

- Gastroenterology* 1982; 83 : 75
- 10 Johnson LR, Guthrie P. Effect of cholecystokinin and 16, 16-dimethyl prostaglandin E₂ on RNA and DNA of gastric and duodenal mucosa. *Ibid* 1976; 70 : 59
- 11 Giles Kw, Myers A. An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. *Nature* 1965; 206 : 93
- 12 Allen A, Garner A. Mucus and bicarbonate secretion in the stomach and their possible role in mucosal protection. *Gut* 1980; 21 : 249
- 13 Watanabe K, Watanabe H, Goto Y, Shimizu M, Maeda-Hagiwara M. γ -Butyrolactone enhances the activity of GABA in the gastric acid secretion of anesthetized rats. *Jpn J Pharmacol* 1983; 33 : 1163
- 14 Vayer P, Mandel P, Maitre M. Conversion of γ -hydroxybutyrate to γ -aminobutyrate in vitro. *J Neurochem* 1985; 45 : 810

* * * * *

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1989 Jul, 10 : (4) 353-356

五味子乙素对原代培养大鼠肝细胞脂质过氧化的抗氧化作用

张铁梅¹、王宝恩²、刘耕陶 (中国医学科学院药物研究所, 北京 100050, 中国)

Action of schizandrin B, an antioxidant, on lipid peroxidation in primary cultured hepatocytes

ZHANG Tie-Mei¹, WANG Bao-En², LIU Geng-Tao

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

ABSTRACT The action of schizandrin B (Sin B) was observed in freshly isolated hepatocytes damaged by FeSO₄/cysteine and CCl₄. Two types of free radicals, ·OH and ·CCl₃, generated from FeSO₄/cysteine and CCl₄, respectively, induced lipid peroxidation in hepatocytes. It was found that the speed of lipid peroxidation (MDA production) and the degree of alteration in hepatocyte morphology were closely related to the type of free radicals. MDA production and membrane protrusion of hepatocytes injured by FeSO₄/cysteine were faster and more severe than those observed with CCl₄. Sin B was shown to decrease the production of MDA and the release of GPT and LDH, and to increase hepatocyte viability as well as maintaining the integ-

rity of the hepatocyte membrane surface. These actions of Sin B were stronger than vitamin E at the same concentration. It was observed that no inhibitory effect of phenobarbital, a typical inducer of cytochrome P-450, as Sin B induced liver cytochrome P-450, on MDA production in hepatocytes damaged by FeSO₄/cysteine. The results suggest that Sin B possesses antioxidant activity.

KEY WORDS free radicals; lipid peroxides; malondialdehyde; antioxidants; schizandrin B

摘要 将新鲜分离的大鼠肝细胞体外培养, 分别用可产生自由基的 FeSO₄/半胱氨酸系统及 CCl₄ 引起肝细胞膜的脂质过氧化。五味子乙素对这两种不同自由基产生系统所引起的肝细胞膜脂质过氧化损伤均有保护作用, 使肝细胞丙二醛的生成及 LDH 和 GPT 酶的释放均减少, 肝细胞存活率提高, 细胞膜形态保持完整。表明五味子乙素有抗氧化作用。

Received 1987 Dec 22 Accepted 1989 Jan 31

¹ 卫生部北京老年医学研究所细胞室, 北京 100730

² Beijing Friendship Hospital, Beijing 100050

关键词 自由基; 脂质过氧化; 丙二醛; 抗氧化剂; 五味子乙素

近年来, 活性氧自由基引起生物膜上多聚不饱和脂肪酸的过氧化被认为与细胞损伤、机体衰老乃至肿瘤发生有密切关系⁽¹⁻³⁾。人们希望由此研究抗氧化剂作为防治某些疾病的新途径。五味子在中医作为滋补强壮剂, 近十余年来又用于慢性肝炎的治疗。该药对动物化学性肝损伤有保护作用, 还可对抗活性氧自由基引起的肝微粒体脂质过氧化及对抗 H_2O_2 的过氧化作用。本研究系探讨五味子乙素对 CCl_4 和 $FeSO_4$ /半胱氨酸所引起的体外原代培养大鼠肝细胞脂质过氧化和细胞膜表面形态损伤的影响。

