

## HPP 对 $\text{CCl}_4$ 致大鼠肝脏灌流损伤的影响<sup>\*</sup>

蒲含林<sup>1</sup>, 洪 岸<sup>1</sup>, 彭 波<sup>2</sup>, 蒋建敏<sup>2</sup>, 许实波<sup>2</sup>

(1. 暨南大学生物工程研究所, 广东 广州 510632;

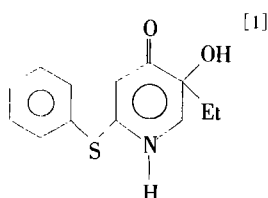
2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

**摘 要:** 对离体大鼠肝脏进行灌流, 用  $\text{CCl}_4$  造成肝细胞损伤, 观察了 2-乙基-3-羟基-6-苯硫基-4(1H)-吡啶酮(HPP)对  $\text{CCl}_4$  诱发的大鼠肝脏灌流损伤的影响, 结果表明 HPP 对  $\text{CCl}_4$  引发的肝细胞损伤导致丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)的升高有明显的抑制作用. 提示 HPP 对离体大鼠肝脏的损伤有抑制作用.

**关键词:** 2-乙基-3-羟基-6-苯硫基-4(1H)-吡啶酮;  $\text{CCl}_4$ ; 肝脏灌流; 损伤

**中图分类号:** R971 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 05-0126-03

2-乙基-3-羟基-6-苯硫基-4(1H)-吡啶酮(HPP)



是由中山大学化学化工学院应用化学系古练权等利用氧化-Michael 加成反应由已知的 2-乙基-3-羟基-4(1H)-吡啶酮类化合物合成得到的. 2-烷基-3-羟基-4(1H)-吡啶酮类化合物的药理学作用已有许多文献报道<sup>[2~4]</sup>, 主要与其捕捉自由基及螯合金属离子有关, 其中许多化合物具有潜在的抗肿瘤作用. 我们在对该类化合物进行药理筛选时发现该类化合物具有显著的抗氧化作用, HPP 对在体  $\text{CCl}_4$  致急性肝损伤大鼠血清谷丙转氨酶(ALT)的病理性升高有明显的抑制作用<sup>[5]</sup>, 为了考察 HPP 对离体动物肝脏损伤的影响, 本实验采用  $\text{CCl}_4$  诱发离体大鼠肝脏灌流损伤, 证实了 HPP 对  $\text{CCl}_4$  诱发离体大鼠肝脏灌流损伤有明显的抑制作用.

### 1 材料与方法

1.1 动物 SD 大鼠, 体质量 230~260 g, 合格证号 98A033, 广东省卫生厅实验动物养殖厂提供.

1.2 试剂及药品 2-乙基-3-羟基-6-苯硫基-4(1H)-吡啶酮, 合成产品, 由中山大学化学化工学院古练权教授提供, 经重结晶纯化, 水做溶媒. II 型胶原酶、RPMI-1640 购于 GIBCO 公司,  $\text{CCl}_4$  (广州化学试剂厂), 谷丙氨酸转氨酶及天门冬氨酸转氨酶(AST)测定试剂盒(上海生物制品研

究所 卫生部临床诊断试剂实验中心), 乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒(北京中生生物工程高技术公司), 其它试剂均为国产.

1.3 方法 取健康 SD 大鼠 20 只, 体质量 230~260 g, 随机分成 5 组, 每组 4 只, 雌雄各半. 实验按 Scholz 等<sup>[6]</sup>的方法进行, 以  $w = 2\%$  戊巴比妥钠 ip 麻醉. 从下腔静脉处注入 1 600 单位肝素钠, 2 min 后, 作门静脉插管, 分离肝脏, 移至灌流装置<sup>[7,8]</sup>, 调整灌流速度至  $8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . 整个灌流过程中应向灌流液中连续不断的通入  $\text{O}_2$ . 灌流装置主要包括超级恒温器, 氧气瓶和蠕动泵. 氧气瓶供给  $\varphi = 95\% \text{ O}_2$  和  $\varphi = 5\% \text{ CO}_2$  混合气体, 蠕动泵驱动灌流液体. 以上灌流液为 Krebs-Ringer  $\text{NaHCO}_3$  缓冲液, 组成为每 1 000 mL 中含:  $\text{NaCl}$  6.9 g,  $\text{KCl}$  0.35 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.29 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.16 g,  $\text{NaHCO}_3$  2.1 g,  $\text{CaCl}_2$  0.28 g, 葡萄糖 2 g.

