丁香提取物对人肝细胞 H_2O_2 氧化损伤的保护作用及其机制

张慧芸，　庄军辉

（河南科技大学 食品与生物工程学院，河南 洛阳 471003）

摘要：研究丁香提取物对由 H_2O_2 引起的人肝细胞 HL770 氧化损伤的保护作用及其机制。采用 H_2O_2 诱导建立细胞氧化损伤模型，通过测定细胞抗氧化酶活性、丙二醛、过氧亚硝基阴离子等指标，分析探讨丁香提取物对细胞损伤的保护作用。结果显示丁香水提取物和乙醇提取物可以剂量依赖性地提高细胞内的 SOD、CAT 和 GSH-Px 酶活性，降低氧化产物过氧亚硝基阴离子和丙二醛含量。表明丁香提取物可通过提高 HL7702 细胞内抗氧化酶活性和降低氧化产物的含量减轻细胞受到的氧化损伤。

关键词：丁香提取物；抗氧化；人肝细胞；过氧化氢；机制

中图分类号：TS 201.2　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2013)09—1002—06

Antioxidant Effects of Clove Polyphenols on RBL Cells Against Oxidative Damage

ZHANG Hui-yun，　*ZHUANG Jun-hui*

(College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: The objective of this study was to investigate the protective effects of clove extracts on HL770 caused by the damage of H_2O_2 and its protective mechanism. For this, oxidative damage was induced by H_2O_2. The influence of clove extracts on H_2O_2-induced HL770 injury was assessed by measuring the superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities, the malondialdehyde (MDA) content and the ONOO$^-$-content. It was found that the addition of clove extracts (0.1, 0.5, 2, and 10 mg/L) into the HL770 cell suspensions prior to the exposure to 100 μmol/L of H_2O_2 resulted in increased protection of SOD, CAT and GSH-PX while reducing oxidation products of peroxynitrite MDA. From the above result, it is concluded that the clove extracts possess protective effects on HL770 cell injuries induced by H_2O_2, and this may be related to improve the activity of intracellular antioxidant enzymes of HL7702, reduce the content of oxidation products.

Keywords: clove extracts, antioxidant, HL770, H_2O_2, mechanism

收稿日期：2013-01-15

作者简介：张慧芸(1977—)，女，黑龙江鸡西人，工学博士，副教授，主要从事天然产物开发与研究。E-mail：zhanghuiyun21@163.com

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

近年来,自由基与多种疾病的关系已愈来愈引起人们的重视,自由基生物医学的发展使得探寻高效低毒的自由基清除剂——天然抗氧化剂成为生物化学和医药学科领域的研究热点。目前,通过测定天然产物的抗氧化能力来筛选生物活性物质的研究较为广泛。随着研究的深入,对天然产物抗氧化作用机理的研究必将成为新的研究方向。

丁香为桃金娘科植物丁香(*Eugeniacaryophylla Thunb.*)的干燥花蕾,是药食两用植物。研究表明,丁香具有众多功能活性[1-3]。Peter 等人[4]报道,丁香中的丁香酚、异丁香酚以及没食子酸等都是重要的抗氧化成分。目前,国内外关于丁香在化学体系中抗氧化活性方面的作用已有较多研究报道[5-10],但对细胞抗氧化活性方面的研究尚未见报道。通过前期研究发现,丁香提取物在体外具有较好的抗氧化和清除自由基活性[11]。为了进一步考查其抗氧化生理功能,本课题研究中以培养人肝细胞 HL7702 为基础,从细胞水平探讨不同剂量丁香提取物对 H_2O_2 所致人肝细胞 HL7702 氧化应激损伤的保护作用及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

丁香,购于洛阳好一生大药房;人肝细胞 HL7702,购于中国科学院细胞库;含青霉素和链霉素的 RPMI-1640 培养液,购于 PBS Solarbio 公司;质量分数 0.25% 胰酶-EDTA 消化液,胎牛血清,DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium) 培养基,Gibco 公司提供;二甲基亚砜(DMSO)溶解后避光保存备用,噻唑蓝(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide,MTT),鲁米诺 (3-氨基邻苯二甲酰肼,luminol),购于 Sigma 公司;丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒,均购自南京建成生物工程公司。

