

双丙戊酸钠和丙戊酸钠对 HepG2 细胞的毒性作用及机制

纪巧丽¹, 林 蓉¹, 史晓莲¹, 毛幼桦², 翟小刚²

(1. 西安交通大学医学院药理学系, 陕西 西安 710061; 2. 陕西天森药物研究开发有限责任公司, 陕西 西安 710075)

摘要: **目的** 探讨双丙戊酸钠和丙戊酸钠对肝细胞的毒性作用及其可能的作用机制。**方法** 肝癌细胞株 HepG2 加入双丙戊酸钠和丙戊酸钠 0.1, 0.3, 1 和 3 mmol·L⁻¹, 培养 24 h 后, MTT 法测定 HepG2 的细胞存活; 双丙戊酸钠和丙戊酸钠 0.3, 0.5 和 1.0 mmol·L⁻¹ 作用 HepG2 细胞 24 h, 丙酮酸法测定培养液中乳酸脱氢酶(LDH) 活性, 赖氏法测定培养液中谷丙转氨酶(GPT) 和谷草转氨酶(GOT) 活性; 双丙戊酸钠和丙戊酸钠 62.5, 125, 250, 500 和 1000 μmol·L⁻¹ 作用 24 h, 实时定量逆转录聚合酶链反应 RT-PCR 测定细胞色素 P450 家族中 CYP1A1 mRNA 和 CYP1A2 mRNA 表达的变化。**结果** 与溶剂对照组比较, 双丙戊酸钠和丙戊酸钠 0.1, 0.3, 1 和 3 mmol·L⁻¹ 均显著抑制细胞的存活 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且存在浓度依赖关系。双丙戊酸钠与丙戊酸钠 0.3, 0.5 和 1 mmol·L⁻¹ 使 HepG2 细胞培养液中 GPT, GOT 和 LDH 的活性明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且随浓度升高, 肝酶活性进一步升高。双丙戊酸钠与丙戊酸钠 62.5, 125, 250, 500 和 1000 μmol·L⁻¹ 使 HepG2 细胞中 CYP1A1 mRNA 和 CYP1A2 mRNA 的表达水平亦逐渐升高。**结论** 双丙戊酸钠和丙戊酸钠对 HepG2 细胞都有明显的毒性作用, CYP1A1 mRNA 和 CYP1A2 mRNA 表达水平的升高可能是丙戊酸类药物诱发肝毒性的机制之一。

关键词: 双丙戊酸钠; 丙戊酸钠; HepG2 细胞; 细胞色素 P450 酶系统; 细胞毒性

中图分类号: R971.6, R99 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2010)02-0214-05

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2010.03.010

近年来, 癫痫发病率居高不下, 抗癫痫药物的治疗仍然是癫痫治疗的主流手段。丙戊酸钠(sodium valproate) 作为国内一线抗癫痫药物在临床广泛使用, 但其不良反应是肝功能受损, 甚至导致肝衰竭^[1]。目前, 国外使用最普遍的丙戊酸盐是双丙戊酸钠(divalproex sodium)。与丙戊酸钠相比, 双丙戊酸钠胃肠道不良反应更轻以及药物相互作用较少^[2]。为阐明双丙戊酸钠和丙戊酸钠对肝细胞的毒性作用及其可能的作用机制, 观察双丙戊酸钠和丙戊酸钠对肝 HepG2 细胞的生长抑制作用; 测定细胞培养液中谷丙转氨酶(glutamic pyruvic transaminase, GPT)、谷草转氨酶(glutamic oxaloacetic transaminase, GOT) 和乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH) 的活性; 实时定量逆转录聚合酶链反应(real time quantitative RT-PCR) 测定细胞色素 P450A1 (cytochrome P450A1,

CYP1A1) 和 CYP1A2 基因表达的变化。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂和仪器

