

大柴胡湯, 柴胡加竜骨牡蛎湯の HepG2 細胞における抗脂血作用

古川 誠一*, 平野 勉, 内藤 博邦, 黒川 宗一, 永野 聖司

昭和大学医学部第一内科学教室

Anti-lipidemic effects of Dai-saiko-to and Saiko-ka-ryukotsu-borei-to in HepG2 cells

Seiichi FURUKAWA*, Tsutomu HIRARO, Hirokuni NAITOU, Munekazu KUROKAWA and Seishi NAGANO

The First Department of Internal Medicine, Showa University School of Medicine

(Received July 11, 1994. Accepted October 12, 1994.)

Abstract

The anti-lipidemic effects of Dai-saiko-to (TJ-8) and Saiko-ka-ryukotsu-borei-to (TJ-12) were investigated in human hepatoblastoma derived cell line, HepG2 cells. Both TJ-8 and TJ-12 reduced intracellular triglyceride (TG) and cholesteryl ester (CE) synthesis at concentrations of 0.5-5.0 mg/ml, depending on the dose. TJ-8 and TJ-12 suppressed TG and CE synthesis about 50% compared to the control at a concentration of 2.0 mg/ml after 3 h of incubation. Apolipoprotein B (apo B) secretion into the medium was also reduced by about half compared to the control at 5 mg/ml of concentration after 3 h of incubation. No cytotoxicities were observed in TJ-8 and TJ-12 treatments with the above concentrations. TJ-8 and TJ-12 proved to be useful as anti-hyperlipidemic drugs in *in vitro* experiments.

Key words Dai-saiko-to, Saiko-ka-ryukotsu-borei-to, HepG2 cell, apolipoprotein B, cholesteryl ester, triglyceride.

Abbreviations ^{14}C , carbon ; CE, cholesteryl ester ; TG, triglyceride ; ^3H , tritium.

緒 言

近年, 血中脂質の代謝経路が明らかにされ, LDL 受容体およびポ蛋白の役割が解明されてきた。高コレステロール血症により引き起こされる動脈硬化症も血中脂質を低下させることにより予防できることが, 疫学調査で明らかにされている。高脂血症の治療剤として, 種々の薬剤が開発されてきているが, 長期予後については十分確立されていない。このため, 長期服用しても安全性の確立されている漢方薬は抗動脈硬化剤として期待されている。漢方薬のなかでも大柴胡湯(TJ-8), 柴胡加竜骨牡蛎湯(TJ-12)は, 傷寒論, 金匱要略に記載され, 柴胡剤の代表的な処方であり, 新たな効用として高脂血症の治療に有用であると考えられている。実際, 大柴胡湯(TJ-

8), 柴胡加竜骨牡蛎湯(TJ-12)はラットやヒトにおいて総コレステロール(TC), 中性脂肪(TG)を低下させ, HDL-コレステロール(HDL-C)を上昇させる作用を有することが報告されている^{1,4)}。我々はTJ-8, TJ-12の抗脂血剤としての作用機序についてヒト肝細胞モデルであるHepG2細胞を用いて検討を加えた。

材料と方法

(1) 材料: ウシ血清アルブミン(BSA), オレイン酸はSigma (St. Louis, USA) より購入した。[4,5- ^3H]-leucine (5.0 TBq/mmol) [2- ^3H]-glycerol (37 GBq/mmol) および, [2- ^{14}C]-acetic acid (2.1 GBq/mmol) はAmersham 社 (Buckinghamshire, England) より購入した。薄層クロマトグラフィー (silica gel 60) は

*〒142 東京都品川区旗の台1-5-8
1-5-8 Hatanodai, Sinagawa-ku, Tokyo 142, Japan

Merck 社 (Darmstadt, Germany) より, Minimal essential medium (MEM), non essential amino acid, sodium pyruvate と penicillin / streptomycin は Sigma (St. Louis, USA) より購入した。抗アポ B 抗体は SEROTEC 社 (Oxford, England) より, ProteinA SepharoseCL-4B は, Pharmacia (Milwaukee, USA) より購入した。

