

本文引用:徐大志,温如燕,李相玲,余浚龙. 双黄连冻干粉成分分析及其与头孢拉定合用对人肝细胞功能的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(9): 1451-1456.

双黄连冻干粉成分分析及其与头孢拉定合用 对人肝细胞功能的影响

徐大志¹, 温如燕², 李相玲^{2*}, 余浚龙^{2*}

(1.大庆市人民医院,黑龙江 大庆 163316;2.广西中医药大学,广西 南宁 530200)

〔摘要〕 目的 检测双黄连冻干粉中的成分含量并探讨双黄连冻干粉及其成分与头孢拉定合用对人肝细胞(HL-7702)功能的影响。方法 应用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测双黄连冻干粉主要成分黄芩苷、汉黄芩素、绿原酸、连翘苷的含量。取双黄连冻干粉以及双黄连冻干粉中各主要成分单独或与头孢拉定合用对 HL-7702 分别分组进行培养。酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测培养后细胞上清液中谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)的含量;HPLC检测细胞中二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)的含量;琼脂糖凝胶电泳检测 HL-7702 细胞环氧化酶 2(cyclooxygenase 2, COX-2)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)的表达水平。**结果** 注射用双黄连冻干粉中,黄芩苷含量最高,汉黄芩素含量最低。与对照组相比,高剂量黄芩苷组、连翘苷组、汉黄芩素组人肝细胞(HL-7702)中 AST、ALT 表达下降($P<0.05$, $P<0.01$),绿原酸+头孢拉定组(0.046 mg/mL)与连翘苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)中 ALT 表达增加($P<0.05$, $P<0.01$),AST 表达差异无统计学意义($P>0.05$);低剂量组与高剂量组中各组实验结果相似。与对照组相比,高剂量组中绿原酸组、绿原酸+头孢拉定组(0.046 mg/mL)与连翘苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)中 ATP 表达下降($P<0.05$, $P<0.01$),ADP 表达差异无统计学意义($P>0.05$);低剂量组中黄芩苷组 ATP、ADP 表达增加($P<0.05$),汉黄芩素组、黄芩苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)与汉黄芩素+头孢拉定组(0.046 mg/mL)中 ATP、ADP 表达下降($P<0.05$, $P<0.01$)。与对照组相比,头孢拉定组 HL-7702 细胞 COX-2、HO-1 的表达差异无统计学意义($P>0.05$),双黄连不同剂量组以及与头孢拉定合用组 HO-1、COX-2 表达均增加且差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 注射用双黄连冻干粉中各成分对肝细胞存在影响,其中黄芩苷影响显著,与头孢拉丁合用时增加头孢拉定对肝细胞的影响。

〔关键词〕 双黄连冻干粉;头孢拉定;HL-7702;谷丙转氨酶;谷草转氨酶;二磷酸腺苷;三磷酸腺苷;环氧化酶 2;血红素加氧酶-1

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.09.006

Composition analysis of Shuanghuanglian freeze-dried powder and its effects on human hepatocyte function when combined with cefradine

XU Dazhi¹, WEN Ruyan², LI Xiangling^{2*}, YU Junlong^{2*}

(1. Daqing People's Hospital, Daqing, Heilongjiang 163316, China;

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530200, China)

〔Abstract〕 Objective To detect the content of components in Shuanghuanglian freeze-dried powder and to explore the effects of Shuanghuanglian freeze-dried powder and its components on human hepatocytes (HL-7702) alone or in combination with

