

# 金银花总黄酮对氧化应激中肝星状细胞的保护作用

马官英<sup>1\*</sup>, 张庆刚<sup>2</sup>, 钟瑞华<sup>3</sup>, 武雯华<sup>2</sup>(1.解放军总医院, 北京 100853; 2.滨州市中心医院, 山东惠民 251700; 3.广东医学院药学院, 广东东莞 523808)

中图分类号 R285;R735.7 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2895-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.06

**摘要** 目的:研究金银花总黄酮对氧化应激中肝星状细胞(HSC)的保护作用。方法:培养大鼠HSC为模型。实验分为空白对照(DMEM培养基)组、模型(DMEM培养基)组与金银花总黄酮①、②、③、④(12.5、25.0、50.0、100.0 μg/ml)组。检测MTT抑制率;测定超氧化物歧化酶(SOD)与乳酸脱氢酶(LDH)活性、丙二醛(MDA)含量、总抗氧化能力(T-AOC)。结果:与空白对照组比较,模型组MTT抑制率降低,MDA含量增加,LDH活性增强,SOD活性减弱,T-AOC减弱,差异有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ );与模型组比较,金银花总黄酮①、②、③、④组MTT抑制率升高,MDA含量减少,LDH活性减弱,SOD活性增强,T-AOC增强,差异有统计学意义( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。结论:金银花总黄酮具有抑制肝纤维化形成的作用,其作用机制可能与抑制HSC的增殖及抗氧化应激,以及抑制脂质过氧化反应有关。

**关键词** 金银花总黄酮;肝星状细胞;脂质过氧化反应;肝纤维化;氧化应激

## Effects of *Lonicera japonica* Total Flavonoids on Hepatic Stellate Cell Activation and Lipid Peroxidation in Oxidative Stress

MA Guan-ying<sup>1</sup>, ZHANG Qing-gang<sup>2</sup>, ZHONG Rui-hua<sup>3</sup>, WU Wen-hua<sup>3</sup>(1.PLA General Hospital Beijing 100853; 2.Binzhou Central Hospital, Shandong Huimin 251700, China; 3.College of Pharmacy, Guangdong Medical University, Guangdong Dongguan 523808)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effect of *Lonicera japonica* total flavonoids on hepatic stellate cell(HSC) activation and lipid peroxidation in oxidative stress. METHODS: HSC model was induced, and the experiment were divided into blank control group (DMEM culture medium), model group(DMEM culture medium). and *L. japonica* total flavonoids ①, ②, ③ and ④ groups (12.5、25.0、50.0、100.0 μg/ml) The proliferation of HSC was detected by MTT assay. The activity of SOD, and the contents of MDA, T-AOC and LDH were measured. RESULTS: Compared with blank control group, inhibition rate of HSC was decreased in model group, and the activity of SOD and the content of T-AOC were decreased, while the levels of MDA and LDH were increased; there was statistical significance ( $P<0.01, P<0.05$ ). Compared with model group, inhibition rate of HSC was increased in *L. japonica* total flavonoids ①, ②, ③ and ④ groups, and the activity of SOD and the content of T-AOC were increased, while the levels of MDA and LDH were decreased; there was statistical significance ( $P<0.01, P<0.05$ ). CONCLUSIONS: *L. japonica* total flavonoids can prevent the formation of hepatic fibrosis probably by inhibiting HSC proliferation, oxidative stress and lipid peroxidation.

**KEYWORDS** *Lonicera japonica* total flavonoids; Hepatic stellate cells; Lipid peroxidation; Hepatic fibrosis; Oxidative stress

- =====
- [ 2 ] 陈奇.中药药理研究方法论[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:895.
  - [ 3 ] 张崇禧,郑友兰.中药研究与新药开发[M].长春:吉林科学技术出版社,2004:326.
  - [ 4 ] 李杰,宋淑霞,吕占军.人参皂苷抗肿瘤作用的研究进展[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2004,11(1):61.
  - [ 5 ] 严萍萍,张文芳,李勇,等.黄芪注射液对心力衰竭患者神经内分泌系统的影响[J].中华实用中西医杂志,2004,17(4):3188.
  - [ 6 ] 周福波.麦门冬的药理作用研究进展[J].牡丹江医学院学报,2006,27(3):69.
  - [ 7 ] 张崇禧,徐海波,贾桂燕.北五味子藤茎生药学研究[J].人参研究,2005(1):15.
  - [ 8 ] 田龙,辛钟成,刘武江,等.淫羊藿苷对动脉性ED模型大鼠阴茎海绵体压力和一氧化氮合酶亚型表达的影响[J].中华医学杂志,2004,84(11):75.
  - [ 9 ] 聂桂丽,郭茂娟,李燕平,等.丹参单体对肿瘤坏死因子损伤的血管平滑肌细胞炎症介质IL-1β表达的影响[J].中国老年学杂志,2007,27(9):823.
  - [ 10 ] 金树梅,赵桂峰,范英昌.丹酚酸B对大鼠心肌缺血再灌注损伤内皮素及TXA2/PGI2系统的影响[J].中国老年学杂志,2004,24(2):127.

