

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.18166

中草药提取物黄连素对草鱼肝细胞氧化应激和细胞凋亡的影响

陈丹红, 陈青青, 田红艳, 施华娟, 刘文斌

南京农业大学动物科技学院, 江苏省水产动物营养重点实验室, 江苏 南京 210095

摘要: 本研究运用细胞生物学研究方法, 探讨中草药提取物黄连素对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肝细胞(L8824)活力、氧化应激和细胞凋亡的影响。用不同浓度黄连素(0 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$)分别处理体外培养的草鱼肝细胞 0 h、6 h、12 h 和 24 h, 采用 CCK-8 法检测细胞活力。结果显示, 黄连素浓度和时间对细胞活力有显著交互作用($P<0.05$), 且黄连素浓度对其活力影响差异显著($P<0.05$), 草鱼肝细胞活力随着黄连素的浓度增加先升高后降低($P<0.05$)。在此基础上, 设置了黄连素梯度浓度(0 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$)培养草鱼肝细胞 12 h 后, 收集细胞, 测定细胞谷丙转氨酶(GPT)及谷草转氨酶(GOT)活性, 丙二醛(MDA)及活性氧(ROS)含量、细胞凋亡水平和相关基因 mRNA 表达量。结果表明, 与不添加黄连素组相比, 当黄连素浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞 GOT 和 GPT 活性、ROS 和 MDA 含量显著($P<0.05$)增加。当黄连素的浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞凋亡水平显著($P<0.05$)升高; 当黄连素的浓度增加到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞凋亡水平显著($P<0.05$)降低。当黄连素的浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞半胱氨酸蛋白酶-3(*caspase-3*) mRNA 表达量显著($P<0.05$)升高。综上所述, 当黄连素浓度超过 50 $\mu\text{mol/L}$ 会抑制细胞的生长, 引发氧化应激, 影响细胞功能。因此, 黄连素在草鱼肝细胞培养液中添加的适宜浓度为 25~50 $\mu\text{mol/L}$ 。

关键词: 草鱼; 肝细胞; 黄连素; 细胞活力; 氧化应激; 细胞凋亡

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)06-1281-08

黄连素又称为小檗碱(berberine, BBR), 是从黄连、黄柏等植物中提取的一类异喹啉生物碱^[1]。已有研究表明, 黄连素在抗炎、降低血糖、调节动物机体免疫性能等方面有显著效果, 在亚洲等地区被广泛使用^[2-4]。Kong 等^[5]研究发现, 黄连素可以降低机体血浆中的胆固醇含量, 表明其在调控脂肪代谢方面也有着重要的作用。在水产养殖中, 黄连素是被作为一种抗菌药物添加在饲料中, 用于治疗鱼肠道疾病。然而, 关于黄连素在调控鱼类机体免疫、氧化应激及营养物质代谢等相关研究报道很少。仅有的报道是本实验室发表的关于黄连素调控团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)脂肪代谢的文章。前期研究结果表明, 黄连素可显著缓解高脂饲料(11%脂肪水平)造成的团头鲂

肝脂肪过量沉积, 改善鱼体的氧化应激水平。但是, 将黄连素添加在正常脂肪含量饲料(5%脂肪水平)中, 团头鲂生产性能显著提升的同时鱼体发生氧化应激, 造成免疫性能和抗病力降低^[6-7]。

在鱼类研究中, 细胞培养是一种新的手段和新的技术^[8]。近年来, 鱼类细胞培养技术主要用于毒理学、病理学、遗传学等试验的相关研究^[9-11], 在营养学上的研究报道相对较少。而关于黄连素在鱼类尤其是细胞营养学上的研究报道尚空白。

因此, 为了使黄连素等中草药添加剂能更好地在水产养殖中应用, 降低其产生的副作用, 本研究以草鱼肝细胞为实验对象, 应用体外细胞生物学研究方法, 检测不同浓度的黄连素对细胞活力、氧化应激和细胞凋亡等影响, 筛选黄连素体

收稿日期: 2018-05-15; 修订日期: 2018-06-19.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31472292); 国家大宗淡水鱼产业技术体系资金项目(CARS-45-14).

作者简介: 陈丹红(1993-), 硕士研究生, 从事水产动物营养与饲料研究. E-mail: 2015105049@njau.edu.cn

通信作者: 刘文斌, 教授, 博士生导师, 从事水产动物生理与营养、水产养殖生态的研究. E-mail: wbliu@njau.edu.cn

外细胞试验的作用时间和浓度,为后续细胞研究提供可参考的科学数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

草鱼肝细胞系 L8824,购于武汉大学保藏中心细胞库并保存于本实验室。

黄连素(纯度>90%)购于美国 Sigma 公司;MEM 培养基与胎牛血清等细胞培养所用试剂均购自 GIBICO 公司;细胞活力、谷草转氨酶(GOT)、谷丙转氨酶(GPT)、活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)和 Annexin-V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自南京建成生物有限公司。

