

赤芍总苷抗氧化活性及对大鼠肝星状细胞增殖的影响

高雪岩 王文全[△] 孙建宁 刘思秦 郑巧云

(北京中医药大学中药学院 北京 100102)

摘要 目的:研究赤芍总苷体外抗氧化活性及对大鼠肝星状细胞 HSC-T6 细胞增殖的影响。方法:采用 DPPH 法测定赤芍总苷体外清除 DPPH 自由基及抗氧化活性,根据清除率曲线,确定 EC50 值;采用 MTT 法考察赤芍总苷对大鼠肝星状细胞 HSC-T₆ 细胞增殖的影响,确定起效剂量,并考察其量效关系。结果:赤芍总苷对 DPPH 自由基具有较强清除作用,其对 DPPH 的清除率的回归方程为 $y=7.4432x+0.6111$ ($r=0.9967$),EC50 值为 6.64 mg/L;赤芍总苷对 HSC-T₆ 的增殖具有明显的抑制作用,给药浓度为 1.152 mg/mL 时,其对 HSC-T₆ 细胞增殖的抑制率可达 39.240 %。结论:赤芍总苷具有较强的抗氧化活性,对肝星状细胞的增殖有一定抑制作用。

关键词 赤芍总苷 DPPH 法 抗氧化 肝星状细胞 增殖

中图分类号 Q95-3 R285.5 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273(2011)14-2609-03

Study on the Antioxygen Activity of Total Paeony Glucosides and Its Inhibition Effect on the Proliferation of HSC-T₆

GAO Xue-yan, WANG Wen-quan[△], SUN Jian-ning, LIU Si-qin, ZHENG Qiao-yun

(College of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, 100102, Beijing, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the antioxygen activity of total paeony glucosides and its inhibition effect on the proliferation of HSC-T₆. **Methods:** The in vitro antioxygen activity of total paeony glucosides was determined by DPPH method, and EC50 was calculated according to the clearance rate curve. And MTT method was employed to investigate the inhibition effect on proliferation of HSC-T₆, its effective dose was determined and dose-effect relationship was inspected. **Results:** Total paeony glucosides had great scavenging effect towards DPPH free radical. The regression equation was $y=7.4432x+0.6111$ ($r=0.9967$), and its EC50 was 6.64 mg/L. There was inhibition effect on the proliferation of HSC-T₆. The inhibition ration reached was 39.240 %, when the concentration was 1.152 mg/mL. **Conclusions:** Total paeony glucosides had strong antioxidant activity and great inhibition effect on the proliferation of hepatic stellate cells.

Key words: Total paeony glucosides; DPPH method; Antioxygen; HSC-T6; Proliferation

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R285.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)14-2609-03

前言

赤芍总苷(Total Paeony Glucosides)是赤芍中单萜苷类化合物的总称,包括芍药苷、芍药花苷、芍药内酯苷、羟基芍药苷、苯甲酰芍药苷等组分^[1],是赤芍的主要活性成分,研究表明该部位具有明显抗凝血、抗血栓、抗内毒素、改善微循环、对心脑血管缺血性损伤的保护作用、抗肿瘤、对肝损伤的保护、改善小鼠学习记忆能力、抗抑郁等方面的药理作用^[2-5],近年来还发现赤芍总苷具有良好的抗肝纤维化作用^[6,7]。肝纤维化过程中,自由基损伤是导致肝纤维化的重要诱因,而肝星状细胞的活化和增殖激发了大量细胞外基质增生和沉积,是肝纤维化发生发展的重要环节^[8-11]。本研究针对肝纤维化发生发展的两个重要环节,考察了赤芍总苷体外抗氧化及对肝星状细胞增殖的抑制作用,探讨赤芍总苷抗肝纤维化的可能的作用环节和作用机制。

1 材料与方法

1.1 试验药物

赤芍饮片购自内蒙古赤峰荣兴堂药业公司,为道地野生优质赤芍,10 倍量 70 %乙醇回流提取 3 次,得粗体液后,采用 AB-8 型大孔吸附树脂柱富集干燥,得赤芍总苷,其中赤芍总苷的含量为 57.72 %,芍药苷的含量为 41.43 %。

