

· 药理与临床 ·

灯盏乙素拮抗硒对人肝细胞 L-02 毒性的研究

王 红, 刘 琼, Ali Abdella, 徐辉碧

(华中科技大学 化学系药物研究所, 湖北 武汉 430074)

摘要:目的 研究灯盏乙素拮抗硒对人肝细胞株 L-02 毒性作用。方法 采用噻唑蓝 (MTT) 法研究灯盏乙素和硒对 L-02 细胞生长的作用; 倒置荧光显微镜观察细胞形态变化; 测定丙二醛 (MDA)、巯基含量和总抗氧化能力等氧化还原相关生化指标。结果 0.5 mmol/L 灯盏乙素与细胞作用 48 h 时达到促细胞生长最佳条件, 且可以显著拮抗 1, 5 $\mu\text{mol/L}$ 硒对 L-02 细胞生长的抑制作用; 灯盏乙素和硒共同处理的细胞与仅用硒处理的细胞相比, 细胞损伤程度明显减轻, MDA 含量显著降低, 巯基含量及体系抗氧化能力均显著增高。结论 灯盏乙素通过抗脂质过氧化和提高细胞抗氧化能力拮抗硒对 L-02 细胞的毒性。

关键词: 灯盏乙素; 硒; 人肝细胞 L-02; 脂质过氧化

中图分类号: R 285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)04-0413-03

Antagonistic effect of scutellarin on toxicity of selenium in human liver cells L-02

WANG Hong, LIU Qiong, ALI Abdella, XU Hui-bi

(Institute of Pharmacy, Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: **Object** To investigate the antagonistic effect of scutellarin on the toxicity of selenium in human liver cells L-02. **Methods** MTT method was used to observe the effects of scutellarin and selenium on cell growth. The morphological changes of cells were observed by fluorescent microscope. The MDA level, thiol content, and total antioxidative capacity of cells were also measured. **Results** The optimum condition for scutellarin to promote cell growth was 0.5 mmol/L in 48 h culture period. Comparing with the only selenium treated group, 0.5 mmol/L scutellarin significantly antagonized the inhibition of cell growth caused by 1 and 5 $\mu\text{mol/L}$ selenium, suppressed the selenium-induced cell damage and the increase of MDA content, as well as increased the thiol content and cell antioxidation capacity. **Conclusion** Scutellarin markedly antagonizes the toxicity of selenium in human liver cells L-02 by inhibiting lipid peroxidation and promoting cellular antioxidation capacity.

Key words: scutellarin; selenium; human liver cells L-02; lipid peroxidation

硒 (Se) 是人体必需的微量元素, 具有重要的生物功能。研究表明硒的浓度过高会使机体中毒^[1]。硒造成细胞毒性的一个重要原因是催化细胞内的巯基发生氧化还原反应产生活性氧 (ROS), 过量 ROS 在体内积累导致细胞抗氧化能力降低, 进而引起细胞损伤^[2]。灯盏乙素是从菊科植物灯盏全草中分离的黄酮成分, 环上有酚羟基, 具有一定的还原性, 可清除 ROS^[3,4]。本实验以人正常肝细胞 L-02 为研究对象, 从细胞生长、形态学变化和氧化还原能力的角度, 观察灯盏乙素对硒的细胞毒性的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器: 灯盏乙素, 云南玉溪药业公司, 含量 > 96%, 用稀 NaOH 溶液溶解。分析纯 Na_2SeO_3 ,

天津化学试剂研究所。RPMI-1640 干粉、新生小牛血清、胰蛋白酶、MTT、吖啶橙 (AO) 均为 Gibco 产品。丙二醛 (MDA)、巯基及总抗氧化能力测试盒购自南京建成生物工程研究所。倒置荧光显微镜为日本产 Olympus IX-70。UV-7500 紫外可见分光光度计, 上海天美科学仪器有限公司。

1.2 细胞培养: 人正常肝细胞株 L-02 购自中国典型培养物保藏中心 (武汉)。细胞用含 10% 新生小牛血清、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素和 0.25 U/mL 胰岛素的 RPMI-1640 完全培养液于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中进行培养。

1.3 灯盏乙素浓度和作用时间的选择: 取生长状态良好的 L-02 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化制成细

收稿日期: 2003-07-12

基金项目: 教育部优秀青年教师资助计划项目 (教人师 2002 No. 40)

