

地参结合酚提取物体外保肝作用

高春燕¹, 杨文艺², 洪玥², 张天阳², 李望², 李媛丽², 卢跃红^{1*}

(¹北方民族大学生物科学与工程学院 银川 750021

²大理大学公共卫生学院 云南大理 671000)

摘要 目的:通过体外 CCl₄ 损伤肝细胞模型,研究地参结合酚提取物的体外保肝作用。方法:采用 MTT 法测定细胞存活率,全自动生化分析仪测定 ALT、AST 和 LDH 的水平。采用试剂盒测定 MDA、SOD、GSH、TNF- α 、IL-6、IL-8 的水平 and Caspase-3 活化程度,流式细胞仪检测细胞凋亡。同时,采用线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)检测线粒体膜电位的变化,并对各检测指标进行相关性分析。结果:地参结合酚在干预剂量(0.2~1.6 mg/mL)范围无细胞毒性,能抑制 CCl₄ 导致的细胞存活率、SOD 和 GSH 的降低以及 MDA、ALT、AST、LDH、TNF- α 、IL-6、IL-8 和 Caspase-3 活化程度的升高;同时,能显著抑制 CCl₄ 引起的细胞凋亡和线粒体膜电位的降低。相关性分析结果显示,ALT、Caspase-3、TNF- α 、IL-6 和 IL-8 之间具有显著的正相关,GSH 和 SOD 与 ALT、Caspase-3、TNF- α 、IL-6、IL-8 之间具有显著的负相关。结论:地参结合酚通过抗氧化、抑制炎症反应和细胞凋亡及保护线粒体,发挥对 CCl₄ 损伤肝细胞的保护作用。

关键词 地参; 结合酚; 抗氧化; 炎症因子; 细胞凋亡; 线粒体膜电位

文章编号 1009-7848(2023)07-0119-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.07.013

肝脏疾病是最常见的慢性疾病,包括肝炎、肝硬化、纤维化和肝细胞癌,已成为死亡和疾病的首要原因之一^[1]。许多因素,如营养不足、病毒感染、酒精和药物依赖、异生物暴露和代谢性疾病,都参与了肝脏疾病的产生和进一步发展^[2]。根据全球疾病负担(GBD)相关数据,近年来因肝脏疾病而死亡的人数有二百多万,约占全球总死亡人数的百分之四^[3]。肝脏疾病正成为一个相当大的公共卫生负担。CCl₄ 是一种常用于肝损伤模型的化学制剂,经代谢产生活性氧自由基,进一步与细胞分子结合,诱导氧化应激反应的发生,从而导致细胞损伤、炎症和凋亡^[4]。据报道,植物酚类化合物可以改善氧化应激和炎症引起的肝损伤,并预防肝脏疾病的发生^[5-8]。

地参 (*Lycopus lucidus* Turcz.), 系唇形科 (Labiatae) 地笋属多年生草本植物,属云南高原特色食品资源,以大理剑川沙溪镇分布最为广泛,且品质最优。民间传统以炒食、做汤、油炸、腌渍食用为主。地参富含矿物质、有机酸、维生素、粗脂肪、

氨基酸和酚类化合物等营养成分^[9-12],具有降血糖^[13-14],降血脂^[13],抑制体外肿瘤细胞生长^[15],抗 D-半乳糖所致小鼠衰老^[16],提高免疫功能^[17],抑制消化酶^[18-19],抗氧化^[11-12,20-21],保肝^[7,22]等多方面生理功能。

植物多酚以游离和结合两种形式存在于植物体内,与游离酚相比,结合酚是与其它物质结合而存在的酚类化合物。前期研究显示^[11-12,20-21],地参结合酚含量丰富,主要含有的单体酚类化合物为咖啡酸,且具有显著的抗氧化活性,而肝损伤通常伴随着氧化损伤。本研究采用体外 CCl₄ 损伤肝细胞模型,通过细胞存活率和肝功能指标(ALT、AST 和 LDH)评价地参结合酚的体外保肝作用。同时,检测脂质过氧化产物、抗氧化指标(SOD 和 GSH)、炎症反应因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-8)、Caspase-3 活化程度、细胞凋亡及线粒体膜电位的变化,从抗氧化、抑制炎症反应和细胞凋亡,保护线粒体的角度揭示地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞的保护作用机制,以期地为地参功能食品的开发提供理论依据。

收稿日期: 2022-07-04

基金项目: 青年人才培养项目(2021KYQD37);国家自然科学基金项目(81960598,81660553)

第一作者: 高春燕,女,博士,教授

通信作者: 卢跃红 E-mail: 78645515@qq.com

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

地参,采于云南省剑川县沙溪镇;BRL 大鼠肝

细胞,中国科学院细胞库;Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒、Caspase-3 活性测试盒、细胞 MDA 测定试剂盒、总超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、还原型谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;TNF- α 、IL-8、IL-6 检测试剂盒,上海酶联生物科技有限公司;线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1),上海碧云天生物技术有限公司。

ELx800 全自动酶标仪,美国 Bio-Tek 基因有限公司;FACSCalibur 流式细胞仪,美国 Becton Dickinson 公司;日立-7180 生化分析仪,日本日立公司;TCS SP8 激光共聚焦显微镜,德国 Leica 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 地参结合酚的提取及纯化 按照文献[18]的方法提取地参结合酚并纯化。具体流程:地参粉末 5.0 g \rightarrow 80%的甲醇超声波辅助提取 3 次 \rightarrow 抽滤 \rightarrow 残渣以 4 mol/L NaOH 水解 4 h \rightarrow 调 pH 值至 1~2 \rightarrow 抽滤 \rightarrow 滤液用乙酸乙酯萃取 \rightarrow 合并乙酸乙酯相 \rightarrow 旋转蒸发 \rightarrow 浓缩液蒸馏水并定容 15 mL \rightarrow 加入 X-5 大孔树脂吸附 24 h \rightarrow 抽滤 \rightarrow 大孔树脂以 70%的乙醇解析 24 h \rightarrow 抽滤 \rightarrow 滤液旋蒸 \rightarrow 浓缩液真空冷冻干燥 \rightarrow 地参结合酚纯化物。

