

梔子苷衍生物五乙酰梔子酸对人肝细胞损伤的保护作用

程 畅 黄 成 王雅蕊 张 磊 汤文建 李 俊

摘要 目的 探讨梔子苷衍生物五乙酰梔子酸对 L-O₂ 型肝细胞化学损伤的保护作用及其机制。方法 培养 L-O₂ 型肝细胞, 采用 CCl₄ 和 H₂O₂ 体外诱导 L-O₂, 检测培养上清液中谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT) 和乳酸脱氢酶(LDH) 的水平, 检测上清液中丙二醛(MDA) 的含量、过氧化物歧化酶(SOD) 的活力及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px) 的活性。结果 五乙酰梔子酸(10、50、100 μg/ml) 不仅可明显降低由 CCl₄ 所致肝细胞培养上清液中 AST、ALT、LDH 水平及 MDA 含量的升高, 显著提高 SOD 的活力及 GSH-Px 的活性; 而且还可使 H₂O₂ 所致肝细胞培养上清液中升高的 AST、ALT、LDH 及 MDA 的含量明显降低, 提高 SOD 的活力及 GSH-Px 的活性。结论 梔子苷衍生物五乙酰梔子酸体外肝细胞损伤有显著的保护作用, 其作用机制可能与其抗氧化作用有关。

关键词 梔子苷; L-O₂ 型肝细胞; 保肝; 抗氧化作用

中图分类号 R 575.5; R 329.2; R 966

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)07-0946-04

梔子为茜草科植物梔子的干燥成熟果实, 性寒味苦, 归心、肺、三焦经, 内服具有清热利湿、利尿、除烦、凉血止血、散瘀之功效, 主要用于慢性肝炎、黄疸型肝炎、尿血、鼻血、牙龈出血、上消化道出血及局部出血、牙痛、目赤、丹毒。外治扭伤肿痛、足跟劳伤

等的治疗^[1]。梔子果中含有一种环烯醚萜的葡萄糖苷—梔子苷, 在梔子的药用效果中起重要作用^[2]。梔子苷对四氯化碳(CCl₄) 和对乙酰氨基酚诱导的肝损伤有一定的保护作用^[3]。但由于梔子苷极性大, 生物利用度低, 难以从梔子中有效分离而得, 极大地限制了其应用。研究^[4]显示梔子苷元的半缩醛结构是抗肿瘤必需的活性基团, 而且 C-4 位的取代基对降低梔子苷的极性及其抗氧化活性有着非常重要的作用。鉴于此, 本实验室设计并合成了 C-4 位取代的梔子苷衍生物, 见图 1。为探讨其作用及机制, 该研究采用体外培养 L-O₂ 型肝细胞, 用 CCl₄ 和 H₂O₂ 体外分别诱导肝细胞损伤模型, 观察梔子苷衍生物五乙酰梔子酸对体外肝细胞损伤的保护作用及其机制。

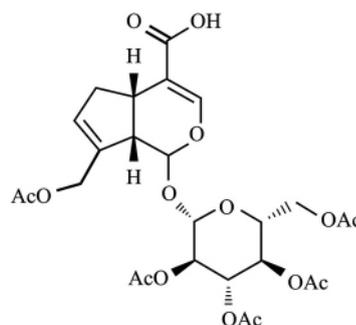


图 1 五乙酰梔子酸的化学结构
分子式 C₂₆H₃₂O₁₅; 分子量 584

2014-03-20 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81072686、81273526)

作者单位: 安徽医科大学药学院, 安徽医科大学肝病研究所, 安徽天然药物活性研究省级实验室, 合肥 230032

作者简介: 程 畅, 女, 硕士研究生;

李 俊, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: lijun@ahmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

higher than that in the plasma. The two antibiotics concentration in the forestomach mucosa was lower than that in the glandular stomach mucosa. The deviation of two antibiotics concentration in the different region of the glandular stomach mucosa was not statistical significance. **Conclusion** The antibiotic amoxicillin and levofloxacin used against *H. pylori* could penetrate the gastric mucosa into the stomach. The antibiotic concentration in gastric mucosa in the different regions is different. The active transport mechanism of the transporting levofloxacin could exist in the stomach. Rabepazole could affect levofloxacin kinetic parameter in blood or gastric mucosa.

