

五味子配伍对补骨脂致肝细胞氧化损伤和内质网应激的影响[△]

张婧茜^{1*}, 殷佳², 曲晓琳¹, 刘慧¹, 王娜¹, 闫佳靓¹, 傅春升^{3#} (1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 山东中医药大学附属医院乳腺甲状腺外科, 济南 250014; 3. 山东中医药大学附属医院科技处, 济南 250014)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)09-1088-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.09.11



摘要 目的 研究五味子配伍对补骨脂致L02肝细胞氧化损伤和内质网应激的影响,为补骨脂-五味子配伍减毒的临床应用提供参考。方法 将L02细胞分为空白对照组、补骨脂模型组(1 200 μg/mL补骨脂,以生药量计)和补骨脂-五味子低、中、高剂量组(1 200 μg/mL补骨脂分别联用600、1 200、2 400 μg/mL五味子,以生药量计)。各组细胞加培养液或药液培养48 h后,检测细胞中天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)水平,检测细胞培养液中谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平,检测细胞中活性氧(ROS)水平及细胞线粒体膜电位,检测细胞中葡萄糖调节蛋白78(GRP-78)、蛋白激酶R样内质网激酶(PERK) mRNA及其蛋白表达水平。结果 与空白对照组比较,补骨脂模型组细胞(或其培养液)中AST、ALT、MDA、ROS水平和GRP-78、PERK mRNA及其蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),GSH、SOD水平和线粒体膜电位均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与补骨脂模型组比较,补骨脂-五味子低、中、高剂量组上述指标均显著改善($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 五味子与补骨脂配伍后可以缓解补骨脂引起的L02细胞氧化损伤和内质网应激。

关键词 五味子;补骨脂;配伍减毒;肝损伤;氧化损伤;内质网应激

Effects of compatibility of *Schisandra chinensis* on *Psoralea corylifolia*-induced oxidative damage and endoplasmic reticulum stress in hepatocytes

ZHANG Jingxi¹, YIN Jia², QU Xiaolin¹, LIU Hui¹, WANG Na¹, YAN Jiajing¹, FU Chunsheng³ (1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Dept. of Breast and Thyroid Surgery, the Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China; 3. Dept. of Science and Technology, the Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the effects of the compatibility of *Schisandra chinensis* on *Psoralea corylifolia*-induced oxidative damage and endoplasmic reticulum stress in L02 hepatocytes, and to provide reference for clinical use of the compatibility attenuation of *P. corylifolia*-*S. chinensis*. **METHODS** L02 cells were divided into blank control group, *P. corylifolia* model group (1 200 μg/mL *P. corylifolia*, calculated by crude drug), *P. corylifolia*-*S. chinensis* low-dose, medium-dose and high-dose groups (1 200 μg/mL *P. corylifolia* combined with 600, 1 200, 2 400 μg/mL *S. chinensis*, respectively, calculated by crude drug). After the cells in each group were cultured in culture medium or drug solution for 48 hours, the levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were detected; the levels of glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in cell culture medium were detected; reactive oxygen species (ROS) level and mitochondrial membrane potential in cells were detected; mRNA and protein expressions of glucose-regulated protein 78 (GRP-78) and protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) were detected. **RESULTS** Compared with blank control group, the levels of AST, ALT, MDA and ROS, mRNA and protein expressions of GRP-78 and PERK were increased significantly in *P. corylifolia* model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); while GSH and SOD levels, mitochondrial membrane potential were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with *P. corylifolia* model group, above indexes of *P. corylifolia*-*S. chinensis* low-dose, medium-dose and high-dose groups were all improved significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **CONCLUSIONS** The compatibility of *P. corylifolia*-*S. chinensis* can alleviate *P. corylifolia*-induced oxidative damage and endoplasmic reticulum stress of L02 cells.

KEYWORDS *Schisandra chinensis*; *Psoralea corylifolia*; compatibility attenuation; liver injury; oxidative damage; endoplasmic reticulum stress

[△] 基金项目:山东省中医药科技发展计划项目(No.2019-0079)

* 硕士研究生。研究方向:中药制剂新剂型、新工艺。E-mail: hhzhangjingxi@163.com

通信作者:主任药师,硕士生导师。研究方向:中药制剂新剂型、新工艺。E-mail: yfuchunsheng@163.com

补骨脂为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实,具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻的功效,临床上常用来治疗骨质疏松症、骨软化症和皮肤病^[1-2]。近年来有报道显示,补骨脂及其复方制剂可致肝损伤^[3-4]。五味子为木兰科植物五味子 *Schisandra*

chinensis (Turcz.) Baill.的干燥成熟果实,是临床上广泛应用的保肝中药^[6]。研究发现,五味子与补骨脂配伍可减轻补骨脂引起的肝损伤^[6]。

