

姜酚对小鼠肝药酶活性的影响

向云亚,蒋苏贞*,黄兆胜
(广州中医药大学中药学院,广州 510006)

[摘要] 目的:研究姜酚对小鼠肝脏细胞色素氧化酶 P450(CYP450)含量及其亚型 CYP2E1 与 CYP3A 活性的影响。方法:小鼠口服给药姜酚(200,100,50 mg·kg⁻¹·d⁻¹),5 d 后钙沉淀法制备肝微粒体,测定并考察姜酚对小鼠肝重、微粒体蛋白、CYP450 及 CYPb₅ 含量的影响;氨基比林法和红霉素法测定肝微粒体 CYP 亚型 CYP2E1 与 CYP3A 的活性。结果:姜酚高、中、低剂量(200,100,50 mg·kg⁻¹·d⁻¹)对小鼠肝重、蛋白含量无影响,能显著降低 CYP450 的含量以及增加 CYPb₅ 的含量($P < 0.01$);3 种剂量姜酚均可抑制 CYP2E1 的活性($P < 0.05$),且随着剂量增加抑制作用增强,高剂量姜酚可以抑制 CYP3A 的活性($P < 0.05$)。结论:姜酚对小鼠 CYP450 含量及亚型 CYP2E1,CYP3A 活性有抑制作用,抑制程度与剂量有关。

[关键词] 姜酚;细胞色素氧化酶 P450;氨基比林;红霉素

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)20-0208-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120813.1215.062.html>

[网络出版时间] 2012-08-13 12:15

Effect of Gingerol on Mice’s Liver Drug Metabolizing Enzyme

XIANG Yun-ya, JIANG Su-zhen*, HUANG Zhao-sheng
(School of Chinese Herbal Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of gingerol on the contents of liver microsomal cytochrome P450 and the activities of CYP2E2 and CYP3A in mice. **Method:** Gingerol (200, 100, 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹) were ig given to male mice for 5 days, after the liver microsomes were prepared by calcium isolation, the effects of gingerol on the contents of mice liver heavy, microsomal protein, CYP450 and CYPb₅ were determined and the activities of CYP2E2 and CYP3A were tested by using erythromycin and aminopyrine. **Result:** The gingerol had no effects on the contents of liver heavy and microsomal protein in mice treated with gingerol (200, 100, 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹) but could markedly decrease and increase the contents of CYP450 and CYPb₅, respectively ($P < 0.01$); the activity of CYP2E1 was inhibited in mice treated with gingerol (200, 100, 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹) ($P <$

[收稿日期] 20120212(013)
[基金项目] 广东省自然科学基金博士启动项目(10451040701006098);广州中医药大学创新基金课题(K0090086)
[第一作者] 向云亚,在读博士,从事中药安全性及有效性评价研究,Tel:15914306023,E-mail:xiangyunya@163.com
[通讯作者] *蒋苏贞,博士,副教授,从事中药安全性及有效性评价研究,Tel:020-39358085,E-mail:jsu8815@163.com

[8] Kutzting M K, Firestein B L. Altered uric acid levels and disease states [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2008, 324 (1):1.

[9] 陈光亮,段玉光,李莉加,等. 加味四妙汤对高尿酸血症和痛风性关节炎防治作用的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(3):48.

[10] 李刚,刘雪梅. 痛风颗粒防治痛风作用及其相关机理研究 [J]. 中成药,2008,30(10):1435.

[11] 周敏,雒晓鸣,张巍,等. 痹清胶囊对鸡高尿酸血症模

型尿酸代谢的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2006, 12(12):35.

[12] 时乐,徐立,尹莲. 加味四妙丸抗痛风作用有效部位群的研究 [J]. 南京中医药大学学报, 2008, 24 (6):386.

[13] 王学美,富宏,刘庚信,等. 痛风丸治疗痛风的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2005,11(4):62.

[责任编辑 聂淑琴]

0.05) and the effect of inhibition became stronger with the dose increasing of gingerol. The activity of CYP3A was inhibited in mice treated with gingerol ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), ($P < 0.05$). **Conclusion:** Gingerol has the effects of inhibiting the content of CYP450 and the activities of CYP2E1 and CYP3A, the degree of inhibition is related to dose.

