

艾纳香二氢黄酮对脂质过氧化损伤大鼠原代培养肝细胞的保护作用

中山大学生命科学学院药学院 (广州 510275) 蒲含林* 赵金华 许实波
云南烟草公司工业研究所 胡 群

摘 要 研究 5 种艾纳香二氢黄酮类化合物对过氧化损伤的原代培养肝细胞的保护作用。胶原酶灌流法分离大鼠肝细胞,以 CCl_4 或 FeSO_4 +Cys 损伤原代培养肝细胞, $\times 10^{-6}$ 和 $\times 10^{-5}$ mol/L 的 5 种艾纳香二氢黄酮均能明显抑制受损伤细胞的转氨酶逸出、MDA 产生及 GSH 耗竭。其中以 2,5-二羟基艾纳香二氢黄酮的作用最强,在 CCl_4 所致肝细胞损伤实验中,其抑制 MDA 产生的 ED_{50} 约为 2.6×10^{-6} mol/L,保护 GSH 的 ED_{50} 约为 1.08×10^{-5} mol/L,抑制 ALT 逸出细胞的 ED_{50} 约为 9.3×10^{-6} mol/L。

关键词 艾纳香二氢黄酮 损伤 大鼠肝细胞 保护

Protective Actions of Blumea Flavanones on Primary Cultured Hepatocytes against Lipid Peroxidation

Department of Pharmacy, College of Life Sciences, Sun Yat-sen University (Guangzhou 510275) Pu Hanlin, Zhao Jinhua and Xu Shibao

Research Institute of Industry, Yunnan Tobacco Co. Hu Qun

Abstract To search for the protective actions of blumea flavanones (BFs) on hepatocytes against lipid peroxidation, rats' hepatocytes were isolated and cultured with or without blumea flavanones, then damaged by FeSO_4 +cysteine or CCl_4 . The lipid peroxidation criteria (malondialdehyde production and GSH depletion) and alteration in hepatocyte membrane (leakage of GPT and GOT) were estimated. It was found that BFs at 10 and 100 μ mol/L inhibited the MDA generation, GSH depletion and GPT leakage of hepatocytes induced by CCl_4 or FeSO_4 +cysteine. Among BFs, BF-I possessed the strongest activity.

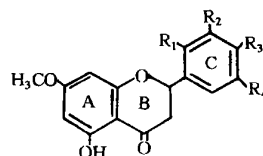
Key words blumea flavanones intoxicate rat hepatocytes protective action

产于中国海南的菊科植物艾纳香 *Blumea blasmifera* DC, 中医主要用作芳香开窍药, 具镇痛、发汗、驱风、祛痰等功效^[1], 中山大学化学系从艾纳香中分离获得艾纳香素^[2], 并发现该化合物具有一定的心血管活性和抗氧化、抗实验性肝损伤作用^[3]。香港理工大学应用生物化学技术系对艾纳香素进行结构改造, 获得 4 个同系物, 本文称之为艾纳香二氢黄酮类化合物 (blumeaflavanoids, BFs), 现报道其肝细胞保护作用。

1 材料

三氯乙酸 (TCA, Sigma Co.); 维生素 E (Vit E, 山东淄博化工厂); 胶原酶 (Collagenase II, Sigma Co.); 胰岛素 (Insulin, 上海第一生化药业公司); 牛血清白蛋白 (BSA, 北京红星生化试剂厂); 硫代巴比妥酸 (TBA, Feinbiochem GmbH Co.); 1640 培养基 (Sigma Co.); ALT/AST 试剂盒 (重庆东方试剂厂); 0.20 μ m 微孔滤膜 (上海医药工业研究院); 艾

纳香二氢黄酮 (BF-I ~ V 光谱纯, 结构见图 1, 香港理工大学应用生物化学技术系陈荣礼教授提供)



- BF-I $R_1 = R_4 = \text{H}, R_2 = R_3 = \text{OH}$
 BF-II $R_1 = R_4 = \text{OH}, R_2 = R_3 = \text{H}$
 BF-III $R_2 = R_4 = \text{OH}, R_1 = R_3 = \text{H}$
 BF-IV $R_1 = R_4 = \text{H}, R_2 = \text{OCOCH}_3, R_3 = \text{OH}$
 BF-V $R_1 = R_4 = \text{H}, R_3 = \text{OCOCH}_3, R_2 = \text{OH}$

图 1 艾纳香二氢黄酮的化学结构

2 方法

2.1 肝细胞分离: 采用胶原酶灌流法^[4]分离大鼠肝细胞, 所得肝细胞以台盼蓝法检测活性 (约 88%), 计数后以 1640 培养液 (含 1% BSA, 10 μ g/mL 链霉素及 1 mmol/L 胰岛素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养。

