

蒙药古日古木-13含药血清对过氧化氢诱导的人Huh-7细胞损伤的保护作用

吴敏超,李璇,段伟娜,张海峰*

(内蒙古医科大学基础医学院,内蒙古 呼和浩特 010059)

摘要:目的:探讨蒙药古日古木-13含药血清对H₂O₂诱导Huh-7细胞氧化应激损伤的保护作用及其可能机制。方法:40只大鼠随机分5组,分为古日古木-13高、中、低剂量组、阳性对照组及PBS空白组,灌胃7天,于最后一次给药1h后取血,制备含药血清培养基;CCK8法筛选H₂O₂损伤Huh-7细胞最适浓度及古日古木-13含药血清最适剂量浓度和作用时间;HPLC法检测古13含药血清中有效成分;流式细胞仪测细胞凋亡变化;qPCR法检测细胞NF-κB的表达变化;蛋白印迹法检测细胞NF-κB蛋白表达变化。结果:Huh-7细胞半数抑制率为930 mmol/mL;选择中剂量浓度古13含药血清,作为后续作用条件(P<0.05);H₂O₂+10%古13血清组作用Huh-7肝细胞的最适时间为18h;古13含药血清的有效成分是没食子酸及鞣花酸;H₂O₂+10%古13血清组能降低H₂O₂损伤的Huh-7细胞凋亡率,差异有统计学意义(P<0.05);H₂O₂+10%古13血清组细胞NF-κB较H₂O₂+10%空白血清组细胞表达量降低,差异有统计学意义(P<0.05);H₂O₂+10%古13血清组细胞的NF-κB蛋白表达量明显低于H₂O₂+10%空白血清组蛋白表达量,差异有统计学意义(P<0.05)。结论:蒙药古日古木-13含药血清对H₂O₂损伤的Huh-7细胞具有保护作用,其机制可能与NF-κB通路有关。

关键词:蒙药古日古木-13含药血清;H₂O₂诱导的肝细胞损伤模型;NF-κB

中图分类号: R966

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2021)02-0147-05

20世纪80年代末日本学者Hiroko Iwama提出的“血清药理学方法”被认为是中药研究的新突破。“含药血清”是指定时定量给动物服用药物之后,经过一定时间后采血,离心后得到的血清。与其他方法相比,含药血清可以较好地反映复合药物的有效作用成分及作用环境。含药血清因其独特的优势,而被众多科研人员所采用,并进行了深入的探索与研究^[1-2]。氧化应激是由于抗氧化剂系统和活性氧(ROS)生产速率不平衡所引起的。适量水平的ROS在正常细胞生理中很重要,但是过量ROS引起的氧化应激超出生理需要可能会干扰正常过程^[3-5]。氧化应激是多种肝损伤发病的重要机制,氧化应激参与炎症、代谢和纤维化性肝病的过程,并与病毒性肝炎、酒精性肝病、非酒精性脂肪肝、肝纤维化、肝癌所致的肝损伤密切相关^[6]。古日古木-13是一种蒙药传统方剂。由红花、木香、栀子、麝香、麦冬、川楝子、牛黄、诃子、银朱、紫檀香、水牛角、丁香及莲子等十三味药材配制而成。目前,蒙医领域已经广泛应用古日古木-13^[7]。邬国栋、郭叶等人曾

采用HPLC法,以栀子苷为内参物,建立没食子酸、羟基红花黄色素A、鞣花酸、木香炔内酯、去氢木香内酯的相对校正因子,计算古日古木-13样品中该6种成分的含量^[8],但却未曾有人检测蒙药古日古木-13含药血清的有效成分,本研究选用过氧化氢(H₂O₂)诱导Huh-7肝癌细胞氧化应激损伤模型,研究蒙药古日古木-13的抗氧化作用及其保护机制,为深入研究其在多种肝病治疗上的应用提供重要基础数据。

