

## 蕊木宁抗四氯化碳肝损伤的作用原理

黄婉芸<sup>1</sup>、刘耕陶<sup>2</sup> (中国医学科学院药物研究所药理室, 北京 100050, 中国)

### Mechanism of the protective action of kopsinine against hepatotoxicity of carbon tetrachloride

HUANG Wan-Yun<sup>1</sup>, LIU Geng-Tao<sup>2</sup> (Department of Pharmacology, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT** Kopsinine 1 mmol/L inhibited microsomal lipid peroxidation (MDA) formation induced by CCl<sub>4</sub> *in vitro*. Metyrapone, a specific inhibitor of cytochrome P-450, partially counteracted the inhibitory effect of kopsinine on MDA formation. Oral administration of kopsinine 200 mg/kg decreased the formation of diene conjugates in liver microsomes in CCl<sub>4</sub> (1 ml/kg ig) intoxicated mice. Kopsinine also inhibited <sup>14</sup>CCl<sub>4</sub> covalent binding to lipids and proteins of liver microsomes. But the degree of inhibition was not as pronounced as that of inhibition of MDA. The metabolic conversion of CCl<sub>4</sub> to carbon monoxide and the utilization of NADPH in the course of CCl<sub>4</sub> metabolism by liver microsomes were increased by kopsinine *in vitro*. It appears that to maintain the stability of membranes of liver cells is the mode of the protective action of kopsinine.

**KEY WORDS** kopsinine; carbon tetrachloride poisoning; lipid peroxides; malondialdehyde

**摘要** 蕊木宁 1 mmol/L 能明显抑制 CCl<sub>4</sub> 引起的肝微

Received 1988 Feb 1 Accepted 1988 Mar 2

<sup>1</sup> Department of Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 630006, China

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed

粒体脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的生成, 抑制率达 51%。预先 24 h 给小鼠 ig 蕊木宁 200 mg/kg 能降低 CCl<sub>4</sub> 所引起的肝脏共轭双烯物的升高。此外, 蕊木宁对 <sup>14</sup>CCl<sub>4</sub> 与肝微粒体脂质和蛋白质共价结合的抑制作用较弱。蕊木宁拮抗 CCl<sub>4</sub> 肝损伤的作用原理可能主要是阻断了 CCl<sub>4</sub> 对膜结构的损伤作用。

**关键词** 蕊木宁, 四氯化碳中毒, 脂质过氧化, 丙二醛

前文报道蕊木宁对 CCl<sub>4</sub>、醋氨酚及硫代乙酰胺引起的小鼠肝损伤有保护作用<sup>(1)</sup>。目前国外公认 CCl<sub>4</sub> 引起肝脏损伤的原理系 CCl<sub>4</sub> 在肝微粒体细胞色素 P-450 激活下生成三氯甲基自由基后, 与分子氧反应生成三氯甲基过氧基 (CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>), 引起肝微粒体脂质过氧化, 导致肝细胞炎症和坏死<sup>(2)</sup>。为探讨蕊木宁抗肝损伤作用的原理, 本文研究了蕊木宁对 CCl<sub>4</sub> 引起肝微粒体脂质过氧化及其与肝微粒体脂质进行共价结合的影响。

#### MATERIALS AND METHODS

昆明种♂小鼠, 体重 19.5±SD 1.1 g。  
Wistar♂大鼠, 体重 121±4 g。

蕊木宁盐酸盐由本所植化室冯孝章提供。  
NADPH 和甲吡酮(metyrapone)均购自 Sigma 公司。<sup>14</sup>CCl<sub>4</sub> 购自英国 Amersham 公司。

**肝微粒体的分离** 大鼠 ip 苯巴比妥钠 80 mg/kg qd × 3 禁食一夜后, 断头, 分离肝微

粒体<sup>(3)</sup>。微粒体重悬于 TMS 缓冲液(Tris-HCl 0.1 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 0.05 mmol/L, 蔗糖 0.25 mmol), 于 -30℃ 保存。