确认灌流无异常后, 换上 1640 培养液(200 mL, 不含血清)灌流. 先平衡 10 min, 然后每隔 10 min 收集灌流液一次, 每次 0.5 mL; 灌流 30 min 后, 每隔 15 min 取样一次, 每次 0.5 mL, 直至满 120 min 为止.

正常对照组灌流 30 min 时, 由与门静脉插管相连的三通管注入 1 640 灌流液 300  $\mu\text{L}$ , 其它各组注入等体积的  $\text{CCl}_4$  储备液(含  $\text{CCl}_4$  30  $\mu\text{L}$  和乙醇 270  $\mu\text{L}$ ), 45 min 时按表 1 所示浓度加入各受试药物 0.4 mL, 每隔 15 min 采集灌流液 1 次, 直至满 120 min 为止. 测定 ALT、AST、LDH, 并与损伤对照组比较, 进行组间  $t$  检验.

\* 收稿日期: 2001-01-04; 作者简介: 蒲含林(1964-), 男, 讲师.

2 结 果

结果如表 1 所示: 加 CCl<sub>4</sub> 损伤之前 (10~30 min), 各组间 ALT、AST、LDH 的变化平稳, 无明显差异. 加入 CCl<sub>4</sub> 损伤造成损伤, 即 30 min 以后, 除正常对照组外, 其余各受试组中 ALT、AST、LDH 均突然升高, 说明已造成损伤. 模型组的各项指标随灌流时间延长而持续升高; HPP 的各剂量组的各项指标在给药后 (灌流 60 min 时) 发生变化. 从 75~120 min, HPP 各剂量组的 ALT、AST、LDH 的变化呈升高、回落, 再缓慢升高的变化趋势. 各项指标几乎平行动作, 回落幅度与模型组比较有显著性差异 ( $P < 0.001$ ), 且与剂量呈对应关系. 正常对照组在整个灌流过程中, ALT、AST、LDH 的变化趋势是小幅攀升. 此结果说明化合物 HPP 各剂量组对 CCl<sub>4</sub> 引起大鼠肝脏灌流损伤模型灌流液中 ALT、AST、LDH 的升高有明显抑制作用, 与模型组比

较, 有显著性差异, 表明化合物 HPP 能抑制 CCl<sub>4</sub> 诱发的大鼠离体肝脏灌流损伤.

3 讨 论

本实验在灌流液中加入 CCl<sub>4</sub>, CCl<sub>4</sub> 为亲肝性毒物, 经肝细胞色素 P450 代谢激活后, 生成 CHCl<sub>3</sub> 自由基等自由基, 迅速引起生物膜的脂质过氧化, 从而破坏生物膜的结构和正常功能, 导致细胞内 ALT 等外溢, 引起肝细胞死亡. 实验观察到 HPP 能降低 CCl<sub>4</sub> 损伤大鼠肝脏灌流液中 ALT、AST 及 LDH 的水平, LDH 是体内起氧化还原作用的酶, 共有 5 种存在形式, 肝脏中以 LDH<sub>5</sub> 的活性最高, 正常情况下它在血清中的活性很低, 当肝脏发生疾病、肝细胞受到损伤时, 肝中的 LDH<sub>5</sub> 就释放入血, 引起血中 LDH<sub>5</sub> 增多, 肝细胞受到损伤越严重血中 LDH<sub>5</sub> 就越多<sup>[9]</sup>. 故 LDH 也是判断肝损伤的一项指标. 提示 HPP 具有拮抗 CCl<sub>4</sub> 对肝脏的损伤作用, 其作用机理可

表 1 HPP 对 CCl<sub>4</sub> 诱发大鼠肝脏灌流损伤中 ALT, AST 和 LDH 的影响<sup>1)</sup>  
Tab.1 Effect of HPP on ALT, AST and LDH activities of perfused rat liver injury induced by CCl<sub>4</sub>