1.2 细胞培养

草鱼肝细胞系 L8824 采用含 10%胎牛血清的 MEM 培养基(含 1%谷氨酰胺与 1%双抗)在 5% CO₂ 的 28℃培养箱中培养。细胞长满后,用 0.25% 胰酶(含 EDTA)消化传代,将细胞接种于 96 孔或 6 孔板进行后续实验。

1.3 细胞活力检测

采用 CCK-8 微板比色法检测细胞活力。将对数生长期的细胞悬液以 1×10^4 密度接种于 96 孔板(每孔 100 μ L),置于细胞培养箱预培养 24 h 后,分别加入含不同浓度的黄连素培养液 100 μ L (黄连素浓度为 0 μ mol/L、5 μ mol/L、25 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L),处理细胞 0 h、6 h、12 h 和 24 h。另设 DMSO 溶剂对照组(0.01%)。每孔再加入 10 μ L CCK-8 溶液,继续孵育 2 h 后,酶联免疫仪(单波长 450 nm)测定各孔的吸光度值(OD 值)。计算公式如下:

$$\text{细胞活力}\% = (\text{加药细胞 OD} / \text{对照细胞 OD}) \times 100\%$$

1.4 ROS 的检测

采用 DCFH-DA 探针法检测细胞内活性氧(ROS)。将不同浓度的黄连素培养液处理细胞(黄连素浓度为 0 μ mol/L、5 μ mol/L、25 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L)12 h 后,设 DMSO 溶剂对照组。弃细胞处理液,加入含 DCFH-DA 工作液(浓度 50 μ mol/L)的细胞处理液孵育 20 min,加入用 DPBS 洗涤细胞 3 次,用 0.25%的胰酶消化细胞,

加入血清终止消化后,1000 g 离心细胞,收集细胞沉淀物,荧光酶标仪 488 nm 激发波长,525 nm 发射波长,测定荧光强度。

1.5 MDA 含量检测

丙二醛在高温及酸性环境下可与 2-硫代巴比妥酸(TBA)反应产生红棕色的产物 3,5,5'-三甲基恶唑 2,4-二酮(三甲川),该物质在 532 nm 处有一吸收高峰,并且在 660 nm 处有较小光吸收。根据其 532 nm 的消光值可计算出溶液中丙二醛的含量。将不同浓度的黄连素培养液处理细胞(黄连素浓度为 0 μ mol/L、5 μ mol/L、25 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L)12 h 后,弃细胞处理液,将细胞转移至离心管中,加入提取液,将细胞制成悬液,按照南京建成细胞专用试剂盒上的说明书处理,酶标仪测定细胞内 MDA 含量。

1.6 GOT 和 GPT 活性检测

样本中 GOT 催化 L-天门冬氨酸和 α -酮戊二酸氨基转换,生成草酰乙酸和 L-谷氨酸。在 NADH 和苹果酸脱氢酶存在下,草酰乙酸被还原为 L-苹果酸,NADH 被氧化为 NAD⁺,从而使 340 nm 处的光吸收值下降,通过监测 340 nm 处的光吸收值下降的速率,可以测定 GOT 的活力。样本种 GPT 催化 L-丙氨酸和 α -酮戊二酸氨基转换,生成丙酮酸和谷氨酸。丙酮酸在 NADH 和乳酸脱氢酶催化下反应生成乳酸和 NAD⁺。NADH 在 340 nm 有特异性吸收峰,其氧化的速率与血清种 ALT 活力成正比,在 340 nm 处测定 NADH 吸光度下降的速率即可计算出 GPT 活力。具体操作如下:将不同浓度的黄连素培养液处理细胞(黄连素浓度为 0 μ mol/L、5 μ mol/L、25 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L)12 h 后,弃细胞处理液,DPBS 洗涤细胞 3 次,收集细胞,3000 g 离心,收集上清液,按照南京建成细胞专用试剂盒上的说明书处理,酶标仪测定细胞内 GOT 和 GPT 活性。

1.7 细胞凋亡检测

采用 Annexin-V-FITC/PI 双染流式细胞术测定细胞凋亡。操作如下:将不同浓度的黄连素培养液处理细胞(黄连素浓度为 0 μ mol/L、5 μ mol/L、25 μ mol/L、50 μ mol/L、100 μ mol/L)12 h 后,收集细胞处理液,并用 DPBS 洗涤贴壁细胞 3 次,用

0.25%的胰酶消化细胞,加入血清终止消化后,再加入原细胞处理液混匀,1000 g 离心细胞,弃上清,用 DPBS 重悬细胞(密度 $1\times 10^5\sim 5\times 10^5$),离心 5 min,弃上清,加入 500 μL 检测工作液重悬细胞,加入 5 μL Annexin-V-FITC 工作液,混匀,再加入 5 μL PI 工作液。避光 10 min,上流式细胞仪进行检测。检测条件:激发波长 488 nm,发射波长 530 nm。Annexin-V-FITC 为绿色荧光通过 FITC 通道检测,PI 为红色荧光通道检测。

1.8 细胞凋亡基因的检测

操作如下:将不同浓度的黄连素培养液处理细胞(黄连素浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$)12 h,设 DMSO 溶剂对照组。

