

蒲葵子总黄酮对肝损伤的保护作用及机制研究

罗晓云^{1,3}, 麦燕随^{1,3}, 朱丽^{1,3}, 张晓君¹, 黄松^{1,2,3*}, 赖小平^{1,2,3}

1. 广州中医药大学 新药开发研究中心, 广东 广州 510006

2. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808

3. 广东省中药新药研发重点实验室, 广东 广州 510006

摘要: 目的 研究蒲葵子总黄酮 (total flavonoids of *Fructus Livistoniae*, TFFL) 对对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 诱导的人正常肝细胞 LO₂ 损伤的作用, 初步探究 TFFL 保护肝损伤的作用机制。方法 MTT 法考察 TFFL 对 LO₂ 细胞的毒性及对 APAP 诱导的 LO₂ 细胞存活率的影响; 流式细胞术和 Hoechst 33342 染色法考察 LO₂ 细胞凋亡率; 试剂盒检测 LO₂ 细胞中丙二醛 (MDA)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 水平及天冬氨酸转氨酶 (AST)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性; Western blotting 法检测 LO₂ 细胞中诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和硝基化酪氨酸微管蛋白 (NT) 表达水平。结果 TFFL 在给定质量浓度下对 LO₂ 细胞无毒性, 且可促进其增殖。对 APAP 诱导的 LO₂ 细胞损伤, TFFL 预防给药能够显著减少细胞凋亡, 降低细胞中 AST 活性和 MDA 水平, 升高 SOD 活性和 GSH 水平, 抑制细胞中 iNOS 和 NT 蛋白的表达。结论 TFFL 对 APAP 诱导的 LO₂ 细胞损伤具有一定的保护作用, 其作用机制可能与抑制氧化应激和硝化应激有关。

关键词: 蒲葵子; 总黄酮; 对乙酰氨基酚; 肝损伤; 细胞损伤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)04-0925-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.04.020

Protective effect and mechanism of total flavonoids of *Fructus Livistoniae* on acetaminophen-induced liver injury

LUO Xiao-yun^{1,3}, MAI Yan-sui^{1,3}, ZHU Li^{1,3}, ZHANG Xiao-jun¹, HUANG Song^{1,2,3}, LAI Xiao-ping^{1,2,3}

1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. Dongguan Institution for Mathematics and Theoretics Engineering Research of Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523808, China

3. Guangdong Provincial Key Laboratory of New Chinese Medicine Research and Development, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To research the effects of total flavonoids of *Livistona chinensis* (TFFL) on normal liver LO₂ cells induced by acetaminophen (APAP), and study the liver protective mechanism on liver injury induced by acetaminophen *in vitro*. **Methods** The effects of TFFL on LO₂ cells and cell activity induced by acetaminophen were determined by MTT method; The apoptosis rate of LO₂ cells induced by APAP was researched by Flow Cytometry combine with staining agent Hoechst 33342; The levels of malondialdehyde (MDA), aspartate aminotransferase (AST), reduced glutathione (GSH), and superoxide dismutase (SOD) were examined; The expressions of iNOS and nitrotyrosine tubulin (NT) in APAP-induced LO₂ hepatocyte injury cells was studied by Western blotting method. **Results** TFFL had no toxicity to LO₂ cells at a given concentration which can promote the proliferation. At the same time, experiment results showed that TFFL prophylactically reduced the apoptosis of LO₂ cells induced by APAP. TFFL decreased the level of AST and MDA, increase the level of GSH and SOD, and inhibit the expressions of iNOS protein and NT protein. **Conclusion** TFFL has a protective effect on LO₂ cells injury induced by APAP. The possible protective mechanism of TFFL is related to the inhibition of oxidative stress and the nitro stress.

