

· 药理 ·

桂郁金水提物对大鼠肝胞浆和微粒体内 II 相脱毒酶的影响

石卫州, 程允相, 樊星花, 杨秀芬*

(广西中医药大学药学院药理学教研室, 南宁 530001)

[摘要] **目的:**研究桂郁金水提物对大鼠肝胞浆液和微粒体内 II 相脱毒酶的影响。**方法:**雄性 SD 大鼠, 桂郁金水提液按(生药剂量)0.81, 2.43, 7.29 g·kg⁻¹3 个剂量组, 灌胃给药, 1 次/d, 连续 3 周, 末次给药后, 动物取血, 分离血清, 测丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr), 摘除肝脏, 差速离心法制备肝脏胞浆液及微粒体, 测定胞浆液的过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽还原酶(GR)和微粒体内谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸转移酶(UGT)的活性。**结果:**桂郁金水提液对大鼠体重增长和肝脏指数及血清 ALT、AST 含量均无明显影响; 桂郁金各剂量组明显降低 Cr 含量($P < 0.01$); 中、高剂量组明显降低了 BUN 含量($P < 0.01$)。在肝胞浆液, 与对照组比较, 桂郁金各剂量组对 CAT 和 GR 的活性没有明显影响; 桂郁金各剂量均明显增高 GSH-Px 活性($P < 0.01$); 桂郁金中、高剂量明显增高 SOD 活性($P < 0.01, P < 0.05$)。在肝微粒体中, 与对照组比较, 桂郁金各剂量组对 UGT 的活性没有显著的影响; 桂郁金各剂量均明显增高 GST 活性($P < 0.05$)。**结论:**桂郁金对大鼠肝脏和肾脏没有毒性, 对肾脏可能还具有保护作用。桂郁金可诱导胞浆液和微粒体内脱毒酶的功能, 具有抗氧化作用, 并能加速体内毒性代谢物的排除, 增加肝脏的解毒能力。

[关键词] 桂郁金; 抗氧化酶; 谷胱甘肽-S-转移酶; 尿苷二磷酸-葡萄糖醛酸转移酶; 脱毒酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)08-0163-04

[doi] 10.11653/syfj2013080163

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130206.0903.007.html>

[网络出版时间] 2013-02-06 9:03

Effects of Water Extract of *Curcuma kwangsiensis* on Detoxication Enzymes in Cytosol and Microsomes of Rat Liver

SHI Wei-zhou, CHENG Yun-xiang, FAN Xing-hua, YANG Xiu-fen*

(Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Guangxi University
of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of water extracts from *Curcuma kwangsiensis* on liver detoxication enzymes in cytosol and microsomes in rats. **Method:** Rats were treated with 0.81, 2.43, 7.29 g·kg⁻¹ once daily for 21 days, serum were collected for determination of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), and liver was removed, then cytosols and microsomes isolated from liver were prepared by differential centrifugation according to the standard procedure. Antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (Gr) in cytosols and glutathione-S-transferase (GST), uridinediphosphoglucuronate glucuronosyl

[收稿日期] 20120907(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81060353);“教育部新世纪优秀人才支持计划人选”项目(教技函 2010-14 号, NCET-10-0093);广西自然科学基金项目(桂科基 0832006, 2011GXNSFF018006)

[第一作者] 石卫州, 硕士学位, 药师, E-mail: sping015@163.com

[通讯作者] * 杨秀芬, 医学博士, 教授, 硕士研究生导师, 从事中药对体内生物转化酶的影响和以酶为靶点的药物研究与开发。Tel: 0771-2279423; E-mail: xiufenyang@163.com

transferase (UGT) in microsomes were determined by UV-V is spectrophotometer. **Result:** *C. kwangsiensis* water extract had no effect on weight, liversomatic indexes, ALT and AST activities under different treatment compared with control group ($P > 0.05$), but significantly decreased the level of Cr ($P < 0.01$) in all groups, middle and high doses could also decreased BUN level ($P < 0.01$). Compared with the control group, *C. kwangsiensis* had no effect on CAT and GR in cytosols. The groups of $2.43 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($P < 0.01$) and $7.29 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($P < 0.05$) significantly increased the activities of SOD. Furthermore, all of the *C. kwangsiensis* groups significantly increased the activities of GSH-Px ($P < 0.01$). Compared with the control group, all of *C. kwangsiensis* groups had no effect on the activities of UGT. All groups of *C. kwangsiensis*, significantly induced the activities of GST ($P < 0.05$) in microsomes. **Conclusion:** *C. kwangsiensis* have no toxicity on liver and kidney in rats, on the contrary, *C. kwangsiensis* may have a protective effect on kidney. *C. kwangsiensis* can induce the detoxication enzymes in cytosols and microsomes of rat liver, it have antioxidant function and increase the detoxication of liver.

