·实验研究·

马尾松针提取物对镉毒 16HBE 细胞保护作用*

袁琛，练玉银，姜志杰，任亮，周珊珊，雷毅雄

【摘 要】**目的** 研究马尾松松针提取液对氯化镉（$CdCl_2$）致 16HBE 细胞毒性的保护作用。**方法** 用萃取法提取马尾松松针乙醇提取物（PMNE），分别用 1、100 和 500 μg/mL 的 PMNE（低、中、高浓度组）预处理 16HBE 细胞 6 h，随后用 25 μmol/L $CdCl_2$ 毒染至 48 h，同时设阴性对照组（正常培养 16HBE 细胞）及空白对照组（无细胞组），用 CCK8 法检测细胞相对生存率，硫代巴比妥酸（TBA）法检测各组细胞内丙二醛（MDA）含量，qPCR 法检测各组细胞凋亡相关基因 Bcl-2 及 Bax 相对表达量。**结果** 与阴性对照组相比，$CdCl_2$ 单独作用组细胞相对生存率下降（$P < 0.05$），细胞内 MDA 表达量升高（$P < 0.05$）；低、中、高浓度 PMNE 预处理组细胞与 $CdCl_2$ 单独处理组相比，细胞相对生存率均升高（$P < 0.05$），MDA 含量均降低（$P < 0.05$），且浓度越高细胞相对生存率越高（$P < 0.05$），MDA 含量越低（$P < 0.05$）。与 $CdCl_2$ 单独作用组相比，低、中、高浓度 PMNE 预处理组抑凋亡基因 Bcl-2 相对表达量均上调（$P < 0.05$），促凋亡基因 Bax 相对表达量均下调（$P < 0.05$），且浓度越高 Bcl-2 相对表达量越高（$P < 0.05$）。**结论** PMNE 对 $CdCl_2$ 所致的细胞毒性有一定程度的保护作用。

【关键词】马尾松；松针提取液；16HBE 细胞；氯化镉（$CdCl_2$）

中图分类号:R 994.6 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-0580(2018)11-1516-04 **DOI:**10.11847/zgggws1118848

Protective effect of *Pinus massoniana* pine needle extract against cadmium chloride-induced cytotoxicity in 16HBE cells

YUAN Chen, LIAN Yu-yin, JIANG Zhi-jie, et al (*Department of Preventive Medicine*, *School of Public Health*, *Guangzhou Medical University*, *Guangzhou*, *Guangdong Province* 510182, China)

【**Abstract**】 **Objective** To study the protective effect of *Pinus massoniana* pine needle extract (PMNE) on cadmium chloride-induced cytotoxicity in human bronchial epithelial cells (16HBE). **Methods** Ethanol extraction method was used to prepare PMNE. The 16HBE cells of low-, moderate-, and high-dose groups were treated with 1, 100, and 500 μg/mL PMNE for 6 hours; then the 16HBE cells were exposed to 25 μmol/L cadmium chloride ($CdCl_2$) for 48 hours. A negative control group (normally cultured 16 HBE cells) and a blank control group (culture medium only) were also established. Cell Counting Kit-8 (CCK8) method was used to detect relative survival rate of the cells. Thiobarbituric acid (TBA) method was adopted to measure intracellular content of malondialdehyde (MDA). Quantitative PCR (qPCR) was applied to determine relative cellular expressions of apoptosis-related genes of B cell lymphoma 2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein. **Results** Compared with that of negative control cells, the relative survival rate of cells treated with $CdCl_2$ alone was decreased significantly ($P < 0.05$) but the intracellular MDA expression was increased ($P < 0.05$). The relative survival rate of the cells treated with low-, moderate-, and high-dose PMNE were increased but the intracellular MDA of the cells was decreased, both in a significant dose-response manner, in comparison with those of the cells treated with $CdCl_2$ alone significantly ($P < 0.05$ for all). Significantly increased relative expression of anti-apoptotic gene Bcl-2 and decreased relative expression of pro-apoptotic gene Bax, both in a significant dose-response manner, were observed in the cells with low-, moderate-, and high-dose PMNE treatment in contrast to those of the cells treated with $CdCl_2$ alone (all $P < 0.05$). **Conclusion** Ethanol extract of *Pinus massoniana* pine needles has a certain protective effect against chloride-induced cytotoxicity in human bronchial epithelial cells *in vitro*.