Key words: *Fructus Livistoniae*; total flavonoids; acetaminophen; liver injury; cell injury

肝脏是人体最大的脏器, 对人体的生理功能调节有重大作用。药物滥用、嗜酒以及长期暴露于有毒环境等都会对肝脏造成损伤^[1]。肝脏疾病是影响人类健康最为常见的疾病之一, 目前对于肝脏疾病

收稿日期: 2018-12-10

基金项目: 广东省重大科技计划项目 (2013A022100002)

作者简介: 罗晓云 (1992—), 女, 中药学在读硕士, 主要从事中药新药研究。E-mail: 568742704@qq.com

*通信作者 黄松, 男, 博士, 研究员, 主要从事中药新药研究开发。

的防治仍是一个严峻的课题。临床上对肝病的控制多采用化学药如联苯双酯等,但其具有肝肾毒性,且容易造成心血管疾病等不良反应,限制了临床应用,故中医药防治肝损伤具有重要的临床意义。

蒲葵子 *Fructus Livistonae* 为棕榈科蒲葵树 *Livistona chinensis* R. Br. 的种子。其味苦,性寒,有小毒,有抗癌、凉血止血、止痛的作用,主产于两广、福建和台湾等地^[2-3],民间广泛用于治疗肝炎及食道癌、鼻咽癌、恶性葡萄胎、白血病、绒毛膜上皮癌、肺癌等^[3]。文献报道蒲葵子的水提物、乙醇提取物和醋酸乙酯提取物均有一定的抗氧化活性,特别是蒲葵子黄酮部分^[4-7]。在南方蒲葵子常用来治疗肝炎,但具体作用及机制尚不明确。本课题组前期研究发现蒲葵子总黄酮(TFFL)具有清除自由基、抗氧化等活性^[4]。本实验在前期研究基础上考察 TFFL 对氧化损伤肝细胞的保护作用,探究其保肝机制。

对乙酰氨基酚(APAP)属苯胺类解热镇痛药,是大多数解热镇痛复方制剂的主要成分。APAP 具有肝毒性,在治疗剂量被认为是安全的,但过量常引起急性肝衰竭^[8]。因此本实验以 APAP 诱导肝细胞损伤,初步探讨 TFFL 对 APAP 诱导的肝损伤的保护作用及机制。

1 材料

1.1 细胞

人正常肝细胞 LO₂ 来源于中国医学科学院细胞库。

1.2 药物与试剂

蒲葵子来源于江门德鑫制药有限公司(批号 523420213),经广州中医药大学新药研发中心主任黄松教授鉴定为棕榈科蒲葵树 *Livistona chinensis* R. Br. 的种子;对乙酰氨基酚(批号 1611129-6,上海麦克林生化科技有限公司);联苯双酯片(批号 5341533,北京协和药厂);天冬氨酸转氨酶(AST)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(南京建成生物科技有限公司);Hoechst33342 染色液(上海碧云天生物技术有限公司);诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、硝基化酪氨酸微管蛋白(NT)抗体(Abcam 公司);PMSF(100 mmol/L)、HRP 标记山羊抗兔二抗、HRP 标记驴抗山羊二抗(武汉谷歌生物科技有限公司); β -actin 抗体(武汉谷歌生物科技有限公司);BCA 蛋白定量检测试剂盒(康为世纪生物科技有限公司)。

1.3 仪器

TGL-16c 离心机(安亭仪器厂);TYXH-II 涡旋器(天悦电子科技有限公司);AlphaEaseFC 灰度分析软件(Alpha Innotech 公司);DYY-6C 电泳仪(北京六一仪器厂);TL-420D 水浴锅(姜堰市天力医疗器械厂有限公司);BCD-186 冰箱(西门子公司);Adobe PhotoShop 图像分析系统(Adobe 公司);Gallios 流式细胞仪(Beckman 公司)。

2 方法

2.1 TFFL 制备

将蒲葵子原药材水洗、晒干、破壳、打粉,过 2 号筛,用 70%乙醇 1:10 提取 3 次,每次 1 h,合并滤液,回收乙醇,得浸膏①。将浸膏①以大孔树脂吸附(柱径比 1:10),50%乙醇洗脱,收集洗脱液,回收乙醇,得浸膏②。浸膏②用聚酰胺纯化,50%乙醇洗脱,收集洗脱液,回收乙醇,得浸膏,干燥,即 TFFL。以芦丁为对照品,TFFL 经紫外分光光度计测定,总黄酮质量分数>75%。