1.2 主要仪器

GLZ-02 型真空冷冻干燥机,上海浦东冷冻干燥设备有限公司制造;RE-2000 型旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂制造;HF-90 型 CO_2 培养箱,力康发展有限公司制造;722S 可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司制造;UV-7504 型单光束紫外分光光度计,上海欣茂仪器有限公司制造;SHG-1 型生物化学发光测量仪,上海计量局实验工厂制造;24/96 孔细胞培养板,CORNING USA 提供;D-1320 型超净工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司制造。

1.3 方法

1.3.1 丁香水提取物的制备方法 将干燥并碾磨成粉状的丁香称取 50 g,放入蒸馏瓶中,加入 300 mL 去离子水,置于 100 ℃沸水中水浴,5 h 后取出抽滤,保存滤液,在残渣中再加入 180 mL 去离子水,100 ℃沸水中水浴 5 h 后取出抽滤,保存滤液,在残渣中再加入 60 mL 去离子水,100 ℃沸水中水浴 5 h 后取出抽滤,合并 3 次滤液,60 ℃旋转蒸发后,将剩余滤液分装于培养皿中,冷冻干燥。

1.3.2 丁香乙醇提取物的制备方法 将干燥并碾磨成粉的丁香称取 30 g 放入蒸馏瓶中,加入 200 mL 体积分数 80%的乙醇,于 60 ℃水浴锅中回流提取 2 h 后抽滤,保存滤液,在残渣中再加入 200 mL 体积分数 80%的乙醇,60 ℃水浴锅中回流提取 2 h 后抽滤,保存滤液,合并 2 次滤液,于 45 ℃下旋转蒸发后,收集剩余滤液分装于培养皿中,冷冻干燥。

1.3.3 HL7702 的培养 活化后的人肝细胞 HL7702 用质量分数 0.25%胰酶溶液消化后传代。血球计数板计数后,以 10^6 个/mL 的密度悬浮于含体积分数 10%胎牛血清(FBS)、100 g/mL 双抗、2 mmol/L 谷胺酰胺的 DMEM 培养基中,于 37 ℃,体积分数 5% CO_2 条件下培养。连续培养 3 代后用于实验。

1.3.4 MTT 法测定样品对于 HL7702 细胞生长的影响 将细胞按 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板,37 ℃培养 24 h 后,加不同浓度丁香提取物分别作用 1 h、12 h、24 h、36 h、48 h 后,每孔加入 0.5 mg/mL MTT 溶液 20 μL,37 ℃培养 4 h,吸去上清液,加 100 μL DMSO,振荡 10 min 使紫色结晶充分溶解,在酶标仪上测 570 nm 处的光吸收值。

1.3.5 实验分组 将细胞按 1×10^5 个/mL 接种于 24 孔板,37 ℃培养过夜,倾去培养基,进行分组实验。1)正常组(control):细胞正常培养 24 h,不加任何药物;2)H_2O_2 损伤组 (injury):细胞中加入 2 mmol/L H_2O_2 后,培养 24 h;3)H_2O_2+样品组:细胞与不同质量浓度的样品(0.1、0.5、2 mg/L 和 10 mg/L)预孵 2 h,再加入 2 mmol/L H_2O_2 培养 24 h。

1.3.6 细胞裂解液的制备 细胞裂解液的制备参

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

考Lee 等人[12]的方法。略加改动后操作如下:用于细胞抗氧化酶测定的细胞以 1.2×10^4 个/mL 的密度接种于 24 孔板。37 ℃培养 16 h 后将不同质量浓度的样品(0.1、0.5、2、10 mg/L)加入孔板中。37 ℃培养 24 h 后，每孔加入 150 μL 细胞裂解液（质量分数 1% triton X-100),4 ℃ 裂解 12 h 后测定酶活。细胞裂解液的蛋白质含量由考马斯亮兰法测定(Bradford,1976)。酶活单位为 U/mg。