(收稿日期:2014-05-19 修回日期:2014-06-23)

\*主管药师,主管护师。研究方向:药学、护理学。电话:010-66875538

金银花为忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或待初开的花,味甘,性寒,有清热解毒、疏散风热之功效。现代医学研究表明,金银花中含有黄酮类化合物<sup>[1]</sup>,具有降低心肌耗氧量,使冠脉、脑血管流量增加的功效,可抗心律失常、软化血管、降血糖血脂等<sup>[2]</sup>。

肝星状细胞(Hepatic stellate cell, HSC)是肝纤维化发生过程中过度沉积的细胞外基质(ECM),尤其是胶原纤维的主要细胞来源,其活化增殖是肝纤维化形成的主要细胞基础<sup>[3-7]</sup>。

近年来研究表明,氧化应激在星状细胞激活的阶段发挥重要作用<sup>[8]</sup>。促氧化物的主要来源是线粒体产生的活性氧(ROS),大量的ROS除了刺激炎症反应的发生外,更重要的是破坏了体内氧化-抗氧化的平衡,使机体失去正常的调节功能,对正常细胞及组织造成损伤,从而促进肝脏炎症及肝纤维化的发展<sup>[9]</sup>。因此,针对HSC的抗氧化调节对于肝脏纤维化的预防和治疗具有重要意义。本研究探讨了金银花总黄酮对氧化应激中HSC活化及脂质过氧化的影响。

## 1 材料

### 1.1 仪器

CO<sub>2</sub>培养箱(美国 Thermo Forma 公司);XDS-1B 型倒置相差生物显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司);680 型酶标仪(美国伯乐公司);干燥箱[施都凯仪器设备(上海)有限公司];KQ-100DE 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司);SW-CJ-1FD 型洁净工作台(广州安泰空气技术有限公司);SY21-K 型电热恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司);LDZX-50KB 型立式电热压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)。

### 1.2 试剂

金银花总黄酮(泰山医学院中药教研室提取);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(北京鼎国昌盛生物技术有限公司);青链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司);丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、乳酸脱氢酶(LDH)、总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;过氧化氢、MTT(美国 Sigma 公司);二甲基亚砜(DMSO,美国 Amresco 公司)。

### 1.3 细胞

HSC 由泰山医学院王晓丹老师惠赠。

## 2 方法

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 过氧化氢溶液的制备 精密量取 5.67  $\mu$ l 过氧化氢,加入 PBS 5 ml,制备成 0.01 mol/L 的过氧化氢母液。使用时用培养基稀释成 50  $\mu$ mol/L。

2.1.2 金银花总黄酮溶液的制备 取金银花总黄酮粉末 4 mg,加入 DMSO 200  $\mu$ l,振荡摇匀,制备成 20  $\mu$ g/ $\mu$ l 的金银花总黄酮母液。根据需要,用培养基稀释成质量浓度为 100.0、50.0、25.0、12.5  $\mu$ g/ml 的含药培养基。

### 2.2 金银花总黄酮的提取

精密称取 2 g 金银花总黄酮粉末,置于 100 ml 圆底烧瓶

中,用 50 ml 70% 乙醇水浴(80  $^{\circ}$ C)加热回流 4 h 提取,通过 AB-8 大孔吸附树脂用 70% 乙醇洗脱,收集洗脱液,干燥。用 25 ml 蒸馏水溶解、转移至分液漏斗中,用等体积乙酸乙酯萃取 3 次,取下层液置于水浴上蒸干。用 25 ml 0.5% 碳酸钠溶液完全溶解,移取 5 ml 置于 25 ml 量瓶中,加蒸馏水溶解,显色,测定溶液在 441 nm 波长处的吸光度,按回归方程计算,质量分数为 71.28%。