1.2.2 细胞毒性的测定 BRL 大鼠肝细胞悬液(2.5×10^4 /mL) \rightarrow 100 μ L/孔接种于 96 孔板(空白对照组加培养液) \rightarrow 培养 12 h \rightarrow 干预组加入 100 μ L 0.2~1.6 mg/mL 的地参结合酚溶液(先用 PBS 配制成质量浓度为 5 mg/mL,再用培养液稀释至各浓度),正常组和空白对照组加入 100 μ L 培养液 \rightarrow 培养 4 h \rightarrow 加入 20 μ L MTT 溶液(5 mg/mL) \rightarrow 培养 4 h \rightarrow 吸走上清液 \rightarrow 加入 150 μ L DMSO \rightarrow 避光低速振荡 15 min \rightarrow 测定吸光度值(490 nm) \rightarrow 计算细胞存活率。

1.2.3 细胞存活率的测定 按照 1.2.2 节方法种板 \rightarrow 培养 12 h \rightarrow 干预组加入 100 μ L 0.4~1.6 mg/mL 的地参结合酚溶液,正常组、损伤组和空白对照组加入 100 μ L 培养液 \rightarrow 培养 4 h \rightarrow 干预组和损伤组加入 40 μ L CCl_4 (100 mmol/L),正常组和空白对照组加入 40 μ L 培养液 \rightarrow 培养 3 h \rightarrow 测定细胞存活率。

1.2.4 ALT、AST 和 LDH 的测定 BRL 大鼠肝细胞悬液(5×10^4 /mL) \rightarrow 500 μ L/孔接种于 24 孔板 \rightarrow

培养 24 h \rightarrow 干预组加入 500 μ L 0.4~1.6 mg/mL 的地参结合酚溶液,正常组、损伤组和空白对照组加入 500 μ L 培养液 \rightarrow 培养 4 h \rightarrow 干预组和损伤组加入 200 μ L CCl_4 (100 mmol/L),正常组和空白对照组加入 200 μ L 培养液 \rightarrow 培养 3 h \rightarrow 离心 \rightarrow 收集上清 \rightarrow 测定。

1.2.5 MDA、SOD 和 GSH 的测定 根据试剂盒说明书操作,具体流程:按照 1.2.4 节方法培养各组细胞 \rightarrow 离心 \rightarrow 收集上清 \rightarrow 测定。MDA、SOD 和 GSH 的测定结果分别以 nmol/mL、U/mL 和 μ mol/L 表示。

1.2.6 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的测定 根据试剂盒说明书操作,具体流程:按照 1.2.4 节方法培养各组细胞 \rightarrow 裂解细胞 \rightarrow 离心 \rightarrow 收集上清 \rightarrow 测定。结果均表示为 pg/mL。以浓度(C)为横坐标,吸光度(A)为纵坐标,绘制标准曲线,得 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的标准曲线方程分别为 $A = 0.0042C + 0.0439$ ($R=0.9912$,线性范围为 0~320 pg/mL), $A = 0.0101C - 0.0101$ ($R=0.9995$,线性范围为 0~160 pg/mL)和 $A = 0.0069C + 0.0014$ ($R=0.9992$,线性范围为 0~240 pg/mL)。

1.2.7 细胞凋亡的检测 根据 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作,具体流程:按照 1.2.4 节方法培养各组细胞 \rightarrow 收集各孔细胞培养液 \rightarrow D-PBS 洗涤细胞 \rightarrow 胰酶消化细胞 1~2 min \rightarrow 加入对应各孔收集的细胞培养液 \rightarrow 混匀 \rightarrow 离心 \rightarrow 弃上清 \rightarrow 收集细胞 \rightarrow D-PBS 重悬细胞 \rightarrow 取 5×10^5 /mL 的细胞悬液 \rightarrow 离心 \rightarrow 弃上清 \rightarrow 加 500 μ L 结合液轻轻重悬细胞 \rightarrow 加入 5 μ L Annexin V-FITC \rightarrow 5 μ L 碘化丙啶 \rightarrow 混匀 \rightarrow 25 $^{\circ}\text{C}$ 暗室放置 10 min \rightarrow 流式细胞仪检测。

1.2.8 Caspase-3 活化程度的测定 按 Caspase-3 活性测试盒说明书操作,具体流程:按照 1.2.4 节方法培养各组细胞 \rightarrow 裂解细胞 \rightarrow 收集培养液 \rightarrow 离心 \rightarrow 取上清液 \rightarrow 测定。Caspase-3 活化程度以 $\text{OD}_{\text{样品}}/\text{OD}_{\text{空白对照}}$ 值来表示。

1.2.9 细胞膜电位的测定 根据试剂盒说明书操作,具体流程:按照 1.2.4 节方法培养各组细胞 \rightarrow 吸除培养液 \rightarrow PBS 洗涤细胞 \rightarrow 加入 1 mL 细胞培养液 \rightarrow 加入 1 mL JC-1 染色工作液 \rightarrow 混匀 \rightarrow 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min \rightarrow 吸弃上清 \rightarrow JC-1 染色缓冲液洗涤 2

次→加入 2 mL 细胞培养液→激光共聚焦显微镜拍照。

1.3 数据处理

各试验组分别设置 5 个复孔,数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用 SPSS 17.0 软件 ANOVA 进行差异统计学检验,采用 Pearson 对各检测指标的相关性进行分析。

2 结果与分析

2.1 细胞毒性

地参结合酚细胞毒性测定结果见表 1。在 0.2~1.6 mg/mL 干预范围,细胞存活率在 90.51%~92.27%,与正常组之间无统计学差异($P>0.05$),表明在该浓度范围,地参结合酚无细胞毒性,可以开展地参结合酚对肝细胞损伤保护作用的后续试验。

2.2 地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞细胞存活率、ALT、AST 和 LDH 的影响

地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞细胞存活率、ALT、AST 和 LDH 的影响见表 2。就细胞存活率而言,CCl₄ 损伤组比正常组下降了 74.48%;0.4,0.8,1.6 mg/mL 地参结合酚干预组比 CCl₄ 损伤组分别增加了 1.25,1.71 倍和 2.08 倍。就 ALT、AST 和

