

乙酰半胱氨酸对四氯化碳诱导的原代培养大鼠肝细胞损伤的保护作用

黄滨南¹, 吴扬², 葛求富¹, 郭殿武¹ (1.杭州民生药业有限公司, 杭州 310011; 2.杭州北斗生物技术有限公司, 杭州 310011)

摘要: 目的 观察乙酰半胱氨酸(NAC)对四氯化碳(CCl_4)诱导的原代培养大鼠肝细胞损伤的作用。方法 在 24 孔细胞培养板上, 用 CCl_4 诱导原代培养肝细胞损伤, 分别加入不同浓度的 NAC, 培养 20 h 后, 测定上清液谷草转移酶(AST)活性, 并 MTT 法检测细胞活力。结果 NAC 在 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内, 对正常培养的大鼠肝细胞没有影响; 在 $4\sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内, NAC 能剂量依赖性地抑制 CCl_4 诱导的肝细胞活性的降低, EC_{50} 约为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 当浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 可以逆转 CCl_4 诱导的肝损伤, 使肝细胞释放 AST 降到接近正常水平, 并明显改善肝细胞形态学变化。结论 NAC 对 CCl_4 诱导的肝损伤具有保护作用。

关键词: 乙酰半胱氨酸; 保肝; 原代培养; 大鼠肝细胞; 四氯化碳损伤

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2011)09-0795-04

作者简介: 黄滨南, 女, 硕士, 工程师

Tel: (0571)89973633-233

E-mail: huang_0451@sina.com.cn

中国现代应用药学 2011 年 9 月第 28 卷第 9 期

Chin JMAP, 2011 September, Vol.28 No.9

• 795 •

Hepatoprotective Effects of *N*-acetylcysteine Injection on Tetrachloride-induced Injury in Primary Rat Hepatic Cells

HUANG Binnan¹, WU Yang², GE Qiufu¹, GUO Dianwu¹(1.Hangzhou Minsheng Pharmaceutical Co., Ltd, Hangzhou 310011, China; 2.Hangzhou BIODOOR Biotechnology Co., Ltd, Hangzhou 310011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of *N*-acetylcysteine (NAC) injection on tetrachloride (CCl₄)-induced injury in primary rat hepatic cells. **METHODS** Primary cultured hepatic cells were induced injury by CCl₄. The cells were incubated with NAC(100, 20, 4 μmol·L⁻¹) for 20 h. The expressions of aspartate transaminase(AST) in hepatic cells were determined by MTT assay. **RESULTS** After incubated with NAC for 20 hours, neither viability of primary rat hepatic cells decreases significantly, nor released AST from hepatic cells increases significantly in medium. However, in 4–100 μmol·L⁻¹, NAC reversed concentration-dependently the CCl₄-decreased viability, and the EC₅₀ was about 20 μmol·L⁻¹; in 100 μmol·L⁻¹, NAC inhibited effectively CCl₄-increased AST in primary rat hepatic cells, and attenuated obviously the change of hepatic cell morphous. **CONCLUSION** NAC has a protective effect on tetrachloride-induced injury.

KEY WORDS: *N*-acetylcysteine; hepatoprotective effect; primary culture; rat hepatic cell; tetrachloride-induced injury

乙酰半胱氨酸(*N*-acetylcysteine, NAC)是细胞内还原型谷胱甘肽(GSH)的前体,最早主要用于治疗呼吸系统疾病,作为呼吸道黏液溶解剂使用至今^[1]。近几年的研究表明,NAC具有肝脏保护作用,可用于药物中毒性肝炎、肝功能衰竭等肝病的治疗^[2]。NAC对肝衰竭等严重肝损伤具有保护作用,而对轻、中度肝损伤的保护作用未见报道。本实验拟在原代培养的大鼠肝细胞中,以CCl₄诱导的肝细胞损伤为模型^[3],研究NAC对轻、中度肝损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SD大鼠,♂,体质量180~220 g,由浙江省医学科学院实验动物中心提供。实验动物合格证号:SCXK(浙)2008-0033。

1.2 主要试剂

乙酰半胱氨酸注射液(阿思欣泰,杭州民生药业有限公司,批号:0706191,规格:20 mL:4 g)。I型胶原酶、IV型胶原蛋白、MTT(Sigma公司);DMEM培养液、D-Hanks缓冲液(杭州宏博生物工程有限公司);四氯化碳(上海凌峰化学试剂有限公司);谷草转移酶(AST)试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 实验仪器

