

# 五味子乙素对人肝细胞氧化损伤的保护作用

蔡晶<sup>1</sup>, 张庆<sup>1</sup>, 肖峰<sup>2</sup>, 迟德彪<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>南方医科大学南方医院; <sup>2</sup>中山大学第三附属医院, 广州 510630; <sup>3</sup>南方医科大学药学院, 广州 510515

**摘要:**以过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)处理人肝细胞(L02)后分组,分别以五味子乙素(Schizandrin B, Sch B) 15、10和5 μmol/L浓度保护细胞6 h后测定细胞存活率及培养基上清液中乳酸脱氢酶(LDH)、谷草转氨酶(AST)、丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性,来考察Sch B对被氧化损伤细胞的保护作用。在H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>作用下,各组细胞存活率下降,LDH、MDA和AST含量均显著升高,SOD活性显著降低;Sch B处理后LDH、MDA和AST含量均有所降低,SOD活性有所恢复。随着Sch B剂量的增高,这种保护作用表现更加明显。因此,我们认为Sch B可减轻H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>导致的细胞氧化损伤,能起到一定的保护作用,且该作用呈现一定的剂量依赖性。

**关键词:**五味子乙素;人肝细胞;抗氧化

中图分类号: R961.1

文献标识码: A

## Schizandrin B Protects Human Liver Cells Oxidized by Peroxide

CAI Jing<sup>1</sup>, ZHANG Qing<sup>1</sup>, XIAO Feng<sup>2</sup>, CHI De-biao<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Nanfang Hospital, Southern Medical University; <sup>2</sup>The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, China;

<sup>3</sup>School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract:** This article was aimed to discuss the protective effect of Schizandrin B on human liver cells (L02) oxidized by peroxide. Oxidize human liver cells (L02) by peroxide then group the cells. Oxidized cells were divided into four groups: model, low, medium and high dose treatment groups, which were co-incubated with 0, 5, 10 and 15 μmol/L of Schizandrin B (Sch B) respectively for 6 h. The cell survival rate was determined using CCK-8. The contents of lactate dehydrogenase (LDH), transaminases (AST), malondialdehyde (MDA) and the activity of Superoxide Dismutase (SOD) in the cell culture supernatant by ELISA were evaluated in order to estimate the protective effect of Sch B on injured L02 cells. Compared with the control group, cell livability decreased, LDH, AST and MDA increased and the activity of SOD weakened simultaneously in all the experimental groups. Compare model group with Sch B groups, cell livability improved, LDH, AST and MDA reduced and the activity of SOD was strengthened concurrently in the latter ones. The changes were proportional to the dosage of Sch B between 0-15 μmol/L. Hence, it was deduced that Sch B can alleviate the oxidative injury caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The protective effect on oxidised L02 cells showed in a dose dependent manner.

**Key words:** schizandrin B; L02; anti-oxidation

五味子又名玄及、会及、五梅子,为木兰科植物五味子的成熟果实。其果实有益气生津,敛肺滋肾、止泻涩精、安神等作用,可治久咳虚喘,津少口干,遗精久泻,健忘失眠等症<sup>[1,2]</sup>。五味子乙素是五味子干燥成熟果实经有机溶剂脱脂后提取分离而得的一种药理活性物,具有显著的抗氧化作用<sup>[3,4]</sup>。自由基的产生是氧化剂发挥氧化作用的主要机制。对自由基的相关研究发现,自由基蓄积的直接后果是诱发多种疾病,如肿瘤、炎症、动脉粥样硬化、癌症、心

血管疾病等<sup>[5,6]</sup>,因此,人们越来越关注各种自由基对机体造成的氧化损伤。本研究采用了常见氧化剂H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对肝细胞造成损伤,并以Sch B保护作为研究内容,来考察Sch B对氧化损伤肝细胞的作用及可能的相关机制。