2.2 CCl_4 致肝细胞损伤: 将细胞以 $\times 10^6$ 细胞 /

* Address: Pu Hanlin, Department of Pharmacy, College of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou

蒲含林, 男, 有机化学专业硕士, 讲师, 97 级生理学专业博士研究生, 研究方向是天然产物的药学研究, 参与导师主持的多项国家自然科学基金课题及“九·五”攻关课题的工作, 完成部分横向科研项目工作, 在国内刊物发表论文数篇。

mL的密度接种于培养试管中(1 mL管),加入 CCl₄ 7.5 mmol/L(终浓度)^[5];给药组在加入 CCl₄前 10 min加入不同浓度的 BF_s或 VitE(浓度见表 1)。加药后 37℃振荡孵育 3 h,1 000 r/min离心 5 min,取上清液以赖氏法测转氨酶(ALT, AST)活性;细胞沉淀以 4℃磷酸缓冲液(PBS, 0.015 mol/L, pH 7.4,含 2%磺基水杨酸)悬浮后, TBA显色法测丙二醛(MDA)生成量, DTNB法测还原型谷胱甘肽(GSH)含量^[6]。

2.3 FeSO₄-Cys致肝细胞损伤:孵育及检测方法同 2.2, FeSO₄-Cys致细胞损伤的浓度为 FeSO₄ 50 μmol/L; Cys 200 μmol/L(均为终浓度)。检测时间为加入 FeSO₄-Cys后 90 min

3 结果

BF_s对 CCl₄及 FeSO₄-Cys损伤的肝细胞有保护作用,结果见表 1、2及图 2

表 1 BF_s对 CCl₄损伤的原代培养大鼠肝细胞的保护作用 (n= 8, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mol/L)	CCl ₄ 7.5 mmol			
		MDA	GSH	ALT	AST
		(nmol/10 ⁶ cells)		(karmans U/mL medium)	
损伤组	-	2.43±0.27	13.4±0.6	57.8±6.8	92.3±7.7
BF-I	× 10 ⁻⁵	1.58±0.09 ^a	18.3±0.8	31.1±4.1 ^a	53.0±7.2
	× 10 ⁻⁴	1.00±0.05 ^a	21.2±1.3	16.4±2.1 ^a	33.7±5.3
BF-II	× 10 ⁻⁷	2.06±0.14 ^a	14.5±0.7	40.4±5.2 ^a	80.2±12.2
	× 10 ⁻⁶	1.55±0.13 ^a	17.4±0.6	25.4±2.5 ^a	62.9±3.9
BF-III	× 10 ⁻⁵	1.10±0.08 ^a	19.3±0.9	18.5±3.9 ^a	38.6±7.6
	× 10 ⁻⁴	0.57±0.19 ^a	22.3±1.1	10.6±4.9 ^a	13.7±6.5
BF-IV	× 10 ⁻⁵	1.73±0.15 ^a	15.6±0.6	43.3±3.3 ^a	56.8±10.5
	× 10 ⁻⁴	1.56±0.10 ^a	18.0±1.0	32.2±3.2 ^a	47.3±3.5
BF-V	× 10 ⁻⁵	1.70±0.13 ^a	16.6±1.2	36.3±5.0 ^a	63.4±4.7
	× 10 ⁻⁴	1.38±0.11 ^a	17.9±1.0	25.9±3.6 ^a	48.1±7.8
VitE	× 10 ⁻⁵	2.12±0.13 ^a	16.2±0.7	40.1±7.0 ^a	72.9±6.5
	× 10 ⁻⁴	1.86±0.22 ^a	16.9±0.9	28.3±3.5 ^a	51.9±8.4
对照组	-	0.38±0.08 ^a	25.4±0.9	2.3±0.5 ^a	7.5±0.5

