

黄芪多糖对鲤化学性肝细胞损伤的抑制作用

贾睿^{1,2} 杜金梁² 曹丽萍² 徐跑^{1,2} 殷国俊^{1,2} 柏爱旭³

1. 南京农业大学无锡渔业学院, 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心/农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室/

鱼类免疫药理学国际联合实验室, 无锡 214081;

3. 淮安出入境检验检疫局, 淮安 223001

摘要 为探讨黄芪多糖对鲤肝细胞的保护作用, 利用 8 mmol/L 的四氯化碳(CCl_4)作用肝细胞 4 h 来构建鲤肝细胞体外损伤模型, 用不同质量浓度(0.2、0.4 和 0.8 mg/mL)的黄芪多糖分别前处理、后处理和前后处理肝细胞, 然后观察肝细胞形态, 检测肝细胞活力, 细胞上清中谷草转氨酶(GOT)、谷丙转氨酶(GPT)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量以及肝细胞中细胞色素 P450 酶 1A 和 3A(CYP1A 和 CYP3A) mRNA 的相对表达量。结果显示: 黄芪多糖显著地抑制由 CCl_4 损伤引起的肝细胞培养上清中 GPT、GOT、LDH 活性和 MDA 含量的升高, 提高 SOD 活性及肝细胞的活力($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 同时, 0.4 和 0.8 mg/mL 黄芪多糖显著提高 CYP1A mRNA 的相对表达量($P < 0.05$), 0.4 mg/mL 黄芪多糖显著提高 CYP3A mRNA 的相对表达量($P < 0.05$), 形态学观察结果也显示黄芪多糖有效地抑制鲤肝细胞死亡。以上结果表明, 黄芪多糖可有效保护鲤化学性肝细胞损伤, 并对 CYP1A 和 CYP3A 的表达有积极作用。

关键词 鲤; 肝细胞; 黄芪多糖; 细胞色素 P450; 四氯化碳

中图分类号 S 942.5; Q 959.46⁺8 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)02-0103-08

在水环境中, 鱼类直接暴露在各种污染物中, 很多毒物需经过肝脏进行代谢, 因此, 和其他器官相比, 肝脏更容易受到损害^[1]。研究表明, 四氯化碳、铬化物、二噁英、乙醇等化学物质在肝细胞内代谢产生大量的自由基导致肝损伤^[2]。目前, 在水产动物的病害防治及其健康养殖中, 中草药提取物以及添加剂已被广泛应用, 可提高鱼类免疫力, 增强病原菌抵抗能力, 促进鱼类生长等^[3-4]。研究发现, 抗生素、杀虫剂和抗病毒药物对鱼类肝损伤治疗效果不明显^[1,5], 而一些研究者利用天然药物提取物来防治鱼类肝损伤, 并取得一定效果^[6-7]。中草药为天然药物, 具有很多优势, 如毒副作用小, 不会在鱼体内残留等, 已经成为替代抗生素、杀虫剂等治疗、预防水产动物疾病的首选药物。因此, 中草药在水产动物肝损伤防治中的应用将逐渐扩大。

研究表明, 体外培养细胞可作为代替模型用于药理和环境毒理学研究^[8]。原代肝细胞培养模型被

广泛应用于各个方面的研究, 如肝细胞结构、血清蛋白的合成与分泌、碳水化合物和氨基酸的代谢和药物作用机理等^[7,9]。体外研究可减少实验动物所用数量、节约试验时间、可排除体内其他因素的干扰^[10], 同时可进行多种药物的药理试验^[11]。

黄芪为豆科紫云英膜荚黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch) Bge.] 及内蒙黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Bge.) (*A. mongolicus* Bge.) Hsian] 的根, 是一种传统的中草药, 用于多种疾病的防治。黄芪的主要药用活性成分黄芪多糖 (*Astragalus polysaccharides*, APS) 具有多方面的活性, 可增强机体免疫力、改善肝细胞的功能、提高抗氧化能力^[12-13]。在水产动物中, Yin 等^[3,14] 研究显示, 黄芪提取物以及主要成分黄芪多糖能显著提高鲤、罗非鱼的免疫力和抗嗜水气单胞菌感染能力。笔者用 CCl_4 对体外原代肝细胞进行损伤, 通过检测细胞中各种生化指标以及 CYP1A 和 CYP3A 基因

收稿日期: 2013-04-28

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK2012535)、国家自然科学基金项目(31202002、31200918)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2013JBFM12)

贾睿, 博士研究生, 研究方向: 鱼类药理学与免疫学, E-mail: jiarui5582@163.com

通信作者: 殷国俊, 博士, 研究员, 研究方向: 鱼类免疫学, E-mail: yingj@ffrc.cn

的相对表达量来探索黄芪多糖对鲤肝细胞的保护作用机制,同时为黄芪提取物在鱼类肝损伤疾病防治中的应用提供一些基础数据。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