TJ-8, TJ-12 は (株) ツムラ (東京, 日本) より供与された。

(2) 細胞培養: HepG2 細胞は American Type Culture Collection (Rockville, USA) より購入した。HepG2 細胞を MEM 培地 (10% fetal bovine serum, 0.1 mM nonessential amino acid, 1 mM sodium pyruvate および penicillin (100 units/ml) / streptomycin (100 μ g/ml) 含有) で培養し, 培養 4 日後に 80% confluent の状態になった細胞を実験に供した。serum-free の MEM 培地に 1.5% BSA を溶解させ, 0.45 μ m のフィルターで滅菌し, これを control (C) とした。TJ-8, TJ-12 の溶液は各々のエキスを 50 mg を 10 ml の C に加え, 37°C で 2 時間攪拌し, 遠沈により上清を得て, 0.45 μ m のフィルターで滅菌ろ過した溶液を 5.0 mg/ml の濃度の stock solution とし, これを C で希釈し, 各々, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 mg/ml の濃度となるよう TJ-8, TJ-12 の各溶液を作成した。

(3) 脂質の測定: 細胞内での TG, cholesteryl ester (CE) の合成は, 100 mm の dish に各々 185 KBq/ml の [3 H]-glycerol, [14 C]-acetate を添加し, 90 分培養し, 細胞内の脂質を hexane : isopropanol (3 : 2/v : v) にて抽出し薄層クロマトグラフィーで展開後, 各スポットをかき出し含有する放射活性をシンチレーションカウンターで測定した。

(4) apoB の測定: medium 中への apoB の分泌量の測定は Dixon らの方法⁵⁾ に従い免疫沈降法にて測定した。すなわち 100 mm の dish に HepG2 細胞を培養し, 1.1 MBq/dish の [3 H]-leucine を添加し, 1, 3, 6 時間後に NET Buffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7.4, 0.5% TritonX-100, 0.1% SDS) と抗アポ B 抗体を添加し 4°C で 12 時間 incubation を行った。ProteinA SepharoseCL-4B を加え, 3 時間 incubation し, 遠沈し上清を捨て, 沈殿物を NET buffer で 3 回洗浄した。Sample buffer (0.125 M Tris HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% mercaptoethanol) を加え 4 分間沸騰させ, 溶出した [3 H]-apoB をシンチレーションカウンターにて測定した。

(5) タンパクの分泌量の測定: HepG2 細胞より分泌されるタンパク量は細胞に TJ-8, TJ-12 とともに 5 mg/ml の濃度で 1.1 MBq/dish の [3 H]-leucine を加え 2 時間培

養し, medium の一部をろ紙にとり trichloro acetic acid (TCA) にて固定し, この [3 H] でラベルされたタンパク量をシンチレーションカウンターにて測定した。

(6) タンパク濃度の測定: HepG2 細胞を細胞溶解液 (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, pH 7.4, 62.5 mM Sucrose, 0.5% TritonX-100, 0.1% SDS, 50 μ g/ml leupeptin, 50 μ g/ml pepstatinA) とともに 4°C で 12 時間転倒混和した後, 遠沈させ, 上清の一部をとり蛋白量を Bicinchoninic acid 法 (Pierce Chemical, Co) にて測定した。

(7) 検定: 多群間の有意差検定には one-way ANOVA を用いた。

結 果

1. 細胞増殖への影響

TJ-8, TJ-12 各々 0.5 mg/ml から 5.0 mg/ml の濃度では 3 時間 incubation 後の顕微鏡下での形状および細胞数に変化はなかった。細胞内蛋白濃度も TJ-8, TJ-12 の各々 0.5 mg/ml から 5.0 mg/ml まで C と有意差はみられなかった。

