

# 藏药“松蒂”(篦齿虎耳草)中黄酮类成分对 L02 肝细胞氧化损伤的影响

费曜<sup>1</sup>, 段恒<sup>1</sup>, 牛亚珍<sup>1</sup>, 钟国跃<sup>2</sup>(1. 重庆医科大学, 重庆 400016; 2. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004)

**摘要:** **目的** 观察藏药“松蒂”(篦齿虎耳草)中所含总黄酮及其中 5 种黄酮类化合物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人肝系 L02 细胞氧化损伤的影响。**方法** 采用 MTT 法检测细胞存活率, 筛选 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导损伤 L02 细胞的浓度、时间, 并确定各干预组分的最佳给药浓度范围。将细胞分为正常对照组、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤模型组、阳性对照组(Trolox 组, 50 μmol·L<sup>-1</sup>)、给药组[包括总黄酮组、金丝桃苷组、山柰酚-3-O-(6''-乙酰基)-D-半乳糖苷组、2', 4', 5, 7-四羟基-5'-甲氧基黄酮组、槲皮素组、芦丁组], 给药组再分别设置低、中、高 3 个剂量组。药物干预后, 采用 MTT 法检测细胞存活率; 采用速率法检测细胞上清液中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)含量; 测定细胞培养液中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)含量及血红素加氧酶-1(HO-1)的活性。**结果** 选择 100 μmol·L<sup>-1</sup>的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 8 h 为造模条件建立氧化损伤 L02 细胞模型。与模型组比较, 篦齿虎耳草总黄酮(200、400、800 μg·mL<sup>-1</sup>)、金丝桃苷(50、100、150 μg·mL<sup>-1</sup>)、槲皮素(50、100、150 μg·mL<sup>-1</sup>)和芦丁(50、100、150 μg·mL<sup>-1</sup>)预处理后, 细胞存活率明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), AST、ALT 水平明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), SOD、GSH-Px 及 HO-1 活力明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), MDA 含量明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 且在一定程度上呈剂量依赖性。**结论** 篦齿虎耳草总黄酮及金丝桃苷、槲皮素和芦丁对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致 L02 肝细胞氧化损伤具有保护作用, 金丝桃苷、槲皮素和芦丁可能是篦齿虎耳草黄酮类成分保肝物质中的潜在活性化合物。

**关键词:** 篦齿虎耳草; 总黄酮; L02 细胞; 抗氧化; 金丝桃苷; 槲皮素; 芦丁

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)09-1260-08

**doi:** 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.09.005

## Study on Protective Effect and Mechanism of the Flavonoids in Tibetan Medicinal Herb "Songdi" (*Saxifraga umbellulata* var. *pectinata*) on the Oxidative Damage of L02 Cells

FEI Yao<sup>1</sup>, DUAN Heng<sup>1</sup>, NIU Yazhen<sup>1</sup>, ZHONG Guoyao<sup>2</sup> (1. Integrated Department of Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004 Jiangxi, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects and mechanism of total flavonoids (ZHT) and five flavonoids [kaempferol-3-O-(6''-acetyl)-D-galactoside (Kag), 2', 4', 5, 7-tetrahydroxy-5'-methoxyflavone (Tem), rutin (Rut), quercetin (Qut) and hyperoside (Hyp)] in Tibetan medicine "songdi" (*Saxifraga umbellulata* var. *pectinata*) on hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) - induced oxidative damage of L02 cells. **Methods** MTT method was used to detect the cell survival rate, to screen the concentration and time of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for induction of damage in L02 cells, and to determine the optimal concentration range of each intervention component. Cells were divided into normal control group, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> injury model group, Trolox group (positive control group, 50 μmol·L<sup>-1</sup>), and administration groups (including ZHT groups, Hyp groups, Kag groups, Tem groups, Qut groups, and Rut groups). The

收稿日期: 2020-11-12

**作者简介:** 费曜, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 天然产物、民族药物资源开发与保护。Email: feiyao@feiyao@163.com。通信作者: 段恒, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中医药对血管生成的影响。Email: duanduan2006@126.com。

**基金项目:** 重庆医科大学中医药学院重点资助创新科研项目(Z2019006); 重庆医科大学学生创新实验项目(201821); 国家留学基金项目(201708505063)。

administration groups were divided into low, medium and high dose groups. After drug intervention, MTT method was used to detect the cell survival rate; the rate method was used to detect the AST and ALT in the cell supernatant. The content and activities of MDA, SOD, GSH-px and HO-1 in the cell culture medium were determined. **Results** The oxidative damage model was established under the condition of  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$  for 8 hours. The pretreatment of ZHT, Hyp, Qut and Rut showed a dose-dependent inhibition on  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced apoptosis ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). ZHT ( $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), Hyp ( $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), Qut ( $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) and Rut ( $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) in high-dose group can significantly alleviate the increase of AST and ALT caused by  $\text{H}_2\text{O}_2$  injury of hepatocytes ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). In the medium and high dose groups, total flavonoids and Hyp can significantly increase SOD activity and GSH level ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), reduce MDA content ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and increase HO-1 activity, which were dose-dependent ( $P < 0.01$ ). The pretreatment of Qut and Rut also showed a certain level of antioxidant effect. The other two flavonoids had no significant effect. **Conclusion** The total flavonoids, hyperoside, quercetin and rutin contained in *S. umbellulata* have protective effects on  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced peroxidative damage in L02 hepatocytes. Hypericin, quercetin, and rutin may be potential active compounds in the hepatoprotective substances of *S. umbellulata*.

