

黄芩素对 4 种肝损伤物质造成肝细胞毒性的拮抗作用

蒋萍¹, 杨阳¹, 季莉莉^{1, 2 *}, 王峥涛^{1, 2}

(1. 上海中医药大学中药研究所中药标准化教育部重点实验室, 中药新资源与质量标准综合评价国家中医药管理局重点研究室, 上海 201210; 2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201210)

[摘要] **目的:**观察黄芩素对 4 种肝毒性物质诱导的人正常肝细胞株 L-02 细胞损伤的拮抗作用。**方法:**培养的 L-02 细胞分别给予 10 mmol·L⁻¹对乙酰氨基酚(AP), 50 μmol·L⁻¹山岗囊吾碱(clivorine, CLI), 2 μmol·L⁻¹川楝素(toosendanin, TSN)和 100 mmol·L⁻¹乙醇(EtOH)诱导肝细胞毒性。黄芩素 1, 10, 25, 50, 100 μmol·L⁻¹分别与细胞预孵 15 min 后, 加入肝毒性物质, 48 h 后 MTT 法检测细胞存活率。**结果:**与对照组相比, 4 种肝毒性物质均能显著降低肝细胞存活率($P < 0.001$)。经不同浓度黄芩素处理后, 各浓度黄芩素均能显著提高 AP, TSN, EtOH 肝细胞损伤模型组的细胞存活率($P < 0.01$, $P < 0.001$); 10, 25, 50, 100 μmol·L⁻¹黄芩素能显著提高 CLI 肝细胞损伤模型组的细胞存活率($P < 0.05$, $P < 0.001$)。**结论:**黄芩素具有拮抗对乙酰氨基酚、山岗囊吾碱、川楝素和乙醇这些肝毒性物质诱导的肝细胞毒性的作用, 且具有一定的浓度依赖性。

[关键词] 黄芩素; 肝毒性; 肝细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0145-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20120113.1030.003 **[网络出版时间]** 2012-01-13 10:30

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120113.1030.003.html>

Protection of Baicalein against Four Hepatotoxins-induced Cytotoxicity

JIANG Ping¹, YANG Yang¹, JI Li-li^{1, 2 *}, WANG Zheng-tao^{1, 2}

(1. The MOE Key Laboratory for Standardization of Chinese Medicines and the SATCM Key Laboratory for New Resources and Quality Evaluation of Chinese Medicines, Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 201210, China;
2. Shanghai R&D Center for Standardization of TCM, Shanghai 201210, China)

[Abstract] **Objective:** The present study is designed to observe the protective effects of baicalein against hepatotoxins-induced cytotoxicity on the human normal liver L-02 cells. **Method:** L-02 cells were seeded and pretreated with or without baicalein (1, 10, 25, 50, 100 μmol·L⁻¹) for 15 min, and then cells were further treated with or without various hepatotoxins, including acetaminophen (AP, 10 mmol·L⁻¹), clivorine (CLI, 50 μmol·L⁻¹), toosendanin (TSN, 2 μmol·L⁻¹) and ethanol (EtOH, 100 μmol·L⁻¹) for 48 h. The survival cells were determined by MTT assay. **Result:** Four hepatotoxins could significantly reduce the cell viability ($P < 0.001$) compared with the control group. After treatments, baicalein could increase the cell viability which was decreased by AP, TSN and EtOH ($P < 0.01$, $P < 0.001$). Moreover, baicalein could significantly increase the cell viability which was decreased by CLI ($P < 0.05$, $P < 0.001$). **Conclusion:** Baicalein can prevent the cytotoxicity induced by those hepatotoxins in human normal liver L-02 cells.