**丙二醛(MDA)的测定** 脂质过氧化产物丙二醛的测定系采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法<sup>(4)</sup>, 取 0.1 mmol/L 的磷酸缓冲液 0.8 ml 及苯巴比妥钠诱导的大鼠肝微粒体悬液 0.1 ml (3 mg) 蛋白, 加 NADPH 2 mmol/L, 苈木宁 1 mmol/L, 温育 15 min, 然后加入乙醇稀释 20 倍的 CCl<sub>4</sub> 10 μl, 置 37℃ 水浴中继续温育 20 min, 取出后冰浴中冷却, 加 20% 三氯醋酸 0.3 ml, 0.67% 硫代巴比妥酸 0.6 ml, 离心, 取上清液放沸水中煮 10 min, 加蒸馏水 3 ml, 535 nm 处比色测 A 值。

**共轭双烯物的测定** 将小鼠禁食 24 h 后处死, 肝脏用蔗糖 0.3 mmol/L 加 EDTA 3 mmol/L 溶液, 制成匀浆。各组 3-5 只小鼠肝匀浆合并, 分离微粒体。制备的微粒体重悬于上述缓冲液内, -30℃ 保存。实验时取肝微粒体悬液 0.5-1 ml, 相当肝脏 1-2 g, 用氯仿-甲醇混合液抽提脂质<sup>(5,6)</sup>, 于紫外分光光度计 200-300 nm 扫描或于 241.5 nm 处测 A 值。

**<sup>14</sup>CCl<sub>4</sub> 与肝微粒体脂质和蛋白质进行共价结合的测定** 将 TMS 0.1 mmol/L 缓冲液 0.7 ml, 用苯巴比妥钠诱导的大鼠肝微粒体蛋白 3 mg 悬液及 NADPH 2 mmol/L, 与苈木宁 1 mmol/L 混匀, 总反应液 1 ml, 置 37℃ 水浴温育 60 min。加甲醇 <sup>14</sup>CCl<sub>4</sub> 18.5 kBq, 继续温育 60 min。用氯仿-甲醇混合液(2:1)提取<sup>(7)</sup>, 振荡 5 min, 加生理盐水洗 1 次, 离心分层, 吸去上层抽提液, 将蛋白层和下层氯仿脂质层分开, 蛋白质层用 TMS 缓冲液洗两次, 用 95% 乙醇和丙酮脱脂, 加 NaOH 1 mmol/L 溶解蛋白, 加 5 ml 二氧六环闪烁液。氯仿脂质提取液加至 5 ml 甲苯闪烁液, 放置 24 h 后, 于液体闪烁仪计数 cpm。

**CCl<sub>4</sub> 转化成 CO 及 NADPH 消耗的测定** 测定 CO 生成时, 取 0.1 mmol/L 磷酸缓冲液

(pH 7.4) 5.6 ml, 大鼠肝微粒体蛋白 3 mg, NADPH 2 mmol/L 与苈木宁 1 mmol/L 混合, 总容量 6 ml, 37℃ 水浴温育 10 min, 加连二亚硫酸钠 3 mg 及血红蛋白溶液 70 μg, 分装于两吸收杯内, 各约 3 ml, 对照管加乙醇 10 μl, 测定管加乙醇稀释 20 倍的 CCl<sub>4</sub> 10 μl, 立即混匀。在紫外分光光度计 423 nm 处监测 1, 3, 5, 7 min 时血红蛋白与 CO 结合物的吸收峰值。

测定 CCl<sub>4</sub> 代谢过程中 NADPH 消耗时, 取磷酸缓冲液 5.6 ml, 大鼠肝微粒体蛋白 3 mg, 充氮气 10 min, 加 NADPH 300 μmol/L 和苈木宁 1 mmol/L, 37℃ 水浴温育 15 min 后, 再加 NADPH 300 μmol/L, 平均分装于两紫外吸收杯内, 对照管加乙醇 10 μl, 测定管加乙醇稀释 20 倍的 CCl<sub>4</sub> 10 μl, 于紫外分光光度 340 nm 处监测 1, 3, 5, 7 min 时 NADPH 吸收峰值的变化<sup>(8)</sup>。

