

慈姑活性成分对体外肝细胞损伤的保护作用

李冰 林殷 王春国 王晶 奚茜 潘诗霞 马芳芳 吕威 廖艳

【摘要】 目的 研究慈姑活性成分的保肝作用及其机理。**方法** 采用系统化学溶剂萃取法制备慈姑不同活性成分,培养 HepG2 型肝细胞,建立异烟肼和利福平合用致体外肝细胞损伤模型,给予慈姑不同活性成分处理后,利用 MTT 法检测肝细胞的存活率,并检测细胞培养上清液中丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶、丙二醛的浓度。**结果** 与模型组比较,慈姑乙酸乙酯组、慈姑石油醚组、慈姑总提取物组和慈姑水提组的细胞存活率均增加 ($P < 0.01$);慈姑石油醚组、慈姑总提取物组和慈姑水提组均可降低肝细胞培养上清液中的丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶、丙二醛的水平 ($P < 0.05$),其中慈姑水提组效果最为明显 ($P < 0.01$)。**结论** 提示慈姑水提部分对体外异烟肼和利福平合用致肝细胞损伤有较强保护作用,其作用可能与抗脂质过氧化有关。

【关键词】 慈姑活性成分; 异烟肼; 利福平; 肝损伤

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.08.001

Protective effects of active part of *Sagittaria Sagittifolia* L. on hepatocytes injury in vitro LI Bing, LIN Yin, WANG Chun-guo, et al. School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: LIAO Yan, E-mail: liaoyanaa@163.com

【Abstract】 Objective To study the protective effects and mechanism of active components of *Sagittaria Sagittifolia* L. on hepatocytes injury induced by co-administration of isoniazid and rifampin. **Methods** Different active ingredients of *Sagittaria Sagittifolia* L. were prepared by systemic chemical solvent extraction method. HepG2 liver cells were incubated, and injured by co-administration of isoniazid and rifampin. MTT assay was used to evaluate the survival rate of liver cells after the cells had been treated with active part of *Sagittaria Sagittifolia* L., culture media were collected to detected the levels of ALT, AST, LDH and MDA. **Results** Compared with the model group, the cell viability of ethyl acetate extract group, petroleum ether extract group, the total extract group and the water extract group was increased ($P < 0.01$); the content of ALT, AST, LDH and MDA was reduced after preventive treatment with petroleum ether extract, the total extract and the water extract, the effect of water extract group was especially obvious ($P < 0.01$). **Conclusion** The water extract from *Sagittaria Sagittifolia* L. has strong protective effect on hepatocytes injury induced by co-administration of isoniazid and rifampin, which may be related to inhibiting the lipid peroxidation.

【Key words】 Active part of *Sagittaria Sagittifolia* L.; Isoniazid; Rifampicin; Hepatocytes Injury

基金项目: 国家自然科学基金(81503633); 北京中医药新奥奖励基金(1000062720044/004)

作者单位: 100029 北京中医药大学基础医学院[李冰(硕士研究生)、林殷、王晶(硕士研究生)、奚茜(硕士研究生)、潘诗霞(硕士研究生)、马芳芳(博士研究生)、廖艳], 科研实验中心(王春国); 针灸推拿学院[吕威(硕士研究生)]

作者简介: 李冰(1991-), 女, 2014 级在读硕士研究生。研究方向: 中医养生与康复。E-mail: 1145571606@qq.com

通讯作者: 廖艳(1975-), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师。研究方向: 药理毒理学。E-mail: liaoyanaa@163.com

近年研究发现药物性肝损伤已成为国内外常见且较严重的药源性疾病^[1]。异烟肼(isoniazid, INH)和利福平(rifampicin, RFP)是标准抗结核化疗方案中一线药物,然而均有肝毒性^[2],故使患者坚持抗结核治疗的关键是寻找护肝办法。慈姑 *Sagittaria Sagittifolia* L. 为药食兼用的天然资源^[3],含有丰富的抗氧化营养素^[4],已有文献报道慈姑汁能减轻 INH/RFP^[5]、镉^[6]和四氯化碳^[7]引起的肝脏损伤,慈姑保肝效果明显,然而针对慈姑保肝活性成分的研究尚未见报道。本实验将进一步对其不同活性成分的保肝作用强弱进行深入研究,为慈姑的开发利用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

慈姑不同活性成分:取新鲜慈姑,去皮切片,烤箱 55℃ 烘干,粉碎得慈姑粉,称取 20 g,加入 6 倍量 70% 的乙醇,冷浸提取 48 小时,并时时摇晃,提取液经布氏漏斗抽滤,将滤液进行减压旋蒸,浓缩至 15 mL 左右,获得慈姑总提取物;取部分慈姑总提取物于 100 mL 分液漏斗中,依次加入 3 倍量石油醚、乙酸乙酯和正丁醇逐次萃取,分别获得慈姑正丁醇部分、乙酸乙酯部分、石油醚部分及水提部分这 4 种慈姑不同化学成分。

利福平(RFP,北京华威锐科化工有限公司);丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)试剂盒、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和丙二醛(malonaldehyde, MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所);噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)和异烟肼(INH)(sigma 公司)。

