

# 黄芩有效成分对四氯化碳致伤的原代培养大鼠肝细胞的作用<sup>\*</sup>

浙江医科大学药理学教研室 王立明 张如松<sup>\*\*</sup> 方瑞英 葛文再<sup>\*\*\*</sup>

**摘要** 作者采用原代培养大鼠肝细胞研究黄芩有效成分的护肝作用,并对其含量较多的结晶单体进行结构鉴定。结果表明:黄芩的乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物(1.0~2.5 mg/ml)均可使四氯化碳致伤的肝细胞培养液中 ALT 活性显著降低( $P<0.001$ )。从黄芩乙酸乙酯萃取物分离出来的晶 I、III、IV 在所试浓度下均有显著护肝作用;晶 I 则主要为直接抑制酶活性作用。经理化鉴别和光谱分析,晶 I、II 分别为汉黄芩素和黄芩素。

**关键词** 黄芩;黄芩素;汉黄芩素;中国传统医学;培养的细胞;  
四氯化碳/毒性;肝/药物作用;大鼠

黄芩为唇形科植物黄芩 (*Scutellaria baicalensis* G) 的干燥根,具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎等功效<sup>[1]</sup>。据报道,黄芩的甲醇提取物对四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)所致肝损伤动物模型有显著保护作用<sup>[2]</sup>;对由半乳糖胺诱导的急性重症肝炎有护肝作用<sup>[3]</sup>;而临床早有报道用黄芩及其制剂治疗急、慢性肝炎且疗效显著<sup>[4]</sup>。本室在原代培养大鼠肝细胞及整体动物肝损伤模型中,亦已证明黄芩水提取物具有显著护肝作用<sup>[5]</sup>。本研究进一步提取、分离黄芩护肝作用的有效成分,以 CCl<sub>4</sub> 致伤的原代培养大鼠肝细胞模型予以筛选、验证,并对部分结晶单体进行结构鉴定,为临床防治肝病提供药理依据。

## 1 材料与方 法

1.1 动物 SD 大鼠,♀,体重 200~250 g,

浙江医科大学实验动物中心提供。

1.2 药材与试剂 黄芩 (*Scutellaria baicalensis* G) 购自杭州市中药店,经浙江医科大学生药教研室张如松副教授鉴定。四乙酸乙烯乙二醇——双 β 氨基乙基乙醚 (EGTA)、胶原酶 (N 型)、牛血清白蛋白 (Frac V)、MEM Eagle 培养液等均为 Sigma 产品,其它试剂均属国产 CP 或 AR 级。

1.3 仪器 XT 双目体视显微熔点测定仪、U-2 000 型紫外分光光度计 (日本 Hitachi 产品),1825 TC-87 型 CO<sub>2</sub> 孵箱 (美国 Sheldon 产品),700 型全自动生化分析仪 (美国 Beckman 产品)。

## 1.4 黄芩有效成分的提取分离

1.4.1 取生药 1.0 kg,用水加热提取,浓缩滤液,得流浸膏约 1 000 ml。向后者加入 95% 乙醇至含醇量 70%,充分搅拌,静置,过滤得

\* 浙江省自然科学基金资助项目

\*\* 生药教研室

\*\*\* 浙江医科大学药理学系 95 届毕业实习生

醇液,回收乙醇,用乙酸乙酯萃取3次,回收溶剂,抽干得生药乙酸乙酯萃取物;水层再用正丁醇萃取3次,得生药正丁醇萃取物。对两提取物分别进行护肝作用的研究。

1.4.2 分离黄芩乙酸乙酯萃取物 12.0 g,硅胶柱层析,以  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  及  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$  递增洗脱,得4个流份。第一流份用乙酸乙酯重结晶,得晶 I;第二、三流份分别以硅胶柱层析,用甲醇重结晶,得晶 II、晶 III;第四流份用甲醇重结晶,得晶 IV。