2. 細胞内脂質の合成

TJ-8 では, 細胞内の CE の合成は, 1.0 mg/ml の濃度で C の約 50% まで有意に減少させた。さらに, 2.0 mg/ml とした場合では, C の約 20% に有意に減少した。5.0 mg/ml の濃度で C の約 5% と著明に低下した。細胞内の TG の合成は, 0.5 mg/ml の濃度で C の約 63%, 1.0 mg/ml で C の約 40% までに抑制した。2.0 mg/ml, 5.0 mg/ml の濃度では各々 C の約 45%, 40% に低下させた。(Fig. 1)

TJ-12 では 5.0 mg/ml まで濃度依存性に CE の抑制がみられ 0.5 mg/ml の濃度で C の約 60% に有意に低下させた。1.0 mg/ml の濃度より C に比較して有意な抑制がみられ, 5.0 mg/ml では C の約 8% まで CE の合成を抑制した。細胞内 TG の合成については, 0.5 mg/ml の濃度では C の約 45% と有意に低下させ, 5.0 mg/ml では C の約 22% に減少させた。(Fig. 2)

TJ-8 と TJ-12 を比較すると, 細胞内 CE の合成は C に比べ, 両者ではほぼ同等の抑制効果が認められるが, TG の合成に関しては, TJ-12 は TJ-8 の同じ濃度においては有意に TG の合成を低下させ, 0.5 mg/ml の濃度で TJ-8 の約 70% に低下, また, 5.0 mg/ml の濃度で TJ-8 の約 60% に低下させた。

3. apoB の分泌

apoB の分泌は培養後 3 時間で, TJ-8, TJ-12 とともに 2.0 mg/ml, 5.0 mg/ml の濃度では C に比べ有意に抑制し

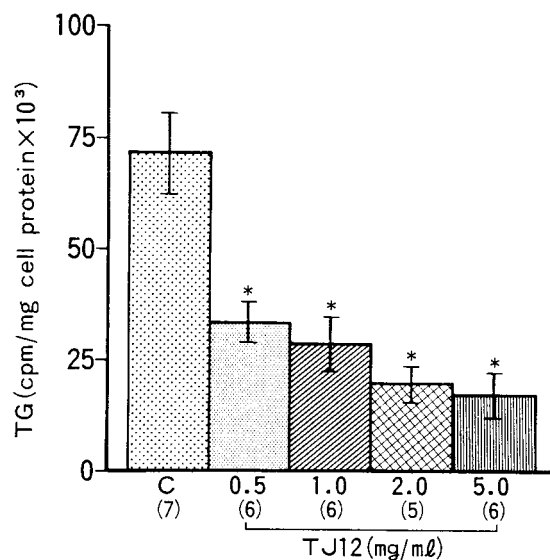
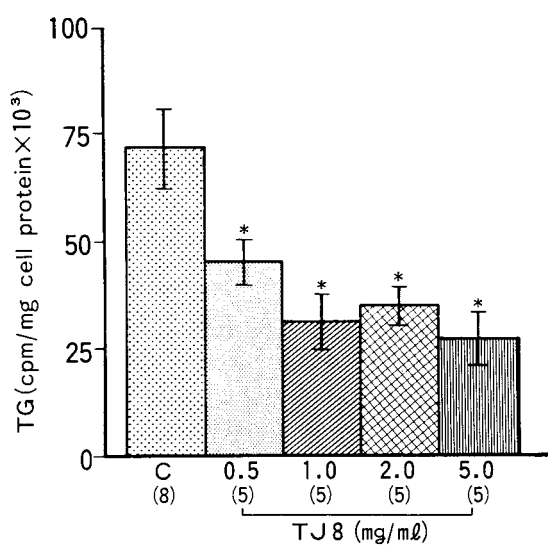
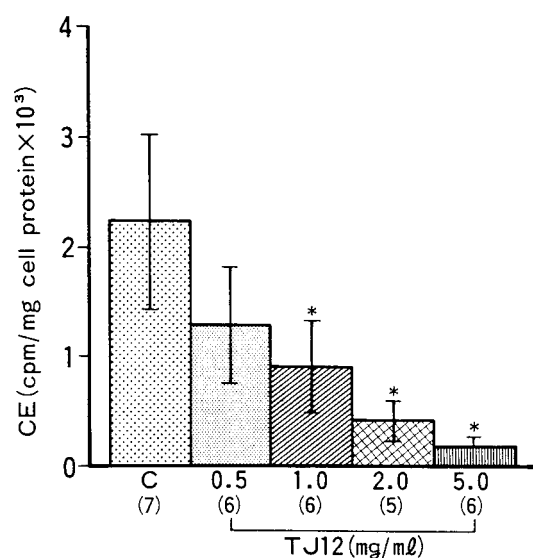
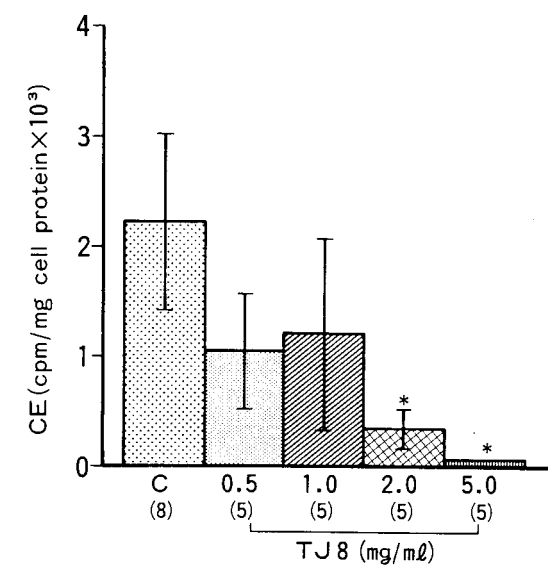