2.2 APAP 诱导肝细胞损伤模型制备

细胞复苏、培养和传代后,取对数生长期细胞,调整密度至 8×10^4 个/mL,轻轻混匀接种于 96 孔板中,每孔加入 100 μ L,边缘孔加 100 μ L PBS 溶液保湿,置于细胞培养箱培养 24 h。吸弃细胞上清液,加入新鲜配制的不同浓度的 APAP 溶液 100 μ L(30、20、15、10、8、5、2 μ mol/L),置于细胞培养箱中反应 9、13、16、19 h,每组 5 个复孔。每孔加入 10 μ L 的 5 mg/mL MTT 溶液,细胞培养箱中反应 4 h。弃去细胞上清液,加入 200 μ L DMSO 溶液,轻轻震荡 10 min,酶标仪上在 490 nm 下测量吸光度(A)值。计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 TFFL 对 LO₂ 细胞的毒性考察

细胞培养同“2.2”项,吸弃细胞上清液,加入新鲜配制的不同质量浓度的 TFFL 溶液 100 μ L(1 000、625、500、125、25、5 μ g/mL),置于细胞培养箱中反应 13 h。每孔加入 10 μ L 的 5 mg/mL MTT 溶液,细胞培养箱中反应 4 h。弃去细胞上清液,加入 200 μ L DMSO 溶液,轻轻震荡 10 min,酶标仪 490 nm 下测量 A 值。计算细胞存活率。

2.4 TFFL 对 APAP 诱导的 LO₂ 细胞存活率的影响

取对数生长期细胞,调整密度为 8×10^4 个/mL,轻轻混匀接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,边缘孔加 100 μ L PBS 溶液保湿。将接种好的细胞置于细胞

培养箱培养 24 h。设对照组、模型组、阳性对照联苯双酯片 (12 $\mu\text{mol/L}$) 组及 TFFL 高、中、低质量浓度组。吸去细胞上清液, 各给药组分别加入培养基稀释的 TFFL 200、100、50 $\mu\text{g/mL}$ 及联苯双酯片 24 $\mu\text{mol/L}$ 各 100 μL , 作用 1 h, 加入 APAP (10 $\mu\text{mol/L}$) 100 μL , 使 TFFL 终质量浓度分别为 100、50、25 $\mu\text{g/mL}$, 联苯双酯片终浓度为 12 $\mu\text{mol/L}$ 。置于细胞培养箱中反应 13 h 后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 10 μL , 细胞培养箱中反应 4 h。弃去细胞上清液, 加入 200 μL DMSO 溶液, 轻轻震荡 10 min, 酶标仪上在 490 nm 下测量 A 值。计算细胞存活率。

2.5 流式细胞仪测定细胞凋亡

细胞悬液密度调整至 3.2×10^5 个/mL, 接种于 6 孔板中, 每孔加入 1 mL, 置于细胞培养箱培养 24 h。分组及处理同“2.4”项, APAP 处理 13 h 后按照 BD 556547 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒说明书操作进行检测。

2.6 细胞核染色剂 Hoechst 33342 法测定细胞凋亡

细胞悬浮液调整密度至 1.6×10^5 个/mL, 轻轻混匀接种于 6 孔板中, 每孔加入 1 mL, 置于细胞培养箱培养 24 h。吸去细胞上清液, 分组及处理同“2.4”项。APAP 处理 13 h 后用 Hoechst33342 法染色: 将染色液母液配成质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$, 6 孔板中每孔加入染色液 1 mL。避光孵育 15 min。弃去上清液, PBS 洗 3 次, 荧光显微镜下观察。