〔收稿日期〕2021-12-08

〔基金项目〕广西自然科学基金项目(2018GXNSFBA050051);广西中医药大学博士启动基金项目(2020BS011)。

〔第一作者〕徐大志,男,硕士研究生,主治医师,研究方向:中医内科学。

〔通信作者〕*李相玲,女,副研究员,E-mail:haoyunlinglong@163.com;余浚龙,男,讲师,主治医师,E-mail:381586879@qq.com。

cefradine. **Methods** High performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect the content of baicalin, wogonin, chlorogenic acid and forsythine, the main components of Shuanghuanglian freeze-dried powder. HL-7702 cells were cultured with Shuanghuanglian freeze-dried powder and the main components of Shuanghuanglian freeze-dried powder alone or in combination with cefradine. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the content of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in the cell supernatant after culture, and HPLC was used to detect the expression level of adenosine diphosphate (ADP) and adenosine triphosphate (ATP); agarose gel electrophoresis was used to detect the expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) and heme oxygenase-1 (HO-1) in HL-7702 cells. **Results** In Shuanghuanglian freeze-dried powder for injection, the content of baicalin was the highest, and the content of wogonin was the lowest. Compared with the control group, the expression of AST and ALT in human hepatocytes (HL-7702) in high-dose baicalin group, forsythine group and wogonin group decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the expression of ALT in chlorogenic acid+cefradine group (0.046 mg/mL) and forsythine+cefradine group (0.046 mg/mL) increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the expression of AST had no statistical significance ($P > 0.05$); the results in the low-dose group were similar to those in the high-dose group. Compared with the control group, ATP expression in chlorogenic acid group, chlorogenic acid+cefradine group (0.046 mg/mL) and forsythine+cefradine group (0.046 mg/mL) in the high-dose group decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and ADP expression was not significantly different ($P > 0.05$); in the low-dose group, the expression of ATP and ADP increased in baicalin group ($P < 0.05$), but decreased in wogonin group, baicalin+cefradine group (0.046 mg/mL) and wogonin+cefradine group (0.046 mg/mL) ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the control group, the expression of COX-2 and HO-1 in HL-7702 cells in the cefradine group showed no statistical significance ($P > 0.05$). The expression of HO-1 and COX-2 in different dosage groups of Shuanghuanglian and the group combined with cefradine increased and the difference was statistically significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** The components of Shuanghuanglian freeze-dried powder for injection have effects on hepatocytes, of which baicalin has a significant effect, and the effects of cefradine on hepatocytes are increased when used in combination with cefradine.

[**Keywords**] Shuanghuanglian freeze-dried powder; cefradine; HL-7702; alanine aminotransferase; aspartate aminotransferase; adenosine diphosphate; adenosine triphosphate; cyclooxygenase 2; heme oxygenase-1

双黄连具有清热解毒功效,临床上常用来与其他药物合用。如双黄连口服液联合雷尼替丁治疗口腔溃疡,其临床疗效和安全性优于单独使用雷尼替丁,且疗效持久、复发率低^[1]。临床上,双黄连冻干粉联合头孢替安治疗儿童上呼吸道感染的效果亦优于头孢替安单独使用^[2]。双黄连注射剂是中医医院治疗上呼吸道感染性疾病的首选药之一,其疗效已被肯定^[3]。然而,2016年国家食品药品监督管理总局通报的中药不良反应报告中,中药注射剂占比53.7%^[4],不良反应发生比例较高^[5]。肝脏是药物代谢的主要器官,谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)是常用的肝功能检测指标^[6]。二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)的含量检测可以反映细胞的生长状态,同时也能部分地反映组织细胞内能量代谢状态和药物的作用^[7]。环氧化酶(cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸合成前列腺素(prostaglandin, PGs)过程中一个重要的限速酶。在肝癌组织中COX-2呈高表达,可以促进肿瘤细胞增殖及肿瘤转移,抵抗细胞凋亡,参与

血管形成,在包括肝癌的多种肿瘤发生中起重要作用^[8]。血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)是一种诱导酶,以其抗炎、抗氧化和神经保护作用而闻名^[9]。HO-1也是肝脏应急后诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)介导保护的另一种有效介体^[10]。由此推测,双黄连冻干粉与头孢类抗生素合用对肝脏有影响。前期研究认为,高浓度的双黄连注射液对体外培养的肝细胞有一定损伤,且与头孢拉定联合应用可增加肝细胞毒性^[11]。为了进一步探讨双黄连注射液的不良反应,以及与头孢类抗生素联合用药之后对肝脏的影响,本研究选择双黄连冻干粉中各成分与头孢拉定合用,检测人肝细胞(HL-7702)中ALT、AST、ADP、ATP、COX-2及HO-1的表达量,进一步研究双黄连冻干粉单独或者与头孢拉定合用对肝细胞的影响,为临床上双黄连注射液的应用以及与其他抗生素合用提供理论支持。