**Keywords:** *Saxifraga umbellulata* var. *pectinata*; total flavonoids; L02 cells; antioxidant; hyperin; quercetin; rutin

藏药“松蒂”为常用保肝藏药“藏茵陈”的主流分支药物之一。虎耳草科鼈齿虎耳草 *Saxifraga umbellulata* var. *pectinata* (Marquand et Airy-Shaw) J. T. Pan 为“松蒂”的正品和主流品种,广泛分布于青藏高原海拔 3 000 m 以上的高山灌丛和草甸,全草入药,味苦性寒,具有清肝胆之热,排脓敛疮之功效,在西藏、青海、四川等藏区临床上长期被用于肝炎、胆囊炎及疮热等的治疗<sup>[1-2]</sup>。

鼈齿虎耳草中富含黄酮和皂苷类成分,总黄酮含量占 7.26%~7.62%<sup>[3]</sup>,皂苷含量占 1.94%~2.37%<sup>[4]</sup>。其中已分离鉴定并测定含量的黄酮类成分包括芦丁(Rutin)占 0.04%~0.06%,槲皮素(Quercetin)占 0.04%~0.07%<sup>[3]</sup>,金丝桃苷(Hyperin)占 0.02%~0.03%<sup>[5]</sup>。另外,还含有其他 2 种黄酮成分:山柰酚-3-O-(6''-乙酰基)-D-半乳糖苷[Kaempferol-3-O-(6''-acetyl)-D-galactosidase]、2',4',5,7-四羟基-5'-甲氧基黄酮(2',4',5,7-Tetrahydroxy-5'-methoxyflavone)<sup>[6]</sup>,2 种新型葫芦烷三萜糖苷:虎耳草皂苷 A (Saxifraganoids A) 和虎耳草皂苷 B (Saxifraganoids B)<sup>[7]</sup>,以及绿原酸(Chlorogenic acid)。有研究<sup>[8]</sup>采用油脂过氧化(POV)值法测定发现,鼈齿虎耳草乙醇提取物对 3 种食用油脂具有一定的抗氧化作用。近年来,黄酮类成分的抗氧化及保肝作用日益受到重视<sup>[9-12]</sup>。预实验中将鼈齿虎耳草各部位提取物(醇提物、总皂苷、总黄酮)作用于氧

化损伤的 L02 肝细胞,总黄酮的作用最显著。因此,本研究旨在寻找鼈齿虎耳草黄酮类组分中对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 L02 细胞损伤具有保护作用的关键化合物,并初步探讨其作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞** 人正常肝细胞株 L02 细胞,由重庆医科大学病毒性肝炎研究所细胞库提供。

**1.2 药物及试剂** 鼈齿虎耳草样品购于西藏拉萨自治区藏药厂原料部门,由重庆医科大学中医药学院费曜副教授鉴定为鼈齿虎耳草 *S. umbellulata* var. *Pectinata* 全草<sup>[11]</sup>。D101 大孔树脂,成都市科龙化工试剂厂;总黄酮(浓度>90%)、山柰酚-3-O-(6''-乙酰基)-D-半乳糖苷(纯度>95%)、2',4',5,7-四羟基-5'-甲氧基黄酮(纯度>95%),均由本实验室自提;芦丁(批号:0081-200904)、槲皮素(批号:100081-200706)、金丝桃苷(批号:111521-201205),均购自中国食品药品检定研究院;1640 培养基(批号:AD185223105)、DMEM 高糖培养基(批号:080531)、胰蛋白酶、小牛血清(批号:JC55621),均购自美国 HyClone 公司;MTT,购自美国 Sigma 公司;丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)检测试剂盒(批号:20190903)及超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(批号:20191115),均购自南

京建成生物工程研究所; 血红素加氧酶-1(HO-1)检测试剂盒(批号: AR0221), 购自美国 Bipec Biopharma 公司; 水溶性维生素 E(Trolox, 批号: 180906), 购自北京贝丽莱生物科技有限公司。

**1.3 主要仪器** Thermo Forma CO<sub>2</sub> 培养箱, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 倒置荧光显微镜, 日本 Olympus 公司; Bio-Rad 全自动多功能酶标仪, 美国伯乐公司; UV-2401PC 紫外-可见分光光度计, 日本岛津公司。

## 2 方法

### 2.1 篦齿虎耳草中总黄酮及 5 种黄酮类成分的提取

将篦齿虎耳草药材粗粉 200 g 加 95% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h。滤过, 合并滤液, 回收溶剂得浸

膏。将浸膏用 100 mL 水溶解, 先后用石油醚、乙酸乙酯各 300 mL 多次萃取; 将萃取后的乙酸乙酯部位过 D101 大孔树脂, 依次分别用 50%、60%、70%、80% 的乙醇进行洗脱, 收集洗脱液。经检测、反复纯化, 即得棕色总黄酮, 以分光光度法检测, 黄酮含量达 90% 以上, 实验时用生理盐水溶解稀释。采用制备型高效液相色谱仪, 从篦齿虎耳草总黄酮组分中分离得到山柰酚-3-O-(6''-乙酰基)-D-半乳糖苷、2', 4', 5, 7-四羟基-5'-甲氧基黄酮、槲皮素、芦丁、金丝桃苷样品。与本课题组前期通过 <sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、GC-MS、HPLC-MS 等理化方法及光谱分析分离并鉴定所得各化合物结构<sup>[6-7]</sup>对照, 经高效液相色谱法检测, 含量达 95% 以上, 结构式见图 1。



