

# 卷烟添加木犀草素与黄芩苷混合物对细胞损伤的减害作用研究

陈义坤<sup>1</sup>, 魏敏<sup>1</sup>, 宋旭艳<sup>1</sup>, 罗诚浩<sup>1</sup>, 李文芳<sup>2</sup>, 王君<sup>2</sup>, 胡霞敏<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 湖北中烟工业有限责任公司技术中心, 武汉市东西湖区金山大道 1355 号黄鹤楼科技园, 430040;

<sup>2</sup> 武汉科技大学医学院, 武汉 430065

**摘要:** 将木犀草素、黄芩苷混合物加入卷烟制成样品卷烟, 研究其在卷烟烟气中对人肺泡上皮细胞损伤的影响。用不同浓度卷烟烟气提取物 (cigarette smoke extract, CSE) 刺激人肺泡上皮细胞 A549, 采用 MTT 实验检测细胞存活率, 彗星实验观察 DNA 损伤, 荧光法测定细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量。结果表明, 与对照卷烟比较, 样品卷烟组细胞存活率升高, 细胞内活性氧 (ROS) 彗星尾长、尾部 DNA 含量、尾距、Olive 尾距均小于对照卷烟组。因此, 添加木犀草素与黄芩苷混合物的特制卷烟烟气对细胞的损伤较少, 产生较少 ROS, 减少一定的 DNA 损伤, 对细胞毒性有一定的减害作用。

**关键词:** 卷烟烟气提取物; 木犀草素; 黄芩苷; 人肺泡上皮细胞 A549; 细胞内活性氧; DNA 损伤

doi: 10. 3969/j. issn. 1004-5708. 2012. 03. 002

中图分类号: TS411 文献标识码: A 文章编号: 1004-5708(2012) 03-0006-04

## Effects of adding Luteolin and Baicalin mixture in cigarettes on reducing cell injury

CHEN Yi-kun<sup>1</sup>, WEI Min<sup>1</sup>, SONG Xu-yan<sup>1</sup>, LUO Cheng-hao<sup>1</sup>, LI Wen-fang<sup>2</sup>, WANG Jun<sup>2</sup>, HU Xia-min<sup>2</sup>

1. Technology Center, China Tobacco Hubei Industry Co. Ltd., Wuhan 430040, China;

2. Medical College of Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China

**Abstract:** Sample cigarettes were made by adding luteolin and baicalin mixture into cigarettes. Cell cytotoxicity experiments were conducted. Cigarette smoke extract (CSE) was collected by dimethyl sulfoxide (DMSO). Human lung adenocarcinoma A549 cells were cultured and then incubated with different concentrations of CSE. Cell viability was evaluated by MTT assay and DNA damage was detected by Comet assay. Contents of reactive oxygen species (ROS) was examined by fluorescence method. Results showed that the sample cigarettes resulted in higher survival rate of A549 cells, lower ROS tail length, tail DNA content, TM, and OTM than control group. It implied that adding luteolin and baicalin mixture into cigarettes could attenuate cell injury, increase cell viability, and reduce DNA damage.

**Keywords:** cigarette smoke extract (CSE); luteolin; baicalin; human lung adenocarcinoma A549 cells; ROS; DNA damage

近年来, 应用中草药有效成分提高卷烟感官质量和降低吸烟危害性方面的研究不断深入。黄酮类化合物广泛存在于蔬菜、水果、牧草和药用植物中, 是植物成分中分布最广的一类多酚化合物。黄酮类化合物在

自然界中以糖甙型和游离型存在, 并以其生物化学及药理作用的多样性, 包括抗氧化活性, 引起了国内外学者的广泛重视<sup>[1-3]</sup>, 对于中式卷烟具有潜在的开发应用价值。黄酮类化合物木犀草素 (luteolin) 是一种天然的多酚化合物<sup>[4]</sup>。中药白毛夏枯草的有效成分即是木犀草素。黄芩苷 (baicalin) 具有抗病原微生物、增强机体免疫力、抗氧化等多种作用, 是黄芩的主要功效成分<sup>[5]</sup>。在中药古方中就常以白毛夏枯草与黄芩配伍, 以增强清肺、祛痰止咳的功效<sup>[6]</sup>。