表 1 细胞毒性测定结果

组别	细胞存活率/%
正常组	92.71 ± 0.13 ^a
0.2 mg/mL 结合酚	90.51 ± 0.53 ^a
0.4 mg/mL 结合酚	91.20 ± 0.89 ^a
0.8 mg/mL 结合酚	90.79 ± 1.81 ^a
1.6 mg/mL 结合酚	92.27 ± 0.70 ^a

注:同一列相同字母表示不同组别间差异无统计学意义($P>0.05$)。

LDH 而言,CCl₄ 损伤组比正常组分别增加了 0.96, 2.57 倍和 1.13 倍;地参结合酚干预组与 CCl₄ 损伤组相比,均有不同程度的下降,且呈剂量效应关系。当干预剂量为 1.6 mg/mL 时,ALT、AST 和 LDH 的水平分别下降 41.13%,21.57%和 15.94%。

LDH 从细胞中的释放是对凋亡信号的回应,LDH 的水平是细胞凋亡的有效指标^[23]。同样,ALT 和 AST 是肝细胞功能受损的重要指标。ALT、AST 和 LDH 大量释放,进入细胞培养液,表明 CCl₄ 对肝细胞的损伤造成细胞膜功能的严重受损,使其通透性增加。地参结合酚预处理显著降低了 ALT、AST 和 LDH 的水平,表明其对体外 CCl₄ 损伤肝细胞具有显著的保护作用。

表 2 地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞细胞存活率、ALT、AST 和 LDH 的影响

Table 2 Effects of bound phenolics from *Lycopus lucidus* Turcz. on cell viability, ALT, AST and LDH in CCl₄-injured hepatocytes

组别	细胞存活率/%	ALT/ U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹
正常组	92.71 ± 0.13 ^a	1.62 ± 0.53 ^a	4.67 ± 0.58 ^a	75.33 ± 2.52 ^a
损伤组	23.66 ± 0.69 ^b	3.18 ± 0.35 ^{bc}	16.67 ± 1.15 ^b	160.33 ± 2.08 ^b
结合酚(0.4 mg/mL)干预组	53.24 ± 2.91 ^c	2.73 ± 0.11 ^{bcd}	14.33 ± 1.15 ^{bcd}	152.33 ± 0.58 ^c
结合酚(0.8 mg/mL)干预组	64.03 ± 0.42 ^d	2.25 ± 0.09 ^{cd}	14.00 ± 2.65 ^{cd}	146.00 ± 1.00 ^d
结合酚(1.6 mg/mL)干预组	72.82 ± 0.29 ^e	1.90 ± 0.22 ^{cd}	13.33 ± 1.15 ^{cd}	135.33 ± 2.52 ^c

注:同一列不同字母表示不同组别间差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞 MDA、GSH 和 SOD 水平的影响

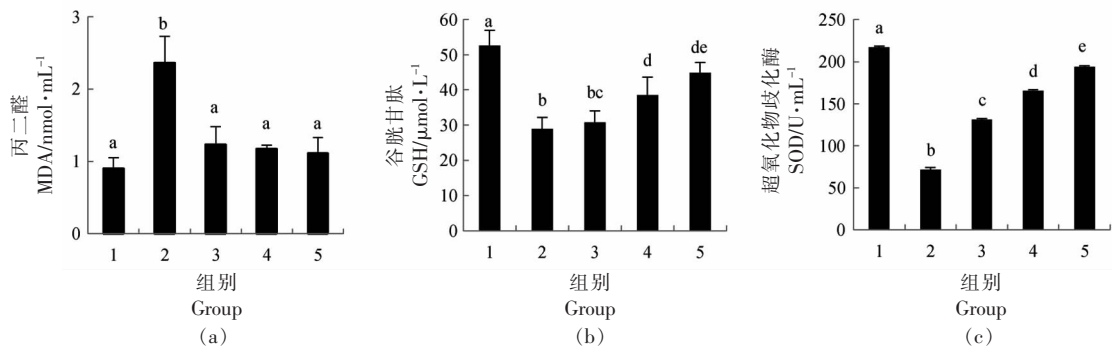
地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞 MDA、GSH 和 SOD 水平的影响见图 1。就 MDA 含量而言,CCl₄ 损伤组比正常组增加了 1.61 倍;0.4,0.8,1.6 mg/mL 地参结合酚干预组比 CCl₄ 损伤组分别减少了 47.76%,50.31%和 52.83%。就 GSH 和 SOD 含

量而言,CCl₄ 损伤组比正常组分别下降了 45.12%和 67.18%;地参结合酚干预组与 CCl₄ 损伤组相比,均有不同程度的上升,且呈现剂量效应关系。当干预剂量为 1.6 mg/mL 时,GSH 和 SOD 的水平分别增加了 55.56%和 172.01%。

CCl₄ 通过自由基和过氧化作用引起肝细胞的损伤,其产生的反应代谢性自由基攻击并破坏多

不饱和脂肪酸,尤其是那些与磷脂相关的脂肪酸,进而导致肝细胞中的脂质过氧化^[24],可对其终产物 MDA 的含量进行表征。SOD 通过催化 ROO·与质子结合,进一步形成过氧化氢和氧,从而促进 ROO·的分解^[25]。GSH 对 CCl₄ 毒性衍生物的解毒有很大贡献,当 GSH 存储明显耗尽时,肝细胞坏死开始^[26]。CCl₄ 损伤组 MDA 含量显著增加,GSH 和

SOD 含量显著下降,表明肝细胞脂质过氧化程度严重,细胞处于氧化损伤状态。地参结合酚抑制了 CCl₄ 损伤引起的肝细胞 MDA 的增加和 GSH 和 SOD 的下降,表明其抑制了肝细胞的脂质过氧化,提高了抗氧化酶的活性,从而发挥对肝细胞损伤的保护作用。



注:1:正常组;2:损伤组;3~5:分别为0.4,0.8,1.6 mg/mL地参结合酚干预组;图2、图4、图5同。

图1 地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞 MDA、SOD 和 GSH 水平的影响

Fig.1 Effects of bound phenolics from *Lycopus lucidus* Turcz. on the levels of MDA, SOD and GSH in CCl₄-injured hepatocytes