作者简介: 王 红 (1978—), 女, 山东德州人, 华中科技大学化学系药物研究所硕士研究生。

* 通讯作者 Tel: (027) 87543532 Fax: (027) 87543632 E-mail: Qiongliu_hust@163.com

胞悬液,接种于 24 孔细胞培养板中。常规培养 24 h 后,弃去培养基,加入新鲜培养基,细胞分为:正常对照组:加入完全培养基;灯盏乙素组:每组加入灯盏乙素,使其终浓度分别为 0.3, 0.5 和 0.7 mmol/L。每组均为 3 孔。加药后分别培养 24, 48, 72 h, 通过 MTT 染色,在 UV—7500 紫外可见分光光度计上于 570 nm 波长处测定各孔的吸光度 (A_{570}) 值,观察细胞的生长状况^[5]。

1.4 灯盏乙素和硒对细胞生长的影响:按 1.3 项方法培养细胞并加入灯盏乙素和 Na_2SeO_3 。细胞分为正常对照组:加入完全培养基;硒组:加入 Na_2SeO_3 溶液,使硒的终浓度分别为 1, 5 $\mu\text{mol/L}$;灯盏乙素组:加入灯盏乙素,使其终浓度为 0.5 mmol/L;硒+灯盏乙素组:每组加入 Na_2SeO_3 溶液和灯盏乙素,使硒的终浓度分别为 1, 5 $\mu\text{mol/L}$,灯盏乙素终浓度为 0.5 mmol/L。加药后分别培养 24, 48, 72 h 后,采用 MTT 法检测细胞生长状况^[5]。

1.5 细胞形态学观察:细胞培养及分组同 1.4 项方法,加药培养 48 h 后,倒置显微镜下观察并用成像系统拍照。然后吸出孔内液体,PBS 洗 2 遍,5 mg/L AO 染色 20 min 后,荧光显微镜下观察并拍照。

1.6 生化指标的测定:将细胞接种于 100 cm^2 的培养盘中,按 1.4 项方法分组,加药培养 48 h 后,将细胞刮下并悬于冷 PBS 中。将细胞置于 -80 低温冰箱和 37 水浴中,反复冻融 4 次,4 000 r/min 离心 10 min 后,吸出上清液用于测定生化指标。蛋白质含量采用考马斯亮蓝 G-250 法测定,以牛血清白蛋白作标准^[6]。MDA 含量、巯基含量和体系总抗氧化能力的测定按试剂盒要求,采用比色法,分别于 532, 412 及 520 nm 波长处测定。

1.7 数据处理:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验。

2 结果

2.1 灯盏乙素浓度及作用时间的选择:结果见表 1, MTT 比色法显示:与对照组相比,0.3, 0.5

mmol/L 灯盏乙素组的 A_{570} 值均增加,且以 0.5 mmol/L 时最为明显,说明在该浓度范围灯盏乙素促进细胞生长;而当灯盏乙素浓度为 0.7 mmol/L 时 A_{570} 值低于对照组,说明该浓度灯盏乙素对细胞生长已表现出抑制作用。从作用时间来看,加药培养 48 h 后灯盏乙素对细胞生长的促进效果最明显。因此,选择 0.5 mmol/L 灯盏乙素进行下面实验。

表 1 灯盏乙素对 L-02 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of scutellarin on L-02 cell growth ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	终浓度 (mmol · L ⁻¹)	A_{570}		
		24 h	48 h	72 h
对照	-	0.336 ± 0.004	0.356 ± 0.008	0.245 ± 0.014
灯盏乙素	0.3	0.338 ± 0.020	0.363 ± 0.010	0.250 ± 0.013
	0.5	0.402 ± 0.012	0.409 ± 0.018	0.254 ± 0.010
	0.7	0.302 ± 0.005	0.310 ± 0.011	0.210 ± 0.002

2.2 灯盏乙素和硒对细胞生长的影响:见表 2。MTT 法显示:与对照组相比,加 1, 5 $\mu\text{mol/L}$ 硒组的细胞 A_{570} 值显著降低,且呈浓度依赖性,表明此浓度范围的硒抑制 L-02 细胞生长;而硒+灯盏乙素组细胞 A_{570} 比对照组低,但显著高于硒组细胞,表明灯盏乙素可以拮抗硒的毒性,促进细胞生长。