**作者简介:** 陈义坤 (1975—), 理学博士, 工程师, 主要从事卷烟减害与产品开发, E-mail: chenyk@hbtobacco.cn

**通讯作者:** 魏敏 (1979—), 理学硕士, 工程师, 主要从事天然植物烟用研究, E-mail: weimin@hbtobacco.cn

**收稿日期:** 2011-04-03

将木犀草素与黄芩苷按一定比例与浓度混合加入卷烟中,前期研究已评价其药理作用<sup>[4]</sup>以及其在卷烟烟气中对呼吸系统的保护作用<sup>[5]</sup>。目前国内有关卷烟烟气的细胞毒性研究相对较少<sup>[6-10]</sup>,对添加木犀草素与黄芩苷混合物的卷烟烟气进行人肺泡上皮细胞 A549 损伤的减害研究还未见报道。本实验采用不同浓度 CSE 刺激人肺泡上皮细胞 A549,MTT 实验检测细胞存活率,彗星实验观察 DNA 损伤,荧光法测定细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量,以验证其降低卷烟危害性的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

大气采样器; CO<sub>2</sub> 培养箱; 全自动酶标仪(美国宝特 Bio-Tek ELX 800); 荧光分光光度计(日本岛津, RF-5100); 荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司, CKX41-F32FL)。

### 1.2 试剂

添加木犀草素与黄芩苷混合物的卷烟(湖北中烟工业有限责任公司提供); 肺泡上皮细胞 A549(武汉大学细胞典藏中心); 溴化乙锭、DMEM 细胞培养液(Hyclone); 胎牛血清、青霉素、链霉素(杭州四季青生物试剂公司); 活性氧检测试剂盒、噻唑兰 DMSO(美国 Sigma 公司)。

### 1.3 卷烟烟气提取物(CSE)的制备

用大气采样器作为采集器,DMSO 作为吸收液,3 个分别含 3 mL 吸收液的 U 形吸收管串联,将卷烟点燃,调节大气采样器的流量使卷烟燃烧速度维持为 1 支/5 min,最后制得浓度为 1 支/mL 的 CSE,于 -20 °C 保存备用。使用时用 DMSO 按照 10%, 20%, 50% 稀释。

### 1.4 细胞培养与处理

将人肺泡上皮细胞 A549 培养于高糖 DMEM 培养基中,培养基中含有 10% 的灭活胎牛血清和双抗(100 kU/L 青霉素,100 kU/L 链霉素),置于 37 °C、湿度 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,取生长状态良好的细胞用于实验。

### 1.5 MTT 细胞活性测定

实验设空白对照、未添加木犀草素与黄芩苷的卷烟组(以下标为原烟组)、添加木犀草素与黄芩苷的卷烟组(以下标为 DX 组),在细胞融合率为 80% 时,加入 20% 和 50% 的卷烟烟气提取物(CSE)作用 12 h。以上各组均设 5 个平行孔。按照常规 MTT 实验操作。在酶标仪上测定 490 nm 波长的吸光度值,以实验组占

对照组的百分率表示细胞存活率。细胞存活率 = (实验组 A 值/空白对照组 A 值) × 100%。

### 1.6 细胞内活性氧的测定

采用活性氧检测试剂盒,按说明书操作。接种细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL,将细胞接种于 6 孔板中,每孔加入 2 mL 培养基,当细胞融合率为 70% 时,加入 50% 卷烟烟气提取液 20  $\mu$ L 作用 4 h,收集细胞后用荧光分光光度计测定,激发波长 488 nm,发射波长 525 nm,整个过程严格避光。

### 1.7 细胞 DNA 损伤的测定

细胞接种在 6 孔板中,融合率在 70% 时加入 50% 的卷烟烟气提取液作用 4 h,按常规方法制片,裂解,解旋,电泳。电泳结束后用 40  $\mu$ L 的溴化乙锭染色(EB, 20  $\mu$ g/mL),荧光显微镜下观察结果并拍照。用 CASP 图像分析软件测量每组中 50 个拖尾细胞的 Olive 尾距和尾长,重复 3 次。