1.5 大鼠肝细胞原代培养方法及  $\text{CCl}_4$  致肝细胞损伤模型 参照文献<sup>[6]</sup>方法制备。

1.6 护肝作用试验 将制备的大鼠肝细胞悬液分瓶预培养 1.5 h,经检查贴壁生长良好,将培养瓶随机分组,每组4瓶:①正常对照组;②二甲亚砜(DMSO)溶剂对照组;③  $\text{CCl}_4$  肝损对照组;④试验组。肝损对照组、试验组均加  $\text{CCl}_4$  10 mmol/L(终浓度),试验组同时加药液(用 DMSO 配制,终浓度分别为 1.0、2.5 mg/ml);DMSO 对照组加等量的培养液与 DMSO;正常对照组则加等量培养液,继续培养 1.5 h,测定培养液中 ALT 活性。将试验组与肝损对照组的 ALT 值相比较,作 *t* 检验;并以肝损对照组 ALT 活性为 100%,将试验组各浓度时 ALT 值与之比较,计算百分率(简称降酶率,%)。

1.7 药物直接抑酶作用试验 经预培养 1.5 h 的肝细胞培养液中加入适量的  $\text{CCl}_4$ ,继续培养 1.5 h,离心除去肝细胞,取培养液分别加入所试浓度药液,同上条件温育 1.5 h,测定 ALT 活性,按上述统计处理,并计算抑酶率(%)。

1.8 晶 I、II 的鉴定 参照文献<sup>[7]</sup>,将含量较多的晶 I、II 进行结构鉴定。

## 2 结果

### 2.1 黄芩乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物对 $\text{CCl}_4$ 损伤原代培养大鼠肝细胞的作用

结果见表 1。正常大鼠肝细胞悬液中 ALT 活性为  $50.7 \pm 2.2$  U/L,加入 10 mmol/L  $\text{CCl}_4$  后升高至  $95.7 \pm 3.1$  U/L,黄芩乙酸乙酯和正丁醇萃取物(1.0~2.5 mg/ml)均能显著降低  $\text{CCl}_4$  所致肝细胞损伤模型的 ALT 活性( $P < 0.001$ );阳性对照药甘草次酸降酶作用也极显著。从表上可看出当给药浓度相同时,黄芩乙酸乙酯萃取物降酶作用较正丁醇萃取物为强。

表 1 黄芩乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物对  $\text{CCl}_4$  损伤肝细胞的作用

组别	浓度 (mg/ml)	ALT ( $\bar{x} \pm s$ , U/L)	%
正常对照组		$50.7 \pm 2.2$	
$\text{CCl}_4$ 对照组		$95.7 \pm 3.1$	100.0
甘草次酸	0.5	$70.8 \pm 2.7^*$	78.0
	1.0	$48.8 \pm 2.0^*$	51.0
黄芩乙酸乙酯萃取物	1.0	$20.5 \pm 2.5^*$	21.4
	2.5	$15.0 \pm 2.5^*$	15.7
黄芩正丁醇萃取物	1.0	$33.5 \pm 3.0^*$	35.0
	2.5	$27.0 \pm 2.5^*$	28.2

每组4瓶,与  $\text{CCl}_4$  肝损对照组比较 \*  $P < 0.001$ , 方差不齐者作 *t'* 检验。

2.2 晶 I、II、III、IV 对  $\text{CCl}_4$  损伤原代培养大鼠肝细胞的作用及对 ALT 的直接作用 结果见表 2。正常对照组肝细胞悬液中 ALT 活性为  $39.0 \pm 2.7$  U/L;加入 0.1 ml 溶剂 DMSO 后 ALT 活性为  $40.3 \pm 2.1$  U/L,与正常对照组比较无显著性差异;而  $\text{CCl}_4$  肝损对照组 ALT 活性显著升高( $P < 0.001$ )。晶 I、II、III、IV (1.0~2.5 mg/ml)均能显著降低  $\text{CCl}_4$  所致肝细胞损伤模型 ALT 活性( $P < 0.001$ ),晶 I、III (2.5 mg/ml),晶 II、IV (1.0~2.5 mg/ml)亦有显著的抑制酶活性作用( $P < 0.05 \sim 0.001$ )。对不同浓度各药的降酶率与抑酶率进行比较,晶 II、III、IV 均有显著差异( $P < 0.05 \sim 0.001$ ),而晶 I 则无显著差异( $P > 0.05$ )。阳性对照药甘草次酸则几乎呈完全的护肝作用。