## 1 试剂与细胞

### 1.1 试剂

Sch B,购自中国药品生物制品检定所。DMEM培养基, Gibco公司;胎牛血清,杭州市四季青生物工程材料有限公司,特级; HEPES: 25 g/瓶,纯度99%, FARCO 化学品供应公司,进口分装,香港;

CCK-8,日本同仁化学研究所(Dojindo);胰蛋白酶(美国Sigma公司);二甲基亚砷(DMSO),Sigma公司;人乳酸脱氢酶(LDH)ELISA试剂盒、人天门冬氨酸氨基转移酶(AST)ELISA试剂盒、人丙二醛(MDA)ELISA试剂盒及人超氧化物歧化酶(SOD)ELISA试剂盒,以上试剂均购自研域(上海)化学试剂有限公司。其余试剂均为分析纯。

## 1.2 细胞

L02,人肝细胞株,购自上海细胞所。

## 2 实验方法

### 2.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导肝细胞损伤的作用模型的建立

参照文献方法<sup>[7]</sup>,取对数生长期人肝 L02 细胞,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,调整细胞密度为  $5 \times 10^5$  /mL,将细胞悬液加入 96 孔和 6 孔培养板中,置 37 ℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养至细胞全部贴壁,供实验用。

### 2.2 实验分组与各项指标测定

设正常对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 终浓度为 0.4 mmol/L)、五味子乙素高、中、低三个浓度组,每组设 6 个复孔。高、中、低浓度组分别加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(终浓度为 0.4 mmol/L)和相应浓度的 Sch B(终浓度分

别为 15、10、5 μmol/L),共同培养 6 h 后,收集培养上清,按照试剂盒说明检测 LDH、AST、MDA 的水平及 SOD 活力,同时用 CCK-8 测定细胞的存活率。

### 2.3 数据统计方法

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS13.0 软件经方差齐性检验后行单向方差分析(one-way ANOVA),以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 实验结果

### 3.1 Sch B 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤肝细胞存活率的影响

加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 后,在显微镜下观察可见细胞减少、皱缩、细胞膜破损、结构不清、贴壁不牢和脱落等现象。CCK-8 检测中,肝细胞存活率与 OD 值成正比。与正常对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组 OD 值有显著性差异( $P < 0.01$ ),可使细胞存活率下降到正常组的 56.8%,此结果说明 0.4 mmol/L 的过氧化氢对肝细胞有明显的氧化损伤作用,这与 Zhu B 等报道结果接近<sup>[7]</sup>。与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组比较,Sch B 各剂量组 OD 值均有升高( $P < 0.01$ ),提示肝细胞存活率提高。这表明,Sch B 对肝细胞的过氧化氢损伤具有一定的保护作用,且保护作用随着 Sch B 的浓度增高而增强(表 1)。

表 1 Sch B 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤细胞存活率的影响( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Table 1 Protective effect of Sch B on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidized L02 cells ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (μmol/L)	OD 值 OD value	存活率 Survival rate (%)
正常对照组 normal	-	1.627 ± 0.011	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 模型组 model	-	0.925 ± 0.014	56.8 <sup>a</sup>
Sch B 低浓度 Sch B-L	5	1.064 ± 0.023	65.4 <sup>a,b</sup>
Sch B 中浓度 Sch B-M	10	1.156 ± 0.042	71.1 <sup>a,b</sup>
Sch B 高浓度 Sch B-H	15	1.198 ± 0.015	73.6 <sup>a,b</sup>

注:与对照组相比,<sup>a</sup> $P=0.000$ ;与模型组相比,<sup>b</sup> $P=0.000$ 。

Note: Compare with control group,<sup>a</sup> $P=0.000$ ; Compare with model group,<sup>b</sup> $P=0.000$ .