1.3.7 *细胞酶活性及 MDA 含量测定* 收集各组处理后的细胞培养基及细胞裂解液，细胞收集后经-20 ℃与室温下反复冻融 3 次。细胞培养液及细胞裂解液的 CAT 、SOD 和 GSH-Px 水平均按试剂盒说明书进行测定。MDA 含量用硫代巴比妥酸(TBARS)方法测定[13]。

1.3.8 *过氧亚硝基阴离子（ONOO-）浓度的测定* 细胞内产生的 ONOO- 浓度的测定，取细胞裂解液 300 μL，加入 pH 10.5 的碳酸盐缓冲液 600 μL,混匀,再加入 0.4 mmol/L 鲁米诺溶液 100 μL,立即启动化学发光,测化学发光强度(CL intensity),对照用 D-Hank'S 液代替细胞裂解液[14]。

1.4 统计分析

每个试验重复 3 次,结果表示为平均数±SD。数据统计分析采用 Statistix 8.1 分析软件（St Paul, MN),利用软件包中 Linear Models 程序进行,差异显著性($P<0.05$)分析使用 Tukey HSD 程序。

2 结 果

2.1 丁香水提物、乙醇提取物对 HL7702 增殖的影响

MTT 法的实验方法简单,实验周期短,所需细胞数目较少,已成为检测活细胞和细胞增殖的一个主要手段。丁香水提取物和醇提取物对 HL7702 细胞增殖的影响分别见图 1、2,丁香水提取物、乙醇提取物在 0.1~10 mg/L 的低质量浓度范围内均可浓度与时间依赖性地促进 HL7702 增殖，而在 10 mg/L 和 50 mg/L 的高质量浓度下抑制 HL7702 的增殖。因此最终确定所考察样品的质量浓度范围为 0.1~10 mg/L。相比较而言,10 mg/L 的水提取物和 2 mg/L 的乙醇提取物对细胞的作用效果较优。

2.2 丁香提取物对 HL7702 细胞抗氧化酶系的作用

为了研究丁香提取物是否具有提高抗氧化酶系统活力的作用，测定了丁香提取物处理后的 HL7702 细胞的 CAT 、SOD 和 GSH-Px 酶的活力。H_2O_2 氧化损伤的 HL7702 的 CAT 、SOD 和 GSH-Px 酶活性明显比正常对照组低,而丁香水提取物和乙醇提取物均可以剂量依赖性地提高其活性，如图 3 所示。比较损伤组以及 10 mg/L 加样组的实验结果可以看出,HL7702 内 CAT、SOD 和 GSH-Px 酶活力明显升高,其中乙醇提取物比水提取物的作用效果好。质量浓度为 0.1~10 mg/L 的丁香提取物作用后的细胞中的 3 种酶含量均显著高于损伤组 ($P<0.05$),但仍比正常组低。

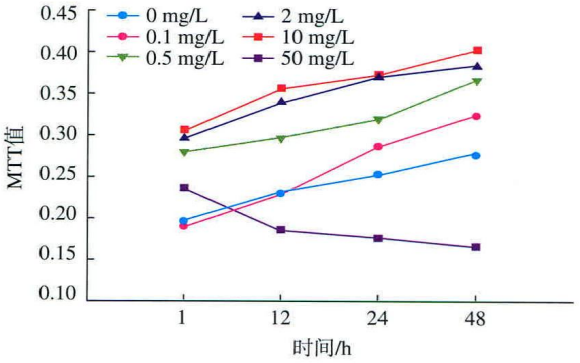


图 1 丁香水提取物对 HL7702 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of water extraction on the proliferation of HL7702