### 1.8 统计分析

所有实验结果最少重复 3 次,细胞活性检测值用均数  $\pm$  标准差( $\bar{X} \pm S$ )表示,用 SPSS 统计分析软件,采用 One-Way ANOVA 进行显著性检验,差异显著性值设定为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 MTT 细胞活性测定结果

MTT 比色法检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为不溶于水的蓝紫色结晶甲臞,用酶联免疫检测仪在 570 nm 波长处测定其吸收值,可间接反应活细胞的数量。在一定细胞数范围内,MTT 结晶形成量与细胞数成正比<sup>[11]</sup>。卷烟烟气提取液对细胞存活率影响如图 1 所示,在 20% 浓度时,DX 组与原烟对照组相比对细胞存活率影响不明显,50% 浓度时 CSE 降低低细胞存活率,而 DX-2 对细胞的存活率影响比原烟对照组较小,加入 CSE 12 h 后,DX 组细胞的存活率为  $85.21\% \pm 2.03\%$ ,原烟组细胞存活率为  $80.01\% \pm 1.9\%$ ,与原烟组比较两者之间有显著性差异( $P = 0.036$ )。

本实验结果表明,50% 浓度的 CSE 使内皮细胞的甲臞形成减少,含量下降,而 DX 烟气使甲臞含量降低的较少,其可能原因是由于卷烟中添加的木犀草素与黄芩苷混合物在卷烟烟气中保护了上皮细胞的线粒体,抑制脂质过氧化,因此对细胞活性损伤具有一定的保护作用。

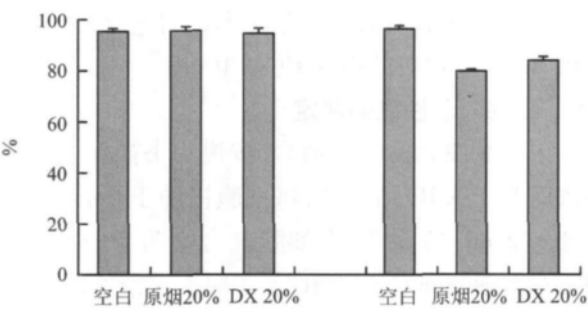


图 1 MTT 法检测经不同 CSE 处理后 A549 的存活率

2.2 CSE 对细胞内 ROS 水平的影响

烟气细胞毒作用机制与细胞氧化损伤有关,在烟气的致氧化损伤作用中,最受关注的成份是自由基。以往研究证明几乎所有化学致癌物都可由酶作用生成自由基,而过量自由基及诱发的连锁反应均可造成生物大分子如 DNA、RNA、蛋白质的损伤,是癌症启动和促进的基础。大量的生物学医学研究实践证明体内过多的活性氧引起的氧化应激是人体多种疾病发生发展的重要因素<sup>[2]</sup>,ROS 检测可以对卷烟烟气的细胞毒性作用机制提供初步探索。

在荧光分光光度计下,荧光强度反映了细胞内活性氧的生成情况。CSE 作用对细胞内 ROS 水平的影响实验结果见表 1,结果表明:空白对照组荧光强度低于其他组,DX 组处理后细胞内活性氧的含量与原烟组相比有明显的降低,两者比较有统计学意义( $P = 0.008$ )。CSE 使上皮细胞 ROS 释放增加,而 DX 组诱导的上皮细胞 ROS 释放量明显低于原烟组,表明添加了木犀草素与黄芩苷的卷烟有促进细胞修复和保护上皮细胞膜的完整性,减轻卷烟烟气危害性的作用。