毒理学研究表明,内质网应激和氧化应激是补骨脂诱导肝损伤的重要机制^[7-10]。其中,内质网应激是通过影响活性氧(reactive oxygen species, ROS)活性来激活氧化应激反应:ROS活性升高会消耗细胞内的抗氧化物质谷胱甘肽(glutathione, GSH)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),引起细胞内丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量增加,致使线粒体膜电位下降、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)和丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)释放过度,进一步加剧线粒体功能障碍,最终发生氧化损伤^[11]。除此之外,氧化应激也可通过内质网中未折叠和折叠错误的蛋白质过度积累,激活内质网应激,导致内质网应激相关标志物葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP-78)和蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)的表达升高^[12]。鉴于此,本研究拟通过体外培养L02肝细胞,从氧化应激和内质网应激两个角度探讨五味子与补骨脂配伍后减轻补骨脂对L02肝细胞损伤的作用机制,为补骨脂-五味子配伍减毒的临床应用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器包括CKX41SF型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司),Cytation 5型细胞成像酶标仪(美国Bio Tek公司),5424R型高速低温离心机(德国Eppendorf公司),HF90型CO₂培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司),Luna- II型自动细胞计数仪(韩国Logos Biosystems公司),Nano Drop One型超微量分光光度计、QuantStudio 5型高分辨实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),GE Amersham Imager 600型多色荧光成像系统(美国General Electric公司)。

1.2 主要药品与试剂

补骨脂饮片(批号2006001)、五味子饮片(批号200301)购自山东中医药大学附属医院中药房,由山东中医药大学附属医院中药临床药学研究室张学顺主任药师鉴定分别为豆科植物补骨脂*P. coryfolia* L.和木兰科植物五味子*S. chinensis* (Turcz.) Baill.的干燥成熟果实。MTT粉末、GSH检测试剂盒(批号BC1175)均购自北京索莱宝科技有限公司;重组Anti-GRP-78抗体、重组Anti-PERK抗体均购自艾博抗(上海)贸易有限公司; β -肌动蛋白(β -actin)抗体购自美国Proteintech公司;AST检测试剂盒(批号C010-2-1)、ALT检测试剂盒(批号C009-2-1)均购自南京建成生物工程研究所;SOD检测试剂盒(批号AK060)、MDA检测试剂盒(批号AK288)、JC-1线粒体膜电位荧光探针(批号D-9113)均购自北京博奥森生物技术有限公司;ROS检测试剂盒(批号

S0033S)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠免疫球蛋白G(IgG)(H+L)二抗、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)二抗均购自上海碧云天生物技术有限公司;其余试剂均为实验室常用规格,水为超纯水。

1.3 细胞株

人正常肝细胞株L02购自北纳创联生物技术有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

将L02细胞培养于含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的RPMI-1640培养基中,于37℃、5%CO₂、饱和湿度下培养。当细胞培养至80%融合时,用胰酶常规消化,取对数生长期的细胞进行实验。

2.2 药物的提取及配制

取补骨脂饮片、五味子饮片各100 g,分别加入10倍量水(1 000 mL)浸泡30 min,然后再以100℃煎煮3次,每次1 h,过滤,合并3次滤液,加热浓缩,制成生药质量浓度均为1 g/mL的浓缩液。将浓缩液在4℃下以5 000 r/min离心10 min,取上清液,用0.22 μ m微孔滤膜过滤;收集滤液,分装保存于-20℃环境下,实验时用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液稀释至需要的质量浓度。

2.3 细胞活力检测

采用MTT法进行检测。取对数生长期的L02细胞,按照 8×10^3 个/孔接种于96孔板中,常规培养24 h。将细胞分为不同质量浓度补骨脂组[0(空白对照)、375、750、1 500、3 000 μ g/mL,质量浓度参考前期预实验结果设置]和不同质量浓度五味子组[0(空白对照)、500、1 000、2 000、4 000、8 000 μ g/mL,质量浓度参考前期预实验结果设置],每组设置3个复孔。加入相应培养液/药液常规培养48 h后,每孔加入20 μ L MTT溶液(5 g/L),37℃孵育4 h。吸弃含MTT的培养液,每孔加入150 μ L的二甲基亚砜,轻微振荡10 min,使结晶充分溶解。采用酶标仪于490 nm波长处检测各组细胞的光密度(OD)值,计算细胞存活率[细胞存活率(%)=给药孔OD₄₉₀/空白对照孔OD₄₉₀ \times 100%],并采用改良寇氏法计算药物的半数抑制浓度(IC₅₀)。实验重复3次。

