

· 毒理 ·

# 基于肝细胞立体培养体系的雷公藤内酯醇肝毒性研究

柳璋璞, 周玲玲\*, 冯哲, 刘天阳, 周学平

(南京中医药大学, 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京 210029)

**[摘要]** **目的:**建立使用微载体进行 LO2 肝细胞系高密度培养的方法,探讨雷公藤内酯醇的肝毒性作用及机制。**方法:**在限制贴壁的条件下,以 Cytodex-3 为材料进行 LO2 肝细胞的三维立体培养,在光镜下观察其生长情况,探究雷公藤内酯醇对肝细胞增殖能力的影响,并对细胞上清液的丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)以及裂解细胞样品的谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等指标进行检测。**结果:**雷公藤内酯醇 100 g·L<sup>-1</sup>组可明显抑制肝细胞的增殖,降低肝细胞活性,使细胞 ALT,AST,LDH 的活性升高,MDA 含量升高,SOD 和 GSH-Px 活性降低。**结论:**雷公藤内酯醇对肝细胞具有明显的损伤作用且随剂量增加具有一定的剂量依赖性,作用机制与其所致细胞脂质过氧化有关。

**[关键词]** 雷公藤;肝毒性;微载体黏附培养法

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)13-0248-04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120504.1209.015.html>

**[网络出版时间]** 2012-05-04 12:09

## Study on Mechanism of Hepatotoxicity of Triptolide Based on Hepatocyte's Microcarrier Culture

LIU Zhang-pu, ZHOU Ling-ling\*, FENG Zhe, LIU Tian-yang, ZHOU Xue-ping

(Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Provincial Key Laboratory of Pharmacology  
and Safety Evaluation of Material Medica, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore a method for high density cultivation of LO2 hepatocytes using microcarrier, and study the hepatotoxicity and its mechanism of triptolide's major toxic components. **Method:** With the condition of the cells restricted to attach dish, three-dimensional cultivating of LO2 hepatocytes was carried out by Cytodex-3. The cell growth was observed on the light microscope and the effect of triptolide on liver cell proliferation was detected. Concentrations of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactic dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in the supernatant were examined. Content of glutathione peroxidase (GSH-Px) was also examined in the cell lysate. **Result:** The proliferation of hepatocytes was considerably inhibited and the activity of hepatocytes was decreased by triptolide (100 μg·mL<sup>-1</sup>). On the other hand, the activity of ALT, AST, LDH was increased by triptolide (100 μg·mL<sup>-1</sup>). The content of MDA was increased, and the activities of SOD and GSH-Px were decreased by triptolide (100 μg·mL<sup>-1</sup>). **Conclusion:** The triptolide could do harm to hepatocytes, which may be caused by the lipid peroxidation of hepatocytes.

**[Key words]** *Tripteryginum wilfordii*; hepatotoxicity; microcarrier culture

**[收稿日期]** 20111115(018)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81072749);教育部博士点基金项目(20103237110004);江苏省中药药效与安全性评价重点实验室开放课题(T09004);江苏省普通高校研究生科研创新计划

**[第一作者]** 柳璋璞,硕士生, Tel:13605143193, E-mail:liuzhangpu@163.com

**[通讯作者]** \*周玲玲, Tel:13002521299, E-mail:llzhou74@163.com

中药致肝毒性损伤已成为令人关注和亟待解决的热点问题。据报道,药物性肝损伤占药物不良反应的10%~15%<sup>[1]</sup>,中药致肝毒性损伤可占全部药物性肝损伤的30%。雷公藤作为我国传统医学中常用的一味中药,因其活血化瘀、清热解毒、消肿散结、杀虫止血等功效,被广泛应用于类风湿性关节炎、肾小球疾病、皮肤病及其他疾病的治疗<sup>[2-4]</sup>。其有效成分雷公藤内酯醇具有免疫调节、抑制细胞增殖、抗炎、抗生育、及抗肿瘤等生物活性<sup>[5]</sup>。伴随其疗效发挥的过程,一些毒副反应也显现出来,如肝毒性、肾毒性、生殖系统毒性等<sup>[6]</sup>,其所致肝脏毒性在相关文献报道中居单味肝损伤中药的首位<sup>[7-8]</sup>,但其具体的肝毒性机制尚不完全清楚。因此,本课题在建立肝细胞微载体黏附立体培养体系的基础上,观察了雷公藤内酯醇对肝细胞的损伤作用及机制。

## 1 材料

**1.1 药品** 雷公藤内酯醇购自南京泽朗医药科技有限公司,纯度99%,批号ZL201005010BY,配制方法:用二甲基亚砜(DMSO)溶解为 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

