

· 毒理 ·

## 山豆根致大鼠肝损伤对肝细胞色素 P450 酶的影响

乔靖怡, 金若敏\*, 姚广涛, 周璐, 甄滢滢  
(上海中医药大学药物安全评价研究中心, 上海 201203)

**[摘要]** **目的:**考察山豆根对大鼠肝细胞色素 P450 酶药酶亚型活性的影响。**方法:**Wistar 大鼠随机分为正常对照组和山豆根低、高剂量组(1, 12 g·kg<sup>-1</sup>)。给药组每日灌胃给药 1 次, 连续 21 d, 对照组灌服等体积蒸馏水。于给药 21d 后处理动物, 收集血清, 采用全自动生化仪测定血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)和总胆红素(TB)的水平; 计算肝脏指数及观察肝组织病理学变化; 采用药物探针法测定大鼠肝脏中细胞色素 P450 酶(CYP450)亚型 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4, CYP2C9 和 CYP2D6 的活性。**结果:**与正常对照组相比, 山豆根高剂量组对肝脏有一定的毒性作用, ALT, ALP 值和肝脏指数显著升高( $P < 0.01$ ), 部分动物的肝脏出现点状坏死和炎症细胞浸润。山豆根高、低剂量组除 CYP3A4 外, 对其他酶亚型的活性影响趋向一致。山豆根高剂量组对 CYP3A4, CYP2C9 和 CYP2D6 活性具有诱导作用( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论:**高剂量山豆根对 CYP3A4, CYP2C9 和 CYP2D6 均有明显的诱导作用, 尤其是对 CYP3A4 的影响。提示山豆根与其他 CYP3A4 底物的药物合用, 应注意药物的相互作用

**[关键词]** 山豆根; 肝损伤; 细胞色素 P450

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)18-0170-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014180170

## Influence of Hepatic Injury Caused by Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma on Cytochrome P450 Enzymes in Rats

QIAO Jing-yi, JIN Ruo-min\*, YAO Guang-tao, ZHOU Lu, ZHEN Ying-ying  
(Research Center for Drug Safety Evaluation, Shanghai University of  
Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma (STR) on the activity of cytochrome P450 (CYP450) in rats. **Method:** Wistar rats were randomly divided into normal control group and STR low dose (1 g·kg<sup>-1</sup>) and high dose (12 g·kg<sup>-1</sup>) groups. STR 1, 12 g·kg<sup>-1</sup> groups were treated with STR decoction by intragastrical administration, while the normal control group was given distilledwater of the same volume once a day for 21 consecutive days. The blood was collected after 21 day treatment. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and total bilirubin (TB) were measured by using automatic biochemical analyzer. The liver weight index was calculated and the pathological changes of hepatic tissues were observed. The activity of the subtype enzymes of CYP450 including CYP1A2, CYP2E1, CYP3A1, CYP2C9 and CYP2D6 of the liver was measured by probe drugs. **Result:** Compared with the normal control group, the STR high dose group demonstrated certain liver toxicity, including the increased activity of ALT, ALP and liver weight index ( $P < 0.01$ ), spotty necrosis and inflammatory cell infiltration in the liver of some animals. The high dose of STR induced the activity of CYP3A4, CYP2C9 and

**[收稿日期]** 20140325(015)

**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2009CB522807); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09502-002, 2011ZX09301-009)

**[第一作者]** 乔靖怡, 博士, 讲师, 从事中药药理及毒理学研究, Tel:021-51323053, E-mail: qiaojingyi618@126.com

**[通讯作者]** \* 金若敏, 研究员, 从事中药新药及毒理研究, Tel:021-51322401, E-mail: rmj801@126.com

CYP2D6 ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Compared with low dose of STR, high dose of STR induced more activity of CYP3A4 ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** High dose of STR can induce the activity of CYP3A4, CYP2C9 and CYP2D6, and it is more sensitive to CYP3A4, suggesting that it should pay more attention to the drug interactions when STR is used in the combination with other drugs which also have the effects on CYP3A4.

[**Key words**] Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma; liver injury; CYP450