2.7 AST、GSH、SOD、MDA 水平检测

细胞分组及处理同“2.4”项, APAP 处理 13 h 后按照 AST、GSH、SOD、MDA 试剂盒说明书操作进行检测。

2.8 Western blotting 法检测 LO₂ 细胞 iNOS 和 NT 蛋白表达水平

细胞处理同“2.4”项, 收集细胞, 加裂解液悬浮细胞离心, 取上清, 测定蛋白浓度, 经 SDS-PAGE 电泳后, 300 mA 恒流转膜 1 h。用 5% 的脱脂牛奶将转好的膜封闭 1 h。一抗 (1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; TBST 洗 3 次, 每次 5 min; 二抗 (1:3 000) 室温孵 30 min 后, TBST 洗 3 次, 每次 5 min。PVDF 膜与混合液充分接触 1~2 min, 去尽残液, 包好, 暗匣中曝光。显影、定影并进行凝胶图像分析。

3 结果

3.1 APAP 诱导肝细胞损伤

图 1 结果表明, APAP 2、5 $\mu\text{mol/L}$ 对 LO₂ 细胞损伤很小, 当浓度为 8~20 $\mu\text{mol/L}$ 时, APAP 对 LO₂

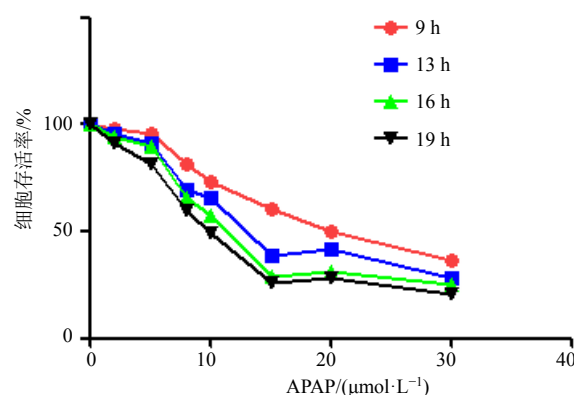


图 1 APAP 对 LO₂ 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effects of APAP on survival rate of LO₂ cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

细胞损伤程度与浓度呈正相关。当 APAP 浓度 > 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞存活率下降趋于平缓, 可能是由于细胞对药物产生了抗药性。APAP 作用 9~19 h 时, 细胞活性下降最快, 因此选择 APAP 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 造模时间为 13 h。

3.2 TFFL 对 LO₂ 细胞的毒性研究

图 2 结果表明, 与对照组比较, TFFL 质量浓度为 5~1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞存活率提高, 表明 TFFL 对 LO₂ 细胞增殖无明显的抑制作用, 且能促进细胞增殖。

3.3 TFFL 对 APAP 诱导的 LO₂ 细胞存活率的影响

结果 (图 3) 表明, 与对照组比较, 模型组细胞存活率显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, TFFL 各质量浓度组细胞存活率显著升高 ($P < 0.01$)。表明 TFFL 对 APAP 诱导的 LO₂ 细胞损伤有一定的保护作用, 且呈剂量依赖性。

3.4 TFFL 对 APAP 诱导的 LO₂ 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果 (图 4、5) 表明, 与对照

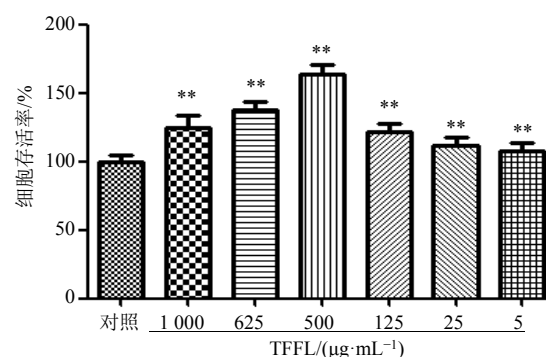
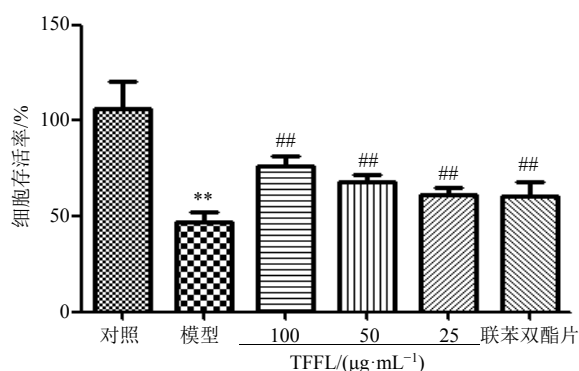


