

## 生半夏不同部位体外抑制 HepG2 细胞增殖和对转氨酶释放影响的研究

周 信<sup>1,2</sup>, 张小荣<sup>2</sup>, 张秋燕<sup>1</sup>, 崔翰明<sup>1\*</sup>

1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 1000531

2. 西南交通大学 生命科学与工程学院, 四川 成都 610031

**摘要:** 目的 研究生半夏对 HepG2 细胞增殖和转氨酶释放量的影响。方法 分别用石油醚、醋酸乙酯、95%乙醇、纯水提取生半夏, 将提取物作用于 HepG2 细胞, 设置对照组、5-氟尿嘧啶 (100 mg/L) 组和半夏提取物组 (剂量分别为 0.1、1、10、20 mg/L)。24 h 后, MTT 法测定生半夏对 HepG2 细胞增殖的影响; 48 h 后, 测定培养上清中谷丙转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 的水平。结果 与对照组相比, 生半夏各组分在剂量不高于 10 mg/L 时毒性很小, 20 mg/L 对细胞增殖有较强抑制作用, 并显著性提高 ALT 释放量。不同组分的细胞毒性强弱趋势为石油醚 > 醋酸乙酯 > 95%乙醇 > 纯水。结论 生半夏对 HepG2 细胞有一定细胞毒性, 表现为抑制细胞增殖和损伤细胞膜, 其作用强度与剂量、提取溶剂有关。

**关键词:** 生半夏; HepG2 细胞; 细胞增殖; 转氨酶释放

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)01-0032-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.01.007

## Inhibition on HepG2 cell proliferation *in vitro* and effect on transaminase release of different parts from *Pinelliae Rhizoma*

ZHOU Xin<sup>1,2</sup>, ZHANG Xiao-rong<sup>2</sup>, ZHANG Qiu-yan<sup>1</sup>, CUI Han-ming<sup>1</sup>

1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China

2. School of Life Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China

**Abstract: Objective** To study the effect of *Pinelliae Rhizoma* on the cell proliferation and transaminase release of HepG2 cells. **Methods** Ligroin, acetidin, 95% ethanol, and water were used to extract the components from *Pinelliae Rhizoma*, and the extracts were added to HepG2 cells. Six groups such as normal (without drugs), control (5-fluorouracil, 100 mg/L), and *Pinelliae Rhizoma* extracts (0.1, 1, 10, and 20 mg/L) groups were set up. After 24 h, cell multiplication was determined by MTT assay. After 48 h, glutamicpyruvic transaminase (ALT) and aminotransferase (AST) in supernatant of culture medium were tested by kits. **Results** Compared with the control group, the toxicity of *Pinelliae Rhizoma* was weak when the dosages were no higher than 10 mg/L. When the dosage came to 20 mg/L, the toxicity was strong, and the release of ALT was enhanced significantly. The precedence ordering of toxicity of different extracts was ligroin > acetidin > 95% ethanol > water. **Conclusion** There are toxicity of *Pinelliae Rhizoma* on HepG2, and it is reflected by the inhibition of cell proliferation and cell membrane injury. The intensity is related with the processing methods and extracting solvent.

**Key words:** *Pinelliae Rhizoma*; HepG2 cells; cell multiplication; transaminase release

半夏为天南星科植物三叶半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎, 具有燥湿化痰、降逆止呕、消痞散结的功效, 用于湿痰寒痰、咳喘痰多、呕吐反胃、胸脘痞闷<sup>[1]</sup>。半夏为有毒中药, 具有一定的肝毒性, 其水提液可使小鼠血清丙氨酸氨基转

氨酶 (ALT)、天门冬氨酸转氨酶 (AST) 水平升高, 并对肝组织造成损害<sup>[2]</sup>。其毒性物质及作用机制尚不明确, 需进一步的试验研究。HepG2 细胞来源于人肝癌组织, 与正常肝细胞在细胞增殖动力学上具有同源性<sup>[3]</sup>, 具有大量肝脏代谢酶, 可模拟体内环

收稿日期: 2013-10-09

基金项目: 国家重大新药创制专项 (2011ZX09102-011-08)

作者简介: 周 信 (1989—), 女, 四川成都人, 硕士, 毕业于西南交通大学, 于中国中医科学院广安门医院做硕士课题, 研究方向为化合物活性筛选及化合物分离纯化。Tel: (010)88001470 E-mail: 394005024@qq.com

