

甘露醇對於巴拉刈誘發大白鼠肝細胞DNA損傷之保護作用

朱嘉一 黃俊銘 謝易修 曾翠華 王朝鐘

甘露醇 (Mannitol; MT) 是茜草科植物“梔子”中主要成分之一，具有抗氧化作用。本研究採用對肝細胞產生過氧化作用的化學除草劑——巴拉刈 (Paraquat; PQ) 當作誘導劑，以誘發鼠肝細胞受損傷，並分別在加入巴拉刈之前、後或同時加入甘露醇處理初代培養之肝細胞，然後測定肝細胞培養基中LDH、AST、ALT等酶含量及肝細胞分解物MDA濃度作為分析指標；進一步再利用UDS的方法探討甘露醇對抗肝細胞DNA損傷的作用機制。由實驗結果顯示甘露醇具有抗肝毒活性及抗脂質過氧化的作用；因此甘露醇對抗肝細胞DNA損傷的作用機制是經由甘露醇抑制了肝細胞膜的脂質過氧化作用 (Lipid Peroxidation)，另外亦可能是由於甘露醇捕捉了巴拉刈誘發肝細胞損傷所產生的氫氧自由基 (Hydroxy radical) 之去毒作用機制所致。

關鍵字：甘露醇、巴拉刈、脂質過氧化作用、DNA損傷。

前 言

近年來隨著醫學的進步，許多傳染病已經能夠防治，但肝炎至今仍是危害性最大的一種傳染病，在台灣慢性肝炎及肝硬化佔台灣地區十大死亡原因之第六位⁽¹⁾而B型肝炎帶原率佔世界第一位⁽²⁾。今日醫學研究指出肝炎是由病毒、酒精、脂肪過氧化物、食物中毒、肝毒性藥物所引起⁽³⁾，然而環顧目前醫學界，治療肝炎仍缺乏適當藥物的治療，一般除臨床休息和補充營養的食物控制外，雖有免疫抑制法及抗病毒藥物如Interferon⁽⁴⁾，然而此等療法均尚在試驗階段，可是天然物中則有不少對肝炎有效的藥物⁽⁵⁾，所以由天然物中尋求一有效治療肝炎的藥物，實為當前刻不容緩的事。

梔子 (Gardeniae Fructus) 始載於我國第一部本草典籍——神農本草經之木部中品，在天然藥物方面應用甚多，尤其在中藥方劑上如黃連解毒湯、茵陳蒿湯……等被收載的方劑多達47個。梔子係茜草科 (Rubiaceae) 植物梔子樹 (Gardenia jasminoides ELLIS) 的乾燥成熟果實。其性寒、味苦，入心、肺、三焦三經，其功能為清熱瀉火、利小便、止血，效用方面民間多用以治熱病，心煩懊憹、黃疸、淋病、消渴、目赤熱痛、吐血、衄血等症⁽⁶⁾。甘露醇 (Mannitol) 是梔子中主要成分之一，分子結構上屬於糖醇類 (Sugar alcohol) 為一種抗氧化劑，具有抗氧化的作用⁽⁷⁾。

巴拉刈 (Paraquat, 學名1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridylium) 是一種極有效而廣泛被使用之除草劑，常因使用不當，誤食或自殺而造成許多全身性毒性的病例，此因巴拉刈的

氧化作用可造成肝、腎、肺等器官的破壞⁽⁸⁾。巴拉刈的除草機制乃藉著干擾細胞內電子傳遞系統，抑制植物葉子光合作用使NADP不能還原成NADPH，而此時氧變成過氧根離子（Superoxide），經由非飽和性脂肪酸的聚合作用破壞含脂細胞膜，而使樹葉枯死⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾。在動物方面，其致病機制類似植物，因刺激細胞內NADPH的氧化，並當作電子接受者，而取得電子，在有氧狀況下，將電子傳遞給氧形成過氧根離子（O₂⁻），巴拉刈復原後再繼續搶奪電子而成為製造過氧根離子的催化劑（Figure 1）；最近研究指出巴拉刈致病機制與其加速脂質過氧化作用（Lipid peroxidation）有關⁽¹¹⁾⁽¹²⁾。