1.2 细胞株

HSC-T₆ 购自中国科学院上海细胞所,为 SV40 转染的 SD 大鼠肝星状细胞,其表现型为活化的 HSC,表达高水平的 型胶原^[12]。

1.3 试剂

DPPH(1,1- 二苯基 -2- 苦基苯肼),购自美国 Sigma,批号为 257621,抗坏血酸,购自天津永大化学试剂有限公司,批号 20100525,秋水仙碱,购自昆明制药集团股份有限公司,批号 090818-01,临用前配制所需浓度,DMEM 培养基、Penicillin-Streptomycin 和胰蛋白酶,购自加拿大 Gibco 公司,批号分别为 101019、837579 和 833117,特级胎牛血清 FBS,购自杭州四季青生物工程材料有限公司,批号 090706,MTT,购自美

作者简介:高雪岩(1982-),女,博士研究生,主要从事中药资源开发利用方面的研究,E-mail:minicat118@163.com

[△] 通讯作者:王文全(1957-),E-mail:wwq57@126.com

(收稿日期:2011-04-08 接受日期:2011-05-03)

国 Sigma 公司 ,批号为 3544B04 ,DMSO 购自美国 Amresco 公司 ,批号 100127。

1.4 仪器与设备

紫外可见分光光度计 ,尤尼克上海仪器有限公司 ;洁净工作台 ,北京东联哈尔仪器制造有限公司 ;CO₂ 培养箱 ,Thermo Fisher Scientific Co. LTD ;倒置显微镜 ,重庆市奥特光学仪器有限公司 ;酶标仪 ,美国伯腾仪器有限公司 ;细胞培养瓶及 96 孔细胞培养板 美国 Corning Co. LTD。

1.5 DPPH 法测定赤芍总苷体外抗氧化活性

1.5.1 抗坏血酸标准溶液的配制 称取 7.5 mg 抗坏血酸 ,置于 250 mL 容量瓶中 ,用蒸馏水稀释成 30 mg/L 的抗坏血酸标准溶液。

1.5.2 DPPH 标准溶液的配制 避光称取 15.0 mg DPPH ,置于 500 mL 容量瓶中 ,用甲醇稀释成 30 mg/L 的 DPPH 标准溶液 ,用移液管量取抗坏血酸标准溶液 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 和 10.0 mL 于 6 个 10 mL 容量瓶中 ,用蒸馏水稀释至刻度 ,摇匀备用。

1.5.3 抗坏血酸 DPPH 清除率标准曲线的制备 分别将抗坏血酸溶液 1.0 mL 与 6 个浓度 DPPH 溶液 5.0 mL 迅速混匀 ,反应 30 min ,以空白溶剂 1.0 mL 蒸馏水 +5.0 mL 甲醇为参比液 ,以样品空白溶液 1.0 mL 蒸馏水 +5.0 mL DPPH 溶液为对照 ,在 517 nm 处测定各溶液的吸光度 A ,每个浓度平行测定三次 ,取其平均值 ,并计算其清除率 ,清除率按下式计算 :

清除率 E=(AControl-ASample)/AControl× 100%

其中 AControl 为未加抗坏血酸溶液的 DPPH 溶液 ,即 1.0 mL 蒸馏水 +5.0 mL DPPH 溶液的吸光度 ,ASample 为 DPPH 溶液与样品溶液 ,即 1.0 mL 样品溶液 +5.0 mL DPPH 溶液反应后的吸光度。

以抗坏血酸质量浓度(mg/L)为横坐标 ,DPPH 清除率(%)为纵坐标绘制标准曲线 (图 1) ,建立线性回归方程 $y=18.74x-0.8219(r=0.9996)$,线性范围为 0.50-5.00 mg/L 根据回归方程计算抗坏血酸的 EC₅₀ 值为 2.71 mg/L (注 :EC₅₀ 值为清除 50% DPPH 自由基所需的样品浓度)。

