

基于高内涵筛选技术的麦冬硫熏前后肝毒性比较研究

王喻淇¹, 尚展鹏¹, 刘子菡¹, 梅晓丹¹, 赵文靖¹, 王志斌², 刘珍清^{2*}, 张加余^{2,3*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

2. 北京中医药大学北京中医药研究院, 北京 100029

3. 滨州医学院药学院, 山东 烟台 264003

摘要: 目的 应用高内涵筛选技术 (high content screening, HCS) 对硫熏麦冬的肝毒性进行研究。方法 以人肝癌细胞系 HepG2 细胞为载体, 分别设置阳性对照药 (噻氯吡啶)、阴性对照药 (阿司匹林)、麦冬提取物、硫熏麦冬提取物组, 利用 HCS 技术测定并分析不同药物的细胞数目、DNA 含量、谷胱甘肽 (GSH) 降低水平、活性氧 (ROS) 含量和线粒体膜电位 (MMP)。结果 与麦冬提取物组细胞相比, 硫熏麦冬提取物组从 50 mg/mL 开始, GSH 降低水平超过肝毒性的阈值; 从 12.5 mg/mL 开始, 硫熏麦冬提取物组细胞 MMP 的改变也超过毒性阈值。结论 麦冬硫熏后表现出潜在的肝毒性, 由其对 MMP 的影响推测硫熏致肝毒性可能与线粒体介导的细胞凋亡有关。

关键词: 麦冬; 硫熏; 高内涵筛选技术; 肝毒性; 谷胱甘肽; 活性氧; 线粒体膜电位

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)18-4372-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.18.016

Hepatotoxicity study of sulfur-fumigated *Ophiopogonis Radix* using high content screening

WANG Yu-qi¹, SHANG Zhan-peng¹, LIU Zi-han¹, MEI Xiao-dan¹, ZHAO Wen-jing¹, WANG Zhi-bin²,
LIU Zhen-qing², ZHANG Jia-yu^{2,3}

1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Beijing Institution of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

3. Pharmacy Department, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

Abstract: Objective An efficient method was established using high content screening (HCS) for the hepatotoxicity evaluation of sulfur-fumigated *Ophiopogonis Radix*. **Methods** Cytotoxicity of positive control group, negative control group, *Ophiopogonis Radix* extracts group and sulfur-fumigated *Ophiopogonis Radix* extracts group were tested based on HepG2 human hepatoma cells. HCS was applied to detect the cell number, DNA content, level of glutathione (GSH), reactive oxygen species (ROS), and mitochondrial membrane potential (MMP). **Results** Compared with the cells of *Ophiopogonis Radix* extracts group, GSH of sulfur-fumigated *Ophiopogonis Radix* extracts decreased significantly at the concentration of 50 mg/mL; The MMP of sulfur-fumigated *Ophiopogonis Radix* extracts changed signally at the concentration of 12.5 mg/mL. **Conclusion** *Ophiopogonis Radix* showed potential cytotoxicity after sulfur-fumigated. The hepatotoxicity of sulfur-fumigated *Ophiopogonis Radix* may be related to mitochondria-mediated apoptosis according to the influence of its MMP from the results.

Key words: *Ophiopogon japonicus* (L. f) Ker -Gawl.; sulfur-fumigation; high content screening; hepatotoxicity; glutathione; active oxygen; mitochondrial membrane potential

麦冬为百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f) Ker -Gawl. 的干燥块根, 始载于《神农本草经》, 被列为上品^[1-2]。其味甘、微苦, 性微寒, 归心、

肺、胃经, 具有养阴润肺、益胃生津、清心除烦等功效^[3-5]。麦冬含有甾体皂苷、高异黄酮和多糖等活性成分, 对心血管系统具有很好的保护作用, 同时

收稿日期: 2019-04-20

基金项目: 2017 年北京市科技新星与领军人才培养专项 (Z171100001117029); 2018 北京中医药大学杰出青年人才项目 (2018-JYB-XJQ008); 2019 北京中医药大学创新创业项目 (2019-JYB-XSCXCX-06)