图 1 篦齿虎耳草 5 种黄酮类成分的结构式

Figure 1 Structural formula of five flavonoids in *S. umbellulata* var. *pectinata*

**2.2 细胞培养** L02 肝细胞用含 10% 小牛血清、100 U·mL<sup>-1</sup> 青霉素、100 μg·mL<sup>-1</sup> 链霉素的 RPMI 1640 完全培养液于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内进行培养, 取对数生长期细胞用于实验。用二甲基亚砜(DMSO)配制药物储备溶液, 并在实验前用培养基稀释。正常对照组细胞仅用 DMSO 处理, 并且终浓度 < 0.5%(V:V)。

**2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 L02 肝细胞损伤的条件筛选** 设正常对照组、不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模型组和无细胞调零空白孔, 每组设 5 个复孔。以 1640 培养液稀释 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 原液, 配成浓度为 5、25、50、100、250、500、750、1 000、1 250、2 500 μmol·L<sup>-1</sup> 的工作液, 分别吸取 50 μL 加入 96 孔培养板中, 继续培养细胞 4、8、12 h。采用 MTT 法检测细胞存活率。各孔分别加入新鲜配制的 MTT 溶液(5 mg·mL<sup>-1</sup>) 20 μL, 继续置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 4 h。培养结束后, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 100 μL DMSO, 振荡 10 min, 使紫色结晶甲臜充分溶解。以空白孔调零, 通过全自动多功能酶标仪在波长 490 nm 处测定各孔光密度(OD)值, 计算: 细胞存活率(%)=(实验

孔 OD 值-空白孔 OD 值)/(对照孔 OD 值-空白孔 OD 值)×100%。

**2.4 各组分的给药浓度筛选** 设正常对照组、给药组(包括总黄酮及 5 种单体黄酮)和无细胞调零空白孔。取生长状态良好的 L02 肝细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 常规培养 24 h 后, 弃去培养基; 正常对照组加入含 1% 吐温的无血清培养液, 给药组分别给予每孔 50 μL 不同浓度(总黄酮 0~5 600 μg·mL<sup>-1</sup>; 5 种单体黄酮 0~400 μg·mL<sup>-1</sup>)的药液进行干预, 每个浓度设 5 个复孔, 培养 24 h。按照“2.3”项下采用 MTT 法检测细胞存活率, 观察各组对 L02 肝细胞增殖的影响, 以确定适宜的给药浓度范围。

**2.5 各组分对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 致 L02 肝细胞损伤的影响** 取 L02 肝细胞接种于 96 孔培养板中(预留无细胞调零空白孔), 培养 24 h 后, 共设 9 组: 正常对照组(正常 L02 肝细胞, 未加 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和药物干预)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤模型组、阳性对照组(Trolox 组, 50 μmol·L<sup>-1</sup>)以及黄酮、5 种单体黄酮给药组, 给药组再根据“2.4”项下确定的给药浓度范围分别设低、中、高 3 个剂量组, 每组/剂量设 3 个复孔。正常对照组和模型组分别加

入 50  $\mu\text{L}$  无血清培养液, 各给药组分别按不同剂量加入 50  $\mu\text{L}$  相应浓度的药液; 预处理培养 24 h 后, 除正常对照组继续加入 50  $\mu\text{L}$  无血清培养液外, 其余各组均同时加入 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{L}$ , 共孵育 8 h。按照“2.3”项下采用 MTT 法检测细胞存活率。

**2.6 L02 肝细胞的 AST、ALT 含量测定** 细胞分组同“2.5”项下, 去除阳性对照组(Trolox 组)。取对数生长期的 L02 肝细胞用胰酶消化后, 用含 10% 灭活新生牛血清的 DMEM 培养液吹打制成  $10\times 10^4\cdot\text{mL}$  的细胞悬液; 加入 6 孔培养板, 每孔 2.0 mL, 每组/剂量设 3 个复孔, 并预留无细胞调零空白孔, 在 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^\circ\text{C}$  培养箱中培养 24 h。待细胞完全贴壁后, 更换新鲜培养基, 正常对照组和模型组加入 50  $\mu\text{L}$  无血清培养液, 给药组分别按不同剂量加入 50  $\mu\text{L}$  相应浓度的药液预处理培养 24 h 后, 模型组和给药组加入 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  50  $\mu\text{L}$  损伤 8 h。吸弃上清液, 用细胞裂解液对细胞进行裂解, 收集所得裂解液, 以 1 000 $\times g$  离心 10 min 后取上清液, 按照试剂盒说明书步骤操作, 采用速率法测定 AST、ALT 含量。

**2.7 L02 肝细胞中 SOD、GSH-Px 及 MDA 含量测定** 按“2.6”项下操作, 收集各组细胞培养液, 按照试剂盒说明书步骤操作, 测定吸光度值, 计算 SOD、GSH-Px、MDA 含量。

**2.8 L02 肝细胞的 HO-1 活性测定** 细胞分组及干预按“2.5”项下操作。将等分试样(20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )的细胞悬浮液( $2\times 10^6$  个细胞)与血红素(20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、大鼠肝胞质(1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、 $\text{MgCl}_2$ (1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(0.2 U)、葡萄糖 6-磷酸(2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )及 NADPH(0.8  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )加在 0.2 mL 磷酸钾缓冲液(0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH=7.4)中, 于 37  $^\circ\text{C}$  光照下反应 15 min; 通过仅用血红素孵育细胞, 超声处理来制备阴性(空白)对照。采用在干冰(-78  $^\circ\text{C}$ )中快速冷却来终止反应。通过酶标仪分别在 463 nm 和 520 nm 处的检测值差异计算胆红素生成量。与对照组进行比较, 计算抗氧化酶 HO-1 的相对活性。