[**Key words**] gingerol; cytochrome P450; aminopyrine; erythromycin

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 是一组结构和功能相关的超家族基因编码的同工酶,与体内物质代谢密切相关,主要分布于肝脏,在肠、肺、肾、脑中也依次有少量分布^[1]。姜酚 (gingerols) 是姜科姜属植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的主要活性成分,现代研究发现^[2-3],姜酚具有强心、舒缩血管、抗血小板聚集、抗氧化、抗肿瘤、抑制病原微生物、抗炎、镇痛等药理作用,应用前景广泛。我们前期研究结果显示^[4],姜酚口服吸收迅速,在肝脏中有较高的分布,而血药浓度较低,推测其口服给药存在首过效应,肝药酶对姜酚代谢可能起着非常重要的作用,但姜酚对肝药酶活性有何影响尚未见报道。随着临床合并用药的增多,由此而引起的代谢性药物相互作用日益受到人们的关注。本文通过对姜酚 3 种剂量下肝重、微粒体蛋白、CYP450 和 CYPb₅ 含量的测定比较以及考察 3 种姜酚剂量对小鼠 CYP450 亚型影响,为姜酚代谢及临床用药提供参考。

1 材料

1.1 动物 SPF 级昆明种雄性小鼠,体重 (25 ± 2) g,由广州中医药大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(粤)2008-0020。

1.2 试剂和药品 姜酚(广州中医药大学药理实验室自制),牛血清蛋白(广州齐云生物技术有限公司,批号 KY201001),还原辅酶 II 四钠盐(NADPH)(广州齐云生物技术有限公司,批号 WH201105),红霉素(GIBCO 公司,批号 20100618),氨基比林(阿拉丁公司,批号 21588)。

1.3 仪器 CR-22G 日立台式低温高速离心机(日本,日立集团),T6 新世纪紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限公司),CU410-86 型 -80°C 冰箱(New Brunswick Scientific, USA)。

2 方法

2.1 分组与给药 雄性昆明种小鼠 60 只随机分组 6 组,每组 10 只。空白组给予蒸馏水,溶媒组给予花生油 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,姜酚高、中、低剂量组分别 ig 给予花生油助溶的姜酚 200, 100, 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,利福平组给予利福平水溶液 80 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每天 1 次,连续 ig 给药 5 d。

2.2 肝微粒体的制备 实验小鼠给药 5 d 后,实验前禁食不禁水 12 h,将小鼠断头处死(以下均在冰浴上进行),迅速打开腹腔,用冰冷的 PBS 缓冲液经肝门静脉灌洗肝脏,同时下腔静脉剪开一小口,释放灌洗液,当肝脏灌洗至土黄色时,剪下肝脏,用滤纸吸干称重,每克肝脏加入 4 mL 冰冷的 PBS 缓冲液,在冰浴中匀浆制备肝匀浆液。肝匀浆液于 0°C $10\,000 \times g$ 离心 20 min,取上清液加冰冷的 88 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl_2 溶液(按每 1 mL 上清液加 0.1 mL),混匀后冰浴 5 min,再于 0°C $30\,000 \times g$ 离心 20 min,弃去上清液,沉淀用 1 mL PBS-20% 甘油缓冲液反复吹打均匀,分装,于 -80°C 保存备用。

2.3 肝微粒体蛋白的测定 精密称取牛血清蛋白 10 mg,用 PBS 缓冲溶液定容至 10 mL,得 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的牛血清蛋白标准溶液。参照 Lowery 法^[5]制作标准曲线,求得蛋白含量回归方程为: $Y = 3.1783X + 0.0779$, $r = 0.9994$,检测范围为 $0.02 \sim 0.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 CYP450, CYPb₅ 含量的测定 采用一氧化碳还原差示光谱法测定^[6]。取肝微粒体蛋白悬液 3 mg,加 pH 7.4 PBS 缓冲液至 6 mL,混合,分装于两个 3 mL 比色杯,向 2 个比色杯加入 5 mg 连二亚硫酸钠混匀,样品杯中轻轻充 CO 1 min,空白杯不通 CO,紫外分光光度计从 400 ~ 500 nm 扫描,记录吸光度(A)。计算公式如下:

$$\text{P450} = (A_{450 \text{ nm}} - A_{490 \text{ nm}}) \times 1\,000 / (91 \times \text{蛋白浓度})$$

CYPb₅ 含量测定除空白杯不加连二亚硫酸钠,样品杯加连二亚硫酸钠且不充 CO 外,其余同上。计算公式如下:

$$\text{CYPb}_5 = (A_{424 \text{ nm}} - A_{490 \text{ nm}}) \times 1\,000 / (171 \times \text{蛋白浓度})$$