\*通信作者 崔翰明, 硕士, 副研究员, 从事中药药效物质和现代中药研究。Tel: (010)88001470

境<sup>[4-5]</sup>, 是用于体外急性毒性试验的经典细胞, 可利用药物对其抑制作研究细胞毒性。ALT、AST 两种酶是 HepG2 细胞接触毒物的效应标志酶<sup>[6]</sup>。为评价肝毒性的灵敏指标, 本实验采用半夏不同组分干预 HepG2 细胞后, 检测 ALT、AST 的变化, MTT 法检测细胞活性, 比较半夏不同组分在不同剂量下对细胞增殖及转氨酶释放量的影响, 研究其肝毒性, 为确定其毒性成分提供参考。

## 1 材料

### 1.1 药材

生半夏(产地为四川, 批号 110707), 经中国科学院崔翰明副研究员鉴定为天南星科植物三叶半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎。

### 1.2 细胞系

HepG2 细胞株购自北京协和医学院细胞库, 实验中所用细胞代数均为 50 代以内。

### 1.3 试剂

DMEM 低糖培养基(批号 862843)、胎牛血清(批号 16140-071), 美国 Gibco 公司; 胰蛋白酶(批号 20100611)、MTT(批号 20110702), 美国 Amresco 公司; 四乙酸乙二胺(EDTA)(批号 E010501)、二甲基亚砷(DMSO)(批号 196055), 美国 Sigma 公司; AST 试剂盒(批号 20120208)、ALT 试剂盒(批号 20120206), 南京建成生物有限公司。

### 1.4 仪器

Hera cell1501 CO<sub>2</sub> 恒温孵育箱(美国 Thermo Forma 公司), DI—CJ—2ND 超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司); Eclipse Ti—U 倒置相差显微镜(日本尼康公司); CF16RX—II 离心机(日本日立公司); 680 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

### 2.1 生半夏各组分的制备

将生半夏粉碎, 过 40 目筛, 取 100 g 药材粗粉, 依次用石油醚、醋酸乙酯、95%乙醇各均 600 mL 冷浸 48 h, 减压回收溶剂, 即得各组分提取物浸膏。

取生半夏 5 g, 150 mL 纯水加热煎煮提取 1.5 h, 滤过, 除去不溶性杂质, 滤液浓缩至 10 mL, 即得水提物。

### 2.2 含药培养液的配制

取生半夏不同组分浸膏适量, 精密称定, 加入 DMSO 溶解使成 4 g/L, 备用。取含药储备液加入无血清 DMEM 培养液中, 分别配制成含有提取物

0.1、1、10、20 mg/L 的培养基, 抽滤除菌, 4 °C 冰箱保存备用。根据各组分提取率换算, 石油醚组分 1 mg 提取物相当于生药量 1 g, 醋酸乙酯组分 1 mg 提取物相当于生药量 0.9 g, 95%乙醇组分 1 mg 提取物相当于生药量 0.5 g。各溶液中 DMSO 的终浓度均小于 0.5%。

在无血清 DMEM 培养液中加入半夏水提液, 配制成每毫升含有药材水提液 50 μL 的培养液, 抽滤除菌, 4 °C 冰箱保存, 备用。

### 2.3 细胞培养

HepG2 细胞株常规传代于含 10% FBS 的 DMEM 低糖培养基, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度条件孵育箱中培养。用 0.25%胰酶 - 0.02% EDTA 消化, 取增殖旺盛、生长状态良好的细胞。

### 2.4 细胞的加药处理

取处于对数生长期的细胞, 用 0.25%胰酶 - 0.02% EDTA 消化, 离心, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液稀释, 调整细胞浓度为 2 × 10<sup>5</sup>/mL, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL, 另加 100 μL 完全培养基, 待细胞长至 80%融合后, 将培养基移出, 按照实验设计分别在不同的孔中加入含不同浓度药物的培养液 100 μL。设立对照组和阳性组。每组 6 个复孔。生半夏不同部分生药浓度与浸膏/提取液浓度见表 1。

表 1 生半夏不同部分生药浓度与浸膏/提取液浓度对照  
Table 1 Comparison on concentration of crude drug and extract/extracting solution of different parts of raw *Pinelliae Rhizoma*

部位	生药质量浓度(g·L <sup>-1</sup> )	浸膏质量浓度(g·L <sup>-1</sup> )
石油醚组分	20	20
	10	10
	1	1
	0.1	0.1
醋酸乙酯组分	18	20
	9	10
	0.9	1
	0.09	0.1
95%乙醇组分	10	20
	5	10
	0.5	1
	0.05	0.1
水提组分	25	5 μL/100 μL