1 实验细胞与实验动物及主要药品

本研究选用实验动物为250g的健康SD大鼠SCXK(蒙)2016-0001,雄性,SPF级,购于内蒙古大学实验动物研究中心。Huh-7人肝癌细胞购于北京北纳创联生物技术有限公司。蒙药古日古木-13(水丸)内蒙古蒙药股份有限公司,硫普罗宁肠溶片上海凯宝新宜药业有限公司,3%过氧化氢试剂Sigma。

收稿日期:2020-10-27;修回日期:2021-01-02

基金项目:内蒙古自治区自然科学基金项目(2020MS08108);内蒙古自治区卫生和计划生育委员会科研计划项目(20171046)

作者简介:吴敏超(1996-),女,内蒙古医科大学基础医学院2018级在读硕士研究生。

通讯作者:张海峰,教授,E-mail:1980zhanghaifeng@163.com 内蒙古医科大学基础医学院,010059

2 实验方法

2.1 H₂O₂致肝癌细胞损伤模型的建立

取对数生长期细胞,细胞数约为 1×10^4 ,均匀细胞悬液至 96 孔板,于培养箱孵育 24 h;加 H₂O₂ 培养 1 h。加 10 μL CCK8 试剂,于培养箱孵育 90 min,测其 OD 值,计算细胞抑制率及 IC₅₀(半数抑制率)^[9,10]。

2.2 蒙药古日古木-13 含药血清及含药血清培养基的制备

将 SD 大鼠 40 只,分为蒙药高、中、低剂量组、PBS 组(PBS + 1%土温 80)。适应性喂养 7 天后灌胃,灌胃前 12 h 禁食。连续灌胃 7 天,于最后一次灌胃后 1 h 心脏取血。离心,滤器过滤,56℃ 灭活。含药血清、双抗、DMEM 基础培养基按 1:0.1:9 比例配置完全培养基。4℃ 冰箱保存。

2.3 蒙药古日古木-13 含药血清最适浓度的选取

将细胞分为空白血清组、H₂O₂ + 空白血清组、H₂O₂ + 阳性血清组、H₂O₂ + 古 13 血清组,均匀接种 96 孔板,37℃、5%CO₂ 培养箱孵育过夜;弃去原培养液,加入 100 μL 含药血清培养基,37℃、5%CO₂ 培养箱孵育 6h、12h、18h、24h。加 H₂O₂,培养箱孵育 1 h。加 10 μL CCK8 试剂,于培养箱孵育 90 min,测其 OD 值。计算细胞增殖率,选取最适浓度组。

2.4 HPLC 法检测血清中有效成分含量

如上述 2.2 步骤制备含药血清,3000 r/min,离心 15 min,吸取血清。取 100 μL 血清加入 300 μL 色谱甲醇,混匀后 12000 r/min 离心 3 min,吸取上清,参考郭国栋、郭叶等人研究^[8],采用 HPLC 法,计算古日古木-13 样品中有效成分。

2.5 Huh-7 细胞凋亡率

接种对数生长期的 Huh-7 细胞于 6 孔板。培养箱孵育至贴壁生长;弃去培养液,加入含药血清培养基,培养箱孵育 18 h。加 H₂O₂ 培养 1 h。吸取 6 孔板内上清,加到 6 个离心管内(终止胰酶作用),PBS 冲洗 6 孔板 3 次,加入胰酶消化 2 min,收集 6 孔板内细胞,标号按顺序加入之前的 6 个离心管内,离心,弃上清。加入 200 μL 结合液,吹打重悬细胞,加入 5 μL FITC 染液,5 μL PI 染液,轻轻混匀。避光孵育 10~20 min,室温放置,等待上机检测。其间每管又加 300 μL 结合液,过 400 目细胞筛于流式上样管中。流式细胞仪上机检测。