【**Key words**】 *Pinus massoniana*; pine needle extract; 16HBE cell; cadmium chloride

镉作为一种被广泛运用于工业生产中的重金属，普遍分布于土壤、水、空气中，因其在体内代谢速度慢，并且对多种器官都能造成不可逆损伤，国际癌症研究机构（International Agency for Research on Cancer, IARC）将其列为 I 类致癌物[1]，体外实验表明，镉暴露能够激活氧化应激反应造成细胞损伤[2]。时下对于镉中毒的保护作用已成为研究热点。马尾松松针是植物马尾松的叶，已有实验证实松针具有抗氧化，抑制肿瘤细胞和清除自由基的功能[3]。但马尾松松针对于重金属镉的保护作用尚未见报道。本研究旨在探讨马尾松松针乙醇提取液（*Pinus massoniana* pine needle ethanol extract, PMNE）的体外抗氧化效果对于氯化镉（cadmium chloride, $CdCl_2$）所导致的 16HBE 细胞毒性的保护作用，为进一步了解 PMNE 对镉毒性作用的的机制研究奠定基础。

* **基金项目:**国家自然科学基金（81573177；81373038）；广州市教育科学“十二五”规划 2015 课题（12101533519）
作者单位:广州医科大学公共卫生学院预防医学系，广东 广州 510182
作者简介:袁琛（1991 – ），女，河南郑州人，硕士在读，研究方向：环境毒理与化学致癌。
通信作者:雷毅雄，E-mail: gz-leizeng@163.com
数字出版日期: 2018 - 06 - 12 11:43
数字出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20180612.1138.002.html

1 材料与方法

1.1 主要原料与试剂　马尾松松针，产自茅山山脉；正常人支气管上皮细胞 16HBE 细胞由广州市呼吸疾病研究所徐军教授馈赠。$CdCl_2$（天津福晨化学试剂厂），胎牛血清，胰蛋白酶（美国 Gibco 公司），分析级无水乙醇，石油醚，乙酸乙酯，正丁醇（广州化学试剂厂），CCK8 试剂盒（日本同仁化学研究所），BCA 蛋白浓度测定试剂盒（碧云天生物技术公司），丙二醛（malondialdehyde，MDA）测定试剂盒（南京建成生物工程研究所），TRIzol 试剂盒（美国 Invitrogen 公司），GoScriptTM Reverse Transcription System（美国 Promega 公司），SYBR Green qPCR Master Mix（美国 Biomega 公司）。

1.2 主要仪器　二氧化碳培养箱（美国 Thermo 公司），电热恒温水浴箱（上海一恒科技有限公司），SHB－3 真空泵（郑州长城工贸有限公司），AK－98 超细中药粉碎机（温岭市奥力中药机械有限公司），分析天平（德国 Sartorious 公司），ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 系统（美国 Thermo 公司），MμLtiskan GO 全波长酶标仪（美国 Thermo 公司），X－22R 离心机（德国 Beckman 公司），UV－3900 紫外分光光度仪（日本 Hitachi 公司），真空冷冻干燥机（北京博医康实验仪器有限公司）。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养　16HBE 细胞在含 10 % 胎牛血清中培养，隔天换液，细胞融合至 80～90 % 时，0.25 % 胰酶消化传代。

1.3.2 PMNE 干粉制备　取一把新鲜松针，洗净，剪去枯叶，叶柄及根部，暗处阴干，用剪刀剪成 1 cm 长小段，用粉碎机将其粉碎制成松针渣，称重。按料液比 1∶37（44 % 乙醇），温度 70.1 ℃，时间 72 min，避光浸提后过滤，得粗提液。粗提液中分别分次加入等体积石油醚，乙酸乙酯，正丁醇各萃取 3 次，回收下层溶液，旋转蒸发仪 70 ℃，60～70 r/min 将有机溶剂蒸出，将所得溶液冷冻成冰，置于真空冻干机中冻干 24 h，得 PMNE 干粉并测定其抗氧化能力。

1.3.3 CCK8 实验　取对数生长期 16HBE 细胞接种于 96 孔板，设 PMNE 预处理组（1、100 和 500 μg/mL）培养 6 h 后，弃去培养液，加入 25 μmol/L $CdCl_2$ 染毒细胞至 48 h，同时设阴性对照（即正常培养细胞）、空白对照（无细胞组）和同浓度的 $CdCl_2$ 单独作用组，每组设置 3 个复孔，分别加药。37 ℃、5 % CO_2 培养 48 h 后加入 10 μL CCK8，避光孵育 2 h，酶标仪（波长 450 nm）测定吸光度（A），计算相对生存率。相对生存率（%）＝[实验组 A 值－空白组 A 值]/[对照组 A 值－空白组 A 值]×100 %。

