [9] MATHEWS V V, BINU P, PAUL S M, et al. Hepatoprotective efficacy of curcumin against arsenic trioxide toxicity[J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2012, 2(2):706-711.
- [10] HAO L C, ZHAO J S, WANG X L, et al. Hepatotoxicity from arsenic trioxide for pediatric acute promyelocytic leukemia [J]. *J Pediat Hematol Onc*, 2013, 35(2):67-70.
- [11] LO-COCO F, AVVISATI G, VIGNETTI M, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(2):111-121.
- [12] BURNETT A K, RUSSELL N H, HILLS R K, et al. Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid treatment for acute promyelocytic leukaemia in all risk groups (AML17): results of a randomised, controlled, phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(13):1295-1305.
- [13] ZHANG J Y, ZHANG B, WANG M, et al. Calcium homeostasis and endoplasmic reticulum stress are involved in salvianolic acid B-offered protection against cardiac toxicity of arsenic trioxide [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(57):97384-97393.
- [14] WANG M, SUN G B, WU P, et al. Salvianolic acid B prevents arsenic trioxide-induced cardiotoxicity *in vivo* and enhances its anticancer activity *in vitro* [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2013, 2013(3): 759483.
- [15] WANG M, SUN G B, SUN X B, et al. Cardioprotective effect of salvianolic acid B against arsenic trioxide-induced injury in cardiac H9c2 cells via the PI3K/Akt signal pathway [J]. *Toxicol Lett*, 2013, 216(2/3): 100-107.
- [16] 赵巍, 胡亚男, 蒋学君, 等. 三氧化二砷诱导肝癌细胞凋亡的机制研究 [J]. *四川大学学报: 医学版*, 2014, 45(5):739-743.
- [17] 张静宜, 孙桂波, 王敏, 等. 三氧化二砷心脏毒性研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(9): 1194-1198.
- [18] 刘艺, 董晓旭, 倪健. 大黄素诱导肝细胞 L-02 凋亡的作用机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(5): 194-200.
- [19] ESTAQUIER J, VALLETTE F, VAYSSIERE J L, et al. The mitochondrial pathways of apoptosis [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 942: 157-183.

[责任编辑 张丰丰]