肝癌细胞株 HepG2 由西安交通大学医学院第一附属医院检验科陈葳教授惠赠; RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司; 新生牛血清购自杭州四季青公司; 噻唑蓝(MTT) 和二甲亚砜(DMSO) 购自美国 Genview 公司; 丙戊酸钠, 纯度 ≥ 98%, 购自美国 Sigma 公司, 双丙戊酸钠, 纯度 ≥ 98%, 由陕西天森药物研究开发有限责任公司提供, 用溶剂 DMSO 溶解受试药物, 加无血清培养基配制成 0.1 mol·L⁻¹ 的储备液, 0.22 μm 滤器过滤除菌, -20℃ 储存备用, 使用时用无血清培养基稀释至应用浓度(DMSO 终浓度 ≤ 1%); LDH 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; Qiagen M48 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒 Rever Tra Ace-α-TM 和 SYBR PrimeScript™ 荧光定量试剂盒购自美国 Sigma 公司。实时定量 RT-PCR 所用的 CYP1A1, CYP1A2 和内参基因 GAPDH 引物均购自美国 ABI 公司。

ND-100 紫外分光光度计, 美国 Nanodrop 公司;

基金项目: 西安市科技攻关项目(SF10165)

作者简介: 纪巧丽(1983-), 女, 湖北省襄樊市人, 硕士研究生, 主要从事心血管药理学研究; 林 蓉(1963-), 女, 陕西省西安市人, 教授, 博士生导师, 主要从事新药筛选及毒理学研究。

通讯作者: 林 蓉, E-mail: linrong@mail.xjtu.edu.cn, Tel: (029)82657691

7900 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; FA210 4S 型电子精密天平, 上海天平仪器厂; CO₂ 培养箱, 美国 Thermo 公司; 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 960 全自动酶标仪, 美国 Meterteoh 公司; CL-7150 全自动生化分析仪, 日本日立公司。

1.2 细胞培养

HepG2 细胞培养于 RPMI 1640 培养基中, 内含 10% 新生牛血清、NaHCO₃ 2 g·L⁻¹、青霉素 100 U·L⁻¹ 和链霉素 100 U·L⁻¹。37℃ 和 5% CO₂ 培养箱中孵育, 细胞生长至对数生长期用 0.25% 胰酶消化, 0.4% 锥虫蓝 (trypan blue) 染色证实细胞存活率 ≥95% 并计数细胞备用。

1.3 MTT 法检测 HepG2 细胞存活

取对数生长期 HepG2 细胞制备细胞悬液, 调整细胞密度为 3 × 10⁷ L⁻¹, 每孔 6 × 10³ 个细胞接种于 96 孔板, 每孔 200 μl 细胞悬液。37℃ 和 5% CO₂ 培养 48 h 后, 分别加入不同浓度的双丙戊酸钠和丙戊酸钠溶液 180 μl, 终浓度分别为 0.1, 0.3, 1 和 3 mmol·L⁻¹, 每个浓度梯度设 5 个复孔, 同时设溶剂对照孔。培养 24 h 后, 每孔加入 20 μl MTT 溶液 5 g·L⁻¹。继续培养 4 h 后, 每孔加入 150 μl 的 DMSO, 充分振荡混匀 10 min 后酶标仪在波长 492 nm 处检测吸光度 A_{492 nm} 值, 各浓度组取平均值, 根据 A_{492 nm} 值计算抑制率, 抑制率 (%) = (对照组 A_{492 nm} - 实验组 A_{492 nm}) / 对照组 A_{492 nm} × 100%。以浓度的对数值为横坐标、细胞抑制率为纵坐标, 绘制浓度-效应曲线, 并计算双丙戊酸钠和丙戊酸钠的半数抑制浓度 (IC₅₀)。

1.4 HepG2 细胞培养液中乳酸脱氢酶、谷丙转氨酶和谷草转氨酶活性的测定

取对数生长期 HepG2 细胞制备细胞悬液, 调整细胞密度为 3 × 10⁸ L⁻¹, 每孔 1.5 × 10⁵ 个细胞接种于 24 孔板, 每孔 0.5 ml 细胞悬液。37℃, 5% CO₂ 培养 48 h 后, 分别加入不同浓度的双丙戊酸钠和丙戊酸钠溶液 0.5 ml, 使终浓度分别为 0.3, 0.5 和 1 mmol·L⁻¹, 每个浓度设 5 个复孔, 同时设溶剂对照孔。培养 24 h 后收集细胞培养液, 按照试剂盒上的操作说明测定 LDH 活性, GPT 和 GOT 活性由 CL-7150 全自动生化分析仪测定。

