

甲基莲心碱对大鼠肝 CYP450 酶含量及 CYP2D1, CYP3A1, CYP2E1 mRNA 的影响

刘萍¹, 黄颖², 胡本容³, 王嘉陵³, 向继洲^{3*}

(1. 湖北中医药大学“中药资源与中药复方”省部共建教育部重点实验室, 武汉 430065;
2. 上海药明康德新药开发有限公司, 上海 201800; 3. 华中科技大学同济医学院
药理学教研室, 武汉 430030)

[摘要] 目的: 探讨甲基莲心碱对大鼠微粒体混悬液蛋白中细胞色素 P450(CYP450) 含量, 及其对 CYP450 亚型 CYP3A1, CYP2D1, CYP2E1 的 mRNA 表达水平的影响。方法: Wistar 大鼠 48 只, 随机分成空白组、肝药酶诱导剂组、肝药酶抑制剂组, 甲基莲心碱(Nef) 低、中、高剂量组。对照组给予 1% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na), 诱导剂组地塞米松 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 抑制剂组酮康唑 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, Nef 低、中、高剂量组分别为 Nef 10, 20, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药, 1 日 1 次, 连续 6 d。取大鼠的肝制备肝微粒体, 测定肝微粒体中的蛋白浓度, 用分光光度计对样品进行比色测定 CYP450 总酶的含量。并采用实时定量反转录——聚合酶链反应(Quantitative real-time RT-PCR) 定量分析了大鼠 CYP450 亚型 CYP3A1, CYP2D1, CYP2E1 的 mRNA 表达水平。结果: 甲基莲心碱在高剂量组的 P450 含量与空白组比较有显著性差异($P < 0.01$), 提示该药在较大剂量时($20 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 对 CYP450 有诱导作用。Nef 在高剂量时, 分别对 CYP3A1 和 CYP2D1 有诱导作用, 可显著升高二者的活性(分别为空白组的 1.92, 2.99 倍, $P < 0.05$); 中剂量时对 CYP2D1 具有诱导作用(为空白组的 2.40 倍, $P < 0.05$); Nef 在 3 个剂量下对 CYP2E1 均无诱导作用。结论: Nef 在 $20, 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量可增加 CYP450 总酶活性和 CYP2D6 mRNA 的表达, 在 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量可增加 CYP3A1 mRNA 的表达, 提示 Nef 在较高剂量时可诱导肝药酶加速自身代谢。

[关键词] 甲基莲心碱; CYP450 酶; 肝微粒体; CYP2D1 mRNA; CYP3A1 mRNA; CYP2E1 mRNA

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0161-04

Effect of Neferine on CYP450 Total Enzyme and CYP3A1, CYP2D1, CYP2E1 mRNA in Rats

LIU Ping¹, HUANG Yin², HU Ben-rong³, WANG Jia-ling³, XIANG Ji-zhou^{3*}

(1. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Resource and Compound Prescription, Hubei University of Chinese Medicine, Ministry of Education, Wuhan 430065, China; 2. WuXi PharmaTech Co., Ltd., Shanghai, 201800, China; 3. Department of Pharmacology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[Abstract] **Objective:** to observe the impact of neferine on contents of CYP450 in rat liver and expression of CYP2D1, CYP3A1, CYP2E1 mRNA. **Method:** neferine was given orally to Wistar rats for 6 days. Liver microsomes were separated with calcium carbonate precipitation and CYP450 enzyme content was measured with ultraviolet spectrophotometry. The expression of CYP2D1, CYP3A1, CYP2E1 mRNA was detected with Real-time quantitative RT-PCR. **Result:** The result of Neferine on CYP450 total enzyme in rats indicated Neferine had inducing effect on drug-metabolizing enzyme at high dose; The expression levels of CYP3A1 and CYP2D1 were both increased significantly

[收稿日期] 20100413(007)

[第一作者] 刘萍, 博士, 助理研究员, 从事中西医结合药理, Tel: 027-63718725, E-mail: lp_wh2008@126.com

[通讯作者] * 向继洲, 博士生导师, 教授, Tel: 027-87541114, E-mail: jizhouxianghb@126.com

in the Neferine $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group compared with the control group ($P < 0.05$); The expression of CYP2D1 was also increased significantly in the Nef $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group ($P < 0.05$); There is no significant differences on expression of CYP2D1 in the all dosing Nef groups and the control group. These results indicated that Nef can raise the expression of CYP2D1 at $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ or $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, and raise the expression of CYP3A1 at $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. It inferred that Nef could accelerate its own metabolism. **Conclusion:** Neferine had effect on inducing CYP450 total enzyme at 20 or $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, and can raise the expression of CYP2D1. Neferine can also raise the expression of CYP3A1 at $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. It inferred that Neferine could accelerate its own metabolism at relative high doses in body.