2.3 CSE 诱导的细胞 DNA 损伤作用测定结果

DNA 是机体生命活动最重要的遗传物质,其分子结构完整性和稳定性的保持对于细胞的存活和正常生理活动的发挥具有重要意义。各种因素诱发细胞

DNA 损伤后会影响 DNA 的高级结构,使其超螺旋松散。这种细胞经过实验中细胞原位裂解(碱裂解)、DNA 解链等过程后,电泳时损伤的 DNA 从核中溢出,朝阳极方向泳动,产生一个尾状带,未损伤的 DNA 部分则保持球形,二者共同形成“彗星”。在一定范围内,“彗星”的长度(代表 DNA 迁移距离)和经荧光染色或银染色后,“彗星”荧光强度或光密度(代表 DNA 的量)与 DNA 损伤程度相关,因此可以定量检测单个细胞中的 DNA 损伤<sup>[3]</sup>。

表 1 CSE 作用下细胞内活性氧含量的影响

| 处理组  | 荧光强度                        |
|------|-----------------------------|
| 空白组  | 0.424 ± 0.007               |
| 原烟组  | 0.736 ± 0.011 <sup>#</sup>  |
| DX 组 | 0.702 ± 0.013 <sup>#*</sup> |

注:与空白组比较<sup>#</sup> $P < 0.01$ ,DX 组与原烟组比较<sup>\*</sup> $P < 0.01$ 。

彗星实验又称单细胞凝胶电泳试验(single cell gel electrophoresis,SCGE),是一种评价遗传性损伤非常灵敏的方法,可以在单细胞水平上检测 DNA 单链和双链损伤,不完全修复位点,碱性不稳定位点和交联等。已被用于检测受试物对哺乳类细胞 DNA 的损伤<sup>[4-5]</sup>。卷烟烟气提取液对细胞刺激后,单细胞凝胶电泳法检测彗星尾长及拖尾细胞百分率。

结果显示,DX 组对人肺泡上皮细胞 A549 的 DNA 损伤结果如表 2 所示,荧光显微镜拍照结果见图 2。结果表明,DX 组在 Tail DNA,尾长、尾距、Olive 尾距 4 个参数与原烟组相比均有明显降低,且有显著性差异( $P < 0.05$ ),说明添加木犀草素与黄芩苷具有降低烟气对细胞 DNA 损伤的作用。

表 2 CSE 对人肺泡上皮细胞 A549 的 DNA 损伤影响结果

| 处理    | DNA 损伤指标                  |                                       |                                       |                                             |
|-------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------|
|       | Tail DNA/%                | 尾长( $\bar{x} \pm s$ ) / $\mu\text{m}$ | 尾距( $\bar{x} \pm s$ ) / $\mu\text{m}$ | Olive 尾距( $\bar{x} \pm s$ ) / $\mu\text{m}$ |
| 空白对照  | 8.49 ± 5.62 <sup>a</sup>  | 6.00 ± 3.26 <sup>a</sup>              | 0.66 ± 0.76 <sup>a</sup>              | 0.94 ± 0.67 <sup>a</sup>                    |
| DX 烟组 | 43.83 ± 6.83 <sup>b</sup> | 22.98 ± 4.79 <sup>b</sup>             | 11.27 ± 3.65 <sup>b</sup>             | 8.05 ± 1.06 <sup>b</sup>                    |
| 原烟组   | 50.11 ± 9.07 <sup>b</sup> | 25.48 ± 4.45 <sup>c</sup>             | 13.06 ± 3.54 <sup>c</sup>             | 9.04 ± 2.10 <sup>c</sup>                    |