**2.9 统计学处理方法** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析; 计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示; 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 检验; 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤 L02 肝细胞的浓度、时间筛选** 结果见图 2。与正常对照组比较, 随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度和作用

时间的增加, L02 肝细胞的存活率逐渐降低。 $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤 8 h 后, 浓度为 25  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 细胞存活率下降为 86.79%( $P<0.05$ ); 浓度为 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 细胞存活率为 61.53%( $P<0.01$ )。随  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度进一步升高, L02 肝细胞存活率逐渐降低, 且逐渐出现细胞生长稀疏, 细胞膜破损、细胞结构不清。当浓度达到 1 000  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 细胞存活率仅为 10.55%。结果表明, 宜选择 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  作用 8 h 作为  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导 L02 肝细胞损伤的条件。

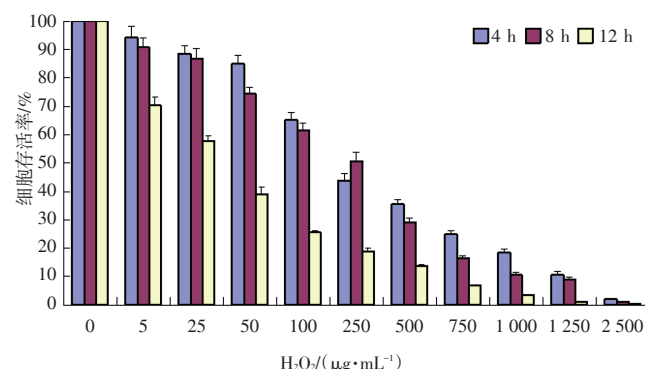


图 2  $\text{H}_2\text{O}_2$  不同浓度及损伤时间对 L02 肝细胞增殖的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Figure 2 Effects of different concentration and different duration of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on L02 cells growth( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

**3.2 篦齿虎耳草各组分的最佳给药浓度筛选** 结果见图 3。与正常对照组相比, 800  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  及以下浓度的总黄酮孵育 L02 肝细胞 24 h, 细胞存活率未见明显变化( $P>0.05$ )。超过 1 400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  后, 细胞生长逐渐被抑制。结果表明, 宜选择浓度为 200、400、800  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的总黄酮作为后续干预的低、中、高剂量。

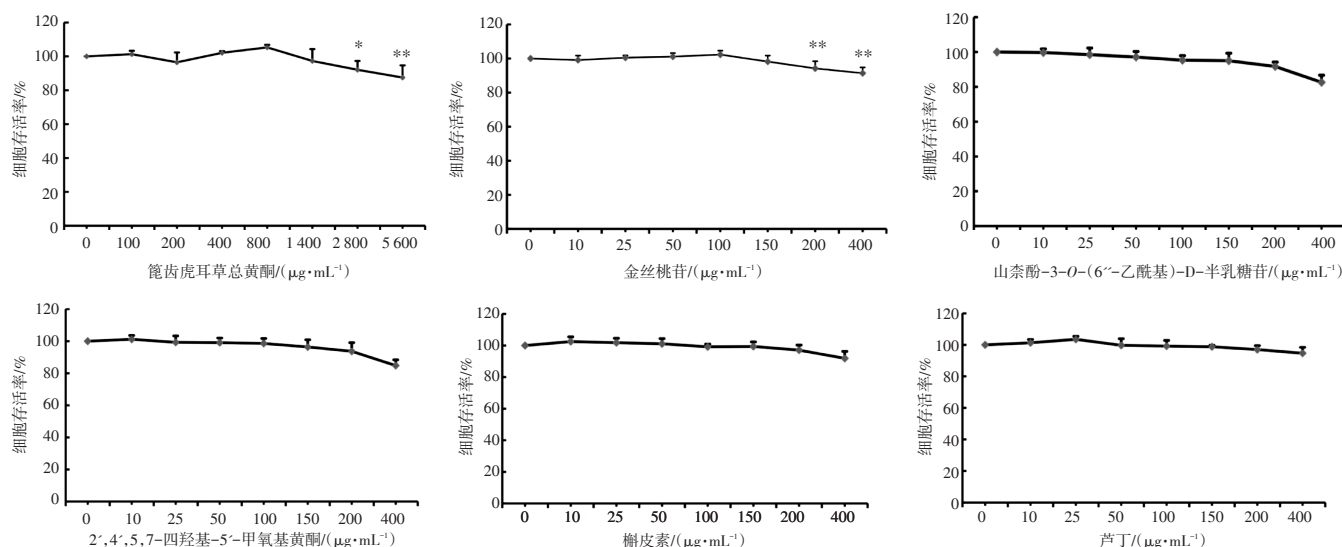
与正常对照组相比, 150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  及其以下浓度的金丝桃苷孵育细胞 24 h, 细胞存活率未见明显变化( $P>0.05$ )。超过 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  后, 细胞生长逐渐被抑制。结果表明, 宜选择浓度为 50、100、150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的金丝桃苷作为后续干预的低、中、高浓度。