2.6 qPCR 法检测 NF-κB 的表达水平

种对数生长期的 Huh-7 细胞于 6 孔板,培养箱

孵育至贴壁生长;弃去培养液,加入含药血清培养基,培养箱孵育 18 h。加过氧化氢,孵育 1 h 后,用 Trizol 提取总 RNA。

表 1 扩增条件

步骤	条件	目的
第一步	95℃ 15min	预变性
第二步	95℃ 10s	变性
第三步	60℃ 20s	退火
第四步	72℃ 30s	延伸
第五步	—	绘制溶解曲线

表 2 引物序列

引物名称	引物名称	下游(5'-3')
NF-κB	AATTGCCCGGCAT	TCCCCTAACCGCGTA
β-actin	CATGTACGTTGCTATC CAGGC	CTCCTTAATGTCACGC ACGAT

2.7 细胞总蛋白提取及蛋白印迹法测蛋白表达量

种对数生长期的 Huh-7 细胞于 6 孔板,培养箱孵育至贴壁生长;弃去培养液,加入含药血清培养基,培养箱孵育 18 h。加入 H₂O₂,37℃,5%CO₂,孵育 1 h。弃去培养液,用冷 PBS 冲洗 2 遍,加入 100 μL 预冷含 PMSF 的蛋白质裂解液,离心取上清,加上样缓冲液,将蛋白放入沸水中煮 10 min。加样、电泳、恒流转膜。5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,放入一抗盒中孵育,4℃ 过夜。TBST 冲洗 10 min,重复 3 遍。常温孵育二抗 1 h。TBST 洗膜 3 次。显色。

2.8 统计分析

采用 Graphpad Prism 8 统计软件分析,数据资料采用表示,两两比较采用取 LSD-t 检验, P < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度 H₂O₂ 损伤 Huh-7 细胞后细胞存活率的变化

通过 CCK8 法及 IC₅₀ 公式可知,肝细胞生存率随着 H₂O₂ 浓度升高而降低(见图 1)。Huh-7 细胞半数致死率为 930 mmol/mL。H₂O₂ 诱导的肝细胞氧化应激损伤模型制备成功。

3.2 不同浓度含药血清对 H₂O₂ 损伤 Huh-7 细胞的保护作用

不同浓度的古 13 含药血清对 H₂O₂ 诱导肝细胞氧化应激损伤模型均有作用,其中中剂量浓度古 13 含药血清,效果最明显(P < 0.05),作为后续作用条

件。古13含药血清孵育人Huh-7细胞6 h、12 h及24 h的保护作用无统计学意义。孵育18 h后,中剂

量古13含药血清对H₂O₂诱导人Huh-7细胞损伤有显著的保护作用($P < 0.05$)(见图2)。

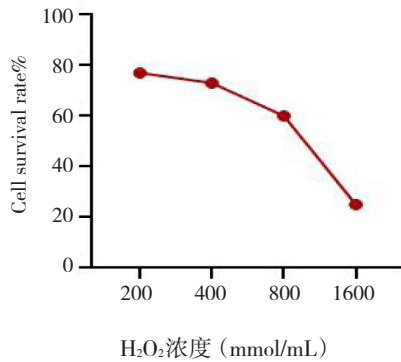


图1 不同浓度H₂O₂损伤Huh-7细胞后细胞存活率的变化

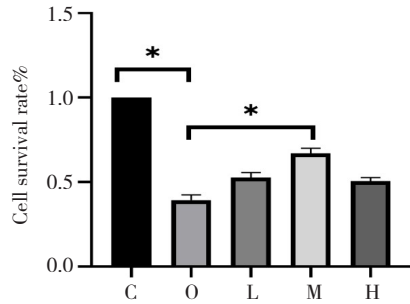


图2 不同浓度含药血清对H₂O₂损伤Huh-7细胞的保护作用
C: 10%空白血清组 O: H₂O₂ + 10%空白血清组 L: H₂O₂ + 低剂量古13血清组 M: H₂O₂ + 中剂量古13血清组 H: H₂O₂ + 高剂量古13血清组

