

清脂健肝方对酒精性肝损伤的防治作用

戴宁, 曾民德, 李继强, 邱德凯

戴宁, 大连医科大学第一附属医院消化内科 辽宁省大连市 116011
曾民德, 李继强, 邱德凯, 上海市消化疾病研究所 上海市 200001
通讯作者: 戴宁, 116011, 辽宁省大连市西岗区中山路222号, 大连医科大学第一附属医院消化内科. daining@dl.cn
电话: 0411-83635963-3163
收稿日期: 2005-02-28 接受日期: 2005-04-01

摘要

目的: 从细胞学水平研究自研中药清脂健肝方对酒精性肝损伤的防治作用。

方法: 原位灌注法分离大鼠肝细胞, 建立酒精性肝损伤的体外培养模型, 分别加入不同浓度中药原液, 观察其对酒精性肝损伤的防治作用。

结果: 不同浓度的中药原液均可显著抑制肝细胞ALT、AST的漏出;减少肝细胞³H-甘油掺入率;降低肝细胞脂质过氧化产物丙二醛的升高, 具有稳定肝细胞膜的作用, 并呈现出量效关系。

结论: 从细胞学水平进一步证实, 清脂健肝方能提高肝细胞的抗氧化力, 可对酒精性肝病起防治作用。

戴宁, 曾民德, 李继强, 邱德凯. 清脂健肝方对酒精性肝损伤的防治作用. 世界华人消化杂志 2005;13(12):1457-1459
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1457.asp>

0 引言

随着酒精消耗量的增加, 酒精对肝脏的损害日渐突出^[1-2]. 目前, 尚缺乏防治酒精性肝病的有效药物, 因此, 有必要积极探索酒精性肝病的防治. 我们曾经观察到自研的复方中药清脂健肝方对大鼠酒精性脂肪肝有较好的防治作用^[3]. 为此, 建立酒精性肝损伤的细胞培养模型, 进一步从细胞水平研究该复方中药的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 动物: 清洁级Wistar ♂大鼠, 体质量150-180 g, 购自中科院上海实验动物中心. 主要试剂: IV型胶原酶、胰蛋白酶抑制剂、1, 6-二苯基-1, 3, 5-己三烯(DPH)购自Sigma公司. 199培养基干粉、MEM培养基干粉购自GIBCO公司. 小牛血清(FCS)购自上海第二医科大学科技中心. Ficol淋巴细胞分离液为上海试剂二厂生产. ³H-甘油(比放射为37.0 MBq, 放射纯度>95)购自Amersham公司. ALT、AST和丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物公司. 主要仪器: 荧光分光光度计RF-5000(日本岛津). 药物: 清脂健肝方由黄精、山楂、泽泻、丹参、陈皮等

药组成, 经水煎醇提法制成含1 g/mL生药的无菌中药原液, 由上海中医药大学制剂室提供。

1.2 方法

1.2.1 鼠肝细胞的分离和培养 原位灌注法分离肝细胞, 先后灌入无钙的Hank's液及含0.5 mg/L胶原酶、Ca²⁺的Hank's液各100 mL, 取出肝脏, 分散细胞, 100目的滤网过滤, 500 r/min离心1 min;然后以492 mL/L的Ficol液精制肝细胞;精制后的肝细胞用MEM培养基洗涤3次, 用含100 mL/L FCS的199培养液悬浮细胞, 接种到培养皿(5 × 10⁸个细胞/L, 每皿3 mL). 锥虫蓝检测细胞活力, 倒置显微镜观察细胞形态。

1.2.2 乙醇诱导肝细胞损伤模型的建立及药物的添加 将含肝细胞的培养皿置于37℃、50 mL/L CO₂的细胞培养箱中, 4 h后更换培养液, 此后每24 h更换一次培养液, 继续培养48 h, 更换新鲜培养液后加入80 mmol/L乙醇, 并分别加入10 g/L、30 g/L、90 g/L的中药原液, 并设正常对照组, 继续培养24 h, 检测以下指标。

