

中草药对花鲈肝细胞氧化损伤的保护作用

王秀琴, 张春晓, 鲁康乐, 王 玲, 宋 凯

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为探究中草药对原代培养花鲈肝细胞氧化损伤的保护作用, 选取 10 种复方(记为 M1、M2、M3、M4、M5、M6、M7、M8、M9、M10) 和 10 种单方中草药, 煎制成终质量浓度为 5 mg/mL 的水提物, 用这 20 种水提物处理花鲈原代培养肝细胞 4 h, 再换用 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理 2 h 进行氧化损伤, 最后测定培养液中胞内酶活性 (AST、ALT 和 LDH) 及肝细胞抗氧化指标 (T-AOC、SOD 和 MDA)。结果显示: 肝细胞受损后, 其培养液中 AST、ALT 和 LDH 的活性显著升高 ($P < 0.05$), 肝细胞中 T-AOC 和 SOD 活性显著降低 ($P < 0.05$), MDA 含量显著上升 ($P < 0.05$); 先经中草药处理再用 H_2O_2 氧化损伤后, 各中草药处理组 AST、ALT 和 LDH 活性降低, 其中姜黄、五味子单方和 M9 复方的 AST、ALT 和 LDH 活性较其他中草药组显著降低 ($P < 0.05$); 姜黄单方和 M9 复方的 T-AOC 和 SOD 活性较其他组明显升高 ($P < 0.05$), MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$)。由此得出: 大黄、丹参、银杏、姜黄、甘草、赤芍、猪苓、五味子单方, M1、M4、M6、M7、M9 复方均能缓解由 H_2O_2 诱导的原代培养花鲈肝细胞损伤, 其中姜黄单方和 M9 复方的保护作用最强。

[关键词] 花鲈; 肝细胞; 中草药; 氧化损伤; 保护作用

[中图分类号] S 948

Protective Effect of Chinese Herbal Medicine Oxidative Damaged Hepatocytes in Primary Culture of Spotted Seabass(*Lateolabrax maculatus*)

WANG Xiuqin, ZHANG Chunxiao, LU Kangle, WANG Ling, SONG Kai

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: To explore the protective effects of Chinese herbal medicine on oxidative damage of *Lateolabrax maculatus* hepatocytes in primary culture, ten kinds of single traditional chinese medicine and ten kinds of compound Chinese medicine (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 and M10) were selected and made into water extract whose final concentration was 5 mg/mL. The primary hepatocytes were treated with 20 kinds of water extract for 4 h, and then treated with 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 for 2 h to cause oxidative damage. The results of this study showed that H_2O_2 treated hepatocytes exhibited significant increases of AST, ALT and LDH in culture medium and the content of MDA in hepatocytes ($P < 0.05$), while the activities of T-AOC and SOD were significantly decreased ($P < 0.05$). Adding Chinese herbal medicine for protection before oxidation damage with H_2O_2 , the activity of AST, ALT and LDH were decreased in each herbal treatment group, while AST, ALT and LDH in *Curcuma longae*, *Schisandrae chinensis* and M9 group were significantly lower than others Chinese medicine groups ($P < 0.05$). T-AOC and SOD in *Curcuma longae* and M9 groups were higher than other groups ($P < 0.05$), and MDA content was significantly reduced ($P < 0.05$). To sum up, among the 10 single

[收稿日期] 2020-12-18

[基金项目] 国家海水鱼产业技术体系项目 (CARS-47)

[作者简介] 王秀琴 (1993—), 女, 硕士生, 从事水产动物营养与饲料研究。通信作者: 宋凯 (1978—), 男, 博士, 副教授, 从事水产动物营养与饲料研究。E-mail: songkai@jmu.edu.cn

formulae and 10 groups of compound Chinese herbal medicines in this study, *Chinese rhubarb*, *Salvia miltiorrhiza*, *Ginkgo biloba*, *Curcuma longae*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Paeonia*, *Polyporus*, *Schisandra chinensis*, M1, M4, M6, M7 and M9 could all alleviate the hepatocyte injury induced by H₂O₂ in primary culture of *L. maculatus*, while *Curcuma longae* and M9 groups have the strongest protective effect.