Fig. 1 Effects of TJ-8 on CE and TG synthesis in Hep G2 cells. The cells were incubated for 90 min in a serum-free medium with [¹⁴C]-acetate (185 KBq/ml) and [³H]-glycerol (185 KBq/ml) containing either 1.5% BSA (control), 0.5-5.0 mg/ml of TJ-8. The media were then aspirated, the cells were washed twice with PBS, and the cellular lipids were extracted with hexane/isopropanol (3 : 2). The incorporation of [¹⁴C]-acetate into CE and [³H]-glycerol into TG were determined by thin-layer chromatography. Data represent the mean ± S.D. of the number (n) of experiments (duplicate). **p* < 0.05 vs. control.

Fig. 2 Effects of TJ-12 on CE and TG synthesis in Hep G2 cells. The cells were incubated for 90 min in a serum-free medium with [¹⁴C]-acetate (185 KBq/ml) and [³H]-glycerol (185 KBq/ml) containing either 1.5% BSA (control), 0.5-5.0 mg/ml of TJ-12. The media were then aspirated, the cells were washed twice with PBS, and the cellular lipids were extracted with hexane/isopropanol (3 : 2). The incorporation of [¹⁴C]-acetate into CE and [³H]-glycerol into TG were determined by thin-layer chromatography. Data represent the mean ± S.D. of the number (n) of experiments (duplicate). **p* < 0.05 vs. control.