[Key words] baicalein; hepatotoxicity; hepatocyte

[收稿日期] 20110907(004)

[基金项目] 上海市科技启明星计划(跟踪)(10QH1402200);国家自然科学基金项目(青年基金 30801544)

[第一作者] 蒋萍, 在读硕士研究生, 主要从事中药毒理、药理研究, Tel: 021-51322517, E-mail: pingjiang0301@163.com

[通讯作者] * 季莉莉, 博士, 研究员, 硕士生导师, 从事中药药理与毒理研究, Tel: 021-51322517, E-mail: lily0913@yahoo.cn

肝脏是人体中最大的腺体,在清除外源物的生物解毒过程中起着重要的作用,因而易受多种有害因素攻击^[1-2]。对乙酰氨基酚(acetaminophen, AP)是维 C 银翘片等多种临床常用药物的主要成分^[3],目前该药是导致美国和欧洲药物引起的急性肝功能衰竭(ALF)的首要原因^[4]。山岗橐吾碱(clivorine, CLI)大量存在于中草药鹿蹄橐吾(*Ligularia hodgsonii*)中^[5],属于吡咯里西啶生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PAs),而 PAs 是一类广泛分布于 6 000 多种高等植物中的肝毒性天然植物毒素。川楝素(toosendanin, TSN)是中药川楝子的主要有效成分,同时也是其毒性成分,可引发急性中毒性肝炎,显著升高血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)活力^[6]。由这些化学药和中草药所引发的药物性肝损伤已经引起了全世界的关注。肝脏也是酒精代谢的主要脏器,过量饮酒会造成肝细胞不同程度的损害^[7]。

黄芩素是黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 所含的主要黄酮之一,具有抗菌、抗病毒、抗炎、保肝、利胆、抗癌等作用^[8],还能抗氧化、抗自由基损伤^[9],具有较好的临床应用价值。本文建立 AP, CLI, TSN 和 EtOH 诱导的 4 种体外肝细胞毒性模型,研究黄芩素对上述 4 种肝毒性物质诱导的 L-02 细胞毒性作用的影响并分析其浓度依赖性。

1 材料

1.1 细胞株 人正常肝细胞株 L-02(中国科学院细胞库)。

1.2 药物 山岗橐吾碱分离自菊科橐吾属植物鹿蹄橐吾 *Ligularia hodgsonii*, 川楝素提取自楝科植物川楝 *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果实,黄芩素由上海中药标准化中心提供。所有化合物结构主要经核磁共振氢谱(¹H-NMR)和核磁共振碳谱(¹³C-NMR)鉴定,纯度 98% 以上。

1.3 试剂 对乙酰氨基酚、溴化-3(4,5-二甲基噻唑-2)2,5-二甲苯基四氮唑(MTT)(美国 Sigma 公司);无水乙醇(上海国药集团有限公司);胎牛血清(FBS)、RPMI 1640 培养液(美国 Invitrogen 公司)。

1.4 仪器 CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo 公司),生物安全柜(美国 Labconoc 公司),BioTek Power Wave XS 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司),离心机(德国 Eppendorf 公司),倒置显微镜(重庆奥特公司),96 孔板(德国 Greiner 公司)。

2 方法

2.1 药物配制 山岗橐吾碱、川楝素和黄芩素用二

甲基亚砜(DMSO)溶解,对乙酰氨基酚用磷酸缓冲液(PBS)溶解,配成 0.1 mol·L⁻¹的母液,用一次性灭菌滤器(0.22 μm)过滤灭菌,存 -20 ℃ 备用;无水乙醇用 RPMI 1640 培养液配成 4 mol·L⁻¹母液,密封保存于 4 ℃ 备用。加药时用 RPMI 1640 培养液稀释至所需浓度,使 DMSO 终浓度不超过 0.1%。

2.2 细胞培养及分组 将人正常肝 L-02 细胞接种于含 10% 灭活胎牛血清、100 U 青霉素和 100 mg·L⁻¹链霉素的 RPMI 1640 培养液中,在 37 ℃,5% CO₂ 的培养箱中培养,取对数生长期的细胞用于实验。采用 4 个肝细胞毒性模型(10 mmol·L⁻¹ AP,50 μmol·L⁻¹ CLI,2 μmol·L⁻¹ TSN,100 mmol·L⁻¹ EtOH)实验,每个模型实验分为 7 组:空白对照组、模型组、黄芩素 5 个浓度组(1, 10, 25, 50, 100 μmol·L⁻¹黄芩素)。