Key words rabepazole; amoxicillin; levofloxacin; *Helicobacter pylori*

1.1.1 实验细胞 人肝细胞株 L-O₂ 购自上海细胞库。

1.1.2 药物及试剂 五乙酰栀子酸(含量 > 98%)、栀子苷(含量 > 98%) (本校药学院研制); 胎牛血清(杭州四季青生物材料工程公司); DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司); 谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)、乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所); 丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽-过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px) ELISA 检测试剂盒(上海博古生物科技有限公司)。

1.1.3 仪器和设备 超净工作台(北京西城区半导体设备一厂); CO₂ 恒温培养箱(美国 Forma Scientific 公司); BX50 型倒置显微镜(日本 Olympus 光学工业株式会社); JT12001 电子天平(上海精天电子仪器厂); GL20A 全自动高速冷冻离心机(湖南仪器仪表总厂离心机厂); MK3 型酶标仪(美国赛默飞世尔公司)。

1.2 方法

1.2.1 栀子苷衍生物五乙酰栀子酸对 CCl₄ 诱导肝细胞损伤的保护作用 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液将人肝 L-O₂ 细胞培养至对数生长期, 调整细胞密度为 5×10^5 /ml, 将肝细胞悬液加入 6 孔培养板中, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待肝细胞全部贴壁生长, 供试验用。设正常组, CCl₄ 模型组(终浓度为 8 mmol/L), 五乙酰栀子酸低、中、高剂量组(10、50、100 μg/ml) 和栀子苷组(100 μg/ml), 分别加入栀子苷、不同浓度的五乙酰栀子酸作用 48 h, CCl₄ 作用 6 h, 然后收集上清液, 检测 ALT、AST、LDH 水平、MDA 的含量及 SOD 和 GSH-Px 的活性。

1.2.2 栀子苷衍生物五乙酰栀子酸对 H₂O₂ 诱导肝细胞损伤的保护作用 设正常组, H₂O₂ 模型组(终浓度为 0.4 mmol/L), 五乙酰栀子酸低、中、高剂量组(10、50、100 μg/ml) 和栀子苷组(100 μg/ml), 肝细胞贴壁培养后, 弃去上清液, 加入栀子苷、不同浓度的五乙酰栀子酸作用 48 h, H₂O₂ 作用 4 h, 然后收集 6 孔板内的培养上清液, 检测 AST、ALT、LDH 水平、MDA 的含量及 SOD 和 GSH-Px 的活性。

1.2.3 微板法检测培养上清液中 AST、ALT、LDH 水平及 SOD 活力 按试剂盒说明书步骤进行测定。

1.2.4 MDA 含量及 GSH-Px 的活性测定 按 ELISA 试剂盒说明书步骤进行测定。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行单因素方差分析(ANOVA) 检验。方差齐应用 LSD 法分析, 方差不齐应用 Dunnett's T3 检验法。

2 结果

2.1 栀子苷衍生物五乙酰栀子酸对 ALT、AST、LDH 活性的影响

2.1.1 五乙酰栀子酸对 CCl₄ 损伤肝细胞 ALT、AST、LDH 活性的影响 正常肝细胞培养基中 ALT、AST、LDH 水平很低, L-O₂ 型肝细胞与 CCl₄ (8 mmol/L) 共育 6 h, 模型组培养上清液中的 AST、ALT 和 LDH 含量显著升高 ($P < 0.01$)。加入五乙酰栀子酸(10、50、100 μg/ml) 和栀子苷(100 μg/ml) 均能显著降低血浆中 ALT、AST、LDH 水平 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 但五乙酰栀子酸效果较栀子苷好, 并且 ALT、AST、LDH 含量随栀子苷衍生物的剂量增大而降低。见表 1。

2.1.2 五乙酰栀子酸对 H₂O₂ 损伤肝细胞 ALT、AST、LDH 活性的影响 与正常肝细胞培养基中 ALT、AST、LDH 含量相比, L-O₂ 型肝细胞与 H₂O₂ (400 μmol/L) 共育 4 h, 可使肝细胞培养上清液中 AST、ALT 和 LDH 较正常组有明显升高 ($P < 0.01$), 不同浓度的五乙酰栀子酸(10、50、100 μg/ml) 可呈剂量依赖性降低损伤肝细胞培养上清液中的 AST、ALT 和 LDH 含量较栀子苷母体效果好, 进而明显改善肝细胞的损伤。见表 1。