试验所用鱼饲养于中国水产科学研究院淡水渔业研究中心渔场,体质量(60 ± 2) g,健康无病,试验前暂养于循环水养殖系统中。

1.2 试剂

黄芪提取物购自西安应化生物技术有限公司,有效成分黄芪多糖含量为 70%。

四氯化碳(CCl_4)购自海谷研科技有限公司;L-15 培养基、Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS)、两性霉素 B(amphotericin B)、链霉素/青霉素(streptomycin/penicillin)、二甲基亚砷(DMSO)、0.25%胰蛋白酶和 0.5%台盼蓝购于 SIGMA 公司(St. Louis, Missouri, USA);新生胎牛血清(FCS)购自 GIBCO 公司(USA);GPT、GOT、LDH、SOD 和 MDA 试剂盒购于南京建成科技有限公司;WST-1 购自碧云天生物技术研究。

1.3 鲤肝细胞分离与培养

肝细胞的分离根据笔者前期建立的方法进行^[10]。已分离的肝细胞用台盼蓝染色后进行活细胞计数,只有在活细胞数达到细胞总数的 90%以上时,方可进行下一步试验。细胞浓度用 L-15 培养基(含 1% S/P 和 5% FCS)调整为每毫升 1×10^6 个细胞,接种到 96 孔板中和 24 孔板中,96 孔板中每孔 100 μL ,24 孔板中每孔 1 mL,27 $^{\circ}\text{C}$ 培养,备用。

1.4 试验设计

将培养于 96 孔板和 24 孔板中的待用肝细胞,吸弃上清,加入 L-15 培养基(含 CCl_4 和 APS),进行肝细胞体外损伤并与保护研究。具体分组为:

正常对照组(Ctrl):用 L-15 培养基培养培养 8 h 后,换用新鲜的 L-15 培养基孵育 4 h,每孔 100 μL 或 1 mL,24 孔板收集上清和细胞。

CCl_4 组(CCl_4):用 L-15 培养基培养 8 h 后,换用含 8 mmol/L CCl_4 的 L-15 培养基培养孵育 4 h,每孔 100 μL 或 1 mL,24 孔板收集上清和细胞。

黄芪多糖对照组(APS Ctrl):用 L-15 培养基培养培养 8 h 后,换用含 0.8 mg/mL 黄芪多糖 L-15 培养基培养孵育 4 h,每孔 100 μL 或 1 mL,24 孔板

收集上清;黄芪多糖对照组用于验证黄芪多糖对鲤肝细胞是否有毒性。

黄芪多糖前处理组(pre-treatment):用 L-15 培养基培养 4 h 后,换用含黄芪多糖(0.2、0.4、0.8 mg/mL)的 L-15 培养基孵育 4 h,再换用含 8 mmol/L 的 CCl_4 的 L-15 培养基孵育 4 h,每孔 100 μL 或 1 mL,24 孔板收集上清和细胞。前处理组用于研究黄芪多糖对鲤肝细胞损伤的预防作用。

黄芪多糖后处理组(post-treatment):用 L-15 培养基培养 4 h 后,换含 8 mmol/L CCl_4 的 L-15 培养基培养 4 h,再换用含黄芪多糖 0.2、0.4、0.8 mg/mL 的 L-15 培养基孵育 4 h,每孔 100 μL 或 1 mL,24 孔板收集上清。后处理组用于研究黄芪多糖对鲤肝细胞损伤的治疗作用。

黄芪多糖前后处理组(pre and post-treatment):含黄芪多糖 0.2、0.4、0.8 mg/mL 的 L-15 培养基培养 4 h,换用含 8 mmol/L CCl_4 的 L-15 培养基孵育 4 h,再换用含黄芪多糖 0.2、0.4、0.8 mg/mL 的 L-15 培养基孵育 4 h,每孔 100 μL 或 1 mL,24 孔板收集上清。前后处理组用于研究黄芪多糖对鲤肝细胞损伤的预防和治疗同时作用。

以上 L-15 培养基均含 1% S/P 和 5% FCS,每个试验组均设 4 个平行重复,4 条鱼重复,96 孔板用于检测细胞活力,24 孔板用于检测生化指标以及 CYP1A 和 CYP3A mRNA 表达。

1.5 细胞活力的检测

细胞活力通过 WST-1 试剂盒检测(碧云天生物技术研究)。将已处理过的 96 孔板中的细胞加入 WST-1 溶液,每孔 10 μL ,然后孵育 2 h,用酶联免疫检测仪测定各孔光吸收值,波长为 450 nm,记录结果。细胞存活率按公式计算:细胞存活率 = D_{450} (处理组) / D_{450} (对照组) $\times 100\%$ 。

1.6 生化指标的测定

收集每组的细胞上清,GPT、GOT 和 LDH 用相应的检测试剂盒测定,SOD 用 WST 法^[15]检测;MDA 通过硫代巴比妥酸(TBA)法^[16]测定,操作方法根据试剂盒说明书进行。