图 2 TFFL 对 LO₂ 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effect of TFFL on survival rate of LO₂ cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$, 下同

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 3 TFFL 对 APAP 诱导的 LO₂ 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effect of TFFL on APAP-induced survival rate of LO₂ cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

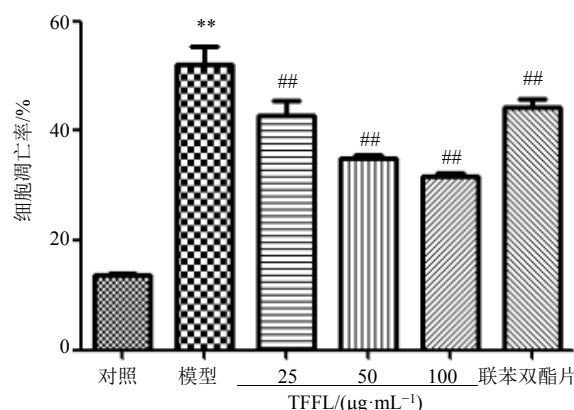


图 4 TFFL 对 APAP 诱导的 LO₂ 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effects of TFFL on APAP-induced apoptosis rate of LO₂ cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

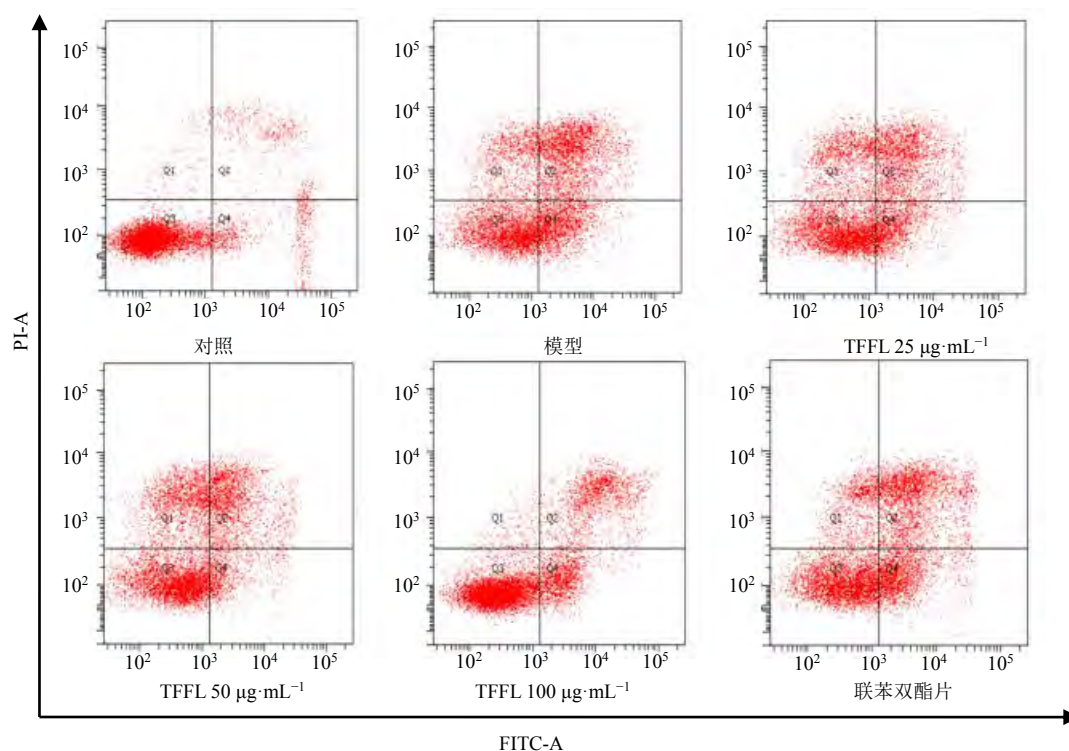


图 5 TFFL 对 APAP 诱导的 LO₂ 细胞凋亡的影响 (流式细胞术)