1.8.1 总 RNA 的提取 弃细胞处理液,DPBS 洗涤 3 次后,加入预冷的 Trizol 试剂 1 mL,在冰浴中反复吹打,直到看不到沉淀,将匀浆液转移至 1.5 mL 的离心管中,采用 Trizol[®] Plus RNA Purification Kit (Invitrogen 货号: 12183-555)进行,具体提取过程参照该试剂盒的说明书。

1.8.2 反转录 按照 Takara Prime Script[®] RT reagent Kit 反转录试剂盒说明书配置 20 μL 的体系,参照说明书规定的反应程序进行 cDNA 反转。

1.8.3 引物设计 试验所需引物由 Primer 5.0 软件进行设计(表 1),上海英捷公司按照引物序列完成相关引物的合成。

表 1 定量 PCR 引物序列		
Tab. 1 Nucleotide sequences of the primers used to assay gene expression by real-time PCR		
目的基因 target gene	登录号 accession number	序列(5'-3') sequence (5'-3')
<i>caspase-3-F</i>	JQ793789	GCTGTGCTTCATTGTTTG
<i>caspase-3-R</i>		TCTGAGATGTTATGGCTGTC
<i>caspase-8-F</i>	KM016991	CTGTGGCGGAGGTGAGAA
<i>caspase-8-R</i>		GTGCTGGAGGACATGGGAAT
<i>caspase-9-F</i>	JQ793787	CTGTGGCGGAGGTGAGAA
<i>caspase-9-R</i>		GTGCTGGAGGACATGGGAAT
<i>β-actin-F</i>	M25013	GGCTGTGCTGTCCCTGTA
<i>β-actin-R</i>		GGGCATAACCCTCGTAGAT

1.8.4 实时荧光定量 PCR 反应 根据 SYBR[®] Premix Ex Taq TMII (TaKaRa 公司)试剂盒说明书进行 Real Time PCR 扩增反应,PCR 反应体系为 20 μL ,操作如下。

表 2 实时荧光量 PCR 反应体系	
Tab. 2 Reaction system of PCR	
试剂 reagent	体积/ μL volume
SYBR	10.0
正向引物	0.4
反向引物	0.4
ROX	0.4
DEPC 处理水	6.8
cDNA 模板	2.0

PCR 反应条件为:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,退火 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,循环次数 40 次。

定量 PCR 扩增效率基本一致的前提下,以 β -actin 为内参基因,读取各样品孔的 C_T 值,应用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算各处理组 mRNA 的相对表达量。

1.9 数据分析

实验中各处理组设置 3 个重复,每重复 3 平行。细胞活力数据用 SPSS 20.0 软件进行双因素方差分析(two-way ANOVA),其他数据用单因素方差分析(one-way ANOVA),数据用平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x}\pm\text{SE}$)表示。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的黄连素和处理时间对草鱼肝脏细胞活力的影响

如图 1 所示,黄连素浓度和作用时间对草鱼肝细胞活力的交互作用显著($P<0.05$)。在相同的处理时间下,随着黄连素浓度的增加,细胞活力呈现出先增加后降低的趋势($P<0.05$)。与不添加黄连素的对照组相比,当黄连素浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活力显著升高($P<0.05$);当黄连素浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活力显著降低($P<0.05$)。处理细胞时间对细胞活力无显著($P>0.05$)影响。

2.2 不同浓度的黄连素对草鱼肝细胞功能的影响

如图 2 所示,与未添加黄连素组相比,当黄连素添加浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞 GOT 活性显

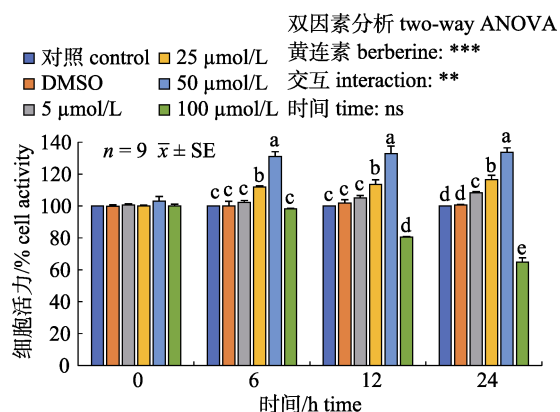


图 1 黄连素对草鱼肝细胞活力的影响

图中不同小写英文字母表示两者之间差异显著($P < 0.05$).

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; ns 表示无显著差异.

Fig. 1 The influence of berberine on *Ctenopharyngodon idellus* hepatopancreas cell activity

Means with different lowercase letters are significantly

different at $p < 0.05$. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$;