作者简介: 王喻淇, 硕士研究生, 主要从事中药分析工作。E-mail: wyqi1994@163.com

*通信作者 张加余, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事中药质量控制及体内代谢研究。Tel: (010)64287540 E-mail: zhangjiayu0615@163.com
刘珍清, 高级实验师, 主要从事中药学研究。Tel: (010)64287540 E-mail: lzq9876@sina.com

具有抗肿瘤、抗氧化、免疫调节、降血糖、调血脂等作用^[6-8]。在麦冬药材的产地加工过程中,常采用硫磺熏蒸(硫熏)的方法以达到干燥、漂白、杀菌防腐、改善外观、易于储存的目的^[9]。现代研究表明,硫熏会影响麦冬固有化学成分的含量,并伴有新的含硫衍生物产生,从而导致性状、化学成分等发生变化^[10-11],由此可能会伴随着毒性的出现^[12-13]。

高内涵筛选技术(high content screening, HCS)是一种基于荧光显微成像的自动化技术,因其具有高通量、快速、动态、自动地获取细胞成像并进行量化分析等优点,被广泛用于药物生物活性和潜在毒性筛选。HCS 可同时对细胞数目、DNA 水平、谷胱甘肽(GSH)水平、活性氧(ROS)水平和线粒体膜电位(MMP)5个指标进行分析测定,从不同方面研究中药毒性作用,从而提高对中药毒性预测的准确性^[14-16]。本研究以人源肝癌细胞系 HepG2 细胞为载体,采用 HCS 技术进行检测,通过比对受试药反应值与毒性阈值的关系,初步明确麦冬硫熏后可能产生的肝毒性风险。

1 材料

1.1 细胞系

人肝癌细胞株 HepG2 细胞购自中国细胞库(上海),置于细胞库中 -80°C 保存。

1.2 药物与试剂

麦冬药材和硫磺均购于北京同仁堂药店,麦冬药材经北京中医药大学中药学院张媛副教授鉴定为百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f) Ker-Gawl. 的干燥块根,产地为四川;阴性对照药阿司匹林(Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司,批号 00209);阳性对照药噻氯吡啶(Sigma 公司,批号 101296953);高内涵肝毒性试剂盒(Thermo Scientific Cellomics 公司);I 型胶原蛋白包被的 96 孔细胞培养板(BD BioCoatTM 公司);DMEM 培养基(Gibco 公司);胰蛋白酶(Amresco 公司);二甲基亚砜(DMSO,上海嵘威达实业有限公司);MTT 试剂(Amresco 公司);0.4%台盼蓝溶液(Invitrogen 公司);标准胎牛血清(FBS)购自天津市灏洋生物制品科技有限公司;NaCl、KCl 以及 95%乙醇购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 仪器

BSC-1360 B2 生物安全柜(Thermo Scientific Cellomics 公司);OLYMPUS 1X71 生物显微镜(Olympus 公司);BS224S 赛多利斯天平(Sartorius

公司);NAPCO 6500 型 CO_2 培养箱(Heal Force 公司);Invitrogen 全自动细胞计数仪(Invitrogen 公司);Spectra Max 190 酶标仪(Molecular Devices 公司);SN510C 立式压力蒸汽灭菌器(Yamato 公司);高内涵技术分析平台(Thermo Scientific Cellomics 公司)。

2 方法

2.1 硫熏麦冬药材的制备及药物配制

2.1.1 硫熏麦冬药材的制备 取 1 kg 麦冬药材,用 1 L 水浸润 0.5 h,点燃 100 g 置于干燥器底部的硫磺,浸润后的药材置于干燥器隔板上层,密闭硫熏 24 h。取出硫熏后药材,置于鼓风干燥箱中 50°C 干燥 24 h,即得干燥的硫熏麦冬药材。

2.1.2 供试药液的制备 分别取硫熏麦冬和麦冬药材 500 g,加入 10 倍体积的水煎煮 2 h,滤过,残渣继续用 10 倍体积水煎煮 1.5 h,滤过,合并 2 次提取液,减压浓缩至 500 mL,使其生药质量浓度为 1 g/mL, -20°C 保存,备用。取 2 种药材提取液,在无菌 Ep 管内,用不含血清 DMEM 培养液依次向下按 0.50 剂间比稀释成 100.00、50.00、25.00、12.50、6.25、3.125、1.562 5、0.781 25 mg/mL 共 8 个质量浓度的药物稀释液,供高内涵肝毒性筛选实验用。