### 2.3 HSC 的培养

含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件下培养,待细胞长至 70%~80% 时进行传代。

### 2.4 复制模型与分组、给药

用终浓度为 50  $\mu$ mol/L 的过氧化氢溶液温育 1 h 以复制细胞氧化应激模型。HSC 以含胎牛血清的 DMEM 培养基制备成细胞密度为  $5 \times 10^4$  ml<sup>-1</sup> 的细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔 100  $\mu$ l。试验随机均分为 6 组,即空白对照(DMEM 培养基)组、模型(DMEM 培养基)组与金银花总黄酮①、②、③、④(12.5、25.0、50.0、100.0  $\mu$ g/ml)组。PBS 冲洗 3 遍模型细胞后加药培养,每个剂量设 5 个复孔。

### 2.5 MTT 抑制率的测定

加药培养 24 h 后每孔加 0.5% MTT 贮存液 10  $\mu$ l 继续孵育 4 h,弃上清,每孔加 DMSO 150  $\mu$ l 溶解细胞内结晶,恒温振荡器震荡 10 min,以酶标仪测定 490 nm 波长处光密度(OD)值。

### 2.6 SOD、MDA、T-AOC 和 LDH 水平的测定

加药培养 24 h 后收集细胞培养基上清液,按试剂盒方法检测 SOD、MDA、LDH、T-AOC 水平。

### 2.7 统计学方法

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS17.0 软件处理分析试验数据。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以 LSD 法进行统计。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 金银花总黄酮对模型细胞 MTT 抑制率的影响

与空白对照组比较,模型组 MTT 抑制率降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与模型组比较,金银花总黄酮①、②、③、④组 MTT 抑制率升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且呈一定剂量-效应关系。金银花总黄酮对模型细胞 MTT 抑制率的影响见表 1。

表 1 金银花总黄酮对模型细胞 MTT 抑制率的影响

Tab 1 Effect of *L. japonica* total flavonoids on the rate of inhibition of MTT in HSC

组别	质量浓度, $\mu$ g/ml	MTT 抑制率
空白对照组		0
模型组		-0.178*
金银花总黄酮①组	12.5	0.070*
金银花总黄酮②组	25.0	0.079*
金银花总黄酮③组	50.0	0.223*
金银花总黄酮④组	100.0	0.381*

与空白对照组比较: \* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$

vs. blank control group: \* $P < 0.01$ ; vs. model group: # $P < 0.05$

### 3.2 金银花总黄酮对模型细胞 SOD、MDA 和 T-AOC 水平的影响

与空白对照组比较,模型组 SOD 活性减弱,MDA 含量增加,T-AOC 减弱,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,金银花总黄酮①、②、③、④组 SOD 活性增强,MDA 含量减少,T-AOC 增强,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且呈一定剂量-效应关系。金银花总黄酮对模型细胞 SOD、MDA、T-AOC 水平的影响见表 2。

表 2 金银花总黄酮对模型细胞 SOD、MDA、T-AOC 水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 2 Effect of *L. japonica* total flavonoids on the levels of SOD, MDA and T-AOC in HSC ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	MDA, nmol/ml	SOD, U/ml	T-AOC, U/ml
空白对照组		8.114 ± 5.446	20.803 ± 4.514	13.320 ± 3.419
模型组		24.857 ± 6.669*	4.381 ± 3.403*	10.520 ± 1.093*
金银花总黄酮①组	12.5	18.729 ± 6.024 <sup>#</sup>	11.714 ± 4.719 <sup>#</sup>	20.026 ± 6.204 <sup>#</sup>
金银花总黄酮②组	25.0	9.971 ± 4.386 <sup>#</sup>	16.399 ± 1.518 <sup>#</sup>	20.473 ± 4.919 <sup>#</sup>
金银花总黄酮③组	50.0	9.629 ± 5.631 <sup>#</sup>	18.297 ± 2.234 <sup>#</sup>	20.782 ± 5.678 <sup>#</sup>
金银花总黄酮④组	100.0	7.400 ± 3.541 <sup>#</sup>	18.929 ± 3.848 <sup>#</sup>	21.784 ± 4.415 <sup>#</sup>