[Key words] neferine; CYP450 enzyme; liver microsome; CYP2D1 mRNA; CYP3A1 mRNA; CYP2E1 mRNA

甲基莲心碱(neferine, Nef)是莲子心中提取出的一种双苄基异喹啉类生物碱。实验证明其药理作用广泛,如抗心肌缺血、降血压、抗血小板聚集、舒张家兔阴茎海绵体平滑肌、逆转肿瘤细胞的多药耐药等^[1-3],这些研究表明甲基莲心碱具有广阔的应用前景。然而目前有关甲基莲心碱代谢的研究少见报道,笔者前期研究发现,甲基莲心碱可通过 CYP2D1 和 CYP3A1 亚型的代谢酶代谢^[4-6]。因此,本试验以大鼠为研究对象,进一步探讨甲基莲心碱对肝细胞色素 P450 酶活性及对各亚型 mRNA 的影响,研究甲基莲心碱对自身代谢的影响,以期今后的新药开发提供实验依据。

1 材料

1.1 药物与试剂 甲基莲心碱(neferine, Nef)由华中科技大学同济医学院药理系植物化学室提供,纯度 $> 97\%$ 。CMC-Na 购自湖北省医药集团化学试剂分公司,化学纯;水为双蒸水;Trizol 试剂(Invitrogen);Taq DNA 聚合酶、M-MLV 逆转录酶、RNA 酶抑制剂和 dNTP, 10buffer 等均购于深圳晶美公司;CYP2D1 (AB008422), CYP3A1 (L24207), CYP2E1 (AF061442) 和 GAPDH (NM017008) 基因引物均由北京奥科生物技术有限责任公司合成。

1.2 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 200 ~ 240 g 共 48 只,购自华中科技大学同济医学院动物实验中心。

1.3 仪器 美国 ABI7900 荧光定量 PCR 仪;日本 mini 岛津紫外分光光度计;德国 ZK15 台式高速离心机;德国 SARTORIUS 电子分析天平; - 80 °C 低温冰箱: Thermo Forma, USA; 德国 5415D 高速低温离心机。

2 方法

2.1 动物分组与剂量 大鼠按体重随机分为 6 组,每组大鼠 8 只,雌雄各半,对照组: 1% 羧甲基纤维素钠(CMC) $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig; 药酶诱导组: 0.5%

地塞米松(Dex)溶液, $100 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig; 药酶抑制组: 1% 酮康唑(Ket)混悬液, $40 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig; Nef 低剂量组: $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig; Nef 中剂量组: $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig; Nef 高剂量组: $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig。酮康唑和地塞米松均用 1% CMC-Na 配制成混悬液。给药 6 d 后,取大鼠肝脏制备肝微粒体并进行蛋白定量。

2.2 肝匀浆及微粒体的制备 采用 CaCl_2 沉淀法制备肝微粒体悬液。大鼠禁食 24 h 后,断头处死,迅速取出肝脏,称重后置于烧杯中剪碎,按每克肝脏 3 mL 的比例加入蔗糖 - Tris-HCl 缓冲液,用手动玻璃匀浆器在冰上制备匀浆。将肝匀浆转移到离心管中,以 $600 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,上清液以 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃去沉淀部分(线粒体)。量取去处线粒体的上清液的总体积,加入 CaCl_2 溶液,使其终浓度为 $8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,以 $25\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,弃去上清液,沉淀部分即为粉红色,半透明状的微粒体。将微粒体沉淀混悬于 KCl-Tris-HCl 缓冲液中,并用玻璃匀浆器充分混匀,再经 $25\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,其沉淀即为清洗的微粒体。最后将制备所获微粒体混悬于 KCl-Tris-HCl 缓冲液(缓冲液用量为 $1 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 组织)中,分装后放置于 - 80 °C 冰箱中保存。