2.5 CYP450 亚型 (CYP2E1 及 CYP3A) 的活性测定 取待测肝微粒体 0.4 mL,空白为等体积的蒸馏水,分别加入 40 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨基比林(或 4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 红霉素) 0.1 mL, 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS 缓冲液 1.5 mL, 37°C 恒温水浴预孵育 3 min, 然后加入 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NADPH 0.1 mL 启动反应, 37°C 恒温水浴预孵育 60 min, 中间每隔 10 min 振摇 1 次, 加入 15% ZnSO_4 0.1 mL 终止反应, 混匀, 冰浴 5 min, 加饱和 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0.1 mL, 混匀, 放置 5 min 后, $11\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 用 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaOH 溶液定容至 1 mL, 用紫外分光光度计在 400 ~ 500 nm 扫描, 记录吸光度(A)。

min⁻¹ 离心 10 min; 取上清液 1 mL, 加 Nash 试剂 1 mL, 60 ℃ 恒温水浴 10 min, 自来水冷却, 420 nm 处测 A 值; 依据甲醛标准曲线计算酶活性, 以每 1 mg 蛋白每分钟生成甲醛的量表示。计算公式如下:

酶活性 = 甲醛浓度 / 蛋白终浓度 × 反应时间

2.6 统计分析 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异比较采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 姜酚对小鼠肝重、微粒体蛋白含量的影响 肝重: 利福平组与空白组相比有显著性差异 ($P < 0.05$), 而姜酚高、中、低剂量组与空白组比较无显著差异 ($P < 0.05$), 说明 3 种剂量姜酚对小鼠肝重影响不显著。蛋白含量: 利福平诱导后蛋白含量与空白组相比有差异 ($P < 0.05$), 而姜酚高、中、低剂量组与溶媒组相比较无差异。见表 1。

3.2 姜酚对小鼠 CYP450, CYPb₅ 含量的影响

表 2 姜酚对小鼠 CYPb₅ 和 CYP450 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	CYPb ₅ 含量/nmol·mg ⁻¹	CYP450 含量/nmol·mg ⁻¹	CYP450 酶含量变化/%
空白	—	0.15 ± 0.02	0.41 ± 0.06	100.0
溶媒	—	0.15 ± 0.01	0.42 ± 0.05	102.4
姜酚	200	0.25 ± 0.04 ²⁾	0.27 ± 0.04 ²⁾	65.9
	100	0.23 ± 0.02 ²⁾	0.32 ± 0.01 ²⁾	78.0
	50	0.21 ± 0.02 ²⁾	0.34 ± 0.05 ²⁾	82.9
利福平	80	0.21 ± 0.04 ²⁾	0.56 ± 0.08 ²⁾	136.6

3.3 姜酚对小鼠肝脏 CYP2E1 及 CYP3A 活性影响

由甲醛标准曲线可知: 浓度为 2 ~ 80 μmol·L⁻¹ 的甲醛其吸光度与浓度呈良好的线性关系, 线性方程为 $Y = 6.383\ 9X - 0.006\ 5, r = 0.999\ 2$, 据此标准曲线计算 CYP2E1 及 CYP3A 的活性, 见表 3。

表 3 姜酚对小鼠肝脏 CYP2E1 及 CYP3A 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /μg·kg ⁻¹	酶活性/nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹	
		氨基吡啶-N-去甲基酶	红霉素脱甲基酶
空白	—	1.04 ± 0.26	1.66 ± 0.60
溶媒	—	1.11 ± 0.30	1.79 ± 0.59
姜酚	200	0.61 ± 0.29 ¹⁾	0.85 ± 0.19 ¹⁾
	100	0.64 ± 0.59 ¹⁾	1.35 ± 0.16
	50	0.73 ± 0.14 ¹⁾	1.47 ± 0.32
利福平	80	1.46 ± 0.17 ¹⁾	1.70 ± 0.46

4 讨论

联合用药日益普遍, 使药物间的相互作用倍受

表 1 姜酚对小鼠肝重、微粒体蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	肝重/g	蛋白含量/mg·g ⁻¹
空白	—	1.23 ± 0.42	8.73 ± 0.29
溶媒	—	1.20 ± 0.31	8.42 ± 0.28
姜酚	200	1.26 ± 0.28	7.90 ± 0.24
	100	1.23 ± 0.35	7.81 ± 0.24
	50	1.27 ± 0.27	7.65 ± 0.16
利福平	80	1.43 ± 0.42 ¹⁾	9.52 ± 0.07 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

CYP450 的含量: 利福平诱导后 CYP450 含量显著增加 ($P < 0.01$), 而姜酚高、中、低剂量组与空白组相比含量显著降低 ($P < 0.01$), 说明 3 个剂量姜酚均能降低 CYP450 的含量且高剂量降低最多。CYPb₅ 含量: 利福平诱导后 CYPb₅ 含量显著增加 ($P < 0.01$), 而姜酚高、中、低剂量组与空白组相比含量显著升高 ($P < 0.01$), 说明 3 个剂量姜酚均能增加 CYPb₅ 的含量且高剂量增加最多。见表 2。