与空白对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$

vs. blank control group: \* $P < 0.05$ ; vs. model group: <sup>#</sup> $P < 0.05$

### 3.3 金银花总黄酮对模型细胞 LDH 活性的影响

与空白对照组比较,模型组 LDH 活性增强,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,金银花总黄酮①、②、③、④组 LDH 活性减弱,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且呈一定剂量-效应关系。金银花总黄酮对模型细胞 LDH 活性的影响见表 3。

表 3 金银花总黄酮对模型细胞 LDH 活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 3 Effect of *L. japonica* total flavonoids on the activities of LDH in HSC ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	LDH, U/L
空白对照组		770.628 ± 245.153
模型组		1 127.728 ± 262.779*
金银花总黄酮①组	12.5	849.028 ± 218.854 <sup>#</sup>
金银花总黄酮②组	25.0	816.293 ± 220.029 <sup>#</sup>
金银花总黄酮③组	50.0	813.154 ± 319.950 <sup>#</sup>
金银花总黄酮④组	100.0	606.876 ± 274.191 <sup>##</sup>

与空白对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$

vs. blank control group: \* $P < 0.05$ ; vs. model group: <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$

0.01

## 4 讨论

MDA 含量常可反映体内脂质过氧化物的程度,间接反映细胞受自由基攻击的严重程度。SOD 对机体的氧化与抗氧化的平衡起着重要的作用,能够清除超氧化阴离子自由基,保护细胞免受损伤。T-AOC 是对细胞或组织各种抗氧化物的总抗氧化能力的表现。笔者研究金银花总黄酮对氧化应激所致 HSC

纤维化效应的影响,结果表明,与模型组比较,金银花总黄酮①、②、③、④组 HSC MDA 含量明显减少,SOD 活性明显增强,T-AOC 明显增强。

正常情况下,由于细胞的衰老死亡,细胞外液中存在一定活性的 LDH,当肝脏、心脏、肾脏、肺等组织器官出现缺氧、变性、坏死等病变时,LDH 会大量逸出细胞外,释放到血液中,使细胞外液中 LDH 活性增加<sup>[10]</sup>。本研究结果表明,与模型组比较,金银花总黄酮①、②、③、④组 HSC LDH 活性明显减弱,MTT 抑制率明显升高。

综上,金银花总黄酮能够减少氧化应激 HSC 脂质过氧化产物 MDA 的产生,降低 LDH 活性,升高 SOD 活性和 T-AOC 水平,抑制了氧化应激中 HSC 的增殖。

## 参考文献

- [1] 王丽婷,杨敏丽.高效液相色谱法同时测定金银花及叶中的黄酮类物质[J].时珍国医国药,2007,18(8):1 850.
- [2] 杨波.黄酮类化合物对心血管系统的作用[J].岭南心血管病杂志,2004,10(2):144.
- [3] Svegliati-Baroni G, De Minicis S, Marzoni M. Hepatic fibro genesis in response to chronic liver injury: novel in sights on the role of cell-to-cell interaction and transit ion [J]. *Liver Int*, 2008, 28(8): 1 052.
- [4] Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injure [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(4): 2 247.
- [5] 肖光夏, Winchurch RA, Thupari JN, 等.烧伤内毒素血症 [J].解放军医学杂志, 1989, 14(2): 90.
- [6] Trent MS, Stead CM, Tran AX, et al. Diversity of endo-toxin and its impact on pathogenesis[J]. *J Endotoxin Res*, 2006, 12(4): 205.
- [7] 杨宗城.烧伤治疗学[M].3版.北京:人民卫生出版社, 2006: 238.
- [8] 郑媛媛,刘振雄.姜黄素对氧化应激中肝星状细胞活化及细胞外基质分泌的影响[J].胃肠病学和肝病学杂志, 2011, 20(4): 309.
- [9] 丁宁.肝星状细胞与肝纤维化[J].中国中医药现代远程教育, 2011, 18(9): 83.
- [10] Mao WH, Lai ML. The diagnostic value of lacate dehy-drogenese in hepatic ischemia injury-the misdiagnosis analysis of 12 hepatic ischemia injury patients [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medi-cine on Liver Diseases*, 2003(Supp 1): 1 116.

(收稿日期:2014-03-14 修回日期:2014-05-24)

《中国药房》杂志——《中国科学引文数据库》(CSCD)来源期刊,欢迎投稿、订阅