2.2 栀子苷衍生物五乙酰栀子酸的保肝作用与抗氧化酶的关系

2.2.1 五乙酰栀子酸对 CCl₄ 损伤肝细胞 MDA 和 SOD 和 GSH-Px 活性的影响 为了证明保肝作用是否与其抗肝细胞内脂质过氧化有关, 检测与其有关的 MDA、SOD 和 GSH-Px 活性。正常肝细胞培养基中 MDA 活性很低, SOD、GSH-Px 浓度较高, 而 CCl₄ 损伤的肝细胞 MDA, 较正常组有明显的升高, SOD 和 GSH-Px 含量较正常组明显降低。给予不同剂量(10、50、100 μg/ml) 的五乙酰栀子酸不仅使肝细胞 MDA 含量呈剂量依赖性降低, 还可使 CCl₄ 降低的 SOD 和 GSH-Px 的活性剂量依赖性升高且效果好于栀子苷。见表 2。

表1 栀子苷衍生物对 CCl₄ 和 H₂O₂ 损伤肝细胞培养上清液 ALT、AST、LDH 的影响 (U/L, n = 10, $\bar{x} \pm s$)

组别	CCl ₄			H ₂ O ₂		
	ALT	AST	LDH	ALT	AST	LDH
正常	25.25 ± 1.57	30.50 ± 3.93	93.89 ± 9.85	24.29 ± 1.53	27.30 ± 1.58	119.53 ± 3.13
模型	48.14 ± 2.02 ^{##}	58.41 ± 3.21 ^{##}	177.91 ± 11.37 ^{##}	45.65 ± 2.58 ^{##}	53.67 ± 3.64 ^{##}	188.16 ± 9.69 ^{##}
栀子苷衍生物 (μg/ml)						
10	44.71 ± 3.24	52.09 ± 5.73	160.16 ± 7.88 [*]	41.31 ± 1.97 [*]	49.69 ± 1.67 [*]	161.73 ± 7.60 ^{**}
50	38.35 ± 2.74 ^{**}	43.34 ± 2.21 ^{**}	136.49 ± 5.84 ^{**}	35.78 ± 2.07 ^{**}	39.24 ± 3.94 ^{**}	142.33 ± 4.78 ^{**}
100	30.57 ± 2.43 ^{**}	36.11 ± 3.27 ^{**}	113.22 ± 2.96 ^{**}	30.10 ± 2.70 ^{**}	35.09 ± 2.95 ^{**}	123.24 ± 5.16 ^{**}
栀子苷 (μg/ml)						
100	41.20 ± 1.40 ^{**}	46.09 ± 2.24 ^{**}	126.75 ± 7.28 ^{**}	38.52 ± 1.15 ^{**}	37.91 ± 3.77 ^{**}	140.87 ± 6.69 ^{**}
F 值	41.956	26.645	44.162	45.552	30.600	121.135

与正常组比较: ^{##}P < 0.01; 与模型组比较: ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01

表2 栀子苷衍生物对 CCl₄ 和 H₂O₂ 损伤肝细胞培养上清液 MDA、SOD、GSH-Px 的影响 (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

组别	CCl ₄			H ₂ O ₂		
	MDA (nmol/L)	SOD (U/ml)	GSH-Px (U · mg/protein)	MDA (nmol/L)	SOD (U/ml)	GSH-Px (U · mg/protein)
正常	3.19 ± 0.25	12.71 ± 1.20	36.50 ± 2.13	3.36 ± 0.50	11.55 ± 1.33	30.25 ± 1.26
模型	5.99 ± 0.45 ^{##}	9.92 ± 0.83 ^{##}	23.82 ± 1.99 ^{##}	6.18 ± 0.22 ^{##}	8.88 ± 0.9 ^{##}	24.40 ± 1.07 ^{##}
栀子苷衍生物 (μg/ml)						
10	5.56 ± 0.27	10.40 ± 0.81 [*]	25.35 ± 1.52	3.36 ± 0.50	11.55 ± 1.33	30.25 ± 1.26
50	4.88 ± 0.19 ^{**}	11.07 ± 0.60 ^{**}	28.15 ± 1.91 ^{**}	4.35 ± 0.64 ^{**}	9.61 ± 0.81 ^{**}	26.77 ± 1.34 ^{**}
100	3.85 ± 0.16 ^{**}	11.62 ± 0.71 ^{**}	31.41 ± 1.72 ^{**}	3.70 ± 0.26 ^{**}	10.19 ± 0.63 ^{**}	27.38 ± 1.67 ^{**}
栀子苷 (μg/ml)						
100	4.71 ± 0.14 ^{**}	11.30 ± 0.64 ^{**}	26.31 ± 1.69 [*]	4.16 ± 0.22 ^{**}	9.67 ± 0.72 ^{**}	26.89 ± 1.53 [*]
F 值	46.190	63.118	26.382	19.157	51.914	17.483