本研究擬以甘露醇為實驗材料加入培養之肝細胞中，採用對肝細胞能誘發脂質過氧化作用之化學除草劑——巴拉刈為誘導劑，誘發鼠肝細胞損傷後，以測定細胞培養基中生化值如Lactate dehydrogenase（LDH），Aspartate aminotransferase（AST）及Alanine aminotransferase（ALT）之酶含量做為肝細胞毒性的分析指標⁽¹³⁾，並分析肝細胞脂質過氧化物之分解產物Malondialdehyde（MDA）的濃度⁽¹⁴⁾，探討甘露醇對肝細胞之抑制作用。進一步利用初代培養之肝細胞，觀察甘露醇對巴拉刈所誘發DNA損傷修補之調節作用，利用Unscheduled DNA synthesis（UDS）的方法觀察DNA損傷之修補作用⁽¹⁵⁾，俾探討甘露醇對抗巴拉刈之作用機制。

材料與方法

一、化學試劑

Paraquat、MTT、TBA（thiobarbituric acid）、Collagenase、Mannitol、[methyl-³H]Thymidine及肝功能生化值AST、ALT、LDH測定試劑均購自美國Sigma公司；Williams E培養基、PSN抗生素購自美國Gibco公司；Proteinase K為德國Merck公司產品；Aquasol-2閃爍液為美國New England Nuclear出品；Protein測定試劑為英國Bio-Rad產品。

二、實驗動物

本研究使用購自台大動物研究中心之Sprague-Dawley品系，體重為220-280公克之雌性大白鼠及體重18-25公克之雄性ICR品系小白鼠為實驗動物。

三、Mannitol對Paraquat急性毒性試驗之影響

使用體重18-25公克之雄性ICR品系小白鼠每組10隻，觀察單獨由腹腔注射給予Paraquat劑量50mg/kg後72小時內小白鼠中毒死亡情形，以及口服給予不同劑量Mannitol（0.5g/kg，2.5g/kg，10g/kg）2小時後，再由腹腔注射相同劑量Paraquat（50mg/kg）後，72小時內實驗動物存活情形。

四、初代肝細胞之培養

初代培養之肝細胞係根據Bonney氏等之方法⁽¹⁶⁾，以肝臟灌注方式取得。由Sprague-Dawley品系大白鼠腹腔注射戊基巴比妥（Pentobarbital，50mg/ml）麻醉，劑量為大白鼠體重每100公克給予0.2ml，麻醉後，打開腹腔以20G血管導管穿刺肝門脈，固定後以加有EGTA而不含鈣、鎂離子之HBSS緩衝液灌注，同時剪斷下腔靜脈放血，再以含膠原酶（Collagenase）及鈣離子之緩衝液灌注後，取下肝臟，分離肝細胞，以每毫升 1.5×10^6 之細胞密度培養於4ml Williams E培養基中含10%胎牛血清及1% PSN抗生素，置於37°C，5% CO₂培養箱中培養。於最初三小時更換培養基，除去未貼壁之細胞，當作以下細胞分析使用。

五、MTT法之細胞活性分析

Paraquat或Mannitol對細胞活性的影響係根據MTT比色法分析之⁽¹⁷⁾。在培養皿中培養一定量肝細胞（ 5.0×10^4 cells/dish）再加入各種不同濃度（2.5mM-10mM）的Paraquat或不同濃度（2.5mM-25mM）的Mannitol，於37°C下分別培養4小時或5小時後，移走培養基，肝細胞以PBS液洗滌，換新培養基後，加入20ml MTT試液（5.0mg/ml），培養4小時，因活細胞會將MTT還原成Formazan結晶，再以Isopropanol溶解之，於光波長563nm下測定吸光度，由吸光度大小測定出活細胞的多寡比較之。