2.3 MTT 法检测细胞活性 将对数生长期的细胞按一定密度铺入 96 孔板,待细胞贴壁 12 h 后给药。不同浓度黄芩素(1, 10, 25, 50, 100 μmol·L⁻¹)与细胞作用 15 min 后加入肝毒性物质(终浓度分别为 10 mmol·L⁻¹ AP,50 μmol·L⁻¹ CLI,2 μmol·L⁻¹ TSN,100 mmol·L⁻¹ EtOH。各处理组 pH 未见明显的变化。),共同孵育 48 h 后加入 MTT,使其终浓度为 0.5 g·L⁻¹;置培养箱孵育 4 h,加三联剂(10% SDS-5% 异丁醇-0.01 mol·L⁻¹ HCl),继续培养 12 h 以上^[10]。然后使用酶标仪在 570 nm 和 630 nm 处读取吸光度(A)。将空白组作为对照,给药组与空白组的百分比定为细胞存活率,按下述公式计算:

$$\text{细胞存活率} = (\text{给药组 } A_{570 \text{ nm}} - \text{给药组 } A_{630 \text{ nm}}) / (\text{对照组 } A_{570 \text{ nm}} - \text{对照组 } A_{630 \text{ nm}}) \times 100\%$$

2.4 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件,以单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

与对照组相比,4 种肝毒性物质均能显著降低肝细胞存活率($P < 0.001$)。经不同浓度(1, 10, 25, 50, 100 μmol·L⁻¹)黄芩素预处理 15 min 后,各浓度黄芩素均能显著提高 AP, TSN, EtOH 肝细胞损伤模型组的细胞存活率($P < 0.01$, $P < 0.001$);10, 25, 50, 100 μmol·L⁻¹黄芩素能显著提高 CLI 肝细胞损伤模型组的细胞存活率($P < 0.05$, $P < 0.001$)。并且,随着黄芩素浓度的增大,其对肝毒性物质抑制 L-02 细胞生长的拮抗作用越来越明显,其细胞存活率越来越高,呈一定的剂量依赖性。正常对照组结果为 100%。见表 1。

表1 不同浓度黄芩素分别对 AP, CLI, TSN, EtOH 所致肝细胞 L-02 损伤的拮抗作用($\bar{x} \pm s, n = 10$)

黄芩素 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%			
	AP 10 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$	CLI 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	TSN 2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	EtOH 100 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$
0	29.38 \pm 1.74 ¹⁾	40.78 \pm 2.35 ¹⁾	72.22 \pm 11.95 ¹⁾	38.02 \pm 5.58 ¹⁾
1	32.45 \pm 0.89 ³⁾	44.47 \pm 3.01	89.83 \pm 9.03 ³⁾	72.36 \pm 9.49 ⁴⁾
10	35.04 \pm 1.16 ⁴⁾	46.02 \pm 3.23 ²⁾	93.18 \pm 7.67 ⁴⁾	93.34 \pm 5.79 ⁴⁾
25	40.05 \pm 0.75 ⁴⁾	50.88 \pm 3.68 ⁴⁾	94.77 \pm 9.48 ⁴⁾	98.14 \pm 7.62 ⁴⁾
50	46.27 \pm 1.44 ⁴⁾	55.43 \pm 3.86 ⁴⁾	94.78 \pm 8.51 ⁴⁾	107.50 \pm 5.06 ⁴⁾
100	58.44 \pm 3.29 ⁴⁾	52.87 \pm 2.72 ⁴⁾	98.18 \pm 10.41 ⁴⁾	105.42 \pm 3.65 ⁴⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.001$;与模型组(无黄芩素处理组)比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$,⁴⁾ $P < 0.001$ 。