2.3 细胞色素 P450 含量的测定 将待测样品配制成 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蛋白液置于冰中;取适量连二亚硫酸钠加入到待测样品中混匀;将样品等量加入到比色杯中,充一氧化碳约 30 s(气泡连续,液体不溢出),然后以参照杯作为空白调零,测定样品在 450 nm 和 490 nm 处的吸收度(分别为 A_{450} 和 A_{490})。按以下公式计算 P450 含量

$$\text{P450 含量} / \text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} = [(A_{450} - A_{490}) / (91 \times \text{蛋白浓度} / \text{g} \cdot \text{L}^{-1})] \times 1\,000$$

2.4 荧光定量 PCR 检测 CYP2D1, CYP3A1 mRNA 的表达 将对照组, Nef 低、中、高剂量组动物的肝脏组织在断头处死后迅速摘取, 随后置液氮中速冻和储存。取 100 mg 组织融后置入普通玻璃匀浆器中, 加入 TRIzol, 迅速匀浆, 充分研磨组织。标本量: TRIzol 量 = 10 mg 100 μ L。将匀浆样品转入 Ep 管, 离心(4 $^{\circ}$ C, 12 000 r \cdot min $^{-1}$ \times 10 min)。室温放置 5 min, 将 0.2 体积(200 μ L) 氯仿加入到 Ep 管中, 充分混匀后, 振荡 15 s, 室温沉淀 2 ~ 3 min, 离心(4 $^{\circ}$ C, 12 000 r \cdot min $^{-1}$ \times 15 min)。将上层水相转入另一 Ep 管, 加入 0.5 mL 异丙醇, 数次颠倒混匀后, 室温沉淀 10 min。4 $^{\circ}$ C, 12 000 r \cdot min $^{-1}$, 离心 15 min, 管底可见胶状 RNA 沉淀, 弃上清。加入 1 mL 0.1% DEPC 处理的等体积 75% 乙醇, 颠倒混匀, 离心(4 $^{\circ}$ C, 7 500 r \cdot min $^{-1}$ \times 5 min), 弃上清。7 500 r \cdot min $^{-1}$ 离心 5 s 后, 用微量移液器小心吸尽液体。溶于 20 μ L 0.1% DEPC 水中。分装于排管内备用。

将样品稀释后测定 RNA 的浓度。随后按照 Fermentas 试剂盒进行逆转录反应。- 20 $^{\circ}$ C 冰箱内保存 cDNA, 用排管将其分装保存。参照文献设计引物序列。CYP2D1 引物序列为: 上游引物, 5'-CAA GAA ATC CCT GGA GGA GTG -3', 下游引物, 5'-GAG GGA TGC GAT CAC ATT ACA-3'。CYP3A1 引物序列为: 上游引物, 5'-TCA AGG AGA TGT TCC CTG TCA -3', 下游引物, 5'-CAC TCC AAA TGA TGT GCT GGT -3'。CYP2E1 引物序列为: 上游引物, 5'-TTG CGG ATA TCC TCT TCA ACA-3', 下游引物, 5'-TGG CTT CCA GGT AGG TAT CGT-3'。GAPDH 引物序列为: 上游引物, 5'-ATC AAG AAG GTG GTG AAG CA-3', 下游引物, 5'-AAG GTG GAA GAA TGG GAG TTG-3'。SYBR Green PCR 扩增程序为: 50 $^{\circ}$ C 2 min(UDG 孵育), 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 15 sec, 60 $^{\circ}$ C 60 sec。一共 40 个循环, 最后延伸 95 $^{\circ}$ C 5 min。将 RT 及 PCR 终产物置于 - 20 $^{\circ}$ C 保存。

用 CT 法对荧光定量 RT-PCR 结果进行相对定量分析。CT 值为目的基因 CT 值与管家基因 (GAPDH) CT 值的差值, Δ CT 为各试验组 CT 与选择的对照组 CT 的差值。平均相对含量 = 2 $^{-\Delta$ CT, 为相对于正常空白组 mRNA 的水平。

2.5 统计学分析 所有结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Excel 2003 软件和 SPSS 统计软件包 12.0 进行单因素方差分析 (ANOVA) 和最小显著差法 (LSD) 检验