1 材料

1.1 主要仪器

高效液相色谱仪(high performance liquid chromatog-

raphy, HPLC)(型号:Dionex Summit, 美国Dionex 公司);分析天平(型号:AUM220D, 日本 Shimadzu 公司);低速大容量离心机(型号:LXJ-IIB, 上海安亭科学仪器厂);高速低温离心机(型号:5810型, 美国 Eppendorf centrifuge 公司);细胞培养箱(型号:MCO175, 日本SANYO 公司);倒置显微镜(型号:IMT-2, 日本奥林巴斯公司);PCR仪(型号:PCR System2400, 美国 PerkinElmer 公司);凝胶成像仪(型号:GDS7600, 英国 Ultra-violet products 公司)。

1.2 试药

绿原酸对照品(批号:110753-200413, 纯度>97%)、连翘苷对照品(批号:110821-200711, 纯度>98%)、黄芩苷对照品(批号:110715-201016, 纯度为99%)、汉黄芩素对照品(批号:110821-200711, 纯度>98%)均购自中国药品生物制品检定所;双黄连冻干粉(哈药集团有限公司, 批号:1005006);ADP对照品(美国 Sigma 公司, 批号:75431-54-8, 纯度 \geq 98%);ATP对照品(美国 Amersco 公司, 批号:Amersco-220, 纯度 \geq 98%)。

1.3 细胞株来源

HL-7702 细胞(批号:BFN608006124), 来自中国科学院上海细胞生物学研究所。

2 方法

2.1 HPLC 检测双黄连冻干粉含量^[12]

根据文献中 HPLC 条件^[13], 应用 HPLC 波长转换法同时检测双黄连冻干粉中绿原酸、连翘苷、黄芩苷及汉黄芩素 4 种成分的含量。

2.2 分组与给药

取对数生长期的 HL-7702 细胞, 胰酶消化后用新鲜培养基制成细胞悬液, 按 5×10^4 cells/mL 接种于 6 孔板中, 每孔 3 mL, 实验分为对照组(只加细胞液)、头孢拉定组、DMSO 组、双黄连组、绿原酸组、连翘苷组、黄芩苷组、汉黄芩素组、绿原酸+头孢拉定组(0.046 mg/mL)、连翘苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)、黄芩苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)以及汉黄芩素+头孢拉定组(0.046 mg/mL)。静置培养 48 h 后, 对照组加入空白溶剂 RPMI 1640, 头孢拉定组加入头孢拉定 0.046 mg/mL, DMSO 组加入 0.2% 的 DMSO。其余分为高剂量组和低剂量组, 其中低剂量组中各组分浓度相当于双黄连组浓度为 0.5 mg/mL, 高剂量组中各组分浓度相当于 2 mg/mL 的双黄连冻干粉培

养液, 具体为:绿原酸组低剂量浓度为 0.009 84 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、高剂量浓度为 0.039 34 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 连翘苷组低浓度为 0.001 388 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、高浓度为 0.005 549 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 黄芩苷组低剂量浓度为 0.129 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、高剂量浓度为 0.517 7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 汉黄芩素组低剂量浓度为 0.000 223 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、高剂量浓度为 0.000 89 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。其余各组为绿原酸+头孢拉定组(0.046 mg/mL)、连翘苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)、黄芩苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)、汉黄芩素+头孢拉定组(0.046 mg/mL)。每个剂量组重复 6 孔, 培养箱中培养后进行观察、处理和取样。