***: $p < 0.001$; ns means not significant.

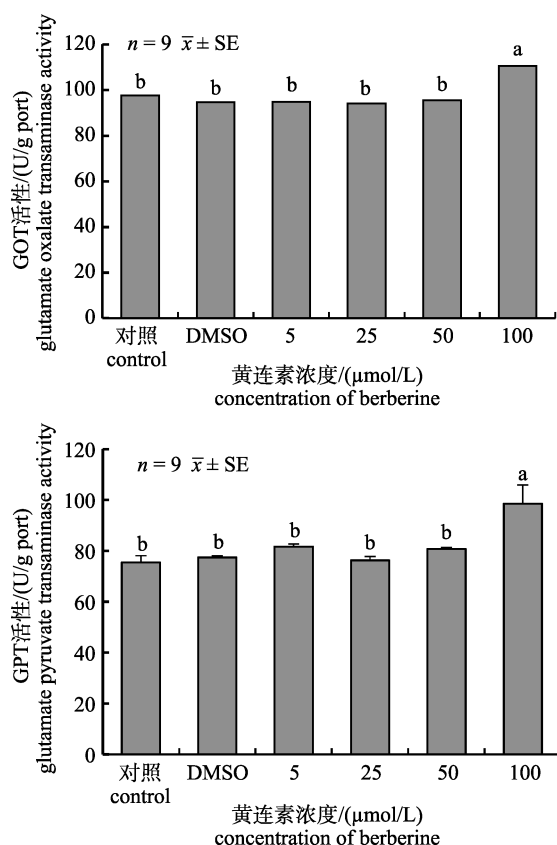


图 2 黄连素对草鱼肝细胞 GOT 和 GPT 活性的影响

图中不同小写英文字母表示两者之间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 2 The influence of berberine on *Ctenopharyngodon idellus* hepatopancreas cell GOT and GPT activities

Means with different lowercase letters are

significantly different at $P < 0.05$.

著($P < 0.05$)显著高于 control 组, 其他各组细胞 GOT 活性无显著($P > 0.05$)差异。各组的 GPT 活性变化趋势与 GOT 一致。

2.3 不同浓度的黄连素对草鱼肝脏细胞氧化应激的影响

如图 3 所示, 与未添加黄连素的组相比, 当黄连素添加浓度为 $100 \mu\text{mol/L}$ 时, 细胞内 ROS 含量显著($P < 0.05$)高于对照组, 其他各组 ROS 含量无显著($P > 0.05$)差异。各组的 MDA 含量变化趋势与 ROS 变化一致。

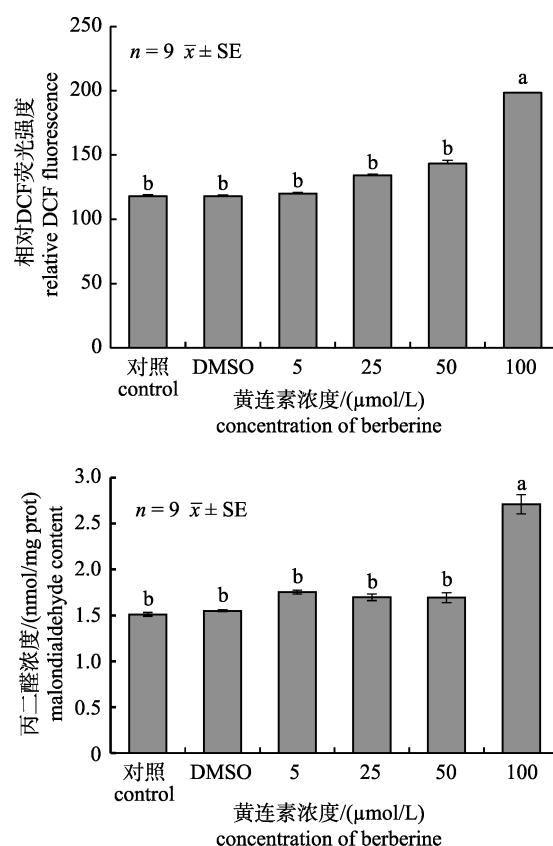


图 3 黄连素对草鱼肝细胞 ROS 和 MDA 含量的影响

图中不同小写英文字母表示两者之间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 3 The influence of on *Ctenopharyngodon idellus* hepatopancreas cell ROS and MDA contents
 Means with different lowercase letters are significantly different at $P < 0.05$.

2.4 不同浓度的黄连素对草鱼肝脏细胞凋亡的影响

如图 4 所示, 随着黄连素添加浓度的增加, 细胞凋亡率呈现先升高后降低的趋势。与未添加

黄连素组相比, 当黄连素的添加浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞凋亡率显著($P<0.05$)升高; 当黄连素的浓度增加到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞凋亡率显著($P<0.05$)降低。

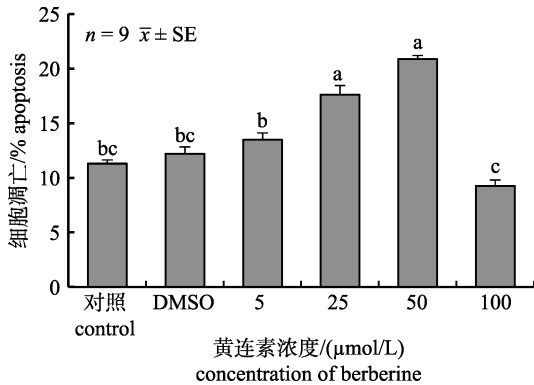


图 4 黄连素对草鱼肝细胞凋亡率的影响
图中不同小写英文字母表示两者之间差异显著($P<0.05$).
Fig. 4 The influence of berberine on *Ctenopharyngodon idellus* hepatopancreas cell apoptosis
Means with different lowercase letters are significantly different at $P<0.05$.