Keywords: *Lateolabrax maculatus*; hepatocyte; Chinese herbal medicine; oxidative damage; protect

0 引言

花鲈 (*Lateolabrax maculatus*) , 别名海鲈、七星鲈。因其具有适应性广、肉鲜味美、营养丰富与生长快速等优质特性, 深受养殖户喜爱, 年产量逐年增长, 2018 年其养殖产量高达 16.66 万吨^[1], 成为仅次于大黄鱼的第二大海水养殖鱼类。然而, 高密度的养殖模式以及化学药剂的滥用会引起鱼类机体的氧化应激, 进而破坏肝功能, 导致肝脏损伤, 影响鱼类正常生长^[2-5]。因此有必要防止氧化应激对鱼类造成的影响。基于此, 近些年科研工作者致力于开发一种“绿色、高效、低成本”的保肝型绿色添加剂来应对氧化应激。中草药具有低成本、污染少、毒副作用小等优点, 其主要发挥作用的成分如多糖、类黄酮和皂苷类能减少氧化应激, 保护肝脏^[6]。在我国, 使用中草药预防和治疗鱼类疾病已十分普遍^[7-8]。因此, 本实验以原代培养花鲈肝细胞为实验材料, 拟从具有保肝功能的 10 种单方和 10 种复方中^[9]筛选出能有效缓解原代培养花鲈肝细胞氧化损伤的中草药, 为中草药在花鲈养殖业更广泛的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

花鲈购于福建省漳州市诏安县慧丰水产发展有限公司。将实验鱼放置在 1×10³ L 的循环桶中暂养, 每天饱食投喂一次(9:00), 并换 50% 体积的淡水, 水温维持在 27 ℃ 左右, 溶解氧大于 7.5 mg/L, pH 5.9~6.8。实验鱼适应性饲养两周后, 每次实验前挑选体格健壮、规格一致的花鲈(体重(30±5.0)g, 体长(10±0.9)cm), 放入盛有体积分数为 0.1% 的青霉素与链霉素的水里暂养并禁食 12 h。

1.2 主要试剂

于厦门集美印斗路莲福堂大药房购买实验所需的中草药。

胰蛋白酶 (体积分数 0.25%)、L-15 培养基和胎牛血清 (FBS) 购自美国 Gibco 公司。总蛋白定量 (BCA)、磷酸盐缓冲液 (PBS)、10 000 IU/mL 青霉素 (S) 和 10 000 IU/mL 链霉素 (P) 购自北京索莱宝科技有限公司。过氧化氢 (含过氧化氢 30%)、红细胞裂解液、谷丙转氨酶 (ALT) 试剂盒、谷草转氨酶 (AST) 试剂盒、乳酸脱氢酶 (LDH)、丙二醛 (MDA)、总抗氧化能力 (T-AOC) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 购自南京建成生物工程研究所。

完全培养基: L-15 培养基 (含有 1% S/P, 15% FBS (体积分数))。

1.3 花鲈原代肝细胞的培养

花鲈原代肝细胞培养方法参照李磊等^[10]的报道。

1.4 中草药的制备

将 10 味单方中草药 (甘草、银杏、柴胡、丹参、苍穹、赤芍、五味子、大黄、姜黄和猪苓) 直接粉碎, 10 味复方中草药 (主要成分见表 1) 按照一定比例粉碎混合, 各方称取 20 g 倒入盛有 150 mL 纯水的玻璃杯中, 浸泡 1 h 后, 开始煎煮, 温度保持在 90 ℃, 边煮边搅拌。待煮 0.5 h 后过滤, 收集滤液, 重复煎煮并收集滤液 3 次。合并 3 次滤液, 浓缩定量至 20 mL, 使各方中草药质量浓度为 1 g/mL, 经离心灭菌处理后, 暂存于 4 ℃ 冰箱。

1.5 中草药安全性评价

将原代培养的花鲈肝细胞平铺于 96 孔板中, 培养 24 h 贴壁后, 再分别加入 20 味中草药 (质量浓度为 5 mg/mL) 孵育 4 h, 然后使用 CCK-8 检测肝细胞的存活率。实验重复 5 次。