2.3 培养液中 ALT、AST 的含量测定

将细胞每孔 3 mL 接种于 6 孔板, 按照“2.2”项下方法给药细胞, 培养箱培养 24 h, 收集细胞悬液, 离心(800 r/min, 5 min, 半径 8.9 cm), 吸取上清液, 试剂盒检测 ALT、AST 的含量。

2.4 肝细胞中的 ATP、ADP 的含量测定

将细胞接种于 6 孔板, 每孔 3 mL, 按照“2.2”项下方法给药细胞, 培养箱孵育 48 h 后收集细胞悬液, 用无菌 PBS 洗 3 次, 0.5 mL 胰蛋白酶消化, 离心(800 r/min, 5 min, 半径 8.9 cm), 弃上清液, 向离心管中加入 100 μL 的磷酸缓冲盐(50 mmol/L)1 mL, 摇匀, 沸水浴中放置 10 min, 在冰浴中冷却, 离心(800 r/min, 5 min, 半径 8.9 cm), 取上清液, 0.45 μm 滤膜过滤, 取滤液, 流动相:甲醇-磷酸盐缓冲液溶液(pH 5.8), 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样器温度 4 $^{\circ}\text{C}$, 检测波长 260 nm, 进样 10 μL , HPLC 方法检测肝细胞中的 ATP、ADP 的含量。

2.5 RT-PCR、琼脂糖凝胶电泳检测 COX-2、HO-1 的表达

取对数生长期的 HL-7702 细胞悬液, 以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板, 每孔 3 mL。培养 48 h 待细胞贴壁后, 对照组加入 10% 的胎牛血清的 RPMI1640 培养液; 头孢拉定组加入含有 0.046 mg/mL 的头孢拉定和含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液; 其余各组加入不同浓度的双黄连冻干粉和不同浓度的双黄连粉针剂与 0.046 mg/mL 头孢拉定的培养液, 每组 3 个复孔。药物作用 1 d 后, 弃上清液, 用无菌 PBS 洗 3 次, 按照 Total RNA 提取试剂盒的说明提取总 RNA。参照文献^[14]设计引物(见表 1), 经 BLAST 确认引物特性, 由生工生物工程(上海)有限公司合成。

将各引物管瞬时离心, 慢慢打开管盖, 加入适量

的无 RNA 水稀释成 10 mmol/L 的引物储备液, 盖上管盖, 充分混匀, 瞬时离心于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备用。RT-PCR 反转录, PCR 扩增。其中, HO-1、 β -actin PCR 条件为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 30 个循环后于 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min。COX-2 的 PCR 条件为 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 30 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 最终延伸 10 min。RT-PCR 法检测 HO-1、COX-2 基因的表达。取上述 PCR 产物每管 $5\text{ }\mu\text{L}$, Marker $1\text{ }\mu\text{L}$ 充分混匀上样。电泳电压 100 V , 60 min 。凝胶成像分析, 以 HO-1、COX-2 与 β -actin 的灰度之比判断 mRNA 的相对表达水平。

表 1 引物序列

引物	序列	长度/bp
HO-1	上游: 5'-TGGAGGAGGAGATTGACCG-3'	636
	下游: 5'-TAAGGACCCATCGGAGAAGC-3'	
COX-2	上游: 5'-TGGTGCTGCTGCTGATGATGATGATG-3'	493
	下游: 5'-ATCTGCTGCTGCTGCTCAATGG-3'	
β -actin	上游: 5'-AGCGGGAAATCGTCCGTGAC-3'	478
	下游: 5'-TCGTCATACTCTGCTGCTTGCTG-3'	

2.6 统计学分析

各实验组数据使用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 各组数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示, 两组样本均数间比较采用 t 检验进行统计分析, 多组之间比较用单因素方差分析, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 双黄连冻干粉含量测定

HPLC 检测, 按照各组分标准品的标准曲线计算双黄连冻干粉中各组分含量, 从结果可知在双黄连冻干粉中, 黄芩苷含量最高, 其次为绿原酸、连翘苷, 汉黄芩素含量最低。详见表 2。

表 2 双黄连冻干粉主要成分含量($n=6, \mu\text{g}$)