3.3 液相色谱分析图分析

通过分析液相色谱分析图(见图3~6),含药血

清主要成分是没食子酸及鞣花酸。

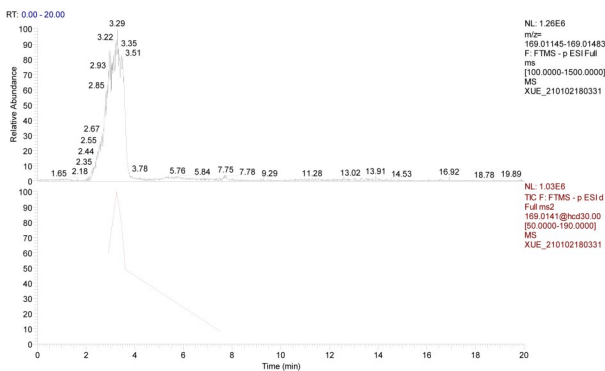


图3 没食子酸一级结构

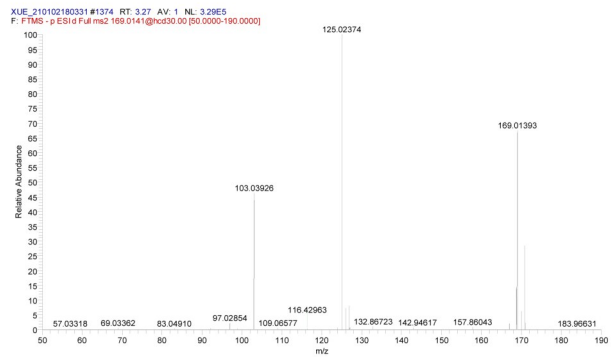


图4 没食子酸二级碎片

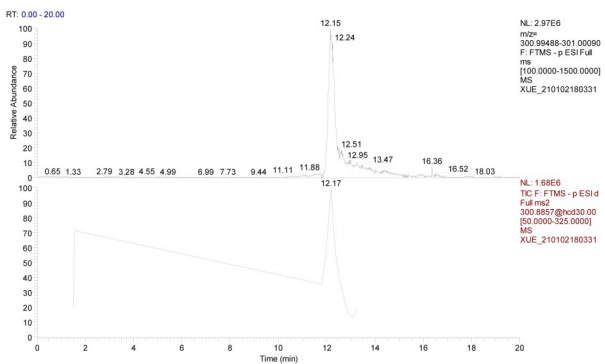


图5 鞣花酸一级结构

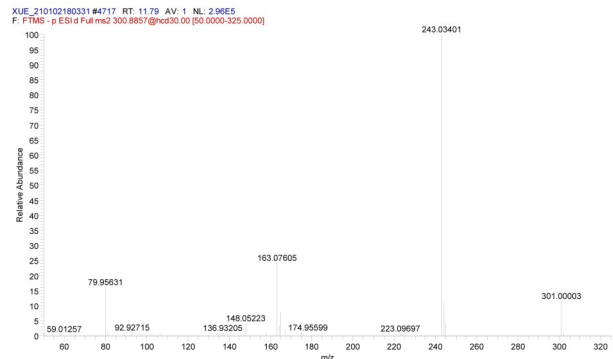


图6 鞣花酸二级碎片

为没食子酸(C₇H₆O₅)标准品及蒙药含药血清待测品, tR/MIN为3.27, 其[M-H]⁻为169.01314, 二级碎片为109.06577(见图3);为鞣花酸(C₁₄H₆O₈)标准品及蒙药含药血清待测品, tR/MIN为11.82, 其

[M-H]⁻为300.99789, 二级碎片为245.0307(见图5)。由此可知蒙药含药血清主要成分是没食子酸及鞣花酸, 其中以鞣花酸为主。

3.4 H₂O₂损伤的Huh-7细胞后凋亡率变化

通过流式细胞仪检测细胞凋亡, H₂O₂诱导 Huh-7 肝细胞损伤模型成功, 即 H₂O₂ + 10%空白血清组作用的肝细胞凋亡率(62.50% ± 1.322%)高于10%空白血清组作用的肝细胞凋亡率(6.443% ±