2.4 细胞中AST、ALT水平检测

采用微板法进行测定。取对数生长期的L02细胞,按照 4×10^3 个/孔接种于6孔板中,常规培养24 h。弃去旧培养基,将细胞分为空白对照组(含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基)、补骨脂模型组(1 200 μ g/mL补骨脂,质量浓度参照“2.3”项下实验结果设置)、补骨脂-五味子低、中、高剂量组(1 200 μ g/mL补骨脂分别联用600、1 200、2 400 μ g/mL五味子,质量浓度参照“2.3”项下实验结果设置),每组设置3个复孔。加入相应培养液/药液常规培养48 h,收集各组细胞,用磷酸盐缓冲液清洗1~2遍后,以1 000 r/min离心10 min,弃上清;细胞沉淀中加入匀浆介质,在冰浴条件下超声(功率300 W,频率40 kHz;每超声3~5 s、间隔30 s,重复5次)破碎,

制备匀浆液,按照试剂盒说明书步骤操作测定细胞中AST、ALT水平。实验重复3次。

2.5 细胞培养液中GSH、SOD、MDA水平检测

取对数生长期的L02细胞,按照 4×10^5 个/孔接种于6孔板中,常规培养24 h后,按“2.4”项下方法分组、给药和培养,每组设置3个复孔。加入相应培养液/药液常规培养48 h后,收集各组细胞,按照相应试剂盒方法操作后,采用酶标仪检测细胞培养液中GSH、SOD、MDA水平。实验重复3次。

2.6 细胞中ROS水平检测

采用流式细胞术进行检测。取对数生长期的L02细胞,按照 4×10^5 个/孔接种于6孔板中,常规培养24 h后,按“2.4”项下方法分组、给药、培养,每组设置3个复孔。加入相应培养液/药液常规培养48 h后,收集各组细胞,按照试剂盒说明书方法操作后,采用Flowjo10.4软件分析细胞中ROS水平。实验重复3次。

2.7 线粒体膜电位检测

采用JC-1法进行检测。取对数生长期的L02细胞,按照 4×10^5 个/孔接种于6孔板中,常规培养24 h后,按“2.4”项下方法分组、给药、培养,每组设置3个复孔。加入相应培养液/药液常规培养48 h后,弃去旧培养基,用磷酸盐缓冲液清洗细胞3次,加入100 μ L培养液,然后再加入100 μ L JC-1染色工作液(10 μ g/mL),避光孵育30 min。孵育结束后吸弃上清液,加入磷酸盐缓冲液洗涤细胞2次,加入培养液,荧光显微镜下观察细胞中JC-1聚合体与JC-1单体的荧光情况(当线粒体膜电位较高时,JC-1大多聚集在线粒体的基质中,形成聚合体,发出红色荧光;而当线粒体膜电位较低时,JC-1不能聚集在线粒体的基质中,此时JC-1为单体,发出绿色荧光),并采用Image J 1.8.0软件分析红色荧光强度值和绿色荧光强度值。以红色荧光强度与绿色荧光强度的比值表示线粒体膜电位变化水平,比值越低表示膜电位越低。实验重复3次。

2.8 细胞中GRP-78、PERK mRNA表达水平检测

采用qRT-PCR法进行检测。取对数生长期的L02细胞,按照 4×10^5 个/孔接种于6孔板中,常规培养24 h后,按“2.4”项下方法分组、给药、培养,每组设置3个复孔。加入相应培养液/药液培养48 h后,收集各组细胞,提取细胞中总RNA;测定总RNA浓度和纯度后,逆转录为cDNA,并以cDNA为模板进行PCR扩增。扩增程序为:50 $^{\circ}$ C热启动10 min,95 $^{\circ}$ C预变性30 s;95 $^{\circ}$ C变性5 s,57 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组细胞中GRP-78、PERK mRNA表达水平。实验重复3次。引物序列由湖南艾科瑞生物工程有限公司合成,待测基因的引物序列及扩增产物大小见表1。

2.9 细胞中GRP-78、PERK蛋白表达水平检测

采用Western blot法进行检测。取对数生长期的L02细胞,按照 4×10^5 个/孔接种于6孔板中,常规培养24 h后,按“2.4”项下方法分组、给药、培养,每组设置3个复

表1 qRT-PCR引物序列及扩增产物大小

基因名称	引物序列	扩增产物大小/bp
GRP-78	上游引物:5'-TGCTGGAAAGCCACCAAGA-3'	127
	下游引物:5'-CTTCACCAGTTGGGGGAGGG-3'	
PERK	上游引物:5'-AGGTGACTGTGGAGGACGCT-3'	299
	下游引物:5'-ACGGTCTTGGTCCCACCTGGA-3'	
β -actin	上游引物:5'-GAGCTACGAGCTGCCTGACG-3'	250
	下游引物:5'-TGCCAGGGCAGTGATCTCTCT-3'	