与正常对照组相比, 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  及其以下浓度的山柰酚-3-*O*-(6''-乙酰基)-D-半乳糖苷孵育细胞 24 h, 细胞存活率未见明显变化( $P>0.05$ )。超过 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  后, 细胞生长逐渐被抑制。结果表明, 宜选择浓度为 10、25、50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的山柰酚-3-*O*-(6''-乙酰基)-D-半乳糖苷作为后续干预的低、中、高浓度。

与正常对照组相比, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  及其以下浓度

的 2', 4', 5, 7-四羟基-5'-甲氧基黄酮孵育细胞 24 h, 细胞存活率未见明显变化( $P>0.05$ )。超过 150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  后, 细胞生长逐渐被抑制。结果表明, 宜选择浓度为 25、50、100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 2', 4', 5, 7-四羟基-5'-甲氧基黄酮作为后续干预的低、中、高浓度。

与正常对照组相比, 150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  及其以下浓度的槲皮素、芦丁孵育细胞 24 h, 细胞存活率未见明显变化( $P>0.05$ )。超过 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  后, 细胞生长逐渐被抑制。结果表明, 选择浓度为 50、100、150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的槲皮素及芦丁作为后续干预的低、中、高浓度。



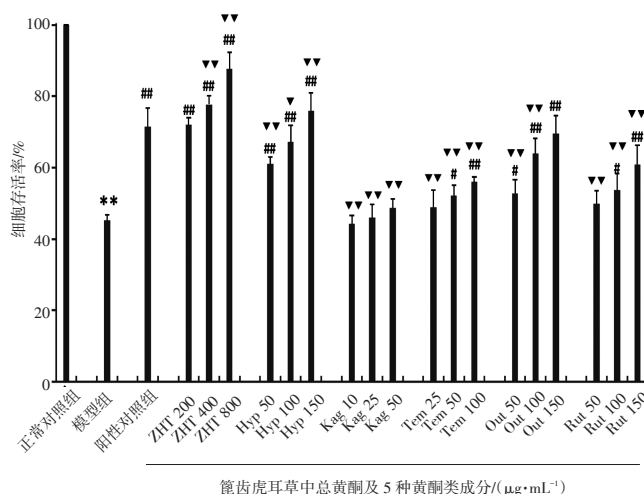
注: 与对照组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

图 3 篦齿虎耳草不同浓度组分对 L02 肝细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Figure 3 Effect of different concentrations of various components in *S. umbellulata* var. *pectinata* on L02 cells growth( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

**3.3 篦齿虎耳草各组分预处理对  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤的 L02 肝细胞活性的影响** 结果见图 4。与正常对照组比较,  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤模型组的细胞存活率显著下降( $P<0.01$ )。与模型组比较, 总黄酮、金丝桃苷、槲皮素各剂量组的细胞存活率明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 2', 4', 5, 7-四羟基-5'-甲氧基黄酮及芦丁中、高剂量组的细胞存活率亦明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与阳性对照组比较, 总黄酮 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、金丝桃苷 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和槲皮素 150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导损伤的 L02 肝细胞的保护作用接近于 Trolox 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果表明, 篦齿虎耳草总黄酮、金丝桃苷、槲皮素和芦丁对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导损伤的 L02 肝细胞具有明显的保护作用, 并呈现剂量依赖性。

**3.4 篦齿虎耳草各组分预处理对  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤的 L02 肝细胞的 AST、ALT 酶活性的影响** 结果见图 5。与正常对照组相比,  $\text{H}_2\text{O}_2$  损伤模型组的 L02 肝细胞的 AST、ALT 水平显著升高( $P<0.01$ )。与模型组比较, 总黄酮高剂量组、金丝桃苷中/高剂量组、槲皮素高剂量组、芦丁中/高剂量组的 L02 肝细胞的 AST 水平明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 总黄酮高剂量



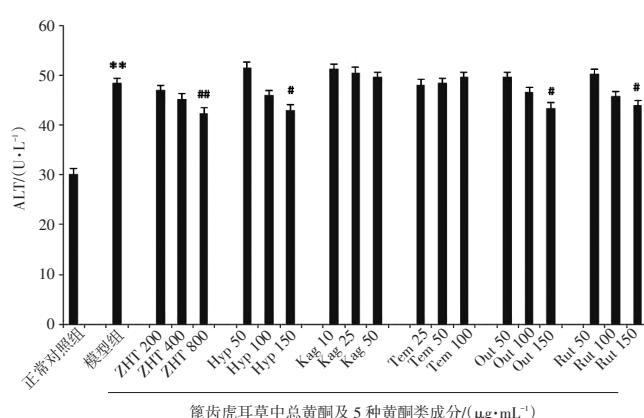
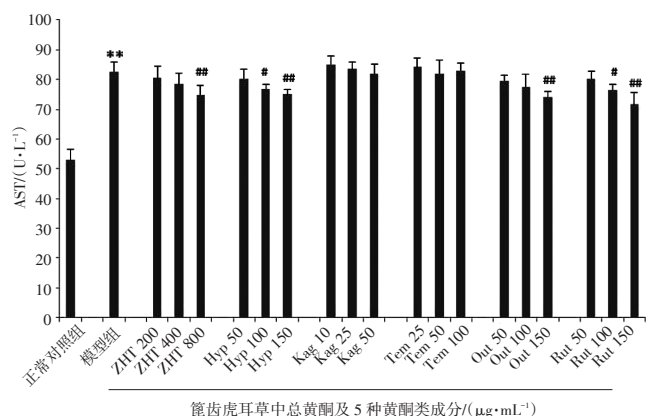
注: ZHT: 总黄酮; Hyp: 金丝桃苷; Kag: 山柰酚-3-O-(6''-乙酰基)-D-半乳糖苷; Tem: 2', 4', 5, 7-四羟基-5'-甲氧基黄酮; Out: 槲皮素; Rut: 芦丁。与对照组相比, \*\* $P<0.01$ ; 与模型组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; 与阳性对照组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$