六、肝細胞毒性分析

以肝功能診斷酵素包括Lactate dehydrogenase（LDH）、Alanine aminotransferase（ALT）及Aspartate aminotransferase（AST）作為肝細胞毒性的分析指標。LDH去氫酶的測定係根據Amador氏等記述的方法⁽¹⁸⁾，將Paraquat（2.5mM）單獨加入培養基中處理肝細胞當作控制組，實驗組分為三組：第一組為將Mannitol 5mM和Paraquat 2.5mM同時

加入處理；第二組則先加入Paraquat 2.5mM處理肝細胞1小時後才加入Mannitol 5mM；第三組則在加入Paraquat 2.5mM前1小時先以Mannitol 5mM加入培養基中處理肝細胞，以上各組均於Paraquat加入後培養4小時，再分取上層培養基2ml，於光波長340nm下測定LDH之活性。轉胺酶AST及ALT的測定則根據Bergmeyer氏等的方法⁽¹⁰⁾，按上述同樣方法分組處理之，並與Paraquat 2.5mM單獨處理肝細胞控制組作比較，於光波長340nm下測定吸光度，分別比較各組AST和ALT的活性。

七、MDA生長濃度之分析

肝細胞中脂質過氧化係藉著其分解產物Malondialdehyde (MDA) 的濃度為指標來測定。在肝細胞培養基中單獨加入Paraquat 2.5 mM當作控制組，實驗組則如同第六項所述分為三組，以同樣方法處理肝細胞。以上各組均於加入Paraquat後培養4小時，更換培養基，刮下肝細胞，加入2ml 10% Trichloroacetic acid去蛋白後，離心之。再精確量取上清液2ml加入等量之1% TBA試劑後，置沸水浴中加熱10分鐘，冷卻後按Stacey氏等修飾的方法⁽¹¹⁾，於光波長535nm下測定吸光度，各組分別與Paraquat控制組比較其MDA含量。

八、DNA損傷修補作用之測定

Mannitol對Paraquat誘發DNA損傷之修補作用係藉著氚標記的胸腺嘧啶 (Tritium-labeled thymidine, H³-thymidine) 在Hydro-

xyurea存在下，併入DNA中的量測定之⁽¹²⁾。將培養之肝細胞先以15mM Hydroxyurea處理，同時加入各種不同濃度之Mannitol (2.5mM, 5.0mM, 10mM) 處理1小時後，加入Paraquat 0.25mM及H³-thymidine (1 μ ci/ml) 繼續培養18小時，將細胞收集下來，置於25mm, 2 μ m孔徑的PC濾紙上，以10ml Lysing buffer (2% SDS, 0.025M EDTA, 0.5mg/ml thymidine, 0.1M glycine, pH10.0) 及0.15mg/ml proteinase K緩衝液沖洗。將濾紙置入含1ml 0.5N HClO₄之試管中，於60°C加熱90分鐘後，取懸浮液加入閃爍液Aquasol-2，以Aloka LSC-900閃爍計數儀測其放射強度以dpm/ μ gDNA表示。DNA含量之測定係根據Rechards之方法定量之。

結 果

一、Mannitol對Paraquat急性毒性試驗之影響

如表1所示，不給Paraquat亦不給Mannitol正常組之10隻小白鼠，經觀察三天結果均正常存活，而單獨給予Paraquat (i.p. 50mg/kg) 之控制組，三天內有5隻小白鼠死亡。實驗組中給予Mannitol (0.5g/kg) 後再給Paraquat (50mg/kg) 者三天內共死亡2隻；給予Mannitol (2.5g/kg) 後再給Paraquat (50mg/kg) 者僅於第二天有1隻死亡；至於實驗組中給予較大劑量Mannitol (10g/kg)

Table 1. Antitoxic effect of MT on PQ induced acute toxicity.

Treatment ^a	No. of mice treated	No. of mice which died after drug administration (days)			Survival rate(%)
		1	2	3	
control	10	0	0	0	100%
PQ	10	1	2	2	50%
PQ+MT (0.5g/kg)	10	0	1	1	80%
PQ+MT (2.5g/kg)	10	0	1	0	90%
PQ+MT (10g/kg)	10	0	0	0	100%

a. All animals received an equal dose of paraquat (PQ) (i.p. 50 mg/kg) except control group and mannitol(MT) were administrated at various doses in prior to the administration of PQ (2 hr).