| 组别       | 时间<br>min | 正常                | 模型             | c(HPP)/(mmol·L <sup>-1</sup> ) |                   |                   |
|----------|-----------|-------------------|----------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|
|          |           |                   |                | 40                             | 8                 | 1.6               |
| ALT<br>组 | 10        | 87.53 ± 8.99      | 83.81 ± 9.70   | 81.59 ± 7.91                   | 77.15 ± 9.87      | 75.88 ± 11.48     |
|          | 20        | 74.93 ± 6.13      | 75.24 ± 8.93   | 77.36 ± 7.57                   | 76.20 ± 9.95      | 74.30 ± 9.43      |
|          | 30        | 83.50 ± 7.77      | 72.17 ± 5.57   | 76.62 ± 6.38                   | 79.06 ± 9.82      | 79.06 ± 7.17      |
|          | 45        | 84.76 ± 7.25***   | 213.51 ± 25.26 | 217.75 ± 10.64                 | 217.96 ± 11.27    | 219.76 ± 11.58    |
|          | 60        | 94.02 ± 6.47***   | 216.90 ± 12.37 | 179.74 ± 12.48***              | 187.26 ± 12.42**  | 192.87 ± 10.52*   |
|          | 75        | 102.6 ± 4.93***   | 237.65 ± 14.93 | 162.38 ± 7.57***               | 173.18 ± 11.91*** | 182.18 ± 11.82*** |
|          | 90        | 107.4 ± 6.09***   | 217.75 ± 26.95 | 154.01 ± 10.56***              | 165.55 ± 12.06*** | 169.37 ± 15.04**  |
|          | 105       | 109.2 ± 4.89***   | 212.03 ± 20.78 | 140.04 ± 8.06***               | 158.67 ± 13.69*** | 164.71 ± 12.16*** |
| AST<br>组 | 120       | 112.9 ± 9.98***   | 211.08 ± 14.04 | 120.88 ± 13.85***              | 146.50 ± 8.65***  | 159.20 ± 15.57*** |
|          | 10        | 93.81 ± 9.90      | 94.88 ± 13.21  | 97.28 ± 9.90                   | 86.21 ± 16.63     | 88.48 ± 12.48     |
|          | 20        | 90.08 ± 12.26     | 94.35 ± 3.77   | 93.68 ± 15.09                  | 81.94 ± 17.84     | 87.28 ± 14.78     |
|          | 30        | 96.08 ± 12.73     | 102.36 ± 7.55  | 100.62 ± 16.04                 | 91.95 ± 12.29     | 93.95 ± 14.21     |
|          | 45        | 98.41 ± 8.64***   | 233.63 ± 14.15 | 247.10 ± 16.04                 | 247.23 ± 12.82    | 248.83 ± 16.07    |
|          | 60        | 104.4 ± 8.96***   | 245.63 ± 15.09 | 183.73 ± 5.19***               | 212.15 ± 14.36**  | 218.15 ± 12.66*   |
|          | 75        | 107.8 ± 6.13***   | 228.56 ± 12.73 | 181.60 ± 4.72***               | 195.07 ± 11.73*** | 206.54 ± 16.33*   |
|          | 90        | 111.4 ± 9.43***   | 221.09 ± 10.85 | 180.26 ± 17.13***              | 197.21 ± 11.20**  | 186.67 ± 21.19*   |
| LDH<br>组 | 105       | 116.7 ± 6.60***   | 206.54 ± 13.21 | 161.05 ± 14.72***              | 183.73 ± 14.19*   | 186.53 ± 8.96*    |
|          | 120       | 123.6 ± 8.02***   | 203.08 ± 22.64 | 160.79 ± 15.62**               | 177.33 ± 10.26*   | 181.33 ± 17.35    |
|          | 10        | 55.81 ± 7.43      | 55.88 ± 7.53   | 49.02 ± 4.63                   | 50.54 ± 5.74      | 57.00 ± 6.93      |
|          | 20        | 64.42 ± 6.92      | 64.91 ± 6.87   | 54.80 ± 6.32                   | 57.38 ± 6.33      | 64.69 ± 8.54      |
|          | 30        | 72.51 ± 7.56      | 71.98 ± 7.01   | 73.70 ± 8.90                   | 70.73 ± 7.48      | 77.00 ± 10.46     |
|          | 45        | 80.63 ± 7.66***   | 224.78 ± 14.68 | 234.16 ± 23.51                 | 224.39 ± 25.93    | 232.26 ± 27.28    |
|          | 60        | 89.31 ± 8.19***   | 226.04 ± 22.83 | 204.29 ± 11.66                 | 216.28 ± 22.06    | 218.03 ± 14.63    |
|          | 75        | 98.36 ± 8.87***   | 229.86 ± 17.86 | 191.47 ± 18.97**               | 204.85 ± 21.58    | 206.85 ± 17.14    |
| LDH<br>组 | 90        | 102.24 ± 10.37*** | 238.81 ± 17.48 | 205.06 ± 22.77*                | 203.58 ± 20.90*   | 209.79 ± 18.00*   |
|          | 105       | 113.38 ± 16.69*** | 242.12 ± 18.01 | 188.43 ± 17.57***              | 198.13 ± 14.04*** | 221.17 ± 16.15    |
|          | 120       | 121.76 ± 20.49*** | 245.03 ± 23.35 | 193.27 ± 16.37***              | 203.48 ± 24.27*   | 221.15 ± 22.12    |

1)  $\bar{x} \pm S$ ,  $n = 4$ ; CCl<sub>4</sub> 在 30 min 时加入, 受试药物在 45 min 时加入;  
\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.005$ (与对照组相比)

能与减轻自由基的损伤有关.本研究结果与 HPP 对在体动物肝损伤的影响是一致的,这说明 HPP 对在体和离体的动物肝损伤均有抑制作用.