1.7 CYP1A 和 CYP3A 相对表达量的测定

收集前处理组中的细胞,检测 CYP1A 和 CYP3A 基因的相对表达量。根据 GenBank 中鲤 CYP1A 序列(AB048939.1)和 CYP3A 序列(GU046696.1),设计 2 对引物,CYP1A (F1: TGACAAGGACAACATC-

CGAGAG, R1: ATAGACGACAAGCCCAA -GACAGAG); CYP3A (F2: CTCGTTCTTCTTGTG-GTCCT, R2: CACCGCTTTATTTCCT-TTCATC), 用鲤的管家基因 β actin 序列 (M24113. 1), 设计 β -actin 引物 (F1: GT-CAAGTCC-GTTGAGATGCACC, R1: GGAT-GATGACCTGAGCATTGAAGC)。所有引物由上海捷瑞生物技术有限公司合成, 扩增的片段为150~173 bp。收集前处理组的鲤肝细胞, 参照 RNeasy Mini Handbook (QIAGEN 公司) 说明书用试剂盒提取总 RNA, D_{260}/D_{280} 保持在 1.8~2.0 左右。

按照 SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit (大连 TaKaRa 公司) 使用说明, 进行 RT 反应, 然后以 RT 反应液为模板进行实时定量 PCR, 荧光染料为 SYBR Green I。反应条件为: 95 °C 3 min, 然后 40 个循环 (95 °C 15 s, 57 °C 60 s, 读板记录荧光量), 最后 72 °C 3 min。熔解曲线的反应条件为 65~92 °C, 每升高 0.2 °C 保持 0.02 s 读板记录荧光量, 溶解曲线分析检测引物的特异性。以 β -actin 为内参, 对得到的各样品 Ct 值进行均一化处理, 以对照组的值为基准, 应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[17] 计算 CYP1A 和 CYP3A mRNA 的相对表达量。

1.8 数据分析

所有数据均用 SPSS17.0 软件包中的单因素方差分析 (one-way -ANOVA) 处理, 对样本之间进行 t 检验。 $P<0.05$ 表示有显著性差异, $P<0.01$ 表示有极显著性差异。试验数据用平均值±标准误表示 (mean ±SD)。

2 结果与分析

2.1 黄芪多糖对肝细胞活力的影响

图 1 结果表明, CCl₄ 导致鲤肝细胞活力极显著下降, 为正常组的 60.29% ($P<0.01$); 而黄芪多糖处理组的肝细胞存活率明显上升, 除后处理组中 0.2 mg/mL 黄芪多糖对肝细胞存活率作用不显著外, 其他各个处理组中黄芪多糖显著地抑制 CCl₄ 引起的肝细胞损伤。

2.2 黄芪多糖对肝细胞中 GOT、GPT 和 LDH 活性的影响

图 2 结果显示, CCl₄ 导致鲤肝细胞损伤, 和对照组相比, CCl₄ 组细胞培养液中 GOT、GPT 和 LDH

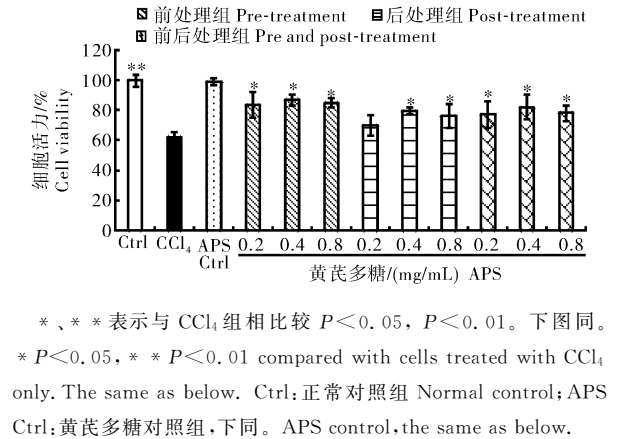


图 1 黄芪多糖对 CCl₄ 损伤原代肝细胞活力的影响
Fig.1 Effects of APS on cell viability in CCl₄-treated primary hepatocytes