再給予Paraquat (50mg/kg)者，則與正常組相同，10隻小白鼠均正常存活下來。由此顯示Mannitol對於口服適當劑量的Paraquat所誘導的毒性具有抗毒性作用 (Antitoxic effect)，並且呈現劑量依存性關係。

二、MTT法之細胞活性分析

如表2所示，利用MTT法測定細胞活性時，當加入Paraquat濃度為2.5mM時，吸光度與控制組比較為89%，顯示該濃度適合作細胞毒性誘導劑的濃度；當Paraquat濃度增為5.0mM或10mM時分別降低為86%或71%，表示對細胞毒性略增。至於Mannitol則如表3所示，當濃度為2.5mM、5.0mM或10mM時與控制組比較，吸光度沒明顯下降，因此本研究中

採用5.0mM濃度作為非毒性劑量。

三、肝細胞毒性分析

如圖二所示，單獨加入Paraquat控制組之LDH值明顯的升高，三個實驗組經5.0mM Mannitol培養1小時後再加入Paraquat的實驗組有顯著的降低作用 ($P < 0.05$)。如圖三所示Paraquat控制組能使AST值顯著升高，實驗組中Mannitol和Paraquat同時處理者或先加Mannitol才給Paraquat兩組AST值均呈現顯著的降低 ($P < 0.05$)。ALT值則如圖四所示，Paraquat控制組明顯升高的作用，在同時加入Mannitol與Paraquat處理者或先加入Mannitol處理1小時後再加入Paraquat處理肝細胞的實驗組則均有顯著的降低作用 ($P < 0.05$)。

Table 2. The cytotoxicity of paraquat with tetrazolium assay

Treatment ^a	% of control absorbance
control	100
PQ (2.5mM)	89 ^b
PQ (5.0mM)	86
PQ (10mM)	71

a. The hepatocyte culture was treated with various doses of paraquat (PQ) for 4 hrs.

b. % of control absorbance.

Table 3. The cytotoxicity of mannitol with tetrazolium assay

Treatment ^a	% of control absorbance
control	100
MT (2.5mM)	98 ^b
MT (5.0mM)	97
MT (10mM)	95
MT (25mM)	91

a. The hepatocyte culture was treated with various doses of mannitol (MT) for 5 hrs.

b. % of control absorbance.