**1.2 LO2人工肝细胞株** 由南京中医药大学中药药理毒理实验室馈赠。

**1.3 试剂** cytodex-3微载体为GE Healthcare公司产品,聚羟乙基异丁烯酸(Poly-HEMA)为Sigma公司产品,DMEM, PBS,双抗,胰蛋白酶均为Gibco公司产品,胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料有限公司,四甲基偶氮唑盐(MTT)为Imvirogen公司产品,丙氨酸转氨酶(ALT)试剂盒、天冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、过氧化物歧化酶(SOD)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,总谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒购自碧云天生物技术研究。

**1.4 仪器** MCO-20AIC型 $\text{CO}_2$ 细胞培养箱(SANYO公司),CKX31SF型倒置显微镜(Olympus公司),SHE-88型往复式水浴恒温振荡器(太仓市试验设备厂),TGL-16M型高速台式冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司),MDF-382E(N)型超低温冰箱(SANYO公司),Synergy HT型酶标仪(美国Biolek公司产品)。

## 2 方法

### 2.1 细胞的培养<sup>[9]</sup>

**2.1.1 Cytodex-3的水化处理** 取1g Cytodex-3置于洁净玻璃容器中,加入50 mL不含 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 的

PBS,室温放置3 h以上进行水化处理,用新鲜PBS清洗后高压灭菌备用。

**2.1.2 细胞培养瓶的处理** 2.5% Poly-HEMA乙醇溶液按 $0.1\text{ mL}\cdot\text{cm}^{-2}$ 被覆培养瓶,于超净台中吹干备用。

**2.1.3 LO2人工肝细胞的微载体培养** 将接种收集的LO2细胞悬液加入Poly-HEMA处理过的细胞培养瓶中,同时将微载体按 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 加入细胞悬液中,每瓶加DMEM(10%胎牛血清pH 7.0)5 mL,每隔15 min用水浴恒温振荡器振荡5 min,3 h后改为每0.5 h振荡5 min,振荡至浮游单细胞数目减少,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养,第2天开始视培养液颜色决定是否换液及换液量(换液间隔为20~30 h)。

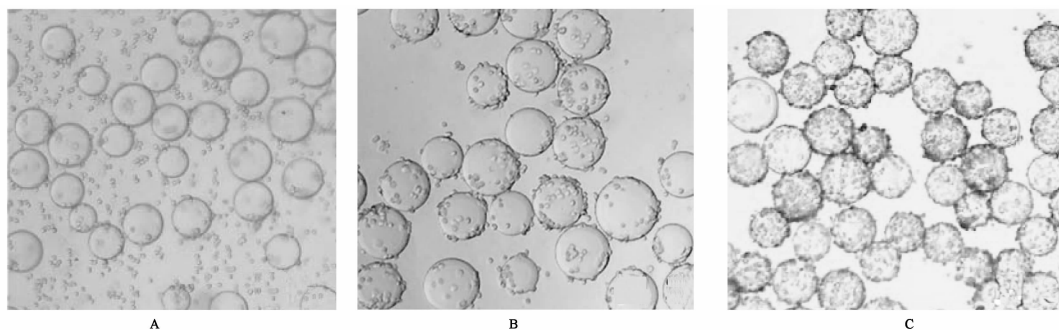
**2.2 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测雷公藤内酯醇抑制细胞增殖作用** 将生长状态良好的细胞用1640单培调成细胞悬液接种于96孔板,每孔190  $\mu\text{L}$ ,共设5组,每组3孔,将雷公藤内酯醇以100,50,25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 分别加入细胞悬液中,空白对照组加入10  $\mu\text{L}$ 微载体,溶剂对照组加入10  $\mu\text{L}$  DMSO。混匀,置孵箱培养12 h后加入MTT( $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )20  $\mu\text{L}$ ,继续培养3 h,吸弃培养液,每孔加入200  $\mu\text{L}$  DMSO,振荡10 min,待完全溶解后,于490 nm波长在酶标仪上测定各孔吸光度(A)。

**2.3 相关指标的测定** 将生长状态良好的细胞用1640调成细胞悬液接种于6孔板,每孔2 mL,共设5组,每组4孔,将雷公藤内酯醇100,50,25  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 分别加入细胞悬液中,空白对照组加入等量微载体,溶剂对照组加入等量DMSO,混匀,置孵箱培养24 h后,分别收集各孔细胞培养上清液和细胞裂解样本。肝细胞培养上清液测定ALT,AST,LDH,SOD,MDA;裂解细胞样品测定GSH-Px。

**2.4 统计学方法** 采用Office Excel 2003软件进行数据统计。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用 $t$ 检验。 $P<0.05$ 有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 光镜下细胞形态观察** 倒置显微镜观察LO2人肝细胞三维培养的细胞形态:如图1所示,刚加入微载体时,细胞和微载体均悬浮于培养液中;图2为加入微载体3 h后,可观察到大部分细胞附着于微载体上并开始铺展;图3为培养至第5天时,大部分微载体均包满细胞,并且微载体之间通过肝细胞连成片悬浮与培养液中;第7天开始有部分细胞开始脱落。