## RESULTS

**对 CCl<sub>4</sub> 引起肝微粒体脂质过氧化产物丙二醛生成量的影响** 结果如 Tab 1 所示, CCl<sub>4</sub> 与肝微粒体及 NADPH 一起温育后丙二醛生成量显著增加, 表示有脂质过氧化反应生成。预先加苈木宁 1 mmol/L, 丙二醛生成量明显减少, 抑制率达 51%, 当苈木宁与 CCl<sub>4</sub> 同时加入肝微粒体和 NADPH 温育液中, 丙二醛生成量亦减少, 但抑制率仅 19%。

**甲吡酮抑制实验中方法同前, 于加苈木宁前 15 min 加甲吡酮 1 mmol/L, 共同温育 15 min, 结果表明, 苈木宁抑制 CCl<sub>4</sub> 诱发的丙二醛生成作用明显减弱。丙二醛生成量高于单纯加苈木宁者(Tab 1)。**

**对共轭双烯物生成量的影响** 为选择适当剂量的 CCl<sub>4</sub> 及测定共轭双烯物的合适时间, 先做了 CCl<sub>4</sub> 引起肝微粒体共轭双烯物生成的剂量-效应关系及时间-效应关系曲线。实验中每组小鼠 3-5 只, 分别 ig CCl<sub>4</sub>-菜籽油或单纯菜籽油, 届时处死动物, 制备肝微粒体, 测

Tab 1. Inhibitory effect of kopsinine (1 mmol/L) on microsomal lipid peroxidation (MDA) induced by CCl<sub>4</sub> and the influence of metyrapone on the inhibition of MDA formation induced by kopsinine. n=2.

	Incubation time (min)	100 × MDA(A/mg protein)		Inhibition (%)
		Control	Kopsinine	
Incubation time (min)	0	42.7, 44.0	35.0, 33.8	19.4
	15	64.5, 64.6	29.7, 30.2	53.6
Metyrapone (mmol/L)	0	65.0, 65.5	26.5, 33.0	53.9
	1	51.0, 54.0	39.0, 38.5	25.0

定其中共轭双烯物的含量。结果测知共轭双烯物的吸收峰为 241.5 nm。CCl<sub>4</sub> 剂量在 0.5, 1, 2, 3 ml/kg ig 时, 服用 1-2 h 后共轭双烯物生成量最高, 4 h 后下降, 至 9 h 恢复至接近正常值。所以, 在正式实验中便采用 CCl<sub>4</sub> 1 ml/kg ig 1 h 后处死小鼠, 于 241.5 nm 处测定肝微粒体中共轭双烯物的含量。

正式实验中将小鼠分为 4 组, 每组 5 只, 正常对照组 ig 同容量蒸馏水, 小鼠于处死前 1 h ig 菜籽油 10 ml/kg。CCl<sub>4</sub> 对照组 ig CCl<sub>4</sub> 1 ml/kg。蕊木宁 200 mg/kg × 3 组, 于处死前 1 d 上下午分别 ig 蕊木宁 200 mg/kg, 相隔 8 h, 小鼠处死当日, 于 ig CCl<sub>4</sub> 前 2 h 再给蕊木宁 1 次, 共 3 次。蕊木宁 200 mg/kg × 1 组, 小鼠于给蕊木宁 200 mg/kg 1 次后立即给 CCl<sub>4</sub>。CCl<sub>4</sub> 1 mg/kg 加 9 ml 菜籽油容量均 10 ml/kg, 服用 CCl<sub>4</sub> 后 1 h, 断头处死小鼠, 测定肝微粒体共轭双烯物含量。结果列于 Tab 2。

由 Tab 2 可见, 小鼠于服 CCl<sub>4</sub> 1 mg/kg 后肝微粒体共轭双烯物增加约 1 倍左右, 于给

Tab 2. Effect of kopsinine 200 mg/kg on diene conjugates produced of liver microsomes in CCl<sub>4</sub> (1 ml/kg ig) intoxicated mice. n=4,  $\bar{x} \pm SD$ . \*\*P<0.05.