### 2.5 生半夏对 HepG2 细胞增殖的影响

按照“2.4”项下方法接种细胞并加药处理, 阳性对照物为 5-氟尿嘧啶 (100 mg/L)。24 h 后弃去原培养基, 加入无血清培养基 100  $\mu$ L, 5 mg/mL MTT 溶液 10  $\mu$ L, 于震荡器震荡 5 min, 置培养箱继续培养, 4 h 后终止培养, 弃去孔内的培养上清液, 每孔加入 100  $\mu$ L 二甲基亚砜, 震荡器震荡 10 min, 使结晶物充分溶解<sup>[7]</sup>。在酶标仪 570 nm 波长下测定各孔的吸光度 ( $A$ ) 值, 计算细胞存活率<sup>[7]</sup>, 以监测细胞的数目与活力。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}$$

### 2.6 生半夏对 HepG2 细胞 ALT、AST 的影响

按照“2.4”项下方法接种细胞并加药处理, 设立对照组。48 h 后取培养液上清, 按照 ALT、AST 试剂盒说明书上操作步骤处理样品, 在酶标仪 510 nm 波长下测定各孔的  $A$  值, 采用标准曲线法计算 AST、ALT 酶活力。

### 2.7 统计学分析

采用 SPSS 11.5 软件进行分析, 所有实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。用 One-way ANOVA 方法进行统计学处理, 组间差异的比较采用  $t$  检验。

## 3 结果

### 3.1 生半夏对 HepG2 细胞增殖的影响

MTT 实验结果表明 (表 2), 与对照组相比, 生半夏各组分在 0.1、1、10 mg/L 剂量下对 HepG2 细胞的增殖没有明显的抑制作用。其中石油醚组分 0.1 mg/L 和醋酸乙酯组分 0.1、1 mg/L 对 HepG2 细胞的增殖有促进作用, 差异具有显著性 ( $P < 0.01$ )。各组分在 20 mg/L 浓度下对细胞的增殖有显著的抑制作用, 其抑制强度为 5-氟尿嘧啶 > 石油醚组分 > 醋酸乙酯组分 > 95%乙醇组分。半夏水提物 (5  $\mu$ L/100  $\mu$ L) 对细胞增殖有抑制作用, 差异具有显著性 ( $P < 0.01$ ), 其抑制强度小于上述 3 种溶剂提取物 20 mg/L 浓度组。

### 3.2 生半夏对 HepG2 细胞 ALT、AST 的影响

ALT、AST 测定结果 (表 3) 表明, 与对照组相比, 生半夏石油醚、醋酸乙酯组分各剂量下均提高了 HepG2 细胞 ALT 的释放, 除石油醚 1 mg/L 剂量组外, 差异均具有显著性。95%乙醇组分 20 mg/L 剂量下, 显著性地提高 ALT 释放量。生半夏各组分对 ALT 上调的整体趋势为石油醚 > 醋酸乙酯 > 95%乙醇, 且上调程度与浓度呈一定相关性。与对照组相比, 生半夏石油醚 10 mg/L 浓度组提高了 HepG2

表 2 生半夏各组分对 HepG2 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Effects of different parts from *Pinelliae Rhizoma* on HepG2 cell proliferation ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )	A <sub>570</sub>	细胞存活率/%
对照	—	2.37±0.01	100
5-氟尿嘧啶	100	1.22±0.13**	51.2**
石油醚组分	20	1.40±0.10**	59.1**
	10	2.25±0.35	94.7
	1	2.36±0.41	99.5
	0.1	2.61±0.35**	110.0**
醋酸乙酯	20	1.42±0.08**	61.6
组分	10	2.32±0.33	97.9
	1	2.71±0.38**	114.1**
	0.1	2.64±0.29**	111.2**
95%乙醇	20	1.50±0.07**	65.1**
组分	10	2.21±0.21	92.9
	1	2.33±0.31	98.2
	0.1	2.12±0.22	89.4
水提组分	5 $\mu$ L/100 $\mu$ L	1.96±0.16**	82.6**

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs control group

表 3 生半夏各组分对 HepG2 细胞 ALT 和 AST 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 3 Effects of different parts from *Pinelliae Rhizoma* on ALT and AST of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	质量浓度/ (mg·L <sup>-1</sup> )	A <sub>570</sub>	
		ALT	AST
对照	—	0.325±0.026	0.462±0.067
石油醚组分	20	0.384±0.027**	0.455±0.027
	10	0.347±0.011**	0.500±0.041**
	1	0.331±0.015	0.462±0.040
	0.1	0.342±0.005**	0.464±0.023
醋酸乙酯	20	0.372±0.042**	0.448±0.039
组分	10	0.346±0.017**	0.456±0.022
	1	0.347±0.008**	0.478±0.023
	0.1	0.338±0.007**	0.439±0.005
95%乙醇	20	0.346±0.034**	0.450±0.024
组分	10	0.329±0.034	0.469±0.044
	1	0.317±0.053	0.448±0.058
	0.1	0.326±0.021	0.444±0.010
水提组分	5 $\mu$ L/100 $\mu$ L	0.344±0.016	0.470±0.017