1.2 实验细胞与分组

人肝癌细胞株 HepG2 细胞株由中国人民解放军军事医学科学院赠予,于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,0.25% 胰蛋白酶消化传代,取对数生长期的细胞用于实验。将 HepG2 细胞随机分成 9 组:空白组、正常对照组、模型(INH+RFP)组、阳性对照(维生素 E)组和慈姑各活性成分组(即慈姑总提取物组、慈姑正丁醇组、慈姑乙酸乙酯组、慈姑石油醚组和慈姑水提组)。

1.3 仪器设备

DU800 紫外/可见分光光度计(美国贝克曼

库尔特有限公司);细胞培养箱(日本 SANYO 公司);超净工作台(日本 SANYO 公司);酶标仪(美国 BIORAD);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);高速离心机(美国 IEC)。

1.4 细胞存活率的检测

取 HepG2 细胞以每孔 5×10^4 个/mL 接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μ L。24 小时后,按 1.2 分组加药,即空白组无细胞,只加培养基;正常对照组加入正常培养液;模型组加入 INH/RFP 使其质量浓度为(0.1+0.2) mg/mL;阳性对照组加入质量浓度为 50 μ mol/mL 的维生素 E;慈姑各活性成分组分别加入质量浓度为 0.5 mg/mL 的各慈姑活性成分,加入慈姑各活性成分或维生素 E,2 小时后加入质量浓度为(0.1+0.2) mg/mL 的 INH/RFP。每个组设 6 个平行孔,继续培养 24 小时,每孔加入质量浓度为 5 g/L 的 MTT 溶液,继续培养 4 小时,弃上清,每孔加入 150 μ L DMSO,摇床震荡 10 分钟,放入酶标仪上测定 570 nm 处的光吸收值,重复 3 次,计算细胞存活率。

细胞存活率=(实验组-空白组)/(正常对照组-空白组)×100%。

1.5 损伤细胞培养液中 LDH、ALT、AST、MDA 的释放

取 HepG2 细胞以每孔 5×10^4 个/mL 接种于 24 孔细胞培养板中,按 1.2 分组加药,24 小时后收集上清,按试剂盒说明书步骤测定上清液中 LDH、ALT、AST、MDA 活性。

1.6 统计学处理

数据采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据均呈正态分布,2 个独立样本组间均数比较用 *t* 检验;多组间采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慈姑各活性成分对肝细胞活力的影响

与正常对照组比较,模型组的细胞存活率明显降低,具有显著性差异($P < 0.01$);与模型组相比,经慈姑各活性成分及维生素 E 的保护后细胞存活率由 56.0% 分别增加到 57.9%、63.8%、61.4%、86.4%、83.3% 和 87.7%。其中慈姑正丁醇组与损伤组相比,无统计学意义($P > 0.05$),其它

组均差异显著($P<0.01$)。见表 1。

表 1 MTT 法测定各组细胞存活率情况($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	A 值 (OD)	细胞存活率 (%)
正常对照组	6	0.8422±0.0250	100
INH/RFP 模型组	6	0.4717±0.0189 ^a	56.0
慈姑正丁醇组	6	0.4880±0.0205	57.9
慈姑乙酸乙酯组	6	0.5372±0.0179 ^b	63.8
慈姑石油醚组	6	0.5173±0.0385 ^b	61.4
慈姑水提组	6	0.7278±0.0219 ^b	86.4
慈姑总提取物组	6	0.7018±0.0320 ^b	83.3
维生素 E 组	6	0.7382±0.0324 ^b	87.7

注:与正常对照组相比,^a $P<0.01$;与模型组相比,^b $P<0.01$ 。

2.2 慈姑各活性成分对肝细胞 LDH、ALT、AST、MDA 释放的影响

HepG2 细胞与 INH/RFP 共同孵育 24 小时后,细胞培养上清液中的 LDH、ALT、AST、MDA 水平均较正常组明显升高,有显著统计学差异($P<0.01$),说明造模成功。与模型组相比,经过慈姑各活性成分及维生素 E 处理后,细胞培养上清液中的 LDH、ALT、AST、MDA 水平均有下降,其中慈姑石油醚组、慈姑总提取物组和慈姑水提组的四个指标均有统计学意义($P<0.05$),尤其是慈姑水提组效果最明显,具有显著性差异($P<0.01$)。提示慈姑各活性成分均有保肝作用,效果最好的存在于水提部分。见表 2。

3 讨论

INH 与 RFP 合用会明显增加肝毒性。INH 主要在肝脏进行代谢,在 N-乙酰转移酶和酰胺键水解酶的作用下,直接或间接生成具有肝毒性的乙酰肼和肼;而 RFP 诱导的肝药酶加速了异烟肼的

代谢^[8-9],代谢产物可产生大量的氧自由基,攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引起脂质过氧化反应,产生的过氧化脂质可进一步加重生物膜的损伤,最终导致肝细胞损伤甚至坏死。本实验选择检测培养基中 LDH、ALT、AST、MDA 的活性,通过肝细胞损伤的常用检测指标来评价肝细胞的损伤情况并通过 MTT 实验来检测肝细胞的生长和存活情况。