进行两两比较。

3 结果

3.1 大鼠肝微粒体的 P450 含量 对照组、药酶诱导组、药酶抑制组、Nef 高、中、低剂量组。各组分别为 (0.556 \pm 0.883), (1.210 \pm 0.101), (0.394 \pm 0.040), (0.982 \pm 0.051), (0.673 \pm 0.083), (0.570 \pm 0.064) nmd \cdot mg $^{-1}$ 与对照组肝微粒体中的 CYP450 总酶含量差值相比, 除 Nef 低剂量给药组以外, 均有统计学差异 ($P < 0.01$), 表明 Nef 在高、中剂量给药时对 CYP450 总酶具有诱导作用。此外高剂量组肝微粒体中的 CYP450 总酶含量显著高于中、低剂量组, 但低于诱导剂组 ($P < 0.01$), 表明 Nef 对 CYP450 总酶的诱导呈剂量依赖性。

3.2 Nef 高、中、低剂量组对 CYP450 亚型 mRNA 的影响 见表 1。结果表明, Nef 高剂量组 CYP3A1 和 CYP2D1 的相对 mRNA 含量分别为对照组的 1.92 和 2.99 倍, 其差异具显著性意义 ($P < 0.05$); Nef 中剂量组 CYP2D1 的相对 mRNA 含量为对照组的 2.40 倍, 其差异具显著性意义 ($P < 0.05$); Nef 低剂量组 CYP3A1, CYP2D1, CYP2E1 的相对 mRNA 含量与空白组比较, 差异无显著性意义; Nef 高、中、低剂量组 CYP2E1 的相对 mRNA 含量与空白组比较, 差异无显著性意义。以上结果说明, Nef 在高剂量时, 分别对 CYP3A1 和 CYP2D1 有诱导作用, 在中剂量时对 CYP2D1 具有诱导作用, 而对 CYP2E1 在 3 个剂量下均无诱导作用。这一结果与体外实验证明 Nef 在大鼠肝微粒体中代谢主要经 CYP3A1 和 CYP2D1 2 个亚酶催化相符, 与诱导 CYP450 总酶活性的结果相符, 进一步证实了在药代动力学实验中“Nef 在较高剂量时可能诱导了自身代谢”的推论。

表 1 甲基莲心碱对大鼠肝微粒体 CYP450 亚型 mRNA 的影响 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	CYP3A1 mRNA	CYP2D1 mRNA	CYP2E1 mRNA
空白对照	1.00 \pm 0.35	1.00 \pm 0.15	1.00 \pm 0.26
Nef 低剂量	1.43 \pm 0.35	1.73 \pm 0.41	0.90 \pm 0.12
Nef 中剂量	1.70 \pm 0.79	2.40 \pm 0.48 ¹⁾	1.08 \pm 0.28
Nef 高剂量	1.92 \pm 0.46 ¹⁾	2.99 \pm 0.96 ¹⁾	1.13 \pm 0.28

注: 与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

药理研究已表明 Nef 在治疗高血压和心律失常方面具有较好应用前景, 而在心血管疾病中, 各种原因引起的心律失常是导致死亡的重要原因。研制和开发新的抗心律失常药物已成为各国医药工作者

为之努力的目标。Nef 有望成为一种有效的新型抗心律失常的药物。因此,进行此类生物碱在动物体内的药物动力学和生物药剂学研究对于认识药物在机体的转化和代谢规律有一定的指导意义,同时有助于同类药物代谢特点和药效关系的比较,以期为此类药物的结构-效应关系的阐明提供一些研究基础^[7-8]。

细胞色素 P450(CYP450) 是体内内源性和外源性化学物质代谢的主要酶系,迄今发现约有 26 个亚族。现已发现 CYP2D6 参与了临床近百种重要药物的代谢,而且对药物的代谢呈现出明显的个体差异和种族差异^[9-12]。CYP3A 亚族因其在肝脏和小肠丰富的含量及对临床药物广泛的代谢作用而成为 CYP 家族中最重要的亚族成员^[13]。CYP3A 在成人肝脏和小肠分别占 CYP 总量的 30% 和 70% 以上,参与 50% ~60% 临床常用药物的氧化代谢。CYP2E1 在药物和人们经常接触的溶剂与环境污染物的代谢中具有重要作用,CYP2E1 不仅参与药物的代谢,而且还能催化许多前致癌物 (procarcinogen) 和前毒物 (protoxin) 的活化过程;因其活性存在明显的个体差异,故对不同个体的药物治疗作用和不良反应以及化学物质的毒性产生重要影响。迄今发现所有 CYP2E1 的底物在人和动物中都是相同的,因此研究动物的 CYP2E1 对人具有重要参考意义^[14]。