4 讨论

本研究所采用的4种肝毒性模型诱导剂,在临床肝损伤病例中较为常见。根据WHO统计,一定时期内AP引发的肝损伤达300余例^[11]。目前的研究提示AP的肝毒性主要由其毒性代谢产物乙酰苯醌亚胺(NAPQI)引起线粒体功能障碍、氧化应激、酪氨酸硝基化及脂质过氧化所致^[12]。传统观念认为植物药相对毒性较小,但目前临床研究发现植物药也存在显著的肝毒性^[13]。本实验所采用的CLI和TSN广泛分布于多种中草药中。CLI是一种大量存在于中药鹿蹄橐吾的肝毒性吡咯里西啶生物碱,可引起肝细胞出血性坏死、肝巨红细胞症及静脉闭塞症等。TSN主要存在于川楝的果实和树皮,在各版《中国药典》川楝子项目下均明确指出其有小毒。有研究表明川楝子能造成大鼠肝组织中超氧化物歧化酶^[14]和谷胱甘肽过氧化物酶活力显著下降,其肝毒性机制可能与自由基造成的肝细胞损伤有关^[15]。酒精代谢主要依靠肝脏,过量饮酒会造成肝细胞不同程度的损害。乙醇能造成小鼠肝损伤模型^[16],加重氧化应激程度,诱导细胞凋亡^[7]。

中药黄芩具有清热燥湿、泻火解毒等功效,其主要有效成分多为黄酮类化合物,有黄芩素、黄芩苷、汉黄芩素和汉黄芩苷等。黄芩素是中药黄芩中主要黄酮之一^[17],具有抗菌、抗炎、抗氧化和保肝利胆等作用^[8-9];它对肝星状细胞增殖作用的强烈抑制,提示其具有开发成抗肝纤维化药物的可能性^[18]。黄芩素对于黄嘌呤氧化酶表现出很强的抑制作用,提示黄芩素在治疗肝炎方面有一定的临床意义^[19]。在小鼠急性肝功能衰竭模型中,黄芩素能通过调控多个途径来抑制肝细胞凋亡,可作为临床治疗急性肝细胞凋亡或损失的候选药物^[20]。

本实验研究发现,黄芩素对化学药和中草药如AP、CLI和TSN所引起肝细胞的毒性有不同程度的

保护作用,另外对常见的酒精性肝损伤模型也有一定的拮抗作用,笔者的研究对将黄芩素进一步开发为临床保肝药物具有一定的实验参考价值。黄芩素抗氧化、抗凋亡作用可能是其保肝活性的关键,其机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Bak M, Kicińska-Krogulska M, Czerniak P, et al. Toxic liver injuries—a current view on pathogenesis. Part II [J]. Med Pr, 2011, 62(2):203.
- [2] 韩玉梅, 鄢丹, 胥秀英, 等. 肝脏疾病动物模型的分类与应用 [J]. 中药材, 2010, 33(4):644.
- [3] 于得才, 李红英. 维C银翘片制备工艺研究探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(3):240.
- [4] Canbay A, Jochum C, Bechmann L P, et al. Acute liver failure in a metropolitan area in Germany: a retrospective study (2002-2008) [J]. Z Gastroenterol, 2009, 47(9):807.
- [5] Ji L L, Zhao X G, Chen L, et al. Pyrrolizidine alkaloid clivorine inhibits human normal liver L-02 cells growth and activates p38 mitogen-activated protein kinase in L-02 cells [J]. Toxicon, 2002, 40(12):1685.
- [6] 齐双岩, 金若敏, 周志兰, 等. 川楝子对大鼠肝毒性的时效和量效关系研究 [J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4):301.
- [7] Hoek J B, Pastorino J G. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury [J]. Alcohol, 2002, 27(1):63.
- [8] 宋扬文, 陈忻. 中药黄芩药理作用的研究进展 [J]. 中国中医药科技, 2010, 17(4):375.
- [9] 姚亚红, 张立伟. 黄芩素清除自由基作用研究 [J]. 陕西师范大学学报:自然科学版, 2007, 35(S2):89.
- [10] Hansen M B, Nielsen S E, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill [J]. J Immunol Methods, 1989, 119(2):203.