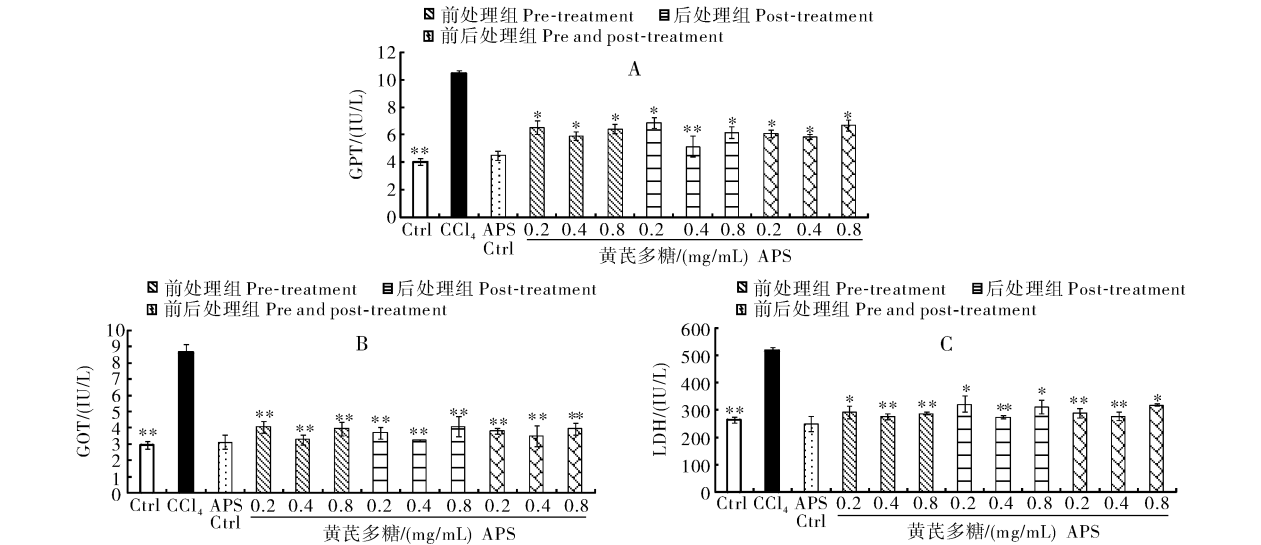


图 2 黄芪多糖对 CCl₄ 损伤原代肝细胞中 GPT (A)、GOT (B) 和 LDH (C) 活性的影响
Fig.2 Effect of APS on GPT (A), GOT (B) and LDH (C) in CCl₄-treated primary hepatocytes

活性出现极显著上升,GPT 和 LDH 值升高 1 倍左右,GOT 值升高 2 倍左右。与 CCl₄ 组相比,3 种酶活性在黄芪多糖前处理组、后处理组和前后处理组都明显升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。

2.3 黄芪多糖对肝细胞中 SOD 活性和 MDA 含量的影响

图 3A 结果显示,与对照组相比,CCl₄ 组中 SOD 活性下降 36.7% ($P<0.05$)。而当用黄芪多糖作用后,SOD 活性下降被显著抑制,其中前处理组和前后处理组中 0.4 mg/mL 的 APS 极显著提高细胞中 SOD 活性。

图 3B 结果显示,CCl₄ 组 MDA 含量比对照组高 1 倍,表明 CCl₄ 致使肝细胞严重损伤,促使 MDA 大量生成。药物处理组各浓度均不同程度地抑制肝细

胞中 MDA 的生成,减少肝细胞受损,其中后处理组 0.8 mg/mL 对肝细胞的保护作用不明显,而其他各处理组中 MDA 含量极显著低于 CCl₄ 组。

2.4 黄芪多糖对肝细胞中 CYP1A 和 CYP3A 表达的影响

肝细胞受到 CCl₄ 损伤后,CYP1A 和 CYP3A mRNA 相对表达量显著下降,与正常组相比分别下降 28.3% 和 24.5% ($P<0.05$)。而先用黄芪多糖作用后,2 种基因的相对表达量有不同程度的提升,在 0.4 mg/mL APS 组中 CYP1A 和 CYP3A 的表达量显著高于 CCl₄ 组,同样在 0.8 mg/mL APS 组中 CYP1A 的表达量也显著高于 CCl₄ 组(图 4A,B)。

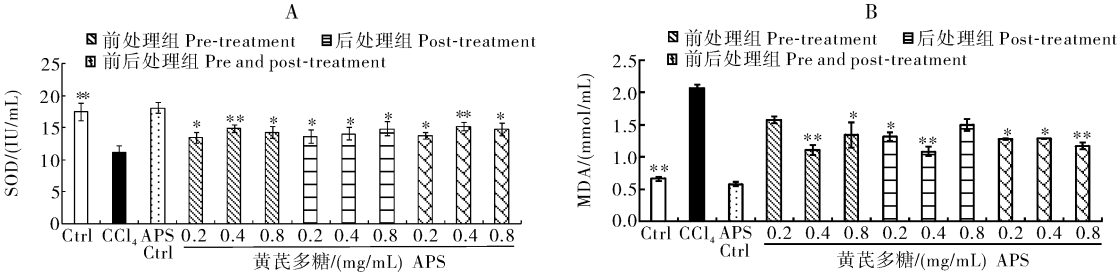


图 3 黄芪多糖对 CCl₄ 损伤原代肝细胞中 SOD (A) 和 MDA (B) 的影响
Fig. 3 Effect of APS on SOD (A) and MDA (B) in CCl₄-treated primary hepatocytes