与损伤组比较: * P < 0.05

表 2 BF_s对 FeSO₄-Cys损伤的原代培养大鼠肝细胞的保护作用 (n= 8, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mol/L)	FeSO ₄ 50 μmol/L+ Cys 200 μmol/L			
		MDA	GSH	ALT	AST
		(nmol/10 ⁶ cells)		(karmans U/mL medium)	
损伤组	-	3.08±0.27	11.0±0.8	29.0±2.2	52.8±4.2
BF-I	× 10 ⁻⁵	1.70±0.17 ^a	16.2±1.3	12.3±1.0 ^a	32.5±2.3
	× 10 ⁻⁴	1.25±0.13 ^a	21.2±0.8	9.9±0.9 ^a	18.4±3.5
BF-II	× 10 ⁻⁷	2.56±0.28 ^a	13.7±0.9	14.9±1.3 ^a	43.4±3.5
	× 10 ⁻⁶	1.95±0.21 ^a	16.5±1.0	11.2±0.6 ^a	33.9±3.9
BF-III	× 10 ⁻⁵	1.27±0.10 ^a	18.9±1.3	8.9±0.8 ^a	21.5±4.0
	× 10 ⁻⁴	0.85±0.20 ^a	22.3±1.0	6.7±0.9 ^a	9.6±2.7
BF-IV	× 10 ⁻⁵	2.18±0.24 ^a	13.2±0.8	21.8±2.8 ^a	38.4±3.3
	× 10 ⁻⁴	1.60±0.27 ^a	17.2±0.8	14.5±0.8 ^a	31.9±3.5
BF-V	× 10 ⁻⁵	2.13±0.21 ^a	12.6±1.3	16.6±1.0 ^a	40.3±4.5
	× 10 ⁻⁴	1.70±0.20 ^a	16.0±0.8	13.6±2.8 ^a	32.6±3.0
VitE	× 10 ⁻⁵	2.52±0.13 ^a	12.9±0.8	26.1±1.6 ^a	46.8±5.3
	× 10 ⁻⁴	2.15±0.30 ^a	15.6±0.5	15.9±1.8 ^a	37.6±2.2
对照组	-	0.68±0.15 ^a	25.5±1.4	2.1±1.6 ^a	4.3±0.8

与损伤组比较: * P < 0.05

结果表明,原代培养肝细胞经 CCl₄或 FeSO₄-Cys损伤后,其培养液中转氨酶含量分别上升 24倍和 14倍,肝细胞中 MDA含量增加 7倍和 6倍, GSH耗竭 58%和 40%。艾纳香二氢黄酮可明显对抗 CCl₄或 FeSO₄-Cys的肝细胞损伤作用, × 10⁻⁴和 × 10⁻⁵ mol/L的 5种艾纳香二氢黄酮均能明显抑制受损伤细胞的转氨酶逸出、MDA产生及 GSH耗竭。其中以 BF-II的作用最强,在 CCl₄所致肝细胞损伤实验中,其抑制 MDA产生的 ED₅₀约为 2.6 × 10⁻⁶ mol/L,保护 GSH的 ED₅₀约为 1.08 × 10⁻⁵ mol/L,抑制 ALT逸出细胞的 ED₅₀约为 9.39 × 10⁻⁶ mol/L

4 讨论

研究表明, BF_s对多种化学物质所致急性肝损伤具有保护作用^[7],对多种自由基发生系统所致的

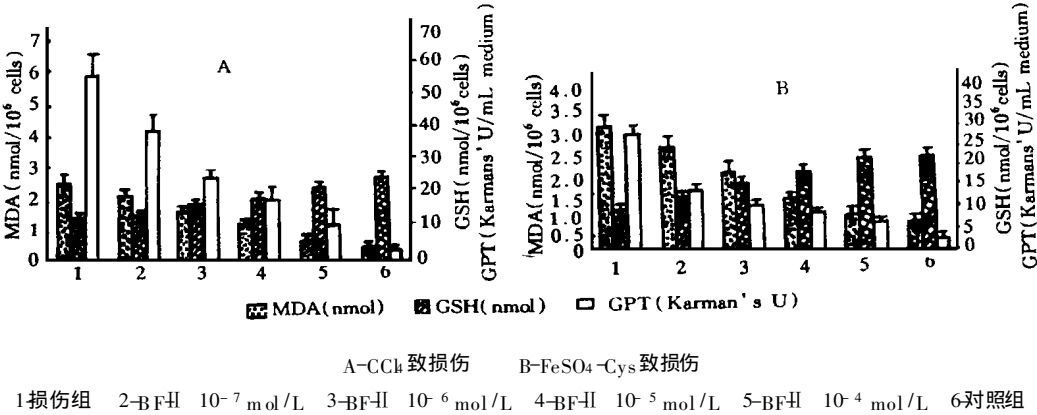


图 2 BF-II对原代培养大鼠肝细胞的保护作用 (n= 8, $\bar{x} \pm s$)

