

大黄素及番泻甙和大黄多糖对培养大鼠肝细胞内游离钙浓度的影响*

林秀珍 马德禄 崔荣芬

内容提要 应用钙荧光指示剂乙酰羟甲酯研究大黄素(EMD)、番泻甙(SEN)和大黄多糖(RPP)对大鼠肝细胞内游离钙($[Ca^{2+}]_i$)浓度的影响。结果表明,在静息状态下肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 为 131.60 ± 37.79 nmol/L。依次加入 $CaCl_2$ (2 mmol/L)和KCl (120 mmol/L)后,肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 较静息时显著增加($P < 0.01$)。预先经EMD (0.037 mmol/L)作用的肝细胞,在静息状态或加入同上剂量的 $CaCl_2$ 和KCl后,细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 均较去离子水对照组明显增加($P < 0.01$);相反,SEN和RPP使肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 明显降低($P < 0.01$),且抑制效应与剂量呈负相关。从大黄不同有效成分EMD、SEN和RPP对细胞内游离钙水平的不同影响提示,大黄对肝细胞功能具有多种调节作用。

关键词 大黄素 番泻甙 大黄多糖 大鼠肝细胞 钙离子

Effects of Emodin, Sennosides and Rheum Polysaccharides on Free Calcium in Isolated Rat Liver Cells Lin Xiu-zhen, Ma De-lu, Cui Rong-fen Dept. of Pharmacology, Tianjin University of Medical Sciences, Tianjin (300070)

The effects of emodin (EMD), sennosides (SEN) and Rheum polysaccharides (RPP) on the free calcium level in the isolated rat liver cells were studied with Ca^{2+} level 131.60 ± 37.79 nmol/L in the liver cells. After adding $CaCl_2$ (2 mmol/L) and KCl (120 mmol/L) to liver cell suspension sequentially, the free Ca^{2+} levels were significantly elevated compared with that of the resting status ($P < 0.01$). When the liver cells were pretreated with EMD (0.037 mmol/L) for 10 min, in the resting status or using the above doses of $CaCl_2$ and KCl, the free Ca^{2+} levels were significantly increased compared with that of the control groups ($P < 0.01$). On the contrary, after administration of SEN (0.046 ~ 0.092 mmol/L) and RPP (0.1 ~ 0.2 mg/ml), the free Ca^{2+} levels were obviously decreased compared with that of the control groups ($P < 0.01$). Furthermore, the inhibitory effect was dose dependent. The opposite effects of the different active ingredients of rhubarb (EMD, SEN, RPP) on the free Ca^{2+} levels suggested that rhubarb has many kinds of regulatory function in the liver cells.

Key words emodin, sennosides, rheum polysaccharide, isolated rat liver cells, calcium ion

大黄有活血化瘀、通里攻下、利胆消黄和清热解毒等作用,已广泛用于治疗多种急、慢性肝炎^(1, 2)。据文献报道^(3, 4),大黄具有钙离子通道阻滞作用。本研究应用钙荧光指示剂乙酰羟甲酯(Fura-2)/Am直接观察大黄不同成分大黄素、番泻甙和大黄多糖对培养大鼠肝细胞内游离钙($[Ca^{2+}]_i$)浓度的影响,为大黄及其组分治疗肝炎的作用机理提供细胞水平的依据。现报告如下。

实验材料

1 动物 Wistar大鼠,体重 204 ± 13 g,雌雄不拘,由天津药物研究院动物室提供。

2 药物 Fura-2/Am为中国医学科学院药物研究所产品。大黄素(EMD)和胶原酶为Sigma产品。番泻甙(番泻甙A占90%以上,SEN)和大黄多糖(RPP)由天津药物研究院提供。胰蛋白酶为新疆化学试剂一厂产品。Eagle's MEM为日本Nissui制药公司产品。

*国家自然科学基金资助课题(No. 39170910)

天津医科大学药理教研室(天津 300070)