2.5 不同浓度的黄连素对草鱼肝脏细胞凋亡基因的影响

如表 2 所示, 与未添加黄连素的组相比, 细胞 *caspase-8* 和 *caspase-9* mRNA 表达量无显著($P>0.05$)变化。当黄连素的添加浓度为 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞 *caspase-3* mRNA 表达量显著($P<0.05$)升高, 其他各组无显著性($P>0.05$)变化。

表 2 黄连素对草鱼肝细胞凋亡相关基因的表达式的影响
Tab. 2 The influence of berberine on grass carp liver cell *caspase-3*, *caspase-8* and *caspase-9* contents at 12 h treatment
 $n=9; \bar{x}\pm\text{SE}$

黄连素浓度/($\mu\text{mol/L}$) concentration of berberine	半胱氨酸 蛋白酶-3 <i>caspase-3</i>	半胱氨酸 蛋白酶-8 <i>caspase-8</i>	半胱氨酸 蛋白酶-9 <i>caspase-9</i>
control	1.00 $\pm$ 0.01 ^b	1.00 $\pm$ 0.01	1.00 $\pm$ 0.11
DMSO	1.13 $\pm$ 0.02 ^b	1.01 $\pm$ 0.01	1.12 $\pm$ 0.02
5	1.57 $\pm$ 0.03 ^b	1.00 $\pm$ 0.03	1.15 $\pm$ 0.13
25	1.71 $\pm$ 0.02 ^{ab}	0.98 $\pm$ 0.02	1.23 $\pm$ 0.11
50	2.17 $\pm$ 0.05 ^a	0.95 $\pm$ 0.01	1.15 $\pm$ 0.06
100	2.32 $\pm$ 0.04 ^a	0.94 $\pm$ 0.02	1.08 $\pm$ 0.06

注: 同列数据上标含不同字母者差异显著($P<0.05$).
Note: Means in the same column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 黄连素对草鱼肝细胞活力的影响

本研究中发现, 高浓度(100 $\mu\text{mol/L}$)的黄连素对草鱼肝细胞活力有明显的抑制作用, 并且随着黄连素浓度的增加, 抑制作用逐渐增强; 而低浓度的黄连素可以促进细胞的生长。50 $\mu\text{mol/L}$ 是黄连素处理鱼肝脏细胞浓度的分界点。前期本实验室在团头鲂的体内实验证实, 黄连素对摄食正常日粮的团头鲂有促生长作用, 这与本次体外实验得出的结论一致^[7, 12]。储岳峰等^[13]研究表明, 部分中草药免疫增强剂能显著提高小鼠(*Mus musculus*)腹腔巨噬细胞和 NK 细胞活力。占今舜等^[14]研究表明, 苜蓿素可以显著提高脂多糖添加下奶牛(*Bos Taurus*)乳腺上皮细胞活力。曹丽萍等^[15]研究表明, 在一定的浓度范围内, 香菇多糖和黄芪多糖均显著提高鲤(*Cyprinus carpio*)免疫细胞的增殖能力。这些哺乳动物和鱼类的研究与本研究结果类似, 表明黄连素作为一种中草药添加剂, 也能显著提高草鱼肝细胞活力。然而, Mantena 等^[16]对正常的人表皮角质形成细胞研究表明, 黄连素处理细胞 72 h 时, 实验中高浓度(50 $\mu\text{mol/L}$ 和 75 $\mu\text{mol/L}$)的黄连素对细胞活力无显著影响。这与本研究结果存在差异, 推测原因可能是: (1) 黄连素选择的浓度范围不一致, 低浓度的黄连素可能对细胞活力无显著影响, 当浓度达到某个临界点时, 可能才会导致细胞活力出现显著性差异; (2) 细胞类型的差异可能也会影响药物的作用效果。

3.2 黄连素对草鱼肝细胞氧化应激的影响

GOT 和 GPT 的活性变化可以反映肝细胞受损的程度^[17]。ROS 是细胞内正常代谢产物^[18], 在正常生理条件下其在细胞中的含量处于动态平衡。但是当细胞受到外界因素的刺激时, 这种动态平衡会破坏, 也会产生 ROS。有研究表明, 当细胞内的 ROS 和 MDA 含量过高时, 会诱发机体产生氧化应激反应^[19]。本研究结果显示, 添加较低浓度的黄连素(<50 $\mu\text{mol/L}$), 细胞内 ROS 和 MDA 含量适量增加, 细胞启动自身的细胞凋亡程序, 清除受损的细胞, 促进健康细胞增殖, 维持机体内正常生理代谢^[20]; 添加高浓度(100 $\mu\text{mol/L}$)