孔。加入相应培养液/药液常规培养48 h后,吸弃培养液,用磷酸盐缓冲液冲洗细胞3遍,加入细胞裂解液(RIPA-PMSF体积比100:1)进行细胞裂解,收集各组细胞的总蛋白,采用BCA法测定细胞中总蛋白浓度。取10 μ L蛋白样品上样,经聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶电压80 V,电泳时间30 min;分离胶电压100 V,电泳时间60 min)分离,然后电转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上(电流350 mA,转膜时间90 min),将PVDF膜置于5%脱脂奶粉中封闭2 h;加入一抗(GRP-78一抗的稀释比例为1:5 000,PERK一抗的稀释比例为1:1 000, β -actin一抗的稀释比例为1:30 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜;用TBST洗涤5次,每次5 min,加入稀释后二抗(稀释比例均为1:1 000),常温孵育1 h;TBST洗膜5次,每次5 min,加入ECL发光液,使用化学发光成像仪进行成像。应用Image J 1.8.0软件进行灰度值分析,以目的蛋白条带灰度值与内参(β -actin)蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。实验重复3次。

2.10 统计学方法

使用SPSS 21.0软件对实验数据进行统计分析,使用GraphPad Prism 8.0软件作图。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 细胞活力测定结果

补骨脂刺激L02细胞48 h后,其对细胞的 IC_{50} 为1 203 μ g/mL,故本研究选择补骨脂1 200 μ g/mL作为造模质量浓度。五味子刺激L02细胞48 h后,其对细胞的 IC_{50} 为3 348 μ g/mL,故本研究选择600、1 200、2 400 μ g/mL作为五味子的配伍浓度与补骨脂联用进行后续研究。

3.2 细胞中AST、ALT水平测定结果

与空白对照组比较,补骨脂模型组细胞中AST、ALT水平显著升高($P<0.01$);与补骨脂模型组比较,补骨脂-五味子低、中、高剂量组细胞中AST、ALT水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表2。

3.3 细胞培养液中GSH、SOD、MDA水平测定结果

与空白对照组比较,补骨脂模型组细胞培养液中GSH、SOD水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),MDA水平显著升高($P<0.05$);与补骨脂模型组比较,补骨脂-五味子低、中、高剂量组细胞培养液中GSH、SOD水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),MDA水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表3。

表2 各组细胞中AST、ALT水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, U/L$)

组别	AST	ALT
空白对照组	28.45 ± 3.41	22.21 ± 3.02
补骨脂模型组	204.36 ± 5.99 ^a	152.59 ± 8.61 ^a
补骨脂-五味子低剂量组	175.96 ± 4.08 ^b	138.71 ± 6.70 ^c
补骨脂-五味子中剂量组	128.33 ± 4.94 ^b	99.00 ± 3.98 ^c
补骨脂-五味子高剂量组	82.70 ± 5.61 ^b	62.37 ± 4.48 ^b

a: 与空白对照组比较, $P < 0.01$; b: 与补骨脂模型组比较, $P < 0.01$; c: 与补骨脂模型组比较, $P < 0.05$

表3 各组细胞培养液中GSH、SOD、MDA水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	GSH/($\mu\text{g/L}$)	SOD/(U/mL)	MDA/(nmol/mL)
空白对照组	116.15 ± 1.61	17.82 ± 0.21	3.98 ± 0.41
补骨脂模型组	88.01 ± 3.95 ^a	8.04 ± 0.24 ^b	8.01 ± 0.25 ^a
补骨脂-五味子低剂量组	102.68 ± 2.90 ^c	8.51 ± 0.45 ^c	7.53 ± 0.21 ^c
补骨脂-五味子中剂量组	105.92 ± 3.08 ^c	11.39 ± 0.30 ^d	6.56 ± 0.21 ^d
补骨脂-五味子高剂量组	115.28 ± 3.22 ^d	13.16 ± 0.27 ^d	5.60 ± 0.32 ^d

a: 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b: 与空白对照组比较, $P < 0.01$; c: 与补骨脂模型组比较, $P < 0.05$; d: 与补骨脂模型组比较, $P < 0.01$

3.4 细胞中ROS水平测定结果

与空白对照组比较,补骨脂模型组细胞中ROS水平显著升高($P < 0.01$);与补骨脂模型组比较,补骨脂-五味子低、中、高剂量组细胞中ROS水平均显著降低($P < 0.01$)。结果见图1、表4。