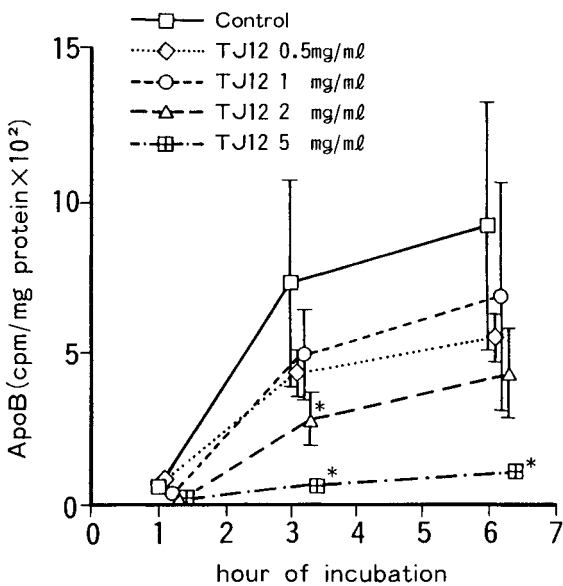
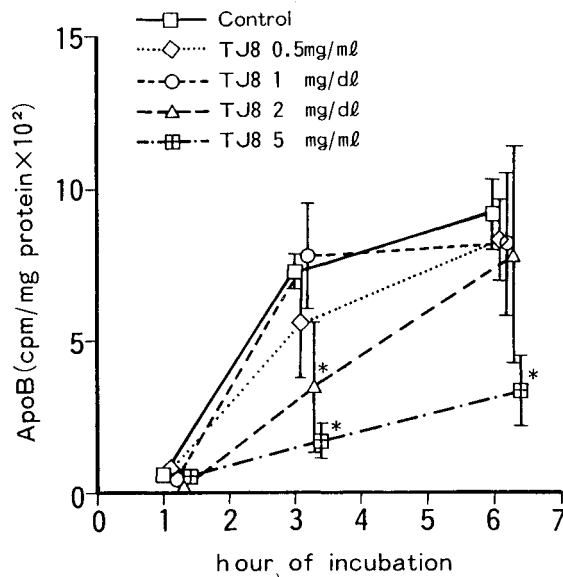


Fig. 3 Effects of various concentrations of TJ-8 on apoB secretion from Hep G2 cells. Hep G2 cells were washed with PBS and incubated in 10 ml of labeling medium (1.1 MBq/dish of [3 H]-leucine) containing either 1.5% BSA (control), 0.5–5.0 mg/ml of TJ-8. At the time indicated, 0.5 ml of medium was removed from each dish and replaced with 0.5 ml of the appropriate fresh [3 H]-leucine containing medium. Apo B was immunoprecipitated from the medium as described. Data represent mean $\pm$ S.D. of the number (n) of experiments (duplicate). * p < 0.05 vs. control in each time.

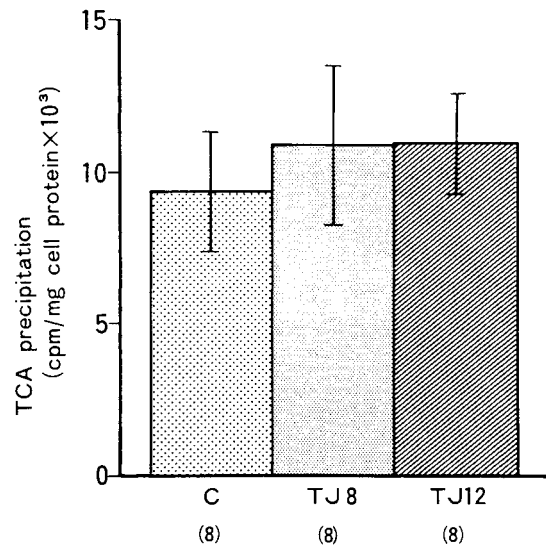


Fig. 4 Secretion of total protein into the medium measured by TCA precipitation method. Hep G2 cells were washed with PBS and incubated in 5 ml of labeling medium (0.6 MBq/dish of [3 H]-leucine) containing either 1.5% BSA (control) or 5.0 mg/ml of either TJ-8 or TJ-12. After 2 h of incubation, aliquot (20 μ l) of each medium was removed from the dish and put on Whatman paper. The paper was dried and the [3 H]-labeled protein attached to the paper was fixed by TCA, and radioactivity was then measured. The data represent mean $\pm$ S.D. of the number (n) of experiments (duplicate).