Fig. 5 Effect of TFFL on APAP-induced apoptosis of LO₂ cells (flow cytometry)

组比较, 模型组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, TFFL 各质量浓度组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.01$), 且呈剂量依赖性。

Hoechst 33342 法检测结果 (图 6) 表明, 对照组细胞核呈现均匀蓝色荧光, 色暗, 细胞核结构完整, 活细胞数目多。模型组细胞核呈现亮蓝色荧光, 呈有点状或丝状强荧光, 荧光亮度较对照组明显增

强, 核发生明显固缩, 显微镜下见散在的凋亡小体, 说明细胞核固缩乃至凋亡。TFFL 各质量浓度组细胞核在显微镜下固缩形态明显减少, 点状或者丝状的荧光也减少, 且具有剂量依赖性。联苯双酯片组细胞呈现近暗蓝色荧光, 细胞形态固缩较模型组减少。结果表明 TFFL 能够抑制 APAP 诱导的 LO₂ 细胞凋亡, 并呈剂量依赖性。

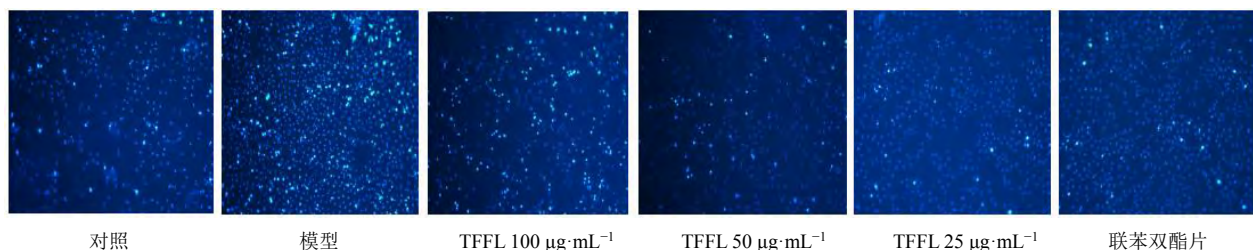


图 6 TFFL 对 APAP 诱导的 LO₂ 细胞凋亡的影响 (×200, Hoechst 33342 染色)

Fig. 6 Effect of TFFL on APAP-induced apoptosis of LO₂ cells (×200, Hoechst 33342 staining)

3.5 TFFL 对 APAP 诱导的 LO₂ 细胞中 AST、SOD 活性及 GSH、MDA 水平的影响

结果 (图 7) 表明, 与对照组比较, 模型组细胞中 AST 活性和 MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$), SOD 活性和 GSH 水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, TFFL 各质量浓度组细胞中 AST 活性和 MDA 水平显著降低 ($P < 0.01$), 而 SOD 活性和 GSH

水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.6 TFFL 对 APAP 诱导的 LO₂ 细胞中 iNOS 和 NT 蛋白表达的影响

结果 (图 8) 表明, 与对照组比较, 模型组 iNOS 和 NT 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, TFFL 各质量浓度组细胞中 iNOS、NT 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