B700-50M型蠕动泵驱动器(保定兰格恒流泵有限公司);MW-15AC型二氧化碳培养箱(SANYO公司);CKX41型倒置显微镜(OLYMPUS公司);

MK3型酶标仪(Thermo公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠肝细胞的分离和培养 参照Seglen方法^[4],稍作改进。将大鼠腹腔注射2%戊巴比妥钠、100 U肝素,常规消毒皮肤,开腹,门静脉插管固定,用含EDTA的D-Hanks缓冲液灌流,20 mL·min⁻¹,10 min。第2步灌流为含0.05%胶原酶的D-Hanks缓冲液约200 mL,至肝脏表面可见肝小叶间出现明显的裂隙,停止灌流。剪下肝脏,剥除肝脏表面的包膜,轻轻振荡肝组织游离肝细胞,在4℃以1 000 r·min⁻¹离心3次,DMEM培养液重悬。用0.4%台盼蓝检测细胞活力若>80%,则调整细胞浓度为5×10⁵个·mL⁻¹,每孔100 μL接种于用1 mg·mL⁻¹胶原蛋白包被的24孔板中,放入37℃、5%CO₂培养箱孵育。

1.4.2 CCl₄诱导原代培养肝细胞损伤 用DMSO配制5 mol·L⁻¹的CCl₄贮备液。精确量取5 mol·L⁻¹的CCl₄贮备液适量,用肝细胞培养液配成含5, 10和20 mmol·L⁻¹ CCl₄的损伤处理液。将上述损伤处理液加入已培养3 h的肝细胞中,作用20 h,以无CCl₄的肝细胞培养液为对照。实验结束后,吸取适量上清液,检测AST的活性,MTT比色法测定肝细胞活力。

1.4.3 NAC对肝细胞作用评价 用肝细胞培养液和肝细胞损伤液(含10 mmol·L⁻¹ CCl₄)分别配制成含100, 20和4 μmol·L⁻¹ NAC,加入已培养3 h的肝细胞中,作用20 h,观察NAC对正常肝细胞和

CCl₄ 诱导的肝细胞损伤的作用。在显微镜下观察肝细胞形态学改变并拍照。

1.5 统计分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理。

2 实验结果

2.1 不同浓度的 CCl₄ 对原代培养大鼠肝细胞的作用

CCl₄ 作用 20 h 后, 浓度在 5~20 mmol·L⁻¹ 内, 能剂量依赖性地诱导大鼠肝细胞不同程度的损伤, 使肝细胞活性明显减少, 而使肝细胞释放 AST 显著增加; 与正常组相比, CCl₄ 浓度为 10 mmol·L⁻¹ 时, 约 45% 的肝细胞坏死, 释放的 AST 也增加到正常细胞的 3 倍左右, 造成肝细胞中度损伤。结果见图 1。

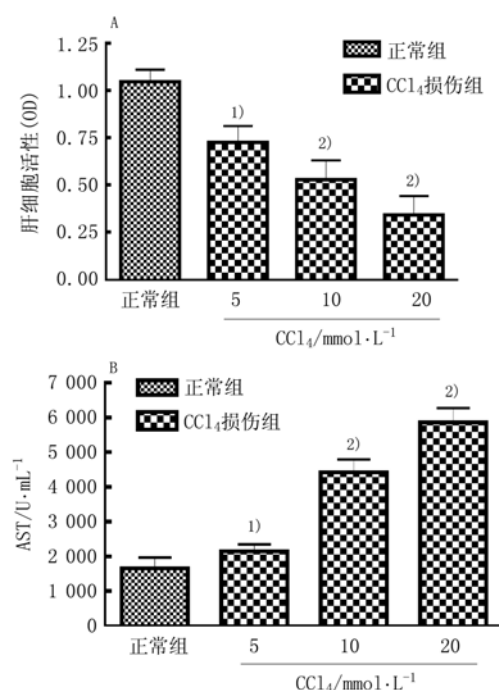


图 1 CCl₄ 对原代培养大鼠肝细胞的损伤作用

A-肝细胞活性; B-AST

注: 与正常组相比, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

Fig 1 Effect of CCl₄ on primary cultured rat hepatic cells

A-viability of hepatic cells; B-AST

Note: Compared with normal group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