2.4 地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞 TNF-α、IL-6 和 IL-8 水平的影响

地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞 TNF-α、IL-6 和 IL-8 水平的影响见图 2。CCl₄ 损伤组与正常组相比,TNF-α、IL-6 和 IL-8 的水平分别增加了 95.61%,75.87%和 41.89%。地参结合酚干预组与 CCl₄ 损伤组相比,TNF-α、IL-6 和 IL-8 水平均显著下降,且呈现剂量效应关系。当地参结合酚干预剂量为 1.6 mg/mL 时,TNF-α、IL-6 和 IL-8 水平

分别下降了 41.72%,21.49%和 21.59%。

CCl₄ 产生的活性氧(ROS)激活了肝细胞内在免疫系统和 Kupff 细胞,通过产生更多的 ROS 和前炎症细胞因子加剧了肝细胞的炎症损伤^[27]。肿瘤坏死因子(TNF-α)作为 CCl₄ 介导的肝损伤炎症介质,刺激细胞因子从巨噬细胞中释放出来,并诱发吞噬细胞的氧化代谢和 NO 的产生^[28]。NO 是反应活性更高的氧化物,它由 iNOS 产生,通过与 ROS 反应和形成过氧亚硝基增强了氧化应激^[29]。

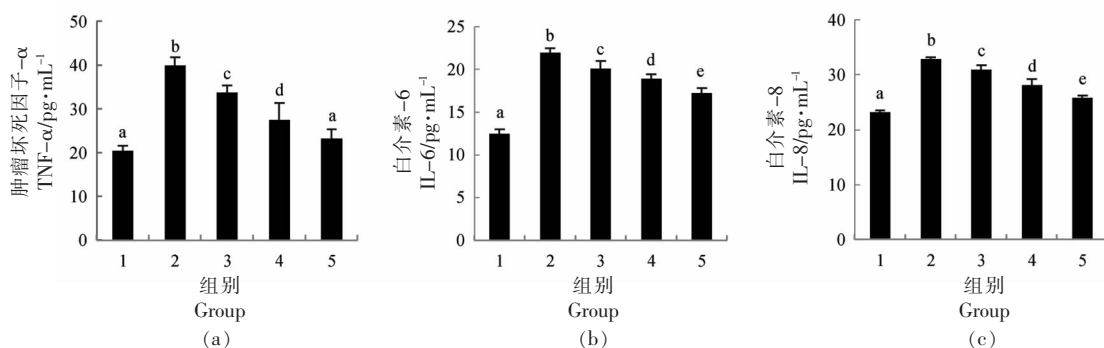


图2 地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞 TNF-α、IL-6 和 IL-8 水平的影响

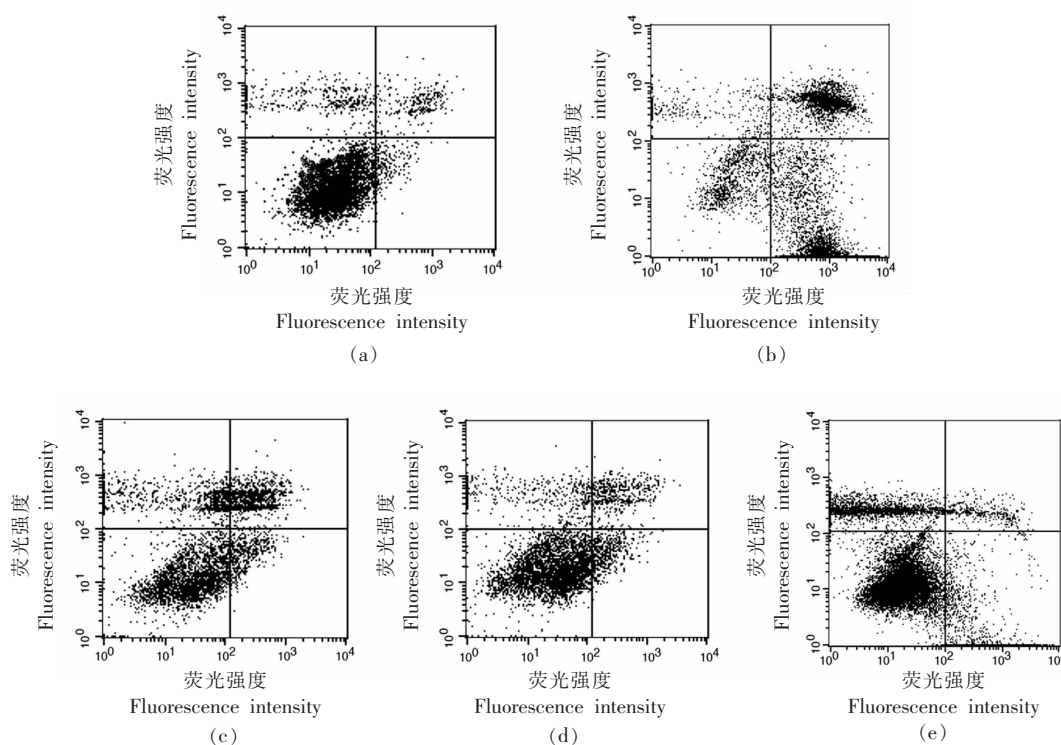
Fig.2 Effects of bound phenolics from *Lycopus lucidus* Turcz. on TNF-α, IL-6 and IL-8 levels in CCl₄-injured hepatocytes

TNF- α 还可引起许多与肝细胞损伤有关的第二介质,如 IL-1 β 、IL-6、IL-8 及蛋白酶等的出现。CCl₄ 损伤组 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 水平的显著提升,表明肝细胞发生严重的炎症反应,地参结合酚干预组 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 水平的显著下降,表明地参结合酚抑制炎症反应,从而发挥对肝细胞损伤的保护作用。