表 1 复方中草药部分组成成分表
Tab.1 Part composition list of compound Chinese herbal medicine

组别 Group	成分 Ingredient
M1	五灵脂、桃仁、红花、赤芍、丹皮、当归和川芎等 <i>Faeces troglodyterori</i> , <i>Peach kernel</i> , <i>Carthamus tinctorius</i> L., <i>Paeonia</i> , <i>Cortex moutan</i> , <i>Angelica sinensis</i> , <i>Chuan xiong</i> , et al
M2	丹参、茯苓、白术、仙灵脾、人参、鳖甲和肉豆蔻等 <i>Salvia miltiorrhiza</i> , <i>Poria cocos</i> , <i>Atractylodes macrocephala</i> , <i>Epimedium</i> , <i>Panax ginseng</i> , <i>Turtle shell</i> , <i>Myristica fragrans</i> , et al
M3	黄芪、丹参、茯苓、土茯苓、连翘、赤芍和泽泻等 <i>Astragalus membranaceus</i> , <i>Salvia miltiorrhiza</i> , <i>Poria cocos</i> , <i>Smilax glabra</i> , <i>Forsythia suspensa</i> , <i>Paeonia</i> , <i>Alisma orientalis</i> , et al
M4	厚朴、猪苓、泽泻、车前子、怀牛膝、茯苓和白术等 <i>Houpoecia officinalis</i> , <i>Polyporus</i> , <i>Alisma orientalis</i> , <i>Plantain asiatica</i> , <i>Achyranthes bidentata</i> , <i>Poria cocos</i> , <i>Atractylodes macrocephala</i> , et al
M5	醋香附、茵陈、炒白芍、当归、丹参、黄芪和柴胡等 <i>Vinegar cyperus</i> , <i>Artemisia scopariae</i> , <i>Radix paeoniae</i> Alba, <i>Angelica sinensis</i> , <i>Salvia miltiorrhiza</i> , <i>Astragalus membranaceus</i> , <i>Radix bupleuri</i> , et al
M6	薏苡仁、山药、法半夏、垂盆草、党参、郁金和决明子等 <i>Semen coicis</i> , <i>Rhizoma dioscoreae</i> , <i>Rhizoma pinelliae</i> , <i>Sedum sarmentosum</i> , <i>Codonopsis pilosula</i> , <i>Curcuma phaeocaulis</i> , <i>Cassia seed</i> , et al
M7	板蓝根、龙胆草、山楂、茵陈、白术和甘草等 <i>Radix isatidis</i> , <i>Adenophora capillaris</i> , <i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge, <i>Artemisia capillaris</i> Thunb, <i>Atractylodes macrocephala</i> , <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch, et al
M8	赤芍、丹参、桃仁、红花、熟地、白芍和麦冬等 <i>Paeonia</i> , <i>Salvia miltiorrhiza</i> , <i>Peach kernel</i> , <i>Carthamus tinctorius</i> L., <i>Cultivated land</i> , <i>Cynanchum otophyllum</i> Schneid, <i>Ophiopogon japonicas</i> , et al
M9	大黄、丹参、赤芍、金钱草、黄芪、栀子和虎杖等 <i>Chinese rhubar</i> , <i>Salvia miltiorrhiza</i> , <i>Paeonia</i> , <i>Lysimachia christinae</i> , <i>Astragalus membranaceus</i> , <i>Gardenia</i> , <i>Reynoutria japonica</i> Houtt, et al
M10	肉苁蓉、茯苓、白术、党参、附子和泽兰等 <i>Cistanche deserticola</i> , <i>Poria cocos</i> , <i>Atractylodes macrocephala</i> , <i>Codonopsis pilosula</i> , <i>Aconitum carmichaeli</i> Debx, <i>Aconitum gymnantrum</i> Maxim, et al

1.6 实验分组设计

H₂O₂ 诱导肝细胞氧化损伤的方法参照张润蔚^[11] 的实验并稍作修改，按其方法获得的适宜损伤条件为：H₂O₂浓度为 200 μmol/L，作用时间为 2 h。花鲈肝细胞培养 24 h 后，将其分为对照组、损伤组、药物组。对照组换用新的完全培养基孵育肝细胞 6 h 后收集培养液与肝细胞；损伤组先用完全培养基孵育肝细胞 4 h 后，再换用 200 μmol/L H₂O₂ 的新培养基孵育肝细胞 2 h，收集培养液与肝细胞；药物组用含质量浓度为 5 mg/mL 的中草药完全培养基孵育肝细胞 4 h，再换用 200 μmol/L H₂O₂ 继续孵育肝细胞 2 h 后收集培养液与肝细胞。

1.7 生化指标的测定

生化指标测定按试剂盒说明书进行。

1.8 数据处理

所用实验数据经 Excel 处理后用 SPSS 20.0 分析软件进行单因素方差分析（one-Way ANOVA），多重比较方法选用 Tukey 法，以 $P < 0.05$ 表示差异显著，实验数据最终以均值 ± 标准误（Mean ± SE）的形式表示。

2 结果与分析

2.1 中草药对花鲈肝细胞活力的影响

由图 1~2 可知：与对照组相比，10 种单方和 10 组复方中草药对花鲈肝细胞的存活率无显著影响（ $P > 0.05$ ）。所以，本实验所用的 20 组中草药均对花鲈原代肝细胞无毒副作用。