2.2 NAC 对正常肝细胞的作用

NAC 作用 20 h 后, 浓度在 100 μmol·L⁻¹ 内, 对正常原代培养的肝细胞没有明显的毒副作用, 没有引起肝细胞的明显坏死, 也没有引起肝细胞释放 AST 的显著增加。结果见图 2。

2.3 NAC 对 CCl₄ 诱导肝细胞损伤的作用

10 mmol·L⁻¹ CCl₄ 作用 20 h, 可诱导肝细胞损伤, 约有 50% 肝细胞发生死亡, 肝细胞释放 AST

增加 2 倍左右, 聚集生长的肝细胞明显收缩变小。NAC 能显著逆转 CCl₄ 诱导的损伤: 在 4~100 μmol·L⁻¹ 内, 能剂量依赖性地抑制肝细胞活性的降低, 与损伤组相比, 4 μmol·L⁻¹ NAC 可抑制约 20% 肝细胞坏死, 当浓度为 100 μmol·L⁻¹ 时, 几乎完全逆转 CCl₄ 诱导的损伤, 使肝细胞释放 AST 基本降到正常水平, 可明显逆转 10 mmol·L⁻¹ CCl₄ 引起的肝细胞形态学的变化。结果见图 3 和图 4。

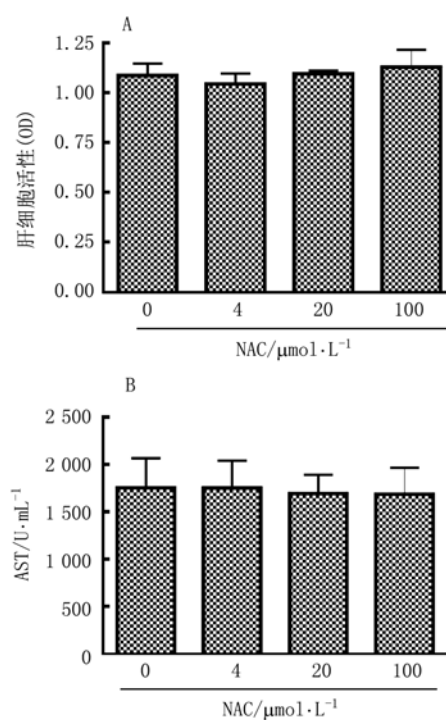


图 2 NAC 对正常原代培养大鼠肝细胞的作用

A-肝细胞活性; B-AST

Fig 2 Effect of NAC on primary cultured rat hepatic cells

A-viability of hepatic cells; B-AST

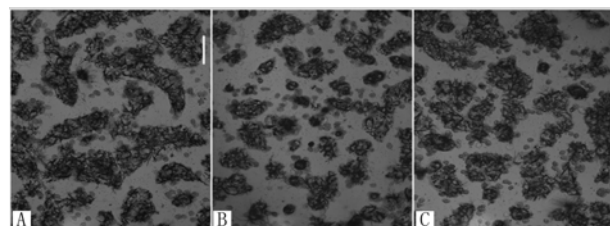


图 3 NAC 和 CCl₄ 对原代培养大鼠肝细胞形态学的影响 (100×)

A-正常大鼠肝细胞; B-10 mmol·L⁻¹ CCl₄ 作用 20 h; C-100 μmol·L⁻¹ NAC 作用

Fig 3 Effect of NAC and CCl₄ on primary cultured rat hepatic cells morphous(100×)

A-normal cultured rat liver cells; B-10 mmol·L⁻¹ CCl₄ added after 20 h; C-100 μmol·L⁻¹ NAC added