2.3 细胞形态学观察:由荧光显微镜照片可观察到,对照组和灯盏乙素组的细胞饱满,胞膜光滑,荧光发光均匀;加 1, 5 $\mu\text{mol/L}$ 硒时,细胞形状变得不规则,发光不均匀,且浓度越大,现象越明显;而硒+灯盏乙素组的细胞与仅加同浓度硒的细胞相比,细胞发光均匀,损伤程度减轻。由倒置光镜照片可观察到,对照组与灯盏乙素组的细胞饱满完整;加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 硒,细胞变形,出现发泡现象;而当硒的浓度达到 5 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞体积肿胀,有碎片出现;硒+灯盏乙素组细胞的损伤程度明显减轻。结果说明灯盏乙素能有效地拮抗硒对 L-02 细胞的毒性作用。

2.4 生化指标的测定

2.4.1 MDA 含量测定:由表 3 可知,与对照组相

表 2 灯盏乙素和硒对 L-02 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of scutellarin and selenium on L-02 cell growth ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	终浓度		A_{570}		
	硒 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	灯盏乙素/(mmol · L ⁻¹)	24 h	48 h	72 h
对照	-	-	0.310 ± 0.008	0.378 ± 0.009	0.363 ± 0.003
硒	1	-	0.266 ± 0.012*	0.289 ± 0.012**	0.269 ± 0.007**
	5	-	0.109 ± 0.004*	0.156 ± 0.011**	0.140 ± 0.015**
灯盏乙素	-	0.5	0.311 ± 0.006	0.379 ± 0.011	0.357 ± 0.010
硒+灯盏乙素	1	0.5	0.297 ± 0.008*	0.316 ± 0.007**	0.308 ± 0.007**
	5	0.5	0.177 ± 0.006**	0.219 ± 0.008**	0.215 ± 0.009**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 1 $\mu\text{mol/L}$ 硒组比较: $P < 0.05$ $P < 0.01$; 与 5 $\mu\text{mol/L}$ 硒组比较: $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; $P < 0.05$ $P < 0.01$ vs 1 $\mu\text{mol/L}$ Se group; $P < 0.01$ vs 5 $\mu\text{mol/L}$ Se group

比, 灯盏乙素组细胞内 MDA 含量显著降低, 表明 0.5 mmol/L 灯盏乙素具有抗氧化、降低细胞脂质过氧化能力; 1 $\mu\text{mol/L}$ 硒组细胞内 MDA 含量与对照组相比差异不显著, 表明该浓度硒不引起细胞脂质过氧化水平的改变; 而硒 (1 $\mu\text{mol/L}$) + 灯盏乙素组细胞内 MDA 含量显著低于对照组和仅加同浓度硒组; 当硒浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞内 MDA 含量显著高于对照组, 说明此浓度硒促进细胞脂质过氧化; 而硒 (5 $\mu\text{mol/L}$) + 灯盏乙素组细胞内 MDA 含量显著低于对照组和仅加同浓度硒组。结果表明, 对 L-02 细胞补充适量硒 (1 $\mu\text{mol/L}$) 不造成细胞脂质

表 3 灯盏乙素和硒对 L-02 细胞 MDA 含量、巯基含量和总抗氧化能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effects of scutellarin and selenium on MDA content, thiol content and total antioxidation capacity of L-02 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	终浓度		MDA /($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$)	巯基 /($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$)	总抗氧化能力 /($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)
	硒/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	灯盏乙素/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)			
对照	-	-	1.81 \pm 0.11	0.184 \pm 0.026	2.76 \pm 0.04
硒	1	-	1.86 \pm 0.15	0.178 \pm 0.015	2.35 \pm 0.27
	5	-	3.95 \pm 1.13*	0.090 \pm 0.023*	1.09 \pm 0.47*
灯盏乙素	-	0.5	0.66 \pm 0.09* *	0.195 \pm 0.002	2.95 \pm 0.21
硒+ 灯盏乙素	1	0.5	0.92 \pm 0.06* *	0.182 \pm 0.021	2.78 \pm 0.09
	5	0.5	1.38 \pm 0.23* *	0.139 \pm 0.003*	2.12 \pm 0.16*

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 1 $\mu\text{mol/L}$ 硒组比较: $P < 0.01$; 与 5 $\mu\text{mol/L}$ 硒组比较: $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; $P < 0.01$ vs 1 $\mu\text{mol/L}$ Se group; $P < 0.05$ vs 5 $\mu\text{mol/L}$ Se group