1.2.3 ALT、AST活性测定 取1 mL上述肝细胞悬液, 4℃, 1 000 r/min离心5 min, 分别取100 μL上清液测定ALT、AST, 按试剂盒说明书操作。

1.2.4 ³H-甘油掺入率的测定 在上述培养的肝细胞内加入³H-甘油使其终浓度为14.8 kBq, 继续培养2 h, 终止反应, 抽提、分离脂质, 将被标记的甘油三脂溶解在适量的CHCl₃中, 然后收集到49号玻璃纤维滤膜上, 阴干后加入1 mL闪烁液, 在YSJ-75型液闪读数仪上测定样品的放射计数(cpm)。

1.2.5 肝细胞MDA的测定 在培养皿中加入1 mL PBC, 用细胞刮刀搜集细胞到玻璃试管中, 加入1 mL 100 mL/L的三氯乙酸, 旋涡振荡1 min, 然后1 000 r/min, 4℃离心5 min, 分别取100 μL上清液测定MDA, 按试剂盒说明书操作。

1.2.6 细胞膜流动性测定 悬浮肝细胞于0.01 mmol/L磷酸盐缓冲液中, 调整细胞数, 取细胞悬液1.5 mL, 加入等体积DPH荧光探针液, 混匀后25℃温育20 min, 用荧光分光光度计测定荧光偏振度(P), 激发光波长为362 nm, 发射光波长432 nm, 计算P, 细胞膜流动性与荧光偏振度值成反比。

统计学处理 计量资料用mean ± SD表示, 组间比较采用t检验, P<0.05为差异有显著意义。

2 结果

2.1 正常肝细胞的得率、活力和形态 每个肝脏正常肝细

胞得率在 10^8 以上, 锥虫蓝染色排除法检测活力 $>90\%$, 培养 24 h 后在相差显微镜下肝细胞伸展为扁平多角形, 胞质透明度高, 大多数细胞相互连接(图1)。



图1 正常肝细胞($\times 30$)。

2.2 药物对培养液 ALT、AST 活性的影响 原代培养大鼠肝细胞加入 80 mmol/L 乙醇 24 h 后, 培养液中 ALT、AST 的活性比正常对照组显著升高 ($P<0.01$), 而各剂量组的中药原液均可显著抑制培养液中 ALT、AST 的升高(表1)。

2.3 药物对 ^3H -甘油掺入率的影响 加入 80 mmol/L 乙醇 24 h 后, 肝细胞 ^3H -甘油掺入率比正常组显著升高 ($P<0.01$), 而不同剂量的中药原液均可减少 ^3H -甘油掺入率, 其中 10 mg 和 30 mg 剂量组的效果相同, 而 90 mg 剂量组效果较好(表1)。

2.4 药物对肝细胞 MDA 变化的影响 加入 80 mmol/L 乙醇 24 h 后, 肝细胞 MDA 的含量比正常组显著升高 ($P<0.01$), 而不同剂量的中药原液均可减少 MDA 的含量, 其中 10 mg 和 30 mg 剂量组的效果相同, 而以 90 mg 剂量组的效果较好(表1)。

2.5 细胞膜流动性 加入 80 mmol/L 乙醇 24 h 后, 荧光偏振度显著升高 ($P<0.01$), 细胞膜的流动性降低, 而不同剂量的中药原液均可使荧光偏振度减少, 以 90 mg 剂量组效果较好 ($P>0.05$)。

3 讨论

研究证实, 乙醇及其代谢物乙醛对肝细胞有直接的毒性

作用, 可使肝细胞的代谢活性下降^[4-5]。我们的研究结果也表明, 在原代培养的大鼠肝细胞内加入 80 mmol/L 乙醇(相当于肝脏每天代谢乙醇 60 g)可使反映肝细胞损害的酶学指标 ALT、AST 的含量显著升高, AST 升高明显高于 ALT 的升高, 不同浓度的药物原液均可显著抑制肝细胞 ALT、AST 的漏出。