表 2 晶 I、II、III、IV 对 CCl<sub>4</sub> 损伤肝细胞的作用及对 ALT 的直接作用 (n=4)

药 物	浓 度 (mg/ml)	ALT( $\bar{x}\pm s$ , U/L)			
		护肝作用		直接酶抑制作用	
CCl <sub>4</sub> 肝损对照组		67.0±4.0 <sup>a</sup>	100.0	34.3±3.1 <sup>b</sup>	100.0
甘草次酸	0.5	52.3±1.9 <sup>***</sup>	78.0 <sup>***</sup>	33.6±2.4	98.0
	1.0	36.2±3.6 <sup>***</sup>	54.0 <sup>***</sup>	32.8±2.0	96.5
晶 I	1.0	50.3±4.0 <sup>***</sup>	75.1	27.7±4.0	80.8
	2.5	46.3±3.5 <sup>***</sup>	69.1	26.0±5.3 <sup>*</sup>	75.8
晶 II	1.0	28.0±3.6 <sup>***</sup>	41.8 <sup>**</sup>	23.4±2.5 <sup>**</sup>	68.2
	2.5	13.3±2.1 <sup>***</sup>	19.9 <sup>**</sup>	18.3±3.8 <sup>***</sup>	53.4
晶 III	1.0	34.8±2.5 <sup>***</sup>	51.7 <sup>***</sup>	30.0±1.0	87.5
	2.5	6.3±2.3 <sup>***</sup>	9.4 <sup>***</sup>	18.3±1.5 <sup>***</sup>	53.4
晶 IV	1.0	27.7±6.0 <sup>***</sup>	41.3 <sup>*</sup>	23.7±3.5 <sup>**</sup>	69.0
	2.5	20.7±3.5 <sup>***</sup>	30.8 <sup>**</sup>	20.7±5.0 <sup>***</sup>	60.3
正常对照组		39.0±2.7			
DMSO 对照组		40.3±2.1			

a: CCl<sub>4</sub> 损伤肝细胞的培养液, b: 离心除去肝细胞的培养液

与 CCl<sub>4</sub> 肝损对照组比较: \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001, 方差不齐者作 t' 检验

与相应浓度的直接抑酶率比较: # P<0.05, ## P<0.01, ### P<0.001

**2.3 晶 I、II 的鉴定** 晶 I 为淡黄色针状结晶, mp 204~207℃; UV λ<sub>max</sub> nm: 274, 315 (sh)(甲醇); 242, 283, 374(甲醇钠); 291, 331, 402(三氯化铝); 290, 329, 400(三氯化铝-盐酸); 283, 371(醋酸钠); 277, 339, 381(醋酸钠-硼酸)。与文献中汉黄芩素的图谱相符。

晶 II 为黄色针状结晶, mp 262~265℃。UV λ<sub>max</sub> nm: 269, 322(甲醇); 256, 365, 410 (sh)(甲醇钠); 247, 272, 372(三氯化铝); 255 (sh), 283, 292 (sh), 345(三氯化铝-盐酸); 257, 360(醋酸钠); 274, 335(醋酸钠-硼酸)。与黄芩素的文献数据相符。

### 3 讨论

中草药中存在着大量防治肝病的有效药物。本室研究了 50 余种中草药及验方, 发现 10 余种中药具明显的抗 CCl<sub>4</sub> 肝损伤作用, 并优选其中的黄芩等中药作进一步研究。本文用 CCl<sub>4</sub> 形成原代培养大鼠肝细胞损伤模型, 研究并筛选黄芩护肝作用的有效成分。结果表明, 黄芩乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物(1.0~2.5 mg/ml)均有显著降低 ALT 活性的作用(P<0.001), 其中乙酸乙酯萃取物