MATERIALS AND METHODS

Wistar 大鼠 11 只, 体重 $222 \pm SD$ 30 g, ♂, 由中国医学科学院实验动物中心供给。胶原酶与胰酶抑制剂系日本和光纯药工业株式会社产品。1640 培养基产自日本日水制药株式会社。半胱氨酸购自英国 L Light 公司。小牛血清为天津生化制品厂生产。五味子乙素为本所植化室提供 (CP, mp 116-8°C, M_r 400)。其余试剂及药品均购自国内市场。试剂为 AR 级。

肝细胞的分离与培养 采用胶原酶两步循环灌流法⁽⁴⁾分离大鼠肝细胞, 收获率 $1-6 \times 10^6$ 细胞/肝, 存活率 $>90\%$ 。1640 培养基用无离子水溶解, $0.45 \mu m$ 滤膜过滤除菌, $4^\circ C$ 存放备用。用前加小牛血清 (10%), 青霉素 (100 IU/ml) 链霉素 (100 μg /ml) 及胰岛素 (1 mol/L)。用上述培养液混匀分离好的肝细胞, 以 1×10^6 细胞/ml 的密度接种于 20 ml 培养瓶内, 置 CO_2 培养箱 ($37^\circ C$, $95\% O_2 + 5\% CO_2$) 内培养。

脂质过氧化物-malondialdehyde (MDA) 的测定 以 MDA 的生成量表示肝细胞脂质过氧化的程度。MDA 的测定采用硫代巴比妥酸荧光法⁽⁵⁾。肝细胞培养 1 h 后, 损伤组内分别

加入 CCl_4 (终浓度 7.5 mmol/L) 或 $FeSO_4$ (终浓度 50 μmol /L, 内含半胱氨酸 200 μmol /L), 取全部培养液和细胞测定 MDA 生成量。给药组在肝细胞预培养 1 h 后, 分别加入 3 个剂量五味子乙素 (溶于 DMSO, 终浓度为 5, 25, 50 μg /ml), 作用 1 h 后, 再加入与损伤组等量的 CCl_4 或 $FeSO_4$ 。五味子乙素 + CCl_4 实验组在损伤后 3 h, 五味子乙素 + $FeSO_4$ /半胱氨酸实验组在损伤后 1 h 分别取全部培养液和细胞测定 MDA 生成量。

转氨酶 (GPT) 乳酸脱氢酶 (LDH) 的测定 GPT 采用改良金氏法, LDH 以乳酸为基质, 加入 DPN, 用比色法测定。

扫描电镜标本制作 培养瓶内加入盖玻片, 使肝细胞贴壁生长于上。取出后经 2.5% 戊二醛, 1% 锇酸固定, 乙醇梯度脱水, 临界点干燥, 离子喷涂后在扫描电镜 (Can Scan 3-30 Avc) 下观察肝细胞膜的表面形态并照象。

酶释放测定实验与扫描电镜实验中肝细胞毒物与药物处理方式与上述 MDA 测定实验中相同。肝细胞存活率采用 trypan 蓝摄入法。

RESULTS

损伤作用时间对肝细胞 MDA 生成的影响 无论是 CCl_4 还是 $FeSO_4$ 损伤实验中, 肝细胞 MDA 生成量随损伤作用时间延长而增加, 但两者又有所不同。在 $FeSO_4$ 损伤实验中, MDA 生成得很快, 加入 $FeSO_4$ 7.5 mmol/L 后, MDA 含量已开始增加, 并在 2 h 内不断上升。 CCl_4 损伤实验中, MDA 生成增加在 1 h 左右出现, 3 h 达高峰, 以后开始下降 (Fig 1)。在上述两组实验中肝细胞存活率相应减少。

五味子乙素的抗氧化作用

1 对脂质过氧化物 MDA 生成的影响 5, 25, 50 μg /ml 的五味子乙素对 CCl_4 和 $FeSO_4$ /半胱氨酸两种自由基产生系统所引起的肝细胞 MDA 生成均有显著抑制作用, 且呈明显的剂量-效应关系。MDA 生成量随五味子乙素剂量加大而减少 (Fig 2)。特别是对 $FeSO_4$ 损伤

