

茵陈有效成分对四氯化碳损伤的原代培养大鼠肝细胞的作用

熊玉兰, 周钟鸣, 王彦礼, 伍迎红, 孙建辉, 朱亚英
(中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 目的: 研究茵陈有效成分对四氯化碳损伤的原代培养肝细胞活力及 ALT 含量的影响。方法: 采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法测定肝细胞活力, 赖氏法测定培养液中丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 含量。结果: 茵陈有效成分 II、IV、V、VI 都能使四氯化碳损伤的肝细胞活力明显提高; 培养液中 ALT 含量显著降低。结论: 茵陈有效成分 II、IV、V、VI 对四氯化碳损伤的原代培养大鼠肝细胞都有保护作用。

关键词: 茵陈有效成分; 肝细胞活力; ALT 含量

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)02-0032-03

Effects of Active Components of *Herba Artemisiae Capillaris* on Rat primary Culture Hepatocytes Injured by CCl_4

XIONG Yu-lan, ZHOU Zhong-ming, WANG Yan-li, WU Yin-ghong, SUN Jian-hui, ZHU Ya-ying
(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing 100700, China)

Abstract: It was studied on the active components of Herbal Antimissile Capillaries on the primary culture rat hepatocytes injured by CCl_4 and the effects on contents of ALT. MTT colorimetric determination was applied to examine the activity of hepatocytes, and by another method, the content of ALT on the culture liquid was determined. The results showed active component II, IV, V, VI of the herb could obviously increase the activity of hepatocytes injured by CCl_4 and decrease the ALT content in culture liquid.

Key words: Active components of *Herba Artemisiae Capillaris*; Activity of hepatocytes; ALT content

茵陈为菊科植物滨蒿 (*Artemisia scoparia* Waldest. et Kit.) 或茵陈蒿 (*Artemisia capillaris* Thunb.) 的干燥地上部份, 具有利胆、保肝等作用^[1]。本文以四氯化碳 (CCl_4) 体外损伤的原代培养大鼠肝细胞模型, 采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法等, 对茵陈中分离的四种化学成分进行保肝试验, 验证了茵陈保肝作用的有效成分。

1 实验材料

动物 Wistar 大鼠, ♂ 体重 200~250g, 中国医学科学院实验动物中心提供。

药品与试剂 茵陈有效成分 II、IV、V、VI 均由本所化学室提供, 为乳白色或淡黄色结晶粉末, 以二甲基亚砜 (DMSO) 配制; 联苯双酯购于中国医学科学院药物所, 以 DMSO 配制; 胶原酶 IV MTT 为 Sigma 公

司产品; RPMI-1640 培养基、小牛血清为 GIBCO 公司产品; 96 孔细胞培养板为丹麦 Nunc 公司产品; ALT 试剂盒 (赖氏法) 为北京北化精细化学品责任有限公司临床诊断试剂分厂产品; 其它试剂均为市售分析纯。

仪器 Bio-Rad 450 型酶标仪 (美国); UV-754 分光光度计 (上海第三分析仪器厂); YAMATO IP-31 CO_2 培养箱 (日本)。

2 方法与结果

2.1 茵陈有效成分对 CCl_4 损伤的原代培养大鼠肝细胞培养液中 ALT 活性的影响 参照文献方法^[2], 大鼠于轻度乙醚麻醉下剖腹, 门静脉插管, 剪断下腔静脉, 先后灌入含 HEPES 的 D-Hank's 及 0.03% 胶原酶 D-Hank's 液各 100ml, 摘出肝脏, 分散肝细胞, 加入 D-Hank's 液, $500\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1min, 洗涤细胞 3 次, 经 0.3% 胎盼兰染色显示细胞活力大于 85%, 以含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液调细胞浓

收稿日期: 2001-06-18

基金项目: 九五国家重点攻关项目 (96-903-02-02)

度为 $5 \times 10^8 \cdot \text{L}^{-1}$, 接种于 96 孔培养板, 每孔 100ul, 5 孔为一组, 分组如下: (1) 正常对照组; (2) 二甲基亚砷(DMSO) 溶剂对照组; (3) CCl_4 肝损伤对照组; (4)、(5)、(6) 阳性药联苯双酯小、中、大三剂量组; (7)、(8)、(9) 茵陈 II 小、中、大三剂量组; (10)、(11)、(12) 茵陈 IV 小、中、大三剂量组; (13)、(14)、(15) 茵陈 V 小、中、大三剂量组; (16)、(17)、(18) 茵陈 VI 小、中、大三剂量组。阳性对照药各组及茵陈有效成分各组加入相应的药液(均用 DMSO 配制), DMSO 对照组加入等量的 DMSO, 正常对照组、肝损伤组加入等量培养液, 使各孔终体积均为 200ul。摇匀后置 37°C 5% CO_2 培养箱中培养 24h 后, 除正常对照组及 DMSO 对照组外, 每孔加入 CCl_4 $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (终浓度), 密封继续培养 2h 后 $1000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5min, 每孔取 100ul 培养液, 用赖氏法试剂盒测定 ALT 含量, 结果见表 1。