1.5 实时 RT-PCR 法检测 HepG2 CYP1A1 和 CYP1A2 mRNA 表达

取对数生长期 HepG2 细胞制备细胞悬液, 调整细胞密度为 3 × 10⁸ L⁻¹, 每孔 3 × 10⁵ 个细胞接种于 24 孔板, 每孔 1 ml 细胞悬液。37℃ 和 5% CO₂ 培养 48 h 后分别加入不同浓度的双丙戊酸钠和丙戊酸钠溶液 0.5 ml, 终浓度分别为 62.5, 125, 250, 500

和 1000 μmol·L⁻¹, 每个浓度设 4 个复孔, 同时设溶剂对照孔。培养 24 h 后收集细胞, 参照说明书操作步骤提取总 RNA, 核酸测定仪在波长 260 nm 和 280 nm 测定吸光度 A₂₆₀ 和 A₂₈₀, 以上述总 RNA 为模板, 逆转录反应参照说明书操作步骤进行反应, 获得的 cDNA - 20℃ 保存。CYP1A1 引物: 正向: 5'-TCC GGGACATCACAGACAGC-3', 反向: 5'-AC-CCTGGGGTTCATCACCAA-3', CYP1A2 引物: 正向: 5'-CATCCCCACAGCACAACAA-3', 反向: 5'-TC-CCACTTGGCCAGGACTTC-3', 内参基因 GAPDH 引物: 正向: 5'-AGGTCCACCACTGACACGTT-3', 反向: 5'-GCCTCAAGATCATCAGCAAT-3'。参照说明书设定 PCR 程序, 重复循环进行扩增。设定熔解曲线程序, 每升高 0.5℃ 检测一次荧光信号值。反应结束仪器自动生成荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数 (threshold cycles, Ct) 值及熔解曲线图。每个样本设 3 个重复管, 同时设无模板阴性对照。将 PCR 产物作熔解曲线分析。目的基因相对表达量采用相对双 ΔCt 法^[3] 进行分析, 目的基因相对表达量以 2^{-(ΔCt_{实验组} - ΔCt_{对照组})} 来计算。ΔCt_{实验组} 和 ΔCt_{对照组} 分别是实验组和对照组目的基因和内参基因的差值。

1.6 统计学分析

实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学分析采用 SPSS 13.0 软件处理系统进行, 均数比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 方法中的 LSD 检验, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 双丙戊酸钠和丙戊酸钠对 HepG2 细胞存活的影响

双丙戊酸钠和丙戊酸钠 0.1, 0.3, 1 和 3 mmol·L⁻¹ 作用 HepG2 细胞 24 h 后, 对 HepG2 细胞存活均出现了不同程度的抑制。如图 1 所示, 与溶剂对照组相比, 双丙戊酸钠和丙戊酸钠 0.1, 0.3, 1 和 3 mmol·L⁻¹ 组对 HepG2 细胞存活均出现了明显的抑制 (*P* < 0.05); 随着双丙戊酸钠和丙戊酸钠浓度的增加, 药物呈浓度依赖性抑制 HepG2 细胞存活。双丙戊酸钠和丙戊酸钠的半数抑制浓度 IC₅₀ 分别为 33.17 和 20.72 mmol·L⁻¹, 表明双丙戊酸钠对 HepG2 细胞毒性大于丙戊酸钠。