### 3.2 Sch B 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤肝细胞 LDH、AST 和 MDA 的影响

与正常对照组相比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组培养上清液中 LDH、AST 和 MDA 含量均明显升高( $P < 0.05$ )。Sch B 各处理组与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组相比,LDH、AST 和

MDA 含量均有所降低,且随着 Sch B 的剂量增加降低幅度越大,呈现一定的剂量依赖性,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。上述结果提示 Sch B 在体外对过氧化氢所导致的肝细胞损伤具有直接地保护作用(表 2)。

表 2 Sch B 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤细胞 LDH、AST 和 MDA 的影响( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 Sch B reduced LDH, AST and MDA of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidized L02 cells ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (μmol/L)	LDH 值 LDH value (U/L)	AST 值 AST value (U/L)	MDA 值 MDA value (mmol/mL)
正常对照组 normal		14.12 ± 0.09	51.16 ± 0.15	2.80 ± 0.08

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 模型组 model	-	39.16 ± 0.15 <sup>a</sup>	84.79 ± 0.13 <sup>a</sup>	10.46 ± 0.12 <sup>a</sup>
Sch B 低浓度 Sch B-L	5	35.43 ± 0.12 <sup>a,b</sup>	82.92 ± 0.20 <sup>a,b</sup>	9.72 ± 0.05 <sup>a,b</sup>
Sch B 中浓度 Sch B-M	10	26.64 ± 0.11 <sup>a,b</sup>	79.94 ± 0.23 <sup>a,b</sup>	8.22 ± 0.09 <sup>a,b</sup>
Sch B 高浓度 Sch B-H	15	24.86 ± 0.20 <sup>a,b</sup>	70.57 ± 0.19 <sup>a,b</sup>	7.79 ± 0.11 <sup>a,b</sup>

注:与对照组相比,<sup>a</sup>*P* = 0.000;与模型组相比,<sup>b</sup>*P* = 0.000。

Note: Compare with control group, <sup>a</sup>*P* = 0.000; Compare with model group, <sup>b</sup>*P* = 0.000.

### 3.3 Sch B 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤肝细胞 SOD 的影响

由表 3 可见, L02 细胞以 0.4 mmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 6h, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组培养上清液中的 SOD 活力显著降低 (*P* < 0.05)。不同浓度的 Sch B (5 ~ 15 μmol/L) 均能显著提高过氧化氢损伤肝细胞中的 SOD 活性 (*P* < 0.05), 随着 Sch B 的剂量增加, SOD 活性也随之增加。

表 3 Sch B 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤细胞 SOD 的影响 (*n* = 6,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Sch B increased SOD of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidized L02 cells (*n* = 6,  $\bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 Dose (μmol/L)	SOD 值 SOD value (U/ml)
正常对照组 normal	-	12.46 ± 0.11
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 模型组 model	-	3.56 ± 0.09 <sup>a</sup>
Sch B 低浓度 Sch B-L	5	4.17 ± 0.08 <sup>a,b</sup>
Sch B 中浓度 Sch B-M	10	6.03 ± 0.13 <sup>a,b</sup>
Sch B 高浓度 Sch B-H	15	7.15 ± 0.12 <sup>a,b</sup>

注:与对照组相比,<sup>a</sup>*P* = 0.000;与模型组相比,<sup>b</sup>*P* = 0.000。

Note: Compare with control group, <sup>a</sup>*P* = 0.000; Compare with model group, <sup>b</sup>*P* = 0.000.

## 4 讨论

五味子乙素具有显著的抗氧化作用, 对多器官均能起到保护作用<sup>[3]</sup>; Sch B 可以作用于 ROS 通路, 阻断 NADPH 的作用, 从而降低高血糖小鼠的肾系膜细胞所受到的损伤<sup>[8]</sup>; Sch B 亦可以显著降低由阿霉素所导致的小鼠血清心肌酶的改变, 显著增加心肌组织中与氧自由基相关酶的活性, 增强氧自由基清除系统的功能, 明显降低氧自由基作用于脂质生成的脂质过氧化物 MDA 的含量, 从而减轻氧自由基对心肌的损伤, 还明显减轻阿霉素引起的心肌超微结构的改变, 延长小鼠寿命, 改善阿霉素急性心肌损伤大鼠的心功能, 通过其抗氧化作用减轻心脏毒性的功能, 起到抗衰老作用<sup>[9]</sup>。