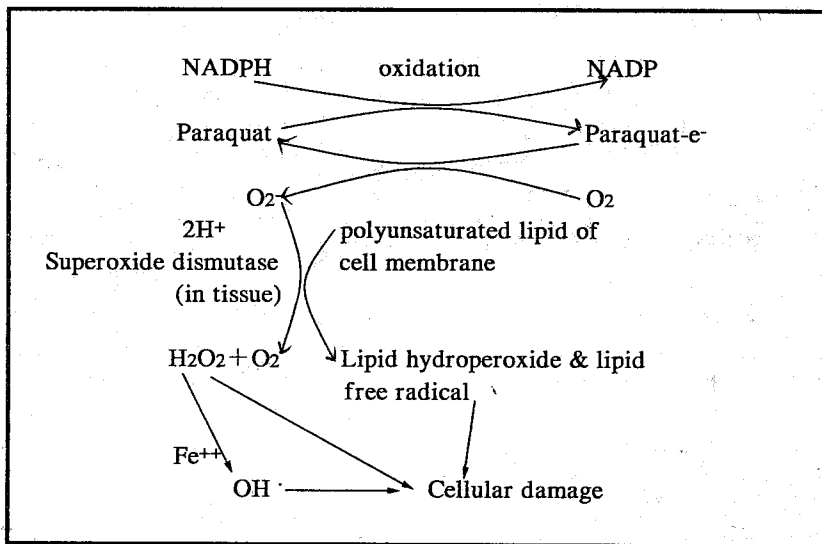


Fig. 1. Mechanism of paraquat intoxication

檔號: K0502-3

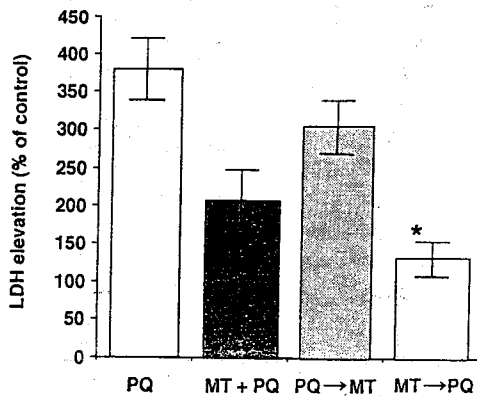


Fig. 2. Decrease cytotoxicity (LDH release) of paraquat PQ (2.5mM) in rat hepatocyte cultures by the pretreated with PQ for 1 hr prior to the addition of mannitol MT (PQ→MT) or by the prior addition (1hr) of MT (MT→PQ) or simultaneous treatment with MT (MT+PQ) after 5hrs treatment. *P<0.05 VS PQ treated group, t-test (mean ± SD; n=3)

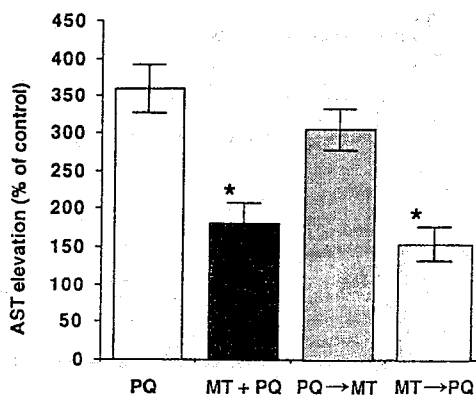


Fig. 3. Decrease cytotoxicity (AST release) of paraquat PQ (2.5mM) in rat hepatocyte cultures by the pretreated with PQ for 1 hr prior to the addition of mannitol MT (PQ→MT) or by the prior addition (1hr) of MT (MT→PQ) or simultaneous treatment with MT (MT+PQ) after 5hrs treatment. *P<0.05 VS PQ treated group, t-test (mean ± SD; n=3)

四、MDA生成濃度之分析

如圖五所示，單獨以Paraquat處理之控制組，其肝細胞中MDA生成濃度急速升高，但經以同時加入Mannitol與Paraquat處理者或先加入Mannitol再加入Paraquat處理，兩組實驗組肝細胞中MDA濃度呈現顯著的降低

作用 (P<0.05)。

五、DNA損傷修補作用之影響

Mannitol對Paraquat誘發肝細胞DNA損傷之修補作用係藉著UDS方法 (Unscheduled DNA synthesis) 來測定。結果如表4所示，Mannitol對Paraquat (0.25mM) 誘發DNA

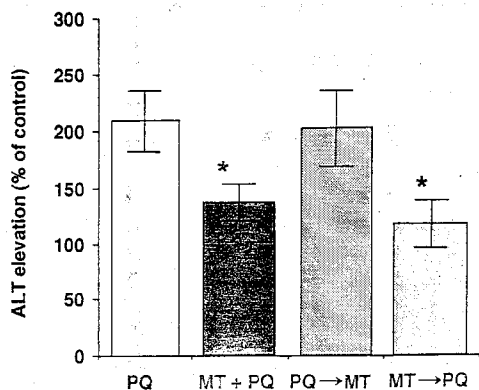


Fig. 4. Decrease cytotoxicity (ALT release) of paraquat PQ (2.5mM) in rat hepatocyte cultures by the pretreated with PQ for 1 hr prior to the addition of mannitol MT (PQ→MT) or by the prior addition (1hr) of MT (MT→PQ) or simultaneous treatment with MT (MT+PQ) after 5hrs treatment. *P<0.05 VS PQ treated group, t-test (mean ± SD; n=3)