本研究采用差示光谱法测定微粒体混悬液蛋白中细胞色素 P450 含量。结果表明甲基莲心碱在高剂量组 (50 mg·kg⁻¹) 的 P450 含量与空白组比较有显著差异 ($P < 0.01$),提示该药在较高剂量时 (20 ~ 50 mg·kg⁻¹) 可增加 CYP450 总酶活性,对 CYP450 有一定的诱导作用。随后,笔者采用实时定量反转录-聚合酶链反应 (quantitative real-time RT-PCR) 定量分析了大鼠 CYP450 亚型 CYP3A1, CYP2D1, CYP2E1 的 mRNA 表达水平。结果表明, Nef 在高剂量时,可增加 CYP3A1 和 CYP2D1 mRNA 的表达,分别为对照组的 1.92, 2.99 倍, ($P < 0.05$); 中剂量时可增加 CYP2D1 mRNA 的表达,为对照组的 2.40 倍, ($P < 0.05$); Nef 在 3 个剂量下对 CYP2E1 均无诱导作用。因此提示甲基莲心碱在较高剂量 (20 ~ 50 mg·kg⁻¹) 时可诱导肝药酶加速自身代谢, CYP3A1 及 CYP2D1 为参与介导甲基莲心碱在大鼠体内生物转化的 CYP450 亚酶。

[参考文献]

[1] Li G R, Li X G, Lu F H. Effects of neferine on

transmembrane potential in rabbit sinoatrial nodes and clusters of cultured myocardial cells from neonatal rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 1989, 10: 328.

- [2] Hu W S, Guo L J, Feng X L, et al. Hypotensive effects of neferine [J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 1990, 4: 107.
- [3] Yu J, Hu W S. Effects of neferine on blood pressure, platelet aggregation and thrombus formation in rats [J]. Chin Pharmacol Bull, 1996, 12: 533.
- [4] Huang Y, Ban Y, Hu B R, et al. Plasma concentration and tissue distribution of total alkaloids of lianzixin after intragastric and intravenous administration in rats [J]. J Huazhong Univ Sci Technol, 2006, 35: 23.
- [5] 黄颖, 王嘉陵, 向继洲, 等. 甲基莲心碱在大鼠肝脏中的代谢产物及其途径 [J]. 药学学报, 2007, 42(10): 1034.
- [6] Huang Ying, Bai Yun, Zhao Libo, et al. Pharmacokinetics and Metabolism of neferine [J]. Biopharm & Drug Dispos, 2007, 28: 1.
- [7] 张洪, 宋娟, 谭晔, 等. 枳椇子乙酸乙酯提取物对大鼠肝微粒体细胞色素 P450 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(3): 37.
- [8] 肖成荣, 王宇光, 代方国, 等. 甘草、芫花合用对大鼠肝脏细胞色素 P450 酶的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(12): 48.
- [9] Schilter B, Omiecinski C J. Regional distribution and expression modulation of cytochrome P-450 and epoxide hydrolase mRNAs in the rat brain [J]. Mol Pharmacol, 1993, 44: 990.
- [10] Kazuyoshi Y, Kaoru K, Mihoko T. Identification of human cytochrome P450 isoforms involved in the 7-hydroxylation of chlorpromazine by human liver microsomes [J]. Life Sci, 2000, 67: 175.
- [11] 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.
- [12] 高晓新, 梁爱华, 郑素勤. 中草药对细胞色素 P450 酶系影响的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(9): 64.
- [13] Hoen P A, Commandeur J N, Vermeulen N P, et al. Selective induction of cytochrome P450 3A1 by dexamethasone in cultured rat hepatocytes: analysis with a novel reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay section sign [J]. Biochem Pharmacol, 2000, 60: 1509.
- [14] 石杰, 王本坚, 杨旭. 体内代谢法研究新药对细胞色素 P450 1A2 和 2E1 的影响 [J]. 肝脏, 2008, 13(5): 387.

[责任编辑 邹晓翠]