1.3.4 细胞 MDA 实验　实验组和对照组加药处理至 48 h 收集细胞，提取总蛋白，按照 MDA 试剂盒方法检测并计算各实验组样本 MDA含量。

1.3.5 qPCR 实验（表 1）　实验组和对照组加药处理至 48 h，提取细胞总 RNA，按照 GoScript^{TM} Reverse Transcription System 试剂盒将提取的 mRNA 逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板对 Bax、Bcl-2 基因进行实时荧光定量 PCR 检测，反应体系 20 μL：SYBR Green I qPCR Master Mix10 μL，Forward Primers（10 μmol/L）1 μL，Reverse Primers（10 μmol/L）1 μL，模板 2 μL，ddH_2O 7 μL，反应条件：预变性 95 ℃ 2 min，变性 95 ℃ 15 s，退火 60 ℃ 1 min，循环 40 次。引物序列使用 Primer 5.0 进行引物设计，委托上海生工公司合成，引物序列见表 1。实验结果以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示并分析各基因相对表达量。$\Delta\Delta Ct = (Ct_{Target} - Ct_{GAPDH})_{实验组} - (Ct_{Target} - Ct_{GAPDH})_{对照组}$。

表 1 PCR 引物序列

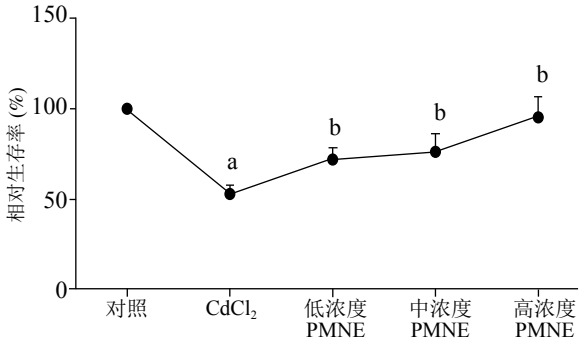
基因名称	上游引物（5′－3′）	下游引物（5′－3′）
GAPDH	ACAGAGCCTCGCCTTTGCCGAT	CTTGCACATGCCGGAGCCGTT
Bcl-2	TCCTGGCTGTCTCTGAAGACT	TGCATATTTGTTTGGGGCAGG
Bax	GACATTGGACTTCCTCCGGG	ACAGGGACATCAGTCGCTTC

1.4 统计分析　实验数据通过 SPSS 16.0 软件分析，各实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，所有实验均重复 3 次，以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准，$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结　果

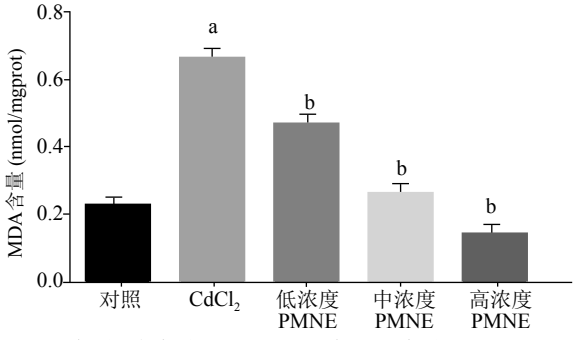
2.1 各实验组 16HBE 细胞相对生存率（图 1）　与对照组相比，$CdCl_2$ 单独作用组 16HBE 细胞生存率明显降低（$P < 0.05$），各 PMNE 组与 $CdCl_2$ 单独作用组相比，16HBE 细胞相对生存率提高（$P < 0.05$），且随着 PMNE 浓度的升高，16HBE 细胞相对生存率提高（$P < 0.05$）。

2.2 各实验组16HBE 细胞内 MDA 表达含量（图 2）　与对照组相比，$CdCl_2$ 单独作用组 16HBE 细胞内 MDA 表达量明显升高（$P < 0.05$），各浓度 PMNE 组与 $CdCl_2$ 单独作用组相比，16HBE 细胞内 MDA 表达量均有降低（$P < 0.05$），且随着 PMNE 浓度升高，16HBE 细胞内 MDA 含量随之降低（$P < 0.05$）。