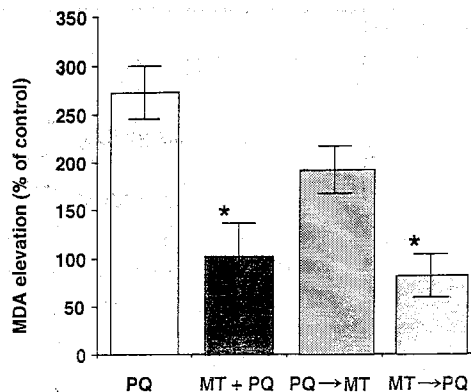


Fig. 5. Decrease cytotoxicity (MDA release) of paraquat PQ (2.5mM) in rat hepatocyte cultures by the pretreated with PQ for 1 hr prior to the addition of mannitol MT (PQ→MT) or by the prior addition (1hr) of MT (MT→PQ) or simultaneous treatment with MT (MT+PQ) after 5hrs treatment. *P<0.05 VS PQ treated group, t-test (mean ± SD; n=3)

Table 4. Effect of mannitol on paraquat-induced DNA damage in cultured hepatocytes

Treatment ^a	dpm/μg DNA	% of PQ control
Control	34 ± 3	—
PQ (0.25 mM)	96 ± 15 ^b	100
PQ (0.25 mM) plus:	—	—
MT (2.5 mM)	65 ± 10 ^{*c}	68
MT (5.0 mM)	61 ± 8 [*]	63
MT (10 mM)	55 ± 7 ^{**}	57

a. Primary hepatocyte cultures were pretreated with hydroxyurea and various concentration of mannitol (MT) for 1 hr then paraquat (PQ) and [methyl-³H] thymidine (1 μCi/mi) was added for 18 hrs. the cells were harvested and lysed for radioactivity counting and DNA quantitation. DNA damage was determined by UDS and expressed as dpm/μg DNA.

b. Mean ± SD, values are the average of triplicate determinations.

c. *P<0.05, **P<0.02, Compared with PQ treated group.

損傷之修補作用在濃度2.5mM和5.0mM (P<0.05), 以及10mM (P<0.02) 下均有顯著的抑制Paraquat所誘發的肝細胞損傷作用。

討 論

本實驗採用對肝細胞能誘導脂質過氧化反

應的除草劑巴拉刈 (Paraquat) 當作誘導劑, 以誘發鼠肝細胞受損, 然後區分為在加入Paraquat之前, 之後或其同時加入Mannitol等三種情況來比較Mannitol是否具有抗肝毒活性 (Antihepatotoxic activity) 與抗脂質過氧化作用 (Anti-lipoperoxidation), 同時比較其活性的大小; 進一步再探討Mannitol

對抗肝細胞受損害的作用機制。

首先由動物實驗觀察經口服給予ICR品系小白鼠Mannitol後再給一半致死量 (LD_{50}) 的Paraquat (50mg/kg)，結果顯示，Mannitol具有抗急性毒性作用，且其保護作用呈現劑量依存性的關係。接著由初代培養的肝細胞測定Mannitol與Paraquat對肝細胞毒性分析指標，即LDH、AST、ALT等酶含量生化值的影響，結果顯示Mannitol亦能顯著的降低肝細胞受Paraquat損傷時肝細胞滲漏的酶含量，證明Mannitol具有抗肝細胞毒性的作用，而且以預先經Mannitol處理肝細胞後，再加入Paraquat的實驗組效果最顯著，其次則為同時加入Mannitol和Paraquat處理的實驗組，由此表示Mannitol對抗肝細胞受傷害具有保護性的作用。至於Mannitol對肝細胞膜脂質的過氧化作用則從分析MDA生成物濃度的結果知道，同樣是先加Mannitol後加Paraquat以及同時加Mannitol和Paraquat兩個實驗組的效果較明顯，具有統計上的意義，因此也證明了Mannitol對Paraquat所引起的過氧化作用具有極顯著的抗脂質過氧化作用。