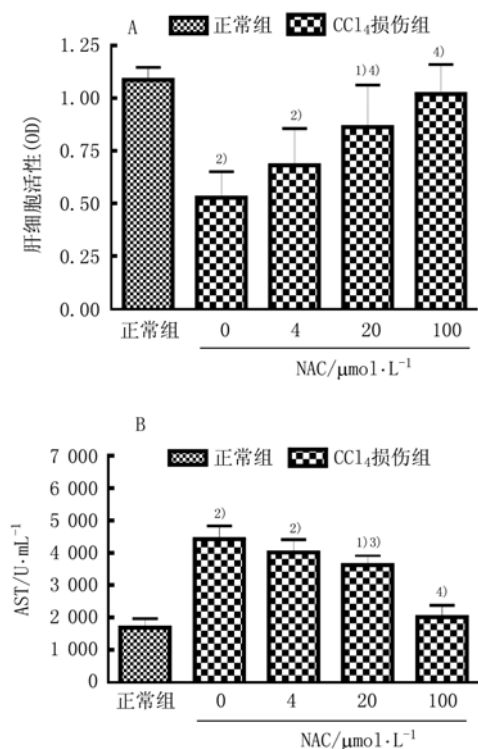


图4 NAC对CCl₄诱导的原代培养大鼠肝细胞损伤的作用

注:与正常组相比,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与损伤组相比,³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$

Fig 4 Effect of NAC on injured primary cultured rat hepatic cells induced by CCl₄

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with control group ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$

3 讨论

NAC在较低的浓度(EC_{50} 约为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,约 $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)即可保护CCl₄诱导的肝细胞损伤,显著降低坏死的肝细胞数量,显著减少肝细胞释放AST量,并明显改善肝细胞形态学变化。研究表明,NAC不仅可用于对乙酰氨基酚引起的肝损伤、肝衰竭等严重肝损伤的治疗,还可开发用于轻、中度肝损伤等适应症,如肝炎病毒引起的肝损伤等。同时,在保证疗效的前提下,还可能减少目前临床推荐剂量($50 \sim 100 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。此外,在抗肝损创新药物的体外筛选中,NAC可作为一个优良的阳性对照药。

CCl₄可通过肝细胞P₄₅₀酶系统激活后生成CCl₃·自由基,导致肝微粒体的脂质过氧化,自由基增多,最后引起肝细胞损伤,细胞内AST大量释放^[3]。NAC保护CCl₄诱导的大鼠肝细胞损伤,可能和NAC能有效提高肝细胞内谷胱甘肽(GSH)含量以及能有效清除肝细胞内自由基密切相关^[5]。另外,NAC还可以通过其还原性巯基,直接清除肝细胞内由CCl₄诱导损伤过程中大量产生的、具有很强细胞损伤力的羟自由基和脂肪酰基过氧化物^[6],从而发挥抗肝细胞损伤的作用。最近的研究表明,NAC还能改善肝细胞线粒体能量代谢,这可能也是NAC对非醋酐酚引起的肝损伤保护作用的重要机制之一^[7]。

综上所述,NAC能提高肝细胞抗氧化能力,显著降低CCl₄引起的肝细胞损伤AST的水平,对CCl₄诱导的肝损伤具有保护作用。

REFERENCES

- [1] MEYER A, BUHL R, KAMPF S, et al. Intravenous N-acetylcysteine and lung glutathione of patients with pulmonary fibrosis and normals [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1995, 152(3): 1055-1060.
- [2] GREGORY S, KELLY N D. Clinical applications of N-acetylcysteine[J]. Altern Med Rev, 1998, 3(2): 114-127.
- [3] LU L G, WANG Z M, ZHANG Y Q, et al. A study on mechanism of liver lesion induced by carbon tetrachloride in rats [J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis(中西医结合肝病杂志), 1996, 6(2): 24-25.
- [4] TAN H L, YANG M H, WANG Y G, et al. Establishment of method for rat hepacyte primary culture [J]. Chin J Appl Physiol(中国应用生理学杂志), 2006, 22(4): 509-512.
- [5] AT KURI K R, MANTOVANI J J, HERZENBERG L A, et al. N-acetylcysteine a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency [J]. Curr Opin Pharmacol, 2007, 7(4): 355-359.
- [6] GALICIA M M, RODRIGUEZ R A, REYES G, et al. N-acetylcysteine prevents carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis: role of liver transforming growth factor-beta and oxidative stress [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2009, 21(8): 908-914.
- [7] ZWINGMANN C, BILODEAU M. Metabolic insights into the hepatoprotective role of N-acetylcysteine in mouse [J]. Hepatology, 2006, 43(3): 454-463.

收稿日期: 2010-11-05