[**Key words**] *Curcuma kwangsiensis*; antioxidant enzymes; glutathione-S-transferase (GST); UDP-glucuronosyl transferase (UGT); detoxication enzymes

桂郁金属于活血化瘀类中药,为广西莪术的干燥块根,其性味辛、苦、寒,归肝、心、肺经,具有行气化瘀、清心解郁、利胆退黄之功效^[1]。桂郁金为广西产大宗道地中药材,其产量约占全国郁金总产量的 60% 以上^[2],对我国市场有较大的影响力。现代药理研究表明桂郁金有抗纤维化、保肝降酶、改善蛋白质合成^[3-6]、止血和凝血^[7-8]等作用。本课题主要研究桂郁金水提物对大鼠肝胞浆液和微粒体内 II 脱毒酶的影响,以进一步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药材 桂郁金 *Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang 于 2011 年 4 月购于广西钦州市灵山县陆屋镇,经广西中医药大学药学院中药鉴定教研室何报作教授鉴定为正品。

1.2 试剂 丙氨酸转氨酶(ALT,批号 20110525)、天冬氨酸转氨酶(AST,批号 20110618)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST,批号 20110628)、尿素氮(BUN,批号 20110611)、肌酐(Cr,批号 20110617)、谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-Px,批号 20110628)、过氧化氢酶(CAT,批号 20110609)、超氧化物歧化酶(SOD,批号 20110622)、和谷胱甘肽还原酶(GR,批号 20110701)试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所。烟酰胺腺嘌呤为核苷酸磷酸的氧化形式(NADP^+);三羟甲基氨基甲烷(Tris, Sigma, T8060),6-磷酸葡萄糖(G-6-P, glucose-6-phosphate, Sigma, G7250)、烟酰胺腺嘌呤为核苷酸磷酸(NADP^+)-G-6-P(Sigma D8090)、维生素 C 和尿苷二磷酸(UDP)-葡萄糖醛酸(Uridine 5-diphosphoglucuronic acid trisodium salt, Sigma);6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G-6-PDH, glucose 6-phosphate

dehydrogenase, Roche, G8020),聚乙二醇辛基苯基醚 Triton x-100(Solarbio, T8200),其他试剂为国产分析纯。

1.3 仪器 台式低速离心机(北京京立离心机有限公司),TU-1901 紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),HH-2 型数显恒温水浴锅(国华电器有限公司),电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),酶标仪(德国 BioTek 公司)。

1.4 动物 雄性 SD 大鼠 40 只,体重 180 ~ 220 g, SPF 级,由广西医科大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(桂)2009-0002。

2 方法

2.1 药材提取 桂郁金称取适量,粉碎,将药材粗粉加 12 倍纯净水浸泡 1 h,文火煎煮 0.5 h,趁热过滤,收集滤液,然后再加入 10 倍水,再煎煮 0.5 h,合并两次滤液,浓缩至一定体积,待用。

2.2 给药 40 只大鼠随机分为桂郁金水提物低、中、高剂量组及对照组,每组 10 只,低、中、高给药组剂量分别为 $0.81, 2.43, 7.29 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,对照组给予等量纯净水,给予水提物和纯净水的容积为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。受试动物 ig 给药,每天 1 次,连续给药 21 d。末次给药结束后,大鼠禁食 12 h,股动脉取血,随后立即处死,分离肝脏,用冰冷的生理盐水充分灌流、洗净至白陶土样后称重,计算肝脏指数。肝指数 = 肝重(g)/体重(g) × 100%。称重后的肝脏组织进行匀浆, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $1\ 000 \times g$,离心 15 min,取上清液,于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $12\ 500 \times g$,离心 2 次,每次 15 min,取上清液转移至超速离心管内, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $105\ 000 \times g$,离心 1 h,上清液为胞浆液,沉淀为微粒体。

2.3 血清中肝、肾功能指标和胞浆液抗氧化酶及微粒体的 GST 测定 按试剂盒操作方法操作。

2.4 葡萄糖醛酸-转移酶(UGT)活性的测定 取辅助因子溶液 1 mL 和 0.5 mL ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2-氨基酚,加 0.5 mL 微粒体蛋白悬液启动反应,空白管加入 0.5 mL 蒸馏水代替 2-氨基酚。37 °C 水浴,振摇温孵 30 min。加 1 mL 冰冷的 20% 三氯醋酸,0.1 mL 的磷酸缓冲液以终止反应。冰浴 5 min,3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 5 min,取上清液 1 mL,加 0.5 mL 新鲜配制的 0.1% 亚硝酸钠,混匀,放置 2 min。加 0.5 mL 0.5% 氨基磺酸胺,混匀,放置 3 min,加 0.5 mL 0.1% *N*-奈乙烯二胺,混匀,放置于暗处 60 min,以空白管调零,540 nm 处测定吸光度(*A*)。然后根据标准曲线计算酶活性。