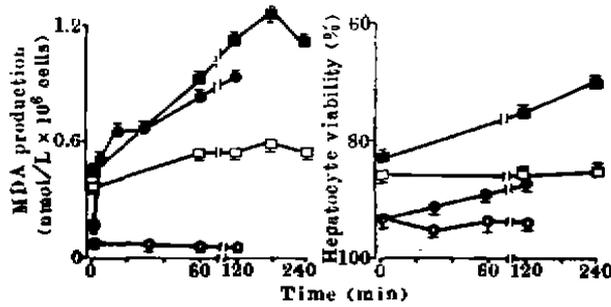


Fig 1. Effect of time of damage on hepatocytes malondialdehyde production and viability induced by FeSO₄ and CCl₄. (○) Fe²⁺ control, (●) Fe²⁺ damage, (□) CCl₄ control, (■) CCl₄ damage.

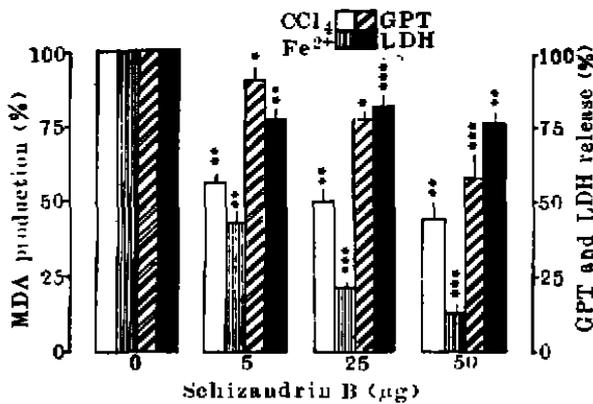


Fig 2. Effect of schizandrin B (Sin B) on hepatocytes malondialdehyde production induced by FeSO₄ and CCl₄, and GPT and LDH release induced by FeSO₄ *in vitro*. All values are expressed as % of damaged production. Each bar of MDA production is the $\bar{x} \pm SD$ of triplicate determinations, each bar of enzyme release is the $\bar{x} \pm SD$ of 6 determinations. **P* > 0.05, ***P* < 0.05, ****P* < 0.01.

造成的MDA生成抑制作用更为显著。

2 对GPT和LDH释放的影响 5, 25, 50 μg/ml的五味子乙素对FeSO₄所致LDH和GPT的释放均有一定的抑制作用(Fig2), 而对CCl₄所致的LDH和GPT释放却无抑制作用。

3 对肝细胞存活率的影响 5, 25, 50 μg/ml五味子乙素均能使CCl₄和FeSO₄/半胱氨酸损伤中肝细胞存活率有所提高。损伤组存活率为72-79%左右, 给药组在85-87%, 有明显统计学差异。

4 肝细胞形态学的扫描电镜观察

4.1 对FeSO₄/半胱氨酸损伤的影响 在未加五味子乙素的损伤组中96%的肝细胞形态出现明显改变。细胞呈椭圆形且不太规则, 细胞中心部位表面绒毛脱落, 周边部位绒毛大部融合呈团状突起(Fig 3 B, Plate 4, 以下各图同)。而经25 μg/ml五味子乙素培育过的肝细胞形态基本完整(Fig 3 C)细胞膜表面绒毛仅较正常对照肝细胞(Fig 3 A)略粗, 表面绒毛聚合呈团状突起的仅占27%。明显低于损伤组。

4.2 对CCl₄损伤的影响 损伤组内69%的肝细胞膜表面绒毛聚合成球状突起, 破烂(Fig 3 D), 经25 μg/ml五味子乙素培育过的肝细胞表面膜基本正常(Fig 3 E)。有轻度上述改变的占34%, 亦明显低于损伤组。

维生素E及苯巴比妥对肝细胞脂质过氧化的作用 维生素E及苯巴比妥处理肝细胞的实验条件同五味子乙素实验。在FeSO₄/半胱氨酸损伤实验中, 维生素E对肝细胞MDA生成和酶的释放亦有一定抑制作用, 但作用程度不如五味子乙素明显(Tab 1)。

