

肝复康滴丸对四氯化碳损伤大鼠 原代肝细胞的保护作用

王和平¹, 管媛媛², 佟雷², 王建明^{2*}

(1. 浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100; 2. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的: 研究肝复康滴丸含药大鼠血清对 CCl₄ 损伤原代肝细胞的保护作用。方法: 采用酶消化法分离大鼠肝实质细胞进行体外培养并建立 CCl₄ 肝损伤模型, 以 AST 和 ALT 为指标, 并采用 MTT 法对细胞活性和增殖进行检测, 观察肝复康滴丸含药血清对肝损伤原代细胞的保护作用。结果: 肝复康滴丸含药血清可使肝损伤大鼠原代细胞的增殖率明显提高, AST 和 ALT 的含量明显降低。结论: 肝复康滴丸具有很好的肝细胞保护作用。

[关键词] 肝复康滴丸; 肝损伤模型; 原代肝细胞; 谷草转氨酶; 谷丙转氨酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2009)03-0060-02

在我国肝炎为常见病多发病, 目前尚无令人满意的治疗药物。肝复康滴丸是在临床有效制剂肝复康胶囊剂的基础上改剂型而成^[1-3], 其主要组成为黄芩苷粗品、五味子、茵陈、柴胡、甘草与猪胆粉(比例为 0.8:3:3:4:3:0.5), 经提取纯化后以 PEG₄₀₀₀ 与 PEG₆₀₀₀ 为基质滴制而成(丸重 100 mg, 每丸含黄芩以黄芩苷计不少于 5.2 mg, 5 粒/次, 3 次/d)。本实验采用酶消化法分离大鼠肝实质细胞, 进行体外培养, 并建立四氯化碳(CCl₄) 体外诱导肝细胞损伤的模型, 选择 CCl₄ 最适损伤浓度, 以谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT) 肝细胞的增殖为指标, 研究肝复康滴丸含药血清对 CCl₄ 损伤大鼠原代肝细胞的保护作用。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠, 雌雄不限, 体重(150~200)g, 在室温(20±2)℃环境下分笼饲养。实验前适应环境饲养 1 周。

1.2 药物与试剂 肝复康滴丸(课题组研制, 批号: 070612); AST、ALT 试剂盒(南京建成生物制品有限公司); 四氯化碳(上海试剂三厂生产); 二甲基亚砜(DMSO) MTT、DMEM 培养基、双抗(北京欣经生物有限公司); 胎牛血清(杭州四季青生物制品有限公

司); PBS 缓冲液、胰蛋白酶(武汉博士德生物工程有限公司)。

1.3 仪器 756 型紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司); 80-2 型离心机(柯大创新股份有限公司中佳分公司); Shellab CO₂ 培养箱(上海跃进医疗器械厂); EL-301 型酶联免疫检测仪(美国 Anthos 公司)。

2 方法与结果

2.1 大鼠肝细胞的分离和培养^[4] 无菌条件下取出实验大鼠肝脏, 移至平皿内, 去肝包膜, 以生理盐水漂洗后剪成细组织块, 移入 0.25% 胰蛋白酶(用 PBS 缓冲液配置)中, 4℃冷消化(10~12)h 后, 以 200 目筛网研磨, 用 PBS 缓冲液吹打成为单个细胞悬液。置 25 mL 离心管中, 离心 1 000 r·min⁻¹, 5 min, 弃上清液, 反复离心 3 次。经 0.4% 台盼蓝拒染法测得细胞活力大于 90%。再以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液悬浮细胞, 调整细胞密度为 1×10⁸L⁻¹, 将肝细胞悬液分别加入 24 孔(每孔 1 mL)和 96 孔(每孔 0.2 mL)培养板中, 置于 37℃的 CO₂ 培养箱中培养 12 h 后, 肝细胞全部贴壁生长, 供实验用。

2.2 肝细胞损伤模型的建立 肝细胞培养 12 h 后, 吸弃上清, 更换培养液并加入不同浓度的 CCl₄(4, 6, 8, 10, 12, 14 mmol·L⁻¹), 以少量的二甲基亚砜助溶, 二甲基亚砜终浓度为 0.1%(v/v), 作用 6 h 后, 收集 24 孔板中培养上清检测 AST, ALT 活性; 同步测定 96 孔板中培养的肝细胞的 MTT 反应。根据检测结果

[收稿日期] 2008-06-23

[基金项目] 宁波市自然科学基金项目(2006A610045)

[通讯作者] * 王建明, Tel: (0451) 82196262; E-mail: wangjianming@hljucm.net

选择最适损伤浓度制备肝细胞的损伤模型,同时设溶媒对照组,每组设 3 个复孔。不同浓度 CCl₄ (4, 6, 8, 10, 12, 14 mmol·L⁻¹) 与原代肝细胞作用 6 h, 检测各项指标。表 1 结果显示,随 CCl₄ 浓度的增高,反映肝细胞增殖的 MTT 反应明显抑制,培养上清中 AST、ALT 值逐渐升高,但 12, 14 mmol·L⁻¹ 两组与 10 mmol·L⁻¹ 组指标值无明显差异,因此我们选择 10 mmol·L⁻¹ CCl₄ 为最适损伤浓度。

实验结果数据以($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料组间比较采用 *t* 检验。两变量间相互关系,采用直线相关和回归分析。