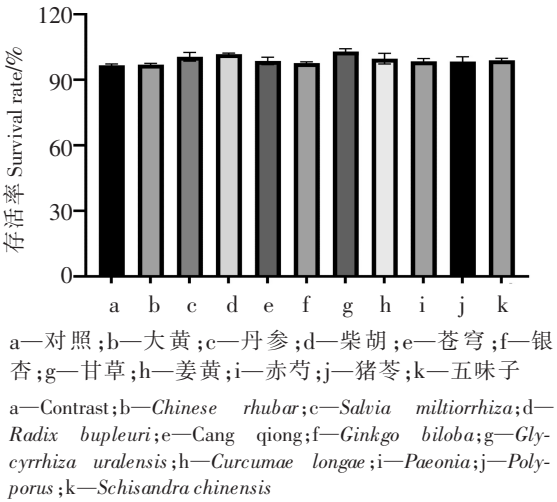


图 1 10 组单方中草药对花鲈肝细胞存活率的影响
Fig.1 Effects of 10 kinds of single Chinese herbal medicine on the survival rate of hepatocytes of *L. maculatus*

2.2 各组 AST、ALT 和 LDH 活性的变化

由表 2 可知: 损伤组培养液中 AST、ALT 和 LDH 较对照组显著升高 ($P < 0.05$), 除大黄组以外的其他单方组的 AST、ALT 和 LDH 活性较损伤组显著降低 ($P < 0.05$); 姜黄、甘草和五味子单方组的 AST 活性较其他单方组显著降低 ($P < 0.05$); 姜黄、丹参和五味子单方组的 ALT 活性较其他单方组低 ($P < 0.05$); 姜黄单方组的 LDH 活性水平较其他单方组低 ($P < 0.05$)。综上, 除大黄以外的其他 9 种单方均能保护肝细胞氧化损伤, 其中姜黄组的保护效果最佳。

由表 2 还可知: H_2O_2 损伤组, AST 和 ALT 活性显著高于对照组 ($P < 0.05$); LDH 活性有上升趋势, 但无显著影响 ($P > 0.05$)。M5 组的 LDH 较损伤组无显著差异 ($P > 0.05$); 10 种复方组的 AST 和 ALT 活性与损伤组比显著降低 ($P < 0.05$); M9 组的 AST、ALT 和 LDH 活性较其他各复方组低 ($P < 0.05$), 其 AST 和 ALT 的活性与对照组无差异 ($P > 0.05$)。综上, 除 M5 组以外的其他 9 组复方中草药均能缓解肝细胞氧化损伤, 以 M9 复方保护效果最佳。

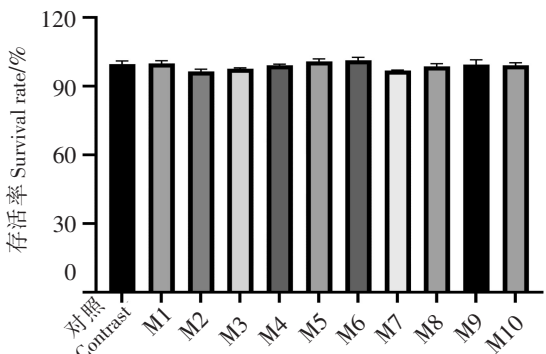


图 2 10 组复方中草药对花鲈肝细胞存活率的影响
Fig.2 Effects of 10 kinds of compound Chinese herbal medicine on the survival rate of hepatocytes of *L. maculatus*