实验方法

1 肝细胞悬液制备及 Fura-2/Am 负载 取 Wistar 大鼠, 雌雄兼用, 乙醚麻醉。按文献^[5, 6]法制备肝细胞悬液。用 0.3% 台盼蓝检查活细胞存活率在 90% 以上。用 MEM 将肝细胞制成 $1 \sim 2 \times 10^7/\text{ml}$ 细胞悬液, 取 2 ml 悬液, 加入 Fura-2/AM (终浓度 $5 \mu\text{mol/L}$) 和牛血清白蛋白 (1mg/ml)。在超级恒温水浴振荡器中孵育 60 min (37°C , $95\%\text{O}_2 + 5\%\text{CO}_2$, 旋转振荡 60 次/min) 后, 离心 (1500 r/min) 5 min, 弃上清液, 沉淀用 Hank's 液冲洗 2 次, 最后加入 2 ml 无钙 Hank's 液悬浮细胞。

2 肝细胞钙荧光测定 取肝细胞悬液 2 ml 温育 (37°C) 5 min 后加中药或去离子水, 再平衡 10 min 进行测定。加药后及测定前均用吸管轻轻吹吸 6~7 次, 使细胞分布均匀。本实验采用岛津 RF-510 (带恒温器) 型荧光分光光度计。测定条件: 发射波长 (EM) 固定在 490 nm, 光栅 10 nm; 激发波长 (EX) 350~380 nm, 光栅 10 nm; 扫描速度 100 nm/min。通过快速转换 EX (4~6 s) 记录 350 nm/380 nm 的荧

光比率, 按公式^[7]方法计算细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。在计算之前, 需减去未负载 Fura-2 的自发荧光。

3 统计分析 各组数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm S$) 表示。两组均数间的差异采用 t 检验。

结 果

1 CaCl_2 和 KCl 对肝细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响 肝细胞在静息状态下 (溶液中含有 0.5 mmol/L 乙二醇四乙酸 (EGTA)) 细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 $131.60 \pm 37.79 \text{ nmol/L}$ ($n=9$)。向肝细胞悬液中依次加入 2 mmol/L CaCl_2 和 120 mmol/L KCl 后, 肝细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 均较静息时增加, $P < 0.01$, 见附表。这是因为外加 Ca^{2+} 可通过肝细胞膜渗入胞浆, 使胞浆内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加。高 K^+ 可打开电压依赖性钙通道, 使 Ca^{2+} 内流增加。

2 EMD 对肝细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响 预先经 EMD (0.037 mmol/L) 作用的肝细胞, 在静息时 (溶液中含有 0.5 mmol/L EGTA) 细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 $174.86 \pm 14.68 \text{ nmol/L}$ ($n=10$), 较去离子水对照组明显升高 ($P < 0.01$)。因溶液中微量 Ca^{2+} 已被 EGTA 螯合, 此时细胞内游离 Ca^{2+} 水平增加, 说明

附表 EMD、SEN 和 RPP 对培养大鼠肝细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响 (nmol/L , $\bar{x} \pm S$)

组别	剂量	鼠数	静息状态 (EGTA 0.5 mmol/L)	CaCl_2 (2 mmol/L)	KCl (120 mmol/L)
对照	等体积去离子水	9	131.60 ± 37.79	371.51 ± 76.10	550.84 ± 177.00
EMD	0.037 mmol/L	10	$174.86 \pm 14.68^{**}$	$770.09 \pm 214.70^{**}$	$1983.27 \pm 713.49^{**}$
对照	等体积去离子水	9	157.80 ± 39.40	379.52 ± 66.92	530.81 ± 172.38
SEN	0.046 mmol/L	7	140.09 ± 41.80	$232.25 \pm 39.77^{**}$	$283.84 \pm 33.98^{**}$
	0.092 mmol/L	7	$112.76 \pm 20.35^*$	$163.77 \pm 38.11^{**\Delta\Delta}$	$225.91 \pm 41.81^{**\Delta\Delta}$
对照	等体积去离子水	8	137.43 ± 35.16	367.95 ± 80.38	568.51 ± 161.11
RPP	0.1 mg/ml	5	142.31 ± 26.02	$224.82 \pm 52.85^{**}$	$311.08 \pm 57.67^*$
	0.2 mg/ml	7	135.78 ± 44.47	$159.13 \pm 30.64^{**\Delta}$	$237.46 \pm 64.73^{**}$