项目	绿原酸	连翘苷	黄芩苷	汉黄芩素
含量	$0.196\ 7\pm 0.008\ 5$	$0.027\ 7\pm 0.002\ 0$	$2.588\ 0\pm 0.120\ 8$	$0.004\ 5\pm 0.001\ 5$

3.2 培养液中 ALT、AST 的含量

与对照组相比, 高剂量组中黄芩苷组、连翘苷组、汉黄芩素组人肝细胞(HL-7702)中 ALT、AST 表达均下降($P<0.05, P<0.01$); 绿原酸+头孢拉定组(0.046 mg/mL)与连翘苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)中 ALT 表达增加($P<0.05, P<0.01$), AST 差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 3。

表 3 高剂量组各组分对 HL-7702 细胞 ALT、AST 的作用($n=6, \bar{x}\pm s, \text{IU/L}$)

组别	ALT	AST
对照组	5.086 ± 0.154	4.611 ± 0.001
头孢拉定组	4.449 ± 0.400	$3.406\pm 0.013^*$
DMSO 组	$3.106\pm 0.195^{**}$	$3.001\pm 0.006^*$
绿原酸组	5.539 ± 0.406	$3.091\pm 0.007^*$
连翘苷组	$3.823\pm 0.208^*$	$3.060\pm 0.004^*$
黄芩苷组	$3.109\pm 0.172^*$	$3.423\pm 0.008^*$
汉黄芩素组	$2.648\pm 0.181^{**}$	$3.255\pm 0.006^*$
绿原酸+头孢拉定组(0.046 mg/mL)	$5.839\pm 0.108^*$	3.895 ± 0.003
连翘苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)	$6.325\pm 0.216^{**}$	3.838 ± 0.001
黄芩苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)	$3.470\pm 0.405^*$	5.084 ± 0.006
汉黄芩素+头孢拉定组(0.046 mg/mL)	$3.445\pm 0.387^*$	4.784 ± 0.017

注: 与对照组比较, $*P<0.05, **P<0.01$ 。

与对照组相比, 低剂量组中黄芩苷组、连翘苷组、汉黄芩素组人肝细胞(HL-7702)中 ALT 表达下降($P<0.05$), AST 表达差异无统计学意义($P>0.05$); 汉黄芩素+头孢拉定组(0.046 mg/mL)与连翘苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)中 ALT 表达增加($P<0.05$), AST 差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 4。

表 4 低剂量组各组分对 HL-7702 细胞 ALT、AST 的作用($n=6, \bar{x}\pm s, \text{IU/L}$)

组别	ALT	AST
对照组	8.407 ± 0.685	4.613 ± 0.362
头孢拉定组	8.257 ± 0.591	4.449 ± 0.279
DMSO 组	$7.447\pm 0.334^*$	4.410 ± 0.351
绿原酸组	7.819 ± 0.406	5.055 ± 0.592
连翘苷组	$5.535\pm 0.429^*$	3.871 ± 0.614
黄芩苷组	$6.304\pm 0.634^*$	4.160 ± 0.898
汉黄芩素组	$7.302\pm 0.332^*$	4.324 ± 0.389
绿原酸+头孢拉定组(0.046 mg/mL)	8.557 ± 0.789	5.528 ± 0.393
连翘苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)	$8.929\pm 0.393^*$	5.080 ± 0.234
黄芩苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)	7.891 ± 0.889	5.024 ± 0.487
汉黄芩素+头孢拉定组(0.046 mg/mL)	$8.929\pm 0.391^*$	4.612 ± 0.200

注: 与对照组比较, $*P<0.05$ 。

3.3 肝细胞中 ATP、ADP 的含量

与对照组比较, 高剂量组中绿原酸组、绿原酸+头孢拉定组(0.046 mg/mL)以及连翘苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)中 ATP 表达显著降低($P<0.05, P<0.01$); 各组对 ADP 表达影响差异均无统计学意义($P>0.05$)。详见表 5。