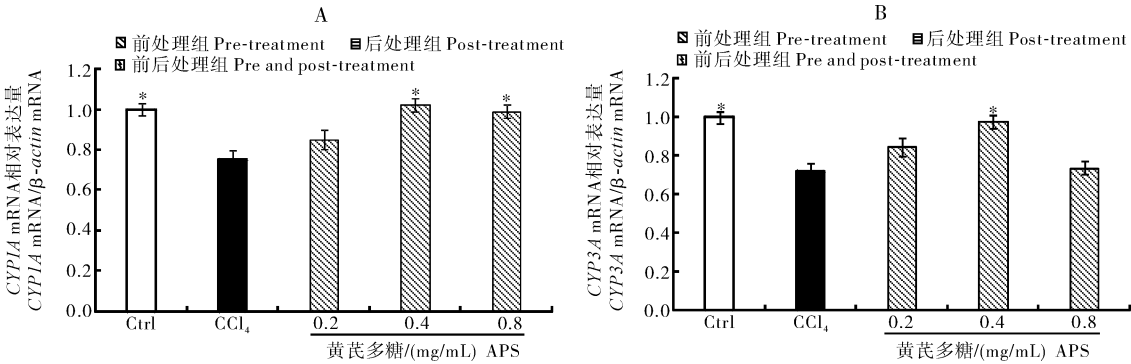
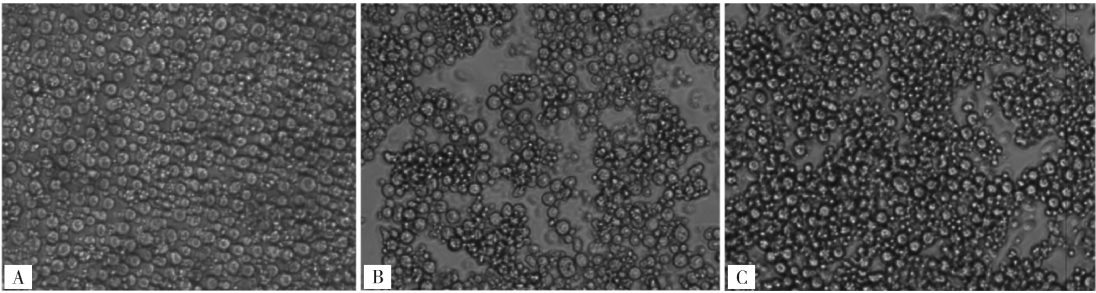


图 4 黄芪多糖对 CCl₄ 损伤原代肝细胞中 CYP1A (A) 和 CYP3A (B) 表达的影响
Fig. 4 Effect of APS on CYP1A (A) and CYP3A (B) expression in CCl₄-treated primary hepatocytes

2.5 离体肝细胞形态观察

用 CCl₄ 损伤 4 h 后,在倒置显微镜下观察肝细胞形态和数量。图 5B 显示,肝细胞数量下降,部分

肝细胞破裂、坏死并悬浮于培养基中。黄芪多糖处理组肝细胞坏死明显减少,肝细胞数量也多于 CCl₄ 组,大部分形态正常(图 5C)。



A: 正常对照组 Normal control; B: CCl₄ 处理组 CCl₄ treatment; C: 黄芪前处理组 (APS 质量浓度: 0.8 mg/mL) APS pre-treatment (APS concentration: 0.8 mg/mL).

图 5 离体肝细胞形态观察(200×)

Fig. 5 Morphological observation of the hepatocytes *in vitro* (200×)

3 讨 论

四氯化碳(CCl₄)损伤模型是目前保肝药物筛选以及作用机制研究中最常用的病理模型。CCl₄在肝细胞内经过 P450 2E1 代谢产生三氯甲基自由基(·CCl₃)、二氯甲基自由基(·CCl₂)及过氧化甲基自由基(CCl₃OO·)^[6]。过量的自由基与膜上的不饱和脂质共价结合,致使脂质过氧化,细胞膜流动性和通透性改变,破坏细胞膜的结构和完整性^[18]。和哺乳动物肝细胞类似,鱼类肝细胞对 CCl₄ 也同样敏感^[19]。研究表明,CCl₄可致使虹鳟肝(细胞)严重损伤,细胞膜通透性增强,LDH 大量外泄和 GSH 含量损耗,并且这些不利的变化呈剂量依赖性^[20]。本研究结果也显示,CCl₄会引起鲤肝细胞活力的显著下降以及 GPT、GOT 和 LDH 大量外泄。

GPT、GOT 和 LDH 为肝细胞是否损伤的经典指标,是存在于肝细胞浆内的可溶性酶,其活性变化反映肝细胞受损伤程度^[21]。CCl₄致使肝细胞损伤,细胞膜通透性增强,细胞内的这 3 种酶溢出量显著增高^[7]。本试验中,肝细胞损伤后,GPT、GOT 和 LDH 大量释放入细胞培养液,致使细胞培养液 GPT、GOT 和 LDH 浓度显著升高。当用黄芪多糖处理后,细胞培养液中 GPT、GOT 和 LDH 活性显著降低。由此推断黄芪多糖对鲤肝细胞膜具有修复作用,有研究者也推测这种保护机制与其抗磷脂氧化作用有关^[22]。研究表明,在哺乳动物体内黄芪多糖可有效地抗脂质氧化,保护细胞膜的完整性^[13]。此结果和以前对小鼠的研究结果一致^[23]。