因Paraquat的氧化作用，產生了許多過氧根離子 (superoxide)，此等過氧根離子再去攻擊肝細胞膜上的脂質而啟動了過氧化作用，當細胞膜上脂質發生了過氧化作用可令其構造發生改變，細胞膜硬化，而使細胞膜上重要的ATPase (Na/k) 酶活性發生改變⁽²¹⁾；進一步細胞膜脂質過氧化作用產物MDA (Malondialdehyde) 又與細胞中的核酸反應而形成加成物，常常導致細胞的致突變作用 (Mutagenesis) 與致癌作用 (Carcinogenesis) 等嚴重的後果⁽²²⁾。利用UDS的方法，顯示Mannitol能抑制Paraquat所誘發之肝細胞損傷作用，因此可以解釋Mannitol之所以能抑制Paraquat所誘發肝細胞DNA損傷的作用機制是經由Mannitol抑制了肝細胞膜脂質發生過氧化作用的結果，以減低Paraquat傷害細胞的作用。

目前已知生物性含氧自由基 (Oxygen free radical) 主要有參種，即過氧根離子 (Superoxide; $O_2^{\cdot-}$)，過氧化氫 (Hydrogen pero-

xide; H_2O_2) 與氫氧自由基 (Hydroxy radical; OH^{\cdot})，當中過氧根離子與核酸分子反應可造成多種傷痕，如DNA分子單股或雙股之切斷及鹼基之修改；而氫氧自由基與DNA反應可產生斷股 (Strand cleavage) 的現象；而此等切斷的DNA則可受到細胞中酶群之修補，或以抗氧化劑來捕捉含氧自由基，以防止細胞免於氧化之傷害⁽²³⁾。對於過氧根離子，在氧化攻擊的特異性上言，必須有一個要件，即結合的金屬離子如Fe (III) 必先還原成Fe (II) 的形態，才能與過氧根離子因受過氧根歧化酶 (Superoxide dismutase) 作用的去毒途徑所生成的 H_2O_2 反應，而形成另一種含氧自由基 (OH^{\cdot}) (Figure 1)，根據報告指出Paraquat可將結合的Fe (III) 還原成Fe (II)⁽²⁴⁾，因而能與 H_2O_2 作用生成有害的氫氧自由基。從目前的研究文獻可以確定Mannitol屬於一種氫氧自由基的捕捉劑 (Scavenger)⁽²⁵⁾，而已知Paraquat的致毒機制除能產生過氧根離子外，亦可能經組織或細胞中Fe (II) 的還原作用而產生氫氧自由基。因此Mannitol抑制Paraquat誘發肝細胞DNA損傷的另一途徑，可能是經由Mannitol捕捉了Paraquat所產生的氫氧自由基之故；關於後者的去毒作用機制，正有待更進一步的探討加以證實。

誌 謝

本研究接受中山醫學院專題計劃獎助，計劃編號為CSMC 81-1-005；感謝院方的支持與鼓勵，使本論文得以順利完成，特此誌謝。

參考文獻

1. 行政院衛生署：中華民國八十年台灣地區衛生資料。行政院衛生署出版，1992：114-116。
2. 吳昭新、陳定和、江易雄等：A型及B型肝炎病毒在台灣感染之研究。台灣醫學雜誌1980；79:694-699。
3. 陳定信；病毒性肝毒討論會。當代醫學，1982；9：81-108。