与对照组比较, 低剂量组中黄芩苷组 ATP 与 ADP 表达明显增加($P<0.05$), 汉黄芩素组 ATP 与 ADP 表达明显降低($P<0.05, P<0.01$); 黄芩苷、汉黄芩素与

表5 高剂量组中各组分对 HL-7702 细胞 ATP、ADP 的作用($n=6, \bar{x} \pm s, \mu\text{g}$)

组别	ATP	ADP
对照组	0.127±0.009	0.389±0.043
头孢拉定组	0.110±0.021*	0.285±0.068
DMSO 组	0.129±0.004	0.325±0.032
绿原酸组	0.118±0.010*	0.305±0.030
连翘苷组	0.126±0.006	0.337±0.046
黄芩苷组	0.128±0.005	0.355±0.004
汉黄芩素组	0.130±0.005	0.275±0.046
绿原酸+头孢拉定组(0.046 mg/mL)	0.116±0.017*	0.293±0.037
连翘苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)	0.096±0.009**	0.240±0.030
黄芩苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)	0.123±0.007	0.314±0.068
汉黄芩素+头孢拉定组(0.046 mg/mL)	0.123±0.012	0.251±0.056

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

头孢拉定合用后细胞中 ATP、ADP 的含量显著降低($P<0.01$)。详见表6。

表6 低剂量组各组分对 HL-7702 细胞 ATP、ADP 的作用($n=6, \bar{x} \pm s, \mu\text{g}$)

组别	ATP	ADP
对照组	0.126±0.014	0.294±0.005
头孢拉定组	0.121±0.006	0.232±0.008
DMSO 组	0.148±0.011	0.297±0.042
绿原酸组	0.119±0.007	0.244±0.068
连翘苷组	0.127±0.008	0.321±0.030
黄芩苷组	0.196±0.015*	0.481±0.065*
汉黄芩素组	0.086±0.002*	0.148±0.009**
绿原酸+头孢拉定组(0.046 mg/mL)	0.096±0.013*	0.223±0.013
连翘苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)	0.127±0.008	0.277±0.011
黄芩苷+头孢拉定组(0.046 mg/mL)	0.066±0.023**	0.142±0.120**
汉黄芩素+头孢拉定组(0.046 mg/mL)	0.052±0.011**	0.101±0.026**

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3.4 HO-1、COX-2 琼脂糖电泳及相对表达量

与对照组比较,头孢拉定组 HO-1、COX-2 相对表达量增加,但差异无统计学意义($P>0.05$);双黄连不同剂量组均能增加 HO-1、COX-2 的表达,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$);双黄连各剂量组与头孢拉定 0.046 mg/mL 合用组均能显著促进 HO-1、COX-2 的表达,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。详见图 1-2。

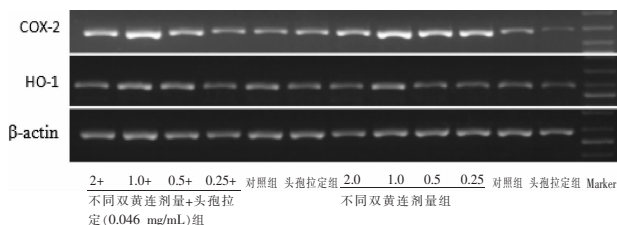


图1 不同浓度双黄连单独以及与头孢拉定合用对 HL-7702 肝细胞 HO-1、COX-2 的 RT-PCR 产物电泳图($n=3, \bar{x} \pm s, \text{mg/mL}$)

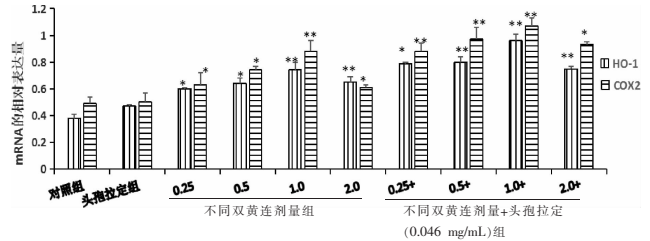


图2 不同浓度双黄连单独以及与头孢拉定合用对 HL-7702 肝细胞 HO-1、COX-2 的 mRNA 表达的影响($n=3, \bar{x} \pm s, \text{mg/mL}$)
注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