2.2 双丙戊酸钠和丙戊酸钠对 HepG2 细胞培养液中乳酸脱氢酶、谷草转氨酶和谷丙转氨酶活性的影响

表 1 和表 2 显示, HepG2 细胞中分别加入双丙

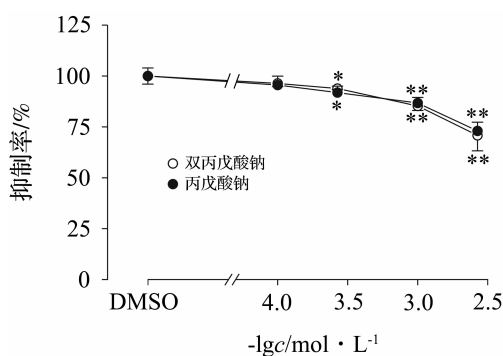


图 1 双丙戊酸钠和丙戊酸钠对 HepG2 细胞存活的影响。双丙戊酸钠和丙戊酸钠分别体外作用 HepG2 细胞 24 h, 用 MTT 方法测定细胞存活, 抑制率 (%) = (对照组 $A_{492\text{nm}}$ - 实验组 $A_{492\text{nm}}$) / 对照组 $A_{492\text{nm}} \times 100\%$. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与溶剂对照组比较。

Fig. 1 Effect of divalproex sodium and sodium valproate on HepG2 cell viability.

表 1 双丙戊酸钠对 HepG2 细胞培养液中乳酸脱氢酶 (GPT)、谷草转氨酶 (GOT) 和谷丙转氨酶 (LDH) 活性的影响

Tab. 1 Effect of sodium valproate on glutamic pyruvic transaminase (GPT), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and lactate dehydrogenase (LDH) activity in the cell medium of HepG2 cells

双丙戊酸钠/ mmol · L ⁻¹	GPT/ U · L ⁻¹	GOT/ U · L ⁻¹	LDH/ U · L ⁻¹
0 (溶剂对照)	12.0 ± 0.6	3.02 ± 0.08	748 ± 23
0.3	13.5 ± 0.4 *	3.24 ± 0.05 *	875 ± 31 **
0.5	15.5 ± 0.6 **	4.24 ± 0.11 **	1050 ± 30 **
1	19.0 ± 1.2 **	4.88 ± 0.23 **	1234 ± 75 **

双丙戊酸钠作用 HepG2 细胞 24 h. GPT: 谷丙转氨酶; GOT: 谷草转氨酶; LDH: 乳酸脱氢酶. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与溶剂对照组比较。

表 2 丙戊酸钠对 HepG2 细胞培养液中乳酸脱氢酶、谷草转氨酶和谷丙转氨酶活性的影响

Tab. 2 Effect of valproate sodium on the GPT, GOT and LDH activity in the cell culture medium of HepG2 cells

丙戊酸钠/ mmol · L ⁻¹	GPT/ U · L ⁻¹	GOT/ U · L ⁻¹	LDH/ U · L ⁻¹
0 (溶剂对照)	17.2 ± 0.5	3.90 ± 0.26	748 ± 47
0.3	19.3 ± 1.0 *	4.34 ± 0.11 *	883 ± 39 *
0.5	22.2 ± 1.1 **	5.16 ± 0.11 **	1044 ± 76 **
1	24.8 ± 1.2 **	5.86 ± 0.50 **	1408 ± 73 **

细胞处理同表 1. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与溶剂对照组比较。

戊酸钠和丙戊酸钠 0.3, 0.5 和 1 mmol · L⁻¹ 继续培养 24 h 后, 培养液中 GPT, GOT 和 LDH 的活性显著升高, 所有浓度与溶剂对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 且呈浓度依赖性。双丙戊酸钠和丙戊酸钠 0.3, 0.5 和 1 mmol · L⁻¹ 使细胞质内标志酶 GPT, GOT 和 LDH 外泄, 引起体外培养细胞死亡, 提示双丙戊酸钠与丙戊酸钠对肝脏细胞有损害作用。

2.3 双丙戊酸钠和丙戊酸钠对 HepG2 细胞 CYP1A1 和 CYP1A2 基因表达的影响

如图 2 所示, 培养至对数生长期的肝癌细胞 HepG2 培养液中分别加入双丙戊酸钠和丙戊酸钠 62.5, 125, 250, 500 和 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 继续培养 24 h, 随着药物浓度的增加, HepG2 细胞中 CYP1A1 和 CYP1A2 mRNA 表达水平逐渐升高。当丙戊酸钠浓度 $\geq 250 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 与溶剂对照组比较, CYP1A1 和 CYP1A2 基因表达有显著性升高 ($P < 0.05$); 而双丙戊酸钠浓度 $\geq 500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, CYP1A1 表达才有显著性升高 ($P < 0.01$), 浓度 \geq