重视。而生姜是一种广泛应用的药食两用植物, 在生活中使用频度极高。不论生姜是在中药复方中配伍使用, 还是与化学药品同时使用, 都可能会发生药物间相互作用, 影响药物的效应与代谢。肝药酶所催化的 I 相反应是药物在体内代谢的关键一步, 可影响药物的生物利用度, 而药物也能够显著影响药酶的活性, 并引起自身或并用其他药物的药代动力学的改变, 使得药效 (毒性) 增强或减弱, 导致药物-药物相互作用^[7-8]。药物代谢性相互作用中 90% 是由 CYP450 酶系介导^[9], 因此, 药物对肝药酶的作用是目前研究的热点和重点。CYP2E1 和 CYP3A 是 CYP450 酶系中两个非常重要的亚型, 临床上 60% 的药物经由它们代谢。因此本研究选取 CYP2E1 和 CYP3A 作为研究姜酚对小鼠肝药酶活性的影响具有一定的代表性。

在本研究中, 空白组和溶媒组作为阴性对照, 利福平组作为阳性对照。空白组与溶媒组相比均无差

异,说明花生油作为助溶剂可行,对肝药酶无影响,不影响姜酚的测定结果。利福平作为诱导剂,在红霉素脱甲基酶上未表现出诱导作用,可能与相关文献报道^[10]的利福平是人 CYP3A 的强诱导剂,对大鼠和小鼠的 CYP3A 却无明显诱导作用有关。

姜酚对 CYP450 总酶有明显的抑制作用且随着剂量增加抑制增强,而对 CYPb₅ 来说,姜酚能明显升高 CYPb₅ 含量,随着剂量的增加,诱导作用增强,由于 CYPb₅ 能与 CYP450 紧密结合形成 1:1 的蛋白质复合物,诱导后者自旋状态由低到高的改变,并增加其与底物的亲和力,从而增加其代谢活性^[11],提示 CYPb₅ 含量的增加能提高 CYP450 的活性。上述提示姜酚在临床上与其他药物合用尤其在长期大剂量使用时,可能减慢其他药物的代谢、增强药物的作用及延长作用时间。从姜酚对 CYP450 亚型的影响结果来看,3 种剂量的姜酚均能抑制小鼠氨基比林-N-脱甲基酶的活性;高剂量的姜酚能抑制小鼠红霉素脱甲基酶的活性,氨基比林在体内的代谢主要由 CYP2E1 介导,而红霉素则由 CYP3A 介导,因此姜酚在高、中、低剂量时均可抑制 CYP2E1 的活性;高剂量的姜酚抑制 CYP3A 的活性。这预示着在临床上同时使用姜酚和其他由 CYP2E1 和 CYP3A 代谢的药物时,要注意姜酚可能会使这类药物在体内的代谢减少而引起血药浓度升高,从而发生一些不良反应。至于姜酚降低 CYP450 含量及抑制 CYP2E1, CYP3A 活性的作用机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 朱立勤,姜建石. 细胞色素 P450 与药物代谢的研究

现状[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9 (10): 1081.

[2] 蒋苏贞,宓穗卿,王宁生. 姜酚心血管药理作用研究进展[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(1): 219.

[3] 黄雪松,宴日安,吴建中. 姜酚的生物活性述评[J]. 暨南大学学报:自然科学版, 2005, 26 (3): 434.

[4] Jiang S Z, Wang N S, Mi S Q. Plasmapharmacokinetics and tissue distribution of 6-gingerol in rats [J]. Biopharm Drug Dispos, 2008, 29(9): 529.

[5] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. J Biolchem, 1951, 193: 265.

[6] 徐叔云,卞如濂,陈修,等. 药理实验方法学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社, 1994: 167.

[7] 王宇光,高月. 中药十八反药理毒理研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9(3): 60.

[8] 翁小刚,朱晓新,梁日欣,等. 中草药代谢与细胞色素 P450 的关系研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(12): 104.

[9] 朱大岭,韩维娜,张荣. 细胞色素 P450 酶系在药物代谢中的作用[J]. 医药导报, 2004, 23(7): 440.

[10] 翁小刚. 戊己丸提取物不同配伍组方对大鼠 CYP450 酶的影响研究[D]. 北京:中国中医科学院, 2010.

[11] Al Chaer E D, Kawasaki M, Pasricha P J. A new of chronic visceral hypersensitivity in adult rats induced by colon irritation during postnatal development [J]. Gastroenterology, 2000, 119(5): 1276.

[责任编辑 聂淑琴]