2.5 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 SPSS 17.0 软件进行组间 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 对正常大鼠体重和肝脏指数的影响 与对照组比较,桂郁金 3 个剂量组对正常大鼠体重增长和肝脏指数的差异均不显著。

3.2 对正常大鼠血清中肝和肾功能指标的影响 与对照组比较,桂郁金 3 个剂量组对 ALT,AST 活性的影响均无明显的差异,均明显降低 Cr 含量 ($P < 0.01$);桂郁金中、高剂量组均明显降低了 BUN 含量 ($P < 0.01$),见表 1。

3.3 对大鼠肝脏胞浆液抗氧化酶和微粒体 GST 和 UGT 活性的影响 与对照组比较,桂郁金各剂量组对 CAT 和 GR 含量、微粒体 UGT 活性的影响没有明显差异;桂郁金中、高剂量明显增高 SOD 活性 ($P < 0.01, P < 0.05$);桂郁金低、中、高各剂量均明显增高 GSH-Px 活性 ($P < 0.01$),明显增高 GST 活性 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 桂郁金对正常大鼠血清 ALT,AST,BUN 和 Cr 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	ALT/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Cr/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白	-	7	18.91 ± 4.18	41.12 ± 13.86	6.22 ± 1.39	112.58 ± 31.14
桂郁金	0.81	8	16.39 ± 4.86	48.90 ± 9.39	5.42 ± 0.63	77.99 ± 16.52 ²⁾
	2.43	8	15.59 ± 3.69	39.43 ± 8.38	4.49 ± 1.23 ²⁾	77.54 ± 13.22 ²⁾
	7.29	8	20.66 ± 5.09	43.13 ± 8.75	2.99 ± 0.39 ²⁾	82.73 ± 11.54 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

表 2 桂郁金对正常大鼠胞浆液 CAT,SOD,GSH-Px,GR 和微粒体内 GST 和 UGT 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	<i>n</i>	CAT/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	GSH-Px/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	GR/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	GST/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	UGT/ $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
空白	-	7	271.35 ± 51.59	250.55 ± 33.43	346.16 ± 34.61	3.73 ± 2.03	17.45 ± 4.58	0.13 ± 0.03
桂郁金	0.81	7	278.52 ± 23.90	277.49 ± 55.15	533.50 ± 102.34 ²⁾	8.62 ± 7.79	50.12 ± 13.00 ²⁾	0.16 ± 0.06
	2.43	8	281.76 ± 32.77	329.47 ± 56.73 ²⁾	499.32 ± 136.64 ²⁾	7.04 ± 7.28	44.12 ± 16.98 ²⁾	0.14 ± 0.10
	7.29	8	253.63 ± 23.09	301.64 ± 36.33 ¹⁾	529.65 ± 94.27 ²⁾	8.92 ± 5.78	37.69 ± 16.65 ¹⁾	0.16 ± 0.03

4 讨论

本实验结果表明,桂郁金水煎液对正常大鼠体重增长和肝脏指数无显著性,提示桂郁金水煎液对正常大鼠的体重增长和肝脏指数没有明显的影响。酶是细胞的物质成分,是生物体内物质代谢的催化剂,大多数血清酶主要来自肝脏,因此,血清中酶的活性可以反映肝脏的功能情况,尤其是 ALT 和 AST^[9]。本实验发现大鼠长期给予桂郁金后其 ALT 和 AST 都没有显著性影响,表明桂郁金对大鼠肝脏没有毒性。

尿素是蛋白质代谢产生的氨在肝脏经鸟氨酸循环生成的终产物,BUN 增高见于急慢性肾炎,各种原因所致急慢性肾功能障碍,心衰、休克、烧伤等。

Cr 是肌酸的代谢产物,是人体肌肉产生的一种废物,其生成、代谢与排除受肾外因素影响较少,能较客观的反应肾脏功能,是较为理想的指标。本实验中,桂郁金对大鼠血清 Cr 和 BUN 有明显的降低作用,提示桂郁金对肾脏没有毒性,可能对肾还具有保护作用。

GSH-Px,CAT,SOD,GR 等是机体内抗氧化系统的主要组分,其作用是及时清除体内代谢过程中产生的各种自由基。SOD 是一种带阴性电荷的金属蛋白酶,是清除自由基最重要的抗氧化酶,可催化超氧阴离子的歧化反应,生成的 H_2O_2 可被 CAT 或 GSH-Px 清除,从而消除自由基对生物体的危害,起到抗氧化的作用,直接或间接保护体细胞免受自由