图 4 篦齿虎耳草不同浓度各组分预处理 24 h 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导损伤的 L02 肝细胞的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Figure 4 Effects of pretreatment with different doses of components in *S. umbellulata* var. *pectinata* for 24 hours on L02 cells damaged by  $\text{H}_2\text{O}_2$ ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

组、金丝桃苷高剂量组、槲皮素高剂量组和芦丁高剂量组 L02 肝细胞的 ALT 水平明显降低( $P < 0.05$ )。结果表明, 篦齿虎耳草总黄酮、金丝桃苷、槲皮素

和芦丁能够降低  $H_2O_2$  诱导损伤的 L02 肝细胞的 AST、ALT 过度释放。



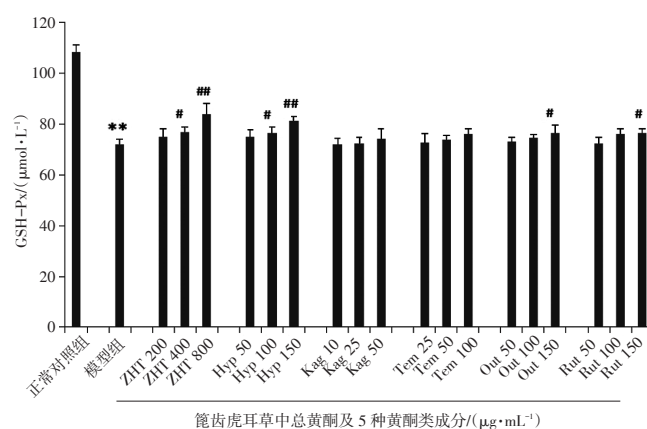
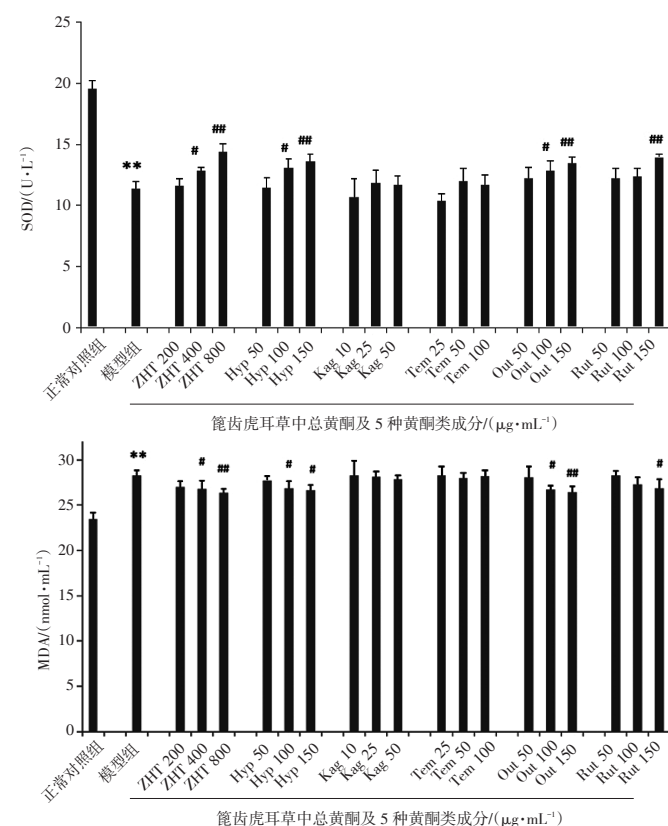
注: ZHT: 总黄酮; Hyp: 金丝桃苷; Kag: 山柰酚-3-*O*-(6''-乙酰基)-D-半乳糖苷; Tem: 2',4',5,7-四羟基-5'-甲氧基黄酮; Out: 槲皮素; Rut: 芦丁。与对照组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$

图 5 篦齿虎耳草不同浓度各组分预处理对  $H_2O_2$  损伤的 L02 细胞肝功能指标的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Figure 5 Effects of pretreatment with different doses of components in *S. umbellulata* var. *pectinata* on liver function indexes of L02 cells damaged by  $H_2O_2$ ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

**3.5 篦齿虎耳草各组分预处理对  $H_2O_2$  损伤的 L02 肝细胞抗氧化应激指标的影响** 结果见图 6。与正常对照组比较,  $H_2O_2$  损伤模型组 L02 肝细胞的 SOD、GSH-Px 活力显著降低( $P < 0.01$ ), MDA 含量显著升高( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 总黄酮中/高剂量组、金丝桃苷中/高剂量组、槲皮素中/高剂量组及芦丁高

剂量组的 SOD、GSH-Px 活力明显升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), MDA 含量明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结果表明, 篦齿虎耳草总黄酮、金丝桃苷、槲皮素、芦丁对  $H_2O_2$  诱导损伤的 L02 肝细胞表现出明显的抗氧化作用, 并呈现剂量依赖性。