2.5 地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞凋亡的影响

地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞凋亡的影响见图 3。图中左下象限为正常细胞,左上象限为坏死细胞,右下象限为早期凋亡细胞,右上象限为晚期凋亡细胞。CCl₄ 损伤组(图 3b)与正常组(图 3a)相比,正常细胞显著减少,凋亡细胞显著增加;地参结合酚干预组(图 3c、3d 和 3e)与 CCl₄ 损伤组

相比,随着干预剂量的增加,正常细胞逐渐增多,凋亡细胞逐渐减少。定量分析结果(图 4)表明,CCl₄ 损伤组与正常组相比,正常细胞减少了 38.48%,坏死细胞、早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞分别增加了 22.99%、234.54%和 140.39%,表明 CCl₄ 导致肝细胞的坏死和凋亡。地参结合酚干预组与 CCl₄ 损伤组相比,干预剂量为 0.4、0.8 mg/mL 和 1.6 mg/mL 时,正常细胞分别增加了 29.07%、41.37%和 49.83%,坏死细胞分别减少了 34.34%、9.66%和 3.62%,早期凋亡细胞分别减少了 29.87%、52.22%和 56.87%,晚期凋亡细胞分别减少了 25.81%、45.55%和 53.06%,这表明地参结合酚在一定程度上可以降低细胞凋亡率,抑制肝细胞坏死,从而发挥对肝细胞损伤的保护作用。



注:a:正常组;b:损伤组;c~e:分别为 0.4、0.8、1.6 mg/mL 地参结合酚干预组。

图 3 地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞凋亡的影响

Fig.3 Effects of bound phenolics from *Lycopus lucidus* Turcz. on CCl₄-injured hepatocyte apoptosis

2.6 地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞 Caspase-3 活化程度的影响

地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞 Caspase-3 活化程度的影响见图 5。CCl₄ 损伤组与正常组相比,Caspase-3 活化程度增加了 44.87%。地参结合酚

干预组与 CCl₄ 损伤组相比,干预剂量为 0.4、0.8 mg/mL 和 1.6 mg/mL 时,Caspase-3 活化程度分别减少了 14.16%、15.49%和 18.58%。

Caspase-3,又称为胱氨酸蛋白酶 3,参与细胞凋亡的执行,是细胞凋亡的效应者。异源活化后的

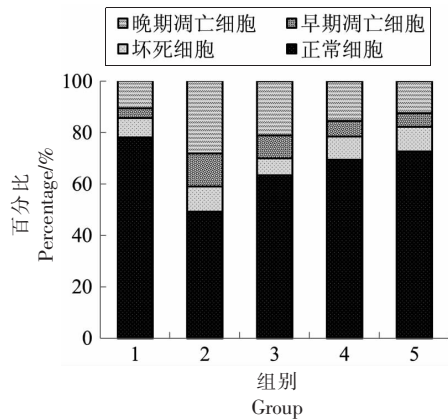


图 4 肝细胞凋亡的定量分析

Fig.4 Quantitative analysis of the hepatocyte apoptosis

Caspase-3 酶解切割胞内重要的蛋白质,使 DFF-45(DNA fragmentation factor-45)、DNA 依赖的蛋白激酶 (DNA-PK)、多聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP, poly (ADP-ribose) polymerase) 降解^[30],从而阻止 DNA 的修复,并导致 DNA 的降解,致细胞凋亡。Caspase-3 的活化程度可以反映细胞凋亡的情况。试验结果显示,CCl₄ 使细胞发生明显的凋亡,而地参结合酚可通过阻滞 Caspase-3 的活化,抑制细胞凋亡。

2.7 相关性分析

为了进一步研究所检测各指标间的关联,进行相关性分析,结果见图 6。ALT、Caspase-3、TNF- α 、IL-6 和 IL-8 之间具有显著的正相关性,这与崔健娇等^[31]研究结果一致,表明 CCl₄ 损伤肝细胞使转氨酶释放并伴随着炎症反应和细胞的凋亡。相反,GSH 和 SOD 与 ALT、Caspase-3、TNF- α 、IL-6、IL-8 间具有显著的负相关性,表明地参结合酚通过抗氧化作用抑制 CCl₄ 引起的肝细胞的炎症反应和凋亡,从而发挥保护肝细胞损伤的作用。

2.8 地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 的影响

地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞 $\Delta\Psi_m$ 的影响见图 7。正常细胞 $\Delta\Psi_m$ 较高,JC-1 以聚合物的形式存在于线粒体中,可以显示红色荧光(图 7A); CCl₄ 产生的自由基和脂质过氧化导致线粒体 DNA 的消耗和损伤以及超微结构的改变^[32],进而导致 $\Delta\Psi_m$ 的降低,此时 JC-1 以单体(Monomer)

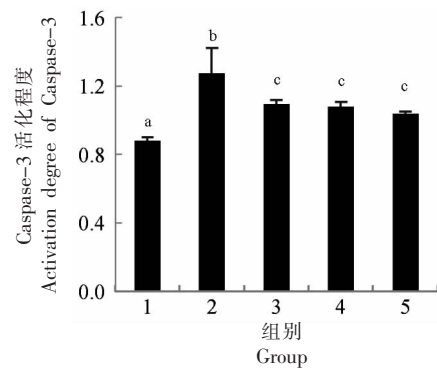
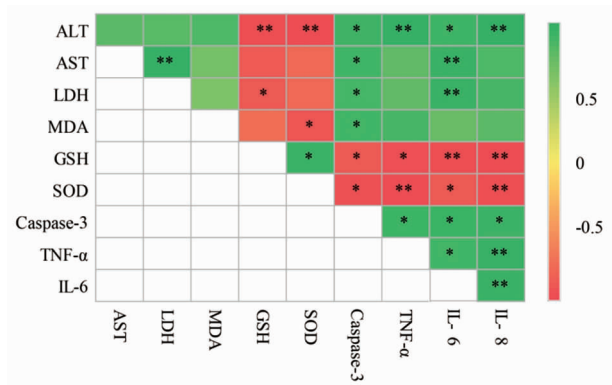


图 5 地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞 Caspase-3 活化程度的影响

Fig.5 Effects of bound phenolics from *Lycopus lucidus* Turcz. on the activation of Caspase-3 in CCl₄-injured hepatocytes



注: * P < 0.05; ** P < 0.01.