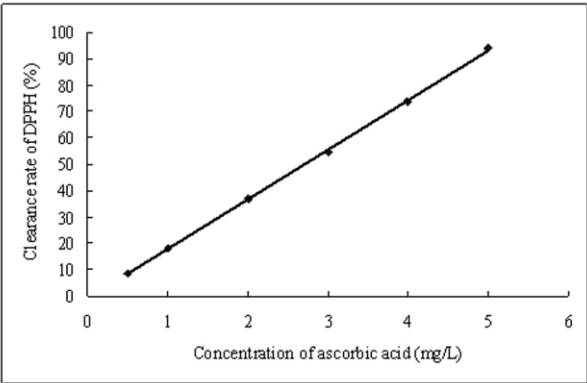


图 1 抗坏血酸浓度 -DPPH 清除率标准曲线

Fig. 1 Standard curve of ascorbic acid between its concentration and clearance rate towards DPPH

1.5.4 赤芍总苷抗氧化活性测定 称取 2.5 g 赤芍总苷 ,置于 250 mL 容量瓶中 ,加入蒸馏水使其溶解 ,定容至刻度 ,摇匀 ,得

样品溶液 ,分别在 5.0 mL DPPH 溶液中加入 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 和 1.0 mL 样品溶液 ,用蒸馏水补足 6.0 mL ,迅速混匀 ,反应 30 min ,按照 1.5.3 项下方法测定溶液的吸光度 A ,每个浓度平行测定三次 ,取平均值。以样品质量浓度 (mg/L)为横坐标 ,DPPH 清除率(%)为纵坐标绘制样品的清除率曲线 ,计算线性回归方程及其 EC₅₀ 值。

1.6 MTT 比色法测定赤芍总苷对 HSC-T6 细胞增殖的影响

1.6.1 HSC-T6 细胞的培养 采用含有 10 %胎牛血清的 DMEM 培养基 ,常规培养于 37 ℃、饱和湿度、5 % CO₂ 培养箱中 ,当细胞密度达到 70 %以上时 ,用 0.25 %胰酶消化传代。

1.6.2 MTT 比色法测定赤芍总苷对 HSC-T6 细胞增殖的影响 取对数生长期细胞 ,加入含 10 % FBS 的 DMEM 培养基 ,调整浓度至 1×10^5 个/mL ,加入 96 孔培养板中 ,每孔 200 μ L ,在 37 ℃、饱和湿度、5 % CO₂ 培养箱静置培养 24 h 后 ,弃上清液 ,加入含有终浓度分别为 0.036、0.072、0.144、0.288、0.576、1.152、5.760 mg/mL 赤芍总苷的 DMEM 完全培养基 ,每孔 200 μ L ,并设对照组 ,每组 8 个复孔 ,培养 44 h 后 ,加入 MTT (5 mg/mL , PBS 配制)20 μ L/ 孔 ,继续培养 4 h ,弃上清液 ,加入 DMSO 100 μ L/ 孔 ,振荡使结晶紫完全溶解 ,自动酶标仪在 490 nm 处测定各孔吸光度 A 值 ,并计算抑制率。抑制率按下式计算 :

抑制率 =(1- 药物组 A 值 / 对照组 A 值)× 100%

2 结果

2.1 DPPH 法测定赤芍总苷体外抗氧化活性

赤芍总苷对 DPPH 具有较强清除作用 ,且 DPPH 的清除率与赤芍总苷的质量浓度 ,在一定浓度范围内 ,呈现良好的线性关系 ,清除率随着样品质量浓度的增大而增大。赤芍总苷 DPPH 清除曲线见图 2 ,其对 DPPH 的清除率的回归方程为 $y=7.4432x+0.6111$ ($r=0.998$) ,线性范围为 1.00-12.00 mg/L ,其 EC₅₀ 值为 6.64 mg/L。