1.075%)(*P* < 0.05), H₂O₂ + 10%古13血清组作用的 Huh-7 肝细胞凋亡率(53.36% ± 0.7428%)小于 H₂O₂ + 10%空白血清组作用的肝细胞凋亡率(*P* < 0.05), 差异有统计学意义(见图7)。

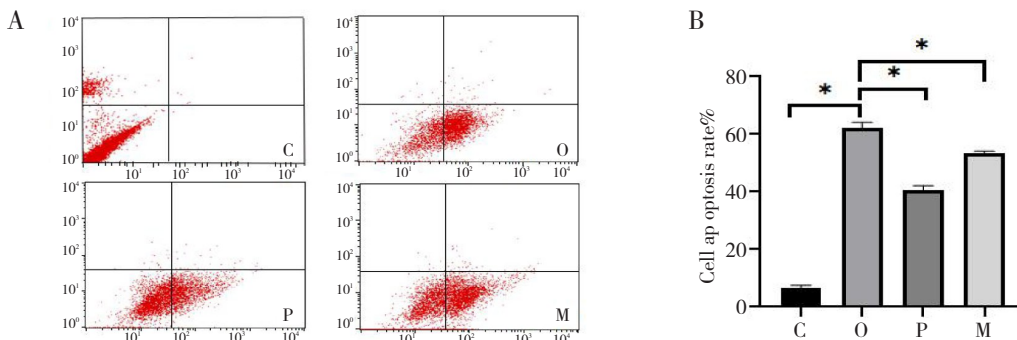


图7 H₂O₂损伤的Huh-7 细胞后凋亡率变化

A: Huh-7细胞凋亡图 B: Huh-7细胞凋亡统计图 C: 10%空白血清组
O: H₂O₂ + 10%空白血清组 P: H₂O₂ + 10%阳性血清组 M: H₂O₂ + 10%古13血清组

通过荧光定量PCR技术, 各血清组分别作用 Huh-7细胞 18 h, 与10%空白血清组 NF-κB mRNA 相比, H₂O₂ + 10%空白血清组 NF-κB mRNA 表达量升高, 表明造模成功; 与 H₂O₂ + 10%空白血清组 NF-κB mRNA 表达量相比, H₂O₂ + 10%阳性血清组及 H₂O₂ + 10%古13血清组表达量明显降低(*P* < 0.05)(见图8)。

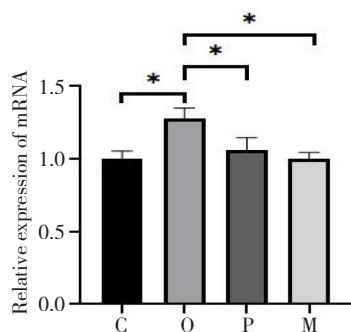


图8 H₂O₂损伤的Huh-7 细胞NF-κB表达量的变化

C: 10%空白血清组 O: H₂O₂ + 10%空白血清组
P: H₂O₂ + 10%阳性血清组 M: H₂O₂ + 10%古13血清组

3.6 H₂O₂损伤的Huh-7 细胞的NF-κB 蛋白表达变化统计

通过蛋白质印迹法检测 NF-κB 蛋白表达量, Image J 软件分析目的蛋白显影灰度值与内参蛋白灰度值的比值, 可得出如下结论(见图9): 各血清组分别作用 Huh-7 细胞 18 h, 与10%空白血清组 NF-κB 蛋白相比, H₂O₂ + 10%空白血清组 NF-κB 蛋白表达量升高, 证明造模成功; 与 H₂O₂ + 10%空白血清组 NF-κB 蛋白表达量相比, H₂O₂ + 10%阳性血清组蛋白表达量及 H₂O₂ + 10%古13血清组蛋白表达量明显降低(*P* < 0.05)。