注：a 与对照组相比，$P < 0.05$；b 与$CdCl_2$相比，$P < 0.05$。

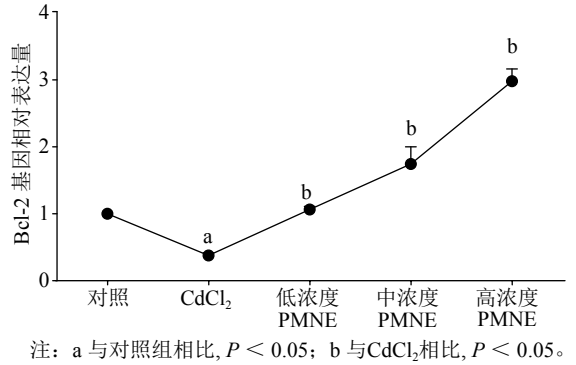
图 1 各实验组细胞相对生存率(%)



注：a 与对照组相比，$P < 0.05$；b 与$CdCl_2$相比，$P < 0.05$。

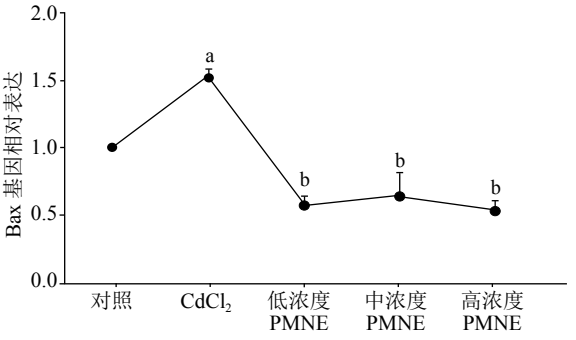
图 2 各实验组 16HBE 细胞内 MDA 含量

2.3 各实验组 16HBE 细胞内 Bcl-2、Bax 基因 mRNA 相对表达量（图 3、4） 与对照组相比，$CdCl_2$ 单独作用组 16HBE 细胞中 Bcl-2 基因相对表达量降低($P < 0.05$)；PMNE 各浓度组与 $CdCl_2$ 单独作用组相比，16HBE 细胞中 Bcl-2 基因相对表达量升高($P < 0.05$)，且随着 PMNE 浓度的升高，16HBE 细胞中 Bcl-2 基因的相对表达量升高($P < 0.05$)。与对照组相比，$CdCl_2$ 单独作用组 16HBE 细胞中 Bax 基因相对表达量升高($P < 0.05$)，PMNE 各浓度组与 $CdCl_2$ 单独作用组相比，16HBE 细胞中 Bax 基因相对表达量降低($P < 0.05$)，但 16HBE 细胞中 Bax 基因相对表达量并未随着预处理 PMNE 浓度的升高而降低($P > 0.05$)。



注：a 与对照组相比，$P < 0.05$；b 与$CdCl_2$相比，$P < 0.05$。

图 3 各实验组 16HBE 细胞 Bcl-2 基因相对表达量



注：a 与对照组相比，$P < 0.05$；b 与$CdCl_2$相比，$P < 0.05$。

图 4 各实验组 16HBE 细胞 Bax 基因相对表达量

3 讨 论

镉及其化合物通过呼吸道或消化道进入人体并蓄积是引起镉中毒的主要原因，又因其排泄缓慢，并可对机体多器官组织造成损伤[4]。马尾松松针作为一种天然植物，有着价格低廉、分布广泛的天然优势，潘炘等[5]对马尾松松针甲醇提取物的研究表明松针提取物有较强的抗氧化能力，不仅因为其含有丰富的黄酮类和酚类化合物，也与其内含其他多种抗氧化物质有关，是一种天然的抗氧化剂。马尾松松针提取物作为一种天然的抗氧化食品添加剂已被杨丽华[6]开发研制成复合功能食品。体外实验也证实松针提取物中某些成分可以抑制肿瘤生长[7－8]。因此将马尾松松针提取物作为一种天然的抗氧化剂用于保护并减轻镉所致 16HBE 细胞毒性作用成为本次研究的重点。

16HBE 细胞活性实验表明，$CdCl_2$ 单独处理组与对照组相比，16HBE 细胞相对存活率降低，提示 $CdCl_2$ 对 16HBE 细胞有一定毒性作用。预先用不同浓度的 PMNE 预处理 16HBE 细胞 6 h 后与 $CdCl_2$ 单独处理的 16HBE 细胞实验组相比，16HBE 细胞的相对生存率有不同程度的升高，提示 PMNE 对 $CdCl_2$ 所致的 16HBE 细胞死亡有一定保护作用。