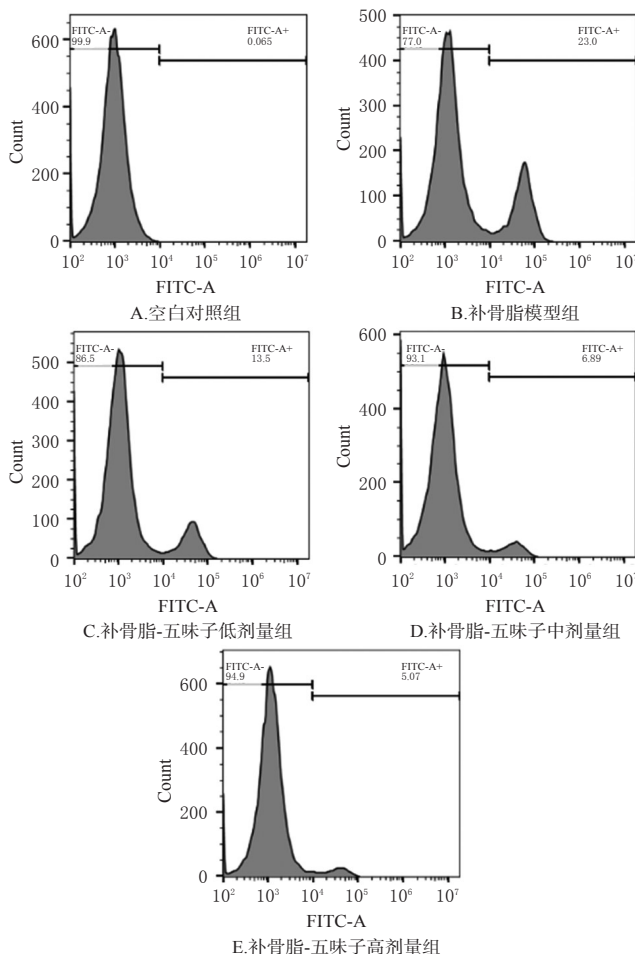


图1 各组细胞中ROS水平检测的流式细胞图

3.5 细胞线粒体膜电位测定结果

与空白对照组比较,补骨脂模型组细胞中绿色荧光强于红色荧光,线粒体膜电位降低($P < 0.01$);与补骨脂模型组比较,补骨脂-五味子低、中、高剂量组细胞中红色荧光强于绿色荧光,线粒体膜电位显著升高($P < 0.01$)。结果见表4、图2。

表4 各组细胞ROS水平和线粒体膜电位测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	ROS/%	线粒体膜电位(红/绿荧光强度比值)
空白对照组	1.11 ± 0.04	1.01 ± 0.01
补骨脂模型组	22.47 ± 3.14 ^a	0.31 ± 0.01 ^a
补骨脂-五味子低剂量组	14.53 ± 1.05 ^b	0.39 ± 0.01 ^b
补骨脂-五味子中剂量组	8.76 ± 2.11 ^b	0.52 ± 0.02 ^b
补骨脂-五味子高剂量组	7.64 ± 2.62 ^b	0.74 ± 0.01 ^b

a: 与空白对照组比较, $P < 0.01$; b: 与补骨脂模型组比较, $P < 0.01$

3.6 细胞中GRP-78、PERK mRNA表达水平测定结果

与空白对照组比较,补骨脂模型组细胞中GRP-78、PERK mRNA表达水平显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与补骨脂模型组比较,补骨脂-五味子低、中、高剂量组细胞中的GRP-78、PERK mRNA表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见表5。

3.7 细胞中GRP-78、PERK蛋白表达水平测定结果

与空白对照组比较,补骨脂模型组细胞中GRP-78、PERK蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$);与补骨脂模型组比较,补骨脂-五味子低、中、高剂量组细胞中GRP-78、PERK蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见图3、表6。

4 讨论

在我国,由中药引发的药物性肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)病例约占总DILI病例的26%^[13],其中由补骨脂造成的肝损伤因发病率较高越来越受到关注。但目前关于补骨脂致肝损伤的作用机制仍未完全阐明。一般认为肝损伤与引起机体胆汁淤积及干扰肝再生、氧化应激与线粒体功能、内质网应激反应等相关^[14]。其中氧化应激和内质网应激引起的肝细胞损伤在各种肝脏疾病的发病机制中起着重要作用^[15-19]。

氧化应激是肝损伤的危险因素之一。在氧化应激过程中,长期保持高水平的ROS会引起DNA、蛋白质和脂质受损;当ROS水平超过机体的抗氧化能力后,会导致细胞内的抗氧化物质GSH和SOD过量消耗,使细胞内脂质过氧化、MDA水平升高,加剧线粒体功能障碍,致使AST、ALT过度释放,引起细胞损伤^[20]。线粒体损伤的早期标志是线粒体膜电位降低^[21]。线粒体损伤后可导致大量的ROS产生,进而打破机体的氧化平衡状态,最终致使线粒体膜电位发生变化^[22]。因此,AST、ALT、GSH、SOD、MDA、ROS水平和线粒体膜电位是反映细胞氧化应激程度的重要指标。近年来越来越多的研究发现,内质网应激与DILI有关^[23-24]。当折叠错误蛋白或未折叠蛋白在内质网内大量积累以及钙在内质网