表 2 各组花鲈肝细胞 AST、ALT 和 LDH 活性

Tab. 2 The activity of AST,ALT and LDH in hepatocyte of <i>L. maculatus</i> in 20 groups of Chinese herbal medicine				
组别 Group		AST/(U · L ⁻¹)	ALT/(U · L ⁻¹)	LDH/(U · L ⁻¹)
单方 Single Chinese herbal medicine	大黄 <i>Chinese rhubar</i>	15.55 ± 0.22 ^c	22.42 ± 0.11 ^{ef}	50.92 ± 4.59 ^b
	丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i>	15.69 ± 0.18 ^{cd}	19.53 ± 0.17 ^c	42.72 ± 7.20 ^{ab}
	柴胡 <i>Radix bupleuri</i>	14.87 ± 0.20 ^c	20.43 ± 0.17 ^{cd}	45.76 ± 5.02 ^{ab}
	苍穹 <i>Cang qiong</i>	15.08 ± 0.15 ^c	20.78 ± 0.24 ^{cd}	43.59 ± 0.63 ^{ab}
	银杏 <i>Ginkgo biloba</i>	15.90 ± 0.25 ^{cd}	20.23 ± 0.12 ^{cd}	41.24 ± 0.85 ^{ab}
	姜黄 <i>Curcuma longae</i>	9.76 ± 0.60 ^a	19.58 ± 0.41 ^c	29.64 ± 2.98 ^a
	甘草 <i>Glycyrrhiza uralensis</i>	10.42 ± 0.28 ^a	21.24 ± 0.10 ^{de}	43.85 ± 2.12 ^{ab}
	赤芍 <i>Paeonia</i>	16.35 ± 0.15 ^{cd}	20.29 ± 0.16 ^{cd}	39.79 ± 1.58 ^{a b}
	猪苓 <i>Polyporus</i>	17.14 ± 0.38 ^d	20.31 ± 0.28 ^{cd}	49.93 ± 2.75 ^b
	五味子 <i>Schisandra chinensis</i>	10.53 ± 0.46 ^a	16.84 ± 0.29 ^b	34.13 ± 0.71 ^{ab}
对照 Contrast		13.11 ± 0.16 ^b	7.03 ± 1.01 ^a	45.28 ± 5.32 ^{ab}
损伤 Injury group		18.79 ± 0.18 ^e	22.81 ± 0.32 ^f	76.74 ± 3.65 ^e
复方 Compound Chinese herbal medicine	M1	17.95 ± 0.17 ^{bcd}	33.03 ± 0.30 ^c	29.72 ± 4.45 ^{bc}
	M2	16.50 ± 0.38 ^{bcd}	25.54 ± 0.11 ^{ab}	21.16 ± 2.42 ^c
	M3	20.70 ± 0.63 ^d	36.48 ± 0.05 ^d	27.56 ± 1.20 ^{bc}
	M4	19.52 ± 0.59 ^{cd}	33.51 ± 1.09 ^{cd}	27.00 ± 6.43 ^{bc}
	M5	13.53 ± 0.87 ^{ab}	32.98 ± 0.62 ^c	32.18 ± 0.72 ^{abc}
	M6	14.21 ± 3.24 ^{abcd}	33.79 ± 0.58 ^{cd}	22.60 ± 1.37 ^c
	M7	15.41 ± 0.47 ^{bcd}	28.25 ± 0.54 ^b	28.08 ± 2.95 ^{bc}
	M8	17.93 ± 0.86 ^{bcd}	34.65 ± 0.13 ^{cd}	24.80 ± 1.39 ^c
	M9	10.31 ± 0.23 ^a	22.98 ± 0.35 ^a	16.52 ± 0.44 ^c
	M10	14.02 ± 0.38 ^{abc}	32.45 ± 0.47 ^c	28.54 ± 1.70 ^{bc}
对照 Contrast		13.03 ± 0.37 ^{ab}	34.65 ± 0.02 ^{cd}	40.66 ± 3.18 ^{ab}
损伤 Injury group		31.36 ± 1.21 ^e	66.27 ± 1.44 ^e	45.61 ± 0.49 ^a

说明: 同列数据肩标字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 字母相同表示无显著差异 ($P > 0.05$)。
Note: In the same row, different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$), the same letter indicates no significant difference ($P > 0.05$).

2.3 各组 T-AOC、SOD 和 MDA 水平的变化

如表 3 所示，在 H₂O₂ 处理肝细胞 2 h 后，损伤组的 T-AOC 和 SOD 活性较对照组显著降低 ($P < 0.05$)，MDA 含量显著升高 ($P < 0.05$)；姜黄、甘草、大黄、丹参和银杏单方组的 T-AOC 活性较损伤组显著升高 ($P < 0.05$)；10 味单方组的 SOD 活性较损伤组均显著升高 ($P < 0.05$)；柴胡和苍穹单方组肝细胞中 MDA 含量与损伤组相比没有显著差异 ($P > 0.05$)，姜黄单方组肝细胞中 T-AOC 和 SOD 活性则高于损伤组。综合以上结果，在本实验条件下，与其他单方组相比，姜黄单方组对氧化损伤的花鲈肝细胞的保护效果最好。

由表 3 可知，M10 组的 T-AOC 活性与损伤组相比无显著差异 ($P > 0.05$)，M7 和 M10 组的 SOD 活性与损伤组相比无显著差异 ($P > 0.05$)，M2、M3、M8 和 M10 组的 MDA 含量与损伤组相比无显著变化 ($P > 0.05$)；M1、M4、M5、M6、M9 组的 T-AOC 和 SOD 活性显著高于损伤组 ($P < 0.05$)，MDA 含量显著低于损伤组 ($P < 0.05$)。M9 组 T-AOC 和 SOD 活性高于其他各复方组，而 MDA 含量低于其他各复方组，即 M9 组对 H₂O₂ 诱导的花鲈肝细胞氧化抗损伤作用最强。