4. Laurence DR, Bennett PN: Clinical Pharmacology Ed. 7. Churchill Livingstone, 1992:215-8.
5. Yang LL, Yen KY, Kiso Y et al: Anti-hepatotoxic actions of formosan plant drugs. *J. Ethnopharmacology* 1987; 19:103-110.
6. 顏焜熒：原色常用中藥圖鑑。南天書局，1989：149。
7. England MD, Cavarochi NC, O'Brasen JF, et al: Influence of antioxidants on oxygen free radical generation during and after cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1986; 74III:134-137.
8. Grant HC, Lantos PL, Parkinson C: Cerebral damage in paraquat poisoning. *Histopathology* 1980; 4:185-195.
9. Dasta JF: Paraquat poisoning: A review. *Am. J. Hosp. Pharm.* 1978; 35:1368-1372.
10. Kuo Ch, Sheen IS, Huang CC et al: Liver biochemical tests in paraquat intoxication. *Chang Guang Med. J.* 1988; 11:160-166.
11. Burk RF, Lawrence RA, Lane JM: Liver necrosis and lipid peroxidation in the rat as the result of paraquat and diquat administration. *J. Clin. Invest.* 1980; 65:1024-1031.
12. Yasaka T, Okudaira K, Fujito H: Further study of lipid peroxidation in human paraquat poisoning. *Arch. Intern. Med.* 1986; 146:681-685.
13. Randall JR, James EK: Inhibition of mouse hepatocyte intercellular communication by paraquat-generated oxygen free radicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1988; 94:427-436.
14. Bernheim G, Bernheim MLC, Wilbur KM: The reaction between thiobarbituric acid and oxidative products of certain lipids. *J. Biol. Chem.* 1948; 174: 257-264.
15. Felix RA, Susan DL, Gerald LS et al: Chemical quantification of unscheduled DNA synthesis in cultured hepatocytes as an assay for the rapid screening of potential chemical carcinogenes. *Cancer Letter.* 1982; 42:3010-3015.
16. Bonney VR, Becker JÉ, Walker PR et al: Primary monolayer cultures of adult rat liver parenchymal cells suitable for study of the regulation of enzyme synthesis in vitro. *Rochille* 1974; 9:399-413.
17. Alley MC, Scudiero DA, Monks A: Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a micro culture tetrazolium assay. *Cancer Research* 1988; 48:589-601.
18. Amador E, Dorfman LE, Wacker WEC: Serum lactic dehydrogenase: An analytical assessment of current assays. *Clin. Chem.* 1963; 9:391.
19. Bergmeyer HU, Scheibe P, Wahlefeld AW: Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clin. Chem.* 1978; 24:58.
20. Stacey NH, Cantilena LR, Klassen CD: Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1980; 53:470-480.
21. Liaw KY, Kuo LL, Chen CC, Lin-Shiau SY: Alterations of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activities in erythrocyte, muscle, and liver of traumatic and septic patients. *Circulatory shock.* 1987; 22:195-203.
22. Breimer LH: Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: The role of DNA base damage. *Mol. Carcinog.* 1990; 3:188-197.
23. Aruoma OI: Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Fd. Chem. Toxic.* 1994; 32:671-683.
24. Niwa Y, Ishimoto K, Kanoh T: Induction of superoxide dismutase in leukocytes by paraquat: correlation with age and possible predictor of longevity. *Blood* 1990; 76:835-841.

25. Korbashi P, Kohen R, Katzhendler J et al: Iron mediates paraquat toxicity in *Escherichia coli*. 1986; 261:12472-12476.

Inhibitory Effect of Mannitol on Paraquat-Induced DNA Damage and Hepatic Toxicity in Rat Hepatocytes

**Chia-Yih Chu, Jin-Ming Hwang, Yih-Shou Hsieh,
Tsui-Hwa Tseng and Chau-Jong Wang**

Mannitol, one of the main constituents of *Gardeniae fructus*, has an antioxidant effect. The purpose of the present study is to investigate the effects of mannitol on paraquat-induced lipid peroxidation and DNA damage in rat hepatocyte. The primary hepatocyte culture was pretreated with mannitol prior to the administration of paraquat, or vice versa, or simultaneously treated with mannitol and paraquat separately. The activities of LDH, AST and ALT were used as hepatic function markers and the activity of MDA as the index of lipid peroxidation. To further

elucidate the inhibitory effect of mannitol on paraquat-induced DNA damage, the paraquat-induced DNA repair synthesis (UDS) in rat hepatocyte was studied. It was found that mannitol possessed both antihepatotoxic and antilipoperoxidant activities. The results suggested that the inhibitory mechanism of mannitol on paraquat-induced DNA damage was caused by the antilipoperoxidation effect of mannitol on the lipid of cell membrane, and the antitoxic effect in which mannitol scavenges the hydroxy free radical produced by paraquat-induced hepatic cell damage.

Key words: Mannitol · Paraquat · Lipid Peroxidation · DNA damage.