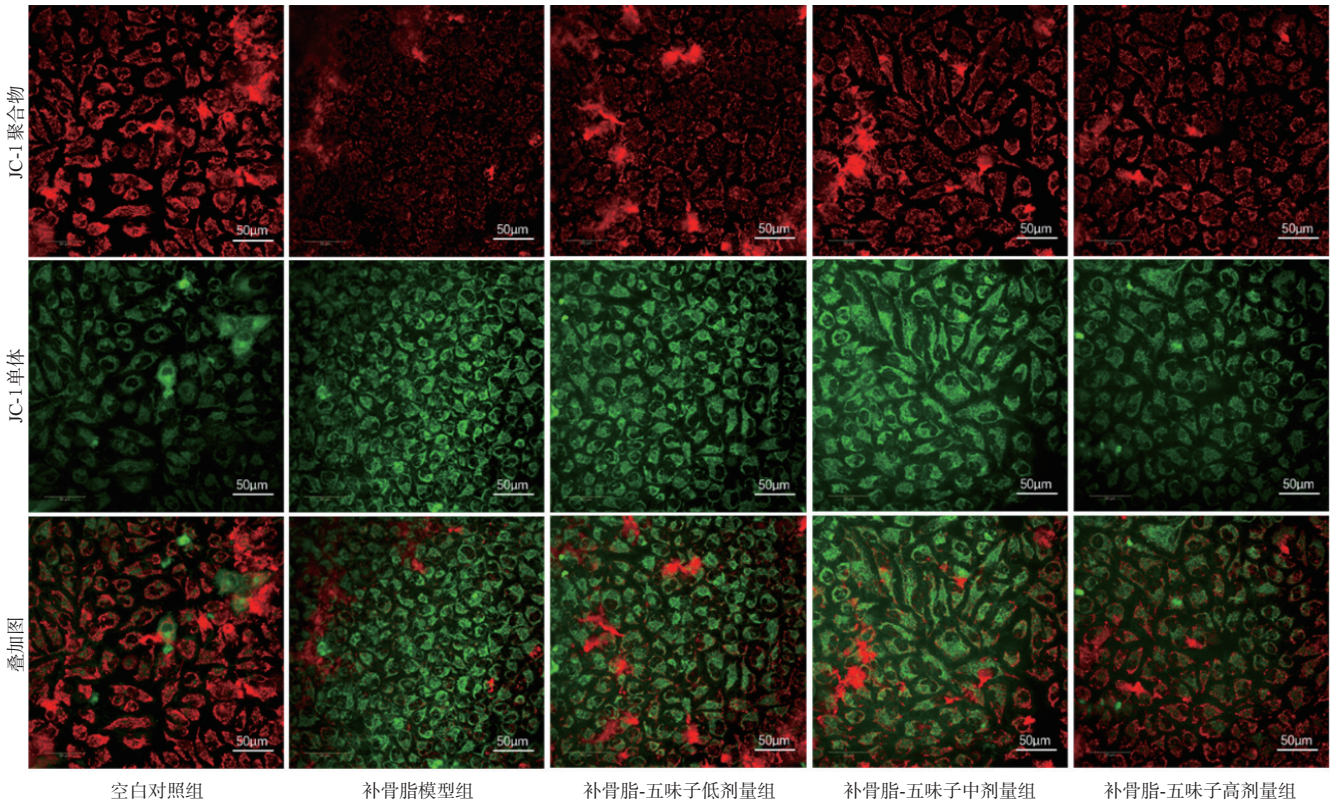


图2 各组细胞线粒体膜电位测定的荧光显微图

表5 各组细胞中 GRP-78、PERK mRNA 表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	GRP-78	PERK
空白对照组	1.00 ± 0.06	1.01 ± 0.01
补骨脂模型组	1.30 ± 0.03 ^a	1.57 ± 0.05 ^b
补骨脂-五味子低剂量组	1.13 ± 0.01 ^c	1.26 ± 0.03 ^d
补骨脂-五味子中剂量组	0.94 ± 0.01 ^c	1.04 ± 0.03 ^d
补骨脂-五味子高剂量组	0.80 ± 0.03 ^c	0.86 ± 0.02 ^e

a: 与空白对照组比较, $P < 0.01$; b: 与空白对照组比较, $P < 0.05$; c: 与补骨脂模型组比较, $P < 0.01$; d: 与补骨脂模型组比较, $P < 0.05$