根据 Harman 的自由基理论, 过多的自由基会对机体的许多器官造成损伤, 如肝脏、脾脏、脑等, 尤其是肝脏最易遭受自由基的攻击, 导致其细胞膜发生脂类过氧化作用。由于细胞膜中富含多不饱和脂

肪酸, 极易受自由基攻击, 发生脂质过氧化反应, 反应的终产物 MDA 可直接弥散入细胞内与各种成分相互作用。氧自由基亦可攻击膜磷脂中的多不饱和脂肪酸, 引发膜脂质过氧化链式反应, 因而使双链脂肪酸聚合生成 MDA, 后者进入膜磷脂的水相, 和膜蛋白、膜磷脂上的 NH<sub>2</sub> 交联形成 Schiff 碱, Schiff 碱会使细胞膜变硬, 膜流动性降低, 通透性增加, 进而导致膜的功能损伤或丧失、肝细胞释放大量 LDH、AST 等。因此, MDA 的高低可以间接反映机体细胞受自由基攻击的严重程度。

在正常生理状态下, 生物体内存在着一定数量的自由基, 适量自由基对细胞的分裂、生长、消炎、解毒等起积极作用; 机体自身的抗氧化酶系 SOD、GSH-Px 以及 CAT 等能及时地清除多余的自由基, 维持体内自由基的动态平衡。SOD 是体内清除自由基、抑制自由基反应的酶系之一, 它能催化自由基的歧化反应、抑制黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤氧化酶、清除超氧阴离子自由基等, 阻止自由基与膜脂质和膜蛋白的反应, 从而保护细胞免受损伤。SOD 活力的高低间接反映了自由基被清除的程度和脂质过氧化的降低程度。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是一种常用的氧化剂, 细胞在接触 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 后会产生了大量的自由基, 进而打破自身的氧化-抗氧化的平衡, 最终引起一系列病理过程。本研究采用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 制作体外诱导肝细胞氧化损伤模型, 选择培养上清液中 LDH、AST 活性、肝细胞 MDA 含量和 SOD 活力作为判断肝细胞损伤和 Sch B 保护作用的检测指标。本研究中 L02 细胞在受到 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后 MDA 含量反应性增高, 表明自由基引起机体内生物膜上不饱和脂类的快速氧化。

实验结果表明, 不同浓度的 Sch B 不仅可以使 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致的 LDH 水平、AST 水平和 MDA 含量升高呈剂量依赖性降低, 而且可使 SOD 活力有所恢复, 可明显改善肝细胞的损伤, 并且对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 导致的肝细胞增殖率降低有恢复作用。从实验结果可知, Sch B 各剂量组中 MDA 的含量均低于模型对照组 (*P* < 0.01), 说明 Sch B 可以显著降低过氧化氢引起的

MDA 异常增高,这表明 Sch B 对自由基引起的生物膜脂质过氧化反应有抑制作用;实验亦表明 Sch B 处理组 L02 细胞的抗氧化酶活力有所增强,可能是 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 产生的过多自由基引发。这些结果都可能与 Sch B 的抗氧化作用相关,但 Sch B 在体内是否有类似的药理学效应仍需进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission (国家药典委员会). Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典). Beijing: China Medical Science Press, 2010. Vol I, 11.
- 2 Li XG(李晓光), Gao Q(高勤), Weng W(翁文), *et al.* 五味子有效部位及其药理作用研究进展. *J Chin Med Mater* (中药材), 2005, 28: 156-159.
- 3 Chiu PY, Ko KM. Time dependent enhancement in mitochondrial glutathione status and ATP generation capacity by schisandrin B treatment decrease the susceptibility of rat heart to ischemia-reperfusion injury. *Bio Factors*, 2003, 19(1-2): 43-51.
- 4 Chiu PY, Leung HY, Poon MK, *et al.* Chronic schisandrin B

treatment improves mitochondrial antioxidant status and tissue heat shock protein production in various tissues of young adult and middle-aged rats. *Biogerontology*, 2006, 7: 199-210.