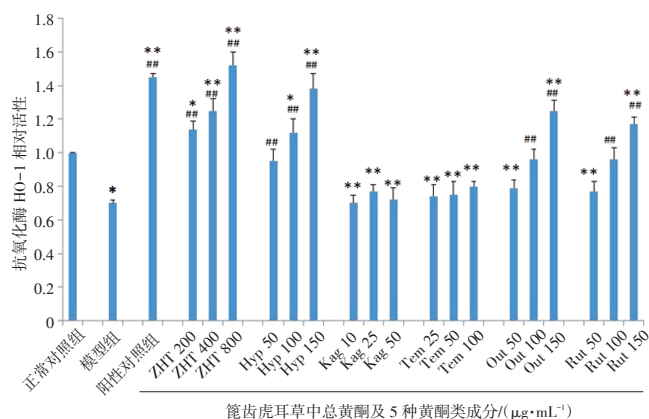


注: ZHT: 总黄酮; Hyp: 金丝桃苷; Kag: 山柰酚-3-*O*-(6''-乙酰基)-D-半乳糖苷; Tem: 2',4',5,7-四羟基-5'-甲氧基黄酮; Out: 槲皮素; Rut: 芦丁。与对照组相比, \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$

图 6 篦齿虎耳草不同浓度各组分预处理对  $H_2O_2$  损伤的 L02 肝细胞抗氧化应激的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Figure 6 Effects of pretreatment with components in *S. umbellulata* var. *pectinata* on antioxidant stress of L02 cells injured by  $H_2O_2$ ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

**3.6 篦齿虎耳草各组分预处理对  $H_2O_2$  损伤的 L02 肝细胞抗氧化酶 HO-1 活性的影响** 结果见图 7。与正常对照组比较,  $H_2O_2$  损伤模型组 L02 肝细胞的 HO-1 活性明显降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较, 总黄酮及金丝桃苷各剂量组、槲皮素及芦丁中/高剂量组的 HO-1 活性显著升高( $P < 0.01$ )。结果表明, 篦齿虎耳草总黄酮、金丝桃苷、槲皮素、芦丁能够明显提升  $H_2O_2$  诱导损伤的 L02 肝细胞的 HO-1 抗氧化酶活性, 并呈现剂量依赖性。



注: ZHT: 总黄酮; Hyp: 金丝桃苷; Kag: 山柰酚-3-O-(6''-乙酰基)-D-半乳糖苷; Tem: 2', 4', 5', 7-四羟基-5'-甲氧基黄酮; Qut: 槲皮素; Rut: 芦丁。与对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组相比, \*\*\* $P < 0.01$

**图 7 篦齿虎耳草不同浓度各组分预处理对  $H_2O_2$  损伤的 L02 肝细胞 HO-1 活性的影响**( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Figure 7 Effects of pretreatment with components in *S. umbellulata* var. *pectinata* on HO-1 activity of L02 cells damaged by  $H_2O_2$ ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

## 4 讨论

氧化应激与肝脏疾病密切相关。 $H_2O_2$ 是活性氧自由基(ROS)的家族成员之一, 过量的  $H_2O_2$  不仅能直接氧化细胞膜上的脂质和蛋白质, 而且能自由穿过细胞膜与细胞内的铁离子反应, 生成羟基自由基( $\cdot OH$ )等活性更强的自由基, 并诱导细胞凋亡<sup>[13]</sup>。在氧化应激过程中, 机体产生大量的 ROS 攻击肝细胞膜, 引起脂质过氧化反应, 过量消耗细胞内的抗氧化物质, 导致内源性抗氧化物如 GSH、SOD 和维生素 E 缺乏, 细胞内 MDA 和钙离子增加; 同时加剧线粒体功能障碍, 致使 AST、ALT 流出细胞, 再消耗细胞内的抗氧化物, 形成恶性循环<sup>[14]</sup>。上述病理变化是慢性病毒性肝炎、酒精性肝病、自身免疫性肝病、代谢相关脂肪性肝病和肝癌发病机理中的重要

因素之一<sup>[15-16]</sup>。因此, 研究传统保肝藏药篦齿虎耳草中黄酮类成分对氧化应激的影响, 对探讨其保肝作用及机理具有重要意义。

本研究结果表明, 以篦齿虎耳草中分离得到的总黄酮、金丝桃苷、槲皮素和芦丁预处理, 对  $H_2O_2$  诱导损伤的 L02 肝细胞具有明显的保护作用, 能够降低细胞 AST、ALT 过度释放, 提高细胞的 SOD、GSH-Px 活力, 降低 MDA 含量, 提升细胞的 HO-1 抗氧化酶活性, 表现出明显的抗氧化作用。提示篦齿虎耳草中的黄酮类成分对过氧化损伤肝细胞有明显保护作用, 金丝桃苷、槲皮素和芦丁可能是其潜在的活性单体。