た。培養後6時間では、各々5.0 mg/mlの濃度でCに比べapoBの分泌を抑制させた。5.0 mg/mlの濃度ではTJ-8、TJ-12とも、すでに培養3時間後にapoBの濃度はCに比較し低下していた。(Fig. 3)

4. タンパクの分泌

タンパクの分泌はTJ-8、TJ-12とも、5.0 mg/mlの濃度においてもCと有意差は認められなかった。よって、TJ-8、TJ-12とも、5.0 mg/mlの濃度でapoBの分泌の低下が生じるが、これは、TJ-8、TJ-12を添加し、細胞内の脂質が減少し、apoBの分泌も低下したためと考えられた。(Fig. 4)

考 察

ラットを用いた実験では、TJ-8およびTJ-12を0.5–1.0 g/kg体重投与した場合、TJ-8はTC、TGの低下作用があり、TJ-12にはTGの軽度低下作用が認められている⁶⁾。TJ-8およびTJ-12ともTGの腸管での吸収を有意に抑制している⁷⁾。TJ-8、TJ-12を高血圧自然発生ラットに投与したところ、TJ-8、TJ-12により、両者とも、大動脈の線維性内膜肥厚が抑制され、TJ-8、TJ-12の抗

動脈硬化作用が証明されている。³⁾

今までにヒトに TJ-8 および TJ-12 を投与した場合、TJ-8 では CE, TG の低下作用があり、TC の低下作用がより強いと報告され我々の *in vitro* での実験と一致する。²⁾ ヒトでは、1 回に 2.5 g 服用するので、約 0.05 g/kg 体重となり、ラットでの投与量よりもはるかに少ない量であり、これがヒトでの脂質抑制作用があまり認められなかった原因と考えられる。一方、山本らは HepG2 細胞に TJ-8 を添加し細胞内脂質の生成について検討を加え、TJ-8 が 0.5 mg/ml および 5.0 mg/ml の濃度で CE, TG を抑制し、特に TG の低下が著明であることを報告した。^{8,9)} TJ-8 は 0.5 mg/ml から 5.0 mg/ml の濃度で CE の生成を濃度依存症に低下させた。細胞内の TG の合成は TJ-8 で抑制がみられたが 5.0 mg/ml の濃度でも CE の合成ほど顕著な抑制はうけなかった。

TJ-12 については細胞内 CE の合成は TJ-8 よりも抑制が著しく、TG 合成について TJ-8 と比較した場合、0.5 mg/ml の濃度で TJ-12 は約 1.5 倍有意に TG 低下作用を持つと考えられた。我々も TJ-8 および TJ-12 は 0.5 mg/ml から 5.0 mg/ml の濃度を用い実験したが、2 時間培養した時点で、細胞外へのタンパク分泌は C と変わらず、この濃度では細胞に対する毒性はないと考えられた。

TJ-8 および TJ-12 は各種の生薬よりできている。TJ-8, TJ-12 の共通の生薬は黄芩、大棗、半夏、柴胡、生姜であり、黄芩、柴胡に抗脂血作用が認められている。¹⁰⁻¹³⁾ TJ-12 は細胞内脂質の合成抑制は TJ-8 よりも顕著であった。これは TJ-12 には人蔘が含まれ、含有するジンセノサイドの抗脂血作用が現れていると考える。山本らは、高脂質血症ラットにジンセノサイド並びに紅参粉抽出液を経口投与し TG, 総コレステロールの低下、HDL-C の上昇を報告している。¹¹⁾ また高脂質血症患者に紅参末を投与した治療も行い同様な抗脂血作用を示している。^{10, 12)}

TJ-8, TJ-12 の抗脂血作用を HMG-CoA 還元酵素阻害剤である fluvastatin と比較した場合に、fluvastatin 5 μ M を HepG2 細胞に添加した時に TG の細胞内生成量は変化がなかったが、CE は C に比べ約 40% に減少していた。TJ-8, TJ-12 は 0.5-1.0 mg/dl の濃度で TG および CE の細胞内生成を C に比べ、約 50% に減少させ、この濃度では fluvastatin よりも強力な抗脂血作用を有すると思われた。¹⁴⁾ さらに、Furukawa らにより fluvastatin を添加し、HepG2 細胞内の CE を減少させた場合に apoB の分泌は変化しないと報告されている。¹⁴⁾ TJ-8, TJ-12 とも細胞内の TG と CE の両者を減少させている