4 讨论

双黄连冻干粉中含有绿原酸、咖啡酸、芦丁、金丝桃苷、连翘酯苷、野黄芩苷、黄芩苷、连翘苷、木犀草素、黄芩素和汉黄芩素等多种成分^[15]。2020 版《中华人民共和国药典》中规定,注射用双黄连(冻干)质量检测的指标成分就是:绿原酸 8.5~11.5 mg/支、黄芩苷 128~173 mg/支、连翘苷 1.4~2.1 mg/支。本研究中,选择应用 HPLC 波长转换法同时检测以上 3 种成分,并增加了汉黄芩素的含量测定。检测结果显示,注射用双黄连冻干粉中黄芩苷含量最高,其次为绿原酸、连翘苷,汉黄芩素含量最低。

前期研究发现,双黄连冻干粉单用以及头孢拉定合用,对人肝细胞生长、增殖、细胞形态都有比较明显的抑制作用,且高浓度双黄连冻干粉(2 mg/mL)体外对人肝细胞有一定的损伤^[11],说明随着注射用双黄连给药量的加大,其对肝细胞的毒性相应加大,进一步说明双黄连主要有效成分合用后可能发生相互作用,产生不良反应。本研究低剂量组中,与对照组相比,连翘苷组、黄芩苷组、汉黄芩素组的实验结果显示此 3 种成分单独使用能显著降低 HL-7702 细胞 ALT 表达,而绿原酸单独应用对 ALT 的表达无影响;高剂量组中绿原酸、连翘苷、汉黄芩素对 HL-7702 细胞 AST、ALT 含量影响与对照组相比差异显著,这与文献报道^[16-18]的其均有保肝作用相一致。在 ATP、ADP 检测结果中,与对照组相比,高剂量组中各组分对 ADP 表达无影响,绿原酸组、绿原酸与头孢拉定合用组以及连翘苷与头孢拉定合用组能显著抑制 ATP 表达;而低剂量组中黄芩苷、汉黄芩素单独以及头孢拉定合用对 ATP、ADP 表达均有显著影响。

COX-2 被认为是一种炎症反应基因,主要分布在核膜,在炎症组织中高表达^[19]。研究发现,在高分化的肝细胞癌中 COX-2 表达增强,参与肝癌的早期形成阶段,在进展期中表达呈现降低^[20]。本实验结

果表明,单独给予不同浓度的双黄连注射液的细胞, COX-2 mRNA 的表达量与给药浓度呈正相关,但是当双黄连浓度达到 2.0 mg/mL 时,其表达量有所下降。这可能与注射液中含有脂多糖类物质有关,当低剂量给药时,双黄连注射剂中含有的脂多糖类物质具有内毒素活性,随着给药浓度的增加,对细胞的刺激性增加,所以药物作用后 COX-2 表达上调。本实验结果发现,HO-1 mRNA 与 COX-2 mRNA 的表达趋势相一致,说明 HO-1 mRNA 与 COX-2 mRNA 的表达具有相关性。这可能与给药后,药物刺激肝细胞产生应激反应,消耗细胞内的抗氧化剂,造成细胞损伤,并调节细胞内的信号转导途径^[21]。

本研究发现,双黄连冻干粉及其组分与头孢拉定合用对肝细胞功能以及能量代谢有一定的影响,对环氧化物酶和血红素加氧酶的表达存在影响。其中,对剂量的探索为后续动物实验的研究奠定基础。其合用之后,所造成的肝细胞损害的作用机制还有待进一步研究,尤其是动物在体实验的研究。