黄连素, 细胞内 ROS 的大量产生, MDA 含量显著增加, 细胞内抗氧化应激能力损失, 诱发氧化应激, 而氧化应激可进一步引起 DNA 损伤, 导致过量的脂质过氧化物生成, 损伤细胞功能, 细胞自身保护程序—细胞凋亡水平降低, 最终造成细胞活力降低。细胞活力、细胞功能指标与细胞凋亡数据的变化趋势也正说明该问题。Park 等^[21]研究表明, 不同浓度(10~200 $\mu\text{mol/L}$)的黄连素处理胰腺癌细胞系 PANC-1 和 MIA-PaCa₂ 时, ROS 随着黄连素浓度的增加显著增加。因此, 在 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 细胞可启动自身的防御机制清除受损细胞, 以维持正常细胞功能及生理代谢。

3.3 黄连素对草鱼肝细胞凋亡的影响

黄连素已被证实在多种细胞中具有诱导细胞凋亡的作用^[16, 22]。Hsu 等^[23]在人的 SW620 细胞中研究发现, 黄连素可以诱导结肠癌细胞发生细胞凋亡。Jantova 等^[24]研究表明, 当黄连素浓度为 75 $\mu\text{g/mL}$ (文献中浓度)可诱导人幼单核细胞(U937)发生细胞凋亡。本试验研究中, 随着黄连素处理浓度的增加, 细胞凋亡率呈现先升高后降低的趋势。Hwang 等^[25]用黄连素处理 HepG2 细胞 24 h, 结果表明, 细胞内 *caspase*-8 和 *caspase*-3 被抑制, 细胞凋亡水平随添加浓度(10 $\mu\text{mol/L}$ 、25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 和 100 $\mu\text{mol/L}$)增高而降低, 该结果与本研究结果类似。Cui 等^[26]研究表明, 大黄素处理草鱼肝细胞 24 h 的细胞凋亡率呈浓度依赖性, 随着大黄素浓度(1~25 mg/mL)的升高, 细胞凋亡数量显著升高。该研究结果与本研究不一致, 推测可能是由添加剂的种类、浓度的选择范围和处理时间等因素造成的。

细胞凋亡可分为外在的半胱氨酸蛋白酶依赖性途径和线粒体依赖性途径^[27-28]。*caspase* 依赖途径包括 *caspase*-8、*caspase*-9 和 *caspase*-3 的激活, 而线粒体途径涉及细胞色素 c 从线粒体流向胞质溶胶, 与 Apaf-1 和 *caspase*-9 形成凋亡体, 并导致激活 *caspase*-3 和细胞凋亡^[29]。*caspase*-9 主要介导了凋亡信号的级联放大和传递, *caspase*-3 是 *caspase* 家族蛋白引起细胞凋亡的最下游分子, 直接参与细胞凋亡的发生^[30]。事实上, 2 条途径都是错综复杂的。本研究中, 黄连素浓度大于

50 $\mu\text{mol/L}$ 时, *caspase*-3 的表达量显著升高。由此推测, 高浓度的黄连素使得机体产生过量的 ROS, 可能激活了 *caspase*-3 的上游基因, 使 *caspase*-3 水解成有活性的蛋白, 从而启动了细胞凋亡程序^[31]。这也与 Yungtsuan 等^[32]研究结果一致。然而, Hwang 等^[25]研究表明, 黄连素(0~100 $\mu\text{mol/L}$)作用于人的肝细胞 24 h 时, 各组的 *caspase*-3 表达量无显著变化, 该结果与本研究不一致。推测原因可能是细胞类型的差异导致药物发挥作用的时间发生了变化。但是 *caspase*-8 和 *caspase*-9 在本研究中没有显著变化, 其原因有待后续研究中进一步验证。

本研究应用鱼类细胞体外方法研究黄连素对细胞活力及氧化应激的影响, 结果显示, 细胞中添加超过 50 $\mu\text{mol/L}$ 的黄连素会抑制草鱼肝细胞活力, 引起氧化应激, 损伤细胞。因此, 适宜的黄连素添加浓度范围为 25~50 $\mu\text{mol/L}$, 这为后续开展黄连素在水产动物细胞生物学等方面的研究提供参考依据。

参考文献:

- [1] Zuo R, Cao X B, Zhang W S. The progress of berberine's pharmacological effects[J]. Global Traditional Chinese Medicine, 2014(7): 568-572. [左茹, 曹雪滨, 张文生. 黄连素药理作用研究进展[J]. 环球中医药, 2014(7): 568-572.]
- [2] Liang K, Wei W, Guan Y Y. Clinical Application Prospects of Berberine[J]. Medical Recapitulate, 2012, 18(17): 2842-2844. [梁坤, 魏巍, 关源源. 黄连素临床应用的研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(17): 2842-2844.]
- [3] Cheng Z, Pang T, Gu M, et al. Berberine-stimulated glucose uptake in L6 myotubes involves both AMPK and p38 MAPK[J]. Biochimica et Biophysica Acta General Subjects, 2006, 1760(11): 1682-1689.
- [4] Jin Y, Liu S, Ma Q, et al. Berberine enhances the AMPK activation and autophagy and mitigates high glucose-induced apoptosis of mouse podocytes[J]. European Journal of Pharmacology, 2016, 794: 106-114.
- [5] Kong W, Wei J, Abidi P, et al. Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins[J]. Nature Medicine, 2004, 10(12): 1344-1351.
- [6] Lu K L, Wang L N, Zhang D D, et al. Berberine attenuates oxidative stress and hepatocytes apoptosis via protecting mitochondria in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed high-fat diets[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2017, 43(1): 1-12.
- [7] Chen Q Q, Liu W B, Zhou M, et al. Effects of berberine on