中药山豆根为豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根和根茎。2010 年版《中国药典》将其归为有毒中药,临床应用广泛,其主要的不良反应有肝毒性、神经毒性、胃肠道反应等<sup>[1-2]</sup>。前期本课题对山豆根肝毒性进行了初步研究<sup>[3]</sup>,而山豆根对肝药酶的影响尚未见报道。细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 主要存在于肝微粒体中,在药物代谢中发挥重要作用。研究发现许多药物可使肝药酶 P450 受到诱导或抑制,从而影响药物及其代谢产物间的相互作用以及导致药物疗效降低和不良反应发生的增加<sup>[4]</sup>。由于药物与肝药酶相互会产生影响,故在考察药物毒性或体内代谢过程均要关注此点。近年来,选用临床剂量和毒性剂量考察中药对 P450 酶主要亚型影响的研究不多,本实验以大鼠为研究对象,选择与人肝药酶相同的亚型,研究 2 个剂量下对酶的影响,为临床合理用药,也为临床联合用药所致的药物间相互作用提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 药物** 山豆根 *Sophorae Tonkinensis Radix et Rhizoma*, 产地:广西,批号 1110016,购于四川新荷花中药饮片有限公司。经上海中医药大学中药学院李西林副教授鉴定为豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根及根茎。药液的制备:称取一定量山豆根药材,加 5 倍量水浸泡 1 h,先武火煮沸,再文火煮 0.5 h,趁热过滤,再加入 3 倍量水,先武火煮沸,再文火煮 0.5 h,趁热过滤,合并 2 次药液浓缩至生药  $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏,备用。经检测山豆根水煎液中苦参碱含量为 0.29%,氧化苦参碱含量为 0.018%。

**1.2 动物** Wistar 大鼠, SPF 级,雌雄各半,  $100 \sim 120 \text{ g}$ ,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,合格证号 SCXK(沪)2007-0005。动物在上海中医药大学实验动物中心 SPF 级饲养室饲养。

**1.3 试剂** 丙氨酸转氨酶 (ALT) 检测试剂盒 (R1 批号 F131, R2 批号 F126), 天冬氨酸转氨酶 (AST) 检测试剂盒 (R1 批号 H132, R2 批号 D125), 碱性磷酸酶 (ALP) 检测试剂盒 (R1 批号 F126, R2 批号

F127), 总胆红素 (TB) 检测试剂盒 (R1 批号 DM704, R2 批号 DM705), 均由日本世诺临床诊断制品株式会社生产。探针底物:非那西丁 (phenacetin, 批号 042K2533), 氯唑沙宗 (chlorzoxazone, 批号 027K1562), 睾酮 (testosterone, 批号 201102001), 双氯芬酸 (diclofenac, 批号 101K3705), 右美沙芬 (dextromethorphan, 批号 120K1657), 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司。BCA 蛋白检测试剂盒 (批号 KB129766), BCA 蛋白检测试剂盒对照品 (批号 LC144446), 均为美国 Thermo Forma 公司, 牛血清白蛋白 (BSA, 批号 K502112, 美国 Sigma-Aldrich 公司)。缓冲溶液 A:  $11.18 \text{ g KCl}$  加入纯水至 1 L, 用 NaOH, HCl 调 pH 至 7.4。缓冲溶液 B:  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-acetate stock solution 10 mL,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA Stock 10 mL, Glycerine 200 mL, 加入纯水至 1 L, 用 NaOH, HCl 调 pH 至 7.4。氨基甲酸乙酯 (批号 T20091109), 甲醛溶液 (分析纯 AR, 批号 20110421), 二水磷酸二氢钠 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 批号 F20110816), 十二水磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 批号 20110801), 均购自国药集团化学试剂有限公司。

**1.4 仪器** 日立 7080 全自动生化分析仪 (日本日和贸易有限公司), Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (美国安捷伦科技有限公司), API4000 三重四级杆质谱分析仪 [美国应用生物系统 (Applied Biosystems, AB) 有限公司]。

## 2 方法

**2.1 动物分组、给药及处理** 取大鼠 18 只随机分为 3 组, 每组 6 只, 雌雄各半, 分别为正常对照组和山豆根低、高剂量组。给药组每天分别灌胃给予山豆根水煎液 (以下简称山豆根, 剂量以生药量计)  $1, 12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 正常对照组灌服等容量蒸馏水  $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 连续 21 d。于末次给药后禁食不禁水 12 h 处理动物, 称量大鼠体重, 以 25% 乌拉坦溶液  $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  麻醉动物, 腹主动脉取血,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$   $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取血清, 进行血液生化检测。然后摘取动物肝脏, 称重并计算肝脏指数。取肝左叶固定于中性福尔马林溶液中, 剩余肝脏置  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存。

**2.2 血液生化和组织病理学检查** 采用全自动生化仪测定血清 ALT, AST, ALP, TB 的水平。肝脏组织经 HE 染色, 进行组织病理学检查。

**2.3 微粒体制备及亚酶活性测定** 肝脏微粒体制备采用超速离心法<sup>[5]</sup>, 并根据美国 FDA 的指导原则(2006 草案)分别以非那西丁、氯唑沙宗、睾酮、双氯芬酸和右美沙芬作为 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4, CYP2C9 和 CYP2D6 的特异性探针底物, 以底物生成检测各亚酶的活性。