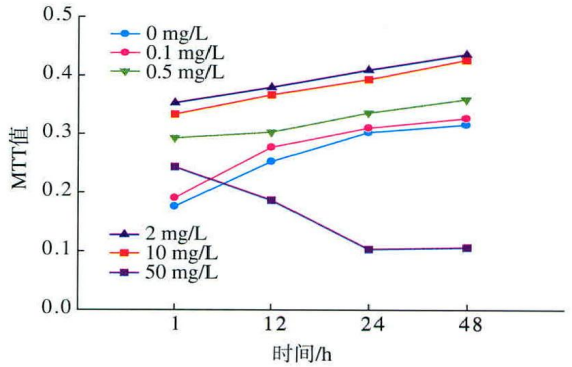
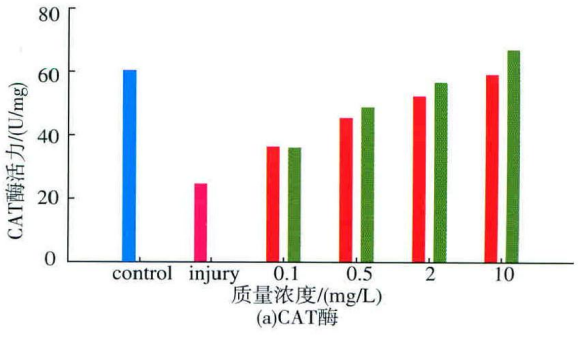


图 2 丁香醇提取物对 HL7702 细胞增殖的影响

Fig. 2 Effect of ethanol extraction on the proliferation of HL7702



© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

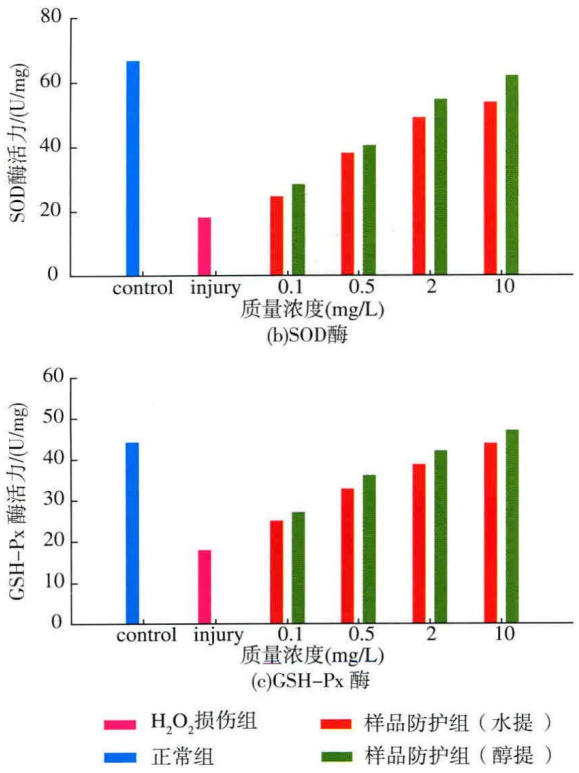


图 3　丁香提取物对氧化损伤的 HL7702 内 CAT、SOD 和 GSH-Px 酶活力的影响

Fig. 3　Effect of extractions of clove on the activity of CAT、SOD and GSH-Px of injured HL7702

H_2O_2 胁迫下，细胞在酶作用下生成大量自由基，也可发生 Fenton 反应生成·OH，还可以与蛋白酶协同作用促进 O_2^{-}·生成，从而导致细胞损伤。包括 SOD、CAT 和 GSH-Px 在内的抗氧化酶通过攻击自由基的作用来调节各种疾病的产生。因此保持自由基的产生率和自由基的清除率是生物体达到动态平衡的必要条件。SOD 能通过歧化反应清除生物细胞中的 O_2^{-}·自由基，生成 H_2O_2 和 O_2。当 CAT 和 GSH-Px 酶紧跟着作用的时候，SOD 酶清除超氧自由基才是有效的，因为这两种酶可以破坏前一步反应中产生的 H_2O_2。许多研究表明，植物提取抗氧化成分不仅能防护体内抗氧化酶，还能增强机体内抗氧化酶活性，如黄酮类中的槲皮素能减少胰岛 β 细胞的氧化损伤，同时还能恢复 Fe^{2+}致肾细胞损伤动物的 SOD、GSH-Px 和 CAT 的活力[15]。皂苷类物质对氧自由基本身影响较少，但大多能提高体内 SOD、CAT 等抗氧化酶的活性，从而增强机体抗氧化系统功能[16]。此外，一些天然物质可在基因与转录水平上诱导体内抗氧化酶如 SOD 的表达，发挥其抗氧化作用[17]。CAT 、SOD 和 GSH-Px 酶活力的测定说明丁香提取物可以通过提高 HL7702 细胞自身抗氧化防御系统的水平，来对抗 H_2O_2 对 HL7702 细胞的氧化损伤作用。这从氧化应激的角度阐述了丁香提取物对肝细胞的保护作用。