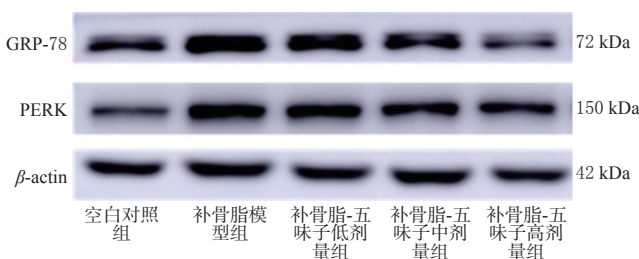


图3 各组细胞中 GRP-78、PERK 蛋白表达的电泳图

表6 各组细胞中 GRP-78、PERK 蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	GRP-78/ β -actin	PERK/ β -actin
空白对照组	0.78 ± 0.04	0.63 ± 0.03
补骨脂模型组	1.12 ± 0.08 ^a	1.14 ± 0.02 ^b
补骨脂-五味子低剂量组	0.99 ± 0.07 ^b	1.00 ± 0.02 ^c
补骨脂-五味子中剂量组	0.87 ± 0.06 ^c	0.92 ± 0.05 ^c
补骨脂-五味子高剂量组	0.57 ± 0.03 ^c	0.80 ± 0.06 ^c

a: 与空白对照组比较, $P < 0.01$; b: 与补骨脂模型组比较, $P < 0.05$; c: 与补骨脂模型组比较, $P < 0.01$

中流失时,内质网的功能就会受损,这种情况被定义为内质网应激^[25]。通过检测内质网应激相关标志物 GRP-78、PERK 的 mRNA 和蛋白表达水平,可反映内质网应激的发生情况^[26]。目前,研究者发现 GRP-78 与肝癌的发生和发展密切相关^[27]。在内质网应激发生初期,GRP-78 与内质网跨膜信号成分 PERK 结合后,促进错误折叠蛋白或未折叠蛋白达到正常状态,从而减少内质网负荷,并保持细胞内环境的稳定性^[28]。但在长期内质网应激的条件下,PERK 与 GRP-78 会迅速分离,进而激活下游信号转导,诱导细胞发生内质网应激损伤^[29]。

本研究以补骨脂刺激细胞时,细胞中 AST、ALT、ROS 水平及细胞培养液中 MDA 水平明显升高,细胞培养液中 GSH、SOD 水平和线粒体膜电位明显降低,表明补骨脂可导致 L02 细胞发生氧化损伤。通过对内质网应激相关标志物 GRP-78、PERK mRNA 及其蛋白表达水平进行检测,发现补骨脂刺激后细胞中 GRP-78 和 PERK mRNA 及其蛋白的表达均显著上调,表明补骨脂激活了内质网应激和相关的凋亡信号通路,从而造成肝损伤。而五味子配伍后,显著降低了细胞(或其培养液)中 AST、ALT、ROS、MDA 水平,显著升高了 GSH、SOD 水平和线粒体膜电位,说明五味子配伍后产生了抗氧化作用,可启动细胞内的抗氧化机制,从而改善补骨脂导致的肝细胞氧化损伤。并且,五味子配伍后能明显下调细胞中 GRP-78、PERK mRNA 及其蛋白表达,提示补骨脂与五味子配伍后可缓解内质网应激。

综上所述,五味子与补骨脂配伍后可以缓解补骨脂引起的L02肝细胞氧化损伤和内质网应激,这对于防治中药引起的肝损伤具有一定参考价值。但由于氧化应激和内质网应激的机制非常复杂,在后续的研究中还需进一步完善。