- the growth and immune performance in response to ammonia stress and high-fat dietary in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2016, 55: 165-172.
- [8] Ai Q H, Li Q F, Mai K S. Advances in research on fish cell culture techniques[J]. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(3): 122-128. [艾庆辉, 李庆飞, 麦康森. 鱼类细胞培养技术研究进展[J]. 渔业科学进展, 2012, 33(3): 122-128.]
- [9] Zhang B, Chen S L. Decades of researching progresses of fish cell culture and its application prospects[J]. Marine Sciences, 2011, 35(7): 113-121. [张博, 陈松林. 近 10 年鱼类细胞培养研究进展及应用展望[J]. 海洋科学, 2011, 35(7): 113-121.]
- [10] Taju G, Abdul M S, Ksn N, et al. Application of fish cell lines for evaluating the chromium induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress[J]. Chemosphere, 2017, 184: 1-12.
- [11] Bermejonogales A, Fernándezcruz M L, Navas J M. Fish cell lines as a tool for the ecotoxicity assessment and ranking of engineered nanomaterials[J]. Regulatory Toxicology Pharmacology, 2017, 90: 297-307.
- [12] Xu W N, Chen D H, Chen Q Q, et al. Growth performance, innate immune responses and disease resistance of fingerling blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*, adapted to different berberine-dietary feeding modes[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2017, 68: 458-465.
- [13] Chu Y F, Li X R, Hu Y L. Effects of Chinese herbal medicinal ingredient on cells mediated immunity in mice[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2004, 27(1): 97-100. [储岳峰, 李祥瑞, 胡元亮. 9 种中药成分对小鼠免疫细胞活性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(1): 97-100.]
- [14] Zhan J S, Gu D P, Hu L Z, et al. Effects of tricin on viability and expressions of genes related to inflammation of bovine mammary epithelial cells stimulated by lipopolysaccharide in vitro[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2018(2): 641-648. [占今舜, 谷德平, 胡利珍, 等. 苜蓿素对脂多糖刺激下体外培养奶牛乳腺上皮细胞活性和炎症相关基因表达的影响[J]. 动物营养学报, 2018(2): 641-648.]
- [15] Cao L P, Ding W D, Zhang L, et al. Effects of the activation of immunological cells and the expression of interleukin-1 β in the *Cyprinus carpio* after stimulation by Lentinan and Astragalus polysaccharides[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(4): 628-635. [曹丽萍, 丁炜东, 张柳, 等. 香菇多糖和黄芪多糖对鲤免疫细胞的活性和 IL-1 β 体外诱生表达的影响[J]. 水产学报, 2008, 32(4): 628-635.]
- [16] Mantena S K, Sharma S D, Katiyar S K. Berberine inhibits growth, induces G1 arrest and apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells by regulating Cdk1-Cdk-cyclin cascade, disruption of mitochondrial membrane potential and cleavage of caspase 3 and PARP[J]. Carcinogenesis, 2006, 27(10): 2018-2027.
- [17] Meng Z N, Chen Y C, Guan X T, et al. Effect of Chinese herb compounds on activities of transaminase in serum and antioxidase in erythrocyte of *Cyprinus carpio*[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2010, 41(8): 75-80. [孟兆娜, 陈玉春, 管雪婷, 等. 复方中草药对镜鲤(*Cyprinus carpio* L.)血清转氨酶及红细胞抗氧化酶活性的影响[J]. 东北农业大学学报, 2010, 41(8): 75-80.]
- [18] Piskounova E, Agathocleous M, Murphy M M, et al. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells[J]. Nature, 2015, 527(7577): 186-191.
- [19] Li A, Xing Y Q, Li X X, et al. Redox regulation of FOXO3a transcription factor[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2016, 32(9): 1203-1207. [李昂, 邢雅琪, 李晓霞, 等. 氧化应激中 ROS 对 FOXO3a 转录因子的调控作用研究进展[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(9): 1203-1207.]
- [20] Xu W N. Effect of trichlorfon on anti-oxidative system and protention of ascorbic acid on *Carassius auratus* Gibeio[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009. [徐维娜. 敌百虫对异育银鲫抗氧化应激系统的影响及抗坏血酸对鱼体的保护作用[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.]
- [21] Park S H, Sung J H, Kim E J, et al. Berberine induces apoptosis via ROS generation in PANC-1 and MIA-PaCa2 pancreatic cell lines[J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2015, 48(2): 111-119.
- [22] Meeran S M, Katiyar S, Katiyar S K. Berberine-induced apoptosis in human prostate cancer cells is initiated by reactive oxygen species generation[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2008, 229(1): 33-43.
- [23] Hsu W H, Hsieh Y S, Kuo H C, et al. Berberine induces apoptosis in SW620 human colonic carcinoma cells through generation of reactive oxygen species and activation of JNK/p38 MAPK and FasL[J]. Archives of Toxicology, 2007, 81(10): 719-728.
- [24] Jantova S, Cipak L, Letasiova S. Berberine induces apoptosis through a mitochondrial/caspase pathway in human promonocytic U937 cells[J]. Toxicology in Vitro, 2007, 21(1): 25-31.
- [25] Hwang J M, Kuo H C, Tseng T H, et al. Berberine induces apoptosis through a mitochondria/caspases pathway in human hepatoma cells[J]. Archives of Toxicology, 2006, 80(2): 62-73.
- [26] Cui Y T, Liu B, Xie J, et al. The effect of emodin on cytotoxicity, apoptosis and antioxidant capacity in the hepatic cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2014, 38(1): 74-79.
- [27] Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis[J]. Cell Research, 2002, 12(3): 459-470.
- [28] Mehmet H. Caspases find a new place to hide[J]. Nature, 2000, 403(6765): 29-30.
- [29] Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria Blocked[J]. Science, 1997, 275(5303): 1129-1132.
- [30] Zhang M, Wang X, Bai B, et al. Oxymatrine protects against sepsis-induced myocardial injury via inhibition of the TNF- α /p38-MAPK/caspase-3 signaling pathway[J]. Mo-