**2.4 统计方法** 应用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料

采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差法, 组间两两比较方差齐性时用 LSD 方法分析, 方差不齐时用 Dunnett's 方法分析。P < 0.05 为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对大鼠血液生化指标的影响** 与正常对照组相比, 山豆根低剂量组 ALT, AST, ALP, TB 均无明显变化; 高剂量组 ALT, ALP 显著升高 (P < 0.01)。与低剂量组相比, 高剂量组 ALT, ALP 亦显著升高。见表 1。

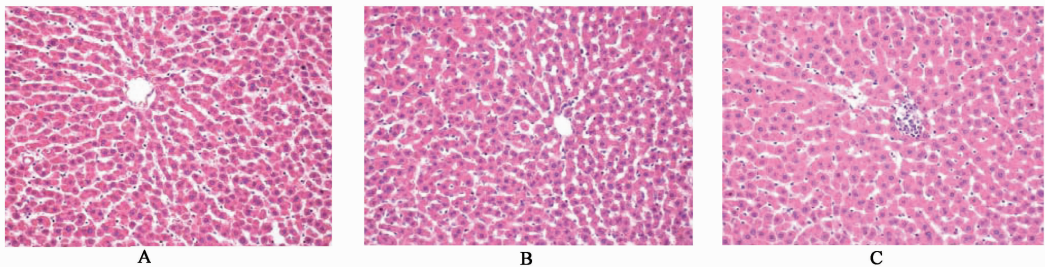
表 1 山豆根对大鼠血液生化指标、肝脏指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>	ALP/U·L <sup>-1</sup>	TB/μmol·L <sup>-1</sup>	肝脏指数/%
正常对照	-	52.83 ± 9.54	191.50 ± 33.66	421.17 ± 153.18	0.34 ± 0.36	3.01 ± 0.27
山豆根	1	58.50 ± 11.98	160.67 ± 28.70	460.33 ± 101.41	0.08 ± 0.33	3.02 ± 0.12
	12	117.67 ± 20.73 <sup>2, 4)</sup>	182.67 ± 34.31	757.83 ± 94.50 <sup>2, 4)</sup>	0.35 ± 0.34	3.68 ± 0.18 <sup>2, 4)</sup>

注: 与正常对照组比较<sup>1)</sup> P < 0.05, <sup>2)</sup> P < 0.01; 与山豆根 1 g·kg<sup>-1</sup> 组比较<sup>3)</sup> P < 0.05, <sup>4)</sup> P < 0.01 (表 2 同)。

**3.2 对大鼠肝脏指数的影响** 与正常对照组相比, 山豆根低剂量组肝脏指数无明显变化; 高剂量组肝脏指数显著升高 (P < 0.01); 与低剂量组相比, 高剂量组肝脏指数亦显著升高 (P < 0.01)。见表 1。

**3.3 对大鼠肝脏组织病理学的影响** 光镜下可见正常对照组和山豆根低剂量组大鼠肝小叶结构清楚, 肝细胞未见明显变性、坏死, 肝窦未见明显瘀血; 山豆根高剂量组有 1/3 动物出现肝细胞点状坏死和炎症细胞浸润。见图 1。



A. 正常对照组; B. 山豆根 1 g·kg<sup>-1</sup>; C. 山豆根 12 g·kg<sup>-1</sup>

图 1 山豆根对大鼠肝脏组织病理学的影响 (HE, ×200)

**3.4 山豆根对肝细胞色素 P450 酶的影响** 与正常对照组相比, 山豆根低剂量组有升高 CYP1A2, CYP2C9 和 CYP2D6 活性的趋势; 高剂量组则明显

升高 CYP3A4, CYP2C9 和 CYP2D6 活性 (P < 0.05 或 P < 0.01)。与山豆根低剂量组相比, 山豆根高剂量组升高 CYP3A4 活性 (P < 0.01)。见表 2。

表 2 山豆根对肝细胞色素 P450 酶的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	CYP1A2	CYP2E1	CYP3A4	CYP2C9	CYP2D6
		/pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup>	/pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup>	/pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup>	/pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup>	/pmol·min <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup>
正常对照	-	53.85 ± 14.03	145.78 ± 54.50	726.05 ± 130.60	182.85 ± 26.55	27.32 ± 6.53
山豆根	1	73.80 ± 27.63	136.85 ± 66.01	706.83 ± 224.28	231.62 ± 88.88	33.76 ± 11.73
	12	82.35 ± 25.84	122.70 ± 44.64	1051.95 ± 182.27 <sup>2, 4)</sup>	296.52 ± 72.45 <sup>1)</sup>	42.12 ± 15.46 <sup>1)</sup>