- 5 Cozzi R, Ricordy R, Aglitti T, *et al.* Ascorbic acid and B-carotene as modulators of oxidative damage. *Carcinogenesis*, 1997, 18: 223-228.
- 6 Ji XY, Tan BK, Zhu YC, *et al.* Comparison of cardioprotective effects using ramipril and DanShen for the treatment of acute myocardial infarction in rats. *Life Sci*, 2003, 73: 1413-1426.
- 7 Zhu B, Liu GT. Cytotoxic effect of hydrogen peroxide on primary cultured rat hepatocytes and its mechanisms. *Chin J Pharm Toxicol*, 1996, 10: 260-266.
- 8 Jeong SI, Kim SJ, Kwon TH, *et al.* Schizandrin prevents damage of murine mesangial cells via blocking NADPH oxidase-induced ROS signaling in high glucose. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50: 1045-1053.
- 9 Chiu PY, Mak DH, Poon MK, *et al.* Role of cytochrome P-450 in schisandrin B-induced antioxidant and heat shock responses in mouse liver. *Life Sci*, 2005, 77: 2887-2895.

(上接第 749 页)

- 3 Hokputsa S, Gerddit W, Pongsamart S, *et al.* Water-soluble polysaccharides with pharmaceutical importance from Durian rinds (*Durio zibethinus* Murr.): isolation, fractionation, characterization and bioactivity. *Carbohydr Polym*, 2004, 56: 471-481.
- 4 Lee JM, Kwon H, Jeong H, *et al.* Inhibition of lipid peroxidation and oxidative DNA damage by *Ganoderma lucidum*. *Phytother Res*, 2001, 15: 245-249.
- 5 Wang WP, Guo SY, Li L, *et al.* Isolation, purification and anticomplement activity of water-soluble polysaccharides from *Chaenomeles cathayensis*. *Food Sci*, 2008, 29: 120-124.
- 6 Wang WP, Guo SY, Li L, *et al.* Extraction, separation and structural analysis of water-soluble polysaccharides from *Chaenomeles cathayensis*. *J South China Univ Tech*, 2008, 36: 128-133.
- 7 Dourado F, Madureira P, Carvalho V, *et al.* Purification, structure and immunobiological activity of an arabinan-rich pectic polysaccharide from the cell walls of *Prunus dulcis* seeds. *Carbohydr Res*, 2004, 399: 2555-2566.
- 8 Xing JM, Li FF. Purification of aloe polysaccharides by using

aqueous two-phase extraction with desalination. *Nat Prod Res*, 2009, 23: 1424-1430.

- 9 Huang G, Chen Y, Wang X. Extraction and deproteinization of pumpkin polysaccharide. *Int J Food Sci Nutr*, 2011, 62: 568-571.
- 10 Dubois M, Gilles KA, Hamilton J, *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *J Anal Chem*, 1956, 8: 350-356.
- 11 Hokputsa S, Harding SE, Inggjerdigen K, *et al.* Bioactive polysaccharides from the stems of the Thai medicinal plant *Acanthus ebracteatus*; their chemical and physical features. *Carbohydr Polym*, 2004, 339: 753-762.
- 12 Nergard CS, Diallo D, Michaelsen TE, *et al.* Isolation, partial characterisation and immunomodulating activities of polysaccharides from *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. exWalp. *J Ethnopharmacol*, 2004, 91: 141-152.
- 13 Santhiya D, Subramanian S, Natarajan KA, *et al.* Surface chemical studies on sphalerite and galena using extracellular polysaccharides isolated from *Bacillus polymyxa*. *J Colloid Interf Sci*, 2002, 256: 237-248.