体外实验证实, 乙醇可以使原代培养肝细胞 TG 的合成增加, 其机制是增加合成 TG 的底物 FFA 的吸收而降低极低密度脂蛋白(VLDL)的分泌。甘油是合成 TG 的另一重要底物。甘油可以合成 3-磷酸甘油, 3-磷酸甘油一方面可以直接合成甘油三酸酯, 另一方面, 脂肪酸的氧化或脂化取决于线粒体外膜上肉碱乙酰转移酶或磷酸甘油乙酰转移酶之间的活性, 3-磷酸甘油浓度的升高可使酒精的氧化还原反应向脂肪酸的酯化方向发展而不是向氧化的方向发展^[6]。我们的研究表明, 在原代培养的大鼠肝细胞内加入 80 mmol/L 乙醇培养 24 h, ^3H -甘油掺入率明显增加, 相应细胞内甘油三脂的合成增加, 而不同浓度的药物原液均可降低 ^3H -甘油的掺入率, 这说明药物可直接阻止肝细胞脂质的合成。

体内研究证实, 脂质过氧化反应在酒精性肝损伤的发病机制中起重要作用^[7-10], 而抗氧化治疗则能有效防治酒精性肝损伤^[11-13]。乙醇可使原代培养肝细胞产生强烈的氧应激, 而使细胞内的抗氧化剂含量如谷胱甘肽(GSH)下降^[14], 氧化与抗氧化机制的失衡使有害自由基产生增多, 细胞膜中富含多不饱和脂肪酸, 极易受自由基攻击, 发生脂质过氧化反应, 脂质过氧化终产物 MDA 能与膜脂质、膜蛋白交联而降低细胞膜的流动性^[5, 9, 15]。我们的结果显示, 加入 80 mmol/L 乙醇后, 反映脂质过氧化反应的可靠指标 MDA 的含量显著升高, 同时细胞膜的流动性降低, 而不同浓度的药物原液均可使 MDA 的含量下降, 恢复细胞膜的流动性, 并呈现量效关系。

我们从细胞学水平进一步证实, 自研的复方中药既有直接保护肝细胞的作用, 也可以减少肝细胞的脂质合成, 又具有抑制脂质过氧化反应从而起到稳定肝细胞膜的作用, 其作用机制是提高了肝细胞的抗氧化能力, 阻止了乙醇及其代谢物对肝细胞的直接毒性作用。

表1 中药对 ALT、AST 活性及 ^3H -甘油掺入率、MDA 变化的影响(mean \pm SD)

组别	n	ALT(nkat/L)	AST(nkat/L)	^3H -甘油掺入率(cpm/ 1.5×10^6 细胞)	MDA(nmol/mL)
正常对照组	6	4 129.16 \pm 6.77	4 760.95 \pm 7.12	1 967.50 \pm 232.97	18.24 \pm 7.01
乙醇 80 mmol/L	6	8 163.30 \pm 16.15 ^b	10 255.38 \pm 12.11 ^b	2 740.17 \pm 420.40 ^b	37.94 \pm 11.36 ^b
乙醇 80 mmol/L + 10 mg/mL 中药原液	6	6 001.20 \pm 11.41	6 878.04 \pm 9.52	2 414.66 \pm 375.00 ^a	33.82 \pm 10.01 ^a
乙醇 80 mmol/L + 30 mg/mL 中药原液	6	5 207.71 \pm 10.96	5 952.86 \pm 12.61	2 399.61 \pm 330.34 ^a	29.79 \pm 10.36 ^a
乙醇 80 mmol/L + 90 mg/mL 中药原液	6	4 965.99 \pm 10.56	5 221.04 \pm 11.31	2 288.00 \pm 318.98	21.39 \pm 8.38