A. 微载体初加入细胞悬液中; B. 振荡 3 h 后, 细胞大部分附着于微载体上; C. 培养 5 d 时, 微载体上包满细胞并连成片

图 1 倒置显微镜观察 LO2 人肝细胞三维培养的细胞形态

**3.2 对肝细胞活性的影响** 与空白对照组比较, 雷公藤内酯醇 100, 50, 25 mg·L<sup>-1</sup> 组的 A 差异有显著性意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 另外雷公藤内酯醇 50, 100 mg·L<sup>-1</sup> 组肝细胞上清液的 ALT 和 AST 活性也明显升高 ( $P < 0.05$ )。以上结果均表明, 雷公藤内酯醇明显抑制肝细胞活性, 且随剂量的增加抑制作用呈上升趋势。见表 1。

**3.3 雷公藤内酯醇对脂质过氧化相关指标的影响** 雷公藤内酯醇 100, 50, 25 mg·L<sup>-1</sup> 组均导致肝细胞培养上清液中 MDA 含量升高, SOD 活性降低, 肝细胞内 GSH-Px 的活性降低, 与空白对照组比较具有显著性差异 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 表明雷公藤内酯醇引起的肝毒性很可能与诱导脂质过氧化有关。见表 2。

表 1 雷公藤内酯醇对肝细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/mg·L <sup>-1</sup>	A	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>	LDH/U·L <sup>-1</sup>
空白对照	-	2.62 ± 0.06	7.03 ± 0.56	5.37 ± 2.51	1212.12 ± 165.36
溶剂对照	-	2.70 ± 0.47	6.79 ± 1.29	4.15 ± 3.64	1171.72 ± 370.86
雷公藤内酯醇	100	1.07 ± 0.09 <sup>2)</sup>	12.61 ± 2.86 <sup>1)</sup>	12.91 ± 3.91 <sup>1)</sup>	1575.76 ± 232.98 <sup>1)</sup>
	50	1.52 ± 0.17 <sup>2)</sup>	10.77 ± 2.20 <sup>1)</sup>	9.87 ± 3.71 <sup>1)</sup>	1447.81 ± 254.20
	25	2.07 ± 0.22 <sup>2)</sup>	9.61 ± 2.36	8.32 ± 1.78	1333.33 ± 212.84

注: 与空白对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 同)。

表 2 雷公藤内酯醇对肝细胞培养上清液 SOD 活性、MDA 含量及肝细胞内 GSH-Px 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	剂量/mg·L <sup>-1</sup>	SOD/U·mL <sup>-1</sup>	MDA/μmol·L <sup>-1</sup>	GSH-Px/U·L <sup>-1</sup>
空白对照	-	23.21 ± 1.07	1.43 ± 0.41	14.87 ± 6.32
溶剂对照	-	22.89 ± 1.32	1.55 ± 1.21	14.59 ± 4.88
雷公藤内酯醇	100	11.33 ± 0.98 <sup>2)</sup>	3.42 ± 1.07 <sup>2)</sup>	7.07 ± 2.46 <sup>1)</sup>
	50	14.87 ± 1.31 <sup>2)</sup>	2.56 ± 1.13 <sup>1)</sup>	8.40 ± 1.81 <sup>1)</sup>
	25	18.89 ± 1.27 <sup>2)</sup>	1.71 ± 0.87 <sup>1)</sup>	9.20 ± 3.85

#### 4 讨论

雷公藤是已知确有肝毒性的中药之一, 其引起肝损害的临床表现类似于急性病毒性肝炎, 有乏力、恶心、呕吐、尿黄等症状, 肝脏肿大、有压痛、血清转氨酶升高、胆汁淤积明显, 临床报道的主要死因是肝功能损害, 同时合并有粒细胞减少<sup>[10]</sup>。作为雷公藤主要有效成分之一的雷公藤内酯醇也是引起不良反应的主要成分。本实验选用 LO2 人工肝细胞作为宿主细胞, 该细胞为正常肝细胞, 又具有永生化的特

性, 为研究的正常进行提供保证。

微载体培养作为目前细胞学研究的主要技术之一, 在肝细胞扩增上取得了一定的成就<sup>[11]</sup>。微载体的悬浮状态为肝细胞的黏附、生长和分泌提供较好环境, 使细胞在培养体系中充分进行物质交换, 在生长过程中保持良好的形态和较高的代谢活性<sup>[12-14]</sup>。本课题采用微载体三维立体培养技术培养肝细胞, 形态观察结果显示: 采用微载体培养的细胞由于贴覆于微载体生长, 在立体的生长环境中能够得到充