- lecular Medicine Reports, 2016, 14(1): 551-559.
- [31] Mirzayans R, Andrais B, Kumar P, et al. The Growing Complexity of Cancer Cell Response to DNA-Damaging Agents: Caspase 3 Mediates Cell Death or Survival[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(5): 708-724.
- [32] Yungtsuan H, Lu C C, Yang J S, et al. Berberine induced apoptosis via promoting the expression of caspase-8, -9 and -3, apoptosis-inducing factor and endonuclease G in SCC-4 human tongue squamous carcinoma cancer cells[J]. Anti-cancer Research, 2009, 29(10): 4063-4070.

Chinese herbal extract berberine on oxidative stress and apoptosis in the hepatic cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

CHEN Danhong, CHEN Qingqing, TIAN Hongyan, SHI Huajuan, LIU Wenbin

Key Laboratory of Aquatic Nutrition of Jiangsu Province, College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Berberine was one kind of Chinese herbal additive, which extracted from the stems and roots of various Berberis species, such as *Cortex phellodendri* (Huangbai), *Rhizoma coptidis* (Huanglian) and so on. It possessed a series of biological activities, including antioxidant, anti-inflammatory, reducing blood glucose and lipid level. In addition, it had been proved that berberine could improve lipid deposition and glucose metabolism in diabetes. Recently, berberine had been applied to aquaculture diets as an herbal feed additive in Asian area. Our laboratory conducted many vivo experiments to study the function of berberine. The current study demonstrated that berberine added in high-fat diet could mitigate oxidative stress, inhibit the apoptosis and enhance disease resistance of fish. However, it was found that the growth performance of fish fed with normal diet supplied berberine was significantly enhanced but immunity was not improved. In order to solve this problem, the study was aimed to explore the effect of different concentrations of berberine on cell activity, oxidative stress and apoptosis of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) hepatopancreas cell in vitro experiment. Cultured cells were treated with different concentrations of berberine (0, 5 $\mu\text{mol/L}$, 25 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$) for 0, 6 h, 12 h, 24 h. Then, the optimal concentration of berberine was showed by detecting cell viability in CCK-8 assay. Results showed that the cell activity was affected by interaction of time and berberine concentration ($P < 0.05$). Berberine significantly ($P < 0.05$) affected cell activity in a dose-dependent manner. According to the cell activity data, the remaining indicators were selected to data of 12 hours for analyzing related indicators, including glutamate oxalate transaminase (GOT) and glutamate pyruvate transaminase (GPT) activity, malondialdehyde (MDA) and ROS content, apoptosis, caspase-3, caspase-8 and caspase-9 mRNA expression. Compared with control group, GOT and GPT activity in group of 100 $\mu\text{mol/L}$ berberine concentration were significantly ($P < 0.05$) increased. Meanwhile, the content of MDA and ROS were significantly increased with increasing concentration of berberine. The tendency of content of MDA and ROS were same as that of GOT and GPT activity ($P < 0.05$). In addition, compared with control group, the total cell apoptosis rate in group of 25 $\mu\text{mol/L}$ and 50 $\mu\text{mol/L}$ berberine concentration were significantly ($P < 0.05$) increased while cell apoptosis rate in 100 $\mu\text{mol/L}$ berberine group was significantly ($P < 0.05$) decreased. At last, the mRNA expression of *caspase-3* in group of 50 $\mu\text{mol/L}$ and 100 $\mu\text{mol/L}$ berberine group were significantly enhanced ($P < 0.05$). In summary, the safety concentration of berberine in stimulating fish liver cells should be 25–50 $\mu\text{mol/L}$. When the concentration was more than 50 $\mu\text{mol/L}$, it would have toxicity to normal growth cells and affect cell function.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; hepatopancreas cell; berberine; cell activity; oxidative stress; apoptosis

Corresponding author: LIU Wenbin. E-mail: wbliu@njau.edu.cn