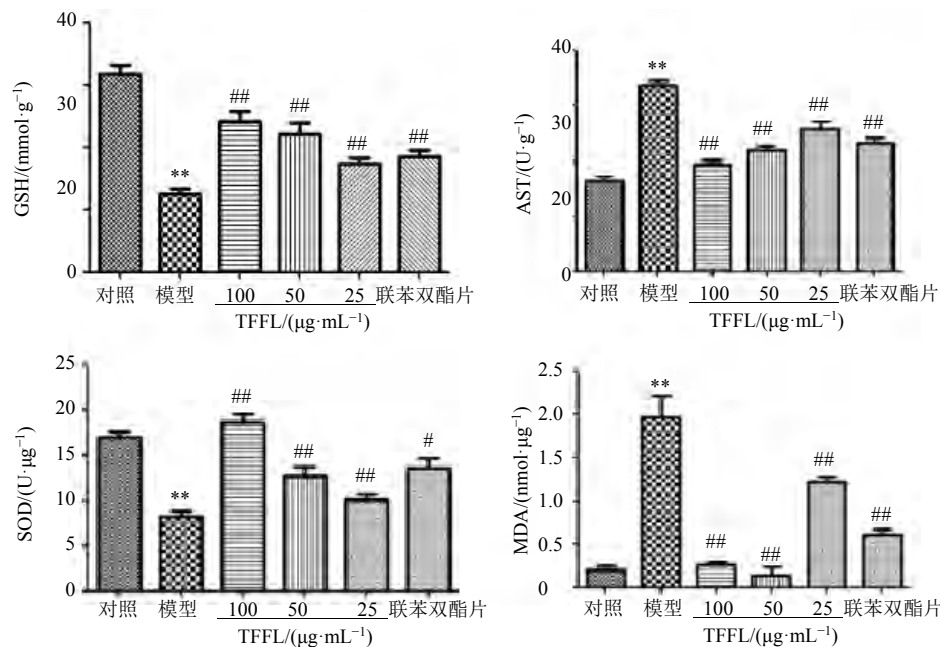


图 7 TFFL 对 APAP 诱导的 LO₂ 细胞中 AST、SOD 活性及 GSH、MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 7 Effects of TFFL on levels of AST, SOD, GSH, and MDA in APAP-induced LO₂ cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

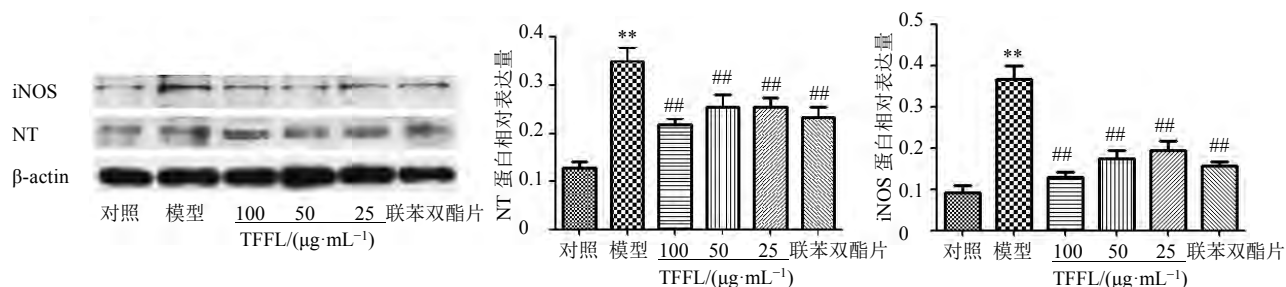


图 8 TFFL 对 APAP 诱导的 LO₂ 细胞中 iNOS 和 NT 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 8 Effect of TFFL on expression of iNOS and NT proteins in APAP-induced LO₂ cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