注: 与对照组相比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与同组不同剂量间比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

EMD 可促进内 Ca^{2+} 释放。依次加入上述浓度的 CaCl_2 和 KCl , 细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 较对照组也显著升高, $P < 0.01$, 见附表。表明 EMD 可促进外 Ca^{2+} 内流。

3 SEN 和 RPP 对肝细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响 预先经 SEN (0.046 和 0.092 mmol/L) 和 RPP (0.1 和 0.2 mg/ml) 处理的肝细胞, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 均较对照组明显降低 ($P < 0.01$), 且 SEN 抑制效应与剂量有关 (见附表)。

讨 论

应用中医中药治疗急、慢性肝炎已积累了不少经验^[1, 2]。大黄及复方制剂治疗急、慢性肝炎除具有清热解毒、活血化瘀和通里攻下等综合作用外, 还可能与改变肝细胞的超微结构、影响细胞酶活性及细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平有关。病理性 Ca^{2+} 升高, 是各种原因引

起肝细胞不可逆损伤的共同通路, 钙离子通道阻滞剂对肝细胞损伤有保护作用^[8]。本实验结果表明, 经 EMD (0.037 mmol/L) 作用的肝细胞胞浆内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度在静息时和依次加入 CaCl_2 、 KCl 后, 较去离子水对照组均明显升高 ($P < 0.01$), 说明 EMD 对外 Ca^{2+} 内流和内 Ca^{2+} 释放均有促进作用, 此结果与文献报道一致^[9]。这可解释大黄能促进琥珀酸脱氢酶、单氨氧化酶等酶促反应, 使线粒体等肝细胞微观结构得以改善, 恢复其功能^[10]。

与 EMD 作用相反, SEN 和 RPP 可使肝细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度显著降低 ($P < 0.01$)。进一步证明大黄的钙离子通道阻滞作用可能与大黄有效成分 SEN 和 RPP 有关。有报道, 小鼠腹腔注射 RPP $100 \text{ mg/kg} \cdot \text{d}$, 对 CCl_4 所致 SGPT 升高的抑制率为 30%。

SEN 和 RPP 抑制细胞外 Ca^{2+} 内流, 有利于减轻高 Ca^{2+} 对肝细胞的损伤、降低血清中转氨酶水平、减少脂质过氧化物产生, 从而起到保护肝脏作用⁽¹¹⁾。

EMD、SEN 和 RPP 均为大黄有效成分。本实验所用剂量比临床剂量小⁽¹¹⁾, 从大黄不同有效成分 EMD、SEN 和 RPP 对细胞内游离钙水平的不同影响提示, 大黄对肝细胞功能具有多种调节的作用。

参 考 文 献

1. 汪承柏. 应用中医中药恢复慢性肝炎病人的肝功能. 中西医结合杂志 1984; 4(2): 120.
2. 张天权. 大黄的临床应用和药理作用. 陕西中医 1980; 1(6): 36.
3. 高贤钧. 中草药钙通道阻滞剂的研究与展望. 中西医结合杂志 1990; 10(7): 447.
4. 康 毅, 郭世铎, 吴威中, 等. 大承气汤对肠梗阻大鼠离

- 体结肠平滑肌 ^{45}Ca 内流影响的实验研究. 中西医结合杂志 1991; 11(2): 107.
5. 周廷冲, 丛 铮, 王崇全, 等. 生化药理学进展(第二辑). 北京: 中国医药科技出版社, 1989: 101—117.
6. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells methods in cell. Biology 1976; 13: 30.
7. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 1985; 260: 3440.
8. 刘海林, 李定国, 陆汉明. 钙离子与肝细胞损伤及钙通道阻滞剂的保护作用. 中华消化杂志 1993; 13: 101.
9. Lin XZ, Cui ZQ, Jin ZH, et al. Effects of emodin on the cytoplasmic free calcium in the platelets. J Chin Pharmaceut Sci 1994; 3(2): 126.
10. 张启元. 大黄的双向调节作用. 冶金医药情报 1990; 7: 103.
11. 陈琼华. 中药大黄的生化药理学研究. 冶金医药情报 1990; 7(3): 88.