表 3 各组花鲈肝细胞 T-AOC、SOD 和 MDA 的含量
Tab. 3 T-AOC, SOD and MDA contents in hepatocytes of *L. japonicus* in groups

组别 Group		T-AOC/(U · mg ⁻¹)	SOD/(U · mg ⁻¹)	(MDA)/(U · mg ⁻¹)
单方 Single Chinese herbal medicine	大黄 <i>Chinese rhubar</i>	4.07 ± 0.11 ^{bc}	128.20 ± 6.12 ^b	17.70 ± 2.57 ^{abc}
	丹参 <i>Salvia miltiorrhiza</i>	4.00 ± 0.09 ^{bc}	151.75 ± 4.14 ^b	15.22 ± 0.49 ^{ab}
	柴胡 <i>Radix bupleuri</i>	3.41 ± 0.20 ^{ab}	162.72 ± 3.15 ^{bc}	44.82 ± 1.46 ^d
	苍穹 <i>Cang qiong</i>	3.07 ± 0.10 ^{ab}	171.30 ± 4.22 ^{bc}	38.92 ± 1.26 ^d
	银杏 <i>Ginkgo biloba</i>	3.85 ± 0.05 ^{bc}	189.21 ± 3.53 ^{bc}	27.35 ± 0.59 ^c
	姜黄 <i>Currumae longae</i>	4.96 ± 0.05 ^d	196.79 ± 5.42 ^d	24.48 ± 1.64 ^{bc}
	甘草 <i>Glycyrrhiza uralensis</i>	4.11 ± 0.24 ^{bc}	169.94 ± 1.40 ^{bc}	15.87 ± 1.58 ^{abc}
	赤芍 <i>Paeonia</i>	3.68 ± 0.35 ^{abc}	177.03 ± 10.84 ^{bc}	22.00 ± 4.73 ^{abc}
	猪苓 <i>Polyporus</i>	3.39 ± 0.05 ^{ab}	166.04 ± 4.85 ^{bc}	10.83 ± 1.23 ^a
	五味子 <i>Schisandra chinensis</i>	3.12 ± 0.00 ^{ab}	170.06 ± 0.99 ^{bc}	22.41 ± 2.49 ^{bc}
对 照 Contrast		4.74 ± 0.41 ^{cd}	194.50 ± 2.24 ^d	25.92 ± 0.89 ^{bc}
损 伤 Injury group		2.65 ± 0.31 ^a	102.04 ± 1.85 ^a	48.64 ± 0.60 ^d
复方 Compound Chinese herbal medicine	M1	3.09 ± 0.04 ^b	206.59 ± 10.42 ^{bc}	35.68 ± 0.19 ^c
	M2	3.92 ± 0.07 ^{cd}	215.67 ± 0.69 ^{bc}	44.49 ± 0.86 ^d
	M3	4.29 ± 0.12 ^{cd}	214.90 ± 0.49 ^{bc}	43.87 ± 0.10 ^d
	M4	2.99 ± 0.06 ^b	216.19 ± 1.09 ^{bc}	30.38 ± 1.27 ^{bc}
	M5	3.50 ± 0.15 ^{bc}	195.74 ± 1.41 ^b	21.96 ± 1.64 ^{ab}
	M6	3.58 ± 0.11 ^{bc}	205.66 ± 5.06 ^{bc}	27.26 ± 0.70 ^b
	M7	3.29 ± 0.16 ^b	177.09 ± 0.71 ^{ab}	20.68 ± 2.61 ^{ab}
	M8	3.42 ± 0.12 ^b	200.58 ± 0.20 ^{bc}	44.18 ± 1.82 ^d
	M9	4.51 ± 0.05 ^d	261.25 ± 0.92 ^d	16.07 ± 0.66 ^a
	M10	2.62 ± 0.38 ^{ab}	164.21 ± 3.62 ^{ab}	44.85 ± 3.20 ^d
对照 Contrast		3.07 ± 0.05 ^b	222.86 ± 0.37 ^{bc}	29.66 ± 0.89 ^{bc}
损伤 Injury group		1.84 ± 0.03 ^a	134.88 ± 2.44 ^a	60.05 ± 3.20 ^d

说明：同列数据肩标字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)，字母相同表示无显著差异 ($P > 0.05$)。

Note: In the same row, different letters in the same column indicate significant differences ($P < 0.05$), the same letter indicates no significant difference ($P > 0.05$).