组织脂质过氧化也有较强的抑制作用^[8]。考虑到 CCl₄ 扑热息痛等所致急性肝损伤均与脂质过氧化密切相关^[9],笔者研究 BF_s对 CCl₄和 FeSO₄-Cys损伤的原代培养肝细胞损伤的保护作用,以进一步探讨 BF_s肝保护与抗氧化的关系。结果表明 BF_I ~ BF_V 均能抑制 CCl₄和 FeSO₄-Cys所致的肝细胞脂质过氧化:MDA产生减少,GSH耗竭降低,同时保护了肝细胞膜的稳定性,转氨酶渗出减少,并呈现出一定的相关性。提示 BF_s的抗氧化作用可能是其肝保护作用的机制。此外,在 BF_s中,BF_I的作用强于 BF_{III}~V,此与“黄酮类化合物中 3,4-OH是抗氧化活性基团”的理论^[10]相符。而活性最强的 BF_{II}是具有 2,5-OH的黄酮类化合物,这一结果可能对

进一步研究黄酮类化合物的抗氧化作用的构效关系有一定的提示作用。

参考文献

- 1 全国中草药汇编编写组,全国中草药汇编(上).北京:人民卫生出版社,1986:49
- 2 林永成,等.中山大学学报,1988,27(2):77
- 3 许实波,等.中国药理学报,1993,14(4):376
- 4 Diane J B, et al. Biochemical Toxicology: A Practical Approach. Oxford: ILK Press Ltd, 1987:56
- 5 樊爱平,等.生理科学,1987,7(6):357
- 6 许实波,等.中国药理学通报,1988,14(2):191
- 7 徐叔云,等.药理实验方法学(第二版).北京:人民卫生出版社,1994:488
- 8 赵金华,等.中国药理学通报,1997,13(5):438
- 9 Plaa G L, et al. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1976, 16:125
- 10 Younes M, et al. Planta Medica, 1981, 43:240

(1999-07-16收稿)

川芎嗪对大鼠浸水应激性胃溃疡的影响

烟台师范学院生物系生理教研室(264025) 万军利* 王昌留 崔胜忠

摘要 以大鼠浸水应激性胃溃疡为模型,从胃酸分泌、胃运动、胃粘膜一氧化氮合成酶(NOS)和一氧化氮(NO)几方面观察 ip川芎嗪(TM P)对大鼠应激性胃溃疡的影响,探讨 TM P的作用机制。结果:TM P 10~40 mg/kg可明显抑制大鼠浸水应激性胃溃疡的发生;TM P 20 mg/kg可促进胃液分泌量的增高,但对胃酸分泌无影响;并可明显抑制胃的运动;浸水应激后大鼠胃粘膜 NOS活力和 NO含量均明显降低,TM P可抑制应激导致的 NOS活力和 NO含量的降低。结论:TM P通过抑制应激引起的胃粘膜 NOS活力的降低,提高胃粘膜 NO含量,进而抑制胃运动途径来抗溃疡,而与胃酸分泌无关。

关键词 川芎嗪 胃溃疡 胃酸 胃运动 一氧化氮

Effect of Tetramethylpyrazine on Gastric Ulcer Induced by Restraint Water-immersion in Rats

Physiological Section, Department of Biology, Yantai Normal College (Yantai 264025) Wan Junli, Wang Changliu and Cui Shengzhong

Abstract To observe the effect of tetramethylpyrazine (TM P), one of the active principles in *Ligusticum wallichii* Franch, on stress ulcer in rats. In the restraint water-immersion rats, the mechanisms of TM P administered intraperitoneally were investigated in gastric secretion, gastric motility, gastric mucosal NOS activity and NO content. Results showed that TM P 10~40 mg/kg significantly inhibited the formation of gastric ulcer; TM P 20 mg/kg could increase gastric juice secretion, but had no effect on gastric acid secretion; TM P 20 mg/kg suppressed gastric motility; in restraint water-immersion rats, gastric mucosal NOS activity and NO content were decreased and TM P 20 mg/kg could inhibited the decrease of NOS activity and NO content. It was concluded that TM P can inhibit gastric ulcer induced by restraint water-immersion and its protection may be related to inhibit gastric motility, the decrease of NOS activity and NO content, but is not related with gastric acid secretion.

Key words tetramethylpyrazine (TM P) gastric ulcer gastric acid gastric motility nitric oxide

川芎为常用的活血化瘀中药,川芎嗪即四甲基吡嗪(tetramethylpyrazine, TM P)是川芎的有效成

分之一,基对中枢神经系统损伤和失血性休克导致的大鼠应激性胃溃疡的作用已有报告^[1,2],我们也观

* Address: Wan Junli, Department of Biology, Yantai Normal College, Yantai

万军利 男,生理学专业研究生毕业,理学硕士学位,副教授,山东省细胞生物学会会员。现从事应激性胃粘膜损伤发病机制及药物抗溃疡机制的研究。主持完成了山东省教委项目《疏基在应激性胃粘膜损伤及细胞保护过程中作用机制及应用研究》。获山东省教委科技进步二等奖1项。已发表论文 16篇。