注: F 值依次为 238.34,194.85,122.23,245.10;不同字母表示组间有统计学差异, $P < 0.05$ 。

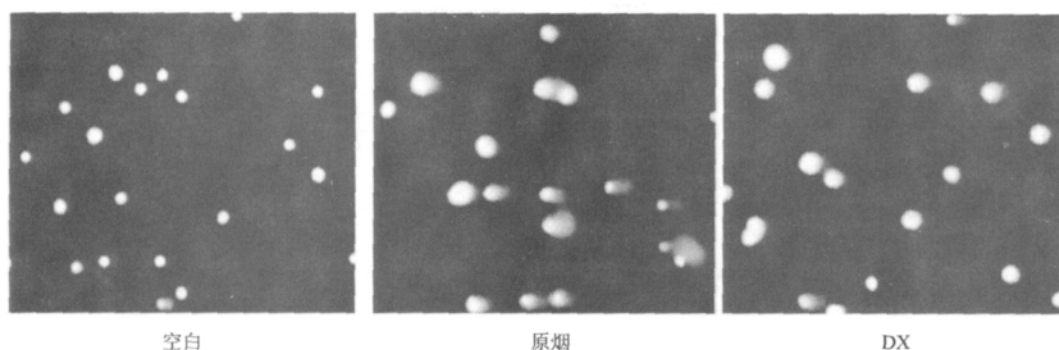


图2 荧光显微镜下 CSE 对 DNA 损伤影响

### 3 结论

本研究采用添加木犀草素与黄芩苷混合物的卷烟(DX)与原烟组卷烟烟气的细胞损伤作用进行了对比研究,结果显示细胞存活率 DX 组细胞的存活率高于原烟组且两者差异性有统计学意义( $P=0.036$ );细胞内 ROS 水平 DX 组明显的降低( $P=0.008$ );彗星试验提示 DX 组在 Tail DNA,尾长、尾距、Olive 尾距 4 个参数与原烟组相比均有明显降低,且有显著性差异( $P<0.05$ )。以上结果提示:在卷烟中添加木犀草素与黄芩苷混合物可以降低卷烟烟气危害性的作用,其机理研究还需要经过进一步研究。

### 参考文献

- [1] 张喜平,田华,程琪辉.黄芩苷的药理作用研究现状[J].中国药理学通报,2003,19(11):1212-1215.
- [2] 谭婷华,刘爱芳.黄芩苷和芸香苷对 OH 的清除作用[J].西安医科大学学报,1997,18(1):41-43.
- [3] Angeliki X, Andreas P, Antonis M, et al. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages[J]. Pharmacol Exp Ther,2001,296(1):181-187.
- [4] 倪健,董竞成.三种中药药效成分抗支气管哮喘变应性炎症的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(4):49-51.
- [5] 王彬,耿连艺,关凤嫦.奚肇庆教授运用小儿肺系膏方临床心得[J].中国中医急症,2009,18(10):1641-1642.
- [6] 罗诚浩,宋旭艳,魏敏,等.黄芩苷、木犀草素混合物镇咳祛痰平喘作用的实验研究[J].世界中西医结合杂志,2012,7(3):212-214.
- [7] 魏敏,王君,宋旭艳,等.卷烟烟气中木犀草素和黄芩苷混合物对呼吸系统作用的研究[J].中国现代应用药学,2011,28(3):197-201.
- [8] 卢斌斌,Ryan M, Lynne W,等.3种不同焦油卷烟烟气的细胞毒性的比较[J].烟草科技,2007(12):38-41.
- [9] 王琴美,兰勤娴,吴嘉彤,等.部分国产烤烟型卷烟烟气冷凝物的中性红细胞毒性试验[J].烟草科技,2007(5):41-43.
- [10] 卢斌斌,Ryan M,周骏,等.不同焦油释放量卷烟烟气的细胞毒性和基因毒性研究[J].中国烟草学报,2010,12(16):66-69.
- [11] 何等旗,唐休发,华成舸,等.两种不同来源成肌细胞存活率的比较研究[J].国际口腔医学杂志,2007(3):153-156.
- [12] 周磊,李扬,苏静,等.维生素 K3 对雄激素非依赖性前列腺癌 PC-3M 细胞的凋亡诱导作用[J].中国病理生理杂志,2007,23(7):1339-1342.
- [13] 林爱军,张旭红,张增利,等.利用不同植物进行 DNA 损伤彗星实验的方法比较[J].生态毒理学报,2006(6):165-171.
- [14] Miranda D D C, Arcari D P, Ladeira M S P, et al. Analysis of DNA damage induced by aflatoxin B1 in dunkin-hartley guinea pigs[J]. Mycopathologia,2007,163:275-280.
- [15] 罗明志,齐浩,陈文芳,等.彗星实验检测紫外线诱导的 K562 细胞 DNA 损伤[J].癌变畸变突变,2007,18(5):400-402.