ため、これが apoB の分泌低下に関与したものと考えられた。TG と CE の両者の合成の低下が apoB の分泌抑制に関係していることが示唆された。

References

- 1) Teramoto, T., Kato, Y., Kinoshita, M.: Hypolipidemic effects of Dai-saiko-to in experimental hyperlipidemic rat. *Kiso To Rin-shou* **20**(16), 105-109, 1986.
- 2) Ishigaki, K., Shimizu, T., Imura, M., Nagai, K., Mitake, K., Kondou, K.: Clinical trial of Dai-saiko-to (TJ-8) on hyperlipidemia. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **5**(3), 328-329, 1988.
- 3) Yamada, T., Sato, S., Yoshimura, S., Sakurai, I.: Anti-atherosclerotic effects of Kampo-medicine. *Kampo-Igaku* **12**(8), 209-215, 1988.
- 4) Shimizu, K.: Effects of Dai-saiko-to and Saiko-ka-ryukotsu-borei-to on serum lipids in mouse. *Kampo-Igaku* **10**(6), 13-15, 1986.
- 5) Joseph L. Dixon, Seiichi Furukawa and Henry N. Ginsberg: Oleate stimulates secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins from HepG2 cells by inhibiting early intracellular degradation of apolipoprotein B. *J. Biol. Chem.* **266**, 5080-5086, 1991.
- 6) Okuda, H.: Effects of Dai-saiko-to and Saiko-ka-ryukotsu-borei-to on superoxide rat and its intestinal absorption of lipids. *Kampo-Igaku* **10**(6), 16-20, 1986.
- 7) Yamamoto, M., Uemura, T., Nakama, S., Uemiya, M., Deguchi, H., Miki, T., Tsukada, S.: Jikkenteki koushikesshou ni okeru kakushu kampo houza no kouka to ouyou. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **3**(3), 340-341, 1986.
山本昌弘, 植村泰三, 中間 慧, 上宮正直, 出口 均, 三木俊治, 塚田 聡: 実験的高脂血症における各種漢方方剤の効果と応用. 和漢医薬学会誌 **3**(3), 340-341, 1986.
- 8) Yamamoto, K., Fukushima, N., Sakai, T., Yanagida, A.: Pharmacological effects of Dai-saiko-to on hepatic lipid metabolism in fatty liver. *Prog. Med.* **11**, 432-438, 1991.
- 9) Yamamoto, K., Yanagida, A., Morito, F., Fukushima, N., Ozaki, I., Sakai, T.: Pharmacological effects of Dai-saiko-to on human hepatoma derived cell line, HepG2 cells. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **7**, 296-297, 1990.
- 10) Yamamoto, M.: Yakubutsu Ryouhou, Kampo shouyaku. *Chiryougaku* **15**, 704-707, 1985.
山本昌弘: 薬物療法, 漢方生薬. 治療学 **15**, 704-707, 1985.
- 11) Yamamoto, M., Uemura, T., Nakama, S., Uemiya, M., Tanaka, T. and Minamoto, S.: Effects of saponins from ginseng and bupleurum, extracts from Xiao-Chai-Hu-Tang and Gui-Zhi-Fu-Ling-Wan, on blood lipoproteins, apoproteins and prostanoids and on hepatic lipids in experimental hyperlipidemia. *J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU* **2**, 377-385, 1985.
- 12) Yamamoto, M.: Hyperlipidemia. *Taisha* **29**, 212-219, 1992.
- 13) Saito, T.: Effects of Dai-saiko-to and Saponin on experimental hyperlipidemia. *To-I-Dai-Shi* **40**, 517-529, 1982.
- 14) Furukawa, S. and Hirano, T.: Rapid stimulation of apolipoprotein B secretion by oleate is not associated with cholesteryl ester biosynthesis in HepG2 Cells *Biochim. Biophys. Acta* **1170**, 32-37, 1993.