MDA 作为一种反应脂质过氧化程度的生物指标，其含量的高低反应了细胞组织遭受自由基造成的氧化应激反应所致的氧化损伤程度[9]。实验结果提示 $CdCl_2$ 可能通过氧化损伤作用使细胞内释放过量的 MDA 造成 16HBE 细胞损伤，16HBE 细胞在加入松针提取液预处理之后，MDA 含量降低，提示 PMNE 预处理的 16HBE 细胞所遭受的氧化损伤程度比单纯 $CdCl_2$ 作用的 16HBE 细胞低，即 PMNE 的抗氧化作用可以保护 16HBE 细胞产生抗氧化应激反应，在一定程度上保护 16HBE 细胞因氧化应激造成的细胞损伤。

Bcl-2 和 Bax 基因作为由 Bcl-2 家族中的一对作用相反的凋亡调控基因，前者可以抑制凋亡的发生，而后者则有促进凋亡的作用[10]，通过研究二者

的表达水平，可以从侧面反映出外源化学物对细胞生命进程的作用，从而得知外源化学物对细胞损伤的严重程度。本次实验表明，16HBE 细胞通过预处理不同浓度的 PMNE 可以抑制由 $CdCl_2$ 所造成的细胞凋亡过程的发生，提示 PMNE 可以通过调控凋亡基因的表达从而抑制细胞死亡，也进一步证明通过预处理 PMNE 可以减轻细胞所遭受的 $CdCl_2$ 所导致的 16HBE 细胞毒性。

以上实验表明，马尾松松针的抗氧化作用不仅可以用于制作抗氧化保健食品，体外实验中也表现出了很好的抗氧化、抑制细胞凋亡的作用。因此，本实验为进一步研究 PMNE 的体外抗氧化机制奠定了坚实的基础。

参考文献

[1] Andujar P, Bensefa-Colas L, Descatha A. Acute and chronic cadmium poisoning[J]. Rev Med Interne, 2010, 31(2): 107 – 115.

[2] Jin Y, Liu L, Zhang S, et al. Cadmium exposure to murine macrophages decreases their inflammatory responses and increases their oxidative stress[J]. Chemosphere, 2016, 144: 168 – 175.

[3] 张超, 刘卉, 徐媛媛, 等. 马尾松松针提取物清除自由基作用的研究[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(9): 1946 – 1948.

[4] 刘莉莉, 林岚, 殷霄, 等. 镉毒性研究进展[J]. 中国职业医学, 2012, 39(5): 445 – 447.

[5] 潘炘, 刘亚群, 陈顺伟, 等. 马尾松松针提取物抗氧化能力研究[J]. 浙江林业科技, 2009, 29(1): 44 – 46.

[6] 杨丽华. 马尾松松针抗氧化活性研究及其抗氧化功能饮料研制[D]. 广州：广州医科大学, 2011.

[7] 杨杰波, 李明, 谢菁菁, 等. 松针提取物 α – 蒎烯对肝癌 HepG2 细胞 miR-221 及其下游靶基因表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(21): 3996 – 3999.

[8] 郑晓珂, 周微, 王小兰. 松针不同提取部位体外抗肿瘤作用的实验研究[J]. 现代预防医学, 2009, 36(9): 1749 – 1754.

[9] Tsikas D, Rothmann S, Schneider JY, et al. Development, validation and biomedical applications of stable-isotope dilution GC-MS and GC-MS/MS techniques for circulating malondialdehyde (MDA) after pentafluorobenzyl bromide derivatization: MDA as a biomarker of oxidative stress and its relation to 15(S)-8-iso-prostaglandin F2α and nitric oxide (NO)[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016, 1019: 95 – 111.

[10] Chen D, Zheng X, Kang D, et al. Apoptosis and expression of the Bcl-2 family of proteins and P53 in human pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Med Princ Pract, 2012, 21(1): 68 – 73.

收稿日期：2018 - 05 - 02　（吴少慧编校）

《中国公共卫生》杂志文章“论著”界定说明

本刊从 2012 年起对栏目设置进行调整，不再单独安排"论著"栏目，根据本刊对国内外有关学术期刊栏目设置、论文体裁（题材）规范、国家出版发行规定的检索查阅及作者咨询要求，现对“论著”的界定作一解释。论著是相对于短篇报道、述评、综述、讲座等而言的一种文体类型。目前国内尚无统一的届定标准和方法。本刊论著是指科研论文中，符合国际通用的温哥华论文格式，全文由中英文摘要、前言、对象（材料）与方法、结果、讨论及参考文献 6 部分组成。中英文摘要为结构式摘要，包括目的，方法、结果、结论四要素。凡符合上述条件的论文，本刊皆界定为论著，特此说明。