## 4 讨论

药物的体内代谢主要在肝脏, 肝细胞色素 P450

酶 (CYP450) 是人体内最重要的药物代谢酶。CYP450 中与药物代谢密切相关的主要亚型有

CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4, CYP2C9 和 CYP2D6, 可参与体内 90% 以上药物的代谢<sup>[7-8]</sup>。已有报道其中 CYP3A4 作为 CYP3A 亚家族中成年人主要的表达亚型, 是人肝脏微粒体内含量最丰富的 P450 酶, 临床上约有 50% 的药物可经由此酶代谢, 如免疫抑制剂、钙离子通道阻滞剂及抗生素等<sup>[9]</sup>。CYP2C9 是 CYP2C 亚家族中最主要的成员, 代谢临床上约 10% 的药物, 包括甲苯磺丁脲、阿米替林、氟西汀等药物的代谢, 并且在前列腺素、前毒物、致突变剂的活化过程中也起作用<sup>[10]</sup>。CYP1A2, CYP2E1 亦参与多种重要的药物性肝损伤<sup>[11-12]</sup>。CYP2D6 参与催化代谢约 30% 的常规药物, 如氯丙嗪、右沙芬、可待因和普萘洛尔等<sup>[13]</sup>。

考虑到某些药在低剂量时对酶活力有作用趋势, 但统计学上并无差异, 往往会忽略药物对酶的影响, 而中药常常以复方形式出现, 药物合用往往会对相同的药酶亚型有叠加或拮抗作用产生互相影响<sup>[14]</sup>, 因此本实验设计山豆根临床剂量和毒性剂量 2 种剂量, 采用药物探针法通过检测大鼠肝脏中 CYP450 亚型 CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4, CYP2C9 及 CYP2D6 的活性进行研究, 其目的考察药物在不同剂量下, 尤其毒性剂量下, 对酶活性影响的放大效应。

山豆根连续灌胃给药 21 d, 生化及病理结果显示: 与正常对照组相比, 山豆根低剂量即临床治疗量对大鼠血清生化指标和病理无明显影响, 表明对肝脏无明显影响; 高剂量即毒性剂量血清生化指标 ALT, ALP 和肝脏指数明显升高, 病理显示部分动物出现肝脏点状坏死和炎症细胞浸润, 表明高剂量对肝脏有一定的毒性。对酶活性影响显示, 高剂量使 CYP3A4, CYP2C9 和 CYP2D6 活性明显升高, 而这些酶参与了约 90% 药物的代谢, 一方面反映了在毒性剂量时药物诱导了酶的活性, 即加快了药物的代谢, 是机体的自我保护的表现; 另一方面考虑到中药常以复方形式出现, 多味药物对酶活性作用是各单味药相互作用的结果, 因此将剂量放大是为了反映可能对哪些酶有潜在的影响, 防止多味药物对同一酶活性的叠加而可能出现的不良反应。因此, 当山豆根与 CYP3A4, CYP2C9, CYP2D6, 尤其是 CYP3A4 底物药物合用时很有可能产生药物间的互相作用, 从而影响药物的疗效或毒性, 出现增效或毒性增大效应, 为临床合理用药提供依据。关于山豆根高剂量对 CYP450 酶亚型的影响、山豆根在体内的代谢、

肝毒性的相关性尚需进一步进行研究。

## [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010:19.
- [2] 杨倩, 郑丽娜, 谢元璋, 等. 山豆根不同组分对小鼠急性肝毒性“量-时-毒”关系研究[J]. 中国药物警戒, 2010, 7(7):385.
- [3] 李峰杰, 姚广涛, 金若敏, 等. 山豆根致大鼠肝毒性机制研究[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(13):1821.
- [4] Zanger U M, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism; regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation[J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 138(1):103.
- [5] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature[J]. *J Biol Chem*, 1964, 239:2370.
- [6] 丁兰. 浅谈药物性肝损害[J]. 天津药学, 2009, 21(4):20.
- [7] Guengerich F P. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity[J]. *AAPS J*, 2006, 8(1):E101.
- [8] Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects[J]. *Am Fam Physician*, 2007, 76(3):391.
- [9] 饶小惠, 陈锋, 潘明新, 等. 用于药物研发的细胞色素 P450 酶 3A4 体外肝细胞模型的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(6):1043.
- [10] 马葵芬, 谢先吉, 刘莹, 等. 细胞色素 P450 酶基因多态性及其介导的药物性肝损伤研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(5):889.
- [11] 张沂, 于春令, 邸秀珍, 等. 氟喹诺酮类药物对大鼠肝微粒体细胞色素 P450 酶系的影响[J]. 解放军医学杂志, 2012, 37(11):1059.
- [12] Vuilleumier N, Rossier M F, Chiappe A. CYP2E1 genotype and isoniazid-induced hepatotoxicity in patients treated for latent tuberculosis [J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2006, 62:423.
- [13] Ashlafi H, Horowitz J D, Frenneaux M P. Pethexiline [J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2007, 25:76.
- [14] 钟育敏, 吴文康. 中药对细胞色素 P450 调控作用的研究进展[J]. 陕西中医, 2011, 2:244.

[责任编辑 聂淑琴]