表 1 不同浓度 CCl₄ 对原代培养大鼠肝细胞增殖和 ALT、AST 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	浓度 (mmol·L ⁻¹)	MTT (490 nm, A)	ALT (U·L ⁻¹)	AST (U·L ⁻¹)
正常组	—	0.27 ± 0.03	31.57 ± 3.17	62.28 ± 18.69
CCl ₄ 组	4	0.26 ± 0.03	44.21 ± 4.33	89.45 ± 20.04
	6	0.25 ± 0.04	44.21 ± 4.33 ¹⁾	98.32 ± 21.374 ¹⁾
	8	0.26 ± 0.05	63.76 ± 8.17 ¹⁾	98.45 ± 20.98 ¹⁾
	10	0.21 ± 0.04	76.59 ± 14.25 ²⁾	104.62 ± 25.46 ²⁾
	12	0.21 ± 0.03	75.89 ± 16.87 ²⁾	105.27 ± 28.52 ²⁾
	14	0.21 ± 0.04	78.32 ± 18.46 ²⁾	104.96 ± 24.71 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01。

2.3 肝复康滴丸含药血清对四氯化碳损伤大鼠原代肝细胞的保护作用

2.3.1 含药血清制备^[5] Wistar 大鼠 20 只,随机分为 2 组,每组 10 只,即正常对照组、肝复康滴丸组。各中药组分别给予中药(剂量相当于人临床有效剂量的 10 倍,即肝复康滴丸 150 粒) ig, 1 次/d, 连续 7 d。正常对照组给予等体积蒸馏水。于末次给药 1 h 后,乙醚麻醉,无菌条件下腹主动脉采血,置无菌试管内。待凝固后 37 °C 水浴 1 h, 3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 分离血清, - 20 °C 冰箱冻存备用。临用时, 56 °C 30 min 灭活,加无血清培养基分别配制成为 5%、10%、20% 的含药血清溶液,过滤除菌。

2.3.2 细胞分组及处理^[6] 调细胞浓度为 1 × 10⁸ L⁻¹。细胞分别加入 24 孔(每孔 1 mL)和 96 孔(每孔 0.2 mL)培养板中,置于 37 °C 的 CO₂ 培养箱中贴壁培养 24 h。随机分为 6 组,每列为 1 组,依次为:正常组、模型组、空白血清组、5% 含药血清组、10% 含药血清组、20% 含药血清组,各组分别加入含药血清培养液,同时各孔加入 CCl₄ (少量 DMSO 助溶), CCl₄ 终浓度为 10 mmol·L⁻¹。置于 37 °C 的 CO₂ 培养箱中,培养 24 h。收集 24 孔板中培养上清检测 AST、ALT 活性;同步测定 96 孔板中培养肝细胞的 MTT 反应。

2.3.3 肝复康滴丸含药血清对肝细胞增殖及 AST 和 ALT 有明显的影响,结果见表 2。

表 2 肝复康滴丸含药血清对 CCl₄ 诱导的肝细胞增殖及 AST、ALT 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	血清浓度(%)	MTT (490 nm, A)	ALT (U·L ⁻¹)	AST (U·L ⁻¹)
正常组	—	0.27 ± 0.03	31.57 ± 3.17	62.28 ± 18.69
模型组	—	0.21 ± 0.05	75.61 ± 13.58	104.83 ± 22.15
空白血清组	—	0.22 ± 0.04	75.21 ± 14.19	102.54 ± 26.74
肝复康含药血清组	5	0.22 ± 0.03	60.42 ± 9.67	90.19 ± 23.71 ¹⁾
	10	0.24 ± 0.044	9.86 ± 8.33 ²⁾	83.87 ± 21.55 ²⁾
	20	0.25 ± 0.024	3.13 ± 8.52 ²⁾	78.23 ± 25.34 ²⁾

注:与模型组相比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01。

表 2 显示:肝复康滴丸 5% 的含药血清组 AST 含量显著降低(*P* < 0.05);肝复康滴丸 10%、20% 的含药血清 AST、ALT 含量均极显著降低(*P* < 0.01)。

3 讨论

本模型选择培养上清中 ALT 和 AST、肝细胞增殖作为评价肝细胞损伤的指标。

肝毒物质 CCl₄ 10 mmol·L⁻¹ 与原代培养大鼠肝实质细胞接触后,肝实质细胞急剧受损,逸出于培养液中的 AST、ALT 等酶活性显著升高。采用 MTT 法对细胞活性和增殖进行检测,研究肝复康滴丸不同浓度含药血清对抗肝损伤的作用。结果发现,肝复康滴丸含药血清能够增强 CCl₄ 肝损伤模型肝细胞的增殖能力,同时能显著降低其 AST、ALT 活性。对中药复方进行血清药理学研究具有优势,是值得推广的方法^[7]。

[参考文献]

- [1] 王和平,管媛媛,王建明,等.肝复康滴丸剂制剂的工艺学研究[J].中成药,2007,29(10):1443-1445.
- [2] 王和平,佟雷,徐美术,等.肝复康胶囊对抗小鼠免疫性肝损伤的实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2006,12(11):52.
- [3] 董培良,王和平,王建明.肝复康滴丸对大鼠利胆作用的实验研究[J].中国药师,2007,10(9):848-849.
- [4] 罗丹,刘华钢.原代肝细胞的分离培养及其在药物研发中的应用[J].广西科学,2006,13(4):334-337,341.
- [5] 张良,徐立,袁冬萍,等.中药血清药理学方法研究进展[J].南京中医药大学学报,2002,18(4):254-255.
- [6] 周明眉,杨奎,姜远平,等.中药血清药理学等方法学研究-含药血清低温保存和血清灭活的影响[J].中药药理与临床,1999,15(2):44-46.
- [7] 王建明,王和平,徐美术,等.中药制剂的工艺学研究及新技术的应用[M].长春:吉林科学技术出版社,2004:260-261.