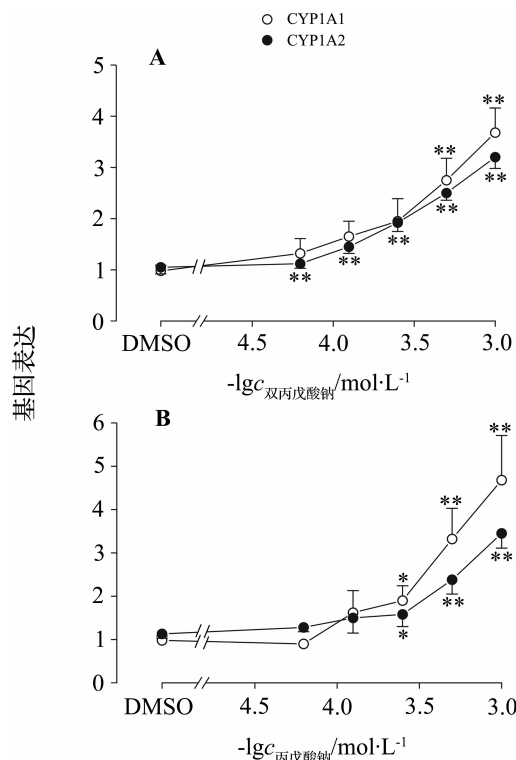


图 2 双丙戊酸钠 (A) 和丙戊酸钠 (B) 对 CYP1A1 和 CYP1A2 基因表达的影响。双丙戊酸钠和丙戊酸钠 62.5, 125, 250, 500 和 1000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 体外作用 HepG2 细胞 24 h, CYP1A1 和 CYP1A2 基因表达用实时定量 RT-PCR 方法测定。CYP1A1 和 CYP1A2 的相对基因表达量采用双 ΔCt 法表示, 其中 Ct 是荧光信号到达阈值时所经历的循环数. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与溶剂对照组比较。

Fig. 2 Effect of divalproex sodium (A) and sodium valproate (B) on CYP1A1 and CYP1A2 gene expression.

125 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, CYP1A2 表达升高, 有显著性差异。以上结果表明, 双丙戊酸钠和丙戊酸钠对 CYP1A1 及 CYP1A2 基因表达的影响有一定程度的不同。

3 讨论

在目前常用的抗癫痫药中, 以双丙戊酸钠和丙戊酸钠为代表的丙戊酸类药物始终是抗癫痫治疗中的一线药物。在国外, 早先上市的是丙戊酸 (valproic acid, VPA) 和丙戊酸类药物。1983 年由美国雅培公司研发上市了双丙戊酸钠。因为 VPA 的液态性质, 限制了其临床应用; 丙戊酸钠的固态性状使其具有很强的引湿性, 从而导致丙戊酸钠稳定性差。而双丙戊酸钠引湿性小, 固体稳定性好, 胃肠道不良反应更轻, 克服了 VPA 和丙戊酸钠在制剂方面的缺点, 因此双丙戊酸钠更为国外普遍使用。

但与其他丙戊酸类药物一样, 双丙戊酸钠也存在诱发肝脏毒性的可能性。有临床资料表明, 2 岁以下的儿童在多药联合使用治疗癫痫时曾有双丙戊酸钠损伤肝脏的病例发生^[4]。本研究结果发现, 当双丙戊酸钠和丙戊酸钠浓度小于 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 对 HepG2 细胞没有影响, 而浓度大于 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 浓度依赖性抑制 HepG2 细胞存活, 表明双丙戊酸钠在一定浓度下对肝细胞也具有损伤作用。当双丙戊酸钠浓度大于 0.3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, GPT, GOT 和 LDH 活性与对照组相比明显升高, 且存在显著性差异。有临床资料表明, 服用 VPA 的患者中 15% ~ 30% 在服药 1 ~ 6 个月出现血清中 GPT, GOT 及 LDH 等肝酶活性的升高^[5]。而实验研究表明, 丙戊酸钠浓度 > 0.3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 有引起成、幼大鼠肝细胞损伤的可能性, 且存在浓度依赖关系^[6]。以上结果表明, 在临床等效剂量 0.3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 两者对肝脏细胞有损害作用, 细胞质内标志酶 GPT, GOT 和 LDH 外泄, 引起体外培养细胞死亡。但是双丙戊酸钠引起肝损伤的机制尚不明确。