2.1.3 阴性对照药与阳性对照药的配制 依据 Thermo 公司的 Drug Induced liver Injury Assay Cartridge 指导说明,阴性对照药阿司匹林的最大血药浓度(C_{max})为 $0.995\text{ }\mu\text{g/mL}$;阳性对照药噻氯吡啶的 C_{max} 为 $2.13\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。将阿司匹林和噻氯吡啶分别制成 200 倍 C_{max} ,并依次向下完成倍比稀释,配制成质量浓度分别为 100 C_{max} 、50 C_{max} 、25 C_{max} 、12.5 C_{max} 、6.25 C_{max} 、3.13 C_{max} 、1.56 C_{max} 的稀释液。

2.1.4 染料的配制 取高内涵肝毒性试剂盒中的 mBCL dye 试剂加入 220 μL DMSO;ROS dye 试剂加入 20 μL DMSO;Mito dye 试剂加入 50 μL DMSO,置于 -20°C 冰箱中。将 500 μL 已预热的 DMEM 培养基加入到 Ep 管中,分别加入 10 μL mBCL 染液、5 μL ROS 染液、3 μL Hoechst 33342 试剂和 4 μL Mito 染液,涡旋 2 min,混匀后,加入到 8 mL 已预热至 37°C 的 DMEM 未完全培养基中,即得。

2.2 HCS 检测

2.2.1 HepG2 细胞的铺板与加样 将 HepG2 细胞用 DMEM 完全培养基(含有 100 $\mu\text{L/mL}$ 的青霉素和 15% FBS)于 37°C 、5% CO_2 条件下进行培养、传代等。将处于对数生长期的 HepG2 细胞用 0.25%胰蛋白酶消化,取 10 μL 细胞混悬液于 Ep 管

中,加入 10 μL 0.4% 台盼蓝溶液,混匀。取 10 μL 混合液加入到计数板中,用全自动细胞计数仪计数。取密度为 2×10^5 个/mL 的 HepG2 细胞悬浮液,以 100 μL /孔接种到 96 孔细胞培养板中,置于细胞培养箱中培养 24 h; 弃去原培养液,每孔分别加入含不同药物(麦冬提取物、硫熏麦冬提取物、阳性对照药和阴性对照药)的 DMEM 培养基 100 μL , 每个药物设置 8 个质量浓度,3 个平行孔,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境中继续培养 24 h。

2.2.2 染色 细胞与药液共同孵育 24 h 后,弃去 96 孔板中的原培养液,将事先配好的染液按 100 μL /孔加入到培养板内,继续孵育 45 min。吸净 96 孔板孔内的液体,用 100 μL PBS 溶液清洗后再加入 100 μL PBS 溶液,上机检测。

2.2.3 图像采集与分析 采用 ToxInsight IVT 平台采集图像,20 倍物镜,每孔采集视野的图像个数为 16 个,存储记录信息用作图像分析。采集条件如下:第 1 通道检测由 Hoechst 33342 染色、标记的细胞核 DNA,计算细胞数目,检测波长为 360 nm 和 460 nm;第 2 通道检测由 mBCI 染色、标记的 GSH,检测波长为 380、461 nm;第 3 通道检测由 ROS Dye 染色、标记的 ROS,检测波长为 504、529 nm;第 4 通道检测由 Mito Dye 染色、标记的 MMP,检测波长为 584、606 nm。将采集的细胞相关图像导入分析平台,自动对图像中的荧光强度进行分析。细胞数目:第 1 通道细胞核内的荧光数目;DNA 含量:第 1 通道细胞核内的荧光强度;GSH 降低水平:第 2 通道细胞质中的荧光强度;

ROS 含量:第 3 通道细胞中的荧光强度;MMP:第 4 通道细胞质与细胞核中的荧光强度的差值。

2.2.4 肝毒性预测 将 ToxInsight IVT 平台分析的数据导入到 DILI Assay Template 中进行运算,结果以细胞数量、DNA 含量、GSH 降低水平、ROS 含量和 MMP 改变等参数形式表示。