图 6 相关性分析热图

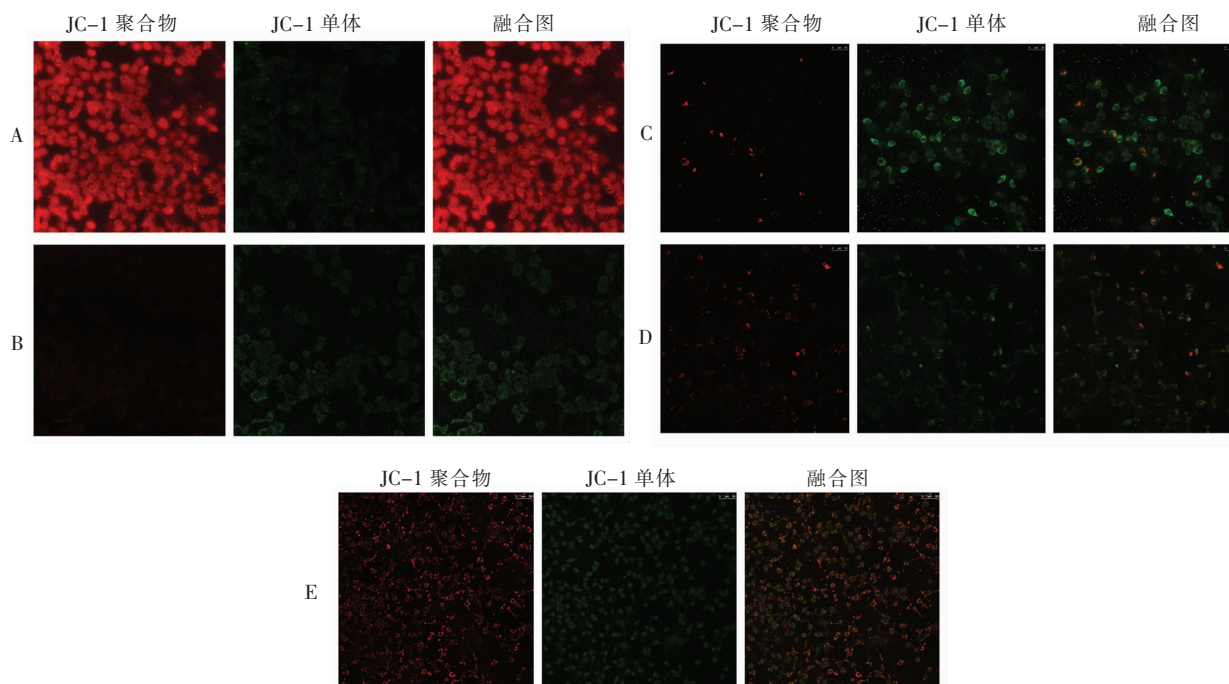
Fig.6 Heatmap of correlation analysis

的形式存在,可以显示绿色荧光(图 7B)。线粒体膜电位的显著降低意味着膜通透性和完整性受到严重损害^[32]。线粒体通透和功能障碍,使线粒体上的膜透过性转换孔开放,释放出大量的促凋亡蛋白和细胞色素 C^[33],进一步诱发细胞的凋亡^[34]。试验结果表明,地参结合酚随着干预浓度的升高,红色荧光逐渐加强(图 7C~7E),提示地参结合酚干预可显著抑制 CCl₄ 诱导的 $\Delta\Psi_m$ 的降低,稳定线粒体的功能,同时具有抑制肝细胞凋亡的作用,这与 Caspase-3 活化程度的测定结果一致。

细胞凋亡受到两条基本途径的调控:死亡受体介导的(外源性)途径和线粒体(内源性)途径^[35]。在外源性途径中,配体与死亡受体(DR)之间的相互作用始于质膜,然后激活 Caspase-8,从

而直接激活 Caspase-3 的下游作用^[36]。在内源性途径中,细胞凋亡使线粒体外膜的通透性增加,从而将溶解的蛋白从线粒体内部释放到细胞质中,进

一步激活 Caspase 破坏细胞^[37]。试验结果显示,地参结合酚通过抑制 Caspase-3 的活化和保护线粒体抑制 CCl₄ 引起的肝细胞的凋亡。



注:A:正常组;B:损伤组;C~E:分别为0.4,0.8,1.6 mg/mL地参结合酚干预组。

图 7 地参结合酚对 CCl₄ 损伤肝细胞线粒体膜电位的影响

Fig.7 Effects of bound phenolics from *Lycopus lucidus* Turcz. on mitochondrial membrane potential in CCl₄-injured hepatocytes

3 结论

地参结合酚在干预剂量范围无细胞毒性,能抑制 CCl₄ 导致的细胞存活率、MDA、SOD 和 GSH 的降低,以及 ALT、AST、LDH、TNF- α 、IL-6、IL-8 和 Caspase-3 活化程度的升高;同时,能显著降低 CCl₄ 引起的细胞凋亡和线粒体膜电位的降低。相关性分析结果显示,ALT、Caspase-3、TNF- α 、IL-6 和 IL-8 之间具有显著正相关,GSH 和 SOD 与 ALT、Caspase-3、TNF- α 、IL-6、IL-8 之间具有显著负相关。研究结果表明,CCl₄ 损伤肝细胞产生了氧化损伤,并伴随着炎症反应、细胞凋亡和线粒体膜电位的改变。地参结合酚通过抗氧化、抑制炎症反应和细胞凋亡及保护线粒体的功能,发挥对 CCl₄ 损伤肝细胞的保护作用。今后可从信号转导通路揭示其抗氧化、抑制炎症反应和细胞凋亡的分子机制,为开发地参保肝功能性食品提供理论参考。

参 考 文 献

- [1] XIAO J, WANG F, WONG N K, et al. Global liver disease burdens and research trends: Analysis from a Chinese perspective[J]. *Journal of Hepatology*, 2019, 71(1): 212-221.
- [2] BHATIA V, SINGHAL A, PANDA S K, et al. A 20-year single-center experience with acute liver failure during pregnancy: Is the prognosis really worse?[J]. *Hepatology*, 2008, 48(5): 1577-1585.
- [3] BYASS P. The global burden of liver disease: A challenge for methods and for public health[J]. *BMC Medicine*, 2014, 12: 159.
- [4] SUN F, HAMAGAWA E, TSUTSUI C, et al. Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by carbon tetrachloride in rat liver