细胞抗氧化系统受到转录因子 NF-E2 相关因子 2 (Nrf2) 的严格调控, 它可以上调抗氧化基因(如 HO-1)。在 Nrf2 诱导剂中, 黄酮类化合物备受关注, 如金丝桃苷能够通过 MAPK 依赖的 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路上调 HO-1 表达<sup>[17]</sup>, 直接清除 ROS、螯合金属离子, 还能增加 GSH-Px、SOD、CAT 等抗氧化酶的活性, 具有抗自由基活性、抗脂质过氧化等作用<sup>[18]</sup>。Kimura S 等<sup>[19]</sup>报道, 槲皮素可以保护人角质形成细胞免受紫外线(UVA)损伤, 主要是通过增强 Nrf2 核转位, 导致抗氧化基因表达上调和抗氧化酶活性增强。槲皮素的邻二酚羟基可经单电子转移的方式直接清除超氧阴离子和羟自由基, 还可通过作用于自由基相关的酶, 沉淀蛋白质, 从而清除自由基, 显示抗氧化作用<sup>[20-21]</sup>。篦齿虎耳草中总黄酮含量可达 7.0 % 以上<sup>[3]</sup>, 在本研究中, 总黄酮中、高剂量的正向影响比上述黄酮单体更为突出, 也进一步提示篦齿虎耳草抗氧化损伤的有效部位集中在黄酮类成分。

综上所述, 篦齿虎耳草总黄酮可能通过金丝桃苷、槲皮素、芦丁等成分增强  $H_2O_2$  诱导损伤的 L02 肝细胞的抗氧化酶活性和 ROS 清除能力, 从而抑制过氧化损害, 提高细胞活力。可为进一步探讨藏茵陈类藏药治疗氧化应激相关疾病提供思路。

## 参考文献:

- [1] 钟国跃, 王昌华, 刘翔, 等. 常用藏药“蒂达(藏茵陈)”的资源与使用现状调查[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2010, 12(1): 122-128.
- [2] 费曜, 钟国跃, 刘翔, 等. 常用藏药“松蒂”(篦齿虎耳草)的显微鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6): 902-906.
- [3] 费曜, 蒋伟, 钟国跃, 等. 常用藏药材“松蒂”(篦齿虎耳草)中总黄酮与绿原酸、芦丁、槲皮素的含量测定[J]. 中药新药与临床

- 药理, 2013, 24(4): 411-415.
- [4] 费曜, 周滢, 钟国跃. 藏药“松蒂”虎耳草属近缘植物的成分比较研究[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(10): 1251-1257.
- [5] 成磊, 蒋伟, 杜小浪, 等. HPLC法测定鼈齿虎耳草及其近缘品种中金丝桃苷的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(3): 327-330.
- [6] 费曜. 藏药“蒂达(藏茵陈)”品种之一鼈齿虎耳草的品质研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.
- [7] JIANG W, FEI Y, DU X L, et al. Saxifraganoids A and B, two novel cucurbitane triterpenoid glycosides from *Saxifraga umbellulata* var. *pectinata*[J]. Tetrahedron Letters, 2017, 5(36): 3541-3544.
- [8] 潘国庆, 王宝存. 藏药鼈齿虎耳草抗氧化性研究[J]. 青海师范大学学报, 2007, 26(4): 70-72.
- [9] YAZIHAN N, ATAOLGU H, YENER B, et al. Erythropoietin attenuates hydrogen peroxide-induced damage of hepatocytes[J]. Turk J Gastroenterol, 2007, 18(4): 239-244.
- [10] CHANG E J, LEE S H, MUN K C, et al. Effect of artificial cells on hepatic function after is chemia-reperfusion injury in liver[J]. Transplant Proc, 2004, 36(7): 1959-1961.
- [11] MEDINA J, MORENO O R. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease[J]. Drugs 2005, 65: 2445-2461.
- [12] SCHARRENBURG J M, WOMS M A, ZIMMERMANN T, et al. The role of death effector domain-containing proteins in acute oxidative cell injury in hepatocytes[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(9): 1911-1917.
- [13] XING H Y, LIU Y, CHEN J H., et al. Hyperoside attenuates hydrogen peroxide-induced L02 cell damage via MAPK-dependent Keap(1)-Nrf(2)-ARE signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 410(4): 759-765.
- [14] 李盈, 高健美, 白鑫宇, 等. 金丝桃苷对HL7702细胞氧化损伤的保护作用及机制[J]. 沈阳药科大学学报, 2013, 30(9): 718-723.
- [15] 黄明春, 陈剑鸿, 胡小刚, 等. 金丝桃苷对CCl<sub>4</sub>诱导大鼠急性肝损伤抗氧化应激研究[J]. 局解手术学杂志, 2013, 22(6): 558-593.
- [16] 孔华丽, 胡克章, 杨新波, 等. 金丝桃苷对小鼠四氧化碳肝损伤的保护作用[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(19): 1794-1797.
- [17] XING H Y, LIU Y, CHEN J H, et al. Hyperoside attenuates hydrogen peroxide-induced L02 cell damage via MAPK-dependent Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 410(4): 759-765.
- [18] PIAO M J, KANG K A, ZHANG R, et al. Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect[J]. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 2008, 1780(12): 1448-1457.
- [19] KIMURA S, WARABI E, YANAGAWA T, et al. Essential role of Nrf2 in keratinocyte protection from UVA by quercetin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 387(1): 109-114.
- [20] ALIA M, MATEOS R, RAMOS S, et al. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defence system of a human hepatoma cell line (HepG2) [J]. European Journal of Nutrition, 2006, 45(1): 19-28.
- [21] SINGH S, SINGH S K, KUMAR M, et al. Ameliorative potential of quercetin against paracetamol-induced oxidative stress in mice blood[J]. Toxicol Int, 2011, 18(2): 140-145.

(编辑: 邹元平)