早期研究认为, VPA 诱导的肝损伤是直接的和剂量相关性的, 其干扰线粒体 β -脂酸氧化, 产生毒性代谢产物, 导致肝细胞线粒体的结构及功能异常^[7-8]。据发现, 与 VPA 肝毒性有关的体内活性代谢产物, 主要由细胞色素 P450 酶系介导产生。其中, 由细胞色素 P450 酶系介导的 ω -氧化是 VPA 毒性代谢产物产生的主要途径, 而细胞色素 P450 酶系中以细胞色素 P450 和细胞色素 P450 还原酶最具重要性^[9-10]。有实验性研究认为, 线粒体细胞色素 P450 还原酶表达的明显增强可能是高危因素时丙

戊酸肝毒性增强的重要机制之一^[11]。细胞色素 P450 酶系表达明显增强, 加剧体内 ω -氧化代谢, 从而产生了更多的 VPA 肝毒性中间代谢产物。双丙戊酸钠在体内先水解为 VPA, 经过一系列生物转化过程, 从而到达靶组织发挥其药理作用。而本研究结果发现, 双丙戊酸钠浓度 $\geq 125 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, HepG2 细胞中 CYP1A1 和 CYP1A2 基因表达水平随双丙戊酸钠增加浓度依赖性升高, 当双丙戊酸钠浓度 $\geq 500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, CYP1A1 mRNA 表达水平升高 2 倍以上, 当双丙戊酸钠浓度 $\geq 125 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, CYP1A2 mRNA 表达水平升高 1.5 倍; 当丙戊酸钠浓度 $\geq 250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, CYP1A1 和 CYP1A2 mRNA 表达水平升高约 2 倍。以上结果表明, 双丙戊酸钠有可能通过增强 CYP1A1 和 CYP1A2 mRNA 表达, 增加双丙戊酸钠肝毒性中间代谢产物, 导致细胞毒性产生。双丙戊酸钠可能诱发肝毒性, 其与 VPA 引起的肝毒性可能具有相同的作用靶点和剂量依赖性。由于 HepG2 细胞系来源于人肝癌细胞系, 关于双丙戊酸钠的肝毒性有待于在大鼠肝细胞和整体动物上做进一步研究。

参考文献:

- [1] Dreifuss FE, Santilli N, Langer DH, Sweeney KP, Moline KA, Menander KB. Valproic acid hepatic fatalities: a retrospective review [J]. *Neurology*, 1987, **37** (3):379-385.
- [2] Freitag FG, Diamond S, Diamond ML, Urban GJ. Divalproex in the long-term treatment of chronic daily headache [J]. *Headache*, 2001, **41** (3):271-278.
- [3] Chini V, Foka A, Dimitracopoulos G, Spiliopoulou I. Absolute and relative real-time PCR in the quantification of *tst* gene expression among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: evaluation by two mathematical models [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2007, **45** (5):479-484.
- [4] Silberstein SD, Wilmore LJ. Divalproex sodium: migraine treatment and monitoring [J]. *Headache*, 1996, **36** (4):239-242.
- [5] Hauser E, Seidl R, Freilinger M, Male C, Herkner K. Hematologic manifestations and impaired liver synthetic function during valproate monotherapy [J]. *Brain Dev*, 1996, **18** (2):105-109.
- [6] 赵媚, 肖琳, 杨琳, 黄绍平. 丙戊酸钠对培养大鼠肝细胞的毒性作用 [J]. 第四军医大学学报, 2005, **26** (3):229-231.
- [7] Tong V, Teng XW, Chang TK, Abbott FS. Valproic acid I: time course of lipid peroxidation biomarkers, liver toxicity, and valproic acid metabolite levels in rats [J]. *Toxicol Sci*, 2005, **86** (2):427-435.
- [8] Lheureux PE, Penalzoa A, Zahir S, Gris M. Science