2.3　丁香提取物对 HL7702 细胞中 MDA 含量的影响

丁香两种提取物对氧化损伤的 HL7702 内 MDA 含量的影响见图 4。由图中可以看出，受 H_2O_2 氧化损伤的 HL7702 内产生的 MDA 比正常组高，而丁香水提取物和乙醇提取物均可不同程度地抑制 MDA 的含量，并呈剂量依赖，表明丁香两种提取物均可以抑制由 H_2O_2 诱导的 HL7702 内的脂质过氧化反应，对被氧化损伤的细胞起到保护作用，其中 10 mg/L 时乙醇提取物效果好于水提取物，差异显著（$P<0.05$）。这与谭廷华[7]等人的报道一致。

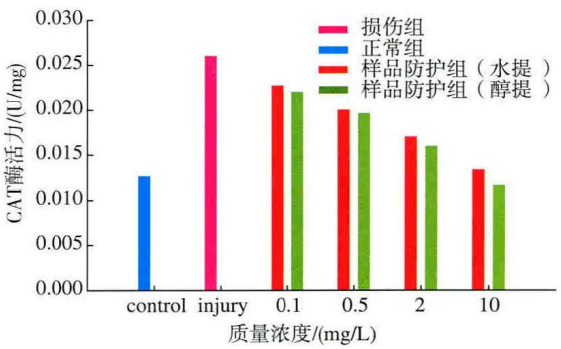


图 4　丁香两种提取物对氧化损伤的 HL7702 内 MDA 含量的影响

Fig. 4　Effect of two extraction of clove on the MDA content of injured HL7702

肌体产生的氧自由基能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸，引起脂质过氧化反应，形成丙二醛（MDA）等脂质过氧化物和新的氧自由基系，MDA 可破坏膜的流动性和完整性，因此其含量的多少能够直接反映细胞的脂质过氧化程度和损伤程度[18]。大量的实验表明，机体衰老和发生疾病时 MDA 水平显著升高[19]。此外过多的自由基所产生的大量的脂质过氧化物主要在肝脏分解，从而对肝脏造成严重损伤[20]。本实验研究结果表明，将丁香水提取物和乙醇提取物作用于 H_2O_2 胁迫下的肝细胞之后，HL7702 中的 MDA 水平随着提取物浓度的升高而缓慢降低，提示丁香提取物可有效降低细胞内 MDA 含量，即能有效阻止或减轻自由基对脂质的攻击，减轻脂质过氧化作用，保护细胞膜系。

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.4 对过氧亚硝基阴离子($ONOO^-$)浓度的影响

$ONOO^-$可使酶氧化失活，可导致脂质过氧化，与核酸作用引起 DNA 裂解，作用于线粒体使能量生成障碍。$ONOO^-$是某些疾病情况下导致细胞损伤、能量耗竭和细胞死亡的重要因素。如图 5 所示，H_2O_2 氧化胁迫下 HL7702 所产生的 $ONOO^-$比正常组高，丁香水提取物和乙醇提取物均可降低本体系中的生物化学发光值。