2.2 MTT 比色法测定赤芍总苷对 HSC-T6 细胞增殖的影响

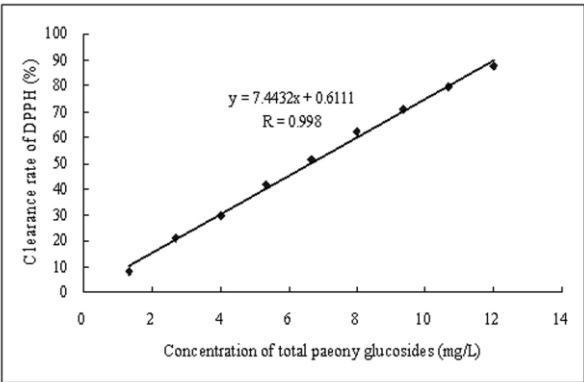


图 2 赤芍总苷浓度 -DPPH 清除率曲线

Fig. 2 Curve of of total paeony glucosides between its concentration and clearance rate towards DPPH

赤芍总苷对 HSC-T6 的增殖具有明显的抑制作用 ,且随着浓度的上升 ,抑制率逐渐增大。赤芍总苷对肝星状细胞的生长有一定的量效关系 ,具体结果详见表 1。

3 讨论

表 1 不同浓度的赤芍总苷对 HSC-T6 细胞增殖的抑制作用($\bar{X} \pm SD$)
Table 1 Inhibition effect on the proliferation of HSC-T6 cells of total paeony glucosides with different concentration ($\bar{X} \pm SD$)

No.	Concentration of total paeony glucosides (mg/mL)	Absorbance after 48 hours	Inhibition rate (%)
1	0.036	0.843± 0.048	2.947± 1.563
2	0.072	0.820± 0.033	4.561± 2.974
3	0.144	0.760± 0.026	11.158± 3.156
4	0.288	0.691± 0.028	19.181± 3.296
5	0.576	0.574± 0.071	32.912± 8.252
6	1.152	0.520± 0.006	39.240± 2.744
7	5.760	0.371± 0.146	56.608± 9.593

肝损伤是导致肝纤维化的直接原因,其中自由基损伤是肝纤维化的常见方式,多种化学性肝损伤、脂肪肝、酒精肝及肝炎向肝纤维化的发生发展,均与自由基损伤有直接或间接的联系,去除病因,保护肝细胞是治疗肝纤维化的首要措施。多种具有抗氧化活性的药物,如谷胱甘肽、维生素 E、水飞蓟素等均具有一定的抗肝纤维化的作用^[13]。本研究结果表明,赤芍总苷体外具有较强的抗氧化和清除自由基的作用,推测其抗氧化活性可能与其抗肝纤维化活性相关。研究表明^[14,15],赤芍总苷具有良好的治疗肝损伤和肝纤维化的作用,并认为其作用机制可能与其抗脂质过氧化有关,与本试验的推测一致。赤芍总苷抗氧化活性和清除自由基的能力,可能是其抗肝纤维化的作用机制之一。

肝纤维化发生的基本机制是细胞外基质的合成与沉积,在此过程中,肝星状细胞的活化和增殖起到了关键作用,因此,抑制肝星状细胞的活化和增殖,减少由其导致的细胞外机制的积累,是治疗肝纤维化的关键步骤^[16]。本研究结果表明,赤芍总苷体外对 HSC-T₆ 细胞增殖具有一定的抑制作用,这与王华等在体内试验中检测到了较少的胶原表达量相一致^[6]。赤芍总苷抑制活化的肝星状细胞增殖,进而抑制细胞外机制的积累和沉积,可能是其抗肝纤维化的另一作用机制。

肝纤维化涉及多种炎症因子、细胞因子的释放及级联反应,包括组织损伤、炎症发生、细胞增殖、细胞趋化、纤维形成、基质降解等环节,是一个复杂的病理发生和发展过程。肝纤维化的防治就是以上述病理过程为靶点,进行逆向调控,目前,肝纤维化的治则包括:去除病因、保护肝细胞、抑制肝脏炎症、抑制肝星状细胞活化、促进肝星状细胞凋亡和促进细胞外基质降解等方面。中药对肝纤维化的治疗一般是多靶点、多通路的综合逆向调节。本研究结果表明,赤芍总苷具有良好的抗氧化活性和一定的抑制肝星状细胞增殖作用,推测赤芍总苷抗肝纤维化作用,至少涉及保护肝细胞和抑制肝星状细胞增殖两个作用靶点。此外,韩海啸等^[17,18]结果表明,赤芍含药血清对肝星状细胞有显著的促凋亡作用,且能显著增加肝星状细胞在 G₀/G₁ 期的比例,并能显著降低 S 期的比例,表明促进肝星状细胞凋亡可能也参与赤芍总苷抗肝纤维化的作用。前人和本论文的研究结果表明,赤芍总苷抗肝纤维化是一个多靶点、多通路的综合调节过程,涉及保护肝细胞、抑制肝星状细胞增殖、促进肝星状细胞凋亡等环节,其详细的作用机制和信号通路有待进一步研