- [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2001, 1535(2): 186–191.
- [5] BAYRAM H M, MAJOO F M, OZTURKCAN A. Polyphenols in the prevention and treatment of non-alcoholic fatty liver disease: An update of preclinical and clinical studies[J]. *Clinical Nutrition ESPEN*, 2021, 44: 1–14.
- [6] MAALEJ A, MAHMOUDI A, BOUALLAGUI Z, et al. Olive phenolic compounds attenuate deltamethrin-induced liver and kidney toxicity through regulating oxidative stress, inflammation and apoptosis[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 106: 455–465.
- [7] LU Y H, TIAN C R, GAO C Y, et al. Protective effect of free phenolics from *Lycopus lucidus* Turcz. root on carbon tetrachloride-induced liver injury *in vivo* and *in vitro*[J]. *Food & Nutrition Research*, 2018, 62: 1398.
- [8] QUITETE F T, ALMEIDA SANTOS G M, DE OLIVEIRA RIBEIRO L, et al. Phenolic-rich smoothie consumption ameliorates non-alcoholic fatty liver disease in obesity mice by increasing antioxidant response [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2021, 336(1): 109369.
- [9] 张荣平, 周宁娜, 罗天浩, 等. 地参中氨基酸、粗蛋白和元素分析[J]. *中医药研*, 1998, 14(5): 52–53. ZHANG R P, ZHOU N N, LUO T H, et al. Analysis of amino acids, crude protein and elements in *Lycopus lucidus* Turcz.[J]. *Research of Traditional Chinese Medicine*, 1998, 14(5): 52–53.
- [10] 许泳吉, 钟惠民, 杨波, 等. 野生植物地参中营养成分的测定[J]. *光谱实验室*, 2003, 20(4): 528–529. XU Y J, ZHONG H M, YANG B, et al. Determination of nutrients in wild *Lycopus lucidus* Turcz.[J]. *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory*, 2003, 20(4): 528–529.
- [11] LU Y H, HUANG J H, LI C, et al. Variation in nutritional compositions, antioxidant activity and microstructure of *Lycopus lucidus* Turcz. root at different harvest times [J]. *Food Chemistry*, 2015, 183(17): 91–100.
- [12] LU Y H, TIAN C R, GAO C Y, et al. Nutritional profiles, phenolics and DNA damage protective effect of *Lycopus lucidus* Turcz. root at different harvest times[J]. *International Journal of Food Properties*, 2017(20): S3062–S3077.
- [13] 熊伟, 陈贵元, 谭德勇, 等. 野生地参多糖对四氧嘧啶致糖尿病小鼠血糖和血脂的影响[J]. *生物加工过程*, 2011, 9(6): 45–48. XIONG W, CHEN G Y, TAN D Y, et al. Effects of wild *Lycopus lucidus* Turcz. polysaccharide on blood glucose and lipid of alloxan induced diabetic mice[J]. *Biological Processes*, 2011, 9(6): 45–48.
- [14] 熊伟, 谭德勇, 陈贵元, 等. 地参多糖对正常及实验性糖尿病小鼠血糖的影响实验研究[J]. *生命科学仪器*, 2010, 8(10): 64–66. XIONG W, TAN D Y, CHEN G Y, et al. Research of polysaccharide from *L. lucidus* Turcz on hypoglycemic effect in mouse[J]. *Journal of Life Science Instrument*, 2010, 8(10): 64–66.
- [15] 熊伟, 焦扬, 罗永会, 等. 地参多糖对实验肿瘤细胞体内外增殖的影响[J]. *生物加工过程*, 2012, 10(4): 64–69. XIONG W, JIAO Y, LUO Y H, et al. Effects of polysaccharide from *Lycopus lucidus* Turcz. on proliferation of tumor cells *in vitro* and *in vivo*[J]. *Biological Processes*, 2012, 10(4): 64–69.
- [16] 林春榕, 左绍远, 熊伟, 等. 地参多糖对D-半乳糖所致衰老小鼠的抗氧化作用研究[J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(18): 9646–9647. LIN C R, ZUO S Y, XIONG W, et al. Antioxidation effects of *Lycopus lucidus* polysaccharides on aged mice induced by D-galactose[J]. *Anhui Agricultural Science*, 2012, 40(18): 9646–9647.
- [17] 熊伟, 谭德勇, 陈贵元, 等. 地参多糖对小鼠免疫功能影响的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(1): 11–13. XIONG W, TAN D Y, CHEN G Y, et al. *Lycopus lucidus* polysaccharide on the immune function of mice with experimental study[J]. *Shi Zhen Chinese Medicine*, 2011, 22(1): 11–13.
- [18] 杨文艺, 高春燕. 地参结合酚提取物对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的抑制作用[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(23): 111–116. YANG W Y, GAO C Y. Inhibitory effects of bound phenolic extracts from *Lycopus lucidus* Turcz. on α -glucosidase and pancreatic lipase[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2018, 39(23): 111–116.
- [19] 孔霄, 高春燕. 地参游离酚对 α -葡萄糖苷酶和胰脂肪酶的抑制作用研究[J]. *中国预防医学杂志*, 2018, 19(8): 564–568. KONG X, GAO C Y. Inhibitory effects of free phe-