药物抗氧化能力在肝保护中起主要作用^[24]。

对哺乳动物的研究表明,黄芪多糖能较好地保持 SOD 酶的含量,从而防止自由基对细胞结构的损伤^[25]。本研究也显示了类似的结果,黄芪多糖可不同程度地抑制 CCl₄使肝损伤导致的肝细胞中 SOD 活性的下降。有研究发现,黄芪多糖能够增强机体的抗氧化能力,提高清除自由基的能力^[13]。由此可推测,黄芪多糖对鲤肝细胞保护作用与其清除自由基能力和还原能力有关。

脂质过氧化是 CCl₄肝损伤的重要指标之一,其主要产物为 MDA,在细胞内可与生物大分子结合形成加醛复合物,进一步破坏细胞膜结构,因此其含量的高低可反映细胞受自由基攻击程度^[26]。CCl₄在细胞内代谢为多种自由基,这些自由基能够介导 MDA 大量生成^[27]。段荟等^[28]研究结果显示,黄芪提取物可抑制 MDA 的上升,提示黄芪提取物对肝细胞的保护作用与其对机体脂质过氧化作用的抑制有关。本试验结果显示,CCl₄可显著增加鲤肝细胞 MDA 的含量,促使肝细胞脂质过氧化;黄芪多糖处理后 MDA 的生成显著被抑制,表明黄芪多糖可有效抑制 CCl₄引起的肝组织脂质过氧化。

中药与损伤剂的给予顺序会影响黄芪多糖对肝细胞的保护作用。图 1 显示,前处理组细胞活力高于后处理组,LDH 和 MDA 含量在前处理 0.4 mg/mL 组中最低,同时,前处理 0.4 mg/mL 组中 SOD 含量高于其他处理组,表明黄芪多糖对鲤肝损伤的预防作用比治疗作用更重要。

细胞色素 P450(CYP450)是一组结构和功能相关的超家族基因编码的同工酶,主要分布于肝脏。90%以上的药物和毒物代谢都要通过肝微粒体酶的

细胞色素 P450^[29]。研究表明,CYP 酶系统对 CCl₄ 非常敏感,CYP2E1 对 CCl₄ 在体内的代谢中起关键性的作用。Kose 等^[30] 在对小鼠的研究中,发现 CCl₄ 造成肝损伤时,体内的 CYP 酶活力要低于正常对照组;Yokogawa 等^[31] 也发现小鼠肝脏暴露在 CCl₄ 24 h 后,其 CYP1A 和 CYP3A 的 mRNA 相对表达量显著降低;后来研究者用 Western blot 方法分析发现,CCl₄ 损伤后小鼠肝脏中 CYP3A 含量也明显下降^[32]。但也有研究发现,一定含量的 CCl₄ 引起 CYP1A 含量的升高^[27];同样,有研究报道 CCl₄ 能诱导淋巴瘤细胞株(MCL-5)中 CYP1A1 和 CYP3A4 的表达^[33];Bastien 等^[34] 研究也发现不同剂量的低浓度的 CCl₄ 对大部分酶活力影响不大,但能使肝组织有些 CYP2E 活力升高,而高剂量的 CCl₄ 明显地降低大部分细胞色素酶活力。

水产动物肝组织中 CYP1A 和 CYP3A 含量很丰富,在药物和和毒物代谢过程中都起着重要作用^[34]。研究表明,在水产动物中 CYP1A 对各种毒性物质非常敏感,如 TCDD 常被作为检测水环境污染的标志物^[35]。当水体受到污染时鱼体内的 CYP1A 会出现上升趋势,但鱼肝脏受到严重损伤后 CYP1A 的表达出现下降^[23]。CYP1A 和 CYP3A 在鱼药的代谢研究中也非常广泛,CYP3A 活性变化直接影响药物治疗效果和毒性反应^[32]。CYP450 活性及表达受药物种类、研究物种和性别差异等因素影响^[36]。

目前,大多数研究着重于诱导剂对细胞色素 P450 酶活性影响以及其酶活性诱导后导致的药物间相互作用,而在分子水平的研究报告很少。本研究发现,肝细胞暴露在 8 mmol/L 的 CCl₄ 中时,其 mRNA 相对表达量明显下降,当用黄芪多糖处理后,CYP1A 和 CYP3A mRNA 相对表达量明显上升。表明黄芪多糖能增强肝细胞中 CYP1A 和 CYP3A 基因的表达,从而使肝细胞内的 CYP1A 和 CYP3A 含量有可能升高,进而增强了肝细胞的解毒能力。