3 结果

3.1 阴性对照药与阳性对照药的分析结果

如图 1 所示,阳性对照药噻氯吡啶组的细胞数目、DNA 含量、GSH 降低水平、ROS 含量以及 MMP 改变 5 个指标的检测结果显示,其在 1.56~200 倍 C_{max} 质量浓度范围内,可抑制 HepG2 细胞增殖,影响细胞中 DNA 含量,降低 GSH 水平,诱导 ROS 过度产生,并改变 MMP。这表明噻氯吡啶对 HepG2 细胞有明显的毒性作用。阴性对照药阿司匹林的细胞数目、DNA 含量、GSH 降低水平、ROS 含量及 MMP 改变 5 个指标检测结果均为阴性,说明阿司匹林对 HepG2 细胞无明显毒性作用。由此可见,本实验中采用的阳性对照药和阴性对照药得出的结果与预期相同,说明测定方法可靠。

3.2 硫熏麦冬提取物与麦冬提取物的高内涵肝毒性分析

硫熏麦冬提取物与麦冬提取物选取 100 mg/mL 为最高质量浓度,依次向下倍比稀释,所测结果如图 2 所示。麦冬提取物在细胞数目、DNA 含量、ROS 含量、GSH 水平及 MMP 改变 5 个方面的检测结果均为阴性;而硫熏麦冬提取物在 GSH 降低水平及 MMP 改变上超过了毒性阈值。如图 3 所示,

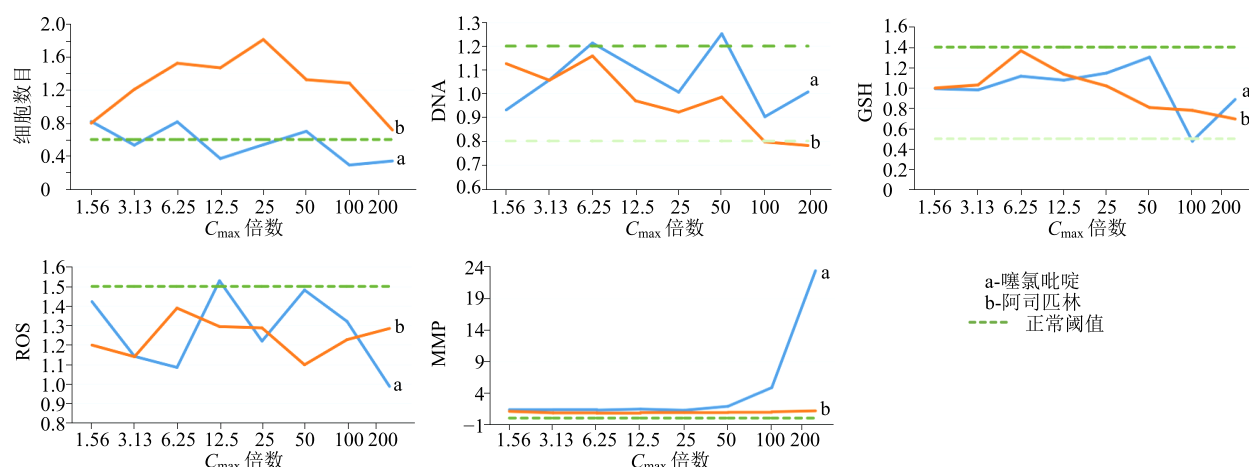


图 1 阿司匹林和噻氯吡啶对 HepG2 细胞数目、DNA 含量、GSH 降低水平、ROS 含量和 MMP 改变的影响 ($n = 3$)

Fig. 1 Influence of aspirin and ticlopidine on cell number, DNA number, GSH levels, ROS content, and MMP of HepG2 cells ($n = 3$)