本实验结果显示:INH 与 RFP 合用损伤肝细胞后,与正常组相比,细胞存活率明显降低,经统计有显著性差异($P<0.01$),细胞培养上清液中的 LDH、ALT、AST、MDA 水平显著升高,经统计有显著性差异($P<0.01$),表明造模成功,INH 与 RFP 合用损伤肝细胞的机制与脂质过氧化相关;给予慈姑各活性成分处理后,与模型组相比,细胞存活率有所升高,除慈姑正丁醇组之外,都有显著差异($P<0.01$),细胞培养上清液中的 LDH、ALT、AST、MDA 水平有所降低,其中慈姑石油醚组、慈姑总提取物组和慈姑水提组的四个指标均有统计学意义($P<0.05$),尤其是慈姑水提组效果显著($P<0.01$)。综上,慈姑各活性成分中保肝效果最好的存在于水提部分,其保肝机制可能与清除自由基、抗脂质过氧化有关。

慈姑在中国资源丰富,民间常为药用和风味食用,已有研究证明其有抗氧化^[10]、调节免疫^[11]、降糖^[12]等生物活性,本实验初步揭示了慈姑活性成分具有保护肝细胞的作用,作为一种广泛栽培、价格低廉的药食同源资源,有望成为未来保肝产品的开发利用热点,本研究初步筛查出慈姑保肝效果最显著的活性成分存在于水提部分,有关慈姑水提部分的有效浓度范围、保肝水提部分的主要活性成分及其作用机理值得进一步探讨。

表 2 各组 LDH、ALT、AST、MDA 的释放情况($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	AST/(U/L)	ALT/(U/L)	LDH/(U/L)	MDA/(U/mg)
正常对照组	6	15.42±6.02	18.74±6.49	222.22±24.34	1.41±0.42
INH/RFP 模型组	6	28.83±6.16 ^a	42.32±6.37 ^a	844.44±73.03 ^a	4.14±0.91 ^a
慈姑正丁醇组	6	23.91±9.51	37.10±4.53	774.07±116.25	3.20±0.68 ^b
慈姑乙酸乙酯组	6	21.03±4.78 ^b	32.38±4.27 ^c	755.56±88.89	2.97±0.82 ^c
慈姑石油醚组	6	20.24±6.31 ^b	34.09±4.41 ^b	692.59±117.10 ^c	3.14±0.97 ^b
慈姑水提组	6	18.36±4.29 ^c	23.26±5.38 ^c	466.67±76.98 ^c	2.64±0.60 ^c
慈姑总提取物组	6	21.06±8.34 ^b	22.74±6.34 ^c	581.48±125.25 ^c	2.51±0.61 ^c
维生素 E 组	6	18.83±5.29 ^b	22.47±5.40 ^c	400.00±54.43 ^c	2.27±0.48 ^c

注:与正常对照组相比,^a $P<0.01$;与模型组相比,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$

参 考 文 献

- [1] 滕光菊,孙颖,常彬霞,等. 418 例药物性肝损害临床特征及预后分析[J]. 肝脏,2013,18(1):11-14.
- [2] 郑晓丹,洪丽如,陈瑞烈. 抗结核药所致药物性肝损伤 80 例临床分析[J]. 热带医学杂志,2015,15(4):536-538.
- [3] 潘晓军,刘芬. 慈姑的研究进展[J]. 西北药学杂志,2006,21(3):146.
- [4] 陆祖福,吴小南,汪家梨,等. 慈菇营养素成分分析与抗氧化作用机理探讨[J]. 海峡预防医学杂志,2002,8(1):50-51.
- [5] 廖艳,孙奇,彭桂英,等. 慈菇对异烟肼和利福平致大鼠肝损伤的保护作用[J]. 北京中医药大学学报,2012,35(7):466-469.
- [6] 陆祖福,吴小南,汪家梨,等. 慈菇对镉致急性肝脏过氧化损伤影响的研究[J]. 中国公共卫生,2002,18(4):388-389.
- [7] 吴小南,汪家梨. 慈菇对小鼠四氯化碳肝损伤保护作用的探讨[J]. 中国公共卫生学报,1996,15(4):238-239.
- [8] Lian Y, Zhao J, Xu PY, et al. Protective effects of metallothionein on isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity in mice[J]. PLoS One, 2013, 8(8):e72058.
- [9] 段自皞. 异烟肼和利福平肝脏毒性研究进展[J]. 现代医学, 2013, 41(6):430-433.
- [10] 吴小南,陆祖福,黄芳,等. 一氧化氮在镉致急性肝损伤中的作用及慈菇的干预效果[J]. 中国公共卫生,2002,18(8):907-908.
- [11] 吴小南,杨雪帆,朱萍萍,等. 慈菇多糖对免疫功能低下小鼠免疫调节作用[J]. 中国公共卫生,2015,31(1):73-75.
- [12] 张翠香,罗永会,徐春萍. 野生慈菇多糖对糖尿病小鼠血糖和血脂作用研究[J]. 考试周刊,2013,(27):194-195.

(收稿日期: 2016-01-28)

(本文编辑: 蒲晓田)