本研究结果显示,黄芪多糖对鲤肝细胞具有保护作用,这种保护作用可能和黄芪多糖的抗氧化能力以及诱导 CYP450 酶的表达有关;同时也表明黄芪多糖可作为一种保肝药物,用来防治鱼类化学性

肝损伤。

参 考 文 献

- [1] MOUTOU K, BRAUNBECK T, HOULIHAN D. Quantitative analysis of alterations in liver ultrastructure of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after administration of the aquaculture antibacterials oxolinic acid and flumequine [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1997, 29(1): 21-34.
- [2] ARNOLD H, PLUTA H J, BRAUNBECK T. Sublethal effects of prolonged exposure to disulfoton in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): cytological alterations in the liver by a potent acetylcholine esterase inhibitor [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1996, 34(1): 43-55.
- [3] YIN G, ARDO L, THOMPSON K, et al. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2009, 26(1): 140-145.
- [4] LIU B, XU L, GE X, et al. Effects of mannan oligosaccharide on the physiological responses, HSP70 gene expression and disease resistance of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) under *Aeromonas hydrophila* infection [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2013, 34(6): 1395-1403.
- [5] 孟祥林, 丁庆秋. 鱼类肝胆综合症的发病原因及防治方法 [J]. 水利渔业, 2004, 24(3): 65-67.
- [6] MALEKINEJAD H, ALIZADEH A, CHERAGHI H, et al. The protective effect of liquorice plant extract on CCl₄-induced hepatotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Proceedings of the Veterinary Research Forum, 2010, 1(3): 158-164.
- [7] YIN G, CAO L, XU P, et al. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Glycyrrhiza glabra* extract against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2011, 37(1): 209-216.
- [8] BRAUNBECK T, SEGNER H. Isolation and cultivation of teleost hepatocytes [J]. The Hepatocyte Review, 2000, 45(2): 49-72.
- [9] 贾睿, 曹丽萍, 丁炜东, 等. 鱼类肝细胞分离, 原代培养与应用研究综述 [J]. 江西农业大学学报, 2012, 34(1): 147-157.
- [10] 贾睿, 曹丽萍, 丁炜东, 等. 鲫鱼肝细胞分离与原代培养方法的优化 [J]. 华北农学报, 2011, 26(12): 206-212.
- [11] LANY C, SEGNER H. *In vitro* fish hepatocytes as source of metabolic clearance data in alternative approaches for the reduction or replacement of *in vivo* bioaccumulation testing with fish [D]. Berne: Library of University of Berne, 2010.
- [12] RIOS J, WATERMAN P. A review of the pharmacology and toxicology of *Astragalus* [J]. Phytotherapy Research, 1998, 11(6): 411-418.