榼藤子生品和炮制品总皂苷体内抗肿瘤作用

邓悟红¹, 肖二², 熊慧², 莫莎莎², 梅之南^{2*}

(1. 武汉市黄陂区中医医院, 武汉 430300; 2. 中南民族大学药学院, 武汉 430074)

[摘要] 目的: 考察榼藤子生品和炮制品总皂苷体内抗肿瘤作用。方法: 荷瘤小鼠随机分为 8 组, 接种后第 2 天给药, 连续 10 d, 模型对照组 ig 以等量生理盐水, 阳性对照组腹腔注射顺铂 3 mg·kg⁻¹, 低、中、高剂量榼藤子生品、炮制品总皂苷组分别 ig 0.25, 0.5, 1 g·kg⁻¹ 剂量。观察榼藤子总皂苷的肿瘤抑制作用; 计算抑瘤率、胸腺指数、脾指数、肝脏指数; 测定血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平。结果: 榼藤子生品高、中、低剂量组的抑瘤率分别为 58.86%, 49.52%, 43.45%, 榼藤子炮制品高、中、低剂量组的抑瘤率分别为 59.41%, 48.81%, 44.59%, 榼藤子生品及炮制品总皂苷还能提升荷瘤小鼠血清 SOD 的活力, 降低 MDA 水平。结论: 榼藤子生品和炮制品总皂苷具有抗小鼠肿瘤作用, 并可增强抗氧化能力。

[关键词] 榼藤子; 总皂苷; 抗肿瘤; 炮制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0148-03

Experimental Study on Anti-tumor Effect of the Total Saponins from the Crude and Processed Products of *Entada phaseoloides*

DENG Wu-hong¹, XIAO Er², XIONG Hui², MO Sha-sha², MEI Zhi-nan^{2*}

(1. Wuhan Huangpi District Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuhan 430300, China;
2. College of Pharmacy, South-central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-tumor action of total saponins from the crude and processed

[收稿日期] 20110825(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073150); 国家科技支撑计划项目(2007BA148B08)

[第一作者] 邓悟红, 主管药师, Tel: 027-85939863, E-mail: 113330031@qq.com

[通讯作者] * 梅之南, 博士, 教授, 从事民族药物基础研究, Tel: 027-67843713, E-mail: meizhinan@163.com

- [11] Bjornsson E, Olsson R. Suspected drug-induced liver fatalities reported to the WHO database [J]. Dig Liver Dis, 2006, 38(1):33.
- [12] Manyike P T, Kharasch E D, Kalhorn T F, et al. Contribution of CYP2E1 and CYP3A to acetaminophen reactive metabolite formation [J]. Clin Pharmacol Ther, 2000, 67(3):275.
- [13] 王君明, 崔瑛, 申玲玲, 等. 中药致药源性肝损伤的氧化应激机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(5):247.
- [14] 王君明, 崔瑛, 王峰涛, 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.
- [15] 齐双岩, 金若敏, 刘红杰, 等. 川楝子致大鼠肝毒性机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(16):2405.
- [16] 韦健全, 罗莹, 薛强, 等. 梅花钻对乙醇引起小鼠肝损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):167.
- [17] 徐丹洋, 陈佩东, 张丽, 等. 黄芩的化学成分研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1):78.
- [18] Inoue T, Jackson E K. Strong antiproliferative effects of baicalein incultured rat hepatic stellate cells [J]. Eur J Pharmacol, 1999, 378(1):129.
- [19] Shieh D E, Liu L T, Lin C C. Antioxidant and free radical scavenging effects of baicalein, baicalin and wogonin [J]. Anticancer Res, 2000, 20(5A):2861.
- [20] Wu Y L, Lian L H, Wan Y, et al. Baicalein inhibits nuclear factor- κ B and apoptosis via c-FLIP and MAPK in D-GalN/LPS induced acute liver failure in murine models [J]. Chem Bio Interact, 2010, 188(3):526.

[责任编辑 聂淑琴]