降酶作用较正丁醇萃取物为强。为进一步筛选护肝作用的有效成分, 本研究对黄芩乙酸乙酯萃取物进行分离, 得到 4 个结晶单体晶 I、晶 II、晶 III、晶 IV, 并进行护肝作用研究。结果表明, 以上 4 种结晶单体均显著降低 CCl<sub>4</sub> 肝损伤细胞 ALT 的活性(P<0.001)。为证明上述 ALT 的降低是肝细胞受到保护所致, 本研究又观察了 4 个单体的直接抑制 ALT 活性的作用, 发现晶 I、III(2.5 mg/ml), 晶 II、IV(1.0~2.5 mg/ml)有不同程度的直接抑酶作用(P<0.05~0.001), 但与抗 CCl<sub>4</sub> 肝损伤的降酶作用比较, 晶 II、III、IV 的降酶率远大于抑酶率(表 2), 两者比较有显著差异(P<0.05~0.001), 提示晶 II、III、IV 可能为黄芩护肝作用的有效成分, 而晶 I 的降酶率与抑酶率较接近, 两者无显著差异(P>0.05), 提示晶 I 可能不具有护肝作用。因晶 I、晶 II 在黄芩中含量较多, 本研究对其进行结构鉴定, 分别为汉黄芩素和黄芩素。此结果与文献相符<sup>[8]</sup>。而晶 III、晶 IV 的结构有待进一步鉴定。

本研究表明, 黄芩的晶 II(黄芩素)、晶 III、晶 IV 可能为黄芩护肝作用的有效成分, 晶

I (汉黄芩素)具有很强的直接抑制 ALT 活性的作用,似无护肝作用。晶 II (黄芩素)含量较高,值得进一步对其进行护肝作用研究。

### 参 考 文 献

1. 中华人民共和国药典. 一部. 北京:人民卫生出版社,1995 : 270
2. 熊尺纪子,等. 药学杂志(日),1990,110(2): 950

3. Ihara, et al. Wakanyaku Shinpojumu, [Kiroku]1981, 14 : 45
4. 祁太平,等. 新医药学杂志,1973,(8): 24
5. 王立明,等. 浙江医科大学学报,1994,23(3): 109
6. 方瑞英,等. 中国医学科学院学报,1992,14(3): 194
7. 中国科学院上海药物研究所植物化学研究室译. 黄酮体化合物鉴定手册. 北京:科学出版社,1981
8. 于留荣,等. 中成药研究,1982,(6): 16

(1996年4月17日收稿,同年7月22日修回)

## PROTECTIVE EFFECT OF COMPONENTS IN SCUTELLARIA BAICALENSIS ON CARBON TETRACHLORIDE-INDUCED CYTOTOXICITY IN PRIMARILY CULTURED RAT HEPATOCYTES

Wang Liming, Zhang Rusong, Fang Ruiying, et al

*Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Medical University*

The Protective effect of active components of *Scutellaria baicalensis* G. (SbG) on carbon tetrachloride-induced cytotoxicity in primarily cultured rat hepatocytes was studied. The results showed that both ethyl acetate and n-butanol extracts of SbG at the dosage of 1.0~2.5 mg/ml significantly lowered the ALT level in the culture media exposed to 10 mmol/L CCl<sub>4</sub>. Crystal II, III and IV isolated from the ethyl acetate extract of SbG at the dosage of 1.0~2.5mg/ml were proved to have highly antihepatotoxic effects. Crystal I showed a direct inhibitory effect on ALT activity. Crystal I and II were separately confirmed to be wogonin and baicalein on the basis of physical and chemical identification and spectral analysis.

**KEY WORDS** Scutellariae baicalens; Wogonin; Baicalein; Medicine, Chinese traditional; Cells, cultured; Carbon tetrachloride/toxicity; Liver/drug eff; Rats