3 讨论

本实验以人正常肝细胞 L-02 作为研究对象, 通过 MTT 比色法研究灯盏乙素和硒对细胞生长的影响, 发现 1, 5 $\mu\text{mol/L}$ 硒组与对照组相比, 细胞生长均受到明显抑制; 细胞形态学表明, 1, 5 $\mu\text{mol/L}$ 硒可造成显著性细胞损伤, 这可能是细胞生长受抑制的原因。对其机制进行研究, 发现 5 $\mu\text{mol/L}$ 硒显著性促进细胞脂质过氧化水平, 降低细胞巯基含量和总抗氧化能力, 这说明过量硒致 L-02 细胞毒性的机制之一为促进细胞发生氧化应激。已有报道, 硒造成细胞毒性的一个重要原因是催化细胞内的巯基发生氧化还原反应产生 ROS, 过量 ROS 在体内的积累导致细胞抗氧化能力降低, 进而引起细胞膜磷脂、DNA 和蛋白质等生物大分子损伤^[2]。本实验通过 L-02 细胞模型进一步证实了这一结论。

本实验结果表明, 0.5 mmol/L 灯盏乙素能显著性促进 L-02 细胞生长, 降低细胞脂质过氧化水平, 并使细胞中巯基含量和总抗氧化能力略有升高。同时, 灯盏乙素能显著逆转过量硒对 L-02 细胞的生长抑制及损伤, 降低由过量硒所致升高的细胞脂质过氧化水平, 并能显著性阻止 5 $\mu\text{mol/L}$ 硒引起的细胞的巯基含量和总抗氧化能力的降低。这说明

过氧化, 而补充过量硒 (5 $\mu\text{mol/L}$) 则促进细胞过氧化。灯盏乙素具有抗氧化作用, 能降低细胞脂质过氧化水平, 并拮抗过量硒所致细胞脂质过氧化损伤。

2.4.2 巯基含量和总抗氧化能力的测定: 由表 3 可见, 1 $\mu\text{mol/L}$ 硒组细胞的巯基含量和总抗氧化能力无显著性变化, 而 5 $\mu\text{mol/L}$ 硒则显著降低细胞内巯基含量和总抗氧化能力; 在硒此浓度下加入 0.5 mmol/L 灯盏乙素, 细胞内巯基含量和总抗氧化能力尽管仍低于对照组, 但却显著高于仅加同浓度硒组, 说明灯盏乙素可以提高细胞抗氧化能力, 拮抗过量硒所致的细胞抗氧化能力的降低。

灯盏乙素通过抗氧化机制保护细胞免受过量硒引起的氧化损伤, 从而达到减轻硒毒性的目的。

硒具有预防癌症及其他多种疾病的功能。然而, 过量补硒或长期大剂量补硒所致的过量硒积累都会造成硒中毒。研究表明, 灯盏乙素作为黄酮类的一种物质通过抗氧化机制拮抗过量硒的毒性。提示其他黄酮类物质也可能在拮抗硒毒性方面发挥作用。

致谢: 华中科技大学药物研究所杨祥良教授和生命科学院徐涛教授提供药物及仪器使用。

References:

- [1] Gabor S, Ciugudenu M, Surcel D. Effect of selenium on quartz-induced cytotoxicity in macrophage [J]. *Environ Res*, 1985, 37(3): 292-299.
- [2] Kramer G F, Ames B N. Mechanisms of mutagenicity and toxicity of sodium selenite (Na_2SeO_3) in *Salmonella typhimurium* [J]. *Mutat Res*, 1988, 201(3): 169-180.
- [3] Mora A, Paya M, Rios J I, et al. Structure activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymatic lipid peroxidation [J]. *Biochem Pharmacol*, 1993, 45(4): 429-437.
- [4] Ali A, Gan L, Liu Q, et al. Antioxidant effect of scutellarin and its antagonistic action on the liver toxicity of Se in rats [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2003, 19(1): 113-115.
- [5] Shen H E, Ong C N, Shi C Y. Involvement of reactive oxygen species in aflatoxin B₁-induced cell injury rat hepatocyte [J]. *Toxicol*, 1995, 99(1-2): 115-123.
- [6] Sedamak J J, Grossberg S E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250 [J]. *Anal Biochem*, 1977, 79(2): 544-552.