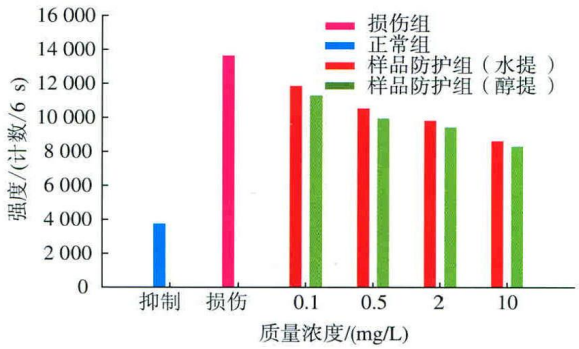


图 5 丁香两种提取物对氧化损伤的 HL7702 内过氧亚硝基阴离子($ONOO^-$)含量的影响

Fig. 5 Effect of two extraction of clove on the $ONOO^-$ content of injured HL7702

表明丁香两种提取物均可抑制 HL7702 内 $ONOO^-$的产生，且在 0.1~10 mg/L 范围内呈剂量依赖效应，即提取物的质量浓度越大，抑制效果越好。其中乙醇提取物的抑制效果较水提取物更佳。

推测丁香可能通过阻止 H_2O_2 氧化胁迫下的 HL7702 合成过量的 NO 和直接清除 $ONOO^-$来提高机体对抗 $ONOO^-$损伤的能力。

3 结 语

检测了丁香水提物和乙醇提取物对 HL7702 细胞增值、H_2O_2 氧化胁迫的 HL7702 细胞抗氧化酶和细胞氧化产物的影响。结果表明，这两种提取物在 0.1~10 mg/L 的低质量浓度范围内均可浓度与时间依赖性地促进 HL7702 细胞的增殖，而在 10 mg/L 和 50 mg/L 的高质量浓度下抑制 HL7702 细胞的增殖。丁香水提取物和乙醇提取物均可剂量依赖性地提高细胞内的 SOD、CAT 和 GSH-Px 酶活性，降低氧化产物过氧亚硝基阴离子 $ONOO^-$含量和脂质过氧化物终产物 MDA 含量。这表明丁香提取物可通过提高 HL7702 细胞内抗氧化酶活性，降低氧化产物的含量，从而减轻细胞受到的氧化损伤。

参考文献：

[1] 周建新，许华，金浩. 丁香油抑菌效果和抑菌成分的研究[J]. 食品工业，2003(3)：24.
ZHOU Jian-xin，XU Hua，JIN Hao. Antimicrobial activity and antimicrobial composition of clove oil [J]. **Food Industry**，2003(3)：24.(in Chinese)

[2] Masae Ito，Keiko Murakami，Masataka Yoshino. Antioxidant action of eugenol compounds：role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation[J]. **Food and Chemical Toxicology**，2005，43：461-466.

[3] 占豪. 丁香罗勒精油和丁香酚的抗氧化、抑菌及包结研究[D]. 天津：天津商业大学，2008.

[4] Peter K V. Handbook of Herbs and Spices[M]. Cambridge：CRC Press Wood head Publishing，2000.

[5] Chaieb K，Hajlaoui H，Zmantar T，et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil，Eugenia caryophyllata (*Syzigium aromaticum L.Myraceae*)：a short review[J]. **Phytotherapy Research**，2007，21(6)：501-506.

[6] 刘骞，孔保华，李菁，等. 丁香不同溶剂提取物抗氧化活性的研究[J]. 包装与食品机械，2011，29(4)：17-20.
LIU Qian，KONG Bao-hua，LI Jing，et al. Antioxidant activity of clove extracts by different polar solvent extraction[J]. **Packaging and Food Machinery**，2011，29(4)：17-20.(in Chinese)

[7] 谭廷华，何西利，高健，等. 丁香酚对氧自由基的清除作用[J]. 西北药学杂志，1996，11(1)：30.
TAN Ting-hua，HE Xi-li，GAO Jian，et al. Scavenging action on oxygen radical of eugenol [J]. **Northwest Pharmaceutical Journal**，1996，11(1)：30.(in Chinese)

[8] Ou H C，Chou F P，Lin T M，et al. Protective effects of eugenol against oxidized LDL-induced cytotoxicity and adhesion molecule expression in endothelial cells[J]. **Food and Chemical Toxicology**，2006，44(9)：1485-1495.