究。

参考文献(References)

[1] Ma SC, Deng SW. Study on the producing technology of total paeony glucosides [J]. Chinese Herbal Medicines, 1998, 29(10): 664-667 (In Chinese)

[2] He YL, Zhou D, Dong LY. Protective effects of total paeony glycosides against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Chinese Journal of Clinical Rehabilitation, 2006, 10 (39): 59-61 (In Chinese)

[3] Lei L, Hu JY, Yu Y, et al. Study on the antiendotoxin effect of Radix Paeoniae [J]. Pharmacology and clinics of Chinese materia medica, 2006, 22(6): 32-34 (In Chinese)

[4] Shen X, Mo XY, Du XY. The protective effect of total paeony glycoside on apoptosis in myocardial ischemic rats [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2007, 23(10): 1300-1305 (In Chinese)

[5] Wu ZB, Wang T, Liu QY, et al. Study on the Anti-coagulation Mechanism of Total Paeony Glycosides [J]. Journal of Anhui TCM college, 2007, 26(3): 39-42 (In Chinese)

[6] Wang H, Wei W, Wang NP, et al. Effects of total glucosides of peony on immunological hepatic fibrosis in rats [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(14): 2124-2129

[7] Sun WY, Wei W, Gui SY, et al. Protective Effect of Extract from Paeonia lactiflora and Astragalus membranaceus against Liver Injury Induced by Bacillus Calmette-Guérin and Lipopolysaccharide in Mice [J]. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2008, 103: 143-149

[8] Lamireau T, Desmouliere A, Bioulac SP, et al. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. Arch Pediatr, 2002, 9(4): 3392-3405

[9] Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis [J]. Gastroenterol, 2008, 134: 1655-1669

[10] Li HB, Ye BP. Research advance on anti-hepatic fibrosis drugs [J]. Progress in Modern Blomedicine, 2010, 10(9): 1780-1782 (In Chinese)

[11] Henderson NC, Forbes SJ. Hepatic fibrogenesis: From within and outwith[J]. Toxicology, 2008, 254: 130-135

[12] Fredman SL, Lalazar A, Wong L, et al. HSC-T6 cells, an immortalized rat stellate cell line. Hepatology, 1997, 26: 338

[13] Scott L. Friedman. Hepatic fibrosis-Overview [J]. Toxicology, 2008, 254: 120-129

(下转第 2641 页)

突切迹后缘与翼钩的连线上由后向前依次经过茎乳孔、棘孔和卵圆孔,乳突切迹后缘可做为血管神经三角内重要结构的定位参考点。

侧颅底结构错综复杂,外科手术常常涉及到多个学科,明确各个结构的解剖关系对于临床应用有重要指导意义。本研究提供了新的侧颅底分区方法,将侧颅底血管神经集中的区域明确划分为血管神经三角,为临床手术入路和定位提供解剖学参考。

参考文献(References)