(收稿: 1995—02—17 修回: 1995—04—16)

软肝胶囊对 98 例肝炎后早期肝硬化 活动期抗纤维化近期疗效观察

由 葛 英¹ 关 洪 祥² 李 桂 艳² 张 学 凤² 何 方 坤¹

笔者近年用自制软肝胶囊对肝炎后早期肝硬化活动期 98 例患者进行治疗观察, 结果报告如下。

临床资料 98 例肝炎后早期肝硬化活动期患者诊断均符合 1990 年全国第六次病毒性肝炎学术会议制订的标准[中华传染病杂志 1991; 9(1): 52]; 其中男性 56 例, 女性 42 例; 年龄 27~60 岁, 平均 45 岁; 病程 2~7 年, 平均 5.3 年。

治疗方法 (1)保肝治疗: 复方益肝灵片, 每次 4 片, 每日 3 次口服, 4 周为 1 个疗程; 维生素 C 200 mg, 每日分 3 次口服。(2)对症治疗: 尿少者给安体舒通片常规量口服; 有腹水者给 20% 人血白蛋白 50 ml, 每周 1~2 次。(3)18 合氨基酸 500 ml 隔日静脉滴注 1 次, 14 次为 1 个疗程, 一般滴注 2 个疗程。(4)口服自制软肝胶囊(当归 1.5 g 川芎 1.0 g 桃仁 1.0 g 枳实 1.5 g 黄芪 2.0 g 丹参 1.5 g 赤芍 2.5 g 柴胡 1.5 g 三棱 1.5 g 莪术 1.5 g 茯苓 2.0 g 香附 1.0 g 生牡蛎 2.0 g 鳖甲 1.5 g 瓦楞子 2.0 g 虎杖 2.0 g, 按此例配制成胶囊, 每粒含生药 0.4 g)每日 3 次, 每次 4 粒, 连服 3 个月为 1 个疗程。服 2 个疗程判定疗效。

结 果 98 例肝炎后肝硬化活动期患者经服 2 个疗程后观察指标变化情况: (1)白蛋白: 98 例入院

时皆低于 35 g/L, 经治疗后 75 例达到 35 g/L 以上, 复常率达 76.5% (30 ± 3 g/L, 40.5 ± 4 g/L; $\bar{x} \pm S$, 下同)。治疗前后比较, $P < 0.01$ 。(2)透明质酸: 98 例入院时皆大于 640 ng/ml, 治疗后有 68 例降至 160 ng/ml, 复常率为 69.4% (718 ± 48.8 ng/ml, 153.6 ± 11.8 ng/ml, $P < 0.01$)。(3)B 超变化: 入院时 68 例回声粗糙, 经治疗后有 48 例转为回声略粗糙, 逆转率为 70.6%; 入院时 30 例回声略粗糙, 经治疗有 21 例转为回声增强, 逆转率为 70%。(4)微循环障碍改善情况: 微循环分度参照文献标准(田牛. 微循环基础与临床. 北京: 人民军医出版社, 1986)入院时 55 例为重度障碍, 经治疗后有 30 例转为中度障碍, 占 54.5%; 入院时中度障碍 43 例, 经治疗转为轻度障碍 30 例, 占 76.7%。

讨 论 肝炎后肝硬化, 是由于肝细胞炎症坏死和免疫损伤后大量纤维组织增生和充填而成。按中医急者治其标、缓者治其本原则研制成软肝胶囊, 可使肝细胞再生, 透明质酸水平下降, B 超回声好转以及微循环障碍等改善都表明, 抗肝纤维化治疗取得较满意的近期疗效。这与软肝胶囊具有活血化瘀、软坚化结作用, 可增强机体免疫(补肾)、清热凉血、舒肝理气有关。

(收稿: 1995—02—17 修回: 1995—04—18)

1. 鞍山市肝病研究所(辽宁 114011); 2. 鞍山市传染病医院