- nolic extracts from *Lycopus lucidus* Turcz. on α -glucosidase and pancreatic lipase[J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2018, 19(8): 564–568.
- [20] 郭琦, 高春燕. 硬毛地笋酚类化合物对 DNA 损伤的保护作用. 食品科学, 2018, 39(23): 54–59.
- GUO Q, GAO C Y. Protective effect of phenolic compounds from *Lycopus lucidus* Turcz. on DNA Damage[J]. Food Science, 2018, 39(23): 54–59.
- [21] 郭琦, 高春燕. 地参酚类化合物对亚硝酸盐的清除作用[J]. 食品工业科技, 2017, 38(19): 57–62.
- GUO Q, GAO C Y. Nitrite scavenging effect of phenolic compounds from *Lycopus lucidus* Turcz.[J]. Science and Technology of Food Industry, 2017, 38(19): 57–62.
- [22] 孔霄. 地参游离酚对体外肝细胞损伤保护作用的研究[D]. 大理: 大理大学, 2019.
- KONG X. Study on the protective effect of free phenolics from *Lycopus lucidus* Turcz. on hepatocyte injury *in vitro*[D]. Dali: Dali University, 2019.
- [23] MA T T, SUN X Y, TIAN C R, et al. Chemical composition and hepatoprotective effects of polyphenols extracted from the stems and leaves of *Sphallerocarpus gracilis* [J]. Journal of Functional Foods, 2015, 18: 673–683.
- [24] WEBER L W, BOLL M, STAMPFL A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model[J]. Carbon Tetrachloride as a Toxicological Model, 2003, 33: 105–136.
- [25] SZYMONIK-LESIUK S, CZECHOWSKA G, STRYJECKA-ZIMMER M, et al. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication[J]. Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences, 2003, 10: 309–315.
- [26] LEE K J, CHOI H J, JEONG H G. Hepatoprotective and antioxidant effects of the coffee diterpenes kahweol and cafestol on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice[J]. Food & Chemical Toxicology, 2007, 45(11): 2118–2125.
- [27] KIM H, PARK J, LEE K, et al. Ferulic acid protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice[J]. Toxicology, 2011, 282(3): 104–111.
- [28] MORIO L A, CHIU H, SPROWLES K A, et al. Distinct roles of tumor necrosis factor- α and nitric oxide in acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice[J]. Toxicology & Applied Pharmacology, 2001, 172(1): 44–51.
- [29] NIU X F, LIU F, LI W F, et al. Hepatoprotective effect of fraxin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity *in vitro* and *in vivo* through regulating hepatic antioxidant, inflammation response and the MAPK-NF- κ B signaling pathway[J]. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie, 2017, 95: 1091–1102.
- [30] 董雅洁, 高维娟. bcl-2, bax, caspase-3 在细胞凋亡中的作用及其关系[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(21): 3.
- DONG Y J, GAO W J. The role of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in apoptosis and its relationship[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2012, 32(21): 3.
- [31] 崔健娇, 赵文霞. 中医药抗非酒精性脂肪性肝炎炎症因子研究现状[J]. 中医临床研究, 2015, 7(20): 139–140, 143.
- CUI J J, ZHAO W X. A review on TCM medicine against nonalcoholic hepatitis inflammatory factors[J]. Clinical Research of Traditional Chinese Medicine, 2015, 7(20): 139–140, 143.
- [32] VOLKMANN N, MARASSI F M, NEWMYER D D, et al. The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis[J]. Cell Death & Differentiation, 2014, 21(2): 206–215.
- [33] TIAN Z X, JIA H Y, JIN Y Z, et al. Chrysanthemum extract attenuates hepatotoxicity via inhibiting oxidative stress *in vivo* and *in vitro*[J]. Food & Nutrition Research, 2019, 63: 1667.
- [34] KNOCKAERT L, BERSON A, RIBAUT C, et al. Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver [J]. Laboratory Investigation, 2012, 92(3): 396–410.
- [35] LAVRIK I N. Systems biology of apoptosis signaling networks[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2010, 21(4): 551–555.
- [36] FERRÍN G, LINARES C I, MUNTANÉ J. Mitochondrial drug targets in cell death and cancer[J]. Current Pharmaceutical Design, 2011, 17(20): 2002–2016.
- [37] REUSCHE N, BEINEKE A, URHAUSEN C, et al. Proliferative and apoptotic changes in the healthy canine endometrium and in cystic endometrial hyperplasia[J]. Theriogenology, 2018, 114: 14–24.

Hepatoprotective Effect of Bound Phenolics from *Lycopus lucidus* Turcz. *in Vitro*

Gao Chunyan¹, Yang Wenyi², Hong Yue², Zhang Tianyang², Li Wang², Li Yuanli², Lu Yuehong^{1*}

(¹College of Biological Science and Engineering, North Minzu University, Yinchuan 750021

²College of Public Health, Dali University, Dali 671000, Yunnan)

Abstract Objective: The hepatoprotective effect of bound phenolics from *Lycopus lucidus* Turcz. was investigated using an *in vitro* CCl₄-induced hepatocyte damage model. Methods: The cell viability was determined by MTT method and the levels of ALT, AST and LDH were determined using a clinical automatic biochemical analyzer. The levels of MDA, SOD, GSH, TNF- α , IL-6, IL-8 and the activation of Caspase-3 were measured by kits. Meanwhile, apoptosis was determined by flow cytometry and the change of mitochondrial membrane potential was detected using a mitochondrial membrane potential assay kit with JC-1. Correlation analysis was carried out by Pearson correlation program. Results: The results showed that no cytotoxicity was found of the bound phenolics from *Lycopus lucidus* Turcz. within the tested dose range (0.2~1.6 mg/mL). The bound phenolics inhibited the CCl₄-induced reduction of cell viability, SOD and GSH. Meanwhile, the bound phenolics pretreatment reduced the CCl₄-induced elevation of MDA, ALT, AST, LDH, TNF- α , IL-6, IL-8 and Caspase-3 activation. Moreover, the bound phenolics pretreatment significantly improved the apoptosis and the decrease of mitochondrial membrane potential caused by CCl₄. The results of the correlation analysis showed a significant positive correlation was observed between ALT, Caspase-3, TNF-, IL-6, and IL-8, and a significant negative correlation was found between GSH and SOD and ALT, Caspase-3, TNF-, IL-6, and IL-8. Conclusions: The bound phenolics from *Lycopus lucidus* Turcz. exerted a protective effect against CCl₄-damaged hepatocytes through antioxidation, inhibition of inflammatory response and apoptosis and protection of mitochondria.

Keywords *Lycopus lucidus* Turcz.; bound phenolics; antioxidation; inflammatory factors; cell apoptosis; mitochondrial membrane potential