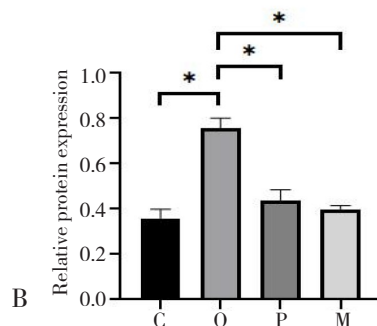
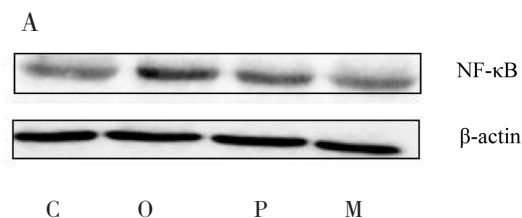


图9 H₂O₂损伤的Huh-7 细胞的NF-κB 蛋白表达变化统计图

A: NF-κB 蛋白表达电泳图 B: NF-κB 蛋白表达变化
C: 10%空白血清组 O: H₂O₂ + 10%空白血清组
P: H₂O₂ + 10%阳性血清组 M: H₂O₂ + 10%古13血清组

4 讨论

蒙药古日古木-13 已广泛应用于肝脏疾病的治疗, 还可与其他蒙药联合应用治疗多种疾病^[11-13]。经本课题组前期研究证明, 蒙药古日古木-13 对小鼠肝部分切除术诱导的肝损伤有明显的保护作用。但其是否对氧化应激损伤的肝细胞有保护作用, 鲜有报道, 为此本课题设计了该实验。本文选取不同浓度的 H₂O₂ 作用于人 Huh-7 细胞, 造成细胞

损伤,使细胞活性降低,通过CCK-8试剂检测人Huh-7细胞在H₂O₂不同浓度损伤的作用下,细胞存活率。通过IC₅₀公式计算细胞半抑制率,结果显示当Huh-7细胞抑制率为50%时,H₂O₂的浓度为930 μmol/L时。故后续实验采取此浓度建立细胞损伤模型。

郭国栋、郭叶等人曾采用HPLC法,检测出古日古木-13样品中6种成分的含量,未有报道显示检测蒙药古日古木-13含药血清有效成分,本课题组,通过HPLC法,以栀子苷为内参物,检测到蒙药古日古木-13含药血清的有效成分是没食子酸及鞣花酸。其中鞣花酸占比较高。鞣花酸是一种天然多酚类植物化学物的衍生物,具有抗氧化、抗癌、抗动脉粥样硬化、抗炎、抗菌和抗毒性等作用^[4]。文献证明,鞣花酸所含的羟基能明显增强其抗氧化损伤的能力,在口服吸收后0.5~1.0h内血清中鞣花酸浓度达到峰值^[5]。蒙药古日古木-13含药血清含有大量鞣花酸,因此蒙药古日古木-13含药血清对过氧化氢诱导人Huh-7细胞有明显保护作用。

为实验进一步研究蒙药古日古木-13含药血清对过氧化氢诱导人Huh-7细胞的保护作用。将大鼠随机分为PBS空白组、古日古木-13低、中、高剂量组,灌胃7天,于末次灌胃后1h心脏取血。制备蒙药古日古木-13含药血清。通过CCK-8试剂检测不同浓度的蒙药古日古木-13含药血清提前6h、12h、18h、24h加入细胞培养基中作用Huh-7细胞,细胞存活率,分析蒙药古日古木-13含药血清作用的最佳时间及最佳浓度。结果显示,当提前18h加入蒙药古日古木-13中剂量含药血清培养基时,其保护作用最佳。

细胞凋亡是有核细胞通过启动自身内部的遗传机制激活内源性DNA内切酶而发生的一种主动细胞死亡过程。通过流式细胞仪检测发现,蒙药古日古木-13含药血清作用过氧化氢损伤的Huh-7细胞后,细胞凋亡率明显下降。