- review; carnitine in the treatment of valproic acid-induced toxicity – what is the evidence [J]? *Crit Care*, 2005, **9**(5):431-440.
- [9] Argikar UA, Rimmel RP. Effect of aging on glucuronidation of valproic acid in human liver microsomes and the role of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4, UGT1A8, and UGT1A10 [J]. *Drug Metab Dispos*, 2009, **37**(1):229-236.
- [10] Neuman MG, Shear NH, Jacobson-Brown PM, Katz GG, Neilson HK, Malkiewicz IM, *et al.* CYP2E1-mediated modulation of valproic acid-induced hepatocytotoxicity[J]. *Clin Biochem*, 2001, **34**(3):211-218.
- [11] 傅大千, 蔡方成, 张晓萍. 丙戊酸肝毒性高危因素易感性机制的实验研究[J]. *中国药理学通报*, 2005, **21**(11):1375-1381.

Cytotoxicity and mechanisms of divalproex sodium and sodium valproate on HepG2 cells

JI Qiao-li¹, LIN Rong¹, SHI Xiao-lian¹, MAO You-hua², ZHAI Xiao-gang²

(1. Department of Pharmacology, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China;
2. Shaanxi Tiansen Pharmaceutical R&D Co. Ltd, Xi'an 710075, China)

Abstract: OBJECTIVE To investigate the cytotoxicity of divalproex sodium and sodium valproate on HepG2 cells and its underlying mechanisms. **METHODS** The cytotoxicity of divalproex sodium and sodium valproate were investigated using HepG2 cell lines. After HepG2 cells were cultured with divalproex sodium or sodium valproate 0.1, 0.3, 1 and 3 mmol·L⁻¹ for 24 h, cell viability was measured by MTT assay. After HepG2 cells were cultured with divalproex sodium or sodium valproate 0.3, 0.5 and 1.0 mmol·L⁻¹ for 24 h, lactate dehydrogenase (LDH) activity in the culture medium was tested by the pyruvic acid method, and the activity of glutamic pyruvic transaminase (GPT) and glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) in the culture medium was determined by malate dehydrogenase method. After HepG2 cells were cultured with divalproex sodium or sodium valproate 62.5, 125, 250, 500 and 1000 μmol·L⁻¹ for 24 h, the gene expressions of cytochrome P4501A1 (CYP1A1) and cytochrome P4501A2 (CYP1A2) were measured by real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. **RESULTS** After treatment with divalproex sodium or sodium valproate 0.1, 0.3, 1 and 3 mmol·L⁻¹ for 24 h, the viability of HepG2 cells was obviously inhibited compared with solvent control group and there was a good concentration-effect relationship. After HepG2 cells were treated with divalproex sodium or sodium valproate 0.3, 0.5 and 1 mmol·L⁻¹ for 24 h, the activity of GPT, GOT and LDH in culture medium was significantly increased. With the increase in concentrations, the activities of GPT, GOT and LDH increased. The gene expressions of CYP1A1 and CYP1A2 was gradually increased after HepG2 cells were treated with divalproex sodium and sodium valproate 62.5, 125, 250, 500 and 1000 μmol·L⁻¹ for 24 h. **CONCLUSION** Growth inhibition is obviously observed after HepG2 cells were treated with divalproex sodium and sodium valproate. Divalproex sodium and sodium valproate may have significant toxic effect. The increased expressions of CYP1A1 mRNA and CYP1A2 mRNA may be one of the mechanisms of hepatotoxicity induced by divalproex sodium and sodium valproate.

Key words: divalproex sodium; sodium valproate; HepG2 cells; cytochrome P-450 enzyme system; cytotoxicity

Foundation item: The project supported by Xi'an Municipal Scientific and Technological Project (SF10165)

Corresponding author: LIN Rong, E-mail: linrong@mail.xjtu.edu.cn, Tel: (029)82657691

(收稿日期: 2009-09-15 接受日期: 2010-03-16)

(本文编辑: 付良青)