表 1 茵陈有效成分对 CCl_4 损伤的原代培养

大鼠肝细胞 ALT 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	ALT (U/dl)	%
CCl_4 对照	—	59.73 ± 8.40	100.0
联苯双酯	0.001	$39.81 \pm 8.94^{***}$	66.6
	0.01	$37.74 \pm 11.6^{***}$	63.2
	0.1	$32.31 \pm 6.99^{***}$	54.1
茵陈 II	0.001	$34.14 \pm 7.38^{***}$	57.2
	0.01	$43.44 \pm 10.2^*$	72.7
	0.1	$45.75 \pm 5.73^*$	76.6
茵陈 IV	0.001	$33.60 \pm 5.91^{***}$	56.3
	0.01	$37.50 \pm 3.48^{***}$	62.8
	0.1	$39.57 \pm 9.15^{**}$	66.2
茵陈 V	0.001	50.43 ± 4.89	84.4
	0.01	$33.87 \pm 18.5^*$	56.7
	0.1	$30.24 \pm 10.7^{***}$	50.6
茵陈 VI	0.001	$41.88 \pm 13.4^*$	70.1
	0.01	$46.53 \pm 6.51^*$	77.9
	0.1	$43.95 \pm 5.46^{**}$	73.6
正常对照	—	$35.67 \pm 4.56^{***}$	
DMSO 对照	—	$31.53 \pm 15.4^{**}$	

注: 与 CCl_4 对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 以下同。

结果表明, 茵陈有效成分 II、IV、V、VI 体外给药均能显著抑制 CCl_4 损伤的肝细胞培养液中 ALT 活性(分别 $P < 0.05$ $P < 0.01$ $P < 0.001$), 阳性药联苯双酯降酶作用也非常显著($P < 0.001$)。

2.2 茵陈有效成分对 CCl_4 损伤的原代培养大鼠肝细胞活性的影响 将上述加药培养了 24h 并经 $20\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CCl_4 损伤 2h 的培养板中剩余的培养液吸干, 每孔加入 $1\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的 MTT 50ul, 继续培养 4h 后 $3000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5min, 弃去上清, 每孔加入 DMSO

150ul, 振摇 10min 后在酶标仪 570nm 波长比色, 结果见表 2。

结果表明, 茵陈有效成分 II、IV、V、VI 均能明显提高 CCl_4 损伤的肝细胞活力, 与模型对照组比较, 均有显著性差异(分别 $P < 0.05$ $P < 0.01$ $P < 0.001$)。阳性对照药联苯双酯提高 CCl_4 损伤的肝细胞活力的作用也非常显著($P < 0.001$)。

表 2 茵陈有效成分对 CCl_4 损伤的原代培养

大鼠肝细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	N	剂量 ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	OD ($\bar{x} \pm sD$)
CCl_4 对照	7	—	0.473 ± 0.016
联苯双酯	5	0.001	$0.525 \pm 0.015^{***}$
	5	0.01	$0.515 \pm 0.007^{***}$
	5	0.1	$0.501 \pm 0.022^*$
茵陈 II	5	0.001	0.477 ± 0.020
	5	0.01	0.492 ± 0.014
	5	0.1	$0.514 \pm 0.015^{**}$
茵陈 IV	5	0.001	$0.494 \pm 0.012^*$
	5	0.01	$0.507 \pm 0.013^{**}$
	5	0.1	$0.519 \pm 0.005^{***}$
茵陈 V	5	0.001	$0.503 \pm 0.023^*$
	5	0.01	$0.527 \pm 0.021^{***}$
	5	0.1	$0.641 \pm 0.023^{***}$
茵陈 VI	5	0.001	$0.502 \pm 0.016^*$
	5	0.01	$0.510 \pm 0.023^*$
	5	0.1	$0.519 \pm 0.019^{**}$
正常对照	5	—	$0.533 \pm 0.014^{***}$
DMSO 对照	6	—	$0.548 \pm 0.007^{***}$

3 讨论

原代培养大鼠肝细胞已用于多方面的研究, 一般认为其灵敏度高、参差性小、再现性好^[3]。我们采用 CCl_4 损伤的原代培养大鼠肝细胞模型, 用 MTT 比色法测定肝细胞活力、赖氏法测定培养液中 ALT 含量, 对茵陈有效成分进行保肝作用研究。

肝毒物质 CCl_4 可使肝细胞膜结构发生过氧化作用而被破坏, 从而导致肝细胞损伤, 使肝细胞活力降低、ALT 的漏出增加。本研究观察到, 加入 CCl_4 损伤的对照组肝细胞活性明显低于正常对照组($P < 0.001$)。培养液中 ALT 含量明显高于正常对照组($P < 0.001$), 而加了茵陈有效成分 II、IV、V、VI 的给药组均能明显对抗 CCl_4 的损伤, 使肝细胞活性提高、培养液中 ALT 含量下降, 提示茵陈有效成分 II、IV、V、VI 均有保肝作用, 这与文献报导的茵陈有效成分抑制肝细胞凋亡是一致的^[4]。

本研究中, 各给药组量效关系不太明显, 可能由于茵陈有效成分 II、IV、V、VI 及阳性药联苯双酯均

为水不溶物质,虽然用 DMSO 助溶,但其含量不能过高,否则影响肝细胞培养,因此各有效成分的溶解度受到影响。经鉴定,茵陈有效成分 II 为 3'-甲氧基黄酮、IV 为黄酮素、V 为茵陈黄酮、VI 为结晶 12。

致谢:本研究中茵陈有效成分 II、IV、V、VI 及其鉴定均由本所化学室张启伟研究员提供。

参考文献:

[1] 黄泰康.常用中药成分与药理手册[M].中国医药科技出版社,1994,1380.

- [2] 刘平,刘乃明.丹参酸乙对四氯化碳体外损伤原代培养大鼠肝细胞的直接保护作用[J].中国中药杂志,1997,22(5):303.
- [3] 陆敏,方瑞英.在肝毒物质损伤的原代培养大鼠肝细胞中观察清毒汤的护肝作用[J].中西医结合杂志 1991,增刊(11):236.
- [4] Tamanoyo M, Fukuda K, Miura N, et al. The herbal medicine Inchirko-To inhibits liver cell apoptosis induced by transforming growth factor- β_1 [J]. Journal of Traditional Japanese Medicine 1995, 12(4):322-323.