参考文献

- [1] CHO J H, OH D S, HONG S H, et al. A nationwide study of the incidence rate of herb-induced liver injury in Korea[J]. Arch Toxicol, 2017, 91(12):4009-4015.
- [2] 赵子婧, 巩政, 史少泽, 等. 补骨脂及其与甘草配伍单次给药大鼠的毒代动力学及肝肾毒性初探[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(11):2221-2226.
- [3] 朱春雾, 王海南, 张亚蕾, 等. 仙灵骨葆胶囊导致肝损伤[J]. 肝脏, 2018, 23(12):1090-1093.
- [4] CHEUNG W I, TSE M L, NGAN T, et al. Liver injury associated with the use of Fructus Psoraleae (Bo-gol-zhee or Bu-gu-Zhi) and its related proprietary medicine[J]. Clin Toxicol (Phila), 2009, 47(7):683-685.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版. 北京:中国医药科技出版社, 2020:68.
- [6] 郭文鹤, 李晓宇, 黄娜娜, 等. 基于中药性味理论的补骨脂配伍规律研究进展[J]. 中国药物警戒, 2017, 14(12):737-741.
- [7] 王敏. 补骨脂二氢黄酮甲醚对肝脏毒性作用及机制研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨商业大学, 2018.
- [8] YU Y L, YU R L, MEN W J, et al. Psoralen induces hepatic toxicity through PERK and ATF6 related ER stress pathways in HepG2 cells[J]. Toxicol Mech Methods, 2020, 30(1):39-47.
- [9] YANG Y, TANG X L, HAO F R, et al. Bavachin induces apoptosis through mitochondrial regulated ER stress pathway in HepG2 cells[J]. Biol Pharm Bull, 2018, 41(2):198-207.
- [10] 于泓洋, 宋远航, 赵亮, 等. 内质网应激与酒精性肝病研究进展[J]. 化工时刊, 2021, 35(10):32-36.
- [11] GÖRLACH A, BERTRAM K, HUDECOVA S, et al. Calcium and ROS: a mutual interplay[J]. Redox Biol, 2015, 6:260-271.
- [12] PLAISANCE V, BRAJKOVIC S, TENENBAUM M, et al. Endoplasmic Reticulum stress links oxidative stress to impaired pancreatic beta-cell function caused by human oxidized LDL[J]. PLoS One, 2016, 11(9):e0163046.
- [13] WANG R, QI X S, YOSHIDA E M, et al. Clinical characteristics and outcomes of traditional Chinese medicine-induced liver injury: a systematic review[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 12(4):425-434.
- [14] 杨阔, 高葺, 马亚中, 等. 补骨脂素药理作用及肝毒性机制的研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(1):289-298.
- [15] 谢一激, 褚金国, 杨乃彬, 等. 姜黄素对脂多糖/D-氨基半乳糖诱导大鼠急性肝损伤中内质网应激的影响[J]. 浙江医学, 2020, 42(13):1359-1363, 1460.
- [16] WU F L, LIU W Y, VAN POUCKE S, et al. Targeting endoplasmic Reticulum stress in liver disease[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2016, 10(9):1041-1052.
- [17] 李艳, 曹美群, 陶文聪, 等. 黄芪散对高脂饮食诱导肥胖大鼠肝脏内质网应激信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(21):6-11.
- [18] 陈圻, 黄文海, 沈正荣, 等. 上皮-间质转化在肺纤维化中的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(9):1155-1160.
- [19] 高晓乐, 段冷昕, 仇可可, 等. 鬼针草水煎液对高脂高糖诱导的小鼠非酒精性脂肪肝的作用及机制研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(16):3915-3921.
- [20] 刘欣盈, 陆文清, 沈昕昕, 等. SIRT3在白血病耐药中作用的研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2019, 39(3):331-335.
- [21] KANG J, JIA Z H, PING Y, et al. Testosterone alleviates mitochondrial ROS accumulation and mitochondria-mediated apoptosis in the gastric mucosa of orchietomized rats[J]. Arch Biochem Biophys, 2018, 649:53-59.
- [22] BHATTI J S, BHATTI G K, REDDY P H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders: a step towards mitochondria based therapeutic strategies[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(5):1066-1077.
- [23] FREDRIKSSON L, WINK S, HERPERS B, et al. Drug-induced endoplasmic Reticulum and oxidative stress responses independently sensitize toward TNF α -mediated hepatotoxicity[J]. Toxicol Sci, 2014, 140(1):144-159.
- [24] IORGA A, DARA L, KAPLOWITZ N. Drug-induced liver injury: cascade of events leading to cell death, apoptosis or necrosis[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(5):1018.
- [25] MANDL J, MÉSZÁROS T, BÁNHEGYI G, et al. Minireview: endoplasmic Reticulum stress: control in protein, lipid, and signal homeostasis[J]. Mol Endocrinol, 2013, 27(3):384-393.
- [26] YU R L, YU Y L, SU S J, et al. Psoralen induces liver injuries through endoplasmic Reticulum stress signaling in female mice[J]. Drug Chem Toxicol, 2021:1-7.
- [27] LUO C L, XIONG H X, CHEN L F, et al. GRP78 Promotes Hepatocellular Carcinoma proliferation by increasing FAT10 expression through the NF- κ B pathway[J]. Exp Cell Res, 2018, 365(1):1-11.
- [28] 杨顺, 袁盾, 刘松林, 等. 内质网应激/未折叠蛋白反应在抑制脑胶质母细胞瘤中的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2021, 48(3):284-288.
- [29] 刘霞, 王艳, 江华维, 等. 内质网应激在年龄相关性黄斑变性中的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2022, 22(2):244-248.

(收稿日期:2022-01-05 修回日期:2022-03-24)

(编辑:林 静)