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 正常对照组。

4 参考文献

- 1 鲁晓岚, 陶明, 罗金燕, 耿燕, 赵平, 赵红莉. 西安酒精性肝病流行病学. 世界华人消化杂志 2003;11:719-722
- 2 厉有名, 陈卫星, 虞朝辉, 乐敏, 刘有特, 徐根云, 季峰, 李舒丹. 浙江省酒精性肝病流行病学调查概况. 中华肝脏病杂志 2003;11:647-649
- 3 戴宁, 曾民德, 彭延申, 李继强, 邱德凯, 陆伦根. 复方中药对酒精性脂肪肝肝细胞色素 P450 II E₁ 表达的影响. 中华肝脏病杂志 2003;11:657-659
- 4 Henzel K, Thorborg C, Hofmann M, Zimmer G, Leuschner U. Toxicity of ethanol and acetaldehyde in hepatocytes treated with ursodeoxycholic or tauroursodeoxycholic acid. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644:37-45
- 5 Sergeant O, Pereira M, Belhomme C, Chevanne M, Huc L, Lagadic-Gossman D. Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313:104-111
- 6 Lamb RG, Koch JC, Snyder JW, Huband SM, Bush SR. An in vitro model of ethanol-dependent liver cell injury. *Hepatology* 1994;19:174-182
- 7 Stewart SF, Vidali M, Day CP, Albano E, Jones DE. Oxidative stress as a trigger for cellular immune responses in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 2004;39:197-203
- 8 易辉, 王新, 苗继延, 樊代明. 环氧合酶-2 对酒精性肝损伤大鼠氧化/抗氧化的作用. 世界华人消化杂志 2004;12:1934-1936
- 9 Castilla R, Gonzalez R, Fouad D, Fraga E, Muntane J. Dual effect of ethanol on cell death in primary culture of human and rat hepatocytes. *Alcohol Alcohol* 2004;39:290-296
- 10 Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology* 2002;35:62-73
- 11 高健, 吴显才, 李孝生, 沈鼎明. 还原型谷胱甘肽治疗酒精性肝病的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:809-811
- 12 崔巍, 苏小林, 傅宝玉. 抗纤复方 1 号抗酒精性肝病的实验研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1245-1249
- 13 Wheeler MD, Nakagami M, Bradford BU, Uesugi T, Mason RP, Connor HD, Dikalova A, Kadiiska M, Thurman RG. Overexpression of manganese superoxide dismutase prevents alcohol-induced injury in the rat. *J Biol Chem* 2001;276:36664-36672
- 14 Cardin R, D'Errico A, Fiorentino M, Cecchetto A, Naccarato R, Farinati F. Hepatocyte proliferation and apoptosis in relation to oxidative damage in alcohol-related liver disease. *Alcohol Alcohol* 2002;37:43-48
- 15 Abraham P, Wilfred G, Ramakrishna B. Oxidative damage to the hepatocellular proteins after chronic ethanol intake in the rat. *Clin Chim Acta* 2002;325:117-125

编辑 徐协群 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国生物医学基金论文摘要网站免费开通

本刊讯 中国生物医学基金论文摘要是由世界胃肠病学杂志社研制的大型生物医学基金论文摘要数据库. 该库收录自 1995-2004 年, 国内生物医学期刊 1191 种发表的各类基金资助论文摘要 155115 条, 其中国家基金资助的论文为 70167 条(45.23%), 其他基金资助的论文为 84948 条(54.76%).

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者、资助), 期刊搜索(A-Z 排序). 论文排序: 期刊论文数, 点击论文数.

2 网址

中国生物医学基金论文摘要(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)

3 论文摘要格式

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉. 鼻咽癌中染色体

3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定. 癌症 2003 年;22(1): 1-5

鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287, 30000188)

背景与目的: 研究显示鼻咽癌细胞 3p14-25 存在高频率杂合性丢失位点. 本研究拟寻找与筛选染色体 3p21 区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(expressed sequence tag, EST), 为定位候选克隆鼻咽癌相关新基因奠定基础. 方法: 充分利用网上的生物信息资源, 采用定位查找 ESTs, 对 ESTs 进行同源性比较分析、筛选; 运用逆转录 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)方法, 检测 ESTs 在鼻咽癌和正常鼻咽组织中的表达; 并用 Northern blot 杂交方法, 检测 EST 在人其他正常组织及肿瘤细胞系的表达状况. 结果: 在 3p21 区域筛选到一个在鼻咽癌中表达下调的 EST(N31985), 在 60.00%(3/5)的鼻咽癌细胞株及 47.06% (16/34)的鼻咽癌活检组织检测到有 EST (N31985)表达下调, 与正常鼻咽上皮组织相比较, 差异有统计学意义(P<0.05). 结论: 染色体 3p21 区域 EST(N31985)在鼻咽癌中表达下调, 提示其可能参与鼻咽癌癌变过程. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)