与正常组比较: ^{##}P < 0.01; 与模型组比较: ^{*}P < 0.05; ^{**}P < 0.01

2.2.2 五乙酰栀子酸对 H₂O₂ 损伤肝细胞 MDA 和 SOD 和 GSH-Px 活性的影响 与正常组相比, H₂O₂ 损伤的肝细胞 MDA 有明显升高, 而 SOD 和 GSH-Px 含量有明显降低。不同浓度的栀子苷衍生物 (10、50、100 μg/ml) 可呈剂量依赖性降低损伤肝细胞培养上清液中的 MDA, 升高 SOD 和 GSH-Px 含量较栀子苷母体效果好进而明显改善肝细胞的损伤。见表 2。

3 讨论

肝损伤是指肝细胞在一系列理化因素的作用下发生不同程度的肿胀、变性、坏死和凋亡, 进而导致肝实质内弥漫性病变。多种损伤因素可以导致肝细胞的损伤, 而肝细胞质膜的脂质过氧化^[5] 是导致肝细胞损伤的主要因素。CCl₄ 和 H₂O₂ 诱导的肝细胞损伤模型被广泛用作研究药物保肝的两种经典模型, CCl₄ 可通过 P-450 酶系统脱卤素后形成 CCl₃ 自由基, 后者能从不饱和脂肪酸分子中夺取氢离子, 引起脂质过氧化, 也可与肝微粒体脂质和蛋白质发生共价结合, 损伤胞膜结构, 从而导致细胞损伤。

H₂O₂ 是一种重要的活性氧, 极易通过细胞膜与细胞内铁离子反应形成高活性 ·OH 损伤肝细胞^[6]。

ALT、AST、LDH 是检测肝细胞损伤的常用检测指标, 反映了肝细胞的损伤程度^[7]。本研究显示, 与正常组相比, 模型组 CCl₄ 和 H₂O₂ 损伤的肝细胞上清液中 AST、ALT、LDH 均明显升高; 在损伤的肝细胞中加入栀子苷和栀子苷衍生物五乙酰栀子酸后, 肝细胞损伤明显减轻, 并且五乙酰栀子酸的保肝作用强于母体栀子苷。随五乙酰栀子酸剂量的加大, 细胞培养基中的 ALT、AST、LDH 水平呈剂量依赖性降低。以上结果表明, 栀子苷衍生物五乙酰栀子酸具有明显的保肝作用。

研究^[8] 显示, 氧化应激是肝细胞损伤的重要因素。生物体内, 自由基作用于脂质发生过氧化反应的终产物 - MDA, 它可以破坏细胞膜结构, 导致细胞肿胀坏死, 是反映过氧化损伤程度和细胞受损程度的重要指标。本研究显示, 与正常组相比, 模型组 CCl₄ 和 H₂O₂ 诱导的 L-O₂ 细胞中 MDA 含量明显升高, 给予栀子苷衍生物五乙酰栀子酸可使其显著降低。SOD 能催化过氧阴离子发生歧化反应, 特异地