分的伸展空间,并且微载体之间形成肝细胞聚集体,细胞彼此接触,保证了肝细胞功能的表达。此外,鉴于微载体高度的面积/体积比,在应用较少的微载体和培养液条件下即可进行细胞的大量繁殖,这种培养的高密度性为更好地研究雷公藤的肝毒性提供了条件。

在建立肝细胞立体培养体系的基础上,课题观察了雷公藤内酯醇对其活性的影响。结果显示:雷公藤内酯醇可以明显抑制微载体培养的肝细胞的增殖;雷公藤内酯醇作用后肝细胞培养上清液中 ALT, AST, LDH 活性明显增高,且随药物剂量的增加,细胞上清液中 ALT, AST, LDH 活性升高越明显。以上结果说明,雷公藤内酯醇对肝细胞具有损伤作用,且呈现出一定的剂量-效应关系。

目前普遍认为,药物对肝细胞的直接毒性作用主要为药物在肝内经代谢转化为亲电子基、自由基及氧基,这些产物与大分子物质共价结合,使细胞结构和功能破坏,自由基和氧基引起膜脂质的过氧化损伤、蛋白质损伤和功能障碍、核酸氧化损伤,最终引起细胞死亡或癌变<sup>[15]</sup>。本文实验结果显示,雷公藤内酯醇作用的细胞 SOD, GSH-Px 活性和正常细胞相比明显降低,说明机体清除氧自由基的能力减弱,而 MDA 水平的明显升高则表明机体细胞受自由基攻击程度严重,三者结果共同提示雷公藤内酯醇引起的肝毒性很可能与诱导脂质过氧化从而引起细胞损伤有关<sup>[16-17]</sup>。

雷公藤是具有肝毒性的代表性中药之一,肝细胞立体培养技术的发展为我们的研究提供了良好的物质基础,本课题初步的研究结果表明其对立体培养的肝细胞具有明显损伤,且其肝损伤作用与诱导脂质过氧化损伤有关。今后拟进一步在立体培养体系培养原代肝细胞的基础上深入研究雷公藤的肝毒性机制,为其肝毒性的防治和临床合理用药提供依据。

#### [参考文献]

[1] 王心如. 毒理学基础[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社,2003:283.  
[2] 郭艳红,谭昱. 雷公藤的毒性及其研究概况[J]. 中药材,2007,30(1):112.

[3] 倪龙,戴静,穆芳英,等. 正相 HPLC 法测定雷公藤药材及其制剂中雷公藤酯甲的含量[J]. 中国药品标准,2007,8(3):32.  
[4] 郭燕芬. 雷公藤在类风湿性关节炎治疗中的应用进展[J]. 中医药通报,2010,9(4):63.  
[5] 刘为萍,刘素香,唐慧珠,等. 雷公藤研究新进展[J]. 中草药,2010,41(7):1215.  
[6] 周岩. 具有生殖毒性中药毒性成分的研究现状[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(8):97.  
[7] 陈一凡,蔡皓东. 中药引起肝损害的调查分析[J]. 药物不良反应杂志,1999(1):27.  
[8] 李尧尧,张志杰,王祝举,等. 近 60 年中药毒副作用及不良反应文献分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(15):213.  
[9] 王英杰. 生物人工肝[M]. 北京:人民卫生出版社. 2002:232.  
[10] 王秀娟,许利平,王敏. 常用中药及复方制剂的肝毒性[J]. 首都医科大学学报,2007,28(2):220.  
[11] 陈杰,彭承宏,沈柏用,等. 肝细胞体外培养技术的研究与进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(53):10539.  
[12] Yeonhee Kim, Padmavathy Rajagopalan. 3D hepatic cultures simultaneously maintain primary hepatocyte and liver sinusoidal endothelial cell phenotypes [J]. Plos ONE,2010,5(11):1.  
[13] Xu Q, Yu D, Qiu Y, et al. Function of a new internal bioartificial liver: an *in vitro* study [J]. Ann Clini Lab Sci,2003,33(3):306.  
[14] Wu C, Pan J, Bao Z, et al. Fabrication and characterization of chitosan microcarrier for hepatocyte culture [J]. J Mater Sci Mater Med, 2007, 18(11):2211.  
[15] 王君明,崔瑛,王峥涛,等. 超氧化物歧化酶参与肝损伤的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):265.  
[16] 杨雪,杨骥,高永翔,等. 雷公藤毒副作用肝损伤及机制初探[J]. 中华实用中西医杂志,2006,19(23):2832.  
[17] 柴智,周文静,高丽,等. 雷公藤肝毒性及其作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):243.

[责任编辑 聂淑琴]