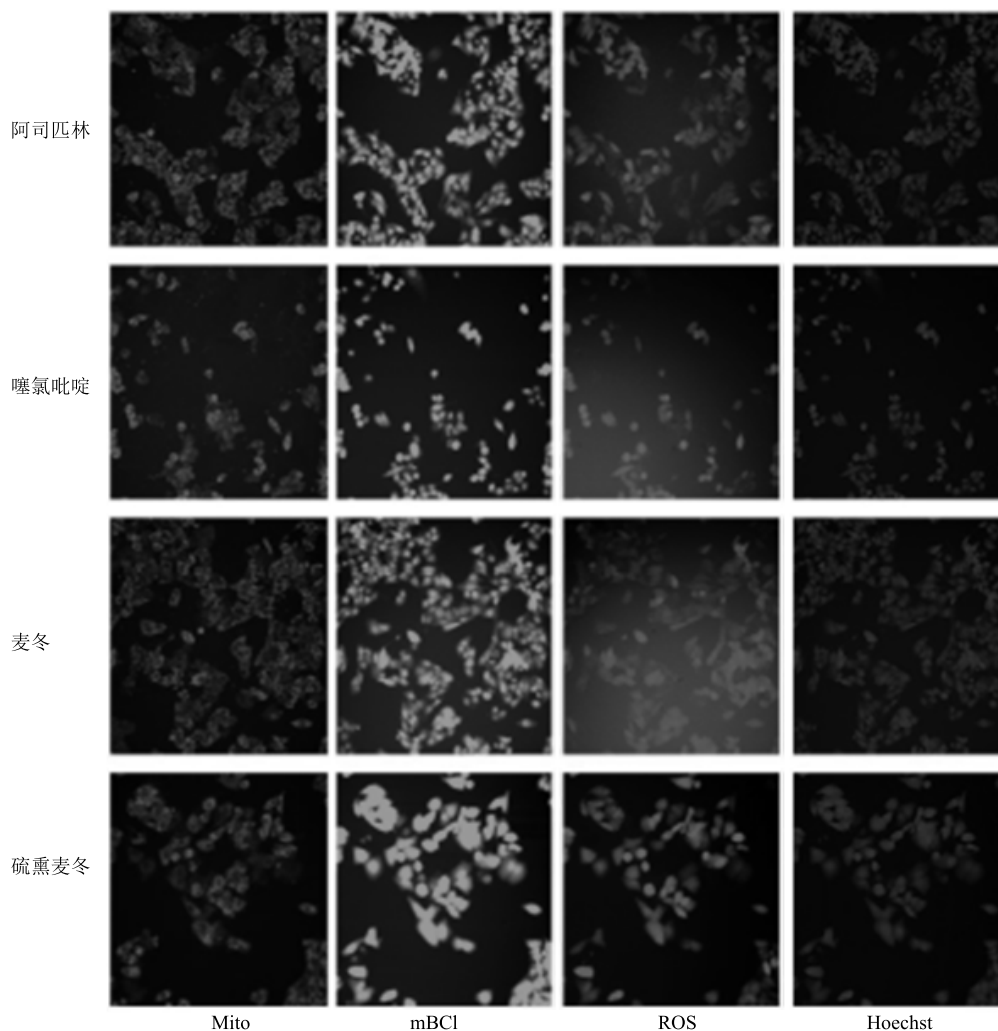


图 2 高内涵分析技术在不同波长下采集的图像 (×20)

Fig. 2 Representative images of drugs obtained at different wavelength by HCS assay (× 20)