Group	Diene conjugates 100 × A/g liver	Inhibition (%)
Normal control	16 ± 5	
CCl <sub>4</sub>	32 ± 4	
Kopsinine × 3 + CCl <sub>4</sub>	24 ± 4**	25
Kopsinine × 1 + CCl <sub>4</sub> simultaneously	24 ± 4**	25

CCl<sub>4</sub> 前预先服蕊木宁 200 mg/kg 3 次或 1 次, 均可部分拮抗 CCl<sub>4</sub> 对肝微粒体的过氧化损伤作用, 使共轭双烯物生成的量减少。

**对 <sup>14</sup>CCl<sub>4</sub> 与肝微粒体脂质和蛋白质进行共价结合的影响** <sup>14</sup>CCl<sub>4</sub> 与大鼠肝微粒体脂质结合的量比与蛋白质结合的量多。蕊木宁对 <sup>14</sup>CCl<sub>4</sub> 与脂质共价结合的抑制作用(15.6%)比对与蛋白质共价结合的抑制作用(6.1%)稍强。

**对 CCl<sub>4</sub> 在肝微粒体代谢转化为 CO 及消耗 NADPH 的影响** CCl<sub>4</sub> 在肝微粒体经细胞色素 P-450 代谢后生成 CO, 同时消耗 NADPH。当 CCl<sub>4</sub> 与 NADPH 还原的肝微粒体共同温育后, 生成的 CO 与加入的血红蛋白溶液形成羧络血红蛋白, 于紫外分光光度计 423 nm 处呈现吸收峰。测定结果表明, 向温孵液中加蕊木宁 1 mmol/L 后于第 3, 5, 7 min 均促进 CCl<sub>4</sub> 代谢转化为 CO, CO 生成量分别增加 20%, 40% 和 41%(Tab 3)。

在 CCl<sub>4</sub> 代谢转化为 CO 过程中 NADPH 消耗增加, 可于紫外分光光度 340 nm 处监测 NADPH 的消耗量, 列于 Tab 3 的结果表明,

Tab 3. Effect of kopsinine on carbon monoxide formation from CCl<sub>4</sub> and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form, NADPH) consumption during CCl<sub>4</sub> metabolism by liver microsomes. n=4,  $\bar{x} \pm SD$ . \*P>0.05. \*\*P<0.05. \*\*\*P<0.01.

Time (min)	CO <sub>2</sub> formation nm/mg protein			NADPH consumption A/mg protein		
	Control	Kopsinine	%	Control	Kopsinine	%
1	8.3 ± 0.5	7.7 ± 1.5	-7.2*	0.32 ± 0.11	0.28 ± 0.10	+12.5*
3	14.0 ± 1.8	16.8 ± 2.6	+20.2*	0.29 ± 0.11	0.22 ± 0.11	+21.4*
5	16.4 ± 3.3	23.0 ± 5.0	+40.2*	0.26 ± 0.11	0.11 ± 0.03	+57.7**
7	19.1 ± 3.5	27.1 ± 2.8	+41.9***	0.24 ± 0.10	0.11 ± 0.03	+54.2**

NADPH 的消耗亦增加。当肝微粒体温育液中蕊木宁在促进  $\text{CCl}_4$  转化为 CO 过程中, 加入  $\text{CCl}_4$  后 1, 3, 5 min 时 NADPH 消耗量分别增加 12.5, 21.4, 57.7, 54.2%。基本上与 CO 生成量的增加平行。