- [13] LI R, CHEN W, WANG W, et al. Antioxidant activity of *Astragalus polysaccharides* and antitumour activity of the polysaccharides and siRNA [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 82(2):240-244.
- [14] YIN G, JENEY G, RACZ T, et al. Effect of two Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Scutellaria radix*) on non-specific immune response of tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. *Aquaculture*, 2006, 253(1):39-47.
- [15] 吴玉泓, 魏彦明, 郭延生. 大鼠实验性流产模型的建立及黄芪多糖对其的影响[J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(4):341-344.
- [16] OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction [J]. *Analytical Biochemistry*, 1979, 95(2):351-358.
- [17] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [18] ADZET T, CAMARASA J, LAGUNA J C. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl_4 toxicity in isolated rat hepatocytes [J]. *Journal of Natural Products*, 1987, 50(4):612-617.
- [19] STATHAM C N, CROFT W A, LECH J J. Uptake, distribution, and effects of carbon tetrachloride in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1978, 45(1):131-140.
- [20] RÁBERGH C M I, LIPSKY M M. Toxicity of chloroform and carbon tetrachloride in primary cultures of rainbow trout hepatocytes [J]. *Aquatic Toxicology*, 1997, 37(2/3):169-182.
- [21] COBALLASE-URRUTIA E, PEDRAZA-CHAVERRI J, CÁRDENAS-RODRÍGUEZ N, et al. Hepatoprotective effect of acetic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl_4 -induced toxicity in rats [J]. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2011, 63(4):363-370.
- [22] WANG J H, DONG J C, ZHAO J X, et al. Effects of different molecule weight *Astragalus polysaccharin* isolated from annual astragalus membranaceus on expressions of inflammatory cytokines in RAW264. 7 cells [J]. *Journal of Jilin University: Medicine Edition*, 2011, 6(12):28-38.
- [23] KRASNOV A, KOSKINEN H, REXROAD C, et al. Transcriptome responses to carbon tetrachloride and pyrene in the kidney and liver of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 74(1):70-81.
- [24] HATTORI T, ITO M, SUZUKI Y. Studies on antinephritic effects of plant components in rats (1). Effects of saikosaponins original-type anti-GBM nephritis in rats and its mechanisms [J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi Folia Pharmacologica Japonica*, 1991, 97(1):13-21.
- [25] YADAV N P, PAL A, SHANKER K, et al. Synergistic effect of silymarin and standardized extract of *Phyllanthus amarus* against CCl_4 -induced hepatotoxicity in *Rattus norvegicus* [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15(12):1053-1061.
- [26] MANSOUR M A. Protective effects of thymoquinone and desferrioxamine against hepatotoxicity of carbon tetrachloride in mice [J]. *Life Sciences*, 2000, 66(26):2583-2591.
- [27] ZHANG Y, JIA Y, YANG M, et al. The impaired disposition of probe drugs is due to both liver and kidney dysfunctions in CCl_4 -model rats [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2012, 33(3):453-458.
- [28] 段荟, 付成效, 邹瑾. 黄芪对酒精性肝损伤小鼠 MDA, GSH 和 TG 的影响及肝脏保护作用的研究 [J]. *陕西医学杂志*, 2010(3):271-273.
- [29] NEMEROFF C B, DEVANE C L, POLLACK B G. Newer antidepressants and the cytochrome P450 system [J]. *The American Journal of Psychiatry*, 1996, 153(3):311-320.
- [30] KOSE N, ISAWA M, KIZU J, et al. Application of the PKCYP test to predict caffeine clearance mediated by CYP1A2 in a rat acute liver injury model [J]. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2003, 18(5):296-302.
- [31] YOKOGAWA K, WATANABE M, TAKESHITA H, et al. Serum aminotransferase activity as a predictor of clearance of drugs metabolized by CYP isoforms in rats with acute hepatic failure induced by carbon tetrachloride [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, 269(2):479-489.
- [32] XIE Y, HAO H, KANG A, et al. Integral pharmacokinetics of multiple lignan components in normal, CCl_4 -induced hepatic injury and hepatoprotective agents pretreated rats and correlations with hepatic injury biomarkers [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010, 131(2):290-299.
- [33] 刘多民. 四氯化碳对乙醇对 3 种细胞色素 P450 酶基因表达的影响 [J]. *中国职业医学*, 2002, 29(2):16-18.
- [34] BASTIEN M C, LEBLOND F, PICHETTE V, et al. Differential alteration of cytochrome P450 isoenzymes in two experimental models of cirrhosis [J]. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 2000, 78(11):912-919.
- [35] BRAMMELL B F, MCCLAIN J S, ORIS J T, et al. CYP1A expression in caged rainbow trout discriminates among sites with various degrees of polychlorinated biphenyl contamination [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2010, 58(3):772-782.
- [36] MEUCCI V, ARUKWE A. The xenoestrogen 4-nonylphenol modulates hepatic gene expression of pregnane X receptor, aryl hydrocarbon receptor, CYP3A and CYP1A1 in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C, Toxicology & Pharmacology*, 2006, 142(1/2):142-150.

Inhibition effect of *Astragalus* polysacharin on chemical hepatocyte damage of common carp (*Cyprinus carpio*)

JIA Rui^{1,2} DU Jin-liang² CAO Li-ping² XU Pao^{1,2} YIN Guo-jun^{1,2} BAI Ai-xu³

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Genetic Breeding and Aquaculture Biology
of Freshwater Fishes, Ministry of Agriculture/
International Joint Research Laboratory for Fish Immunopharmacology,

Freshwater Fisheries Research Center,
Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China;

3. Huai'an Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Huai'an 223001, China

Abstract To evaluate the inhibition effect of *Astragalus* polysacharin (APS) on chemical hepatocyte injury of common carp, APS (0.2, 0.4 and 0.8 mg/mL) was added to the primary hepatocytes pre-treatment, post-treatment and both pre- and post-treatment with the incubation of hepatocytes in the culture medium with 8 mmol/L CCl₄. The morphology of liver cells was then observed by microscope, lactate dehydrogenase (LDH), glutamate pyruvate transaminase (GPT), glutamate oxalate transaminase (GOT), superoxide dismutase (SOD) and malondial-dehyde (MDA) in the supernatants were measured, hepatocyte viability was investigated and the mRNA expression of cytochrome P450 1A and 3A (CYP1A and CYP3A) in the hepatocytes were studied. The results showed that APS significantly improved cell viability, inhibited the elevation of GPT, GOT, LDH and MDA, and increased the SOD level in the supernatants ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression of CYP1A mRNA was improved in 0.4 and 0.8 mg/mL APS treatments ($P < 0.05$) and the expression of CYP3A mRNA was upgraded in 0.4 mg/mL APS treatment ($P < 0.05$). The observation of morphology also showed that APS effectively inhibited mortality of the hepatocytes. It can be concluded from the data obtained that APS exhibited protective effect against CCl₄-induced hepatotoxicity in fish, and positively induced the expression of CYP1A and CYP3A.

Key words *Cyprinus carpio*; hepatocytes; *Astragalus* polysacharin; cytochrome P-450; carbon tetrachloride

(责任编辑:边书京)