基损伤,而过量的超氧阴离子自由基又可诱导机体产生 SOD。GSH-Px 是机体内最为重要的含硒氧化酶,不但能清除细胞质及线粒体内产生的 H_2O_2 ,还能清除脂质过氧化物等有机过氧化物。CAT 也是金属酶,主要存在于过氧化体内,主要功能为催化过氧化氢分解为水和氧,可以清除过氧化体内酶反应产生的 H_2O_2 ^[10-11]。还原型谷胱甘肽(GSH)是细胞合成的重要抗氧化剂(可清除自由基),是 GSH-Px 催化有机过氧化物或 H_2O_2 还原反应以及脱氢抗坏血酸还原酶催化脱氢抗坏血酸还原反应的供氢体,也是谷胱甘肽硫转移酶(GST)清除毒物时的亲电子物质的解毒剂。在上述的各种反应中,GSH 被氧化,变成氧化型谷胱甘肽(GSSG)。而 GSSG 可在 GR 催化下还原变成 GSH,从而再次发挥 GSH 的抗氧化作用^[10-11]。因此,GR 可通过 GSH 在清除体内自由基及其损伤修复中起重要作用。

本试验结果表明,在灌胃给予桂郁金水提液后,桂郁金不同程度增高 SOD 和 GSH-Px 的活性,有研究认为 GSH-Px, SOD, CAT 之间存在协同与相互保护关系,共同构成一个抗氧化酶网络,其中任何一种酶的活性变化都可能在一定程度上影响着其他酶的活性^[10-11]。因此认为桂郁金能够增强大鼠肝脏胞浆液抗氧化酶清除自由基的能力,起到调节机体组织抗氧化系统的作用。

GST, UGT 是 II 相主要的药物代谢酶,主要参与药物的结合代谢, GST 催化还原型谷胱甘肽与一系列亲电子化合物结合,对进入体内的亲电子致癌物、外源性毒物起解毒和保护作用, UGT 催化大多数药物、致癌物、毒物等与葡萄糖醛结合而代谢、解毒、排泄^[10-11]。GST 是具有多种功能的 II 相代谢酶家族,能催化谷胱甘肽 GSH 与细胞色素 P450 催化形成的底物及与体内各种化学反应形成的亲电子剂结合;催化 GSH 与体内氧化还原产物和体内代谢形成的氧自由基结合,使其易于从胆汁或尿液中排泄^[10-12]。本实验表明,桂郁金各剂量组对 GST 均有明显的诱导作用,说明桂郁金可加速排出体内大多数毒性代谢物,增加肝脏的解毒能力。

UGT 是化学物质在生物体内进行第 II 相生物转化时最重要的一种微粒体酶,在所有通过 II 相酶代谢的药物中,有大约 35% 是通过 UGT 代谢的。该酶能催化葡萄糖醛酸与大量的内源性化学物质如胆红素和外源性化学物质如药物相结合,加速其代谢,这

也是机体的一个解毒的过程^[10-11,13]。本研究显示,与空白组相比,桂郁金对 UGT 没有明显的影响。

[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:中国医药科技出版社, 2010:193.
- [2] 姜宏伟, 叶虹. 郁金治疗淤胆型肝炎的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(4): 433.
- [3] 秦华珍, 李彬, 时博, 等. 广西桂郁金对肝纤维化大鼠肝脏组织病理的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(7): 130.
- [4] 黄小鸥, 秦华珍, 李彬, 等. 广西桂郁金对肝纤维化大鼠血清学指标的影响[J]. 广西中医药, 2009, 32(3): 59.
- [5] 秦华珍, 郑作文, 邓家刚, 等. 广西桂郁金对小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 广西中医学院学报, 2008, 11(1): 1.
- [6] 秦华珍, 李彬, 时博, 等. 广西桂郁金对小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(11): 2671.
- [7] 周芳, 杨秀芬, 仇霞. 桂郁金醇提物对小鼠出血及凝血时间的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(11): 143.
- [8] 杨秀芬, 周芳, 李丽花, 等. 桂郁金水提物对小鼠出血和凝血时间的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9): 封 3.
- [9] 杨晴. 血清转氨酶长期升高的原因和处理[J]. 实用乡村医生杂志, 1999, 6(1): 14.
- [10] Shen G, Kong A N T. Nrf2 plays an important role in coordinated regulation of phase II drug metabolize enzymes and phase III drug transporters[J]. Biopharm Drug Dispos, 2009, 30(7): 345.
- [11] Klaassen C D, Reisman S A. Nrf2 the rescue: effects of the antioxidant/electrophilic response on the liver[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 244(1): 57.
- [12] Higgins L G, Hayes J D. Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents [J]. Drug Metab Rev, 2011, 43(2): 92.
- [13] Ishii Y, Nurrochmad A, Yamada H. Modulation of UDP-glucuronosyl transferase activity by endogenous compounds [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2010, 25(2): 134.

[责任编辑 聂淑琴]