4 讨论

APAP 的肝毒性与其在肝内的代谢有关。APAP 主要在肝内与硫酸盐和葡萄糖苷酸结合,只有少量被 CYP2E1 酶降解为高毒性的活性代谢物 *N*-乙酰-对-苯醌亚胺 (NAPQI), NAPQI 与线粒体内 GSH 结合后解毒。当 APAP 剂量过大时,其代谢过程中产生的大量 NAPQI 超过了 GSH 的解毒能力,未被清除的 NAPQI 与细胞和线粒体蛋白质结合,影响其功能并最终导致细胞坏死^[9-11]。APAP 的水溶性较好,在 70~80 °C 的热水中易溶解,且不易挥发,适于制备体外肝细胞损伤模型。血清 AST 被认为是肝细胞损害的敏感指标^[12]。MDA 是膜脂氧化的最终分解产物,其含量可以反映机体和肝脏脂质过氧化损伤程度,间接反映肝细胞毒性损伤程度。当 APAP 诱导细胞损伤时,细胞产生炎症因子,促进 iNOS 生成,促进酪氨酸转变为硝基化的酪氨酸,而硝基化的酪氨酸可以与微管蛋白结合,从而使微管变形,细胞凋亡^[13]。

蒲公英在南方地区广泛使用,用于治疗肝炎和肝癌。本实验室前期提取分离了蒲公英的有效部位,并对其中的醋酸乙酯部位进行了一系列抗氧化作用研究^[4],得到蒲公英对双氧水诱导的肝损伤有保护作用。本实验考察 TFFL 对 APAP 诱导的 LO₂ 细胞损伤的保肝作用,初步探讨蒲公英对肝细胞损伤保护作用的机制。

实验结果表明,TFFL 对 LO₂ 细胞无细胞毒性,且可促进其增殖。TFFL 预防给药能够抑制 APAP 诱导的 LO₂ 细胞凋亡,降低细胞中 AST 活性和 MDA 水平,升高 SOD 活性和 GSH 水平,抑制细胞中 iNOS 和 NT 蛋白的表达,表明其对 APAP 诱导的肝细胞损伤有一定的保护作用,且保护作用可能与抑制氧化应激和硝化应激有关。后续希望通过动物实验验证这一途径。

参考文献

- [1] 孙晓梅, 阎 姝, 田书霞. 中药治疗肝损伤的研究进展 [J]. 中药材, 2016, 5(11): 2664-2667.
- [2] 陈 艳, 姚 宏, 李少光, 等. HPLC 法测定蒲公英药材中六种组分含量 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(4): 645-650.
- [3] 陈 艳, 林新华. 蒲公英的体外抗癌活性 [J]. 福建医科大学学报, 2008, 42(2): 93-95.
- [4] 张 亮. 蒲公英抗氧化及保肝活性研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [5] Uzi D, Barda L, Scaiewicz V, et al. CHOP is a critical regulator of acetaminophen-induced hepatotoxicity [J]. *J Hepatol*, 2013, 3(11): 1118-1129.
- [6] Liu M W, Liu R, Wu H Y, et al. Protective effect of Xuebijing injection on D-galactosamine- and lipopolysaccharide-induced acute liver injury in rats through the regulation of p38 MAPK, MMP-9 and HO-1 expression by increasing TIPE2 expression [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(5): 1419-1432.
- [7] Liao W Q, Qi Y L, Wang L, et al. Recql5 protects against lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced liver injury in mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(36): 176-180.
- [8] Chen Y H, Chen H L, Chien C S, et al. Contribution of mature hepatocytes to biliary regeneration in rats with acute and chronic biliary injury [J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): 543-561.
- [9] Zhang W, Yin L, Tao X, et al. Dioscin alleviates dimethylnitrosamine-induced acute liver injury through regulating apoptosis, oxidative stress and inflammation [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 10(6): 976-997.
- [10] 柳 雷, 熊常健, 朱岳麟, 等. 蒲公英活性单体的分离及其抗癌活性研究 [J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2015, 4(6): 78-83.
- [11] 张东梅, 黄 欣, 闫春雷, 等. 实验性肝损伤模型的研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(22): 1871-1873.
- [12] Nelson S D. Mechanisms of the formation and disposition of reactive metabolites that can cause acute liver injury [J]. *Drug Metab Rev*, 1995, 27(1/2): 147-177.
- [13] Pumford N R, Halmes N C, Hinson J A. Covalent binding of xenobiotics to specific proteins in the liver [J]. *Drug Metab Rev*, 1997, 10(5): 6675-6683.