- [1] 葛明华,谭卓,何剑锋,等.侧颅底受侵或侧颅底相关头颈部恶性肿瘤的手术治疗[J].中国肿瘤,2008,17(5):407-410
Ge Ming-hua, Tan Zhuo, He Jian-feng, et al. An Analysis of Operation for Lateral Skull Base Involved or Related Head and Neck Malignancy[J]. Bulletin of Chinese Cancer, 2008, 17(5): 407-410
- [2] 刘良发,姜泗长,杨伟炎,等.侧颅底神经血管的应用解剖学-颞下窝径路的外科解剖学研究[J].中国临床解剖学杂志,1999,17(2):97-99
Liu Liang-fa, Jiang Si-chang, Yang Wei-yan, et al. Applied Anatomy of Infratemporal Fossa Approach of Lateral Cranial Base [J]. Chinese Journal of Clinical Anatomy, 1999,17(2):97-99
- [3] 邱明国,张绍祥.侧颅底解剖学研究及其临床意义[J].中国临床解剖学杂志,2002,20(4):318-320
Qiu Ming-guo, Zhang Shao-xiang. Anatomy of the lateral skull base and its clinical significance [J]. Chinese Journal of Clinical Anatomy, 2002,20(4):318-320
- [4] 刘良发,姜泗长,杨伟炎.侧颅底的解剖[J].中国耳鼻咽喉颅底外科杂志,1996.2. (4):237-340
Liu Liang-fa, Jiang Si-chang, Yang Wei-yan. Anatomy of the lateral skull base [J]. Chinese Journal of Otorhinolaryngology-skull Base Surgery. 1996.2. (4):237-340
- [5] Huijzer VC. Anatomy of the skull base and the infratemporal fossa[J]. Adv Otorhinolaryngol, 1984,34:242-253
- [6] Kumar A, Valvassori G, Jafar J, et al. Skull base anatomy: A classification and surgical approaches [J]. Laryngoscope, 1986, 96 (3): 252-263
- [7] 姜平,童鑫康,杭健育.与颅底外科手术入路有关的应用解剖[J].中国临床解剖学杂志,1996,14(4):268-270
Jiang Ping, Tong Xin-Kang, Hang Jian-yu. The application of anatomy connect with skull base surgery approaches [J]. Chinese Journal of Clinical Anatomy, 1996, 14(4):268-270
- [8] 余得志,邱建新,王节,等.成人侧颅底临床解剖学研究[J].临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2008,22(10):449-453
Yu De-zhi, Qiu Jian-xin, Wang Jie, et al. Clinical anatomical study of the adult lateral skull base[J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology, 2008,22(10):449-453
- [9] 许华,张铁辉,蔺友志,等.侧颅底后部骨性标志测量和横窦、乙状窦的体表定位研究[J].中国微侵袭神经外科杂志,2006,11(5):214-216
Xu Hua, Zhang Tie-hui, Lin You-zhi, et al. Measurement of bony landmarks in the posterior part of the lateral cranial base[J]. Chinese Journal of Minimally Invasive Neurosurgery, 2006,11(5):214-216
- [10] 夏寅,王天铎.侧颅底及颅后窝手术入路应用解剖[J].山东医科大学学报,2001,39(2):155-157
Xia Yin, Wang Tian-duo. Applied Anatomy for Approaches of the Lateral Skull Base and Posterior Fossa[J]. ACTA Academiae Medicinae ShanDong, 2001, 39(2):155-157
- [11] synthesis[J]. Can J Gastroenterol, 2001,15(3): 187-193
- [12] Jiang YD, Li JX, Han HX, et al. Effect of aqueous extract of Radix Paeoniae on the expression of protein bax, bcl-2 and caspase-3 in HSC-T6 [J]. Beijing Journal of Traditional Chinese Medicine, 2007, 26(4): 247 (In Chinese)
- [13] Han HX, Li JX, Liu DX, et al. Apoptosis-promoting effect of serum with extract from Radix Paeoniae Rubra on HSC-T6 cells [J]. Shen-zhen Journal of Integrated traditional Chinese and Western Medicine, 2007, 17(1): 1-5 (In Chinese)
- [14] Gao XY, Sun JN, Wang WQ, et al. Preparation of Total Paeony Glycosides and Research on its Hepatoprotective Effects in Mice [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2010, 16 (18): 183-186 (In Chinese)
- [15] Yuan DS, Zhou LF, Shi L. Protective effect of total paeony glucoside on hepatic injury induced by D-galactosamine [J]. Journal of tropical medicine, 2007, 7(2): 139-142 (In Chinese)
- [16] Neubauer K, Saile B, Ramadori G. Liver fibrosis and altered matrix

(上接第 2611 页)