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs control group

细胞 AST 的释放, 差异具有显著性; 其余各组对 HepG2 细胞 AST 的释放差异不具显著性。半夏水提物 (5  $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ ) 能提高细胞 ALT 的释放, 差异具有显著性 ( $P < 0.01$ ), 对 AST 的释放影响不大。

#### 4 讨论

半夏为临床常用中药, 历代本草均将半夏立为有毒药物, 半夏具有一定黏膜刺激性、神经毒性、生殖毒性、肝毒性<sup>[8]</sup>。目前对半夏刺激性的研究已较为深入, 而对半夏肝毒性研究较少。本实验以 HepG2 细胞为模型, 研究生半夏对肝细胞的毒性。研究结果表明, 生半夏具有一定的细胞毒性, 但各组提取物在浓度不高于 10 mg/L 时毒性很小, 在 20 mg/L 浓度下, 对细胞的增殖具有明显的抑制作用, 半夏水提物 (5  $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$ ) 亦显著地抑制细胞增殖, 因此后续工作将采用流式细胞术进行细胞周期及凋亡实验, 进一步明确其毒性机制。

HepG2 细胞所含生物转化酶与正常肝实质细胞具有同源性, 且 HepG2 细胞分化程度高, 保留了较完整的生物转化代谢酶<sup>[9]</sup>。ALT 分布在胞浆, AST 分布在胞浆和线粒体中, HepG2 细胞受损时, 细胞膜通透性增加, 转氨酶释放增加<sup>[10]</sup>。因此, ALT、AST 水平能反映细胞膜受损程度<sup>[11]</sup>。转氨酶测定结果表明, 生半夏能够对 HepG2 细胞膜造成损伤, 提高转氨酶的释放量, 其中 ALT 水平升高幅度与毒性程度具有较高相关性, 石油醚、醋酸乙酯组分对培养上清中 ALT 上调程度高于 95%乙醇组分、水提组分, 提示对细胞膜造成损伤的物质极性较低。仅石油醚组分 10 mg/L 浓度组对 AST 的上调差异具有显著性。实验结果表明半夏具有一定细胞毒性, 但半夏中的毒性物质, 有待进一步研究。后续工作将

对半夏各组分进行 HPLC 分析, 寻找半夏毒性与成分之间的关系, 为探讨可能的毒性化合物提供参考。

#### 参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2010: 110.
- [2] 张亚因, 黄幼异, 鲍志焯, 等. 半夏酸水渗漉液单次给药对小鼠肝毒性“量-时-毒”关系研究 [J]. 中国药物警戒, 2011, 8(1): 15-18.
- [3] 吴灵飞, 苏建东, 李国平, 等. 腺苷体外对人肝癌 HepG2 细胞凋亡的诱导作用及其作用机制 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2008, 22(3): 205-211.
- [4] Balls M. *Report and Recommendations of the CAAT/ERGATT Workshop on the Validation of Toxicity Test Procedures* [M]. New York: ATLA, 1990: 313.
- [5] Ekwall B, Clemedson D, Barile F, et al. Comparison between human skin irritancy and in vitro cytotoxicity from 77 systems for the first 12 MEIC chemicals [J]. *In Vitro Toxicol*, 1994, 7(2): 156-163.
- [6] 张丽美, 鲍志焯, 黄幼异, 等. 半夏水提组分对小鼠肝毒性“量-时-毒”关系研究 [J]. 中国药物警戒, 2011, 8(1): 11-14.
- [7] 任宁, 王世明, 董秀山, 等. 自噬对肝癌 HepG2 细胞增殖及对细胞周期影响的研究 [J]. 中国当代医药, 2012, 19(11): 8-10.
- [8] 王丽, 孙蓉. 与功效、毒性相关的半夏化学成分研究进展 [J]. 中药药理与临床, 2009, 25(5): 101-107.
- [9] 欧瑜, 郑姗, 林琳. 藻蓝蛋白对体外诱导 HepG2 细胞损伤的保护作用 [J]. 药物生物技术, 2009, 16(5): 435-438.
- [10] 郎桂玲, 周琴, 李卫平, 等. 茶多酚对 HepG2 细胞保护作用的实验研究 [J]. 中国药房, 2006, 17(9): 663-665.
- [11] 宋淑亮, 肖增平, 吉爱国, 等. 绞股蓝多糖对 HepG2 细胞酒精性损伤的保护作用 [J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(5): 302-305.