3 讨论

H₂O₂ 是一种作用很强的氧化剂，其通过氧化细胞膜，使细胞膜组分发生异常，胞内 AST、ALT

释放到体液中,引起细胞或组织氧化损伤^[11-15]。本实验中,用 H_2O_2 直接处理肝细胞后其培养液中 AST、ALT 和 LDH 的活性水平上升,说明肝细胞发生氧化损伤。而在 H_2O_2 处理前使用中草药加以保护,AST、ALT 和 LDH 的活性均降低,这说明中草药能缓解 H_2O_2 引起的肝细胞氧化损伤。姜黄和五味子单方组的 AST、ALT 和 LDH 的含量低于其他组,说明这两味中草药能显著提高肝细胞的抗氧化能力。有研究表明,中草药中含有的多糖类、类黄酮和皂苷类,能保护肝脏免受氧化损伤^[16],姜黄含有丰富的酚类化合物,可减少细胞内 ROS 生成^[17-19]。王丽宏等^[20]的研究表明五味子的有效成份木脂素类,通过降低转氨酶活性,维持肝脏的正常生理状态。综上,姜黄和五味子中的有效成分具有清除自由基、降低转氨酶活性和提高机体抗氧化的能力。

有研究^[21]表明,有些中草药配伍,能更大程度地发挥作用。本实验中 M9 组显著降低 AST、ALT 和 LDH 的活性,可能是因为此复方中的中药具有协同保护肝脏的作用。赤芍因其含有丰富的单萜苷类化合物,可以通过抑制 ROS 的产生,提高抗氧化能力^[22],与金钱草配伍,可以降低肝脏中转氨酶的活性,清除自由基,保护肝脏免受损伤^[23]。

T-AOC 反映机体总抗氧化的能力。本研究中,损伤组 T-AOC 的活性较对照组低,表明肝细胞抗氧化能力下降。姜黄单方组和 M9 组 T-AOC 的活性明显高于其他各组,说明这两方中草药提高了肝细胞的抗氧化能力,保护肝细胞免受 H_2O_2 的不利影响,维持肝脏的健康。MDA 是脂质过氧化的重要产物,是判断细胞或组织发生氧化反应的重要指标之一^[24]。SOD 通过清除细胞或组织内的自由基来保护机体免受损伤,其活性的大小反映机体抗氧化能力的强弱^[25]。姜黄组和 M9 组 SOD 的活性较损伤组显著升高,同时脂质过氧化产物 MDA 的含量显著下降,这说明这两方中草药肝细胞清除自由基能力变强,可以减少 H_2O_2 引起的氧化损伤。有研究^[26]表明,姜黄素可以通过升高 T-AOC 和 SOD 活性水平,减少 MDA 生成,来对抗氧化应激,这与本实验结果一致。孙学亮等^[21]的研究表明,由大黄、丹皮和黄芪为主要成分组成的复方中草药通过提高亚东鲑 (*Salmo trutta fario*) 和白点鲑 (*Salvelinus pluvius* Hilgendorf) 血液中 SOD 和 T-AOC 的活性,提高其抗氧化能力,是因为其之间的协同作用。由此可知,姜黄单方和 M9 复方对 H_2O_2 诱导的花鲈原代肝组织损伤的保护作用与其清除自由基能力有关。姜黄能保持细胞抗氧化指标 (T-AOC 和 SOD) 的酶活性,使 MDA 的生成减少,增强抗氧化能力。

4 结论

在本研究的 10 味单方和 10 味复方中草药中,丹参、银杏、姜黄、甘草、赤芍、猪苓、五味子单方组, M1、M4、M6、M7、M9 复方组均能缓解由 H_2O_2 诱导的原代培养花鲈肝细胞损伤,提高肝细胞的抗氧化能力;大黄、柴胡、苍穹单方组, M2、M3、M5、M8、M10 复方组的抗氧化能力较其他组弱。从 20 组中草药中筛选出姜黄单方和 M9 复方对肝脏保护效果最好。

[参考文献]

- [1] 农业部渔业管理局. 2019 年中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2019.
- [2] 王国强, 王雯. 应激反应对鱼类影响的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(24): 11579-11580.
- [3] 黄建, 汤茜, 姚卓凤, 等. 水霉菌感染鲤诱导氧化应激发生的研究 [J]. 湖北农业科学, 2015, 5(22): 5677-5681.
- [4] 王秋举. L-肉碱对 H_2O_2 诱导氧化应激的两种鱼细胞抗氧化功能影响及其机理研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.
- [5] 王云鹏, 马越. 养殖业抗生素的使用及其潜在危害 [J]. 中国抗生素杂志, 2008(9): 519-523.
- [6] 明建华, 谢骏, 徐跑, 等. 大黄素、维生素 C 及其配伍对团头鲂感染嗜水气单胞菌后生理生化指标的影响 [J]. 中国水产科学, 2011, 18(3): 588-601.
- [7] 钱续. 虹鳟肝损伤的中草药治疗 [J]. 淡水渔业, 2002(3): 31-32.