## DISCUSSION

目前公认  $\text{CCl}_4$  引起肝损伤的机理主要是对肝微粒体的脂质过氧化损伤和共价结合。本研究结果表明, 对  $\text{CCl}_4$  肝损伤有保护作用的蕊木宁在体外能抑制  $\text{CCl}_4$  引起的肝微粒体脂质过氧化反应, 使丙二醛生成量减少。体内实验发现, 蕊木宁亦能够抑制  $\text{CCl}_4$  引起的小鼠肝脏脂质过氧化产物共轭双烯物的生成。体外与体内结果一致。表明蕊木宁能拮抗  $\text{CCl}_4$  经肝微粒体代谢激活后生成的毒性产物对膜脂质的损害作用。甲吡酮为细胞色素 P-450 特异性抑制剂, 在体外实验中当加入甲吡酮后, 蕊木宁拮抗  $\text{CCl}_4$  引起肝微粒体脂质过氧化反应的作用明显减弱。由此推测, 蕊木宁抗  $\text{CCl}_4$  脂质过氧化作用可能是通过对细胞色素 P-450 的影响而实现的。

从  $\text{CCl}_4$  代谢转化为 CO 及对 NADPH 消耗的实验结果可看出, 蕊木宁能促进  $\text{CCl}_4$  代谢转化为 CO 及 NADPH 的消耗, 意味着  $\text{CCl}_4$  在肝脏滞留的时间缩短, 从而使  $\text{CCl}_4$  对肝脏的损伤作用减弱。这亦可能是蕊木宁抗  $\text{CCl}_4$  肝脏毒性作用机理中的一个环节。蕊木宁的这一作用与五味子恰好相反, 后者是降低  $\text{CCl}_4$  代谢转化为 CO 及 NADPH 的消耗, 可见蕊木宁与五味子抗肝脏损伤作用的机理不尽相同。

## REFERENCES

- 1 Huang WY, Liu GT. Protective action of kopsinine against experimental liver injuries in mice. *Acta Pharmacol Sin* 1989; 10 : 65
- 2 Recknagel RO. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: Status quo and future prospects. *Trends Pharmacol Sci* 1983; 4 : 129
- 3 Lesca P, Lecointe P, Paoletti C, Mansuy D. Induction des monooxygénases hépatiques par l'ellipticine chez le Rat: Formation de cytochrome P<sub>448</sub>. Activité hydroxylante. *C R Hebd Acad Sci [D]* 1976; 282 : 1457
- 4 Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. In: Fleischer S, Packer L, eds. *Methods in Enzymology*. vol 52 Biomembranes Part C. NY: Academic Press, 1978 : 302-10
- 5 Klassen CD, Plaa GL. Comparison of the biochemical alterations elicited in livers from rats treated with carbon tetrachloride, chloroform, 1,1,2-trichloroethane and 1,1,1-trichloroethane. *Biochem Pharmacol* 1969; 18 : 2019
- 6 Jaeger RJ, Travulus MJ, Murphy SD. Biochemical effects of 1,1-dichloroethylene in rats: Dissociation of its hepatotoxicity from a lipoperoxidative mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol* 1973; 24 : 457
- 7 Díaz Gómez MI, Castro JA, de Ferreyra EC, D'Acosta N, de Castro CR. Irreversible binding of <sup>14</sup>C from <sup>14</sup>CCl<sub>4</sub> to liver microsomal lipids and proteins from rats pretreated with compounds altering microsomal mixed-function oxygenase activity. *Ibid* 1973; 25 : 534
- 8 Wolf CR, Harrelson WG Jr, Nastainczyk WM, Philpot RM, Kalyanaraman B, Mason RP. Metabolism of carbon tetrachloride in hepatic microsomes and reconstituted monooxygenase systems and its relationship to lipid peroxidation. *Mol Pharmacol* 1980; 18 : 553
- 9 Plaa GL, Witschi H. Chemicals, drugs, and lipid peroxidation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1976; 16 : 125

## Instructions to authors

Please read *Acta Pharmacol Sin* 1989; 10 : 1-6

*Ann Intern Med* 1988; 108 : 258-65

*Br Med J* 1988; 298 (6619) : 401-5.