[9] Misharina T A，Samusenko A L. Antioxidant properties of essential oils from lemon，grapefruit，coriander，clove and their mixtures

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[J].**Applied Biochemistry and Microbiology**,2008,44(4):438-442.

[10] Groneberg D A,Grosse-Siestrup C,Fischer A. In vitro models to study hepatotoxicity[J]. **Toxicol Palhol**,2002,30:394.

[11] 张慧芸,孔保华,孙旭. 香辛料提取物抗氧化活性及其作用模式的研究[J]. 食品科学,2010(5):111-115.
ZHANG Hui-yun,KONG Bao-hua,SUN Xu. Antioxidant activity and mode of action of spice extracts [J]. **Food Science**,2010(5):111-115.(in Chinese)

[12] Lee S E,Hwang H J,Ha J S,et al. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity[J]. **Life Sciences**,2003(73):167-179.

[13] 王光伟,丰昀,邱细敏,等. 白术多糖对大鼠创伤性脑损伤后脑水肿的影响[J]. 食品科学,2008,29(6):675-677.
WANG Guang-wei,FENG Yun,QIU Xi-min,et al. Effect of atractylodes macrocephalaon polysaccharide on encephaledema after rat traumatic cerebral injury[J]. **Food Science**,2008,29(6):675-677.(in Chinese)

[14] 陈季武,胡斌,苏裕,等. 一种新的产生和检测过氧亚硝基的化学发光法[J]. 辐射研究与辐射工艺学报,2006,24(1):11-14.
CHEN Ji-wu,HU Bin,SU Yu,et al. A new chemiluminiscence method used for production and detection peroxynitrite[J]. **Journal of Radiation Research and Radiation Technology**,2006,24(1):11-14.(in Chinese)

[15] Toyokuni S,Tanaka T,Kawaguchi N R,et al. Effects of the phenolic contents of mauritianendemic plant extracts on promoter activities of antioxidant enzymes[J]. **Free Radic Res**,2003,37:1215.

[16] Sparg S G,Lisht M E,Staden J V. Biological activities and distribution of plant saponins[J]. **J Ethnophann**,2004,94:219-243.

[17] 黄品,王桂兰,刘志婷,等. 复方沙棘提取液对老龄大鼠 SOD mRNA 表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2004,24(5):431-432.
HUANG Pin,WANG Gui-lan,LIU Zhi-ting,et al. Effect of compound hippophae rhamnoides extracts on the SOD mRNA expression of aging rat[J]. **Chinese Journal of Gerontology**,2004,24(5):431-432.(in Chinese)

[18] 梁忠,陈军,黄波. 针刺对大鼠痛阈及血清 SOD、MDA 影响的实验研究[J]. 湖北中医学院学报,2009,11(3):18-20.
LIANG Zhong,CHEN Jun,HUANG Bo. Effect of acupuncture on SOD and MDA of rat feeling threshold and serum [J]. **Journal of Hubei College of Traditional Chinese Medicine**,2009,11(3):18-20.(in Chinese)

[19] 钟碧瑾,姚丹,刘娟娟,等. 两种有机磷农药对沼水蛙蝌蚪抗氧化系统及 MDA 浓度的影响[J]. 福建师范大学学报:自然科学版,2009,25(2):91-95.
ZHONG Bi-jin,YAO Dan,LIU Juan-juan,et al. Effect of organophosphorus pesticides on antioxidant system and MDA concentration of Hylarana guentheri tadpole[J]. **Journal of Fujian Normal University:Natural Science**,2009,25(2):91-95.(in Chinese)

[20] 张申,李湘群,卫涛涛. 银杏叶提取物对过氧化氢诱导的星形胶质细胞氧化损伤的保护作用[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2007,16(1):92-98.
ZHANG Shen,LI Xiang-qun,WEI Tao-tao. Protection effect of ginkgo biloba extract on astrocyte oxidative damage induced by hydrogen peroxide[J]. **Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry**,2007,16(1):92-98.(in Chinese)

© 1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net