- [8] 刘丽平, 薛晖, 葛筱琴, 等. 复方中草药对青虾肌肉和肝胰脏中几种非特异性免疫因子的影响 [J]. 淡水渔业, 2007(6): 11-14.
- [9] 李飞. 方剂学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
- [10] 李磊, 周文豪, 蔡林森, 等. 油酸诱导花鲈肝细胞脂肪沉积模型的建立及二甲双胍对脂肪沉积的影响 [J]. 集美大学学报 (自然科学版), 2020, 25(1): 1-7.
- [11] 张润蔚. 过氧化氢诱导斜带石斑鱼肝细胞氧化损伤的转录组学研究 [D]. 厦门: 集美大学, 2017: 66.
- [12] 任泽林, 霍启光, 曾虹, 等. 氧化鱼油对鲤鱼生产性能和肌肉组织结构的影响 [J]. 动物营养学报, 2001(1): 59-64.
- [13] 金鹿. 维生素 A 对奶牛乳腺泌乳蛋白合成及抗氧化功能影响机理的研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2014.
- [14] LI D, LIU Y, XU R, et al. Astragalus polysaccharide alleviates H_2O_2 -triggered oxidative injury in human umbilical vein endothelial cells via promoting KLF2 [J]. Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology, 2019, 47(1): 2188-2195.
- [15] GOWRI SHANKAR N L, MANAVALAN R, VENKAPPAYYA D, et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Commiphora berryi* (Arn) Engl bark extract against CCl_4 -induced oxidative damage in rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(9): 3182-3185.
- [16] 许维国. 中草药导致药物性肝损伤的现状与研究进展 [J]. 中国处方药, 2020, 18(6): 14-16.
- [17] AYATI Z, RAMEZANI M, AMIRI M S, et al. Ethnobotany, phytochemistry and traditional uses of *Curcuma* spp. and pharmacological profile of two important species (*C. longa* and *C. zedoaria*): a review [J]. Current Pharmaceutical Design, 2019, 25(8): 871-935.
- [18] YANG Q, CHENG L, ZHANG T, et al. Phenolic profiles, antioxidant, and antiproliferative activities of turmeric (*Curcuma longa*) [J]. Industrial Crops and Products. 2020, 152: 112-561.
- [19] FENG R Z, WANG Q, TONG W Z, et al. Extraction and antioxidant activity of flavonoids of *Morus* [J]. International Journal and Experimental Medicine, 2015, 8(12): 22328-22336.
- [20] 王丽宏, 吉红, 张宝彤, 等. 中草药保肝作用的研究进展 [J]. 饲料博览, 2012(11): 41-45.
- [21] 孙学亮, 杨树元, 陈书奇, 等. 复方中草药对白点鲑和亚东鲑抗氧化、非特异性免疫及消化酶指标的影响 [J]. 水产学杂志, 2020, 33(3): 7-12.
- [22] SONG S, XIAO X, GUO D, et al. Protective effects of paeoniflorin against AOPP-induced oxidative injury in HUVECs by blocking the ROS-HIF-1 α /VEGF pathway [J]. Phytomedicine, 2017, 34: 115-126.
- [23] 杨浩宇, 王新苗, 顾成娟, 等. 茵陈、赤芍、金钱草治疗胆汁淤积及转氨酶升高经验——全小林三味小方撮萃 [J]. 吉林中医药, 2020, 40(1): 18-20.
- [24] WU Y, NAN F, HUANG S, et al. Studies of macrophage cellular response to the extracellular hydrogen peroxide by tilapia model [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 36(2): 459-466.
- [25] CHAUDIERE J, FERRARI-ILIOU R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms [J]. Food and Chemical Toxicology, 1999, 37(9/10): 949-962.
- [26] SINGH R, SHARMA P. Hepatoprotective effect of curcumin on lindane-induced oxidative stress in male wistar rats [J]. Toxicol Int, 2011, 18(2): 124-129.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)