氧化应激损伤是最常见的应激损伤,是细胞中ROS水平超过细胞抗氧化能力的一种状态,也是肝损伤发生机制中的重要损伤机制和环节。氧化应激反应常引起NF-κB信号通路表达。NF-κB是一种多效性的核转录因子,可调控多种基因的表达,这些基因也可促进各种肿瘤细胞的生长、存活和转化。NF-κB转录因子是中央协调宿主防御者对压力,伤害和感染的反应调节剂。本课题通过逆转录酶定量聚合酶链反应(qPCR)实验可知,蒙药古日古

木-13含药血清中剂量组NF-κB表达量较模型组NF-κB表达量明显下降($P < 0.05$)。说明古13含药血清中剂量组对过氧化氢诱导人Huh-7细胞损伤有保护作用,其机制可能与NF-κB通路有关。

参考文献

- [1]吴沅峰,刘维,赵文甲.血清药理学方法对药理、药效学和新药研发的贡献[J].中国组织工程研究,2018;22(24):3914-3920
- [2]庞延,卢健棋,朱智德,等.养心通脉方含药血清预处理内皮祖细胞对急性心肌梗死兔心肌bFGF、VEGF水平的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2021;19(01):41-44
- [3]Park Eunju, Paik Hyun-Dong, Lee Seung-Min. Combined effects of whey protein hydrolysates and probiotics on oxidative stress induced by an iron-overloaded diet in rats[J]. Int J Food Sci Nutr, 2018;69:298-307
- [4]Li Yan, Guo Jianru, Zhang Huixia, et al. Protective Effect of Thymidine on DNA Damage Induced by Hydrogen Peroxide in Human Hepatocellular Cancer Cells[J]. ACS Omega, 2020;5:21796-21804
- [5]Krishnan Vasanth, Subramaniam Selvakumar, Chia-Chuan Chang, et al. Leonurus sibiricus Anticancer Activity of L.: Possible Involvement of Intrinsic Apoptotic Pathway[J]. Nutr Cancer, 2021:1-12
- [6]肖琨珉,孔晨帆,姚树坤.龙胆苦苷对过氧化氢诱导HepG2细胞氧化应激损伤的保护作用研究[J].世界中西医结合杂志,2019;14(11):1530-1534
- [7]吴敏超,杨晨,韩乐,等.蒙药古日古木-13的研究进展[J].疾病监测与控制,2019;13(03):226-228
- [8]郭国栋,郭叶,李刚,等.一测多评法同时测定蒙药古日古木-13丸中6种成分[J].中草药,2020;51(06):1542-1547
- [9]文丽梅,卢帅,吕国栋,等.过氧化氢诱导人肝癌细胞BEL7402产生氧化应激细胞模型的建立[J].安徽医药,2019;23(01):37-41
- [10]赵斌,葛金芳,朱娟娟,等.小议在MTT法测细胞增殖抑制率中IC₅₀的计算方法[J].安徽医药,2007(09):834-836
- [11]Chang Hong, Liu Qing, Bai Wan-Fu, et al. Protective effects of Amygdalus mongolica on rats with renal fibrosis based on serum metabolomics[J]. J Ethnopharmacol, 2020;257:112858
- [12]鲍劲松.蒙药古日古木-13味丸治疗布病性肝损伤的临床观察[J].中国民族医药杂志,2020;26(04):12-13
- [13]刘卓,马丽杰,包金凤,等.蒙药古日古木-13对大鼠酒精性神经损伤的影响[J].内蒙古大学学报(自然科学版),2018;49(04):396-402
- [14]Rosillo MA, Sanchez-Hidalgo M, Cárdeno A, et al. Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease[J]. Biochem Pharmacol, 2011;82(7):737-745
- [15]龙毅,骆静方,胡敏予,等.鞣花酸对CCl₄诱导小鼠急性肝损伤的保护作用及其机制[J].吉林大学学报(医学版),2017;43(03):572-576