参考文献

- [1] 王诗恒,刘剑锋,秦培洁,等.双黄连口服液或者联合雷尼替丁治疗口腔溃疡的临床疗效和安全性的 Meta 分析[J].中药药理与临床,2020,36(1):182-189.
- [2] 苏荣山.双黄连冻干粉联合头孢替安治疗儿童上呼吸道感染的效果[J].中国乡村医药,2014,21(15):34-35.
- [3] 唐伟,石庆平,马涛,等.双黄连注射剂不良反应发生率的 Meta 分析[J].中国中药杂志,2016,41(14):2732-2742.
- [4] 张彦昭,文占权,刘传绪,等.2013—2016 年国家药品不良反应监测年度报告统计分析[J].药物流行病学杂志,2017,26(11):763-765.
- [5] 文雯,贺福元,刘文龙,等.基于免疫指纹图谱法筛查双黄连注射剂的致敏成分[J].中国中药杂志,2019,44(8):1588-1595.
- [6] 傅求真,白玉蓉,寇丹,等.脂肪肝患者 ALT、AST、 γ -GT 水平及意义[J].中华保健医学杂志,2019,21(5):454-455.
- [7] 郑屹,陈赛慧,叶薇,等.高效液相色谱法检测细胞能量代谢物质的方法建立与应用[J].科技通报,2012,28(7):46-50.
- [8] CUSIMANO A, FODERÀ D, LAMPIASI N, et al. Prostaglandin E2 receptors and COX enzymes in human hepatocellular carcinoma: Role in the regulation of cell growth[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2009, 1155: 300-308.
- [9] FERNÁNDEZ-MENDÍVIL C, LUENGO E, TRIGO-ALONSO P, et al. Protective role of microglial HO-1 blockade in aging: Implication of iron metabolism[J]. Redox Biology, 2021, 38: 101789.
- [10] QIAO Y L, XIAO F, LI W K, et al. Hepatocellular HO-1 mediated iNOS-induced hepatoprotection against liver ischemia reperfusion injury[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2020, 521(4): 1095-1100.
- [11] 张荣,徐大志,刘启德,等.双黄连注射剂及其与头孢拉定合用对人正常肝细胞的毒性作用研究[J].新中医,2012,44(8):163-165.
- [12] 赵丽颖,宋殿荣.HPLC 法同时测定胎盘灌流液中双黄连冻干粉中 8 种成分的含量[J].中国药房,2015,26(27):3823-3825.
- [13] 徐大志,张荣,刘启德,等.HPLC 波长转换法同时检测双黄连口服液液中 4 种有效成分的含量[J].中药新药与临床药理,2012,23(1):73-76.
- [14] 王淑云,王玲,李栋,等.血红素加氧酶-1 在人肺癌细胞中的表达及其对血管生成因子的影响[J].山东大学学报(医学版),2011,49(12):21-24,33.
- [15] 卞婷婷,安益强,汤道权,等.HPLC 法同时测定双黄连冻干粉中 11 个成分的含量[J].药物分析杂志,2012,32(1):52-56.
- [16] 刘银华,戚之琳,徐国祥,等.连翘苷对酒精性肝损伤的保护作用[J].中国临床药理学与治疗学,2016,21(1):6-9,15.
- [17] 吴绮丽,袁晓峰,陈静柔,等.汉黄芩素诱导中性粒细胞凋亡保护免疫性肝损伤[J].热带医学杂志,2021,21(12):1512-1516,1640.
- [18] 杨玉辉,周艳,阮征,等.绿原酸保护由脂多糖诱导引起的大鼠慢性肝脏损伤[J].现代食品科技,2014,30(7):23-26,241.
- [19] FORONES N M, KAWAMURA K Y, SEGRETO H R C, et al. Expression of COX-2 in stomach carcinogenesis[J]. Journal of Gastrointestinal Cancer, 2008, 39(1/2/3/4): 4-10.
- [20] CERVELLO M, MONTALTO G. Cyclooxygenases in hepatocellular carcinoma[J]. World Journal of Gastroenterology, 2006, 12(32): 5113-5121.
- [21] BEERE H M, WOLF B B, CAIN K, et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome[J]. Nature Cell Biology, 2000, 2(8): 469-475.

(本文编辑 匡静之)