#### 参考文献:

- [1] LI M S, GU L Q, HUANG Z S, et al. Synthesis of 6-substituted-3-hydroxy-4 (1H)-pyridiones: oxidation-michael addition of 3-hydroxy-4(1H)-pyridinones[J]. Tetrahedron, 1999, 55(2): 237 - 243.
- [2] CRAGG L, HEBBEL R P, MILLER W, et al. The iron chelator L1 potentiates oxidative DNA damage in iron-loaded liver cells[J]. Blood, 1998, 92(2): 632 - 636.
- [3] MOREL I, CILLARD J, LESCOAT G, et al. Antioxidant and free radical scavenging activities of the iron chelators pyoverdin and hydroxypyrid-4-ones in iron-loaded hepatocyte cultures: comparison of their mechanism of protection with that of desferrioxamine[J]. Free Radic Biol Med, 1992, 13(5): 499 - 503.
- [4] SADRZADEH S M, NANJI A A, PRICE P L. The oral

iron chelator, 1, 2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one reduces hepatic-free iron, lipid peroxidation and fat accumulation in chronically ethanol-fed rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1994, 269(2): 632 - 635.

- [5] 蒲含林, 孙奋勇, 许实波. 2-乙基-3-羟基-6-苯硫基-4(1H)-吡啶酮对动物实验性肝损伤的保护作用[J]. 暨南大学学报(自然科学和医学版), 2001, 22(3): 105 - 109.
- [6] SCHOLZ R, HANSEN W, THURMAN R G. Interaction of mixed function oxidation with biosynthetic processes. 1. Inhibition of gluconeogenesis by aminopyrine in perfused rat liver[J]. Eur J Biochem, 1973, 38: 64.
- [7] 李仪奎, 王钦茂. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 科学技术出版社, 1991.
- [8] 丁炜, 朱苓, 李晓冬, 等. 银杏叶提取物对诱发大鼠肝灌流损伤的影响[J]. 中国药科大学学报, 1999, 30(2): 127 - 129.
- [9] 马润泉, 顾熊飞. 生物化学[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1994.

## Effect of 2-Ethyl-3-Hydroxy-6-Phenylthio-4- (1H) -Pyridinone on Perfused Rat Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride

PU Han-lin<sup>1</sup>, HONG An<sup>1</sup>, PENG Bo<sup>2</sup>, JIANG Jian-min<sup>2</sup>, XU Shi-bo<sup>2</sup>

(1. Bio-Engineering Institute, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** This paper reported the effects of 2-ethyl-3-hydroxy-6-phenylthio-4- (1H) -pyridinone (HPP) on perfused rat liver injury induced by carbon tetrachloride. The results showed that HPP obviously reduced the release of alanine aminotransferase, aspartic aminotransferase and lactic dehydrogenase from carbon tetrachloride induced hepatocytes. It indicated that HPP has a hepatoprotective action on isolated liver injury.

**Keywords:** 2-ethyl-3-hydroxy-6-phenylthio-4- (1H) -pyridinone; carbon tetrachloride; liver injury

(上接第 125 页)

#### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国林业部. 全国湿地资源调查与监测技术规程(试行本), 1997.
- [2] 国家海洋局编. 中国海洋 21 世纪议程行动计划[M]. 北京: 国家海洋局, 1996.

- [3] 陆健健. 中国湿地研究和保护[M]. 上海: 华东师范大学出版社, 1998.
- [4] 广东省志. 海洋与海岛志[M]. 广州: 广东人民出版社, 2000.
- [5] 陈述彭. 遥感地学分析[M]. 北京: 北京科技出版社, 1990.
- [6] 胡著智. 遥感技术与地学应用[M]. 南京: 南京大学出版社, 1999.

## Investigation, Exploitation and Management of Guangdong Coastal Wetland Using Remote Sensing

HE Zhi-jian, GUAN Lu-ji, KE Dong, WANG Juan, LI Fang

(Center of Remote Sensing, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** The present situation and developing trend of Guangdong coastal wetlands are investigated with remote sensing technology. It is found that the main uses of these wetlands are aquaculture, farming, urban development and fishery. The most serious threat to the wetland in this area comes mainly from overuse and environmental pollution. Based on the results of investigation, the resource and environment of the coastal wetland in Guangdong is evaluated and some strategies and measurements for the protection and exploitation are given.

**Keywords:** remote sensing; coastal wetland; resource and environment