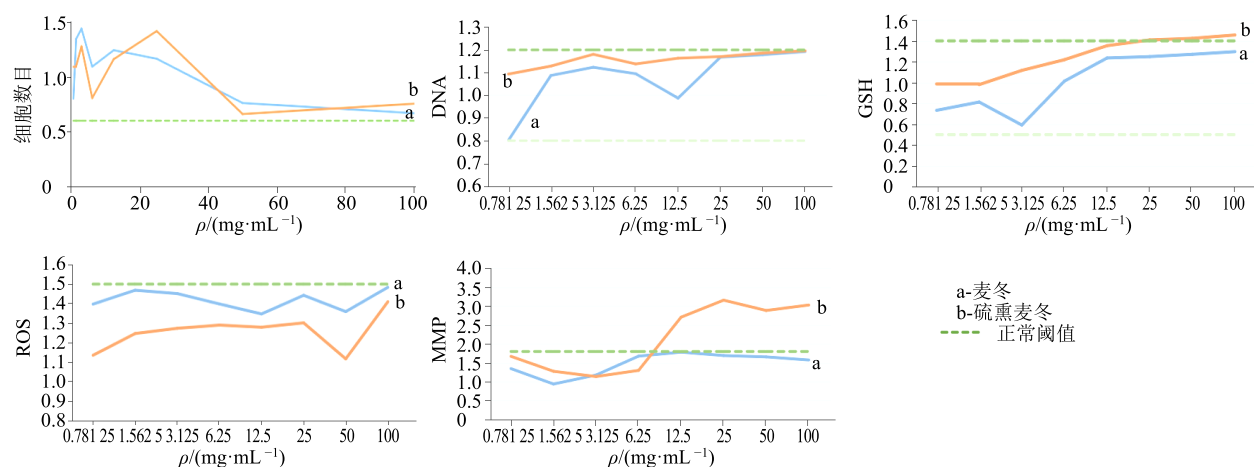


图 3 麦冬及硫熏麦冬作用于 HepG2 细胞时对细胞数目、DNA 含量、GSH 降低水平、ROS 含量和 MMP 改变的影响 ($n = 3$)

Fig. 3 Influence of *Ophiopogon Radix* and sulfur-fumigated *Ophiopogon Radix* on cell number, DNA number, GSH levels, ROS content, and MMP of HepG2 cells ($n = 3$)

在 GSH 降低水平上, 硫熏麦冬提取物从 50.00 mg/mL 开始, GSH 降低水平逐渐超过了肝毒性阈值; 随着硫熏麦冬提取物质量浓度的增加, GSH 降低水平也逐渐提高。由 MMP 的改变量可以看到, 硫熏麦冬提取物从 12.50 mg/mL 开始超过了毒性阈值。由此可见, 相同的质量浓度下, 麦冬提取物对 HepG2 细胞并未表现出明显的肝毒性, 而硫熏麦冬提取物由于降低了细胞内 GSH 的含量, 改变了细胞能量代谢水平, 表现出了潜在的肝毒性。

4 讨论

HCS 是近年来发展起来的一种高通量、直观动态监测筛选, 其不再是在分子水平针对单一靶标进行的筛选, 而是在细胞水平针对生物体内多系统、多途径、多种靶标进行的实时动态筛选。因此, HCS 技术可以获得被筛样品对细胞产生的多维立体和实时快速的生物效应信息, 从而为药物毒理学研究提供高效的使用工具。近年内 HSC 常被用来评价中药的药效和毒性^[17-18]。

GSH 是由甘氨酸、谷氨酸以及半胱氨酸组成的三肽类化合物, 是大多数需氧生物体内主要的非蛋白巯基化合物, 可在所有器官、组织、细胞内生成, 尤其以肝脏的生成最为重要^[19]。GSH 主要的生理功能包括氨基酸的转运, 蛋白、核酸的合成, 抗氧化作用及亲电子异生化作用, 以维持酶的活性状态, 即: 发挥抗氧化和解毒的作用^[20]。肝脏中 GSH 的储备, 可保护肝脏组织免受应激状态下的氧化损伤。在硫熏麦冬组的给药细胞中, GSH 水平下降, 致使细胞更易遭受氧化应激损伤, 并使细胞的解毒功能减弱。

细胞数量与细胞存活率直接相关, 是药物毒性检测中最重要、最灵敏的指标之一, 对考察药物毒性具有重要作用。线粒体作为细胞能量代谢中心, 是介导细胞凋亡的重要细胞器。现代研究表明, 线粒体在呼吸氧化的过程中形成的 MMP 是维持线粒体功能和结构的根本, 它的异常会造成线粒体膜发生一系列的功能和状态的变化, 对线粒体造成功能性损伤, 进而使细胞发生凋亡^[21]。硫熏麦冬提取物改变了 HepG2 细胞中的 MMP 水平, 导致细胞形态和数目发生改变, 进而提高细胞发生氧化应激损伤的可能性; 同时影响细胞内能量供应, 且更易诱导细胞发生凋亡。