苯巴比妥(5, 25, 50, 100 μg/ml)与肝细胞共同培育后, 在FeSO₄/半胱氨酸损伤中, 损伤组MDA生成量为3.71 nmol/1 × 10⁶cells, 苯巴比妥处理组为3.48-4.2 nmol/1 × 10⁶cells。

Tab 1. Protective effect of schizandrin B 25 μg and vitamin E 25 μg against Fe²⁺/cysteine-induced hepatocytes injury *in vitro*. $\bar{x} \pm SD$. **P* > 0.05, ***P* < 0.05, ****P* < 0.01.

Drug	MDA (nmol/1 × 10 ⁶ cells)	LDH (IU/100 μl medium)	GPT	Viability (%)
FeSO ₄	2.69 ± 0.54	522 ± 31	499 ± 16	74 ± 3.05
FeSO ₄ + Vit E	1.14 ± 0.3	494 ± 67	417 ± 18	90 ± 1.15
FeSO ₄ + Sin B	0.33 ± 0.007	271 ± 14	365 ± 65	87 ± 1.14

对 MDA 的生成毫无抑制作用。

DISCUSSION

CCl₄ 经细胞色素 P-450 系统激活生成自由基 ·CCl₃, FeSO₄ 在有还原剂存在下, 一方面通过微粒体上黄素蛋白的电子传递体系诱发产生超氧阴离子 (O₂⁻), 进一步催化 O₂⁻ 与 H₂O₂ 反应生成羟自由基 (·OH), 使氧化性损伤作用较低的 O₂⁻ 转变为具有强氧化能力的 ·OH。本实验结果表明, 利用 FeSO₄/半胱氨酸系统和 CCl₄ 造成原代培养肝细胞脂质过氧化损伤可作为一种体外研究自由基与抗氧化的实验方法。

五味子乙素是从五味子种仁中提取的有效单体之一, 属联苯环辛烯类化合物⁽⁶⁾。在上述两种不同类型自由基的实验系统中均有抗脂质过氧化作用, 而且对有强氧化能力的 ·OH 拮抗作用更显著。为探讨五味子乙素抗氧化作用是否与其对细胞色素 P-450 诱导作用⁽⁷⁾有关, 特选用已知细胞色素 P-450 诱导剂苯巴比妥与肝细胞共同培育, 然后以 FeSO₄/半胱氨酸造成脂质过氧化。其结果表明苯巴比妥对肝细胞丙二醛生成毫无作用。由此看来, 五味子乙素的抗氧化作用与其对 P-450 酶系的诱导无关。既往的实验表明五味子中含有多种抗氧化成分⁽⁸⁾。究竟这些包括五味子乙素在内的成分是怎样清除自由基从而阻断脂质过氧化反应的,

尚需进一步研究。不论怎样, 五味子乙素有可能成为一种新类型的抗氧化剂。它的这些作用对于了解五味子治疗慢性肝炎和其它疾病及作为中医滋补强壮药提供了新的实验依据。

REFERENCES

- 1 Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222 : 1
- 2 Bulkley GB. The role of oxygen free radicals in human disease processes. *Surgery* 1983; 94 : 407
- 3 Pryor WA. Cancer and free radicals. *Basic Life Sci* 1986; 39 : 45
- 4 Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976; 13 : 29
- 5 Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 1976; 15 : 212
- 6 陈延镛、舒增宝、黎莲娘。五味子的研究——北五味子降谷丙转氨酶有效成分的分离和鉴定。 *中国科学* 1976; 22 : 98
- 7 Liu GT, Bao TT, Wei HL, Song ZY. Induction of hepatocyte microsomal cytochrome P-450 by schizandrin B in mice. *Acta Pharm Sin* 1980; 15 : 206
- 8 Lu H, Liu GT. Anti-oxygen free radical activity of eight dibenzocyclooctadiene lignans isolated from *Fructus schisandrae*. In: *The 30th anniversary of the founding of the Chinese Academy of Medical Sciences The 70th anniversary of the founding of the Peking Union Medical College, Collection of Scientific Papers*. Beijing: China Science and Technology Press, 1987 : 119-20