清除体内的氧自由基,使自由基不能与膜脂质和膜蛋白进行反应而破坏肝细胞,从而保护细胞免受损伤,其活力的高低间接反映了自由基清除的程度和脂质过氧化的降低程度^[9]。GSH-Px 是重要的催化过氧化物分解的酶,不仅能特异地催化还原型谷胱甘肽过氧化氢的还原反应,使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物,从而保护细胞膜的结构及功能不受过氧化物的干扰及损害,还能特异的清除机体活性氧,减轻和阻止活性氧的过氧化作用,是协调身体的抗氧化剂防御过程的核心组成部分^[10]。研究结果表明,CCl₄ 和 H₂O₂ 诱导后的肝细胞 SOD 活力及 GSH-Px 活性显著降低,说明细胞清除自由基的能力降低,给予栀子苷衍生物五乙酰栀子酸后能逆转上述指标的改变,且较栀子苷母体更加显著。

本研究结果表明,C-4 位取代的栀子苷衍生物五乙酰栀子酸具有较母体更显著的保肝作用,其对体外肝细胞的保护作用可能与增强机体清除自由基及抑制自由基的反应,防止过度的脂质过氧化有关。但是体外培养肝细胞和肝损伤动物模型还是有较大差异的,故还需要在动物体内进行进一步验证。同时栀子苷及其衍生物的保肝作用与其他机制是否有关,与抗氧化机制的关系是直接的还是间接的,目前尚不能定论,需要进一步深入研究。

参考文献

- [1] 游伟良,平其能,孙敏捷,等. 栀子苷的药理学研究新进展 [J]. 药学进展 2012, 36(4): 158-62.
- [2] 孟祥乐,李红伟,李颜,等. 栀子化学成分及其药理作用研究进展 [J]. 中国新药杂志 2011, 20(11): 959-67.
- [3] 刘益华,李晶,林曼婷,等. 栀子有效成分栀子苷的现代研究进展 [J]. 中国药学杂志 2012, 47(6): 406-9.
- [4] 张玲,孙科,王翀,等. 栀子苷的药理活性与结构改造的研究进展 [J]. 齐鲁药事 2011, 30(9): 530-3.
- [5] 张欣,党双锁. 实验性肝损伤机制研究进展 [J], 中国肝脏病杂志 2009, 1(2): 60-2.
- [6] 蔡秀江,闫冰,姚卫峰,等. 二至丸保肝活性成分群对体外肝细胞损伤的保护作用 [J]. 辽宁中医杂志 2012, 39(2): 212-4.
- [7] 张群,刘加群,孙华丽,等. 复方甘草酸单铵和异甘草酸镁对化学损伤人肝细胞的保护作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(29): 3019-22.
- [8] 张红,史天陆,王静,等. 五乙酰栀子酰苯胺对 D-GalN 所致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 安徽医科大学学报, 2013, 48(7): 786-9.
- [9] 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): 265-8.
- [10] 蔡晓波,陆伦根. 谷胱甘肽过氧化物酶与肝脏疾病 [J]. 世界华人消化杂志 2009, 17(32): 3279-82.

Protective effect of Gardenoside derivative on human hepatocyte injury

Cheng Chang, Huang Cheng, Wang Yarui, et al

(School of Pharmacy, Anhui Medical University; Institute for Liver Diseases of Anhui Medical University; Anhui Key Laboratory of Bioactivity of Natural Products, Hefei 230032)

Abstract Objective To determine the protective effects of Gardenoside derivative on L-O₂ induced by CCl₄ or H₂O₂ and to reveal the mechanism. **Methods** L-O₂ hepatocyte cells were incubated and then injured by CCl₄ or H₂O₂. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) activity and liver homogenate superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px) were measured. **Results** Not only the CCl₄-induced L-O₂ hepatocyte cells increased AST, ALT, LDH, MDA levels, and the loss of SOD and GSH-Px activities were remarkably attenuated by Gardenoside derivative (10, 50, 100 μg/ml), but also the H₂O₂-induced elevation of ALT, AST, LDH levels in the supernatant of hepatocytes increased MDA content of hepatocytes, and loss of SOD and GSH-Px activities were significantly attenuated by Gardenoside derivative (10, 50, 100 μg/ml). In addition, gardenoside derivative had a better effect on the protective of human hepatocyte injury than gardenoside. **Conclusion** Gardenoside derivative is good at protecting hepatocytes than gardenoside from *in vitro* injury induced by CCl₄ or H₂O₂ and the mechanism might be related to the anti-oxidant process.

Key words Gardenoside derivative; L-O₂ hepatocyte cell; liver protection; anti-oxidation effect