综上所述, 麦冬对 HepG2 细胞并未表现出肝

毒性; 硫熏麦冬提取物对 HepG2 细胞活力产生明显抑制作用, 通过改变细胞内 GSH 含量, 导致 MMP 异常, 最终导致细胞凋亡, 具有潜在的肝毒性。本研究所采用的 HCS 技术灵敏稳定, 简便可行, 能够实现药物多种生物活性、毒性的早期、快速检测, 能够为中药体外肝毒性的安全风险评估提供依据。本研究结果同时表明, 当前《中国药典》对硫熏应用的限制是合理的。在中药材前处理过程中, 应综合评价硫磺熏蒸法的利弊, 以确保中药使用的安全性和有效性。

参考文献

- [1] 孙晓媛, 于凡, 肖伟, 等. 麦冬现代应用的研究进展 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(11): 1453-1458.
- [2] 彭婉, 马骁, 王建, 等. 麦冬化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(2): 477-488.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] 赵振彪, 王辉, 刘歌, 等. 麦冬药性与功用考证 [J]. 中医药导报, 2019, 25(5): 82-85.
- [5] 吴万征, 苏薇薇, 王永刚, 等. 麦冬寡糖对自发性 2 型糖尿病 db/db 小鼠降血糖的作用 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2017, 56(6): 128-133.
- [6] 张璐欣, 周学谦, 李德坤, 等. 麦冬多糖的化学组成、分析方法和药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(2): 279-284.
- [7] 王子健, 刘颖, 刘思臻, 等. UPLC-HRMSⁿ 结合高能诱导裂解快速鉴定麦冬中高异黄酮类成分 [J]. 质谱学报, 2016, 37(6): 481-491.
- [8] Fan Y, Ma X, Ma L, et al. Antioxidative and immunological activities of ophiopogon polysaccharide liposome from the root of *Ophiopogon japonicus* [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 135(1): 110-120.
- [9] 谈梦霞, 陈佳丽, 邹立思, 等. 不同干燥方法对麦冬多元活性成分的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(1): 100-109.
- [10] 王菲, 尚展鹏, 马志国, 等. 不同干燥方法对川麦冬甾体皂苷和高异黄酮的影响 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(23): 4393-4399.
- [11] Dai S Y, Shang Z P, Wang F, et al. Novelty application of multi-omics correlation in the discrimination of sulfur-fumigation and non-sulfur-fumigation *Ophiopogonis Radix* [J]. *Sci Rep*, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-10313-1.
- [12] 尚展鹏, 王菲, 王子健, 等. UHPLC-LTQ-Orbitrap 分析硫磺熏蒸麦冬中高异黄酮硫酸酯和亚硫酸酯 [J]. 质谱学报, 2018, 39(2): 180-191.
- [13] 李友连, 朱晶晶, 陈两绵, 等. 硫磺熏蒸对菊花入肠吸

- 收成分影响 [J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(7): 553-559.
- [14] Zanella F, Lorens J B, Link W. High content screening: seeing is believing [J]. *Trends Biotechnol*, 2010, 28(5): 237-245.
- [15] 焦玉菡, 冯 阳, 李海舟. 高内涵筛选在药物肝毒性预测中的应用进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2018, 40(6): 1008-1015.
- [16] 葛 帅, 汤纳平, 付立杰, 等. 毒理学研究的高内涵筛选及其在药物肝毒性研究中的应用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31(6): 689-695.
- [17] 杨文华, 史志龙, 柏兆方, 等. 铁棍山药促进巨噬细胞吞噬细菌的高内涵分析方法研究 [J]. 中草药, 2017, 48(8): 1604-1610.
- [18] 马 喆, 赵琚睿, 董冉冉, 等. 基于高内涵分析技术的何首乌提取物及其主要成分肝毒性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4021-4029.
- [19] Mandal P K, Shukla D, Tripathi M, *et al*. Cognitive improvement with glutathione supplement in Alzheimer's disease: A way forward [J]. *J Alzheimer's Dis*, 2019, 68(2): 531-535.
- [20] 王玮玮, 唐 亮, 周文龙, 等. 谷胱甘肽生物合成及代谢相关酶的研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(7): 89-95.
- [21] Zorova L D, Popkov V A, Plotnikov E J, *et al*. Functional significance of the mitochondrial membrane potential [J]. *Biochem Suppl*, 2018, 12(1): 20-26.